

BIOTEKNOLOGI

**LAPORAN HASIL
HIBAH PENELITIAN TIM PASCASARJANA
(HIBAH PASCA)**



**PENINGKATAN AKTIVITAS ENZIM HEMISELULASE DENGAN
REKAYASA PROTEIN UNTUK PENGOLAHAN BIOMASSA BERBASIS
LIGNOSELULOSA**

**Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
Prof. Dr. Eddy Bagus W., M.S., Sp.MK.
A.A. Istri Ratnadewi
Anita Kurniati
Laura Navika Yamani**

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian kepada Masyarakat Mono Tahun, dan Pengabdian kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2011 Nomor : 844/H3/KR/2011, Tanggal 20 April 2011

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2011**

KK
KKC
LP.19/12
PUS
P

BIOTEKNOLOGI

**LAPORAN HASIL
HIBAH PENELITIAN TIM PASCASARJANA
(HIBAH PASCA)**



**PENINGKATAN AKTIVITAS ENZIM HEMISELULASE DENGAN
REKAYASA PROTEIN UNTUK PENGOLAHAN BIOMASSA BERBASIS
LIGNOSELULOSA**

**Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
Prof. Dr. Eddy Bagus W., M.S., Sp.MK.
A.A. Istri Ratnadewi
Anita Kurniati
Laura Navika Yamani**

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian kepada Masyarakat Mono Tahun, dan Pengabdian kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2011 Nomor : 844/H3/KR/2011, Tanggal 20 April 2011

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2011**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Peningkatan Aktivitas Enzim Hemiselulase dengan Rekayasa Protein untuk Pengolahan Biomassa Berbasis Lignoselulosa
2. Peneliti Utama
- a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 19630615 1987001 2001
 - d. Jabatan Fungsional : Guru Besar pada bidang Biokimia
 - e. Jabatan Struktural : Direktur Pendidikan
 - f. Bidang Keahlian : Biokimia
 - g. Fakultas/Jurusan : Fakultas Sains dan Teknologi / Kimia
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

NO.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. Eddy Bagus W., M.S., Sp.MK.	Mikrobiologi	Fakultas Kedokteran/ Mikrobiologi	Universitas Airlangga
2.	A.A. Istri Ratnadewi	Biokimia	Fakultas MIPA/ Kimia (Mahasiswa Doktor)	Universitas Jember
3.	Anita Kurniati	Biokimia	Mahasiswa Magister pada Program Studi Kimia	Universitas Airlangga
4.	Lannya Navika Yamani	Biokimia	Mahasiswa Magister pada Program Studi Kimia	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 Tahun
 - b. Biaya yang diusulkan untuk 3 tahun : Rp. 265.000.000,-
 - b. Biaya yang disetujui tahun ke 1 : Rp. 60.000.000,-



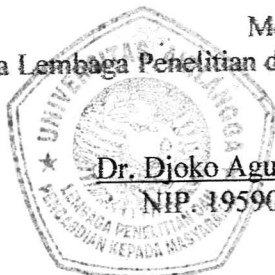
Mengetahui
Plh. Dekan

Dr. Nani Siti Aminah, M.Si.
NIP. 19630615 1987001 2001

Surabaya, 9 Nopember 2011
Ketua Peneliti,

Prof. Dr Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi
NIP. 19630615 1987001 2001

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt.,MSi.
NIP. 195908051987011001

RINGKASAN

Penelitian yang telah dilakukan dan dikembangkan oleh Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim selama 8 tahun terakhir telah berhasil mengisolasi, mengkarakterisasi enzim-enzim xilanolitik termofilik dari isolat lokal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dan *Bacillus subtilis* PC-01 serta telah pula berhasil mengklon gen-gen penyandi enzim xilanolitik termofilik tersebut ke dalam *Escherichia coli*. Kemampuan enzim-enzim xilanolitik rekombinan tersebut dalam mendegradasi limbah pertanian kaya hemiselulosa xilan telah pula dilakukan. Hasil menunjukkan tingginya produk xilo-oligosakarida selain dihasilkan pula monosakarida xilosa dan arabinosa. Hasil penelitian Hibah Pasca (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2007-2008) telah berhasil mensekresikan enzim xilanolitik rekombinan tersebut ke dalam sel inang komersial *Bacillus megaterium* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu, uji aktivitasnya sebagai anti-bakteri juga telah pula menunjukkan adanya sinergi fungsi anti-bakteri dan prebiotik akan sangat bermanfaat dalam pengembangan industri pangan. Penelitian Hibah Pascasarjana tersebut telah pula meluluskan 2 orang Doktor dan 3 orang Magister. Aplikasi produk enzim hemiselulase tunggal maupun konsorsium telah pula dikembangkan dan saat ini dalam proses perolehan patent dengan merk *Excelzyme*. Untuk lebih meningkatkan aktivitas dan daya saing komersial di masa yang akan datang, maka pada penelitian ini akan dilakukan pendekatan proteomik untuk meningkatkan aktivitas hemiselulase yang telah berhasil dikembangkan dalam produk *Excelzyme*. Rekayasa protein dalam sistem proteomik tersebut terdiri dari *site directed mutagenesis*, *direct evolution*, analisis SEM terhadap kerja enzim terhadap substrat limbah pertanian terpilih serta *over-ekspressi* nya. Peningkatan produksi enzim-enzim rekombinan secara mandiri tersebut diharapkan akan mampu meningkatkan ekonomi bangsa.

Pada tahun pertama pelaksanaan penelitian Hibah Pascasarjana ini telah berhasil mendapatkan enzim exo-xilanase rekombinan dalam sistem pET-30 dan akan dilanjutkan pemurnian dan karakterisasinya pada penelitian tahun kedua. Selain itu telah pula berhasil disekresikannya enzim α -L-arabinofuranosidase dalam sistem M5 plasmid di *E. coli* BL21 (DE3). Enzim xilosidase varian telah pula berhasil dihasilkan melalui *site directed mutagenesis* pada D121V, D121N, D121E. Ketiga varian tersebut akan di analisis struktur dan fungsinya pada tahun kedua, demikian pula kristalisasi protein varian dan akan dibandingkan dengan enzim wild typenya. Analisis SEM dan XRD dilakukan terhadap jerami padi dan enceng gondok yang telah diperlakukan dengan α -L-arabinofuranosidase rekombinan, jerami padi dan enceng gondok yang tidak diperlakukan dengan α -L-arabinofuranosidase rekombinan digunakan sebagai kontrol. Hasil analisis SEM dan XRD menunjukkan terjadi perubahan struktur permukaan jerami padi dan enceng gondok setelah diperlakukan dengan α -L-arabinofuranosidase rekombinan serta terjadi perubahan kristalinitas enceng gondok.

ABSTRACT

Scanning Electron Microscope and X-ray Diffraction Analysis of Surface Structure Modification and Crystallinity of Rice Straw and Water Hyacinth after recombinant α -L-arabinofuranosidase treatment

The purpose of this research were to investigate surface structure modification and crystallinity of rice straw and water hyacinth after recombinant α -L-arabinofuranosidase treatment. Analysis of surface structure modification and crystallinity were done by SEM and XRD. In the process of rice straw and water hyacinth hydrolysis were determined optimization of intracellular enzyme (P) and extracellular enzyme mixture ratio and optimization of incubation time. The optimum ratio of rice straw was 1:1 and water hyacinth was 1:2. The optimum incubation time of rice straw and water hyacinth hydrolysis was 8 hours. Rice straw and water hyacinth after recombinant α -L-arabinofuranosidase treatment were analyzed by SEM and XRD, Rice straw and water hyacinth before recombinant α -L-arabinofuranosidase treatment were used as control. The conclusion of this research indicated that enzymatic hydrolysis damaged surface structure of rice straw and water hyacinth. Enzymatic hydrolysis showed effect on cristallinity of water hyacinth.

Keywords : α -L-arabinofuranosidase, rice straw, water hyacinth, scanning electron microscope, x-ray diffraction.

Construction Extracellular Secretion and Increased optimum pH of α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT 08

Aims of this study were design α -L-arabinofuranosidase extracellular expressed by M5 plasmid system in *E. coli* BL21 (DE3) and increasing the activity of α -L-arabinofuranosidase through directed evolution. α -L-arabinofuranosidase from *E. coli* DH5 α was successfully expressed and secreted in the M5 plasmid system (excretory expression system) with *E. coli* BI21 (DE3) as host. Optimum conditions for the expression of α -L-arabnofuranosidase extracellular from *E. coli* BL21 (DE3) / pBM5ABF has done with the addition of 2,5 mM inducer IPTG and incubation time of 36 hours. In addition, the α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme has also been successfully purified by affinity chromatography system with Ni-NTA column. The results showed the specific activity of crude enzyme was 8.191 U / mg, whereas pure α -L-arabinofuranosidase enzyme of purification with Ni-NTA has a specific activity of 11.427 U / mg. Pure α -L-arabinofuranosidase enzyme has optimum activity at 70 ° C and pH 8, while for the temperature stability ranging from 50 to 70 ° C and pH stability ranging from 4 to 7. α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme of *E. coli* BL21 (DE3) / pBM5ABF) that have been generated in this study had optimum activity at pH 8 and the activity decreased drastically at pH 9. For that would be an increase in the activity of α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme pH 9 by the method of directed evolution. Directed evolution process of gene α -L-arabinofuranosidase from mold pBM5ABF performed by PCR-errorprone. Screening α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme variant of 10 colonies that have been selected from the first stage of screening results with MUA substrate with 96 well microtiter plate produces positive variants that emit high-intensity blue fluorescence at pH 9, the second stage of screening was then performed with pNPA substrate in

buffer NaOH-glycine at pH 9. The highest activity in mutant A12 that is equal to 2.874223 U / ml, while for the activity of the control (wildtype) of 0.754 U / ml. This means that the activity of α -L-arabinofuranosidase enzyme varian with pNPA substrate in buffer at pH 9 increased 4-fold of the enzyme activity of α -L-arabinofuranosidase wildtype.

Keywords : α -L-arabinofuranosidase, M5 plasmid system, excretory expression system, directed evolution, PCR-errorprone.

CAPAIAN INDIKATOR KINERJA

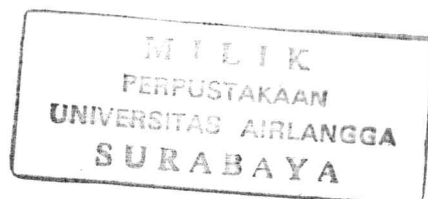
No.	Indikator Kinerja	Tahun I	Tahun II	Tahun III	Capaian Tahun I 2011
1.	Jumlah mahasiswa jenjang magister	2	2	2	2
2.	Jumlah mahasiswa jenjang Doktor	2	1	1	2
3.	Jumlah publikasi internasional (submitted)	1	2	2	1 (accepted)
4.	Jumlah mahasiswa magister yang lulus tepat waktu	2	2	2	2
5.	Jumlah mahasiswa Doktor yang lulus tepat waktu	-	2	1	-

LUARAN HASIL PENELITIAN

1. Tesis 2 mahasiswa Program Magister Kimia yang telah lulus
2. Satu naskah artikel publikasi internasional dari tesis mahasiswa program magister kimia yang telah dinyatakan *accepted* di Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development (bukti terlampir)
3. Dua orang mahasiswa Program Doktor MIPA (Jurusan Kimia, mInat Biokimia) telah lulus ujian proposal dan saat ini sedang mengikuti Program Sandwich di University of Groningen, Belanda dan Mie University, Jepang selama 3 bulan
4. Jejaring kerjasama dengan Perguruan Tinggi Luar Negeri yang telah dijalin sebelumnya tetap dilanjutkan untuk pengiriman mahasiswa S2 dan S3 mengikuti program sandwich, yaitu University of Groningen, Belanda; Mie University dan Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
ABSTRAK	iii
CAPAIAN INDIKATOR KINERJA	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I	
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	
BAB IV. METODE PENELITIAN	
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	
BAB VII. RENCANA/PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA	
A. Tujuan Khusus	
B. Metode	
C. Jadwal kerja	
BAB VIII. Draf Artikel Ilmiah atau Artikel yang sudah terbit	
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN:	
A. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Sektor pertanian merupakan penyumbang kedua terjadinya pemanasan global di bumi ini. Kalimat tersebut tentunya menimbulkan tanda tanya besar bagi kita semua, mengingat aktivitas pertanian tidak akan pernah berhenti selama di bumi ini masih ada kehidupan. Pertanian adalah sumber utama bagi kelangsungan hidup manusia. Oleh karena itu, hasil pengolahan pertanian yang berupa hasil panen dan limbah hasil pengolahan pertanian sebaiknya dikelola dengan baik dan maksimal bagi kelestarian alam. Dua penyumbang utama penyebab pemanasan global asal pertanian adalah penggunaan lahan, pembakaran biomassa (10%), dan hasil samping/limbah pertanian (12,5%). Selanjutnya langkah-langkah apa yang perlu dilakukan oleh masyarakat untuk mengurangi efek pemanasan global akibat aktivitas pertanian tersebut?

Limbah pertanian yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri kimia, bio-energi dan prebiotik adalah limbah pertanian kaya akan kandungan selulosa, dan hemiselulosa. Kandungan polisakarida yang cukup tinggi pada limbah pertanian tersebut dapat didegradasi secara kimia maupun enzimatis menjadi gula sederhana, selanjutnya digunakan sebagai bahan baku pembuatan bio-etanol. Sedangkan produk hidrolisis dalam bentuk oligosakarida sangat bermanfaat sebagai bahan prebiotik. Degradasi secara kimia dapat menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan, oleh karena itu degradasi enzimatis yang lebih spesifik dan ramah lingkungan sangat diperlukan dalam proses degradasi limbah pertanian tersebut. Teknologi seperti ini dikenal dengan nama *White Biotechnology*, yaitu menggunakan enzim sebagai biokatalis dalam proses industri.

Salah satu kelompok enzim yang dapat mendegradasi limbah pertanian tersebut adalah kelompok enzim hemiselulase, diantaranya adalah kelompok enzim xilanase. Berbagai limbah pertanian, seperti ampas tebu, tongkol jagung, limbah padat pengolahan kelapa sawit, dedak padi dan gandum mengandung hemiselulosa yang kaya akan kandungan xilan. Hemiselulosa merupakan suatu heteropolimer yang mengandung monosakarida pentosa (xilosa, arabinosa), heksosa (glukosa, galaktosa, manosa) dan juga gula asam (asam glukuronat) (Saha, 2003). Degradasi hemiselulosa kaya xilan secara enzimatis akan menghasilkan monosakaridan dan oligosakarida yang selanjutnya dapat dimanfaatkan pada proses pembuatan alkohol maupun industri

kimia lain, seperti pembuatan xilitol, 2,3-butanadiol. Penggunaan enzim xilanolitik termofilik hasil rekombinasi galur lokal yang telah berhasil dilakukan oleh peneliti pengusul (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2000 – 2009) akan sangat bermanfaat dalam degradasi limbah pertanian kaya hemiselulosa, seperti limbah padat kelapa sawit, ampas tebu, ampas pengolahan bio-diesel biji jarak, limbah tongkol jagung menjadi gula sederhana. Keberadaan limbah-limbah pertanian tersebut di atas sangatlah berlimpah di Indonesia yang merupakan negara agraris, berbasis pada pertanian.

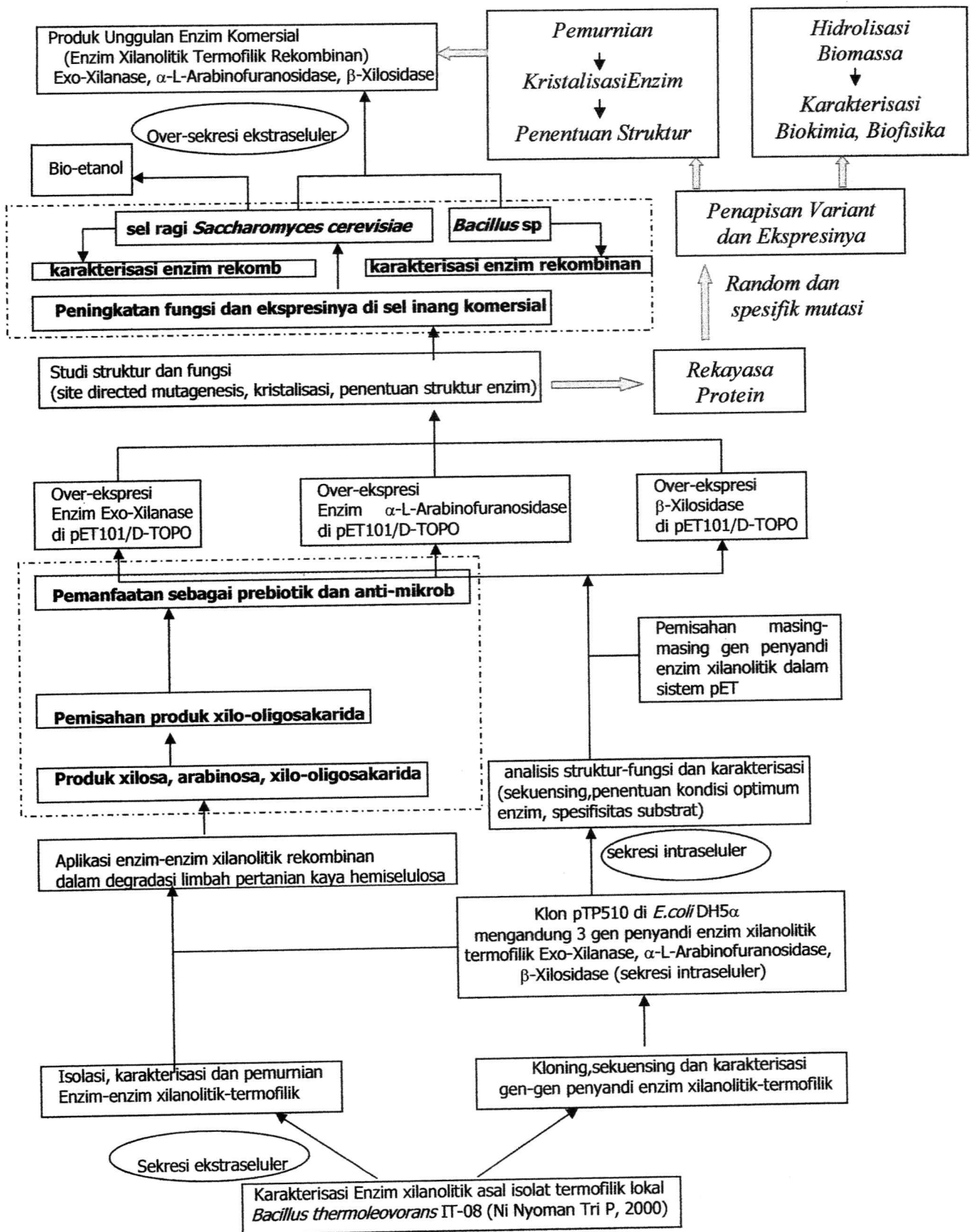
Hidrolisis total hemiselulosa xilan membutuhkan beberapa enzim yang berbeda, yaitu endo-1,4- β -xilanase (1,4- β -D-xylanxylanohydrolase, EC.3.2.1.8) menghidrolisis struktur dasar xilan secara acak menjadi xilooligosakarida; 1,4- β -D-xilosidase (1,4- β -D-xylanxylohydrolase, EC.3.2.1.37) memutus xilooligosakarida menjadi xilosa. Gugus samping yang menyusun xilan akan dibebaskan oleh α -L-arabinofuranosidase, α -D-glukuronidase, galaktosidase dan asetil xilan esterase menjadi arabinosa, glukuronat, galaktosa dan asetat (Subramaniyan *et al.*, 2002).

Enzim xilanolitik dapat digunakan untuk beberapa keperluan, diantaranya adalah untuk (1) proses pemutihan industri pulp dan kertas, (2) meningkatkan mutu pakan ternak, (3) pengolahan bahan makanan, (4) meningkatkan kemampuan dalam degradasi material tumbuhan, khususnya limbah pertanian, (5) produksi alkohol, xilitol serta (6) meningkatkan proses ekstraksi minyak tumbuhan. Keberadaan limbah pertanian kaya hemiselulosa xilan akan sangat bermanfaat sebagai bahan baku industri kimia bila didegradasi secara enzimatik menjadi oligosakarida maupun monosakarida.

Penelitian Penelitian yang telah dilakukan dan dikembangkan oleh Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim selama 8 tahun terakhir telah berhasil mengisolasi, mengkarakterisasi enzim-enzim xilanolitik termofilik dari isolat lokal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dan *Bacillus subtilis* PC-01 serta telah pula berhasil mengklon gen-gen penyandi enzim xilanolitik termofilik tersebut ke dalam *Escherichia coli*. Kemampuan enzim-enzim xilanolitik rekombinan tersebut dalam mendegradasi limbah pertanian kaya hemiselulosa xilan telah pula dilakukan. Hasil menunjukkan tingginya produk xilo-oligosakarida selain dihasilkan pula monosakarida xilosa dan arabinosa. Hasil penelitian Hibah Pasca (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2007-2008) telah berhasil mensekresikan enzim xilanolitik rekombinan tersebut ke dalam sel inang komersial *Bacillus megaterium* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu, uji

aktivitasnya sebagai anti-bakteri juga telah pula menunjukkan adanya sinergi fungsi anti-bakteri dan prebiotik akan sangat bermanfaat dalam pengembangan industri pangan. Penelitian Hibah Pascasarjana tersebut telah pula meluluskan 2 orang Doktor dan 3 orang Magister. Aplikasi produk enzim hemiselulase tunggal maupun konsorsium telah pula dikembangkan dan saat ini dalam proses perolehan patent dengan merk *Excelzyme*. Untuk lebih meningkatkan aktivitas dan daya saing komersial di masa yang akan datang, maka pada penelitian ini akan dilakukan pendekatan proteomik untuk meningkatkan aktivitas hemiselulase yang telah berhasil dikembangkan dalam produk *Excelzyme*. Rekayasa protein dalam sistem proteomik tersebut terdiri dari *site directed mutagenesis*, *gene shuffling*, analisis SEM terhadap kerja enzim terhadap substrat limbah pertanian terpilih serta over-ekspressi nya. Peningkatan produksi enzim-enzim rekombinan secara mandiri tersebut diharapkan akan mampu meningkatkan ekonomi bangsa. Penelitian ini melibatkan 2 mahasiswa Magister dan 2 mahasiswa Program Doktor.

Roadmap penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 1. Tahapan penelitian yang akan dilakukan dalam usulan penelitian Hibah Pasca ini dtunjukkan pada *huruf miring dalam kotak*.

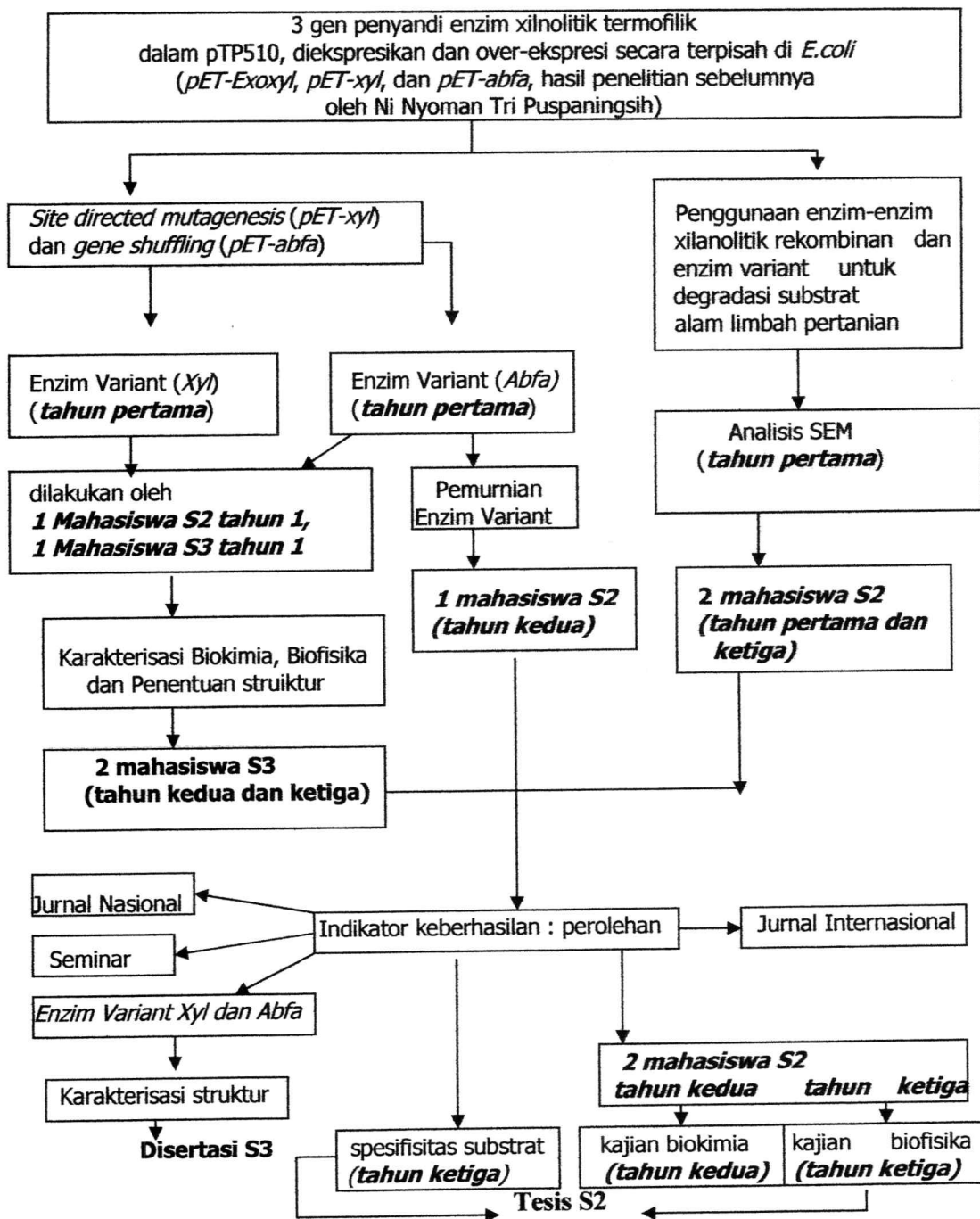


Gambar 1. State of the art bidang penelitian [Hibah Pasca 2007-2008 ([])]

Tujuan Penelitian

- a. Meningkatkan fungsi enzim hemiselulase melalui *site directed mutagenesis* dan *directed evolution*
- b. Mengkarakterisasi enzim variant untuk efisiensi hidrolisis limbah pertanian kaya akan hemiselulosa
- c. Menentukan struktur protein melalui *protein modeling*
- d. Menganalisis produk hidrolisis enzim dan *scanning electron microscope*

Sistematika Penelitian



BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN I

2.1. Tujuan Khusus

5. Meningkatkan fungsi enzim hemiselulase melalui *site directed mutagenesis* dan *directed evolution*
6. Mengkarakterisasi enzim variant untuk efisiensi hidrolisis limbah pertanian kaya akan hemiselulosa
7. Menentukan struktur protein melalui *protein modeling*
8. Menganalisis produk hidrolisis enzim dan *scanning electron microscope*

2.2. Manfaat Penelitian

1. Meningkatkan nilai ekonomis limbah pertanian sebagai sumber energi yang kaya akan polisakarida
2. Pengembangan bioproduk secara mandiri dari isolat lokal
3. Meningkatkan wawasan keilmuan bagi mahasiswa pascasarjana dalam penguasaan rekayasa protein

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

Pemurnian dan pencirian enzim xilanolitik-termofilik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 telah berhasil dilakukan (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2002). Isolat *Bacillus thermoleovorans* diisolasi dari Sumber Air Panas Gunung Pancar, Bogor oleh Tan, I (1999). Selain itu, gen penyandi enzim xilanolitik telah pula berhasil diklonkan ke dalam plasmid pBluescript KS-II(+) di *Escherichia coli* DH5 α dan dinamakan pTP510 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2003). Peta restriksi pTP510 terlihat pada Gambar 2. Turunan pTP510 telah pula berhasil dikembangkan dalam vektor ekspresi pET101/D-TOPO dan dinamakan *pET-exoxyl*, *pEt-abfa* dan *pET-xyl* (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2007-2009). Keunggulan kedua enzim tersebut adalah secara sinergis mampu menghasilkan produk utama xilosa, arabinosa dan xilo-oligosakarida. Hasil ini sangat menguntungkan bila diaplikasikan secara industri. Hasil degradasi berbagai substrat xilan komersial oleh enzim xilanolitik rekombinan di pTP510 tertera pada Tabel 1.

Table 1. Produk hidrolisis berbagai xilan komersial oleh enzim xilanolitik di pTP510 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim, 2006)

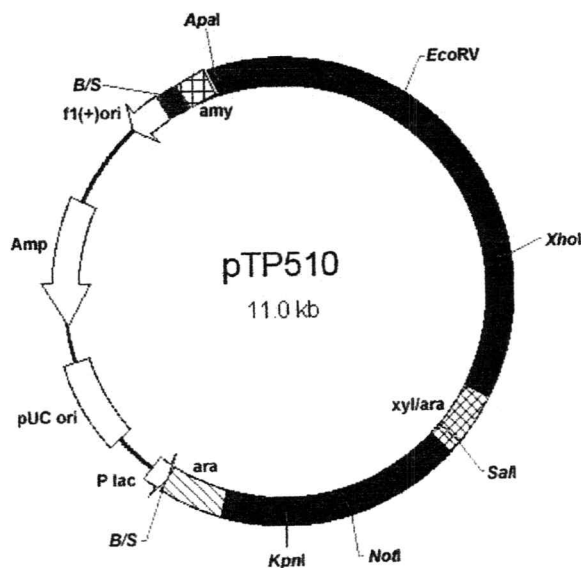
No.	Substrat	Xylose (%)	Arabinose (%)	Xylo-oligosaccharides (%)
1.	Oat spelt xylan	21.73	26.67	-
2.	Birchwood	20.60	22.26	18.60
3.	Wheat arabinoxylan	17.62	19.95	42.46
4.	Ryeflour arabinoxylan	8.89	13.02	10.05
5.	Arabinan (sugar beet)	13.55	15.10	13.99

Hasil pada Tabel 1 menunjukkan bahwa produk tertinggi xilo-oligosakarida dihasilkan oleh degradasi substrat *wheat arabinoxylan*. Selanjutnya dalam penelitian lanjutan ini akan diisolasi xilo-oligosakarida dari substrat *wheat arabinoxylan*.

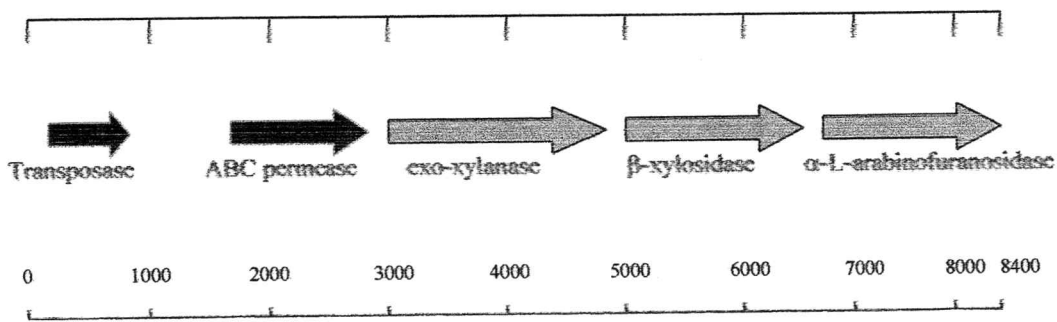
Mekanisme sinergis kedua enzim dalam menghidrolisis *oat spelt xylan* diawali oleh pemutusan rantai cabang arabinosil oleh enzim α -L-arabinofuranosidase, kemudian diikuti dengan pelepasan unit xilosa oleh aktivitas ekso dari enzim β -xilosidase (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2003). Hasil sekuensing sebagian dari pTP510 ujung 3' menunjukkan gen penyandi α -L-arabinofuranosidase mempunyai

kesamaan yang tinggi dengan gen *abfa* dari *Geobacillus stearothermophilus* T6 famili GH51. Sedangkan hasil sekuensing sebagian gen penyandi xilosidase (*xyl*) dan/atau β -xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase (*xyl/abfa*) mempunyai kesamaan hanya 25-34% dengan famili GH43 dari gen *xyl/abfa* *Oceanobacillus theynsis* HTE831 dan gen *xyl* dari *Bacillus halodurans*. Enzim β -xilosidase (Xyl) dan α -L-arabinofuranosidase (Abfa) yang diisolasi dari isolat *B. thermoleovorans* maupun *E.coli* DH5 α rekombinan menunjukkan kesamaan sifat, yaitu (1) secara sinergis mampu menghidrolisis *oat spelt xylan* menghasilkan produk utama xilosa, (2) bekerja pada suhu optimum 70°C, dan (3) memiliki stabilitas pH pada kisaran 5-8. Perbedaan hanya terjadi pada pH optimumnya. Selain itu aktivitas kedua enzim rekombinan menunjukkan peningkatan aktivitas dibanding enzim aslinya.

Analisis struktur gen penyandi enzim xilanolitik yang terinsersi dalam pTP510 dilakukan pada tahun 2005 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih) dan hasil menunjukkan bahwa selain gen penyandi β -xilosidase (*xyl*) dan α -L-arabinofuranosidase (*abfa*) juga ditemukan adanya gen penyandi *exo-xylanase* (*exo-xyl*). Peta posisi masing-masing gen dalam pTP510 terlihat pada Gambar 3. Diduga dua dari gen penyandi xilanolitik, yaitu *xyl* dan *exo-xyl* merupakan novel enzim yang menarik untuk dieksplorasi lebih mendalam. Selain itu, ditemukan pula terinsersinya 2 gen penyandi transposase dan ABC permease dalam pTP510. Kedua gen tersebut diduga berperan dalam proses transport monosakarida dalam transport membran.



Gambar 2. Peta restriksi pTP510 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2003)



Gambar 3. Diagram gen penyandi enzim xilanolitik yang terinsersi dalam pTP510 (⇒) (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2005)

Ketiga gen penyandi enzim xilanolitik termofilik telah terdaftar di GenBank dengan perolehan 3 Accession Number (Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim, 2006), yaitu DQ345777 untuk gen penyandi xilosidase, DQ387046 untuk gen penyandi α -L-arabinofuranosidase, dan DQ387047 untuk gen penyandi exo-xylanase. Informasi ketiga gen tersebut dapat diakses secara internasional oleh seluruh peneliti dunia melalui website NCBI atau DDBJ. Hasil penelusuran pada data GenBank menunjukkan bahwa belum ada data mengenai klon penyandi enzim xilanolitik yang dieksplorasi dari isolat *Bacillus thermoleovorans* IT-08 yang telah dihasilkan oleh tim peneliti pengusul. (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2000 – 2005).

Beberapa penelitian mengenai enzim-enzim pendegradasi xilan khususnya dari *Bacillus sp.* telah pula dilaporkan. Diantaranya adalah β -xylanase dan β -xylosidase dari *Bacillus stearothermophilus*. Kedua gen penyandi enzim tersebut telah pula berhasil diklonkan (Nanmori et al. 1990 dan 1994), kelompok β -xylanase termofilik asal *Bacillus thermoleovorans* K-3d (Sunna, et al., 1997) hanya mengkarakterisasi enzim ekstrak kasar, β -xylanase asal *Bacillus sp.* Thermoalkalifilik strain TAR-1 (Takahashi, et al., 2000).

Gen penyandi enzim xilanolitik telah dilaporkan merupakan suatu kelompok gen. Beberapa diantaranya adalah kelompok gen (gen klaster) penyandi enzim β -xylanase; β -xilidase serta α -L-arabinofuranosidase dari *Clostridium stercorarium* (Schwarz et al. 1990) dan *Bacteroides ovatus* (Whitehead dan Hespell. 1990), β -xilidase dan xilanase dari *Bacillus stearothermophilus* 21 (Baba et al. 1994), β -xilidase dan α -L-arabinofuranosidase dari *Trichoderma reesei* (Clark et al. 1996).

Ukuran kelompok gen penyandi enzim xilanolitik tersebut bervariasi, misalnya kelompok gen penyandi xilosidase dan arabinofuranosidase dari *Bacteroides ovatus* yang berukuran 3,8 kb (Whitehead dan Hespell. 1990) dan kelompok gen penyandi xilosidase dan xilanase dari *Bacillus stearothermophilus* 21 yang berukuran 4,2 kb (Kulkarni et al. 1999).

Pemanfaatan produk hidrolisis hemiselulosa kaya xilan yaitu xilo-oligosakarida sebagai prebiotik dan anti-mikrob telah dikembangkan oleh Christakopoulos P. (2002) dan Dominique *et al* (2003).

BAB IV
METODE PENELITIAN

Tahun I :

Rekayasa Protein Enzim Hemiselulase (dilakukan oleh 1 mahasiswa S2 dan 1 mahasiswa S3)

a. Mutagenesis Enzim Hemiselulase Rekombinan

Enzim hemiselulase yang dipilih adalah enzim xilosidase dan arabinofuranosidase rekombinan yang diisolasi dari pET-xyl dan pET-abfa hasil penelitian sebelumnya. Rekayasa Protein yang digunakan adalah dengan *site directed mutagenesis* dan *directed evolution*. Teknik yang digunakan menggunakan PCR

b. Seleksi dan Analisis Enzim Variant

Gen penyandi enzim variant diklonkan ke dalam vektor ekspresi system pET dan diseleksi ekspresi enzim Xilosidase dan Arabinofuranosidase Variant menggunakan *overlay detection* dengan turunan methylumbelliferyl dan dilakukan analisis genomic dengan sekuensing dan uji alignment

c. Hidrolisis Limbah Pertanian berbasis lignoselulosa dengan Enzim Hemiselulase Rekombinan (dilakukan oleh 1 mahasiswa S2)

Limbah pertanian yang akan digunakan adalah jerami padi, tongkol jagung dan enceng gondok. Optimasi kondisi hidrolisis digunakan dengan melakukan variasi aktivitas enzim hemiselulase. Analisis kerja enzim diamati dengan *Scanning Electron Microscope*. Hasil ini akan dibandingkan dengan hasil kerja enzim variant pada tahun kedua

d. Isolasi Gen Penyandi exo-xilanase dan Analisis Kinetika Reaksi serta Residu Aktifnya

Isolasi gen penyandi exo-xilanase dilakukan dari *E.coli* (pTP510) dan disubklonkan ke dalam pET30. Rekombinan selanjutnya akan diuji ekspresi dan dimurnikan enzim nya untuk mempelajari kinetika serta residu aktif yang berperan.

BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN

USULAN PENELITIAN

**KARAKTERISASI ENZIM EKSO-XILANASE *PUTATIVE* REKOMBINAN DARI
Geobacillus thermoleovorans IT-08 DAN IDENTIFIKASI RESIDU KATALITIKNYA**



Oleh :
Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si
NIM 090970210

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

USULAN PENELITIAN DISERTASI YANG TELAH DIUJI
PADA TANGGAL,

Oleh
Pembimbing Ketua/Promotor



Prof Dr Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si
NIP 19630615 198701 2001

Pembimbing II/Ko promotor I



Drs. Zeily Nurachman, D.Sc.
NIP 19650313 198903 1 025

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Lembar Pengesahan	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Gambar	v
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Masalah Penelitian	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan umum	6
1.3.2 Tujuan khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat keilmuan	7
1.4.2 Manfaat praktis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Xilan sebagai substrat xilanase	8
2.2 Enzim Xilanolitik.....	8
2.2.1 Lokasi Enzim	9
2.2.2 Aktifitas Katalitik Enzim Xilanolitik.....	11
2.2.3 Klasifikasi Xilanase	13
2.3 Ekso-xilanae	14
2.4 Kinetika Enzim.....	16
2.5 Aplikasi Enzim Xilanolitik	23
2.6 Plasmid pET30a.....	24
2.7 Mutasi Terarah dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	26
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	29
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	35
4.1 Jenis Penelitian	35
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	35
4.3 Bahan dan Alat Penelitian	35
4.3.1 Sampel Penelitian	35
4.3.2 Bahan Penelitian	35
4.3.3 Alat Penelitian	36
4.4 Kerangka Operasional Penelitian	37
4.5.1 Peremajaan Bakteri	38
4.5.2 Teknik DNAREkombinan.....	38
a. Preparasi DNA Plasmid.....	38
b. Amplifikasi Fragmen DNA.....	38
c. Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi.....	39
d. Elektroforesis Gel Agarosa.....	39

e. Pemurnian DNA dari Gel Agarosa.....	39
f. Reaksi Ligasi.....	39
g. Subkloning gen ekso-xil ke vektor ekspresi pET30a.....	39
h. Transformasi sel <i>E. coli</i>	40
i. PCR- <i>site directed mutagenesis</i>	41
4.5.3 Metode Produksi protein dan analisis protein.....	42
a. Produksi enzim ekso-xilanase rekombinan dan mutan	42
b. Pemurnian enzim ekso-xilanase rekombinan dan mutan	42
c. Uji aktivitas enzim ekso-xilanase rekombinan dan mutan dengan substrat p- nitrofenil-β-D-xilopiranosida.....	43
d. Kadar protein ekso-xilanase.....	43
4.5.4 Karakteristik ekso-xilanase terhadap pH dan suhu.....	44
4.5.5 Kinetika ekso-xilanase putative rekombinan dan mutan.....	44
4.5.6 Hidrolisis xilan dengan enzim ekso-xilanase rekombinan dan analisis produk.....	44

DAFTAR PUSTAKA

e. Pemurnian DNA dari Gel Agarosa.....	39
f. Reaksi Ligasi.....	39
g. Subkloning gen ekso-xil ke vektor ekspresi pET30a.....	39
h. Transformasi sel <i>E. coli</i>	40
i. PCR- <i>site directed mutagenesis</i>	41
4.5.3 Metode Produksi protein dan analisis protein.....	42
a. Produksi enzim ekso-xilanase rekombinan dan mutan	42
b. Pemurnian enzim ekso-xilanase rekombinan dan mutan	42
c. Uji aktivitas enzim ekso-xilanase rekombinan dan mutan dengan substrat p- nitrofenil-β-D-xilopiranosida.....	43
d. Kadar protein ekso-xilanase.....	43
4.5.4 Karakteristik ekso-xilanase terhadap pH dan suhu.....	44
4.5.5 Kinetika ekso-xilanase putative rekombinan dan mutan.....	44
4.5.6 Hidrolisis xilan dengan enzim ekso-xilanase rekombinan dan analisis produk.....	44

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur xilan.....	9
2.2 Lokasi penyerangan enzim xilanolitik.....	10
2.3 Perubahan konsentrasi reaktan suatu reaksi enzimatis terhadap waktu.....	17
2.4 Kurva kinetika Michaelis-Menten: hubungan antara kecepatan reaksi (V) dan konsentrasi substrat ([S]).....	18
2.5 Kurva Lineweaver-Burk: hubungan antara $1/V$ thd $1/[S]$...	19
2.6 Penentuan kecepatan awal pada berbagai konsentrasi.....	19
2.7 Peta Plasmid pET30a.....	23
2.8 Kontrol sistem pET.....	24
3.1 <i>Superimpose</i> model protein ekso-xilanase putative dengan protein 2E kelompok GH43.....	30
3.2 Mekanisme umum reaksi inversi ekso-xilanase GH43.....	32
3.3 Bagan Kerangka konseptual Penelitian.....	33
4.2 Kerangka Operasional Penelitian.....	36

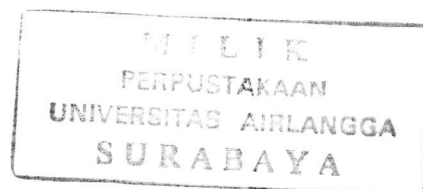
BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Perkembangan dan kemajuan bidang pertanian dan industri pertanian di Indonesia telah menimbulkan peningkatan limbah pertanian yang sebagian besar merupakan limbah berlignoselulosa. Berbagai limbah pertanian lignoselulosa yang mengandung hemiselulosa kaya xilan di antaranya yaitu jerami padi, tandan kelapa sawit, daun kacang tanah, daun kedelai, tongkol, batang dan daun jagung (Puchart and Biely, 2008). Limbah lignoselulosa yang mengandung hemiselulosa kaya xilan dapat berpotensi dalam aplikasi industri sebagai sumber xilosa, xilitol, pakan ternak dan bahan bakar. Melihat potensi limbah kaya xilan yang berlimpah maka perlu penggalian yang lebih intensif tentang pemanfaatan potensi tersebut. Salah satu sasaran adalah pemanfaatan enzim yang mampu mendegradasi limbah hemiselulosa yang kaya xilan (Collin *et al.*, 2004).

Kelompok enzim xilanolitik yang bekerja secara sinergis mempunyai kemampuan untuk mendekomposisikan xilan, yang merupakan penyusun hemiselulosa paling besar setelah selulosa. Xilan tersusun dari unit xilopiranosil yang dihubungkan dengan ikatan 1,4 β dan beberapa cabang seperti residu arabinosil, glukuronosil, 4-O-metil glukuronosil dan asetil. Jumlah dan komposisi cabang tergantung dari sumber dari xilan. Struktur kompleks xilan membutuhkan enzim berbeda dalam menghidrolisis xilan seperti endo- β -1,4-xilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glukoronidase, asetilxilan esterase. Mekanisme hidrolisis xilan diawali oleh α -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55) yang menghidrolisis rantai cabang xilan menghasilkan L-arabinosa dan xilobiosa. Pemutusan rantai cabang ini selanjutnya akan memudahkan hidrolisis kerangka utama xilan oleh xilanase (EC.3.2.1.8) dan β -xilosidase (EC.3.2.1.37) (Vieira *et al.*, 2009).



Exo-β-1,4-D-xilanase atau ekso-xilanase (EC.3.2.1.X) merupakan salah satu kelompok enzim xilanolitik, yang mengkatalisis hidrolisis ikatan β-1,4-D-xilosa pada kerangka utama xilan untuk menghasilkan xilobiosa pada heteroarabinosilan (Saha, 2003). Enzim ini mampu memutus rantai polimer xilosa pada ujung non pereduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek (Richana, 2002). Ghose and Bisaria (1987) menyatakan bahwa *D-xilanase* bersifat *ekso* maupun *endo*. Fakta yang dijumpai adalah terdapat banyak klaim pustaka mengenai ekso-xilanase sebagai enzim terpisah, berbeda dari β-xilanosidase namun beberapa di antaranya sulit dibedakan dari β-*D*-xilosisidase karena keduanya mampu mendegradasi *D*-xiloöligosakarida ($DP \geq 2$) walaupun berdasarkan definisi hanya ekso-xilanase yang menyerang xilan. Dibandingkan dengan enzim xilanolitik lainnya, belum banyak yang mengeksplorasi ekso-xilanase dan masih sedikit yang mengetahui tentang residu katalitik dan mekanisme kerjanya terhadap substrat.

Enzim xilanolitik termofilik yang berasal dari *Geobacillus thermoleovorans IT-08* telah berhasil dimurnikan dan dikarakterisasi. Kelompok gen xilanolitik termofilik asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* juga telah berhasil diklon dalam plasmid pTP510. Analisis struktur gen penyandi enzim xilanolitik termofilik yang terinsersi dalam pTP510 menunjukkan bahwa selain dua gen pengkode enzim xilanolitik gen β-*D* xilosidase (*xyl*) dan α-*L*-arabinofuranosidase (*abfA*). juga ditemukan gen lain yaitu gen ekso-xilanase *putative* (*exo-xyl*). Gen-gen tersebut telah terdaftar dalam *Genebank Accession* : Gen ekso-xilanase *putative* (DQ387047), β-xilosidase (DQ345777) dan α-*L*-arabinofuranosidase (DQ387046) (Puspaningsih, 2004). Gen α-*L*-arabinofuranosidase dan β-xilosidase dari kelompok gen xilanolitik asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* telah berhasil diekspresikan, dimurnikan dan dikarakterisasi. Namun gen ekso-xilanase *putative* dari kelompok gen xilanolitik belum diekplorasi seperti dua kelompok gen xilanolitik.

Usui, K., *et al* (1999) dan Fujimoto, *et al* (2005) mengelompokkan ekso-xilanase dalam famili GH10. Ekso-xilanase tersebut merupakan hasil ekspresi gen XynX asal *Aeromonas caviae ME-1* dan ekso-xilanase ini telah berhasil dikristalkan. Profil produk hidrolisis enzim pada substrat xilan menunjukkan hasil eksklusif xilotetraosa, sehingga data ini memperkuat enzim yang berasal dari gen XynX memiliki aktifitas ekso-xilanase. Glikosida Hidrolase telah mengklasifikasikan 118 famili berdasarkan kemiripan urutan asam amino dan struktur serta mekanisme kerja enzimnya. Ekso-xilanase dikelompokkan dalam famili GH10, GH11 dan GH43 ([cazy, http://www.cazy.org/](http://www.cazy.org/)). Famili GH43 terdiri dari kelompok enzim-enzim yaitu β -xilosidase (E.C. 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase (exo, 1,5 α -L-arabinofuranosidase), bifungsional β -xilosidase dengan α -L-arabinofuranosidase, endo α -L-arabinofuranosidase (E.C.3.2.1.99), endo β -1,4 xilanase (E.C.3.2.1.8) dan exo- β -1,3 galaktanase (E.C.3.2.1.145) (Fujimoto *et al.*, 2010).

Gen ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* hasil blast protein *database* (PDB) diindikasikan sebagai novel enzim dalam famili 43 (GH43) karena gen ekso-xilanase *putative* dikelompokkan dalam famili 43 (GH43) dengan homologi yang sangat rendah (25-34%). Homologi yang sangat rendah dihasilkan dengan membandingkan ekso-xilanase *putative* dengan protein-protein kelompok GH43, yang telah diketahui struktur tiga dimensinya dalam PDB, seperti protein-protein dengan kode 3CPN, 3AKF, 3KST, 3CU9 dan 2EXY. Asam amino-asam amino yang konsisten (*conserve*) yang menunjukkan residu katalitik pada kelompok GH43 berkisar pada posisi sepuluh untuk asam amino aspartat dan seratusan untuk asam amino aspartat dan glutamat, seperti kelompok protein famili GH43 yaitu protein PDB kode 2EXY (Asp15, Asp110 dan Glu186) dan 3CU9 (Asp27, Asp142 dan Glu201). Namun hasil *alignent* ekso-xilanase *putative* dengan beberapa protein kelompok GH43 menunjukkan daerah asam amino yang konsisten pada daerah Aspartat287, Aspartat412 dan Glutamat476.

Berdasarkan kajian yang telah dipaparkan, ada hal yang unik untuk ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08*, yakni PDB mengelompokkannya dalam famili GH43 walaupun dengan homologi yang cukup rendah 25-30%, sedangkan ekso-xilanase *putative* tidak dikelompokkan dalam famili GH10 atau GH11. Maka perlu penelitian lebih lanjut untuk mendukung ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* sebagai novel ekso-xilanase (enzim baru yang memiliki keunikan). Dalam penelitian ini akan dilakukan karakterisasi ekso-xilanase *putative* dan mengamati produk hidrolisisnya. Profil produk hidrolisis akan memberikan informasi ekso-xilanase *putative* sebagai ekso-xilanase atau kelompok xilanase lain seperti ekso- β -xilosidase. Ekso xilanase *putative* sebagai ekso-xilanase akan menghasilkan produk hidrolisisnya xilooligosakarida spesifik seperti xilobiosa atau xilotriosa atau xilotetraosa, sedangkan ekso-xilanase *putative* sebagai ekso- β -xilosidase akan menghasilkan produk hidrolisis hanya xilosa saja. Selanjutnya penelitian ini juga mengidentifikasi residu katalitik ekso-xilanase yang mempunyai peranan besar memberi informasi penting tentang mekanisme katalitik enzim. Kandidat residu katalitik ekso-xilanase *putative* ditentukan melalui homologi asam amino dengan asam amino kelompok GH43 yang mempunyai gugus samping yaitu gugus karboksilat (Glu or Asp). Perlu diketahui belum ada laporan yang mengidentifikasi residu katalitik pada ekso-xilanase dalam kelompok famili GH43.

Penelitian pendahuluan pada ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* adalah profil zimogram pada enzim xilanolitik asal isolat *IT-8* menunjukkan adanya pita protein dengan massa molekul relatif sekitar 80 kDa dan sekitar 59 kDa. Protein ekso-xilanase *putative* di indikasi pada ukuran sekitar 80 kDa sedangkan protein α -L-arabinofuranosidase dan β -xilosidase berukuran yang mirip sekitar 59 kDa. Mekanisme sinergisme dari enzim-enzim xilanolitik yang diekspresikan oleh pTP510 di *E.coli*

- alenda \rightarrow air mili-Q.

- timbang \rightarrow 9 1 kg 2 standar.

rekombinan dengan menghasilkan produk hidrolisis xilosa, yang di deteksi menggunakan HPLC (Puspanigsih,2004).

