

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Surfaktan adalah bahan yang sering digunakan pada berbagai industri. Surfaktan dibutuhkan di dalam industri karena memiliki kemampuan untuk meningkatkan kelarutan, kapasitas berbasa, dan menurunkan tegangan permukaan. Surfaktan dapat berupa surfaktan sintetis dan biosurfaktan. Surfaktan sintetis memiliki kekurangan seperti memiliki toksisitas yang tinggi, *less sustainable*, dan biodegradabilitasnya rendah. Berkebalikan dengan surfaktan sintetis, biosurfaktan memiliki keuntungan seperti toksisitas yang rendah, lebih *sustainable*, dan memiliki biodegradabilitas yang tinggi.

Salah satu biosurfaktan yang digunakan dalam berbagai industri adalah rhamnolipid. Secara khusus, rhamnolipid telah digunakan secara luas dalam industri kosmetik untuk produk seperti pelembab dan sampo (Irfan *et al.*, 2014). Rhamnolipid memiliki kemampuan yang dapat diaplikasikan dalam bidang bioremediasi area. Salah satu dari kemampuan bioremediasi rhamnolipid adalah bioremediasi area tercemar logam berat (Muligan *et al.*, 2007). Selain memiliki kemampuan bioremediasi, rhamnolipid juga memfasilitasi degradasi limbah hidrokarbon seperti minyak mentah dan minyak sayur (Zhang *et al.*, 1992). Rhamnolipid adalah surfaktan yang berharga dalam industri kosmetik, dan rhamnolipid adalah sumber rhamnose (Linhardt *et al.*, 1989).

Rhamnolipid memiliki fungsi sebagai biosurfaktan dengan berbagai prospek. Rhamnolipid lebih mudah terurai secara hayati dan bersifat non-toksik dari pada surfaktan sintetis lainnya. Rhamnolipid juga memiliki kadar *critical micelle concentration* (CMC) yang lebih rendah. Keunggulan lain dari rhamnolipid adalah memiliki kapasitas emulsi yang tinggi dan solubilitas yang baik sehingga secara potensial dapat dimanfaatkan di bidang industri agrikultur, farmasi, dan bioremediasi minyak (Zhou *et al.*, 2019). Rhamnolipid terkenal dengan keefektifannya untuk menghilangkan minyak mentah dari lumpur yang terkontaminasi dan memfasilitasi bioremediasi tumpahan minyak (Costa *et al.*, 2010). Rhamnolipid memiliki tingkat toksisitas yang rendah, sifat aktif

permukaan, dan memiliki sifat antimikroba terhadap beberapa patogen oportunist seperti *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*. Dengan potensi-potensinya, rhamnolipid menunjukkan aplikasi yang menjanjikan dalam bidang obat-obatan dan terapi (Magalhaes dan Nitschke, 2013). Rhamnolipid sebagai bahan aktif terbukti efektif untuk beberapa perawatan kulit yaitu, penyembuhan luka, penyembuhan syok luka bakar, dan pengobatan keriput sehingga diminati di industri kesehatan dan kecantikan (Piljac, 2007).

Rhamnolipid dapat disintesis secara biologis oleh bakteri dari genus *Burkholderia* dan *Pseudomonas*. Salah satu penghasil rhamnolipid yang paling sering dipelajari adalah *Pseudomonas aeruginosa* (Soberón *et al.*, 2005). Sintesis rhamnolipid pada *P. aeruginosa* diregulasi oleh gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR*. *rhlA* mengkode enzim RhlA yang mengkatalisis sintesis dari asam lemak dimer rhamnolipid dan (3-(3-hydroxyalkanoxyloxy) asam alkanoid bebas. *rhlB* mengkode rhamnosyltransferase I (RhlB) yang mengkatalisis transfer dari L-rhamnose teraktivasi ke HAA dan membentuk mono-rhamnolipid. Sedangkan *rhlC* akan mengkode rhamnosyltransferase II (RhlC) yang mengkatalisis transfer L-rhamnose teraktivasi ke mono-rhamnolipid dan membentuk di-rhamnolipid (Sinumvayo *et al.*, 2015; Amani *et al.*, 2013). Terakhir, *rhlR* berperan untuk regulasi *quorum sensing* dan sintesis rhamnolipid. Sintesis rhamnolipid diregulasi oleh sinyal *quorum sensing* (Ochsner *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 1997). Enzim RhlR (dikode oleh gen *rhlR*) dan LasI adalah enzim-enzim yang bertanggung jawab atas sintesis molekul *autoinducer*. Molekul *autoinducer* dikeluarkan jika rhamnolipid mencapai konsentrasi jenuhnya dan molekul *autoinducer* menghambat ekspresi dari gen *rhl* dengan cara berikatan dengan protein regulasi RhlR dan LasI (Reis *et al.*, 2011).

