



**FORUM GURU BESAR**  
INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG



# **Orasi ilmiah Guru Besar Institut Teknologi Bandung**



## **EKSPLORASI HALOASAM DEHALOGENASE DARI BAKTERI ENDOGENUS INDONESIA**

**Profesor Enny Ratnaningsih**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Bandung**

**Aula Barat ITB  
27 Januari 2024**



Orasi Ilmiah Guru Besar  
Institut Teknologi Bandung

**EKSPLORASI HALOASAM  
DEHALOGENASE DARI BAKTERI  
ENDOGENUS INDONESIA**



Orasi Ilmiah Guru Besar  
Institut Teknologi Bandung

# **EKSPLORASI HALOASAM DEHALOGENASE DARI BAKTERI ENDOGENUS INDONESIA**

**Prof. Enny Ratnaningsih**

27 Januari 2024  
Aula Barat ITB



Hak cipta © pada penulis dan dilindungi Undang-Undang

Hak penerbitan pada ITB Press

Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh bagian dari buku ini tanpa izin dari penerbit

*Orasi Ilmiah Guru Besar Institut Teknologi Bandung:*

***EKSPLORASI HALOASAM DEHALOGENASE DARI BAKTERI ENDOGENUS  
INDONESIA***

Penulis : Prof. Enny Ratnaningsih

Reviewer : Prof. Dessy Natalia

Editor Bahasa : Rina Lestari

Cetakan I : 2024

ISBN : 978-623-297-382-4

e-ISBN : 978-623-297-383-1 (PDF)

**ITB PRESS**

© Gedung STP ITB, Lantai 1,  
Jl. Ganesa No. 15F Bandung 40132  
☎ +62 22 20469057  
🌐 www.itbpress.id  
✉ office@itbpress.id  
Anggota Ikapi No. 043/JBA/92  
APPTI No. 005.062.1.10.2018

*Genes are like the story, and  
DNA is the language that the story is written in.*

**-Sam Kean-**





# PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim. Puji syukur penulis panjatkan pada Allah Swt., yang telah memberikan waktu dan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan naskah ilmiah ini sebagai buku pegangan untuk orasi ilmiah yang diselenggarakan oleh Forum Guru Besar Institut Teknologi Bandung.

Penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada ketua dan sekretaris Forum Guru Besar Institut Teknologi Bandung, beserta semua pihak terkait yang telah memfasilitasi dan memberikan dukungan untuk terselenggaranya orasi ilmiah ini. Naskah berjudul 'Eksplorasi Haloasam Dehalogenase dari Bakteri Endogenus Indonesia' ini menyampaikan garis besar hasil penelitian untuk salah satu topik yang penulis tekuni selama menjalankan tugas Tri Dharma Perguruan Tinggi, sebagai dosen biokimia dan bioteknologi di Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.

Topik dehalogenase, dalam hal ini haloasam dehalogenase dari bakteri, merupakan salah satu fokus penelitian yang telah penulis lakukan bersama dengan mahasiswa tingkat sarjana dan pascasarjana, mengintegrasikan penelitian dengan kepentingan pembelajaran bagi para mahasiswa. Berbagai teknik laboratorium terkait kimia, biokimia, dan bioteknologi telah digunakan untuk memberikan pemahaman tentang struktur dan fungsi biomolekul. Hasil penelitian terkait haloasam dehalogenase ini telah banyak dipublikasikan di berbagai jurnal ilmiah bereputasi, baik di tingkat nasional maupun internasional. Pada kesempatan ini, penulis juga menyampaikan terima kasih kepada para mahasiswa yang telah berkontribusi pada keberhasilan penelitian dalam topik ini.

Haloasam dehalogenase merupakan kelompok enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan kovalen antara atom halogen dengan atom karbon dalam senyawa organik haloasam. Dalam kaitan ini, penulis telah mempelajari haloasam dehalogenase dari empat galur bakteri lokal. Untuk memfasilitasi pemahaman terkait posisi haloasam dehalogenase dibandingkan dehalogenase secara menyeluruh, maka uraian singkat tentang organohalogen dan dehalogenase disampaikan di bagian awal buku ini. Produksi dan penggunaan senyawa organohalogen yang dilakukan

masyarakat secara masif dan sifat toksik yang diakibatkan oleh limbah organohalogen, terutama senyawa organik haloasam, merupakan faktor pendorong bagi penulis untuk melakukan penelitian ini.

Uraian rinci terkait strategi dan alur logis tahap-tahap penelitian juga penulis sampaikan untuk salah satu bakteri yang diteliti. Hal ini dimaksudkan untuk memberikan gambaran yang lengkap terkait metode dan logika penggunaan berbagai metode terkait untuk memfasilitasi pencapaian tujuan dalam mempelajari keterkaitan struktur dan fungsi biomolekul, dari gen hingga protein.

Semoga naskah singkat ini dapat memberikan gambaran kepada masyarakat dan memicu para praktisi industri untuk mengolah limbah beracun senyawa organohalogen sebelum dibuang ke lingkungan, yang salah satunya dapat dilakukan melalui bioremediasi. Tulisan singkat ini juga diharapkan dapat memotivati para mahasiswa, baik di level sarjana maupun pascasarjana, untuk mulai memanfaatkan dan mengeksplorasi organisme endogenus Indonesia guna berkontribusi secara aktif pada pengembangan keilmuan dan mempromosikan pemanfaatan enzim sebagai biokatalis di berbagai bidang. Pengembangan dan penerapan ilmu kimia dan bioteknologi, penggunaan hasil-hasil penelitian untuk diterapkan di industri, penyelesaian permasalahan industri, dan pembuangan limbah industri secara aman ke lingkungan, merupakan aspek keluaran penting yang sangat diharapkan. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

Bandung, 27 Januari 2024

Penulis,  
Enny Ratnaningsih

# SINOPSIS

Naskah orasi ilmiah Forum Guru Besar Institut Teknologi Bandung ini menyampaikan garis besar hasil penelitian penulis selama menjalankan tugas sebagai dosen di kelompok keahlian Biokimia, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung. Topik dehalogenase, dalam hal ini haloasam dehalogenase dari bakteri, merupakan salah satu fokus penelitian yang telah penulis lakukan selama hampir 30 tahun, bersama dengan banyak mahasiswa tingkat sarjana dan pascasarjana. Hasil penelitian terkait haloasam dehalogenase ini telah banyak dipublikasikan dalam berbagai jurnal ilmiah bereputasi, baik di level nasional maupun internasional.

Organohalogen, merupakan senyawa organik yang minimal mempunyai satu atom halogen yang terikat secara kovalen pada atom karbon dalam molekul. Senyawa ini dapat terbentuk secara alami, mempunyai beragam sifat fisik, dan menunjukkan berbagai aktivitas biologi yang menguntungkan manusia. Oleh sebab itu, seiring dengan perkembangan dan kemajuan peradaban kehidupan manusia, organohalogen juga disintesis secara masif untuk memenuhi kebutuhan komersial dan menunjang kesejahteraan kehidupan manusia. Data yang ada menunjukkan bahwa sintesis organohalogen dan ragam penggunaannya dalam kehidupan manusia, semakin hari semakin luas dan selalu meningkat dari waktu ke waktu. Fakta ini mengakibatkan melimpahnya limbah dan sampah organohalogen yang dibuang ke lingkungan.

Senyawa organohalogen, terutama organohalogen sintesis, banyak yang bersifat toksik, bioakumulatif, memberikan efek negatif bagi kesehatan, sulit didegradasi, dan membahayakan kehidupan dalam jangka panjang. Senyawa ini digolongkan sebagai antropogenik, polutan, dan xenobiotik. Efek negatif yang ditimbulkan oleh organohalogen sangat bervariasi bergantung pada struktur, sifat, dan kadar senyawa yang berkontak dengan manusia. Sebagian besar senyawa organohalogen dapat menyebabkan iritasi, bersifat neurotoksik, imunotoksik, teratogenik, dan bahkan karsinogenik.

Data yang ada menunjukkan bahwa di daerah yang terkontaminasi organohalogen ternyata bisa ditemukan organisme yang mampu beradaptasi

dengan sifat racunnya dan mampu mendegradasi, mentransformasi, atau memineralisasi organohalogen menjadi senyawa lain yang lebih sederhana dan aman bagi lingkungan dan kehidupan. Organisme-organisme ini diketahui menghasilkan dehalogenase, suatu kelompok enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan kovalen antara atom karbon dan atom halogen, sehingga mengubah atau mendegradasi organohalogen menjadi senyawa lain yang tidak beracun. Dengan demikian, organisme penghasil dehalogenase sangat potensial untuk digunakan dalam bioremediasi organohalogen.

Haloasam dehalogenase merupakan salah satu kelompok dehalogenase yang mengkatalisis degradasi senyawa organohalogen golongan haloasam, menghasilkan asam hidroksi karboksilat dan ion halida. Seperti halnya enzim-enzim lain, haloasam dehalogenase bekerja secara spesifik pada substrat haloasam tertentu. Dalam kelompok ini, 2-haloasam dehalogenase yang dihasilkan oleh bakteri merupakan enzim yang paling banyak dipelajari. Istimewanya, enzim ini bekerja secara stereospesifik, sehingga selain untuk bioremediasi, 2-haloasam dehalogenase juga berpotensi untuk digunakan dalam sintesis kimia yang memerlukan stereoselektifitas. Variasi mekanisme katalisis oleh enzim ini di tingkat molekul telah dipelajari secara ekstensif.

Analisis di level gen dan struktur molekul protein 2-haloasam dehalogenase juga telah banyak dilaporkan, termasuk berbagai modifikasi residu asam amino dalam molekul enzim, yang umumnya dilakukan untuk mempelajari cara kerja enzim dalam memutuskan ikatan kovalen antara atom karbon dan atom halogen dalam substrat 2-haloasam secara enzimatik untuk mendukung upaya peningkatan kinerja enzim. Dalam buku orasi ilmiah ini penulis melaporkan hasil-hasil penelitian menggunakan berbagai teknik mutakhir bioteknologi untuk mempelajari 2-haloasam dehalogenase dari 4 bakteri endogenus Indonesia, yaitu *Bacillus cereus* IndB1, *Pseudomonas aeruginosa* ITB1, *Klebsiella pneumoniae* ITB1, dan *Pseudomonas putida*. Urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase dari tiga bakteri yang dipelajari telah didokumentasikan dalam GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dengan kode akses KU498039.1 untuk *Bacillus cereus* IndB1, kode akses KX898150.1 untuk *Klebsiella pneumoniae* ITB1, dan kode akses OK203790.1 untuk *Pseudomonas aeruginosa* ITB1. Urutan asam amino dalam protein haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1 dapat dilihat dengan kode akses AQT27349.1.

Buku ini menyampaikan hasil pekerjaan yang mengintegrasikan penelitian dengan pembelajaran. Bagian awal buku ini menguraikan berbagai aspek terkait senyawa haloasam, terutama terkait penggunaan dan dampak yang dapat ditimbulkannya. Sesuai dengan profesi penulis sebagai dosen, maka peran ilmu kimia, biokimia, dan bioteknologi dalam mengantisipasi dampak yang ditimbulkan oleh penggunaan haloasam juga diuraikan secara singkat. Salah satu upaya yang banyak diadopsi untuk mengatasi dampak negatif yang ditimbulkan oleh haloasam adalah memanfaatkan dehalogenase. Oleh sebab itu, uraian terkait berbagai aspek tentang dehalogenase, khususnya haloasam dehalogenase, juga disampaikan. Selanjutnya, penulis menyampaikan hasil-hasil penelitian untuk mempelajari haloasam dehalogenase dari empat bakteri endogenus Indonesia. Uraian rinci terkait strategi, alur logis, dan hasil-hasil yang telah diperoleh disampaikan hanya untuk satu bakteri saja, dimaksudkan untuk memberikan gambaran riil tentang tahap-tahap pekerjaan yang dilakukan. Pekerjaan dan hasil-hasil untuk tiga bakteri lainnya disampaikan secara singkat, dengan tetap menyampaikan perbedaan strategi yang telah dilakukan. Secara keseluruhan, buku ini memberikan gambaran tentang adopsi berbagai metode kimia, biokimia, dan bioteknologi untuk mempelajari haloasam dehalogenase.

Uraian singkat dalam buku ini diharapkan dapat memberikan gambaran dan motivasi kepada semua pihak untuk memanfaatkan biodiversitas dan kekayaan alam Indonesia dalam menunjang pengembangan ilmu pengetahuan dan industri. Buku ini juga diharapkan dapat memberikan gambaran kepada para praktisi industri tentang pentingnya pengolahan limbah, salah satunya melalui bioremediasi, untuk mengurangi tingkat pencemaran lingkungan akibat senyawa organohalogen.



# DAFTAR ISI

PRAKATA.....	vii
SINOPSIS .....	ix
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL.....	xix
1 Pendahuluan .....	1
1.1 Organohalogen .....	1
1.2 Efek Penggunaan Organohalogen .....	2
1.3 Peran Ilmu Kimia dan Bioteknologi .....	5
2 Organohalogen dan dehalogenase.....	9
2.1 Klasifikasi Organohalogen dan Dehalogenase .....	9
2.2 Haloasam dan Haloasam Dehalogenase .....	13
2.3 Mekanisme Katalisis dan Karakteristik Struktur 2-Haloasam Dehalogenase .....	17
3 Haloasam dehalogenase dari bakteri endogenus indonesia.....	23
3.1 <i>Bacillus cereus</i> IndB1 .....	23
3.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ITB1 .....	45
3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ITB1 .....	54
3.4 <i>Pseudomonas putida</i> .....	66
4 Penutup.....	73
5 Ucapan Terima Kasih.....	75
DAFTAR PUSTAKA.....	79
CURRICULUM VITAE.....	101





# DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Struktur molekul vankomisin. ....	3
Gambar 2	Struktur molekul DDT ( <i>dichlorodiphenyltrichloroethane</i> ) dan PCB ( <i>polichlorinated biphenyl</i> ). ....	5
Gambar 3	Struktur molekul (a) asam trikloroasetat (TCA), (b) asam-2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D), dan (c) asam monokloroasetat (MCA). ....	14
Gambar 4	Reaksi yang dikatalisis oleh 2-haloasam dehalogenase tipe inversi .....	18
Gambar 5	Mekanisme katalisis oleh 2-haloasam dehalogenase Grup I. ....	19
Gambar 6	Mekanisme katalisis oleh 2-haloasam dehalogenase Grup II. ....	20
Gambar 7	Penggabungan dua struktur molekul 2-haloasam dehalogenase Grup I. ....	21
Gambar 8	Struktur dimer dan penggabungan dua struktur molekul 2-haloasam dehalogenase Grup II. ....	21
Gambar 9	Elektroforegram gen haloasam dehalogenase putatif dari <i>B. cereus</i> IndB1 (a) dan peta restriksi plasmid rekombinan pGEMT- <i>bcd1</i> (b). M = standar DNA sebagai marker, HA = gen putatif haloasam dehalogenase <i>bcd1</i> = nama gen pengkode haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1. ....	26
Gambar 10	Peta restriksi plasmid rekombinan pET- <i>bcd1</i> (b) dan elektroforegram hasil re-PCR menggunakan pasangan primer F1 dan R3 (a). ....	27
Gambar 11	Zimogram produk <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET- <i>bcd1</i> dengan substrat MCA dan perendaman dengan AgNO <sub>3</sub> . ....	28
Gambar 12	Urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase ( <i>bcd1</i> ) dari <i>B. cereus</i> IndB1 .....	29
Gambar 13	Urutan asam amino haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1 ( <i>Bcd1</i> ) yang dideduksi dari urutan nukleotida <i>bcd1</i> . ....	29
Gambar 14	Reaksi pembentukan kompleks besi(III) tiosianat .....	31

Gambar 15	Elektroforegram SDS-PAGE untuk berbagai fraksi protein yang dihasilkan oleh klon rekombinan <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET- <i>bcd1</i> . .....	33
Gambar 16	Prediksi struktur tersier haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1. ....	35
Gambar 17	Perbandingan struktur tersier tiga haloasam dehalogenase. ....	38
Gambar 18	Penyejajaran sisi aktif Bcd1 (biru) dengan L-DEX YL (merah) dari <i>Pseudomonas</i> sp YL dan ps-2-HAD (abu-abu) dari <i>Pseudomonas syringae</i> . ....	39
Gambar 19	Skema interaksi antara residu asam amino dalam sisi aktif Bcd1 dengan ligan asam 2-kloroalkanoat. ....	42
Gambar 20	Variasi jenis dan jumlah atom halogen pada substrat asam-2-haloalkanoat untuk haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1. ....	44
Gambar 21	Skor doking untuk 12 jenis substrat asam haloasetat dengan haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1. Sumber: Aridayani, 2022. ....	45
Gambar 22	Urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase ( <i>hakp1</i> ) dari <i>K. pneumonia</i> ITB1. ....	48
Gambar 23	Kurva kontur konsentrasi ion Cl <sup>-</sup> sebagai fungsi suhu induksi dan konsentrasi IPTG (a), suhu induksi dan waktu induksi (b), serta waktu induksi dan konsentrasi IPTG (c). ....	52
Gambar 24	Kurva kontur prediksi konsentrasi ion Cl <sup>-</sup> sebagai fungsi suhu induksi dan konsentrasi IPTG (a), suhu induksi dan waktu induksi (b), serta waktu induksi dan konsentrasi IPTG (c). ....	53
Gambar 25	Kurva optimasi untuk suhu induksi (°C), waktu induksi (jam), dan konsentrasi IPTG (mM) pada produksi haloasam dehalogenase oleh klon rekombinan <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET- <i>hakp1</i> dinyatakan sebagai konsentrasi ion Cl <sup>-</sup> dalam campuran reaksi. ....	54
Gambar 26	Urutan nukleotida gen <i>paed-d</i> dalam plasmid rekombinan pET/ <i>paed-d</i> (disebut sebagai <i>paed-d</i> subclone) dan dalam pGEM/ <i>paed-d</i> (disebut sebagai <i>paed-d</i> ). ....	58

Gambar 27	Perbandingan struktur primer Paed-d terhadap haloasam dehalogenase dari <i>P. aeruginosa</i> dengan kode akses 3UMC_A dan prediksi struktur sekunder Paed-d dari <i>P. aeruginosa</i> ITB1. ....	61
Gambar 28	Prediksi struktur tersier haloasam dehalogenase dari <i>P. aeruginosa</i> ITB1 (a) dan gambaran residu asam amino penting dalam sisi aktifnya (b).....	62
Gambar 29	Visualisasi LigPlot MCA-Paed-d-WT (a) dan MCA-Paed-d-D7A (b).....	63
Gambar 30	Urutan nukleotida gen <i>paed-d</i> dan gen <i>paed-d</i> hasil mutasi serta urutan asam amino Paed-d-WT dan Paed-d-D7A hasil deduksi.....	65
Gambar 31	Penyejajaran struktur HAD3 dan HAD5 dengan 1JUD (L-haloasam dehalogenase dari <i>Pseudomonas</i> sp. YL). Sumber: Kelvin, 2021.....	70



# DAFTAR TABEL

Tabel 1	Pengelompokan dehalogenase berdasarkan gugus alkil dalam substratnya. ....	11
Tabel 2	Beberapa mikroorganisme penghasil dehalogenase dan spesifisitas katalisisnya. ....	12
Tabel 3	Genus bakteri dan genus jamur penghasil 2-haloasam dehalogenase. ....	16
Tabel 4	Rancangan primer untuk isolasi gen pengkode haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1. ....	25
Tabel 5	Skor untuk profil tiga dimensi dan evaluasi aspek geometri pada enam model struktur tersier haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1. ....	36
Tabel 6	Nilai energi afinitas interaksi haloasam dehalogenase dari <i>B. cereus</i> IndB1 dengan asam 2-khloroalkanoat pada pose terbaik. ....	41
Tabel 7	Rentang variabel dalam optimasi produksi haloasam dehalogenase dari klon rekombinan <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET- <i>hakp1</i> . ....	51
Tabel 8	Nilai skor-C hasil pemodelan HAD menggunakan I-TASSER. ....	68
Tabel 9	Hasil doking beberapa substrat asam khloroalkanoat terhadap HAD3 dan HAD5. ....	71



# 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Organohalogen

Organohalogen merupakan senyawa organik yang molekulnya mengandung minimal satu atom halogen, umumnya berupa fluor (F), khlor (Cl), brom (Br), atau iod (I). Organohalogen yang mengandung F disebut sebagai organofluorida, yang mengandung Cl disebut organokhlorida, yang mengandung Br merupakan organobromida, dan yang mengadung I disebut sebagai organoiodida. Organohalogen mempunyai variasi struktur yang sangat beragam, dengan sifat fisik yang juga beragam, dan banyak di antaranya yang mempunyai aktivitas biologis tertentu. Senyawa ini banyak digunakan untuk memenuhi berbagai kebutuhan manusia, mulai dari pertanian, farmasi, elektronik, plastik, peralatan rumah tangga, pelarut, dan berbagai keperluan lain dalam industri.

Organohalogen dapat terbentuk secara alami, baik melalui proses abiogenik maupun biogenik. Senyawa ini banyak dihasilkan oleh proses dalam gunung berapi, terbentuk saat kebakaran hutan, dan dihasilkan secara geogenik pada berbagai proses geotermal (Gribble, 2010). Dalam kaitan ini, organohalogen merupakan senyawa yang terlibat dalam siklus halogen di udara, darat, dan air. Selain itu, hampir semua organisme hidup juga menghasilkan organohalogen, mulai dari bakteri, jamur, tanaman, insekta, hewan tingkat tinggi, hingga manusia (Gribble, 2004a).

Organisme laut merupakan penghasil alami utama yang memproduksi organohalogen. Organohalogen banyak ditemukan sebagai metabolit utama dan metabolit sekunder dalam berbagai jalur metabolisme organisme laut (Carrol *et al.*, 2021; Al-Adilah *et al.*, 2022). Air laut mengandung khlor dan brom dalam konsentrasi tinggi, sehingga organisme laut cukup mudah untuk mengambil dan memasukkan halogen ini ke dalam berbagai jalur metabolismenya. Pada organisme laut, organohalogen umumnya memegang peran penting dalam mekanisme pertahanan hidup. Pada organisme tingkat tinggi, organohalogen menunjukkan sifat sebagai antivirus, antibakteri, antijamur, antiserangga, dan antikanker, selain juga berperan sebagai hormon dan feromon. Berbagai variasi bioaktivitas senyawa organohalogen ini telah memicu banyak studi dan penelitian untuk memanfaatkan

organohalogen dalam dunia pertanian, farmasi, dan kedokteran (Gribble, 2004b).

Organohalogen sangat menarik untuk dipelajari, karena senyawa ini mempunyai sifat fisik dan sifat kimia yang banyak memberikan manfaat untuk meningkatkan kualitas hidup manusia. Eksplorasi, identifikasi, dan karakterisasi organohalogen sebagai bahan alam, terus menerus dilakukan. Pada tahun 1968, dikenal hanya sekitar 25 senyawa organohalogen alami, namun saat ini telah dikenal lebih dari 8000 senyawa organohalogen, sebagian besar merupakan organoklorida dan organobromida (Gribble, 2023).

Sejalan dengan kemajuan industri, dan didorong oleh banyaknya variasi struktur organohalogen yang masing-masing menawarkan manfaat istimewa dalam meningkatkan kualitas hidup manusia, senyawa organohalogen juga marak disintesis untuk memenuhi kebutuhan komersial. Sayangnya, introduksi senyawa organohalogen sintesis ini telah memicu banyak masalah lingkungan karena organohalogen sintesis bersifat persisten di lingkungan, sulit didegradasi, dan bersifat racun bagi makhluk hidup

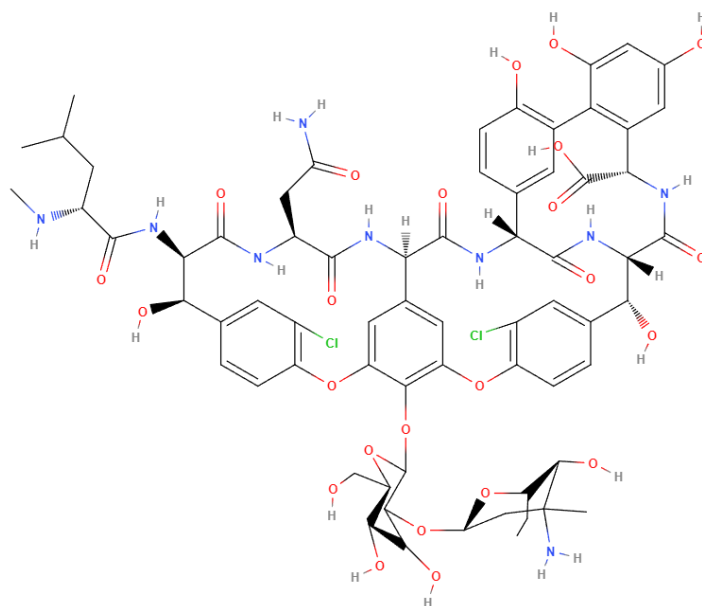
Organohalogen dikenal sebagai antropogenik, istilah untuk menyatakan aktivitas manusia, baik sengaja maupun tidak sengaja, yang dilakukan secara terus menerus sehingga memberikan dampak buruk bagi masyarakat karena memicu atau mempercepat terjadinya bencana (Gill dan Malamud, 2017). Sintesis dan penggunaan organohalogen secara masif telah menyebabkan polusi serius pada lingkungan. Oleh sebab itu, sintesis organohalogen dan penggunaannya perlu mempertimbangkan keseimbangan antara keuntungan yang diperoleh dengan kemungkinan efek negatif yang ditimbulkannya terhadap lingkungan (Gribble 2010).

## 1.2 Efek Penggunaan Organohalogen

Produksi berbagai senyawa organohalogen ditengarai selalu meningkat setiap tahun, terutama karena penggunaannya yang semakin beragam dan semakin luas. Saat ini, organohalogen banyak digunakan sebagai biosida, pestisida, herbisida, bahan pemlastis, prekursor, bahan dasar pembuatan polimer, obat-obatan, pelarut, zat penahan api (*flame retardants*) pada bahan polimer, pewarna tekstil, pewarna cat, dan sebagai bahan pembersih atau pemutih (Ameen *et al*, 2021). Plastik berbahan dasar organohalogen banyak digunakan



dalam berbagai peralatan modern, termasuk peralatan rumah tangga. Organohalogen dengan aktivitas biologis tertentu banyak digunakan dalam dunia kedokteran sebagai obat-obatan. Salah satu contohnya adalah vankomisin, dengan struktur yang ditunjukkan dalam Gambar 1, merupakan senyawa organohalogen yang digunakan sebagai antibiotik dengan spektrum luas, telah digunakan selama hampir 70 tahun. Hingga saat ini, vankomisin dan turunannya masih banyak digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit infeksi.



**Gambar 1** Struktur molekul vankomisin.

Setiap tahun selalu ditemukan senyawa organohalogen baru dengan fungsi spesifik yang lebih menguntungkan, sehingga memicu produksi dan kreasi penggunaannya. Penggunaan organohalogen secara masif dalam memenuhi kebutuhan hidup manusia berakibat meningkatnya jumlah sampah organohalogen yang dibuang ke lingkungan, sehingga sumbangan organohalogen sebagai polutan di lingkungan menjadi sangat signifikan. Organohalogen merupakan polutan terbesar di ekosistem hidrosfer dan atmosfer (Rompp *et al.*, 2001), dan juga di ekosistem tanah.

Keberadaan limbah organohalogen di lingkungan memberikan efek negatif bagi kesehatan makhluk hidup, termasuk manusia. Limbah organohalogen digolongkan sebagai xenobiotik karena bersifat racun, persisten atau sulit didegradasi (Atashgasi *et al.*, 2018). Limbah organohalogen

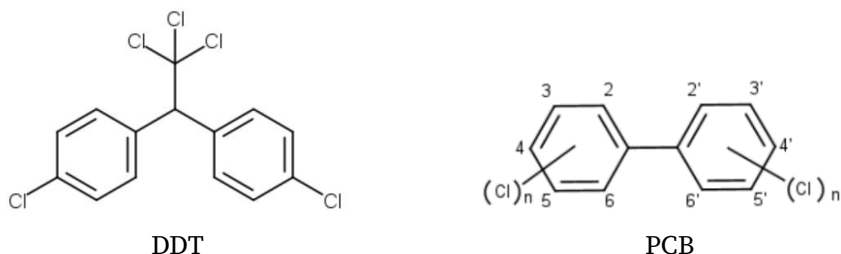
juga digolongkan sebagai antropogenik, karena dalam jangka panjang dapat memberikan efek negatif pada kesehatan manusia.

Organohalogen dapat masuk ke tubuh manusia melalui berbagai jalur, antara lain akibat kontak secara langsung melalui kulit, terhisap melalui pernafasan, atau tertelan melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi. Sebagian besar senyawa organoklorida diketahui bersifat neurotoksik, imunotoksik, karsinogenik, menimbulkan efek negatif pada proses reproduksi, endokrin, dan berdampak pada perubahan perilaku satwa liar serta manusia (Loganathan dan Kodavanti, 2016). Beberapa senyawa organohalogen juga bersifat sebagai teratogenik dan mutagenik (Zhang *et al.*, 2021).

Sebagai contoh, bioakumulasi dan kontaminasi PCBs (*polychlorinated biphenyl*) di lingkungan telah menyebabkan keracunan dan munculnya berbagai penyakit kulit ekstrem pada manusia, bahkan mengakibatkan kematian (Akahane *et al.*, 2018). PCBs merupakan senyawa organoklorida yang mempunyai rumus kimia  $C_{12}H_{10-x}Cl_x$  dengan  $x$  adalah jumlah Cl dalam molekul. PCBs banyak diproduksi oleh industri, digunakan secara luas sebagai cairan dielektrik, bahan pendingin pada peralatan listrik, digunakan pada kertas penyalin tanpa karbon, dan merupakan cairan untuk transfer panas pada berbagai peralatan industri. Struktur molekul PCBs ditunjukkan pada Gambar 2.

Senyawa organohalogen lain yang banyak ditemukan di lingkungan adalah DDT (*dichlorodiphenyltrichloroethane*) dengan rumus kimia  $C_{14}H_9Cl_5$ . Senyawa ini digunakan secara ekstensif sebagai pestisida untuk mengatasi hama insekta dalam pertanian. DDT juga banyak digunakan untuk membasmi nyamuk yang mengakibatkan wabah malaria di berbagai negara saat perang dunia II (Dagen, 2020). Namun, DDT ditengarai bersifat persisten dan sulit didegradasi, sehingga residu DDT banyak ditemukan di tanah dan perairan. Di samping itu, DDT juga dapat terakumulasi pada jaringan tubuh hewan dan manusia. DDT, dan juga senyawa organohalogen lain, diketahui bersifat lipofil sehingga banyak terbawa pada berbagai produk hewani, termasuk daging, minyak hewan, ikan, susu, dan telur (Junque *et al.*, 2017). Hewan yang hidup di perairan yang terkontaminasi DDT ditengarai mengalami kegagalan untuk bereproduksi (Beckvar dan Lotufo, 2011), dan hal serupa dikhawatirkan juga dapat terjadi pada manusia. DDT ternyata juga ditransfer dari ibu hamil

kepada bayi yang dikandungnya dan mengakibatkan antropometrik, yakni bayi yang dilahirkan mempunyai berat yang jauh lebih besar dan ukuran yang jauh lebih panjang dibandingkan bayi normal (Bravo *et al.*, 2019). Struktur molekul DDT ditunjukkan pada Gambar 2.



**Gambar 2** Struktur molekul DDT (*dichlorodiphenyltrichloroethane*) dan PCB (*polichlorinated biphenyl*).

Sejak tahun 2001, penggunaan senyawa organohalogen yang membahayakan makhluk hidup, termasuk PCBs dan DDT, sudah dilarang di banyak negara maju (Stockholm Convention, 2001), bahkan sintesis DDT sudah ditekan sejak tahun 1976. Namun, permasalahan polutan organohalogen masih berlanjut hingga sekarang. Residu organohalogen masih ditemukan di lingkungan dalam konsentrasi cukup tinggi, dan pengaruh negatif polutan ini pada hewan dan manusia juga masih terdeteksi. Fakta ini disebabkan karena sifat persisten organohalogen yang ekstrim, sehingga residunya tetap berada di lingkungan hingga jangka waktu lama. Residu organohalogen bahkan juga teridentifikasi di negara atau daerah yang sama sekali tidak menggunakan senyawa terkait, karena organohalogen dapat terbawa melalui udara dan air, sehingga permasalahan polutan ini menjadi permasalahan global.

### 1.3 Peran Ilmu Kimia dan Bioteknologi

Perkembangan kehidupan masyarakat modern selalu membutuhkan banyak material baru dengan sifat yang unik dan mendukung kebutuhan kehidupan modern yang umumnya lebih praktis dan serba cepat, termasuk untuk melawan dan mengobati infeksi virus dan bakteri yang selalu bermutasi dan menjadi resisten terhadap antibiotik yang ada. Penelitian untuk mengeksplorasi dan mengidentifikasi organohalogen dari berbagai sumber alam, masih terus dilakukan. Data yang ada menunjukkan bahwa setiap tahun ditemukan sekitar 100 hingga 200 senyawa organohalogen baru dari alam

(Gribble, 2004b), banyak di antaranya yang mempunyai bioaktivitas tertentu, terutama organohalogen yang ditemukan dari organisme laut (Gribble, 2015; Yamazaki, 2022).

Sintesis kimia untuk mendapatkan senyawa organohalogen baru dengan sifat fisik unggul yang mendukung kehidupan manusia modern juga marak dilakukan. Berbagai metode sintesis kimia dengan bantuan alat-alat modern telah diterapkan untuk mendapatkan senyawa organohalogen baru dengan sifat fisik dan bioaktivitas yang diinginkan. Keberhasilan sintesis senyawa turunan polihaloakridon yang berpotensi sebagai antikanker telah dilaporkan (Huang *et al.*, 2015).

Introduksi senyawa organohalogen sintetis dalam kehidupan manusia ternyata menimbulkan masalah baru bagi lingkungan karena organohalogen sintesis umumnya bersifat persisten, tetap berada di lingkungan dalam jangka waktu lama (Kirkinci *et al.*, 2021). Sampah organohalogen sebenarnya dapat didegradasi secara alami melalui fotodegradasi oleh cahaya matahari atau dibiodegradasi oleh berbagai mikroorganisme yang terdapat secara alami di lingkungan. Sayangnya, proses ini memerlukan waktu yang cukup lama dan tidak dapat mengatasi sampah organohalogen yang bervariasi dengan jumlah yang selalu meningkat. Beberapa jenis organohalogen sintetis, terutama yang mempunyai struktur sangat kompleks, bahkan tidak dapat didegradasi sama sekali. Dalam kaitan ini, ilmu kimia diperlukan untuk dapat mengembangkan cara-cara tertentu yang efisien, aman, dan murah untuk mengubah organohalogen menjadi senyawa lain yang tidak beracun dan tidak berbahaya bagi makhluk hidup. Untuk itu, sintesis senyawa organohalogen baru perlu selalu diimbangi dengan strategi untuk mendegradasi senyawa tersebut kembali menjadi komponen-komponen kimia yang tidak membahayakan lingkungan.

Upaya yang juga banyak dikembangkan untuk mengatasi polutan organohalogen adalah bioremediasi. Bioremediasi organohalogen merupakan proses penggunaan mikroorganisme yang mampu mendegradasi atau mentransformasi senyawa organohalogen menjadi senyawa lain yang lebih sederhana, tidak beracun, dan lebih aman bagi lingkungan (Kimoto *et al.*, 2010). Mikroorganisme ini secara sengaja ditambahkan pada media yang mengandung polutan organohalogen. Dibandingkan dengan cara kimia atau fisika, bioremediasi merupakan proses yang lebih ramah lingkungan dan

lebih aman untuk membersihkan lingkungan dari polutan (Kumar *et al.*, 2018). Mikroorganisme yang dapat memanfaatkan senyawa organohalogen sebagai sumber karbon dalam proses metabolismenya dan menyisakan senyawa dalam bentuk yang tidak membahayakan lingkungan diketahui menghasilkan dehalogenase. Oleh sebab itu, eksplorasi dehalogenase merupakan aspek penting yang perlu terus dikembangkan.

Kemampuan mikroorganisme untuk mendegradasi organohalogen dapat ditingkatkan melalui berbagai cara. Bioteknologi dapat diterapkan untuk mengaklimatisasi mikroorganisme pada lingkungan yang mengandung senyawa organohalogen, yang kemungkinan dapat menginduksi dan meningkatkan kemampuan mikroorganisme terkait untuk mendegradasi senyawa organohalogen tersebut. Beberapa mikroorganisme diketahui melakukan dehalogenasi untuk mendapatkan energi dari proses tersebut dan hal ini merupakan salah satu aspek penting dalam siklus karbon (Yang *et al.*, 2020). Dalam kaitan ini, proses dehalogenasi dapat terjadi karena organohalogen bertindak sebagai akseptor elektron pada sistem respirasi anaerob. Penambahan glukosa bersama substrat organohalogen sering kali diperlukan untuk memicu pertumbuhan mikroorganisme dan meningkatkan efisiensi degradasi (Zhu *et al.*, 2023).

Bioteknologi juga menawarkan penerapan teknologi DNA rekombinan untuk merekayasa gen, termasuk gen yang mengkode dehalogenase, guna meningkatkan produksi enzim atau meningkatkan aktivitas enzim terkait. Beberapa tahapan yang dilakukan antara lain isolasi gen, kloning, subkloning, dan rekayasa gen dalam klon rekombinan untuk mendapatkan enzim dengan fungsi dan karakteristik tertentu sesuai keinginan. Gen termaksud dapat diperoleh dari organisme yang memang diketahui mampu mendegradasi organohalida, meskipun dengan kemampuan yang sangat rendah. Gen tersebut kemudian dapat diklon, dimodifikasi, dan diekspresikan dalam sel inang lain yang berbeda. Kestabilan dan kemampuan klon rekombinan untuk mendegradasi senyawa organohalogen pada berbagai kondisi, termasuk pH dan temperatur, kemudian dapat dipelajari dan dimodifikasi lebih lanjut.