Pada penelitian ini akan dikarakterisasi novel ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* dan mengidentifikasi residu katalitik yang berperan dalam proses hidrolisis. Karakterisasi ekso-xilanase *putative* meliputi suhu, pH dan profil produk hidrolisis. Tahap ini diawali dengan melakukan over ekspresi ekso-xilanase melalui tahapan : kloning gen ekso-xilanase *putative* dari plasmid pTP510 ke dalam plasmid pET30a, over ekspresi dalam plasmid pET30a di *E.coli BL21*. Selanjutnya dilakukan tahap kedua yaitu mengidentifikasi residu katalitik melalui mutasi searah dengan PCR berdasarkan penggantian asam amino pada ekso-xilanase *putative* dan karakteristik dari mutan ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08*.

1.2 Rumusan Masalah

Ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* berdasarkan *database* protein (PDB) dikelompokkan dalam famili GH43 dengan homologi yang cukup rendah (25-30%), dan daerah konsisten (*conserve*) asam amino yang dihasilkan berjauhan dari posisi residu katalitik pada kelompok GH43. Ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* diindikasikan sebagai novel enzim (enzim baru yang memiliki keunikan), maka dalam penelitian ini akan dilakukan karakterisasi ekso-xilanase *putative* meliputi suhu, pH dan profil produk hidrolisisnya untuk mendukung ekso-xilanase *putative* sebagai novel enzim.

Identifikasi residu katalitik pada ekso-xilanase *putative* dilakukan dengan mengganti asam amino yang konsisten pada asam amino yaitu Asp287, Asp412 dan Glu476 yang didasarkan oleh homologi asam amino yang mempunyai gugus samping karboksilat dengan asam amino pada beberapa protein kelompok GH43. Penggantian asam amino asam amino konsisten yang dilakukan pertama mengganti asam amino aspartat (asp287 dan asp412)

dengan asam amino asparagin, kedua mengganti asam amino glutamat (glu476) menjadi glutamin dan ketiga mengganti ketiga asam amino (asp287, asp412 dan glu476) dengan asam amino glisin. Penggantian asam amino akan mempengaruhi mekanisme enzim yaitu perubahan aktifitas enzim, spesifitas substrat, dan misfolding. Perubahan aktifitas akan digambarkan pada data analisis kinetik ekso-xilanase *putative* rekombinan dan mutannya

Maka dalam penelitian ini ada beberapa permasalahan seperti :

1. Bagaimanakah karakteristik novel ekso-xilanase *putative* rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* serta profil produk hidrolisisnya menunjang ekso-xilanase *putative* rekombinan dalam kelompok GH43 dengan homologi rendah
2. Residu asam amino apa yang berperan dalam sisi katalitik ekso-xilanase *putative* rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08*

3. Seberapa besarkah perubahan aktifitas mutan enzim ekso-xilanase *putative* terhadap ekso-xilanase *putative* rekombinan

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi enzim novel ekso-xilanase *putative* rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* dan mengidentifikasi residu katalitiknya

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengisolasi dan mengkarakterisasi novel ekso-xilanase *putative* rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08*.
 - a. Mengisolasi dan menentukan karakteristik gen ekso-xilanase *putative* rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* dalam plasmid ekspresi pET30a di *E.coli BL21*

- b. Mengisolasi dan menentukan karakteristik ekso-xilanase *putative* rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* dan profil produk hidrolisisnya
2. Menentukan asam amino yang berperan sebagai residu katalitik melalui mutasi searah dengan metode PCR
3. Menentukan karakteristik (K_m , K_{cat} dan K_{cat}/K_m) ekso-xilanase *putative* rekombinan dan mutannya asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08*

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuaan

Hasil karakteristik dari penelitian ini dapat mendukung ekso-xilanase *putative* rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* sebagai novel enzim dan memberikan informasi mengenai residu katalitik yang berperan dalam proses hidrolisis ekso-xilanase yang dikelompokkan pada famili GH43.

1.4.2 Manfaat Praktis

Setelah karakteristik ekso-xilanase *putative* diketahui maka peningkatan pemanfaatan dan kualitas aplikasi lebih lanjut khususnya aplikasi dalam industri produksi xilosa, melalui proses fermentasi xilosa dapat diubah menjadi produk bioetanol. Bioetanol yang dihasilkan itu selanjutnya bisa dimanfaatkan untuk campuran premium maupun pertamax. Selain itu dapat digunakan untuk bahan dasar minuman beralkohol, antiseptik, pelarut untuk parfum, dan pembuatan beberapa deodoran.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Xilan Sebagai Substrat Xilanase

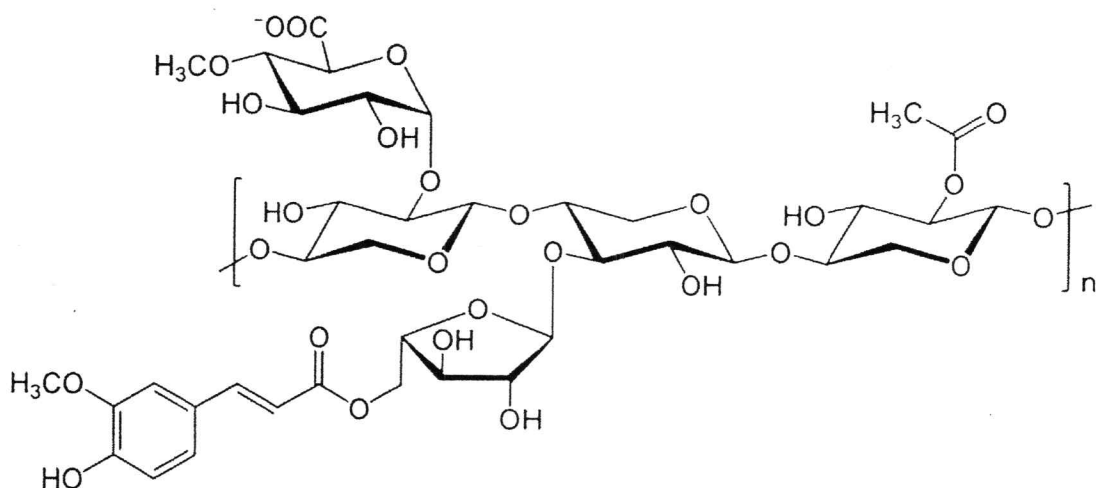
Xilan sebagai substrat enzim-enzim xilanolitik adalah polisakarida struktural utama dalam sel tumbuhan, dan merupakan polisakarida paling berlimpah kedua di alam atau menyusun sekitar sepertiga total karbon organik terbaru di alam (Prade, 1995). Xilan merupakan komponen utama penyusun hemiselulosa, suatu kompleks karbohidrat polimerik yang mencakup *D*-mannan (komponen terbesar), *D*-galaktan, *L*-arabinan, *L*-arabino-*D*-xilan (tepung terigu), *L*-arabino-*D*-glukurono-*D*-xilan (rerumputan), *D*-glukurono-*D*-xilan (kayu), *D*-xilan, xiloglukan (heteropolimer *D*-xilosa dan *D*-glukosa), glukomannan (heteropolimer *D*-glukosa dan *D*-mannosa), galaktoglukomannan (heteropolimer *D*-galaktosa, *D*-glukosa, dan *D*-mannosa), dan arabinogalaktan (heteropolimer *D*-galaktosa dan arabinosa) (Ghose and Bisaria, 1987; Shallom and Shoham, 2003). Klasifikasi fraksi hemiselulosa tersebut bergantung pada tipe gula sebagian didalamnya, dengan monomer dominan *D*-xilosa, *D*-mannosa, *D*-galaktosa, dan *L*-arabinosa.

Pada tumbuhan, xilan/hemiselulosa terletak diantara lignin dan kumpulan serat selulosa dibawahnya. Berdasarkan kepadatan struktur kimia dan substitusi gugus sampingnya, xilan tampaknya berselang-seling (*interspersed*), berjalin (*interwined*), dan berikatan secara kovalen pada beberapa titik dengan cara melapisi lapisan lignin, seraya membentuk lapisan disekitar dasar untaian selulosa melalui ikatan hydrogen. Lapisan xilan dengan ikatan kovalennya terhadap lignin dan interaksi non kovalennya dengan selulosa penting dalam mempertahankan integritas selulosa *in situ* dan membantu melindungi serat terhadap degradasi oleh selulase (Uffen, 1997).

Xilan menempati porsi terbesar sebagai hemiselulosa pada kayu keras (*hardwood*) dari *Angiospermae* dengan jumlah sekitar 15-30% dari kandungan dinding sel, namun kurang

berlimpah pada kayu lunak (*softwood*) dari *Gymnospermae* yang hanya mencapai 7-12% dari berat kering totalnya, serta pada tumbuhan *graminaceous* tahunan hingga 30% (Singh *et al.*, 2003). Umumnya xilan ditemukan pada dinding sel sekunder tumbuhan, namun juga dapat dijumpai pada dinding sel primer terutama pada monokotil (Wong, *et al.*, 1988).

Struktur xilan sebagai heteropolisakarida kompleks dan multicabang, bervariasi antara spesies tumbuhan yang berbeda. Rantai kerangka utama homopolimer unit-unit β -D-xilopiranosil yang berikatan -1,4- dapat tersubstitusi oleh rantai gugus samping glukopiranosil/glukuronisil (asam α -1,2-D-glukuronat), 4-O-metil-D-glukopiranosil (asam 4-O-metil- α -1,2-D-glukuronat/4-O-MeGlcA), α -1,3-D/L-arabinofuranosil/3-O-arabinosil, 2-O/3-O-asetil, feruloil, dan atau *p*-kumaroil (Jänis, *et al.*, 2005) seperti yang tampak pada gambar 2.1 Asam ferulat dan *p*-kumarat menyusun 1,5% (b/b) dinding sel rerumputan

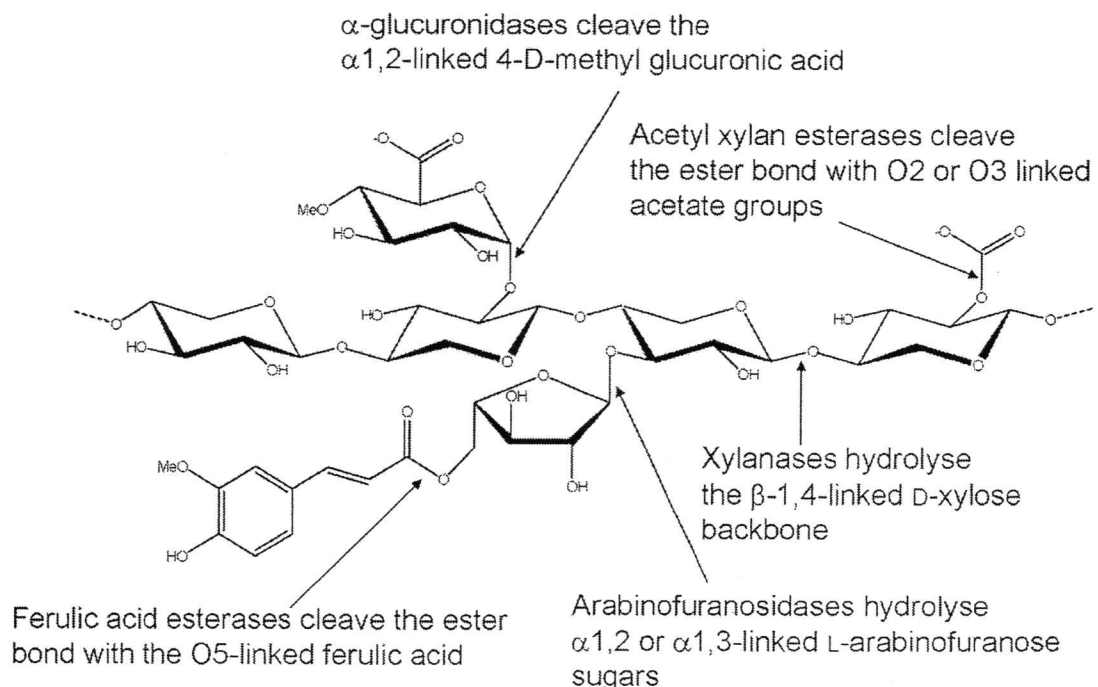


Gambar 2.1 Struktur xilan. (Emami *et al.*, 2008)

2.2 Aktivitas Katalitik Enzim Xilanolitik

Xilan tumbuhan dengan heterogeneitas dan sifat kimianya yang kompleks menyebabkan penguraian sempurna membutuhkan aksi kompleks beberapa enzim hidrolitik dengan spesifitas dan aktivitas (mode aksi) yang berbeda-beda. Hal tersebut tidak

mengejutkan karena sel mampu mendegradasi xilan untuk menghasilkan suatu kumpulan protein yang mendegradasi polimer. Sistem enzim xilanolitik yang menghidrolisis xilan umumnya tersusun atas sekelompok enzim-enzim hidrolitik seperti β -1,4-endoxylanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glukuronidase, asetil xilan esterase, dan asam fenolat (asam ferrulat dan *p*-koumarat) esterase (gambar 2.2). Enzim-enzim tersebut beraksi secara bersama-sama untuk mengubah xilan menjadi gula-gula penyusunnya. Keberadaan sistem enzim xilanolitik multifungsional tersebar luas pada jamur, *actinomycetes*, dan bakteri (Biely *et al.*, 1985). Hidrolisis xilan membutuhkan aksi multiple xilanase yang *overlapping* namun dengan spesifitas berbeda (Wong *et al.*, 1988). Multiplisitas enzim-enzim xilanolitik telah dilaporkan dari beberapa mikroba seperti *Streptomyces* spp. *Aureobasidium pullulans* NRCC Y2311-1, fungi mesofil termofilik (Smith *et al.*, 1991), *Thermoanaerobacterium saccharolythicum*, *Penicillium purpurogenum*, *Melanocarpus albomyces* IIS 68, *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353 dan *Aeromonas caviae* W-61 (Chaudary and Deobagkar, 1997).



Gambar 2.2. Lokasi penyerangan enzim xilanolitik pada substrat xilan (Emami, *et al.*, 2008)

Produksi sistem multienzim xilanase dimana masing-masing enzim memiliki fungsi tertentu adalah salah satu strategi dari suatu mikroba untuk menghidrolisis xilan secara efektif. Selama hidrolisis xilan tersebut, sinergisme dapat ditemui antara enzim yang beraksi pada kerangka utama β -1,4-D-xilan (*endo*- β -1,4-D-xilanase dan *ekso*- β -1,4-D-xilosidase), dan enzim-enzim yang memutuskan rantai samping (α -L-arabinofuranosidase, asetil xilan esterase, dan α -D-glukuronidase). Aksi sinergistik antara asetil xilan esterase dan endoxilanase menyebabkan degradasi xilan terasetilasi yang efisien (Biely *et al.*, 1986). Pelepasan asam asetat oleh asetil xilan esterase akan meningkatkan aksesibilitas kerangka utama xilan terhadap serangan endoxilanase. Endoxilanase menghasilkan polimer terasetilasi yang lebih pendek dan merupakan substrat yang lebih disukai untuk aktivitas esterase (Biely *et al.*, 1986). Menurut Pell *et al.* (2004), untuk degradasi sempurna xilan, rantai samping arabinofuranosil dan asetil dilepaskan dari polisakarida masing-masing oleh arabinofuranosidase dan asetil xilan esterase, sedangkan α -glukuronidase yang melepaskan asam 4-O-metil-D-glukuronat hanya beraktivitas pada xiloöligosakarida dimana xilosa pada rantai akhir non pereduksinya terikat dengan asam uronat.

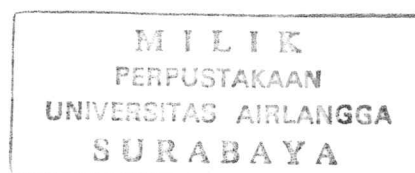
Actinomycete termofilik *Thermomonospora fusca* memiliki aktivitas sistem multienzim endoxilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, dan asetil esterase (Bachmann and McCarthy, 1991). β -xilosidase akan meningkatkan hidrolisis xilan oleh endoxilanase dengan membantu inhibisi produk akhir endoxilanase (Beg *et al.*, 2001). Degradasi xilan oleh xilanase *Bacillus pumilus* IPO menghasilkan xilobiosa, xilotriosa, dan xilotetraosa yang selanjutnya dihidrolisis oleh β -xilosidase 1 menjadi xilosa (Ghose and Bisaria, 1987). Demikian pula dengan penambahan α -arabinofuranosidase terhadap endoxilanase yang akan meningkatkan sakarifikasi arabinoxilan (Beg *et al.*, 2001).

Karakteristik sinergisme dari enzim xilanolitik dalam menghidrolisis *oat-spelt xylan* telah pula dilaporkan pada *Penicillium* sp. AHT-1. Mekanisme hidrolisis diawali oleh enzim

α -L-arabinofuranosidase yang menghidrolisis rantai cabang xilan menghasilkan L-arabinosa dan xilobiosa. Pemutusan rantai cabang ini selanjutnya akan memudahkan hidrolisis kerangka utama xilan oleh enzim xilanase dan β -xilosidase (Rahman *et al.*, 2003).

2.3 Klasifikasi Xilanase

Heterogenitas dan kompleksitas xilan menyebabkan kelimpahan xilanase beragam dengan berbagai kekhasan, urutan primer dan lipatan, sehingga keadaan ini menyebabkan keterbatasan dalam klasifikasi enzim xilanase oleh spesifisitas substrat saja. Wong *et al.* mengklasifikasikan xilanase berdasarkan sifat fisikokimia dan mengusulkan dua kelompok berdasarkan berat molekul (<30 kDa) dan titik isoelektrik (pI) bersifat basa dikelompokkan ke dalam famili 11 dan berat molekul (>30 kDa) dan titik isoelektrik (pI) bersifat asam dikelompokkan ke dalam famili 10. Namun dengan pengelompokan seperti diatas, ada yang tidak terklasifikasikan oleh sistem ini, kemudian sistem klasifikasi lebih lengkap diperkenalkan yang memungkinkan klasifikasi tidak hanya xilanase, tetapi juga kelompok glikosidase (EC 3.2.1.x) yang dapat terklasifikasi. Klasifikasi yang berdasarkan pada perbandingan struktur utama dari domain katalitik dan urutan basa penyusun enzim, kini telah menjadi standar sarana klasifikasi enzim tersebut. Klasifikasi cara ini, pada awalnya dikelompokkan menjadi 6 keluarga (A-F), berkembang menjadi 77 keluarga dan sampai saat ini sudah hampir 125 glikosida hidrolase keluarga yang ada. Kelompok ini dapat dilihat pada enzim karbohidrat-aktif CAZy. Enzim yang termasuk dalam satu kelompok memiliki struktur tiga dimensi dan mekanisme molekular yang sama. Dalam sistem klasifikasi, xilanase biasanya dilaporkan pada famili 10 dan famili 11, namun dengan menggunakan *database* Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) yaitu data aktifitas xilanase dikelompokkan dalam family 5,7,8,16,26,43,52,dan 62, didasarkan pada kemiripan urutan asam amino dan folding protein (Collin,T.,*et al.*,2004)



2.4 Eksoxilanase (EC 3.2.1.X)

Ekso- β -1,4-D-xilanase atau eksoxilanase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan β -1,4-D-xilosa pada kerangka utama xilan untuk menghasilkan xilobiosa pada heteroarabinoxilan (Saha, 2003). Enzim ini mampu memutus rantai polimer xilosa pada ujung non pereduksi, sehingga menghasilkan xilan sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek (Richana, 2002). Reilly (1981) mengklasifikasikan 3 aktivitas β -xilosidase sebagai eksoxilanase karena memiliki aktivitas yang terdeteksi pada xilan. Dua dari enzim tersebut memiliki aktivitas transferase yang rendah dan enzim lain yang menyebabkan inversi konfigurasi (menghasilkan α -D-xilosa selama awal hidrolisis). Eksoxilanase dapat meningkatkan laju hidrolisis xilan melalui penyerangan terhadap xiloöligosakarida besar yang dihasilkan endoxilanase dan yang dihidrolisis secara tidak efektif oleh β -xilosidase. Bentuk sinergisme seperti ini tidak diharapkan untuk meningkatkan hidrolisis yang terjadi kecuali adanya faktor lain yang terlibat seperti aksesibilitas ikatan xilosida pada xiloöligosakarida pendek atau bercabang, reduksi inhibisi produk, ataupun jumlah β -xilosidase ekstraseluler. Mun and Choi (1992) telah melakukan purifikasi dan karakterisasi eksoxilanase dari *Escherichia coli*/plasmid rekombinan pMG1. Berbeda dengan uraian-uraian tersebut, Katapodis *et al.* (2003) dan Puspaningsih (2004) justru menyatakan bahwa *ekso- β -1,4-D-xilanase* sebagai β -xilosidase (EC 3.2.1.37, D-xilan xilanohidrolase).

Ghose and Bisaria (1987) menyatakan bahwa *D-xilanase* potensial bersifat *ekso* maupun *endo*. Fakta yang dijumpai adalah terdapat banyak klaim literatur mengenai eksoxilanase sebagai enzim terpisah, namun beberapa diantaranya sulit dibedakan dari β -D-xilosidase karena keduanya mampu mendegradasi *D-xiloöligosakarida* ($DP \geq 2$) walaupun berdasarkan definisi hanya eksoxilanase yang menyerang xilan. Walaupun eksoxilanase telah dilaporkan diproduksi secara ekstraseluler oleh fungi seperti *Aspergillus* dan *Coniophora*, namun tidak dimurnikan lebih jauh seperti endoxilanase. Kinerja aktivitas eksoxilanase

diketahui bersifat komplikatif berkaitan dengan fakta bahwa produk yang sama akan diperoleh bila enzim preparasi merupakan campuran β -D-xilosidase dan endoxilanase. Oleh karena itu, selain eksoxilanase telah diketahui bersifat homogen, namun karakteristik dan mode aksinya harus diinterpretasikan dengan cermat.

Produk hidrolisis xilan yang dihasilkan oleh eksoxilanase adalah xilooligosakarida rantai pendek, (Usui *et al*, 1999) melaporkan bahwa xylanase IV dari perpustakaan genom *Aeromonas caviae* ME-1 diprediksi mempunyai aktifitas eksoxilanase. Ini ditunjukkan dari profil produk hidrolisis enzim pada substrat xilan menggunakan TLC, yang menunjukkan hasil eksklusif xilotetraosa. Enzim ini juga tidak menghidrolisis substrat *p-nitrophenil* β -D-xylosidase, sehingga enzim xylanase IV tidak menunjukkan aktifitas xilosidase. Eksoxilanase dikelompokkan dalam 3 famili yaitu famili GH10, GH11 dan GH43 (cazy, <http://www.cazy.org/>). Ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 oleh data *base protein* (PDB) dikelompokkan dalam famili 43 berdasarkan kemiripan urutan asam aminonya dan struktur protein.

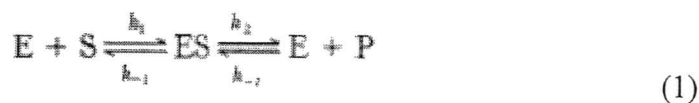
2.5 Kinetika enzim

Kinetika enzim mempelajari kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Kinetika enzim dapat memberikan informasi terhadap mekanisme kerja enzim, peranan enzim di bawah kondisi yang terdapat di dalam sel dan tanggapan atau respon enzim terhadap perubahan konsentrasi metabolit serta memperlihatkan bagaimana aktifitas dapat dikendalikan

Data kinetika reaksi dilakukan melalui percobaan bertujuan untuk menentukan kecepatan pembentukan produk atau berkurangnya substrat dengan reaksi enzimatik dalam kondisi tertentu. Kecepatan enzim dapat dilakukan dalam berbagai cara seperti metode *stop and sample* (*discountinuous*) yaitu menghentikan kerja enzim dengan menambahkan suatu senyawa dan ditentukan jumlah produk yang terbentuk. Dalam metode ini sangat diperlukan

kromatografi untuk pemisahan produk dengan substrat. Metode kedua yaitu metode *continuous*, penentuan terus menerus dari beberapa perubahan sifat selama reaksi berlangsung. Metode ini dapat dilakukan dengan menggabungkan dengan senyawa tertentu dan mengamati perubahan absorbansi. Setelah metode penentuan sudah diputuskan maka ada beberapa hal penting yang harus diperhatikan seperti substrat, buffer dan sebagainya harus mempunyai kemurnian tinggi, enzim yang digunakan dalam keadaan stabil, artinya tidak kehilangan aktifitas enzim selama waktu yang dipakai dan parameter-parameter pH dan suhu sudah dipastikan.

Analisis kinetika enzim dipandang dari model teoritis, kemudian kebenaran model diuji dan melalui persamaan yang diperoleh dari model ditarik kesimpulan nilai tetapan konstansta. Secara teori reaksi antara enzim substrat terjadi secara reversible selanjutnya kompleks ES pecah menjadi enzim dan produk, seperti reaksi di bawah ini



$k_{-2} \llll k_2$ (laju penguraian kompleks ES jauh lebih rendah daripada laju pembentukannya)

Penentuan kecepatan reaksi enzimatis dapat diselesaikan dengan dua pendekatan, yaitu (1) pendekatan kesetimbangan, dan (2) pendekatan keadaan tunak (*steady state*).

(1) Pada pendekatan kesetimbangan:

Reaksi pembentukan produk dari kompleks ES merupakan tahap penentu laju reaksi (tahap paling lambat). Tetapan pembentukan kompleks ES, K_S adalah:

$$K_1 = \frac{[ES]}{[E][S]} \rightarrow \text{tahap ini tahap cepat, sehingga segera mencapai kesetimbangan}$$

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (2)$$

$$[E_{\text{tot}}] = [E] - [ES] \quad \text{atau}$$

$$[E] = [E_{\text{tot}}] - [ES] \quad (3)$$

Penyusunan ulang persamaan (1) dan substitusi persamaan (3) dihasilkan :

$$[ES] = \frac{K_1 [E_{tot}] [S]}{(1 + K_1 [S])} \quad (4)$$

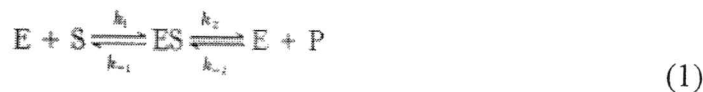
Substitusi persamaan (4) pada (2):

$$V = \frac{k_2 [E_{tot}] [S]}{\left(\frac{1}{K_1} + [S] \right)} \quad V = k_2 \frac{K_1 [E_{tot}] [S]}{(1 + K_1 [S])}$$

$$V = \frac{V_{max} [S]}{(K_M + [S])} \quad \dots\dots\dots \text{pers. Michaelis-Menten}$$

(2) Pada pendekatan keadaan tunak (*steady state*):

Digunakan kondisi yang tidak berubah, yaitu konsentrasi senyawa antara ([ES]).



$k_{-2} \lllll k_2$ (laju penguraian kompleks ES jauh lebih rendah daripada laju pembentukannya)

Prinsip: laju pembentukan senyawa antara sama dengan laju penguraiannya

$$d[ES]/dt = - d[ES]/dt \quad (2)$$

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] + k_{-2}[E][P] \quad (3)$$

$$\text{karena } k_{-2} \lllll k_2, \text{ maka } k_{-2}[E][P] = 0$$

$$- d[ES]/dt = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (4)$$

$$[E_{tot}] = [E] - [ES]$$

$$[E] = [E_{tot}] - [ES] \quad (5)$$

Dengan mensubstitusi persamaan (5), (4), (3) pada persamaan (2), akan diperoleh:

$$k_1([E_{tot}] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6)$$

$$[ES] = \frac{k_1[E_{tot}][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (7)$$

$$[ES] = \frac{[E_{tot}][S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1} \quad (8)$$

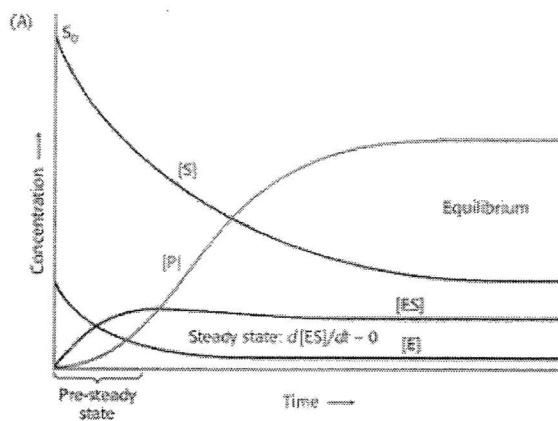
$$V = k_2[ES]$$

$$V = \frac{k_2[E_{tot}][S]}{\frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1} + [S]} \quad (9)$$

$$V = \frac{V_{max} [S]}{(K_M + [S])} \quad \dots\dots\dots \text{pers. Michaelis-Menten}$$

di mana:

$$K_1 = \frac{[ES]}{[E][S]} \quad ; \quad K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

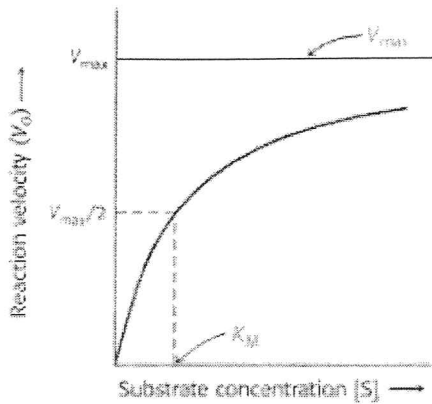


Gambar 2.3 Perubahan konsentrasi reaktan suatu reaksi enzimatik terhadap waktu

Pada kedua pendekatan diatas sangat sulit untuk batasan nilai V (V_{maks}) secara langsung dari plot v terhadap $[S]$, sehingga K_m tidak dapat ditentukan secara langsung. Untuk mengatasi masalah ini maka digunakan beberapa persamaan

Berdasarkan Persamaan Lineweaver Buck

- a. Berdasarkan persamaan Michaelis-Menten: dibuat kurva antara V dan S .



Gambar 2.4 Kurva kinetika Michaelis-Menten: hubungan antara kecepatan reaksi (V) dan konsentrasi substrat ($[S]$)

Kurva kinetika Michaelis-Menten membentuk orde 1 pada $[S]$ rendah, orde 2 pada $[S]$ tinggi dan jenuh, dan pseudo-order di antaranya. Pada saat $[S]$ tinggi atau jenuh, semua sisi aktif enzim telah mengikat substrat, tidak ada sisi aktif enzim yang masih kosong, sehingga akan diperoleh V_{\max} . Pada saat $V = \frac{1}{2} V_{\max}$, maka $[S] = K_M$. K_M adalah parameter khas suatu enzim.

b. Berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk

Persamaan ini adalah resiprokal ganda dari persamaan Michaelis-Menten, yaitu dengan melakukan resiprokal pada kedua sisi persamaan Michaelis-Menten, sebagai berikut:

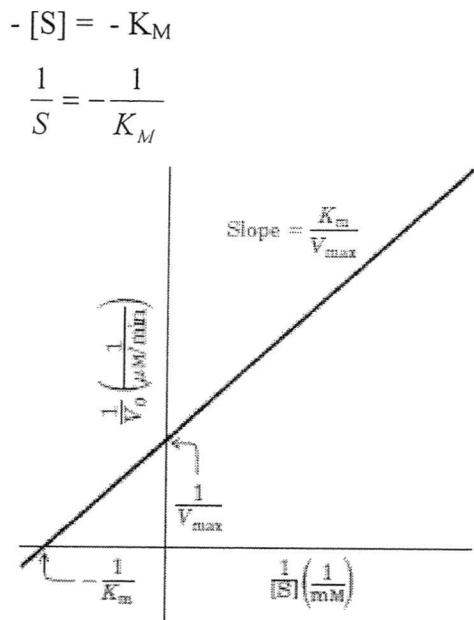
$$\begin{aligned} \frac{1}{V_0} &= \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \\ \frac{1}{V_0} &= \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} \\ \frac{1}{V_0} &= \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \dots\dots\dots \text{Pers. Lineweaver-Burk} \end{aligned}$$

Dengan membuat kurva $1/V$ versus $1/[S]$ (gambar 2.5), persamaan ini dapat diselesaikan dan nilai K_M dan V_{\max} dapat ditentukan.

Pada saat $1/[S] = 0$, diperoleh $1/V = 1/V_{\max}$.

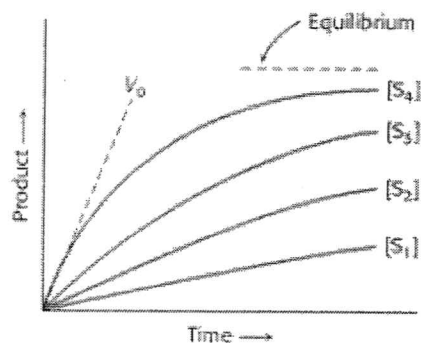
Pada saat $1/V = 0$,

$$\begin{aligned} 0 &= \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \\ -\frac{1}{V_{\max}} &= \frac{K_M}{V_{\max} [S]} \end{aligned}$$



Gambar 2.5 Kurva Lineweaver-Burk: hubungan antara $1/V$ thd $1/[S]$

Pada percobaan, nilai K_M dan V_{max} hanya ditentukan untuk enzim yang telah murni (kemurnian 98%). Hal ini penting karena parameter tersebut sangat khas untuk setiap enzim. Oleh karenanya jika enzim belum murni, maka parameter tersebut memiliki arti atau makna yang ambigu, tidak mencerminkan karakter khas dari enzim yang diteliti.



Gambar 2.6 Penentuan kecepatan awal pada berbagai konsentrasi

Pada prakteknya, penentuan parameter K_M dan V_{max} dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode (i) *initial rate* dan (ii) laju sesaat. Pada metode (i) dilakukan percobaan pengukuran aktivitas enzim pada minimal 5 variasi konsentrasi substrat (gambar 2.6). Aktivitas enzim dapat ditentukan berdasarkan pengukuran konsentrasi substrat atau pembentukan produk. Pengamatan aktivitas enzim dilakukan setiap

selang waktu tertentu selama waktu tertentu (misal, setiap 10 detik selama 2 menit pertama). Selanjutnya dibuat kurva hubungan aktivitas terhadap konsentrasi substrat, akan diperoleh 5 grafik. Untuk masing-masing grafik ditentukan aktivitas pada saat 0 detik, yang menyatakan laju awal (V_0), yaitu dengan menginterpolasi masing-masing grafik yang diperoleh pada sumbu Y (sumbu aktivitas). Setelah itu dibuat kurva Michaelis-Mentennya, hubungan antara V_0 dan $[S]$.

Pada metode (ii), dilakukan percobaan serupa, namun inkubasi berbagai konsentrasi substrat dilakukan selama selang waktu yang sama (misal, 10 menit). Setelah itu, dihitung kecepataannya, yaitu $d[P]/dt \rightarrow (\text{Abs pada } t = 10 \text{ menit}) / 10 \text{ menit} = V_0$ (satuan: $\text{Abs} \cdot \text{menit}^{-1}$). Selanjutnya dengan cara yang sama, yaitu dengan membuat kurva Michaelis-Mentennya, dapat ditentukan nilai parameter K_M dan V_{\max} .

Arti fisik besaran K_M , k_{cat} dan k_{cat}/K_M

1. K_M : menyatakan konsentrasi substrat yang diperlukan agar reaksi katalisis efektif dan sering dihubungkan dengan affinitas enzim terhadap substrat

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Jika nilai : $k_2 \ll k_{-1}$, maka menghasilkan $K_M = k_{-1}/k_1 = K_S$. jika K_M besar, berarti k_{-1} lebih besar dari k_1 , artinya enzim berikatan dengan substrat lemah, namun jika nilai k_2 besar, maka K_M juga ikut besar, ini berarti nilai K_M besar, namun jika dihubungkan dengan dengan persamaan Michaelis Menten, K_M adalah sama dengan konsentrasi substrat ($K_M = [S]$) pada kecepatan setengah kecepatan maksimum ($v = \frac{1}{2} V_{\max}$), maka K_M adalah mengukur konsentrasi substrat yang diperlukan untuk reaksi katalis berlangsung dengan efektif. Enzim dengan nilai K_M tinggi diperlukan konsentrasi substrat besar untuk mencapai kecepatan reaksi dibandingkan dengan enzim yang mempunyai nilai K_M rendah.

cara pengakhiran rantai oleh F. Sanger, serta cara degradasi kimiawi oleh Maxam dan Gilbert (Brown, 2006).

Cara terminasi atau pengakhiran rantai memerlukan DNA untai tunggal sebagai cetaknya. Molekul yang akan disekuensing biasanya diklon ke dalam vektor M13, karena cara terminasi rantai melibatkan sintesis enzimatik untai DNA kedua yang komplementer terhadap cetakan yang ada. Langkah pertama adalah penggabungan primer ke dalam molekul M13 rekombinan. Primer ini bertindak sebagai titik permulaan reaksi sintesis untai komplemen yang dikatalisis oleh fragmen Klenow polymerase DNA I. Reaksi sintesis untai DNA dimulai dengan penambahan polymerase Klenow dan masing-masing dari keempat deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Selain itu, ditambahkan pula nukleotida yang dimodifikasi, yang disebut dideoksinukleotida, misalnya dideoksi ATP (ddATP). Nukleotida ini menyebabkan penghentian sintesis untai selanjutnya karena dideoksi tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 3' komponen gula. Gugus ini diperlukan untuk perlekatan nukleotida berikutnya dan oleh karena itu terminasi rantai terjadi jika dideoksinukleotida digabungkan oleh enzim pada polinukleotida yang sedang tumbuh.

Reaksi sintesis untai dilakukan empat kali secara paralel. Hasilnya akan merupakan empat kelompok polinukleotida baru yang berbeda. Satu kelompok akan mengandung untai yang berakhir pada ddATP, satu untai berakhir pada ddTTP, dan seterusnya. Langkah selanjutnya adalah memisahkan komponen tiap-tiap kelompok sehingga panjang tiap untai dapat ditentukan. Hal ini dapat dilakukan dengan elektroforesis gel poliakrilamid.

Pada metode kimiawi oleh Maxam-Gilbert, diperlukan fragmen DNA untai ganda, sehingga tidak memerlukan kloning ke dalam vektor M13. Selain itu tidak dibutuhkan primer karena dasar metode ini bukan sintesis untai baru, melainkan pemotongan molekul DNA yang ada menggunakan reagen kimia yang bekerja secara spesifik pada nukleotida tertentu. Fragmen DNA untai ganda yang akan ditentukan urutannya mula-mula dilabel menggunakan gugus fosfor radioaktif pada ujung 5' tiap untai, kemudian ditambahkan dimetil sulfoksid dan sampel DNA yang dilabel dipanaskan sampai 90°C. Hal ini menyebabkan putusya untai molekul DNA menjadi dua untai. Kedua untai saling dipisahkan dengan elektroforesis gel yang bekerja atas dasar bahwa, salah satu untai akan lebih banyak mengandung nukleotida purin daripada nukleotida yang lain dan oleh karena itu akan lebih berat. Untai yang berat dimurnikan dari gel dan dibagi menjadi lima sampel kemudian diberi reagen pemotong. Reagen pertama yang ditambahkan menyebabkan modifikasi nukleotida yang spesifik terhadap reagen tersebut, sehingga untai mudah terpotong pada nukleotida ini pada waktu penambahan piperidin. Setelah elektroforesis, pita-pita yang terlihat dengan autoradiografi akan menunjukkan fragmen-fragmen yang dilabel tersebut. Ukuran nukleotida kemudian dapat dibaca dari autoradiograf (Brown, 2006).

BAB 3**KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN**

β -xilosidase adalah salah satu kelompok enzim xilanolitik yang berperan penting pada proses hidrolisis xilan. Xilan merupakan komponen utama penyusun hemiselulosa, yang banyak terdapat pada limbah hutan dan pertanian. Enzim ini bekerja secara sinergis dengan endo- β -xilanase, ekso-xilanase, dan α -L-arabinofuranosidase, yaitu menghidrolisis xilobiosa dan sejumlah kecil xilooligosakarida, hasil hidrolisis enzim xilanolitik lainnya, menjadi D-xilosa. D-xilosa merupakan produk hidrolisis xilan yang banyak digunakan di industri makanan maupun farmasi. Pada pemanfaatannya kelompok enzim yang memiliki kestabilan tinggi, baik terhadap suhu maupun pH, lebih diminati dan memiliki nilai jual lebih tinggi.

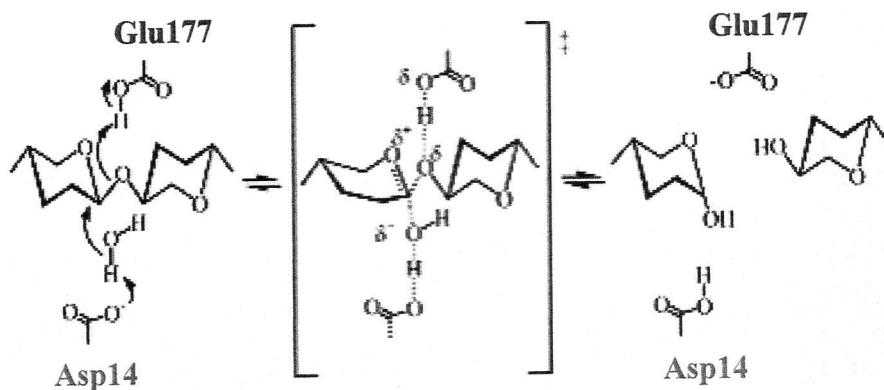
Gen penyandi β -D-xilosidase (*xyl*) dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 telah berhasil diklon ke plasmid pTP510 dalam *E. coli* DH5 α . Selanjutnya gen *xyl* tersebut berhasil diklon dan diekspresi tinggi dalam sistem pET101/D-TOPO dalam inang *E. coli* BL21 star (DE3). Enzim rekombinan yang dihasilkan memiliki kelebihan dapat diproduksi secara konstitutif pada suhu pertumbuhan sel inang (37°C), dan tetap mampu menunjukkan aktivitas optimum pada suhu 50°C, namun masih bersifat labil terhadap alkali (aktivitas optimum pada pH 6) (Puspaningsih *et al.*, 2004, 2007). Dibandingkan dengan α -L-arabinofuranosidase dari sumber yang sama, yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 70°C, kestabilan terhadap suhu dari enzim β -xilosidase yang dihasilkan masih tergolong rendah.

Purwadi (2009) telah memproduksi mutan D139N dari enzim ini dalam rangka meningkatkan kestabilannya terhadap basa. Namun upaya ini hanya mampu menggeser pH optimum β -xilosidase satu unit saja, dari pH 6 menjadi pH 7, dengan aktivitas optimum tetap pada suhu 50°C. Oleh karenanya, masih diperlukan upaya untuk meningkatkan kestabilan β -xilosidase yang diekspresikan oleh sistem pET101/D-TOPO dalam inang *E. coli* BL21 (DE3 star).

Pada penelitian ini akan dilakukan upaya peningkatan kestabilan β -xilosidase dari sistem pET101/D-TOPO rekombinan melalui mutasi terarah dengan PCR, berdasarkan desain rasional. Desain rasional dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan teknik bioinformatika dan pemodelan protein, dengan memperhatikan beberapa faktor penentu kestabilan enzim terhadap basa. Informasi mengenai faktor-faktor penentu kestabilan enzim terhadap basa diperoleh dari beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, terhadap xilanase dari berbagai sumber mikroorganisme.

β -xilosidase yang digunakan pada penelitian ini termasuk kelompok enzim GH 43. Enzim ini memiliki residu katalitik Asp14 sebagai basa umum, Glu177 sebagai asam umum, serta Asp121 sebagai modulator pKa umum dan penentu arah yang tepat terhadap substrat. Mekanisme reaksi katalisis xilan oleh β -xilosidase kelompok GH43 berdasarkan inversi pusat anomerik dengan melibatkan residu katalitik aspartat dan glutamat dengan reaksi penggantian tunggal (Gambar 3.1). Gugus karboksil pertama, Glu177, berfungsi sebagai asam umum yang mengkatalisis pelepasan gugus pergi aglikon, dengan cara memprotonasinya. Gugus karboksil kedua, Asp14, berfungsi sebagai asam umum, yang mengaktivasi molekul air nukleofilik untuk menyerang karbon anomerik, sehingga

memutus ikatan glikosidik dan menyebabkan inversi konfigurasi pada karbon anomerik (Brüx *et al.*, 2006, Collins *et al.*, 2005).

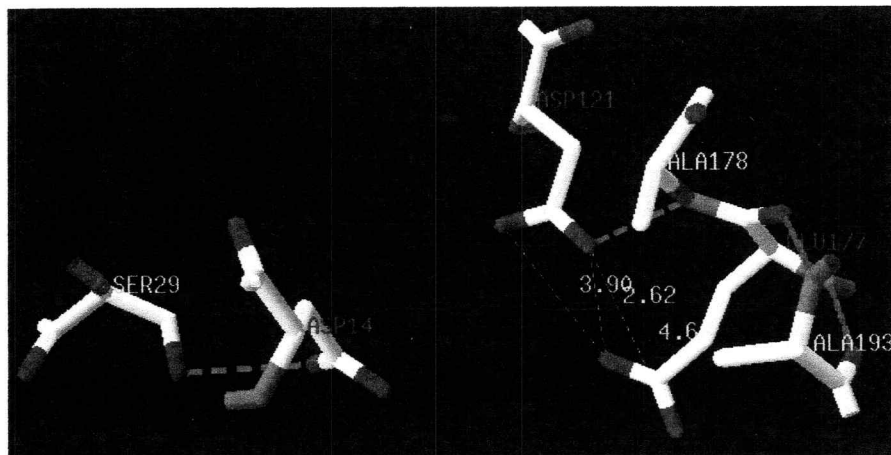


Gambar 3.1 Mekanisme umum reaksi inversi β -xilidase GH43

Residu Asp14 dan Glu 177 merupakan residu asam amino bersifat asam, dengan pKa berturut-turut 3,65 dan 4,25 (Lehninger, 2000). Pada pH optimum enzim, yaitu pH 6,0, kedua residu ini akan terionisasi menjadi ion bermuatan negatif, sesuai persamaan $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{COO}^-$. Hal ini bersifat logis untuk residu Asp14, yang pada mekanisme katalisis enzimatik β -xilidase dengan substrat berfungsi sebagai basa umum, yaitu mengaktifasi molekul air untuk bertindak sebagai nukleofilik yang menyerang atom karbon anomerik. Namun demikian, ionisasi residu Glu177 pada pH 6,0 bersifat tidak logis, karena residu ini berperan sebagai asam yang mendonorkan protonnya untuk memprotonasi aglikon sebagai gugus pergi. Dengan mengurangi keasaman sisi katalitik, yaitu keasaman daerah sekitar residu Glu177, maka kemampuan residu Glu177 sebagai pendonor proton berkurang, sehingga membutuhkan pH lebih tinggi (pH optimum enzim lebih tinggi) untuk mengembalikan fungsi Glu177 sebagai asam atau donor proton.

Berdasarkan analisis terhadap model β -xilidase dengan menggunakan program Swiss PDB Viewer atau DeepView, dapat diketahui residu-residu di sekitar residu katalitik yang berinteraksi dengan residu katalitik dan mungkin mempengaruhi reaksi

katalisis enzim dengan substrat. Residu-residu tersebut adalah Ala193 yang membentuk dua ikatan hidrogen dengan residu Glu177, residu Ala178 yang membentuk satu ikatan hidrogen dengan Asp121, serta residu Ser29 yang membentuk satu ikatan hidrogen dengan residu Asp14 (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Residu-residu katalitik model β -xilosidase GH43 dan tetangganya
(program Swiss PDB Viewer)

Pada gambar 3.2 juga diperlihatkan residu terdekat dengan residu Glu177 adalah residu Asp121, dengan jarak 2,62 Å. Dengan demikian, residu Asp121 adalah residu yang berperan penting dalam menyumbangkan proton ke residu Glu177, sehingga Glu177 tetap terprotonasi pada pH optimum enzim yang lebih besar daripada pKa glutamat,, dan tetap dapat berfungsi sebagai asam pada reaksi enzim-substrat. Hal ini didukung oleh hasil eksplorasi β -xilosidase kelompok GH43 dari *Geobacillus stearothermophilus* (Brüx *et al.*, 2006). Selain itu, residu Asp128 enzim ini, yang analog dengan residu Asp121 pada β -xilosidase kelompok GH43 dari *Geobacillus thermoleovorans*, memiliki fungsi sebagai pengarah orientasi enzim terhadap substrat dan juga berperan dalam pengikatan substrat melalui 2-O glikon.

Dalam rangka meningkatkan kestabilan β -xilosidase terhadap pH, maka pada penelitian ini akan dilakukan mutasi terarah terhadap gen penyandi enzim tersebut. Asam amino yang akan dimutasi adalah residu yang mempengaruhi keasaman sisi katalitik, yaitu residu Asp121. Residu ini akan dimutasi menjadi beberapa residu asam amino lainnya, yaitu asparagin, glutamat, leusin, dan threonin (Gambar 3.3).

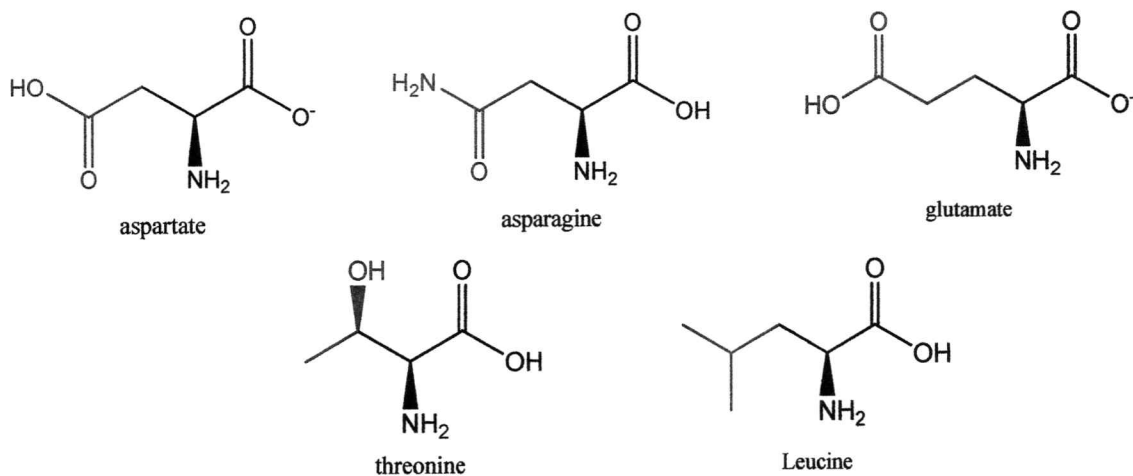
Asparagin memiliki rantai samping yang sama dengan aspartat, namun bermuatan netral. Dengan menggunakan program DeepView, dapat diprediksikan bahwa dengan bergantinya gugus $-OH$ menjadi gugus NH_2 , maka akan terbentuk ikatan hidrogen baru antara atom O dari Glu177 dengan atom H dari gugus NH_2 residu Asn, dan jarak antar residu berkurang menjadi 2,47 Å. Namun demikian keelektronegatifan atom N lebih rendah dibandingkan atom O, sehingga kecenderungan atom N untuk memprotonasi (mendonorkan protonnya) ke atom O residu Glu177 lebih rendah. Dengan demikian residu Glu177 akan semakin sulit terprotonasi, sehingga dibutuhkan suasana pH lebih tinggi untuk memprotonasi residu ini, atau dengan kata lain pH optimum enzim akan bergeser ke suasana lebih basa.

Sasaran mutasi yang kedua adalah Asp121 menjadi Glu121. Berdasarkan pemodelan dengan program DeepView, diperkirakan jarak antara gugus $-OH$ Glu121 dengan atom O karboksilat Glu177 menjadi lebih pendek, yaitu dari 2,62 Å menjadi 2,38 Å, sehingga residu Glu177 menjadi semakin mudah terprotonasi. Dengan demikian pH optimum enzim diperkirakan bergeser ke suasana lebih asam.

