

EKSPLOKASI GEN ENZIM LIPASE PADA TANAH PENGOLAHAN LIMBAH KELAPA SAWIT DENGAN PENDEKATAN METAGENOMIK

Sri Sumarsih*, Andre Pratama, Afaf Baktir

Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi,
Universitas Airlangga, Surabaya

*email: sri-sumarsih@fst.unait.ac.id, srimarish@yahoo.com

Received 20 Pebruari 2017

Accepted 20 April 2017

Abstrak

Enzim lipase merupakan bagian dari enzim hidrolase yang bekerja pada ikatan ester. Enzim ini juga mengkatalisis beberapa jenis reaksi sehingga merupakan enzim yang potensial diaplikasikan ke berbagai bidang seperti industri tekstil, kulit, deterjen, makanan, dan lain-lain. Salah satu cara mendapatkan enzim *novel* ialah dengan pendekatan secara metagenomik dari sampel lingkungan tanpa melalui kultur di dalam laboratorium. Sampel lingkungan yang biasa diteliti ialah memiliki keadaan ekstrem atau memiliki sumber substrat enzim yang ingin dieksplorasi. Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi gen enzim lipase pada tanah hasil pengolahan limbah kelapa sawit (POME) melalui pendekatan metagenomik menggunakan desain primer *degenerate* untuk gen enzim lipase untuk golongan HSL. Didapatkan fragmen gen lipase yang memiliki ukuran 250-300 pasang basa dan dilakukan kloning ke dalam plasmid pET-30a(+) dengan sel inang *E. coli* TOP10 menghasilkan pustaka fragmen lipase limbah sawit (PFL2S) sebanyak 26 klon.

Kata kunci: *Lipase, metagenomik, tanah, POME, primer degenerate*

Abstract

Lipase is a hydrolase enzymes that cleavage on the ester bond. This enzyme is catalyze several reactions so this is a potential enzyme that applied to various fields such as textile, leather, detergents, food, and others. One of the method to get a novel enzyme is metagenomic approach from environmental samples without culturing in the laboratory. Environmental sample commonly studied is have an extreme environment or have a source of the enzyme substrate that researcher want explored. In this research, exploration lipase gene on the soil the processing of palm oil mill effluent (POME) through metagenomic approach using design of degenerate primers for lipase gene fragment for HSL group. Obtained lipase gene fragment size of 250-300 base pairs and cloned into pET-30a(+) plasmid with the *E. coli* TOP10 as a host cells to produce libraries of lipase fragment gene of palm oil mill effluent (PFL2S) that have a 26 clones.

Keywords: *Lipase, metagenomic, soil, POME, primer degenerate*

Pendahuluan

Industri besar dan industri rumahan yang menggunakan katalis sekarang ini sangat bergantung dengan yang namanya

enzim. Karena enzim dapat melakukan konversi dalam hitungan menit maupun detik (Otten *and* Quax, 2005). Selain itu, enzim juga dapat mengkatalis reaksi yang

sulit dilakukan metode kimiawi seperti hidrolisis atau adisi enansioselektif maupun regioselektif senyawa kiral. Kondisi reaksi dari enzim pun secara umum bisa dalam temperatur ruang dan ada enzim yang tahan pada suhu yang ekstrem serta kebanyakan bereaksi dalam pelarut air sehingga penelitian dan permintaan biokatalis terus berkembang pesat (Schoemaker, 2003).

Enzim lipase merupakan bagian dari enzim hidrolase yang bekerja pada ikatan ester. Lipase dapat menghidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak, dan gliserol. Selain menghidrolisis ikatan ester, lipase juga dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi, interesterifikasi, dan transesterifikasi pada media tanpa air (Momsia and Momsia, 2013). Kegunaan enzim lipase ini membuatnya menjadi enzim yang potensial untuk diaplikasikan ke berbagai bidang. Sehingga, sangat menarik untuk menemukan dan memproduksi enzim lipase dengan aktivitas tertentu karena banyak sekali potensi dari enzim lipase untuk diaplikasikan pada berbagai bidang.

