

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Berkurangnya sumber bahan baku pada industri pulp dan kertas yang berasal dari serat alam serta maraknya isu pemanasan global mengakibatkan berkurangnya luas hutan sebagai paru-paru dunia telah mendorong industri pulp dan kertas untuk mencari sumber bahan baku lain atau yang biasa disebut serat sekunder. Serat sekunder (non kayu) telah menjadi bahan baku utama pada industri kertas dan pulp. Selain karena harganya yang murah, juga dapat membantu menjaga kelestarian hutan, serta dapat mengurangi polusi. Penggunaan enzim pada industri pulp dan kertas banyak diterapkan dalam proses bio-pulping yang bertujuan untuk mengurangi energi yang dibutuhkan dalam penggilingan (*refining*) pulp, *bio-bleaching* untuk mendapatkan pulp yang lebih putih dan lebih ramah lingkungan (bebas klorin). Dalam proses biodeinking, enzim dapat digunakan untuk mengoptimalkan pelepasan partikel tinta tanpa merusak serat. Reaksi enzimatik yang terjadi pada proses biodeinking dapat meningkatkan hidrolisis dan depolimerisasi selulosa antar serat, sehingga terjadi pemisahan satu sama lain (Kim *et al.*, 1991). Enzim dapat memperlemah ikatan-ikatan serat pada partikel tinta dapat terlepas dari permukaan serat (Eom *et al.*, 1990). Menurut wirawan (2008) enzim α -amilase akan mendegradasi lapisan pati yang terdapat pada permukaan serat. Menurut Van der Maarel *et al.*, (2002) α -amilase dalam industri pulp dan kertas juga dapat digunakan untuk memodifikasi pati sebagai pelapis kertas.

Enzim α -amilase merupakan endoamilase yang dapat memotong ikatan α -1,4 glikosidik rantai amilosa atau amilopektin untuk menghasilkan produk dengan konfigurasi α (Martinez *et al.* 2015). Aktivitas enzim ini dipengaruhi oleh keberadaan kofaktor kalsium sehingga disebut juga sebagai metalloenzim. Meskipun dapat memutus ikatan α -1,4 glikosidik, α -amilase tidak bisa memutus ikatan α -1,6 glikosidik. Amilase mengkatalisis hidrolisis dari α -1,4 glikosida polisakarida untuk menghasilkan dekstrin, oligosakarida, maltosa, dan D-glukosa. Berdasarkan kemampuan memecah glukosa, enzim amilase terbagi atas tiga kelompok yakni, α -amilase, β -amilase, dan glukamilase (Aiyer, 2005). α -amilase merupakan jenis enzim endoamilase, sedangkan β -amilase merupakan jenis enzim

eksoamilase (Tiwari, 2015). α -amilase bekerja memutus ikatan α -1,4- glikosidik secara acak dari bagian dalam amilosa atau amilopektin. Produk akhir amilosa atau amilopektin yang didegradasi oleh enzim α -amilase adalah oligosakarida dengan panjang rantai yang berbeda-beda. Sedangkan β -amilase bekerja memutus ikatan α -1,4-glikosidik yang terdapat pada bagian luar pati menjadi glukosa, amilopektin dan dekstrin. Sifat α -amilase yang dapat memutus ikatan α -1,4-glikosidik secara acak pada bagian dalam pati dan dapat bekerja di semua bagian substrat, menyebabkan aktivitas α -amilase dapat bekerja lebih cepat dibandingkan dengan amilase lainnya terutama β -amilase (Taniguchi *et al.*, 2009).