Mutasi Asp121 menjadi Thr121, menyebabkan jarak antar residu 121 dengan Glu177 menjadi lebih panjang, yaitu 3,64 Å. Akibatnya residu Glu177 menjadi lebih sulit

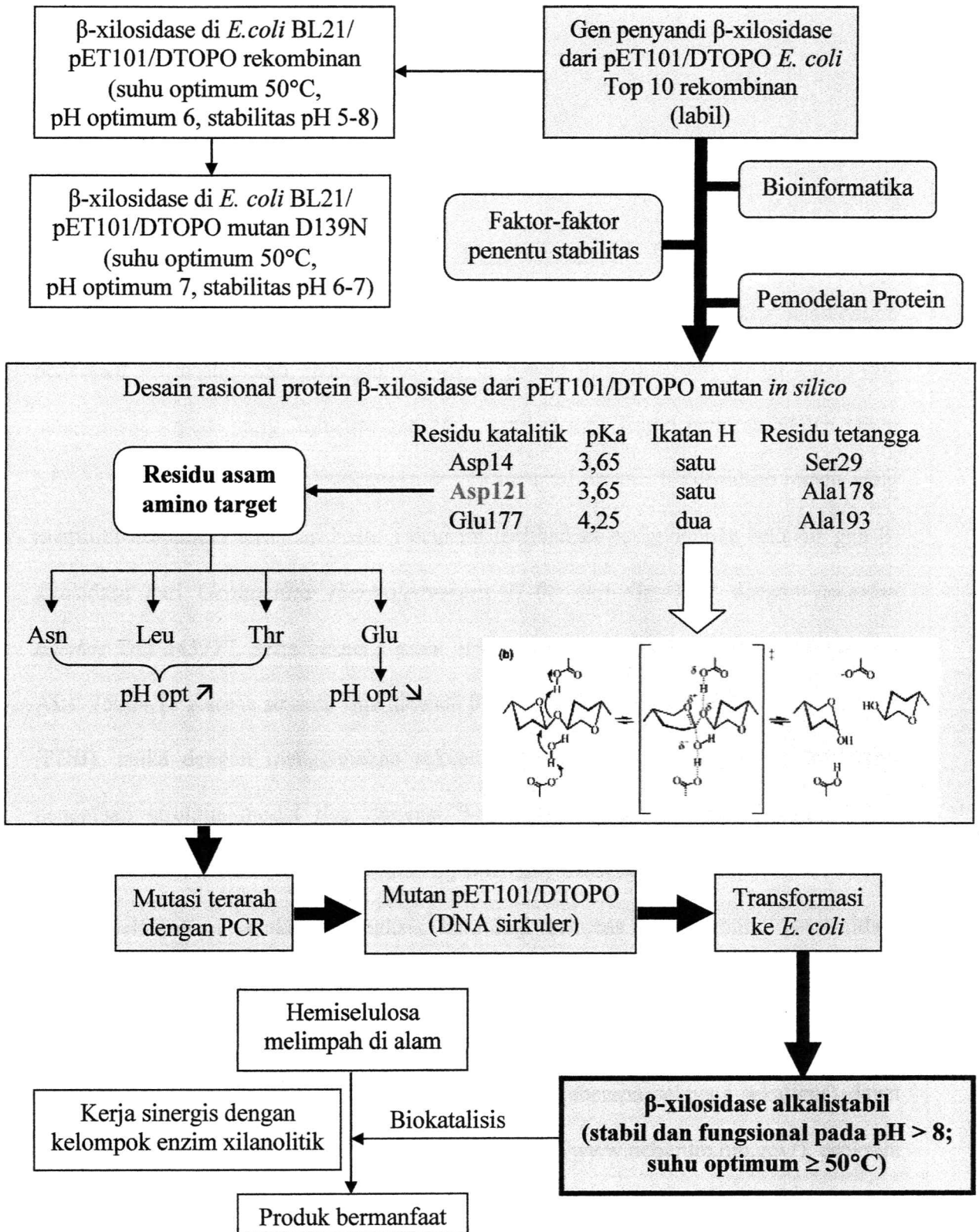
untuk terprotonasi dibandingkan tipe aslinya. Oleh karena itu diperkirakan pH optimum enzim diperkirakan bergeser ke suasana lebih basa.

Mutan keempat adalah Asp121 menjadi Leu121. Leusin adalah residu asam amino yang bersifat non polar, tidak memiliki atom O atau atom lain yang bersifat elektronegatif. Dengan demikian residu leusin diperkirakan tidak mampu memprotonasi residu Glu177, dan diperkirakan pH optimum akan bergeser ke suasana basa, namun aktivitas enzim akan berkurang dibandingkan tipe aslinya.



Gambar 3.3 Residu asam amino sasaran dan target mutasi pada β -xilosidase

Berdasarkan hasil desain rasional secara *in silico*, dilakukan mutasi terhadap gen penyandi β -xilosidase dari sistem pET101/D-TOPO rekombinan dengan menggunakan PCR. Produk PCR adalah suatu DNA mutan yang berbentuk sirkuler, yang selanjutnya ditransformasikan ke *E. coli* BL21 (DE3 star). Selanjutnya, dilakukan karakterisasi terhadap suhu dan pH optimum, serta kestabilan terhadap suhu dan basa dari β -xilosidase yang dihasilkan. Kerangka konseptual penelitian dapat dilihat pada bagan dalam Gambar 3.4 di bawah ini.

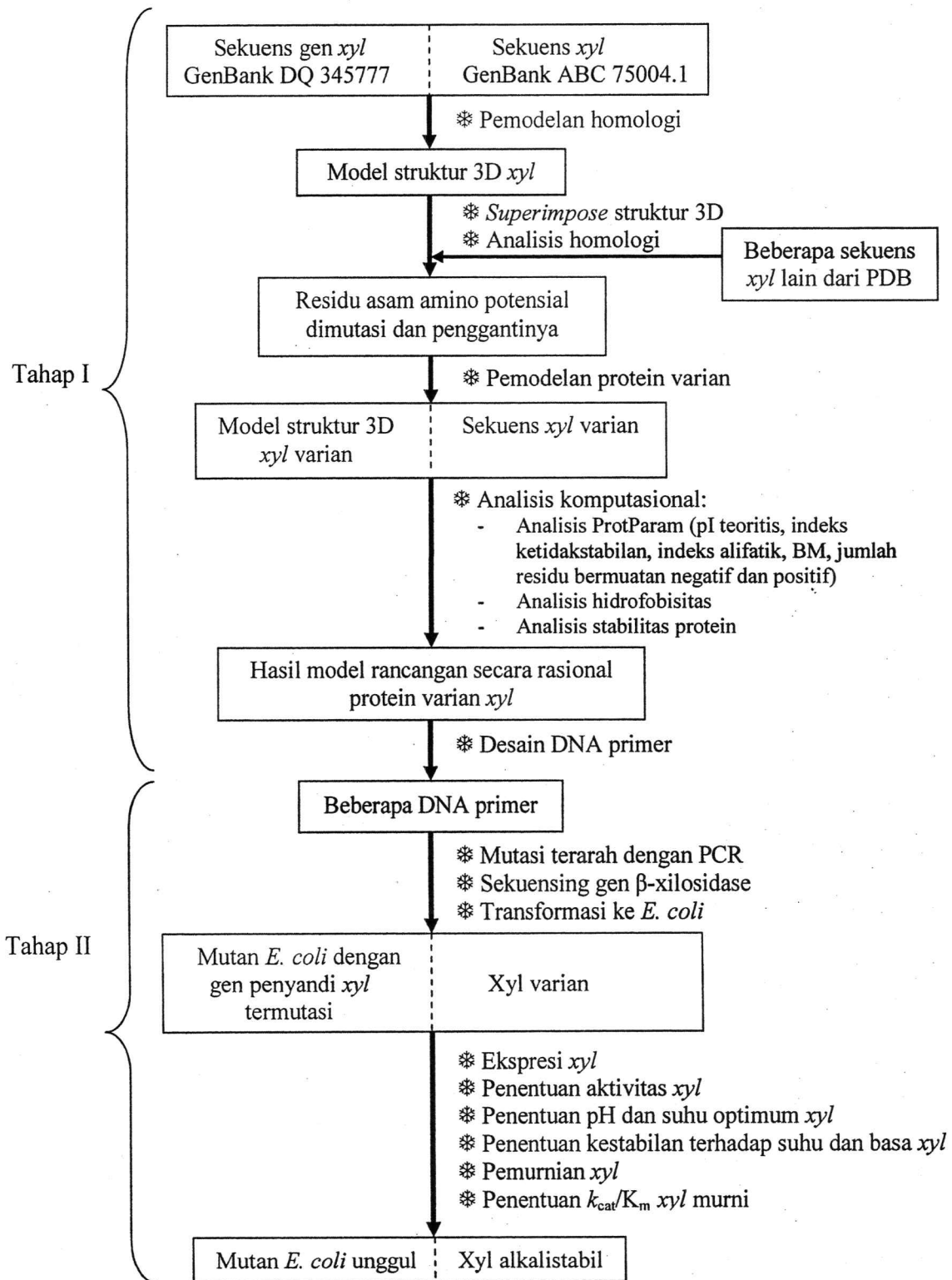


Gambar 3.4 Skema kerangka konseptual penelitian (Catatan: bagian yang akan diteliti diberi warna biru)

BAB 4**MATERI DAN METODE PENELITIAN****4.1 Kerangka Operasional Penelitian**

Kerangka operasional penelitian, skema kerja umum dan skema kerja detail dalam penelitian ini ditunjukkan pada gambar 4.1 di bawah ini. Penelitian dibagi dalam dua tahap besar seperti yang diilustrasikan pada gambar 4.1. Tahap pertama adalah tahap laboratorium kering, yaitu perancangan secara rasional protein β -xilosidase mutan yang memiliki kestabilan terhadap basa. Tahap ini melibatkan pengunduhan sekuens gen β -xilosidase dari *Geobacillus thermoleovorans IT-08* dari GenBank dengan *accession number* DQ 345777, serta sekuens asam amino β -xilosidase dengan *accession number* ABC 75004.1. Karena struktur tiga dimensi β -xilosidase belum ada di Protein Data Bank (PDB), maka dengan menggunakan sekuens asam amino yang diperoleh dilakukan penentuan struktur model tiga dimensi β -xilosidase tersebut dengan menggunakan program *on-line* SwissProt atau program *off-line* Easy Modeller.

Selanjutnya dilakukan analisis homologi sekuens asam amino β -xilosidase terhadap beberapa sekuens asam amino β -xilosidase dari sumber mikroorganisme lainnya, yang diperoleh dari PDB. Analisis homologi (*alignment*, baik membandingkan hanya sepasang sekuens, maupun membandingkan beberapa sekuens sekaligus) dapat dilakukan dengan BLAST (program *online* dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), program Clone Manager, atau program BioEdit. *Superimpose* dan analisis struktur tiga dimensi protein, dapat dilakukan dengan menggunakan program Pymol serta Swiss PDB Viewer / DeepView.



Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian

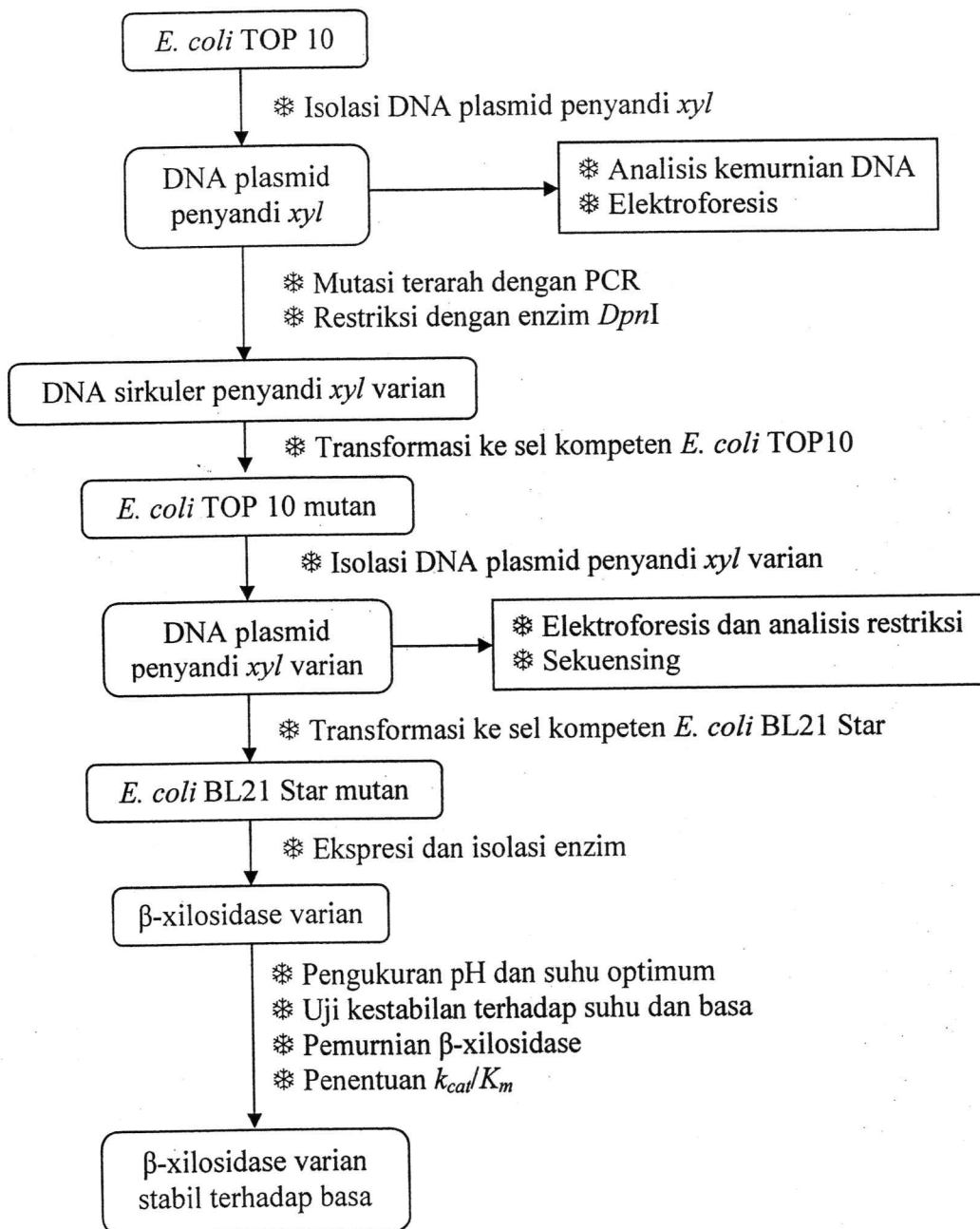
Berdasarkan hasil analisis homologi, dan dengan memperhatikan beberapa faktor penentu stabilitas protein terhadap suhu maupun pH, maka dapat ditentukan residu asam amino yang potensial untuk dimutasi, dengan menggunakan teknik mutasi terarah - PCR. Proses mutasi secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan program Swiss PDB Viewer (SPDBV atau DeepView). Dengan program ini pula dapat dilakukan minimasi energi untuk memperoleh model mutan yang dikehendaki dengan energi minimal atau stabil.

Selain itu dilakukan pula analisis *in silico* terhadap protein varian hasil mutasi, yang meliputi:

1. analisis sifat-sifat fisika protein (pI teoritis, indeks ketidakstabilan, indeks alifatik, BM, jumlah residu bermuatan negatif dan positif), dengan program *online* ProtParam;
2. prediksi hidrofobisitas protein, misalnya melalui <http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydrophaty/>;
3. prediksi ikatan disulfida, melalui <http://disulfind.dsi.unifi.it/>;
4. prediksi kestabilan protein, melalui <http://eris/dokhlab/org> (harus registrasi dulu dan perlu file PDB protein yang dianalisis) atau <http://foldx.crg.es/> (untuk protein yang memiliki ikatan disulfida).

Setelah diperoleh rancangan protein varian, langkah selanjutnya adalah mendesain beberapa primer yang diperlukan untuk melakukan proses mutasi terarah pada beberapa lokasi residu asam amino. Desain primer dilakukan dengan program Clone Manager.

Tahap kedua pada penelitian ini adalah tahap mutasi terarah berdasarkan rancangan yang telah disiapkan pada tahap pertama. Tahapan kerja pada tahap kedua ini diilustrasikan pada gambar 4.2 berikut.



Gambar 4.2 Skema kerja tahap II

4.2 Rancangan Penelitian

Untuk menjawab rumusan masalah, dilaksanakan penelitian yang terdiri dari dua tahapan, seperti diuraikan pada awal bab ini. Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorium (deskriptif eksploratif).

4.3 Bahan Penelitian

4.3.1 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai kualitas pro-analisis (p.a) dan biologi molekuler.

4.3.2 Galur, Plasmid dan Media Pertumbuhan

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *E. coli* strain TOP10 yang mengandung plasmid penyandi β -xilosidase (*xyI*) rekombinan sistem pET101/DTOPO dari penelitian sebelumnya (Puspaningsih, 2003) serta *E. coli* strain BL21 Star (DE3). Pertumbuhan *E. coli* dilakukan pada media Luria Bertani (LB) cair dengan komposisi *bacto-triptone* 1% (b/v), *yeast extract* 0,5% (b/v), dan NaCl 1% (b/v). Media LB padat memiliki komposisi yang sama seperti LB cair dengan penambahan *bacto-agar* 2% (b/v).

4.4 Alat Penelitian

Di dalam penelitian ini digunakan berbagai alat gelas dan instrumen yang umum digunakan di laboratorium biokimia dan biologi molekuler. Beberapa instrumen yang digunakan pada penelitian ini antara lain: *microcentrifugator* (Jouan, A-14), *micropipet* (Gilson) (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L), *vortex* (Labinco, L46), *thermal cycler* (Bio Rad,

10431), seperangkat alat elektroforesis agarosa (Gibco, 250), *UV transluminator* (Bio Rad, 465BR), *waterbath* (Gemmyco, YCW-010), *shaker incubator* (Sibata, RMS-225), *laminar air flow cabinet* (Dalton, PAU-850BG), kawat ose, mesin sekuenser (*Applied Biosystems, ABI PRIMS 310*), labu Erlenmeyer (*Pyrex*), pH meter (*Metrohm, 713*), *microtube* (Eppendorf) (1 mL, 0,5 mL), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, A1005).

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Persiapan Penelitian Tahap II

a. Pembuatan media inokulum untuk tahap isolasi DNA plasmid penyandi *xyI*

NaCl sebanyak 1 gram, 1 gram tripton, 0,5 gram *yeast extract*, ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Campuran ditambahkan aquades 100 ml kemudian ditutup lalu disterilisasi dengan autoclaf.

b. Persiapan primer untuk PCR *Site-directed mutagenesis*

Dilakukan pengenceran primer dari stok primer dengan konsentrasi 100 μ M menjadi larutan kerja dengan konsentrasi 0,5 μ M.

c. Pembuatan dapar dan gel agarosa untuk elektroforesis

c.1. Pembuatan dapar TBE 5X pH 8

Tris sebanyak 54 gram, 27,7 gram asam borat, dan 3,722 gram Na₂EDTA ditimbang, kemudian dicampur dalam gelas beker 1 liter, selanjutnya dilarutkan dengan 1 liter aquades, cek pH 8,00.

c.2. Pembuatan dapar TBE 0,5X pH 8

Dapar TBE 5X dipipet sebanyak 1 mL kemudian diencerkan dengan aquades sebanyak 19 mL, sehingga total volume menjadi 20 mL.

c.3. Pembuatan gel agarosa

Agarosa sebanyak 0,2 gram ditimbang kemudian dilarutkan dengan penambahan 20 ml dapar TBE 0,5X sambil dipanaskan sampai bubuk agarosa larut sempurna. Larutan agarosa dituang ke dalam cetakan dan ditunggu sampai memadat.

d. Pembuatan media untuk proses transformasi

d.1. Pembuatan media LB (Luria Bertani)

Sebanyak 1 gram NaCl, 1 gram tripton, 0,5 gram *yeast extract* ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Campuran ditambah aquades 100 ml kemudian ditutup dan disterilisasi dengan autoclaf.

d.2. Pembuatan media padat

Sebanyak 1 gram NaCl, 1 gram tripton, 0,5 gram *yeast extract*, dan 2 gram *bacto agar* ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Pada campuran ditambahkan aquades 100 ml kemudian ditutup lalu disterilisasi dengan autoclaf. Setelah steril dan suhunya sekitar 50°C, ditambahkan larutan ampisilin 100 µl (100 mg/ml) ke dalam media, kemudian dituang ke dalam 5 cawan petri steril masing-masing sebanyak 20 ml dan dibiarkan memadat.

e. Pembuatan sel kompeten untuk proses transformasi

Sel kompeten dibuat dengan cara menumbuhkan terlebih dahulu 5 ml sel inang *E.coli* dalam *shaker* inkubator 37°C selama 16-18 jam. Sebanyak 0,5 ml suspensi sel yang sudah tumbuh dimasukkan ke dalam media LB 50 ml, kemudian digoyang sampai $OD_{600nm} = 0,4$. Sebanyak 1 ml suspensi sel tersebut dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml, lalu disentrifugasi 12.000 rpm, 1 menit. Supernatan dibuang, pelet sel dilarutkan dengan 50 µl 0,1 M CaCl₂ dingin, kemudian diletakkan di penangas es selama 30 menit.

Campuran disentrifugasi 12.000 rpm, 1 menit, kemudian supernatan dibuang dan pelet sel dilarutkan dengan 50 μ l campuran 0,1 M CaCl_2 + 14,5% gliserol.

f. Pembuatan media produksi

Sebanyak 2 gram NaCl, 2 gram tripton, 1 gram *yeast extract* ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Campuran ditambah aquades 200 ml kemudian ditutup lalu disterilisasi dengan autoclaf.

g. Pembuatan dapar untuk penentuan aktivitas enzim β -xilosidase

g.1. Pembuatan dapar fosfat sitrat

Dibuat larutan A yang mengandung asam sitrat 0,1 M (1,92 gram dalam 100 mL) dan larutan B yang berisi Na_2HPO_4 0,2 M (5,37 gram dalam 100 mL). Campuran X mL larutan A ditambah Y mL larutan B kemudian diencerkan dengan akuades sampai volume 100 mL. Untuk mendapatkan dapar dengan pH tertentu, volume X dan Y diatur seperti tabel di bawah ini:

X(mL)A	Y(mL)B	pH
24,3	25,7	5
17,9	32,1	6

g.2. Pembuatan dapar fosfat

Dibuat larutan A yang mengandung 0,2 M NaHPO_4 (27,8 g dalam 1 liter), dan larutan B yang mengandung 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27,8 g dalam 1 liter). Untuk mendapatkan dapar dengan pH tertentu, campuran X dan Y diatur seperti tabel berikut:

X(mL)A	Y(mL)B	pH
39	61	7
5,3	94,7	8

g.3. Pembuatan dapar Glisin-NaOH

Dibuat larutan A yang mengandung 0,2 M glisin (15,01 g dalam 1 liter), dan larutan B yang mengandung 0,2 M NaOH. Untuk mendapatkan dapar dengan pH tertentu, campuran X dan Y diatur seperti tabel berikut:

X(mL)A	Y(mL)B	pH
50	8,8	9
50	32	10

h. Pembuatan larutan substrat pNP-xilopiranosida untuk penentuan aktivitas β -xilosidase

Substrat p-nitrophenol-xilopiranosida ditimbang sebanyak 2,71 mg kemudian dilarutkan dengan 10 ml dapar fosfat sitrat pH 7. Proses penimbangan substrat dilakukan lagi sebanyak lima kali untuk membuat substrat dengan pH 5, 6, 8, 9, dan 10.

4.5.2 Pelaksanaan Penelitian Tahap II

a. Isolasi DNA plasmid

DNA plasmid *xyl* rekombinan sistem pET101/DTOPO diisolasi dari dari *E. coli* TOP 10 menggunakan *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* sesuai dengan petunjuk yang tercantum pada kit. Prosedurnya adalah sebagai berikut. Sebanyak 3-5 mL suspensi sel dalam *microtube* disentrifus selama 1 menit pada 12.000 rpm. Pelet sel diresuspensi dengan 250 μ l dapar P1 kemudian diaduk perlahan sampai semua sel tersuspensi. Dapar P1 mengandung RNase yang berperan menghilangkan RNA dan meresuspensi sel. Selanjutnya ditambahkan 250 μ l dapar P2 yang mengandung NaOH dan dicampur

perlahan dengan membolak-balikkan tabung selama 4-6 kali. *Dapar* P2 berperan dalam melisis sel.

Langkah selanjutnya adalah penambahan 350 μ l *dapar* N3 lalu dicampur perlahan dengan membolak-balikkan tabung selama 4-6 kali. Kandungan dari *dapar* ini adalah guanidin hidroklorida dan asam asetat yang berperan mengikat DNA. Campuran lalu disentrifus selama 10 menit pada 13.000 rpm. Supernatan bening yang terdapat di bagian atas selanjutnya dipipet dan dipindahkan ke dalam *QIAprep spin column*, kemudian disentrifus selama 1 menit pada 13.000 rpm lalu cairannya dibuang. *QIAprep spin column* selanjutnya dicuci dengan penambahan 750 μ l *dapar* PE yang mengandung etanol yang berfungsi sebagai pencuci, kemudian disentrifus selama 1 menit lalu cairannya dibuang. Sentrifugasi tambahan selama 1 menit perlu dilakukan untuk menghilangkan sisa *dapar* N3. Tahap akhir adalah memindahkan kolom *QIAprep* ke dalam *microtube* 1,5 ml kemudian DNA plasmid *xyI* dielusi dengan 2x 25 μ l *dapar* elusi, dibiarkan selama 1 menit agar *dapar* elusi benar-benar terserap ke dalam filter, lalu disentrifus 1 menit.

DNA hasil isolasi kemudian dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran DNA plasmid *xyI* sirkuler adalah sebesar 7289 bp. Kemurnian DNA yang diperoleh diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, jika rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dengan 280 lebih atau sama dengan 1,8 menunjukkan bahwa tidak terdapat protein pengotor pada DNA, tetapi jika kurang dari rasio tersebut menunjukkan bahwa DNA masih ada pengotor seperti protein (Brown, 2004).

b. Mutasi terarah - PCR

Mutasi terarah terhadap DNA plasmid *xyl* dilakukan dengan teknik PCR menggunakan dua pasang primer DNA mutagenik untuk mutasi pada asam amino posisi tertentu, yang ditentukan dari hasil penelitian tahap I. Urutan kedua primer tersebut dirancang dengan menggunakan program desain primer Clone Manager.

PCR dilakukan dengan mencampurkan ke dalam tabung PCR 0,5 ml : 1 μ l dNTP *mix* (10 mM), primer *forward* 1 μ l (0,5 μ M), primer *reverse* 1 μ l (0,5 μ M), DNA *template* 1 μ l (10 ng), 1 μ l MgSO₄ (50 mM), air suling 44,5 μ l, enzim *Taq DNA polymerase* 0,5 μ l (5U/ml). Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan ke mesin PCR. Mutasi terarah-PCR dilakukan menggunakan kondisi PCR sebagai berikut:

Pre denaturasi	: 95°C, 2 menit
Denaturasi	: 95°C, 30 detik
<i>Annealing</i>	: dioptimasi sesuai nilai T_m primer yang digunakan, 30 detik
Elongasi	: 72°C, 3 menit
Post elongasi	: 72°C, 5 menit

PCR dilakukan sebanyak 20 siklus. Tahap selanjutnya adalah restriksi hasil PCR, yaitu dengan cara menambahkan 1 μ l enzim DpnI ke dalam hasil PCR. Setelah itu campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, untuk memotong DNA *template* pada posisi G^mATC di mana A termetilasi.

c. Transformasi ke sel kompeten *E.coli* TOP 10

Proses transformasi dilakukan dengan mencampurkan hasil PCR yang sudah direstriksi dengan enzim restriksi DpnI ke dalam 50 μ L sel kompeten *E.coli* TOP 10.

Campuran diinkubasi di es selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan menginkubasi campuran sel dalam penangas air pada suhu 42°C selama 30 detik, kemudian segera dipindah ke penangas es selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan 0,5 ml media LB cair ke dalam masing-masing campuran sel, selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* suhu 37°C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media *agar plate* yang mengandung ampisilin, dengan cara memipet masing-masing 250 µl suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Plasmid yang ada dalam sel inang *E.coli* TOP 10 ditumbuhkan pada media agar LB (Luria Bertani) yang mengandung ampisilin, karena pET101/DTOPO merupakan vektor yang memiliki gen resisten terhadap ampisilin sedang inang *E.coli* TOP 10 tidak memiliki gen resisten terhadap ampisilin.

d. Isolasi DNA plasmid mutan dari *E. coli* TOP 10

Dipilih 10 koloni tunggal secara acak dari transforman yang tumbuh, hasil transformasi ke sel inang *E. coli* TOP 10, masing-masing untuk mutasi menjadi asam amino tertentu. Sebanyak satu ose koloni ditumbuhkan ke dalam 10 ml media LB cair yang mengandung ampisilin, kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C selama 16 jam. DNA plasmid diisolasi dari *E. coli* TOP 10 menggunakan *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* sesuai dengan petunjuk yang tercantum pada kit. Prosedurnya adalah sebagai berikut. Sebanyak 3-5 mL suspensi sel dalam *microtube* disentrifus selama 1 menit pada 12.000 rpm. Pelet sel diresuspensi dengan 250 µl dapar P1 kemudian diaduk perlahan sampai semua sel tersuspensi. Dapar P1 mengandung RNase yang berperan menghilangkan RNA dan meresuspensi sel. Selanjutnya

ditambahkan 250 μL dapar P2 yang mengandung NaOH dan dicampur perlahan dengan membolak-balikkan tabung selama 4-6 kali. Dapar P2 berperan dalam melisis sel.

Langkah selanjutnya adalah penambahan 350 μL dapar N3 lalu dicampur perlahan dengan membolak-balikkan tabung selama 4-6 kali. Kandungan dari dapar ini adalah guanidin hidroklorida dan asam asetat yang berperan mengikat DNA. Campuran lalu disentrifus selama 10 menit pada 13.000 rpm. Supernatan bening yang terdapat di bagian atas selanjutnya dipipet dan dipindahkan ke dalam *QIAprep spin column*, kemudian disentrifus selama 1 menit pada 13.000 rpm lalu cairannya dibuang. *QIAprep spin column* selanjutnya dicuci dengan penambahan 750 μL dapar PE yang mengandung etanol yang berfungsi sebagai pencuci, kemudian disentrifus selama 1 menit lalu cairannya dibuang. Sentrifus tambahan selama 1 menit perlu dilakukan untuk menghilangkan sisa dapar N3.

Tahap akhir yaitu dengan memindahkan *QIAprep column* ke dalam *microtube* 1,5 ml kemudian DNA plasmid pETxyl2 dielusi dengan 2 x 25 μL dapar elusi, dibiarkan selama 1 menit agar dapar elusi benar-benar terserap ke dalam filter, lalu disentrifus 1 menit. DNA hasil isolasi kemudian dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran DNA plasmid sirkuler adalah sebesar 7289 bp. Hasil isolasi DNA plasmid selanjutnya direstriksi dengan enzim restriksi EcoRV untuk mengecek ukuran plasmid.

Komposisi campuran untuk restriksi sebagai berikut:

Air suling	: 7,5 μL
Dapar	: 1 μL
Sampel	: 1 μL
Enzim EcoRV	: 0,5 μL

Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian dielektroforesis gel agarosa 1%. Hasil restriksi yang benar menunjukkan ukuran pita 4230 bp dan 3052 bp.

e. Sekuensing

Sekuensing merupakan metoda pengurutan nukleotida pada molekul DNA. Pada penelitian ini sekuensing dilakukan menggunakan primer T7 yaitu *forward* dan *reverse* dengan urutan sebagai berikut:

reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

forward: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

Primer ini bertindak sebagai titik permulaan reaksi sintesis untai komplemen yang dikatalisis oleh fragmen Klenow polymerase DNA I. Reaksi sintesis untai DNA dimulai dengan penambahan *polymerase Klenow* dan masing-masing dari keempat deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Selain itu, ditambahkan pula nukleotida yang dimodifikasi yang disebut dideoksinukleotida misalnya dideoksi ATP (ddATP). Nukleotida ini menyebabkan penghentian sintesis untai selanjutnya karena dideoksi tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 3' komponen gula. Gugus ini diperlukan untuk perlekatan nukleotida berikutnya dan oleh karena itu terminasi rantai terjadi jika dideoksinukleotida digabungkan oleh enzim pada polinukleotida yang sedang tumbuh. Reaksi sintesis untai dilakukan empat kali secara paralel. Hasilnya akan merupakan empat kelompok polinukleotida baru yang berbeda. Satu kelompok akan mengandung untai yang berakhir pada ddATP, satu untai berakhir pada ddTTP, dan seterusnya.

Langkah selanjutnya adalah memisahkan komponen tiap-tiap kelompok sehingga panjang tiap untai dapat ditentukan.

Dari 10 koloni yang diisolasi DNA plasmidnya masing-masing untuk mutasi asam amino tertentu, dipilih salah satu untuk disekuensing. Urutan primer sekuensingnya adalah:

reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

forward: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

Untuk sekali proses sekuensing hanya menggunakan satu primer yaitu *forward* atau *reverse* saja.

f. Transformasi plasmid mutan ke *E.coli* BL21 Star

Koloni yang positif mengalami mutasi, selanjutnya ditransformasi ke sel inang *E.coli* BL21 Star untuk mengetahui ekspresinya. Proses transformasi dilakukan dengan mencampurkan 3 μ L DNA plasmid ke dalam 50 μ L sel kompeten *E.coli* BL21 Star. Campuran diinkubasi di es selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan menginkubasi campuran sel dalam penangas air pada suhu 42°C selama 30 detik, kemudian segera dipindah ke penangas es selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan 0,5 ml media LB cair ke dalam masing-masing campuran sel, selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* suhu 37°C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media *agar plate* yang mengandung ampisilin, yaitu dengan cara memipet masing-masing 250 μ l suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media, lalu diinkubasi pada suhu 37° selama 16 jam. Plasmid mutan yang ada dalam sel inang *E.coli* BL21 Star ditumbuhkan pada media agar LB yang mengandung ampisilin, karena

pET101/DTOPO merupakan vektor yang memiliki gen resisten terhadap ampisilin sedang inang *E.coli* BL21 Star tidak memiliki gen resisten terhadap ampisilin.

g. Isolasi β -xilosidase

Produksi β -xilosidase dilakukan dengan menumbuhkan plasmid mutan pada 5 mL media LB cair yang mengandung ampisilin, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam dengan pengocokan 150 rpm. Sebanyak 1 mL biakan mutan yang sudah tumbuh tersebut dipindah ke dalam 100 mL LB cair yang sudah mengandung 250 μ L IPTG 0,4M, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 2,5 jam dengan pengocokan 150 rpm. Enzim dipanen dengan mensentrifugasi biakan mutan pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet sel yang diperoleh dilarutkan dengan dapar fosfat pH 7 kemudian selnya dipecah dengan sonikator. Sel yang sudah pecah tersebut disentrifugasi kembali untuk mengisolasi enzimnya yang terdapat pada supernatan dan dipakai untuk analisis selanjutnya

h. Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase

Pengukuran pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim yaitu dengan cara mencampur 100 μ L enzim dengan 300 μ L substrat pNP-xilopiranosida pada berbagai variasi pH yaitu dari pH 5,6 (dapar fosfat sitrat), 7,8 (dapar fosfat), 9 dan 10 (dapar glisin-NaOH), kemudian diinkubasi dalam penangas air suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μ L Na₂CO₃ 0,4 M kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 405 nm. Sebagai kontrol digunakan campuran yang sama tetapi tanpa enzim dan enzim diganti

dengan aquabides. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk (*p*-nitrofenol) per menit (Scope, 1982).

i. Uji kestabilan β -xilosidase terhadap basa

Kestabilan β -xilosidase terhadap basa diuji dengan cara menginkubasi enzim pada berbagai variasi pH yaitu dari pH 5,6 (dapar fosfat sitrat), 7,8 (dapar fosfat), 9 dan 10 (dapar glisin-NaOH), kemudian diinkubasi dalam penangas air suhu 50°C selama 1 jam. Setelah diinkubasi, pH enzim diatur ke pH optimumnya yang diketahui setelah pengukuran pH optimum, kemudian dilakukan uji aktivitas enzim. Kestabilan enzim terhadap basa diketahui setelah dihitung aktivitas residu enzim.

Kurva standar *p*-nitrofenol dibuat pada konsentrasi berkisar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mM *p*-nitrofenol/mL dari stok *p*-nitrofenol 10 mM/ml dalam pelarut dapar fosfat sitrat pH 7. Masing-masing sebanyak 100 μL larutan standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 100 μL dapar fosfat sitrat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 μL Na_2CO_3 0,4 M. Absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada λ 405 nm. Dari kurva standar *p*-nitrofenol akan diperoleh persamaan regresi linier: $y = ax + b$ (Lever, 1972 dan Chen *et al.*, 1986)

Unit aktivitas enzim akan dihitung menggunakan persamaan berikut (Lever, 1972 dan Chen *et al.*, 1986):

$$\text{UA /ml} = \frac{\text{M x FP x } 1000 \times 10}{\text{T x BM pNP- xilopiranosida}}$$

Keterangan:

UA = Unit Aktivitas enzim ($\mu\text{mol/ml}$)

- M = Konsentrasi pNP- xilopiranosida (mM)
Fp = Faktor pengenceran
T = Waktu inkubasi (menit)
BM = Berat Molekul

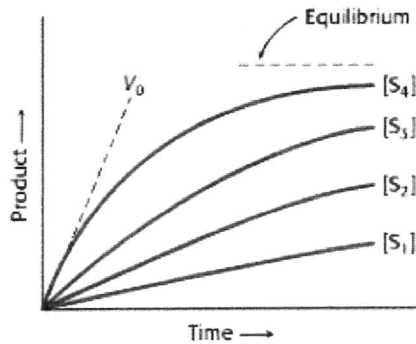
j. Uji kestabilan β -xilosidase terhadap panas

Kestabilan terhadap panas ditentukan dengan menginkubasi enzim tanpa substrat di penangas air pada suhu optimum enzim (50°C) selama 10 jam dan disampling tiap 2 jam untuk diukur aktivitasnya (Puspaningsih, 2004).

k. Penentuan parameter k_{cat}/K_m

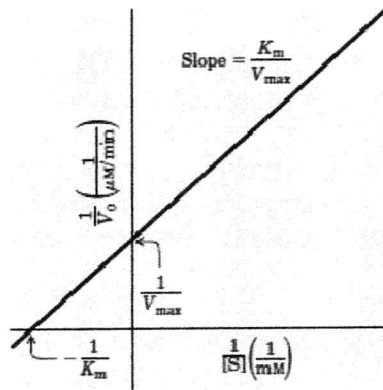
Penentuan parameter K_M dan V_{max} dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode (i) *initial rate* dan (ii) laju sesaat. Pada metode (i) dilakukan percobaan pengukuran aktivitas enzim pada minimal 5 variasi konsentrasi substrat (gambar 2.5). Aktivitas enzim dapat ditentukan berdasarkan pengurangan konsentrasi substrat atau pembentukan produk. Pengamatan aktivitas enzim dilakukan setiap selang waktu tertentu selama waktu tertentu (misal, setiap 10 detik selama 2 menit pertama). Selanjutnya dibuat kurva hubungan aktivitas terhadap konsentrasi substrat, akan diperoleh 5 grafik. Untuk masing-masing grafik ditentukan aktivitas pada saat 0 detik, yang menyatakan laju awal (V_0), yaitu dengan menginterpolasi masing-masing grafik yang diperoleh pada sumbu Y (sumbu aktivitas). Setelah itu dibuat kurva Michaelis-Mentennya, hubungan antara V_0 dan $[S]$, atau dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk (Fersht, 1999).

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{(K_M + [S])} \quad \dots\dots\dots \text{pers. Michaelis-Menten}$$



Gambar 4.3 Penentuan kecepatan awal pada berbagai konsentrasi

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \dots\dots\dots \text{pers. Lineweaver-Burk}$$



Gambar 4.4 Kurva Lineweaver-Burk: hubungan antara 1/V thd 1/[S]

Pada metode (ii), dilakukan percobaan serupa, namun inkubasi berbagai konsentrasi substrat dilakukan selama selang waktu yang sama (misal, 10 menit). Setelah itu, dihitung kecepataannya, yaitu $d[P]/dt \rightarrow (\text{Abs pada } t = 10 \text{ menit}) / 10 \text{ menit} = V_0$ (satuan: $\text{Abs} \cdot \text{menit}^{-1}$). Selanjutnya dengan cara yang sama, yaitu dengan membuat kurva Michaelis-Mentennya, dapat ditentukan nilai parameter K_M dan V_{\max} . Nilai k_{cat} dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan: $V_{\max} = k_{cat} [E]_0$, di mana $[E]_0$ adalah konsentrasi enzim yang digunakan pada percobaan kinetika.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 2007. Quikchange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual. <http://www.stratagene.com>, Stratagene, USA.
- Beg QKM, Kapoor L, Mahajan G, Hoondal S, 2001. Microbial Xylanase from the Newly Isolated *Bacillus sp.* Strain BP-23. *Can. J. Microbiol.* 39:1162-1166.
- Brown TA, 2004. Gene Cloning and DNA Analysis, an introduction, 5th edition. Blackwell publishing. England.
- Brüx C, Ben-David A, Shallom-Shezifi D, Leon M, Niefind K, Shoham G, Shoham Y, Schomburg D, 2006. The Structure of an Inverting GH43 β -Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its Substrate Reveals the Role of the Tree Catalytic Residues. *J. Mol. Biol.* 359:97-109.
- Chen WP, Matsuo M, Tsuneo Y, 1986. Purification and some properties of β -1,3-xylanase from, *Aspergillus terreus* A-07. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1183-1194.
- Chen X, Xu S, Zhu M, Cui L, Zhu H, Liang Y, Zhang Z, 2009. Site-directed mutagenesis of an *Aspergillus niger* xylanase B and its expression, purification and enzymatic characterization in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. doi:10.1016/j.procbio.2009.08.009.
- Collins T, Gerday C, Feller G, 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:3-23.
- Dably PA, 2003. Optimising Enzyme Function by Directed Evolution, *Current Opinion in Structural Biology.* 13:500-505.
- Fersht A, 1999. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W.H. Freeman and Company. New York.
- Invitrogen, 2006. Champion pET Directional TOPO Expression Kits. Five-minute, directional TOPO Cloning of blunt-end PCR product into vectors for high-level, inducible expression in *E.coli*.
- Jordan DB, Li XL, Dunlap CA, Whitehead TR, Cotta MA, 2007. Structure-Function Relationships of a Catalytically Efficient β -D-Xylosidase. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 141:51-76.
- Kim JH, Kim BW, Yoon KH, Nam SW, 2000. Expression of *Bacillus sp.* B-xylosidase gene (xylB) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Letter* 22: 1025-1029.
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M, 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Rev.* 23: 411-456.

- La Grange DC, Pretorius IS, van Zyl WH, 1997. Cloning of the *Bacillus pumilus* β -xylosidase gene (xynB) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 262-266.
- Lee JM, Shin JW, Nam JK, Choi JY, Jeong CS, Han IS, Nam SW, Choi YJ, Chung DK, 2009. Molecular Cloning and Expression of The *Trichoderma harzianum* C4 Endo- β -1,4-Xylanase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Biotechnol. 19(8): 823-828.
- Lever M, 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Analytical Biochemistry. 47:273-279.
- Littlechild JA, Guy J, Connelly S, Mallett L, Waddell S, Rye CA, Line K and Isupov M, 2007. Natural methods of protein stabilization: thermostable biocatalysts. Biochemical Society Transaction, Volume 35, part 6: 1558-1563.
- Liu L, Wang B, Chen H, Wang S, Wang M, Zhang S, Song A, Shen J, Wu K, Jia X, 2009. Rational pH-engineering of the thermostable xylanase based on computational model. Process Biochemistry 44: 912-915.
- Mamo G, Thunnissen M, Hatti-Kaul R, Mattiasson B, 2009. An alkaline active xylanase: insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. Biochimie 91:1187-1196.
- Purwadi MND, 2009. Peningkatan Alkalistabilitas B-Xilosidase Dari Mutan pET-xyl2 Yang Diperoleh Dengan Metoda *Site Directed Mutagenesis*. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Puspaningsih NNT, 2004. Pencirian Enzim Xilanolitik dan Kloning Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Puspaningsih NNT, Suwito H, Sumarsih S, Rohman A, Asmarani O, 2007. Hidrolisis Beberapa Jenis Xilan Dengan Enzim Xilanolitik Termofilik Rekombinan, Berk. Penel. Hayati 12: 191-194.
- Richana N, 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase Dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia, Buletin Agrobio, 5(1): 29-36.
- Rohman A, van Oosterwijk N, Kralj S, Dijkhuizen L, Dijkstra BW, Puspaningsih, NNT, 2007. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a thermostable glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, Acta Cryst. F63, 932-935.
- Saha BC, 2003. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 279-291.
- Scopes RK, 1987. Protein Purification, Principles and Practice, Edisi ke-2, Springer-Verlag, New York.

- Sriprang R, Asano K, Gobsuk J, Tanapongpipat S, Champreda S, Eurwilaichitr L, 2006. Improvement of thermostability of fungal xylanase by using site-directed mutagenesis. *J. Biotechnol.* 126:454-462.
- Subramaniyan S and Prema P, 2002. Biotechnology of Microbial Xylanase: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Rev. in Biotech.* 22:33-64.
- Sumarsih S, 2009. Kloning dan Ekspresi Gen Penyandi β -xilosidase Dalam Sistem pHis1525/*Bacillus megaterium* MS941, Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Vieille C and Zeikus GJ, 2001. Hyperthermophilic Enzyme: Source, Uses, and Molecular Mechanism for Thermostability. *Microbial. Mol. Biol Rev.* 65:1-43.
- Walker JM and Rapley R (eds.), 2000. *Molecular Biology and Biotechnology*. 4th edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Weiner MP, Costa W, Schoettlin J, Cline E, Mathur, Bauer JC, 1994. Rapid PCR Site Directed Mutagenesis. *ISSN.* 4:1054-9805.
- Yuwono T, 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi Offset. Yogyakarta.

TESIS

**KONSTRUKSI SEKRESI EKSTRASELULER DAN PENINGKATAN pH
OPTIMUM α -L-ARABINOFURANOSIDASE dari
Geobacillus thermoleovorans IT 08**

**LAURA NAVIKA YAMANI
NIM. 080942012**

**MAGISTER KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

DAFTAR SINGKATAN

ATP	: <i>Adenosin Triphosphate</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
Da	: Dalton
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	: <i>Deoxynucleoside Triphosphate</i>
IPTG	: <i>Isopropyl-β-D-thiogalactoside</i>
<i>Lac</i>	: lactose
LB	: Luria Bertani
MCS	: <i>Multiple Cloning Site</i>
MUA	: <i>methylumbelliferyl-α-L-arabinofuranosidase</i>
Pb	: pasang basa
pBM5ABF	: plasmid M5 yang telah disisipi gen α-L-arabinofuranosidase
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pI	: pH Isoelektrik
pNPA	: para-Nitrofenil α-L-arabinofuranosidase
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
rRna	: <i>ribosomal Ribonucleic Acid</i>
SDS	: <i>Sodium Dedocyl sulphate</i>
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
Ta	: <i>Temperature Annealing</i>
tRNA	: <i>transfer Ribonucleic Acid</i>
w/v	: <i>weight/volume</i>

SUMMARY

Construction Extracellular Secretion and Increased optimum pH of α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT 08

Application of α -L-arabinofuranosidase interest is in the pulp and paper industry, because the use of these enzymes can reduce the amount of chlorine and other chemicals used as a bleaching agent. Most of the hemicellulose degradation processes mainly in the pulp and paper industry performed at a high pH and temperature, so the use of this enzymes becomes inactive at temperatures and high pH. Therefore, enzyme which has alkalistability and thermostability will be very useful in the process (Vieille, 2001). Increased activity and development of superior properties of α -L-arabinofuranosidase enzyme specifically increased alkalistable has been done, through directed evolution. In directed evolution need screening methods that is easy, fast and precise. For developing an easy method for screening libraries of recombinant proteins, in this research will develop the expression and secretion of α -L-arabinofuranosidase from *E. coli* DH5/pTP510 to M5 plasmid system in *E. coli* BL21 (DE3).

This study aims to obtain α -L-arabinofuranosidase extracellular expressed by M5 plasmid system (excretory expression system) in *E. coli* BL21 (DE3) was performed increased activity of α -L-arabinofuranosidase at alkaline pH through directed evolution. α -L-arabinofuranosidase from *E. coli* DH5 α was successfully expressed and secreted in the M5 plasmid system with *E. coli* BL21 (DE3) as host. For the optimization of α -L-arabinofuranosidase extracellular expression has been carried out at the temperature expression and the addition of inducer IPTG. Obtained optimum conditions for the expression of α -L-arabnofuranosidase extracellular from *E. coli* BL21 (DE3) / pBM5ABF done with the addition of 2,5 mM inducer IPTG and incubation time of 36 hours. In addition, the α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme has also been successfully purified by affinity chromatography system with Ni-NTA column. The result showed that the specific activity of crude enzyme was 8,191 U / mg, whereas α -L-arabinofuranosidase enzyme of purification with Ni-NTA has a specific activity of 11.427 U / mg. Pure α -L-arabinofuranosidase enzyme has optimum activity at 70 ° C and pH 8, while for the temperature stability ranging from 50 to 70 ° C and pH stability ranging from 4 to 7. α -L-arabinofuranosidase extracellular expressed by *E. coli* BL21 (DE3) / pBM5ABF) that have been generated

in this study had optimum activity at pH 8 and the activity decreased drastically at pH 9. For that would be an increase in the activity of α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme pH 9 by the method of directed evolution. Directed evolution process of gene α -L-arabinofuranosidase from mold pBM5ABF performed by PCR-errorprone. Library screening of variant α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme have done through two stages, namely: (1) semi-quantitative screening with a Methylumbeliferil-Arabinofuranosidase (MUA) substrate, (2) quantitative screening with the para-nitrofenil-Arabinofuranosidase (pNPA) substrate. α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme variant of 10 colonies that have been selected from the first stage of screening results with MUA substrate with 96 well microtiter plate produces positive variants that emit high-intensity blue fluorescence at pH 9, the second stage of screening was then performed with pNPA substrate in buffer NaOH-glycine at pH 9. The highest activity in mutant A12 that is equal to 2.874223 U / ml, while for the activity of the control (wildtype) of 0.754 U / ml. This means that the activity of α -L-arabinofuranosidase enzyme varian with pNPA substrate in buffer at pH 9 increased 4-fold of the enzyme activity of α -L-arabinofuranosidase wildtype.

Conclusions of this study were α -L-arabinofuranosidase extracellular has successfully expressed and secreted in the M5 plasmid system in *E. coli* BL21 (DE3) and indicated that variants of α -L-arabinofuranosidase from PCR-errorprone showed increasing activity at the optimum pH 9.

ABSTRACT

Construction Extracellular Secretion and Increased optimum pH of α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT 08

Aims of this study were design α -L-arabinofuranosidase extracellular expressed by M5 plasmid system in *E. coli* BL21 (DE3) and increasing the activity of α -L-arabinofuranosidase through directed evolution. α -L-arabinofuranosidase from *E. coli* DH5 α was successfully expressed and secreted in the M5 plasmid system (excretory expression system) with *E. coli* BL21 (DE3) as host. Optimum conditions for the expression of α -L-arabinofuranosidase extracellular from *E. coli* BL21 (DE3) / pBM5ABF has done with the addition of 2,5 mM inducer IPTG and incubation time of 36 hours. In addition, the α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme has also been successfully purified by affinity chromatography system with Ni-NTA column. The results showed the specific activity of crude enzyme was 8.191 U / mg, whereas pure α -L-arabinofuranosidase enzyme of purification with Ni-NTA has a specific activity of 11.427 U / mg. Pure α -L-arabinofuranosidase enzyme has optimum activity at 70 ° C and pH 8, while for the temperature stability ranging from 50 to 70 ° C and pH stability ranging from 4 to 7. α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme of *E. coli* BL21 (DE3) / pBM5ABF that have been generated in this study had optimum activity at pH 8 and the activity decreased drastically at pH 9. For that would be an increase in the activity of α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme pH 9 by the method of directed evolution. Directed evolution process of gene α -L-arabinofuranosidase from mold pBM5ABF performed by PCR-errorprone. Screening α -L-arabinofuranosidase extracellular enzyme variant of 10 colonies that have been selected from the first stage of screening results with MUA substrate with 96 well microtiter plate produces positive variants that emit high-intensity blue fluorescence at pH 9, the second stage of screening was then performed with pNPA substrate in buffer NaOH-glycine at pH 9. The highest activity in mutant A12 that is equal to 2.874223 U / ml, while for the activity of the control (wildtype) of 0.754 U / ml. This means that the activity of α -L-arabinofuranosidase enzyme varian with pNPA substrate in buffer at pH 9 increased 4-fold of the enzyme activity of α -L-arabinofuranosidase wildtype.

Keywords : α -L-arabinofuranosidase, M5 plasmid system, excretory expression system, directed evolution, PCR-errorprone.

BAB I**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Masalah**

Genetika dan rekayasa protein baik *rational design* maupun *irrational design* adalah teknik-teknik modern dalam produksi enzim komersial untuk peningkatan stabilitas enzim antara lain, stabilitas terhadap suhu, pH, oksidator dan pelarut organik. Enzim-enzim yang memiliki stabilitas tinggi baik termostabil maupun alkalistabil dapat diaplikasikan dalam industri yang bergerak di bidang bioteknologi. Dewasa ini telah berkembang penggunaan enzim dengan stabilitas tinggi dalam berbagai industri, salah satunya enzim xilanolitik yang dapat diaplikasikan dalam industri antara lain : industri deterjen (37%), tekstil (12%), pati (11%), baking (19%) dan pakan ternak (6%) (Lesney, 2003). Keunggulan enzim xilanolitik ini mampu mendegradasi limbah berlignoselulosa khususnya hemiselulosa menjadi produk yang bermanfaat seperti prebiotik, bioetanol, dan xilitol serta produk-produk fermentasi lainnya yang banyak digunakan oleh industri (Herman *et al.*, 1997).

