

## Penyimpanan Haloalkana Dehalogenase: Pengaruh Konsentrasi Terhadap Stabilitas dan Aktivitas Enzim

Khomaini Hasan

Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Achmad Yani, Jalan Terusan Jendral Sudirman, Cimahi, Jawa Barat, 40285

\*Penulis korespondensi: [k.hasan@lecture.unjani.ac.id](mailto:k.hasan@lecture.unjani.ac.id)

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v5.n3.16059>

**Abstrak:** Karena kebutuhan penyimpanan protein rekombinan dalam waktu yang sangat lama, berbagai macam kondisi penyimpanan telah disarankan dalam berbagai publikasi guna mempertahankan integritas struktur dan/atau aktivitas enzim asalnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh konsentrasi protein terhadap kestabilan penyimpanan dari haloalkana dehalogenase murni. Haloalkana dehalogenase rekombinan dimurnikan dengan dua langkah pemurnian, yaitu kromatografi penukar ion dan afinitas. Dua kondisi konsentrasi enzim diobservasi selama 4 minggu. Aktivitas enzim diuji tiap minggu yang merefleksikan kestabilan dari enzim. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi enzim 0.5 mg/mL, dibandingkan dengan konsentrasi 2 mg/mL, lebih mudah mengalami inaktivasi dan kehilangan aktivitas. Peningkatan aktivitas dan stabilitas enzim bentuk konsentrat selama penyimpanan mungkin dipengaruhi oleh oligomerisasi protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi tinggi dari haloalkana dehalogenase direkomendasikan untuk proses penyimpanan enzim dalam waktu yang lama.

**Kata kunci:** haloalkana dehalogenase, stabilitas penyimpanan, stabilitas protein

**Abstract:** *Since the recombinant proteins often need to be stored for an extended period of time, various treatments have been proposed in many papers for retaining their original structural integrity and/or activity. The objective of this research was to study the effect of protein concentration towards storage stability of purified haloalkane dehalogenase. Recombinant haloalkane dehalogenase was purified by using two step purification i.e. ion exchange and affinity chromatographies. Two different concentration of enzyme were observed for four weeks. The activity of the enzyme was determined every week which reflected the stability of the enzyme. The result demonstrated that concentration of 0.5 mg/mL of haloalkane dehalogenase was more prone to inactivation and loss activity compared to 2 mg/mL. Tremendous increased on enzyme activity and stability by concentrated form during storage could be connected to oligomerization. Taken together, high concentration of haloalkane dehalogenase is recommended during long term enzyme storage.*

**Keywords:** *haloalkane dehalogenase, storage stability, protein stability*

### PENDAHULUAN

Protein adalah biomolekul yang kestabilannya cukup marginal sehingga sangat mudah mengalami denaturasi oleh berbagai tekanan yang terjadi dalam larutan molekul air yang mengelilingi protein molekul, atau dalam dalam keadaan beku atau kering. Karena protein selalu butuh untuk disimpan dalam waktu yang cukup lama, banyak metode penyimpanan yang direkomendasikan untuk diaplikasikan. Metode yang paling sering digunakan adalah penyimpanan protein pada suhu 4°C dalam tabung atau alat gelas yang bersih dan steril. Penyimpanan pada suhu kamar sering menyebabkan degradasi protein dan/atau hilangnya aktivitas sebagai akibat pertumbuhan mikroba dan aktivitas enzim protease. Untuk penyimpanan dalam waktu singkat (1-7 hari), protein dapat disimpan dalam larutan buffer biasa, pada suhu 4°C, tetapi untuk penyimpanan pada waktu lama (seperti 1 bulan atau 1 tahun, penambahan perlakuan atau zat tertentu

sangat dibutuhkan untuk menjaga stabilitas dan aktivitas protein atau enzim (Arakawa *et al.* 1993).

Haloalkana dehalogenase (HLD, EC. 3.8.1.5) adalah enzim yang mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan karbon-halogen dari senyawa-senyawa yang terhalogenasi. Produk hasil hidrolisis HLD adalah berupa alkohol dan proton. Enzim ini memiliki spesifitas substrat terhalogenasi yang sangat beragam, antara lain alkana, sikloalkana, alkena, eter, alkohol, keton atau siklik diena (O'Hagan & Schmidberger, 2010; Streltsov *et al.* 2003). Oleh karena itu, HLD memiliki potensi aplikasi pada berbagai macam industri biokatalis, biosensor atau bioremediasi (Prokop *et al.* 2003). Untuk menunjang efektifitas dan efisiensi dalam rangka aplikasi HLD pada industri, maka dituntut karakteristik HLD dengan aktivitas dan stabilitas enzim yang baik selama proses aplikasi dan terutama pada proses penyimpanannya.