Aktivitas α -amilase di industri menjadi penting sebagai contoh, pada konversi pati menjadi glukosa dan fruktosa (Sundarram, 2014). Pemanfaatan enzim pada industri umumnya beroperasi pada suhu tinggi untuk membantu dalam proses penghilangan pati. Pada proses ini memerlukan suhu tinggi sekitar 70°-80°C sehingga harus menggunakan enzim yang bersifat termostabil, tahan terhadap suhu tinggi, suhu yang tinggi dapat meningkatkan laju reaksi kimia termasuk reaksi enzimatik serta dapat mengurangi kontaminan (Setiasih, 2006). α -amilase yang digunakan dalam industri bersifat termostabilitas dan termoaktivitas karena umumnya dihasilkan oleh bakteri yang berasal dari sumber air panas (Gaur *et al.*, 2012). Sumber air panas sebagai tempat pertumbuhan yang memiliki potensi untuk ditemukannya bakteri termofilik. Bakteri termofilik adalah sekelompok bakteri yang mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan yang bersuhu tinggi, dengan rentang suhu berkisar 45°-90°C (Tuntun dan Misbahul, 2014). Bakteri termofilik mempunyai beberapa keunggulan yakni reaksi bersifat lebih spesifik, laju reaksi enzimatik lebih cepat serta memiliki ketahanan yang baik pada penyimpanan suhu kamar. Rendahnya tingkat kehilangan aktivitas enzim, bakteri termofilik memiliki termostabilitas intrinsik yang baik (Yuda, 2013). Adapun jenis- jenis bakteri yang tergolong termofilik terdiri dari spesies *Bacillus* yang meliputi *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus globisporus* and *Bacillus alvei* (Shindu, 2014). *Anoxybacillus* telah dikenal dapat menghasilkan berbagai jenis enzim pendegradasi karbohidrat (Derekova *et al.*, 2008). Ozdemir *et al.*, (2011) telah berhasil mengisolasi strain *Anoxybacillus flavithermus* dari sumber air panas

di Turki yang digunakan untuk produksi enzim α -amilase dari sekam padi menggunakan fermentasi *solid-state*.

Bakteri *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Sumber Air Panas Gunung Pancar Bogor yang memiliki aktivitas amilolitik, yang dapat menghasilkan enzim α -amilase (Putrianti, 2016). Pada industri, enzim α -amilase termostabil dapat meningkatkan proses degradasi pati untuk menghasilkan glukosa, maltose, dan maltodekstrin. Azmil (2017) telah mengamplifikasi gen penyandi α -amilase asal bakteri *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 dengan ukuran fragmen 1434 bp menggunakan metode PCR dengan primer *forward* dan primer *reverse* sehingga diperoleh urutan basa nukleotida α -amilase *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 yang memiliki tingkat homologi tinggi sebesar 90,7%-94,1% dibandingkan dengan tujuh gen penyandi α -amilase dari *Anoxybacillus* lain di Genbank. Fragmen yang berhasil diisolasi merupakan fragmen bagian tengah dan belum dilakukan kloning ke dalam bakteri *E. coli*. Dita (2019) melakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan gen penyandi utuh α -amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 dengan mendesain primer yang baru sehingga diperoleh fragmen 1519 bp.

Dalam upaya untuk meningkatkan efisiensi penggunaan enzim α -amilase dalam menghidrolisis substrat pati mentah dapat dilakukan dengan menambahkan modular pengikat karbohidrat atau CBM (*carbohydrate binding modul*). *Carbohydrate Binding Module* (CBM) adalah komponen kecil yang terdapat pada beberapa enzim dengan aktivitas pengikatan karbohidrat spesifik secara independen (Oliveira *et al.*, 2015). *Carbohydrate Binding Module* (CBM) berfungsi untuk mendekatkan sisi katalitik enzim pada permukaan polisakarida yang tak larut sehingga meningkatkan aktivitas enzim (Obembe *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2011). Adanya domain tambahan seperti CBM dapat mengoptimalkan kerja dari enzim itu sendiri. CBM memediasi enzim dengan substrat lebih lama sehingga aktivitas katalitik enzim tersebut lebih optimal (Ratnadewi, 2013).

