

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Saat ini perkembangan bidang bioteknologi semakin meningkat. Peran bioteknologi telah memberikan dampak yang sangat besar terhadap bidang pertanian, kesehatan, lingkungan, ekonomi dan lain-lain. Salah satu yang berkembang pesat adalah teknologi enzim (Singh dan Arya, 2019). Enzim memegang peranan penting dalam industri diantaranya industri makanan dan minuman, industri tekstil, industri kulit, industri kertas, industri peternakan, industri pertanian dan lain-lain (Naik *et al.*, 2022). Industri delignifikasi *pulp* dan kertas sedang meningkat pesat di seluruh dunia. Pada proses delignifikasi baik tradisional maupun konvensional membutuhkan sejumlah besar bahan kimia. Hal tersebut menyebabkan metode ini menjadi sangat mahal, merusak lingkungan, dan juga meningkatkan jumlah bahan kimia di lingkungan. Dalam hal ini, penggunaan enzim dapat mengurangi penggunaan bahan kimia dan juga akan menurunkan biaya proses delignifikasi serta mengurangi dampak kerusakan lingkungan. Enzim lakase memainkan peranan penting dalam industri kertas *pulp* terutama untuk delignifikasi *pulp*. Dalam industri *pulp* dan kertas, penggunaan enzim dalam jumlah besar berbanding lurus dengan biaya yang dikeluarkan (Singh dan Arya, 2019). Oleh karena perlu adanya modifikasi enzim lakase untuk meningkatkan efisiensinya dalam menghidrolisis lignoselulosa, sehingga akses enzim ke dinding sel polisakarida juga akan meningkat (Liu *et al.*, 2022).

Lakase merupakan enzim polifenol oksidase yang mempunyai atom-atom tembaga pada pusat katalitiknya sehingga lakase biasa disebut sebagai famili *multicopper* oksidase. Enzim lakase merupakan protein yang mempunyai berat molekul sekitar 70 kDa, dimana enzim ini juga mengandung logam tembaga yang berfungsi sebagai katalis biologi dalam reaksi oksidasi. Enzim lakase mempunyai kemampuan dalam mengkatalisis reaksi oksidasi dari berbagai jenis substrat-substrat organik dan anorganik diantaranya mono, di-, dan polifenol, amino fenol, metoksi fenol, amina aromatis dan askorbat yang diikuti dengan reaksi reduksi 4 atom elektron dari oksigen menjadi air

(Stanzione *et al.*, 2020). Lakase secara umum banyak terdapat pada tanaman, jamur, serangga dan bakteri. Berdasarkan data-data penelitian, ada ratusan enzim lakase yang sudah diisolasi dan dikarakterisasi. Hampir sebagian besar enzim lakase yang sudah dikarakterisasi berasal dari jamur khususnya *white rot basidiomycetes*, *Ascomycetes*, *Deuteuromycetes* sedangkan enzim lakase yang berasal dari tanaman jarang sekali dipelajari. Berbeda dengan enzim lakase yang berasal dari jamur, hanya sedikit enzim-enzim lakase yang berasal dari bakteri yang sudah dipelajari meskipun peningkatan penelitian tentang analisis genom menunjukkan bahwa enzim-enzim lakase juga tersebar luas di bakteri (Stanzione *et al.*, 2020). Enzim-enzim lakase yang berasal dari bakteri lebih memiliki banyak keunggulan dibandingkan dengan enzim-enzim lakase yang berasal dari jamur jika diaplikasikan dalam industri dimana enzim-enzim yang berasal dari bakteri lebih aktif, lebih stabil pada suhu dan pH tinggi (Illuri *et al.*, 2021). Enzim lakase merupakan enzim yang sangat penting karena enzim ini dapat mengoksidasi substrat toksik dan non toksik. Karena kemampuannya tersebut menjadikan lakase sebagai enzim yang paling menjanjikan untuk industri diantaranya industri kertas, nanoteknologi, industri kesehatan, bioremediasi limbah industri makanan dan lain-lain.

Peran enzim lakase pada industri kertas adalah sebagai agen *biobleaching pulp* terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Pada proses *pulping* 90% lignin yang tidak terlarut akan terlarut dan dihilangkan pada proses ini sedangkan lignin yang tertinggal akan menyebabkan *pulp* menjadi berwarna dan harus dihilangkan pada proses *biobleaching*. Proses *biobleaching* menggunakan metode konvensional masih menggunakan bahan kimia yang berbasis klorin tetapi penggunaan klorin memiliki dampak buruk yaitu dapat mendegradasi selulosa dan juga memberikan produk samping yang berbahaya (Singh & Arya, 2019). Beberapa tahun terakhir penelitian tentang penggunaan enzim pada proses *biobleaching* sangat berkembang. Salah satu enzim yang digunakan adalah enzim lakase. Lakase mendegradasi dan menghilangkan lignin pada proses *pulping*, lakase juga digunakan untuk mendelignifikasi sisa lignin setelah proses *pulping* (Viswanath *et al.*, 2014). Enzim lakase memainkan peran penting dalam industri kertas *pulp* terutama untuk delignifikasi *pulp*. 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*)