Pendekatan secara metagenomik merupakan aplikasi dari genomik molekular untuk konsorsium mikroba yang tidak dapat dikultur dan dapat dipergunakan untuk mencari enzim industri yang baru karena keragaman materi genetik yang dianalisis (JunGang *et al.*, 2010; Kakirde *et al.*, 2010; Lämmle *et al.*, 2007; Lorenz and Eck, 2005; Steele *et al.*, 2009). Lebih dari 99% mikroorganisme tidak dapat dikultur (Handelsman *et al.*, 1998), akibat kondisi pertumbuhannya yang belum diketahui atau pertumbuhannya memerlukan konsorsium mikroba. Berbagai macam lipase telah diisolasi melalui pendekatan metagenomik selama beberapa dekade (Glogauer *et al.*, 2011; JunGang *et al.*, 2010; Kakirde *et al.*, 2010; Lämmle *et al.*, 2007; Liaw *et al.*, 2010; Lorenz and Eck, 2005; Simon and Daniel, 2009; Uchiyama and Miyazaki, 2009). Salah satu sampel

lingkungan yang menarik untuk dianalisis enzim lipase dengan pendekatan metagenomik ialah sampel tanah dari limbah pengolahan kelapa sawit atau biasa disebut POME (*Palm Oil Mill Effluent*).

Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi gen enzim lipase pada tanah hasil pengolahan limbah kelapa sawit (POME) melalui pendekatan metagenomik. Sampel diambil dari tanah milik PT. Agro Bukit Central Kalimantan, Sampit, Kalimantan Tengah, yang merupakan tempat proses biologis dari limbah pengolahan kelapa sawit yang salah satunya mengandung minyak. Metode yang digunakan ialah metode ekstraksi DNA berbasis SDS (Hurt *et al.*, 2001) termodifikasi, DNA metagenom diekstraksi secara langsung dari sampel tanah dengan pengayaan mikroba terlebih dahulu dalam media Luria Bertani. Konstruksi pustaka metagenom dilakukan dengan cara kloning gen hasil PCR menggunakan vektor plasmid pET-30a(+) dan sel inang *E. coli* TOP10. Koleksi klon merupakan pustaka fragmen gen lipase dari sumber tanah limbah pengolahan kelapa sawit.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat utama yang digunakan antara lain: autoklaf, *laminar air flow*, *shaker incubator*, sentrifuga, nano drop spectrophotometer, *Thermocycler*, perangkat elektroforesis DNA, *Gel Doc*, pipet mikro berbagai ukuran, serta alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium mikrobiologi dan biokimia.

Bahan penelitian yang digunakan meliputi: *Escherichia coli* TOP10, pET-30a(+), 2-merkaptotanol, Tris-HCl, NaCl, *cetyltrimethylammonium bromide* [CTAB], NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, EDTA, sodium dodecyl sulphate (SDS), nitrogen cair, isopropanol, polietilen glikol (PEG 6000), kloroform, isoamil alcohol, *GenElute[™] Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma Aldrich). *KAPA2G Fast ReadyMix with Dye* (Boston, Massachusetts, United States). *QIAquick PCR purification kit*

(Qiagen), tripton, yeast extract, bacto agar, dan minyak zaitun, gel loading buffer, marker DNA, agarosa, etidium bromida (EtBr), asam asetat glasial, glukosa, NaOH, CaCl₂, natrium asetat, etanol 70%, dH₂O, dan ddH₂O.

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel dan ekstraksi DNA

Sampel tanah dari *Palm Oil Mill Effluent* diambil dari pabrik pengolahan kelapa sawit milik PT. Agro Bukit Central Kalimantan yang terletak di jalan Sudirman Km 106 Sampit, Kalimantan Tengah (2°33'55.3"S, 112°46'03.5"E) pada bulan Januari 2016. Ekstraksi DNA metagenom dilakukan dengan metode Hurt et al. (2001) termodifikasi. sampel tanah sebanyak 5 gr juga dilakukan pengayaan terlebih dahulu menggunakan 100 ml media LB (Luria Bertani) cair dengan minyak zaitun 1% dan shaker selama semalam. Sampel dan hasil pengayaan ditambahkan 9 ml buffer ekstraksi (100 mM natrium fosfat [pH 7,0], 100 mM Tris-HCL [pH 7,0], 100 mM EDTA [pH 8,0], 1,5 M NaCl, 1% CTAB dan 2% SDS) dan diinkubasi selama 30 menit pada 65°C sambil diaduk tiap 10 menit lalu disentrifugasi pada 1800 x g selama 10 menit. Supernatan ekstraksi langsung sampel tanah dituangkan ke dalam tabung berpenangas es yang mengandung 20 ml aliquot dari 25:24:1 fenol-kloroform-isoamil alkohol. Sedangkan supernatan ekstraksi dari hasil pengayaan dimurnikan dengan *GenElutetm Bacterial Genomic DNA Kit*.

