

**LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN KOMPETITIF  
Penelitian Dasar**



**SKRINING GEN-GEN PENGKODE KITINASE DARI *Paenibacillus sp.*  
YANG DIISOLASI DARI SUMBER AIR PANAS PRATAAN-TUBAN**

**RUTH CHRISNASARI, STP., MP (210001/0725108402)**

**UNIVERSITAS SURABAYA  
MARET 2016**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Skrining Gen- Gen Pengkode Kitinase dari  
*Paenibacillus sp.* yang Diisolasi dari Sumbar  
Air Panas Prataan-Tuban

Nama Rumpun Ilmu : Sains

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Ruth Chrisnasari, STP., MP

b. NPK/NIDN : 210001/ 0725108402

c. Jabatan Fungsional : Dosen

d. Fakultas/Program Studi : Teknobiologi/Biologi

e. HP : 08980024149/03183879232

f. alamat email : ruth\_c@staff.ubaya.ac.id

Lama Penelitian Keseluruhan : 1 tahun

Penelitian Tahun ke : 1 dari 1 tahun

Biaya : Rp. 15.000.000,-

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Teknobiologi

Surabaya, 31 Maret 2016  
Ketua Peneliti,

(Dr.rer.nat. Maria Goretti M. Purwanto)  
NPK: 195039

(Ruth Chrisnasari, STP., MP)  
NPK: 210001

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Surabaya

(Dr. Drs. A. J. Tjahjoanggoro, M.Si)  
NPK: 188008

# SKRINING GEN-GEN PENGKODE KITINASE DARI *Paenibacillus sp.* YANG DIISOLASI DARI SUMBER AIR PANAS PRATAAN-TUBAN

## ABSTRAK

*Paenibacillus sp. isolat D* merupakan salah satu bakteri penghasil kitinase termotabil yang berpotensi untuk digunakan di industri konversi kitin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tipe gen-gen pengkode kitinase yang ada pada *Paenibacillus spp.* dan dari tipe-tipe tersebut dapat dibuat degenerate primer untuk mendeteksi keberadaan gen-gen pengkode kitinase pada *Paenibacillus sp. isolat D* melalui teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Degenerate primer digunakan dengan mempertimbangkan adanya keterbatasan informasi mengenai sekuen lengkap dari genom isolat D, adanya codon bias, dan variabilitas pada daerah conserved gen pengkode kitinase. Pengelompokan hasil identifikasi gen-gen pengkode kitinase dari database *Paenibacillus spp.* di National Center of Biotechnology Information (NCBI) menunjukkan bahwa kitinase *Paenibacillus spp.* tersebar pada dua famili glikosil hidrolase (GH) yaitu GH18 dan GH19. Adapun sembilan kelompok conserved domain spesifik teridentifikasi dari kelompok GH18. Degenerate primer didesain dengan HYDEN dan Geneious R8 dari tiga kelompok domain terbesar. Tiga pasang degenerate primer yang diperoleh yaitu ChiA\_8915\_2, ChiD\_5915\_1, dan GH19\_5915\_1 digunakan untuk deteksi dengan PCR. Berdasarkan hasil analisis dengan teknik PCR menggunakan ketiga pasang primer degenerate dan hasil analisis sekuensing, keberadaan gen-gen pengkode kitinase pada Isolat D belum dapat ditentukan. Dari tiga pasang primer tersebut, hanya pasangan primer ChiA\_8915\_2 yang diketahui dapat mendeteksi gen pengkode kitinase yaitu pada domain target yaitu ChiA.

