

1 DESKRIPSI RISET I

STUDI PENGARUH PENGGUNAAN *IONIC LIQUID* SEBAGAI PELARUT PADA STABILITAS DAN AKTIVITAS LIPASE DARI BAKTERI HALOFILIK MODERAT ISOLAT KAWAH LUMPUR ASIN BLEDUK KUWU JAWA TENGAH

1.1 Deskripsi singkat

Bakteri halofilik merupakan salah satu golongan ekstremofil yang mampu bertahan hidup di lingkungan dengan kadar garam tinggi. Bakteri ini sudah banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang bioteknologi, karena merupakan sumber potensial untuk biokatalis multistabil dan metabolit sekunder, seperti biosurfaktan, bioplastik, ectoin, dan levan. Salah satu biokatalis yang bersumber dari bakteri halofilik yang menarik untuk dipelajari adalah lipase. Enzim ini merupakan salah satu enzim industri yang banyak diaplikasikan dalam bidang energi alternatif seperti biodiesel dan dalam sintesis senyawa-senyawa obat kiral. Beberapa lipase telah diisolasi dari bakteri halofilik moderat yang diseleksi dari sumber alam berupa kawah lumpur asin di desa Bleduk Kuwu, Purwodadi, Jawa Tengah. Hasil karakterisasi terhadap lipase-lipase tersebut menunjukkan karakteristik yang unik, antara lain aktivitasnya dipengaruhi oleh polaritas dari pelarut. Beberapa pelarut organik dapat meningkatkan aktivitas lipase hingga 2-3 kali lipat dibanding aktivitas dalam pelarut air. Akan tetapi, pelarut organik umumnya bersifat mudah menguap dan toksik sehingga tidak dapat digunakan dalam reaksi sintesis senyawa obat atau dalam proses pengolahan makanan yang melibatkan lipase. Oleh karena itu, perlu dilakukan pendekatan lain yang dapat meniru efek pelarut organik tetapi lebih ramah lingkungan. Saat ini *liquid ionic*, yaitu garam dengan titik leleh rendah sehingga berada dalam keadaan cair, merupakan solusi alternatif untuk menggantikan peran dari pelarut organik. Beberapa studi pada pemanfaatan *liquid ionic* untuk peningkatan aktivitas dan stabilitas enzim telah dilaporkan di beberapa literatur. Pada penelitian ini akan dikembangkan *liquid ionic* turunan dari senyawa imidazol untuk dipelajari pengaruhnya pada aktivitas dan stabilitas lipase dari genus *Halomonas* isolat kawah lumpur Bleduk Kuwu. Jenis pelarut ini akan digunakan dengan tiga cara, yaitu sebagai *cosolvent* dengan pelarut air, sebagai pelarut murni, dan sebagai sistem dua fasa bersama pelarut lain. Pengaruh terhadap aktivitas akan dipelajari dengan membandingkan parameter kinetiknya (k_{cat} , K_M , V_M) dengan lipase yang dilarutkan dalam buffer. Sedangkan stabilitasnya akan dipelajari dengan membandingkan parameter termodinamikanya terhadap gangguan termal. Disamping itu juga akan dipelajari efek penggunaan *ionic liquid* pada sintesis biodiesel.

1.2 Roadmap riset program doktor

Tahapan	Periode			
	Tahun 1	Tahun 2	Tahun 3	Tahun 4
Tahap Lanjut				Studi lanjut efek <i>ionic liquid</i> pada aktivitas lipase halostabil dan reaksi esterfikasi pada sintesis biodisel
Tahap Pengembangan			Optimasi stuktur dan sintesis, serta karakterisasi <i>ionic liquid</i> berdasarkan hasil studi awal	
Tahap awal	Sintesis dan karakterisasi senyawa liquid <i>ionic turunan imidazol</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Isolasi lipase halostabil dari bakteri halofilik isolat kawah lumpur Bleduk Kuwu - Studi awal efek <i>ionic liquid</i> sebagai kosolvent, pelarut murni, dan sistem dua fasa pada aktivitas lipase halostabil 		

Penelitian ini akan dibagi ke dalam tiga tahap dalam waktu empat tahun, yang terdiri dari:

- **Tahap awal** (dua tahun).