Desain primer fragmen gen lipase

Untuk mendapatkan gen target pada proses amplifikasi gen dengan PCR, dibutuhkan sepasang primer yang spesifik yaitu dengan cara dilakukan desain primer forward dan primer reverse (Shi et al., 2009). Primer degenerate yang di desain untuk amplifikasi fragmen gen lipase berdasarkan lipase golongan HSL yang telah dipublikasikan pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>).

Daerah lestari asam amino yang potensial diidentifikasi menggunakan Clustal W. Kemudian di awal basa dari primer yang didesain, ditambahkan beberapa basa pijakan dan urutan basa dari enzim restriksi *SacI* untuk forward dan *HindIII* untuk reverse.

Konstruksi pustaka fragmen gen lipase

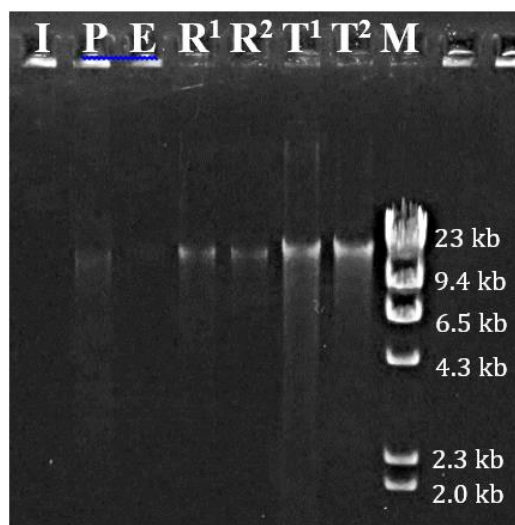
Proses amplifikasi gen fragmen lipase menggunakan teknik PCR dan *kit KAPA2G Fast ReadyMix with Dye* dengan primer CLF dan CLR. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus sebagai berikut: pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi suhu 95°C selama 15 detik, annealing suhu 63,2°C; 64,4°C; 66,8°C; 68oC, dan 69,5°C selama 15 detik, elongasi suhu 72°C selama 15 detik dan pasca-elongasi suhu 72°C selama 1 menit. hasil PCR dimurnikan menggunakan *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen). Untuk konstruksi pustaka fragmen gen lipase, hasil purifikasi PCR dilakukan kloning gen dengan vektor pET-30a(+) dan transformasi ke dalam *E. coli* TOP10 melalui *heat shock*.

Hasil dan Pembahasan

Sampel tanah diambil sedalam 3 cm dari permukaan tanah dan berasal dari 2 titik yaitu dasar kolam dan pinggir kolam. Pengambilan pada 2 titik ini bertujuan agar mikroorganisme yang didapatkan merupakan mikroorganisme aerob dan anaerob. Karakteristik tanah secara fisik berupa tanah liat berwarna hitam (dasar kolam) dan coklat (pinggir kolam).

Hasil panen pelet dilakukan ekstraksi menggunakan buffer ekstraksi DNA tanpa melalui ekstraksi DNA secara fisik serta dilakukan perbandingan hasil dengan menggunakan kit. Supernatant diambil dan dilakukan pemurnian DNA metagenom menggunakan kolom *GenElutetm Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma Aldrich). Didapatkan DNA metagenome dari kedua media kultur pada kondisi yang berbeda. Dapat dilihat dari hasil elektroforesis

berupa elektroforegram dengan band DNA berkisar ~20 kb (Gambar 1).



Gambar 1. Elektroforegram DNA metagenom dari sampel tanah. (I) dengan isopropyl alkohol, (P) dengan PEG 6000, (E) dengan etanol, (R¹, R²) suhu ruang, (T¹, T²) suhu tinggi, (M) Marker DNA λ /HindIII.