**Kata kunci:** kitinase, domain ChiA, degenerate primer, *Paenibacillus spp.*

## ABSTRACT

*Paenibacillus sp. isolate D* is a thermostable chitinase-producing bacteria which is very potential in chitin-converting industry. This research aimed to identify the type of chitinase genes in *Paenibacillus spp.* in order to design degenerate primers for detecting chitinase genes in isolate D by Polymerase Chain Reaction (PCR). Degenerate primer design was chosen considering to the lack of isolate D complete genome sequence, presence of codon bias, and also the variability of chitinase genes conserved region. Identification results from the database in National Center of Biotechnology Information (NCBI) showed that chitinase genes in *Paenibacillus spp.* were belong in two family of glycosyl hydrolase (GH), GH 18 with nine specific conserved domains and GH 19. Three degenerate primers, ChiA\_8915\_2, ChiD\_5915\_1, and GH19\_5915\_1, were designed based on three largest domain groups using HYDEN and Geneious R8 software. A chitinase gene with targeted domain was succesfully amplified by ChiA\_8915\_2 in positive control although ChiD\_5915\_1 and GH19\_5915\_1 were unsuccessful. Furthermore, the particular chitinase genes in *Paenibacillus sp. isolate D* were not able to be detected using these degenerate primers.

**Keywords:** chitinase, ChiA domain, degenerate primer, *Paenibacillus spp.*

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	i
ABSTRAK.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB III METODE PENELITIAN.....	13
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	78
DAFTAR PUSTAKA.....	79
LAMPIRAN.....	83

## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Karakteristik Morfologis dan Fisiologis <i>Paenibacillus sp.</i> isolat D .....	10
Tabel 3.1	Sekuen pasangan primer yang digunakan pada penelitian .....	16
Tabel 3.2	Bakteri kontrol pada reaksi PCR dengan <i>degenerate primer</i> .....	18
Tabel 3.3	Komposisi umum reaksi optimasi PCR.....	19
Tabel 3.4	Tahapan umum reaksi optimasi PCR .....	19
Tabel 3.5	Variasi optimasi PCR dengan <i>degenerate primer</i> .....	19
Tabel 3.6	Komposisi reaksi ligasi.....	20
Tabel 3.7	Komposisi reaksi <i>colony</i> PCR.....	22
Tabel 3.8	Tahapan reaksi <i>colony</i> PCR.....	22
Tabel 3.9	Komposisi reaksi PCR.....	23
Tabel 4.1	Klasifikasi <i>conserved domain</i> enzim kitinase pada <i>Paenibacillus</i> spp.....	26
Tabel 4.2	Pasangan primer <i>degenerate</i> hasil HYDEN .....	29
Tabel 4.3	Pasangan primer <i>degenerate</i> hasil modifikasi.....	30
Tabel 4.4	Hasil analisis pasangan primer <i>degenerate</i> .....	37
Tabel 4.5	Hasil analisis kualitas primer untuk domain ChiA .....	38
Tabel 4.6	Hasil analisis kualitas primer untuk domain ChiD .....	39
Tabel 4.7	Hasil analisis kualitas primer untuk domain GH19.....	40
Tabel 4.8	Hasil optimasi PCR pasangan primer <i>degenerate</i> .....	47
Tabel 4.9	Ukuran plasmid rekombinan .....	51
Tabel 4.10	Ukuran amplikon dengan primer SP6 Promoter-T7 Promoter .....	52
Tabel 4.11	Hasil penentuan ukuran <i>insert</i> .....	53
Tabel 4.12	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen ChiA_K+ pada <i>database</i> umum .....	56
Tabel 4.13	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen ChiA_K+ pada <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 = ATCC 15480 .....	56
Tabel 4.14	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen ChiD_K+ pada <i>database</i> umum .....	57
Tabel 4.15	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen ChiD_380 pada <i>database</i> umum .....	60
Tabel 4.16	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen ChiD_380 pada <i>database Paenibacillus</i> spp. ....	60
Tabel 4.17	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen GH19_150 pada <i>database</i> umum .....	62
Tabel 4.18	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen GH19_150 pada <i>database Paenibacillus</i> spp. ....	62
Tabel 4.19	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen GH19_300 pada <i>database</i> umum .....	63
Tabel 4.20	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen GH19_300 pada <i>database Paenibacillus</i> spp .....	63
Tabel 4.21	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen GH19_400 pada <i>database</i> umum .....	65
Tabel 4.22	Hasil BLAST (BLASTn) fragmen GH19_400 pada <i>database Paenibacillus</i> spp .....	66