Berbagai gen dehalogenase telah berhasil diklon dan spesifitasnya terhadap substrat juga telah dipelajari. Baru-baru ini dilaporkan bahwa sekelompok mikroorganisme yang tidak dapat dikultur secara individu telah

ditemukan di tanah yang terkontaminasi organohalogen, dan dilaporkan bahwa 6 gen pengkode dehalogenase telah berhasil diisolasi dalam studi metagenomik (Lomza *et al.*, 2023). Keberhasilan ini memberikan peluang untuk mendapatkan gen-gen dehalogenase baru guna mendegradasi berbagai variasi senyawa organohalogen yang terus bertambah, baik jenis maupun jumlahnya.

Di lain pihak, bioteknologi di level protein juga menawarkan berbagai cara sintesis bahan kimia baru dengan memanfaatkan enzim, termasuk enzim yang dihasilkan oleh organisme rekombinan hasil rekayasa genetika. Perkembangan pengetahuan terkait produksi enzim, pemurnian enzim, imobilisasi enzim, inhibisi enzim, koenzim dan regenerasinya, serta rekayasa enzim telah membuka berbagai bidang baru yang sangat menarik terkait aplikasi enzim di berbagai industri. Dalam kaitan ini, kerja dehalogenase dengan stereoselektivitas yang tinggi telah menarik banyak perhatian dalam dunia sintesis kimia. Baru-baru ini telah dilaporkan sintesis senyawa khiral turunan oxazolidinon menggunakan katalis halohidrin dehalogenase (Zhou *et al.*, 2023). Oxazolidinon merupakan kelompok obat antibiotik baru yang mulai digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab infeksi serius pada kulit, sering kali digunakan saat antibiotik lain dinyatakan tidak berfungsi.

## 2 ORGANOHALOGEN DAN DEHALOGENASE

### 2.1 Klasifikasi Organohalogen dan Dehalogenase

Organohalogen dan dehalogenase merupakan pasangan substrat dan enzim yang mengkatalisis proses dehalogenasi substrat tersebut. Suatu badan internasional yang mengklasifikasi enzim dengan memberikan nomor secara berseri adalah *Enzyme Commission* (EC). Daftar EC telah mencakup lebih dari 6500 enzim dengan variasi fungsi biokimia yang telah dipublikasikan oleh para peneliti dalam berbagai jurnal ilmiah internasional. Jenis reaksi kimia yang dikatalisis oleh enzim-enzim ini dikelompokkan sebagai nomor pada digit pertama. Jenis ikatan kimia dan senyawa kimia yang mencerminkan kerja katalisis enzim ditunjukkan sebagai digit kedua dan ketiga. Digit keempat dalam penomoran EC menunjukkan spesifitas enzim.

Dalam buku ikhtisar Brenda (*Braunschweig Enzyme Database*) yang baru diperbaharui pada tahun 2023, dehalogenase digolongkan sebagai EC 3.8.1, yakni enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pada pemutusan ikatan kovalen antara atom karbon dan atom halogen pada senyawa organohalogen. Klasifikasi dehalogenase dalam ikhtisar Brenda adalah sebagai berikut:

3 hidrolase

3.8 enzim bekerja pada ikatan halida

3.8.1 enzim aktif terhadap senyawa karbon-halida

3.8.1.1 alkilhalidase

3.8.1.2 (S)-2-haloasam dehalogenase

3.8.1.3 haloasetat dehalogenase

3.8.1.4 tiroksin deiodinase

3.8.1.5 haloalkana dehalogenase

3.8.1.6 4-klorobenzoat dehalogenase

3.8.1.7 4-klorobenzoil-KoA dehalogenase

3.8.1.8 atrazine klorohidrolase

3.8.1.9 (R)-2-haloasam dehalogenase

3.8.1.10 2-haloasam dehalogenase (inversi konfigurasi) pada asam (S)- dan (R)-2-haloalkanoat

3.8.1.11 2-haloasam dehalogenase (retensi konfigurasi)

3.8.1.B1 2-haloakrilat hidratase

Dalam beberapa kasus, enzim dengan karakteristik yang berbeda bisa saja masuk ke dalam kelompok yang sama, karena ikhtisar yang disampaikan disusun berdasarkan ribuan publikasi yang ada. Oleh sebab itu, untuk mempelajari fungsi biokimia suatu enzim tertentu secara lebih detail, maka tetap harus mengacu pada artikel asli terkait enzim tersebut.

Sebagai contoh, haloalkana dehalogenase (EC 3.8.1.5), merupakan enzim yang mengkatalisis proses hidrolisis ikatan kovalen antara atom karbon dan atom halogen dalam substrat haloalkana. Namun, enzim ini sering kali juga memiliki aktivitas terhadap substrat lainnya, mulai dari 1-haloalkana, haloalkohol, haloalkena, hingga haloaromatik. Dalam kaitan ini, para peneliti sering kali ingin membedakan haloalkana dehalogenase dari haloalkohol dehalogenase, yang juga dibedakan dari haloaromatik dehalogenase. Oleh sebab itu, secara trivial, dehalogenase sering kali diberi nama sesuai dengan substratnya. Secara garis besar, pengelompokan organohalogen berdasarkan gugus alkil yang mengikat atom halida dalam substrat dan penamaan trivial dehalogenase yang mengkatalisis degradasinya ditunjukkan dalam Tabel 1.

Dehalogenase umumnya digunakan oleh mikroorganisme untuk melakukan dehalogenasi pada senyawa organohalogen dan menghasilkan senyawa karbon tidak beracun sebagai sumber karbon untuk menunjang kehidupannya. Pada beberapa mikroorganisme, dehalogenasi juga merupakan proses untuk mendapatkan energi, yakni dengan memanfaatkan senyawa organohalogen sebagai akseptor elektron pada proses pernafasan mikroorganisme dalam kondisi anaerob (Atashgahi *et al.*, 2016). Dalam kaitan ini, enzimnya disebut sebagai dehalogenase reduktif.

Toksisitas organohalogen sangat ditentukan oleh banyaknya atom halogen yang diikat oleh suatu senyawa. Semakin banyak atom halogen yang diikat oleh suatu senyawa maka semakin tinggi daya racun senyawa tersebut. Mikroorganisme yang tahan terhadap senyawa racun ini diketahui menghasilkan dehalogenase yang umumnya berfungsi untuk menghilangkan atom halogen tersebut satu-persatu, dan produk yang dihasilkannya dapat menjadi substrat bagi spesies lainnya yang berada dalam satu konsorsium. Beberapa mikroorganisme penghasil dehalogenase dengan spesifitas substrat dan produk hasil katalisisnya ditunjukkan dalam Tabel 2.

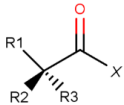
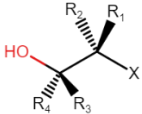
Enzim umumnya mempunyai fungsi spesifik terhadap substrat tertentu, dan hal ini juga berlaku untuk dehalogenase. Tabel 2 menunjukkan bahwa berbagai



variasi substrat dapat didehalogenasi oleh enzim yang berbeda, yang umumnya dihasilkan oleh organisme yang berbeda pula, meskipun tidak menutup kemungkinan adanya satu organisme yang menghasilkan beberapa jenis dehalogenase. Selain itu, ada juga kemungkinan bahwa satu jenis dehalogenase dapat mengkatalisis proses dehalogenasi pada beberapa jenis substrat. Dehalogenase yang paling banyak dipelajari adalah dehalogenase yang dihasilkan oleh bakteri, umumnya diisolasi dari tanah atau perairan yang tercemar organohalida. Sebagian besar bakteri umumnya dapat beradaptasi dengan lingkungan dan memanfaatkan sumber karbon yang ada untuk menunjang kehidupannya.

**Tabel 1** Pengelompokan dehalogenase berdasarkan gugus alkil dalam substratnya.

Substrat		Struktur	Dehalogenase
Kelompok	Sub-kelompok		
Haloalkana	Haloalkana primer		Haloalkana dehalogenase
	Haloalkana sekunder		
	Haloalkana tersier		
Haloalkena	Vinilhalida		Haloalkena dehalogenase
	Alilhalida		
Haloalkuna	Etilhalida		Haloalkuna dehalogenase
	Propargilhalida		
Haloaromatik	-		Haloaromatik dehalogenase
Haloasam	-		Haloasam dehalogenase

Substrat		Struktur	Dehalogenase
Kelompok	Sub-kelompok		
Asilhalida	-		Asilhalida dehalogenase
Haloalkohol	-		Haloalkohol dehalogenase

Catatan: R adalah gugus alkil dan X adalah gugus halida

**Tabel 2** Beberapa mikroorganisme penghasil dehalogenase dan spesifisitas katalisisnya.

Organisme	Dehalogenase	Substrat	Produk	Referensi
<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5	haloalkana dehalogenase	Haloalkana	Alkanol	Li dan Shao, 2014
<i>Psychobacter cryohalolentis</i> K5	haloalkana dehalogenase	1,2-dikhloroetana	2-khloroetanol	Drienovska <i>et al.</i> , 2012
<i>Shewanella sediminis</i>	haloalkena dehalogenase	tetrakhloroetena	Trikhloroetena	Lohner dan Spormann, 2013
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	haloalkena dehalogenase	tetrakhloroetena dan trikhloroetena	Etena	Magnuson <i>et al.</i> , 2000
<i>Dehalococcoides sp. strain</i> BAV1	haloalkena dehalogenase	khloroetena	Etena	Nijenhuis <i>et al.</i> , 2018
<i>Pseudomonas sp. strain</i> CBS3	haloaromatik dehalogenase	asam-4-khlorobenzoat	asam-4-hidroksibenzoat	Muller <i>et al.</i> , 1984
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i>	haloaromatik dehalogenase	pentakhlorofenol	tetrakhloro-hidroquinon	Yang <i>et al.</i> , 2005
<i>Agrobacterium radiobacter</i> AD1	haloalkohol dehalogenase	1,3-dikhloro-2-propanol	epoksida, ion khlor, dan proton	De Jong, 2003
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	dehalogenase reduktif	3-khlorobenzoat	3-khlorobenzoil-KoA	Egland <i>et al.</i> , 2001
<i>Arthrobacter sp. strain</i> TM-1	dehalogenase reduktif	4-khlorobenzoil-KoA	4-hidroksibenzoil-KoA	Zhou <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia sp.</i> FA1	fluoroasetat dehalogenase	asam fluoroasetat	asam glikolat	Kurihara <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas cepacia</i> MBA4	bromoasetat dehalogenase	asam-mono-bromoasetat	asam-hidroksi asetat	Tsang <i>et al.</i> , 1988
<i>Pseudomonas pavonaceae</i> 170	haloalkenoat dehalogenase	asam <i>cis</i> - dan <i>trans</i> -3-khloroakrilat	asam malonat semialdehida	De Jong <i>et al.</i> , 2004
<i>Moraxella sp. strain</i> B	haloasam dehalogenase	L-2-haloasam	asam-D-2-hidroksi alkanoat	Kawasaki <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudomonas sp.</i> 113	haloasam dehalogenase	asam D- dan L-2-haloalkanoat	asam-L- dan D-2-hidroksialkanoat	Nardi-Dei <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas putida</i> AJ1	haloasam dehalogenase	asam-2-mono-khloropropanoat	asam laktat	Jones <i>et al.</i> , 1992
<i>Staphylococcus aureus</i> ZT	haloasam dehalogenase	asam-2,2-dikhloropropanoat	asam piruvat	Zaidi dan Huyop, 2021
<i>Bacillus cereus</i> WH2	haloasam dehalogenase	asam-3-mono-khloropropanoat	asam-3-hidroksi propanoat	Muslem <i>et al.</i> , 2020

Sebagian disarikan dari: Ang *et al.*, 2018

Sebagian besar gen yang mengkode dehalogenase telah berhasil diisolasi, diklon, dikarakterisasi, dan diekspresikan pada sel inang tertentu (Ang *et al.*,

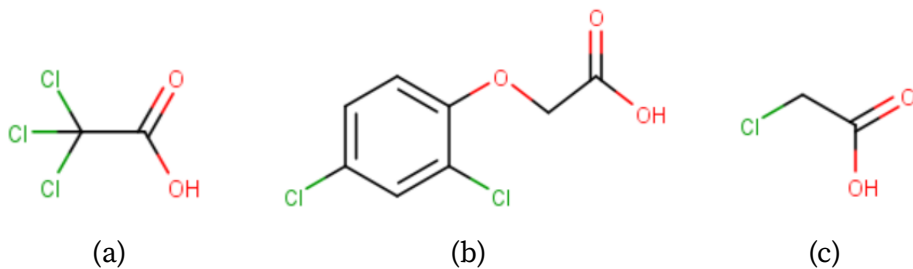
2018). Hal ini memungkinkan dilakukannya berbagai rekayasa genetik terkait dehalogenase, baik untuk meningkatkan jumlah produksi dehalogenase terkait maupun untuk meningkatkan efisiensi katalisisnya. Penelitian untuk memahami mekanisme katalisis berbagai jenis dehalogenase juga telah banyak dilakukan, termasuk penentuan residu asam amino yang berperan penting dalam proses katalisis dan penentuan struktur tiga dimensi protein dehalogenase, memberikan detail pemahaman tentang keterkaitan antara fungsi dan struktur dehalogenase.

## 2.2 Haloasam dan Haloasam Dehalogenase

Haloasam, sering disebut juga sebagai asam haloalkanoat, merupakan salah satu kelompok senyawa asam organik yang banyak digunakan di berbagai bidang. Seperti halnya senyawa organik lain, haloasam memiliki banyak variasi struktur. Selain pada struktur senyawa karbonnya, variasi haloasam juga terjadi pada jenis atom halogenya, jumlah total atom halogen dalam molekulnya, posisi atom halogen tersebut relatif terhadap gugus karboksilat, dan stereokimia molekulnya, yang umumnya ditentukan oleh khiralitas atom karbon yang mengikat atom halogen. Contoh senyawa haloasam yang banyak digunakan adalah asam trikloroasetat (TCA) dan asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D). TCA merupakan senyawa korosif yang sering digunakan untuk menghapus tato, sedangkan 2,4-D merupakan herbisida yang digunakan secara luas untuk mengatasi pertumbuhan lumut di perairan dan mengatasi gulma di daerah pertanian (Islam *et al.*, 2018). Kedua senyawa ini bersifat toksik dan diduga karsinogenik, bergantung pada dosis, frekuensi, dan sensitivitas individu (Bouvard *et al.*, 2015)

Contoh haloasam lain yang banyak digunakan dalam industri adalah asam 2-monokloroasetat (MCA). Senyawa ini sangat bermanfaat dalam sintesis organik karena reaktivitasnya yang tinggi. Produksi MCA ditengarai terus meningkat dari tahun ke tahun. MCA merupakan prekursor dalam pembuatan beberapa jenis senyawa komersial seperti asam merkaptoasetat, asam glikolat, asam tioglikolat, dan khloro asetamida. Dalam pertanian, MCA digunakan sebagai bahan dasar untuk sintesis herbisida dan pestisida. Dalam dunia farmasi, MCA digunakan untuk produksi asam maleanat, ibuprofen, glisin, natrium dikhlofenak, dan beberapa jenis vitamin. Industri plastik menggunakan MCA dalam pembuatan polivinilklorida (PVC).

Salah satu kegunaan utama MCA adalah sebagai pereaksi dalam sintesis karboksi metil selulosa (CMC). Saat ini, lebih dari 30% produksi MCA dunia digunakan untuk kepentingan ini. CMC merupakan senyawa yang mudah larut dalam air, diproduksi dalam jumlah besar untuk memenuhi kebutuhan industri makanan, obat-obatan, kosmetik, deterjen, sabun, cat, pemlastis, pewarna, dan zat perekat. Dalam hal ini, CMC terutama berfungsi sebagai zat pengental, penstabil emulsi atau suspensi, dan untuk mempertahankan air. Baru-baru ini telah dilaporkan bahwa modifikasi CMC menjadi mikro- atau nano-partikel dapat menghasilkan biopolimer yang dapat diterapkan di dunia pertanian untuk mempertahankan kadar air di daerah kering sehingga dapat meningkatkan produksi sayur-sayuran dan buah-buahan (Riseh *et al.*, 2023).



**Gambar 3** Struktur molekul (a) asam trikhloroasetat (TCA), (b) asam-2,4-dikhlorofenoksiasetat (2,4-D), dan (c) asam monokhloro asetat (MCA).

Secara umum, haloasam (termasuk MCA) bersifat persisten di lingkungan sehingga merupakan salah satu kelompok organohalogen yang merupakan xenobiotik. Meskipun jumlah yang dilepaskan ke lingkungan adalah sangat sedikit, tetapi sifatnya yang persisten menyebabkan senyawa ini dapat masuk ke tanah, terakumulasi dalam air tanah, dan berpotensi mengakibatkan polusi dalam jangka panjang. Sebagai contoh, MCA mempunyai sifat sitotoksik dan membahayakan kesehatan manusia (Dartsch *et al.*, 2000). Kontak dengan larutan MCA konsentrasi rendah dapat mengakibatkan iritasi mata dan kulit, sedangkan kontak dengan larutan MCA konsentrasi tinggi dapat mengakibatkan luka bakar dan korosi. MCA dapat menghambat enzim pada aktivitas metabolisme, antara lain mengganggu proses glikolisis dan siklus Krebs sehingga dapat membahayakan organ tubuh seperti hati, ginjal, sistem saraf pusat, dan melemahkan otot, karena mengakibatkan akumulasi asam laktat dan asam piruvat di dalam tubuh (National Research Council, 2009).

Fakta yang ada menunjukkan bahwa di daerah yang tercemar MCA atau senyawa haloasam lain, ternyata dapat ditemukan mikroorganisme yang tahan terhadap sifat toksiknya, bahkan dapat mendegradasi dan mentransformasi senyawa haloasam tersebut menjadi senyawa lain yang tidak berbahaya bagi lingkungan dan tidak baracun bagi makhluk hidup. Mikroorganisme pendegradasi haloasam dan senyawa organohalogen lain ternyata juga dapat ditemukan di suatu tempat yang secara sengaja dibuat menjadi terkontaminasi oleh senyawa tersebut (Janssen *et al.*, 2005). Hal ini memberikan peluang untuk memanfaatkan mikroorganisme tersebut sebagai agen bioremediasi dan membuka kemungkinan untuk memanipulasi kemampuannya dalam melakukan dehalogenasi.

Mikroorganisme yang dapat mendegradasi haloasam diketahui menghasilkan haloasam dehalogenase, salah satu kelompok dehalogenase yang merupakan bagian dari *HAD-like superfamily* bersama fosfatase, enzim yang berfungsi jika terdapat ion magnesium dan ATPase. Haloasam dehalogenase mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan kovalen antara atom halogen dan atom karbon dalam senyawa haloasam, menghasilkan asam hidroksi karboksilat dan ion halida (Fetzner dan Lingens, 1994). Banyak mikroorganisme yang telah diidentifikasi menghasilkan haloasam dehalogenase, meskipun enzim yang dihasilkannya berjumlah sedikit. Dalam kaitan ini, 2-haloasam dehalogenase yang dihasilkan oleh bakteri merupakan enzim yang paling banyak dipelajari. Organisme eukariot yang dilaporkan mampu mendegradasi senyawa 2-haloasam masih sangat terbatas dan penelitian umumnya dilakukan pada jamur. Beberapa contoh genus bakteri dan genus jamur yang telah dilaporkan menghasilkan 2-haloasam dehalogenase ditunjukkan dalam Tabel 3. Hingga saat ini, hanya dua organisme yang dilaporkan menghasilkan haloasam dehalogenase yang aktif terhadap asam-3-kloropropanoat, yakni *Bacillus cereus* WH2 (Muslem *et al.*, 2020) dan *Pseudomonas* sp. B6P (Mesri *et al.*, 2009).

2-Haloasam dehalogenase, merupakan enzim yang menarik untuk digunakan dalam bioremediasi, terutama untuk menghidrolisis dan mendetoksikasi polutan haloasam, karena enzim ini dapat bekerja tanpa memerlukan tambahan zat pereduksi lain (Zakary *et al.*, 2021). Sebagian besar bioremediasi untuk mengurangi atau menghilangkan polutan 2-haloasam dilakukan menggunakan bakteri sebagai mikroorganisme pendegradasi. Beberapa masalah yang sering dihadapi antara lain adalah rendahnya

efisiensi degradasi dan waktu bioremediasi yang lama, karena bakteri yang digunakan hanya menghasilkan haloasam dehalogenase dalam jumlah sedikit akibat rendahnya tingkat ekspresi gen terkait. Selain itu, kondisi lingkungan umumnya juga kurang mendukung pertumbuhan bakteri, hanya menyediakan nutrisi dalam jumlah yang sangat terbatas, sehingga kurang mendukung produksi haloasam dehalogenase oleh bakteri tersebut. Dalam kaitan ini, peningkatan produksi dan modifikasi struktur haloasam dehalogenase untuk meningkatkan efisiensi katalisisnya, menjadi aspek penting untuk dilakukan dan dikembangkan.

**Tabel 3** Genus bakteri dan genus jamur penghasil 2-haloasam dehalogenase

Genus bakteri	Referensi	Genus bakteri	Referensi
<i>Agrobacterium</i>	Kohler <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>Alcaligenes</i>	Hill <i>et al.</i> , 1999		Ratnaningsih <i>et al.</i> , 2021b
<i>Ancylobacter</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2016	<i>Psychromonas</i>	Novak <i>et al.</i> , 2013b
<i>Arthrobacter</i>	Bagherbaigi <i>et al.</i> , 2013	<i>Pyrococcus</i>	Arai <i>et al.</i> , 2006
<i>Azotobacter</i>	Diez <i>et al.</i> , 1996	<i>Rhizobium</i>	Adamu <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacillus</i>	Horisaki <i>et al.</i> , 2011		Oyewusi <i>et al.</i> , 2020
	Ratnaningsih dan Idris, 2017	<i>Rhodobacteraceae</i>	Novak <i>et al.</i> , 2013a
	Oyewusi <i>et al.</i> , 2021	<i>Serratia</i>	Abel <i>et al.</i> , 2012
<i>Burkholderia</i>	Edbelb <i>et al.</i> , 2020	<i>Sulfolobus</i>	Quehenberger <i>et al.</i> , 2017
<i>Klebsiella</i>	Tahya dan Ratnaningsih, 2015	<i>Xanthobacter</i>	Van der Ploeg <i>et al.</i> , 1991
<i>Lysinibacillus</i>	Heidarrezael <i>et al.</i> , 2020	Genus jamur	Referensi
<i>Methylobacterium</i>	Kurihara and Esaki, 2008	<i>Beauveria</i>	Satpathy <i>et al.</i> , 2016
<i>Mesorhizobium</i>	Zakary <i>et al.</i> , 2021	<i>Botrytis</i>	Bustillo <i>et al.</i> , 2003
<i>Moraxella</i>	Kurihara <i>et al.</i> , 2000	<i>Candida</i>	Polnisch <i>et al.</i> , 1991
<i>Paracoccidioides</i>	Satpathy <i>et al.</i> , 2015	<i>Dichomitus</i>	Muzikar <i>et al.</i> , 2011
<i>Paracoccus</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014	<i>Fusarium</i>	Li <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudoalteromonas</i>	Liao <i>et al.</i> , 2015	<i>Metarhizium</i>	Satpathy <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas</i>	Hasan <i>et al.</i> , 1994	<i>Phanerochaete</i>	Wang <i>et al.</i> , 2009
	Park <i>et al.</i> , 2003	<i>Pycnopus</i>	Muzikar <i>et al.</i> , 2011
	Schmidberger <i>et al.</i> , 2008	<i>Trichoderma</i>	Bagherbaigi <i>et al.</i> , 2013

Sebagian disarikan dari: Wang *et al.*, 2021

2-Haloasam dehalogenase juga sangat berguna dalam aplikasi sintesis kimia karena sebagian besar enzim ini melakukan katalisis secara stereoselektif (Wang *et al.*, 2020). Enzim ini berpotensi untuk digunakan dalam produksi asam 2-hidroksi karboksilat dari 2-haloasam bermassa molekul rendah yang bersifat optis aktif dengan khiralitas tertentu, suatu senyawa antara yang banyak diperlukan dalam industri dan sintesis pestisida,

herbisida, serta obat-obatan (Martin *et al.*, 2020; Gurushankara, 2021). Dalam campuran rasemat, bakteri hanya akan mendegradasi salah satu enansiomer dan menyisakan enansiomer lain. Selain itu, penggunaan haloasam dehalogenase dalam aplikasi biosensor untuk mendeteksi polutan haloasam, juga telah dilaporkan (Gul *et al.*, 2020). Semua kebutuhan ini tentunya akan terpenuhi jika tersedia 2-haloasam dehalogenase dalam jumlah yang memenuhi kebutuhan.

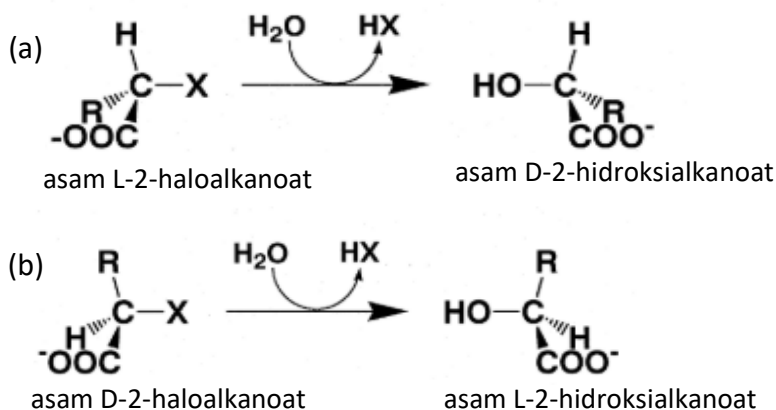
## 2.3 Mekanisme Katalisis dan Karakteristik Struktur 2-Haloasam Dehalogenase

2-Haloasam dehalogenase merupakan kelompok dehalogenase yang secara spesifik mengkatalisis reaksi hidrolisis terhadap senyawa 2-haloasam dengan memutuskan ikatan kovalen antara atom karbon- $\alpha$  dengan atom halogen dalam substrat, menghasilkan asam 2-hidroksi karboksilat dan ion halida. Enzim ini melakukan katalisis dengan mekanisme yang bervariasi. Pada awalnya, 2-haloasam dehalogenase dibedakan menjadi 4 kelompok dengan mendasarkan pada spesifisitas substratnya, yaitu L-2-haloasam dehalogenase, D-2-haloasam dehalogenase, DL-2-haloasam dehalogenase (tipe inversi), dan DL-2-haloasam dehalogenase (tipe retensi).

L-2-Haloasam dehalogenase (EC 3.8.1.2), sering kali disebut sebagai L-DEXs, hanya aktif pada asam L-2-haloalkanoat sebagai substrat dan produk hasil katalisisnya adalah asam D-2-hidroksialkanoat. Enzim ini merupakan haloasam dehalogenase yang paling banyak dipelajari karena sebagian besar bakteri diidentifikasi menghasilkan enzim ini secara alami. Mekanisme reaksi hidrolisis yang dikatalisis oleh L-DEXs ditunjukkan pada Gambar 4 (a) (Kurihara *et al.*, 2000). Contoh enzim ini adalah L-2-haloasam dehalogenase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas putida* No.109 (Liu *et al.*, 1994), L-2-haloasam dehalogenase dari *Pseudomonas* sp. CBS3 (Klages *et al.*, 1983), dan L-2-haloasam dehalogenase dari *Pseudomonas* sp YL (Hisano *et al.*, 1996). Enzim dari *Pseudomonas* sp YL telah berhasil dikristalkan dan struktur molekulnya telah dipelajari secara detail.

D-2-Haloasam dehalogenase (EC 3.8.1.9), sering kali disebut sebagai D-DEXs, mengkatalisis hidrolisis asam D-2-haloalkanoat menjadi asam L-2-hidroksialkanoat dengan mekanisme reaksi katalisis seperti pada Gambar 4

(b) (Kurihara *et al.*, 2000). Contoh enzim ini adalah D-2-halopropionat dehalogenase dari *Pseudomonas putida* AJ1/23 (Smith *et al.*, 1990).



**Gambar 4** Reaksi yang dikatalisis oleh 2-haloasam dehalogenase tipe inversi. L-2-haloasam dehalogenase (L-DEXs) mengkatalisis reaksi (a), D-2-haloasam dehalogenase (D-DEXs) mengkatalisis reaksi (b), sementara DL-2-haloasam dehalogenase (DL-DEXs) mengkatalisis reaksi (a) dan (b). R menunjukkan gugus alkil. Sumber: Kurihara *et al.*, 2000.

DL-2-haloasam dehalogenase (tipe inversi) (EC 3.8.1.10), juga dikenal sebagai DL-DEXi, mengkatalisis hidrolisis asam L-2-haloalkanoat maupun D-2-haloalkanoat berturut-turut menghasilkan asam D-2-hidroksialkanoat dan asam L-2-hidroksialkanoat dengan mekanisme reaksi seperti pada Gambar 4 (a) dan 4 (b) (Kurihara *et al.*, 2000). Khiralitas pada atom C2 dalam produk asam 2-hidroksi alkanoat merupakan inversi konfigurasi dari substrat haloasamnya. Contoh enzim ini adalah DL-2-haloasam dehalogenase dari *Pseudomonas* sp. strain 113 (Nardi-Dei *et al.*, 1999).

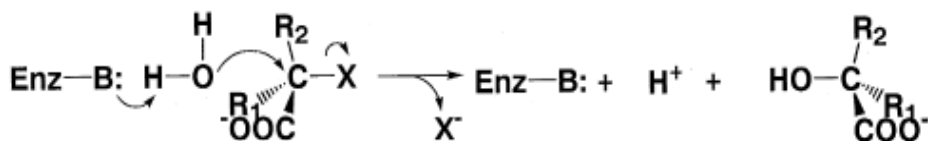
DL-2-haloasam dehalogenase (tipe retensi) (EC 3.8.1.11), sering kali disebut sebagai DL-DEXr, mengkatalisis reaksi hidrolisis asam L-2-haloalkanoat maupun D-2-haloalkanoat berturut-turut menjadi asam L-2-hidroksialkanoat dan asam D-2-hidroksialkanoat. Katalisis oleh enzim ini mempertahankan konfigurasi pada atom khiral C2 dengan reaksi yang kemungkinan terjadi dalam dua tahap atau dua kali inversi. Pada tahap pertama, terjadi inversi konfigurasi pada C2 dengan melepaskan ion halida dan pada tahap kedua terjadi penyerangan oleh molekul air yang menyebabkan terjadinya inversi konfigurasi kembali pada C2 (Wang *et al.*, 2021). Reaksi dehalogenasi yang terjadi diduga melibatkan residu sistein, karena DL-DEXr ini sensitif terhadap pereaksi sulfhidril, seperti *N*-



etilmaleimida dan asam *p*-kloromerkuribenzoat (Wang *et al.*, 2021). Contoh enzim tipe ini adalah DL-2-haloasam dehalogenase fraksi I dari *Pseudomonas putida* PP3 (Weightman *et al.*, 1982).

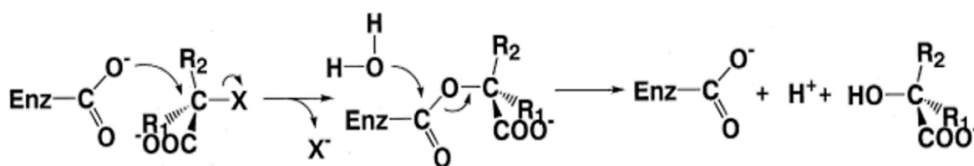
Berdasarkan mekanisme yang dikatalisis oleh L-2-haloasam dehalogenase, D-2-haloasam dehalogenase, dan DL-2-haloasam dehalogenase (tipe inversi) dapat dipahami bahwa reaksi yang dikatalisisnya merupakan reaksi inversi stereokimia substrat pada atom C2, sedangkan DL-2-haloasam dehalogenase (tipe retensi) melakukan katalisis dengan mempertahankan stereokimia substrat (Kurihara *et al.*, 2000). Pada perkembangannya, pengelompokan 2-haloasam dehalogenase dilakukan dengan lebih menekankan pada kekerabatan enzim, kesamaan struktur dan urutan asam aminonya, serta detail mekanisme reaksi katalis yang terjadi. Dalam hal ini, 2-haloasam dehalogenase kemudian diklasifikasi secara filogenetik menjadi dua kelompok, yaitu Grup I dan Grup II (Hill *et al.*, 1999). Pengelompokan ini digunakan hingga sekarang. Grup I terdiri atas D-2-haloasam dehalogenase (D-DEXs) yang aktif terhadap substrat D-enansiomer dan DL-2-haloasam dehalogenase (DL-DEXs) yang dapat bekerja pada kedua jenis enansiomer sebagai substrat, sedangkan Grup II hanya terdiri atas L-2-haloasam dehalogenase (L-DEXs) yang hanya aktif terhadap L-enansiomer sebagai substrat (Wang *et al.*, 2018).

Berbagai penelitian pada haloasam dehalogenase menunjukkan bahwa enzim ini umumnya menggunakan residu asam aspartat sebagai nukleofil, dan posisi asam aspartat dalam struktur primer enzim dapat bervariasi, tetapi di dalam ruang tetap berada pada sisi aktif enzim (Ang *et al.*, 2018). Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh 2-haloasam dehalogenase Grup I menggunakan asam aspartat untuk mengaktifkan molekul air yang kemudian menyerang substrat dan secara langsung mengganti substituen atom halogen alfa dengan gugus hidroksil sehingga menyebabkan terjadinya inversi konfigurasi (Wang *et al.*, 2018). Mekanisme reaksi katalisisnya ditunjukkan pada Gambar 5.



**Gambar 5** Mekanisme katalisis oleh 2-haloasam dehalogenase Grup I.  
Sumber: Wang *et al.*, 2018.

Di lain pihak, mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh 2-haloasam dehalogenase Grup II awalnya menggunakan asam aspartat untuk mengikat substrat dan membentuk ester sebagai senyawa antara yang kemudian dihidrolisis oleh molekul air yang teraktivasi untuk menghasilkan asam hidroksi karboksilat (Wang *et al.*, 2018). Aktivasi molekul air umumnya dilakukan oleh residu histidin dalam enzim. Mekanisme ini ditunjukkan pada Gambar 6. Mekanisme katalisis oleh Grup II haloasam dehalogenase merupakan reaksi substitusi  $S_N2$  dan telah dikonfirmasi melalui kristalografi sinar-X, pelabelan dengan isotop  $^{18}O$ , kromatografi cair-spektroskopi massa (LC-MS), mutagenesis terarah, serta melalui perhitungan mekanika kuantum (QM) dan mekanika molekul (MM) (Adamu *et al.*, 2017).

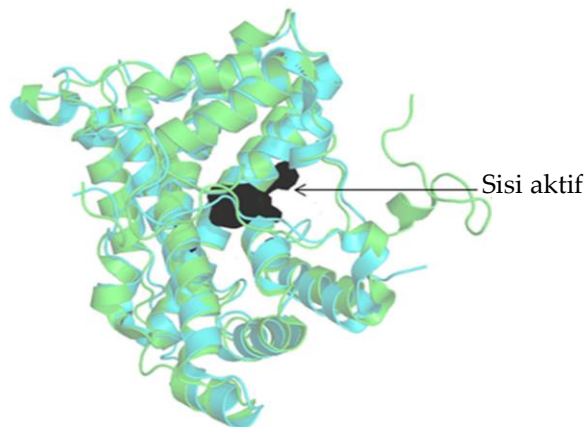


**Gambar 6** Mekanisme katalisis oleh 2-haloasam dehalogenase Grup II.  
Sumber: Wang *et al.*, 2018.

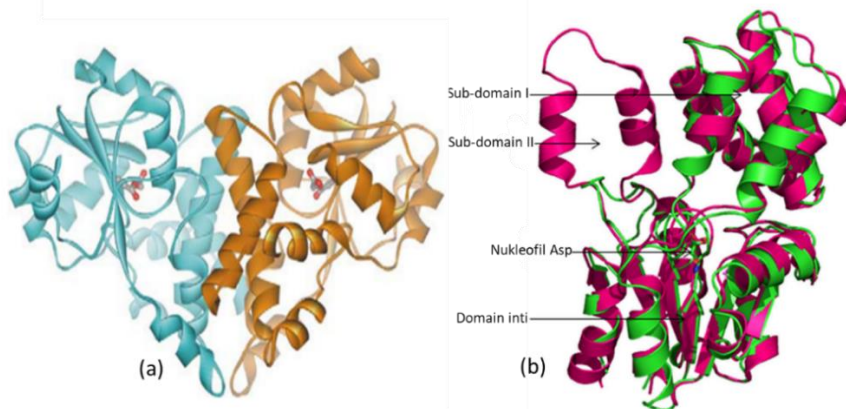
Klasifikasi 2-haloasam dehalogenase sebagai Grup I dan Grup II juga didukung oleh karakteristik struktur protein kedua golongan enzim tersebut. DL-DEXi, yang dikelompokkan sebagai Grup I, merupakan hidrolase  $\alpha$ -heliks yang tidak mempunyai homologi dengan L-DEXs dan bentuk pelipatan lain pada superfamili hidrolase (Siwek *et al.*, 2013) dengan struktur kristal homodimer seperti ditunjukkan pada Gambar 7 (Wang *et al.*, 2021). Dalam molekul ini, 16% residu asam amino pada N-terminus merupakan asam amino yang identik dengan residu asam amino pada C-terminus, sehingga molekul enzim ini membentuk pseudo-dimer. Sisi aktif enzim terletak di antara pseudo-dimer dan dapat berikatan dengan substrat D- dan L-2-haloasam (Schmidberger *et al.*, 2008).

L-DEXs, yang dikelompokkan sebagai Grup II, merupakan enzim dengan tipe hidrolase  $\alpha/\beta$  yang domain intinya mempunyai ciri khas *Rossmann-fold-like* dengan sisi aktif terletak di antara kedua domain seperti ditunjukkan pada Gambar 8 (b) (Wang *et al.*, 2021). Sebagian besar molekul haloasam dehalogenase Grup II merupakan dimer dengan dua sub-unit identik yang merupakan monomernya (Gambar 8 (a)) (De Jong dan Dijkstra, 2003),

meskipun beberapa enzim menunjukkan pengecualian struktur secara spesifik (Arai *et al.*, 2006).