Puspaningsih (2004) telah melakukan proses *shotgun cloning* untuk memperoleh gen klaster pengkode enzim xilanolitik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dari kawah panas Gunung Pancar Bogor Jawa Barat. Gen klaster tersebut berukuran 8444 bp yang terdiri dari gen transposase, ABC permease,

GbtXyl43A (DQ345777), α -L-arabinofuranosidase (DQ387046) dan ekso-xilanase *putative* (DQ387047). Ekso-xilanase *putative* dalam gen bank dimasukkan dalam famili GH43 namun belum terkarakterisasi dan menunjukkan homologi yang sangat rendah dibanding sejenisnya dalam GH43. Selanjutnya Ratnadewi (2013) telah berhasil mengeksplorasi gen ekso-xilanase *putative* tersebut dan berdasarkan karakternya enzim ini bukan termasuk enzim xilanase yang bersifat ekso, namun teridentifikasi sebagai enzim β -xilosidase, yaitu GbtXyl43B. Enzim ini terdiri dari dua domain yaitu CM (*Catalytic module*) pada residu asam amino 157–604 dan CBM (*Carbohydrate binding module*) yang terletak pada residu asam amino 15–149. Analisis pohon filogenik dari 50 famili CBM menunjukkan bahwa CBM-GbtXyl43B termasuk dalam famili CBM36.

Pengaplikasikan CBM dapat dilakukan dengan melakukan fusi CBM dengan enzim yang bertujuan untuk mendapatkan protein bifungsional (Carla *et al.*, 2015). Dalam dunia teknologi DNA penggunaan CBM yang paling menarik ialah dengan melakukan fusi CBM dengan protein (Oliveira *et al.*, 2015). Hal ini bertujuan agar didapatkan aktivitas enzim dari protein tersebut menjadi lebih tinggi setelah dilakukan fusi dengan CBM dibandingkan dengan aktivitas enzim tanpa dilakukan fusi. Fusi ini juga dapat menghasilkan fungsi ganda dari suatu protein, untuk meningkatkan aktivitas katalitiknya, berfungsi untuk produksi dan pemurnian dari enzim (Connaris *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2015). Ravalason *et al.*, (2009) menambahkan modular pengikat karbohidrat atau CBM (*carbohydrate binding modul*) pada enzim lakase untuk meningkatkan sifat biokatalisnya. Penelitian lain juga dilakukan oleh Kittur *et al.*, (2003) melakukan fusi CBM famili 2b dengan xilanase dari *Thermotoga maritime* untuk meningkatkan aktivitas hidrolisis terhadap substrat larut xilan. Levy *et al.*, (2002) melakukan fusi CBM yang mengandung modul pengikat selulosa CBM3 dari *Clostridium cellulovorans*, untuk diaplikasikan pada kertas saring selulosa yang mampu meningkatkan sifat mekanik kertas saring tersebut. Rahmah (2016) telah berhasil melakukan fusi *cbm*-Gbtxyl43b dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dengan gen penyandi lakase *lcc2* dari *Pleurotus salmoneostramineus* untuk meningkatkan aktivitas enzim lakase *lcc2* dalam mendegradasi lignin pada proses delignifikasi dalam industri pulp dan kertas.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan fusi gen penyandi CBM-GbtXyl43B dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dengan gen penyandi α -

amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01. Diharapkan hasil fusi *cbm*-amilase mampu meningkatkan aktivitas enzim α -amilase dalam menghidrolisis pati matang maupun mentah. Fusi *cbm*-amilase ini nantinya akan diinsersi ke vektor sekresi pGEX-4T-2-His.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan maka dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah gen penyandi *cbm*-GbtXyl43B dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dapat difusikan dengan gen penyandi α -amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01?
2. Bagaimana karakteristik dari gen *cbm*-amilase hasil fusi terkait dengan profil restriksi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan fusi gen penyandi *cbm*-GbtXyl43B dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dengan gen penyandi α -amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 untuk meningkatkan aktivitas enzim α -amilase dalam menghidrolisis substrat pati mentah.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Memfusikan gen penyandi *cbm*-GbtXyl43B dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dan α -amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01.
2. Mengetahui karakteristik dari gen *cbm*-amilase hasil fusi terkait dengan profil restriksi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat keilmuan

Fusi CBM-GbtXyl43B ke amilase dapat mendukung biokapabilitas enzim α -amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 dalam mendegradasi karbohidrat.

1.4.2. Manfaat praktis

Hasil konstruksi fusi gen penyandi antara CBM-GbtXyl43B dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dan α -amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 dapat meningkatkan aktivitas enzim dalam mendegradasi karbohidrat pada proses

pemecah pati mantang maupun mentah. Dengan adanya peningkatan aktivitas enzim, maka nilai ekonomisnya juga akan meningkat.