Pada umumnya, komponen hemiselulosa tersusun atas xilan, manan, arabinan dan arabinogalaktan. Pemecahan sempurna pada polimer hemiselulosa tersebut, khususnya xilan, arabinan, dan arabinogalaktan memerlukan aktivitas sinergis dari beberapa enzim hemiselulosa, salah satunya adalah α -L-arabinofuranosidase. (Numan and Bhosle, 2006). Enzim α -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55) menghidrolisis ujung non-pereduksi antara ikatan α -L-

arabinofuranosida dengan berbagai polisakarida yang mengandung arabinofuranosa (Debeche *et al.*, 2002). Enzim ini merupakan bagian dari glikosida hidrolase yang berperan dalam proses degradasi hemiselulosa seperti arabinoxilan, arabinogalaktan, dan L-arabinan. Adanya substituen L-arabinofuranosida dalam struktur xilan dapat secara kuat menghambat aktivitas endo-xilanase dan β -xilosidase yang berakibat menghalangi degradasi total dari polimer xilan (Shallom *et al.*, 2002), hal ini disebabkan oleh struktur L-arabinofuranosida yang cukup besar sebagai rantai cabang dan menghalangi ruang bagi aktivitas endo-xilanase dan β -xilosidase. Oleh karena itu, keberadaan enzim α -L-arabinofuranosidase sangat penting dalam degradasi total xilan (Debeche *et al.*, 2002 dan Shallom *et al.*, 2002).

Aplikasi α -L-arabinofuranosidase yang menarik perhatian adalah dalam industri *pulp* dan kertas, karena penggunaan enzim ini dapat mengurangi jumlah klorin dan bahan kimia lainnya yang dipakai sebagai agen pemutih (*bleaching*). Enzim α -L-arabinofuranosidase berperan membuka struktur ikatan antara lignin, selulosa dan hemiselulosa sehingga memudahkan terserapnya agen pemutih, sehingga dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai pemutih. Proses pemutihan *pulp* dan kertas yang menggunakan klorin dapat menghasilkan limbah yang berbahaya bagi lingkungan karena senyawa organik yang terkhlorinasi bersifat toksik, mutagenik, dan terakumulasi dalam sistem biologis (Horikoshi, 1999). Sebagian besar proses degradasi hemiselulosa terutama pada industri *pulp* dan kertas dilakukan pada pH dan suhu yang tinggi, sehingga penggunaan enzim menjadi kendala karena enzim menjadi tidak aktif pada suhu dan pH tinggi. Oleh

karena itu adanya enzim dengan stabilitas terhadap alkali dan suhu yang tinggi akan sangat berguna pada proses tersebut (Vieille, 2001).

Gen α -L-arabinofuranosidase dari bakteri termofilik *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 yang diisolasi dari kawah Gunung Pancar, Bogor, Jawa Barat, Indonesia, telah berhasil diklon ke pBluescript dan dinamakan pTP510 dalam *E. coli* DH5 α . Seluruh gen yang tersisipkan dalam pTP510 mengindikasikan adanya lima gen, yaitu transposase, ABC permease, dan tiga gen pengkode enzim xilanolitik [ekso-xilanase(exo-xyl), β -D-xilosidase (xyl) dan α -L-arabinofuranosidase (abfa)]. α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 maupun yang terekspresi intraseluler di *E. coli* DH5 α /pTP510 rekombinan menunjukkan kesamaan sifat, yang memiliki aktivitas optimum pada temperatur 70 °C dan stabilitas pH pada kisaran 5-8. Namun perbedaannya pada pH optimum, enzim yang dihasilkan dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 memiliki pH optimum 7, sedangkan yang diproduksi dari *E. coli* DH5 α /pTP510 mempunyai pH optimum 6. Gen penyandi α -L-arabinofuranosidase ini juga telah berhasil disubklon dan diekspresi tinggi dalam sistem pET101/D-TOPO di *E. coli*. Dalam sistem ekspresi ini, α -L-arabinofuranosidase juga terekspresi intraseluler dan memiliki karakteristik yang sama seperti yang terekspresi di *E. coli* DH5 α /pTP510 (Puspaningsih *et al.*, 2004; Puspaningsih *et al.*, 2005). Gen α -L-arabinofuranosidase yang telah disubklonkan tersebut memiliki pH optimum tertinggi adalah 7. Peningkatan aktivitas dan pengembangan sifat-sifat unggul enzim α -L-arabinofuranosidase khususnya peningkatan alkalistabilitas dapat dilakukan melalui teknik rekayasa genetik,

Metode *site-directed mutagenesis* pada enzim-enzim xilanolitik (pTP510) sudah sangat efektif dalam meningkatkan aktivitas pada kondisi yang dikehendaki diantaranya, peningkatan alkalistabilitas β -xilosidase dari mutan pETxyl2 yang diperoleh dengan *site-directed mutagenesis* (Purwadi, 2009), peningkatan bifungsional enzim α -L-arabinofuranisidase dari *Geobacillus thermoleovorans* (Puspaningsih, 2008), Peningkatan termostabilitas β -xilosidase dengan *site-directed mutagenesis* (Rohman, 2007). Pada desain *site-directed mutagenesis*, perubahan yang tepat pada sekuen asam amino seharusnya ditentukan sebelumnya berdasarkan pengetahuan rinci dari struktur protein, fungsi, mekanisme, tetapi pengetahuan yang dibutuhkan tidak selalu cukup diperoleh. Pada sisi lain, fungsi dari enzim ditentukan tidak hanya oleh sekuen dari asam amino pada sekitar pusat sisi aktif, tetapi juga konformasi keseluruhan yang benar dari protein. Selain itu juga, keberhasilan pemakaian metode *site-directed mutagenesis* jarang terjadi karena seringkali belum ada kejelasan residu manakah yang hendak dimutasi. Sehingga para peneliti banyak yang beralih menggunakan metode *directed evolution* yang banyak digunakan untuk membuat pustaka gen atau untuk menghasilkan mutasi acak pada urutan DNA. Dalam *directed evolution* diperlukan metode skrining yang mudah, cepat dan tepat. Pengembangan metode skrining untuk mendeteksi adanya ekspresi gen target yang diinginkan, akan dengan mudah dilakukan langsung pada sistem ekspresi sel inang yang tepat.

Sistem ekspresi dalam sel inang prokariotik seperti *Escherichia coli* telah menjadi sel inang pilihan bagi produksi enzim rekombinan. Kebanyakan enzim rekombinan yang disekresikan oleh *E.coli* merupakan enzim intraseluler.

Kelemahan enzim intraseluler akan mempersulit proses skrining pustaka protein dari *directed evolution*. Untuk itu perlu dikembangkan metode skrining yang mudah untuk pustaka protein rekombinan. Dalam penelitian ini akan dikembangkan ekspresi dan sekresi α -L-arabinofuranosidase dari *E. coli* DH5/pTP510 ke sistem plasmid M5 dalam inang *E. coli* BL21 (DE3). Plasmid M5 merupakan hasil konstruksi plasmid pET 21-a yang disisipkan urutan sekuen signal peptida *endoxylanase* pada N-terminal dan telah dimodifikasi secara *site-directed mutagenesis* dalam rangka peningkatan sekresi protein rekombinan. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan studi awal ekspresi gen α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dalam sistem plasmid M5/ *E. coli* BL21 (DE3). Untuk selanjutnya gen α -L-arabinofuranosidase yang berhasil diklon dalam sistem plasmid M5 ini dapat digunakan sebagai cetakan untuk rekayasa genetik dalam rangka pengembangan enzim yang memiliki pH basa secara *directed evolution*. Gen α -L-arabinofuranosidase dalam sistem plasmid M5 akan mempermudah proses skrining yang dilakukan karena mampu mensekresikan enzim ekstraseluler ke medium pertumbuhan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dapat dikemukakan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah gen α -L-arabinofuranosidase dari *E. coli* DH5/pTP510 dapat diekspresikan dan disekresikan menggunakan plasmid M5 (*excretory expression system*) dalam inang *E. coli* BL21 (DE3)?

2. Apakah varian enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler hasil *directed evolution* menunjukkan aktivitas hidrolase terhadap substrat *p*-nitrofenil α -L-arabinofuranosidase (pNPA) pada pH basa ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Melakukan ekspresi dan sekresi gen α -L-arabinofuranosidase dari *E.coli* DH5/pTP510 dalam plasmid M5 (*excretory expression system*) dan meningkatkan pH optimum enzim ini melalui *directed evolution* menggunakan PCR-*errorprone*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengkonstruksi α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari *E. coli* DH5/pTP510 yang diekspresikan dalam sistem plasmid M5 (*excretory expression system*) dalam inang *E. coli* BL21 (DE3).
2. Menentukan varian enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler hasil *directed evolution* yang memiliki aktivitas hidrolase terhadap substrat *p*-Nitrofenil α -L-arabinofuranosidase (pNPA) pada pH basa.

1.4 Manfaat penelitian

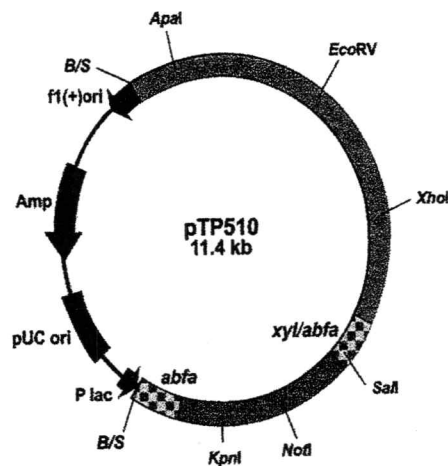
Dari penelitian ini diharapkan mendapatkan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler yang memiliki aktivitas hidrolase terhadap substrat *p*-Nitrofenil α -L-arabinofuranosidase (pNPA) pada pH basa sehingga enzim ini dapat diaplikasikan dalam industri *pulp* dan kertas.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Plasmid Rekombinan pTP510/ *E. coli* DH5 α

Isolat *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 yang diisolasi dari sumber air panas Gunung Pancar, Bogor menghasilkan enzim xilanolitik termofilik (Tan, 1999). Gen penyandi enzim xilanolitik termofilik dari isolat bakteri tersebut telah diklon dalam vektor kloning dengan teknik shotgun dengan inang *Escherichia coli* DH5 α . DNA plasmid rekombinan dinamakan pTP510. Enzim xilanolitik yang diekspresikan oleh *E. coli* DH5 α , menunjukkan peningkatan aktivitas dibandingkan dengan enzim dari sumber aslinya. Namun demikian, enzim xilanolitik ekstraseluler *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 tersebut diekspresikan sebagai enzim intraseluler oleh *E. coli* DH5 α (Puspaningsih, 2003). Peta restriksi terlihat pada Gambar 2.1.

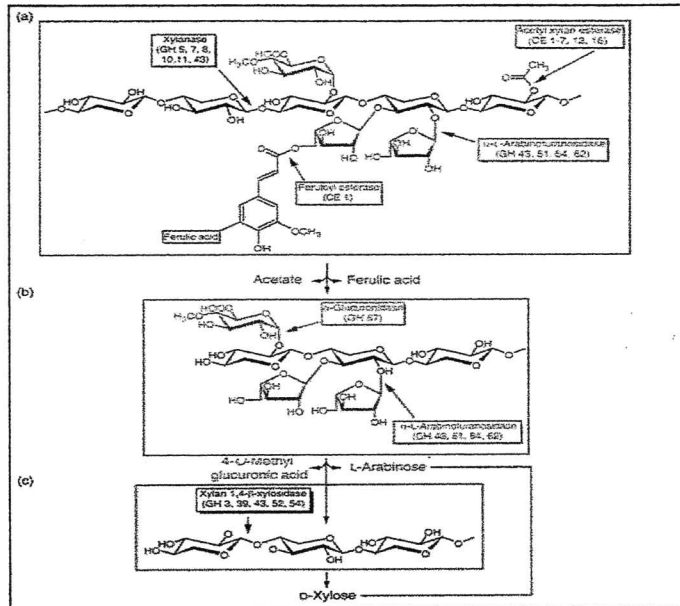


Gambar 2.1. Peta restriksi pTP510 (Puspaningsih, 2003)

Hasil analisis urutan nukleotida seluruh gen yang terinsersi dalam pTP510 menunjukkan adanya 3 jenis gen penyandi enzim xilanolitik termofilik, yaitu gen penyandi ekso-xilanase, β -xilosidase (*xyl*) dan α -L-arabinofuranosidase (*abfa*). Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa gen *abfa* mempunyai homologi yang tinggi (90%) dengan *abfa* asal *G. stearothermophilus* T-6, sedangkan gen penyandi β -xilosidase (*xyl*) dan ekso-xilanase hanya memberikan homologi 30 % dengan data di *Gene Bank*. Gen penyandi β -xilosidase (*xyl*) dalam pTP510 tersebut juga telah diklon dalam pET101/D-TOPO di *E. coli* TOP 10 dan diekspresikan dalam *E. coli* BL21 DE (Puspaningsih, 2005). Ketiga gen dalam pTP510 tersebut telah terdaftar dalam *Gene Bank* dengan nomor akses : DQ387047 (exo-xilanase), DQ387046 (α -L-arabinofuranosidase) dan DQ345777 (β -xilosidase). Enzim β -xilosidase (*Xyl*) dan α -L-arabinofuranosidase (*Abfa*) yang diisolasi dari isolat *G. thermoleovorans* IT-08 maupun *E. coli* DH5 α rekombinan menunjukkan kesamaan sifat yaitu : (1) mampu menghidrolisis *oat-spelt xylan*, (2) bekerja pada suhu optimum 70⁰ C, dan (3) memiliki stabilitas pH pada kisaran 5-8.

Enzim-enzim penghidrolisis xilan disebut enzim xilanolitik (xilanase). Hidrolisis total xilan membutuhkan beberapa enzim yang berbeda, yaitu endo-1,4- β -xilanase (1,4- β -D-xylanxylanohydrolase, EC.3.2.1.8) yang menghidrolisis struktur dasar xilan secara acak menjadi xilooligosakarida; 1,4- β -D-xilosidase (1,4- β -D-xylanxylohydrolase, EC.3.2.1.37) dan memutus xilooligosakarida menjadi xilosa. Gugus samping yang menyusun xilan akan dibebaskan oleh α -L-

arabinofuranosidase, β -D-glukuronidase, galaktosidase dan asetil xilan esterase menjadi arabinosa, glukuronat, galaktosa dan asetat (Lee *et al.*, 2009).



Gambar 2.2. Struktur xilan tumbuhan dan lokasi kerja enzim xilanolitik (Dodd *et al.*, 2009)

Lokasi pemotongan oleh masing-masing enzim xilanolitik juga ditunjukkan pada gambar 2.2, selain itu ditunjukkan pula lokasi pengikatan xilan dengan lignin melalui pengikatan residu L-arabinosa yang merupakan rantai cabang xilan dengan residu ferulil dan kumarin dari lignin (Dodd *et al.*, 2009).

Enzim xilanolitik bermanfaat untuk beberapa keperluan industri, antara lain untuk industri prebiotik, anti bakteri, pemutihan *pulp* dan kertas, pakan ternak, pengolahan bahan makanan (roti dan jus), bioetanol, xilitol, dan ekstraksi minyak tumbuhan (Lee *et al.*, 2009).

Enzim α -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55) merupakan enzim kunci dalam sistem enzim hemiselulase. Enzim α -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55)

juga merupakan tipe enzim exo yang menghidrolisis ikatan α -1,2-, α -1,3-, dan α -1,5-L-arabinofuranosida dalam hemiselulosa. Dimana enzim α -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55) menghidrolisis ujung non-pereduksi antara ikatan α -L-arabinofuranosida dengan berbagai polisakarida yang mengandung arabinofuranosa. Enzim ini merupakan bagian dari glikosida hidrolase yang berperan dalam proses degradasi hemiselulosa seperti arabinoxilan, arabinogalaktan, dan L-arabinan (Ali, 2009).

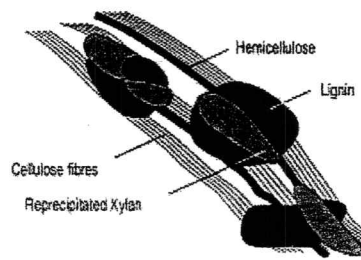
Adanya substituen L-arabinofuranosida dalam struktur xilan dapat secara kuat menghambat aktivitas endo-xilanase dan β -xilosidase yang berakibat menghalangi degradasi total dari polimer xilan. Hal ini disebabkan oleh struktur L-arabinofuranosida yang cukup besar, sehingga akan terjadi halangan ruang bagi aktivitas endo-xilanase dan β -xilosidase. Oleh karena itu, keberadaan enzim arabinofuranosidase sangat penting dalam degradasi total xilan (Canakci *et al.*, 2009). Berdasarkan kesamaan runtunan N-terminalnya, maka enzim α -L-arabinofuranosidase digolongkan ke dalam 5 famili glikosida hidrolase yaitu GH 3, 43, 51, 54, dan 62 (Birgisson *et al.*, 2004).

Enzim α -L-arabinofuranosidase dapat dimanfaatkan untuk berbagai aplikasi industri terutama untuk meningkatkan kualitas kertas dan mengurangi penggunaan klorin yang dapat mencemari lingkungan (*biobleaching*) dalam industri *pulp* dan kertas, biokonversi berbagai limbah berlignoselulosa, peningkatan daya cerna makanan ternak (Ali, 2009).

2.2 Aplikasi Enzim-enzim Xilanolitik dalam Biobleaching

Enzim xilanolitik sebagian besar diaplikasikan dalam pre-bleaching pada *kraft pulps* (Bajpai, 1999). Proses *pulping* dengan klorin yang telah dikembangkan relatif tidak efisien dan ramah lingkungan karena menghasilkan produk beracun dalam prosesnya. Proses *pulping* yang ramah lingkungan sangat dibutuhkan, salah satunya telah dilakukan pengembangan biobleaching dengan menggunakan mikroorganisme atau enzim. Telah dikembangkan beberapa mikroorganisme yang dapat mendepolimerisasi lignin secara langsung dan penggunaan mikroorganisme atau enzim yang dapat memecah hemiselulosa sehingga selanjutnya memfasilitasi depolimerisasi (Techapun *et al.*, 2003).

Enzim xilanolitik memecah hemiselulosa dan merusak ikatan antara selulosaa dan lignin, sehingga memudahkan penghilangan lignin yang terikat pada hemiselulosa dengan sedikit merusak untuk mendapatkan *pulp* (Gambar 2.3). Proses biobleaching ini dapat mengurangi produk beracun yang dihasilkan dari perlakuan biobleaching secara kimiawi. Di samping itu biobleaching melalui penghilangan lignin dengan penggunaan enzim xilanolitik dapat membantu meningkatkan *pulp fibrillation*, yang dapat mengurangi waktu untuk biobleaching. Perlakuan dengan enzim xilanolitik ini dapat meningkatkan ekstraksi lignin dari pulp. Sehingga secara signifikan dapat mengurangi sejumlah reagen kimia untuk biobleaching dan mengurangi racun klorin yang dilepaskan ke lingkungan.



Gambar 2.3. Struktur dari *kraft pulp fibre* (Viikari *et al.*, 1994).

Enzim xilanolitik digunakan sebagai additif dalam biobleaching selama proses *pulp* secara kimia atau termomekanik, beberapa keuntungan enzim xilanolitik efektif untuk biobleaching :

1. Enzim xilanolitik yang digunakan tidak memiliki aktivitas selulase untuk mencegah pengurangan kualitas *pulp*.
2. Dapat menghasilkan produk tinggi dengan biaya yang murah
3. Enzim xilanolitik yang digunakan ini sebaiknya memiliki berat molekul kecil sehingga mampu menembus serat *pulp*. Enzim harus dapat masuk ke substrat untuk melepaskan ikatan lignin dan gugus kromofor
4. Enzim ini harus memiliki pH optimum basa dan pH isoelektrik ketika proses *kraft pulp* sangat basa (pH 8-10). Serat *pulp* memiliki muatan negatif karena adanya gula yang bersifat asam, sehingga enzim harus memiliki pI basa. Oleh sebab itu, muatan positif pada pH operasional akan mengakibatkan ikatan yang efektif dari enzim dan serat *pulp*.
5. Xilanolitik termasuk α -L-arabinofuranosidase harus stabil pada suhu yang berlaku untuk proses pulp (60-90 °C) dengan waktu inkubasi 3-5 jam.

Kombinasi termostabil dan alkali pada enzim xilanolitik ini akan dikembangkan dengan rekayasa genetik pada akhir-akhir ini.

2.3 *Directed Evolution*

Directed evolution adalah metode yang digunakan dalam rekayasa genetik dengan memanfaatkan kekuatan dari seleksi alami untuk mengembangkan protein atau RNA dengan sifat yang diinginkan yang tidak ditemukan pada sifat dasarnya.

Percobaan *directed evolution* dilakukan dengan 3 tahapan :

1. *Diversification* : Gen yang mengkode protein target dimutasi atau direkombinasi secara random untuk membuat pustaka besar dari varian gen. teknik yang secara umum digunakan adalah PCR *error-prone* untuk memutasi dan DNA *shuffling* untuk merekombinasi.
2. *Selection* : Pustaka diuji untuk adanya mutan atau varian yang memiliki sifat yang diinginkan menggunakan proses skrining atau seleksi. Untuk skrining memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi dan mengisolasi mutan atau varian terbaik secara manual, kemudian seleksi secara otomatis mengeliminasi semua mutan atau varian nonfungsional.
3. *Amplification* : Varian atau mutan yang diidentifikasi dari seleksi atau skrining dan direplikasi lebih banyak, yang memungkinkan peneliti untuk sekuensing DNA tersebut untuk tujuan mengetahui apakah mutasi telah terjadi.

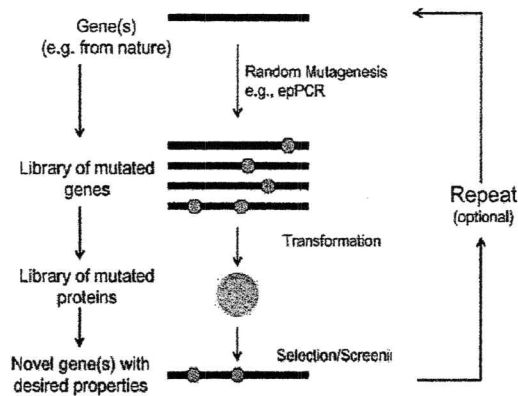
Metode *directed evolution* telah mendapatkan posisi penting dalam berbagai teknik rekayasa protein (Reetz *et al.*, 2002; Waldo, *et al.*, 2003; tao *et al.*, 2002). Salah satu hal yang mendorong perkembangan metode *directed evolution*

adalah pada kasus dimana informasi tentang fungsi protein belum diketahui walaupun pemahaman tentang hubungan struktur dan fungsi protein telah dan senantiasa terus berkembang, namun masih ada beberapa aspek fungsi protein yang belum dapat atau sukar diprediksi. Kondisi ini telah meniru perkembangan metode desain dengan menggunakan strategi rekombinasi untuk membuat pustaka protein, kemudian dilanjutkan skrining atau seleksi varian unggul dari pustaka tersebut.

Tabel 1.1 Keuntungan dan kerugian metode *directed evolution* (Baktir, 2010)

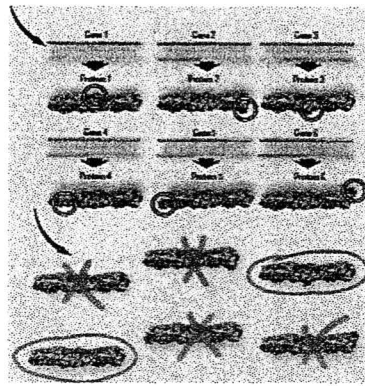
Metode pembuatan pustaka DNA	Keuntungan	Kerugian
Mutagenesis : Saturation	Dapat mengakses secara sempurna semua mutasi yang mungkin ada	-Posisi residu harus ditentukan terlebih dahulu -Eksplorasi urutan diversitas sangat terbatas
Random	Mudah dan murah	-Eksplorasi urutan diversitas hanya pada urutan yang dekat induk -Frekuensi mutasi bias
Rekombinasi berbasis annealing : DNA <i>shuffling</i> , StEP,RACHITT, single stranded <i>shuffling</i>	-Protokol berbasis PCR yang sederhana -dapat untuk rekombinasi sejumlah besar urutan induk	-Posisi crossover bias terhadap urutan homologi -bias terhadap urutan induk -terjadi <i>reassembly</i> bila identity urutan < 60 %
Rekombinasi non-homolog : ITCHY,SHIPREC, SCRATCHY, SISDC, SCOPE, <i>Gene Reassembly</i>	- tidak ada bias pada daerah urutan identity -dapat <i>crossover</i> ganda dengan SCRATCHY, SISDC, SCOPE, dan <i>GeneReassembly</i> -dapat untuk pradeterminasi sisi <i>crossover</i> pada SISDC, SCOPE <i>Reassembly</i>	-protokol rumit -hanya dihasilkan hibrida <i>crossover</i> tunggal dengan ITCHY dan SHIPREC
Rekombinasi oligonukleotida sintetik : <i>Shuffling</i> sintetik, ADO, DH	- <i>crossover</i> dapat terjadi antara daerah mutasi yang berdekatan - <i>rare mutations</i> dapat ditingkatkan dengan penambahan oligonukleotida - <i>Codon usage</i> dapat dimodifikasi mengikuti inang	-aktivitas pustaka dapat diturunkan untuk memutus coupling -pada umumnya mahal -memerlukan waktu panjang Untuk mendesain oligonukleotida

PCR-*errorprone* atau PCR mutagenesis berbasis random pada umumnya melibatkan reaksi PCR dalam kondisi yang mengurangi ketepatan penggabungan nukleotida. Kondisi tersebut meliputi adanya penambahan Mn^{2+} sub atau jumlah super-optimal dari nukleotida dan meningkatnya jumlah Mg^{2+} yang menghambat aktivitas *Taq* DNA polimerase (Arnold, 1994; Wan *et al.*, 1998; Melnikov dan Youngman, 1999).



Gambar 2.4. Skema *PCR-errorprone* (Arnold, 1994)

Protein diekspresikan dari masing-masing gen mutan, masing-masing gen mutan memproduksi protein yang bervariasi struktur fisik dalam cara tidak terlihat (pada tahapan siklus). Bentuk yang tidak terlihat tersebut menghasilkan protein yang bervariasi dan kemungkinan dapat meningkatkan fungsi dari perubahan protein. Masing-masing varian protein diuji untuk menentukan protein tertentu yang memiliki peningkatan fungsi sesuai dengan keinginan. Meskipun banyak protein baru tidak akan dibuktikan keuntungannya, tetapi dari beberapa protein akan diseleksi untuk studi selanjutnya.



Gambar 2.5. Seleksi protein target dari pustaka gen yang diperoleh

2.4 Kloning Gen

Pengklonan gen merupakan bagian dari teknologi DNA rekombinan, yaitu teknik pengisolasian dan perbanyakan gen (Snustad and Simmons, 2006). Pengklonan gen melibatkan proses penyisipan DNA sisipan ke dalam vektor sehingga membentuk DNA rekombinan. DNA rekombinan tersebut kemudian diintroduksi ke dalam sel inang. Replikasi vektor di dalam sel inang dan proliferasi sel inang akan diikuti dengan dihasilkannya salinan DNA sisipan dalam jumlah banyak (Brooker, 2005).

Molekul DNA rekombinan perlu dimasukkan ke dalam suatu sel inang untuk dapat mengekspresikan produk DNA sisipan. Beberapa komponen yang perlu diperhatikan dalam memilih sel inang yang baik untuk pengklonan adalah sebaiknya sel inang memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat, dapat tumbuh pada medium kultur, tidak bersifat patogen, dapat ditransformasi oleh DNA dan stabil. Sel inang dalam pengklonan umumnya berupa mikroorganisme, misalnya *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Saccharomyces cerevisiae* (Brock *et al.*, 1994).

Sistem ekspresi dalam sel inang prokariotik seperti *Escherichia coli* telah menjadi sel inang pilihan bagi produksi enzim rekombinan. Hal ini disebabkan karena pengetahuan genetik baik DNA plasmid dan DNA kromosom dari *E. coli* telah diketahui secara lengkap dan banyak strain *E. coli* yang tersedia di alam. Selain itu juga sistem ekspresi dalam sel inang *E. coli* ini diketahui dapat mengoptimalkan baik transkripsi gen dan translasi mRNA sehingga tingkat ekspresi enzim rekombinan meningkat (sitoplasma Goeddel *et al.*, 1979; Ikehara *et al.*, 1984; DalboÈge *et al.*, 1987; Mukhija *et al.*, 1995; Shin *et al.*, 1998; Patra *et al.*, 2000). Sistem ekspresi dalam sel inang *E. coli* secara umum berbeda dengan sel inang lain yang sering digunakan untuk ekspresi gen, seperti *Bacillus subtilis* dan ragi yang memiliki urutan sekuen signal peptide. Signal peptida ini dapat mengarahkan sekresi ekstraseluler dari enzim rekombinan sehingga enzim ini dapat dikeluarkan ke medium pertumbuhan. Urutan signal peptida ini akan dipotong dari enzim rekombinan selama sekresi. Sebaliknya *E. coli wildtype* tidak memiliki signal peptida yang dapat mensekresikan protein atau enzim langsung ke medium pertumbuhan. Walaupun *E. coli* tidak memiliki kelebihan seperti ragi dan *B. subtilis*, *E. coli* jauh memiliki efisiensi transformasi yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan *B. subtilis* dan ragi. Selain itu juga, *E. coli* dapat tumbuh lebih cepat, persiapan untuk kloning plasmid lebih sederhana dan DNA plasmid yang dihasilkan jauh lebih tinggi sehingga memungkinkan untuk karakterisasi klon.

Kebanyakan enzim rekombinan yang disekresikan oleh *E.coli* merupakan enzim intraseluler. Kelemahan enzim intraseluler akan mempersulit proses skrining pustaka protein dari *directed evolution*.

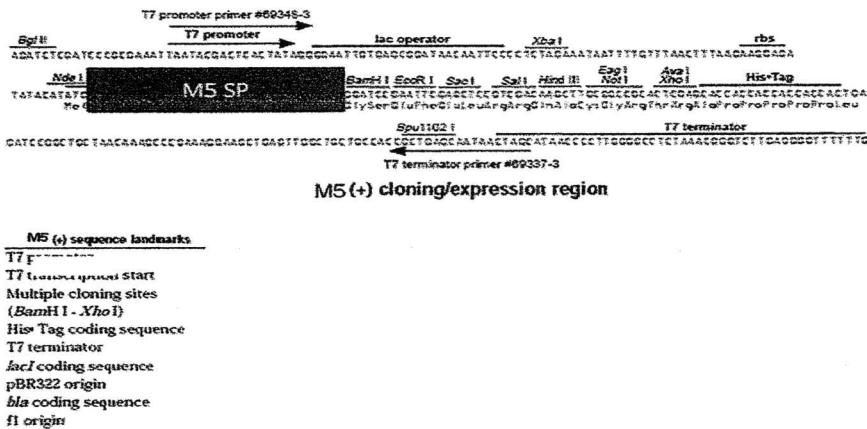
Vektor merupakan molekul DNA pembawa DNA sisipan ke dalam sel inang dan bereplikasi di dalam sel tersebut. Vektor pengklonan harus memiliki tiga komponen penting, yaitu sisi replikasi (*origin of replication*), penanda gen selektif (gen pengkode resistensi antibiotik pada sel inang) dan sisi restriksi untuk minimal satu enzim restriksi endonuklease (Snustad and Simmons, 2006). Ukuran dari DNA sisipan dan tujuan penelitian merupakan faktor penting dalam menentukan jenis vektor pengklonan untuk menghasilkan DNA rekombinan (Cooper and Hausman, 2004).

Vektor prokariot untuk pengklonan dapat berupa plasmid atau bakteriofage. Plasmid merupakan vektor pengklonan yang paling umum digunakan. Plasmid adalah molekul DNA ekstrakromosomal sirkular yang dapat bereplikasi secara independen. Vektor plasmid berukuran sekitar 2-4 kb (Cooper and Hausman, 2001). Plasmid dipilih sebagai vektor pengklonan karena memiliki beberapa keuntungan, antara lain ukurannya yang kecil membuat DNA plasmid lebih mudah untuk diisolasi dan dimanipulasi, bentuk DNA plasmid yang sirkular membuat DNA akan lebih stabil selama isolasi, dan memiliki kemampuan untuk bereplikasi secara independen (Brock *et al.*, 1994).

2.5 Plasmid M5

Plasmid M5 ini telah dikonstruksi dari plasmid pET-21 a dengan menambahkan sekuen dari signal peptida endoxylanase pada N-terminal sehingga mampu mensekresikan protein-ekstraseluler (Jonet, 2011) dalam sel inang *E. coli*. Signal peptida yang berada dalam plasmid M5 ini juga telah dimodifikasi dengan *site-directed mutagenesis* untuk peningkatan sekresi dari protein rekombinan dalam *E. coli* (Jonet, 2011). Dari peta restriksi plasmid M5 terlihat bahwa sekuen signal peptida ditambahkan dalam *mcs* (*Multiple Cloning Site*) dari plasmid pET21 a pada posisi N-terminal.

Keunggulan kloning gen dalam plasmid M5 ini dengan sel inang *E.coli* mampu mensekresikan enzim rekombinan ke dalam medium sebagai enzim ekstraseluler dan secara tidak langsung dapat memisahkan kontaminasi dari protein-protein lain yang ada di dalam sel dan terutama dapat mempermudah proses skrining pustaka protein (*protein library*) dari *directed evolution* (Chen *et al.* 2001; Sroga and Dordick, 2002).Plasmid M5 memiliki ukuran 5443 bp.



Gambar 2.6. Peta Restriksi dari plasmid M5 (Jonet, 2011)

Protein sekretori atau ekstraseluler merupakan protein yang disekresikan dari sitoplasma sel. Protein sekretori dihasilkan pada vektor atau sel inang yang memiliki signal petida. Protein sekretori memberikan beberapa keuntungan dibandingkan dengan protein sitosol (protein dalam sitoplasma). Pertama, aktivitas protease dalam ruang periplasmik lebih kecil dibandingkan dalam sitoplasma. Kedua, Purifikasi protein rekombinan dalam periplasmik lebih sederhana karena sedikit kontaminasi dibandingkan dalam sitoplasma. Ketiga, pembentukan ikatan disulfida yang tepat dapat difasilitasi dalam ruang periplasmik karena dalam ruang periplasmik menyediakan lingkungan oksidatif yang lebih banyak daripada sitoplasma (Makrides, 1996). Protein sekretori dapat diaplikasikan dalam uji aktivitas secara in-vivo karena protein yang disekresikan lebih besar sehingga dapat bereaksi dengan substrat (Chen *et al.*, 2001; Sroga and Dordick, 2002).

2.6 Tahap-tahap Pengklonan Gen

2.6.1 Sintesis dan Amplifikasi DNA sisipan

Sintesis dan amplifikasi DNA sisipan yang akan diklon dilakukan melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Melalui teknik tersebut fragmen DNA tertentu dapat diamplifikasikan secara cepat dan dihasilkan salinan fragmen DNA dalam jumlah banyak (Snustad and Simmons, 2006).

Proses PCR dilakukan menggunakan materi awal mengandung sampel DNA disebut DNA cetakan (template DNA). Beberapa reagen ditambahkan untuk membantu sintesis DNA. Reagen tersebut antara lain sepasang primer (komplementer terhadap sekuen pada ujung-ujung fragmen DNA yang akan

diampifikasi), deoksiribonukleosida trifosfat (dNTP), dan polimerase DNA disebut *Taq polymerase* (Brooker, 2005)

Reaksi amplifikasi suatu fragmen DNA diawali dengan denaturasi DNA cetakan sehingga DNA untai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi untai tunggal (*single stranded*). Tahapan selanjutnya adalah *annealing* pada suhu sekitar 55 °C. Primer akan menempel (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi untai tunggal (Yuwono, 2006). Proses dilakukan selama 1-2 menit, kemudian suhu inkubasi dinaikkan menjadi 72 °C selama 90 detik agar terjadi proses polimerisasi untai DNA yang baru berdasarkan informasi dari DNA cetakan. DNA untai ganda yang terbentuk selanjutnya akan didenaturasi lagi dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 95 °C (Brown, 1999).

2.6.2 Restriksi dan Ligasi DNA Rekombinan

Salah satu tahap penting dalam pengklonan gen adalah restriksi molekul DNA dan vektor dengan ukuran yang tepat. Molekul DNA vektor direstriksi untuk dapat disisipi DNA target. Pemotongan dilakukan pada posisi sama agar molekul DNA vektor dan DNA sumber dapat disatukan (Brown, 2006).

Proses restriksi dilakukan dengan menggunakan enzim endonuklease. Enzim tersebut akan mengenali sekuen nukleotida tertentu (sisi restriksi) pada DNA kemudian memotong DNA tersebut pada atau dekat sisi restriksi (Cooper and Hausman, 2004). Enzim restriksi endonuklease umumnya dalam pengklonan adalah tipe II karena dapat memotong DNA pada sisi spesifik, sehingga dihasilkan pola potongan spesifik. Sisi pengenalan enzim restriksi endonuklease tipe II

berupa *inverted repeats*, yaitu sekuen dapat dibaca sama dari arah manapun, atau disebut *palindrome* (Brooker, 2005).

Pola potongan dari aktivitas endonuklease restriksi II adalah pola pemotongan ujung tumpul (*blunt ends*) dan ujung lengket (*sticky ends*) (Tamarin, 2002). Pola potongan ujung tumpul dihasilkan jika enzim memotong DNA tepat di tengah sisi restriksi. Pola potongan ujung lengket (*sticky ends*) dihasilkan jika enzim memotong sisi restriksi tidak pada tempat yang sama (Brooker, 2005)

DNA vektor dan DNA target yang telah dipotong kemudian digabungkan untuk membentuk DNA rekombinan (Snustad and Simmons, 2006). Proses tersebut dinamakan proses ligasi, sebab dilakukan dengan menggunakan enzim DNA ligase (Brooker, 2005). Enzim DNA ligase berperan sebagai katalis dalam pembentukan kembali ikatan fosfodiester antar potongan DNA dengan bantuan ATP (Wong, 1997).

2.6.3 Transformasi DNA Rekombinan

Transformasi merupakan perubahan suatu genotip sel bakteri dengan cara mengambil DNA asing dari lingkungan sekitarnya (Campbell, 1999). Bakteri diberi perlakuan dengan campuran kation-kation divalent untuk membuat mereka permeable terhadap molekul DNA kecil untuk sementara. Identifikasi transforman dilakukan menggunakan penanda selektif yang disandikan oleh plasmid. Penanda tersebut memberikan fenotip baru, sehingga membuat bakteri yang telah ditransformasi dapat diseleksi dengan mudah. Penanda selektif paling umum digunakan adalah gen resistensi terhadap antibiotik seperti ampisilin, tetrasiklin, chloramphenicol dan kanamisin (Sambrook, 1989).

Sel bakteri yang umum digunakan dalam transformasi DNA rekombinan adalah *Escherichia coli* (Sambrook & Russell, 2001). Bakteri *E. coli* digunakan karena bersifat non-patogenik, dapat mempertahankan stabilitas DNA yang diintroduksi dan dapat berkembang biak secara cepat (Tamarin, 2002). Metode transformasi kejutan panas (*heat shock*) diawali dengan pemberian CaCl_2 untuk menghasilkan sel bakteri kompeten, bakteri tersebut akan mengambil DNA setelah diberi perlakuan kejutan panas (*heat shock*). Molekul DNA, misalnya plasmid, dimasukkan ke dalam sel dengan metode tersebut kemudian akan bereplikasi di dalam sel. Sel kemudian diinkubasi dalam medium pertumbuhan non-selektif untuk memulihkan kondisi sel (Zhiming Tu, 2005). Pembuatan sel kompeten yang baik mampu menghasilkan sampai 10^9 koloni transforman/ μg DNA (Sambrook, 1989).

Transformasi juga dapat dilakukan secara elektroporasi, yaitu dengan induksi muatan listrik untuk mengganggu kestabilan membrane *E.coli* sehingga akan terbentuk pori-pori pada membrane sel yang dapat dilewati DNA. Elektroporasi merupakan metode transformasi paling cepat, mudah dan efisien. Efisiensi transformasi diperoleh dapat mencapai 10^{10} transforman/ μg DNA (Sambrook, 1989).

2.6.4 Sekuensing DNA

Sekuensing merupakan metoda yang sangat penting dalam bidang biologi molekuler karena melalui sekuensing dapat diketahui urutan nukleotida yang tepat dari molekul DNA. Dua macam teknik telah dikembangkan hampir secara

bersamaan yaitu cara pengakhiran rantai oleh F. Sanger, serta cara degradasi kimiawi oleh Maxam dan Gilbert (Brown, 2006).

1. Pengakhiran rantai oleh Sanger

Cara terminasi atau pengakhiran rantai memerlukan DNA untai tunggal sehingga molekul yang akan disekuensing biasanya diklon ke dalam vektor M13, karena cara terminasi rantai melibatkan sintesis enzimatik untai DNA kedua yang komplementer terhadap cetakan yang ada. Langkah pertama adalah penggabungan *primer* ke dalam molekul M13 rekombinan. *Primer* ini bertindak sebagai titik permulaan reaksi sintesis untai komplemen yang dikatalisis oleh fragmen *Klenow* polymerase DNA I. Reaksi sintesis untai DNA dimulai dengan penambahan DNA polymerase dan masing-masing dari keempat deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Selain itu, ditambahkan pula nukleotida yang dimodifikasi yang disebut dideoksinukleotida misalnya dideoksi ATP (ddATP). Nukleotida ini menyebabkan penghentian sintesis untai.

2. Cara kimiawi oleh Maxam-Gilbert

Metoda ini memerlukan fragmen DNA untai ganda, sehingga tidak memerlukan kloning ke dalam vektor M13. Selain itu tidak dibutuhkan *primer* karena dasar cara ini bukan sintesis untai baru, melainkan pemotongan molekul DNA yang ada menggunakan reagen kimia yang bekerja secara spesifik pada nukleotida tertentu. Fragmen DNA untai ganda yang akan ditentukan urutannya mula-mula dilabel menggunakan gugus fosfor radioaktif pada ujung 5' tiap untai.

2.7 Pemurnian Protein

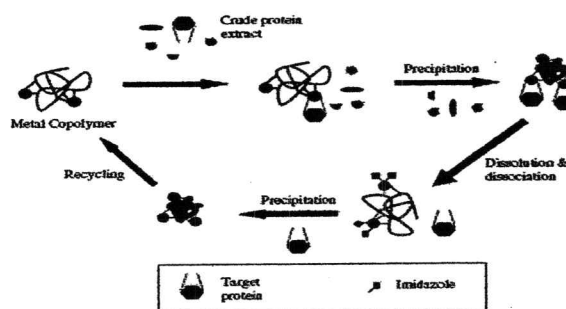
Pemurnian protein merupakan proses lanjutan untuk mengisolasi protein tunggal dari sebuah campuran kompleks. Proses ini bertujuan memperoleh protein murni yang akan digunakan untuk studi penelitian berikutnya. Studi tersebut meliputi karakterisasi aktivitas, struktur, dan fungsi protein. Untuk protein ekstraselular, seperti protein yang ada di dalam media fermentasi atau di dalam serum atau urin, sel-sel atau partikel-partikel lain, harus dipisahkan untuk mencegah terjadi campuran dalam langkah pemurnian selanjutnya. Untuk pemisahan ini, dibutuhkan metode sentrifugasi atau mikrofiltrasi. Jika ekstrak akan diendapkan ke dalam kolom maka presipitasi dilakukan untuk memurnikannya dari partikel-partikel lain. Untuk pemurnian protein intraselular, metode pemisahannya dilakukan dengan disrupti. Proses disrupti ini dapat mengakibatkan beberapa masalah karena destruksi protein intraselular yang terpisah satu sama lain. Kasus tersebut misalnya protease yang ada dalam organel maka ditangani oleh buffer dan pendingin, kemudian jika terbentuk partikel-partikel besar dilakukan filtrasi, jika terjadi oksidasi lingkungan yang menyebabkan denaturasi, inaktivasi, dan agregasi ditambahkan 2-merkaptoetanol atau EDTA.

2.7.1 Pemurnian Protein dengan Kromatografi Afinitas

Pemisahan protein dengan kromatografi afinitas berdasarkan interaksi spesifik diantara makromolekul biologi dengan pasangannya, sebagai contoh enzim dengan substrat atau inhibitor, dan antibodi dengan antigen. Ligan akan terikat secara kovalen pada matriks. Komponen protein yang memiliki afinitas

spesifik terhadap ligan akan diserap, dan komponen lainnya (protein kontaminan) yang tidak memiliki afinitas akan terelusi terlebih dahulu (Stryer *et al.*, 2002).

Enzim rekombinan dapat dimurnikan secara kromatografi afinitas dengan penambahan resin Ni-NTA (Ni-NTA His-Bind Resin). Resin ini digunakan untuk pemurnian satu tahap secara cepat pada protein yang mengandung sekuen His-Tag dengan cara kromatografi pengkhelat logam. Dicampurkannya resin Ni-NTA dengan enzim bertujuan mereaksikan sekuen His-Tag yang akan terikat dengan kation Ni^{2+} dan terjebak dalam resin Ni-NTA tersebut. Setelah protein yang tak terikat dilepaskan, target protein akan terikat kembali dengan dielusikannya imidazol, ini terjadi saat pencucian dengan bufer A dan B. Pemurnian dengan resin ini didasarkan bahwa akan terjadi afinitas antara 6–10 Histidin dengan penjebakan ion logam Ni^{2+} . Logam akan dikhelat oleh kelompok kovalen reaktif kuat. Dalam resin Ni-NTA, digunakan *nitriloacetic acid* (NTA) sebagai pengkhelat yang memiliki 4 sisi yang dapat berinteraksi dengan ion logam. NTA secara kimia meminimalkan pelepasan ion logam selama proses pemurnian, dan masih bekerja dengan ditambahkan β -mercaptoethanol untuk mereduksi ikatan disulfida (Novagen, 2001).



Gambar 2.7. Skema pemurnian protein dengan teknik kromatografi afinitas (Galaev *et al.*, 1999)

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

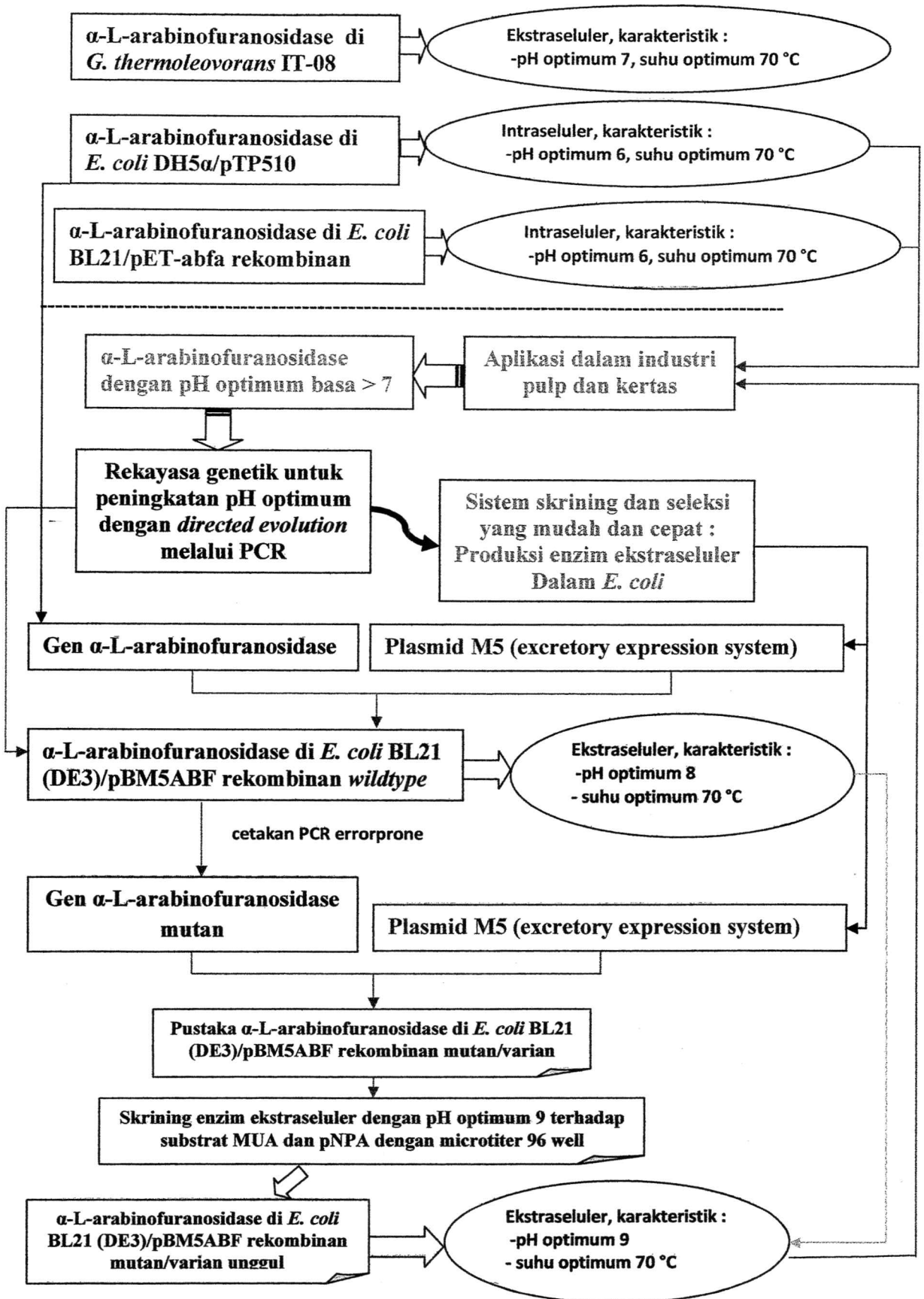
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Gen α -L-arabinofuranosidase dari bakteri termofilik *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 yang diisolasi dari kawah Gunung Pancar, Bogor, Jawa Barat, Indonesia, telah berhasil diklon ke pBluescript dan dinamakan pTP510 dalam *E. coli* DH5 α . Seluruh gen yang tersisipkan dalam pTP510 mengindikasikan adanya lima gen, yaitu transposase, ABC permease, dan tiga gen pengkode enzim xilanolitik [ekso-xilanase(exo-xyl), β -D-xilosidase (xyl) dan α -L-arabinofuranosidase (abfa)]. α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 maupun yang terekspresi intraseluler di *E. coli* DH5 α /pTP510 rekombinan menunjukkan kesamaan sifat, yang memiliki aktivitas optimum pada temperatur 70 °C dan stabilitas pH pada kisaran 5-8. Namun perbedaannya pada pH optimum, enzim yang dihasilkan dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 memiliki pH optimum 7, sedangkan yang diproduksi dari *E. coli* DH5 α /pTP510 mempunyai pH optimum 6. Gen penyandi α -L-arabinofuranosidase ini juga telah berhasil disubklon dan diekspresi tinggi dalam sistem pET101/D-TOPO di *E. coli*. Dalam sistem ekspresi ini, α -L-arabinofuranosidase juga terekspresi intraseluler dan memiliki karakteristik yang sama seperti yang terekspresi di *E. coli* DH5 α /pTP510 (Puspaningsih *et al.*, 2004; Puspaningsih *et al.*, 2005). Aplikasi α -L-arabinofuranosidase yang menarik perhatian adalah dalam industri *pulp* dan kertas, karena penggunaan enzim ini

dapat mengurangi jumlah klorin dan bahan kimia lainnya yang dipakai sebagai agen pemutih (*bleaching*). Sebagian besar proses degradasi hemiselulosa terutama pada industri *pulp* dan kertas dilakukan pada pH dan suhu yang tinggi, sehingga penggunaan enzim menjadi kendala karena enzim menjadi tidak aktif pada suhu dan pH tinggi. Oleh karena itu adanya enzim dengan stabilitas terhadap alkali dan suhu yang tinggi akan sangat berguna pada proses tersebut (Vieille, 2001).