Tingkat kemurnian sampel DNA metagenom dari kedua media kultur bisa dikatakan murni karena memenuhi rentang kemurnian DNA yang baik (Tabel 1). sehingga dapat digunakan pada tahap selanjutnya. Konsentrasi DNA pada media bersuhu tinggi lebih besar dibandingkan media pada suhu ruang. Hal ini bisa disebabkan karena lingkungan asli tanah pada kolam limbah ialah bersuhu tinggi (Rupani *and* Singh, 2010;

Soleimaninanadegani *and* Manshad, 2014) sehingga lebih banyak mikroorganisme berkembang pada suhu tinggi (60°C).

Untuk mendapatkan gen penyandi lipase, digunakan primer *degenerate* yang berasal dari lipase golongan HSL atau hormone sensitive lipase (Shi *et al.*, 2009). Primer *degenerate* didesain berdasarkan gen lipase golongan HSL dengan pencarian Entrez pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>).

Dua daerah lestari pada H-G dan G-X-S-X-G (X merupakan asam amino) ditemukan pada kebanyakan lipase yaitu daerah lestari untuk lubang oksianion dan sisi aktif enzim (Jaeger *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2004). Pada lipase golongan HSL berdasarkan 6 mikroorganisme yang disejajarkan urutan asam aminonya. Didapat 2 daerah lestari pada lubang oksianion yaitu [V/L]-[F/Y/D]-[F/I]-H-G-G-[G/A] dan sisi aktif enzim HSL lipase yaitu G-[D/V]-S-[A/V]-G-G-[N/C]-[L/M/I]. Setelah itu, didesain primer yang komplemen dengan dua daerah lestari tersebut. Untuk mengecek primer yang didesain, dilakukan tes pada susunan gen lipase yang diketahui dan membandingkan hasil primer dengan susunan gen lipase yang telah terpublikasi menggunakan BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Setelah beberapa kali dioptimasi, didapatkan primer *degenerate* CLF (*Cold Lipase Forward*) dan CLR (*Cold Lipase Reverse*) (Tabel 2).

Tabel 1. hasil spektrofotometri nanodrop

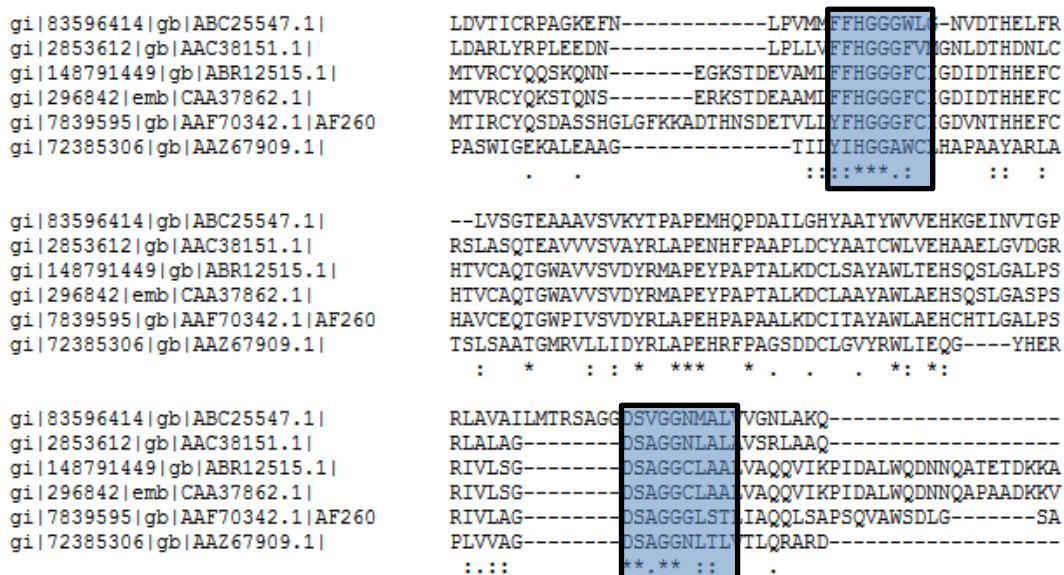
Sample	230	260	280	260/280	260/230	ng/ μ l
T ¹	6,854	5,264	3,413	1,54	0,77	263,2
T ²	4,489	6,342	3,312	1,91	1,41	317,1
R ¹	0,977	0,674	0,387	1,74	0,69	33,7
R ²	0,67	0,669	0,347	1,93	1	33,4
Manual PEG 6000	32,77	60,508	44,126	1,37	1,85	3025,4

