

ABSTRAK

Kloning Gen Penyandi Enzim 1,3-B-Glukanase Melalui Pendekatan Pustaka Metagenomik cDNA dari *Digestive Gland Achatina Fulica* sebagai Kandidat Antibiofilm *Candida*

Maris Kurniawati, Afaf Baktir, Purkan

Enzim 1,3- β -glukanase diperlukan untuk memenuhi berbagai kebutuhan, antara lain memproses biomassa menjadi bioenergi, industri pakan ternak, industri pulp dan kertas dan industri detergen serta pemanfaatan di bidang kesehatan sebagai anti-biofilm *Candida* pada kondisi kandidiasis. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkonstruksi pustaka metagenomik cDNA dari *digestive gland A. fulica*, melakukan penapisan suatu gen penyandi 1,3- β -glukanase novel menggunakan substrat laminarin, menganalisis karakteristik enzim 1,3- β -glukanase rekombinan yang diperoleh, serta memprediksikan struktur tersier dan spesifitasnya berdasarkan analisis *in silico*. Metode penelitian ini meliputi tahapan antara lain: 1) Isolasi RNA total. 2) Sintesis cDNA menggunakan LD (*long distance*) PCR. 3) Konstruksi Pustaka cDNA. 4) Identifikasi Pustaka Teramplifikasi. 5) Penapisan *E. coli* rekombinan berdasarkan aktivitas 1,3- β -glukanase. 6) Penentuan sensitivitas protein secara *in silico*. Pustaka cDNA dengan efisiensi tinggi telah berhasil dikonstruksi dari sistem *digestive Achatina fulica*, yaitu menunjukkan nilai titer = $1,1 \times 10^{10}$ Pfu/mL. Sejumlah 1 μ L dari suspensi pustaka cDNA yang diencerkan 10^6 kali menghasilkan 17 klon positif terhadap substrat laminarin. Hasil penapisan pustaka ekspresi metagenomik diperoleh satu gen novel endo-1,3- β -glukanase *mkafGlu1* dari sistem *digestive Achatina fulica*. Sekuen nukleotida *mkafGlu1* telah terdaftar pada GeneBank NCBI dengan kode akses No. MH206587. Hasil pensejajaran menunjukkan *mkafGlu1* merupakan representasi baru dari anggota famili Glikosida Hidrolase 16 (GH16) dengan EC 3.2.1.39. Gen *mkafGlu1* tersusun atas 717 bp, yang urutannya menunjukkan homologi tertinggi dengan β -glukanase dari *Holiotis discus hannai*, sebesar 45%. Urutan asam amino deduksi menunjukkan urutan sejumlah 239 AA, sesuai dengan data berat molekul yang ditentukan menggunakan SDS-PAGE dan zymogram adalah 26,61 kDa. MKAFGlu1 bekerja dengan suhu optimum 40°C dan dua puncak pH adalah pH 7 dan pH 3, dengan aktivitas 1,07 U/ml. Enzim MKAFGlu1 memiliki keunikan karakteristik asidofilik dan alkalofilik glukanase. Enzim MKAFGlu1 merupakan 1,3-1,6- β -glukanase yang dapat memotong 1,3- β - dan 1,6- β - ikatan glikosidik. Sedangkan hasil *in silico* menunjukkan bahwa *mkafGlu1* memiliki spesifisitas tertinggi terhadap laminarin (substrat 1,3-1,6- β -glukanase), dibandingkan dengan substrat barley- β -glukan dan CMC. Hal ini mendukung kesimpulan bahwa *mkafGlu1* termasuk representasi baru dari GH16. Hasil *in silico* juga menunjukkan bahwa enzim MKAFGlu1 bekerja berdasarkan mekanisme retensi dalam reaksinya terhadap substrat.

Kata kunci: 1,3- β -Glukanase, Metagenomik, *Digestive Gland*, *Achatina fulica*