Peningkatan aktivitas dan pengembangan sifat-sifat unggul enzim α -L-arabinofuranosidase khususnya peningkatan pH optimum dapat dilakukan melalui teknik rekayasa genetik, salah satunya *directed evolution* secara PCR-errorprone. Metode *directed evolution* digunakan untuk membuat pustaka gen atau untuk menghasilkan mutasi pada urutan DNA (Arnold, 1997) tanpa ada pengetahuan secara rinci mengenai urutan asam amino dari enzim tertentu. Dalam *directed evolution* diperlukan metode skrining yang mudah, cepat dan tepat. Pengembangan metode skrining untuk mendeteksi adanya ekspresi gen target yang diinginkan, akan dengan mudah dilakukan langsung pada sistem ekspresi sel inang yang tepat. Sistem ekspresi dalam sel inang prokariotik seperti *Escherichia coli* telah menjadi sel inang pilihan bagi produksi enzim rekombinan. Hal ini disebabkan karena pengetahuan genetik baik DNA plasmid dan DNA kromosom di *E. coli* telah diketahui secara lengkap dan keberadaan beberapa variabilitas galur *E. coli* yang tersedia di alam. Selain itu juga sistem ekspresi dalam sel inang *E. coli* ini diketahui dapat mengoptimalkan baik transkripsi gen dan translasi mRNA sehingga tingkat ekspresi enzim rekombinan meningkat (Sitoplasma Goeddel *et al.*, 1979; Ikehara *et al.*, 1984; DalboEge *et al.*, 1987; Mukhija *et al.*,

1995; Shin *et al.*, 1998; Patra *et al.*, 2000). Kelemahan sistem ekspresi pada sel inang *E. coli wildtype* adalah protein atau enzim rekombinan tidak dapat disekresikan secara ekstraseluler. Ekspresi dan sekresi enzim rekombinan di sel inang *E. coli* memerlukan vektor yang telah direkayasa dengan sekuen signal peptida. Vektor ekspresi dapat berfungsi untuk sekresi protein rekombinan apabila ditambahkan signal sekuen tertentu yang disisipkan downstream dari arah promoter atau berada sebelum MCS (*multiple cloning site*) vektor. Selama transportasi protein ke luar dari sitoplasma, sekuen signal ini akan dipotong oleh signal peptidase untuk menghasilkan produk protein *mature*. Efisiensi dari sekresi protein rekombinan tergantung dari sel inang, sekuen signal peptida, dan tipe protein yang disekresikan. Plasmid M5 merupakan hasil konstruksi plasmid pET 21-a yang disisipkan urutan sekuen signal peptida *endoxylanase* pada N-terminal dan telah dimodifikasi secara *site-directed mutagenesis* dalam rangka peningkatan sekresi protein rekombinan. Protein ekstraseluler dapat mengatasi masalah dalam pengembangan bidang rekayasa genetik karena dapat mempermudah dan memfasilitasi skrining pustaka protein yang diperoleh khususnya pada proses *directed evolution*. Gen α -L-arabinofuranosidase akan diklon dalam sistem plasmid M5 ini yang dapat digunakan sebagai cetakan untuk *directed evolution* dalam rangka pengembangan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler unggul. Proses skrining pustaka enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler ini digunakan *microtiter 96 well* untuk mendapatkan varian unggul yang memiliki aktivitas pH basa terhadap substrat methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranosidase (MUA) dan *p*-Nitrofenil Arabinofuranosidase (pNPA).



Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian

3.2 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah, tujuan dan kerangka konseptual yang ingin dicapai melalui penelitian ini, maka dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

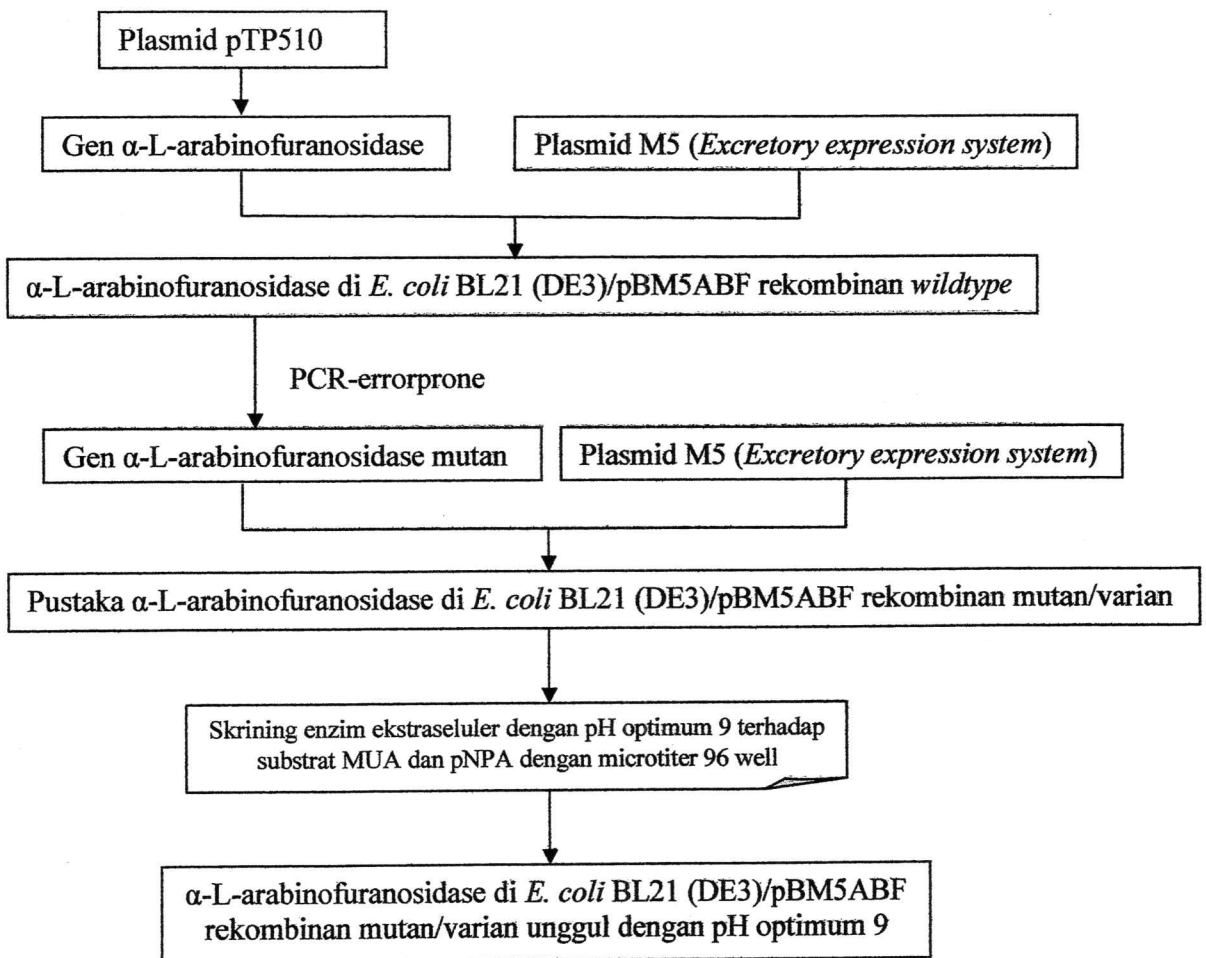
1. Ekspresi dan sekresi α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dapat dicapai dengan plasmid M5 di sel inang E. coli BL21 (DE3).
2. Enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan pH optimum 9 bisa diperoleh dari pustaka varian hasil directed evolution secara PCR errorprone.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dan untuk mencapai tujuan penelitian ini, maka dilakukan beberapa tahap penelitian seperti yang terlihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Klasifikasi variabel

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah varian enzim α -L-arabinofuranosidase hasil PCR-errorprone.

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah varian enzim α -L-arabinofuranosidase dengan pH optimum basa (pH 9).

c. Variabel kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi suhu optimum, waktu inkubasi, substrat MUA dan pNPA dan alat-alat yang digunakan.

4.2.2 Definisi operasional variabel

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah varian enzim α -L-arabinofuranosidase hasil PCR-errorprone dengan variasi konsentrasi dNTP dan variasi suhu annealing.

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah varian enzim α -L-arabinofuranosidase dengan pH optimum basa (pH 9) yang diskining dengan microtiter 96 well terhadap substrat MUA.

c. Variabel kendali

1. Suhu optimum untuk uji aktivitas varian enzim α -L-arabinofuranosidase terhadap substrat MUA dan pNPA.

2. Alat-alat tertentu yang digunakan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNA plasmid pTP510 yang diperoleh dari Prof. Dr. Ni Nyoman Tri puspaningsih (Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Indonesia) dan DNA plasmid M5 yang diperoleh dari Prof. Dr. Rosli Md illias (Departemen Bioproses, Fakultas Teknik Kimia, Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia). *E. coli* JM109 dan *E. coli* BL21 (DE3) sebagai sel inang.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk tahap-tahap penelitian ini adalah: dNTP, DNA polymerase, $MgCl_2$, Agarosa, Etidium bromide, Tris, *Loading buffer*, *Marker HindIII*, NaCl, Trypton, *Yeast Extract*, *Bacto Agar*, pepton, ampicilin, akrilamid, bis-akrilamid, HCl, SDS, ammonium per sulfat, TEMED, $CaCl_2$, glisin, gliserol, RNase, imidazole, asam asetat glacial, primer *forward*: 5' GCGGGATCCATGGCTACAAAAAAGCAACCATGATC -3, *reverse*: 5' - GGCCTCGAGTCGTTTTCTAAACGAATCACATTCCA - 3', *bromophenol blue*, *coomassie blue*, methanol, enzim restriksi *PstI* (PROMEGA), BSA (*Bovine Serum Albumin*), sukrosa, Na_2HPO_4 , Natrium deodecylsulfat, Asam sitrat, KCl, glukosa, kalium asetat, HCl, Etanol, Na_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , *p-nitrophenol* (*para-nitrophenol*), *p-nitrophenil arabinofuranosidase* (Sigma), Na_2HPO_4 , Asam sitrat. Semua bahan kimia yang disebutkan dalam penelitian ini berspesifikasi pro-analisis (p.a).

4.4.2 Alat-alat

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini antara lain: *Micropipet* (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L), *Vortex*, *Microsentrifugator* dan sentrifugator, PCR perkin Elmer, Seperangkat alat elektroforesis agarosa, *UV transluminator*, *Waterbath*, *Shaker incubator*, *elektroporated*, *Laminar Air flow cabinet*, Mesin sekuenser, pH meter, *Waterbath*, Spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*, A1005), AKTA PRIME, pengaduk magnetik, shaker inkubator, autoklaf, *plate microtiter 96 well*, *microchanel pipet*, tip.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium, Departemen Bioproses, *Faculty of Chemical Engineering*, Universiti Teknologi Malaysia (UTM).

4.5.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret-Juli

4.6 Cara Kerja

4.6.1 Kloning gen α -L-arabinofuranosidase dalam plasmid M5 (*excretory expression system*)

4.6.1.1 Pembuatan media padat untuk koloni *E. coli* DH5 α rekombinan (pTP510)

Media yang digunakan merupakan media Luria Bertani (LB). Media padat digunakan untuk meremajakan koloni *E. coli* DH5 α yang mengandung pTP510. Dibuat media padat 20 mL, ditimbang 0,4 g agar, 0,2 g pepton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g yeast extract, dilarutkan dalam 20 mL aquades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121⁰C selama 15 menit. Media steril yang telah hangat-

hangat kuku ditambah dengan 40 μ L ampisilin (50 mg/mL), dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri.

4.6.1.2 Pembuatan media padat untuk koloni *E.coli* JM109 rekombinan (pM5)

Media yang digunakan merupakan media Luria Bertani (LB). Media padat digunakan untuk meremajakan koloni *E. coli* JM109 rekombinan yang mengandung plasmid M5. Dibuat media padat 20 mL, ditimbang 0,4 g agar, 0,2 g pepton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g yeast extract, dilarutkan dalam 20 mL aquades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121⁰C selama 15 menit. Media steril yang telah hangat-hangat kuku ditambah dengan 40 μ L ampisilin (50 mg/mL), dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri.

4.6.1.3 Pembuatan inokulum *E.coli* DH5 α rekombinan (pTP510)

Media cair yang digunakan adalah media LB. Dibuat media cair 20 mL, ditimbang 0,2 g pepton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g yeast extract, dilarutkan dalam 20 mL aquades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121⁰C selama 15 menit. Media cair steril disimpan dalam lemari pendingin. Satu koloni tunggal *E.coli* DH5 α rekombinan (pTP510) diinokulasikan ke dalam 5 mL medium cair LB (Luria Bertani) yang mengandung 10 μ L ampisilin (50mg/mL) dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C dengan pengocokan 150 rpm selama 16 jam.

4.6.1.4 Pembuatan inokulum *E.coli* JM109 yang mengandung DNA plasmid M5

Media cair yang digunakan adalah media LB. Dibuat media cair 20 mL, ditimbang 0,2 g pepton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g yeast extract, dilarutkan dalam 20 mL aquades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121⁰C selama 15 menit. Media cair

steril disimpan dalam lemari pendingin. Satu koloni tunggal *E.coli* JM109 (pM5) diinokulasikan ke dalam 5 mL medium cair LB (Luria Bertani) yang mengandung 10 μ L ampisilin (50mg/mL) dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan pengocokan 150 rpm selama 16 jam.

4.6.1.5 Isolasi DNA Plasmid

4.6.1.5.1 Isolasi DNA Plasmid (pTP510) dari *E.coli* DH5 α rekombinan

Inokulum yang telah dibuat kemudian disentrifugasi dan didapatkan pelet yang mengandung sel *E.coli* DH5 α rekombinan (pTP510). Isolasi DNA plasmid pTP510 dilakukan dengan menggunakan metode konvensional. Pelet yang mengandung sel *E.coli* DH5 α rekombinan (pTP510) dalam tabung eppendorf dilarutkan dalam 95 μ L larutan GTE (Glukosa, Tris-HCl dan EDTA) dan ditambahkan 10 μ L RNase. Kemudian ditambahkan 200 μ L larutan 0,2 N NaOH - 1 % SDS, dibolak-balik sebanyak 5 kali dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 menit (dalam es). Ditambahkan 150 μ L larutan garam tinggi (kalium asetat, asam asetat glasial dan dH₂O) dan dibolak-balik sebanyak 5 kali, kemudian diinkubasi dalam es selama 3-5 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama 5 menit. Supernatan ditransfer ke dalam tabung eppendorf baru. Kemudian ditambahkan etanol 100 % sebanyak 2 kali volume awal yaitu 900 μ L, divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Sentrifugasi kecepatan tinggi pada suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 70 % etanol sebanyak 1 mL. Sentrifugasi dengan kecepatan tinggi pada suhu 4 °C selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pelet dilarutkan dalam 35 μ L ddH₂O. Plasmid yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

4.6.1.5.2 Isolasi DNA Plasmid M5 dalam *E.coli* JM109 rekombinan

Inokulum yang telah dibuat kemudian disentrifugasi dan didapatkan pelet yang mengandung sel *E.coli* JM109 (DNA plasmid M5). Isolasi DNA plasmid M5 dilakukan dengan menggunakan metode konvensional. Pelet yang mengandung sel *E.coli* JM109 (plasmid M5) dalam tabung eppendorf dilarutkan dalam 95 μ L larutan GTE (Glukosa, Tris-HCl dan EDTA) dan ditambahkan 10 μ L RNase. Kemudian ditambahkan 200 μ L larutan 0,2 N NaOH - 1 % SDS, dibolak-balik sebanyak 5 kali dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 menit (dalam es). Ditambahkan 150 μ L larutan garam tinggi (kalium asetat, asam asetat glasial dan dH_2O) dan dibolak-balik sebanyak 5 kali kemudian diinkubasi dalam es selama 3-5 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama 5 menit. Supernatan ditransfer ke dalam tabung eppendorf baru. Kemudian ditambahkan etanol 100 % sebanyak 2 kali volume awal yaitu 900 μ L, divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Sentrifugasi kecepatan tinggi pada suhu 4 °C selama 5 menit. Buang supernatan dan tambahkan 1 mL 70 % etanol. Sentrifugasi dengan kecepatan tinggi pada suhu 4 °C selama 2 menit. Buang supernatan dan larutkan pelet dalam 35 μ L ddH_2O . Plasmid yang diperoleh dianalisis elektroforesis.

4.6.1.6 Amplifikasi gen penyandi α -L-arabinofuranosidase

4.6.1.6.1 Amplifikasi dan purifikasi gen penyandi α -L-arabinofuranosidase dari pTP510

Amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari plasmid pTP510 dilakukan dengan PCR menggunakan plasmid pTP510 sebagai DNA cetakan. Sepasang primer yang digunakan pada amplifikasi gen penyandi arabinofuranosidase didesain berdasarkan data urutan nukleotida gen penyandi α -

L-arabinofuranosidase yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Puspaningsih, 2005) dan disesuaikan dengan data restriksi pada plasmid M5 yang akan digunakan untuk proses kloning yaitu dengan menambahkan sisi restriksi *Bam*HI pada primer forward dan *Xho*I pada primer reverse. Sepasang primer yang akan digunakan untuk amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari pTP510 adalah :

Primer-F : 5'- GCGGGATCCATGGCTACAAAAAAGCAACCATGATC -3'
Primer-R : 5'- GGCTCGAGTCGTTTTCTAAACGAATCACATTCCA- 3'

Proses amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari plasmid pTP510 dilakukan menggunakan alat PCR perkin Elmer.

PCR dilakukan dengan mencampurkan ke dalam tabung PCR 0,2 mL : 5 μ L 10x PCR bufer, 1 μ L dNTP mix (10 mM), 1,5 μ L MgCl₂ (50 mM), primer forward 0.5 μ L (10 μ M), primer reverse 0.5 μ L (10 μ M), DNA cetakan 3 μ L (10 ng), distilled water 38,5 μ L, enzim platinum *Taq DNA polymerase* 0,2 μ L (1U/mL) atau KOD *Hot Start DNA polymerase*. Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan ke mesin PCR. Sebelum proses amplifikasi DNA, terlebih dahulu dilakukan pra-denaturasi pada 95 °C selama 5 menit. Proses amplifikasi dilakukan 30 siklus reaksi. Setiap siklus terdiri dari : proses denaturasi pada 95 °C selama 1 menit, annealing pada 53°C selama 45 detik, perpanjangan rantai 72 °C selama 2 menit. Proses amplifikasi DNA diakhiri dengan penambahan ekstensi pada 72 °C selama 7 menit. Selanjutnya produk PCR dianalisis dengan elektroforesis agarosa. Produk PCR (amplikon) yang menunjukkan fragmen DNA ukuran yang benar untuk gen α -L-arabinofuranosidase (\pm 1500 pb). Gen α -L-arabinofuranosidase dipurifikasi dengan *Gel Purification (Fermentas)* untuk

menghilangkan sisa-sisa reagen PCR. Selanjutnya hasil purifikasi ini dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

4.6.1.7 Kloning gen α -L-arabinofuranosidase

4.6.1.7.1 Restriksi dan pemurnian DNA plasmid M5 dan produk hasil PCR

Komposisi campuran untuk restriksi sebagai berikut: 2 μ L bufer, 1 μ L enzim *Bam*HI, 1 μ L enzim *Xho*I, 6 μ L template 0,4 μ L BSA, 9,6 μ L *distilled water*. Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 4 jam, kemudian dielektroforesis gel agarosa 1%. Gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 yang telah direstriksi akan dipurifikasi dengan *solution Purification (Fermentas)* untuk menghilangkan sisa-sisa reagen proses restriksi. Selanjutnya hasil purifikasi ini dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

4.6.1.7.2 Ligasi gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5

DNA plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase yang telah direstriksi kemudian diligasi. Campuran yang terdiri dari 7 μ L gen α -L-arabinofuranosidase, 3 μ L plasmid M5, 1 μ L T4 DNA ligase, 2 μ L reaction bufer dan 7 μ L dH₂O (volume total 20 μ L) diinkubasi pada suhu 4 °C selama *overnight*

4.6.1.8 Transformasi DNA plasmid rekombinan dalam *E. coli* JM109

4.6.1.8.1 Persiapan Sel Kompeten dengan larutan TSS (*Transformation and Storage for chemical Transformation*)

Menumbuhkan kultur *E.coli* JM109 sebanyak 4 mL dari stok gliserol ke dalam media LB padat. Inokulasikan ke dalam 100 mL media LB cair *overnight* pada suhu 37 °C sehingga mencapai OD_{600 nm} =0,5. Letakkan kultur tersebut dalam es selama 20 menit. Tuangkan kultur dalam tabung sentrifus dingin dan disentrifugasi pada 7000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Buang supernatan dan larutkan pelet dalam 10 mL larutan TSS (*Transformasi and storage for*

chemical Transformation) dalam keadaan dingin. Sel kompeten ini dapat dipindahkan dalam ependorf 1,5 mL. Simpan sel kompeten dalam freezer -70°C . Untuk menggunakan sel kompeten, ambil sel kompeten dari freezer -70°C dan letakkan dalam suhu ruang sampai sel kompeten hampir mencair dan kemudian transfer tabung eppendorf ke dalam es.

Larutan TSS (*Transformation and Storage Solution for chemical transformation*) merupakan campuran dari 85 % media LB, 10 % PEG (polyethylene glycol), 5 % DMSO dan 50 mM MgCl_2 . Campuran ini kemudian diautoklaf terlebih dahulu hingga larut sempurna dan simpan dalam suhu 4°C .

4.6.1.8.2 Transformasi ke sel kompeten *E.coli* JM109

Proses transformasi dilakukan dengan mencampurkan 10 μL hasil ligasi gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 ke dalam 100 μL sel kompeten *E.coli* JM109. Campuran diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan menginkubasi campuran sel dalam *waterbath* pada suhu 42°C selama 2 menit, kemudian segera dipindah ke *icebath* selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan 200 μL media LB cair ke dalam masing-masing campuran sel, selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* suhu 37°C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media *agar plate* yang mengandung ampisillin, yaitu dengan cara memipet 100 μL suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Plasmid yang ada dalam sel inang *E.coli* JM109 ditumbuhkan pada media agar LB (Luria Bertani) yang mengandung ampisillin, karena plasmid M5 memiliki gen resisten ampisillin sedang inang *E.coli* JM109 tidak resisten.

4.6.1.9 Skrining koloni pembawa plasmid rekombinan pBM5ABF penyandi gen α -L-arabinofuranosidase

Skrining untuk mendapatkan koloni pembawa plasmid yang mengandung gen α -L-arabinofuranosidase dilakukan dengan 2 metode, yaitu (1) Restriksi plasmid dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I dan (2) Amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dengan PCR. Dari koloni yang tumbuh hasil transformasi produk ligasi antara gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 diambil secara acak sebanyak 10 koloni. Sepuluh koloni ini dilakukan isolasi plasmid dengan metode konvensional. Dari 10 plasmid yang telah diisolasi direstriksi dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I untuk mengetahui adanya gen insert yang telah masuk dalam plasmid M5. Hasil dari restriksi plasmid ini dapat dianalisis dengan elektroforesis gel. Untuk koloni positif pembawa plasmid rekombinan yang mengandung gen α -L-arabinofuranosidase akan didapatkan 2 pita pada hasil elektroforesis gel agarosa dengan ukuran masing-masing untuk pita plasmid ± 5413 pb dan untuk gen α -L-arabinofuranosidase ± 1500 pb.

Untuk lebih menyakinkan hasil skrining ini, setelah didapatkan plasmid positif pembawa gen insert dapat dilakukan amplifikasi pada plasmid tersebut dengan PCR. Produk PCR yang akan didapatkan memiliki ukuran ± 1500 pb. Kondisi PCR ini sama seperti kondisi awal untuk amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase.

4.6.2 Ekspresi gen α -L-arabinofuranosidase dalam pBM5ABF

4.6.2.1 Re-Transformasi plasmid rekombinan pBM5ABF dalam *E. coli* BL21 (DE3)

Proses re-transformasi dilakukan isolasi plasmid terlebih dahulu dari satu koloni *E. coli* JM109 rekombinan pembawa gen α -L-arabinofuranosidase dalam

plasmid M5. Sebanyak 10 μL plasmid M5 rekombinan penyandi gen $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidase ditambahkan ke dalam 100 μL sel kompeten *E.coli* BL21 (DE3). Campuran diinkubasi pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan menginkubasi campuran sel dalam *waterbath* pada suhu 42 $^{\circ}\text{C}$ selama 2 menit, kemudian segera dipindah ke *icebath* selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan 200 μL media LB cair ke dalam masing-masing campuran sel, selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media *agar plate* yang mengandung ampicillin, yaitu dengan cara memipet masing-masing 100 μL suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media, lalu diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 16 jam.

4.6.2.2 Analisis restriksi plasmid rekombinan pBM5ABF

Komposisi campuran untuk restriksi sebagai berikut: 2 μL bufer, 1 μL enzim *Bam*HI, 1 μL enzim *Xho*I, 6 μL template 0,4 μL BSA, 9,6 μL *distilled water*. Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 4 jam, kemudian dielektroforesis gel agarosa 1%. DNA hasil isolasi kemudian dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran DNA plasmid sirkuler adalah sebesar 5445 pb dan gen insert $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidase 1500 pb.

4.6.2.3 Ekspresi enzim $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidase ekstraseluler dalam pBM5ABF/*E. coli* BL21 (DE3) dengan Optimasi induser IPTG

4.6.2.3.1 Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF

E. coli BL21 (DE3)/pBM5ABF ditumbuhkan dalam media LB cair sebanyak 50 mL yang mengandung 100 μL ampicilin dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ sampai mencapai OD = 0,8, kemudian ditambahkan induser IPTG dengan

variasi konsentrasi 0.5 sampai 3 mM. Setelah 4 jam inkubasi ditambahkan aditif glisin 10 mM. Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dibuat dengan menghitung OD pada masing-masing variasi konsentrasi IPTG setiap 4 jam sekali sampai 48 jam.

4.6.2.3.2 Uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan para-nitrofenil Arabinofuranosidase (pNPA)

Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler diukur pada masing-masing variasi induser IPTG. Sampling untuk mengukur aktivitas dilakukan bersamaan saat mengukur OD untuk kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF. Enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler berada dalam supernatan dari kultur bakteri. Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler diuji dengan substrat spesifik pNP-Arabinofuranosida. Aktivitas α -L-arabinofuranosidase diukur pada masing-masing variasi penambahan induser IPTG setiap 4 jam sekali sampai 36 jam selama inkubasi. Sebagai kontrol negatif ekspresi digunakan plasmid M5 tanpa insert dalam *E. coli* BL21 (DE3) yang diberikan perlakuan yang sama seperti ekspresi α -L-arabinofuranosidase dalam *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF.

Untuk uji aktivitas 10 μ L sampel enzim ditambahkan 190 μ L substrat pNPA dalam bufer fosfat sitrat pH 7 dan diinkubasi pada suhu 70 °C dalam *waterbath* selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 200 μ L Na_2CO_3 0,5 M dan 600 μ L akuades kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 415 nm. Sebagai kontrol digunakan campuran yang sama tetapi tanpa enzim dan enzim diganti dengan aquabides. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang

dapat menghasilkan satu μmol produk (*p*-nitrofenol) per menit (Weng *et al.*, 2005).

Kurva standar *p*-nitrofenol dibuat pada konsentrasi berkisar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mM *p*-nitrofenol/mL dari stok *p*-nitrofenol 10 mM/mL dalam pelarut bufer fosfat sitrat pH 7. Masing-masing sebanyak 100 μL larutan standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 100 μL bufer fosfat sitrat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 70⁰ C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 200 μL Na₂CO₃ 0,5 M dan 600 μL akuades. Absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada λ 415 nm. Dari kurva standar *p*-nitrofenol akan diperoleh persamaan regresi linier: $y = ax + b$

Unit aktivitas enzim akan dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas} = \frac{M \times \text{faktor pengenceran}}{T}$$

Keterangan:

M = Konsentrasi *p*-Nitrofenol (mM)

T = Waktu inkubasi (menit)

4.6.2.3.3 Analisis SDS-PAGE α -L-arabinofuranosidase pada berbagai variasi konsentrasi IPTG

Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE menggunakan gel pemisah 10% poliakrilamida dan gel penahan 4% poliakrilamida (Laemmli, 1970). Kedalam tabung Eppendorf dimasukkan 40 μL sampel enzim dan 5 μL loading buffer. Campuran dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Sampel dimasukkan ke dalam sumur gel penahan menggunakan pipet mikro. Selanjutnya piranti elektroforesis dipasang, dan 300 mL bufer elektroforesis pH

8,3 dituangkan ke dalam bejana elektroforesis. Proses elektroforesis berlangsung $\pm 1,5$ jam pada tegangan 80 volt. Gel elektroforesis dilepas dari cetakan dan jarak migrasi bromofenol biru diukur dari batas atas gel pemisah. Penampakan pita protein dilakukan dengan merendam gel SDS-PAGE dalam larutan pewarna gel *Coomassive Blue* selama 30 menit sambil digoyang konstan pada mesin penggoyang. Kelebihan warna dihilangkan dengan larutan peluntur warna sampai diperoleh pita-pita protein berwarna biru dengan latar belakang tak berwarna.

4.6.2.4 Ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dalam pBM5ABF/*E. coli* BL21 (DE3) dengan optimasi suhu ekspresi

4.6.2.4.1 Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF

Dalam optimasi ini, suhu yang digunakan untuk ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase adalah 20, 25, 30 dan 37 °C. *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF ditumbuhkan dalam media LB cair pada suhu 20, 25, 30 dan 37 °C sampai mencapai OD = 0,8, kemudian ditambahkan induser IPTG dengan variasi konsentrasi 0,5 sampai 3 mM. Setelah 4 jam inkubasi ditambahkan aditif glisin 10 mM. Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dibuat dengan menghitung OD pada masing-masing variasi konsentrasi IPTG setiap 4 jam sekali sampai 48 jam.

4.6.2.4.2 Uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan para-nitrofenil Arabinofuranosidase (pNPA)

Untuk uji aktivitas 10 μ L sampel enzim dari masing-masing variasi suhu ekspresi ditambahkan 190 μ L substrat pNPA dalam bufer fosfat sitrat pH 7 dan diinkubasi pada suhu 70 °C dalam *waterbath* selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 200 μ L Na_2CO_3 dan 600 μ L akuades kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 415

nm. Sebagai kontrol digunakan campuran yang sama tetapi tanpa enzim dan enzim diganti dengan aquabides. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk (*p*-nitrofenol) per menit (Weng *et al.*, 2005).

4.6.3 Purifikasi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan kolom Ni-NTA dalam AKTA PRIME

Enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dimurnikan dengan kolom Ni-NTA dalam AKTA PRIME. Sebanyak 10 mL supernatan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dialirkan ke dalam kolom Ni-NTA. Elusi kolom dengan bufer A (50 mM buffer fosfat pH 8, 250 mM NaCl, dan 5 mM β -mercaptoetanol). Kemudian elusi kolom dengan bufer B (50 mM buffer fosfat pH 8, 250 mM NaCl, 50 mM imidazol) kemudian ditampung kembali (Invitrogen, 2006). Hasil pemurnian ditentukan aktivitas enzim dengan substrat pNPA dan kadar protein dengan reagen *Bradford*.

4.6.4 Karakterisasi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler

4.6.4.1 Pengukuran suhu optimum

Pengukuran suhu optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim yaitu dengan cara mencampur 10 μL enzim dengan 190 μL substrat *pNP*-arabinofuranosidase dalam bufer fosfat sitrat pH 7, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada berbagai variasi suhu 50, 60, 70, 80 dan 90 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 200 μL Na_2CO_3 0,4 M dan 600 μL akuades kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 415 nm.

4.6.4.2 Pengukuran pH optimum

Pengukuran pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim yaitu dengan cara mencampur 10 μL enzim dengan 190 μL substrat *pNP*-arabinofuranosidase pada berbagai variasi pH yaitu dari pH 5, 6 (*buffer* fosfat sitrat), 7, 8 (*buffer* fosfat), 9, dan 10 (*buffer* glisin-NaOH), kemudian diinkubasi dalam *waterbath* suhu 70°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 200 μL Na_2CO_3 0,5 M dan 600 μL akuades kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 415 nm.

4.6.5.1 Amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari pBM5ABF

PCR dilakukan dengan kondisi *PCR-Errorprone* dengan mencampurkan ke dalam tabung PCR 0,2 mL : 5 μL 10x bufer PCR, 5 μL dNTP *mix* (10 mM), primer *forward* 1 μL (0,5 μM), primer *reverse* 1 μL (0,5 μM), DNA *template* 3 μL (10 ng), 7 μL MgCl_2 (50 mM), 1,5 MnCl_2 (50 mM), *distilled water* 26 μL , enzim *Taq DNA polymerase* 0,5 μL (5U/mL). Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan ke mesin PCR. Sebelum proses amplifikasi DNA, terlebih dahulu dilakukan pra-denaturasi pada 95°C selama 5 menit. Proses amplifikasi dilakukan 30 siklus reaksi. Setiap siklus terdiri dari : proses denaturasi pada 95°C selama 1 menit, *annealing* pada 53°C selama 45 detik, perpanjangan rantai 72°C selama 2 menit. Proses amplifikasi DNA diakhiri dengan penambahan ekstensi pada 72°C selama 7 menit. Selanjutnya produk PCR dianalisis dengan elektroforesis agarosa. Produk PCR (amplikon) yang menunjukkan fragmen DNA ukuran yang benar untuk gen α -L-arabinofuranosidase (± 1500 pb). Produk PCR selanjutnya dimurnikan dengan metoda *Gel Purification*.

4.6.5.2 Restriksi gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 dari pBM5ABF

DNA hasil isolasi kemudian dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran DNA plasmid sirkuler adalah sebesar 5413 pb dan gen insert α -L-arabinofuranosidase 1500 pb. Komposisi campuran untuk restriksi sebagai berikut: 2 μ L bufer, 1 μ L enzim *Bam*HI, 1 μ L enzim *Xho*I, 6 μ L template 0,4 μ L BSA, 9,6 μ L *distilled water*. Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam, kemudian dielektroforesis gel agarosa 1%.

Gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 yang telah direstriksi akan dipurifikasi dengan *solution Purification (Fermentas)* untuk menghilangkan sisa-sisa reagen proses restriksi. Selanjutnya hasil purifikasi ini dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Untuk selanjutnya ligasi antara Gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 sama seperti pada tahap 4.4.1.7.2.

4.6.5.3 Transformasi pBM5ABF varian dalam *E. coli* BL21 (DE3)

4.6.5.3.1 Persiapan sel elektrokompeten

Menumbuhkan kultur *E.coli* BL21 (DE3) sebanyak 4 mL dari stok gliserol ke dalam media LB padat. Inokulasikan ke dalam 50 ml media LB cair *overnight* sehingga mencapai $OD_{600\text{ nm}} = 0,4$. Letakkan kultur tersebut dalam es selama 15-30 menit. Tuangkan kultur dalam tabung sentrifus dingin sebanyak 1000 gram/8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Buang supernatan dan larutkan pelet dalam 200 ml H₂O dingin. Sentrifugasi masing-masing 1000 gram/8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Buang supernatan dan larutkan pelet dalam 100 ml gliserol dingin 10 %. Ulangi tahapan sentrifugasi kemudian larutkan pelet dalam 4 ml gliserol dingin 10 %. Sentrifugasi lagi selama 20 menit

pada suhu 4 °C. Buang supernatan dengan menggunakan pipet. Larutkan kembali pelet dalam 1 mL gliserol dingin 10 %. Hitunglah jumlah sel dari bakteri dengan menghitung OD₆₀₀ dimana jika absorbansi 1,0 pada OD_{600 nm} sekitar $2,5 \times 10^8$ cells/mL. Pindahkan 40 µL suspensi bakteri tersebut dalam es dan lakukan *electroporation cuvette* (dengan konduktivitas rendah, < 5 mEq). Simpan elektrokompeten sel dengan menambahkan nitrogen cair dan pindahkan dalam freezer -70 °C. Untuk menggunakan sel kompeten, ambil sel kompeten dari freezer -70 °C dan letakkan dalam suhu ruang sampai sel kompeten hampir mencair dan kemudian transfer tube ke dalam es.

4.6.5.3.2 Transformasi DNA Rekombinan ke *E.coli* BL21 (DE3)

Proses transformasi dilakukan dengan mencampurkan 1-2 µL DNA hasil PCR yang sudah dikloning pada plasmid ke dalam 40 µL sel kompeten *E.coli* BL21 (DE3) dalam ependorf.

Campuran diinkubasi di es selama 30 - 60 menit. Kemudian menyiapkan perlengkapan elektroporasi yaitu kapasitas 25 µF, tegangan 2,5 kv dan hambatan 200 Ω. Pipet DNA ke dalam kuvet dingin untuk proses elektroporasi dan proses elektroporasi dimulai. Setelah itu tambahkan 1 ml médium SOC pada suhu kamar. Pindahkan sel ke tube polypropylene dan inkubasi kultur dalam *shaker incubator* suhu 37° C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media LB *agar plate* yang mengandung ampicillin, yaitu dengan cara memipet masing-masing 250 µL suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media simpan pada suhu ruang sampai cairan suspensi sel terabsorpsi ke dalam medium, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 12-16 jam.

4.6.5.4 Seleksi Transforman

4.6.5.4.1 Analisis pBM5ABF varian

DNA hasil isolasi kemudian dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran DNA plasmid sirkuler adalah sebesar 5445 pb dan gen insert α -L-arabinofuranosidase 1500 pb.

Komposisi campuran untuk restriksi sebagai berikut: 2 μ L bufer, 1 μ L enzim *Bam*HI, 1 μ L enzim *Xho*I, 6 μ L cetakan 0,4 μ L BSA, 9,6 μ L *distilled water*. Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam, kemudian dielektroforesis gel agarosa 1%.

4.6.5.4.2 Isolasi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler

Enzim α -L-arabinofuranosidase diproduksi dengan menumbuhkan transforman pada 50 mL media LB cair kemudian diinkubasi pada suhu 37°C sampai OD = 0,8 dengan pengocokan 150 rpm dalam microtiter 96 well. Kemudian ditambahkan IPTG kondisi optimum, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 6 jam dengan pengocokan 150 rpm. Enzim dipanen dengan mensentrifugasi biakan transforman pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, dimana enzim terdapat pada supernatant karena gen α -L-arabinofuranosidase diklon dalam plasmid yang mampu mensekresikan enzim tersebut. Enzim α -L-arabinofuranosidase yang terdapat pada supernatant dan dipakai untuk analisis selanjutnya.

4.6.5.4.3 Uji ekspresi α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler rekombinan dengan methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranosidase (MUA)

Uji ekspresi xilanolitik rekombinan dengan methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranosidase (MUA). Uji ini dilakukan untuk mengetahui klon yang positif

menghasilkan enzim α -L-arabinofuranosidase. Sebanyak masing-masing 100 μ L enzim dalam *microtiter 96 well* ditambahkan larutan MUA dalam bufer NaOH-glisin pH 9. Transforman positif ditandai dengan sel yang berfluoresensi biru di atas transluminator UV.

4.6.5.4.4 Uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler

Sebanyak 10 μ L enzim α -L-arabinofuranosidase ditambah 190 μ L substrat pNPA dalam bufer NaOH-glisin pH 9 dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 60 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 200 μ L Na₂CO₃ 0,4 M dan 600 μ L akuades. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan. Pengamatan jumlah *p*-nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan spektrofotometri pada λ 415 nm. Blangko yang digunakan 10 μ L bufer NaOH-glisin pH 9 dan 190 μ L substrat pNPA diperlakukan sama dengan kondisi di atas.

Standar *p*-nitrofenol digunakan pada kisaran 0,1-0,5 mM *p*-nitrofenol/mL dari stok *p*-nitrofenol 10 mM/mL dalam pelarut buffer NaOH-glisin pH 9. Sebanyak 10 μ L masing-masing larutan standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 190 μ L buffer NaOH-glisin pH 9 dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 200 μ L Na₂CO₃ 0,4 M dan 600 μ L akuades. Absorbansi dibaca pada λ 415 nm.

4.6.5.4.5 Sekuensing DNA

Tahap awal proses sekuensing DNA plasmid rekombinan maupun subklonya adalah perbanyakkan DNA dan penghentian untai DNA secara PCR. Ke

dalam tabung PCR dimasukkan 2 μL DNA plasmid rekombinan dan 8 μL akuades steril pada suhu 96 °C selama 1 menit. Tabung segera didinginkan dalam es dan selanjutnya ke dalam masing-masing tabung dimasukkan 2 μL primer M13 *forward* (1,6 pmol/ μL) dan 2 μL primer *reverse* (1,6 pmol/ μL). Kemudian ke dalam masing-masing tabung ditambahkan pula 8 μL *quick star master mix* (bufer reaksi sekuensing 10 x, campuran dNTP, campuran *dye terminator* dan enzim taq DNA polimersae). Reaksi PCR berlangsung dalam 40 siklus dengan tahapan reaksi denaturasi pada suhu 96 °C, 20 detik; penempelan primer pada suhu 50 °C, 20 detik; dan perpanjangan rantai pada suhu 60 °C, 4 menit. Amplikon selanjutnya ditambahkan ke dalam eppendorf yang telah berisi larutan penghenti reaksi (2 μL Na-asetat 3 M, 2 μL EDTA 0,1 M dan 1 μL glikogen 20 mg/mL). Campuran dihomogenkan, kemudian ditambah 60 μL etanol absolut dingin. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Pelet DNA dicuci dengan 200 μL etanol 70 % dingin, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4 °C. Pencucian dengan etanol 70 % dingin ini dilakukan 2-3 kali. Pelet DNA dikeringkan dengan vakum, kemudian ditambahkan 40 μL SLS (*sample loading solution*) dan siap dimasukkan ke dalam alat DNA sequencer (*Beckman Coulter, USA*). Urutan nukleotida selanjutnya dianalisis menggunakan program FASTA (<http://www.ebi.ac.uk>) dan BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

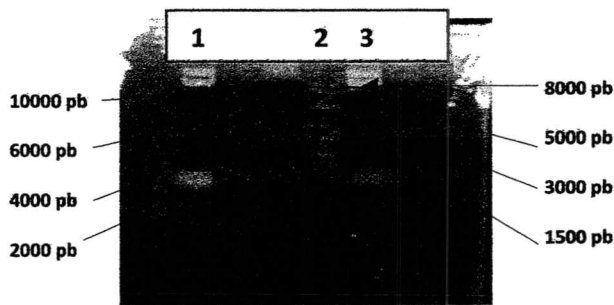
BAB V

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Kloning gen α -L-arabinofuranosidase dalam plasmid M5 (*excretory expression system*)

5.1.1 Isolasi dan restriksi DNA Plasmid pTP510

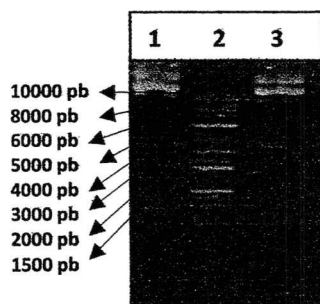
DNA plasmid pTP510 diisolasi dari sel inang *E.coli* DH5 α dengan menggunakan metode isolasi plasmid secara konvensional. Hasil isolasi DNA plasmid kemudian dicek dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Di bawah ini adalah gambar hasil elektroforesis isolasi DNA plasmid pTP510.



Gambar 5.1. Hasil isolasi DNA plasmid pTP510 (1) pTP510, (2) Marker, (3) pTP510

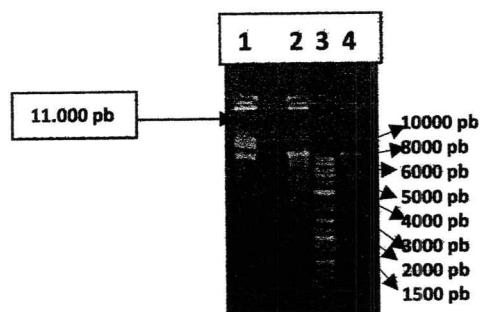
Gambar 5.1 menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA plasmid pTP510 tidak murni karena terkontaminasi oleh RNA, tampak adanya pita RNA berada pada posisi paling bawah. Hal ini disebabkan bahwa pada proses isolasi DNA plasmid secara konvensional tidak cukup pemberian RNase sehingga kontaminasi RNA ini harus dihilangkan, ada 2 metode penghilangan RNA : (1) Penambahan RNase, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit (2) Tanpa penambahan RNase, diinkubasi pada suhu 65 °C selama 15 menit. Kedua metode ini telah dilakukan

dan kontaminasi RNA berhasil dihilangkan. Berikut ini gambar hasil penghilangan kontaminasi RNA.



Gambar 5.2. DNA plasmid pTP510 yang dimurnikan dari kontaminasi RNA. (1) pTP510 + RNase, (2) Marker, (3) pTP510 diinkubasi pada suhu 65 °C

DNA plasmid pTP510 hasil isolasi berada pada posisi yang sejajar dengan ukuran 11 kbp. Nilai ini berasal dari penjumlahan dari plasmid asalnya yaitu plasmid Bluescript sebesar 2961 bp dan gen insert sebesar 8444 bp. Di bawah ini adalah gambar hasil restriksi DNA plasmid pTP510 dengan enzim restriksi *Pst*I seperti yang dapat dilihat pada gambar 5.3.



Gambar 5.3. Analisis restriksi plasmid pTP510. (1) Cetakan pTP510, (2) Restriksi pTP510 dengan komposisi optimum, (3) Marker, (4) Restriksi pTP510 dengan komposisi standar

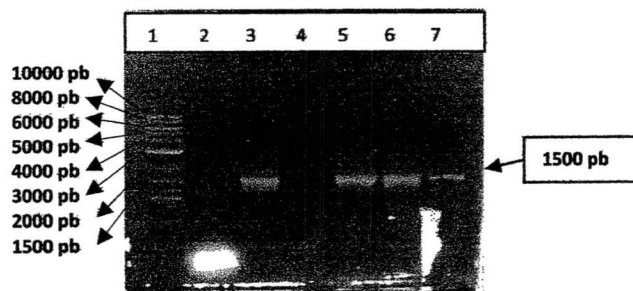
5.1.2 Amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase

Plasmid pTP510 digunakan sebagai cetakan untuk mengamplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase. Desain primer dilakukan dengan menggunakan *clone*

manager untuk mengamplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari cetakan DNA plasmid pTP510. Untuk mempermudah pada tahapan proses kloning dengan *double digest* maka desain primer *forward* dan *reverse* akan ditambahkan sisi restriksi. Pada penelitian ini, desain primer *forward* pada ujung 5' ditambahkan sisi restriksi *Bam*HI dan primer *reverse* pada ujung 5' ditambahkan sisi restriksi *Xho*I. Dibawah ini merupakan primer yang akan digunakan untuk amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase :

Primer *forward* : 5'- GCGGGATCCATGGCTACAAAAAAGCAACCATGATC-3'
 Primer *reverse*: 5'- GGCCTCGAGTCGTTTTCTAAACGAATCACATTCCA-3'

Pada amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase ini akan digunakan taq DNA polimerase yang memiliki *high fidelity* sehingga menghindari terjadinya mutasi pada saat amplifikasi gen. Taq DNA polimerase yang dapat digunakan adalah taq platinum atau KOD *Hot Start* DNA polimerase.

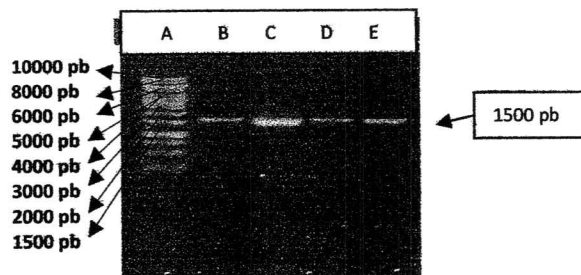


Gambar 5.4. Hasil amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase. (1) Marker, PCR dengan *Taq* platinum dengan suhu annealing (2) 56 °C, (3) 54 °C, (4) 52°C, PCR dengan taq KOD *Hot Start* DNA polymerase dengan suhu annealing (5) 56 °C, (6) 54 °C, (7) 52 °C

Gambar 5.4 menunjukkan bahwa gen α -L-arabinofuranosidase dengan ukuran 1500 bp telah berhasil diamplifikasi oleh *Taq* KOD *Hot Start* DNA polimerase pada beberapa suhu annealing, sedangkan untuk *Taq* platinum hanya berhasil mengamplifikasi pada suhu annealing 54 °C. sehingga untuk amplifikasi

gen penyandi α -L-arabinofuranosidase selanjutnya dipilih menggunakan KOD *Hot Start* DNA polimerase.

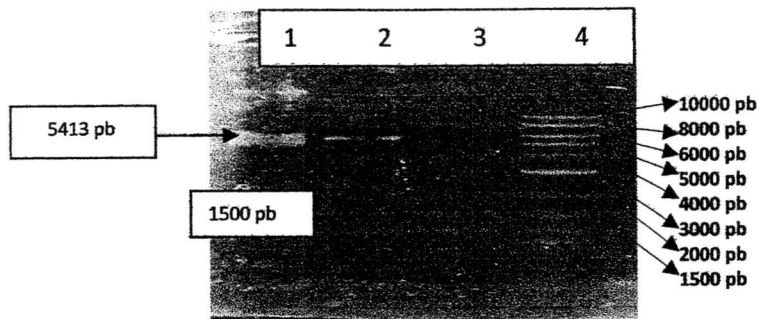
Purifikasi produk PCR ini dilakukan dengan metode *Gel Purification*. Setelah itu gen α -L-arabinofuranosidase yang telah murni ini sebelum diklonkan ke dalam plasmid direstriksi *double digest* terlebih dahulu dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I dan hasil restriksi ini akan dilakukan *solution purification*. Untuk mengetahui hasil *gel purification* dan *solution purification* untuk gen α -L-arabinofuranosidase dapat dilihat dari elektroforesis gel agarosa.



Gambar 5.5. Hasil purifikasi gel produk PCR untuk gen α -L-arabinofuranosidase (dengan KOD *Hot Star* DNA polimerase). (A) Marker, (B dan C) Hasil purifikasi gel gen α -L-arabinofuranosidase, (D dan E) Hasil restriksi gen α -L-arabinofuranosidase dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I

5.1.3 Isolasi plasmid M5 (*excretory expression system*)

Isolasi plasmid M5 ini dilakukan dengan metode konvensional. Plasmid M5 hasil isolasi ini kemudian direstriksi *double digest* dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I, Hasil restriksi plasmid M5 dipurifikasi dengan *solution purification* dan dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% dan terlihat satu pita dengan ukuran \pm 5443 bp. Dibawah ini merupakan gambar elektroforesis hasil isolasi plasmid dan purifikasi restriksi dari plasmid M5.



Gambar 5.6. Hasil isolasi plasmid M5, purifikasi restriksi plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase dengan *Bam*HI dan *Xho*I. (1) Hasil isolasi plasmid M5, (2) Purifikasi restriksi plasmid M5, (3) Purifikasi restriksi produk PCR gen α -L-arabinofuranosidase, (4) Marker

Tahapan selanjutnya proses ligasi antara gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5.

5.1.4 Ligasi gen α -L-arabinofuranosidase dalam plasmid M5

Penentuan rasio ligasi ini dapat ditentukan berdasarkan ukuran tebal pita DNA pada gel elektroforesis hasil purifikasi restriksi maupun konsentrasi dari plasmid dan gen insert. Berikut ini adalah tabel pengukuran konsentrasi dari plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase.

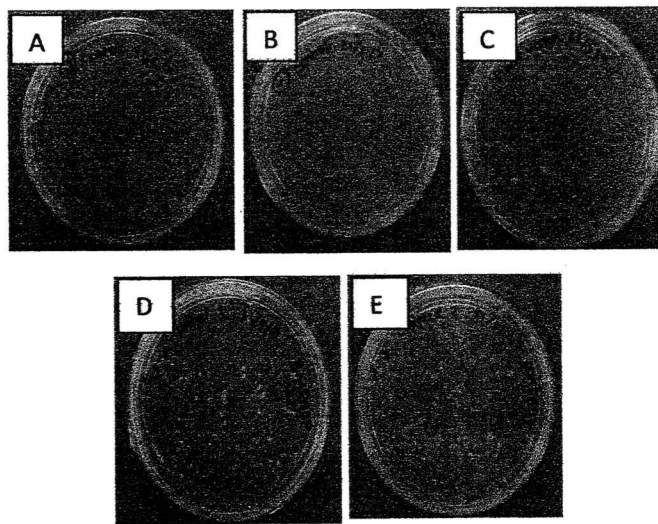
Tabel 5.1. Pengukuran konsentrasi plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase.

DNA	Konsentrasi
Gen α -L-arabinofuranosidase	57,8 μ g/mL
Plasmid M5	65 μ g/mL

Untuk menentukan rasio ligasi pada penelitian ini telah dipilih berdasarkan ukuran ketebalan pita DNA dari gel elektroforesis, variasi rasio ligasi dari plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase yaitu 1 : 4 dan 3 : 7. Proses ligasi ini diinkubasi pada suhu 4 °C semalam.

