

DISERTASI

**EKSPRESI DAN KARAKTERISASI FUSI GEN
MODUL PENGIKAT KARBOHIDRAT *CBM36*
DENGAN LAKASE *LCC2***



**ANITA KURNIATI
081617027317**

**PROGRAM STUDI S3 MIPA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

DISERTASI

**EKSPRESI DAN KARAKTERISASI FUSI GEN
MODUL PENGIKAT KARBOHIDRAT (*CBM36*)
DENGAN LAKASE (*LCC2*)**



**ANITA KURNIATI
081617027317**

**PROGRAM STUDI S3 MIPA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

HALAMAN PERNYATAAN TIDAK MELAKUKAN PLAGIASI

Bagian atau keseluruhan isi disertasi ini tidak pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademis pada bidang studi dan / atau universitas lain dan tidak pernah dipublikasikan atau ditulis oleh individu selain penyusun, kecuali bila dituliskan dengan format dalam isi disertasi.

Apabila ditemukan bukti bahwa pernyataan saya tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan yang berlaku di universitas airangga.

Surabaya, 24 Agustus 2022

Penulis



Anita Kurniati

NIM. 081617027317

LEMBAR PENGESAHAN

Naskah disertasi ini telah disetujui

Pada tanggal 18 November 2022

Oleh :

PROMOTOR



Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M. Si
NIP. 196306151987012001

KO-PROMOTOR I



Prof. Dr. Afaf Baktir, M. S
NIP. 195610141983032001

KO-PROMOTOR II



Drs. Ali Rohman, M. Si, Ph. D
NIP. 196808071994031003

Mengetahui,

DEKAN

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA



Prof. Dr. Moh Yasin, M.Si.
NIP. 196703121991021001

Halaman Panitia Ujian Tertutup naskah Disertasi

Disertasi ini telah diuji pada Ujian Tertutup

Tanggal : 24 Agustus 2022

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Mulyadi Tanjung, M.Si.

Anggota :

1. Prof. Dr. Ini Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si (Promotor)
2. Prof. Dr. Afaf Baktir, M. S (Ko-promotor I)
3. Ali Rohman, M.Si., Ph. D (Ko-promotr II)
4. Prof. Dr. Retna Apsari, M.Si
5. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S. Si., M. Sc
6. Dr. F. V. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si

Ditetapkan dengan Surat Keputusan Dekan

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Airlangga

Nomor :

DAFTAR ISI

Halaman sampul.....	i
Halaman sampul dalam.....	ii
Halaman pengesahan.....	iii
Halaman panitia ujian.....	iv
Daftar isi.....	v
Halaman prakata.....	viii
Daftar gambar.....	x
Daftar tabel.....	xii
Daftar lampiran.....	xiii
Daftar singkatan.....	xiv
Abstrak.....	xv
<i>Abstract</i>	xvi

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah.....	4
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.4 Manfaat penelitian.....	4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fusi gen.....	5
2.2 <i>Carbohydrate binding module</i>	6
2.3 Lakase.....	9
2.3.1 Tipe-tipe lakase.....	10
2.3.2 Reaksi lakase.....	11
2.3.3 Sistem mediator lakase.....	12
2.3.4 Mekanisme reduksi O ₂	12
2.3.5 Aplikasi enzim lakase.....	13
2.4 Vektor ekspresi.....	14
2.4.1 Vektor ekspresi pET32a.....	15
2.4.2 Vektor ekspresi pET28a.....	16
2.4.3 Vektor ekspresi pET30a.....	17
2.5 <i>Polymerase chain reaction</i>	17

Bab 3 HIPOTESIS DAN KERANGKA ILMIAH

3.1 Konsep ilmiah.....	19
3.2 Hipotesa penelitian.....	22

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis penelitian.....	23
4.2 Kerangka operasional penelitian.....	23
4.3 Tempat dan waktu penelitian.....	25
4.4 Bahan dan alat penelitian.....	25
4.4.1 Sampel penelitian.....	25
4.4.2 Bahan-bahan penelitian.....	25
4.5 Prosedur pengumpulan data.....	26
4.5.1 Peremajaan bakteri.....	26
4.5.2 Teknik DNA rekombinan.....	26
4.5.3 Ekspresi protein fusi CBM36-LCC2.....	33
4.5.4 Karakterisasi protein fusi CBM36-LCC2.....	33

