

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Indonesia adalah negara agraris yang kaya akan sumber daya alam, diantaranya adalah pertanian, perkebunan, perikanan, peternakan, dan kehutanan. Bidang industri pertanian di Indonesia telah mengalami kemajuan yang pesat, namun hal itu juga diiringi dengan peningkatan limbah pertanian. Limbah pertanian tersebut saat ini belum dimanfaatkan secara optimal, walaupun di dalamnya terkandung lignoselulosa yang tinggi. Lignoselulosa kaya akan xilan yang dapat dimanfaatkan dalam berbagai proses bioteknologi seperti proses pemutihan pulp kertas, produksi bioethanol, dan sintesis oligosakarida untuk industri makanan (Quintero *et al*, 2007).

Komposisi biomassa lignoselulosa bervariasi tergantung pada spesies tanamannya. Komposisi utama lignoselulosa berupa selulosa (35-50%), hemiselulosa (20-35%) dan lignin (10-25%) (Campos *et al*, 2013). Xilan merupakan hemiselulosa utama dari biomassa yang mengandung lignoselulosa. Xilan adalah polisakarida kompleks yang tersusun atas β -1,4-xilopiranosida dengan gugus samping tersusun atas rantai asetil, glukuronosil, dan arabinosil (Shi *et al*, 2013). Hidrolisis sempurna xilan dilakukan oleh kelompok xilanase (enzim xilanolitik) secara sinergis (Puspaningsih *et al*, 2007). Beberapa enzim terlibat dalam hidrolisis tulang punggung xilan, misalnya endo- β -xilanase (EC 3.2.1.8) untuk menghidrolisis xilan menjadi xilobiosa dan xilooligosakarida, β -xilosidase (EC 3.2.1.37) menghidrolisis xilooligosakarida menjadi xilosa, sedangkan enzim yang dapat menghidrolisis rantai samping pada tulang punggung xilan adalah α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), asetil xilan esterase (EC 3.1.1.72), feruloyl esterase (EC 3.1.1.73) dan α -glukuronidase (EC 3.2.1.39) (Gruninger *et al*, 2013).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan Puspaningsih (2004) telah berhasil mengidentifikasi dan mengkloning gen penyandi enzim xilanolitik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. Gen klaster yang terisolasi mengandung 5 gen, meliputi gen transposase, ABC permease, GbtXyl43A (β -D-xylosidase gene,

xyl43A Gen Bank No. DQ345777), arabinofuranosidase (abfa51 GenBank No. DQ387046) dan ekso-xilanase *putative* (GenBank No. DQ387047). Gen α -L-arabinofuranosidase dan β -D-xilosidase dari kelompok gen xilanolitik *G. thermoleovorans* IT-08 telah berhasil di *clone* dan diekspresikan.

Enzim yang menunjukkan aktivitas β -xilosidase dikategorikan ke dalam delapan famili GH (Glikosida Hidrolase) yang berbeda sebagai berikut: 3, 30, 39, 43, 52, 54, 116 dan 120 (Rasmussen *et al*, 2012). Glikosida Hidrolase adalah sekelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis ikatan glikosidik antara dua atau lebih karbohidrat atau antara karbohidrat dan non karbohidrat (Brux *et al*, 2006). Enzim-enzim dalam kelompok ini memiliki struktur tiga dimensi yang terdiri dari dua modul, yaitu modul katalitik (*Catalytic Module*, CM) yang berupa lima bilah baling-baling β (*five bladed β -propeller*) dan modul pengikat karbohidrat (*Carbohydrate Binding Module*, CBM) yang disusun oleh struktur apitan beta (*β -sandwich*) (Ratnadewi, *et al*, 2013). Penelitian mengenai Glikosida Hidrolase meningkat karena aplikasinya dalam bidang industri, misalnya bio-bleaching pulp pada industri kertas, pengolahan buah dan sayuran, produksi anggur, penambahan zat aditif pada pakan ternak, produksi bioetanol dan peningkatan mutu tepung pada industri roti (Eneyskaya *et al*, 2006).

Enzim β -xylosidase terdapat pada bakteri, ragi, alga, protozoa (Quintero *et al*, 2007). β -xilosidase digolongkan ke dalam eksoglikosidase yang membebaskan monomer xilosa dari ujung xilooligosakarida dan xilobiosa (Wagschal *et al*, 2005). Karakterisasi enzim β -xilosidase telah banyak dilakukan pada *Selenomonas ruminantium* (Jordan *et al*, 2007), bakteri termofilik *Geobacillus pallidus* (Quintero *et al*, 2007), *Bacillus halodurans* (Wagschal *et al*, 2011), jamur *Penicillium purpurogenum* (Ravanal *et al*, 2013). Karakterisasi terhadap β -xilosidase dilakukan untuk mengetahui kemampuannya mendegradasi hemiselulosa. Karakterisasi tersebut meliputi aktivitas enzim pada pH dan suhu optimum, kestabilan pH dan suhu, parameter kinetika (K_M dan k_{cat}), serta pengaruh mutasi beberapa residu asam aminonya.