Pada penelitian ini, kami mempelajari pengaruh konsentrasi terhadap stabilitas penyimpanan salah satu HLD, yaitu DatA yang merupakan rekombinan yang di produksi dari *Escherichia coli* yang gen nya diisolasi dari *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Hasan *et al.* 2011).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan kimia

Media Luria Bertani (LB) untuk fermentasi, 1,3-dibromo propana untuk uji aktivitas enzim, IPTG untuk induksi protein rekombinan, Tris, HCl,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , NaCl, dan imidazol untuk larutan buffer dibeli dari Sigma Aldrich. St. Louis, Mo, USA. Coomassie Brilliant Blue R250 dari Merck, Darmstadt, Jerman. Bahan kimia yang digunakan memiliki derajat pro-analisis. Matriks Q-sepharose dan HiTrap<sup>TM</sup> untuk pemurnian DatA dibeli dari Amersham Biosciences, Freiburg, Jerman.

### Ekspresi dan Pemurnian

Ekspresi dan pemurnian DatA yang mengandung HisTag mengikuti metode yang telah dilaporkan oleh Hasan *et al.* (2011). Secara singkat: DatA diproduksi secara rekombinan dengan menggunakan *E. coli* BL21(DE3)ArcticExpress sebagai inang. Proses fermentasi menggunakan LB media 1 L pada suhu 37°C. Ekspresi DatA diinisiasi dengan penambahan IPTG 0.1 M, ketika densitas optik bakteri pada panjang gelombang 600 nm mencapai 0.5. Pemurnian DatA dilakukan melalui dua langkah, pertama dengan menggunakan kromatografi penukar anion Q-sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg Jerman) dengan menggunakan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 9. DatA yang terikat dielusi dengan buffer Tris-HCl 20 mM, pH 9 yang mengandung 500 mM NaCl. Fraksi aktif DatA dikumpulkan. Selanjutnya pemurnian DatA dilanjutkan dengan kromatografi afinitas kolom khelat HiTrap<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Freiburg, Jerman) dengan menggunakan buffer A (buffer fosfat 20 mM, pH 7,5, yang mengandung NaCl 500 mM dan imidazol 10 mM). Elusi DatA menggunakan buffer B (buffer fosfat 20 mM, pH 7,5, yang mengandung NaCl 500 mM dan imidazol 500 mM).

### SDS-PAGE

Kemurnian DatA di analisis dengan SDS PAGE (Laemmli 1971). Pita-pita protein divisualisasi menggunakan Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck) (Blakesley & Boezi 1977). Konsentrasi DatA ditentukan dengan metode yang dikembangkan oleh Bradford (Bradford 1976).

### Pengujian aktivitas DatA

Aktivitas HLD dari DatA ditentukan dengan substrat 1,3-dibromo propana (Sigma-Aldrich) menggunakan metode yang dikembangkan oleh Iwasaki (Iwasaki *et al.* 1952). Produk hidrolisis berupa ion halida ditentukan secara spektrofometri pada panjang gelombang 460 nm (Spektrofotometer

Sunrise, Tecan, Männedorf, Swiss) dengan menggunakan larutan Hg-tiosianat dan Fe-amonium sulfat.

### Uji penyimpanan DatA

Pengaruh konsentrasi enzim terhadap stabilitas penyimpanan DatA menggunakan sampel DatA yang telah dimurnikan dengan menggunakan 2 konsentrasi, yaitu 0,5 dan 2 mg/mL yang didialisis dengan buffer fosfat, 50 mM pH 7,5, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C pada tabung Falcon yang steril. Penyimpanan dilakukan selama 4 minggu, setiap minggu sampel DatA dari kedua kondisi diambil secara aseptik, dan aktivitas HLD dari DatA diuji.

