

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perubahan iklim secara drastis masih menjadi isu global yang dirasakan oleh seluruh masyarakat dunia hingga saat ini. Penyebab perubahan iklim terbesar adalah penggunaan bahan bakar berbasis fosil yang berlebihan. Selain ketersediaan bahan bakar fosil yang terbatas, dampak yang disebabkan oleh produksi skala besar dan penggunaan bahan bakar fosil berkontribusi negatif terhadap lingkungan akibat emisi gas rumah kaca dan bahan-bahan beracun yang dihasilkan (Vijayan et al., 2017). Indonesia termasuk peringkat 10 terbesar negara penghasil gas rumah kaca dan kondisi ini menyebabkan Indonesia menjadi negara yang rentan terhadap dampak yang disebabkan oleh perubahan iklim. Berkaitan dengan rencana Indonesia dalam mengurangi emisi gas rumah kaca pada tahun 2030 di Perjanjian Paris, permasalahan ini dapat dimitigasi salah satunya pada sektor energi dan bahan bakar, yaitu dengan mendorong pengembangan energi terbarukan (UNDP, 2022). Adapun salah satu contoh energi terbarukan dapat bersumber dari biomassa. Biomassa dapat menjadi sumber daya alternatif untuk produksi energi dan bahan kimia serta dalam waktu yang bersamaan dapat mengatasi masalah limbah.

Biomassa merupakan seluruh material yang diproduksi dan umumnya berasal dari makhluk hidup. Potensi pemanfaatan biomassa sebagai energi terbarukan di Indonesia didukung oleh fakta bahwa Indonesia memproduksi sekitar 146,7 juta ton biomassa per tahun (Abdullah K, 2003). Dalam pengolahannya menjadi biogas, struktur biomassa yang terdiri atas polisakarida kompleks perlu dikonversi menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana. Hal ini dapat dilakukan secara enzimatik. Enzim diperlukan pada hampir seluruh proses seluler sehingga memiliki peran mendasar dalam beragam fungsi biokimia. Identifikasi residu katalitik merupakan langkah awal yang penting dalam mengkarakterisasi mekanisme dan fungsi enzim dikarenakan keterlibatannya secara langsung dalam proses katalitik enzim. Selain

memberikan informasi terkait mekanisme katalitik, identifikasi residu katalitik juga memiliki aplikasi penting di bidang desain obat, rekayasa protein, analisis jalur metabolisme, dan biologi sintetik (Han et al., 2012). Oleh karena itu, penelitian tentang identifikasi residu katalitik enzim diperlukan.

β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37) merupakan salah satu enzim xilanolitik yang dapat menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi unit xilosa tunggal. Enzim ini termasuk rangkaian glikosida hidrolase yang bekerja terhadap degradasi xilan secara menyeluruh (Bravman et al., 2003; Polaina & MacCabe, 2007). Menurut database CAZy, β -xilosidase ditemukan pada famili glikosida hidrolase (GH), yaitu GH1, GH2, GH3, GH5, GH10, GH30, GH39, GH43, GH51, GH52, GH54, GH116, dan GH120. Pengelompokan ini dilakukan berdasarkan kesamaan urutan asam amino, kemiripan mekanisme reaksi, dan struktur 3D (Bravman et al., 2003; Henrissat & Daviest, 1997; Rohman et al., 2018). β -xilosidase, seperti enzim xilanolitik lainnya, memiliki potensi yang besar dalam beberapa aplikasi bioteknologi, seperti pada proses *biobleaching* dalam industri pulp dan kertas, pemrosesan pakan hewan, ekstraksi kopi, minyak tumbuhan dan pati, serta untuk produksi bahan bakar dan bahan baku kimia (Beg et al., 2001; Sunna & Antranikian, 1997).

Mekanisme katalitik enzim-enzim famili GH43 menggunakan dua residu katalitik, yaitu satu residu yang berperan sebagai nukleofil dan satu residu yang berperan sebagai asam-basa. Berdasarkan database CAZy, kedua residu tersebut merupakan asam aspartat (Asp) dan asam glutamat (Glu). Analisis *multiple sequence alignment* (MSA) menunjukkan bahwa Txy-Xyl mirip dengan β -xilosidase dari famili GH43. Hal ini juga didukung melalui pemodelan homologi Txy-Xyl menggunakan program *modelling* SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) yang menunjukkan bahwa β -xilosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 (Xyl; PDB ID 5Z5D) memiliki persentase identitas asam amino sebesar 51,61% terhadap Txy-Xyl. Pada penelitian sebelumnya, residu-residu katalitik β -xilosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 telah ditentukan. Enzim ini menggunakan Asp-121 sebagai nukleofil dan Glu-177 sebagai asam-basa (Rohman et al.,

2018). Berdasarkan analisis MSA, kedua residu ini *conserved* pada beberapa residu katalitik dari mikroba lainnya dalam famili GH43, termasuk residu katalitik β -xilosidase dari *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11 (Lampiran 2). Hal ini dapat menunjukkan bahwa kedua residu Asp-121 dan Glu-177 berperan penting pada enzim-enzim tersebut dan dapat diperkirakan bahwa kedua residu ini merupakan residu katalitik bagi Txy-Xyl. Dalam hal Txy-Xyl, Asp-121 berperan sebagai nukleofil dan Glu-171 berperan sebagai asam-basa.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji dan membuktikan bahwa residu Asp-121 dan Glu-171 merupakan residu-residu katalitik *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *site-directed mutagenesis* menjadi asam amino alanin (Ala) untuk mendapatkan dua mutan Txy-Xyl, yaitu Asp-121-Ala dan Glu-171-Ala. Alanin dipilih karena kemampuannya untuk mengeliminasi rantai samping di luar β -karbon dan cenderung mempertahankan konformasi rantai utama (Bromberg & Rost, 2008). Txy-Xyl mutan yang telah diekspresi dan dimurnikan selanjutnya akan dibandingkan aktivitasnya terhadap Txy-Xyl *wild type*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah Asp-121 dan Glu-171 merupakan residu-residu katalitik β -xilosidase asal *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11?
2. Bagaimana aktivitas β -xilosidase yang ditunjukkan oleh Txy-Xyl *wild type* terhadap Txy-Xyl mutan Asp-121-Ala dan Glu-171-Ala?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengidentifikasi residu-residu katalitik β -xilosidase asal *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11.

2. Membandingkan aktivitas β -xilosidase yang ditunjukkan oleh Txy-Xyl *wild type* terhadap Txy-Xyl mutan Asp-121-Ala dan Glu-171-Ala.

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat membuktikan identifikasi residu-residu katalitik Txy-Xyl. Dengan informasi identifikasi tersebut, mekanisme katalisis enzim oleh *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11 dapat dijelaskan dan hasil yang didapatkan dari penelitian ini dapat dimanfaatkan dengan baik dalam industri pengolahan biomassa.