**Gambar 7** Penggabungan dua struktur molekul 2-haloasam dehalogenase Grup I. Hijau: Dehl dari *Pseudomonas putida* PP3 (PDB ID: 3bjx) dan Sian: DL-DEX dari *Methylobacterium* sp. CPA1 (PDB ID: 4n2x).  
Sumber: Wang *et al.*, 2021



**Gambar 8** Struktur dimer dan penggabungan dua struktur molekul 2-haloasam dehalogenase Grup II. (a) Molekul dimer haloasam dehalogenase dari *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (DhIB, PDB ID: 1AQ6). (b) Penggabungan dua struktur molekul 2-haloasam dehalogenase Grup II. Pink: DhIB dari *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (PDB ID: 1qq5) dan Hijau: L-DEX YL dari *Pseudomonas* sp. strain YL (PDB ID: 1jud).  
Sumber: (a) De Jong dan Dijkstra, 2003; (b) Wang *et al.*, 2021

Ciri khusus pada L-DEXs adalah adanya 6 rantai paralel lipatan  $\beta$  yang di kedua sisinya diapit oleh 5 struktur  $\alpha$ -heliks, membentuk 3 lapisan lipatan  $\alpha/\beta$  sebagai bagian dari domain inti (Zhang *et al.*, 2018). Gugus karboksilat dari residu asam aspartat bertindak sebagai nukleofil dalam pusat aktif molekul yang menyerang atom C2 pada molekul L-2-haloasam dan membentuk ester

sebagai senyawa antara (Schmidberger *et al.*, 2007). Senyawa antara ini kemudian dihidrolisis oleh molekul air yang diaktivasi oleh His, Glu, Asn, Ser, atau Lis, membentuk asam 2-hidroksi alkanoal sebagai produk akhir katalisis (Wang *et al.*, 2021). Ion halida yang dihasilkan ditangkap dan distabilkan oleh Arg, Asn, atau Phe. Kehadiran senyawa atau gugus fungsi yang dapat menangkap ion halida ditengarai mendukung proses dehalogenasi pada senyawa haloasam dengan ikatan C-X yang kuat (Kondo *et al.*, 2014).

## 3 HALOASAM DEHALOGENASE DARI BAKTERI ENDOGENUS INDONESIA

### 3.1 *Bacillus cereus* IndB1

Genus *Bacillus* merupakan organisme protista uniseluler yang masuk dalam kelompok bakteri heterotrof. *Bacillus* adalah salah satu genus bakteri dekomposer penting yang dapat hidup pada berbagai kondisi lingkungan. Secara vegetatif, *Bacillus* dapat menghasilkan endospora yang mempunyai ketahanan tinggi terhadap berbagai faktor kimia dan fisika, seperti suhu, pH ekstrem, alkohol, dan desinfektan.

*Bacillus cereus* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang, bersifat aerobik fakultatif, motil, dan resisten terhadap beberapa jenis antibiotik. Bakteri ini merupakan bakteri mesofil dan banyak ditemukan di tanah, air, sayuran, dan makanan yang membusuk. *B. cereus* bersifat patogen pada manusia yang pertahanan tubuhnya sedang lemah. Bakteri ini umum ditemukan pada berbagai penyakit infeksi, terutama infeksi pada saluran pencernaan. Bakteri ini diyakini merupakan penyebab beberapa kasus keracunan makanan dengan gejala awal muntah dan diare (Lesley *et al.*, 2013).

*B. cereus* dapat digunakan sebagai agen bioremediasi karena bakteri ini memiliki kemampuan untuk menguraikan berbagai polutan, termasuk senyawa haloasam. Selain itu, bakteri ini juga mampu mereduksi merkuri dengan mengubah  $Hg^{2+}$  menjadi Hg (Sinha *et al.*, 2012), namun mekanisme dan reaksi katalisisnya masih belum banyak dipelajari. *B. cereus* dilaporkan mampu menurunkan tingkat *chemical oxygen demand* (COD) dan total nitrogen (NT) dalam air reklamasi melalui proses denitrifikasi (Zhao *et al.*, 2009), meskipun belum ada penjelasan terkait enzim yang dihasilkan oleh *B. cereus* dan digunakan untuk kepentingan ini.

Penelitian yang kami lakukan menggunakan *B. cereus* IndB1, strain bakteri lokal Indonesia yang diperoleh dari Balitbang Pertanian, Indonesia. Bakteri ini diketahui mampu mendegradasi MCA, mengindikasikan bahwa bakteri ini dapat menghasilkan haloasam dehalogenase dan memiliki gen pengkode haloasam dehalogenase. Dalam penelitian ini, gen pengkode haloasam dehalogenase dari genom *B. cereus* IndB1 telah berhasil diisolasi melalui pendekatan *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer yang

didesain berdasarkan daerah lestari gen haloasam dehalogenase yang tersedia di GenBank NCBI dan amplikon yang diperoleh kemudian diklon ke dalam vektor pGEM-T Easy dengan sel inang *E. coli* TOP10 untuk dianalisis secara restriksi dan ditentukan urutan nukleotidanya (Arif, 2013). Urutan nukleotida gen ini telah disampaikan ke GenBank NCBI dan dapat diakses dengan kode akses KU498039.1

Gen 2-haloasam dehalogenase yang didapat dari *B. cereus* IndB1 telah di sub-klon ke vektor ekspresi pET-30(a) (Idris dan Ratnaningsih, 2015) dan diekspresikan secara intergenerik dalam *E. coli* BL12 (DE3) (Ratnaningsih dan Idris, 2017). Kondisi optimum untuk ekspresi klon rekombinan ini, termasuk efek induksi oleh isopropiltiogalaktosida (IPTG) telah dipelajari (Ratnaningsih *et al.*, 2021a). 2-Haloasam dehalogenase hasil ekspresi klon rekombinan ini, disebut sebagai Bcfd1, telah dimurnikan menggunakan kolom kromatografi Ni-NTA dan aktivitasnya terhadap MCA telah dipelajari (Ratnaningsih *et al.*, 2021c). Struktur protein, residu asam amino penting dalam katalisis, enansioselektivitas, dan spesifitas substrat untuk Bcfd1, terutama efek perpanjangan rantai karbon dalam substrat, juga telah dipelajari dengan pendekatan *in-silico* (Ratnaningsih dan Saepullah, 2022). Efek jenis dan jumlah atom halogen serta pengaruh posisi halogen terhadap aktivitas haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 juga telah dipelajari (Aridayani, 2022). Berbagai hasil penelitian ini memberikan informasi yang berguna untuk menggunakan haloasam dehalogenase dari bakteri lokal sebagai katalis yang efisien dalam bioremediasi dan sintesis kimia.

## **Kloning gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1**

Penggunaan haloasam dehalogenase dalam industri memerlukan enzim dalam jumlah besar dengan efisiensi katalisis yang tinggi. Hal ini dapat terpenuhi jika gen pengkode haloasam dehalogenase dapat diperoleh dalam klon rekombinan yang memfasilitasi peningkatan produksi enzim dan modifikasi kemampuan katalisisnya. Oleh sebab itu, kloning gen pengkode haloasam dehalogenase dan upaya modifikasi gen untuk meningkatkan efisiensi katalisisnya menjadi penting untuk dilakukan.

Isolasi gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 dilakukan dengan pendekatan PCR, menggunakan sepasang primer yang didesain berdasarkan urutan lestari gen serupa yang tersedia di GenBank NCBI. Referensi gen

diambil dari delapan bakteri yang semuanya berasal dari genus *Bacillus*, yaitu: *B. cereus* dengan kode akses NC016771, *B. cereus* dengan kode akses CP001746, *B. cereus* dengan kode akses AP007209, *B. anthracis* dengan kode akses NC012659, *B. anthracis* dengan kode akses NC005945, *B. anthracis* dengan kode akses NC007530, *B. anthracis* dengan kode akses CP002091, dan *B. thuringiensis* dengan kode akses CP002508. Perancangan primer dilakukan dengan program ClustalX, GenDoc, dan EditSeq. Posisi primer dipilih pada urutan nukleotida yang homologinya tinggi dengan komposisi G-C mendekati 50%. Hasil rancangan primer ditunjukkan pada Tabel 4. Primer F (F1, F2, dan F3) merupakan primer maju, sedangkan primer R (R3, R2, dan R1) merupakan primer mundur. Primer yang dirancang merupakan *degenerate primer* dan tidak ditambahkan urutan nukleotida tertentu untuk sisi restriksi. Hal ini dimaksudkan untuk menjaga homologinya saat digunakan dalam PCR dengan kromosom *B. cereus* IndB1 sebagai templat.

**Tabel 4** Rancangan primer untuk isolasi gen pengkode haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1

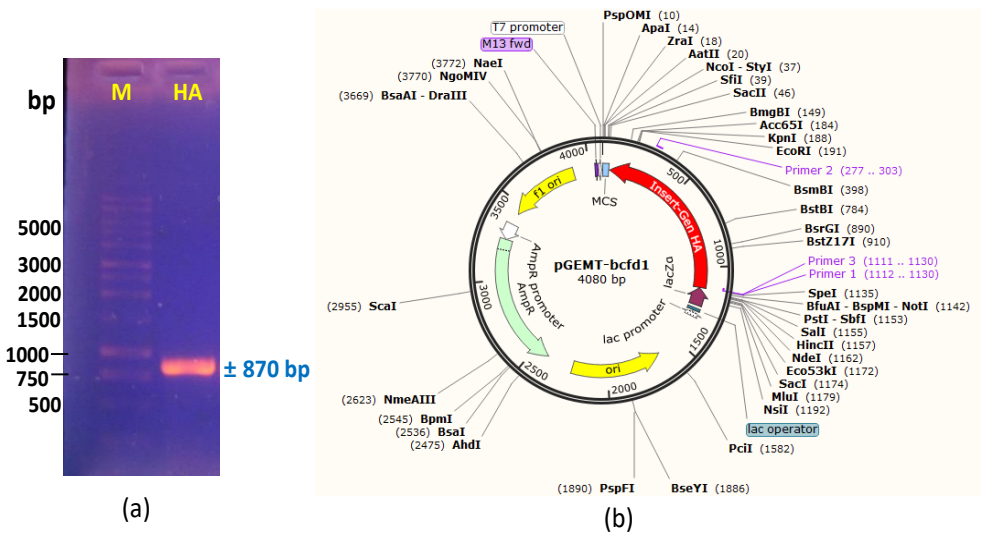
Primer	Urutan primer (5' - 3')	% GC	Tm (°C)
<b>F1</b>	ATGGATGG(A/T)ACACTACTATCATCTA(A/G)TCTTGAAATCTCC	38	67,85
<b>F2</b>	GCATGCACTAGATGTTAC(A/G)CTTGAGGAAC	48	67,45
<b>F3</b>	CGCAG(G/T)GCATCGCGCACAGCTATTAAG	55	69,16
<b>R1</b>	CTTAATAGCTGTGCGCGATGC(A/C)CTGCG	55	69,16
<b>R2</b>	G(C/T)TCGATTGCATGAGCAACACCATG(C/T)TC	46	66,08
<b>R3</b>	CCAATACCAGATCCAACAGTGAAGCGAGAG	50	68,73

Sumber: Arif, 2013.

Isolasi gen haloasam dehalogenase dari kromosom *B. cereus* IndB1 dilakukan dengan pasangan primer R dan F, dan hasil eksperimen menunjukkan bahwa pasangan primer F1 dan R3 memberikan ampikon tunggal yang paling jelas dan paling bersih seperti ditunjukkan pada elektroforegram Gambar 9 (a). Ampikon ini kemudian diklon ke pGEM-T *Easy* dalam sel inang *E. coli* TOP untuk analisis restriksi, konfirmasi secara re-PCR, dan penentuan urutan nukleotidanya. Klon rekombinan yang dihasilkan disebut sebagai *E. coli* TOP10/pGEMT-*bcf*d1 dengan *bcf*d1 adalah sebutan bagi gen putatif pengkode haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1. Peta restriksi pGEMT-*bcf*d1 ditunjukkan pada Gambar 9 (b).

Gen putatif pengkode haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 (disebut sebagai *bcf*d1) dalam plasmid rekombinan pGEMT-*bcf*d1 ditentukan urutan nukleotidanya dengan metode dideoksi Sanger. Hasil yang diperoleh

menunjukkan bahwa *bcf1* mempunyai ukuran nukleotida 852 pasang basa, mengandung urutan primer F1 dan R3 di kedua ujungnya, dan mempunyai start kodon ATG serta stop kodon TAA. Deduksi asam amino yang dikode oleh gen ini memberikan 282 asam amino, memberikan kemungkinan bahwa gen tersebut merupakan gen pengkode 2-haloasam dehalogenase. Pembuktian lebih lanjut dilakukan melalui analisis ekspresi, dan untuk ini maka *bcf1* perlu dipindahkan ke vektor ekspresi.



**Gambar 9** Elektroforegram gen haloasam dehalogenase putatif dari *B. cereus* IndB1 (a) dan peta restriksi plasmid rekombinan pGEMT-*bcf1* (b). M = standar DNA sebagai marker, HA = gen putatif haloasam dehalogenase *bcf1* = nama gen pengkode haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1. Sumber: Idris, 2015.

Analisis restriksi menunjukkan bahwa urutan nukleotida *bcf1* tidak mengandung sisi restriksi untuk *EcoRI* dan *HindIII*. Oleh sebab itu, sisi restriksi untuk kedua enzim ini kemudian digunakan untuk merancang primer baru untuk memfasilitasi sub-kloning secara terarah guna memindahkan *bcf1* dari pGEMT ke vektor ekspresi pET-30(a).

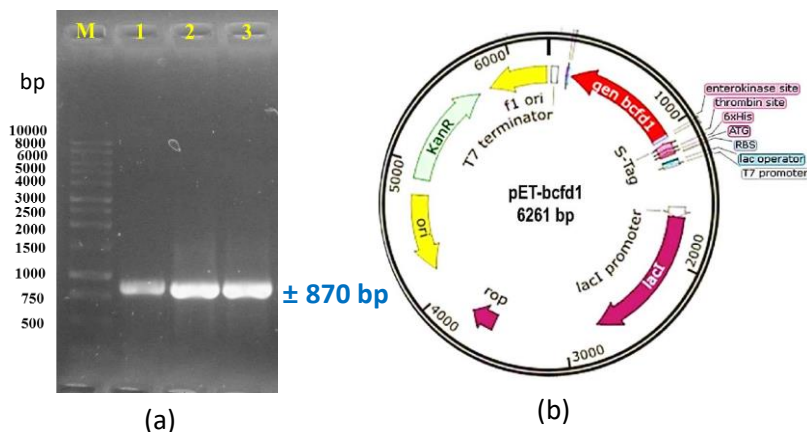
### Sub-Kloning dan ekspresi gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 dalam vektor ekspresi pET-30(a)

Gen *bcf1* dalam plasmid rekombinan pGEM-*bcf1* tidak dapat diekspresi, karena vektor pGEMT tidak mempunyai promotor yang sesuai untuk ekspresi. Oleh sebab itu, gen *bcf1* dipindahkan ke vektor ekspresi secara terarah, agar ekspresinya dalam klon rekombinan dapat dipelajari. Primer untuk



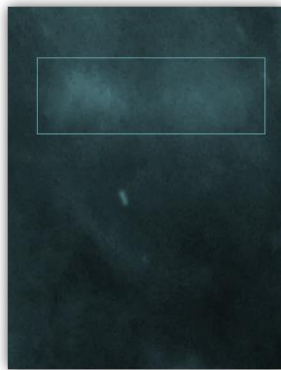
memindahkan *b CFD1* dari klon rekombinan pGEM-*b CFD1* ke vektor ekspresi dirancang dengan menambahkan sisi restriksi *EcoRI* yaitu GAATTC dan *HindIII* yaitu AAGCTT. Susunan primer maju adalah 5'-GCAGAATTC ATGGATGGAACACTACTATC-3' dan susunan promoter mundur adalah 5'-GCGAAGCTTTTATTTACTAGATGAAGTTTG-3'. Penambahan tiga basa di ujung 5'- kedua primer dimaksudkan untuk memfasilitasi pemotongan amplicon oleh enzim restriksi sebelum diligasi ke vektor ekspresi pET-30(a).

Dalam eksperimen, amplicon hasil PCR dengan penambahan sisi restriksi di kedua ujungnya ternyata sulit untuk dipotong dengan kedua enzim restriksi terkait sehingga sub-kloning yang dilakukan selalu gagal. Oleh sebab itu, amplicon disisipkan lebih dahulu ke vektor pGEM-T dalam *E. coli* TOP10, klon rekombinan yang diperoleh ditumbuhkan dalam medium yang sesuai, plasmid rekombinannya diisolasi kembali, molekul DNA plasmid dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII*, kemudian fragmen DNA yang dihasilkan disub-klon ke vektor ekspresi pET-30(a) dalam *E. coli* BL21 (DE3). Klon rekombinan yang diperoleh disebut sebagai *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*b CFD1*. Plasmid rekombinan yang berhasil diisolasi kembali dari *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*b CFD1* ditunjukkan pada Gambar 10 (b) dan konfirmasi melalui re-PCR dengan pasangan primer F1 dan R3 ditunjukkan pada Gambar 10 (a). Hasil re-PCR ini menunjukkan keberhasilan sub-kloning yang telah dilakukan.



**Gambar 10** Peta restriksi plasmid rekombinan pET-*b CFD1* (b) dan elektroforegram hasil re-PCR menggunakan pasangan primer F1 dan R3 (a). M = standar DNA sebagai marker, 1, 2, dan 3 adalah amplicon yang diperoleh dengan templat 1 = kromosom *B. cereus* IndB1, 2 = pGEM-*b CFD1*, 3 = pET-*b CFD1*. Sumber: Idris, 2015.

Ekspresi gen putatif haloasam dehalogenase dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcd1* dilihat secara kualitatif melalui analisis terhadap protein intrasel klon rekombinan menggunakan gel elektroforesis natif poliakrilamid diikuti dengan perendaman dalam larutan MCA. Aktivitas haloasam dehalogenase dilihat dengan mengidentifikasi ion khlorida yang dihasilkan menggunakan larutan AgNO<sub>3</sub>. Munculnya pita putih dalam gel menandakan terbentuknya AgCl, membuktikan bahwa klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcd1* menghasilkan haloasam dehalogenase yang aktif terhadap substrat MCA. Zimogram yang dihasilkan dari eksperimen ini ditunjukkan pada Gambar 11. Fakta ini mengindikasikan bahwa fragmen DNA yang berhasil disub-klon adalah gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1.



**Gambar 11** Zimogram produk *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcd1* dengan substrat MCA dan perendaman dengan AgNO<sub>3</sub>. Pita putih menunjukkan hasil positif adanya gen haloasam dehalogenase dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcd1*. Sumber: Idris, 2015.

Urutan nukleotida *bcd1* dalam plasmid rekombinan pET-*bcd1* kemudian ditentukan dengan metode dideoksi Sanger dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 12. Urutan nukleotida *bcd1* merupakan gen utuh yang mengandung start kodon ATG dan stop kodon TAA dengan ukuran 852 basa. Urutan nukleotida ini kemudian dianalisis kemiripannya dengan gen haloasam dehalogenase lain yang terdapat dalam GenBank NCBI. Hasil analisis mengindikasikan bahwa urutan nukleotida *bcd1* mempunyai kemiripan hingga ~99% dengan gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* NC7401 dengan kode akses AP007209.1, *B. cereus* strain Q1 dengan kode akses CP000227.1, *B. cereus* AH187 dengan kode akses CP001177.1, dan *B. thuringiensis* serovar konkukian strain 97-27 dengan kode akses AE017355.1. Hasil analisis ini

semakin meyakinkan bahwa *b CFD1* adalah gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130     140
ATGGATGGAACTACTACTCATCTAATCTTGAATCTCCAAAGAGAAGCTTACAAGCTATCCAAACTGCAAAAGAGGCTGGTCATATTGTCATGATTGTTCTGGCCGTGCAAAAGAGGATGCTTTGAAATTATTGGAAGA
150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260     270     280
GTAATAACTATCTCTCCAGTTGGAGCAAGCAATGGGCAATTGTTTATGGATGGAGAAGTAATTAACACAGTTGTATACAAAACGACAAAGTGCACAACTTGCAAAATTACTAGAACTGGAAGCTTCTCTTATA
290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390     400     410     420
AGCTATATACAATAAAGGAGTTTATCTCCATATACATGGCAAGATCAAGTTATGCAAGCGTTGAAAGAAAATAAGCATGCACTAGATGTTACGCTTGAGGAACCTGAAAGAATTACGAAAAAACAAAAGAAATCAAA
430     440     450     460     470     480     490     500     510     520     530     540     550     560
TTAATTACTGATTTCCAAAATAAGAAAGTGTGTAATAATCCAGAATTAGAAATATCTAAATCTTTATTTGACATTTAACGCAGGGCATCGCCGACAGCTATTAAAGTATGTACAAGAAGATACTGATATTATGGT
570     580     590     600     610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TACAGCATCTGCTCTACTAATTTAGAAATTTGGACAAGAATGGACATAAAGGAAATGGACTGAAACAAATGGCAGCCATTTAATATACCAATTGAAGATACAGTTGCTATCGGTGACAATTTAACGATGATACCA
710     720     730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
TGTTAGAAGCAGCTGGTTTATCAGTTGCAATGGGAAGCGCTGAAGAAGATGTAATAAATAATATGATGATGTGTAACATTAACAACAATGAACATGGTGTGCTCATGCAATGAACAATTTGATGAAACAACCTCA
850
TCTAGTAAATAA

```

**Gambar 12** Urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase (*b CFD1*) dari *B. cereus* IndB1  
Start kodon ATG dan stop kodon TAA ditunjukkan dalam kotak merah.

Berdasarkan urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase, maka urutan asam amino molekul protein yang dihasilkannya dapat dideduksi. Hasil deduksi ini memberikan struktur primer protein Bcfd1 yang mengandung 283 residu asam amino seperti ditunjukkan pada Gambar 13. Molekul protein ini mempunyai massa molar 31,4. kDa, pH isoelektrik 4,87, dan indeks ketidakstabilan ~32%, mengindikasikan bahwa Bcfd1 merupakan enzim yang cukup stabil. Protein dengan indeks ketidakstabilan <40% diprediksi bersifat stabil, sedangkan protein dengan indeks ketidakstabilan >40% mengindikasikan bahwa protein tersebut bersifat tidak stabil (Guruprasad, *et al.* 1990).

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MDGTLSSNL EISKENLQAI QTAKEAGHIV MICSGRAKED ALKLEEYKL SLPVGASNGA IYVVDGEVIN SRCIQNDKQV KLAKLLESEG FPKLYTNKG
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
VYSPYTWQDQ VMQAFENKHQ ALDVTLEELE RITEKQKXSN LITDFQKIED VVNNPELEIS KFFILTFNAG HRAQLLSMLQ EDTDIMVTAS APTNLEIMDK
210     220     230     240     250     260     270     280
NGHKGNGLKQ MAAHFNIPIE DTVAIGDNFN DVPMLEAAGL SVAMGNAEED VKKLCQDVTL TNNEHVAHA IEQFVLKQTS SSK

```

**Gambar 13** Urutan asam amino haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 (Bcfd1) yang dideduksi dari urutan nukleotida *b CFD1*.

Analisis urutan asam amino Bcfd1 terhadap struktur primer haloasam dehalogenase yang terdapat di GenBank NCBI menunjukkan bahwa Bcfd1 mempunyai kemiripan hingga ~99% dengan struktur primer *haloacid dehalogenase-like hydrolase* dari beberapa strain *B. cereus*, yaitu haloasam dehalogenase dari *B. cereus* dengan kode akses WP\_001996528.1 dan WP\_000766404.1 dan haloasam dehalogenase dari *B. thuringiensis* dengan kode akses YP\_034565.1. Bcfd1 memiliki homologi yang sangat rendah dengan

haloasam dehalogenase dari genus lain, masing-masing hanya sekitar 26% dengan haloasam dehalogenase dari *Moraxella catarrhalis* dengan kode akses WP\_003673567.1 dan *Pseudomonas fluorescens* dengan kode akses WP\_003222979.1 Semua data ini sangat mendukung bahwa gen *bcfD1* dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcfD1* adalah gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1.

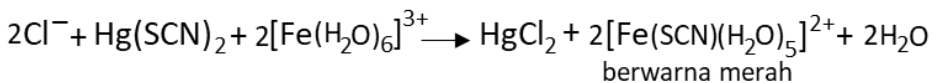
Keberadaan haloasam dehalogenase dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcfD1* dipelajari melalui analisis protein dalam elektroforesis poliakrilamid gel (PAGE) dengan adanya sodium dodesil sulfat (SDS) untuk mendenaturasi protein. Analisis dilakukan terhadap lisat dan debris sel. Hasil analisis menunjukkan bahwa kedua sampel memberikan pita tebal di daerah antara 30-40 kDa, sesuai dengan ukuran yang diidentifikasi dalam zimogram di Gambar 11. Fakta ini memperkuat dugaan bahwa gen *bcfD1* mengkode 2-haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1. Protein ini kemungkinan berada dalam sel sebagai bentuk tidak terlarut (*inclusion bodies*) karena protein BcfD1 teridentifikasi lebih banyak dalam pelet sel.

### **Optimasi kemampuan klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcfD1* dalam mendegradasi MCA**

Klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcfD1* tidak mampu tumbuh dalam minimum medium yang hanya mengandung MCA sebagai satu-satunya sumber karbon. Oleh sebab itu, ketahanan klon rekombinan ini terhadap MCA dipelajari dalam LB medium yang tidak mengandung NaCl dengan penambahan MCA. Pengukuran jumlah sel dilakukan pada kultur cair segar yang telah diinkubasi selama semalam pada 37 °C. Pengukuran dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm dan dinyatakan sebagai densitas optik (OD<sub>600</sub>). Semakin tinggi nilai OD<sub>600</sub> mengindikasikan bahwa sel di dalam kultur berjumlah lebih banyak dibandingkan jumlah sel dalam kultur dengan nilai OD<sub>600</sub> yang lebih rendah. Hasil eksperimen menunjukkan bahwa klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcfD1* mampu mentolerir keberadaan 2 mM MCA dalam medium LB tanpa NaCl, namun jumlah sel semakin menurun sejalan dengan peningkatan konsentrasi MCA, dan klon rekombinan tidak mampu tumbuh lagi pada 6 mM MCA. Data ini mengindikasikan bahwa MCA bersifat racun terhadap sel, meskipun keberadaan MCA dalam konsentrasi rendah masih dapat ditolerir oleh sel. Sebagian besar mikroorganisme yang tahan terhadap MCA diketahui

menghasilkan haloasam dehalogenase yang berfungsi mendegradasi MCA. Hal ini tentu saja diharapkan juga terjadi pada klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcf*d1.

Sesuai dengan mekanisme dehalogenasi, baik oleh haloasam dehalogenase Grup I maupun Grup II, kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi MCA dapat dipelajari secara kolorimetri dengan menentukan jumlah ion  $\text{Cl}^-$  yang dilepaskan ke medium oleh kultur. Salah satu cara yang paling umum digunakan dalam penentuan kadar ion  $\text{Cl}^-$  dalam jumlah kecil adalah menggunakan pereaksi  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$  dan ion  $\text{Fe}^{3+}$  (Bergmann dan Sanik, 1957). Dalam kondisi ini, ion  $\text{Cl}^-$  hasil biodegradasi MCA akan membentuk ion kompleks  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$  yang berwarna merah dan dapat dideteksi secara kuantitatif pada panjang gelombang 460 nm. Reaksi yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 14.



**Gambar 14** Reaksi pembentukan kompleks besi(III) tiosianat

Optimasi kemampuan klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcf*d1 untuk mendegradasi MCA dipelajari dengan variasi kondisi pengkulturan. Variasi yang dilakukan meliputi konsentrasi IPTG sebagai induser, konsentrasi MCA yang ditambahkan ke medium LB (tanpa NaCl), suhu inkubasi sebelum induksi, suhu inkubasi selama induksi atau setelah penambahan IPTG, waktu induksi, dan pH medium. Strategi yang digunakan adalah melakukan variasi terhadap satu variabel dan menjaga variabel lain bernilai tetap seperti kondisi normal untuk mengkultur klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcf*d1.

Kondisi normal untuk mengkultur klon rekombinan ini sebelum induksi adalah inkubasi 6 jam pada 37 °C dengan pengocokan dan 1 mM MCA dalam medium pH 7. Konsentrasi 1 mM MCA dipilih untuk memastikan bahwa sel di dalam kultur dapat tumbuh dengan baik. Sebanyak 0,02 mM IPTG kemudian ditambahkan dan kultur diinkubasi kembali selama 2 jam pada 30 °C dengan pengocokan. Kondisi ini merupakan kondisi normal pasca-induksi. Kadar ion  $\text{Cl}^-$  kemudian ditentukan secara kolorimetri.

Optimasi salah satu variabel dilakukan dengan menjaga kelima variabel lainnya bernilai tetap seperti kondisi normal. Saat kondisi optimum untuk satu variabel telah diperoleh, maka kondisi ini digunakan untuk mengganti

kondisi normal dan variasi terhadap variabel lain kemudian dilakukan. Optimasi dimulai dengan variasi konsentrasi induser IPTG, kemudian dilanjutkan berturut-turut untuk konsentrasi MCA, waktu inkubasi sebelum induksi, kombinasi suhu inkubasi sebelum dan sesudah induksi, waktu inkubasi selama induksi, dan diakhiri dengan variasi pH medium.

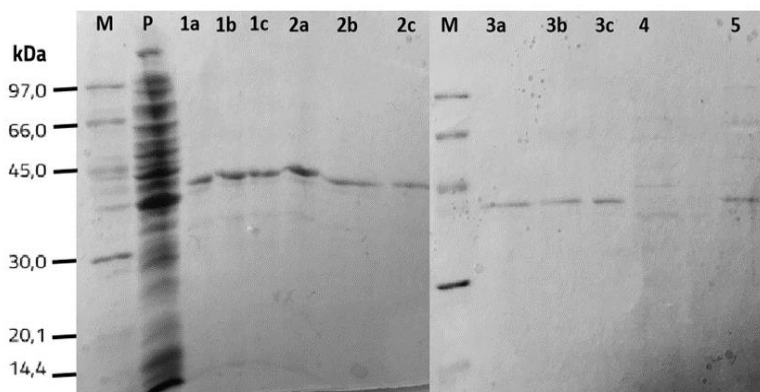
Semua hasil analisis ini menunjukkan bahwa biodegradasi MCA oleh klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcf*d1 terjadi secara optimum dalam medium LB (tanpa NaCl) pada pH 7 dengan substrat MCA pada konsentrasi 0,2 mM. Kondisi inkubasi sebelum penambahan induser IPTG adalah selama 6 jam pada 37 °C dengan pengocokan. Konsentrasi IPTG yang diperlukan untuk ekspresi gen secara optimum adalah 10 µM, yang diikuti dengan waktu inkubasi setelah induksi selama 2 jam pada 30 °C dengan pengocokan.

Hasil ini mengindikasikan bahwa klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcf*d1 dapat digunakan dalam bioremediasi MCA, meskipun konsentrasi MCA yang dapat ditolerir oleh klon ini masih relatif kecil dan kemampuan biodegradasinya masih rendah. Percobaan laboratorium dengan variasi kondisi medium yang mendekati kondisi riil dalam pengolahan limbah masih perlu dilakukan, terutama dengan memperhatikan efek keberadaan zat-zat lain yang dapat mengganggu ekspresi gen dan proses dehalogenasi yang dilakukan oleh klon rekombinan. Upaya modifikasi gen agar protein yang dihasilkan dapat disekresi ke luar sel juga perlu dilakukan.

Untuk memfasilitasi berbagai studi lanjutan terhadap haloasam dehalogenase, ketersediaan protein murni adalah sangat penting. Dalam eksperimen ini, pemurnian haloasam dehalogenase yang dihasilkan oleh klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcf*d1 dipelajari menggunakan kolom kromatografi afinitas Ni-NTA dengan memanfaatkan residu 6 × His-tag yang dikode oleh vektor ekspresi pET-30(a), yang menjadi bagian N-terminus haloasam dehalogenase hasil ekspresi. Residu histidin ini memfasilitasi pemurnian enzim yang dihasilkan oleh plasmid rekombinan, dan berbagai protein rekombinan yang dihasilkan oleh sel telah berhasil dimurnikan (Bornhorst dan Falke, 2000).

Pada pH tertentu, residu histidin pada His-tag akan berinteraksi dan terikat secara spesifik pada ion nikel yang diimobilisasi dengan asam nitrilotriasetat dalam matriks resin (Ni-NTA), sementara protein lainnya akan keluar dari kolom (*flowthrough*). Target protein kemudian dapat dielusi

dengan larutan imidazol, yang dalam hal ini dilakukan dengan gradien konsentrasi dari 100 mM, 250 mM, hingga 500 mM, masing-masing menghasilkan eluat 1, eluat 2, dan eluat 3. Setiap eluat ditampung dalam 3 tabung sehingga masing-masing memberikan 3 fraksi (a, b, dan c). Elektroforegram SDS PAGE untuk melihat molekul protein yang diperoleh dalam setiap fraksi ditunjukkan pada Gambar 15.



**Gambar 15** Elektroforegram SDS-PAGE untuk berbagai fraksi protein yang dihasilkan oleh klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bctd1*.

M = Molekul protein standart, P = *flowthrough*, 1a = fraksi 1 eluat 1, 1b = fraksi 2 eluat 1, 1c = fraksi 3 eluat 1, 2a = fraksi 1 eluat 2, 2b = fraksi 2 eluat 2, 2c = fraksi 3 eluat 2, 3a = fraksi 1 eluat 3, 3b = fraksi 2 eluat 3, 3c = fraksi 3 eluat 3, 4 = larutan cucian 1, dan 5 = larutan cucian 2. Sumber: Ratnaningsih *et al.*, 2021c.

Kandungan protein dalam masing-masing eluat dikuantifikasi menggunakan pereaksi *brilliant coomassie blue* sesuai metode Bradford (Bradford, 1976), dan aktivitas haloasam dehalogenasenya ditentukan dengan menetapkan konsentrasi ion  $\text{Cl}^-$  yang dihasilkan dalam reaksi enzimatik menggunakan substrat MCA. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas haloasam dehalogenase meningkat secara signifikan dalam pemurnian. Aktivitas spesifik tertinggi diperoleh sekitar 12 kali lebih tinggi dibandingkan aktivitas spesifik enzim dalam larutan ekstrak kasar enzim. Hal ini mengindikasikan bahwa pemisahan dan pemurnian enzim dengan memanfaatkan His-tag telah berhasil dilakukan. Keberhasilan pemurnian ini membuka peluang untuk dilakukannya berbagai studi lanjut yang memerlukan haloasam dehalogenase murni, seperti studi kristalografi untuk analisis struktur tersier haloasam dehalogenase.

## Analisis struktur haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1

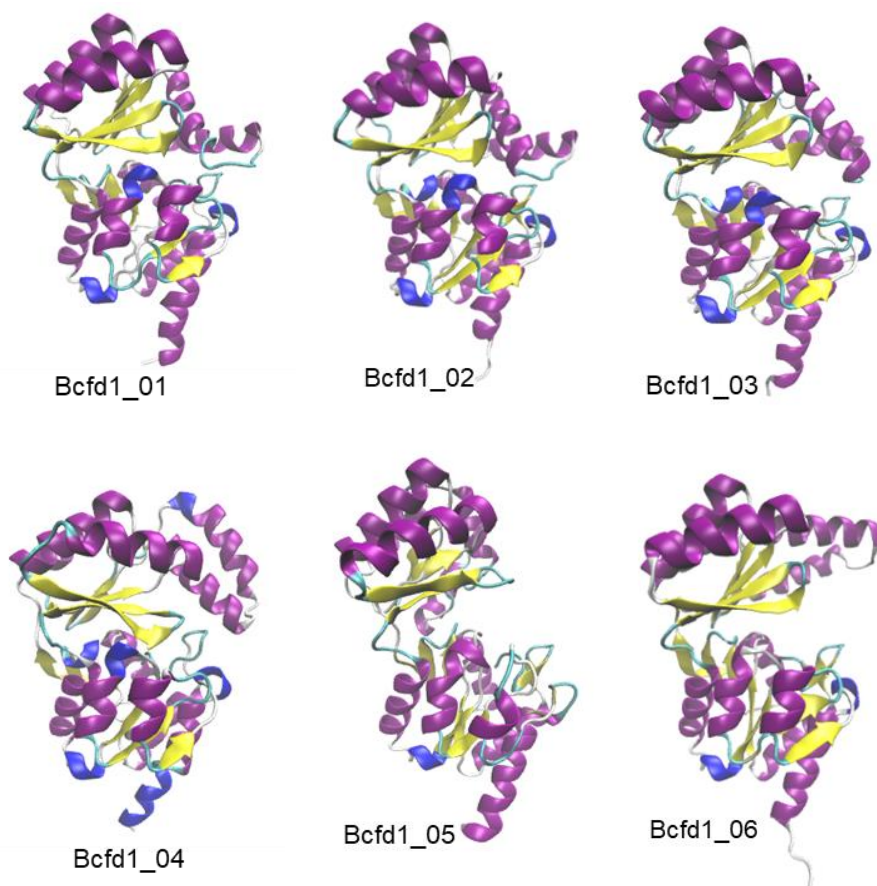
Analisis struktur haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 diprediksi secara *in silico* berdasarkan urutan asam amino dalam struktur primer enzim (Bcfd1) yang dideduksi dari urutan nukleotida *bcbd1* dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bcbd1* menggunakan program translate ExpASy (<https://www.expasy.org/resources/translate>). Analisis awal terhadap struktur ini dilakukan menggunakan *Conserved Domain Database* (CDD), menunjukkan *specific hit* (*e-value*  $5,02 \times 10^{-81}$ ), mengindikasikan bahwa Bcfd1 memiliki domain HAD\_Pase (HAD *family phosphatase*), mirip dengan domain protein Cof dari *Escherichia coli* dan protein TM0651 dari *Thermotoga maritima* yang termasuk ke dalam superfamili HAD\_like (Lu *et al.*, 2020). Sejalan dengan analisis ekspresi yang telah dilakukan, fakta ini menguatkan bahwa Bcfd1 merupakan haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1.