5.1.5 Transformasi hasil ligasi gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 dalam *E. coli* JM109

Pada penelitian ini teknik transformasi yang digunakan untuk mentransfer plasmid rekombinan (gen α -L-arabinofuranosidase dalam plasmid M5) ke dalam sel inang *E. coli* JM109 dengan metode *heat shock*. Setelah proses *heat shock* ke dalam sel-sel bakteri tersebut ditambahkan medium LB dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam kemudian di sebar pada media LB padat yang mengandung ampisilin dan diinkubasi pada suhu 37 °C semalam

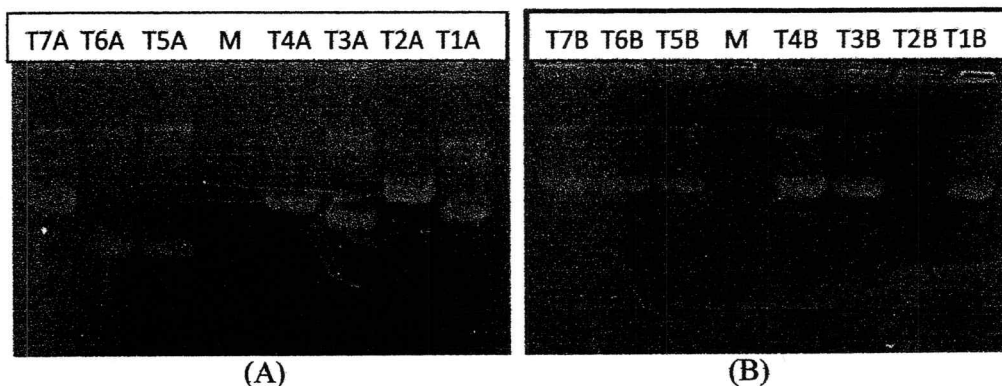


Gambar 5.7. Hasil transformasi. (A) kontrol negatif (*E. coli* JM109), (B) kontrol positif (plasmid M5 dalam *E. coli* JM109), (C) kontrol transformasi restriksi plasmid M5 tanpa ligasi dalam *E. coli* JM109, (D dan E) *E. coli* JM109 (pBM5ABF)

Gambar 5.7 menunjukkan hasil transformasi produk ligasi gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5 dalam *E. coli* JM109 telah berhasil dilakukan baik pada rasio ligasi 1 : 4 maupun 3 :7, tetapi hal ini perlu dilakukan skrining pada koloni hasil transformasi tersebut untuk mengetahui adanya plasmid rekombinan pBM5ABF yang mengandung gen penyandi α -L-arabinofuranosidase atau terjadi proses *self ligation* dari plasmid M5 tersebut.

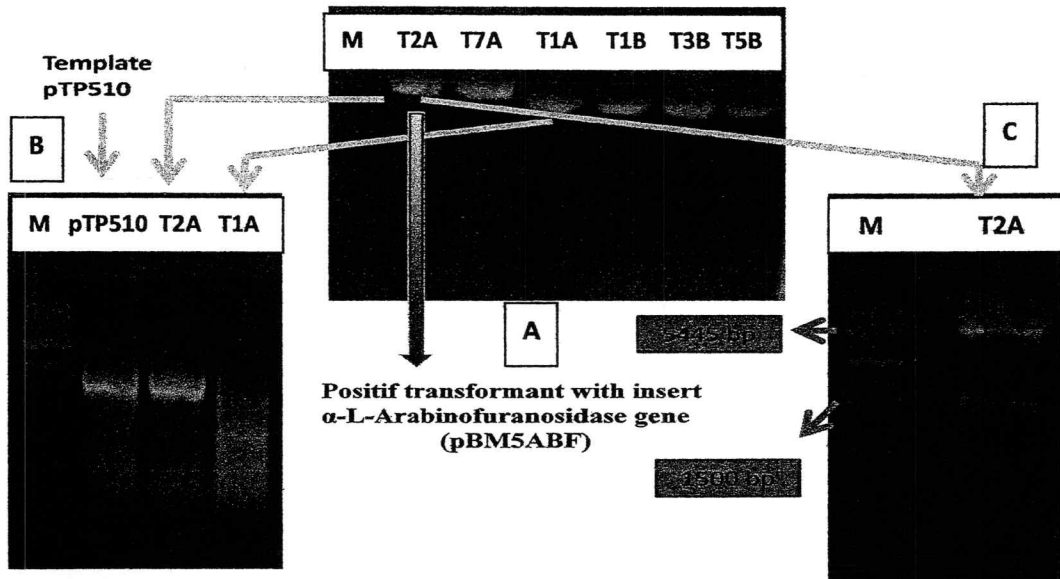
5.1.6 Skrining koloni pembawa plasmid rekombinan pBM5ABF penyandi α -L-arabinofuranosidase

Skrining dilakukan untuk mengetahui adanya plasmid rekombinan pembawa gen insert α -L-Arabinofuranosidase dalam plasmid M5 atau yang disebut pBM5ABF. Skrining ini dapat dilakukan dengan 2 metode : (1) Restriksi plasmid pBM5ABF dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I, (2) Amplifikasi gen insert α -L-arabinofuranosidase dalam plasmid pBM5ABF dengan PCR.



Gambar 5.8. Hasil isolasi plasmid koloni hasil transformasi produk ligasi plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase dengan rasio ligasi. (A) 3 : 7, (B) 1 : 4

Dari Gambar 5.8 menunjukkan pada gambar A, semua plasmid hasil isolasi terlihat pada elektroforesis gel agarosa dan menunjukkan variasi ukuran plasmid, sedangkan pada gambar B menunjukkan tidak adanya variasi ukuran plasmid dan ada satu koloni yang tidak menunjukkan adanya plasmid pada T2 diasumsikan sebagai koloni satelit. Selanjutnya beberapa plasmid ini akan dilakukan restriksi dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I untuk mengetahui adanya gen insert. Setelah proses restriksi, plasmid yang positif mengandung gen insert α -L-arabinofuranosidase ini untuk menyakinkan akan dilakukan amplifikasi dengan PCR.



Gambar 5.9. Skrining koloni *E. coli* JM109 pembawa pBM5ABF. (A) Isolasi plasmid rekombinan, (B) Amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase, (C) Restriksi plasmid rekombinan pBM5ABF

Restriksi pBM5ABF positif akan didapatkan 2 pita DNA yaitu plasmid M5 dengan ukuran 5413 pb dan gen insert α -L-arabinofuranosidase dengan ukuran 1500 pb. Pada gambar di atas menunjukkan bahwa koloni yang positif adalah koloni T2A. Plasmid dari koloni T2A ini juga diamplifikasi dengan PCR menghasilkan gen dengan ukuran 1500 pb yang tampak pada elektroforesis gel agarosa. Untuk proses selanjutnya dilakukan ekstraksi plasmid rekombinan pBM5ABF dari koloni T2A dari *E. coli* JM109 kemudian plasmid ini di re-transformasikan ke dalam sel inang *E. coli* BL21 (DE3) untuk tahapan ekspresi dari gen α -L-arabinofuranosidase tersebut.

5.1.7 Sekuensing gen α -L-arabinofuranosidase

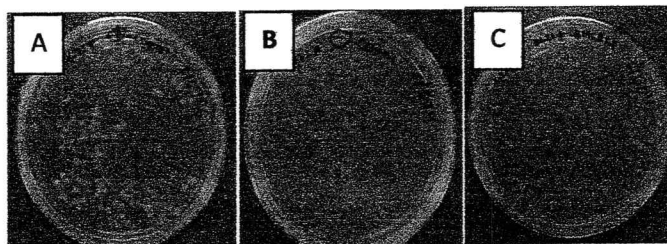
Untuk menganalisis proses kloning yang terjadi dapat dilakukan dengan sekuensing pada DNA plasmid rekombinan. Pada penelitian ini, sekuensing

dilakukan dengan menggunakan primer *pBRev* dan *T7 terminator*. Hasil sekuensing yang menggunakan primer *T7 terminator*, dikomplemenken terlebih dahulu, selanjutnya digabung dengan hasil sekuensing untuk primer *pBrev* sehingga diperoleh sekuen secara keseluruhan. Hasil sekuen selanjutnya dihomologikan dengan sekuen *cetakan* (α -L-arabinofuranosidase dalam pTP510) untuk mengetahui homologi gen yang telah diklonkan dalam sistem plasmid baru. Dari hasil homologi sekuensing gen α -L-arabinofuranosidase pada pBM5ABF dengan sekuen α -L-arabinofuranosidase pada pTP510, tidak ditemukan mutasi dan homologinya 100 %.

5.2 Ekspresi gen α -L-arabinofuranosidase dalam pBM5ABF

5.2.1 Re-Transformasi plasmid pBM5ABF dalam *E.coli* BL21 (DE3)

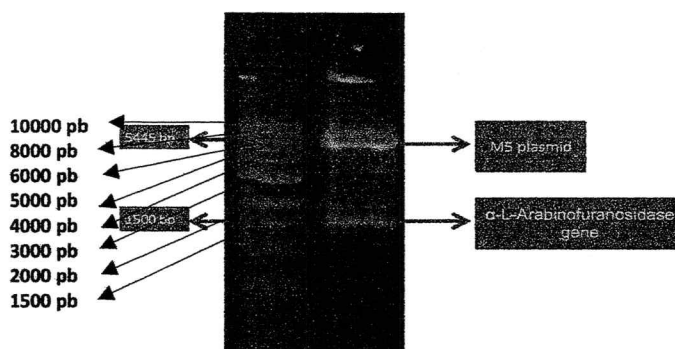
Re-Transformasi plasmid rekombinan pBM5ABF ke *E.coli* BL21 (DE3) bertujuan untuk melihat ekspresi gen α -L-arabinofuranosidase dalam plasmid M5, karena *E.coli* BL21 (DE3) merupakan sel inang untuk ekspresi gen. Proses transformasi ini juga dilakukan dengan menggunakan metode *heatshock*. Hasil transformasi menunjukkan pertumbuhan koloni setelah diinkubasi pada suhu 37°C semalam pada media LB padat yang mengandung ampicillin.



Gambar 5.10. Hasil transformasi (A) Kontrol positif (plasmid M5 dalam *E. coli* BL21(DE3)), (B) Kontrol negatif (*E. coli* BL21 (DE3)), (C) pBM5ABF dalam *E. coli* BL21 (DE3)

5.2.2 Analisis restriksi plasmid rekombinan pBM5ABF

Setelah pBM5ABF dire-transformasikan ke dalam *E.coli* BL21 (DE3) perlu dilakukan isolasi plasmid untuk meyakinkan adanya pBM5ABF dalam *E. coli* BL21 (DE3) sebelum tahapan ekspresi gen. Plasmid pBM5ABF hasil isolasi ini kemudian direstriksi dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I. Dari hasil gel elektroforesis tampak bahwa pBM5ABF telah berhasil ditransformasikan dalam *E. coli* BL21 (DE3).



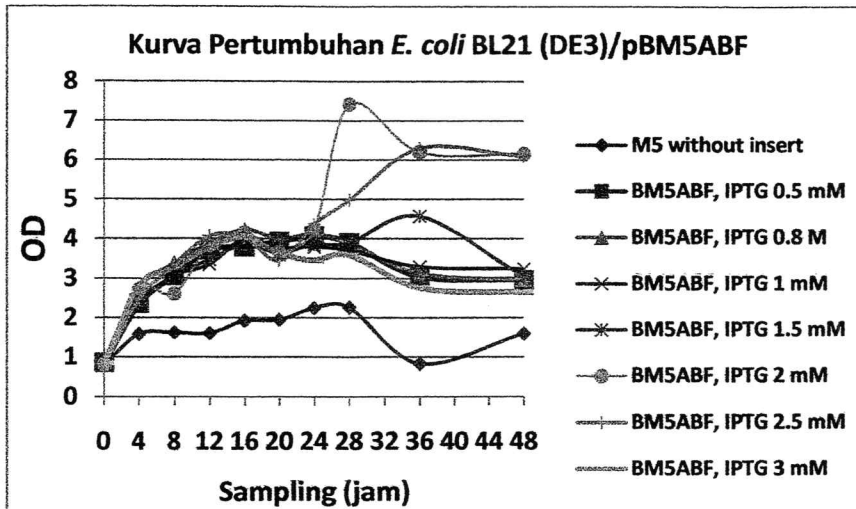
Gambar 5.11. Analisis restriksi plasmid pBM5ABF setelah dire-transformasi ke *E. coli* BL21 (DE3)

5.2.3 Ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dalam pBM5ABF/*E. coli* BL21 (DE3)

5.2.3.1 Optimasi induser IPTG pada ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler

5.2.3.1.1 Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3) rekombinan (pBM5ABF)

E. coli BL21 (DE3)/pBM5ABF ditumbuhkan dalam media LB cair pada suhu 37° C sampai mencapai OD = 0,8, kemudian ditambahkan induser IPTG dengan variasi konsentrasi 0,5 sampai 3 mM. Setelah 4 jam inkubasi ditambahkan aditif glisin 10 mM. Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dibuat dengan menghitung OD pada masing-masing variasi konsentrasi IPTG setiap 4 jam sekali sampai 48 jam.



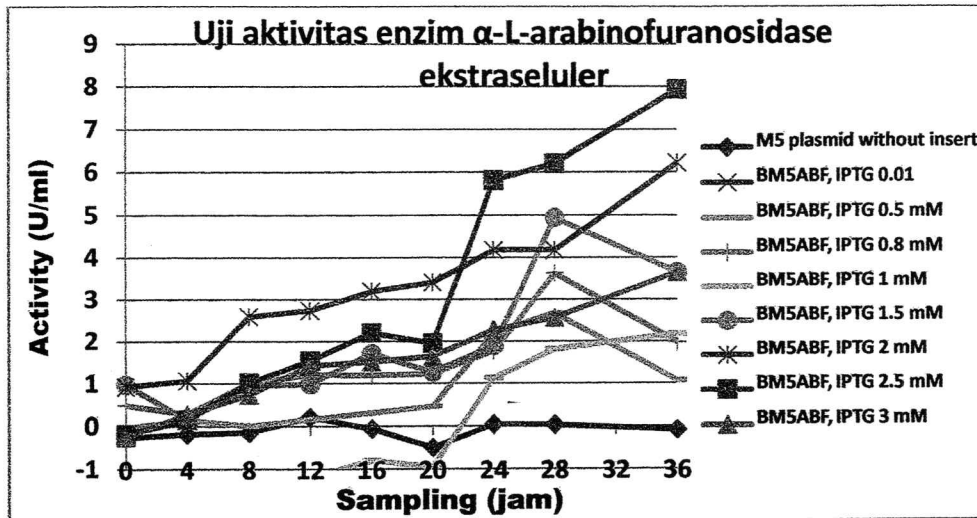
Gambar 5.12. Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF pada optimasi induser IPTG

Gambar 5.12 terlihat bahwa pertumbuhan sel *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF tertinggi pada penambahan IPTG 2 mM dengan waktu inkubasi 28 jam. Pada penambahan IPTG 0,5-1 dan 3 mM terlihat pertumbuhan sel *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF hampir sama sampai waktu inkubasi 48 jam. Untuk penambahan IPTG 1,5 dan 2,5 mM terlihat pertumbuhan sel tertinggi pada waktu inkubasi 36 jam.

5.2.3.1.2 Uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan para-nitrofenil Arabinofuranosidase (pNPA)

Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler diukur pada masing-masing variasi induser IPTG. Sampling untuk mengukur aktivitas dilakukan bersamaan saat mengukur OD untuk kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF. Enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler berada dalam supernatan dari kultur bakteri. Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler diuji dengan substrat spesifik pNP-arabinofuranosida. Kontrol

background untuk uji aktivitas ini yaitu pNPA yang ditambahkan enzim tanpa inkubasi. Aktivitas α -L-arabinofuranosidase yang bernilai negatif berarti lebih kecil dari kontrol *background*. Kontrol negatif digunakan plasmid M5 tanpa insert dalam *E. coli* BL21 (DE3).

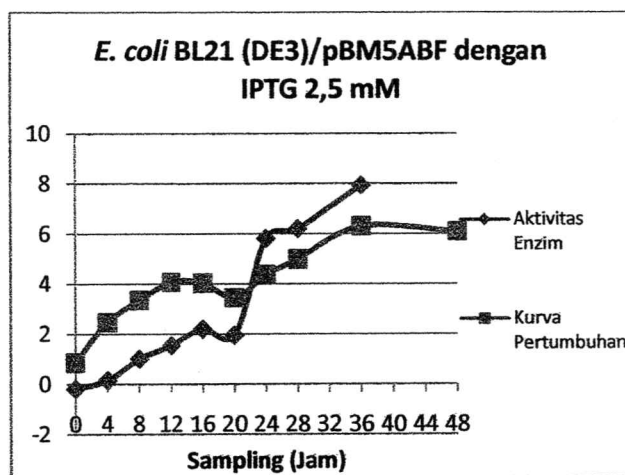


Gambar 5.13. Kurva uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler pada optimasi induser IPTG

Dari kurva 5.13 terlihat bahwa aktivitas dari enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler yang diekspresikan oleh *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF setelah diinduksi oleh IPTG pada berbagai konsentrasi. Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler pada waktu produksi 36 jam meningkat sebanding dengan penambahan konsentrasi induser IPTG, aktivitas tertinggi pada penambahan induser IPTG 2,5 mM memiliki aktivitas 7,932313 U/mL per menit. Sedangkan untuk aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase pada penambahan induser 3 mM mengalami penurunan dengan aktivitas 3,648821 U/mL, hal ini sesuai dengan kurva pertumbuhan dari *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF yang mengalami penurunan jumlah sel secara

drastis pada penambahan induser IPTG 3 mM karena penambahan induser IPTG yang cukup tinggi dapat membunuh sel bakteri tersebut dan produksi protein menurun. Unt

Untuk kontrol negatif (plasmid M5 tanpa insert) tidak memiliki aktivitas α -L-arabinofuranosidase sesuai dengan kurva di atas dengan aktivitas mendekati 0 yaitu 0,08496 U/mL.



Gambar 5.14. Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dan aktivitas dari α -L-arabinofuranosidase dengan induser IPTG 2.5 mM

Kondisi optimal untuk ekspresi α -L-arabinofuranosidase dengan penambahan induser IPTG 2,5 mM. Dari Gambar 5.14 terlihat bahwa ada korelasi antara pertumbuhan jumlah sel *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dengan peningkatan aktivitas α -L-arabinofuranosidase dengan adanya penambahan induser IPTG 2,5 mM.

5.2.3.1.3 Analisis SDS-PAGE α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler pada berbagai variasi konsentrasi IPTG

Tahapan selanjutnya untuk mengetahui ukuran dari enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dapat dianalisis dengan SDS-PAGE. Analisis

SDS-PAGE ini juga dapat melihat perbedaan ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler setelah dioptimasi dengan induser IPTG antara 0,5-3 mM. Gambar 5.15 menunjukkan bahwa enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler mulai tampak tebal pada konsentrasi IPTG 2 mM dan 2,5 mM. Hal ini sesuai dengan uji aktivitas sebelumnya, aktivitas tertinggi pada konsentrasi IPTG 2.5 mM.

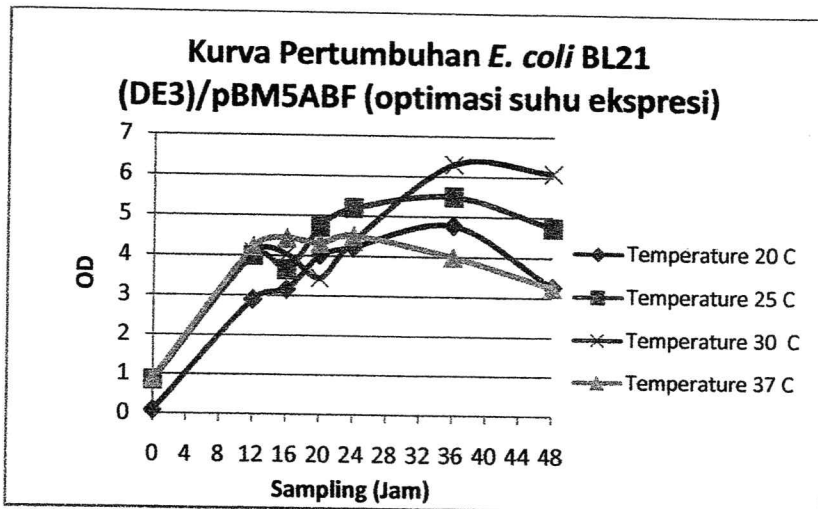


Gambar 5.15. Analisis SDS-PAGE dari enzim α -L-arabinofuranosidase pada berbagai variasi induser IPTG

5.2.3.2 Optimasi suhu ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler

5.2.3.2.1 Kurva Pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF

Pengaruh suhu dalam ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler akan diamati melalui kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dan aktivitas dari enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler. Dalam optimasi ini, suhu yang digunakan untuk ekspresi enzim α -L-arabinofuranosidase adalah 20, 25, 30 dan 37 °C.

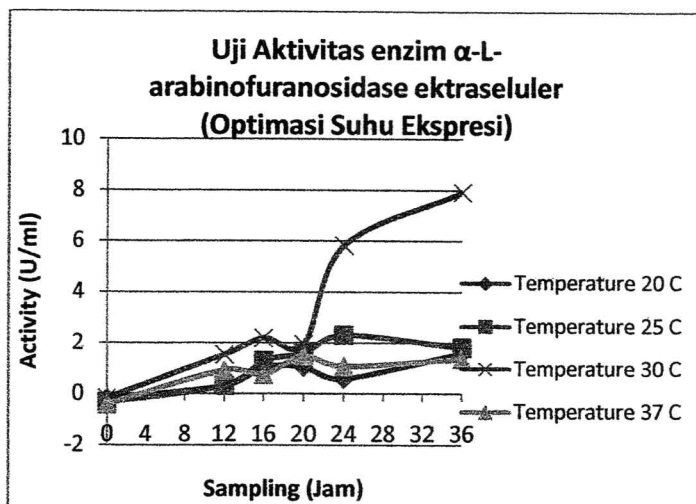


Gambar 5.16. Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF pada berbagai variasi suhu ekspresi

Gambar 5.16 terlihat bahwa pertumbuhan sel *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF tertinggi setelah waktu inkubasi 36 jam pada suhu 30 °C. Sedangkan pertumbuhan sel *E. coli* BL21 (DE3) terendah pada suhu 37 °C.

5.8.3.1.2 Uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan para-nitrofenil Arabinofuranosidase (pNPA)

Aktivitas α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler tertinggi didapatkan pada suhu ekspresi 30 °C, yaitu 7.93 U/mL dengan masa produksi 36 jam. Aktivitas tertinggi ini sebanding juga dengan pertumbuhan tertinggi sel *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF pada suhu ekspresi 30 °C dengan waktu inkubasi 36 jam.



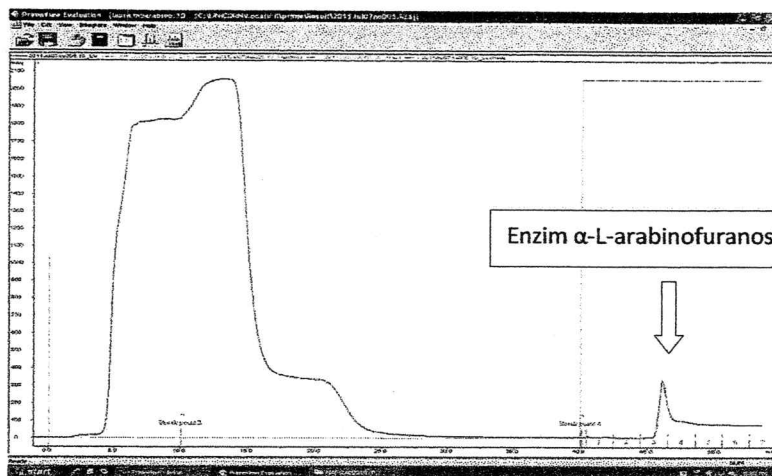
Gambar 5.17. Kurva Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler pada variasi suhu ekspresi

Dari kurva pertumbuhan *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dan aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler di atas dapat disimpulkan bahwa kondisi optimal untuk mengekspresikan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dilakukan dengan penambahan induser IPTG 2.5 mM dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 36 jam.

5.3. Purifikasi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan kolom Ni-NTA dalam AKTA PRIME

Enzim α -L-arabinofuranosidase rekombinan memiliki penanda His-tag yang diperoleh dari plasmid M5 pada sisi C-terminalnya, sehingga dalam proses purifikasi dapat digunakan purifikasi afinitas dengan kolom Ni-NTA. Enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler diproduksi dari *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5ABF dalam skala besar pada kondisi ekspresi yang optimum yaitu penambahan induser IPTG 2.5 mM dan diinkubasi pada suhu ekspresi 30 °C selama 36 jam. Enzim yang dihasilkan ini disebut sebagai *crude enzyme*, kemudian *crude enzyme* ini

dimasukkan dalam sistem AKTA PRIME untuk proses purifikasi dengan kolom Ni-NTA.



Gambar 5.18. Grafik dari purifikasi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan kolom Ni-NTA

Gambar 5.18 menunjukkan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dapat dipurifikasi dengan kolom Ni-NTA dalam AKTA PRIME. Dalam grafik tersebut terlihat bahwa enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler muncul setelah di elusi dengan imidazol 2 mM, enzim ini muncul pada fraksi ke-3. Sehingga pada fraksi ini akan dilakukan uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase dengan *p*-Nitrofenil Arabinofuranosidase untuk mengetahui aktivitas dari enzim yang telah dipurifikasi tersebut.

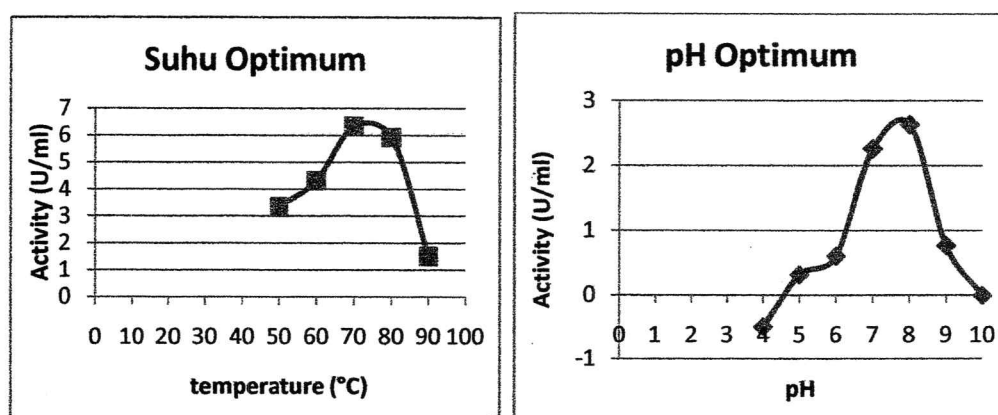
Tabel 5.2. Tabel kemurnian dari enzim α -L-arabinofuranosidase.

Sampel	Volume (mL)	aktivitas (U/mL)	Total Activity (U)	Total protein (mg)	Spesifik aktivitas (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	10	5,1766	51,766	6,319252	8,191	1	100
α -L-arabinofuranosidase pure	2	9,353004	18,706008	0,001637	11.427	1395	36.14

Tabel 1.2 diketahui bahwa aktivitas spesifik dari crude enzim adalah 8,191 U/mg, sedangkan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler hasil purifikasi dengan Ni-NTA memiliki aktivitas spesifik 11.427 U/mg.

5.4 Karakterisasi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler

Hasil purifikasi enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler akan digunakan untuk karakterisasi dari enzim tersebut. Karakterisasi pada enzim ini meliputi : pengukuran suhu optimum dan pH optimum.



Gambar 5.19. Grafik hasil pengukuran dari enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler. (A) Suhu Optimum, (B) pH optimum

Untuk menentukan suhu optimum dari enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dilakukan pengukuran aktivitas pada suhu inkubasi 50, 60, 70, 80 dan 90 °C. Berdasarkan hasil penelitian pada pengukuran suhu optimum enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler menunjukkan suhu optimum enzim tersebut adalah 70 °C dengan aktivitas 6.34 U/mL. Aktivitas enzim ini turun secara drastis pada suhu inkubasi 90 °C.

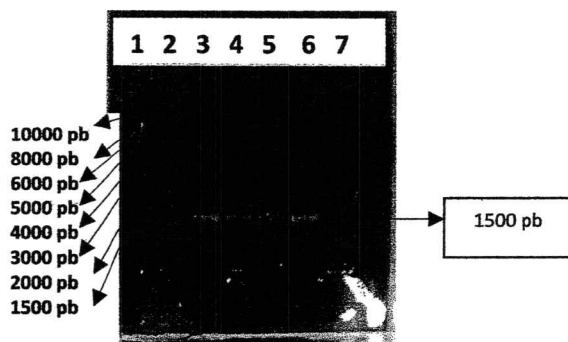
Untuk menentukan pH optimum dari enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dilakukan pengukuran aktivitas pada pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Berdasarkan hasil penelitian pada pengukuran pH optimum enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler menunjukkan pH optimum enzim tersebut adalah 8 dengan aktivitas 2,64 U/mL. Aktivitas enzim ini turun secara drastis pada pH 9.

5.5 PCR-Errorprone

5.5.1 Amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari pBM5ABF

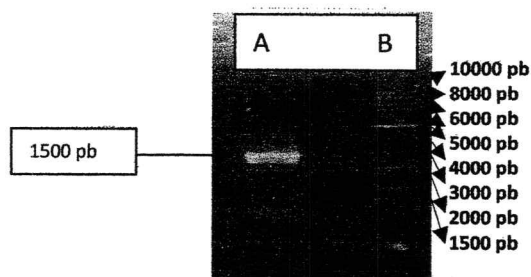
Proses amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari plasmid pBM5ABF untuk kondisi *errorprone* dilakukan menggunakan alat PCR Perkin Elmer dengan kondisi amplifikasi sebagai berikut : Sebelum proses amplifikasi DNA, terlebih dahulu dilakukan pra-denaturasi pada 95 °C selama 5 menit. Proses amplifikasi gen α -L-arabinofuranosidase dari pBM5ABF dilakukan 30 siklus reaksi. Setiap siklus terdiri dari : proses denaturasi pada 95 °C selama 1 menit, annealing pada 53°C selama 45 detik, perpanjangan rantai 72 °C selama 2 menit. Proses amplifikasi DNA diakhiri dengan penambahan ekstensi pada 72 °C selama 7 menit.



Gambar 5.20. Hasil amplifikasi gen α -arabinofuranosidase pada kondisi PCR-*errorprone* dengan optimasi gradien suhu annealing. (1) Marker, pBM5ABF dengan kondisi PCR-*errorprone* pada suhu annealing (2) 52°C, (3) 54°C (4) 56°C, (5) 58°C (6) 53°C (7) 51°C

Gambar 5.20 terlihat bahwa gen α -L-arabinofuranosidase dapat teramplifikasi dalam kondisi PCR-*errorprone* dengan optimasi gradien suhu

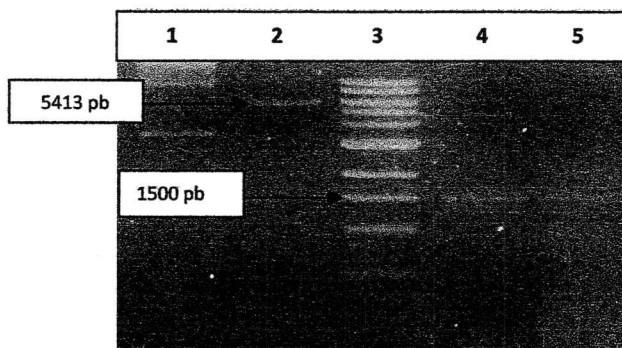
anealing. Ukuran gen α -L-arabinofuranosidase hasil amplifikasi menunjukkan \pm 1500 pb. Pita yang paling tebal merupakan kondisi PCR-*errorprone* yang paling optimal yaitu pada suhu annealing 54 °C sehingga pada kondisi optimum ini dilakukan PCR-*errorprone* kembali.



Gambar 5.21. PCR-*errorprone* pada gen α -L-arabinofuranosidase dengan suhu annealing 54 °C, (A) Kondisi PCR-*errorprone*, (B) Marker

5.5.2 Analisis restriksi gen α -L-arabinofuranosidase dan plasmid M5

Selanjutnya gen α -L-arabinofuranosidase dari produk PCR-*errorprone* dilakukan purifikasi gel. Kemudian gen ini dan plasmid M5 direstriksi oleh enzim *Bam*HI dan *Xho*I dan hasil kedua restriksi ini diligasikan dengan *T4* ligase. Produk ligasi ini ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21 (DE3) untuk mengekspresikan arabinofuranosidase mutan dalam proses skrining.

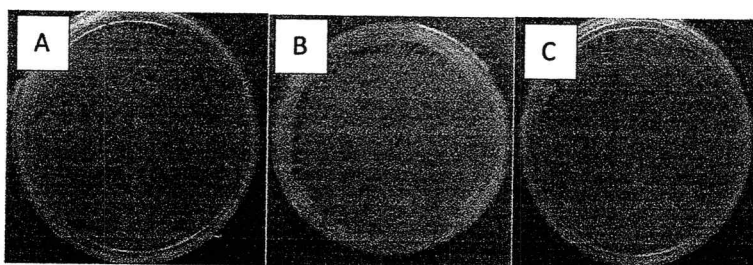


Gambar 5.22. Restriksi plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase. (1) Plasmid M5, (2) Restriksi plasmid M5 dengan enzim *Bam*HI and *Xho*I, (3) Marker, (4) Produk PCR (PCR-*errorprone*), (5) Restriksi produk PCR (PCR-*errorprone*)

Selanjutnya plasmid M5 dan gen α -L-arabinofuranosidase hasil restriksi diligasi untuk mendapatkan pBM5ABF varian dari hasil *errorprone*.

5.5.3 Transformasi pBM5ABF varian dalam *E. coli* BL21 (DE3)

Untuk selanjutnya gen α -L-arabinofuranosidase yang diamplifikasi dalam kondisi PCR-*errorprone* dan telah diklon dalam plasmid M5 sebagai pBM5ABF mutan ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21 (DE3).

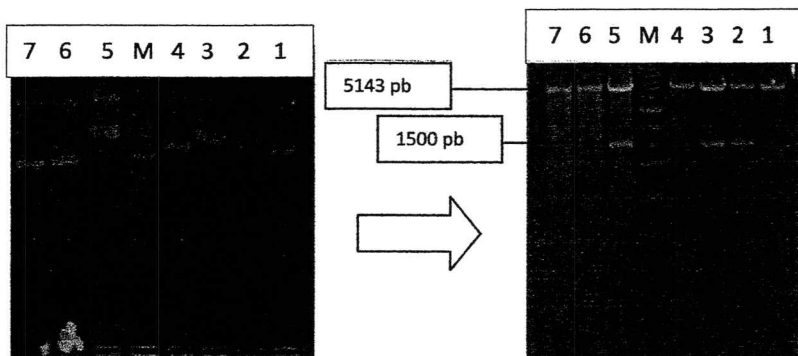


Gambar 5.23. Hasil transformasi varian (A) Kontrol positif (plasmid M5 dalam *E. coli* BL21 (DE3)), (B) Kontrol negatif (*E. coli* BL21 (DE3)), (C) pBM5ABF varian dalam *E. coli* BL21 (DE3)

5.5.4 Skrining Varian

Setelah proses transformasi ini dilakukan skrining pada beberapa koloni dilakukan untuk mengetahui efisiensi transformasi dan efisiensi *errorprone*. Untuk efisiensi transformasi dapat dianalisis dengan menghitung banyak koloni penyandi gen insert yang diambil secara acak. Beberapa koloni diambil secara acak untuk diisolasi plasmidnya dan dilakukan analisis restriksi dengan *Bam*HI dan *Xho*I. Plasmid yang telah diisolasi tersebut kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa untuk mengetahui adanya gen insert. Efisiensi transformasi dihitung dari banyaknya koloni positif penyandi gen insert dibandingkan dengan banyaknya koloni yang diambil secara acak. Dari Gambar 5.25 menunjukkan bahwa isolasi plasmid dari 7 koloni yang diambil secara acak

hanya 3 koloni positif pembawa gen insert. Hal ini berarti bahwa efisiensi transformasi 40 %.



Gambar 5.24. Skrining varian pBM5ABF. (A) Isolasi plasmid pBM5ABF varian, (B) Restriksi pBM5ABF varian

5.5.4.1 Sekuensing pBM5ABF varian hasil PCR-errorprone

Sekuensing dilakukan untuk menganalisis pBM5ABF varian dari hasil PCR-errorprone. Untuk analisis sekuensing setiap primer hanya mampu membaca 600 pb DNA secara tepat, sehingga karena gen α -L-arabinofuranosidase memiliki ukuran 1500 pb maka diperlukan desain primer tambahan yang dapat membaca sekuen pada posisi tengah. Untuk itu pada sekuensing pBM5ABF varian, dibutuhkan primer tambahan yang didesain pada posisi tengah urutan nukleotida dari gen α -L-arabinofuranosidase yang disebut sebagai primer *forward* 3 (F3). Pada penelitian ini, sekuensing dilakukan dengan menggunakan 3 primer, yaitu primer *pBRev*, *T7 terminator* dan F3. Hasil sekuensing yang menggunakan primer *T7 terminator*, dikomplemenken terlebih dahulu, selanjutnya digabung dengan hasil sekuensing untuk primer *pBrev* dan F3 sehingga diperoleh sekuen secara keseluruhan. Hasil sekuen selanjutnya dihomologikan dengan sekuen cetakan (α -L-arabinofuranosidase dalam pBM5ABF) untuk mengetahui ada tidaknya mutasi yang terjadi mutasi pada pBM5ABF hasil PCR-errorprone. Dari

hasil homologi dengan sekuen cetakan, didapatkan terjadi mutasi pada urutan nukleotida dari 5 sampel plasmid pBM5ABF varian hasil PCR-*errorprone* yang telah diambil secara acak.

5.5.4.2 Skrining varian enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan aktivitas pada pH 9

Hasil transforman yang didapatkan akan diskriming untuk mendapatkan koloni penyandi gen varian α -L-arabinofuranosidase, skrining ini dilakukan untuk mendapatkan varian yang mampu mengekspresikan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler yang memiliki aktivitas pada pH 9. Tahap skrining semikuantitatif digunakan substrat MUA. Substrat MUA akan memberikan reaksi positif pada enzim α -L-arabinofuranosidase dengan memunculkan *blue fluorescence*. Untuk proses skrining enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler mutan yang memiliki aktivitas pada pH 9 dapat dilakukan dengan mereaksikan enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dengan substrat MUA yang dilarutkan dalam bufer NaOH-glisin pH 9 dalam *microtiter plate 96 well*.

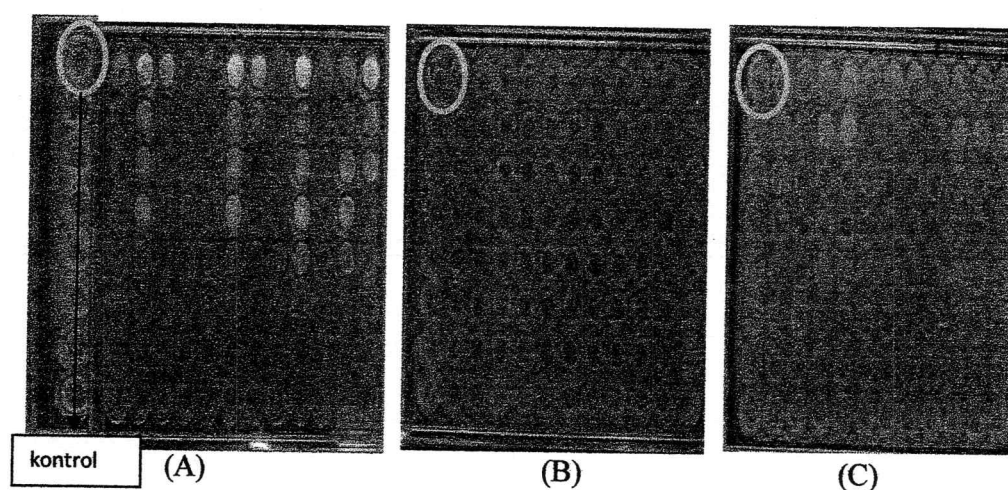
Sebelum dilakukan proses skrining pada varian dengan substrat MUA pH 9, metode skrining yang akan digunakan terlebih dahulu diujikan pada enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler hasil dari optimasi induser IPTG dalam *microtiter plate 96 well* dengan substrat MUA yang dilarutkan dalam bufer fosfat sitrat pH 7. Sebagai kontrol negatif digunakan enzim yang diproduksi oleh plasmid M5 tanpa gen insert.



Gambar 5.25. *Microtiter plate 96 well* untuk uji aktivitas semikuantitatif enzim α -L-arabinofuranosidase dari hasil optimasi penambahan induser IPTG dengan substrat MU-Arabinofuranosidase dalam bufer fosfat sitrat pH7. (1) M5 tanpa insert (kontrol negatif), (2) IPTG 0,5 mM, (3) IPTG 0,8 mM, (4) IPTG 1 mM, (5) IPTG 1,5 mM, (6) IPTG 2 mM, (7) IPTG 2,5 mM, (8) IPTG 3 mM

Dari Gambar 5.25 terlihat bahwa *blue fluorescence* dengan intensitas tertinggi pada enzim arabinofuranosidase ekstraseluler yang diekspresikan dengan induksi IPTG 2,5 mM, sedangkan pada kontrol negatif tidak menunjukkan adanya *blue fluorescence*. Setelah dilakukan uji pada metode skrining pada enzim arabinofuranosidase *wildtype* dan terbukti berhasil untuk membedakan aktivitas dari enzim tersebut yang diproduksi dengan variasi induser IPTG, untuk selanjutnya metode ini akan digunakan untuk skrining enzim arabinofuranosidase ekstraseluler hasil mutan dari PCR-*errorprone*. Arabinofuranosidase ekstraseluler hasil mutan diskriming dengan substrat MUA pH 9 dalam *microtiter plate 96 well*. Dari penelitian ini telah dilakukan skrining 288 koloni untuk mendapatkan mutan yang menghasilkan arabinofuranosidase ekstraseluler yang memiliki aktivitas pada pH 9. Koloni pada media LB padat hasil transformasi ke *E. coli* BL21 (DE3) diinokulasikan ke dalam 200 μ l media LB cair dalam *microtiter plate 96 well* selama *overnight*. Inokulum dari *96 well* masing-masing dipindahkan ke dalam *microtiter plate 96 well* yang berisi 800 μ l media LB cair dan diinkubasi pada suhu sampai OD=0,8, setelah itu ditambahkan induser IPTG 2,5 mM pada masing-masing well dan diinkubasi kembali pada suhu 30 °C selama 36 jam kemudian 4 jam pertama ditambahkan aditif glisin 10 mM. Kemudian *microtiter*

plate 96 well disentrifugasi sehingga didapatkan supernatan dan pelet. arabinofuranosidase ekstraseluler berada pada supernatan. Supernatan yang mengandung arabinofuranosidase ekstraseluler dari masing-masing *well* diambil 100 μL dimasukkan dalam *plate 96 well* dengan *micro channel pipet* dan ditambahkan 100 μL MUA dalam bufer pH 9 kemudian diinkubasi pada suhu 70 $^{\circ}\text{C}$ selama 25 menit. Setelah itu *plate 96 well* diamati dibawah UV akan terlihat *blue fluorescence* untuk arabinofuranosidase ekstraseluler yang memiliki aktivitas pada pH 9.



Gambar 5.26. *Microtiter plate 96 well* untuk skrining aktivitas semikuantitatif Enzim $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidase substrat MU-Arabinofuranosidase dalam bufer NaOH-glisin pH 9. (A) koloni 1-96, (B) koloni 97-192, (C) koloni 193-288

Dari Gambar 5.26 *microtiter plate 96 well* menunjukkan bahwa ada beberapa enzim $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidase setelah direaksikan dengan substrat MUA dan diamati dibawah UV memberikan *blue fluorescence*. *Microtiter* yang diberikan lingkaran berwarna kuning sesuai dengan gambar di atas merupakan kontrol dari enzim $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidase *wildtype*. Enzim $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosidase ekstraseluler yang memiliki aktivitas tinggi pada pH 9 akan

memberikan intensitas *blue fluorescence* yang paling tinggi. Ada beberapa enzim α -L-arabinofuranosidase hasil varian yang memberikan *blue fluorescence* dengan intensitas tinggi dibandingkan dengan kontrol. Enzim tersebut diseleksi untuk dilakukan skrining tahap kedua yaitu uji aktivitas secara kuantitatif dengan substrat pNPA. Dari skrining tahap pertama dengan substrat MUA dipilih 10 koloni yang mengekspresikan enzim α -L-arabinofuranosidase dengan intensitas *blue fluorescence* yang tinggi dari 21 koloni yang memancarkan *blue fluorescence*. Dari 10 koloni ini akan dilakukan uji aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase dengan substrat pNPA dalam bufer NaOH-glisin pH 9. Berikut data aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase dari 10 koloni varian.

Tabel 5.3 Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari beberapa koloni varian dengan substrat pNPA

	OD		Aktivitas (U/mL)
<i>Wild Type</i>	0.053	0.055	0.4647
Varian 7A	0.109	0.115	1.7069
Varian 9A	0.115	0.116	1.7819

Tabel 5.3 merupakan aktivitas varian enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler terhadap substrat pNPA dalam bufer NaOH-glisin pH 9 yang diambil sampling pada 2 varian yang memancarkan *blue fluorescence* dengan intensitas tinggi. Kemudian diskriminasi lagi 10 varian enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dan diuji aktivitas terhadap substrat pNPA dalam bufer NaOH-glisin pH 9.

Tabel 5.4 Aktivitas enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari beberapa koloni varian dengan substrat pNPA

	OD		Aktivitas (U/mL)
<i>wildtype</i>	0.073	0.084	0.753895
varian A2	0.142	0.127	1.953272
varian A3	0.153	0.149	2.167447
varian A6	0.175	0.180	2.874223
varian A12	0.147	0.142	2.30666
varian B2	0.129	0.142	1.97469
varian D2	0.122	0.119	1.653428
varian D6	0.101	0.138	1.63201
varian D9	0.122	0.113	1.589175

Dari Tabel 5.4 terlihat bahwa pada enzim α -L-arabinofuranosidase ekstraseluler varian dari 10 koloni yang telah dipilih dari hasil skrining tahap pertama dengan substrat MUA memiliki aktivitas pada substrat pNPA lebih besar dari kontrol enzim α -L-arabinofuranosidase *wildtype*. Aktivitas tertinggi pada varian A12 yaitu sebesar 2,874223 U/mL.

Untuk tahap selanjutnya dari 10 mutan yang memiliki aktivitas tertinggi ini akan dilakukan analisis sekuensing. Untuk sekuensing dari varian hanya dipilih 3 koloni yang memiliki aktivitas paling tinggi yaitu, A6, A9 dan A12. Hasil sekuensing ini dapat melihat adanya mutasi atau tidak dari masing-masing sekuen varian A6, A9 dan A12 dibandingkan dengan sekuen *wildtype*.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Gen penyandi α -L-arabinofuranosidase dari *E. coli* DH5 α /pTP510 telah berhasil diekspresikan dan disekresikan dalam sistem plasmid M5 (*excretory expression system*) di sel inang *E. coli* BL21 (DE3).
2. Beberapa varian α -L-arabinofuranosidase hasil dari *directed evolution* dengan PCR-*errorprone* menunjukkan peningkatan aktivitas hidrolase terhadap substrat *p*-Nitrofenil α -L-arabinofuranosidase (pNPA) pada pH optimum yaitu pH 9.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka perlu dipertimbangkan saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang karakterisasi varian α -L-arabinofuranosidase unggul yang memiliki aktivitas pH 9.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang segi bioinformatika dan *modeling* dari sekuen varian α -L-arabinofuranosidase unggul untuk melihat pengaruh adanya mutasi hasil *directed evolution* terhadap aktivitas enzim pada pH 9.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, U.F., 2009. **Extracellular α -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* and *A. oryzae***, *Australian Journal of Basic Applied Science*, 3(3):1984-1993.
- Arnold, F.H. 1998. **Design by directed evolution**. *Accounts of Chemical Research* 31: 125-131.
- Arnold, F.H. and Volkov, A.A. 1999. **Directed evolution of biocatalysts**. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 54-59.
- Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K. and Gershenson, A. 2001. **How enzymes adapt: lessons from directed evolution**. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26: 100-106.
- Arnold, F.H. and Gergiou, G. 2003. **Directed evolution library construction: methods and protocols**. Humana Press Inc., Totowa New Jersey.
- Auger EA and GN Bennett. 1987. **Temperature optimization of in vivo expression from the *E. coli* trp and trp : lac**. *Biotechnol Leu* 8 : 157-162.
- Baneyx F, A Ayling, T Palumbo, D Thomas and G Georgiou. 1991. **Optimization of growth conditions for production of proteolytically-sensitif protein in the periplasmic space of *Escherichia coli***. *Appl Microbial Biotechnol* 36:14-20
- Beg QKM, kapoor I, Mahajan G, hoondal S. 2001. **Microbial xylanase and their industrial application : a review**, *Appl Microbiol Biotechnol* 56 : 326-338.
- Birgisson, H., Fridjonsson, O., Mougeot, F.K.B., Hreggvidsson, G.O., Kristjansson, J.K., Mattiasson, B.. 2004. **A New Thermostable α -L-Arabinofuranosidase from a Novel Thermophilic Bacterium**, *Biotechnology Letters*, 26:1347-1351
- Brown, T.A. 2001. **Gene Cloning and DNA Analysis : An Introduction**. 4th Ed. Black well Science.
- Campbell, I.D. and Dwek, R. **Biological Spectroscopy**. Benjamin Cummings, new York, 1999
- Canakci, S., Kacagan, M., Inan, K., Belduz, A.O., Saha, B.C., 2008, **Cloning, Purification and Characterization of a Thermostable α -L-**

- Arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari, *Appl Microbiol Biotechnol*, 81:61-68.**
- Chen G, Hayhurst A, Thomas JG, Garvey BR, Iverson BL, Georgiou G. 2001. **Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS).** *Nat Biotechnol* 19:537-542.
- Chesshyre JA and AR Hipkiss. 1989. **Low temperature stabilize interferon alpha-2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 31 : 158-162.
- Cooper, G.M. and Hausman, R. E. 2004. **The Cell: A Molecular Approach 4 th ed.** Amer. Soc. Microbiol., Washington and Sinauer Assoc., Sunderland, MA
- Cooper, G.M. and Hausman, R.E. 2001. **The Cell: A Molecular Approach 3d ed.** Amer. Soc. Microbiol., Washington and Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- 112
- Debeche T. Cummings N. Connerton I. Debeire P. and O'Donohue MJ. 2000. **Genetic and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 66.4: 1734-1736.
- Fernandez LA, Sola I, Enjuanes L, De Lorenzo V. 2000. **Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system.** *Appl Environ Microbiol* 66:5024-5029.
- Fu Z, Hamid SBA, Razak CAN, Basri M, Salleh AB, Rahman RNZA. 2003. **Secretory expression in *Escherichia coli* and single-step purification of a heat-stable alkaline protease.** *Protein Expr Purif* 28:63-68.
- Herman, M. 1997. **Insect resistant via genetic engineering.** In: A. Darussamin, I.P. Kompang, and S. Moeljopawiro (Eds.). **Proceedings Second Conference on Agricultural Biotechnology.** Jakarta, 13-15 June 1995. Current Status of Agricultural Biotechnology in Indonesia, Research and Development and Priorities, Agency for Agricultural Research and Development, Ministry of Agriculture: 217-226.
- Horikoshi K. 1999. **Alkaliphilic : Some Application of their Products for biotechnology,** *Microbiol mol Biol Rev* 63 : 735-750

- Ingraham J. 1987. **Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth.** In : *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular Biology (Neidhardt FC, JL Ingraham, KB low, B Magasanik, M Schaechter and HE Umbarger, eds), Vol 2, pp 1543-1554, American society for Microbiology, wangsington, DC.
- Invitrogen, 2006. **Champion pET Directional Expression Kits. Five-minute, directional Cloning of blunt-end PCR product into vectors for high-level, inducible expression in *E.coli***
- Jang KH, Seo KB, Song KB, Kim CH, Rhee SK. 1999. **Extracellular secretion of levansucrase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*.** Bioproc Eng 21:453-458.
- Jeong KJ, Lee SY. 2002. **Excretory production of human β -endorphin into culture medium by using outer membrane protein F as a fusion partner in recombinant *Escherichia coli*.** Appl Environ Microbiol 68:4979-4985.
- Jonet M.A. 2011. **Optimization of a heterologous signal peptide by site-directed mutagenesis for improved secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*.** The Genomic and molecular Biology initiatives Programme of Malaysia Genome Institute, Ministry of Science, Technology ang Innovatiomm Malaysia.
- Kaderbhai N, Karim A, Hankey W, Jenkins G, Venning J, Kaderbhai MA. 1997. **Glycine-induced extracellular secretion of a recombinant cytochrome expressed in *Escherichia coli*.** Biotechnol Appl Biochem 25:53-61.
- Kleist S, Miksch G, Hitzmann B, Arndt M, Friehs K, Flaschel E. 2003. **Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fedbatch fermentation strategies.** Appl Microbiol Biotechnol 61:456-462.
- Kosinski MJ, U Rinas and JE Bailey. 1992. **Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside influences metabolism of *Escherichia coli*.** Appl Microbial 36 : 782-784.
- Kuchner, O. and Arnold, F.H. 1997. **Directed evolution of enzyme catalysts.** Trends in Biotechnology 15: 523-530.
- Kujau MJ, Hoischen C, Riesenbergr D, Gumpert J. 1998. **Expression and secretion of functional miniantibodies McPC603scFvDhlx in cell-wall-less L-form strains of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*: A comparison of the synthesis capacities of L-form strains with an *E. coli* producer strain.** Appl

Microbiol Biotechnol 49:51–58.

