

BAB. I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Inulin merupakan senyawa yang sangat potensial untuk dikembangkan. Potensi utama inulin adalah dapat dijadikan fruktosa dan *fructo-oligosaccharides* (FOS) (Ricca *et al.*, 2007; Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2006). Fruktosa dan FOS merupakan senyawa yang sangat penting pada industri makanan, minuman, dan farmasi (Tohamy, 2006; Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007; Singh, 2006).

Fruktosa merupakan pemanis alternatif alami yang aman dibanding sukrosa karena mempunyai efek yang bermanfaat pada pasien diabetes, menaikkan penyerapan zat besi pada anak-anak dan mempunyai kapasitas manis yang lebih tinggi (Singh, 2006). Sebaliknya sukrosa diketahui menyebabkan penyakit yang berhubungan dengan *corpulence*, *cariogenecity*, *artherosclerosis* dan diabetes (Ricca *et al.*, 2007). FOS adalah *ingredient* yang penting pada industri makanan dan farmasi (Singh, 2006). FOS dipandang sebagai *functional food* karena mempunyai pengaruh positif terhadap komposisi mikroflora usus manusia (Roberfroid *et al.*, 1998; Kaplan, 2003).

Pembuatan fruktosa dari inulin jauh lebih efektif dan efisien dibandingkan dari pati. Pembuatan fruktosa dari pati melibatkan tiga enzim, yaitu amilolisis pati dengan katalis α -amilase dan amiloglukosidase, diikuti dengan pengubahan glukosa ke fruktosa yang dikatalisis oleh glukosa isomerase. Proses ini menghasilkan maksimal hanya sekitar 42% fruktosa, sisanya 50% glukosa dan 8% oligosakarida (Zittan, 1981). Teknik *ion exchange* telah dikembangkan untuk memperkaya fruktosa, tetapi hanya menambah ongkos produksi. Oleh sebab itu, enzim yang terlibat pada reaksi hidrolisis inulin adalah pilihan yang paling tepat. Enzim tersebut adalah inulinase dan levanase.

Sejauh ini diketahui bahwa inulinase dan levanase aktif pada substrat inulin dan levan. Inulinase dari *Bacillus polymyxa* dapat menghidrolisis sukrosa, levan, raffinosa and inulin (Kwon *et al.*, 2003). Exoinulinase dari *Aspergillus awamori* dapat menghidrolisis inulin dan levan melalui aksi *exo-* melepaskan fruktosa (Arand *et al.*, 2002). Levanase dari *Bacillus subtilis* yang diekspresikan dalam *Escherichia coli* aktif pada levan, inulin and sukrosa (Wanker *et al.*, 1995), sementara exolevanase dari *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 dapat menghidrolisis levan, inulin, dan sukrosa (Menendez *et al.*, 2002).

Aksi endo- atau exo- dari levanase dan inulinase pada inulin menghasilkan produk yang berbeda. Produksi fruktosa dari inulin dapat digunakan exoinulinase atau exolevanase, sedangkan untuk memperoleh FOS dari inulin digunakan endoinulinase atau endolevanase. Kombinasi endo- dan exo- mempunyai efek sinergik yang kuat untuk menghasilkan fruktosa dari inulin (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007).

Mikroorganisme yang mengekspresikan inulinase dan levanase mempunyai aplikasi yang potensial untuk transformasi inulin ke fruktosa atau prebiotik FOS. Enzim ini dapat berasal dari fungi, ragi dan bakteri. Salah satu keunggulan bakteri adalah dapat ditemui hidup pada suhu tinggi yang dikelompokkan sebagai bakteri termofilik dan bakteri hipertermofilik. Bakteri termofilik tumbuh optimal pada suhu 50-80°C, sedangkan bakteri hipertermofilik tumbuh optimal pada suhu 80-110°C (Vieille, 2001).

Kelompok bakteri termofilik yang mengekspresikan inulinase atau levanase termostabil merupakan pilihan yang paling tepat sebagai katalis reaksi hidrolisis inulin untuk memperoleh fruktosa dan prebiotik FOS. Hal ini karena inulin lebih larut dalam air pada suhu di atas 50°C (Phelps, 1965). Keuntungan lain penggunaan bakteri ini adalah enzim yang diekspresikan lebih mudah dimurnikan karena perlakuan panas, bersifat termostabil sehingga resisten terhadap denaturasi. Selain itu, reaksi enzimatik pada suhu tinggi memungkinkan kelarutan substrat lebih besar, memperendah viskositas, memperkecil resiko kontaminasi dengan mikroorganisme lain dan kecepatan reaksi makin tinggi (Vieille, 2001).

Allais *et al.* (1987) telah mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofilik yang mempunyai aktivitas inulinase yang ternyata dimiliki oleh genus *Bacillus*. Kebanyakan bakteri termofilik termasuk genus *Bacillus* (Souza, 2001). Gao *et al.* (2008) menentukan urutan basa nukleotida sebagian gen 16S rRNA bakteri termofilik yang mengekspresikan termostabil endoinulinase yang ternyata diidentifikasi sebagai spesies *Bacillus smithii* T7.