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Struktur Kimia dari Kitin .....	5
Gambar 2.2	Struktur Polimer Kitin dan Kitosan .....	6
Gambar 2.3	Enzim yang Terlibat dalam Degradasi Kitosan .....	6
Gambar 2.4	Reaksi Hidrolisis Kitin oleh Kitinase .....	7
Gambar 2.5	Struktur sel dan bentuk koloni dari Paenibacillus .....	9
Gambar 2.6	Contoh sekuen nukleotida gen pengkode kitinase GH 19.....	15
Gambar 2.7	Kromatogram hasil sekuensing dengan metode Sanger.....	20
Gambar 2.8	Struktur pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector .....	21
Gambar 3.1	Skema penelitian .....	25
Gambar 4.1	Hasil analisis homologi domain ChiA.....	27
Gambar 4.2	Hasil analisis homologi domain ChiD. ....	28
Gambar 4.3	Hasil analisis homologi domain GH19.....	28
Gambar 4.4	Hasil <i>multiple sequence alignment</i> dengan Geneious R9 versi 9.0.4 untuk modifikasi sekuen ForChiA_8915_2.....	31
Gambar 4.5	Hasil <i>multiple sequence alignment</i> dengan Geneious R9 versi 9.0.4 untuk modifikasi sekuen RevChiA_8915_2.....	32
Gambar 4.6	Hasil <i>multiple sequence alignment</i> dengan Geneious R9 versi 9.0.4 untuk modifikasi sekuen ForChiD_5915_1.....	33
Gambar 4.7	Hasil <i>multiple sequence alignment</i> dengan Geneious R9 versi 9.0.4 untuk modifikasi sekuen RevChiD_5915_1.....	34
Gambar 4.8	Hasil <i>multiple sequence alignment</i> dengan Geneious R9 versi 9.0.4 untuk modifikasi sekuen ForGH19_5915_1.....	35
Gambar 4.9	Hasil <i>multiple sequence alignment</i> dengan Geneious R9 versi 9.0.4 untuk modifikasi sekuen RevGH19_5915_1.....	36
Gambar 4.10	Visualisasi hasil elektroforesis optimasi PCR pasangan primer ForChiA_8915_2 dan RevChiA_8915_2 untuk kontrol positif ( <i>Bacillus licheniformis</i> Isolat D <sub>11</sub> ).....	42
Gambar 4.11	Visualisasi hasil elektroforesis optimasi PCR pasangan primer ForChiA_8915_2 dan RevChiA_8915_2 untuk <i>Paenibacillus</i> sp. Isolat D.....	43
Gambar 4.12	Visualisasi hasil elektroforesis optimasi PCR pasangan primer ForChiD_5915_1 dan RevChiD_5915_1 .....	45
Gambar 4.13	Visualisasi hasil elektroforesis optimasi PCR pasangan primer ForGH19_5915_1 dan RevGH19_5915_1 .....	48
Gambar 4.14	Visualisasi hasil elektroforesis preparasi sekuensing pada gel agarosa 2% dalam buffer TAE 1X.....	49
Gambar 4.15	Visualisasi hasil elektroforesis isolasi plasmid rekombinan pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1X.....	50
Gambar 4.16	Visualisasi hasil elektroforesis PCR dengan pasangan primer SP6 Promoter dan T7 Promoter untuk plasmid rekombinan .....	51
Gambar 4.17	Visualisasi hasil elektroforesis PCR pasangan <i>degenerate</i> <i>primer</i> .....	52
Gambar 4.18	Visualisasi posisi insert .....	53
Gambar 4.19	Hasil sekuensing enam amplicon hasil PCR dengan pasangan primer <i>degenerate</i> (format FASTA dibuat dengan EMBOSS Seqret EMBL-EBI) .....	54

Gambar 4.20	Hasil <i>alignment</i> sekuen fragmen ChiD_K+ dengan beberapa sekuen gen pengode kitinase .....	58
Gambar 4.21	Hasil <i>alignment</i> dengan sekuen <i>Paenibacillus</i> sp. FPU-7 .....	59
Gambar 4.22	Hasil <i>alignment</i> dengan sekuen <i>Paenibacillus</i> sp. IHBB 10380.....	64