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Konstruksi gen fusi <i>cbm36-lcc2</i>	36
5.2 Restriksi dan ligasi gen <i>cbm36-lcc2</i> dengan pET32a.....	40
5.3 Transformasi.....	42
5.4 Analisis sekuensing.....	44
5.5 Ekspresi dan produksi protein CBM36-LCC2.....	46
5.6 Uji aktivitas protein CBM36-LCC2 pET32a.....	49
5.7 Optimasi pH.....	52
5.8 Optimasi suhu.....	53
5.9 Stabilitas suhu.....	54
5.10 Stabilitas pH.....	55
5.11 <i>Novelty</i>	56
5.12 Interaksi antara CBM dan lakase.....	58

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan.....	60
6.2 Saran.....	60

DAFTAR PUSTAKA.....	61
---------------------	----

LAMPIRAN.....	65
DATA PRIBADI.....	87

HALAMAN PRAKATA

Segala puji syukur atas kehadiran Allah SWT, Tuhan semesta alam yang telah melimpahkan segala rahmat, taufik, hidayah, serta inayah-Nya. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang telah menuntun umatnya dari jaman kegelapan menuju jaman yang terang sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul **“Ekspresi dan Karakterisasi Fusi Gen Modul Pengikat Karbohidrat (*Cbm36*) Dengan Lakase (*Icc2*)”** dengan baik dan tepat waktu. Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan akademik untuk memperoleh gelar doktor pada Program S3 Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada beberapa pihak yang telah membantu dalam penyusunan Tugas Akhir diantaranya:

1. Rektor Universitas Airlangga yang telah membantu menyediakan fasilitas selama perkuliahan dan penelitian selama menjalani program S3.
2. Prof. Dr. Moh Yasin, M. Si. selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah membantu menyediakan fasilitas selama perkuliahan.
3. Dr. Dwi Winarni, M. Si selaku koordinator program studi yang telah membantu selama proses perkuliahan selama menjalani program S3.
4. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M. Si selaku promotor dan pembimbing akademik yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti program S3 MIPA Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga serta membantu penulis dalam menyediakan fasilitas dalam melaksanakan penelitian baik di Universitas Airlangga dan Universitas Mie, Jepang.
5. Prof. Afaf Baktir, M. S selaku ko-promotor 1 yang telah membantu dalam memberikan nasihat dan saran.
6. Dr. Ali Rohman, Ph. D selaku ko-promotor 2 yang telah membantu dalam memberikan nasihat dan saran.
7. Kepada staf laboratorium proteomik pusat riset rekayasa molekul hayati Universitas Airlangga yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian serta selalu memberikan dukungan.

8. Kepada teman-teman staf pengajar dan tenaga pendidikan di D4 Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Vokasi Universitas Airlangga yang telah memberikan dukungan selama proses penyelesaian disertasi ini.
9. Kepada staf administrasi S3 MIPA Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan selama proses perkuliahan.
10. Semua pihak yang terlibat dan membantu baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian disertasi ini

Surabaya, 24 Agustus 2022

Penulis

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Overlapping</i> PCR.....	6
Gambar 2.2 Struktur <i>carbohydrate binding module</i> dari sumber berbeda.....	8
Gambar 2.3 Model katalitik dari lakase dari <i>T. versicolor</i>	11
Gambar 2.4 Reaksi lakase.....	11
Gambar 2.5 Reaksi oksidasi lignin non fenolik.....	12
Gambar 2.6 Mekanisme reduksi O ₂	13
Gambar 2.7 Peta plasmid pET32a.....	15
Gambar 2.8 Peta plasmid pET28a.....	16
Gambar 2.9 Peta plasmid pET30a.....	17
Gambar 2.10 Prinsip dan tahap PCR.....	18
Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual penelitian.....	21
Gambar 4.1 Bagan kerangka operasional.....	24
Gambar 4.2 Tahap <i>overlapping</i> PCR.....	28
Gambar 4.3 Bagan prosedur teknik DNA rekombinan.....	32
Gambar 4.4 Bagan prosedur karakteristik protein CBM36-LCC2.....	35
Gambar 5.1 Skema ikatan pada DNA.....	38
Gambar 5.2 Elektroforesis DNA pET32a dan <i>overlapping</i> DNA.....	39
Gambar 5.3 Elektroforesis hasil purifikasi DNA.....	40
Gambar 5.4 Peta restriksi pET32a.....	41
Gambar 5.5 Hasil transformasi.....	42
Gambar 5.6 Amplifikasi koloni transformasi.....	43
Gambar 5.7 Hasil pemotongan DNA.....	44
Gambar 5.8 Hasil sekuensing.....	45
Gambar 5.9 Peta plasmid <i>cbm36-lcc2</i> dalam pET32a.....	46
Gambar 5.10 Ekspresi protein.....	48
Gambar 5.11 Optimasi pH.....	52
Gambar 5.12 Optimasi suhu.....	53
Gambar 5.13 Stabilitas suhu.....	54
Gambar 5.14 Stabilitas pH.....	55
Gambar 5.15 Paten merek.....	57