Sintesis rhamnolipid yang berasal langsung dari *P. aeruginosa* dinilai kurang sesuai untuk digunakan di industri pangan, farmasi, atau kosmetik. Rhamnolipid yang disintesis langsung oleh *P. aeruginosa* dikhawatirkan mengandung kontaminan dari *P. aeruginosa* itu sendiri. Karena *P. aeruginosa* adalah bakteri patogen potensial, maka dari itu perlu dilakukan transformasi gen-gen terkait biosintesis rhamnolipid ke bakteri inang lain yang tergolong sebagai

bakteri *Generally Recognized as Safe* (GRAS). Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan rhamnolipid telah berhasil disintesis oleh *Saccharomyces cerevisiae* rekombinan (Bahia *et al.*, 2018) dan *Methilotuvimicrobium alcaliphilum* rekombinan (Awasthi *et al.* 2022).

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan gen penyandi rhamnolipid dari *P. aeruginosa* strain PAO1 yang terisolasi dari luka manusia (Pseudomonas Genome DB, 2020). Sintesis rhamnolipid juga telah dilakukan menggunakan *P. putida* sebagai agen sintesis rhamnolipid. Namun, sintesis rhamnolipid oleh *P. putida* hanya menghasilkan rhamnolipid sebesar 1.5 g/l (Soberón *et al.*, 2021). Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga memiliki isolat *P. aeruginosa* strain UA yang diisolasi dari lumpur tercemar limbah minyak. *P. aeruginosa* UA memiliki koloni yang mengeluarkan pigmen kehijauan dan memiliki bentuk sel batang pendek yang berwarna merah jika diwarnai dengan metide Gram. Untuk mengkonfirmasi bahwa isolate tersebut adalah *P. aeruginosa*, analisis 16s rRNA telah dilakukan dan hasil menunjukkan kesamaan sebesar 99.65% dengan *P. aeruginosa* strain NBRC_12689 (data belum dipublikasikan). *P. aeruginosa* UA diharapkan memiliki enzim-enzim terkait sintesis biosurfaktan yang lebih unggul. Keunggulan dari enzim-enzim terkait biosintesis rhamnolipid oleh *P. aeruginosa* UA ini dapat disebabkan oleh adanya variasi susunan asam amino. Dari keunggulan-keunggulan tersebut, dapat diimplikasikan bahwa terdapat variasi pada susunan basa nukleotida gen terkait biosintesis rhamnolipid pada *P. aeruginosa* UA. Sebagai langkah awal untuk membentuk strain rekombinan penghasil rhamnolipid, maka perlu dilakukan penelitian untuk mempelajari dan menganalisis gen penyandi rhamnolipid dari *P. aeruginosa* UA.

Gen target dari strain donor harus dideteksi keberadaannya terlebih dahulu agar transformasi dapat menghasilkan produk target. Sayangnya, suatu gen tidak dapat terlihat secara langsung dengan elektroforesis jika hanya menggunakan sampel DNA *whole genome*. Oleh sebab itu, diperlukan untuk memperbanyak gen target dengan amplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Hasil dari amplifikasi menggunakan PCR adalah pita-pita gen yang terlihat saat tahapan elektroforesis.