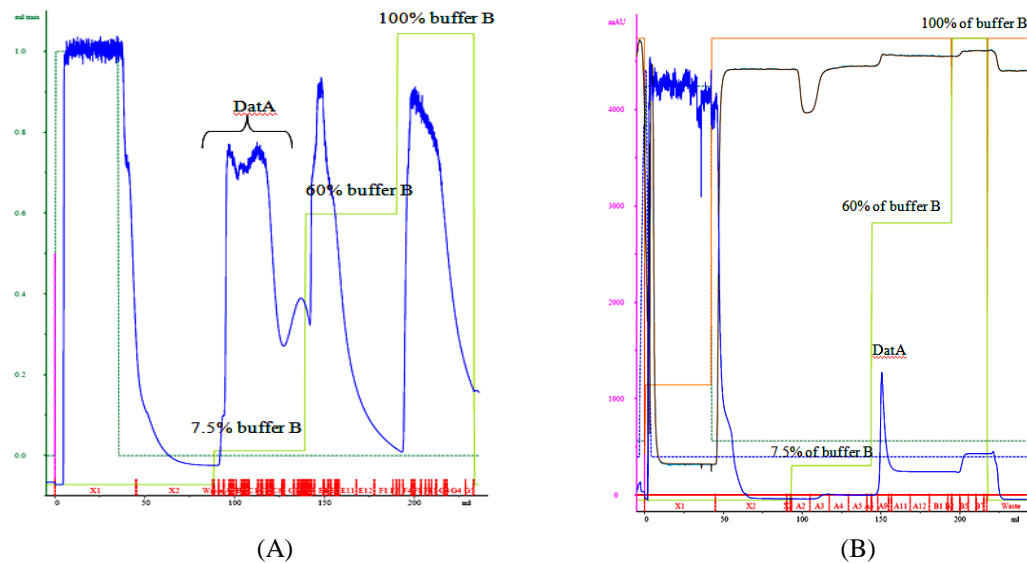
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak kasar dari DatA yang dihasilkan dari 1 L kultur selanjutnya dimurnikan dengan 2 langkah pemurnian, kromatografi penukar anion dan afinitas, dan profil hasil kedua kromatografi ditunjukkan pada Gambar 1. Profil kromatografi penukar anion menunjukkan DatA, yang dideteksi aktivitasnya secara kualitatif dan SDS PAGE (Gambar 2A), terikat pada matriks dan dapat dielusi dengan 7,5% buffer fosfat yang mengandung 500 mM NaCl (Gambar 1A). Selanjutnya puncak yang mengandung DatA dikumpulkan dan pemurnian dilanjutkan dengan kromatografi afinitas. Fraksi dari kromatografi afinitas menunjukkan satu puncak DatA yang tajam, pada konsentrasi 60% pengelusi buffer B (Gambar 1B).

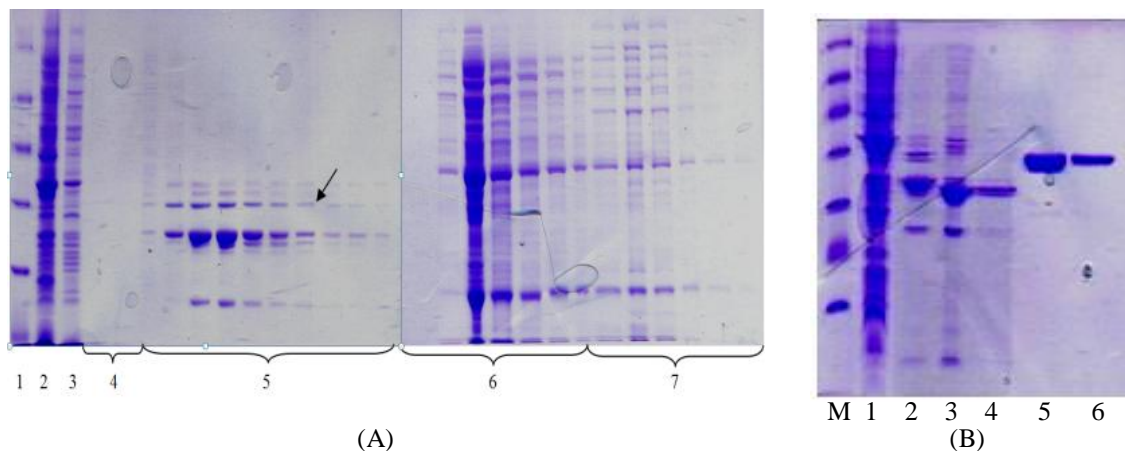
Hasil menunjukkan bahwa DatA, berbobot molekul 35 kDa, berhasil diekspresikan dan dimurnikan (tanda panah, Gambar 2) dengan konsentrasi ~20 mg/L. Tingkat kemurnian ditunjukkan pada gel SDS-PAGE (Gambar 2B). Pita tunggal DatA yang dihasilkan menunjukkan tingkat kemurnian dari DatA yang tinggi, dan dapat digunakan untuk penentuan stabilitas penyimpanan enzim. Hasil dan tingkat kemurnian yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan hasil sebelumnya (Hasan *et al.* 2011).

