

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Arthrobacter psychrolactophilus merupakan salah satu mikroorganisme bakteri yang dapat memproduksi berbagai macam enzim. *Arthrobacter psychrolactophilus* termasuk ke dalam genus *Arthrobacter* dan bakteri ekstremofil psikrofilik yang dapat bertahan hidup pada suhu rendah (di bawah 20°C), sehingga *Arthrobacter psychrolactophilus* dapat menghasilkan biokatalis fungsional yang mampu bertahan pada kondisi ekstrem (Rani & Dev, 2016). *Arthrobacter psychrolactophilus* dapat hidup pada lingkungan yang kaya nutrisi, seperti tanah subur atau substrat organik yang terdekomposisi. Genus *Arthrobacter* umumnya diisolasi dari lingkungan dingin seperti Antartika, sehingga memiliki potensi sebagai sumber enzim *cold active* (Wang *et al.*, 2009). Genom *Arthrobacter psychrolactophilus* memiliki gen pengkode enzim yang diperlukan untuk menghasilkan enzim tertentu melalui informasi genetiknya, sehingga dapat memproduksi enzim tertentu (Fernandes *et al.*, 2014; Prins *et al.*, 2015).

Enzim dapat dihasilkan oleh organisme seperti tanaman dan hewan serta mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Mikroorganisme paling sering digunakan untuk memproduksi enzim dalam skala industri karena tingkat pertumbuhannya cepat, aktivitasnya stabil pada kondisi fisik dan kimia yang bervariasi, serta mudah dilakukan menggunakan teknologi DNA rekombinan untuk meningkatkan produksi dan pengembangan secara ilmiah

(Singh *et al.*, 2016). Salah satu enzim potensial yang dihasilkan oleh mikroorganisme bakteri yaitu lakase.

Mikroorganisme bakteri yang dapat memproduksi lakase yaitu *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas desmoliticum*, dan *Enterobacter* sp. yang berfungsi sebagai bioremediasi lingkungan dengan mendegradasi pewarna tekstil reaktif yang berpotensi bersifat toksik bagi lingkungan. Struktur kimia pewarna sintesis yang sulit pudar karena tahan terhadap cahaya dan air dapat didegradasi oleh lakase, sehingga berpotensi untuk meminimalisasi toksisitas terhadap lingkungan (Shehker *et al.*, 2011; Domínguez, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Kalme *et al.* (2009) menunjukkan bahwa lakase dari *Pseudomonas desmoliticum* dengan suhu optimum 60°C dan pH 4 mampu mendokolorisasi *Direct Blue-6*, *Green HE4B*, dan *Red HE7B*. Penelitian yang dilakukan oleh Edoamodu dan Nwodo (2021) menunjukkan bahwa lakase dari *Enterobacter* sp. dengan suhu optimum 60°C dan pH 4 mampu mendokolorisasi *Malachite Green* (MG), *Congo Red* (CR), *Methyl Orange* (MO), *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR), dan *Reactive Blue 4* (RB4). Penelitian yang dilakukan oleh Chopra dan Sondhi (2022) menunjukkan bahwa lakase dari *Bacillus licheniformis* menjadi kandidat yang baik untuk diaplikasikan pada industri tekstil sebagai pendegradasi pewarna sintesis seperti *methylene blue*. Lakase yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* termostabilitas pada suhu 40°C dan pH 8. Termostabilitas pada lakase diperlukan supaya enzim tidak mudah rusak atau kehilangan aktivitasnya ketika terpapar suhu tinggi.

Lakase memproduksi enzim dalam jumlah yang rendah, sehingga diperlukan teknologi rekombinan untuk produksi enzim dalam jumlah yang lebih banyak dengan kloning gen pengkode enzim lakase melalui *host* yang sesuai menggunakan kit kloning dan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk dihasilkan lakase dengan produksi yang lebih tinggi secara identik (Kalyani *et al.*, 2016). PCR dilakukan untuk melakukan perbanyakan fragmen DNA target dan isolasi gen dalam waktu yang relatif cepat (Hoseini & Sauer, 2015). Gen target yang telah didapatkan kemudian dikloning. Kloning pada umumnya dilakukan melalui tahap ligasi, namun pada penelitian ini kloning dilakukan secara *homologous recombination* yang dilakukan tanpa melalui proses ligasi (Jacobus & Gross, 2015).

