

**STRATEGI**  
**FUNGSIONAL METAGENOMIK**  
**DALAM INVESTIGASI GEN PENYANDI SENYAWA**  
**NOVEL BIOAKTIF GLIKOSIDA HIDROLASE**

**TIM PENYUSUN:**

**Maris Kurniawati**

**Amak Yunus**

**Subandi**

**Suharti**



**KANJURUHAN**  
**PRESS**

**2021**

**STRATEGI**

# **FUNGSIONAL METAGENOMIK**

**DALAM INVESTIGASI GEN PENYANDI SENYAWA NOVEL  
BIOAKTIF GLIKOSIDA HIDROLASE**

*© Kanjuruhan Press, 2021*

Tim Penyusun

**Maris Kurniawati**

**Amak Yunus**

**Subandi**

**Suharti**

Desain Cover & Penata Isi

**Tim Kanjuruhan Press**

Cetakan I, November 2021

Diterbitkan oleh :

**Kanjuruhan Press**

Anggota IKAPI 135/JTI/2011

APPTI 002.019.1.10.2017

Email : [kanjuruhanpress@unikama.ac.id](mailto:kanjuruhanpress@unikama.ac.id)

**ISBN 978-623-91605-8-6**

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ke dalam bentuk apapun, secara elektronik maupun mekanis, termasuk fotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya, tanpa izin tertulis dari Penerbit. Undang-Undang Nomor 19 Tahun 2000 tentang Hak Cipta, Bab XII Ketentuan Pidana, Pasal 72, Ayat (1), (2), dan (6)

## KATA PENGANTAR

Terucap puji syukur yang tak terhingga kepada Allah SWT karena atas limpahan karunia-Nya monograf ini dapat terselesaikan. Monograf ini berjudul Strategi Fungsional Metagenomik dalam Investigasi Gen Penyandi Senyawa Novel Bioaktif Glikosida Hidrolase. Monograf ini menjelaskan tentang proses isolasi mRNA dan sintesis cDNA, proses konstruksi pustaka metagenomik cDNA dari *digestive gland Achatina fulica*, penapisan gen dari pustaka ekspresi metagenomik, serta sekuensing dan analisis gen glikosida hidrolase. Hasil sekuensing pustaka metagenomik didapatkan novel gen penyandi 1,3- $\beta$ -glukanase. Novel gen penyandi 1,3- $\beta$ -glukanase ini dapat diekspresikan sehingga didapatkan 1,3- $\beta$ -glukanase rekombinan yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan termasuk sebagai kandidat antibiofilm *Candida*.

Pada kesempatan ini kami selaku Tim penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada: (1) Pemerintah Republik Indonesia cq. Menteri Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana hibah sehingga dapat menghasilkan luaran monograf ini; (2) Rektor Universitas PGRI Kanjuruhan yang telah memberikan ijin untuk melaksanakan penelitian; dan (3) Rektor Universitas Negeri Malang yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan kerjasama penelitian. Akhirnya kepada semua pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung yang namanya tidak tercantum dalam tulisan ini, semoga Alloh SWT membalas kebaikan bapak dan ibu sekalian dengan pahala, rahmat dan hidayahNya. Aamiin.

Malang, Oktober 2021

Tim Penulis

# DAFTAR ISI

Kata Pengantar .....	iii
Daftar Isi.....	iv
Daftar Gambar .....	vi
Daftar Tabel.....	viii
Daftar Singkatan .....	ix
Ringkasan .....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	2
1.2 Tujuan dan Manfaat.....	4
BAB II METODE.....	7
2.1. Strategi Fungsional Metagenomik.....	8
2.2. Isolasi RNA Total dan Sintesis cDNA.....	8
2.3. Konstruksi Pustaka Metagenomik .....	12
2.4. Identifikasi Pustaka Metagenomik .....	13
BAB III STRATEGI FUNGSIONAL METAGENOMIK.....	17
BAB IV ISOLASI RNA DAN SINTESIS cDNA .....	23
4.1. Isolasi RNA dari <i>Digestive Gland Achatina fulica</i> .....	24
4.2. Sintesis cDNA.....	28
BAB V KONSTRUKSI PUSTAKA EKSPRESI METAGENOMIK cDNA .....	33
5.1. Analisis Hasil Ligasi cDNA terhadap Vektor Lambda.....	34
5.2. Titer Pustaka Metagenomik .....	35
5.3. Penapisan Plak Rekombinan dengan Aktivitas 1,3- $\beta$ -GLUKanase .....	36

BAB VI SEKUENSING DAN ANALISIS GEN .....	41
6.1. Sekuensing dan Analisis Gen 1,3-B-Glukanase.....	42
BAB VII KESIMPULAN .....	45
Referensi .....	47