Dalam tahap ini kandidat doktor akan berdiskusi dengan pembimbing tentang disain awal senyawa *ionic liquid* turunan imidazol apa saja yang akan disintesis dan juga akan didiskusikan strategi sintesisnya. Selanjutnya kandidat doktor akan melakukan sintesis beberapa senyawa *ionic liquid* yang strukturnya telah disepakati. Senyawa *liquid ionic* yang diperoleh akan dikarakterisasi dengan metode spektroskopi untuk memverifikasi kesesuaian struktur hasil sintesi dan disain.

Untuk studi awal efek penggunaan *ionic liquid* pada aktivitas lipase halostabil yang pada studi sebelumnya diketahui memiliki stabilitas dan aktivitas yang baik dalam pelarut organik, pertama-tama akan dilakukan isolasi dan pemurnian lipase target dari bakteri halofilik isolat kawah lumpur Bleduk Kuwu. Lipase yang telah dimurnikan kemudian diuji aktivitasnya dengan kondisi tanpa kehadiran *ionic liquid* dan dengan kehadiran beberapa senyawa *ionic liquid* hasil sintesis sebagai kosolvent, pelarut murni dan sistem

dua fasa. Hasil dari studi awal ini akan diketahui senyawa *ionic liquid* manakah yang memberikan efek peningkatan aktivitas paling tinggi dan dalam kondisi apa (sebagai kosolvent, pelarut murni atau sitem dua fasa).

- **Tahap pengembangan** (1 tahun)

Senyawa *ionic liquid* hasil seleksi pada studi awal kemudian dioptimasi strukturnya lebih lanjut dengan menambahkan beberapa konstituen yang diperkirakan dapat meningkatkan kekuatan aktivasi terhadap lipase. Senyawa turunan ini kemudian dikarakterisasi strukturnya secara spektrofotometri.

- **Tahap lanjut** (1 tahun)

Senyawa *ionic liquid* hasil pengembangan dipelajari efeknya pada aktivitas lipase halostabil. Pada tahap ini efek yang dipelajari tidak hanya pada aktivitas, juga pada aspek stabilitasnya. Selain itu juga akan dipelajari efek penggunaan *ionic liquid* pada reaksi-reaksi esterfikasi pada biositensis biodisel.

Skema penyelesaian studi

Kandidat doktor program PMDSU ini akan menyelesaikan studinya dalam program 4 tahun:

- **Tahun 1.** Mahasiswa akan mengikuti semua perkuliahan program S2 reguler dengan fokus bidang biokimia. Selain itu mahasiswa juga akan diperkenalkan dengan permasalahan yang akan dihadapi dan bimbingan penulisan proposal. Pada tahun pertama ini juga mahasiswa akan mulai melakukan sintesis dan karakterisasi beberapa senyawa *ionic liquid* turunan imidazol.

- **Tahun 2.** Mahasiswa menyelesaikan sisa perkuliahan program S2. Untuk risetnya mahasiswa akan menyiapkan sampel lipase dengan mengisolasi langsung dari bakteri halofilik yang telah diisolasi sebelumnya dari sumber kawah lumpur Bleduk Kuwu. Senyawa *ionic liquid* yang diperoleh pada tahun pertama kemudian dipelajari efeknya terhadap aktivitas lipase. Hasil dari studi awal ini sudah dapat dipublikasikan di jurnal internasional.

- **Tahun 3.** Mahasiswa akan menyiapkan proposal untuk ujian kualifikasi dan proposal riset doktor berdasarkan hasil studi awal yang telah diperoleh pada jenjang S2. Mahasiswa akan mengikuti semua persyaratan akademik yang dimampatkan dalam dua semester. Pada tahun ini, mahasiswa akan mempelajari pengembangan disain molekular dari *ionic liquid* hasil studi awal agar memiliki kenaikan efek peningkatan aktivitas lipase tetapi tetap menjaga stabilitasnya.