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Kitin adalah polisakarida natural yang tersusun atas monomer  $\beta$ -1,4-N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) dan tersedia paling melimpah kedua sesudah selulosa. Di alam kitin dapat dijumpai di kulit *crustaceae*, komponen *eksoskeleton* insekta, dinding sel fungi, alga, nematoda maupun tumbuhan (Ikeda *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Produksi kitin di seluruh dunia diperkirakan sekitar  $10^{10}$ - $10^{12}$  ton/tahun (Gortari & Hours, 2013). Keberadaan kitin yang melimpah ini berpotensi besar untuk diolah lebih lanjut karena produk turunan kitin seperti kitinoligosakarida berat molekul rendah memiliki aktivitas melawan oksidasi, meningkatkan kekebalan tubuh yang sangat penting untuk pengobatan AIDS, kanker, jantung dan penyakit darah (Shahidi, *et al.*, 1999). Selain itu, monomer dari kitin yaitu N-Asetil-D-glukosamin dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi dan kosmetik, diantaranya sebagai pengontrol kadar gula darah, suplemen antiinflamasi serta pencegah hiperpigmentasi karena N-asetil-D-glukosamin dapat mengurangi aktivitas enzim tirosinase yang berperan dalam produksi melanin (Haliza dan Suhartono, 2012).

Pengolahan kitin menjadi senyawa turunannya dapat dilakukan melalui dua cara, yakni cara kimiawi maupun enzimatis. Cara kimiawi dilakukan melalui proses hidrolisis menggunakan asam kuat, seperti 15-36% HCl pada suhu 40-80°C (Bohlman, *et al.*, 2004). Namun terdapat beberapa kekurangan metode ini, yakni biaya yang tinggi, *yield* yang rendah (dibawah 65%) dan residu asam dari penggunaan HCl (Sashiwa, *et al.*, 2001). Selain itu, juga ditemukan kandungan produk samping seperti *O-acetylated*, *di-acetylated* dan sisa pelarut yang terdeteksi dengan LC-MS. Produksi GlcNAc dengan metode kimia tidak secara luas diterapkan karena limbah kimia yang dihasilkan tidak ramah lingkungan. Cara kedua adalah dengan cara enzimatis. Keuntungan penggunaan cara enzimatis adalah dihasilkannya produk yang lebih spesifik, proses dilakukan pada *mild condition* serta ramah lingkungan (Chen, Shen dan Liu, 2010).

Sementara itu, kitin tersusun atas struktur kristal  $\alpha$ -kitin dan  $\beta$ -kitin yang terorganisasi dalam lapisan-lapisan yang secara kuat diikat oleh beberapa ikatan hidrogen (Rinaudo, 2006). Enzim memiliki keterbatasan untuk menghidrolisis



kitin natural karena terbatasnya akses ke ikatan  $\beta$ -glikosidik di dalam struktur kristal kitin tersebut (Kurita *et al.*, 2003). Kemampuan kitin untuk bertindak sebagai substrat dari hidrolisis enzimatik dapat ditingkatkan dengan proses dekrystalisasi strukturnya yang akan membuat akses enzim ke kitin lebih mudah dan enzim dapat mendegradasi kitin secara maksimal (Chen, Shen, dan Liu, 2010). Dekrystalisasi kitin dapat dilakukan dengan *treatment* panas di dalam pelarut hidrofobik atau surfaktan yang dapat melemahkan ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik antara struktur kristal kitin dan memfasilitasi enzim untuk reaksi dekomposisi (Shen *et al.*, 2010). Proses dekrystalisasi dengan pemanasan pada suhu tinggi ini mengakibatkan dibutuhkan enzim yang dapat bekerja secara optimum pada suhu tinggi.