Pengaruh konsentrasi enzim terhadap stabilitas DatA setelah penyimpanan ditunjukkan pada Gambar 3. Aktivitas spesifik kedua sampel diawal relatif sama. Setelah satu minggu penyimpanan, aktivitas spesifik DatA dari kedua kondisi penyimpanan relatif menurun sebanyak 30-40% dari aktivitas awalnya. Pada minggu kedua sampai minggu keempat penyimpanan, aktivitas DatA dipertahankan ketika disimpan pada konsentrasi rendah relatif stabil, yaitu antara 50-60% terhadap aktivitas awal dari DatA.

Hal yang menarik justru terjadi pada DatA yang disimpan pada konsentrasi 2 mg/mL. Peningkatan signifikan aktivitas spesifik DatA dibandingkan keadaan awal terjadi. Peningkatan 125% aktivitas relatif terhadap keadaan awal terjadi setelah disimpan selama 2 minggu. Aktivitas relatif diatas 100% tetap dipertahankan sampai minggu keempat penyimpanan.



**Gambar 1.** (A) Profil kromatografi penukar ion matriks Q-sepharose dan (B) afinitas kolom pengkhelat kolom HiTrapTM. Protein ditunjukkan dengan garis biru. Konsentrasi buffer pengelusi ditunjukkan dengan warna hijau muda. Kecepatan alir elusi pada kedua kromatografi adalah 1 mL/menit.

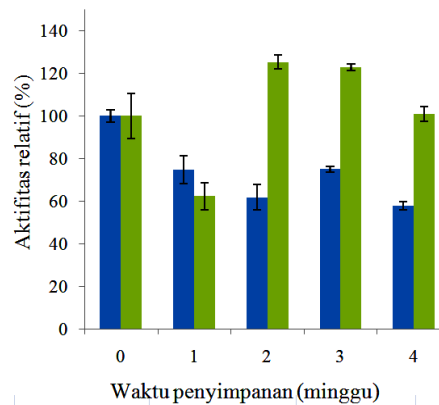


**Gambar 2.** SDS-PAGE hasil pemurnian DatA yang diekspresikan pada *Escherichia coli* BL21(DE) ArcticExpress. (A) Seluruh fraksi yang diperoleh dari kromatografi penukar anion matriks Q-sepharose. (1) standar massa molekul, (2) ekstrak kasar, (3) fraksi yang tidak terikat, (4) fraksi pencucian, (5) elusi 7,5 % buffer pengelusi, (6) 60% buffer pengelusi dan (7) 100% buffer pengelusi. (B) Hasil gabungan dari dua tahap pemurnian. (M) standar massa molekul, (1) ekstrak kasar, (2) sampel DatA hasil kromatografi penukar anion Q-sepharose, (3) sampel *flow-through* kromatografi afinitas, (4) sampel protein pengotor, (5) DatA hasil pemurnian dengan kromatografi afinitas (6) Standar DatA. Tanda panah menunjukkan fraksi DatA.

Data pada penyimpanan DatA pada konsentrasi 0,5 mg/mL dan 2 mg/mL ini menunjukkan interaksi molekul protein dengan larutan buffer memiliki sifat dipengaruhi oleh konsentrasi protein. Interaksi molekul air yang tinggi pada sampel larutan buffer dengan molekul DatA 0,5 mg/mL terhadap perjalanan waktu cenderung mendorong instabilitas struktur yang direfleksikan dengan menurunnya aktivitas DatA. Walaupun demikian, dalam penelitian ini, instabilitas struktur belum dapat disimpulkan apakah berasal dari perubahan struktur sekunder, tersier maupun kuartener, Karena banyak interaksi yang terlibat dalam membentuk struktur protein, termasuk diantaranya elektrostatis, hidrofobik, dan

interaksi protein dengan larutan. Namun, banyaknya interaksi asam amino pada permukaan DatA dengan air menjadi salah satu faktor yang dapat memicu menurunnya stabilitas DatA.