Laffend L and ML Ahuler. 1994. **Structured model of genetic control via the lac promoter in *Escherichia coli***. Biotechnol Bioeng 43 : 399-410.

Lee, J.W., Park, J.Y., Kwon, M., Choi, I.G., 2009, **Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from the Brown-Rot Fungus *Laetiporus sulphureus***, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, VOL. 107 No. 1, 33-37.

Lesney, M.S. 2003. **Biocatalysis on board. Today's Chemist at work**. pp 20-23.

Lin W, Huang S, Chou CP. 2001b. **High-level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of *Escherichia coli***. J Chem Technol Biotechnol 76:1030–1037.

Makrides SC. 1996. **Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli***. Microbiol Rev 60:512–538.

Miksch G, Neitzel R, Fiedler E, Friehs K, Flaschel E. 1997 **Extracellular production of a hybrid β -glucanase from *Bacillus* by *Escherichia coli* under different cultivation conditions in shaking cultures and bioreactors**. Appl Microbiol Biotechnol 47:120–126.

Nagahari K, Kanaya S, Munakata D, Aoyagi Y, Mizushima S. 1985. **Secretion into the culture medium of a foreign gene product from *Escherichia coli*: use of the *ompF* gene for secretion of human β -endorphin**. EMBO J 16:3589–3592.

Numan, M.T and Bhosle, N.B. 2006. **α -L-arabinofuranosidase : the potential applications in biotechnology**. J Ind Microbial Biotechnol 33 : 247-260.

Promrose, S.B. and Old, R.W. 2003. **Principles of Gene Manipulation : An introduction to Genetic Engineering**. Lackwell Science Ltd.p : 237-146.

Pugsley AP. 1993. **The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria**. Microbiol Rev 57:50–108.

Purwadi, N.M. 2009. **Peningkatan Alkalistabilitas β -xilosidase dari mutan pETxyl2 yang diperoleh dengan *site-directed mutagenesis*, penelitian S2-UNAIR, Surabaya.**

- Puspaningsih, N.N.T. 2003. **Kloning Gen Penyandi Enzim xilanolitik di E.coli DH5 α** , penelitian S3-IPB, Bogor dan JSPS-Short Course Program, September-November, Mie University, Jepang.
- Puspaningsih, N.N.T.; Suwanto A.; Suhartono M.T.; Suminar S.A.; Kimura T., dan Ohmiya, K. 2005. **Cloning of Clustered Gene for Thermostable Xylan-Degrading Enzyme β -xylosidase and α -arabinofuranosidase of *Bacillus thermoleovorans IT-08***, International Workshop on Biorefinery and Bioenergy, Kyoto 9-10 februari 2005, Japan.
- Puspaningsih, N.N.T., Manuhara, S.Y, Kralj, S.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B.W. 2008. **Peningkatan Bifungsional enzim α -arabinofuranosidase dari *Geobacillus thermoleovorans*.**
- Robbens J, Raeymaekers A, Steidler L, Fiers W, Remaut E. 1995. **Production of soluble and active recombinant murine interleukin-2 in *Escherichia coli*: high level expression, Klf-induced release, and purification.** Protein Expr Purif 6(4):481-486.
- Reetz MT, Rentzsch M, Pletsch A, Maywald M, **Towards the Directed Evolution of Hybrid Catalysts**, Chimia 2002, 56, 721-723.
- Rohman, A.; oosterwijk, N.; Kralj, S.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B.W. and Puspaningsih, N.N.T. 2007. **Peningkatan termostabilitas β -xilosidase dengan site-directed mutagenesis.**
- Rohman, A.; oosterwijk, N.; Kralj, S.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B.W. and Puspaningsih, N.N.T. 2007. **Purification, crystallization and preliminary x-ray abalysis of a thermostable glycoside hydrolase family 43 β -xilosidase *Geobacillus thermoleovorans***, Acta Crystallogr., F63 : 932-935.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2001. **Molecular Cloning.** A Laboratory Manual 3rded. New York : Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. (eds). 2001. **Molecular Cloning : a Laboratory manual**, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shallom D, Belakhov V, Solomon D, Shoham G, Baasov T, Shoham Y. 2002. **Detailed Kinetic Analysis and Identification of Nucleophile in α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6, afamily 51 Glycoside Hydrolase**, J Biol Chem 277 : 436667-43673.

- Sroga GE, Dordick J. 2002 **A strategy for in vivo screening of subtilisin E reaction specificity in *E. coli* periplasm.** *Biotechnol Bioeng* 78:761–769.
- Stryer L, Tymoczko JL, and Berg JM. 2002. **Biochemistry**, Edisi ke-5, New York : WH Freeman.
- Surek B, M Wilhelm and W Hillen. 1991. **Optimizing the promoter and ribosome binding sequence for expression of human single chain urokinase-like plasminogen activator in *Escherichia coli* and stabilization of the product by avoiding heat shock response.** *Appl Microbiol Biotechnol* 34 : 488-494.
- Tan, I. 1999. **Karakterisasi Xilanase Bakteri Xilanolitik Termofilik yang diisolasi dari Sumber Air Panas Gunung Pancar Bogor**, Tesis S2-IPB, Bogor.
- Takagi H, Y Morinaga, M Tsuchiya, H Ikemura and M. Inouye. 1988. **Control of folding of protein secreted by a high expression vector, pIN-III-OmpA : 16-fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*.** *Bio/Technology* 6 : 948-950
- Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K. 2003. **Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocess : A review.** *Process Biochem.* 38 : 1237-1340.
- Tong L, Lin Q, Wong WKR, Ali A, Lim D, Sung WL, Hew CL, Yang DSC. 2000. **Extracellular expression, purification, and characterization of a winter flounder antifreeze polypeptide form *Escherichia coli*.** *Protein Expr Purif* 18:175–181.
- Van derWal FJ, Koningstein G, ten Hagen CM, Oudega B, Luirink J. 1998. **Optimization of bacterocin release protein (BRP)- mediated protein release by *Escherichia coli*: random mutagenesis of the pCloDF13-Derived BRP gene to uncouple lethality and quasi-lysis from protein release.** *Appl Environ Microbiol* 64:392–398.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J. 2001. **Hyperthermophilic Enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 1-43.
- Viikari L, Kantelinen A, Sundquist J, Linko M. 1994. **Xylanases in bleaching : from an idea to the industry.** *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:305-317.

- Wan EW, Baneyx F. 1998. TolAIII co-expression facilitates the recovery of periplasmic recombinant proteins into the growth medium of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 14:13–22.
- Yang J, Moyana T, Mackenzie S, Xia Q and Xiang J. 1998. One hundred Seventy-fold increase in excretion of an FV frangmant tumor necrosis factor alpha fusion protein (SFV/TNF- α) from *Escherichia coli* caused by the synergistic effects of glycine and triton X-100. *Appl Environ Microbiol* 64:2669–2874.
- Yang, Y.; Yoon, H.; Ahn, HJ.; Lee, B.; Pedelacq, J.; Llong, E.C.; Berendzen, J.; Laivenicks, M.; Vielle, C.; Zeikus, J.G.; Vocadlo, D.J.; Wither, S.G. and Suh, S.W. 2004. Crystal structure of β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a family 39 glycoside hydrolase, *J. Molecular Biology*, 335 : 155-165.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase chain reaction*. Andi offset. Yogyakarta
- Zhou S, Yomano LP, Saleh AZ, Davis FC, Aldrich HC, Ingram LO. 1999. Enhancement of expression and apparent secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase (encoded by *celZ*) in *Escherichia coli* B. *Appl Environ Microbiol* 65:2439–2445.

LAPORAN KEMAJUAN

**PENINGKATAN pH OPTIMUM β -XILOSIDASE REKOMBINAN
DENGAN TEKNIK MUTASI TERARAH BERDASARKAN
DESAIN RASIONAL**



**Lanny Hartanti
NIM. 090970206/D**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

0

1. Pendahuluan

β -xilosidase adalah salah satu kelompok enzim xilanolitik yang berperan penting pada proses hidrolisis xilan. Xilan merupakan komponen utama penyusun hemiselulosa, yang banyak terdapat pada limbah hutan dan pertanian. Enzim ini bekerja secara sinergis dengan endo- β -xilanase, ekso-xilanase, dan α -L-arabinofuranosidase, yaitu menghidrolisis xilobiosa dan sejumlah kecil xilooligosakarida, hasil hidrolisis enzim xilanolitik lainnya, menjadi D-xilosa. D-xilosa merupakan produk hidrolisis xilan yang banyak digunakan di industri makanan maupun farmasi. Pada pemanfaatannya kelompok enzim yang memiliki kestabilan tinggi, baik terhadap suhu maupun pH, lebih diminati dan memiliki nilai jual lebih tinggi.

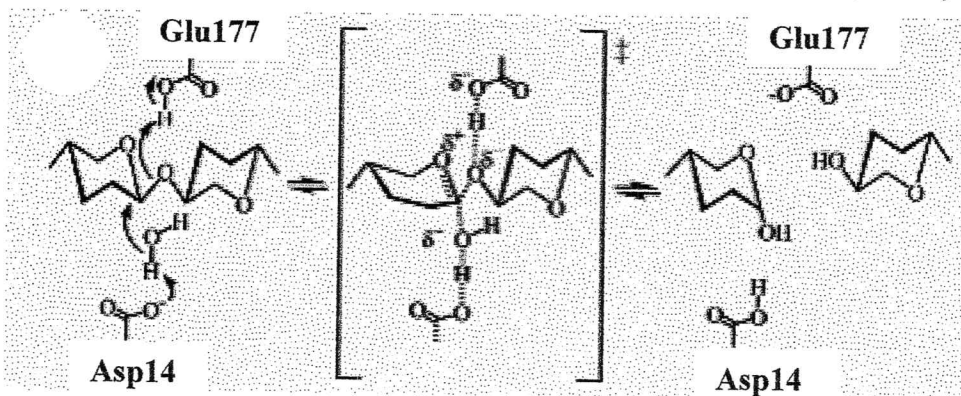
Gen penyandi β -D-xilosidase (*xyI*) dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 telah berhasil diklon ke plasmid pTP510 dalam *E. coli* DH5 α . Selanjutnya gen *xyI* tersebut berhasil diklon dan diekspresi tinggi dalam sistem pET101/D-TOPO dalam inang *E. coli* BL21 star (DE3). Enzim rekombinan yang dihasilkan memiliki kelebihan dapat diproduksi secara konstitutif pada suhu pertumbuhan sel inang (37°C), dan tetap mampu menunjukkan aktivitas optimum pada suhu 50°C, namun masih bersifat labil terhadap alkali (aktivitas optimum pada pH 6) (Puspaningsih *et al.*, 2004, 2007). Dibandingkan dengan α -L-arabinofuranosidase dari sumber yang sama, yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 70°C, kestabilan terhadap suhu dari enzim β -xilosidase yang dihasilkan masih tergolong rendah.

Purwadi (2009) telah memproduksi mutan D139N dari enzim ini dalam rangka meningkatkan kestabilannya terhadap basa. Namun upaya ini hanya mampu menggeser pH optimum β -xilosidase satu unit saja, dari pH 6 menjadi pH 7, dengan aktivitas optimum tetap pada suhu 50°C. Oleh karenanya, masih diperlukan upaya untuk meningkatkan kestabilan β -xilosidase yang diekspresikan oleh sistem pET101/D-TOPO dalam inang *E. coli* BL21 (DE3 star).

Pada penelitian ini akan dilakukan upaya peningkatan kestabilan β -xilosidase dari sistem pET101/D-TOPO rekombinan melalui mutasi terarah dengan PCR, berdasarkan desain rasional. Desain rasional dilakukan secara *in*

silico dengan menggunakan teknik bioinformatika dan pemodelan protein, dengan memperhatikan beberapa faktor penentu kestabilan enzim terhadap basa. Informasi mengenai faktor-faktor penentu kestabilan enzim terhadap basa diperoleh dari beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, terhadap xilanase dari berbagai sumber mikroorganisme.

β -xilosidase yang digunakan pada penelitian ini termasuk kelompok enzim GH 43. Enzim ini memiliki residu katalitik Asp14 sebagai basa umum, Glu177 sebagai asam umum, serta Asp121 sebagai modulator pKa umum dan penentu arah yang tepat terhadap substrat. Mekanisme reaksi katalisis xilan oleh β -xilosidase kelompok GH43 berdasarkan inversi pusat anomerik dengan melibatkan residu katalitik aspartat dan glutamat dengan reaksi penggantian tunggal (Gambar 1.1). Gugus karboksil pertama, Glu177, berfungsi sebagai asam umum yang mengkatalisis pelepasan gugus pergi aglikon, dengan cara memprotonasinya. Gugus karboksil kedua, Asp14, berfungsi sebagai asam umum, yang mengaktifasi molekul air nukleofilik untuk menyerang karbon anomerik, sehingga memutus ikatan glikosidik dan menyebabkan inversi konfigurasi pada karbon anomerik (Brüx *et al.*, 2006, Collins *et al.*, 2005).

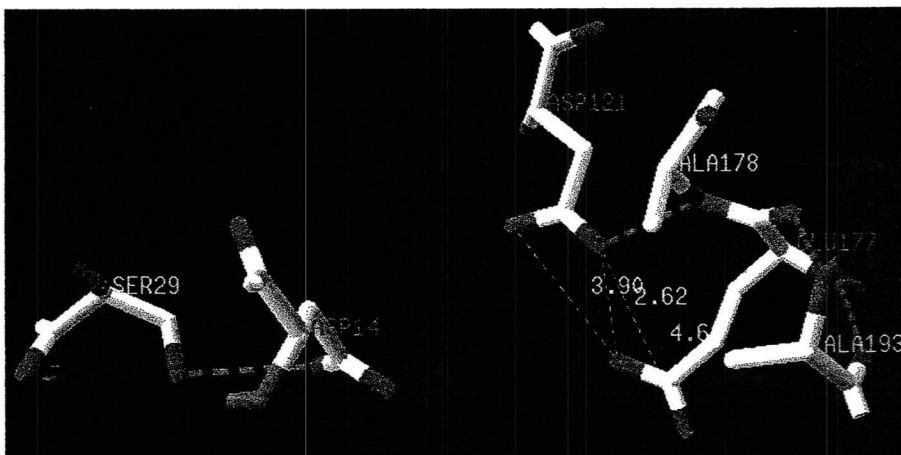


Gambar 1.1 Mekanisme umum reaksi inversi β -xilosidase GH43

Residu Asp14 dan Glu 177 merupakan residu asam amino bersifat asam, dengan pKa berturut-turut 3,65 dan 4,25 (Lehninger, 2000). Pada pH optimum enzim, yaitu pH 6,0, kedua residu ini akan terionisasi menjadi ion bermuatan negatif, sesuai persamaan $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{COO}^-$. Hal ini bersifat logis untuk residu Asp14, yang pada mekanisme katalisis enzimatik β -xilosidase dengan substrat berfungsi sebagai basa umum, yaitu mengaktifasi molekul air untuk

bertindak sebagai nukleofilik yang menyerang atom karbon anomerik. Namun demikian, ionisasi residu Glu177 pada pH 6,0 bersifat tidak logis, karena residu ini berperan sebagai asam yang mendonorkan protonnya untuk memprotonasi aglikon sebagai gugus pergi. Dengan mengurangi keasaman sisi katalitik, yaitu keasaman daerah sekitar residu Glu177, maka kemampuan residu Glu177 sebagai pendonor proton berkurang, sehingga membutuhkan pH lebih tinggi (pH optimum enzim lebih tinggi) untuk mengembalikan fungsi Glu177 sebagai asam atau donor proton.

Berdasarkan analisis terhadap model β -xilosidase dengan menggunakan program Swiss PDB Viewer atau DeepView, dapat diketahui residu-residu di sekitar residu katalitik yang berinteraksi dengan residu katalitik dan mungkin mempengaruhi reaksi katalisis enzim dengan substrat. Residu-residu tersebut adalah Ala193 yang membentuk dua ikatan hidrogen dengan residu Glu177, residu Ala178 yang membentuk satu ikatan hidrogen dengan Asp121, serta residu Ser29 yang membentuk satu ikatan hidrogen dengan residu Asp14 (Gambar 1.2).



Gambar 1.2 Residu-residu katalitik model β -xilosidase GH43 dan tetangganya (program Swiss PDB Viewer)

Pada gambar 2.2 juga diperlihatkan residu terdekat dengan residu Glu177 adalah residu Asp121, dengan jarak 2,62 Å. Dengan demikian, residu Asp121 adalah residu yang berperan penting dalam menyumbangkan proton ke residu Glu177, sehingga Glu177 tetap terprotonasi pada pH optimum enzim yang lebih besar daripada pKa glutamat, dan tetap dapat berfungsi sebagai asam pada

reaksi enzim-substrat. Hal ini didukung oleh hasil eksplorasi β -xilosidase kelompok GH43 dari *Geobacillus stearothermophilus* (Brüx *et al*, 2006). Selain itu, residu Asp128 enzim ini, yang analog dengan residu Asp121 pada β -xilosidase kelompok GH43 dari *Geobacillus thermoleovorans*, memiliki fungsi sebagai pengarah orientasi enzim terhadap substrat dan juga berperan dalam pengikatan substrat melalui 2-O glikon.

Dalam rangka meningkatkan kestabilan β -xilosidase terhadap pH, maka pada penelitian ini akan dilakukan mutasi terarah terhadap gen penyandi enzim tersebut. Asam amino yang akan dimutasi adalah residu yang mempengaruhi keasaman sisi katalitik, yaitu residu Asp121. Residu ini akan dimutasi menjadi beberapa residu asam amino lainnya, yaitu asparagin, glutamat, leusin, dan threonin (Gambar 1.3).

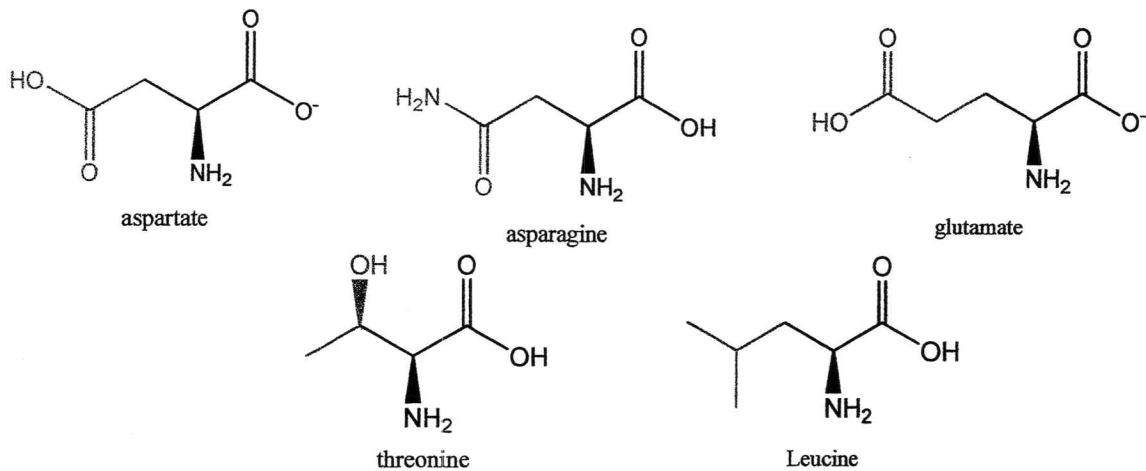
Asparagin memiliki rantai samping yang sama dengan aspartat, namun bermuatan netral. Dengan menggunakan program DeepView, dapat diprediksikan bahwa dengan bergantinya gugus $-OH$ menjadi gugus NH_2 , maka akan terbentuk ikatan hidrogen baru antara atom O dari Glu177 dengan atom H dari gugus NH_2 residu Asn, dan jarak antar residu berkurang menjadi 2,47 Å. Namun demikian keelektronegatifan atom N lebih rendah dibandingkan atom O, sehingga kecenderungan atom N untuk memprotonasi (mendonorkan protonnya) ke atom O residu Glu177 lebih rendah. Dengan demikian residu Glu177 akan semakin sulit terprotonasi, sehingga dibutuhkan suasana pH lebih tinggi untuk memprotonasi residu ini, atau dengan kata lain pH optimum enzim akan bergeser ke suasana lebih basa.

Sasaran mutasi yang kedua adalah Asp121 menjadi Glu121. Berdasarkan pemodelan dengan program DeepView, diperkirakan jarak antara gugus $-OH$ Glu121 dengan atom O karboksilat Glu177 menjadi lebih pendek, yaitu dari 2,62 Å menjadi 2,38 Å, sehingga residu Glu177 menjadi semakin mudah terprotonasi. Dengan demikian pH optimum enzim diperkirakan bergeser ke suasana lebih asam.

Mutasi Asp121 menjadi Thr121, menyebabkan jarak antar residu 121 dengan Glu177 menjadi lebih panjang, yaitu 3,64 Å. Akibatnya residu Glu177

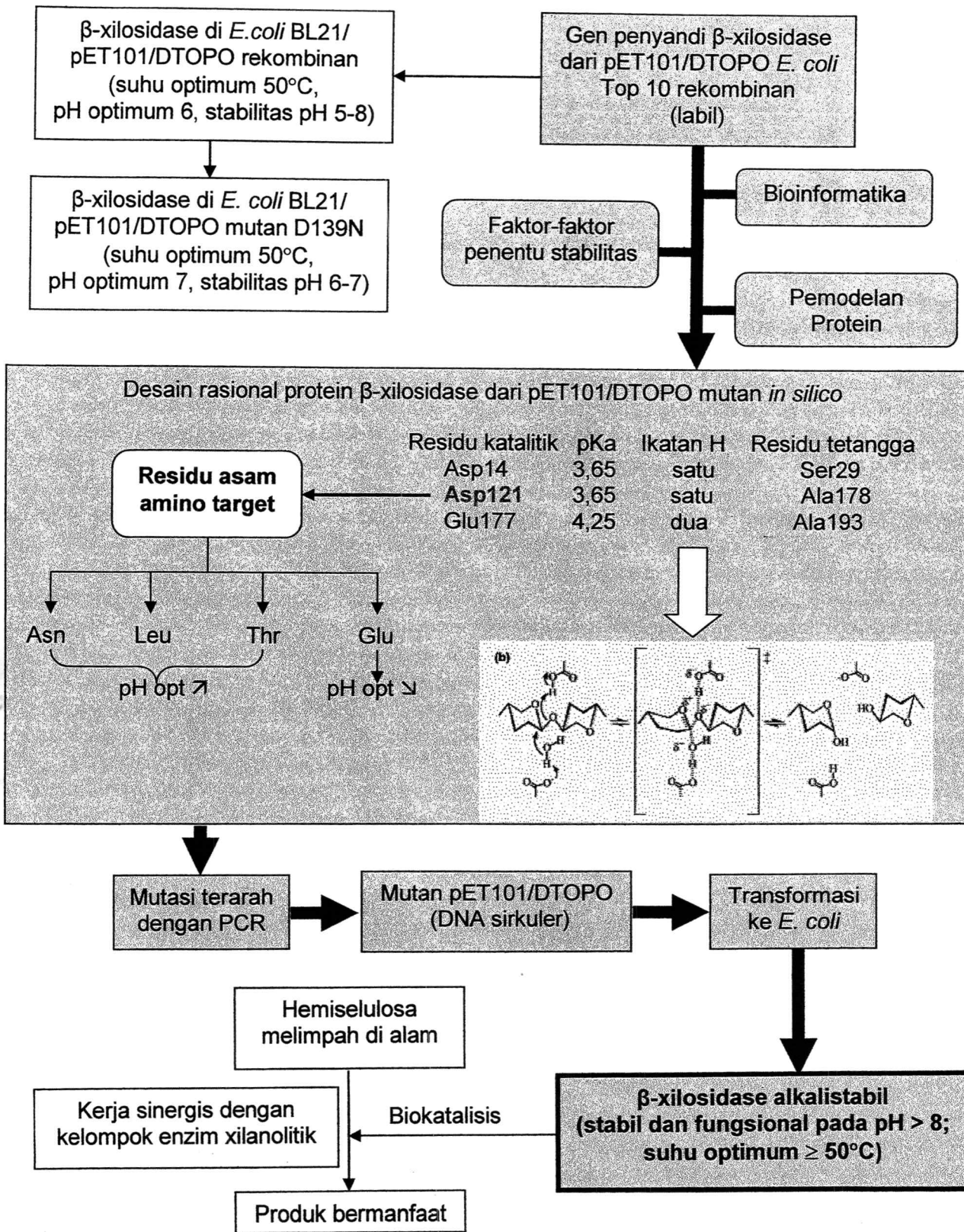
menjadi lebih sulit untuk terprotonasi dibandingkan tipe aslinya. Oleh karena itu diperkirakan pH optimum enzim diperkirakan bergeser ke suasana lebih basa.

Mutan keempat adalah Asp121 menjadi Leu121. Leusin adalah residu asam amino yang bersifat non polar, tidak memiliki atom O atau atom lain yang bersifat elektronegatif. Dengan demikian residu leusin diperkirakan tidak mampu memprotonasi residu Glu177, dan diperkirakan pH optimum akan bergeser ke suasana basa, namun aktivitas enzim akan berkurang dibandingkan tipe aslinya.



Gambar 1.3 Residu asam amino sasaran dan target mutasi pada β -xilosidase

Berdasarkan hasil desain rasional secara *in silico*, dilakukan mutasi terhadap gen penyandi β -xilosidase dari sistem pET101/D-TOPO rekombinan dengan menggunakan PCR. Produk PCR adalah suatu DNA mutan yang berbentuk sirkuler, yang selanjutnya ditransformasikan ke *E. coli* BL21 (DE3 star). Selanjutnya, dilakukan karakterisasi terhadap suhu dan pH optimum, serta kestabilan terhadap suhu dan basa dari β -xilosidase yang dihasilkan. Kerangka konseptual penelitian dapat dilihat pada bagan dalam gambar 1.4 di bawah ini.



Gambar 1.4 Skema kerangka konseptual penelitian (Catatan: bagian yang akan diteliti diberi warna biru)

2. Tujuan Penelitian

2.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh temuan baru yaitu β -D-xilosidase yang stabil, yaitu memiliki suhu optimum $> 50^{\circ}\text{C}$, pH optimum > 8 , serta kestabilan tinggi terhadap suhu dan pH basa. Selain itu ingin diperoleh pula pemahaman mengenai pengaruh mutasi satu asam amino potensial, menjadi asam amino lain yang bersifat netral atau non polar, terhadap kestabilan enzim terhadap pH maupun suhu, serta struktur tiga dimensi β -D-xilosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 secara *in silico*.

2.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk :

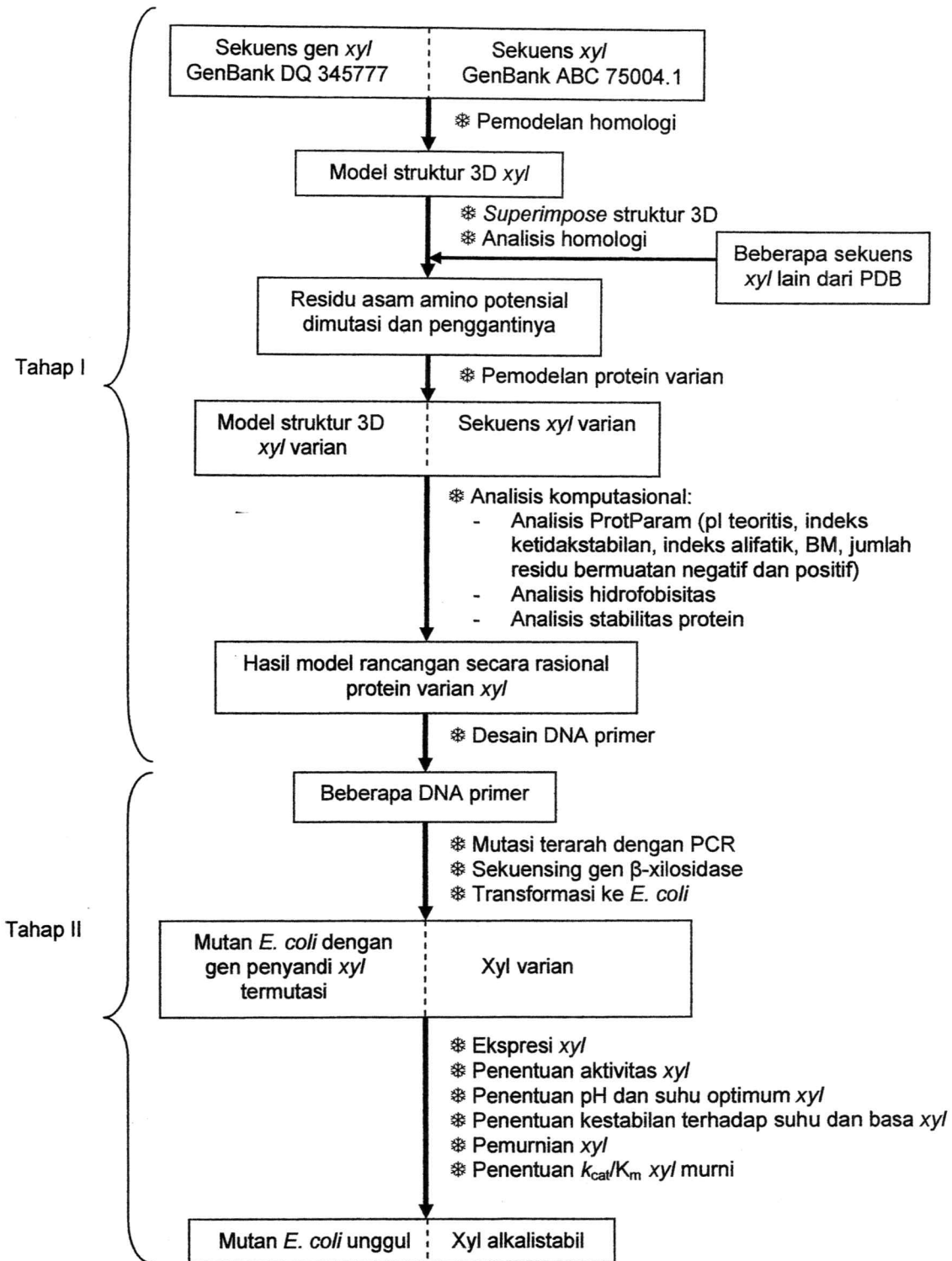
- a. Mengidentifikasi residu asam amino pada β -xilosidase yang berperan pada sifat kestabilannya terhadap pH basa.
- b. Menentukan hasil mutasi pada residu asam amino sasaran yang meningkatkan pH optimum β -xilosidase.

3. Metode Penelitian

Penelitian dibagi dalam dua tahap besar seperti yang diilustrasikan pada gambar 3.1. Tahap pertama adalah tahap laboratorium kering, yaitu perancangan secara rasional protein β -xilosidase mutan yang memiliki kestabilan terhadap basa. Tahap ini melibatkan pengunduhan sekuens gen β -xilosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dari GenBank dengan *accession number* DQ 345777, serta sekuens asam amino β -xilosidase dengan *accession number* ABC 75004.1. Karena struktur tiga dimensi β -xilosidase belum ada di Protein Data Bank (PDB), maka dengan menggunakan sekuens asam amino yang diperoleh dilakukan penentuan struktur model tiga dimensi β -xilosidase tersebut dengan menggunakan program *on-line* SwissProt atau program *off-line* Easy Modeller.

Selanjutnya dilakukan analisis homologi sekuens asam amino β -xilosidase terhadap beberapa sekuens asam amino β -xilosidase dari sumber mikroorganisme lainnya, yang diperoleh dari PDB. Analisis homologi (*alignment*, baik membandingkan hanya sepasang sekuens, maupun membandingkan beberapa sekuens sekaligus) dapat dilakukan dengan BLAST (program *online* dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), program Clone Manager, atau program

BioEdit. *Superimpose* dan analisis struktur tiga dimensi protein, dapat dilakukan dengan menggunakan program Pymol serta Swiss PDB Viewer / DeepView.



Gambar 3.1 Kerangka operasional penelitian

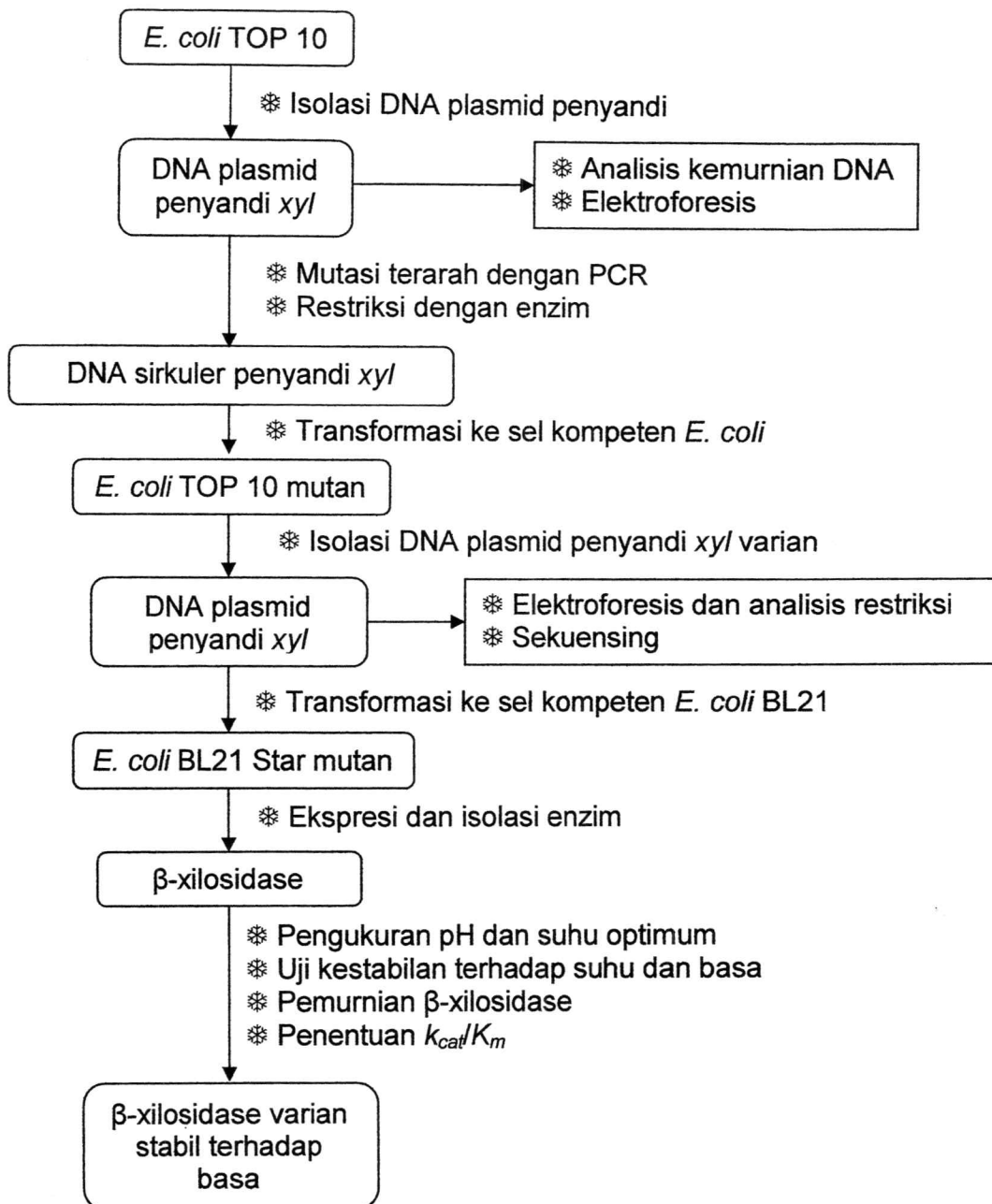
Berdasarkan hasil analisis homologi, dan dengan memperhatikan beberapa faktor penentu stabilitas protein terhadap suhu maupun pH, maka dapat ditentukan residu asam amino yang potensial untuk dimutasi, dengan menggunakan teknik mutasi terarah - PCR. Proses mutasi secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan program Swiss PDB Viewer (SPDBV atau DeepView). Dengan program ini pula dapat dilakukan minimasi energi untuk memperoleh model mutan yang dikehendaki dengan energi minimal atau stabil.

Selain itu dilakukan pula analisis *in silico* terhadap protein varian hasil mutasi, yang meliputi:

1. analisis sifat-sifat fisika protein (pI teoritis, indeks ketidakstabilan, indeks alifatik, BM, jumlah residu bermuatan negatif dan positif), dengan program *online* ProtParam;
2. prediksi hidrofobisitas protein, misalnya melalui <http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydrophaty/>;
3. prediksi ikatan disulfida, melalui <http://disulfind.dsi.unifi.it/>;
4. prediksi kestabilan protein, melalui <http://eris/dokhlab/org> (harus registrasi dulu dan perlu file PDB protein yang dianalisis) atau <http://foldx.crg.es/> (untuk protein yang memiliki ikatan disulfida).

Setelah diperoleh rancangan protein varian, langkah selanjutnya adalah mendesain beberapa primer yang diperlukan untuk melakukan proses mutasi terarah pada beberapa lokasi residu asam amino. Desain primer dilakukan dengan program Clone Manager.

Tahap kedua pada penelitian ini adalah tahap mutasi terarah berdasarkan rancangan yang telah disiapkan pada tahap pertama. Tahapan kerja pada tahap kedua ini diilustrasikan pada gambar 3.2 berikut.



Gambar 3.2 Skema kerja tahap II

4. Hasil Penelitian sampai Bulan Agustus 2011

Sampai akhir bulan Agustus 2011, tahap I dari penelitian ini telah selesai dikerjakan, sehingga diperoleh dasar untuk menetapkan hipotesis penelitian seperti yang dijelaskan pada bagian pendahuluan. Pada laporan kemajuan ini akan dijelaskan hasil penelitian pada tahap II, yaitu mulai dari tahap mutasi terarah, sampai diperoleh varian-varian baru hasil mutasi yang murni serta karakterisasinya.

Desain DNA Primer

Untuk melakukan mutasi *xyl*, didesain beberapa *sequence* primer mutagenik. DNA primer tersebut didesain berdasarkan *sequence* DNA penyandi *Xyl* (GenBank dengan *Accession number* ABC75004). Desain DNA primer dilakukan dengan menggunakan program CloneManager (Scientific & Educational Software, 2000). Tabel 4.1 menunjukkan *sequence* primer-primer mutagenik yang digunakan untuk melakukan mutasi (*site-directed mutagenesis*).

Tabel 4.1 *Sequence* primer mutagenik

Mutasi	Kode ^{*)}	Panjang (pb)	Sequence Primer ^{**)}
D121E	D121E-F	17	5' -GGAGGCATTGAGCCATC-3'
	D121E-R	17	5' -GATGGCTCAATGCCTCC-3'
D121N	D121N-F	19	5' -GATGGGGAGGCATTAATCC-3'
	D121N-R	19	5' -GGATTAATGCCTCCCCATC-3'
D121T	D121T-F	19	5' -GGAGGCATTACTCCATCAC-3'
	D121T-R	19	5' -GTGATGGAGTAATGCCTCC-3'
D121V	D121V-F	19	5' -GGAGGCATTGTTCATCAC-3'
	D121V-R	19	5' -GTGATGGAACAATGCCTCC-3'
D121L	D121L-F	19	5' -GGAGGCATTCTTCATCAC-3'
	D121L-R	19	5' -GTGATGGAAGAATGCCTCC-3'

^{*)} Kode dengan akhiran F adalah primer forward, sedang kode dengan akhiran R adalah primer reverse

^{**)} Posisi mutasi ditunjukkan oleh residu nukleotida yang tercetak dengan garis bawah.

Mutasi Terarah

pET-*xyl* diisolasi dari dari *E. coli* TOP10 menggunakan QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) sesuai dengan protokolnya. Mutasi terarah terhadap pET-

xyI dilakukan dengan teknik PCR menggunakan DNA primer yang telah didesain, dengan komposisi reaksi PCR seperti pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Komposisi reaksi PCR sampel

Larutan	Volume
10x Buffer reaksi	2 μ l
Plasmid pET- <i>xyI</i>	1 μ l
Primer forward	0.8 μ l
Primer reverse	0.8 μ l
dNTP mix 10 mM	0.4 μ l
MgSO ₄ 50 mM	0.8 μ l
ddH ₂ O	14.24 μ l
<i>Tag-Hifi</i> DNA polymerase	0.2 μ l

Reaksi PCR dilakukan pada kondisi seperti pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Kondisi reaksi PCR

Tahap	Siklus	Suhu ($^{\circ}$ C)	Selama
Pre denaturasi	1	95	2 menit
Denaturasi <i>Anneal</i> <i>Extension</i>	25	95	30 detik
		51 – 61*)	50 detik
		72	3 menit
Post elongasi	1	72	5 menit

*) variasi tergantung T_m dari masing-masing primer.

Produk amplifikasi PCR kemudian didigesti dengan enzim restriksi *Dpn* I untuk menguraikan plasmid *template* (pET-*xyI*).

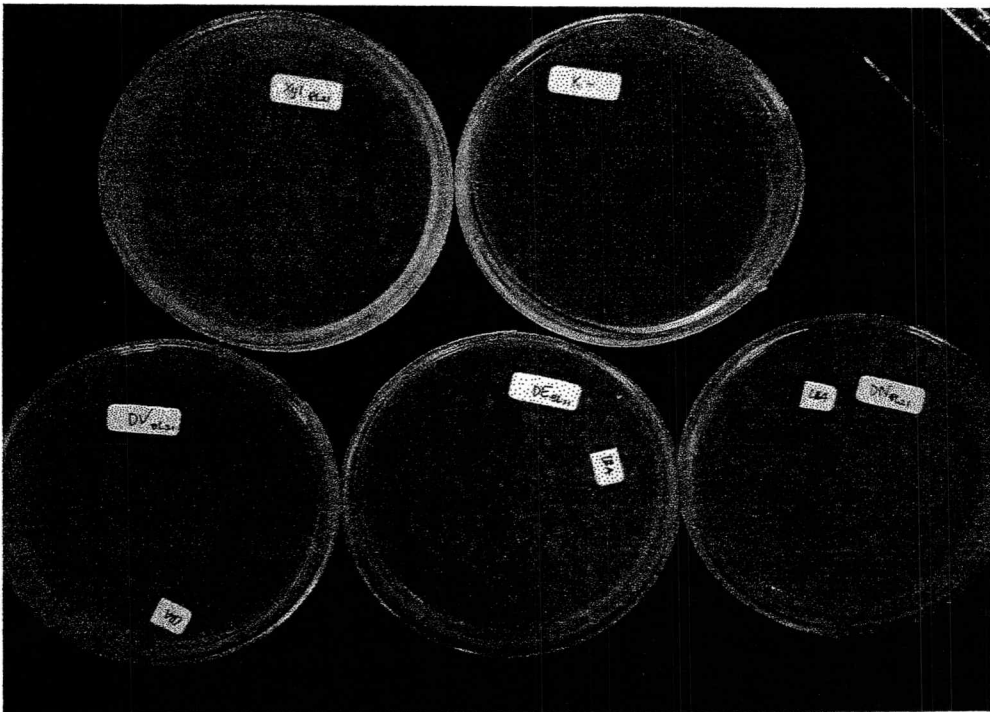
Transformasi *E. coli* TOP10

DNA plasmid produk mutasi terarah ditransformasikan ke dalam *E. coli* TOP10. *E. coli* TOP10 dicairkan pada penangas es. Sebanyak 3 μ l DNA plasmid produk mutasi terarah ditambahkan ke dalam 50 μ l sel kompeten. Campuran diinkubasi pada penangas es selama 30 menit dan selanjutnya dipindahkan ke penangas air suhu 42 $^{\circ}$ C selama 30 detik. Setelah itu segera dipindahkan kembali pada penangas es selama 2 – 10 menit, kemudian ditambahkan 250 μ l media LB segar. Tabung eppendorf disegel dengan parafilm dan kemudian diinkubasi pada

suhu 37°C, dengan pengocokan 150 rpm selama 1 jam. Selanjutnya sebanyak 100-200 µl kultur disebarakan pada media agar LB yang mengandung 100 µg/ml ampicillin, dan diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C.

Ekspresi varian Xyl pada *E. coli* BL21 (DE3 star)

Semua plasmid mutan (3 varian, D121E, D121N, D121V) dan plasmid pET-xyl (sebagai kontrol positif) diisolasi dari mutan-mutan *E. coli* TOP10 menggunakan QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) sesuai dengan protokolnya. Plasmid-plasmid mutan tersebut masing-masing ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21 (DE3 star), dengan prosedur yang sama seperti transformasi ke *E. coli* TOP 10. Hasil transformasi ditunjukkan oleh gambar 4.1.



Gambar 4.1 Transforman varian xyl pada *E. coli* BL21 (DE3 Star)

Semua varian Xyl kemudian diekspresikan dari setiap transforman *E. coli* BL21 (DE3 star). Pre-kultur bakteri-bakteri transforman tersebut ditumbuhkan semalam di dalam medium LB yang mengandung ampicillin (100 µg/mL) pada suhu 310 K. Pre-kultur tersebut kemudian digunakan untuk inokulasi (1%) 100 mL medium LB baru yang juga mengandung ampicillin (100 µg/mL), dan diinduksi dengan 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) setelah 2,5 jam inkubasi. Sel bakteri dipanen setelah diinduksi selama 2,5 jam.

Penentuan Aktivitas Xyl

Pelet sel disuspensikan ke dalam 5 mL buffer fosfat sitrat pH 6, kemudian disonikasi pada frekuensi 80 Hz selama 2 menit. Sel hancur dibuang dengan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit pada suhu 277 K. Supernatan yang mengandung Xyl rekombinan diuji aktivitasnya menggunakan substrat *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (pNPX) secara spektrofotometri.

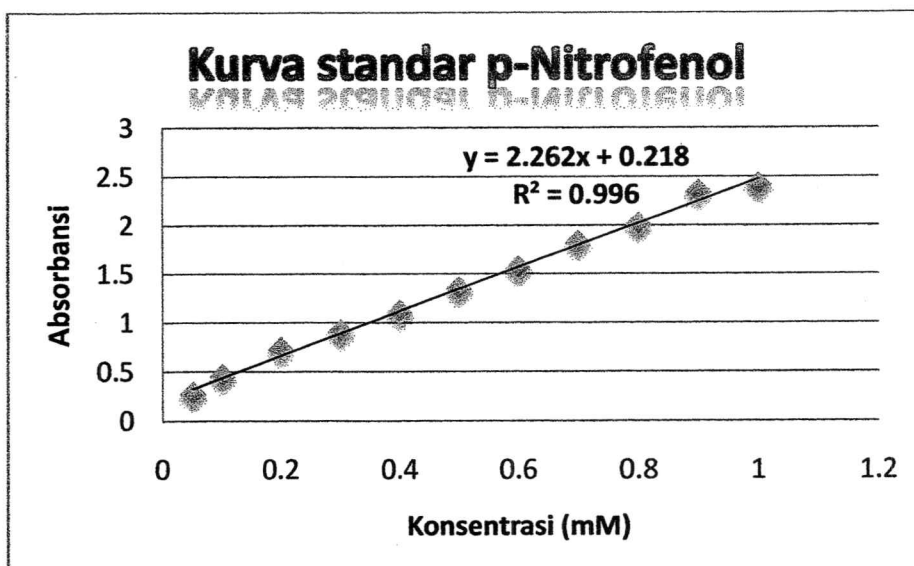
Penentuan Suhu Optimum Xyl

Suhu optimum Xyl dan mutan-mutannya ditentukan dengan menguji aktivitas enzim-enzim tersebut dengan variasi suhu antara 30°C – 90°C pada pH 6 (buffer fosfat sitrat).

Penentuan pH Optimum Xyl

pH optimum Xyl dan mutan-mutannya ditentukan dengan menguji aktivitas enzim-enzim tersebut dalam berbagai pH antara 3 sampai 10 pada suhu optimum masing-masing. Pengujian pada pH 3 – 7 digunakan larutan buffer fosfat sitrat, pH 7 – 8 digunakan larutan buffer fosfat, sedangkan pengujian pada pH 8 – 10 digunakan larutan buffer glisin-NaOH.

Masing-masing absorbansi aktivitas xyl dan varian, diubah menjadi satuan konsentrasi dengan menggunakan kurva standar *p*-Nitrofenol seperti pada gambar 4.2.

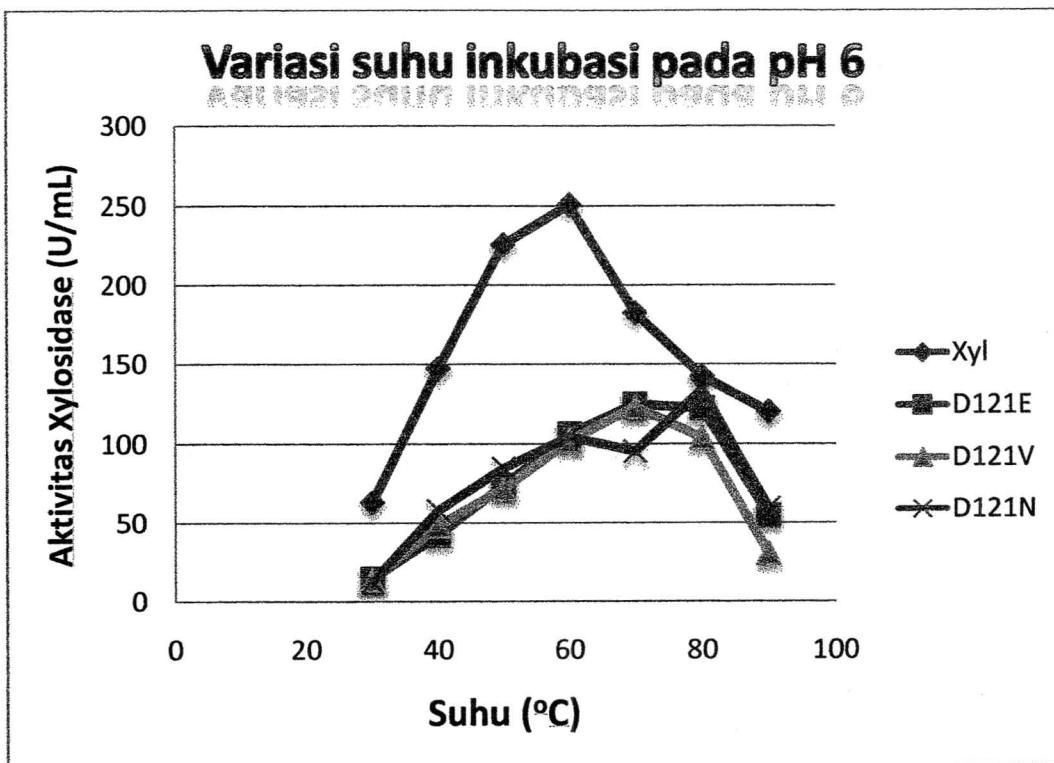


Gambar 4.2 Kurva standar *p*-Nitrofenol

Setelah itu dikonversi menjadi aktivitas enzim menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas xilosidase} = \frac{(C - C_k) \times FP \times 1000 \times 10}{\text{Incubation time}} \text{ U/mL}$$

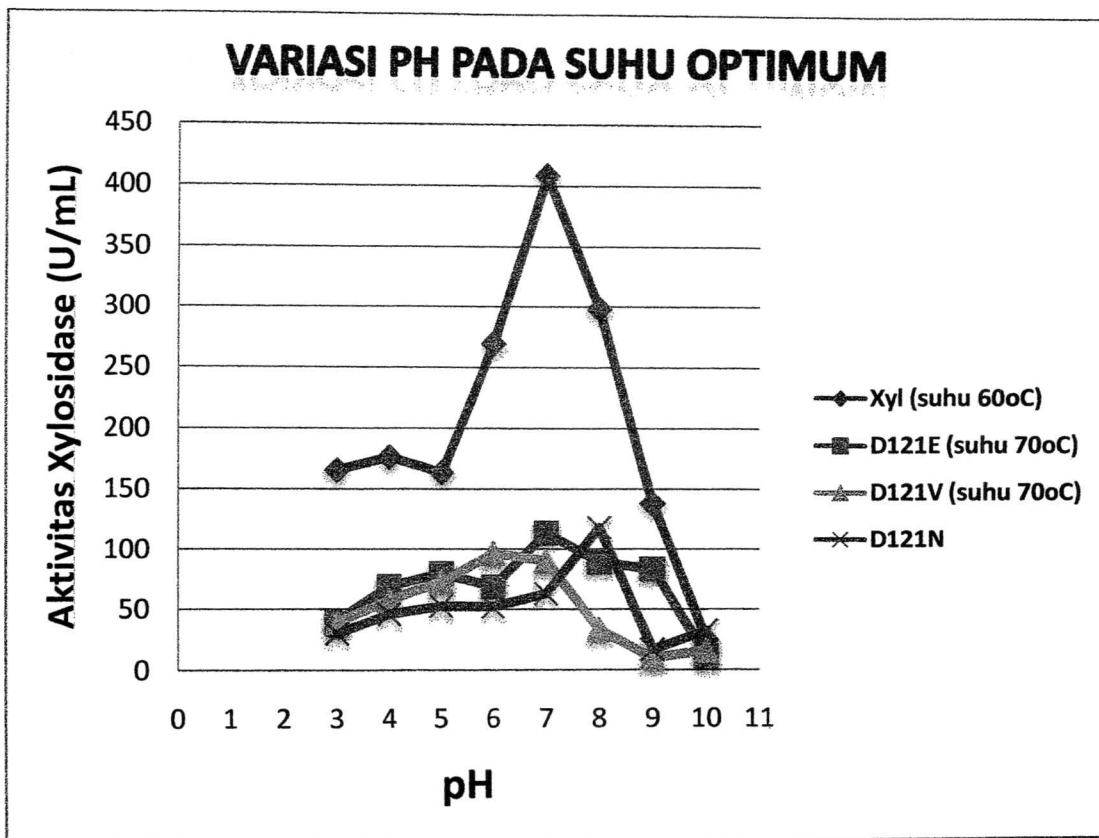
Hasil pengujian aktivitas ekstrak kasar xylosidase dan variannya pada variasi suhu inkubasi ditunjukkan oleh gambar 4.5 berikut.