Enzim yang berperan dalam proses hidrolisis kitin menjadi senyawa monomernya (GlcNAc) dan pembuatan senyawa turunan dari kitin adalah kitinase. Enzim yang mampu bekerja pada suhu tinggi (enzim termostabil) umumnya juga dihasilkan oleh mikroorganisme termofil bahkan hipertermofil karena secara alami mikroorganisme tersebut hidup pada lingkungan yang ekstrim panas (Rahayu *et al.*, 1999). Pada penelitian sebelumnya, peneliti telah berhasil mengisolasi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi bakteri *Paenibacillus sp* dari sumber air panas Prataan-Tuban yang telah terbukti memiliki aktivitas enzim kitinase termostabil (Yasaputera *et al.*, 2013). Selain itu, peneliti juga telah berhasil mengkarakterisasi dan mempurifikasi enzim kitinase termostabil yang dihasilkan. Enzim kitinase termostabil dari *Paenibacillus sp* sumber air panas Prataan-Tuban ini berukuran 61,36 dan 68.15 kDa, memiliki aktivitas optimum pada suhu 55 °C dan pH 6-7 serta tetap memiliki aktivitas setelah dipanaskan 100 °C hingga menit ke-26 (data belum dipublikasikan). Termostabilitas enzim kitinase ini menarik untuk diteliti lebih lanjut khususnya untuk solusi bioproses degradasi kitin.

Untuk memproduksi enzim kitinase dalam jumlah besar, diperlukan upaya optimasi produksi enzim. Telah dilakukan optimasi produksi enzim kitinase dari *Paenibacillus sp* sumber air panas Prataan-Tuban, dimana pada kondisi optimum bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim kitinase sebanyak  $2,25 \times 10^{-02}$  U/ml (data belum dipublikasikan). Untuk lebih meningkatkan produksi enzim ini, dapat

dilakukan overekspresi gen pengkode enzim kitinase termostabil dari *Paenibacillus sp* sumber air panas Prataan-Tuban ke organisme lain seperti *E. coli*. Oleh karena itu, pada tahap awal diperlukan penelitian untuk mengetahui gen- gen pengkode enzim kitinase termostabil ini. Itoh *et al.* (2013) telah melakukan skrining dan isolasi gen penghasil kitinase ekstraseluler dari *Paenibacillus sp.* strain FPU-7 dan menemukan 7 gen pengkode kitinase dari famili GH-18. Selain itu, Morimoto *et al.* (1997) dan Kawase *et al.* (2004) juga menemukan gen pengkode kitinase yang termasuk famili GH-18 dan famili GH-19.

Pada penelitian ini, akan dilakukan skrining gen pengkode enzim kitinase termostabil dari *Paenibacillus sp* sumber air panas Prataan-Tuban. Skrining gen dilakukan dengan mempelajari gen-gen penghasil kitinase dari bakteri lain dalam satu genus atau genus yang berbeda dan mencari *conserved* region pada gen-gen tersebut secara *in silico*. *Conserved* region ini akan digunakan sebagai dasar perancangan primer PCR untuk mendeteksi keberadaan gen-gen pengkode kitinase tersebut. Hasil rancangan primer ini, selanjutnya akan diujikan ke beberapa isolat yang positif memiliki aktivitas kitinase dan *Paenibacillus sp* sumber air panas Prataan-Tuban.

## **1.2 Perumusan Masalah**

- a. Bagaimanakah profil dan sekuen *conserved* region dari gen-gen pengkode kitinase dari beberapa jenis bakteri?
- b. Bagaimanakah desain primer PCR untuk skrining gen-gen pengkode kitinase tersebut?
- c. Gen-gen pengkode kitinase apa sajakah yang ada di *Paenibacillus sp* sumber air panas Prataan-Tuban?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

- a. Mengetahui profil dan sekuen *conserved* region dari gen-gen pengkode kitinase dari beberapa jenis bakteri
- b. Mengetahui desain primer PCR untuk skrining gen-gen pengkode kitinase.

- c. Mengetahui gen-gen pengkode kitinase yang ada di *Paenibacillus sp* sumber air panas Prataan-Tuban

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui gen-gen pengkode kitinase termostabil dari *Paenibacillus sp* yang diisolasi dari sumber air panas Prataan-Tuban. Informasi keberadaan gen-gen ini selanjutnya dapat diteliti lebih lanjut untuk tahap isolasi dan overekspresi ke *E. coli*. Hasil overekspresi gen ini nantinya dapat digunakan untuk menghasilkan enzim kitinase termostabil dalam skala lebih besar yang akan menjadi solusi untuk bioproses degradasi kitin.