Urutan asam amino Bcfd1 kemudian disejajarkan dengan berbagai protein yang terdapat dalam *protein data bank* (UniProtKB\_pdb) menggunakan BLASTP (<https://www.uniprot.org/blast/>) untuk mencari templat yang sesuai guna memprediksi struktur tersier Bcfd1. Enam model terbaik untuk Bcfd1 diperoleh melalui analisis dengan metode *ab initio* dan pengenalan lipatan (*fold recognition*), yakni menggunakan I-TASSER (Yang dan Zhang, 2015) yang memberikan struktur Bcfd1\_01, Robetta (Hiranuma *et al.*, 2021) menghasilkan struktur Bcfd1\_02, TrRosetta (Yang *et al.*, 2020) menghasilkan struktur Bcfd1\_03, Robetta *ab initio* (Song *et al.*, 2013) menghasilkan struktur Bcfd1\_04, C-Quark (Mortuza, *et al.*, 2021) menghasilkan struktur Bcfd1\_05, dan RaptorX (Wang *et al.*, 2017) memberikan struktur Bcfd1\_06. Enam model struktur terbaik ini ditunjukkan pada Gambar 16. Dapat dilihat bahwa enam model struktur ini menunjukkan kesamaan adanya domain inti (*main domain*) dan domain tutup (*cap domain*) dengan beberapa struktur  $\alpha$ -heliks dan lembaran- $\beta$  yang membentuk lipatan Rossmannoid. Adanya lembaran- $\beta$  pada enam model ini mengindikasikan bahwa haloasam dehalogenase (Bcfd1) dari *B. cereus* IndB1 merupakan Grup II ((Schmidberger *et al.*, 2008).

Analisis lebih lanjut dilakukan melalui penggabungan enam model struktur ini dan hasilnya menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada domain tutup. Rentang deviasi akar kuadrat rata-rata (RMSD) untuk keenam model ini adalah 1,399–3,326 Å, mengindikasikan adanya perbedaan antar keenam struktur global protein tersebut. Oleh sebab itu, analisis



lanjutan perlu dilakukan untuk menetapkan struktur Bcfd1.terbaik, dalam hal ini untuk memfasilitasi analisis doking molekul dan dinamika molekul menggunakan beberapa jenis haloasam sebagai substrat.



**Gambar 16** Prediksi struktur tersier haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1.

Bcfd1\_01: model struktur tersier Bcfd1 dari I-TASSER, Bcfd1\_02: model struktur tersier Bcfd1 dari Robetta, Bcfd1\_03: model struktur tersier Bcfd1 dari TrRosetta, Bcfd1\_04: model struktur tersier Bcfd1 dari Robetta *ab initio*, Bcfd1\_05: model struktur tersier Bcfd1 dari C-Quark, Bcfd1\_06: model struktur tersier Bcfd1 dari RaptorX.  
Sumber: Ratnaningsih dan Saepulloh, 2022.

*Visual molecular dynamics* (VMD) kemudian digunakan untuk menggambarkan dan menyejajarkan keenam model struktur Bcfd1 untuk mempelajari persamaan dan perbedaannya secara lebih detail. Profil tiga dimensi dan aspek geometri keenam struktur dianalisis menggunakan program ERRAT (Colovos dan Yeates, 1993), Verify3D (Bowie *et al.*, 1991), PROVE (Pontius *et al.*, 1996) dan QMEAN (Benkert *et al.*, 2011). Skor terbaik

yang didapat dari analisis menggunakan masing-masing program ditunjukkan pada Tabel 5.

**Tabel 5** Skor untuk profil tiga dimensi dan evaluasi aspek geometri pada enam model struktur tersier haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1

Model	ERRAT	Verify 3D (%)	PROVE (%)	QMEAN
Bcfd1_01	96,00	82,33	5,50	-3,18
Bcfd1_02	-	90,11	3,90	1,72
Bcfd1_03	99,27	93,64	3,20	1,86
Bcfd1_04	-	85,87	4,20	0,86
Bcfd1_05	90,91	100	5,90	-6,25
Bcfd1_06	94,49	85,87	11,60	1,14

Ket: Bcfd1\_02 dan Bcfd1-04 tidak memberikan hasil untuk analisis ERRAT

Disarikan dari: Ratnaningsih dan Saepulloh, 2022.

ERRAT mengevaluasi kualitas model struktur tiga dimensi Bcfd1 berdasarkan aspek statistik interaksi antar-atom tanpa ikatan di dalam ruang (C···C, C···N, N···N, N···O, dan O···O) yang kemudian dibandingkan dengan basis data struktur lain yang terpercaya dengan resolusi tinggi (Colovos dan Yeates, 1993). Skor ERRAT di atas 50% mengindikasikan kualitas struktur yang baik (Rosdi *et al.*, 2018). Dalam hal ini, empat model Bcfd1 dapat digolongkan sebagai struktur yang baik, sedangkan dua model lainnya tidak memberikan skor ERRAT.

Verify3D digunakan untuk mengevaluasi kompatibilitas model struktur tiga dimensi Bcfd1 berdasarkan lokasi setiap residu asam amino melalui perbandingan dengan struktur protein lain yang terdapat di PDB) (Bowie *et al.*, 1991). Skor Verify3D di atas 80% dikategorikan sebagai struktur tiga dimensi dengan kualitas baik (Rosdi *et al.*, 2018). Dapat dilihat di Tabel 5 bahwa keenam model struktur tersier Bcfd1 dapat digolongkan sebagai model struktur yang baik.

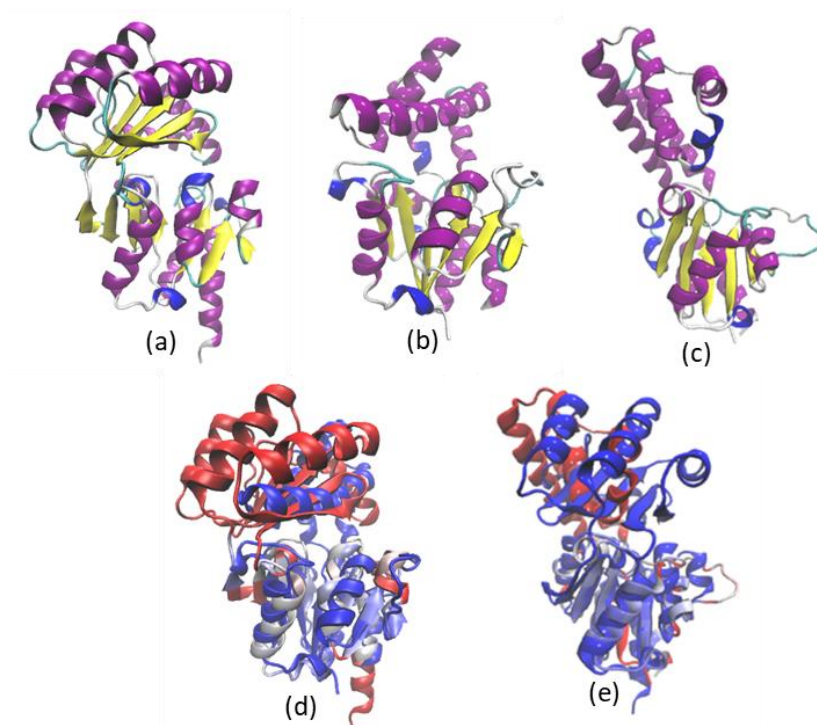
PROVE mengevaluasi kualitas model struktur Bcfd1 berdasarkan deviasi volume atom dalam molekul protein dibandingkan terhadap volume atom standart, dinyatakan sebagai skor-Z (*volume Z-score*) (Pontius *et al.*, 1996). PROVE menghitung persentase atom yang terkubur dalam molekul protein yang teridentifikasi mempunyai deviasi volume 3 kali lebih besar dibandingkan deviasi standar atom serupa dalam berbagai struktur lain. Atom-atom ini disebut sebagai *outlier*, sehingga semakin kecil nilai skor-Z maka model struktur yang disarankan adalah semakin baik. Data yang disampaikan di Tabel 5 menunjukkan bahwa Bcfd1\_03 mempunyai nilai skor-

Z paling rendah, mengindikasikan bahwa model ini adalah model yang terbaik.

QMEAN digunakan untuk mengevaluasi dan memperkirakan kesalahan (*error*) pada suatu model struktur, baik pada keseluruhan struktur (global) maupun lokal (per residu asam amino) (Benkert *et al.*, 2011). Evaluasi menggunakan QMEAN menghasilkan skor kualitas struktur secara keseluruhan dengan mempertimbangkan berbagai aspek geometris model struktur seperti torsi, solvasi, dan interaksi yang potensial berdasarkan karbon beta ( $C\beta$ ) serta semua jenis atom lain. Selain itu, QMEAN juga memberikan informasi mengenai estimasi kualitas masing-masing residu penyusun model struktur. Skor QMEAN yang tinggi mengindikasikan bahwa model yang diusulkan adalah lebih baik dibandingkan model lain dengan skor yang lebih rendah. Dalam Tabel 5 terlihat bahwa model Bcfd1\_03 mempunyai skor QMEAN yang paling tinggi, menyarankan bahwa model ini adalah lebih baik dibandingkan model lainnya.

Evaluasi keenam model struktur tersier mengindikasikan bahwa Bcfd1\_03 merupakan model yang lebih baik dibandingkan lima model lainnya dalam Gambar 16. Meskipun demikian, model Bcfd1\_03 tidak menunjukkan skor terbaik untuk analisis ERRAT dan Verify3D. Oleh sebab itu, dilakukan evaluasi lanjutan menggunakan PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), WHAT\_CHECK (Hooft *et al.*, 1996) dan MolProbity (Williams *et al.*, 2018).

PROCHECK menilai kualitas stereokimia model struktur protein berdasarkan analisis geometri residu asam amino penyusunnya melalui perbandingan dengan struktur protein lain yang beresolusi tinggi, dan hasilnya ditampilkan dalam bentuk diagram Ramachandran. WHAT\_CHECK digunakan untuk melakukan perhitungan secara lebih ekstensif terhadap parameter-parameter stereokimia. Evaluasi dengan MolProbity sangat bergantung pada kekuatan dan sensitivitas penempatan atom hidrogen yang dioptimalkan dan analisis kontak antara semua atom dalam struktur (Eswar *et al.*, 2006), menghasilkan *clash score* yang menunjukkan kontak antar-atom dengan tumbukan (*clash*) yang nyata. Analisis dan evaluasi menggunakan ketiga program ini mendukung penetapan Bcfd1\_03 (selanjutnya disebut sebagai Bcfd1 saja) sebagai model struktur tersier terbaik untuk haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1.



**Gambar 17** Perbandingan struktur tersier tiga haloasam dehalogenase.

(a) Bcfd1. (b) L-DEX YL dari *Pseudomonas* sp. YL. (c) ps-2-HAD dari *Pseudomonas syringae*.

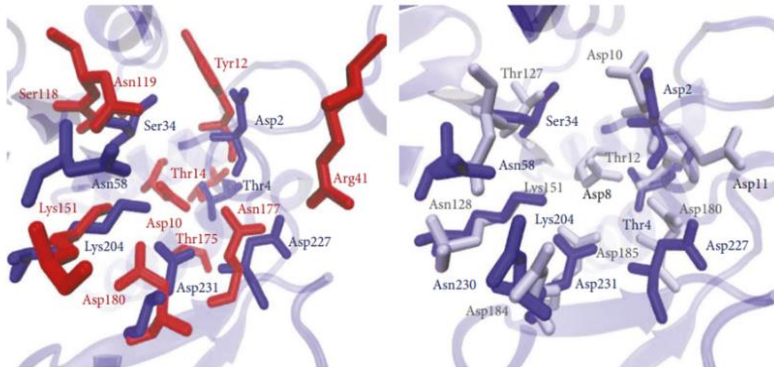
(d) penyejajaran Bcfd1 dengan L-DEX YL. (e) penyejajaran Bcfd1 dengan ps-2-HAD. Sumber: Ratnaningsih dan Saepulloh, 2022.

Analisis struktur lebih lanjut untuk mempelajari residu asam amino penting dalam sisi aktif Bcfd1 dan memprediksi enansioselektivitas Bcfd1 terhadap substrat, maka dilakukan analisis menggunakan DALI server (Holm, 2020). Penyejajaran struktur Bcfd1 dengan struktur haloasam dehalogenase yang terdapat dalam PDB menunjukkan bahwa Bcfd1 mempunyai kemiripan yang tinggi dengan L-haloasam dehalogenase dari 28 bakteri, dengan kemiripan tertinggi terhadap L-2-haloasam dehalogenase L-DEX YL dari *Pseudomonas* sp. YL (Li *et al.*, 1998) and ps-2- HAD dari *Pseudomonas syringae* (Hou *et al.*, 2013). Perbandingan struktur tersier ketiga L-2-haloasam dehalogenase ini serta hasil penyejajaran Bcfd1 dengan kedua enzim lainnya ditunjukkan pada Gambar 17.

Hasil analisis ini menunjukkan bahwa Bcfd1 merupakan L-haloasam dehalogenase. Serupa dengan haloasam dehalogenase lainnya, Bcfd1 juga mempunyai domain tutup dan domain utama. Domain utama Bcfd1 dan L-DEX YL mengandung beberapa struktur  $\alpha$ -heliks dan lipatan- $\beta$  yang

membentuk lipatan Rossmannoid, namun Bcfd1 mempunyai lebih banyak  $\alpha$ -heliks dan lipatan- $\beta$  dibandingkan L-DEX YL. Domain tutup Bcfd1 mempunyai lima lipatan- $\beta$  yang terhubung dengan lima struktur  $\alpha$ -heliks, dan lokasi antara lipatan- $\beta$  keempat dan kelima terletak pada domain utama. Di lain pihak, domain tutup yang dimiliki oleh L-DEX YL hanya mempunyai empat  $\alpha$ -heliks yang terletak di antara lipatan- $\beta$  pertama dan kedua dalam domain utama. Perbandingan serupa juga diamati antara Bcfd1 dengan ps-2-HAD, karena L-DEX YL mempunyai kemiripan yang tinggi dengan ps-2-HAD.

Untuk mempelajari kemungkinan adanya residu lestari yang menunjang aktivitas Bcfd1 seperti yang dipunyai oleh L-DEX YL dan ps-2-HAD, maka dilakukan penyejajaran secara lebih detail. Hasil penyejajaran ini ditunjukkan pada Gambar 18.



**Gambar 18** Penyejajaran sisi aktif Bcfd1 (biru) dengan L-DEX YL (merah) dari *Pseudomonas* sp YL dan ps-2-HAD (abu-abu) dari *Pseudomonas syringae*.  
Sumber: Ratnaningsih dan Saepulloh, 2022.

Hasil penyejajaran ini menunjukkan bahwa sisi aktif Bcfd1 lebih mirip dengan sisi aktif ps-2-HAD yang mempunyai lebih banyak residu asam aspartat dibandingkan L-DEX YL. Asam aspartat diprediksi sebagai residu yang terlibat dalam mekanisme katalisis haloasam dehalogenase. Selain itu, sisi aktif Bcfd1 mempunyai residu lestari yang hampir sama dengan L-DEX YL yang diidentifikasi sebagai residu penting untuk mengikat substrat (Thr4, Ser34, Asn58, Lys204, and Asp227) dan melakukan hidrolisis (Asp180). Residu-residu ini hampir berimpit dengan residu yang dimiliki oleh Bcfd1 (Asp2, Thr4, Ser34, Asn58, Lys204, Asp227, and Asp231). Namun, dibandingkan dengan L-DEX YL, Bcfd1 tidak mempunyai residu lestari Asp10 yang berperan

sebagai nukleofil dan tidak mempunyai Arg41 yang berperan dalam menstabilkan ion halida dalam proses katalisis.

Jika dibandingkan dengan ps-2-HAD, Bcfd1 memiliki semua residu yang diperlukan dalam katalisis kecuali Asp8 yang diperkirakan berfungsi sebagai nukleofil. Bcfd1 dan ps-2-HAD tidak mempunyai residu lestar Arg seperti halnya L-haloasam dehalogenase lain, tetapi keduanya mempunyai lebih banyak residu Asp pada sisi aktifnya. Secara keseluruhan, residu asam amino pada sisi aktif Bcfd1 lebih mirip dengan ps-2-HAD, mengindikasikan bahwa Bcfd1 kemungkinan aktif terhadap substrat D-haloasam maupun L-haloasam dehalogenase. Aspek ini memerlukan pembuktian di laboratorium (*wet experiments*), dan dapat diprediksi secara *in silico* melalui pendekatan doking molekul serta dinamika molekul.

## **Analisis spesifitas substrat haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1**

Interaksi haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 dengan ligan dipelajari secara *in silico* menggunakan substrat asam 2-kloro karboksilat dengan jumlah atom karbon yang diperpanjang, mulai dari MCA hingga asam 2-kloroheksanoat, baik yang berkonfigurasi D- maupun L-. Asam 2-kloro alkanat dipilih karena Bcfd1 diketahui aktif terhadap MCA dan memiliki struktur yang mirip dengan L-DEX YL dan ps-2-HAD, tetapi enasioselektifitasnya terhadap substrat dengan kerangka atom karbon yang lebih panjang masih belum diketahui. Analisis dilakukan dengan pendekatan doking di tingkat molekul menggunakan 9 jenis substrat seperti ditunjukkan pada Tabel 6.

Struktur ligan disiapkan dengan program MarvinSketch menggunakan medan gaya MMFF94 untuk mendapatkan konformasi yang paling stabil. Muatan dan kepolaran atom hidrogen ditambahkan pada semua struktur ligan dan molekul Bcfd1 menggunakan perangkat AutoDock 1.5.7. Doking di tingkat molekul kemudian dilakukan dengan program AutoDock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021) menggunakan algoritma genetik Lamarckian (LGA) untuk mencari pose terbaik ligan di dalam sisi aktif Bcfd1. Dimensi *grid box* pada sisi aktif Bcfd1 ditetapkan sebesar  $20 \times 20 \times 20$  Å. Proses doking dilakukan secara menyeluruh pada nilai 24 dengan jumlah mode sebanyak 50 untuk setiap ligan (Forli *et al.*, 2016). Proses simulasi dilakukan berulang sebanyak 10 kali untuk

masing-masing ligan. Pose doking terbaik bagi setiap ligan ditentukan berdasarkan skor doking dalam bentuk energi afinitas dan nilai akar kuadrat rata-rata deviasi (RMSD) antara ligan dan atom-atom dalam residu sisi aktif Bcfd1. Hasil ini ditunjukkan pada Tabel 6.

**Tabel 6** Nilai energi afinitas interaksi haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 dengan asam 2-kloroalkanoat pada pose terbaik

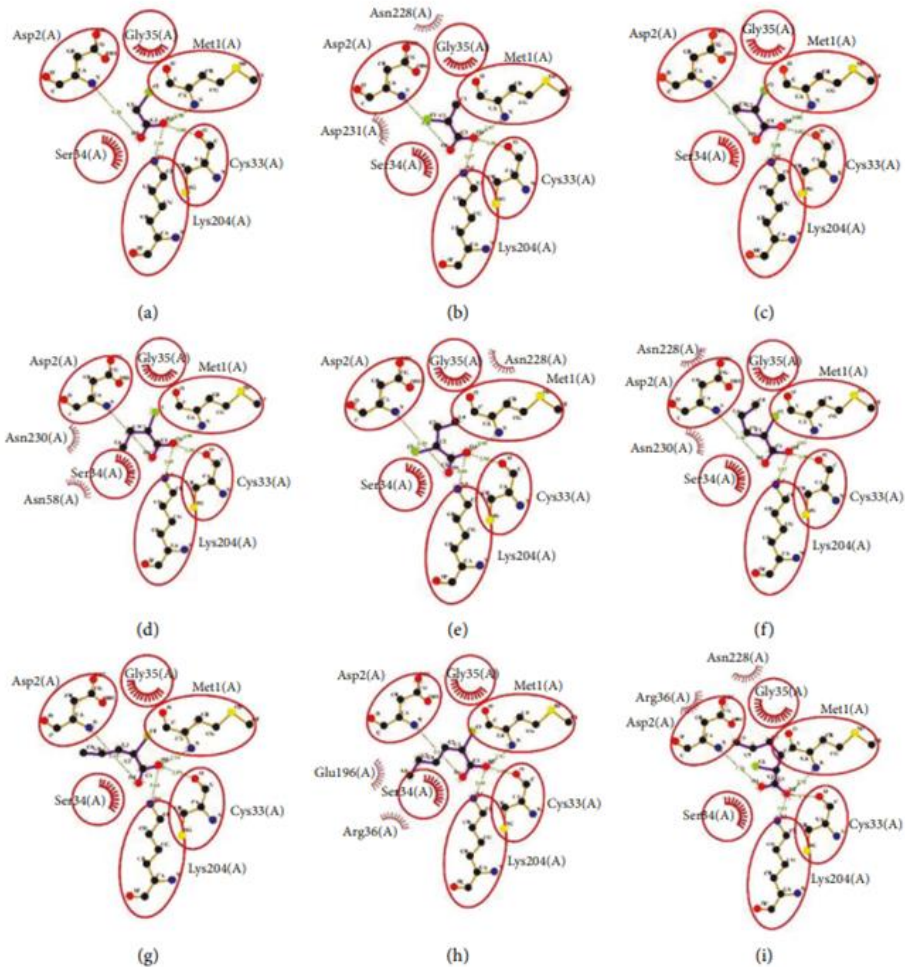
No.	Ligan	Kode	Energi afinitas (kkal/mol)	RMSD	Pose
1	Asam monokloroasetat	MCA	-3,6	0 - 0,03	Mode 1
2	Asam L-2-kloropropanoat	L2CP	-4,1	0	Mode 1
3	Asam D-2-kloropropanoat	D2CP	-4,1	0	Mode 1
4	Asam L-2-klorobutanoat	L2CB	-4,2	0 - 0,04	Mode 4
5	Asam D-2-klorobutanoat	D2CB	-4,3	0,03 - 0,04	Mode 5
6	Asam L-2-kloropentanoat	L2CPn	-4,4	0,02 - 0,06	Mode 3
7	Asam D-2-kloropentanoat	D2VPn	-4,5	0,01 - 0,04	Mode 4
8	Asam L-2-kloroheksanoat	L2CH	-4,6	0,05 - 0,09	Mode 4
9	Asam D-2-kloroheksanoat	D2CH	-4,7	0,02 - 0,14	Mode 4

Ket: RMSD = *root mean square deviation*. Disarikan dari: Ratnaningsih dan Saepulloh, 2022.

Dapat dilihat di Tabel 6 bahwa skor *doking* cenderung menurun dengan bertambah panjangnya rantai karbon pada ligan. Hasil ini sesuai dengan aktivitas haloasam dehalogenase DehIVa dari *Burkholderia cepacia* MBA4 yang menunjukkan penurunan nilai energi afinitas dengan ligan yang mempunyai kerangka karbon lebih panjang (Schmidberger *et al.*, 2007). Meskipun demikian, visualisasi pada setiap pose Bcfd1 menunjukkan bahwa energi afinitas terendah hanya terjadi saat ligan MCA, L-2CD, dan D2CP terikat pada sisi aktif enzim. Ligan lain dengan kerangka karbon yang lebih panjang tampak terikat pada kantung lain Bcfd1, meskipun masih dapat terikat pada sisi aktif Bcfd1 dengan energi yang lebih tinggi atau afinitas yang lebih rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa Bcfd1 mempunyai aktivitas yang lebih rendah terhadap substrat asam 2-alkanoat dengan kerangka karbon yang lebih besar dari asam propoanoat.

Data di Tabel 6 juga menunjukkan bahwa skor doking untuk ligan L-haloasam dan D-haloasam tidak berbeda secara signifikan, terutama untuk L2CP dan D2CP. Fakta ini mengindikasikan bahwa Bcfd1 bersifat aktif terhadap L2CP maupun D2CP, serupa dengan data yang telah dilaporkan untuk DehE, DL-haloasam dehalogenase dari *Rhizobium* sp. RC1 yang mempunyai energi ikatan sama terhadap L2CP dan D2CP (Hamid *et al.*, 2013). Di lain pihak, hasil percobaan di laboratorium menyatakan bahwa haloasam

dehalogenase ps-2-HAD dari *P. syringae* pv. Tomato DC3000 ditemukan aktif terhadap L2CP dan D2CP (Hou *et al.*, 2013). Meskipun demikian, L-haloasam dehalogenase DehIVa dari *B. cepacia* MBA4 dilaporkan mempunyai skor doking serupa untuk ligan L-haloasam dan D-haloasam, namun hasil laboratorium menunjukkan bahwa DehIVa hanya aktif terhadap L-haloasam (Schmidberger *et al.*, 2007). Hal ini mengindikasikan bahwa percobaan laboratorium untuk mempelajari aktivitas Bcfd1 terhadap L2CP dan D2CP jelas masih diperlukan.



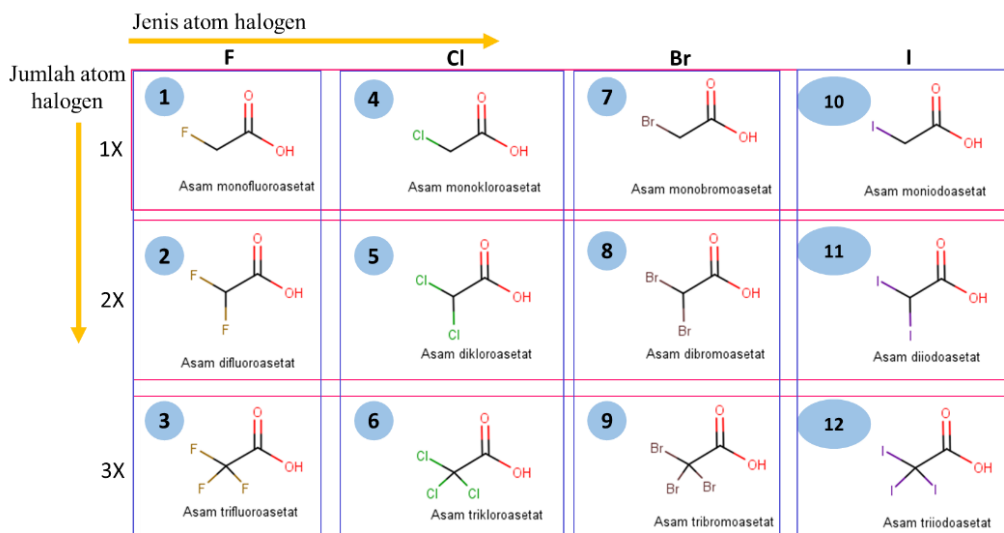
**Gambar 19** Skema interaksi antara residu asam amino dalam sisi aktif Bcfd1 dengan ligan asam 2-kloroalkanoat.  
 (a) MCA. (b) L2CP. (c) D2CP. (d) L2CB. (e) D2CB. (f) L2CPn. (g) D2CPn. (h) L2CH. (i) D2CH  
 Sumber: Ratnaningsih dan Saepulloh, 2022.



Interaksi antara ligan dengan residu asam amino pada sisi aktif Bcfd1 dianalisis menggunakan LigPlot+ (Laskowski dan Swindells, 2011). Ligan yang digunakan adalah sembilan asam 2-kloroalkanoat yang ditunjukkan pada Tabel 6 dan gambaran LigPlot yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 19. Hasil analisis LigPlot ini memperlihatkan bahwa empat residu asam amino pada sisi aktif Bcfd1, yaitu Met1, Asp2, Cys33, dan Lys204, membentuk ikatan hidrogen dengan ligan dan berorientasi dengan arah yang sama pada gugus karboksilat yang dimiliki oleh ligan, mengindikasikan bahwa keempat residu ini memegang peran penting dalam Bcfd1 untuk menstabilkan substrat dalam sisi aktif enzim. Semua ikatan hidrogen ini mengarahkan gugus karboksilat yang dimiliki oleh molekul ligan ke sisi aktif Bcfd1 sehingga memfasilitasi proses katalisis. Meskipun demikian, kemampuan katalisis Bcfd1 untuk melakukan dehalogenasi masih perlu dipelajari lebih lanjut.

Analisis LigPlot+ ini juga menunjukkan adanya interaksi hidrofobik antara ligan dengan residu Gly35, Ser34, Asn58, Asn228, Asn230, dan Asp 231. Jumlah residu asam amino dalam Bcfd1 yang berinteraksi secara hidrofobik dengan ligan terlihat meningkat dengan semakin panjangnya rantai karbon pada molekul ligan, mengindikasikan pentingnya asam amino ini dalam mengikat dan mengarahkan ligan pada sisi aktif enzim untuk memfasilitasi proses dehalogenasi. Meskipun ligan dengan kerangka karbon hingga enam masih dapat terikat pada sisi aktif Bcfd1, namun skor *docking*-nya cenderung menurun, mengindikasikan bahwa interaksinya cenderung melemah dengan semakin panjangnya rantai karbon pada ligan. Pembuktian lebih lanjut melalui analisis dinamika molekul masih diperlukan untuk mendukung hasil ini. Sebagian besar haloasam dehalogenase yang telah dipelajari umumnya hanya aktif pada substrat dengan 3 rantai karbon.

Spesifisitas jenis substrat untuk Bcfd1 juga dipelajari melalui simulasi menggunakan variasi asam haloasetat yang mengandung atom halogen berbeda dengan jumlah yang berbeda. Dalam hal ini, digunakan asam haloasetat yang pada Ca mengandung halogen F, Cl, Br, atau I, baik sebagai asam monohaloasetat, asam dihaloasetat, maupun asam trihaloasetat. Struktur duabelas substrat yang digunakan dalam simulasi ini ditunjukkan pada Gambar 20.

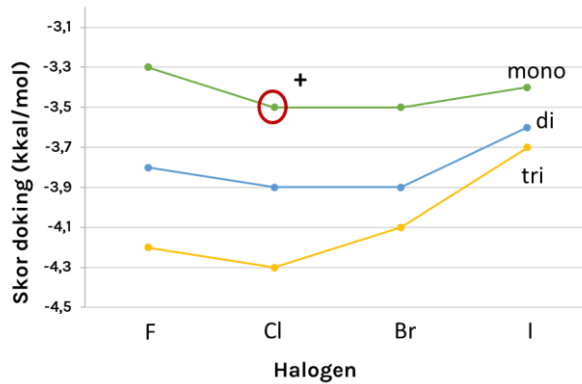


**Gambar 20** Variasi jenis dan jumlah atom halogen pada substrat asam-2-haloalkanoat untuk haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1.

1 = MFA, 2 = DFA, 3 = TFA, 4 = MCA, 5 = DCA, 6 = TCA, 7 = MBA, 8 = DBA, 9 = TBA, 10 = MIA, 11 = DIA, 12 = TIA. Sumber: Aridayani, 2022.

Analisis interaksi substrat dengan residu asam amino pada sisi aktif Bcfd1 dipelajari menggunakan LigPlot+ (Laskowski dan Swindells, 2011). Konsisten dengan hasil-hasil sebelumnya, analisis ini menunjukkan bahwa Asp2 selalu mengarah pada C $\alpha$ , mengindikasikan kemungkinan perannya sebagai nukleofil dalam reaksi katalisis. Meskipun demikian, aspek ini perlu dipelajari dan dibuktikan lebih lanjut menggunakan mutasi terarah, yakni dengan mengganti Asp2 dengan asam amino lain dan melihat efeknya dalam proses katalisis.

Analisis skor doking antara ke-12 substrat asam haloasetat dengan Bcfd1 ditunjukkan pada Gambar 21. Secara umum, asam mono-haloasetat selalu memiliki nilai skor doking yang tinggi, mengindikasikan bahwa substrat ini lebih mudah berinteraksi dengan enzim. Selain itu, tidak terlihat perbedaan yang signifikan untuk skor doking bagi mono-, di-, dan tri-haloasam dengan jenis atom halogen yang sama, meskipun substrat iodo- menunjukkan arah orientasi yang berbeda. Fakta ini mengindikasikan kemungkinan adanya aktivitas haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1 untuk tipe substrat termaksud. Dalam kaitan ini, pembuktian lebih lanjut melalui percobaan basah di laboratorium masih diperlukan.



**Gambar 21** Skor doking untuk 12 jenis substrat asam haloasetat dengan haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1. Sumber: Aridayani, 2022.

### 3.2 *Klebsiella pneumoniae* ITB1

*Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang dari family Enterobacteriaceae. Bakteri ini dikenal sebagai patogen penyebab penyakit paru yang dikenal sebagai pneumoniae. Sifat patogen *K. pneumoniae* terutama disebabkan karena adanya lapisan kapsul tebal yang mengelilingi dinding selnya yang bertindak sebagai antigen, selain juga berfungsi untuk melindungi bakteri ini dari fagositosis (Lawlor *et al.*, 2005). Berbagai genus *Klebsiella* diketahui memproduksi dua jenis antigen untuk melapisi permukaan selnya, yaitu antigen O yang merupakan lipopolisakarida dan antigen K yang merupakan kapsul polisakarida.

Urutan genom utuh beberapa strain *K. pneumoniae* telah berhasil ditentukan dan tersedia di GenBank NCBI, beberapa di antaranya diketahui mengandung gen haloasam dehalogenase. Dalam penelitian kami, secara tidak sengaja kami telah mendapatkan *K. pneumoniae* strain lokal yang kemudian kami sebut sebagai *K. pneumoniae* ITB1. Identifikasi dan karakterisasi secara *ribotyping* menggunakan 16S rRNA telah dilakukan, dan gen pengkode haloasam dehalogenase dari bakteri ini telah berhasil diperoleh melalui pendekatan PCR dan diklon ke dalam pGEM-T Easy untuk analisis restriksi dan sekuensing (Tahya dan Ratnaningsih, 2015). Gen haloasam dehalogenase ini, yang disebut sebagai *hakup1*, kemudian di sub-klon ke vektor ekspresi pET-30a (Anggoro dan Ratnaningsih, 2017a) dan analisis ekspresi gen *hakup1* dalam klon rekombinan telah dilakukan (Anggoro dan Ratnaningsih, 2017b). Optimasi kondisi ekspresi gen haloasam dehalogenase ini dalam klon

rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*harp1* juga telah dipelajari menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) (Ratnaningish *et al.*, 2022). Urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1 telah dideposit dalam GenBank NCBI dengan kode akses KX898150.1, sementara struktur primer proteinnya dapat diakses dengan kode AQT27349.1.

## **Kloning dan analisis urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1**

Penelitian dimulai dengan identifikasi *K. pneumoniae* hasil isolasi sebagai bakteri Gram negatif melalui reaksi pewarnaan Gram menggunakan kristal violet, diikuti dengan *ribotyping* 16S rRNA menggunakan primer universal 5'-AGAGTTTGAT(A/C)TGGCTCAG-3' (BactF1) dan 5'-GGTTAC(G/C)TTTGGTACGACTT-3' (UniB1). Kedua analisis ini memberikan hasil bahwa isolat yang dipunyai adalah *K. pneumoniae*, yang kemudian disebut *K. pneumoniae* ITB1.

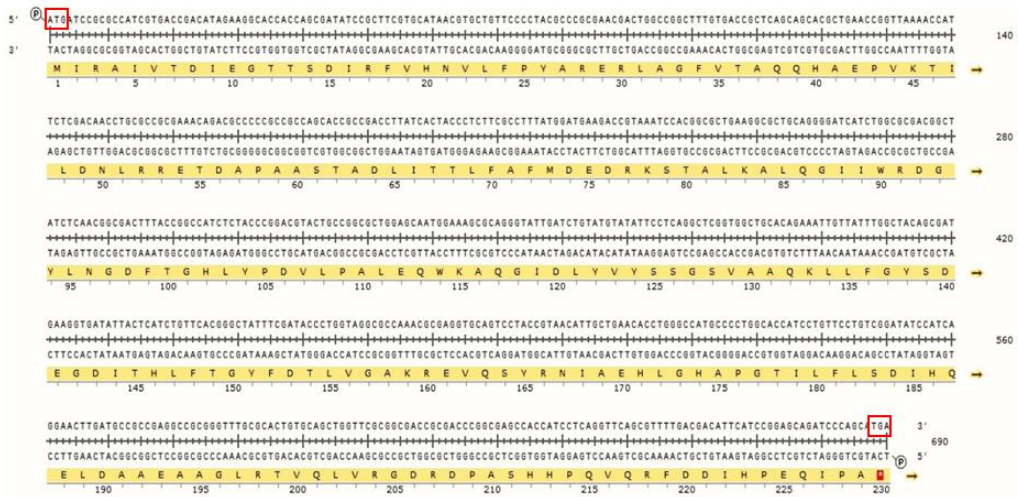
Kemampuan *K. pneumoniae* ITB1 untuk tumbuh dalam minimal medium yang hanya mengandung MCA sebagai sumber karbon dipelajari dengan mengamati jumlah sel dalam kultur segar sebagai nilai OD<sub>600</sub> dan menentukan konsentrasi ion Cl<sup>-</sup> yang dilepaskan ke medium. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa *K. pneumoniae* ITB mampu tumbuh dalam minimal medium yang hanya mengandung MCA sebagai sumber karbon. Jumlah sel paling banyak diamati pada 5 mM MCA, dan jumlah sel semakin menurun dengan meningkatnya konsentrasi MCA. Hal ini berarti bahwa MCA merupakan racun bagi sel, namun dalam konsentrasi tertentu masih dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk menunjang kehidupan bakteri. Sejalan dengan pertumbuhan sel, konsentrasi ion Cl<sup>-</sup> paling tinggi juga diamati pada 5 mM MCA. Kedua fakta ini mengindikasikan bahwa *K. pneumoniae* dapat mendegradasi MCA dan dapat diduga bahwa bakteri ini mempunyai gen haloasam dehalogenase.

Upaya untuk isolasi gen dilakukan melalui pendekatan PCR menggunakan sepasang primer yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen serupa dari *K. pneumoniae* yang tersedia di GenBank NCBI. Primer yang kemudian digunakan dalam PCR adalah 5'-ATGATCC GCGCCATCGTG-3' sebagai primer maju dan 5'-TCATGCTGGGATCTG CTCC-3' sebagai primer mundur, menggunakan kromosom *K. pneumoniae* ITB sebagai templat. Amplikon yang diperoleh merupakan amplikon tunggal yang bersih dan sangat tajam dengan

ukuran sekitar 0,7 kb. Ukuran amplikon ini adalah sesuai dengan yang diharapkan, dan kemungkinan besar merupakan gen putatif haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1. Amplikon ini kemudian disisipkan pada pGEM-T Easy dan diperbanyak dalam sel inang *E. coli* TOP10 untuk analisis lebih lanjut. Plasmid rekombinan yang diperoleh disebut sebagai pGEM-HAD.