- **Tahun 4.** *Ionic liquid* hasil pengembangan pada tahun ketiga dipelajari kembali efeknya pada aktivitas dan stabilitas lipase. Studi pengaruh kehadiran *ionic liquid* terhadap kinerja katalisis lipase pada reaksi produksi biodisel juga akan dipelajari. Hasil dari tahap ini akan dipublikasi pada jurnal internasional.

1.3 Indikator keberhasilan

No.	Indikator Keberhasilan	Deskripsi
1.	Keluaran (<i>output</i>) Hasil Riset	2 Jurnal internasional
2.	Dampak (<i>outcome</i>) Hasil Riset	Pemanfaatan hasil riset untuk prototipe industri
4.	Presentasi pada <i>international conference</i>	1 prosiding
6.	Networking nasional dan internasional	

1.4 Tim pembimbing dan kolaborator

Promotor: Dr. Rukman Hertadi

Ko-Promotor: 1. Dr. Deana Wahyuningrum

2 DESKRIPSI RISET I

KLONING DAN EKSPRESI OPERON POLI-3-HIDROKSIBUTIRAT (PHB) HALOMONAS ELONGATA KE DALAM *Escherica coli* UNTUK PRODUKSI BIOPLASTIK

2.1 Deskripsi singkat

Sebagian besar plastik diproduksi secara sintetis menyebabkan masalah lingkungan karena tidak mudah terdegradasi secara alamiah. Bioplastik yang merupakan poliester yang disintesis oleh bakteri dapat menjadi solusi alternatif untuk mengatasi dampak negatif plastik terhadap lingkungan. Bioplastik yang populer saat ini adalah polihidroksi alkanat (PHA) karena memiliki sifat fisikokimia yang mirip dengan plastik sintetis selain dari sifatnya yang dapat terdegradasi di alam. PHA umumnya memiliki bentuk (R)- β -hidroksi asam lemak, dimana poli 3-hidroksibutirat (PHB) adalah bentuk umum dari PHA. *Halomonas elongata* telah berhasil diidentifikasi sebelumnya merupakan salah satu produsen PHB. Kendala utama penggunaan bakteri produsen PHB alamiah adalah terbatasnya produksi PHB karena adanya enzim pendegradasi PHB yang juga dihasilkan bakteri tersebut. Hal ini menyebabkan biaya produksi PHB menggunakan bakteri produsen alamiah menjadi tidak ekonomis. Salah satu upaya untuk menekan biaya produksi adalah dengan mengklon gen pengkode enzim yang hanya terlibat dalam produksi PHB ke dalam bakteri yang tumbuh dengan cepat, yaitu *Eschericia coli*. Biosintesis PHB melibatkan tiga tahap reaksi yang dikatalisis oleh tiga enzim berbeda. Reaksi pertama dikatalisis oleh β -ketoasil CoA tiolase (dikode oleh gen *phbA*) yang berperan mengkondensasi dua molekul asetil-CoA menjadi asetoasetil-CoA. Reaksi kedua adalah reduksi asetoasetil-CoA menjadi (R)-3-hidroksibutiril-CoA oleh asetoasetil-CoA dehidrogenase (dikode oleh gen *phbB*). Reaksi terakhir adalah polimerisasi monomer (R)-3-hidroksibutiril-CoA menjadi PHB yang dikatalisis oleh P(3HB) polimerase (dikode oleh gen *phbC*). Ketiga gen ini berada dalam satu kluster gen yang disebut sebagai operon yang akan dikloning dari *Halomonas elongata*. Operon yang telah berhasil dikloning kemudian disisipkan ke dalam vektor ekspresi dan ditransfer ke *E. coli*. Selanjutnya PHB akan diproduksi dan dikarakterisasi secara spektroskopi untuk menentukan struktur PHB yang dihasilkan.