pada enzim lakase untuk meningkatkan sifat biokatalisnya (Liu *et al.*, 2022). Penelitian yang dilakukan oleh Miao *et al* (2022) tentang fusi CBM dengan endoglukanase dapat meningkatkan aktivitas hidrolisisnya terhadap substrat larut xilan. Penelitian tentang fusi CBM family 1b dari *Aspergillus niger* dengan lakase dari *Pycnoporus cinnabarinus* juga telah dilakukan oleh Ravalason *et al* (2009) dan menunjukkan hasil bahwa terjadi peningkatan kemampuan delignifikasi dari enzim terhadap pulp softwood kraft dengan bantuan mediator.

Carbohydrate Binding Module merupakan domain paling umum yang terdapat pada kompleks enzim hemiselulase (Yang *et al.*, 2018). *Carbohydrate Binding Module* adalah modul non katalik pengikat substrat diturunkan dari Glikosida hidrolase. *Carbohydrate Binding Module* merupakan sisi non katalitik modul yang mengenali dan mengikat karbohidrat. *Carbohydrate Binding Module* dapat meningkatkan aktivitas hidrolitik dari enzim hidrolase terhadap substrat yang tidak terlarut dengan meningkatkan konsentrasi enzim pada permukaan substrat (Cheng *et al.*, 2016).

Gen penyandi enzim xilanolitik dari bakteri termofilik *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 telah berhasil diisolasi dari kawah Gunung Pancar, Bogor, Jawa Barat, Indonesia, dengan melalui proses *shotgun cloning* ke dalam *pBluescript* dan dinamakan pTP510 dalam *E. coli* DH5 α . Gen klaster yang tersisipkan dalam pTP510 mempunyai panjang 8444 bp nukleotida yang mengandung lima gen, yaitu transposase, ABC permease, gen penyandi enzim β -D-xilosidase (GbtXyl43B, GenBank No. DQ387047), gen penyandi enzim β -D-xilosidase kedua (GbtXyl43A, GenBank No. DQ345777), dan gen penyandi α -L-arabinofuranosidase (abfa51, GenBank No. DQ387046) (Puspaningsih, 2004). Gen penyandi β -D-xilosidase (GbtXy43B) dari kelompok gen xilanolitik asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 telah berhasil diekspresikan, dimurnikan dan dikarakterisasi (Ratnadewi, 2013). Selain itu ditemukan juga bahwa Protein GbtXyl43B mengandung 2 domain yaitu *Carbohydrate Binding module* 36 (cbm36) (residu asam amino 15–149) dan *Catalytic Domain* (CM) (Ratnadewi., 2013).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan fusi gen penyandi *cbm36* *GbtXyl43B* dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dengan gen penyandi lakase *lcc2* dari *Pleurotus salmoneostramineus*. Dengan adanya fusi ini diharapkan *cbm36*

GbtXyl43B mampu meningkatkan aktivitas enzim lakase LCC2 dalam mendegradasi lignin pada proses delignifikasi dalam industri pulp dan kertas.

1.2 Rumusan masalah

1. Apakah gen penyandi *Carbohydrate Binding Module 36 (cbm36)* dari GbtXyl43B dapat difusikan dengan gen penyandi *lcc2* dari *Pleurotus salmoneostramineus*?
2. Bagaimanakah karakteristik biokimia protein fusi CBM36-LCC2 yang diekspresikan di *E. coli kodon plus*?
3. Bagaimanakah aktivitas LCC2 sebelum dan setelah difusikan dengan CBM36?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan enzim chimera dari hasil fusi gen *Carbohydrate Binding Module 36 (cbm36)* dari GbtXyl43B dan gen *lcc2* dari *Pleurotus salmoneostramineus*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Memfusikan gen penyandi *Carbohydrate Binding Module 36 (cbm36)* dari GbyXyl43B dan gen penyandi lakase (*lcc2*) dari *Pleurotus salmoneostramineus*.
2. Mengukur aktivitas enzim LCC2 sebelum dan setelah difusikan dengan CBM36.
3. Mengidentifikasi sifat-sifat biokimia protein fusi CBM36-LCC2.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat keilmuan

Enzim chimere CBM36-LCC2 merupakan inovasi pengembangan keilmuan di bidang *biocatalysis engineering*.

1.4.2 Manfaat praktis

Fusi gen penyandi *cbm36-GbtXyl43B* dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dengan gen penyandi lakase *lcc2* dari *Pleurotus salmoneostramineus* dapat membantu efisiensi kerja lakase sehingga dapat meningkatkan aplikasi enzim lakase pada industri khususnya industri kertas.