Gen haloasam dehalogenase putatif dalam klon rekombinan pGEM-HAD dikonfirmasi dengan re-PCR, dan urutan nukleotidanya ditentukan menggunakan metode dideoksi Sanger. Hasil re-PCR memberikan fragmen tunggal dengan ukuran 0,7 kb, mengkonfirmasi bahwa fragmen DNA yang berhasil disisipkan ke vektor pGEM adalah benar. Urutan nukleotida yang diperoleh bersama urutan asam amino hasil deduksinya ditunjukkan pada Gambar 22. Gen ini kemudian disebut sebagai *hakup1* dan protein hasil translasinya disebut Hakup1. Urutan nukleotida *hakup1* merupakan urutan gen utuh yang mengandung *start kodon* ATG hingga *stop kodon* TGA dengan ukuran 690 bp, sesuai dengan ukuran gen yang telah diperoleh sebelumnya dalam elektroforegram gel agarosa. Keberadaan *start* dan *stop kodon* ini akan memudahkan analisis ekspresi gen dalam sel inang intergenera.

Analisis urutan nukleotida *hakup1* terhadap urutan nukleotida yang terdapat di basis data GenBank NCBI menunjukkan bahwa *hakup1* memiliki kesamaan  $\geq 99\%$  dengan urutan nukleotida tertentu dalam genom berbagai strain *K. pneumoniae* lain. Urutan nukleotida *hakup1* menunjukkan kesamaan  $>99\%$  dengan fragmen nukleotida dalam genom *K. pneumoniae* strain PMK1 dengan kode akses CP008929.1, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* PittNDM01 dengan kode akses CP006798.1, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 1158 dengan kode akses CP006722.1, *K. pneumoniae* strain XH209 dengan kode akses CP009461.1 dan *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Kp13 dengan kode akses CP003999.1. Fragmen-fragmen dalam berbagai genom strain *K. pneumoniae* belum diketahui fungsinya secara pasti. Di lain pihak, urutan nukleotida *hakup1* mempunyai kesamaan tinggi dengan gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain KPNIH31 dengan kode akses CP009876.1, *K. pneumoniae* HK787 dengan kode akses CP006738.1, *K. pneumoniae* CG43 dengan kode akses CP006648.1, dan *K. pneumoniae* KCTC 2242 dengan kode akses CP002910.1. Hasil analisis ini mengindikasikan bahwa gen *hakup1* adalah benar berasal dari *K. pneumoniae* ITB1 yang mengkode haloasam dehalogenase.



**Gambar 22** Urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase (*hkp1*) dari *K. pneumoniae* ITB1  
 Start kodon ATG dan stop kodon TGA ditunjukkan dalam kotak merah  
 Sumber: Tahya dan Ratnaningsih, 2015.

Analisis di tingkat protein, menggunakan hasil translasi *hkp1*, menunjukkan bahwa Hkp1 mempunyai kemiripan yang tinggi dengan haloasam dehalogenase (HAD)-like superfamili hidrolase dari *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain KPNIH31 dengan kode akses AIX82895.1, haloasam dehalogenase-like famili fosfatase dari *K. pneumoniae* HK787 dengan kode akses AJB29985.1. Selain itu, Hkp1 juga mempunyai kesamaan tinggi dengan fosfatase dari *K. pneumoniae* strain PMK1 dengan kode akses AIT03589.1, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* PittNDM01 dengan kode akses AIG81466.1 dan AIG1467.7. Fosfatase adalah enzim yang merupakan salah satu kelas dalam famili haloasam dehalogenase. Hasil analisis ini mendukung hasil sebelumnya yang menunjukkan bahwa Hkp1 merupakan haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1. Analisis lebih lanjut untuk mempelajari aktivitas enzim haloasam dehalogenase yang dikode oleh *hkp1* memerlukan klon rekombinan dalam vektor ekspresi, sehingga protein enzim dapat dihasilkan untuk memfasilitasi analisis. Oleh sebab itu, gen ini perlu dipindahkan dari pGEM-HAD ke vektor ekspresi, dalam hal ini digunakan sistem pET-30(a) dalam sel inang *E. coli* Bl21 (DE3).

## Sub-Kloning gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1 ke vektor ekspresi pET-30(a)

Gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1 (*hkp1*) yang telah diperoleh dalam klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-HAD dipindahkan ke vektor ekspresi pET-30(a) melalui pendekatan PCR menggunakan sepasang primer dengan penambahan sisi restriksi di kedua ujungnya agar sub-kloning dapat dilakukan secara terarah sesuai keperluan ekspresi. Sisi restriksi *EcoRI* ditambahkan pada primer maju dan sisi restriksi *HindIII* ditambahkan pada primer mundur, karena kedua sisi restriksi ini tidak terdapat dalam urutan nukleotida *hkp1*. Urutan primer untuk sub-kloning ini adalah 5'-**GAATTC** ATGATCCGCGCCATCGTG-3' sebagai primer maju dan 5'-**AAGCTT**TCATG CTGGGATCTGCTCC-3' sebagai primer mundur.

Pasangan primer ini digunakan dalam PCR menggunakan templat kromosom *K. pneumoniae* ITB1 dan amplicon yang diperoleh disisipkan lebih dahulu ke pGEM-T Easy untuk diperbanyak dalam *E. coli* TOP10. Plasmid rekombinan yang terbentuk diisolasi kembali sebagai pGEM-*hkp1*. Selanjutnya, pGEM-*hkp1* dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII*, dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa, dan gen *hkp1* diligasi dengan pET-30(a) yang telah dilinearisi dengan *EcoRI-HindIII*. Plasmid rekombinan yang diperoleh digunakan untuk mentransformasi *E. coli* BL21 (DE3) sehingga didapatkan klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hkp1*. Gen *hkp1* dalam klon rekombinan pET-*hkp1* ini dikonfirmasi dengan menentukan ukuran plasmid rekombinan dan analisis restriksi menggunakan *EcoRI* dan *HindIII*, selain juga dilakukan re-PCR yang menghasilkan amplicon berukuran ~0,7 kb. Analisis pada zimogram untuk melihat aktivitas haloasam dehalogenase dari klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hkp1* juga memberikan hasil positif. Semua konfirmasi ini menunjukkan bahwa plasmid rekombinan pET-*hkp1* telah berhasil diperoleh. Keberhasilan sub-kloning ini memfasilitasi analisis ekspresi gen haloasam dehalogenase *K. pneumoniae* dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hkp1*.

## **Analisis dan optimasi ekspresi gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1 dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hakp1***

Analisis ekspresi gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1 dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hakp1* dilakukan dengan melihat protein hasil ekspresi dalam klon rekombinan, sebelum dan sesudah induksi dengan IPTG. Sel dari kultur segar dipecah menggunakan sonikasi dan lisat sel dipisahkan dari debris sel melalui sentrifugasi. Lisat dan debris sel kemudian dianalisis dalam SDS PAGE. Sesuai yang diharapkan, hasil analisis ini menunjukkan adanya protein yang berukuran sekitar 28 kDa dalam debris sel, yang berkorelasi dengan haloasam dehalogenase, mengindikasikan bahwa ekspresi gen *hakp1* dalam plasmid rekombinan pET-*hakp1* telah berhasil dilakukan. Protein yang berukuran 28 kDa ini tidak teramati dalam medium, mengindikasikan bahwa Hakp1 merupakan enzim intrasel. Di lain pihak, protein ini teramati baik dalam debris sel maupun dalam lisat sel tanpa bisa dibedakan secara signifikan sebagai protein terlarut atau protein yang tidak larut di dalam sel. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa haloasam dehalogenase yang ditemukan dalam debris sel umumnya merupakan *inclusion bodies* yang bersifat tidak aktif (Ratnaningsih *et al.*, 2021c).

Analisis lebih lanjut terhadap lisat sel klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hakp1*, mengonfirmasi bahwa protein yang berukuran sekitar 28 kDa hanya dihasilkan setelah induksi dengan IPTG dan tidak teridentifikasi dalam lisat sel tanpa adanya induksi IPTG, mengindikasikan pentingnya induser untuk ekspresi gen dalam sistem pET.

Aktivitas haloasam dehalogenase dari klon rekombinan ini ditunjukkan dengan jelas pada analisis zimogram yang diperoleh dengan merendam SDS PAGE natif dalam larutan yang mengandung substrat MCA dan dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan AgNO<sub>3</sub>. Munculnya pita putih pada 28 kDa, yang merupakan AgCl, menunjukkan hasil positif adanya aktivitas haloasam dehalogenase dalam lisat sel yang dihasilkan oleh klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hakp1*. Penelitian selanjutnya untuk penentuan kondisi optimum ekspresi gen haloasam dehalogenase dalam klon rekombinan ini dilakukan menggunakan lisat sel sebagai ekstrak kasar enzim.

Optimasi ekspresi gen haloasam dehalogenase dari *K. pneumoniae* ITB1 dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hakp1* dipelajari dengan



metode statistik *Response Surface Methodology* (RSM). Metode statistik ini memungkinkan untuk melakukan beberapa variasi kondisi penumbuhan kultur secara simultan untuk mendapatkan kondisi optimum sehingga meminimasi jumlah pengulangan eksperimen yang perlu dilakukan di laboratorium (Said dan Amin, 2015). Strategi ini berbeda dengan optimasi ekspresi yang telah dilakukan pada klon rekombinan yang membawa gen haloasam dehalogenase dari *B. cereus* IndB1, yang optimasinya dilakukan dengan mengubah variabel satu persatu dan menjaga variabel lain pada nilai yang tetap.

RSM telah banyak digunakan untuk mengoptimasi produksi protein rekombinan dari klon rekombinan (Behravan dan Hashemi, 2021). Berbagai eksperimen yang menggunakan RSM menunjukkan keberhasilan tinggi karena metode statistik ini juga memberikan informasi terkait interaksi beberapa variabel dan menghindari pekerjaan untuk mengubah hanya satu variabel pada satu eksperimen (Papaneophyton dan Kontopidis, 2014).

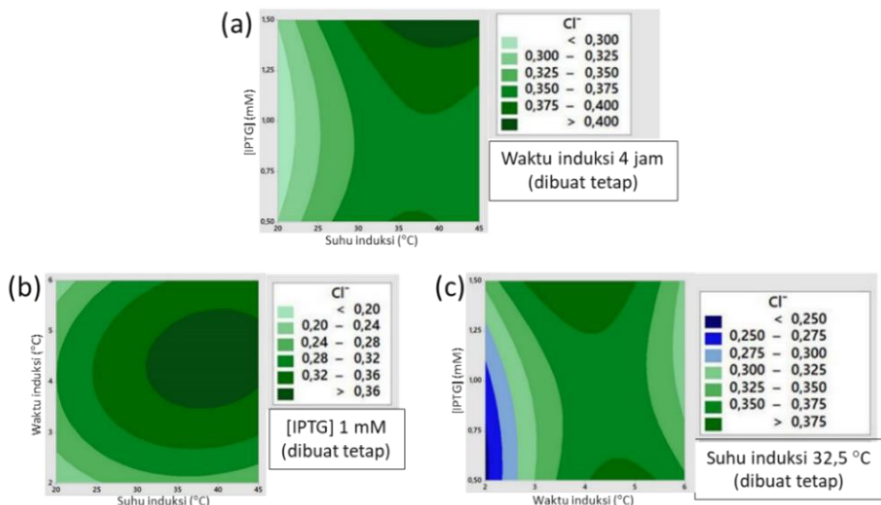
**Tabel 7** Rentang variabel dalam optimasi produksi haloasam dehalogenase dari klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hakp1*

Variabel	Rentang untuk optimasi	
	Set 1	Set 2
Konsentrasi IPTG (mM)	0,5 – 1,5	1,3 – 2,3
Suhu inkubasi selama induksi (°C)	20 – 45	30 – 44
Waktu inkubasi selama induksi (jam)	2 – 6	3 – 5

Sumber: Ratnaningsih *et al*, 2022

Kondisi optimum ekspresi *hakp1* ditentukan dengan variasi konsentrasi IPTG sebagai induser, suhu inkubasi selama induksi, dan waktu inkubasi selama induksi, dengan tetap mempertahankan komposisi medium dan kondisi pertumbuhan yang selama ini dilakukan. Pemilihan rentang variabel dalam RSM dilakukan dengan berpedoman pada kondisi normal. Rentang yang dipilih ditunjukkan pada Tabel 7 set 1. Prediksi terhadap respons yang diharapkan dianalisa menggunakan *Minitab Statistical Software* 18 untuk mendesain 20 eksperimen yang masing-masing dilakukan satu kali pada poin sentral. Pengamatan hasil eksperimen dilakukan secara kolorimetri untuk menentukan kadar ion  $Cl^-$  dalam reaksi enzimatik (Bergmann dan Sanik, 1957) menggunakan substrat 0,5 mM MCA. Enzim yang digunakan dalam setiap reaksi adalah ekstrak kasar enzim yang merupakan lisat sel klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hakp1* yang dikultur pada kondisi tersebut.

Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada kurva kontur dua dimensi (Gambar 23) yang menyatakan kadar ion  $\text{Cl}^-$  dalam campuran reaksi enzimatik.

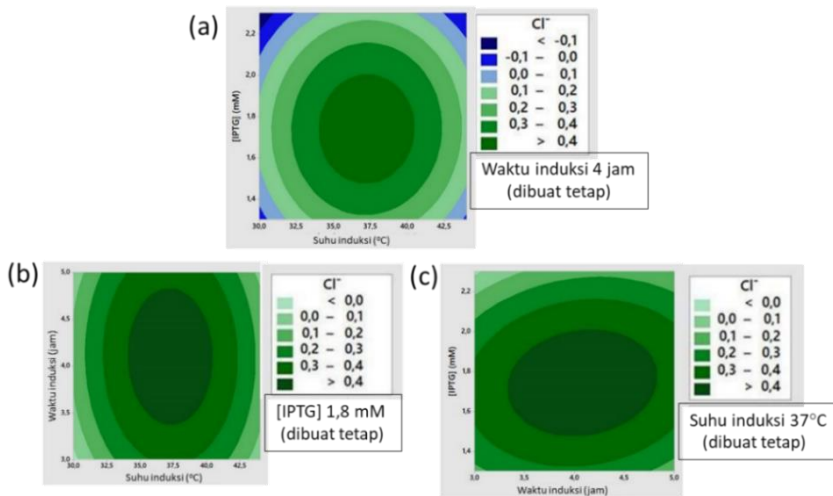


**Gambar 23** Kurva kontur konsentrasi ion  $\text{Cl}^-$  sebagai fungsi suhu induksi dan konsentrasi IPTG (a), suhu induksi dan waktu induksi (b), serta waktu induksi dan konsentrasi IPTG (c). Kondisi optimum ditunjukkan sebagai lingkaran hijau tua di bagian tengah kurva. Sumber: Ratnaningsih *et al.*, 2022.

Gambar 23 menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk produksi haloasam dehalogenase oleh klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*halkp1* hanya diperoleh pada kurva kontur Gambar 23 (b), yang merupakan fungsi suhu induksi dan waktu induksi dengan konsentrasi IPTG yang dibuat tetap. Kondisi optimum dengan 1 mM IPTG sebagai inducer ini dapat dicapai bila inkubasi kultur (setelah penambahan IPTG) dilakukan pada suhu 37 °C selama 4 jam. Sayangnya, zona optimum untuk menentukan konsentrasi IPTG masih belum ditemukan, meskipun Gambar 23 (a) mengindikasikan bahwa konsentrasi IPTG yang diperlukan kemungkinan adalah > 1,5 mM. Oleh sebab itu, rancangan eksperimen dilakukan lagi dengan merekonstruksi rentang variabel seperti yang ditunjukkan pada Tabel 7 set 2.

Dalam rekonstruksi kondisi ini, rentang suhu induksi dan rentang waktu induksi dipersempit sesuai dengan hasil yang diperoleh pada set 1, tetapi konsentrasi IPTG ditingkatkan untuk area di atas 1,5 mM. Prosedur RSM yang sama diterapkan untuk merancang 20 kondisi baru, tetapi kadar ion  $\text{Cl}^-$  diprediksi secara manual mengikuti kecenderungan kurva kontur yang diperoleh di Gambar 23 (a) dan (c), tidak ditentukan secara eksperimen di

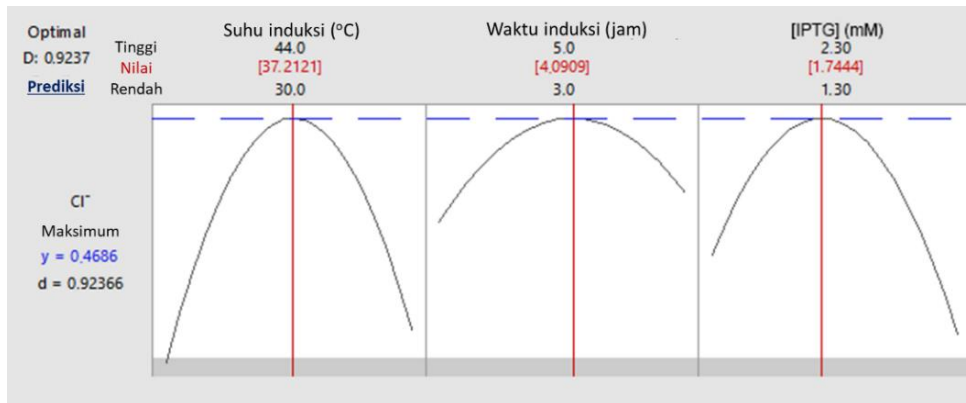
laboratorium. Kurva kontur yang menyatakan kadar ion  $\text{Cl}^-$  hasil prediksi ini ditunjukkan pada Gambar 24.



**Gambar 24** Kurva kontur prediksi konsentrasi ion  $\text{Cl}^-$  sebagai fungsi suhu induksi dan konsentrasi IPTG (a), suhu induksi dan waktu induksi (b), serta waktu induksi dan konsentrasi IPTG (c). Prediksi kondisi optimum ditunjukkan sebagai lingkaran hijau tua di bagian tengah kurva. Sumber: Ratnaningsih *et al.*, 2022.

Dapat dilihat pada Gambar 24 bahwa ketiga kurva kontur telah memperlihatkan zona optimum untuk produksi haloasam dehalogenase, ditunjukkan sebagai lingkaran penuh berwarna hijau tua yang terdapat di pusat kurva. Hasil ini konsisten dengan kurva kontur yang diperoleh dari eksperimen set 1, namun konsentrasi IPTG optimum telah teridentifikasi, yakni sebesar 1,8 mM. Dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum untuk produksi haloasam dehalogenase dari klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*harp1* adalah menggunakan induser IPTG dengan konsentrasi 1,8 mM diikuti dengan inkubasi kultur pada 37 °C selama 4 jam, yang diprediksi dapat mendegradasi MCA secara optimum, menghasilkan ion  $\text{Cl}^-$  hingga 0,48 mM dari 0,50 mM substrat MCA. Konsentrasi IPTG ini berada pada rentang efektif konsentrasi induser yang digunakan untuk ekspresi gen pada sistem pET dalam sel inang *E. coli*, yakni 0,1 mM – 3,0 mM bergantung pada komposisi medium yang digunakan (Ashayeri-Panah *et al.*, 2017). Kondisi induksi harus tetap diadopsi pada suhu kultivasi yang berbeda, namun konsentrasi induser yang lebih rendah adalah lebih menguntungkan karena hal ini tidak memberatkan proses metabolisme dalam klon rekombinan (Muhlmann *et al.*, 2017). Dalam kaitan ini, kekuatan induksi merupakan

parameter yang penting untuk mengoptimasi ekspresi gen dalam suatu klon rekombinan (Zhang *et al.*, 2014).



**Gambar 25** Kurva optimasi untuk suhu induksi (°C), waktu induksi (jam), dan konsentrasi IPTG (mM) pada produksi haloasam dehalogenase oleh klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hdkp1* dinyatakan sebagai konsentrasi ion Cl<sup>-</sup> dalam campuran reaksi. Sumber: Ratnaningsih *et al.*, 2022.

Beberapa analisis lanjutan telah dilakukan untuk melihat keterkaitan antara ketiga variabel yang diteliti, salah satunya menghasilkan persamaan kuadrat polinomial dengan respon optimasi tertentu yang memberikan kurva optimasi kondisi secara lebih teliti seperti ditunjukkan pada Gambar 25. Kurva ini menunjukkan bahwa kondisi optimum produksi haloasam dehalogenase dari klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*hdkp1* diprediksi menggunakan 1,7444 mM IPTG diikuti inkubasi pada 37,2121 °C selama 4,0909 jam. Hasil ini serupa dengan perolehan dari analisis kurva kontur, mengindikasikan kesesuaian model analisis yang diadopsi. Aspek serupa juga telah dilaporkan dalam optimasi ekspresi gen sintesis Mpt64 dalam *E. coli* BL21 (DE3) (Kusuma *et al.*, 2019).

### 3.3 *Pseudomonas aeruginosa* ITB1

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang yang banyak ditemukan di lingkungan, dapat memproduksi pigmen berwarna biru kehijauan yang dikenal sebagai piosianin, dan bersifat patogen oportunistik pada manusia (Wu *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* mempunyai kemampuan yang tinggi untuk beradaptasi dengan berbagai kondisi lingkungan hidup dan interaksinya dengan manusia sering menyebabkan infeksi, terutama saat pertahanan tubuh manusia sedang dalam kondisi

sangat lemah. Pasien di lingkungan rumah sakit sangat rentan terhadap infeksi *P. aeruginosa*, yang dapat terjadi akibat adanya kuman bawaan saat intubasi, pembedahan, kateter, dan *tracheostomy* (Valles *et al.*, 2004). Bakteri ini mampu bertahan pada permukaan yang lembab dengan rentang suhu pertumbuhan 25 °C –41 °C. Infeksi *P. aeruginosa* paling banyak terjadi pada luka bakar dan infeksi paru (*cystic fibrosis*), selain juga dijumpai pada infeksi keratitis mata, telinga, saluran kencing, kulit, jaringan lunak, saluran pernafasam, dan pada sambungan tulang (Sathe *et al.*, 2023.). *P. aeruginosa* mempunyai genom yang dinamis, mampu menggunakan berbagai jenis substrat untuk mendukung pertumbuhannya, mempunyai banyak faktor virulensi, dan mudah berkonversi menjadi tahan terhadap berbagai jenis antibiotik sehingga sangat sulit dieradikasi dan menyebabkan tingginya angka kematian akibat infeksi oleh bakteri ini. (Wu *et al.*, 2015).

*P. aeruginosa* bersifat anaerob fakultatif sehingga mampu bertahan hidup pada kondisi hanya ada sedikit ataupun tidak ada oksigen. Dalam kondisi anaerob, *P. aeruginosa* menggunakan nitrat atau nitrit sebagai akseptor elektron terminal. Dalam kondisi tidak ada oksigen, nitrat, dan nitrit, *P. aeruginosa* mampu memfermentasi arginin dan piruvat untuk menghasilkan ATP atau GTP dengan mentransfer gugus fosforil langsung ke ADP atau GDP dari senyawa terfosforilasi lainnya (Schobert dan Jahn, 2010). Dimilikinya berbagai gen yang mendukung variasi metabolisme dalam *P. aeruginosa* menyebabkan bakteri ini mampu menggunakan banyak jenis substrat untuk tumbuh di berbagai kondisi lingkungan.

Galur lokal *P. aeruginosa* ITB1 diidentifikasi mampu menggunakan MCA sebagai satu-satunya sumber karbon dalam minimal medium (Ulma'awi, 2013). Bakteri ini awalnya diperoleh sebagai *Pseudomans* strain lain dari Program Studi Biologi SITH ITB, tetapi identifikasi *ribotyping* menggunakan 16S rDNA menunjukkan bahwa bakteri ini adalah *P. aeruginosa* (Utami, 2014) yang kemudian kami sebut sebagai *P. aeruginosa* ITB1.

Gen pengkode haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 telah berhasil diisolasi dengan pendekatan PCR, diklon ke pGEM-T Easy dalam *E. coli* TOP10 untuk analisis restriksi dan penentuan urutan nukleotidanya, dan di subklon ke pET-30(a) untuk dipelajari ekspresinya dalam *E. coli* BL21 (DE3) (Ratnaningsih *et al.*, 2021b). Residu asam amino penting dalam sisi aktif haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 telah dipelajari dan dimutasi

secara *in silico* (Khoiriyah, 2021)) dan saat ini sedang dilakukan pembuktian peran residu tersebut secara eksperimen melalui mutasi terarah di laboratorium.

## **Kloning dan analisis urutan nukleotida gen haloasam dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* ITB1**

Gen haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 diisolasi dengan pendekatan PCR menggunakan pasangan primer yang didesain berdasarkan urutan gen serupa dari 10 strain *P. aeruginosa* yang tersedia dalam GenBank NCBI. Gen haloasam dehalogenase yang disejajarkan untuk mendapatkan daerah lestari adalah dari *P. aeruginosa* MSH-10 acUKG supercont1.1.C11 dengan kode akses ASWW01000011.1, *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 dengan kode akses CP000438.1, *P. aeruginosa* DQ8 contig000121 dengan kode akses NZ\_ALIO01000121.1, *P. aeruginosa* E2 contig0162 dengan kode akses AKZH01000152.1, *P. aeruginosa* PAb1 Contig1.455 dengan kode akses NZ\_ABKZ01000456.1, *P. aeruginosa* C127 Contig0132 dengan kode akses AKZG01000127.1, *P. aeruginosa* MRW44.1 contig00008 dengan kode akses NZ\_ALBW01000008.1, *P. aeruginosa* PA7 dengan kode akses CP000744.1, *P. aeruginosa* PAK ac-UKM-supercont-complete.C18 dengan kode akses ASWU01000018.1, dan *P. aeruginosa* ATCC 700888 Contig0398 dengan kode akses AKZF01000393.1.

Berdasarkan hasil penyejajaran gen haloasam dehalogenase dari sepuluh strain *P. aeruginosa* tersebut, telah dirancang dua pasang primer, yaitu F1-R1 dan F2-R2. Urutan primer maju F1 adalah 5'-ATGCGCGGATCCTGTTCTGA-3' dan urutan primer mundur R1 adalah 5'-TCAGGCCGAGGCCCGCCAGTT-3'. Sementara, urutan primer maju F2 adalah 5'-ATGTGGCGGATACC GCGCCG-3' dan urutan primer mundur F2 adalah 5'-TTGCCCGGGT CCATGTAGCC-3'. Pasangan primer F1 dan R1 dirancang untuk mengamplifikasi gen haloasam dehalogenase saja, sedangkan pasangan primer F2 dan R2 dirancang agak lebar ke atas dan ke bawah gen (*upstream* dan *downstream*).

Hasil amplifikasi menggunakan kedua pasangan primer ini, menunjukkan bahwa pasangan primer F1 dan R1 menghasilkan ampikon yang tajam dan tegas dengan ukuran sekitar 0,7 kb, sedangkan pasangan primer F2 dan R2 memberikan ampikon yang mengindikasikan terjadinya *nonspecific priming*. Ampikon yang diperoleh dengan pasangan primer F1 dan R1, disebut sebagai

*paed-d(i)*, gen putatif awal yang diharapkan merupakan gen pengkode haloasam dehalogenase. Amplikon ini kemudian disisipkan ke vektor pGEM-T Easy untuk diperbanyak dalam sel inang *E. coli* TOP10 untuk analisis lebih lanjut. Amplikon yang diperoleh dengan pasangan primer F2 dan R2 belum digunakan dalam analisis.

Urutan gen putatif awal haloasam dehalogenase dalam klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d(i)* kemudian ditentukan dengan metode dideoksi Sanger dan hasilnya menunjukkan sebagai gen utuh yang mengandung *start kodon* ATG serta *stop kodon* TGA dengan ukuran gen 702 pasang basa. Urutan ini mempunyai homologi 99% dengan gen haloasam dehalogenase dari 25 strain *P. aeruginosa* lain yang terdapat dalam GenBank NCBI, mengindikasikan bahwa *paed-d(i)* merupakan gen haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1. Oleh sebab itu, gen ini kemudian disub-klon ke vektor ekspresi pET-30(a) secara terarah untuk memfasilitasi analisis ekspresi.

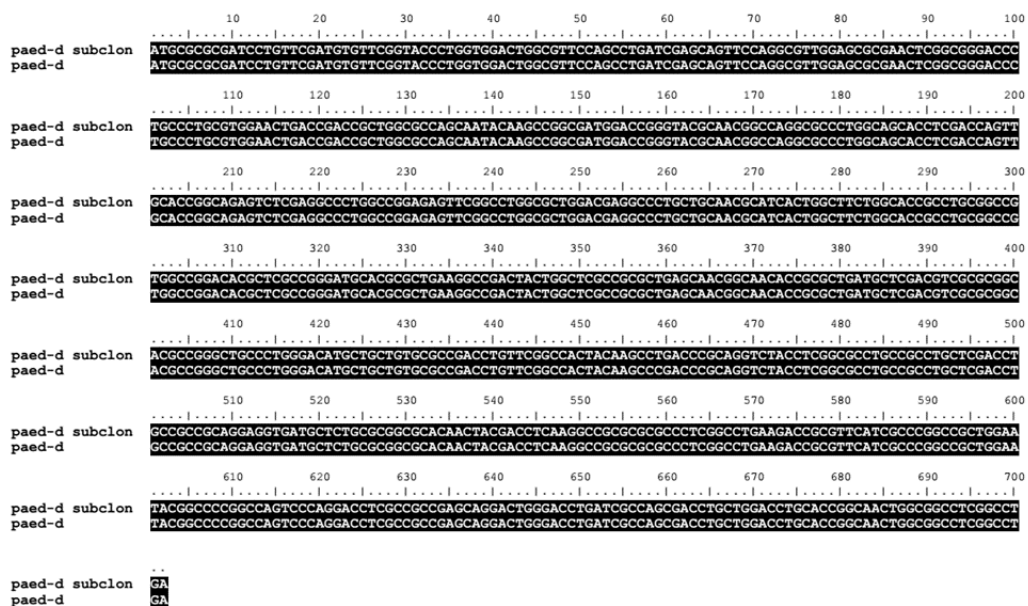
### **Sub-Kloning gen haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* IndB1 ke vektor ekspresi pET-30(a)**

Gen putatif awal haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 dalam klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d(i)* dipindahkan ke vektor ekspresi pET-30(a) secara terarah untuk memfasilitasi analisis ekspresi. Dalam hal ini, perlu didapatkan arah penyisipan gen secara tepat agar ekspresi gen dapat dilakukan menggunakan promoter yang tersedia dalam vektor ekspresi. Untuk itu, di kedua ujung gen perlu ditambahkan sisi restriksi agar proses kloning dapat dilakukan dengan arah yang benar sehingga gen dapat diekspresi dengan tepat dari *start kodon* hingga *stop kodon*.

Analisis restriksi pada gen putatif *paed-d(i)* menunjukkan bahwa urutan nukleotidanya tidak mengandung sisi restriksi untuk *EcoRI* dan *HindIII*. Oleh sebab itu, kedua enzim restriksi ini dapat dimanfaatkan dalam sub-kloning guna memindahkan *paed-d(i)* dari klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d(i)* ke vektor ekspresi melalui pendekatan PCR. Untuk melakukan sub-kloning secara terarah, maka sisi restriksi *EcoRI* ditambahkan pada ujung primer maju (Fs) dan sisi restriksi *HindIII* ditambahkan pada ujung primer mundur (Rs). Urutan primer maju Fs adalah 5'-**GAATTC**ATGCGCGC GATCCTGTTCTGA-3' dan urutan primer mundur Rs adalah 5'-**AAGCTT**T CAGGCCGAGGCCGCCAGTT-3'.

Pasangan primer Fs dan Rs ini digunakan dalam PCR menggunakan templat DNA kromosom dari *P. aeruginosa* ITB1 dan plasmid rekombinan pGEM-*paed-d*(i). Hasil percobaan menunjukkan bahwa kedua templat memberikan amplikon dengan ukuran yang sama, yaitu sekitar 0,7 kb, sesuai dengan ukuran *paed-d*(i) dalam klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d*(i). Amplikon ini diklon lebih dahulu ke pGEM-T Easy dalam *E. coli* TOP10, menghasilkan klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d*.

Analisis restriksi terhadap plasmid rekombinan pGEM-*paed-d* dengan *EcoRI* dan *HindIII*, menunjukkan bahwa kedua sisi restriksi yang ditambahkan pada pasangan primer telah dapat memotong gen *paed-d* dalam rekombinan plasmid pGEM-*paed-d* sehingga sub-kloning *paed-d* ke vektor ekspresi pET-30(a) untuk dimasukkan ke sel inang *E. coli* BL21 (DE3) dapat dilakukan. Klon rekombinan yang diperoleh disebut sebagai *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d*. Konfirmasi melalui analisis re-PCR terhadap klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d* dan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d* membuktikan adanya gen *paed-d* yang berukuran 0,7 kb dalam *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d*, sama seperti ukuran *paed-d*(i).



**Gambar 26** Urutan nukleotida gen *paed-d* dalam plasmid rekombinan pET/*paed-d* (disebut sebagai *paed-d subclone*) dan dalam pGEM/*paed-d* (disebut sebagai *paed-d*). Plasmid rekombinan pET/*paed-d* diisolasi dari *E. coli* BL21 (DE3), sedangkan pGEM/*paed-d* diisolasi dari *E. coli* TOP10. Sumber: Ratnaningsih *et al.*, 2021b.



Plasmid rekombinan dalam *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d* dan plasmid rekombinan dalam *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d* kemudian diisolasi, dimurnikan, dan urutan nukleotida gen *paed-d* ditentukan dengan metode dideoksi Sanger. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 26. Urutan nukleotida dalam kedua klon rekombinan ini 100% sama dengan urutan nukleotida *paed-d(i)* yang terdapat dalam klon rekombinan *E. coli* TOP10/pGEM-*paed-d(i)*, mengindikasikan bahwa sub-kloning gen *paed-d* ke vektor ekspresi pET-30(a) telah berhasil dilakukan.

Perbandingan urutan nukleotida gen *paed-d* dengan gen haloasam dehalogenase lain dari berbagai strain *P. aeruginosa* yang terdapat dalam GenBank NCBI menunjukkan bahwa gen ini memiliki homologi 100% dengan gen haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* PAO1H2O dengan kode akses CP008749.1, *P. aeruginosa* YL84 dengan kode akses CP007147.1, *P. aeruginosa* SCV20265 dengan kode akses CP006931.1, dan *P. aeruginosa* M18 dengan kode akses CP002496.1, yang semuanya mengkode haloasam dehalogenase dari Grup II. Selain itu, *paed-d* juga mempunyai homologi >99% dengan gen haloasam dehalogenase Grup II yang dimiliki oleh 25 *P. aeruginosa* strain lain. Data ini mengkonfirmasi bahwa gen haloasam dehalogenase (*paed-d*) yang berhasil diisolasi dari *P. aeruginosa* ITB1 merupakan gen yang mengkode haloasam dehalogenase dari Grup II.

### **Analisis ekspresi gen haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE30)/pET-*paed-d***

Ekspresi gen haloasam dehalogenase (*paed-d*) dari *P. aeruginosa* ITB1 dilakukan dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d* dengan variasi konsentrasi IPTG sebagai induser dan variasi suhu inkubasi saat induksi, dengan waktu inkubasi saat induksi dibuat tetap selama 3 jam. Kondisi lainnya dibuat sama dengan kondisi kultur normal. Hasil eksperimen menunjukkan bahwa produk gen *paed-d* merupakan protein yang berukuran sekitar 26 kDa dan hanya terlihat setelah dilakukan induksi IPTG. Ukuran protein ini sesuai dengan ukuran yang diprediksi secara *in silico*.

Variasi konsentrasi IPTG sebagai induser (0,01 mM dan 0,1 mM) dan variasi suhu inkubasi saat induksi (4 °C dan 30 °C) tidak memberikan perbedaan yang signifikan terkait keberadaan protein 26 kDa ini dalam pelet sel. Data ini mengindikasikan bahwa sebagian besar haloasam dehalogenase

dari *P. aeruginosa* ITB1 berada dalam bentuk tidak terlarut (*inclusion bodies*) dalam pellet sel. Hal ini kemungkinan disebabkan karena terjadinya *over* ekspresi gen *paed-d* dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d* yang mengakibatkan agregasi protein (Singh dan Panda, 2005), selain pengaruh komposisi medium yang juga dinyatakan memberikan efek signifikan pada pembentukan protein rekombinan sebagai protein terlarut atau tidak terlarut (Ashayeri-Panah *et al.*, 2017).

Berbagai percobaan lanjutan masih diperlukan untuk mendapatkan enzim yang terlarut, seperti modifikasi pelarutan, pelipatan ulang molekul protein enzim, penetapan kondisi induksi secara lebih teliti, dan juga purifikasi enzim. Meskipun demikian, keberadaan pita tajam yang berukuran 26 kDa pada SDS PAGE memberikan indikasi kuat bahwa gen *paed-d* dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d* telah berhasil diekspresi.

Hasil eksperimen juga mengindikasikan bahwa kondisi terbaik untuk ekspresi gen *paed-d* dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d* adalah menggunakan 0,01 mM IPTG sebagai induser dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 3 jam pada 30 °C. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa semakin rendah konsentrasi IPTG sebagai induser maka kondisi yang dihasilkan akan semakin menguntungkan untuk inkubasi kultur pada suhu yang lebih tinggi, karena aspek ini tidak memberikan beban metabolisme pada sel inang (Muhlmann *et al.*, 2017).

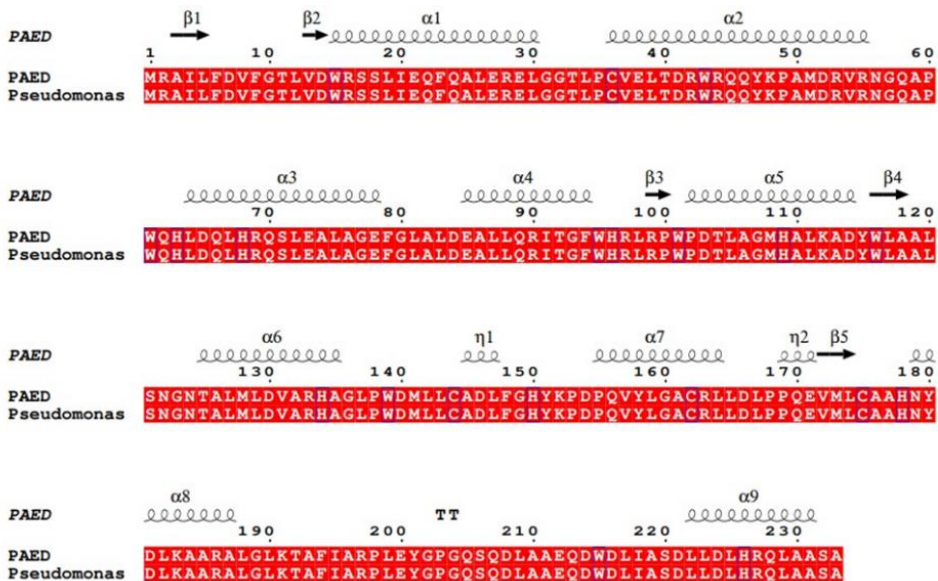
## **Prediksi struktur tersier dan residu penting pada sisi aktif haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1**

Analisis menggunakan program ExPasy ProtParam (<https://www.expasy.org/resources/translate>) menunjukkan bahwa gen *paed-d* ditranslasi menjadi molekul protein dengan 233 residu asam amino. Molekul protein ini mempunyai pI sekitar 5,42 dengan massa molekul 26,251 kDa, sesuai dengan yang diperoleh pada elektroforegram hasil SDS PAGE.