Gen yang berhasil dikloning kemudian ditransformasi pada plasmid dalam kompeten sel. Plasmid yang telah dimasuki oleh *gene insert* perlu dilakukan ekspresi melalui sel kompeten yang sesuai. Hasil dari ekspresi divisualisasi dengan metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk diketahui berat molekulnya. Enzim dimurnikan untuk mengeliminasi protein target dari ion-ion yang tidak digunakan lagi, sehingga aktivitas spesifik enzim dapat meningkat. Pemurnian enzim dilakukan melalui *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) yang menggunakan ikatan spesifik pada fase gerak dan fase diam melalui elusi terlebih dahulu, sehingga didapatkan protein yang sangat murni (Urh *et. al.*, 2009). Enzim yang telah murni diukur total proteinnya dalam larutan melalui metode *Bicinchoninic Acid* (BCA) *Protein*

Assay. Total protein yang telah didapat dijadikan sebagai parameter penting dalam melakukan uji lanjut aktivitas enzim (Goldring, 2019).

Laksmi *et al.* (2022) telah berhasil melakukan kloning, ekspresi, purifikasi, dan karakterisasi enzim D-allulose 3-epimerase (DAEase) termotabil yang berasal dari *Arthrobacter psychrolactophilus* strain B7. Protein rekombinan DAEase yang dapat mengkatalisis *D-fructose* menjadi *D-alullose* menunjukkan aktivitas optimum pada suhu 70°C dan pH 8,5. Nirwantono *et al.* (2024) juga meneliti mengenai keberhasilan kloning, ekspresi, purifikasi, dan karakterisasi L-arabinose isomerase (L-AI) yang termotabil dari *Arthrobacter psychrolactophilus* strain B7 yang dapat mengkatalisis *D-galactose* menjadi *D-tagatose*. Protein rekombinan L-AI menunjukkan aktivitas optimum pada suhu 60°C dan pH 7 – 7,5. Penelitian mengenai enzim lakase yang diproduksi oleh bakteri ekstremofil *Arthrobacter psychrolactophilus* belum pernah dilakukan, sehingga perlu dilakukan kloning, ekspresi, dan purifikasi enzim lakase dari *Arthrobacter psychrolactophilus* sebagai penelitian awal terhadap gen penyandi lakase pada *Arthrobacter psychrolactophilus*, ekspresi protein rekombinan, dan purifikasi enzim dengan harapan memiliki sifat termotabil seperti penelitian yang pernah dilakukan pada *Arthrobacter psychrolactophilus*.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah gen lakase dari bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* strain B7 dapat dikloning pada *Escherichia coli* DH5- α ?

- 1.2.2 Apakah protein rekombinan lakase dengan vektor pET-28a(+) dapat diekspresikan melalui *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) sebagai protein target?
- 1.2.3 Apakah lakase dapat dimurnikan?
- 1.2.4 Berapakah ukuran berat molekul dan jumlah protein lakase murni?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Memperoleh gen lakase dari bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* strain B7 yang dikloning pada *Escherichia coli* DH5- α .
- 1.3.2 Memperoleh ekspresi protein rekombinan lakase dengan vektor pET-28a(+) melalui *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) sebagai protein target.
- 1.3.3 Memperoleh lakase yang dimurnikan menggunakan histidin-tag dengan *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC).
- 1.3.4 Menentukan ukuran berat molekul lakase berdasarkan SDS-PAGE dan jumlah protein lakase murni berdasarkan *Bicinchoninic Acid* (BCA) *Protein Assay*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian yaitu memberikan informasi mengenai cara kloning gen lakase dari bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* strain B7 pada *Escherichia coli* DH5- α , cara ekspresi protein rekombinan lakase dengan vektor pET-28A(+) melalui *Escherichia coli* BL21 Star (DE3), dan cara purifikasi lakase.