Tabel 2. Primer degenerate lipase golongan HSL

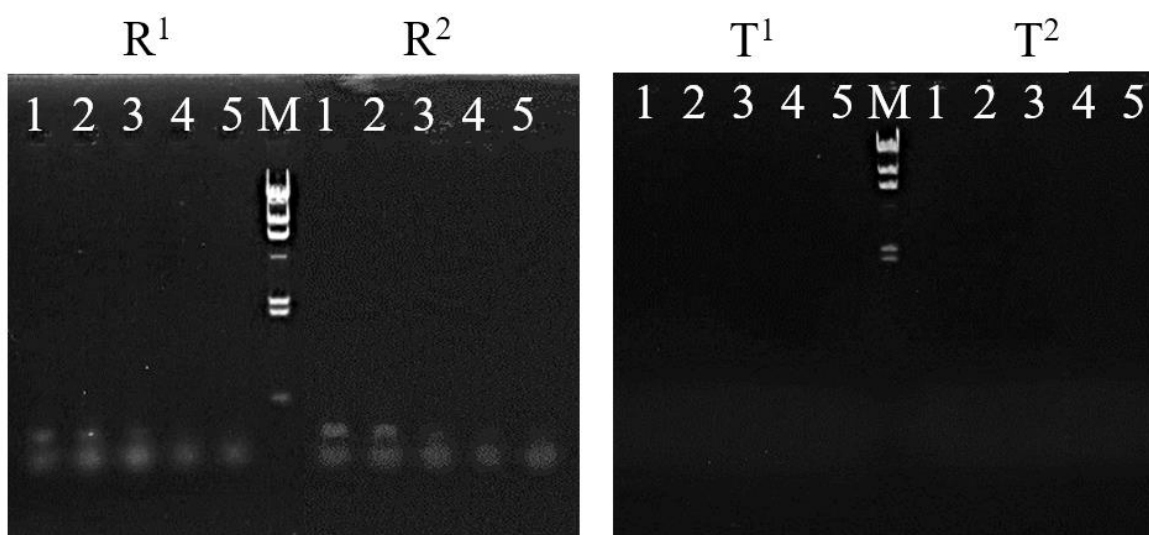
Primer	Susunan (5' ke 3') ^{a, b}
CLF	ACG <u>GAGCTCGTGGTGTAYTTYCAYGGBGG</u>
CLR	TGTA <u>AGCTTCAGGTTGCCRCCSGCRCTRTCNCC</u>

^aB: C, G/T; N: A, C, G/T; R: A/G; S: G/C; Y: C/T.

^bSisi restriksi ditandai dengan catak miring dan garis bawah.



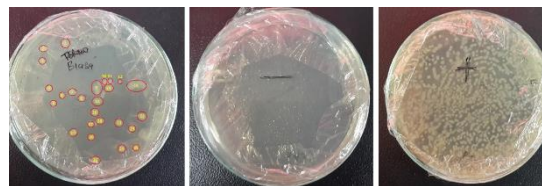
Gambar 2. Pensejajaran asam amino dari mikroorganisme penghasil lipase golongan HSL pada GenBank (NCBI) dengan ClustalW. (AAC38151) *Pseudomonas sp.* B11-1; (ABC25547) *Pseudomonas sp.* CL-61; (CAA37862) *Moraxella sp.* TA144; (ABR12515) *Psychrobacter sp.* 2-17; (AAF70342) *Psychrobacter sp.* St1; (AAZ67909) *uncultured bacteria* dari sedimen laut. Dua daerah lestari pada lubang oksianion dan sisi aktif berada pada kotak biru.



Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR sampel DNA metagenom R¹, R², T¹, dan T² dengan variasi suhu *annealing*. (M) Marker DNA λ *HindIII*, (1) suhu 63.2°C, (2) suhu 64.4°C, (3) suhu 66.8°C, (4) suhu 68°C, dan (5) suhu 69.5°C.