Struktur sekunder Paed-d yang diperoleh melalui program ESPrit 3.0 ditunjukkan pada Gambar 27. Potein ini terlihat mengandung struktur lembaran- $\beta$ , mengindikasikan bahwa haloasam dehalogenase ini merupakan Grup II (Schmidberger *et al.*, 2008). Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa struktur ini mempunyai homologi 100% dengan L-2-haloasam dehalogenase

dari *P. aeruginosa* dengan kode akses 3UMC\_A dalam NCBI. yang kemudian digunakan sebagai pedoman untuk memprediksi struktur tersier Paed-d.

Struktur tersier Paed-d yang dideduksi menggunakan Swis model ExPasy menunjukkan bahwa haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 ini mempunyai 5 lembaran- $\beta$  yang dikelilingi oleh struktur  $\alpha$ -heliks seperti yang ditunjukkan pada Gambar 27 dan 28 (a). Struktur tersier haloasam dehalogenase Grup II ini telah dilaporkan mempunyai ciri khusus pada domain inti yang berupa lipatan Rossmanoid, dengan 5 struktur  $\alpha$ -heliks yang diapit oleh 6 struktur paralel lembaran- $\beta$  (de Jong dan Dijkstra, 2003). Data ini mengkonfirmasi bahwa haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 merupakan Grup II, yang kemungkinan hanya aktif terhadap substrat L-2-haloasam. Fakta ini memberikan pedoman untuk mempelajari aktivitas Paed-d secara lebih detail, baik untuk pekerjaan komputasi dalam doking molekul dan dinamika molekul, maupun uji aktivitas enzim dalam eksperimen basah di laboratorium.

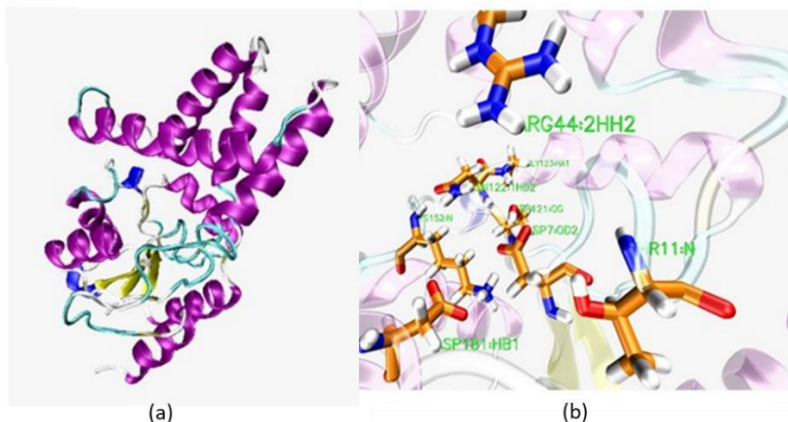


**Gambar 27** Perbandingan struktur primer Paed-d terhadap haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* dengan kode akses 3UMC\_A dan prediksi struktur sekunder Paed-d dari *P. aeruginosa* ITB1. Sumber: Ratnaningsih et al., 2021b.

Program *Sequence Annotated by Structure* (SAS) dan EXIA digunakan untuk memprediksi residu katalitik penting dalam Paed-d. Hasil analisis SAS yang ditampilkan pada Gambar 28 (b) menunjukkan bahwa residu Asp7, Arg44, Ser121, Asn122, Lys152, His178, dan Asp181 dapat dijumpai pada sisi aktif

enzim, merupakan kandidat kuat yang perlu dipertimbangkan dalam menentukan residu penting untuk proses katalisis.

Di lain pihak, analisis dengan EXIA menunjukkan bahwa residu Asp7, Ser121, Thr11, Asn122, dan Trp15 merupakan asam amino penting dalam sisi katalitik enzim. Kedua hasil analisis ini mengindikasikan bahwa residu Asp7, Ser121, dan Asn122 kemungkinan merupakan tiga asam amino esensial dalam proses katalisis. Hasil ini sejalan dengan laporan terdahulu yang menyatakan bahwa haloasam dehalogenase dari *Pseudomonas* sp. YL mempunyai Asp, Thr, Arg, Ser, Lys, Tyr, dan Asn pada sisi aktifnya (Hisano *et al.*, 1996) dan haloasam dehalogenase dari *Sulfolobus tokodaii* yang mengidentifikasi Asp, Thr, Arg, Lys, Tyr, dan Ser sebagai residu penting dalam proses katalisis (Rye *et al.*, 2008). Banyak hasil penelitian yang telah menyampaikan bahwa residu Asp merupakan asam amino kunci dan lestari pada proses katalisis oleh sebagian besar L-2-haloasam dehalogenase (Adamu *et al.*, 2020) karena residu ini bertindak sebagai nukleofil yang menyerang substrat pada proses dehalogenasi. Aspek ini dipelajari lebih lanjut dengan melakukan mutasi terarah, diawali dengan studi komputasi dan dilanjutkan dengan eksperimen di laboratorium.



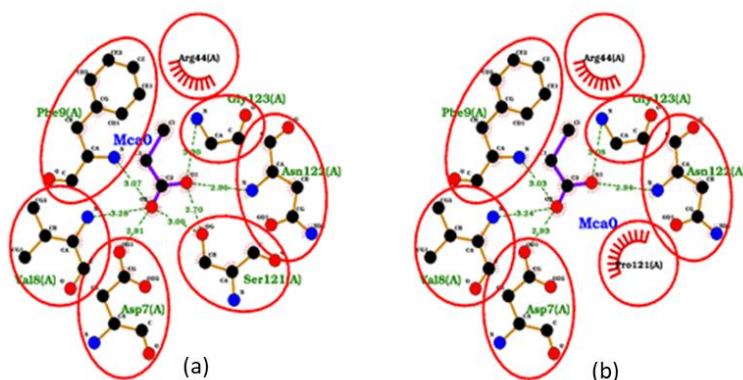
**Gambar 28** Prediksi struktur tersier haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 (a) dan gambaran residu asam amino penting dalam sisi aktifnya (b). Sumber: Ratnaningsih *et al.*, 2021b.

### **Mutasi D7A haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d***

Hasil analisis residu katalitik pada haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1 dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d* menggunakan

serangkaian analisis komputasi menunjukkan bahwa residu asam aspartat pada posisi 7 (D7) memiliki peran sebagai nukleofil dalam proses katalisis. Untuk mempelajari hal ini secara lebih detail, maka dilakukan mutasi titik terarah secara komputasi menggunakan pendekatan doking molekuler dengan mengubah asam aspartat pada posisi 7 menjadi alanin (D7A). Hasil komputasi ini kemudian dibuktikan secara eksperimen menggunakan metode PCR untuk melakukan mutasi secara terarah, dilanjutkan dengan mengamati perubahan aktivitas haloasam dehalogenase asal (Paed-d-WT) dan mutan (Paed-d-D7A).

Analisis komputasi mutasi D7A diawali dengan melakukan doking menggunakan ligan MCA terhadap Paed-d-WT dan Paed-d-D7A. Analisis ini menghasilkan energi doking rata-rata sebesar -3,72 kkal/mol untuk Paed-d-WT dan -3,80 kkal/mol untuk Paed-d-D7A, menunjukkan bahwa kedua protein tidak berbeda secara signifikan dalam mengikat MCA. Oleh sebab itu dilakukan analisis lebih detail menggunakan LigPlot+ (Laskowski dan Swindells, 2011) dan hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 29.



**Gambar 29** Visualisasi LigPlot MCA-Paed-d-WT (a) dan MCA-Paed-d-D7A (b).  
Sumber: Khoiriyah, 2021

Pada Gambar 29 (a) dapat dilihat bahwa residu D7 dari molekul protein Paed-d-WT berada dalam jarak yang cukup dekat dengan atom Ca yang mengikat atom halogen pada substrat MCA sehingga memungkinkan terjadinya serangan nukleofilik. Di lain pihak, mutan Paed-d-D7A tidak memperlihatkan adanya interaksi antara A7 dengan ligan. MCA, karena A7 memang tidak memiliki atom oksigen pada residu alkilnya sehingga tidak memungkinkan terjadinya serangan nukleofil pada Ca. Berdasarkan analisis dan visualisasi LigPlot ini, dapat diharapkan bahwa mutasi D7A dapat menghilangkan interaksi antara haloasam dehalogenase Paed-d dengan ligan

MCA. Kemungkinan penggantian peran D7 oleh D14 dalam Paed-d-D7A dapat ditepis karena sejak awal D14 diketahui tidak berperan sebagai residu katalitik dan posisinya tidak berada di kantung katalitik Paed-d dengan jarak yang cukup jauh dari posisi ligan MCA.

Hasil analisis komputasi ini, yakni hilangnya interaksi antara haloasam dehalogenase mutan (Paed-d-D7A) dengan ligan MCA, dikonfirmasi lebih lanjut di laboratorium. Mutan Paed-d-D7A dikreasi melalui pendekatan PCR menggunakan sepasang primer yang dirancang untuk menghasilkan mutan Paed-d-D7A dari Paed-d-WT. Urutan nukleotida pasangan primer ini diperoleh dengan mengubah kodon pada posisi 19-21 dari GAT menjadi GCT pada primer maju (MutF) dan dari ATC menjadi AGC pada primer mundur (MutR). PCR dilakukan untuk mengamplifikasi seluruh DNA plasmid rekombinan yang berukuran sekitar 6 kb, dengan pasangan primer yang merupakan homolognya, sehingga memerlukan pengaturan kondisi PCR secara cermat.

Plasmid mutan yang diperoleh digunakan untuk mentransformasi *E. coli* BL21 (DE3). Analisis awal hasil PCR dengan elektroforesa gel agarose tidak dilakukan karena jumlah molekul DNA yang didapat hanya sedikit, namun konfirmasi keberadaan plasmid dalam sel transforman telah dilakukan. Hasil analisis mengindikasikan bahwa molekul DNA plasmid yang berukuran sekitar 6 kb dapat diperoleh dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*paed-d-D7A*. Urutan nukleotida dalam plasmid mutan ini dikonfirmasi melalui penentuan urutan nukleotida menggunakan metode dideoksi Sanger, dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 30. Dapat dilihat bahwa mutasi yang diharapkan, yakni D7A, terbukti telah berhasil dilakukan, sehingga studi lebih lanjut untuk mempelajari peran D7 dalam proses katalisis dapat dilakukan. Meskipun demikian, selain mutasi D7A, dalam klon rekombinan ini juga terjadi mutasi pada kodon 153, namun mutasi ini tidak mengubah residu asam amino dalam Paed-d-D7A, sehingga mutasi ini tentunya tidak berpengaruh terhadap aktivitas Paed-d.

<i>paed-d</i>	ATG	CGC	GCG	ATC	CTG	TTC	GAT	GTG	TTC	GGT	ACC	CTG	GTG	GAC	TGG	CGT	TCC	AGC	CTG	ATC
Paed-d	Met	Arg	Ala	Ile	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Gly	Thr	Leu	Val	Asp	Trp	Arg	Ser	Ser	Leu	Ile
	1				5			10				15			20					
<i>paed-d mutan</i>	ATG	CGC	GCG	ATC	CTG	TTC	GCT	GTG	TTC	GGT	ACC	CTG	GTG	GAC	TGG	CGT	TCC	AGC	CTG	ATC
Paed-d mutan	Met	Arg	Ala	Ile	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Gly	Thr	Leu	Val	Asp	Trp	Arg	Ser	Ser	Leu	Ile
	1				5			10				15			20					
<i>paed-d</i>	GAG	CAG	TTG	CAG	GCG	TTG	GAG	CGC	GAA	TCT	GGC	GGG	ACC	CTG	CCC	TGC	GTG	GAA	CTG	ACC
Paed-d	Glu	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Arg	Glu	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Pro	Cys	Val	Glu	Leu	Thr
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	GAG	CAG	TTG	CAG	GCG	TTG	GAG	CGC	GAA	TCT	GGC	GGG	ACC	CTG	CCC	TGC	GTG	GAA	CTG	ACC
Paed-d mutan	Glu	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Arg	Glu	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Pro	Cys	Val	Glu	Leu	Thr
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	GAC	CGC	TGG	GCG	CAG	CAA	TAG	AAG	CCG	GCG	ATG	GAC	CGG	GTA	CGC	AAG	GGC	CAG	GCG	CCC
Paed-d	Asp	Arg	Trp	Arg	Gln	Gln	Asp	Lys	Pro	Ala	Met	Asp	Arg	Val	Arg	Lys	Gly	Gln	Ala	Pro
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	GAC	CGC	TGG	GCG	CAG	CAA	TAG	AAG	CCG	GCG	ATG	GAC	CGG	GTA	CGC	AAG	GGC	CAG	GCG	CCC
Paed-d mutan	Asp	Arg	Trp	Arg	Gln	Gln	Asp	Lys	Pro	Ala	Met	Asp	Arg	Val	Arg	Lys	Gly	Gln	Ala	Pro
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	TGG	CAG	CAC	CTC	GAC	CAG	TTG	CAC	CGG	CAG	AGT	CTC	GAG	GCC	CTG	GCC	GGG	GAG	TTC	GGC
Paed-d	Trp	Gln	His	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Arg	Gln	Ser	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Phe	Gly
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	TGG	CAG	CAC	CTC	GAC	CAG	TTG	CAC	CGG	CAG	AGT	CTC	GAG	GCC	CTG	GCC	GGG	GAG	TTC	GGC
Paed-d mutan	Trp	Gln	His	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Arg	Gln	Ser	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Phe	Gly
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	CTG	GCG	CTG	GAC	GAG	GCC	CTG	CTG	CAA	CGC	ATC	ACT	GGC	TTC	TGG	CAC	CGC	CTG	CGG	CCG
Paed-d	Leu	Ala	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Gln	Arg	Ile	Thr	Gly	Phe	Trp	His	Arg	Leu	Arg	Pro	
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	CTG	GCG	CTG	GAC	GAG	GCC	CTG	CTG	CAA	CGC	ATC	ACT	GGC	TTC	TGG	CAC	CGC	CTG	CGG	CCG
Paed-d mutan	Leu	Ala	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Gln	Arg	Ile	Thr	Gly	Phe	Trp	His	Arg	Leu	Arg	Pro	
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	TGG	CCG	GAC	ACG	CTC	GCC	GGG	ATG	CAC	GCG	CTG	AAG	GCC	GAC	TAC	TGG	CTC	GCC	GCG	CTG
Paed-d	Trp	Pro	Asp	Thr	Leu	Ala	Gly	Met	His	Ala	Leu	Lys	Ala	Asp	Tyr	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	TGG	CCG	GAC	ACG	CTC	GCC	GGG	ATG	CAC	GCG	CTG	AAG	GCC	GAC	TAC	TGG	CTC	GCC	GCG	CTG
Paed-d mutan	Trp	Pro	Asp	Thr	Leu	Ala	Gly	Met	His	Ala	Leu	Lys	Ala	Asp	Tyr	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	AGC	AAC	GGC	AAC	ACC	GCG	CTG	ATG	CTC	GAC	GTC	GCG	CGG	CAC	GCC	GGG	CTG	CCC	TGG	GAC
Paed-d	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Ala	Leu	Met	Leu	Asp	Val	Ala	Arg	His	Ala	Gly	Leu	Pro	Trp	Asp
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	AGC	AAC	GGC	AAC	ACC	GCG	CTG	ATG	CTC	GAC	GTC	GCG	CGG	CAC	GCC	GGG	CTG	CCC	TGG	GAC
Paed-d mutan	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Ala	Leu	Met	Leu	Asp	Val	Ala	Arg	His	Ala	Gly	Leu	Pro	Trp	Asp
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	ATG	CTG	CTG	TGC	GCC	GAC	CTG	TCC	GGC	CAC	TAC	AAG	CCC	GAC	CCG	CAG	GTC	TAC	TCT	GGG
Paed-d	Met	Leu	Leu	Cys	Ala	Asp	Leu	Ser	Gly	His	Tyr	Lys	Pro	Asp	Pro	Gln	Val	Tyr	Ser	Gly
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	ATG	CTG	CTG	TGC	GCC	GAC	CTG	TCC	GGC	CAC	TAC	AAG	CCCT	GAC	CCG	CAG	GTC	TAC	TCT	GGG
Paed-d mutan	Met	Leu	Leu	Cys	Ala	Asp	Leu	Ser	Gly	His	Tyr	Lys	Pro	Asp	Pro	Gln	Val	Tyr	Ser	Gly
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	GCC	TGC	GCG	CTG	CTC	GAC	CTG	CCC	CCG	CAG	GAG	GTG	ATG	CTC	TGC	GCG	GCG	CAC	AAC	TAC
Paed-d	Ala	Cys	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Pro	Pro	Gln	Glu	Val	Met	Leu	Cys	Ala	Ala	His	Asn	Tyr
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	GCC	TGC	GCG	CTG	CTC	GAC	CTG	CCC	CCG	CAG	GAG	GTG	ATG	CTC	TGC	GCG	GCG	CAC	AAC	TAC
Paed-d mutan	Ala	Cys	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Pro	Pro	Gln	Glu	Val	Met	Leu	Cys	Ala	Ala	His	Asn	Tyr
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	GAC	CTC	AAG	GCC	GCG	GCG	GCC	TCT	GGC	CTG	AAG	ACC	GCG	TCC	ATC	GCC	GCG	CCG	CTG	GAA
Paed-d	Asp	Leu	Lys	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Glu
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	GAC	CTC	AAG	GCC	GCG	GCG	GCC	TCT	GGC	CTG	AAG	ACC	GCG	TCC	ATC	GCC	GCG	CCG	CTG	GAA
Paed-d mutan	Asp	Leu	Lys	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Glu
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	TAC	GGC	CCC	GGC	CAG	TGC	CAG	GAC	CTC	GCC	GCC	GAG	CAG	GAC	TGG	GAC	CTG	ATC	GCC	AGC
Paed-d	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Gln	Asp	Leu	Ala	Ala	Glu	Gln	Asp	Trp	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	TAC	GGC	CCC	GGC	CAG	TGC	CAG	GAC	CTC	GCC	GCC	GAG	CAG	GAC	TGG	GAC	CTG	ATC	GCC	AGC
Paed-d mutan	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Gln	Asp	Leu	Ala	Ala	Glu	Gln	Asp	Trp	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser
					5			10			15			20						
<i>paed-d</i>	GAC	CTG	CTG	GAC	CTG	CAC	CGG	CAA	CTG	GCG	GCC	TGC	GCC	TGA						
Paed-d	Asp	Leu	Leu	Asp	Leu	His	Arg	Gln	Leu	Ala	Ala	Ser	Ala							
					5			10			15			20						
<i>paed-d mutan</i>	GAC	CTG	CTG	GAC	CTG	CAC	CGG	CAA	CTG	GCG	GCC	TGC	GCC	TGA						
Paed-d mutan	Asp	Leu	Leu	Asp	Leu	His	Arg	Gln	Leu	Ala	Ala	Ser	Ala							
					5			10			15			20						

**Gambar 30** Urutan nukleotida gen *paed-d* dan gen *paed-d* hasil mutasi serta urutan asam amino Paed-d-WT dan Paed-d-D7A hasil deduksi. Kotak merah menunjukkan mutasi yang terjadi. Sumber: Trisnahadi, 2018.

Konfirmasi lebih lanjut terkait peran D7 dalam katalisis dipelajari dengan melihat aktivitas Paed-d-D7A dalam klon rekombinan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-

*paed-d-D7A* menggunakan substrat MCA. Analisis dilakukan dengan membandingkan aktivitas Paed-d-D7A terhadap aktivitas Paed-d-WT pada kondisi yang sama. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa mutan Paed-d-D7A mempunyai aktivitas tiga kali lebih rendah dibandingkan Paed-d-WT. Data ini mengkonfirmasi bahwa D7 mempunyai peran penting dalam mengkatalisis reaksi dehalogenasi yang dilakukan oleh haloasam dehalogenase dari *P. aeruginosa* ITB1. Hasil studi mutasi ini merupakan langkah awal untuk memodifikasi haloasam dehalogenase dengan berbagai karakteristik yang diharapkan, terutama untuk meningkatkan efisiensi katalisis dan meningkatkan ketahanan enzim agar dapat digunakan dalam berbagai kondisi lingkungan.

### **3.4 *Pseudomonas putida***

*Pseudomonas putida* merupakan bakteri dengan karakteristik serupa dengan genus *Pseudomonas* lainnya, yakni merupakan suatu bakteri Gram-negatif yang memiliki bentuk basil dan dapat ditemukan di berbagai ceruk lingkungan (Peter *et al.*, 2017). Berbagai strain *P. putida* banyak berperan sebagai rhizosfer dan inhabitasi air jernih, terutama untuk melakukan metabolisme terhadap berbagai senyawa biogenik dan xenobiotik (Udaondo *et al.*, 2013). Berbeda dengan *P. aeruginosa* yang merupakan patogen oportunistik, *P. putida* sangat jarang menyebabkan penyakit pada manusia sehingga *P. putida* banyak digunakan dalam bioremediasi. Beberapa studi telah melaporkan bahwa beberapa strain *P. putida* dapat dimanfaatkan sebagai inokulan untuk meremediasi tanah yang terkontaminasi naftalena (Gomes *et al.*, 2005). Berbagai strain *P. putida* juga memiliki potensi untuk digunakan sebagai antagonis fungi, antara lain terhadap *Phythium aphanidermatum* dan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurbitacearum* pada tanaman *lettuce* dan mentimun (Amer dan Utkhede, 2000) serta *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* pada tanaman tomat (Validov *et al.*, 2007). Selain itu, *P. putida* juga merupakan bakteri yang dapat dikembangkan untuk membuat *superbug*, suatu bakteri yang memiliki resistensi tinggi terhadap berbagai jenis antibiotik dan xenobiotik, untuk digunakan dalam bioremediasi dan restorasi tanah yang terkontaminasi oleh zat-zat pencemar tertentu (Rebello *et al.*, 2021).

Dalam eksperimen secara komputasi, upaya pencarian gen haloasam dehalogenase dilakukan dengan model *P. putida* KT2440. Bakteri ini



merupakan mutan dari *P. putida* mt-2 yang kehilangan plasmid TOL pWW0, suatu plasmid yang membawa gen-gen pendegradasi senyawa aromatik (Martinez-Garcia et al., 2014). *P. putida* KT2440 sering dimanfaatkan sebagai sel inang dalam kloning dan urutan nukleotida genomnya telah berhasil ditentukan secara lengkap (Nelson et al., 2002). Sebagian besar gen dalam kromosom *P. putida* KT2440 telah berhasil diidentifikasi, baik struktur maupun fungsinya, namun masih dijumpai banyak protein putatif dan protein tanpa fungsi yang belum dipelajari.

Haloasam dehalogenase dalam *P. putida* merupakan sistem tandem yang mendegradasi 2-kloroalkohol. Proses degradasi ini telah diamati pada *P. putida* US2 (Strotmann et al., 1990). Degradasi dimulai dengan oksidasi 2-kloroalkohol menjadi 2-kloroaldehid dan asam 2-kloroalkanoat, kemudian dilanjutkan oleh haloasam dehalogenase untuk membentuk asam glikolat (dari substrat kloroasetat) atau asam D-laktat (dari substrat asam L-kloropropanoat). Beberapa bakteri mampu menggunakan senyawa haloasam sebagai substrat karena memiliki transpoter untuk haloasam. *P. putida* KT2440 memiliki gen yang mengekspresikan alkohol dihidrogenase dan aldehid dehidrogenase, sehingga memungkinkan terjadinya sistem tandem untuk menggunakan substrat haloasam. Studi keberadaan transporter haloasam pada *P. putida* perlu dipelajari untuk mengetahui kemampuan absorpsi senyawa haloasam dari lingkungan secara langsung. Fakta ini mengindikasikan bahwa *P. putida* sangat potensial untuk digunakan dalam bioremediasi senyawa haloasam. Oleh sebab itu, studi komputasi untuk mencari gen haloasam dehalogenase dari *P. putida* perlu dilakukan dan sebagai langkah awal dilakukan studi komputasi untuk mencari kandidat gen haloasam dehalogenasi dari genom *P. putida* KT2440.

## **Penelusuran daerah lestari dan pemodelan L-2-haloasam dehalogenase dalam *Pseudomonas putida* KT2440**

Penelusuran gen pengkode haloasam dehalogenase dari *P. putida* KT2440 dilakukan menggunakan data yang tersedia di GenBank NCBI. Penelusuran awal dilakukan untuk mencari daerah lestari pada protein L-2-haloasam dehalogenase (HAD) dengan cara menyejajarkan urutan asam amino HAD dari beberapa genus bakteri yang secara intensif telah dipelajari kemampuannya dalam menghasilkan HAD, yakni *Rhodobacteraceae*, *P.*

*aeruginosa*, *Pseudomonas* sp. strain YL, *Bulhorderia cepacia*, *Ralstonia solanacearum*, *Sulfolobus tokodaii*, dan *Xanthobacter autotrophicus*.

Analisis penyejajaran menunjukkan adanya beberapa asam amino lestari yang diduga berperan dalam proses hidrolisis, antara lain Asp10, Thr14, Arg41, Ser118, Lys151, dan Asp180. Asam aspartat diketahui merupakan nukleofil dalam sebagian besar HAD, meskipun posisinya dalam molekul dapat berbeda. Dalam analisis ini, tidak ditemukan adanya motif tertentu yang membentuk struktur sekunder khas bagi grup hidrolase. Berdasarkan hal ini, maka penelusuran gen putatif HAD dalam kromosom *P. putida* KT2440 dilakukan menggunakan *CD-search* untuk mendapatkan beberapa gen putatif yang menghasilkan protein dengan panjang yang serupa dengan grup hidrolase HAD. Analisis ini menghasilkan lima molekul protein serupa HAD, yang kemudian disebut sebagai HAD1, HAD2, HAD3, HAD4, dan HAD5.

Kelima protein HAD yang diperoleh dari hasil penelusuran ini kemudian dimodelkan menggunakan I-TASSER dengan templat struktur tiga-dimensi L-2-haloasam dehalogenase yang terdapat pada basis data (Uniprot). Hal ini dilakukan dengan mempertimbangkan kemiripan struktur dan tingkat energi terbaik, dinyatakan sebagai nilai skor-C yang positif. Proses ini menghasilkan beberapa model untuk setiap protein HAD. Nilai skor-C untuk masing-masing model ditunjukkan pada Tabel 8. Dapat dilihat bahwa model 1 untuk HAD3 (selanjutnya disebut sebagai HAD3), HAD4, dan HAD5 memiliki nilai skor-C yang tinggi. Di lain pihak, semua model untuk HAD1 dan HAD2 memiliki skor-C yang rendah sehingga kedua model ini dieleminasi.

**Tabel 8** Nilai skor-C hasil pemodelan HAD menggunakan I-TASSER

Protein	Model	Skor-C	Protein	Model	Skor-C	Protein	Model	Skor-C
HAD1	Model 1	-0,20	HAD2	Model 1	0,3	HAD3	Model 1	1,02
	Model 2	-1,94		Model 2	-1,65		Model 2	-1,73
	Model 3	-1,65		Model 3	-1,83		Model 3	-3,60
	Model 4	-2,70		Model 4	0,18	HAD4	Model 1	1,40
	Model 5	-2,50		Model 5	-2,56		HAD5	Model 1

Disarikan dari: Kelvin, 2021.

Analisis lebih lanjut terhadap HAD3, HAD4, dan HAD5 dilakukan menggunakan *Tm-align*, dilanjutkan dengan COACH, dan COFACTOR untuk mencari kekerabatan protein yang paling tinggi berdasarkan kesamaan struktur. Hasil analisis ini mengindikasikan bahwa HAD4 tidak memiliki kedekatan dengan L-2-HAD. Oleh sebab itu, analisis residu katalitik

menggunakan COFACTOR dan COACH hanya dilakukan untuk HAD3 dan HAD5.

Analisis COFACTOR dan COACH terhadap HAD3 dan HAD5 memberikan gambaran tentang residu-residu katalitik yang serupa dengan protein fungsional yang terdapat dalam RSCB Protein Data Bank (RSCB PDB). Analisis ini memberikan informasi mengenai kedekatan struktur HAD dengan protein yang memiliki nomor EC 3.8.1.2 (grup haloasam dehalogenase), mengindikasikan bahwa HAD3 dan HAD5 merupakan kandidat haloasam dehalogenase milik *P. putida* KT2440.

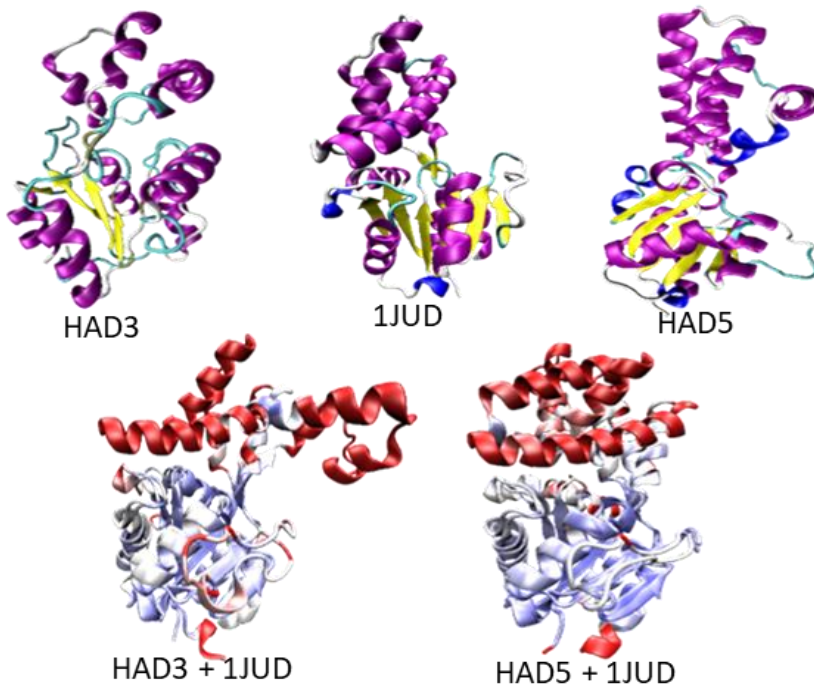
Hasil analisis secara keseluruhan mengindikasikan bahwa HAD3 memiliki kemiripan yang lebih baik dengan grup haloasam dehalogenase, karena proteinnya memiliki kemiripan yang tinggi dengan L-haloasam dehalogenase dari 3 bakteri lain, yakni *Pseudomonas* sp. YL, *Bulhkoderia cepacia*, dan *Xanthobacter autotrophicus*. Sementara itu, HAD5 hanya mirip dengan haloasam dehalogenase dari satu bakteri, yaitu L-2-HAD dari *Pseudomonas* sp. YL, namun memiliki nilai skor-C dan identitas yang lebih tinggi dibandingkan HAD3. Nilai skor-C dan identitas yang tinggi mengindikasikan bahwa prediksi fungsi protein adalah lebih tepat. Oleh sebab itu, analisis lanjutan terhadap motif HAD3 dan HAD5 kemudian dilakukan dengan penyejajaran residu-residu asam aminonya untuk mendapatkan satu kandidat haloasam dehalogenase dari *P. putida* KT2440 yang paling baik.

## **Analisis motif protein HAD3 dan HAD5**

Penyejajaran motif protein HAD3 dan HAD5 dilakukan menggunakan templat L-haloasam dehalogenase dari *Pseudomonas* sp. YL dengan PDB ID 1JUD, untuk memastikan bahwa kedua protein merupakan kelompok L-2-HAD. Ketiga protein ini memiliki residu katalitik yang konservatif dengan L-2-HAD pada umumnya. Residu-residu tersebut adalah Asp10, Thr14, Lys151, Asn/His177, dan Asp180 (penomoran relatif terhadap *Pseudomonas* sp. YL). Penyejajaran struktur selanjutnya dilakukan menggunakan COFACTOR untuk mendapatkan gambaran terkait posisi residu-residu katalitik yang dimiliki oleh HAD3 dan HAD5, dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 31.

Analisis hasil penyejajaran struktur ini mengindikasikan bahwa HAD3 dan HAD5 tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap model L-2-HAD dari *Pseudomonas* sp. YL. Analisis secara lebih detail terhadap residu katalitik

dalam sisi aktif enzim juga menunjukkan hal serupa. Residu-residu katalitik tersebut terlihat saling berimpit. Fakta ini mengindikasikan bahwa HAD3 dan HAD5 kemungkinan memiliki fungsi katalisis yang serupa dengan L-HAD dari *Pseudomonas* sp. YL. Aspek ini dipelajari lebih lanjut melalui studi doking dan dinamika molekul menggunakan asam L-haloalkanot sebagai substrat.



**Gambar 31** Penyejajaran struktur HAD3 dan HAD5 dengan 1JUD (L-haloasam dehalogenase dari *Pseudomonas* sp. YL). Sumber: Kelvin, 2021.

### **Studi doking dan dinamika molekul menggunakan substrat asam khloroalkanoat terhadap HAD3 dan HAD5**

Studi doking molekul dilakukan dengan program *Autodock* VINA (Eberhardt *et al.*, 2021) untuk menganalisis kemampuan HAD3 dan HAD5 dalam mengikat substrat. Substrat yang dipilih untuk simulasi adalah D2CP dan L2CP, dengan MCA sebagai kontrol positif dan kloropirifos (CLP) sebagai kontrol negatif. Hasil simulasi dinyatakan sebagai skor doking, ditunjukkan pada Tabel 9.

Hasil analisis doking molekul ini menunjukkan bahwa protein HAD3 dan HAD5 memiliki potensi untuk mengikat beberapa substrat asam haloalkanot massa molekul rendah, namun jelas tidak mampu mengikat CLP. Dalam hal ini, HAD5 terlihat lebih sulit mengikat substrat dibandingkan HAD3. Analisis

LigPlot+ terhadap HAD3 mengindikasikan peran residu Arg94 untuk membentuk ikatan hidrogen dan menstabilkan posisi substrat pada sisi katalitik enzim. Penstabilan ini mendukung reaksi hidrolisis pada proses dehalogenasi. Di lain pihak, HAD5 tidak memiliki residu Arg di daerah sisi aktif, namun terlihat adanya pengaruh Asp9 dalam menstabilkan interaksi hidrogen antara substrat dengan residu Asn29 dan Gly130. Residu Thr128 dan Lys156 tidak berinteraksi dengan Asp9 dan diperkirakan berperan sebagai pengganti kekosongan Arg sebagai penstabil posisi substrat. HAD5 terlihat memiliki interaksi hidrogen yang lebih banyak dan lebih kompleks dibandingkan dengan HAD3. Hal ini juga didukung dengan nilai skor doking yang lebih negatif untuk HAD5.

**Tabel 9** Hasil doking beberapa substrat asam khloroalkanoat terhadap HAD3 dan HAD5

No.	Substrat	Kode	Protein	Skor doking
1.	asam 2-khloroasetat	MCA	HAD3	-2.30
2.	khloropirifos	CLP	HAD3	+66.2
3.	asam D-2-khloropropanoat	D2CP	HAD3	-2.20
4.	asam L-2-khloropropanoat	L2CP	HAD3	-2.20
5.	asam-3-khloropropanoat	3CPr	HAD3	-2.60
6.	asam 2-khloroasetat	MCA	HAD5	-3.40
7.	khloropirifos	CLP	HAD5	+8.10
8.	asam D-2-khloropropanoat	D2CP	HAD5	-3.80
9.	asam L-2-khloropropanoat	L2CP	HAD5	-3.90
10.	asam-3-khloropropanoat	3CPr	HAD5	-3.90

Disarikan dari: Kelvin, 2021.

Analisis lebih lanjut dilakukan dengan melakukan studi dinamika molekul untuk mengamati kestabilan dan kemampuan enzim dalam mempertahankan posisi substrat pada sisi aktifnya. Kestabilan protein diamati dari perubahan nilai RMSD antara protein dan ligan pada  $t = 0$ . Sedangkan aspek kemampuan protein dalam mengikat substrat diamati melalui fluktuasi jarak antara residu katalitik yang melakukan serangan nukleofilik, yaitu Asp12 pada HAD3 dan Asp9 pada HAD5 selama 40 ns waktu simulasi

Hasil simulasi dinamika molekul pada HAD3 dengan berbagai substrat menunjukkan nilai rata-rata fluktuasi RMSD lebih dari 5 Å sehingga dinyatakan tidak mengalami perubahan struktur yang berarti selama simulasi 40 ns. Selain itu, pengukuran jarak antara Asp12 dengan Ca pada semua substrat menunjukkan nilai  $>10$  Å, mengindikasikan bahwa HAD3 tidak memiliki kemampuan untuk mengikat substrat selama 40 ns.

Hasil yang cukup signifikan diperoleh pada HAD5. Analisis hasil simulasi selama 40 ns menunjukkan tidak adanya perubahan struktur berdasarkan RMSD yang tetap berada di nilai  $<5 \text{ \AA}$ . Selain itu, kestabilan protein yang tinggi juga teramati selama simulasi 40 ns dalam pelarut air. Hasil pengukuran jarak antara atom oksigen dalam Asp9 dengan atom Ca pada substrat MCA menunjukkan adanya kestabilan protein yang tinggi selama waktu simulasi 40 ns.

Berdasarkan semua analisis ini dapat disimpulkan bahwa hanya HAD5 yang memiliki potensi sebagai L-2-haloasam dehalogenase dari *P. putida* KT2440. Hasil analisis ini memberikan arahan pada percobaan lanjutan di laboratorium untuk mengisolasi dan mempelajari gen dan protein haloasam dehalogenase dari *P. putida* KT2440. Pendekatan serupa tentunya juga bisa dilakukan untuk strain *P. putida* lainnya.