Gambar 4.3 Aktivitas ekstrak kasar xylosidase dan variannya pada berbagai suhu inkubasi

Tampak bahwa varian D121N memiliki suhu optimum yang paling tinggi di antara semua varian xylosidase, yaitu pada suhu 80°C. Dua varian lainnya, yaitu D121E dan D121V memiliki suhu optimum 10 derajat lebih tinggi dibandingkan tipe *wild typenya*. Dengan demikian, untuk sementara dapat disimpulkan bahwa mutasi pada asam amino nomor 121, menyebabkan peningkatan terhadap suhu optimum dari xylosidase.

Hasil pengujian aktivitas ekstrak kasar xylosidase dan variannya pada variasi pH inkubasi ditunjukkan oleh gambar 4.4 berikut.



Gambar 4.4 Aktivitas ekstrak kasar xylosidase dan variannya pada berbagai pH inkubasi

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas xylosidase pada berbagai pH (gambar 4.4), tampak bahwa adanya mutasi pada asam amino nomor 121 menyebabkan pergeseran pH optimum, baik ke arah asam maupun ke arah basa. Hanya mutasi menjadi glutamat yang tidak menyebabkan pergeseran pH optimum. Namun mutasi menjadi valin dan asparagin menyebabkan pH optimum bergeser sebesar 1 unit, yaitu menjadi pH 6 pada valin dan pH 8 pada asparagin.

Oleh karena itu, untuk sementara ini dapat diambil kesimpulan bahwa asam amino nomor 121 pada struktur protein β -xylosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 memegang peranan penting terhadap karakteristik enzim. Mutasi pada asam amino ini menyebabkan perubahan baik pH optimum maupun suhu optimum enzim. Namun hal ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut, dengan

karena itu, pada tahapan penelitian selanjutnya akan dilakukan upaya untuk pemurnian enzim, baik xylosidase *wild type* maupun varian-varian hasil mutasinya, untuk selanjutnya ditentukan kembali karakteristik masing-masing enzim tersebut.

Tahapan pemurnian dan penentuan karakterisasi enzim sedang dilakukan di Laboratorium Biophysical Chemistry, Universitas Groningen Belanda, pada program Sandwich-Like yang dibiayai oleh Dikti. Jika memungkinkan pada masa penelitian 3 bulan tersebut juga akan dilakukan upaya kristalisasi beberapa protein xylosidase maupun variannya, untuk selanjutnya ditentukan strukturnya secara difraksi sinar X. Dengan demikian diharapkan dapat diperoleh pemahaman yang lebih baik mengenai peran penting asam amino nomor 121 pada xylosidase terhadap karakteristik maupun kestabilannya.

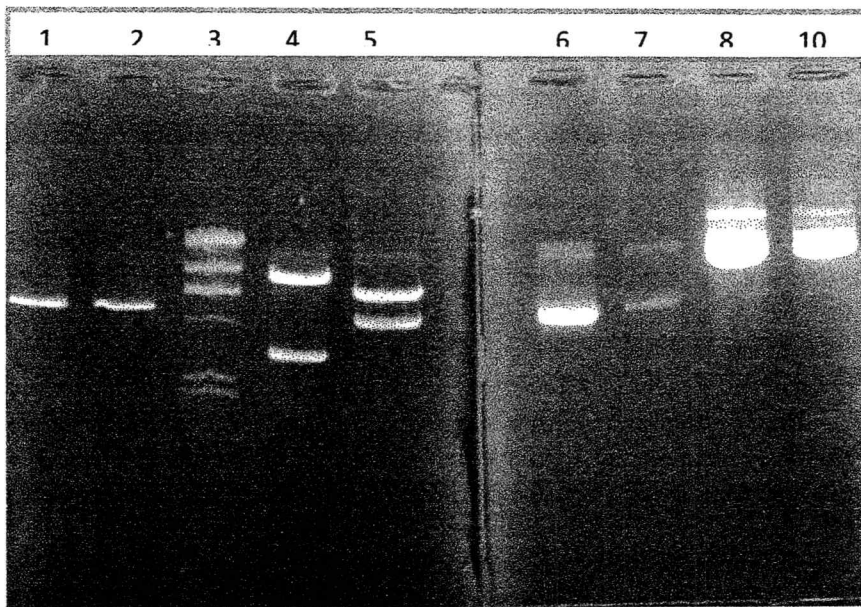
Laporan kemajuan riset

(A.A. Istri Ratnadewi)

1. Isolasi plasmid pET30a dan pTP510

Plasmid pET30a sebagai plasmid/vektor ekspresi telah berhasil diisolasi. Plasmid ini sebagai plasmid yang akan mengekspresikan eksoxilanase (gambar 1)

Plasmid pTP510 juga telah berhasil diisolasi, plasmid ini akan digunakan sebagai templet PCR untuk mengangkat eksoxilanase (Gambar 1)

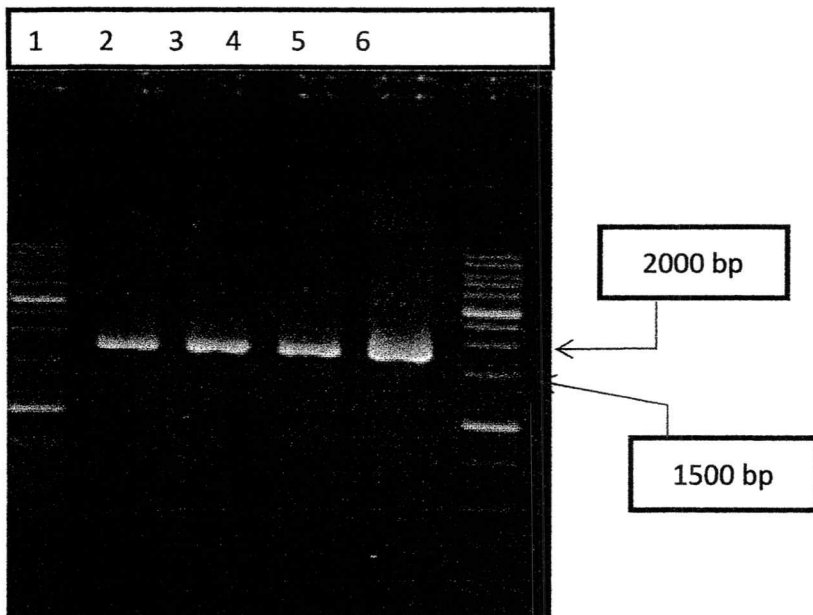


Keterangan

1. pET30 direstriksidenganSacI±5000bp)
2. pET30direstrks I denganXhoI (±5000bp)
3. Marker Hind III
4. pTP510 direstiksidadengan Sac (± 8000 bpdan 200 bp)
5. pTP510 direstriksidadenganXhoI (± 6000 bpdan 4000 bp)
6. DNA pET 30
7. DNA pET30
8. DNA pTP510

2. Produk PCR eksoxilanase

Eksoxilanase berhasil diamplifikasi dengan templet DNA pTP510 pada variasi suhu annealing dan produk PCR ini juga telah disequensing



Keterangan

1. Marker
2. Produk PCR ekso (58,2 0C) ukuran± 1800 bp
3. Produk PCR ekso (59,4 0C) ukuran± 1800 bp
4. Produk PCR ekso (60,6 0C) ukuran± 1800 bp
5. Produk PCR ekso (61,8 0C) ukuran± 1800 bp

3. Subkloning eksoxilanase ke dalam pET30a

Produk PCR eksoxilanase yang telah dimurnikandisubkloning dalam plasmid pET30a. Sebelumnya dilakukan *double digest* dengan enzim *Sac I* dan *Xho I*. pada produk PCR eksoxilanase dan pET30 pada kondisi suhu 37 °C selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan ligasi pada beberapa kondisi dan selanjutnya dilakukan transformasi ke *E.coli Top10*. Hasil transformasi ditunjukkan ditunjukkan dalam tabel

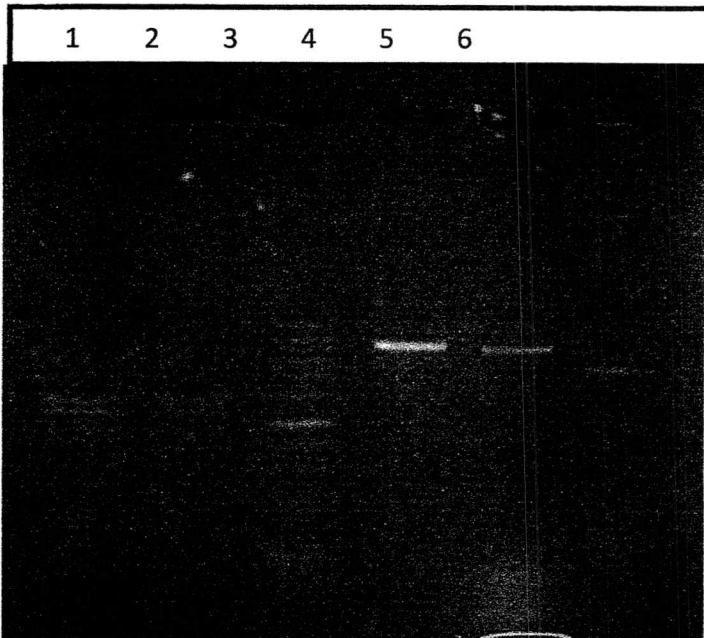
Hasil Tansformasi

Transforman	Pertumbuhan koloni		
	4 0C	16 0C	25 C
pET30a + Exo (SacI & XhoI)	-	1 koloni	-
pET30a (SacI & XhoI)	-	-	-
pET30a (XhoI)	Banyak koloni	Banyak koloni	Banyak koloni
pET30a	Banyak koloni	Banyak koloni	Banyak koloni
Kontrol	-	-	-

4. Rekombinan pET-Exoxilanase

Dari hasil kloning telah berhasil mengklon atau subklon eksoxilanase ke dalam plasmid pET30a. Ini ditunjukkan dengan adanya koloni hasil transformasi dan DNA yang dihasilkan

transforman yang telah direstriksi menunjukkan ukuran yang cocok atau sesuai dengan ukuran plasmid dan pET30a sekitar 7000 bp. Ditunjukkan gambar dibawah ini



Keterangan :

1. pET-ExodirestriksidenganBglI (\pm 4000 bp & 3600 bp)
2. pET-ExodirestriksidenganBglI (\pm 4000 bp & 3600 bp)
3. Marker
4. pET-ExodirestriksidenganXho (\pm 7000 bp)
5. pET-ExodirestiksidenEcoRV (\pm 7000 bp)
6. pET30a direstriksidenganXho (\pm 5000 bp)

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Rekayasa Protein melalui *site directed mutagenesis* terhadap enzim β -D-xilosidase telah menghasilkan 4 enzim varian
2. Rekayasa protein melalui *direct evolution* terhadap enzim α -L-arabinofuranosidase telah menghasilkan beberapa varian , dan salah satu diantaranya menunjukkan karakterisasi pH dan suhu lebih tinggi dibandingkan wild type nya.
3. Kerusakan substrat limbah pertanian oleh enzim xilanolitik telah berhasil dianalisis dengan *Scanning Electron Microscope*
4. Gen *exo-xilanase* dalam pTP510 telah berhasil diisolasi dan disisipkan dalam pET-30b

6.2. Saran

Untuk dilakukan penelitian lanjutan pada tahun kedua yang meliputi pemurnian enzim varian, pemodelan masing-masing varian, seleksi enzim xilanolitik dalam sistem pTP510 yang menunjukkan karakterisasi sesuai kebutuhan industri kimia, diantaranya pakan ternak, kertas dan pupuk organik

BAB VII
RENCANA/ PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA
(TAHUN KEDUA)

A. Tujuan Khusus

1. Memurnikan dan Mengkarakterisasi enzim hemiselulase varian
2. Kristalisasi dan Menganalisis struktur dan fungsi enzim hemiselulase varian
3. Menentukan efisiensi hidrolisis limbah pertanian dengan enzim hemiselulase varian

B. Metode

1. Pemurnian Enzim Hemiselulase variant (dilakukan oleh 1 mahasiswa S3)

a. Pemurnian Enzim Variant (xilosidase, arabinofuranosidase) hasil *site directed mutagenesis* maupun *direct evolution* dilakukan menggunakan affinitas kromatografi dengan perangkat kolom Ni-NTA . Hasil pemurnian dianalisis dengan SDS-PAGE, uji aktivitas menggunakan substrat spesifik turunan p-nitrophenol.

b. Karakterisasi struktur dan fungsi enzim variant

Klon positif yang telah dikarakterisasi strukturnya dengan sekuensing, selanjutnya diuji ekspresinya dengan menentukan aktivitas enzim variant yang dihasilkan menggunakan substrat spesifik p-nitrofenil- α -L-arabinosida dan p-nitrofenil- β -D-xylopiranoside. Enzim dan substrat diinkubasi selama 30menit pada suhu 70°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 405 nm.

2. Kristalisasi dan Analisis Struktur Hemiselulase Varian

Hemiselulase Varian yang telah diperoleh pada tahun pertama akan dilakukan kristalisasi untuk menganalisis struktur varian (mutan) terutama yang menunjukkan aktivitas tertinggi (xilosidase, arabinofuranosidase) . Kristalisasi dilakukan dengan metode hanging drop menggunakan larutan standar kristalisasi.

3. Hidrolisis Limbah Pertanian berbasis hemiselulosa dengan Hemiselulase Varian

Uji kemampuan hidrolisis hemiselulase varian terhadap limbah pertanian seperti berbagai limbah pertanian alam, seperti jerami padi, enceng

gondok, dan tongkol jagung akan dibanding dengan enzim hemiselulase wild type nya. Efisiensi hasil hidrolisis akan diamati dengan *Scanning Electron Microscope*.

C. Jadwal Kerja

No.	Kegiatan	Jadwal		
		Tahun I	Tahun II	Tahun III
1.	Rekayasa Protein melalui <i>site directed mutagenesis</i> dan <i>gene shuffling</i> terhadap Xylosidase dan Arabinofuranosidase Rekombinan (<i>pET-xyl</i> dan <i>pET-abfa</i>)			
2.	Analisis SEM aktivitas enzim hemiselulase terhadap limbah pertanian			
3.	Pemurnian Enzim Variant			
4.	Karakterisasi Struktur dan Fungsi Xylosidase dan Arabinofuranosidase Variant			
5.	Kajian Biokimia Enzim Variant			
6.	Kajian Biofisika enzim Variant			

BAB VIII.
DRAF ARTIKEL ILMIAH YANG TELAH DITERIMA

Search

Search Mail

Search Web

WHAT'S NEW INBOX (16543) CONTACTS UPDATES JABSD-11-024 has been

Compose Message Delete Reply Forward Spam Print

Inbox 5214

JABSD-11-024 has been accepted/ Payment Reminder

Show Details

Drafts 76

Sent

Spam 67

Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Developm

www.academicjournals.org/JABSD

Folders

Online Contacts

Facebook Friends

Applications

All My Purchases

Attach Large Files

Automatic Organizer

Calendar

Edit Photos

Evite

lickr

ly Cool Fonts

ly Drive

otepad

ationery

nscriber

Dear Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development. There are some corrections which we will make before the proof is sent to you.

Please note that the Official Acceptance Letter will be sent to you after you have effected payments for your article. Kindly make payment as soon as possible to enable us include your manuscript in this month's publication. "Kindly ignore if you have done this".

The email address of our accounts department is given below:

accounts_acadjourn@yahoo.com

Best regards,

Veronica Owigho
Editorial Assistant
Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development (JABSD)
Email: jabsd.acadjourn@gmail.com
<http://www.academicjournals.org/jabsd>

9/21/2011 4:13 PM

Full Length Research Paper

Modification of surface structure and crystallinity of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) following recombinant α -L-arabinofuranosidase (abfa) treatment

Anita Kurniati¹, Handoko Darmokoesoemo² and Ni Nyoman Tri Puspaningsih^{1,2*}¹Biotechnomic Laboratory, Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Campus C Mulyorejo, Surabaya, East Java 60115, Indonesia.²Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Campus C Mulyorejo, Surabaya, East Java 60115, Indonesia.

Accepted 6 September, 2011

This research was aimed to investigate the modification of surface structure and crystallinity of water hyacinth after recombinant α -L-arabinofuranosidase treatment. The process of water hyacinth hydrolysis was optimized first, by determination of the most optimal intracellular enzyme (P) and extracellular enzyme (S) mixture ratio, and its incubation time. The optimum of water hyacinth hydrolysis process was achieved at ratio P:S = 1:2, after 8 h incubation. The surface structure of water hyacinth after recombinant α -L-arabinofuranosidase treatment was analyzed by scanning electron microscope (SEM) and X-ray diffraction (XRD), using untreated water hyacinth as control. This research showed that enzymatic hydrolysis damaged the surface structure of water hyacinth and changed its crystallinity. The enzyme used in this research can be applied further for bio-bleaching of paper pulp and animal feed stock, while the hydrolysis product can be applied for bioethanol production.

Key words: Water hyacinth, α -L-arabinofuranosidase, scanning electron microscope, X-ray diffraction.

INTRODUCTION

Cellulosic biomass has long been recognized as a potential low cost source of mixed sugars for industry (Antonietti et al., 2005). Lignocelluloses biomass, such as water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), is a free floating aquatic weed which is considered the world's most problematic aquatic plant. It is responsible in the disruption of aquatic system by creating low oxygen condition (Sari et al., 2011). Besides that, it is also recognized as a big problem for agriculture, water mitigation and aquatic ecosystem owing to its rapid growth rate and robustness (Harun et al., 2011). Water hyacinth contains high contents of hemicelluloses, cellulose and low lignin content (Ma et al., 2010). It generally contains lignin (18.20%), hemicelluloses (48.70%) and cellulose (18.20%) (Sari et al., 2011). Some study indicated that water hyacinth is a promising plant for production of ethanol (ma et al.,

2010). Ethanol production from biomass consists of enzymatic hydrolysis, fermentation and product separation (Sari et al., 2011). Hemicelluloses are plant heteropolysaccharides, that is widely distributed in nature (Achouri et al., 2009), which contain xylans, mannan, galactan and arabinan (Saha, 2003). Xylan is a major component of hemicellulose, and it is rich in xylose (Koukiekolo et al., 2005). In plants, xylans or the hemicelluloses are situated between the lignin and the collection of cellulose fibers. Consistent with their structural chemistry and side-group substitutions, xylans seem to be interspersed, intertwined and covalently linked at various points with the overlying 'sheath' of lignin, while producing a coat around underlying strands of cellulose via hydrogen bonding (Beg et al., 2001). It has a backbone of β -1,4-linked D-xylopyranoside residues with branches containing acetyl, arabinofuranosyl and 4-O-methylglucuronosyl residues (Lee et al., 2009).

The complete degradation of xylan into

*Corresponding author. E-mail: nyomantri@yahoo.com. Tel: +62 315922427. Fax: +62 315922427.

polysaccharides requires the synergistic action of several hydrolytic enzymes (Perez et al., 2002). One of the enzymes is α -L-arabinofuranosidase. Alpha-L-arabinofuranosidases are exo-type enzymes that catalyze the hydrolysis of arabinofuranosidic bonds in hemicelluloses, such as arabinoxylan, arabinan and other arabinose containing polysaccharides (Canacki et al., 2003). The presence of arabinoses as side groups can inhibit activity of the backbone degrading enzymes (Lindström et al., 2004). Alpha-L-arabinofuranosidases have received a great deal of attention in recent years, because of their applications in industrial processes, such as the bioconversion of lignocelluloses material to fermentable products for subsequent production of fuel ethanol, improvement of animal feed-stock digestibility and use as a useful in bio-bleaching of paper pulp (Ali, 2009). The application of α -L-arabinofuranosidase would further enhance the delignification of pulp as the enzyme acts to remove arabinose side chain that retard the action of other bleaching enzymes. The enzyme acted synergistically with a thermophilic xylanase in the delignification process (Nurman and Boshle, 2006). The purpose of this research was to investigate the modification of surface structure and crystallinity of water hyacinth which was hydrolyzed using recombinant α -L-arabinofuranosidase. The surface structure modification of water hyacinth was determined by SEM, while its crystallinity was determined using XRD.

MATERIALS AND METHODS

Organism and media culture

The xylanolytic gene cluster from a thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* IT-08 that had been isolated from the Pancar hot spring (Bogor, West Java, Indonesia) was successfully cloned into the plasmid pTP510 in *Escherichia coli*. This gene cluster encodes exo-xylanase (geneBank accession number DQ387047), β -xylosidase (DQ345777) and α -L-arabinofuranosidase (DQ387046) (Puspaningsih, 2004). α -L-arabinofuranosidase (abfa) was successfully subcloned into *E. coli* (Puspaningsih et al., 2005). This *E. coli* BL21 was used in this research, grown in Luria-Bertani medium (LB medium). LB medium contains tryptone 1%, yeast extract 0.5% and sodium chloride 1%. The LB medium prepared was sterilized by autoclaving for 15 min at 121°C before it was used (Basar et al., 2005).

Preparation

Cultures were grown in LB medium containing 100 μ g/ml ampicillin (Rohman et al., 2007) and incubated under shaking (150 rpm) at 37°C up to 18 h. Samples were taken after incubation and centrifuged (6000 \times g) for 10 min. The cell pellet was then resuspended in 100 mM phosphate citrate buffer (pH 6.0). After that cell suspension was lysed by ultrasonicator (UP150P, Sanyo) and centrifuged (10000 \times g) for 10 min to separate crude enzymes (Puspaningsih et al., 2005). The α -L-arabinofuranosidase activity was estimated both in intracellular enzyme (P) and extracellular enzyme (S).

Enzymatic assay

α -L-arabinofuranosidase (abfa) activity was determined by measuring the reducing sugar released from oat spelt xylan according to the method of Miller (Miller, 1959). One percent (w/v) oat spelt xylan was used as the substrate, which was preliminarily suspended homogeneously in a 100 mM phosphate citrate buffer (pH 6.0). The reaction mixture containing 100 μ l of enzyme solution, and 100 μ l of substrate was incubated at 70°C for 60 min. After incubation, 600 μ l of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent was added to the reaction mixture and boiled for 15 min. The absorbance was measured at 550 nm using a UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μ mol of arabinose per min at 70°C (Lee et al., 2009). In this process abfa activity was estimated in mixture of intracellular enzyme (P) and extracellular enzyme (S) with ratio P:S = 1:0, 1:10, 1:20 and 0:1.

Sample preparation

The trunks of water hyacinth were collected from Surabaya, East Java, Indonesia. They were chopped into small pieces of about 3 to 4 cm in length by a cutter for scanning electron microscope analysis. Then, the small pieces of water hyacinth's trunks were washed and dried at 40°C to yield powder for X-ray diffraction and further treatment with the abfa enzyme. In hydrolysis process, the powder of water hyacinth was added to the enzyme solution until fully submerged.

Optimization of P and S mixture ratio

The optimum mixture ratio of P and S was determined using water hyacinth as the substrate. The reaction mixture contains enzyme solution and substrate. The mixture was incubated at 70°C for 60 min. After incubation, 600 μ l of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent was added to 200 μ l of reaction mixture and was boiled for 15 min. Absorbance was measured at 550 nm using a UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu).

Optimization of hydrolysis incubation time

The optimum hydrolysis incubation time was determined using water hyacinth as the substrate. The reaction mixture contains enzyme solution and substrate. The mixture was incubated at 70°C for 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h. After incubation, 600 μ l of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent was added to 200 μ l of reaction mixture and boiled for 15 min. Absorbance was measured at 550 nm using a UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu).

SEM analysis

The modification of surface structure of water hyacinth after being hydrolyzed by recombinant α -L-arabinofuranosidase at optimum condition was analyzed by scanning electron microscope (SEM) (Phenom). Sample was coated with gold before measured by SEM (Pongjanta et al., 2008). In this method, water hyacinth that was not treated with recombinant α -L-arabinofuranosidase treatment was used as control.

XRD analysis

The crystallinity of pre-treated and treated water hyacinth with recombinant α -L-arabinofuranosidase at optimum condition was

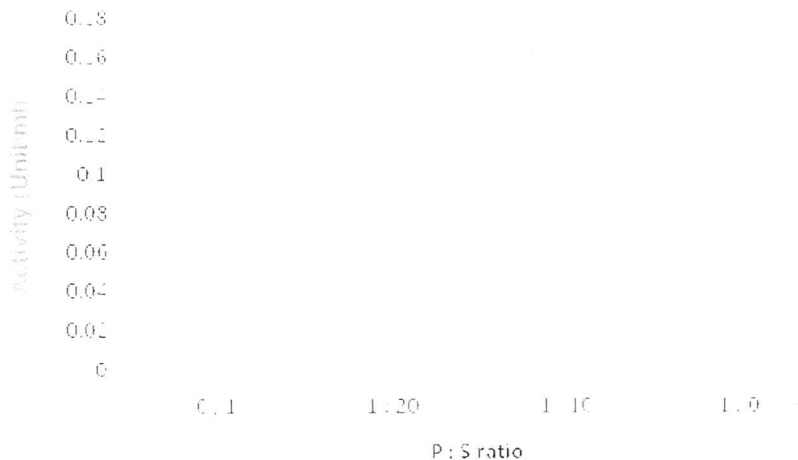


Figure 1. The abfa activity at different intracellular (P) and extracellular (S) ratio.

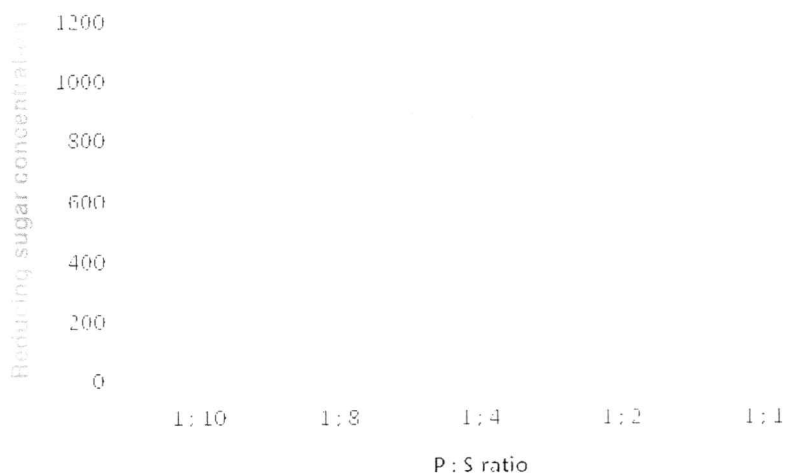


Figure 2. The optimization of P and S mixture ratio for water hyacinth hydrolysis

zed by X-ray diffraction method (PANalytical 'xpert pro).

ULTS

matic assay

result of α -L-arabinofuranosidase (abfa) activity y is summarized in Figure 1.

mization of P and S mixture ratio

optimization result of P and S mixture ratio is arized in Figure 2. The optimum ratio of P and S ure for water hyacinth hydrolysis was 1:2.

Optimization of hydrolysis incubation time

The optimization result of incubation time in water hyacinth hydrolysis is summarized in Figure 3. The highest reducing sugar concentration was detected at 8 h. After 8 h of incubation time, the abfa activity was decreased.

Hydrolysis of water hyacinth

The result of water hyacinth hydrolysis showed that there was a modification in water hyacinth appearance. After hydrolysis, water hyacinth has darkened color and more wrinkling surface as compare to the untreated one. These can be seen in Figure 4.

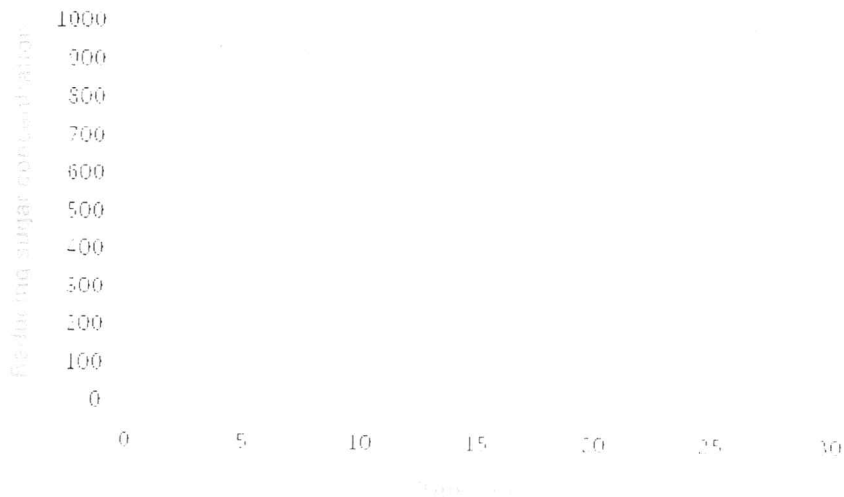


Figure 3. The optimization of hydrolysis incubation time.



Figure 4. Water hyacinth; (A) before abfa treatment and (B) after abfa treatment.

analysis

result of SEM analysis showed that there was a variation in water hyacinth's surface structure, after abfa treatment. The modification of surface structure can be seen in Figures 5 and 6.

analysis

X-ray diffractogram showed that enzymatic hydrolysis can increase the crystallinity of water hyacinth. This can be seen in Figure 7.

DISCUSSION

Enzymatic assay

α -L-arabinofuranosidase (abfa) is an intracellular enzyme. Nevertheless, Puspaningsih et al. (2005) have

found that α -L-arabinofuranosidase is both an intracellular and extracellular enzyme, though the extracellular one has low activity. In this research, the mixture of intracellular enzyme (P) and extracellular enzyme (S) was used in order to lower the cost in its industrial application. Before the mixture was applied to hydrolyze the plant samples used in this research, the mixture ratio of P and S was optimized first. Figure 1 shows that the mixture of P and S in 0:1 ratio had the lowest activity, while 1:0 ratio of mixture P and S had the highest one. The mixture of P and S in 1:0 up to 1:10 was then used in second optimization experiment, to determine the best mixture ratio of P and S in water hyacinth hydrolysis process. The hydrolysis process of water hyacinth was monitored by the amount of reducing sugar produced and measured by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Figure 2 shows that reducing sugar concentration increased from ratio 1:10 to 1:4 of P and S mixture used in hydrolysis process. The optimum hydrolysis process was obtained at mixture ratio of P and S = 1:2.

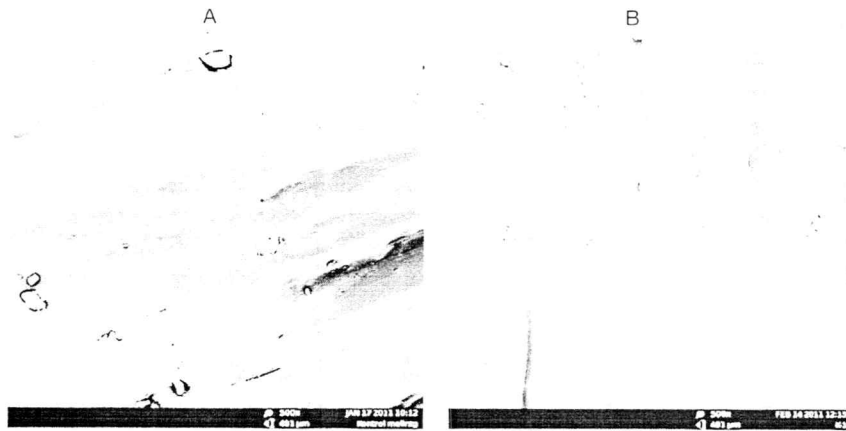


Figure 5. The surface structure of water hyacinth: (A) before treatment and (B) after treatment, analysed by SEM.

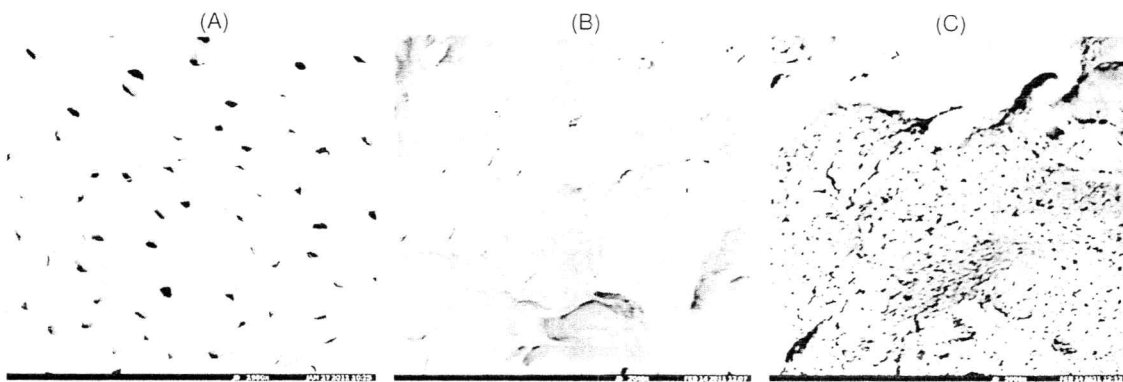


Figure 6. The SEM analysis result of water hyacinth's surface structure (A) before treatment, (B) after treatment in 1980x resolution and (C) after treatment in 5000x resolution.

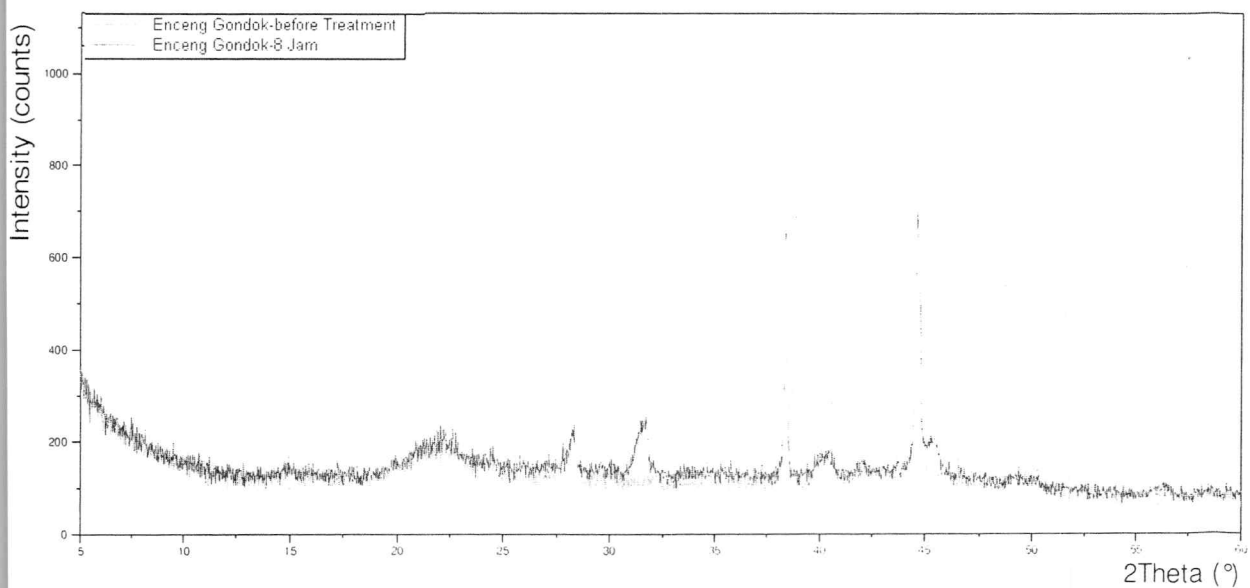


Figure 7. X-ray diffractogram of water hyacinth, before abfa treatment (red) and after abfa treatment (blue); x: intensity, y: 2 theta (°).

Figure 3 shows that the activity of recombinant α -L-arabinofuranosidase in water hyacinth hydrolysis increased from the 1 to 8 h, and reached optimum at 8 h of incubation, followed by decreasing activity afterwards. The results were consistent to the previous study concerning thermostability properties of recombinant α -L-arabinofuranosidase (Puspaningsih et al., 2005). According to them, the recombinant α -L-arabinofuranosidase was stable during 5 to 10 h of incubation, while after 10 to 24 h of incubation, the recombinant α -L-arabinofuranosidase activity decreased. Hydrolysis of water hyacinth with recombinant α -L-arabinofuranosidase (abfa) yielded a change in its macroscopic appearance, as shown in Figure 4. Macroscopically, water hyacinth that has been hydrolyzed by abfa showed a darkened color and more irregular surface. These might be caused by some loss in the arabinosyl chain contained in the plant's hemicelluloses.

Scanning electron microscope

SEM analysis results (Figures 5 and 6) showed that there was some modification in the surface structure of water hyacinth after α -L-arabinofuranosidase (abfa) hydrolysis. The surface of water hyacinth before enzymatic treatment was regular and compact (Figures 4A and 5A), after enzymatic treatment the surface changed into more irregular, chapped and cracked structures (Figures 5B, 6A and 6B). This modification was due to α -L-arabinofuranosidase activity. α -L-arabinofuranosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of arabinofuranosidic bonds in hemicelluloses, such as arabinoxylan, arabinan, and other arabinose containing polysaccharides (Subramaniyan and Prema, 2002). In this case, abfa enhanced the delignification of water hyacinth by releasing arabinose side chains that linked to lignin. The α -L-arabinofuranosidase acted synergistically with a thermophilic xylanase in the delignification process, releasing 19.2% of lignin (Nurman and Boshle, 2006).

X-ray diffraction

The structures of non-treated and treated water hyacinth samples were examined by X-ray diffractometer (XRD). Figure 7 shows that there were some changes in peak intensity, where the peak intensity of abfa-treated water hyacinth was higher than non-treated water hyacinth. X-ray diffractogram showed that enzymatic hydrolysis could reduce the crystallinity of water hyacinth. The intensity increase can be attributed to the preferential removal of lignin (Maeda et al., 2011). Besides that, the intensity increased because amorphous component (arabinose and hemicellulose) were removed. All plant cells

are surrounded by a polysaccharide-rich wall, which provides support, strength and shape to the plant. This structural material in the cell wall is known as lignocellulose which composed mainly of cellulose (Crystalline), hemicellulose and lignin (Amorph) (Kim and Holtzapple, 2006). Various enzymes are reported to be responsible for the degradation of xylan degradation, such as endo-1,4- β -xylanase, β -xylosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase and acetyl xylan esterase (Kumar et al., 2008). Arabinofuranosidase catalyze the hydrolysis of arabinofuranosidic bonds in hemicelluloses, such as arabinoxylan, arabinan and other arabinose containing polysaccharides (Canacki et al., 2008).

This study can be applied for the bioconversion of lignocellulose material to fermentative products, the improvement of animal feedstock digestibility and bio-bleaching in pulp and paper industry to reduce or even eliminate the need for chlorine-based compounds (Gilead and Shoham, 1995).

Conclusion

It can be concluded from this research that α -L-arabinofuranosidase (abfa) activity can damage the surface structure of water hyacinth; otherwise, it could change the crystallinity of water hyacinth.

REFERENCES

- Achouri IM, Guerfali M, Gargouri A, Belghith H (2009). Production of Xylo-oligosakarida from Agro-Industrial Residues using Immobilized *Talaromyces Thermophilus* Xylanase. *J. Mole. Catalysis B Enzymatic*, 59: 145-152.
- Ali UF (2009). Extracellular α -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* and *A. oryzae*. *Aus J of Basic Appl Sci*. 3(3): 1984-1993.
- Beg QKM, Kapoor L, Mahajan G, Hoondal S (2001) Microbial Xylanase and Their Industrial Application : *Rev. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 326-338.
- Basar B, Shamzi MM, Rosfarizan M, Puspaningsih NNT, Ariff AB (2010). Enhanced Production of Thermophilic Xylanase by Recombinant *Escherichia coli* DH5 α through Optimization of Medium and Dissolved Oxygen Level. *Int. J. Agric Biotech* , 12: 321-328
- Birgisson H, Fridjonsson O, Mougéot FKB, Hreggvidsson GO, Kristjansson JK, Mattiasson B (2004). A New Thermostable α -L-Arabinofuranosidase from a Novel Thermophilic Bacterium. *Biotech. Lett.*, 26: 1347-1351.
- Canacki S, Kacagan M, Inan K, Belduz AO, Saha BC (2008). Cloning, Purification and Characterization of a Thermostable α -L-Arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 61-68.
- Gilead S, Shoham Y (1995). Purification and Characterization of α -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus staerothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* pp. 170-174.
- Harun MY, Radiah ABD, Abidin ZZ, Yunus R (2011). Effect of Physical Pretreatment on Dilute Acid Hydrolysis of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Biores Technol.*, 102: 5193-5199.
- Houghton J, Weatherwax S, Ferrel J (2005). Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda. A Research Roadmap Resulting from the Biomass to Biofuels Workshop Sponsored by the U.S. Department of Energy, Rockville, Maryland.
- Kim S, Holtzapple MT (2006). Effect of Structural Features on Enzyme

- stability of Corn Stover. J. Biores Technol., 97: 583-591.
- Ar R, Singh S, Singh OV (2008). Bioconversion of Lignocellulosic mass: Biochemical and Molecular Perspectives : a Review. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35: 377-391.
- Ekolo R, Cho HY, Kosugi A, Inui M, Yukawa H, Doi RH (2005). Degradation of Corn Fiber by *Clostridium cellulovorans* Cellulases and Hemicellulases and Contribution of Scaffolding Protein CbpA. Environ. Microbiol., pp. 3504-3511.
- JW, Park JY, Kwon M, Choi IG (2009). Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from the Brown-Rot Fungus *Laetiporus sulphureus*. J. Biosci. Bioeng., 107(1): 33-37.
- Yang N, Xu C, Yu H, Wu J, Zhang S (2010). Combination of Physical Pretreatment with Mild Acid Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Production from Water Hyacinth. J. Biores Technol., 101: 9600-9604.
- da RB, Serpa VI, Rocha RAL, Mesquita RAA, Anna LMMS, De Toledo AM, Driemeier CE, Pereira N, Polikarpov I (2011). Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugar Cane Bagasse using *Penicillium chulosum* and *Trichoderma harzianum* Cellulases. J. Process Technol., 101: 9600-9604.
- GR (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for Determination of Reducing Sugars. Anal. Chem., 31: 426-428.
- JN (2002). Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Hemicellulose Acid Hydrolysate to Motor Fuel Ethanol by Fermenting Yeast. J. Biotechnol., 97: 107-116.
- n MT, Bhosle NB (2006). α -L-arabinofuranosidase: The Potential Enzymes in Biotechnology. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33: 247-254.
- J, Dorado JM, de la Rubia T, Martinez J (2002). Biodegradation of Lignin: Biological Treatment of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: an overview. Int. Microbiol., 5: 53-63.
- pta J, Utaipatanacheep A, Naivikul O, Piyachomkwan K (2008). Production of High Amylose-resistant Starch (RS III) from Pullulanase-Debranched High Amylose Rice Starch. Kasetsart J., 42: 198-205.
- Puspaningsih NNT (2004). Characterization of Xylanolytic Enzyme and Cloning Xylosidase Gene from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. PhD Dissertation, Bogor Agricultural University, Indonesia.
- Puspaningsih NNT, Baktir A, Rachmania N, Suryani, Dijkstra BW, Dijkhuizen L (2005). Structure Function Study of β -xylosidase and α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus thermoleovorans* IT-08 Expressed in *Escherichia coli* DH5 α . Research Report of KNAW mobility Program (04-MP-19). Report of Joint Research Airlangga University (Indonesia), University of Groningen, KNAW (Netherlands).
- Rohman A, Oosterwijk NV, Kralj S, Dijkhuizen L, Dijkstra BW, Puspaningsih NNT (2007). Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of a thermostable Glycoside Hydrolase Family 43 β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. Acta Cryst., F63: 932-935.
- Saha BC (2003). Hemicellulose Bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30: 279-291.
- Subramanian S, Prema P (2002). Biotechnology of Microbial Xylanases : Enzymology, Molecular Biology and Application. Critical Rev. Biotechnol., 22: 33-46.
- Sari E, Syamsiah S, Sulisty H, Muslikhin (2011). The Kinetic of Biodegradation Lignin in Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by *Phanerochaete chrysosporium* using Solid State fermentation (SSF) Method for Bioethanol Production. World Acad. Sci., p. 78.

DAFTAR PUSTAKA

- Beg QKM, Kapoor L, Mahajan G, Hoondal S. 2001. Microbial xylanase and their industrial application : a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 326-338.
- Biswas S dan Vashishtha N. 2003. Xylitol : Technology & Business Opportunities. Internet.
- Clark EM, Tenkanen M, Nakni-Setana T and Pentika M. 1996. Cloning of gene encoding α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3840-3846.
- Christakopoulos, P *et al.* 2002. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endo-xylanases, *International Journal of Biological Macromolecules*, 31 : 171-175
- Dominique H *et al.* 2003, Xylo-oligosaccharides : Properties and Production Technologies, *Electronic Journal Environmen. Agric. Food. Chem.*, ISSN : 1579-4377.
- Gupta N, Reddy SV, Maiti S, Ghosh A. 2000. Cloning, Expression and sequence Analysis of The Gene Encoding the Alkali-Stable, Thermostable Endo-1,4- β -xylanase from Alkalophilic, Mesophilic *Bacillus sp.* Strain NG-27, *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2631-2635.
- Hilge M, Gloor S, Winterhalter K, Zimmermann W, Piontek K. 1996. Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of Two β -Mannanase Isoform from *Thermotomonospora fusca* KW3, *Acta Cryst. D* 52:1224-1225.
- Horikoshi K. 1999. Alkaliphilic : Some Applications of their Products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 735-750
- Kulkarni NA, Shendye, dan Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 23: 411-456.
- Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A and Kawamura Y. 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain, *J. of Bact.*, 172: 6669-6672.
- Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2002. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08, Penelitian S3-IPB Bogor dan *JSPS-Short-course Program*, Juli-Oktober, Osaka Prefecture University, Jepang
- Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2003. Kloning Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di *E. coli* DH5 α , Penelitian S3-IPB, Bogor dan *JSPS-Short Course Program*, September-November, Mie University, Jepang.
- Ni Nyoman Tri Puspaningsih dkk. 2005. Kloning, Over-ekspresi Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di sistem pET101/D-TOPO, KNAW Mobility Program, The Netherlands
- Ni Nyoman Tri Puspaningsih dkk, 2005 dan 2006. Degradasi Limbah Kelapa Sawit dengan Enzim Xilanolitik Rekombinan, Penelitian RUT XII (berakhir 2006), Menristek, Jakarta

Saha BC. 2003. Hemicellulose bioconversion, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 279-291.

Schwarz HW, Adelsberger H, Jauris S, Herte C, Funk B, Staudenbauer LW.1990.Xylan Degradation by The Thermophilic *Clostridium stercorareum* : Cloning and Expression of Xylanase, β -D-xylosidase, and α -L-arabinofuranosidase Genes in *Escherichia coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170 : 368-374

Shallom D, Belakhov V, Solomon D, Shoham G, Baasov T, Shoham Y.2002. Detailed Kinetic Analysis and Identification of the Nucleophile in α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6, a Family 51 Glycoside Hydrolase, *J.Biol.Chem.*, 277: 436667-43673.

LAMPIRAN

SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Peningkatan Aktivitas Enzim Hemiselulase dengan Rekayasa Protein untuk Pengolahan Biomassa Berbasis Lignoselulosa melalui pendanaan Hibah Tim Pascasarjana direncanakan berlangsung selama 4 tahun. Penelitian tahun pertama telah meluluskan 2 mahasiswa jenjang Magister dan melibatkan 2 mahasiswa jenjang Doktor. Selain itu telah pula menghasilkan 1 publikasi internasional (accepted). Hasil penelitian tahun pertama menunjukkan bahwa (1). rekayasa protein melalui *site directed mutagenesis* terhadap enzim β -D-xilosidase telah menghasilkan 4 enzim varian, (2). rekayasa protein melalui *direct evolution* terhadap enzim α -L-arabinofuranosidase telah menghasilkan beberapa varian, dan salah satu diantaranya menunjukkan karakterisasi pH dan suhu lebih tinggi dibandingkan wild type nya, (3). kerusakan substrat limbah pertanian oleh enzim xilanolitik telah berhasil dianalisis dengan *Scanning Electron Microscope*, dan (4). Gen *exo-xilanase* dalam pTP510 telah berhasil diisolasi dan disisipkan dalam pET-30b. Hasil penelitian pada tahun pertama tersebut akan dilanjutkan pada tahun kedua ini dengan tujuan khusus dan tahapan penelitian sebagai berikut.

A. Tujuan Khusus

4. Memurnikan dan Mengkarakterisasi enzim hemiselulase varian
5. Kristalisasi dan Menganalisis struktur dan fungsi enzim hemiselulase varian
6. Menentukan efisiensi hidrolisis limbah pertanian dengan enzim hemiselulase varian

B. Metode

4. Pemurnian Enzim Hemiselulase variant (dilakukan oleh 1 mahasiswa S3)

- a. Pemurnian Enzim Variant (xilosidase, arabinofuranosidase) hasil *site directed mutagenesis* maupun *direct evolution* dilakukan menggunakan affinitas kromatografi dengan perangkat kolom Ni-NTA. Hasil pemurnian dianalisis dengan SDS-PAGE, uji aktivitas menggunakan substrat spesifik turunan p-nitrophenol.
- b. Karakterisasi struktur dan fungsi enzim variant

Klon positif yang telah dikarakterisasi strukturnya dengan sekuensing, selanjutnya diuji ekspresinya dengan menentukan aktivitas enzim variant yang

dihasilkan menggunakan substrat spesifik p-nitrofenil- α -L-arabinosida dan p-nitrofenil- β -D-xylopiranoside. Enzim dan substrat diinkubasi selama 30menit pada suhu 70°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 405 nm.

5. Kristalisasi dan Analisis Struktur Hemiselulase Varian

Hemiselulase Varian yang telah diperoleh pada tahun pertama akan dilakukan kristalisasi untuk menganalisis struktur varian (mutan) terutama yang menunjukkan aktivitas tertinggi (xylosidase, arabinofuranosidase) . Kristalisasi dilakukan dengan metode hanging drop menggunakan larutan standar kristalisasi.

6. Hidrolisis Limbah Pertanian berbasis hemiselulosa dengan Hemiselulase Varian

Uji kemampuan hidrolisis hemiselulase varian terhadap limbah pertanian seperti berbagai limbah pertanian alam, seperti jerami padi, enceng gondok, dan tongkol jagung akan dibanding dengan enzim hemiselulase wild type nya. Efisiensi hasil hidrolisis akan diamati dengan *Scanning Electron Microscope*.

C. Jadwal Kerja

No.	Kegiatan	Jadwal		
		Tahun I	Tahun II	Tahun III
1.	Rekayasa Protein melalui <i>site directed mutagenesis</i> dan <i>gene shuffling</i> terhadap Xylosidase dan Arabinofuranosidase Rekombinan (<i>pET-xyl</i> dan <i>pET-abfa</i>)			
2.	Analisis SEM aktivitas enzim hemiselulase terhadap limbah pertanian			
3.	Pemurnian Enzim Variant			
4.	Karakterisasi Struktur dan Fungsi Xylosidase dan Arabinofuranosidase Variant			
5.	Kajian Biokimia Enzim Variant			
6.	Kajian Biofisika enzim Variant			