Gen-gen yang telah terdeteksi pada tahapan elektroforesis akan diurutkan dengan metode *sequencing* Sanger. *Sequencing* dengan metode Sanger adalah metode pengurutan DNA yang melibatkan PCR dan elektroforesis. Metode *sequencing* Sanger didasarkan pada penggabungan acak terminator rantai dideoksinukleotida oleh DNA polimerase selama replikasi DNA *in vitro*. Gen-gen yang berhasil di-*sequencing* dengan metode Sanger akan berupa urutan-urutan (urutan) basa nukleotida. Seperti yang telah diketahui, basa nukleotida adalah penyandi dari asam amino. Sebanyak tiga basa nukleotida akan menyandi satu asam amino. Untuk mengetahui urutan asam amino, maka basa nukleotida perlu ditranslasikan. Translasi basa nukleotida ke asam amino dapat dilakukan menggunakan *software sequencing* seperti BioEdit. Untuk konfirmasi nama dan urutan basa nukleotida atau asam amino perlu dilakukan pencocokan dengan algoritma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Dengan BLAST, dapat diketahui homologi dari basa nukleotida dan asam amino dengan database yang ada di GenBank. Pencarian homologi antara basa nukleotida hasil *sequencing* dengan database yang ada di GenBank dapat dilakukan melalui BLAST nukleotida seperti penelitian yang dilakukan oleh Makhaola, *et al.* (2022). Sedangkan pencarian homologi antara asam amino hasil *sequencing* dengan database yang ada di GenBank dapat dilakukan melalui BLAST protein seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Zhang *et al.* (2022).

Umumnya, enzim adalah protein globular yang bekerja secara tunggal atau bersinergis dengan membentuk kompleks yang lebih besar. Karena enzim merupakan protein, maka penulis utamanya adalah asam amino. Asam amino pada enzim menentukan struktur enzim secara spesifik. Struktur enzim yang ditentukan oleh asam amino akan mempengaruhi aktivitas katalitik dari suatu enzim (Anfinsen *et al.*, 1973). Enzim dapat dibedakan berdasarkan dua kriteria, yaitu berdasarkan urutan asam aminonya, dan berdasarkan aktivitas enzimatisnya. Golongan enzim dapat diketahui secara spesifik dengan memanfaatkan *website NCBI conserved domain search*. Enzim memiliki sisi katalitik dan sisi pengikatan substrat. Gabungan dari sisi katalitik dan sisi pengikat substrat disebut dengan sisi aktif enzim. Sisi aktif enzim merupakan tempat terjadinya reaksi yang sebenarnya. Sisi aktif pada enzim memiliki satu

atau lebih residu asam amino untuk berikatan dengan substrat. Sedangkan fungsi dan struktur protein dapat ditemukan dengan bantuan website UniProt.

Agar transformasi strain bakteri GRAS yang mengandung gen-gen terkait biosintesis rhamnolipid dapat dilakukan, maka, pada penelitian ini akan dilakukan deteksi gen terkait biosintesis rhamnolipid (*rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR*) pada *P. aeruginosa* UA dengan metode PCR. Pada penelitian ini juga dilakukan sequencing basa nukleotida dan asam amino yang terkode dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA dengan metode Sanger. Untuk mengetahui kekhasan dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* serta asam amino pada *P. aeruginosa* UA, maka pada penelitian ini dilakukan pencarian homologi basa nukleotida gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* dengan database yang ada di GenBank. Pencarian homologi basa nukleotida dilakukan menggunakan BLAST nukleotida. Sedangkan pencarian homologi asam amino dilakukan menggunakan BLAST protein. Sebagai pelengkap, akan dilakukan pencarian golongan, fungsi, dan struktur dari enzim yang dikode oleh gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA dengan memanfaatkan website NCBI *conserved domain search* dan UniProt.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan, maka dapat diambil rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

- 1.2.1. Apakah *Pseudomonas aeruginosa* strain UA memiliki gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR*?
- 1.2.2. Berapakah homologi urutan basa nukleotida dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan basa nukleotida *P. aeruginosa* PAO1?
- 1.2.3. Berapakah homologi urutan asam amino yang terkode dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan asam amino *P. aeruginosa* PAO1?
- 1.2.4. Termasuk golongan apakah enzim hasil sintesis dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA?