## 4 PENUTUP

Uraian singkat yang disampaikan dalam buku orasi ilmiah ini memberikan gambaran bahwa Indonesia sangat kaya dengan keanekaragaman hayati yang harus terus dieksplorasi untuk meningkatkan pengetahuan anak bangsa dan menunjang kemajuan bangsa secara menyeluruh. Indonesia sangat kaya dengan berbagai jenis mikroorganisme yang memiliki potensi besar untuk digunakan dalam bioremediasi, untuk mengimbangi berbagai polusi yang terus meningkat dari tahun ke tahun. Bioremediasi perlu digalakkan di masyarakat dan di berbagai industri agar limbah industri yang dibuang ke lingkungan tidak lagi mengandung berbagai polutan yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan makhluk hidup di sekitarnya.

Dalam kaitannya dengan polutan organohalogen, maka mikroorganisme yang menghasilkan dehalogenase mempunyai peran dan potensi besar untuk dimanfaatkan dalam bioremediasi. Efektivitas dan kemampuan dehalogenasi mikroorganisme dapat ditingkatkan melalui bioteknologi dan rekayasa genetika. Berbagai metode kimia, biokimia, bioteknologi, dan rekayasa genetika, dapat diaplikasikan untuk mencapai tujuan tersebut. Eksplorasi haloasam dehalogenase dari beberapa bakteri endogenus Indonesia merupakan contoh yang dapat dipelajari oleh peserta didik, terutama terkait alur pemikiran dan strategi yang dapat diadopsi dalam mempelajari keterkaitan antara struktur dan fungsi suatu biomolekul, untuk mendapatkan sifat-sifat biomolekul yang unggul sesuai yang diinginkan.

Buku ini telah menguraikan berbagai aspek, dari gen hingga protein, mulai dari isolasi gen, kloning dan sub-kloning, analisis klon rekombinan, hingga analisis ekspresi gen dan optimasinya, dengan menerapkan berbagai teknik dan metode yang sesuai. Upaya untuk melakukan modifikasi struktur protein melalui mutasi gen juga telah dilakukan. Studi komputasi tentunya sangat membantu, namun pembuktian lebih lanjut melalui eksperimen basah di laboratorium tetap diperlukan. Di masa depan, diharapkan lebih banyak ahli kimia, biokimia, dan bioteknologi yang memanfaatkan kekayaan dan biodiversitas Indonesia untuk memberikan sumbangsih yang signifikan bagi kemajuan bangsa dan ilmu pengetahuan, sejajar dengan negara-negara maju di dunia.





## 5 UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis memanjatkan puji syukur kehadirat Allah Swt. karena atas rahmat dan hidayah-Nya maka tulisan singkat sebagai buku orasi ilmiah ini dapat terselesaikan dalam waktu yang ditentukan. Penulis menyampaikan penghargaan yang tinggi dan menghaturkan terima kasih yang tak terhingga kepada Prof. Dessy Natalia yang telah meluangkan waktu untuk *me-review* dan memberikan saran-saran berharga dalam penyelesaian tulisan ilmiah singkat buku orasi ini.

Pada kesempatan ini, perkenankan penulis untuk menghaturkan terima kasih yang tinggi kepada ayah, Darsono Hadisoebroto (alm) dan ibu Soeparmi (almh), beserta seluruh keluarga besar, yang telah membesarkan dan mendidik penulis dengan kasih sayang dan cinta, mengajarkan penulis untuk selalu jujur dan kuat dalam menghadapi berbagai persoalan hidup, mempertahankan kebenaran, berbuat kebajikan, dan menanamkan jiwa pebelajar yang kuat sehingga membawa penulis dari desa ke ITB dan saat ini bisa berdiri di sini, di gedung megah yang sarat dengan sejarah, di depan sidang Forum Guru Besar ITB yang mulia, dan di depan bapak dan ibu yang sangat penulis hormati. Terima kasih dan penghargaan yang tinggi penulis haturkan kepada semua pimpinan ITB, yang telah mengizinkan penulis untuk berdiri di sini dan menyampaikan orasi ilmiah ini.

Penulis juga menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada suami, mas Tjundoko, yang selalu sabar dan selalu mendorong penulis untuk terus maju dan berkarya, dengan cinta kasih tulus yang memberikan kesejukan dan ketenangan. Penulis sangat berterima kasih pada kedua putri penulis, Tika dan Lisa, dan kedua menantu penulis, Mantik dan Zaki, yang selalu sabar, setia, dan penuh kasih dalam menemani penulis di saat suka dan duka. Saat ini penulis telah dianugerahi tujuh cucu yang sehat, tiga wanita dan empat pria, anugerah terbesar yang sangat berharga bagi penulis, dan satu cucu saat ini telah menjadi mahasiswa di Sekolah Farmasi ITB. Semoga semuanya selalu sehat dan sukses dalam meniti kehidupan dunia dan akherat.

Penghargaan dan rasa terima kasih yang tinggi penulis haturkan pada semua pimpinan ITB beserta jajarannya, Dekan FMIPA ITB beserta jajarannya, khususnya ibu wakil dekan bidang sumberdaya FMIPA, Dr. Hanni Garmina, atas dukungan dan fasilitasi yang telah diberikan kepada penulis

sehingga penulis bisa melewati semua proses panjang yang berliku untuk sampai pada titik keberhasilan ini. Secara khusus penulis menghaturkan terima kasih yang tak terhingga kepada Prof. I Gede Wenten yang telah memberikan motivasi, mendorong, dan menguatkan penulis untuk terus maju hingga mencapai titik ini, meskipun penulis telah berkali-kali hampir mengibarkan bendera putih. Dalam kelompok ini penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Dr. Grandprix T. M. Kadja dan Dr. Rindia M. Putri yang dengan sabar dan telaten telah membantu penulis untuk menyelesaikan berbagai urusan untuk sampai ke tahap ini, kerja keras yang telah menghasilkan buah yang sangat manis. Semoga semua kebaikan yang telah bapak ibu limpahkan mendapatkan ganjaran yang berlipat ganda dari Allah Swt..

Pada kesempatan ini, penulis menghaturkan rasa terima kasih yang tinggi kepada semua kolega di Kelompok Keahlian Biokimia, Prodi Kimia FMIPA ITB yang telah membuka dan memberikan jalan kepada penulis untuk mencapai titik ini, Prof. Akhmaloka, Prof. Zeily Nurachman, Prof. Dessy Natalia, Prof. Fida M. Warganegara, Dr. Ihsanawati, Dr. Sari Dewi Kurniasih, Dr. Fifi Fitriyah Masduki, Dr. Made Puspasari, Dr. Yanti Rachmayanti, Dr. Reza Aditama, dan Dr. Rindia M. Putri. Dukungan yang bapak ibu berikan merupakan aspek yang sangat berharga buat penulis. Penghargaan yang tinggi juga penulis haturkan pada semua staf pengajar di Prodi Kimia FMIPA ITB atas persahabatan dan kekeluargaan yang nyaman dalam perjuangan tanpa akhir untuk mengembangkan Prodi Kimia FMIPA ITB dan memajukan ilmu kimia di Indonesia.

Penulis juga menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada para kolega yang telah memberikan rekomendasi untuk membuka jalan penulis hingga bisa sampai di tahap ini, Prof. Richard Saffery dari Royal Melbourne Children Hospital, Prof. Erik Heeres dari Groningen University, Prof. Waras Kamdi dari Universitas Negeri Malang, Prof. Irmina Kris Murwani dari Institut Teknologi 10 Nopember Surabaya, Prof. Surya Rosa Putra dari Intitut Teknologi 10 Nopember Surabaya, Prof. Titania Tjandrawati Nugroho dari Universitas Riau, Prof. I Gede Wenten dari Program Studi Teknik Kimia FTI ITB, Prof. Mindriyani Syafila dari Program Studi Teknik Lingkungan FTSL ITB, Prof. Hermawan Kresno Dipoyono dari Program Studi Teknik Fisika FTI ITB, Prof. Robert Manurung dari SITH ITB, Prof. Triyanta dari Program Studi Fisika FMIPA ITB, Prof. Djulia Onggo dari Program Studi Kimia FMIPA ITB,

Prof. I Made Arcana dari Program Studi Kimia FMIPA ITB, dan Prof. Dessy Natalia dari Program Studi Kimia FMIPA ITB. Ulasan dalam surat rekomendasi yang bapak ibu berikan serta berbagai kerja sama yang selama ini kita lakukan sangat membesarkan hati dan merupakan bekal yang sangat berharga bagi penulis untuk terus melangkah maju dan berjuang dalam mengembangkan ilmu kimia dan bioteknologi di Indonesia.

Rasa terima kasih yang tinggi juga penulis haturkan kepada Prof. Susanto Imam Rahayu (alm) yang telah membawa penulis menjadi staf pengajar di Prodi Kimia FMIPA ITB. Terima kasih kepada Drs. Detlev Narosa yang telah memberikan banyak ilmu semasa penulis menempuh pendidikan S1 dan mengerjakan tugas akhir dengan polarografi tetes raksa di Prodi Kimia FMIPA ITB. Terima kasih kepada Prof. Oei Ban Liang (alm) yang telah membimbing penulis saat studi magister di Prodi Kimia FMIPA ITB dan memperkenalkan penulis ke bidang Bioteknologi Molekul saat PAU Bioteknologi mulai dikembangkan di ITB.

Penulis mangawali penelitian di bidang bioteknologi molekul dengan Prof. Bruce W. Holloway dari Department of Genetics, Monash University, Australia menggunakan teknologi DNA rekombinan untuk menyusun peta fisik kromosom *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 dengan *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), pembuatan pustaka genom, dan teknik hibridisasi menggunakan  $^{32}\text{P}$  untuk mendapatkan peta fisik kromosom yang sesuai dengan peta genetik yang telah ada. Sejak itu penulis fokus untuk mendalami dan mengembangkan bioteknologi molekul di Indonesia.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Prof. Jaohan Sanders dan Dr. Marieke Bruins dari Wageningen University atas pembimbingan bersama yang telah membuahkan dua orang doktor dalam bidang bioteknologi yang kini telah sukses berkiprah dan mengembangkan bioteknologi di Indonesia. Terima kasih kepada Prof. Erik Heeres dari Groningen University dan Prof. Robert Manurung dari SITH ITB yang telah memfasilitasi dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk bergabung dan mengikuti program post-doctoral terkait pengembangan *Jatropha curcas* di University of Groningen, The Netherland.

Terima kasih dan penghargaan yang tinggi juga penulis sampaikan kepada Prof. Dessy Natalia yang telah bersama mengembangkan dan mengampu mata kuliah Bioteknologi Molekul serta mata kuliah Genetika Molekul dan

Rekayasa Genetika di Prodi Kimia FMIPA ITB, memperkenalkan berbagai teknik penting dan topik-topik terbaru bioteknologi dan teknologi DNA rekombinan kepada para mahasiswa. Terima kasih pula kepada Prof. I Made Arcana yang selama ini telah bersama berjuang untuk mengembangkan dan mengampu mata kuliah Prinsipia Kimia bagi mahasiswa *honours* di Prodi Kimia FMIPA ITB. Semoga di masa depan semakin banyak cendekiawan Indonesia yang berkiprah di bidang kimia, biokimia, dan bioteknologi untuk berkontribusi pada kemajuan dan kesejahteraan bangsa.

Pada kesempatan ini, penulis juga menyampaikan terima kasih yang tinggi kepada Prof. Rukman Hertadi atas semua kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk berkontribusi pada penelitian terkait pengembangan biopolimer yang dapat terbiodegradasi, seperti levan dan polihidroksi butirat (PHB), serta penelitian terkait pengembangan insulin oral menggunakan levan dan levan terasetilasi sebagai nanopartikel pembawa insulin oral. Terima kasih yang tinggi juga penulis haturkan kepada Prof. I Gede Wenten dan Dr. Khomaruddin yang telah banyak memberikan kesempatan kepada penulis untuk berkontribusi pada penelitian dan penulisan *review* terkait membran dan berbagai aspeknya dalam kimia dan biokimia. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Wa Ode Sri Rizki yang telah membantu penulis dalam mempersiapkan semuanya dan selalu memberikan semangat kepada penulis untuk sampai ke tahap ini.

Semoga semua amal baik dan bantuan yang sangat berharga ini mendapatkan balasan yang berlipat ganda dan barokah dari Allah Swt.. Semoga Allah Swt. selalu menganugerahkan kasih sayang dan rahmat-Nya kepada kita semua. Amin, yaa Robbal alamin.

# DAFTAR PUSTAKA

- Abel, E., Ibrahim, N., and Huyop, F., (2012), Identification of *Serratia marcescens* SEI and Determination of Its Herbicide 2,2-Dichloropropionate (2,2-DCP) Degradation Potential, *Malaysian Journal of Microbiology*, 8 (4), 259-265. <https://doi.org/10.21161/mjm.44412>
- Adamu, A., Shamsir, M. S., Wahab, R. A., Parvizpour, S, and Huyop, F., (2017), Multi-templat Homology-based Structural Model of L-Haloacid Dehalogenase (DehL) from *Rhizobium* sp. RC1, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35 (15), 3285-3296, <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1254115>, PMID: 27800712
- Adamu, A., Wahab, R. A., Aliyu, F., Aminu, A. H., Hamza, M. M., and Huyop, F., (2020), Haloacid Dehalogenases of *Rhizobium* sp. and Related Enzymes: Catalytic Properties and Mechanistic Analysis, *Process Biochemistry*, 92, 437-446, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.002>
- Akahane, M., Matsumoto, S., Kanagawa, Y., Mitoma, C., Uchi, H., Yoshimura, T., Furue, M., and Imamura, T., (2018), Long-Term Health Effects of PCBs and Related Compounds: A comparative Analysis of Patients Suffering from Yusho and the General Population, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 74 (2), 203-217, <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0486-6>, PMID: 29256109
- Al-Adilah. H., Feiters, M. C., Carpenter, L. J., Kumari, P., Carrano, C. J., Al-Bader, D., Kupper, F. C., (2022), Halogens in Seaweeds: Biological and Environmental Significance, *Phycology*, 2, 132-171, <https://doi.org/10.3390/phycolgy2010009>
- Ameen, F., Al-Nadhari, S., and Al-Homaidan, A. A., (2021), Marine Microorganisms as An Untapped Source of Bioactive Compounds, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 (1), 224-231, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>
- Amer, G. A., and Uthkhede, R. S., (2000), Development of Formulation of Biological Agent for Management of Root Rot of Lettuce and Cucumber, *Canadian Journal of Microbiology*, 46 (9), 809-816, <https://doi.org/10.1139/s00-063>

- Ang, T. F., Maiangwa, J., Salleh, A. B., Normi, Y. M., and Leow, T. C., (2018), Dehalogenases: From Improved Performace to Potential Microbial Dehalogenation Application, *Molecules*, 23, 1100-1140, <https://doi.org/10.3390/molecules23051100>
- Anggoro, R. R, and Ratnaningsih, E., (2017a), Subcloning of Haloacid Dehalogenase Gene from *Klebsiella pneumoniae* Strain ITB1 into pET-30a Expression Vector, *Proceeding of The 7th Annual Basic Science International Conference*, 3, 99-104, ISSN 2338-0128.
- Anggoro, R. R., and Ratnaningsih, E., (2017b), Expression of Haloacid Dehalogenase Gene and Its Molecular Protein Characterizaon from *Klebsiella pneumoniae* ITB1, *Indonesian Journal of Biotechnology*, 22 (1), 1-5, <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.26004>
- Arai, R, Kukimoto-Niino, M., Kuroishi, C., Bessho, Y., Shirouzu. M., and Yokoyama, S., (2006), Crystal Structure of The Probable Haloacid Dehalogenase PH0459 from *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Protein Science*, 15, 373-377, <https://doi.org/10.1110/ps.051922406>
- Aridayani, E. N., (2022), Studi Interaksi Haloacid Dehalogenase dari *Bacillus cereus* IndB1 terhadap Variasi Substrat Asam 2-(mono-, di-, tri)-Haloasetat, Skripsi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Arif, F., (2013), Kloning dan Penentuan Urutan Nukleotida Gen Haloacid Dehalogenase dari *Bacillus cereus* Strain Lokal, Skripsi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Ashayeri-Panah, M., Eftekhar, F., Kazemi, B., and Joseph, J., (2017), Cloning, Optimization of Induction Conditions, and Purification of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1733c Protein Expressed in *Escherichia coli*, *Iranian Journal of Microbiology*, 9 (2), 64–73, PMID: 29213997
- Atashgahi, S., Lu, Y., and Smidt, H., (2016), Overview of Known Organohalide Respiring Bacteria – Phylogenetic Diversity and Environmental Distribution, In book: *Organohalide-Respiring Bacteria*, pp.63-105, [https://doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0_5)
- Atashgahi, S., Shetty, S. A., Smidt, H., and de Vos., (2018), Flux, Impact, and Fate of Halogenated Xenobiotic Compounds in The Gut, *Front Physiol*, 9: 888, <https://doi.org/fphys.2018.00888>, PMID 30042695

- Bagherbaigi, S., Gicana, R., Lamis, R. J., Nemati, M., and Huyop, F., (2013), Characterization of *Arthrobacter* sp. S1 that Can Degrade  $\alpha$ - and  $\beta$ -Haloalkanoic Acids Isolated from Contaminated Soil, *Annual Microbiology*, 63, 1363-1369, <https://doi.org/10.1007/s3213-012-0595-4>
- Beckvar, N., and Lotufo, G. R., (2011), DDT and Other Organohalogen Pesticides in Aquatic Organisms, In: *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*, U. S. Environmental Protection Agency Papers, 248, 47-101, <http://digitalcommons.unl.edu/usepapapers/248>
- Behravan, A., and Hashemi, A., (2021), Statistical Optimization of Culture Conditions for Expression of Recombinant Humanized Anti-EpCAM Single-Chain Antibody Using Response Surface Methodology, *Research in Pharmaceutical Science*, 16 (2), 153–164, <https://doi.org/10.4103/1735-5362.310522>, PMID: 34084202.
- Benkert, P., Biasini, M., and Schwede, T., (2011), Toward The Estimation of The Absolute Quality of Individual Protein Structure Models, *Bioinformatics*, 27 (3), 343–350, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Bergmann, J. G., dan Sanik, J., (1957), Determination of Trace Amounts of Chlorine in Naphtha, *Analytical Chemistry*, 29, 241–243, <https://doi.org/10.1021/AC60122A018>
- Bornhorst, J. A., and Falke, J., (2000), Purification of Protein Using Polyhistidine Affinity Tags, *Methods Enzymology*, 324, 245–254, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8), PMID: 11036646
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Tallaa, L. B., Guha, N., Mattock, H., and Strait, K., (2015), Carcinogenicity of Consumption of Red and Processed Meat, *The Lancet Oncology*, 16 (16), P159, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)
- Bowie, J. U., Luthy, R., and Eisenberg, D., (1991), A Method to Identify Protein Sequences that Fold Into a Known Three-Dimensional Structure, *Science*, 253 (5016), 164–170, <https://doi.org/10.1126/science.1853201>
- Bravo, N., Grimalt, J. O., Chashchin, M., Chashchin, V. P., and Odland, J. O., (2019), Drivers of Maternal Accumulation of Organohalogen Pollutants in Arctic Areas (Chukotka, Rusia) and 4,4'-DDT Effects on The Newborns, *Environment International*, 124, 541-552, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.049>, PMID: 3069245

- Bradford, M. M., (1976), A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254, <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>, PMID: 942051
- Brenda, (2023), The Enzyme Database, [www.brenda-enzyme.org](http://www.brenda-enzyme.org)
- Bustillo, A., Aleu, J., Hernandez-Galan, R., and Collado, I., (2003), Biotransformation of The Fungistic Compound (R)-(+)-1-(4'-Chlorophenyl) propan-1-ol by *Botrytis cinerea*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21 (4-6), 267-271, [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00231-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00231-X)
- Carrol, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., and Prinsep, M. R., (2021), Marine Natural Products, *Natural Products Reports*, 39, 1122-1171, <https://doi.org/10.1039/d1np00076d>
- Colovos, C., and Yeates, T. O., (1993), Verification of Protein Structures: Patterns of Nonbonded Atomic Interactions, *Protein Science*, 2 (9), 1511–1519, <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>
- Dagen, M., (2020), History of Malaria and its Treatment, In: *Antimalarial Agents*, Elsevier Ltd., <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101210-9.00001-9>
- Dartsch, P. C., Wolburg, H., Al Makdessi, S., Schiek, D., Sweidan, H., Kimmel, R., and Schmahl, F. W., (2000), Sodium Monochloroacetate Causes Cytotoxic Effects, an Increased Lactate and Pyruvate Level and Induces Ultra Structural and Cytoskeletal Alterations in Cultured Kidney and Liver Epithelial Cells, *Human and Experimental Toxicology*, 19 (2), 138-148, <https://doi.org/10.1191/096032700678815693>, PMID: 10773845
- De Jong, R. M., (2003), Structure and Mechanism of A Bacterial Haloalcohol Dehalogenase: A New Variation of The Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Fold Without NAD(P)H Binding site, *The EMBO Journal*, 22 (19), 4933-4944, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg479>
- De Jong, R. M., and Dijkstra, B. W., (2003), Structure and Mechanism of Bacterial Dehalogenases: Different Ways to Cleave a Carbon-Halogen Bond, *Current Opinion in Structural Biology*, 13 (6), 722-730, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.10.009>
- De Jong, R. M., Brugman, W., Poelarends, G. J., Whitman, C. P., and Dijkstra, B. W., (2004), The X-Ray Structure of trans-3-Chloroacrylic Acid Dehalogenase Reveals A Novel Hydration Mechanism in The



- Tautomerase Superfamily, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (12), 11546-11552, <https://doi.org/10.1074/jbc.M311966200>
- Diez, A., Prieto, M. I., Alvarez, M. J., Bautista, J. M., Garrido, A., and Puyet, A., (1996), Improved Catalytic Performance of a 2-Haloacid Dehalogenase from *Azotobacter* sp. by Ion-Exchange Immobilization, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220 (3), 828-833, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0489>
- Drienovska, I., Chovancova, E., Koudelakova, T., Damborsky, J., and Chaloupkova, R., (2012), Biochemical Characterization of a Novel Haloalkane Dehalogenase from a Cold-Adapted Bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4995-4998, <https://doi.org/10.1128/AEM.00485-12>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., and Forli, S., (2021), AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61 (8), 3891-3898, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- Edbeib, M., Wahab, R., Huyop, F., Aksoy, H., and Kaya, Y., (2020), Further Analysis of *Burkholderia pseudomallei* MF2 and Identification of Putative Dehalogenase Gene by PCR, *Indonesian Journal of Chemistry*, 20, 386-394. <https://doi.org/10.22146/ijc.43262>
- Egland, P. G., Gibson, J., and Harwood, C. S., (2001), Reductive, Coenzyme A-Mediated Pathway for 3-Chlorobenzoate Degradation in The Phototrophic Bacterium *Rhodospseudomonas palustris*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (3), 1369-1399, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1396-1399.2001>, PMID: 11229940
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., and Sali, A., (2006), Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller, *Current Protocols in Bioinformatics*, 27-49, <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0209s50>
- Fetzner, S., and Lingens, F., (1994), Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications, *Microbiological Review*, 58, 641-685, <https://doi.org/10.1128/mr.58.4.641-685.1994>
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., and Olson, A. J., (2016), Computational Protein-Ligand Docking and Virtual Drug Screening with The AutoDock Suite, *Nature Protocols*, 11 (5), 905-919, <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>

- Gill, J. C., and Malamud, B. D., (2017), Anthropogenic Processes, Natural Hazards, and Interactions in A Multi-hazard Framework, *Earth-Science Reviews*, 166, 246-269, <https://doi.org/10.1016/J.earscirev.2017.01.002>
- Gomes, N. C. M., Kosheleva, I. A., Abraham, W. R., and Smalla, K., (2005), Effects of The Inoculant Strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of Naphthalene Contamination on The Soil Bacterial Community, *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 21-33, <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.005>
- Gribble, G. W., (2023), Naturally Occurring Organohalogen Compounds – A Comprehensive Review, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 121, 1-546, <https://doi.org/10.1007/978-3-031-26629-41>, PMID: 37488466
- Gribble, G. W., (2015), A Recent Survey of Naturally Occuring Organohalogen Compounds, *Environmental Chemistry*, 12 (4), A-I, <https://doi.org/10.1071/EN15002>
- Gribble, G. W., (2010), Naturally Occuring Organohalogen Compounds – A Comprehensive Update, *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer Vienna, 91, 1-613, <https://doi.org/10.1007/978-3-211-99323-1>
- Gribble, G. W., (2004a), Natural Organohalogens, *Science Dossier*, Euro Chlor 17, Belgium, 1-79.
- Gribble, G. W., (2004b), Natural Organohalogens: A New Frontiers for Medicinal Agents?, *Journal of Chemical Education*, 81, 1441-1449, <https://doi.org/10.1021/ed081p1441>
- Gul, I., Wang, Q., Jiang, Q., Fang, R., and Tsang, L., (2020), Enzyme Immobilization on Glass Fiber Membrane for Detection of Halogenated Compounds, *Analytical Biochemistry*, 609, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113971>
- Gurushankara, H. P., (2021), Chapter-13 – Recent Development in Biocatalysis and Influence on The Pharmaceutical Industry, in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Ed. B. Viswanath, Cambridge, MA Academic Press, p. 127-139
- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., and Pandit, M. W., (1990), Correlation Between Stability of a Protein and Its Dipeptide Composition: A Novel Approach for Predicting In Vivo Stability of a Protein from Its Primary

Sequence, Protein Engineering, Design, and Selection, 4 (2), 155-161, <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>

- Hamid, A. A. A., Wong, E. L., Joyce-Tan, K. H., Shamsir, M. S., Hamid, T. H. T. A., and Huyop, F., (2014), Molecular Modelling and Functional Studies of The Non-Stereospecific  $\alpha$ -Haloalkanoic Acid Dehalogenase (DehE) from *Rhizobium* sp. RC1 and Its Association with 3-Chloropropionic Acid ( $\beta$ -Chlorinated Aliphatic Acid), *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27 (2), 3725–3736, <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0142>
- Hasan, A. K. M. Q., Takada, H., Koshikawa, H., Liu, J. Q., Kurihara, T., Esaki, N., and Soda, K., (1994), Two Kinds of 2-Halo Acid Dehalogenases from *Pseudomonas* sp. YL Induced by 2-Chloroacrylate and 2-Chloropropionate, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 1599–1602. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1599>
- Heidarrezaei, M., Shokravi, H., Huyop, F., Koor, S. S. R., and Petru, M., (2020), Isolation and Characterization of A Novel Bacterium from The Marine Environment for Trichloroacetic Acid Bioremediation, *Applied Sciences*, 10, 1–17, <https://doi.org/10.3390/app10134593>
- Hill, K., Marchesi, J., and Weightman, A. J., (1999), Investigation of Two Evolutionary Unrelated Halocarboxylic Acid Dehalogenase Gene Families, *Journal of Bacteriology*, 181, 2535-2547, <https://doi.org/10.1128/JB.181.8.1535-2547.1999>
- Hiranuma, N., Park, H., Baek, M., Anishchenko, I., Dauparas, J., and Baker, D., (2021), Improved Protein Structure Refinement Guided by Deep Learning Based Accuracy Estimation, *Nature Communication*, 12 (1), 1340, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21511-x>
- Hisano, T., Hata, Y., Fujii, T., Liu, J. Q., Kurihara, T., Esaki, N., and Soda, K., (1996), Crystal Structure of L-2-Haloacid Dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL: An  $\alpha/\beta$  Hydrolase Structure that is Different from The  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (34), 20322-20330, <https://doi.org/10.1074/jbc.34.20322>
- Huang, C., Yan, S. J., Zeng, X. H., Sun, B., Lan, M. B., and Lin, J., (2015), Synthesis and Evaluation of the Antitumor Activity of Polyhalo Acrylonitrile Derivatives, *RSC Advances*, 5, 17444-17450, <https://doi.org/10.1039/C4RA12354A>
- Holm, L., (2020), DALI and The Persistence of Protein Shape, *Protein Science*, 29 (1), 128–140, <https://doi.org/10.1002/pro.3749>

- Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E., (1996), Errors in Protein Structures, *Nature*, 381, 272, <https://doi.org/10.1038/381272a0>
- Horisaki, T., Yoshida, E., Sumiya, K., Takemura, T., Yamane, H., and Nojiri, H., (2011), Isolation and Characterization of Monochloroacetic Acid-Degrading Bacteria, *Journal of General and Applied Microbiology*, 57, 277-284, <https://doi.org/10.2323/jgam.57.277>, PMID: 22139456
- Hou, Z., Zhang, H., Li, M., and Chang, W., (2013), Structure of 2-Haloacid Dehalogenase from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 69 (6), 1108–1114, <https://doi.org/10.1107/S0907444913006021>
- Idris, (2015), Sub Kloning dan Ekspresi Gen Haloacid Dehalogenase dari *Bacillus cereus* Strain Lokal, Thesis Magister, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Idris, and Ratnaningsih, E., (2015), Cloning of Haloacid Dehalogenase Gene from *Bacillus cereus* Lokal Strain with The Addition of Restriction Sites, *Procedia Chemistry*, 16, 314-320, <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.058>
- Islam, , F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S. S., Xu, L., Zhu, J., Zhao, M., Munos, S., Li, Q. X., and Zhou, W., (2018), Potential Impact of The Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Human and Ecosystem, *Environment International*, 111, 332-351, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>
- Janssen, D. B., Dinkia, I. J. T., Poelarends, G. J., and Terpstra, P., (2005), Bacterial Degradation of Xenobiotic Compounds: Evolution and Distribution of Novel Enzyme Activities, *Environmental Microbiology*, 7 (12), 1868-1882, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00966.x>
- Jones, D. H., Barth, P. T., Byrom, D., and Thomas, C. M., (1992), Nucleotide Sequence of The Structural Gene Encoding a 2-Haloalkanoic Acid Dehalogenase of *Pseudomonas putida* strain AJ1 and Purification of The Encoded Protein, *Journal of General Microbiology*, 138 (4), 675-683, <https://doi.org/10.1099/00221287-138-4-675>, PMID:1588303
- Junque, E., Gari, M., Arce, A., Torrent, M., Sunyer, J., and Grimalt, J. O., (2017), Integrated assesment of Infant Exposure to Persistent Organic Pollutants and Mercury Via Dietary Intake in A Central Western

Mediterranean Site (Menorca Island), *Environmental Research*, 156, 714-724, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.030>

- Kawasaki, H., Yahara, H., and Tonomura, K., (1981), Isolation and Characterization of Plasmid pUO1 Mediating Dehalogenation of Haloacetate and Mercury Resistance in *Moraxella* sp. B, *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 (6), 1477-1481, <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864721>
- Kelvin, B., (2021), Studi Gen Pengkode L-2-Haloacid Dehalogenase dari *Pseudomonas putida* KT2440, Skripsi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Khoiriyah, N. N., (2021), Studi Komputasi Mutasi Titik Terarah pada Gen Haloacid Dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* ITB1, Tesis, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Kimoto, H., Suye, S. I., Makishima, H., Arai, J. I., Yamaguchi, S., Fujii, Y., Yoshioka, T., and Taketo, A., (2010), Cloning of a Novel Dehalogenase from Environmental DNA, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74 (6), 1290-1292, <https://doi.org/10.1271/bbb.100027>
- Kirkinci, S. F., Edbeib, M. F., Aksoy, H., M., Marakli, S., and Kaya, Y., (2021), Identification of Dalapon Degrading Bacterial Strain, *Psychrobacter* sp. TaeBurcu001 Isolated from Antarctica, *Polar Science*, 28, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.polar.2021.100656>
- Klages, U., Krauss, S. and Lingens, F., (1983), 2-Haloacid Dehalogenase from a 4-Chlorobenzoate-Degrading *Pseudomonas* spec. CBS 3, *Journal of Biological Chemistry*, 364 (1), 529-536, <https://doi.org/10.1515/bchm2.1983.364.1.529>
- Kohler, R., Brokamp, A., Schwarze, R., Reiting, R. H., and Schmidt, F. R., (1998), Characteristic and DNA Sequence of a Cryptic Haloalkanoic Acid Dehalogenase from *Agrobacterium tumefaciens* RS5, *Current Microbiology*, 36, 96-101, <https://doi.org/10.1007/s002849900286>
- Kondo, H., Nakamura, T., and Tanaka, S., (2014), A Significant Role of Arg41 Residue in The Enzymatic Reaction of Haloacid Dehalogenase L-DEX YL Studied by QM/MM Method, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 110, 23-31, <https://doi.org/j.molcatb.2014.09.006>
- Kumar, A., Devi, S., and Singh, D., (2018), Significance and Approaches of Microbial Bioremediation in Sustainable Development, In book:

- Microbial Bioprospecting for Sustainable Development, pp. 93-114, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053_5)
- Kumar, A., Pillay, B., and Olaniran, A. O., (2016), L-2-Haloacid Dehalogenase from *Ancylobacter aquaticus* UV5: Sequence Determination and Structure Prediction, *International Journal of Biology and Macromolecule*, 83, 216-225, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.066>
- Kurihara, T., and Esaki, N., (2008), Bacterial Hydrolytic Dehalogenases and Related Enzymes: Occurrences, Reaction mechanisms, and Application, *The Chemical Record*, 8 (2), 67-74, <https://doi.org/10.1002/tcr.20141>
- Kurihara, T., Esaki, N., and Soda, K., (2000), Bacterial 2-Haloacid Dehalogenases: Structures and Reaction Mechanisms, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 (1-3), 57-65, [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00108-9)
- Kurihara, T., Yamauchi, T., Ichiyama, S., Takahata, H., and Esaki, N., (2003), Purification, Characterization, and Gene Cloning of A Novel Fluoroacetate Dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23 (2-6), 347-355, [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00098-5)
- Kusuma, S. A. F., Parwati, I., Rostinawati, T., Yusuf, M., Fadhollah, M., Ahyudanari, R. R., Rukayadi, Y., and Subroto, T., (2019), Optimization of Culture Conditions for Mpt64 Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Using Surface Response Methodology, *Heliyon*, 5 (11), e02741, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02741>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and J. M. Thornton, J. M., (1993), PROCHECK: A program to Check The Stereochemical Quality of Protein Structures, *Journal of Applied Crystallography*, 26 (2), 283-291, <https://doi.org/10.1107/S002188982009944>
- Laskowski, R. A., and Swindells, M. B., (2011), LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51 (10), 2778-2786, <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- Lawlor, M. S., Hsu, J., Rick, P. D., and Miller, V. L., (2005), Identification of *Klebsiella pneumoniae* Virulence Determinants Using an Intranasal Infection Model, *Molecular Biology*, 58 (4), 1054-1073, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04918.x>

- Lesley, M. B., Velnetti, L., Youss, A. N., Kasing, A., and Samuel, L., (2013), Presence of *Bacillus cereus* s.l. from Ready-to-Eat (RTE) Cereals Products in Sarawak, *International Food Research Journal*, 20 (2), 1031-1034, <http://www.ifrj.upm.edu.my>
- Li, A., and Shao, Z., (2014), Biochemical Characterization of a Haloalkane Dehalogenase DadB from *Alcanivorax dieselolei* B-5, *Plos One*, 9 (2), e89144, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089144>
- Li, J., Cai, W., and Zhu, L., (2011), The Characteristics and Enzyme Activities of 4-Chlorophenol Biodegradation by *Fusarium* sp., *Bioresource Technology*, 102, 2985-2989, <https://doi.org/j.biortech.2010.10.006>
- Li, Y. F., Hata, Y., Fujii, T., Hisano, T., Nishihara, M., Kurihara, T., and Esaki, N., (1998), Crystal Structures of Reaction Intermediates of L-2-Haloacid Dehalogenase and Implications for The Reaction Mechanism, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (24), 15035-15044, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.15035>
- Liao, L., Sun, X., Zeng, Y., Luo, W., Yu, Y., and Chen, B., (2015), A New L-Haloacid Dehalogenase from The Arctic Psychrotrophic *Pseudoalteromonas* sp.BSW20308, *Polar Biology*, 38, 1161-1169, <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1674-3>
- Liu, J. Q., Kurihara, T., Nardi-Dei, V., Esaki, N., and Soda, K., (1994), Overexpression and Rapid Purification of L-2-Haloacid Dehalogenase of *Pseudomonas putida* No. 109, *Bulletin of The Institute for Chemical Research, Kyoto Univ*, 72 (3-4), 330-335, <https://hdl.handle.net/2433/77584>
- Loganathan, B. G., and Kodavanti, P. R. S., (2017),. Organohalogen Pollutants and Human Health. In: Quah, S.R. and Cockerham, W. C. (eds), *The International Encyclopedia of Public Health*, 2nd edition, 5, 359–366. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00318-0>
- Lohner, S. T., and Spormann, A. M., (2013), Identification of A Reductive Tetrachloroethene Dehalogenase in *Shewanella sediminis*, *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 368 (1616), 20120326, <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0326>, PMID: 23479755
- Lomza, P., Krucon, T., and Tabernacka, A., (2023), Potential of Microbial Communities to Perform Dehalogenation Processes in Natural and Anthropogenically Modified Environments - A Metagenomic Study, *Microorganisms*, 11 (7), 1702, <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071702>

- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., and Marchler-Bauer, A. (2020): CDD/SPARCLE: The Conserved Domain Database in 2020, *Nucleic Acids Research*, 48 (D1), D265–D268, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
- Magnuson, J. K., Romine, M., Burriss, D. R., and Kingsley, M. T., (2000), Trichloroethene Reductive Dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and Substrate Range Characterization, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5141-5147, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5141-5147.2000>
- Martin, L. L., Peschke, T., Venturoni, F., and Mostarda, S., (2020). Pharmaceutical industry perspectives on flow chemocatalysis and biocatalysis, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 25, 100350, <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.011>
- Martinez-Garcia, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., and de Lorenzo, V., (2014), Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its Proviral Load Strengthens Endurance to Environmental Stresses, *Environmental Microbiology*, 17 (1), 76-90, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12492>
- Mesri, S., Wahab, R. A., and Huyop, F., (2009), Degradation of 3-Chloropropionic Acid (3-CP) by *Pseudomonas* sp. B6P Isolated from A Rice Paddy Field, *Annals of Microbiology*, 59 (3), 447-451, <https://doi.org/10.1007/bf03175129>
- Mortuza, S. M., Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., and Zhang, Y., (2021), Improving Fragment-Based Ab Initio Protein Structure Assembly Using Low-Accuracy Contact-Map Predictions, *Nature Communications*, 12 (1), 5011-5012, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25316-w>
- Muslem, W. H., Edbeib, M. F., Aksoy, H. M., Kaya, Y., Hamid, A. A. A., Hood, M. H. M., Wahab, R. A., and Huyop, F., (2020) Biodegradation of 3-Chloropropionic Acid (3-CP) by *Bacillus cereus* WH2 and Its In-Silico Enzyme-Substrate Docking Analysis, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(11), 3432-3441, <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1655482>
- Muhlmann, M., Forsten, E., Noack, S., and Buchs, J., (2017), Optimizing Recombinant Protein Expression Via Automated Induction Profiling in