Pengaruh mutasi pada residu asam amino kelompok enzim GH telah diamati pada beberapa penelitian. Mutasi residu asam amino Triptofan145 dari

Selenomonas ruminantium menjadi beberapa asam amino lain secara umum menyebabkan parameter kinetika (k_{cat} , K_M) meningkat dibandingkan dengan tipe alaminya (Jordan *et al*, 2011). Pada *Bacillus halodurans* C-125, mutasi gen Triptofan147 menjadi Glysin menyebabkan parameter kinetika varian hasil mutasi meningkat dibandingkan dengan tipe alaminya (Wagschal *et al*, 2012). Mutasi residu asam amino Tyrosin509 menjadi Glutamat dari *Geobacillus stearothermophilus* menyebabkan nilai K_M varian hasil mutasi lebih besar dari tipe alaminya, namun nilai k_{cat} dan nilai k_{cat}/K_M varian hasil mutasi lebih kecil jika dibandingkan dengan tipe alaminya (Huang *et al*, 2013). Ketiga penelitian tersebut menunjukkan perubahan parameter kinetika enzim keluarga GH setelah dilakukan mutasi pada salah satu residu asam aminonya.

Asam amino Asp121 dimutasi menjadi tiga asam amino lain, yaitu menjadi Glu, Asn dan Val. Mutasi Asp121 pada GbtXyl43A menyebabkan penurunan aktivitas enzim secara signifikan pada berbagai variasi pH dan suhu. Penurunan aktivitas pada ketiga GbtXyl43A varian menunjukkan perubahan konformasi yang disebabkan adanya mutasi tersebut. Dengan demikian, mutasi Asp menjadi Glu (D121E), Asn (D121N) dan Val (D121V) menyebabkan perubahan sifat GbtXyl43A. Jika dibandingkan dengan tipe alaminya, varian hasil mutasi memiliki aktivitas yang rendah pada suhu ruang. Aktivitas optimum GbtXyl43A tipe alami pada pH 6 sebesar $0,342 \text{ U mg}^{-1}$, pada suhu 50°C $0,338 \text{ U mg}^{-1}$. Aktivitas optimum varian D121E pada pH 6 sebesar $0,007 \text{ U mg}^{-1}$, pada suhu 90°C $0,016 \text{ U mg}^{-1}$; varian D121V memiliki aktivitas optimum pada pH 9 sebesar $0,013 \text{ U mg}^{-1}$, pada suhu 90°C $0,042 \text{ U mg}^{-1}$; sedangkan varian D121N memiliki aktivitas optimum pada pH 9 sebesar $0,019 \text{ U mg}^{-1}$, pada suhu 90°C $0,045 \text{ U mg}^{-1}$. Varian D121N memiliki aktivitas paling tinggi dibandingkan dengan varian D121E maupun D121V, oleh karena itu pada penelitian ini hanya digunakan varian D121N saja.

Berdasarkan uraian-uraian yang diatas, diduga penyebab turunnya aktivitas enzim GbtXyl43A varian D121N karena perbedaan nilai parameter kinetika enzim varian D121N tersebut dengan GbtXyl43A tipe alami. Penentuan parameter kinetika enzim GbtXyl43A perlu dilakukan karena perubahan sifat

enzim setelah dimutasi. GbtXyl43A varian D121N memiliki aktivitas optimum pada pH 9 (basa) dan pada suhu 90°C, hal ini menandakan bahwa varian D121N lebih tahan pada kondisi lingkungan yang ekstrem. Turunnya aktivitas enzim GbtXyl43A varian D121N mungkin disebabkan berubahnya konformasi enzim mengakibatkan daya afinitas enzim terhadap substrat berkurang. Oleh karena itu, perlu dilakukan karakterisasi lanjutan dari GbtXyl43A tipe alami dengan menentukan parameter kinetika enzim yang meliputi V_{max} , K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M . Karakterisasi lanjutan dari GbtXyl43A varian D121N dilakukan dengan menentukan nilai V_{max} dan K_M .

Pada penelitian ini akan dilakukan karakterisasi lanjutan dari GbtXyl43A tipe alami dan varian D121N dengan menentukan parameter kinetika enzim yang meliputi k_{cat} , K_M , k_{cat}/K_M . Parameter-parameter tersebut mengindikasikan mekanisme katalitik dari enzim GbtXyl43A.

1.2. Rumusan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah karakteristik kinetika (K_M , V_{max} , k_{cat} dan k_{cat}/K_M) β -xilosidase GbtXyl43A tipe alami?
2. Bagaimanakah karakteristik kinetika (K_M dan V_{max}) β -xilosidase GbtXyl43A varian D121N?
3. Apakah mutasi Asp121 pada GbtXyl43A mempengaruhi karakteristik kinetika enzim GbtXyl43A?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Menentukan karakteristik kinetika (K_M , V_{max} , k_{cat} dan k_{cat}/K_M) β -xilosidase GbtXyl43A tipe alami.
2. Menentukan karakteristik kinetika (K_M dan V_{max}) β -xilosidase GbtXyl43A varian D121N.
3. Menentukan pengaruh mutasi pada GbtXyl43A terhadap karakteristik kinetika enzim GbtXyl43A.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat keilmuan

Hasil penelitian ini akan memberikan informasi karakteristik kinetika β -xilosidase GbtXyl43A rekombinan dan varian D121N dari *G. thermoleovorans* yang dapat digunakan untuk menentukan spesifisitas enzim.

1.4.2. Manfaat praktis

Pengetahuan baru mengenai karakteristik kinetika β -xilosidase GbtXyl43A dapat membantu penelitian selanjutnya untuk merancang enzim yang bersifat ekstrem namun masih memiliki aktivitas katalitik yang cukup tinggi. Hal ini dapat dimanfaatkan untuk aplikasi industri ramah lingkungan.