Gambar 5.16 Permohonan paten.....	58
Gambar 5.17 Mekanisme enzim (CBM36-LCC2) dalam mendegradasi lignin.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Komposisi reagen PCR tahap 1.....	37
Tabel 5.2 Kondisi PCR tahap 1.....	37
Tabel 5.3 Komposisi reagen PCR tahap 2.....	38
Tabel 5.4 Kondisi PCR tahap 2.....	38
Tabel 5.5 Komposisi reagen PCR tahap 3.....	39
Tabel 5.6 Kondisi PCR tahap 3.....	39
Tabel 5.7 Proses restriksi.....	41
Tabel 5.8 Perbandingan peningkatan aktivitas enzim setelah fusi dengan CBM.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil sekuensing fusi gen <i>cbm36-lcc2</i>	62
Lampiran 2. Perhitungan uji aktivitas lakase CBM36-LCC2.....	66
Lampiran 3. Perhitungan optimasi suhu.....	68
Lampiran 4. Perhitungan optimasi pH.....	69
Lampiran 5. Perhitungan stabilitas suhu.....	70
Lampiran 6. Perhitungan stabilitas pH.....	71
Lampiran 7 Publikasi jurnal.....	75

DAFTAR SINGKATAN

CBM	: <i>Carbohydrate binding module</i>
CM	: <i>Catalytic module</i>
LCC2	: <i>Laccase</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
GH	: <i>Glikosida hidrolase</i>
CAZy	: <i>Carbohydrate active enzyme database</i>
MCOs	: <i>Multiplecopper oxidase</i>
Cys	: <i>Cystein</i>
WT	: <i>Wild type</i>
EPR	: <i>Electronic paramagnetic resonance</i>
PI	: <i>Peroxidase intermediate</i>
NI	: <i>Native intermediate</i>
RO	: <i>Resting oxidized</i>
PAHs	: <i>Poliaromatik hidrokarbon</i>
TPS	: <i>Trombin protease</i>
MCS	: <i>Multiple cloning site</i>
A	: <i>Adenin</i>
T	: <i>Timin</i>
G	: <i>Guanin</i>
C	: <i>Sitosin</i>
SDS PAGE	: <i>Sodium dodecyl sulfate polyachrylamide gel electrophoresis</i>
IU	: <i>Internasional unit</i>
ABTS	: <i>Asam 2,2-azinobis-di-(2-ethylbenztiazolinesulfonat)</i>
F	: <i>Forward</i>
R	: <i>Reverse</i>
IPTG	: <i>Isopropil β-D-1-tiogalaktopiranosida</i>