- 1.2.5. Apakah produk enzim dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* *P. aeruginosa* UA memiliki sisi aktif fungsional?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah, didapatkan tujuan dari penelitian sebagai berikut:

- 1.3.1. Melakukan deteksi gen terkait biosintesis rhamnolipid (*rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR*) dari *P. aeruginosa* UA.
- 1.3.2. Menentukan homologi basa nukleotida dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* *P. aeruginosa* UA terhadap urutan basa nukleotida *P. aeruginosa* PAO1.
- 1.3.3. Menentukan pada homologi asam amino yang terkode dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan asam amino *P. aeruginosa* PAO1.
- 1.3.4. Melakukan analisis golongan enzim hasil sintesis dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* *P. aeruginosa* UA.
- 1.3.5. Melakukan analisis pada sisi aktif enzim hasil sintesis dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* *P. aeruginosa* UA.

1.4 Manfaat

Penelitian diharapkan memiliki manfaat untuk:

- 1.4.1. Memberikan informasi tentang keberadaan gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.
- 1.4.2. Memberikan informasi tentang besar homologi dari urutan basa nukleotida dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan basa nukleotida *P. aeruginosa* PAO1.
- 1.4.3. Memberikan informasi tentang besar homologi urutan asam amino yang terkode dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan asam amino *P. aeruginosa* PAO1.
- 1.4.4. Memberikan informasi tentang golongan enzim yang terkode dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.

- 1.4.5. Memberikan informasi tentang sisi aktif enzim yang terkode dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.

1.5 Asumsi

Berdasarkan pernyataan secara empiris dan teoritis pada penemuan, pengamatan, dan penelitian sebelumnya, maka pada penelitian kali ini dapat diasumsikan bahwa:

- 1.5.1. *Pseudomonas aeruginosa* strain UA mengandung gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* yang terkait dengan biosintesis rhamnolipid.
- 1.5.2. Berdasarkan hasil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-Nukleotida, dapat diketahui homologi dari basa nukleotida gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* *P. aeruginosa* UA terhadap urutan basa nukleotida yang ada *P. aeruginosa* PAO1.
- 1.5.3. Berdasarkan hasil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-Protein, dapat diketahui homologi dari asam amino yang hasil sintesis dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan asam amino pada *P. aeruginosa* PAO1
- 1.5.4. Berdasarkan hasil analisis golongan enzim di NCBI *conserved domain search*, dapat diketahui golongan enzim yang terkode oleh gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.
- 1.5.5. Berdasarkan hasil analisis sisi aktif enzim di *website* UNIPROT, dapat diketahui sisi aktif enzim yang terkode oleh gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.

1.6 Hipotesis Penelitian

- 1.6.1. Jika *Pseudomonas aeruginosa* strain UA memiliki gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR*, maka akan terlihat pita-pita DNA yang berkaitan dengan gen-gen tersebut pada hasil visualisasi menggunakan metode elektroforesis.
- 1.6.2. Jika diketahui persen homologi dari urutan basa nukleotida gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan yang ada pada GenBank, maka akan diketahui kekhasan pada urutan basa nukleotida gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.

- 1.6.3. Jika diketahui persen homologi dari urutan asam amino hasil sintesis dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA terhadap urutan yang ada pada GenBank, maka akan diketahui kekhasan pada asam amino yang hasil sintesis gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.
- 1.6.4. Jika analisis dengan NCBI conserved domain search dapat dilakukan, maka dapat diketahui golongan enzim hasil produk gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.
- 1.6.5. Jika analisis menggunakan website UniProt dapat dilakukan, maka dapat diketahui residu asam amino yang merupakan sisi aktif enzim hasil sintesis dari gen *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*, dan *rhlR* pada *P. aeruginosa* UA.