2.2 Roadmap riset program doktor

Tahapan	Periode			
	Tahun 1	Tahun 2	Tahun 3	Tahun 4
Tahap Lanjut				Produksi dan karakterisasi PHB dengan sistem ekspresi di <i>E. coli</i>
Tahap Pengembangan			Pengembangan sistem ekspresi dan produk gen <i>phbA</i> , <i>phbB</i> , dan <i>phbC</i> di <i>E. coli</i>	
Tahap awal	Kloning gen <i>phbA</i> , <i>phbB</i> , dan <i>phbC</i>	Validasi dan karakterisasi gen hasil kloning		

Penelitian ini akan dibagi ke dalam tiga tahap dalam waktu empat tahun, yang terdiri dari:

- **Tahap awal** (dua tahun).
 Dalam tahap ini kandidat doktor akan ditugaskan untuk mengidentifikasi keberadaan gen *phbA*, *phbB*, dan *phbC* dalam beberapa strain *Halomonas elongata* koleksi laboratorium biokimia ITB. Hasil identifikasi ini akan mendasari disain primer PCR dengan optimasi secara *in silico*. Primer yang telah didisain selanjutnya digunakan untuk mengkloning ketiga gen dengan teknik PCR. Gen yang berhasil dikloning kemudian ditentukan urutan nukleotidanya dan divalidasi secara *in silico* dengan teknik bioinformatika.
- **Tahap pengembangan** (1 tahun)
 Gen hasil kloning yang telah divalidasi kemudian akan ditransfer ke sistem ekspresi yang memudahkan untuk tahap pemurnian enzim hasil ekspresinya. Enzim yang diperoleh dari hasil ekspresi kemudian akan dikarakterisasi untuk diketahui kondisi optimum kerjanya.
- **Tahap lanjut** (1 tahun)
 Pada tahap selanjutnya akan dilakukan produksi poli-hidroksibutirat (PHB) secara *in vitro* menggunakan tiga enzim hasil ekspresi pada tahap sebelumnya. Optimasi produksi akan dilakukan dengan memvariasikan berbagai parameter fisik dan kimia.

Skema penyelesaian studi

Kandidat doktor program PMDSU ini akan menyelesaikan studinya dalam program 4 tahun:

- **Tahun 1.** Mahasiswa akan mengikuti semua perkuliahan program S2 reguler dengan fokus bidang biokimia. Selain itu mahasiswa juga akan diperkenalkan dengan permasalahan yang akan dihadapi dan bimbingan penulisan proposal. Pada tahun pertama ini juga mahasiswa akan mulai melakukan kloning gen *phbA*, *phbB*, dan *phbC*.

- **Tahun 2.** Mahasiswa menyelesaikan sisa perkuliahan program S2. Untuk risetnya mahasiswa akan melakukan validasi dan karakterisasi gen hasil kloning. Hasil pada tahap ini akan dipublikasikan pada jurnal internasional.
- **Tahun 3.** Mahasiswa akan menyiapkan proposal untuk ujian kualifikasi dan proposal riset doktor berdasarkan hasil studi awal yang telah diperoleh pada jenjang S2. Mahasiswa akan mengikuti semua persyaratan akademik yang dimampatkan dalam dua semester. Pada tahun ini, mahasiswa akan melakukan penelitian pada tahap ekspresi gen dan karakterisasi enzim hasil ekspresi.
- **Tahun 4.** Mahasiswa akan mulai menyiapkan draf disertasi dan melanjutkan penelitian di tahap produksi PHB dan karakterisasinya. Hasil pada tahap ini akan dipublikasikan pada jurnal internasional.

2.3 Indikator keberhasilan

No.	Indikator Keberhasilan	Deskripsi
1.	Keluaran (<i>output</i>) Hasil Riset	2 Jurnal internasional
2.	Dampak (<i>outcome</i>) Hasil Riset	Pemanfaatan hasil riset untuk prototipe industri
4.	Presentasi pada <i>international conference</i>	1 prosiding
6.	Networking nasional dan internasional	Universitas Kobe, Jepang

2.4 Tim pembimbing dan kolaborator

Promotor: Dr. Rukman Hertadi

Ko-Promotor: 1. Dr. Made Puspasari

2. Dr. Rachmawati