Kanjuruhan Press

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Vektor phage $\lambda$ TriplEx2 .....	9
Gambar 2.2	Peta Retriksi Vector Phagemid $\lambda$ TriplEx2.....	11
Gambar 2.3	<i>Flow chart</i> Protokol Kit Konstruksi Pustaka cDNA dari SMART .....	13
Gambar 2.4	Operasional langkah-langkah dalam investigasi gen novel 1,3- $\beta$ -glukanase.....	16
Gambar 3.1	Garis besar langkah strategi metagenomik. ....	19
Gambar 3.2	Perbedaan alur strategi pustaka metagenomik dan pustaka ekspresi metagenomik untuk memperoleh gen novel .....	20
Gambar 4.1	Anatomi sistem digestif <i>A. fulica</i> .....	24
Gambar 4.2	Fase air dan fase organik pada proses isolasi RNA.....	25
Gambar 4.3	Elektroforesis RNA total cairan crop dan <i>digestive gland A. fulica</i> menggunakan gel agarose 1,1%.....	27
Gambar 4.4	Elektroforesis cDNA <i>digestive gland A. fulica</i> hasil RT-PCR dengan metode LD PCR untuk amplifikasi gen glukanase .....	30
Gambar 4.5	Elektroforesis gel agarose 1,1% dari hasil digesti cDNA <i>A. fulica</i> dengan <i>SfiI</i> dalam beberapa durasi waktu proses digesti.....	31
Gambar 4.6	Elektroforesis fraksinasi cDNA <i>A. fulica</i> menggunakan kolom chroma SPIN-400 .....	32
Gambar 5.1	Plak rekombinan [ $\lambda$ TriplEx2-glikosida hidrolase] hasil konstruksi pustaka metagenomik <i>digestive gland A. Fulica</i> ....	35
Gambar 5.2	Hasil penapisan plak rekombinan [ $\lambda$ TriplEx2-1,3- $\beta$ -glukanase] menggunakan substrat laminarin dengan pewarnaan <i>Congo Red</i> .....	37
Gambar 5.3	Analisis restriksi DNA sisipan pada beberapa klon rekombinan [pTriplEx2-1,3- $\beta$ -glukanase] yang dipotong dengan enzim <i>HindIII</i> .....	38

Gambar 5.4	Produk PCR untuk membuktikan adanya DNA sisipan pada klon rekombinan [p TriplEx2-1,3- $\beta$ -glukanase] .....	39
Gambar 6.1	Sekuen nukleotida dan asam amino deduksi dari 1,3- $\beta$ -glukanase <i>mkafGlu1</i> .....	42
Gambar 6.2	Struktur <i>mkafGlu1</i> penyandi 1,3- $\beta$ -glukanase <i>A. fulica</i> .....	42
Gambar 6.3	Urutan asam amino deduksi MKAFGlu1. ....	43
Gambar 6.4	Verifikasi gen sisipan <i>mkafGlu1</i> dengan PCR menghasilkan pita tunggal gen <i>mkafGlu1</i> .....	43

Kanjuruhan Press

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Beberapa hasil penelitian dengan strategi metagenomik.....	21
Tabel 4.1	Hasil pengamatan kondisi <i>A. fulica</i> pasca induksi 3 jenis makanan berkadar $\beta$ -glukan tinggi .....	25
Tabel 4.2	Konsentrasi RNA total hasil isolasi dari cairan crop dan <i>digestive gland</i> .....	26
Tabel 4.3	Rasio OD hasil isolasi RNA dari beberapa sumber RNA.....	28
Tabel 5.1	Jumlah plak yang terbentuk dari hasil ligasi dengan 3 macam perbandingan cDNA dan vektor .....	34
Tabel 5.2	Jumlah klon dalam beberapa pustaka cDNA.....	36



## DAFTAR SINGKATAN

A	: <i>adenine, alanine</i>
BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BM	: <i>Bobot molekul</i>
bp	: <i>base pairs</i>
C	: <i>Cytosine, cysteine</i>
D	: <i>Asam aspartat</i>
cDNA	: <i>complementary Deoxyribo Nucleic Acid</i>
CNS	: <i>Central Nervous System</i>
DNA	: <i>Deoxyribosa Nucleic Acid</i>
E	: <i>Asam glutamat</i>
EC	: <i>Enzyme Commission</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
F	: <i>Fenilalanin</i>
G	: <i>Guanine, glicine</i>
GH	: <i>Glycoside Hydrolase</i>
GPI	: <i>Glycosyl Phosphatidylinositol</i>
H	: <i>Histidine</i>
I	: <i>Isoleusine</i>
IPTG	: <i>Isopropyl-Triogalaktoside</i>
K	: <i>Lycine</i>
kb	: <i>kilo basa</i>
L	: <i>Leucine</i>
LB	: <i>Luria Bertani</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
N	: <i>Asparagine</i>

NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear Factor kappaB</i>
P	: <i>Proline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKS	: <i>Poliketide Sintase</i>
Q	: <i>Glutamine</i>
R	: <i>Arginine</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction</i>
S	: <i>Serine</i>
Sap	: <i>Secreted aspartyl proteinase</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis</i>
T	: <i>Thymine</i>
TM	: <i>Time melting</i>
V	: <i>Valine</i>
W	: <i>Triptopane</i>
Y	: <i>Tirosine</i>

## RINGKASAN

Subkategori enzim glikosida hidrolase diperlukan untuk memenuhi berbagai kebutuhan, antara lain memproses biomassa menjadi bioenergi (Bhat, 2000; Joel *et al.*, 2009; Yanase *et al.*, 2010), industri pakan ternak (Fernandes *et al.*, 2015), industri pulp dan kertas dan industri detergen (Chu *et al.*, 2011) serta pemanfaatan di bidang kesehatan sebagai anti-biofilm *Candida* pada kondisi kandidiasis (Baktir, 2016). Glikosida hidrolase dihasilkan oleh bakteri, jamur dan ditemukan juga pada molusca, salah satunya adalah *Achatina fulica* (Tenget *et al.*, 2010; Hanum dkk., 2013). Mengingat banyaknya manfaat glikosida hidrolase maka diperlukan eksplorasi sisi genetik enzim glikosida hidrolase. Kloning metagenomik telah menjadi pendekatan yang potensial untuk mengeksploitasi biokatalitik baru dari komunitas mikrobiota dari *digestive gland Achatina fulica*. Metagenomik memberikan peluang besar mendapatkan jenis klon enzim glikosida hidrolase baru dari seluruh mikrobiota *culturable* (99%) maupun *unculturable* (1%), sehingga berpotensi untuk dipatenkan dan dikomersialkan.

Tujuan penulisan monograf ini adalah menjadi referensi dalam:

- 1) Melakukan konstruksi pustaka metagenomik cDNA yang diperoleh dari sampel *digestive gland Achatina fulica*.
- 2) Melakukan *screening* komposisi pustaka metagenomik cDNA dari sampel *digestive gland Achatina fulica* yang merupakan gen penyandi glikosida hidrolase.
- 3) Menentukan homologi urutan nukleotida salah satu glikosida hidrolase yang diperoleh dari pustaka metagenomik *Achatina fulica* dengan urutan nukleotida glikosida hidrolase dari *genebank*, sebagai ukuran kebaruan gen glikosidhidrolase yang diperoleh.
- 4) Mengidentifikasi urutan asam amino deduksi gen penyandi enzim glikosida hidrolase. Metode yang dilakukan meliputi langkah-langkah: 1) Isolasi RNA Total: Isolasi RNA total berdasarkan protokol kit *PureZol™ RNA Isolation Reagent Instruction Manual BIO-RAD*. 2) Sintesis cDNA: Sintesis cDNA sesuai dengan protokol *SMART™ cDNA Library Construction Kit* (CLONTECH, AMERIKA SERIKAT) menggunakan protokol LD (*long distance*) PCR. 3) Konstruksi Pustaka cDNA: meliputi Ligasi cDNA dengan vektor  $\lambda$ TriplEx2,  $\lambda$  *phage packaging*, *Titering unamplified library*, menentukan

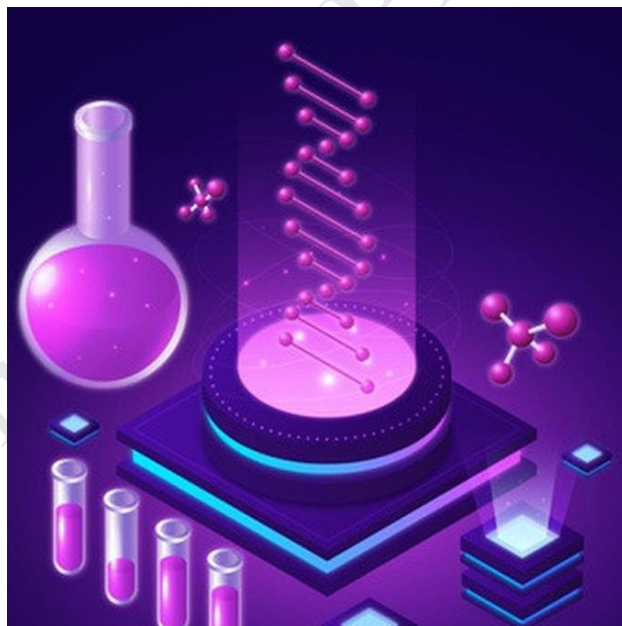
persentase klon rekombinan pada *unamplified library*, amplifikasi Pustaka. 4) Identifikasi Pustaka Teramplifikasi: meliputi titering pustaka teramplifikasi, penentuan persen klon rekombinan pustaka teramplifikasi dan identifikasi cDNA insert rekombinan. 5) *Screening E. coli* rekombinan berdasarkan aktivitas glikosida hidrolase: meliputi penapisan berdasarkan aktivitas glikosida hidrolase, konversi phagemenjadi plasmid, sequencing plasmid rekombinan, dan analisis bioinformatika.