Proses amplifikasi gen penyandi fragmen lipase dilakukan dengan memvariasi suhu penempelan primer atau *annealing* yaitu pada suhu 63,2°C; 64,4°C; 66,8°C; 68°C, dan 69,5°C. Variasi suhu dilakukan dengan tujuan untuk menentukan suhu optimal dari primer agar dapat menempel pada DNA template secara sempurna sehingga didapatkan fragmen DNA dari gen penyandi lipase. Dari hasil variasi tersebut, fragmen gen lipase dapat teramplifikasi dengan suhu *annealing* 63,2°C dan 64,4°C (Gambar 3). Amplikon yang di dapatkan dari hasil PCR dengan menggunakan primer CLF dan CLR memiliki ukuran basa sebesar 250-300 pasang basa. Hal ini sesuai pada penelitian yang telah dilakukan oleh Shi *et al.* (2009) dan Yan *et al.* (2016). Dari 4 sampel DNA metagenom, hanya sampel dari pengayaan pada suhu ruang yang positif menghasilkan amplikon fragmen gen lipase golongan HSL. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada mikroorganisme penghasil lipase golongan HSL pada suhu tinggi karena mikroorganisme golongan HSL ini hidup pada suhu rendah (Shi *et al.*, 2009). Hasil PCR kemudian dipurifikasi menggunakan kolom *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen). Lalu dilakukan kloning gen dan

menghasilkan klon yang tumbuh sebanyak 26 klon



Gambar 4. Hasil transformasi. (kiri) klon plasmid rekombinan fragmen gen lipase, (tengah) kontrol negatif, (kanan) kontrol positif.

Kesimpulan

Tingkat kemurnian hasil ekstraksi DNA sampel tanah pengolahan limbah kelapa sawit menggunakan metode Hurt *et al.* (2001) termodifikasi mempunyai rasio absorbansi 260/280 sebesar 1,93 serta ukurannya berkisar 20 bp. Primer *degenerate* CLF dan CLR dapat mengamplifikasi fragmen gen lipase dari sampel tanah pengolahan limbah kelapa sawit dengan ukuran 250-300 bp. Hasil transformasi plasmid pET-30a(+) tersisipi fragmen gen lipase menghasilkan pustaka klon sebanyak 26 klon yang disebut pustaka fragmen lipase limbah sawit (PFL2S).

Daftar Pustaka

- Glogauer, A., Martini, V.P., Faoro, H., Couto, G.H., Müller-santos, M., Monteiro, R.A., Mitchell, D.A., Souza, E.M. De, Pedrosa, F.O., Krieger, N., 2011. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microb. Cell Fact.* 10, 54.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5, R245–R249.
- Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Tiedje, J.M., Zhou, J., Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y.U.L., Palumbo, A. V, 2001. Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67.
- Jun Gang, L., Ke Gui, Z., Wen Jun, H., 2010. Cloning and biochemical characterization of a novel lipolytic gene from activated sludge metagenome, and its gene product. *Microb. Cell Fact.* 9, 83.

- Kakirde, K.S., Parsley, L.C., Liles, M.R., 2010. Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1911–1923.
- Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., Rupp, S., 2007. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J. Biotechnol.* 127, 575–592.
- Liaw, R. B., Cheng, M. P., Wu, M. C., Lee, C. Y., 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. *Bioresour. Technol.* 101, 8323–9.
- Lorenz, P., Eck, J., 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nature* 3, 510–516.
- Momsia, T., Momsia, P., 2013. A review on “microbial lipase-versatile tool for industrial applications .” *Int. J. life Sci. Biotechnol. pharma Res.* 2.
- Otten, L.G., Quax, W.J., 2005. Directed evolution: selecting today’s biocatalysts. *Biomol. Eng.* 22, 1–9.
- Schoemaker, H.E., 2003. Dispelling the Myths--Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science* 299, 1694–1697.
- Shi, P., Liu, W., Meng, K., Bai, Y., Wang, G., Zhan, Z., Yao, B., 2009. Lipase Diversity in Glacier Soil Based on Analysis of Metagenomic DNA Fragments and Cell Culture 19, 888–897.
- Simon, C., Daniel, R., 2009. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 265–276.
- Steele, H. L., Jaeger, K. E., Daniel, R., Streit, W. R., 2009. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16, 25–37.
- Uchiyama, T., Miyazaki, K., 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 616–622.
- Yan, Q., Duan, X., Liu, Y., Jiang, Z., Yang, S., 2016. Biotechnology for Biofuels Expression and characterization of a novel 1, 3 - regioselective cold - adapted lipase from *Rhizomucor endophyticus* suitable for biodiesel synthesis. *Biotechnol. Biofuels* 1–13