Sebaliknya, kecenderungan meningkatnya aktivitas DatA dengan konsentrasi 2 mg/mL selama penyimpanan sangat mungkin terjadi akibat perubahan struktur kuartener dari DatA. Dinamika struktur kuartener ini dilaporkan pada penelitian sebelumnya bahwa struktur natif dari DatA yang dimer sangatlah tergantung pada keberadaan konsentrasi garam NaCl pada larutan (Hasan *et al.* 2011). Informasi dari struktur kuartener DatA yang tergantung pada konsentrasi garam menjadi dasar dan



**Gambar 3.** Pengaruh konsentrasi DatA stabilitas setelah penyimpanan. Aktivitas spesifik HLD awal (0) dari DatA dengan konsentrasi 0.5 mg/mL (biru) adalah  $0.0236 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Sementara aktivitas spesifik dengan konsentrasi 2 mg/mL (hijau) adalah  $0.0206 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Pengujian aktivitas spesifik dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

pendukung dalam mendapatkan struktur kristal DatA (Guan *et al.* 2014). Apabila dibandingkan dengan kondisi penyimpanan DatA pada 0,5 mg/mL, maka peningkatan konsentrasi 4 kali dapat menurunkan tekanan interaksi protein dan larutan yang menjadi pemicu instabilitas dari protein. Sehingga secara termodinamika, kestabilan molekul protein konsentrasi tinggi dalam larutan lebih baik dibandingkan pada konsentrasi rendah (Arakawa *et al.* 1993).

#### KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa konsentrasi rendah DatA cenderung berpotensi pada proses terjadinya inaktivasi dan kehilangan aktivitasnya dibandingkan DatA yang disimpan pada konsentrasi tinggi. Peningkatan aktivitas relatif mungkin berhubungan dengan proses oligomerisasi yang lazim terjadi pada protein pada konsentrasi tinggi. Penurunan interaksi molekul protein dengan air mungkin menjadi pemicu terjadinya oligomerisasi ini dan meningkatkan stabilitas struktur protein secara keseluruhan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Jiri Damborsky dari Masaryk University, Republik Ceko yang memberikan keluasaan dalam melakukan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C. & Carpenter, J.F., 1993. Factors Affecting Short-Term and Long-Term Stabilities of Proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 10(1): 1-28.  
Blakesley, R.W. & Boezi, J.A. (1977). A New Staining Technique for Proteins in Polyacrylamide Gels Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*. 82(2): 580-582.  
Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram

Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254.

Guan, L., Yabuki, H., Okai, M., Ohtsuka, J. & Tanokura, M. (2014). Crystal Structure of the Novel Haloalkane Dehalogenase DatA from *Agrobacterium tumefaciens* C58 Reveals a Special Halide-Stabilizing Pair and Enantioselectivity Mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(20): 8573-8582.

Hasan, K., Fortova, A., Koudelakova, T., Chaloupkova, R., Ishitsuka, M., Nagata, Y., Damborsky, J. & Prokop, Z. (2011). Biochemical Characteristics of the Novel Haloalkane Dehalogenase DatA, Isolated from the Plant Pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(5): 1881-1884.

Iwasaki, I., Utsumi, S. & Ozawa, T. (1952). New Colorimetric Determination of Chloride Using Mercuric Thiocyanate and Ferric Ion. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 25(3): 226-226.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.

O'Hagan, D. & Schmidberger, J.W. (2010). Enzymes that Catalyze SN 2 Reaction Mechanisms. *Natural Product Reports*. 27(6): 900-918.

Prokop, Z., Monincová, M., Chaloupková, R., Klvaňna, M., Nagata, Y., Janssen, D.B. & Damborský, J. (2003). Catalytic mechanism of the Haloalkane Dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Journal of Biological Chemistry*. 278(46): 45094-45100.

Streltsov, V.A., Prokop, Z., Damborský, J., Nagata, Y., Oakley, A. & Wilce, M.C. (2003). Haloalkane Dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: X-ray Crystallographic Studies of Dehalogenation of Brominated Substrates. *Biochemistry*. 42(34): 10104-10112.