Gen inulinase telah diisolasi dari DNA genomik ragi *Pichia guilliermondii* menggunakan metoda PCR. Gen ini mempunyai *Open Reading Frame* (ORF) 1542 pb yang mengkode 514 residu asam amino dari protein inulinase (Zhang *et al.*, 2009). Gen levanase telah diisolasi dari pustaka genom *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 dan diekspresikan pada *Escherichia coli* (Menendez *et al.*, 2002), sedangkan gen levanase dari *Bacillus subtilis* telah diekspresikan pada *Saccharomyces cerevisiae* (Martel *et al.*, 2011). Gen inulinase yang dimuat pada basis data *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI) sebanyak 26 macam, 15 diantaranya merupakan gen inulinase dari spesies bakteri yang berbeda dengan 6 endoinulinase bakteri dan 7 exoinulinase bakteri. Gen levanase bakteri yang dimuat pada basis data NCBI sebanyak 505 buah, hanya 2 yang telah teridentifikasi sebagai exolevanase dan 9 sebagai endolevanase (www.ncbi.nlm.nih.gov, pada 12 September 2012).

Informasi bakteri pendegradasi inulin yang berasal dari sumber air panas di Solok Sumatera Barat mulai dipelajari pada tahun 2009. Isolat bakteri yang berasal dari sumber air panas tersebut telah berhasil dikulturkan pada media yang mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon. Isolat bakteri tersebut telah diidentifikasi secara genotip dan fenotip (Azhar *et al.*, 2012, Azhar dkk, 2012).

1.2. Perumusan Masalah

Sumatera Barat mempunyai dua potensi alam yang dapat dikembangkan untuk pembuatan fruktosa dari inulin yaitu tanaman dahlia dan sumber air panas. Pada umbi tanaman dahlia terdapat inulin dalam jumlah besar. Kelarutan inulin dalam air lebih besar pada suhu air yang lebih tinggi. Oleh sebab itu, enzim pendegradasi inulin yaitu inulinase atau levanase termostabil paling tepat digunakan sebagai katalis reaksi hidrolisis inulin. Enzim ini dapat dihasilkan dari bakteri sumber air panas.

Inulinase dan levanase termasuk kelompok keluarga enzim *glicoside hydrolase* 32 (GH32). Keluarga enzim GH32 pada basis data *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZY) terdapat 1163 enzim dari bakteri, namun hanya 63 enzim yang telah dikarakterisasi (<http://www.cazy.org>, pada 27 November 2012). Enzim yang termasuk E.C 3.2.1.80 yang bersumber dari bakteri adalah 6 buah, sedangkan EC 3.2.1.65 yang bersumber dari bakteri adalah 8 buah. Pada basis data *Protein Data Bank* (PDB), terdapat exoinulinase dari *Aspergillus awamori* (Nagem *et al.*, 2004) dan endoinulinase dari *Aspergillus ficuum* (Pouyez *et al.*, 2012) yang telah diketahui struktur kristalnya, sedangkan exolevanase belum ditemukan (<http://www.rcsb.org/pdb>, pada 10 Januari 2013). Pada basis data NCBI tercatat 7 gen exoinulinase yang berasal dari spesies bakteri yang berbeda, dan 2 gen exolevanase yang berasal dari strain bakteri yang berbeda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pada 12 September 2012). Beberapa publikasi telah memuat bakteri termofilik pendegradasi inulin dari tanah, tetapi belum ditemui publikasi molekuler gen penyandi enzim pendegradasi inulin dari bakteri sumber air panas di Sumatera Barat.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah :

- 1) Menskrining dan mengidentifikasi isolat bakteri pendegradasi inulin dari sumber air panas Bukik Kili dan Padang Balimbiang di Solok Sumatera Barat
- 2) Menentukan karakteristik enzim ekstraseluler isolat bakteri UBCT-007 pada substrat inulin
- 3) Mencari gen penyandi enzim pendegradasi inulin pada isolat bakteri UBCT-007
- 4) Mengkaji model struktur tiga dimensi enzim pendegradasi inulin dari isolat bakteri UBCT-007 secara *in silico*

1.4. Ruang Lingkup Penelitian

Inulin merupakan fruktan yang melimpah di dataran tinggi Sumatera Barat. Oleh sebab itu, untuk analisis karakterisasi enzim ekstraseluler digunakan substrat inulin. Ruang lingkup penelitian dibatasi pada skrining dan identifikasi bakteri pendegradasi inulin dari sumber air panas Bukik Kili dan Padang Balimbiang di Solok Sumatera Barat, karakteristik enzim ekstraseluler pada substrat inulin serta kloning gen dan modeling tiga dimensi enzim pendegradasi inulin dari isolat bakteri UBCT-007. Skrining bakteri pendegradasi inulin dilakukan pada media yang mengandung inulin atau inulin-*Remazol Brilliant Blue* (inulin-RBB) sebagai satu-satunya sumber karbon. Identifikasi bakteri dilakukan secara genotip dan fenotip. Karakteristik enzim ekstraseluler pada substrat inulin yang diteliti meliputi aktivitas enzim pada variasi pH dan suhu, aktivitas enzim pada butir inulin, tipe *action mode* enzim dan penentuan massa molekul enzim. Gen penyandi enzim pendegradasi inulin diisolasi dengan metoda PCR. Pemodelan struktur enzim dilakukan menggunakan program PHYRE.

