

IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

nomor *Enzyme Commission* (EC) yaitu 3.2.1., dimana enzim golongan glukosa hidrolase secara umum memiliki dua residu katalitik yang berperan dalam proses katalitik baik secara retensi atau inversi. Berdasarkan spesifisitas substrat dan cara kerja terhadap substrat polimerik (ekso- atau endo-), Abf (EC 3.2.1.55) merupakan enzim yang mampu melepaskan L-arabinosa. Sedangkan pengelompokan berdasarkan urutan asam amino dan strukturnya pada *carbohydrate active enzymes* (CAZy) *database* (www.cazy.org) enzim Abf tersebar dalam sembilan *Glycoside Hydrolase Family* (GH family), yaitu GH 2, 3, 5, 10, 39, 43, 51, 54, dan 62.

α -L-Arabinofuranosidase berperan penting dalam meningkatkan kinerja enzim xilanase untuk menghidrolisis xilan. Sehingga keberadaan Abf sangat penting pada proses sakarifikasi xilan. Proses pengolahan sari buah menjadi minuman anggur dan jus pengolahan dilakukan pada suhu rendah untuk menghindari perubahan rasa dan aroma akibat suhu tinggi. Pada proses tersebut Abf berperan untuk meningkatkan aroma anggur dan mengoptimalkan proses klarifikasi jus (Poria, *et al.*, 2020). Proses industri umumnya mempunyai keadaan yang berbeda seperti kondisi lingkungan asli enzim. Sehingga dibutuhkan enzim yang dapat beradaptasi dengan kondisi proses industri.

Industri bioteknologi berbasis biomassa, memiliki karakter proses industri yang berbeda-beda. Sehingga, karakter enzim yang digunakan pada proses industri harus disesuaikan. Seperti pada industri kertas, proses delignifikasi dengan larutan kimia dapat menghasilkan garam dari proses netralisasi. Artikel penelitian Tanaka *et al.*, (Tanaka, 1984) menyebutkan rata-rata garam total yang terbentuk pada proses netralisasi adalah >10 mM. Penambahan 5% (855 mM) NaCl dilaporkan dapat meningkatkan proses delignifikasi pulp kertas (Li, *et al.*, 2002). Sehingga enzim yang memiliki ketahanan pada kadar garam lebih dari 85 mM sangat dibutuhkan. Salah satu contoh enzim Abf yang memiliki aktivitas halofilik adalah enzim α -L-Arabinofuranosidase dari halofilik bakteri *Colletotrichum graminicola* (Carvalho, *et al.*, 2018). Selain itu, industri fermentasi menggunakan enzim Abf pada proses konversi xilan menjadi produk *bio-fuel* seperti etanol (Poria, *et al.*, 2020). Selama proses industri, untuk meningkatkan proses sakarifikasi konversi xilan dilakukan dengan menggunakan campuran enzim Abf yang bekerja sinergi dengan enzim xilanolitik lain seperti endo-xilanase dan β -Xilosidase. Hasil hidrolisis xilan dengan enzim campuran akan menghasilkan produk yang beragam, seperti α -L-arabinosa sebagai produk dari Abf; D-xilosa dari β -Xilosidase; dan glukosa. Terjadinya

IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

peningkatan jumlah produk yang tinggi meningkatkan resiko penurunan aktivitas enzim akibat dari inhibisi produk dan menyebabkan proses sakarifikasi menjadi tidak sempurna. Sehingga diperlukan enzim yang tahan terhadap konsentrasi produk tinggi, serta memiliki efek sinergi dengan enzim lain. Sehingga, dalam rangka memenuhi kebutuhan industri tersebut, penelitian mengenai pengaruh konsentrasi garam, monosakaroda, dan efek sinergi enzim Abf perlu dilakukan.

Mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan aktinomicetes yang hidup dilingkungan dengan kandungan biomassa berbasis polimer seperti selulosa, hemiselulosa dan pektin diketahui dapat menghasilkan enzim α -L-Arabinofuranosidase. Mikroorganisme seperti bakteri diketahui memiliki rentang wilayah hidup yang cukup luas, baik di lingkungan normal sampai dengan lingkungan yang ekstrim seperti di lingkungan dengan suhu dingin dan panas (Madigan, 2005). Bakteri yang mampu tumbuh dilingkungan dengan suhu dibawah 5 °C dikenal sebagai bakteri psikrofilik dan psikrotoleran. Bakteri *Paenibacillus antarcticus* merupakan bakteri yang diisolasi dari sedimen antartika yang diambil dari Chlorite Lake pada wilayah Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica) (Montes, *et al.*, 2004). Bakteri *P. antarcticus* adalah bakteri psikrotoleran dengan suhu tumbuh optimum antara 10°–15°C. Selain itu, bakteri tersebut merupakan kelompok bakteri gram-positif yang bersifat aerob fakultatif. Bakteri tersebut juga mampu tumbuh di lingkungan dengan kadar garam 4 % (Montes, *et al.*, 2004). Berdasarkan analisis genomik *P. antarcticus*, memiliki gen yang menyandi enzim α -L-Arabinofuranosidase dan glukosil hidrolase lain seperti, β -D-xilosidase, α -amilase, dan β -L-mananase (Montes, *et al.*, 2004). Enzim yang dihasilkan oleh bakteri psikrofilik/psikrotoleran dilaporkan aktif pada suhu rendah (*cold-active enzyme*). Beberapa enzim dari bakteri psikrofilik yang telah berhasil dikarakterisasi adalah enzim selulase dari *Pseudoalteromonas* sp. DY3 (CelX) yang diisolasi dari sedimen lautan dalam (Zeng, *et al.*, 2006); Lipase dari *Staphylococcus epidermidis* bersumber dari ikan beku (Joseph, *et al.*, 2006); dan α -Amylase dari *Pseudoalteromonas haloplanktis* yang diisolasi dari antartika (Cipolla, *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil penelitian mengenai karakteristik *cold-active enzyme* menunjukkan nilai aktivitas spesifik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan enzim homolognya dari bakteri mesofilik dan termofilik.

IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Enzim α -L-Arabinofuranosidase dari novel bakteri *Paenibacillus antarcticus* sp. (Pan-Abf) telah dilakukan penelitian sebelumnya (Fikriyah, belum dipublikasi; Hamiah, belum dipublikasi). Berdasarkan studi bioinformatik, Pan-Abf merupakan enzim *Glycoside Hydrolase* famili GH51, memiliki stuktur primer yang tersusun dari 504 asam amino (**Lampiran 1**), serta tidak memiliki signal peptida. Urutan asam aminonya telah tersedia di GenPept dengan kode akses WP_068651726.1. Pada penelitian tersebut diatas, urutan basa nukleotida gen *Pan-Abf* ditentukan menggunakan urutan asam amino yang tersedia secara *in-silico* dan disesuaikan dengan *codon-bias* bakteri *Escherichia coli*. Gen *Pan-Abf* selanjutnya disisipkan ke dalam plasmid pET-15b untuk memperoleh plasmid rekombinan pET15b-*Pan-Abf* dilakukan sintesis secara kimiawi (Genscript Biotech, United State). Kemudian, Pan-Abf telah berhasil diekspresikan di dalam bakteri *E. coli* BL21 (DE3) dan dimurnikan. Karakterisasi Pan-Abf menunjukkan bahwa enzim ini dapat menghidrolisis substrat kromogenik sintesis *p*-nitrofenil- α -L-Arabinofuranosida (*p*NP-A), dengan aktivitas maksimum pada pH $\sim$ 6,0 dan suhu $\sim$ 40 °C (Fikriyah, belum dipublikasi). Pan-Abf bersifat termolabil, dengan waktu paruh 6 jam pada suhu 35 °C. Disamping itu, analisis pengaruh zat aditif seperti logam berat, senyawa organik, detergen, dan gula terhadap aktivitas Pan-Abf telah dilakukan (Hamiah, belum dipublikasi). Pan-Abf kehilangan aktivitasnya dengan adanya Al^{3+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} , dan sodium dodesilsulfat (SDS). Menariknya penambahan 10 mM garam NaCl, KCl, $CaCl_2$, dan $MgCl_2$ tidak menunjukkan perubahan aktivitas. Sedangkan pada penambahan 100 mM monosakarida arabinosa, xilosa, glukosa, dan galaktosa aktivitas Pan-Abf relatif tinggi. Karakteristik Pan-Abf sebagai enzim yang tahan terhadap suhu dingin secara kinetika belum diketahui, dan sifat ketahanan enzim terhadap konsentrasi garam di atas 100 mM belum diketahui. Sehingga, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik Pan-Abf.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karateristik enzim Pan-Abf dengan melakukan uji beberapa parameter. Penentuan spesifisitas substrat terhadap subtart sintetik dan alami. Penentuan parameter kinetika enzim terhadap sintesis *p*-nitrofenil- α -L-Arabinofuranosida (*p*NPA), meliputi laju aktivitas maksimum (V_{max}), konstanta Michaelis-Menten (K_M), konstanta katalisis atau *turn-over number* (k_{cat}), dan konstanta spesifisitas (k_{cat}/K_M). Di mana, kondisi reaksi dilakukan pada suhu dan pH optimum dari hasil penelitian sebelumnya (Fikriyah, belum dipublikasi). Pengaruh konsentrasi produk

IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

terhadap aktivitas enzim ditentukan dengan melakukan variasi konsentrasi arabinosa, xilosa, dan glukosa. Selain itu, dilakukan pengaruh garam sodium klorida (NaCl) dengan konsentrasi lebih dari 100 mM terhadap aktivitas Pan-Abf. Hal ini dilakukan karena sumber bakteri Pan-Abf dihasilkan oleh bakteri *P. antarcticus* yang dapat tumbuh pada lingkungan dengan kadar garam tinggi. Analisis kerja sinergi Pan-Abf dengan enzim endo-xilanase dan β -Xilosidase dikerjakan menggunakan wheat arabinoxylan sebagai substrat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimana parameter kinetika meliputi laju aktivitas maksimum ($V_{\max}$), konstanta Michaelis-Menten (K_M), konstanta katalisis (*turn-over number*, k_{cat}), dan konstanta spesifisitas (k_{cat}/K_M) Pan-Abf terhadap substrat pNP-A?
2. Bagaimana spesifisitas Pan-Abf terhadap substrat sintetik, oligosakarida, dan polimer?
3. Bagaimana pengaruh monosakarida arabinosa, xilosa, dan glukosa pada aktivitas Pan-Abf terhadap substrat pNP-A?
4. Apakah konsentrasi garam 5% dapat mempengaruhi aktivitas Pan-Abf?
5. Apakah pengaruh sinergi kerja Pan-Abf dengan enzim endo-xilanase dan β -Xilosidase pada hidrolisis wheat arabinoxylan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menentukan parameter kinetika meliputi laju aktivitas maksimum ($V_{\max}$), konstanta Michaelis-Menten (K_M), konstanta katalisis (*turn-over number*, k_{cat}), dan konstanta spesifisitas (k_{cat}/K_M) Pan-Abf terhadap substrat pNP-A.
2. Menentukan spesifisitas Pan-Abf terhadap substrat sintetik, oligosakarida, dan polimer.
3. Menganalisis pengaruh monosakarida arabinosa, xilosa, dan glukosa pada aktivitas Pan-Abf terhadap substrat pNP-A.

IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

4. Menentukan pengaruh garam pada konsentrasi 5% terhadap aktivitas Pan-Abf.
5. Menganalisis pengaruh sinergi kerja Pan-Abf dengan enzim endo-xilanase dan β -Xilosidase pada hidrolisis wheat arabinoxylan.

1.4 Manfaat Penelitian

Analisis karakteristik enzim Pan-Abf dapat membantu menjelaskan sifat-sifat biologis enzim α -L-Arabinofuranosidase yang tahan terhadap suhu rendah. Sehingga kedepannya pemanfaatan enzim Abf yang tahan suhu rendah dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang industri.