Konstruksi Pustaka cDNA dari sistem *digestive Achatina fulica* telah berhasil dilakukan, dan menunjukkan lebih dari  $1 \times 10^{10}$  Pfu/mL nilai titer. Hasil *screening* 1  $\mu$ L suspensi pustaka cDNA yang diencerkan hingga 1/1.000.000 kali berhasil diperoleh 17 klon positif terhadap substrat laminarin. Hasil penjejakan menunjukkan gen glikosida hidrolase baru yang kemudian diberi nama gen *mkafGlu1* merupakan representasi baru dari anggota famili Glikosida Hidrolase 16 (GH16) dengan EC 3.2.1.39. Gen *mkafGlu1* tersusun atas 717 GPI, yang urutannya menunjukkan homologi tertinggi dengan  $\beta$ -glukanase dari *Holiotis discus hannai*, sebesar 45%. Asam amino (AA) deduksi gen *mkafGlu1* memiliki urutan dengan jumlah 239 AA.

**Kata kunci:** Glikosida Hidrolase, Metagenomik, *Digestive Gland*, *Achatina fulica*

# BAB I PENDAHULUAN

---



Kan

press

## 1.1. Latar Belakang

Perkembangan penelitian tentang pemanfaatan enzim hidrolase telah berkembang dengan pesat. Enzim hidrolase adalah enzim yang mengkatalis hidrolisis ikatan-ikatan ester, eter, peptida, glikosil, anhidrida asam, C-C, C-halida, atau P-N. Kelompok utama enzim hidrolase dibagi dalam sub kelompok enzim esterase, glikosidase, peptidase, fosfatase, tiolase, fosfolipase, amidase, deaminase dan ribonuklease (Indah, 2004). Sub kelompok enzim glikosidase atau glikosida hidrolase seperti enzim selulase, hemiselulase dan lignase telah dimanfaatkan untuk berbagai kebutuhan, antara lain memproses biomassa tanaman menjadi bioenergi, pemanfaatan bidang kesehatan, bidang industri pakan ternak, industri pulp dan kertas dan industri detergen.

Enzim-enzim selulase dan hemiselulase sangat menarik perhatian dalam penelitian dan komersial bidang bioenergi sebab sangat potensial untuk dikembangkan dalam aplikasi melalui bioteknologi (Bhat, 2000). Fungsi selulase adalah mendegradasi atau menghidrolisis selulosa menjadi glukosa (Yanase *et al.*, 2010). Glukosa dapat difermentasi menjadi etanol sebagai pengganti bahan bakar fosil (Jeon *et al.*, 2009; Yanase *et al.*, 2010). Sejumlah penelitian telah memberikan perhatian lebih terhadap pengembangan selulase dan hemiselulase baru yang lebih stabil dan memiliki efisiensi tinggi seperti enzim endo- $\beta$ -1,4-glukanase (Teng *et al.*, 2010; Ueda *et al.*, 2014),  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase (Niu *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2016), dan  $\beta$ -1,3- glukanase (Linton *et al.*, 2015) untuk pengembangan bioenergi.

Pemakaian enzim  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase dan  $\beta$ -1,4-glukanase pada industri pakan unggas diperlukan untuk meningkatkan nilai nutrisi pakan. *Barley* sebagai bahan dasar pakan unggas dominan dengan komponen  $\beta$ -1,4-glukan dan sebagian kecil  $\beta$ -1,3-glukan. Penggunaan campuran kedua enzim  $\beta$ -1,3-1,4-glukanase dan  $\beta$ -1,4-glukanase sebagai suplemen pakan unggas, lebih efektif dalam menghidrolisis  $\beta$ -glukan pada pakan unggas (Fernandes *et al.*, 2015). Enzim glikosida hidrolase juga dimanfaatkan pada aplikasi proses industri tekstil yaitu sebagai pelembut kain katun, pembersih dan anti deposisi pada detergen, pelembut pada industri makanan, serta modifikasi serat pada industri pulp dan kertas (Chu *et al.*, 2011).