ABSTRAK

Pengembangan *green* teknologi dapat dilakukan dengan penggunaan enzim. Salah satu contoh penggunaan enzim adalah pada proses *biobleaching*. Enzim lakase berperan dalam proses degradasi lignoselulosa. Lakase merupakan enzim yang dapat menghilangkan lignin pada proses *pulping* di industri *pulp* dan kertas. Selama ini industri *pulp* dan kertas menggunakan metode konvensional dalam menghilangkan lignin. Salah satu contoh bahan kimia yang digunakan untuk menghilangkan lignin adalah klorin. Penggunaan klorin menjadikan biaya proses lebih mahal dan tidak ramah lingkungan. Lakase juga digunakan untuk mendelignifikasi sisa lignin setelah proses *pulping*. Dalam industri pulp dan kertas perlu adanya pengembangan dengan meningkatkan efisiensinya dalam menghidrolisis lignoselulosa, sehingga akses enzim ke dinding sel polisakarida juga akan meningkat. Salah satu caranya adalah dengan menambahkan modular pengikat karbohidrat atau CBM (*carbohydrate binding module*). *Carbohydrate binding module 36* (CBM36) adalah merupakan modul non katalitik yang menjadi bagian enzim β -D-xilosidase GbtXyl43B. Pada penelitian ini dilakukan fusi gen penyandi *cbm36* β -D-xilosidase (GbtXy43B) dengan gen penyandi lakase *lcc2* dari *Pleurotus salmoneostramineus*, karakteristik protein fusi CBM36-LCC2 yang diekspresikan di *E. coli* serta menentukan aktivitas lakase LCC2 sebelum dan setelah difusikan dengan CBM36. Fusi dilakukan dengan metode amplifikasi menggunakan *overlapping*, kemudian gen fusi dikloning dan diekspresikan di pET32a dan dianalisis sifat-sifat biokimianya diantaranya massa molekul, pH optimal, suhu optimal, stabilitas pH dan termostabilitas. Aktivitas enzim lakase LCC2 ditentukan dengan menggunakan substrat 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS). Fusi gen penyandi *cbm36* β -D-xilosidase (GbtXy43B) dengan gen penyandi lakase *lcc2* dari *Pleurotus salmoneostramineus* telah berhasil dilakukan dengan ukuran gen *cbm36lcc2* 7907 bp. Analisis prorein didapatkan berat molekul protein CBM36-LCC2 sebesar 73 kDa. Aktivitas enzim lakase setelah fusi (CBM36-LCC2) mengalami peningkatan dengan aktivitas sebesar 44,2778 U/mL dibandingkan dengan enzim lakase sebelum fusi (LCC2) sebesar 24,9444 U/mL. Enzim lakase CBM36-LCC2 mempunyai pH optimal 6 dan suhu optimal 60°C. Enzim ini juga stabil pada pH 5 – 7 dan stabil pada suhu 60°C selama 125 menit. Enzim lakase CBM36-LCC2 stabil selama 125 menit dan pada pH 5 – 7.

Kata kunci : *Carbohydrate Binding module 36*, Lakase, *Pleurotus salmoneostramineus*, β -D-xilosidase (GbtXy43B)

ABSTRACT

*Research on the biobleaching and pulping industry has been developing in recent years. One of the enzymes is the laccase. Laccase degrades and removes lignin in the pulping process, it is also used to delignify lignin residue after the pulping process. Degradation of lignin used a conventional method in pulping and paper industry, using chlorine as a reagent. Chlorine can damage the environment and need high cost. Increasing efficiency of laccase in hydrolyzing lignocellulose is necessary to increase the access of enzymes to the polysaccharide cell wall. One way is to add a carbohydrate-binding module or CBM (carbohydrate-binding module) to the laccase enzyme to increase its biocatalyst properties. The gene encoding β -D-xylosidase (GbtXy43B) from the xylanolytic gene group from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 has been successfully expressed, purified, and characterized, in addition, it was also found that the GbtXyl43B protein contains carbohydrate-Binding module 36 (CBM36). In this study, the fusion of the gene encoding cbm36 β -D-xylosidase (GbtXy43B) with the gene encoding the laccase lcc2 from *Pleurotus salmoneostramineus* was carried out. Characteristics of the cbm36-lcc2 fusion protein is expressed in *E. coli* and determined the activity of laccase LCC2 before and after fusion with cbmCBM36. Fusion was performed by amplification using the overlapping method, then the fusion gene was cloned and expressed in pET32a. Molecular weight analysis was performed using SDS PAGE. The activity of the LCC2 laccase enzyme was determined using the ABTS method. The fusion of the gene encoding cbm β -D-xylosidase (GbtXy43B) with the gene encoding the laccase lcc2 from *Pleurotus salmoneostramineus* has been successfully carried out with a gene size of cbm36-lcc2 7907 bp. Protein analysis showed that the molecular weight of the protein CBM36-LCC2 was 73 kDa. The activity of the laccase enzyme after fusion increased with an activity of 44.2778 U/mL compared to the laccase enzyme before fusion of 24.9444 U/mL. The optimum pH of laccase enzyme cbm36lcc2 is 6 and an optimum temperature of is 60°C. This enzyme is also stable at pH 5-7 and at 60°C for 125 minutes.*

Key words: Carbohydrate Binding module 36, Laccase, *Pleurotus salmoneostramineus*, β -D-xylosidase (GbtXy43B)