1.5. Hipotesis

Bakteri yang berasal dari suatu sumber air panas mensintesis enzim pendegradasi inulin dengan urutan residu asam amino yang unik. Dengan demikian urutan basa nukleotida gen yang menyandi enzim pendegradasi inulin bakteri tersebut berbeda dengan urutan basa nukleotida gen penyandi yang telah diketahui.

1.6. Asumsi Penelitian

Urutan basa nukleotida suatu gen dari bakteri dapat dipengaruhi oleh karakteristik lingkungan di mana bakteri itu hidup. Dengan demikian bakteri dengan lingkungan yang berbeda akan mempunyai gen dengan urutan basa nukleotida yang unik pula.

1.7. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian memberikan kontribusi terhadap khasanah ilmu biokimia khususnya biokimia pangan berbasis biologi molekuler dengan ilmu terapan bioteknologi modern. Kontribusi yang diberikan adalah ditemukan gen pendegradasi inulin yang unik dari bakteri sumber air panas, isolat lokal di Sumatera Barat.

1.8. Garis Besar Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam 4 tahap besar. Pada tahap ke-1, skrining dan identifikasi bakteri pendegradasi inulin. Skrining bakteri pendegradasi inulin dilakukan pada media yang mengandung inulin atau inulin-RBB sebagai satu-satunya sumber karbon. Inulin diekstraksi dari umbi tanaman dahlia. Inulin tersebut direaksikan dengan RBB membentuk inulin-RBB. Identifikasi bakteri dilakukan secara genotip dan fenotip. Identifikasi bakteri secara genotip berdasarkan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA. Identifikasi bakteri secara fenotip meliputi morfologi koloni, mikroskopik sel dan sifat-sifat fisiologi bakteri. Pada tahap ke-2 dilakukan karakterisasi enzim ekstraseluler pada substrat inulin yang meliputi aktivitas enzim pada variasi pH dan suhu, aktivitas enzim pada granula inulin dengan SEM, tipe *action mode* enzim pada substrat inulin menggunakan TLC, penentuan massa molekul enzim dengan SDS-PAGE.

Pada tahap ke-3 dilakukan pencarian gen yang menyandi enzim pendegradasi inulin. Pada tahap ini dilakukan perancangan beberapa primer degeneratif berdasarkan daerah lestari exoinulinase dan exolevanase bakteri yang dimuat pada basis data *GenBank*. Primer ini digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen penyandi enzim pendegradasi inulin menggunakan metoda PCR. Amplikon murni fragmen gen diklon pada vektor pGEM-T *Easy* dengan sel inang *E. coli* TOP10F'. DNA rekombinan dimurnikan dan dijadikan templat untuk menentukan urutan basa nukleotida fragmen gen tersebut. Gen utuh pengkode enzim ditemukan dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik yang dirancang berdasarkan fragmen gen yang telah ditemukan.

Pada tahap ke-4 dilakukan pemodelan struktur tiga dimensi enzim secara *in silico*. Urutan basa nukleotida gen pendegradasi inulin yang ditemukan pada isolat bakteri UBCT-007 diterjemahkan menjadi urutan residu asam amino. Urutan residu asam amino hasil deduksi tersebut dijadikan data masukan untuk pemodelan struktur tiga dimensi enzim menggunakan program PHYRE. Sebagai templat digunakan exoinulinase dari *Aspergillus awamori*.

1.9. Sistematika Disertasi

Disertasi terdiri dari lima Bab yaitu Bab I berisikan pendahuluan yang memberikan gambaran latar belakang penelitian, keunggulan enzim pendegradasi inulin yang berasal dari bakteri sumber air panas, perumusan masalah, tujuan penelitian, ruang lingkup penelitian, hipotesis, asumsi, manfaat penelitian dan garis besar pelaksanaan penelitian. Pada Bab II memuat kajian pengetahuan sampai saat ini yang berhubungan dengan judul disertasi yang meliputi inulin, mikroorganisme pendegradasi inulin, keluarga enzim GH32, inulinase dan levanase, definisi spesies pada bakteri secara molekuler, kloning dan sekuensing gen pendegradasi inulin. Pada Bab III berisikan metode-metode penelitian yang digunakan, meliputi ekstraksi inulin dan pembuatan inulin-RBB, skrining bakteri pendegradasi inulin, identifikasi bakteri, penentuan karakteristik enzim ekstraseluler pada substrat inulin dan isolasi gennya serta bioinformatika. Bab IV berisikan pembahasan tentang identitas isolat bakteri UBCT-007 dan UBCT-030, karakteristik enzim ekstraseluler, urutan gen penyandi enzim pendegradasi inulin yang berhasil ditemukan dan model struktur tiga dimensi enzim. Bab V merupakan bab penutup berisikan kesimpulan yang merupakan capaian dari tujuan penelitian serta saran alur penelitian baru yang dapat dibangun berdasarkan hasil penelitian ini.