- Microtiter Plates at Different Temperatures, *Microbial Cell Factories* 16 (1), 220, <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0832-4>
- Muller, R., Thiele, J., Klages, U., and Lingens, F., (1984), Incorporation of [18O]Water into 4-Hydroxybenzoic Acid in The Reaction of 4-Chlorobenzoate Dehalogenase from *Pseudomonas spec.* CBS3, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 124(1), 178-182, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90933-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90933-1)
- Muzikar, M., Kresinova, Z., Svobodova, K., Filipovi, A., Cvancarova, M., Cajthamlovi, K., and Cajhami, T., (2011), Biodegradation of Chlorobenzoic Acids by Ligninolytic Fungi, *Journal of Hazardous Material*, 196, 386-394, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.041>
- Nardi-Dei, V., Kurihara, T., Park, C., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Soda, K., and Esaki, N., (1999), DL-2-Haloacid Dehalogenase from *Pseudomonas sp.* 113 is a New Class of Dehalogenase Catalyzing Hydrolytic Dehalogenation Not Involving Enzyme-Substrate Ester Intermediate, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (30), 20977-20981, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20977>
- National Research Council, (2009), *Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals*, Vol 7, Washington DC, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK214910>
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chriss Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moesti, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., Timmis, K. N., Dusterhoft, A., Tummeler, B., and Fraser, C. M., (2002), Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of The metabolically Versatile *Pseudomonas putida* KT2440, *Environmental Microbiology*, 4 (14), 799-808, <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Nijenhuis, I., Stollberg, R., and Lechner, U., (2018), Anaerobic Microbial Dehalogenation and Its Key Players in The Contaminated Bitterfeld-Wolfen Megasite, *FEMS Microbiology Ecology*, 94(4), 1-10, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy012>
- Novak, H. R., Sayer, C., Isupov, M. N., Paszkiewicz, K., Gotz, D., Spragg, A. M., and Littlechild, J. A., (2013a). *Marine Rhodobacteraceae L-Haloacid*

- Dehalogenase Contains a Novel His/Glu Dyad that Could Activate the Catalytic Water, *The FEBS Journal*, 280 (7), 1664-1680, <https://doi.org/10.1111/febs.12177>
- Novak, H. R., Sayer, C., Panning, J., and Littlechild, J. A., (2013b), Characterisation of an L-Haloacid Dehalogenase from The Marine Psychrophile *Psychromonas ingrahamii* with Potential Industrial Application, *Marine Biotechnology*, 15, 695-705. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9522-3>
- Oyewusi, H. A., Huyop, F., Wahab, R. A., and Hamid, A. A. A., (2021), In-Silico Assessment of Dehalogenase from *Bacillus thuringiensis* H2 in Relation to Its Salinity-Stability and Pollutants Degradation, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39, 1-15, <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1927846>
- Oyewusi, H. A., Wahab, R. A., and Huyop, F., (2020), Dehalogenase-Producing Halophiles and Their Potential Role in Bioremediation, *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111603, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111603>
- Papaneophyton, C. P., and Kontopidis, G., (2014), Statistical Approaches to Maximize Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*: A General Review, *Protein Expression and Purification*, 94, 22-32, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016>
- Park, C., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., and Esaki, N., (2003), A New DL-2-Haloacid Dehalogenase Acting on 2-Haloacid Amides: Purification, Characterization, and Mechanism, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23, 329-336, [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00096-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00096-1)
- Peter, S., Oberhettinger, P., Schuele, L., Dinkelacker, A., Vogel, W., Dorfel, D., Bezdán, D., Ossowski, S., Marschal, M., Liese, J., and Willmann, M., (2017), Genomic Characterisation of Clinical and Environmental *Pseudomonas putida* Group Strains and Determination of Their Role in The Transfer of Antimicrobial Resistance Genes to *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Genomics*, 18, 859, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4216-2>
- Polnisch, E., Kneifel, H., Franzke, H., and Hofmann, K. H., (1991), Degradation and Dehalogenation of Monochlorophenols by The Phenol-Assimilating yeast *Candida maltosa*, *Biodegradation*, 2, 193-199, <https://doi.org/10.1007/BF00124493>

- Pontius, J., Richelle, J., and Wodak, S. J., (1996), Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures, *Journal of Molecular Biology*, 264 (1), 121-136, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0628>
- Quehenberger, J., Shen, L., Albers, S. V., Siebers, B., and Spadiut, O., (2017), *Sulfolobus* – A Potential Key Organism in Future Biotechnology, *Frontiers in Microbiology*, 8, 2474, <https://doi.org/fmicb.2017.02474>, PMID: 29312184
- Ratnaningsih, E., Ade., R., Putri, R. M., and Idris., I., (2021a), Optimization of Monochloroacetic Acid Biodegradation by Recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/pET-bcfd1 Carrying Haloacid Dehalogenase Gene from *Bacillus cereus* IndB1, *International Journal of Renewable Energy Development*, 10 (4), 857-863, <https://doi.org/10.14710/ijred.2021.28887>
- Ratnaningsih, E., and Idris, (2017), Cloning and Expression of Haloacid Dehalogenase Gene from *Bacillus cereus* IndB1, *Indonesian Journal of Biotechnology*, 22, 55-60, <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.27338>
- Ratnaningsih, E., and Saepulloh, S., (2022), In Silico Analysis on The Interaction of Haloacid Dehalogenase from *Bacillus cereus* IndB1 with 2-Chloroalkanoic Acid Substrates, *The Scientific World Journal*, 2022, 1-9, Article ID 1579194, <https://doi.org/10.1155/2022/1579194>
- Ratnaningsih, E., Sukandar, S. I., Putri, R. M., Kadja, G. T. M., and Wenten, I. G., (2022), Optimization of haloacid dehalogenase production by recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/pET-hakp1 containing haloacid dehalogenase gene from *Klebsiella pneumoniae* ITB1 using Response Surface Methodology (RSM), *Heliyon*, 8 (2022), e11546, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11546>
- Ratnaningsih, E., Sunaryo, S. N., Idris, I., and Putri, R. M., (2021c), Recombinant Production and One-Pot Purification for Enhancing Activity of Haloacid Dehalogenase from *Bacillus cereus* IndB1, *Reaktor*, 21 (2), 59-64, <https://doi.org/10.14710/reaktor.21.2.59-64>
- Ratnaningsih, E., Utami, L. D., Nurlaida, N., and Putri, R. M., (2021b), Molecular Cloning and Expression of Haloacid Dehalogenase Gene from a Local *Pseudomonas aeruginosa* ITB1 strain and Tertiary Structure Prediction of The Produced Enzyme, *Journal Kimia Sains dan Aplikasi*, 24 (5), 161-169, <https://doi.org/10.14710/jksa.24.5.161-169>
- Rebello, S., Nathan, V. K., Sindhu, R., Binod, P., Awasthi, M, K., and Pandey, A., (2021), Bioengineered Microbes for Soil Health Restoration: Present

- Status and Future, *Bioengineered*, 12 (2), 12839-12853, <https://doi.org/10.1080/2155979.2021.2004645>
- Riseh, R. S., Vazvani, M. G., Hassanisaadi, M., and Skorik, Y. A., (2023), Micro-/Nano-Carboxymethyl Cellulose as a Promising Biopolymer with Prospects in The Agriculture Sector: A Review, *Sustainable Natural Polymers from Biomass, Polymers*, 15 (2), 440 , <https://doi.org/10.3390/polym15020440>
- Rompp, A., Klemm, O., Fricke, W., Frank, H., (2001). Haloacetates in Fog and Rain, *Environmental Science and Technology*, 35, 1294-1298, <https://doi.org/10.1021/es0012220>
- Rosdi, M. N. M., Arif, S. M., Bakar, M. H. A., Razali, S. A., Zulkifli, R. M., and Ya'akob, H., (2018), Molecular Docking Studies of Bioactive Compounds from *Annona muricata* Linn as Potential Inhibitors for Bcl-2, Bcl-w and Mcl-1 Antiapoptotic Proteins, *Apoptosis*, 23 (1), 27-40, <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1434-7>
- Rye, C. A., Isupov, M. N., Lebedev, A. A., and Littlechild, J. A., (2008), Biochemical and Structural Studies of an L-Haloacid Dehalogenase from The Thermophilic Archaeon *Sulfolobus tokodaii*, *Extremophiles*, 13 (1), 179, <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0208-0>
- Sathe, N., Beech, P., Croft, L., Suphioglu, C., Kapat, A., and Athan, E., (2023), *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and Novel Approaches to Treatment “Knowing the Enemy” the Threat of *Pseudomonas aeruginosa* and Exploring Novel Approaches to Treatment, *Infectious Medicine*, 2 (3), 178-194, <https://doi.org/10.1016/j.imj.2023.05.003>
- Said, K. A. M., and Amin, M. A. M., (2015), Overview on The Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Process, *Journal of Applied Science and Process Engineering*, 2 (1), 279-287, <https://doi.org/10.33736/jaspe.161.2015>
- Satpathy, R., Konkimalla, V. B., and Ratha, J., (2015), In-Silico Gene Co-Expression Network Analysis in *Paracoccidioides brasiliensis* with Reference to Haloacid Dehalogenase Superfamily Hydrolase Gene, *Journal of Pharmacy Bioallied Sciences*, 7, 212-217, <https://doi.org/10.4103/0975-7406.160023>, PMID: 26229356
- Satpathy, R., Konkimalla, V. B., and Ratha, J., (2016), In-Silico Phylogenetic Analysis and Molecular Modelling Study of 2-Haloalkanoic Acid

- Dehalogenase Enzymes from Bacterial and Fungi Origin, *Advances in Bioinformatics*, 2016, 8701201, <https://doi.org/10.1155/2016/8701201>
- Schmidberger, J. W., Wilce, J. A., Tsang, J. S. H., and Wilce, M. C. J., (2007), Crystal Structure of The Substrate Free-Enzyme and Reaction Intermediate of The HAD Superfamily Member, Haloacid Dehalogenase DehIVa from *Burkholderia cepacia* MBA4, *Journal of Molecular Biology*, 368, 706-717, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.015>
- Schmidberger, J. W., Wilce, J. A., Weightman, A. J., Whisstock, J. C., and Wilce, M. C., (2008), The Crystal Structure of DehI Reveals a New Alpha-Haloacid Dehalogenase Fold and Active-Site Mechanism, *Journal of Molecular Biology*, 378, 284-294, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.035>
- Schobert, M., and Jahn, D., (2010), Anaerobic Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in The Cystic Fibrosis Lung, *International Journal of Medical Microbiology*, 300 (8), 549-556, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.007>
- Singh, S. M., and Panda, A. K., (2005), Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (4), 303-310, <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Sinha, A., Pant, K. K., and Khare, S. K., (2012), Studies on Mercury Bioremediation by Alginate Immobilized Mercury Tolerant *Bacillus cereus* cells, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 71, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.12.014>
- Siwek, A., Omi, R., Hirotsu, K., Jitsumori, K., Esaki, N., Kurihara, T., and Paneth, P., (2013), Binding Mode of DL-Haloacid Dehalogenase Revealed by Crystallography, Modelling and Isotope Effects Studies, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 540, 26-32, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.09.012>
- Smith, J. M., Harrison, K., and Colby, J., (1990), Purification and Characterization of D-2-Haloacid Dehalogenase from *Pseudomonas putida* AJ1/23, *Journal of General Microbiology*, 136, 881-886, <https://doi.org/10.1099/00221287-136-5-881>
- Song, Y., Dimaio, F., Wang, R. Y., Kim, D., Miles, C., Brunette, T. J., Thompson, J., and Baker, D., (2013), High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM, *Structure*, 21 (10), 1735-1742, <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>

- Stockholm Convention, (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, U. S. Department of State, <https://www.state.gov/key-topics-office-of-environmental-quality-and-transboundary-issues/stockholm-convention-on-persistent-organic-pollutants/>
- Strotmann, U. J., Pentenga, M., and Janssen, D. B., (1990), Degradation of 2-Chloroethanol by Wild Type and Mutants of *Pseudomonas putida* US2, Archives of Microbiology, 154, 294–300, <https://doi.org/10.1007/BF00248970>
- Tahya, C. Y., and Ratnaningsih, E., (2015), Cloning and Sequencing of Haloacid Dehalogenase Gene from *Klebsiella pneumoniae* ITB1, Procedia Chemistry, 16, 121-128, <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.039>
- Trisnahadi, S. R., (2018), Mutasi D7A pada Gen Haloacid Dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* dalam Klon Rekombinan pET-paed-d, Skripsi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Tsang, J. S. H., Sallis, P. J., Bull, A. T., and Hardman, D. J., (1988), A Monobromoacetate Dehalogenase from *Pseudomonas cepacia* MBA4, Archives of Microbiology, 150, 441-446, <https://doi.org/10.1007/BF00422284>
- Udaondo, Z., Molina, L., Daniels, C., Gomez, M. J., Molina-Henares, M., Matilla, M. A., Roca, A., Fernandez, M., Duque, E., Segura, A., and Ramos, J. L., (2013), Metabolic Potential of The Organic-Solvent Tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E Deduced from Its Annotated Genome, Applied Microbiology International - Microbial Biotechnology, 6 (5), 598-611, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12961>
- Ulma'awi, U., (2013), Isolasi dan Karakterisasi Haloacid Dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* Strain Lokal, Skripsi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Utami, L. D., (2014), Kloning dan Penentuan Urutan Nukleotida Gen Haloacid Dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* Strain Lokal, Skripsi, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung.
- Validov, S., Kamilova, F., Qi, S., Stephan, D., Wang, J. J., Makarova, N., and Lugtenberg, B., (2007), Selection of Bacteria Able to Control *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radices-lycopersici* in Stonewool Substrate, Journal of

Applied Microbiology, 102 (2), 461-471, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03083.x>

- Valles, J., Mariscal, D., Cortes, P., Coll, P., Villagra, A., Diaz, E., Artigas, A., and Rello, J., (2004), Patterns of Colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in Intubated Patients: A 3-Year Prospective Study of 1,607 Isolates Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis with Implications for Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia, *Intensive Care Medicine*, 30, 1768-1775, <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2382-6>
- van der Ploeg, J., van Hall, G., and Janssen, D. B., (1991), Characterization of The Haloacid Dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and Sequencing of The dhIB Gene, *Journal of Bacteriology*, 173 (24), 7925-7933, <https://doi.org/10.1128/jb.173.24.7925-7933.1991>
- Wang, C., Xi, J., Hu, H. Y., and Wen, X., (2009), Biodegradation of Gaseous Chlorobenzenes by White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biomedical and Environmental Science*, 21, 474-478, [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(09\)60005-2](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(09)60005-2)
- Wang, Y., Xiang, Q., Zhou, Q., Xu, J., and Pei, D., (2021), Mini Review: Advances in 2-Haloacid Dehalogenases, *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 758886, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758886>
- Wang, Y., Xue, S., Zhou, Q., and Pei, D., (2020), Recent Progress in 2-Haloacid Dehalogenases, *Chinese Journal of Biotechnology*, 36, 868-878, <https://doi.org/10.13345/j.cjb.190370>
- Wang, Y., Feng, Y., Cao, X., Liu, Y., and Xue, S., (2018), Insight Into The Molecular Mechanism of Dehalogenation Catalyzed by D-2-Haloacid Dehalogenase from Crystal Structures, *Scientific Reports*, 8, 1454, <https://doi.org/10.1038/s41589-017-19050-x>
- Wang, S., Sun, S., Li, Z., Zhang, R., and Xu, J., (2017), Accurate de Novo Prediction of Protein Contact Map by Ultra-Deep Learning Model, *PLoS Computational Biology*, 13 (1), e1005324, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005324>
- Weightman, A. J., Weightman, A. L., and Slater, J. H., (1982), Stereospecificity of 2-Monochloropropionate Dehalogenation by The Two Dehalogenases of *Pseudomonas putida* PP3: Evidence for Two Different Dehalogenation Mechanisms, *Microbiology*, 128, 1755-1762, <https://doi.org/10.1099/00221287-128-8-1755>

- Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendal, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., and Richardson, D. C., (2018), MolProbity: More and Better Reference Data for Improved All-Atom Structure Validation, *Protein Science*, 27 (1), 293-315, <https://doi.org/10.1002/pro.3330>
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., and Jin, S., (2015), Chapter 41 – *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular Medical Microbiology*, Second Edition, 2, 753-767, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2-00041-X>
- Yamazaki, H., (2022), Exploration of Marine Natural Resources in Indonesia and Development of Efficient Strategies for The Production of Microbial halogenated metabolites, *Journal of Natural Medicines*, 76, 1-19, <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01557-3>
- Yang, C. F., Lee, C. M., and Wang, C. C., (2005), Degradation of Chlorophenols Using Pentachlorophenol-Degrading Bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* in a Batch Reactor, *Current Microbiology*, 51(3), 156-160, <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4481-1>
- Yang, Y., Sanford, R., Yan, J., Chen, G., Capiro, N. L., Li, X., Löffler, F. E., (2020), Roles of Organohalide-Respiring Dehalococcoidia in Carbon Cycling, *mSystems Perspective*, 5 (3), <https://doi.org/10.1128/mSystems.00757-19>
- Yang, J., and Zhang, Y., (2015), I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions, *Nucleic Acids Research*, W1 (43), pp. W174–W181, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Yang, J., Anishchenko, I., Park, H., Peng, Z., Ovchinnikov, S., and Baker, D., (2020), Improved Protein Structure Prediction Using Predicted Interresidue Orientations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117 (3), 1496–1503, <https://doi.org/10.1073/pnas.1914677117>
- Zaidi, Z. Z., and Huyop, F., (2021), Utilization of 2,2-DCP by *Staphylococcus aureus* ZT and In Silico Analysis of Putative Dehalogenase, *Biosaintifika*, 13 (1), 1-8, <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v13i1.26322>
- Zakary, S., Oyewusi, H., and Huyop, F., (2021), Genomic Analysis of *Mesorhizobium loti* strain TONO Reveals Dehalogenases for Bioremediation, *Journal of Tropical Life Science*, 11, 67-77, <https://doi.org/10.11594/jtls.11.01.09>



- Zhang, J., Cao, X., Xin, Y., Xue, S., and Zhang, W., (2013), Purification and Characterization of a Dehalogenase from *Pseudomonas stutzeri* DEH130 Isolated from The Marine Sponge *Hymeniacidon perlevis*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1791-1799, <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1340-2>
- Zhang, J., Jiang, L., Chen, X., Lv, K., Basiony, M., Zhu, G., Karthik, I., Ouyang, L., Zhang, L., and Liu, X., (2021), Recent Advances in Biotechnology for Marine Enzymes and Molecules, *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 308-315, <https://doi.org/j.copbio.2012.05.009>, PMID: 34116375
- Zhang, J., Xin, Y., Cao, X., Xue, S., and Zhang, W., (2014), Purification and Characterization of 2-Haloacid Dehalogenase from Marine Bacterium *Paracoccus* sp. DEH99 Isolated from Marine Sponge *Hymeniacidon perlevis*, *Journal of Ocean University of China*, 13, 91-96, <https://doi.org/10.1007/s11802-014-2357-3>
- Zhang, C., Allen, K. N., and Dunawaymariano, D., (2018), Mechanism of Substrate Recognition and Catalysis of The Haloalkanoic Acid Dehalogenase Family Member  $\alpha$ -Phosphoglucosyltransferase, *Biochemistry*, 57, 4504-4517, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00396>
- Zhao, S., Hu, N., Chen, Z., Zhao, B., and Liang, Y., (2009), Bioremediation of Reclaimed Wastewater Used as Landscape Water by Using the Denitrifying Bacterium *Bacillus cereus*, *Springer Science*, 83, 337-340, <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9684-x>
- Zhou, C., Chen, X., Lv, T., Han, X., Feng, J., Liu, W., Wu, Q., and Zhu, D., (2023), Flipping the Substrate Creates A Highly Selective Halohydrin Dehalogenase for The Synthesis of Chiral 4-Aryl-2-oxazolidinones from Readily Available Epoxides, *ACS Catalysis*, 13 (7), 4768-4777, <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c06417>
- Zhou, L., Marks, T. S., Poh, R. P. C., Smith, R. J., Chowdhry, B. Z., and Smith, A. R. W., (2004), The Purification and Characterization of 4-Chlorobenzoate: CoA ligase and 4-Chlorobenzoyl CoA Dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain TM-1, *Biodegradation*, 15, 97-109, <https://doi.org/10.1023/b:biod.0000015614.94615.34>, PMID: 15068371
- Zhu, X., Liao, C., Song, D., Yan, X., Wan, Y., Sun, H., and Wang, X., (2023), Glucose Facilitates the Acclimation of Organohalide-Respiring Bacteria,

Journal of Hazardous Materials, 444 (Part A), 130421,  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130421>

# CURRICULUM VITAE



Nama : Enny Ratnaningsih  
Tempat/tgl lahir : Semarang, 1 September 1958  
Kel. Keahlian : Biokimia dan Rekayasa Biomolekul  
Alamat Kantor : Jl. Ganesa No.10 Bandung 40132  
Nama Suami : Ir. Tjundoko Suprijadi, M.T.  
Nama Anak : 1. dr. Kantika Prinandita, MS, SpM.  
2. Dr. Karlisa Priandana, M.Eng.

## I. RIWAYAT PENDIDIKAN

- Post Doctoral, University of Groningen, The Netherland, 2011.
- Post Doctoral, University of Groningen, The Netherland, 2009.
- Doktor (S3), Department of Genetics, Monash University, 1991.
- Magister (S2), Program Studi Kimia FMIPA ITB, 1987.
- Sarjana (S1), Program Studi Kimia FMIPA ITB, 1983.

## II. RIWAYAT KERJA DI ITB

- Ketua Tim Nilai, Program Studi Kimia FMIPA ITB, 1986-1988.
- Ketua Perpustakaan, Program Studi Kimia FMIPA ITB, 1994-1995.
- Ketua Tim Nilai, Program Studi Kimia FMIPA ITB, 1997-1998.
- Direktur Program DUE-like TPB ITB, 1999-2001.
- Wakil Ketua LP3 ITB, 2011 – 2012.
- Wakil Direktur PAU Bioteknologi ITB, 2013-2014.
- Koord. Kimia Dasar, Program Studi Kimia FMIPA ITB, 2016 -2017.

## III. RIWAYAT KEPANGKATAN

- Penata Muda, Golongan III/a, 1 Maret 1984.
- Penata Muda Tingkat I, Golongan III/b, 1 Oktober 1992.
- Penata, Golongan IIIc, 1 Oktober 1995.
- Penata Tingkat I, Golongan IIId, 1 April 2004.
- Pembina, Golongan IVa, 1 April 2015.

#### IV. RIWAYAT JABATAN FUNGSIONAL

- Asisten Ahli Madya, 1 April 1988.
- Asisten Ahli, 1 Juni 1992.
- Lektor Muda, 1 Mei 1995.
- Lektor, 1 Januari 2001.
- Lektor Kepala, 1 Desember 2014.
- Profesor, 1 Maret 2023.

#### V. KEGIATAN PENELITIAN

Penulis mulai menekuni penelitian di bidang biokimia dan bioteknologi, khususnya di bidang teknologi DNA rekombinan, sejak 1983 dengan menyusun peta fisik kromosom *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 menggunakan *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) yang saat itu merupakan teknik baru untuk memisahkan fragmen DNA berukuran besar. Hasil penelitian ini telah membawa penulis menjadi peneliti muda Indonesia yang pertama (1992), yang kemudian menjadikan penulis sebagai duta bioteknologi Indonesia dalam kompetisi di tingkat ASEAN yang dikenal sebagai *Young ASEAN Scientist Technology Award* (AYSTA).

Saat PAU Bioteknologi mulai dikembangkan di ITB tahun 1991, penulis mengaplikasikan teknik rekombinasi DNA untuk meneliti penisilin asilase dari bakteri lokal *Bacillus subtilis* BAC4. Pada saat yang sama, penulis juga bekerjasama dengan *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO) Australia untuk mengembangkan vaksin berbasis protein guna mencegah infeksi hewan ternak terhadap *screw worm fly*, *Chrysomya bezziana* Vil.

Penelitian terkait haloasam dehalogenase dari bakteri lokal *Bacillus cereus* IndB1, *Klebsiella pneumoniae* ITB1, *Pseudomonas aeruginosa* ITB1, dan *Pseudomonas putida* merupakan fokus penulis untuk mensinergikan penelitian dengan pembelajaran bagi peserta didik di ITB, baik di level sarjana maupun pascasarjana. Selain itu, penulis juga terlibat dalam penelitian terkait biodegradasi, terutama terkait kloning gen dari *Bacillus thuringiensis* untuk memproduksi polimer yang dapat terbiodegradasi sebagai pengganti plastik, salah satunya adalah polihidroksi butirat (PHB). Kloning gen, ekspresi, dan karakterisasi klon

rekombinan yang dapat digunakan untuk produksi PHB telah dilakukan dan terus dikembangkan.

Penulis juga terlibat dalam penelitian terkait kloning gen poliketida sintase untuk meningkatkan produksi poliketida, suatu polimer alami yang banyak digunakan di dunia medis. Bersama program studi lain di lingkungan ITB, penulis terlibat dalam penelitian untuk mempelajari biodegradasi polutan minyak bumi yang merupakan senyawa hidrokarbon berantai panjang menggunakan *Azotobacter chroococcum*, yang kemudian lebih difokuskan pada produksi dan analisis biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri ini. Penulis juga berkesempatan untuk mempelajari teknologi membran bersama program studi lain, terutama untuk oksigenasi dan pemisahan protein atau molekul organik lain.

Penulis terlibat aktif dalam kelompok peneliti yang mengembangkan levan, suatu biopolimer yang dapat terbiodegradasi, ramah lingkungan, dan banyak digunakan dalam dunia medis sebagai nanopartikel pembawa obat. Kloning gen pengkode levansukrase dari bakteri halofilik, *Halomonas elongata*, telah berhasil dilakukan. Penggunaan levan dan levan terasetilasi sebagai nanopartikel pembawa insulin oral saat ini sedang dikembangkan.

## VI. PUBLIKASI

Rizki, W. O., S., **Ratnaningsih, E.**, and Hertadi, R., (2023) Production of Poly-(R)-3-Hydroxybutyrate from Halophilic Bacterium *Salinivibrio* sp. Utilizing Palm Oil Mill Effluent as A Carbon Source, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102558, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102558>

**Ratnaningsih, E.**, Sukandar, S. I., Putri, R. M., Kadja, G. T. M., and Wenten, I. G., (2022), Optimization of Haloacid Dehalogenase Production by Recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/pET-hakp1 Containing Haloacid Dehalogenase Gene from *Klebsiella pneumoniae* ITB1 Using Response Surface Methodology (RSM), *Heliyon*, Vol. 8 (11), e11546, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11546>

**Ratnaningsih, E.**, and Saepulloh, S., (2022), In Silico Analysis on The Interaction of Haloacid Dehalogenase from *Bacillus cereus* IndB1 with 2-Chloroalkanoic Acid Substrates, *The Scientific World Journal*, 2022, 1-9, Article ID 1579194, <https://doi.org/10.1155/2022/1579194>

**Ratnaningsih, E.**, Kadja, G. T. M., Putri, R. M., Alni, A., Khoiruddin, K., Djunaidi, M. C., Ismadji, S., and Wenten, I. G., (2022), Molecularly Imprinted Affinity Membrane: A Review, *ACS Omega*, 7 (27), 23009-23026, <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02158>

Sabiqoh, Z., Hertadi, R., and **Ratnaningsih, E.**, (2022), Cloning, Expression, and *In Silico* Analysis of Class IV Poly-(R)-3-Hydroxybutyrate Genes from New Strain of *Bacillus thuringiensis* TH-01, *HAYATI Journal of Biosciences*, 3 (29), 310-319, <https://doi.org/10.4308/hjb.29.3.310-319>

**Ratnaningsih, E.**, Ade., R., Putri, R. M., and Idris., I., (2021), Optimization of Monochloroacetic Acid Biodegradation by Recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/pET-bcfd1 Carrying Haloacid Dehalogenase Gene from *Bacillus cereus* IndB1, *International Journal of Renewable Energy Development*, 10 (4), 857-863, <https://doi.org/10.14710/ijred.2021.28887>

**Ratnaningsih, E.**, Utami, L. D., Nurlaida, N., and Putri, R. M., (2021), Molecular Cloning and Expression of Haloacid Dehalogenase Gene from A Local *Pseudomonas aeruginosa* ITB1 Strain and Tertiary Structure Prediction of The Produced Enzyme, *Journal Kimia Sains dan Aplikasi*, 24 (5), 161-169, <https://doi.org/10.14710/jksa.24.5.161-169>

**Ratnaningsih, E.**, Sunaryo, S. N., Idris, I., and Putri, R. M., (2021), Recombinant Production and One-Pot Purification for Enhancing Activity of Haloacid Dehalogenase from *Bacillus cereus* IndB1, *Reaktor*, 21 (2), 59-64, <https://doi.org/10.14710/reaktor.21.2.59-64>

**Ratnaningsih, E.**, Aryanti, P. T., P., Himma, N. F., Wardani, A. K., Khoiruddin, K., Kadja, G. T., M., Prasetya, N., and Wenten, I. G., (2021), Membrane Oxygenator for Extracorporeal Blood Oxygenation, *Journal of Engineering & Technological Sciences*, 5 (53), 1-29, <https://doi.org/10.5614/10.5614/j.eng.technol.sci.2021.53.5>

Hertadi, R., Permatasari, N. U., and **Ratnaningsih, E.**, (2021), Box-Wilson Design for Optimization of In Vitro Levan Production and Levan

Application as Antioxidant and Antibacterial Agents, Iranian Biomedical Journal, 3 (25), 202-212, <https://doi.org/10.52547/ibj.25.3.202>

**Ratnaningsih**, E., Julian, H., Khoiruddin, K., Mangindaan, D., Wenten, I. G., (2021), Membrane-Based Beverage Dealcoholization, Membrane Systems in The Food Production, Edited by Alfredo Cassano and Enrico Drioli, Volume 1, Chapter 4, Dairy, Wine, and Oil Processing, pp. 69-94 , <https://doi.org/10.1515/9783110742992-004>

Permatasari, N. U., **Ratnaningsih**, E., and Hertadi, R., (2021), Recombinant Expression and Biochemical Characterization of Levansucrase from Halophilic Bacteria *Bacillus licheniformis* BK1 and BK2, Key Engineering Materials, (874), 96-106, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.874.96>

**Ratnaningsih**, E., Reynard, R., Khoiruddin, K., Wenten, I. G., and Boopathy, R., (2021), Recent Advancements of UF-Based Separation for Selective Enrichment of Proteins and Bioactive Peptides—A Review, Applied Sciences, 11 (3), 1-36, <https://doi.org/10.3390/app11031078>

Rizki, W. O., S., Sabiqoh, Z., **Ratnaningsih**, E., and Hertadi, R., (2021), Isolation and Characterization of Poly-(R)-3-Hydroxybutyrate Produced by *Bacillus thuringiensis* TH-01, Key Engineering Materials, (874), 81-87, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.874.81>

Hertadi, R., Amari, M. M., S., and **Ratnaningsih**, E., (2020), Enhancement of Antioxidant Activity of Levan Through the Formation of Nanoparticle Systems with Metal Ions, Heliyon, 6 (6), 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04111>

Ikhsan, F., and **Ratnaningsih**, E., (2020), Cloning, Sequencing, and Identification of *rhd*  $\alpha$ -Subunit Gene of Haloaromatic Dehalogenase Terminal Oxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* Local Strain, Malaysian Applied Biology, 2 (49), 43-48, <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v49i2.1521>

Oktavia, I., Fithriah, A. N., Permatasari, N. U., **Ratnaningsih**, E., and Hertadi, R., (2020), Levan Produced by the Halophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* BK1 as a Nanoparticle for Protein Immobilization,

Indonesian Journal of Chemistry, 3 (20), 493-502, <https://doi.org/10.22146/ijc.41064>

Permatasari, N. U., **Ratnaningsih**, E., and Hertadi, R., (2019), Molecular Cloning and Expression of Levansucrase Gene from *Bacillus licheniformis* BK1 Isolated from Bledug Kuwu Mud Crater, EurAsian Journal of BioScineces, 1 (13), 223-230

Anggoro, R. R., and **Ratnaningsih**, E., (2017), Expression of Haloacid Dehalogenase Gene and Its Molecular Protein Characterization from *Klebsiella pneumoniae* ITB1, Indonesian Journal of Biotechnology, 1 (22), 1-5, <http://dx.doi.org/10.22146/ijbiotech.26004>

Anggraeni, V. J., **Ratnaningsih**, E., and Nurachman, Z., (2017), Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Asam Monokloroasetat dari Tanah, Jurnal Kimia dan Pendidikan, 2 (2), 174-185, <http://dx.doi.org/10.30870/educhemia.v2i2.1327>

**Ratnaningsih**, E., and Idris, (2017), Cloning and Expression of Haloacid Dehalogenase Gene from *Bacillus cereus* IndB1, Indonesian Journal of Biotechnology, 22, 55-60, <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.27338>

Anggoro, R. R., and **Ratnaningsih**, E., (2017), Subcloning off Haloacid **Dehalogenase** Gene from *Klebsiella pneumoniae* Strain ITB1 into pET-30a Expression Vector, Proceeding of The 7th Annual Basic Science International Conference, 3, 99-104, ISSN 2338-0128.

Yuliasri, N. P., **Ratnaningsih**, E., and Hertadi, R., (2017), Cloning of Acetyl-CoA Acetyltransferase Gene from *Halomonas elongata* BK-AG18 and *In Silico* Analysis of Its Gene Product, Indonesian Journal of Biotechnology, 1 (22), 39-42, <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.27235>

Widyarani, W., Sari, Y. W., **Ratnaningsih**, E., and Sanders, J. P., M., (2016), Production of Hydrophobic Amino Acids from Biobased Resources: Wheat Gluten and Rubber Seed Proteins, Applied Microbiology and Biotechnology, (100), 7909-7920, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7441-8>

Nurachman, Z., Hartini, H., Rahmaniyah, W. R., Kurnia, D., Hidayat, R., Prijamboedi, B., Suendo, V., **Ratnaningsih**, E., Panggabean, L. M., G., and Nurbaiti, S., (2015), Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of



photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells, *Algal research*, (10), <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.009>

Tahya, C. Y., and **Ratnaningsih**, E., (2015), Cloning and Sequencing off Haloacid Dehalogenase Gene from *Klebsiella pneumoniae* ITB1, *Procedia Chemistry*, 16, 121-128, <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.039>

Widyarani, W., **Ratnaningsih**, E., Sanders, J. P., M., and Bruins, M. E., (2014), Biorefinery Methods for Separation of Protein and Oil Fractions from Rubber Seed Kernel, *Industrial Crops and Products*, (62), 323-332, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.005>

**Ratnaningsih**, E., Handayani, D., Khairunnisa, F., Ihsanawati, I., Kurniasih, S. D., Mangindaan, B., Rismayani, S., Kasipah, C., and Nurachman, Z., (2013), Screening, gene sequencing and characterising of lipase for methanolysis of crude palm oil, *Applied biochemistry and biotechnology*, (170), 32-43, <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0160-z>

## VII. PENGHARGAAN

1992 Indonesian Young Scientist Award, LIPI - TVRI, Indonesia.

1992 Candidate of Young ASEAN Technology Award, AYSTA ASEAN.

1993 Women in Science, KOWANI - Menteri Negara Urusan Peranan Wanita Indonesia.

1996 The Best National Award, Mitra Karya Bhakti Pertiwi, Indonesia.

2014 Penghargaan Pengabdian 25 Tahun, Rektor Institut Teknologi Bandung.

2014 Piagam Penghargaan dari BSNP Nomor 2492/H3/LL/2014, Penilai Buku Teks Pelajaran dan Buku Panduan Guru SMA/MA Kelas XII, Badan Standar Nasional Pendidikan.

2014 Piagam Penghargaan dari BSNP Nomor 23136/H3/LL/2014, Penilai Buku Teks Pelajaran dan Buku Panduan Guru SMA/MA Kelas XI, Badan Standar Nasional Pendidikan.

2015 Piagam Tanda Kehormatan Satyalencana Karya Satya XXX Tahun, Presiden Republik Indonesia.

2019 Penghargaan Pengabdian 35 Tahun, Rektor Institut Teknologi Bandung.

## VIII. SERTIFIKASI

- 2010 Sertifikat Pendidik dari Kementerian Pendidikan Nasional, Republik Indonesia sebagai dosen di Institut Teknologi Bandung.
- 2013 Certificate of Appreciation dari Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia, sebagai Oral Presenter dalam 2<sup>nd</sup> Natural Pigments Conference for South East Asia NP-SEA).
- 2015 Certificate for the participation in Grant Ceremony and Seminar on Research Findings Assisted by The Asahi Glass Foundation 2015, Vice Rector fo Research, Innovation, and Partnership, ITB.
- 2015 Sertifikat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITB, sebagai Pembimbing Pelatnas Tahap III IChO 47, Tahun 2015.
- 2016 Sertifikat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITB, sebagai Pembimbing Pelatnas Tahap I IChO 48, Tahun 2016.
- 2016 Certificate as the Scientific Committee of The 6<sup>th</sup> International conference on Mathematics and Natural Sciences, Faculty of Mathematics and Natural Sciences & School of Life Sciences and Technology & School of Pharmacy, ITB.
- 2016 Certificate as Speaker in Grant Ceremony and Seminar on Research Findings Assisted by The Asahi Glass Foundation 2016, Institute for Research and Community Service, ITB.
- 2017 Certificate as Moderator of The 6<sup>th</sup> Asean Bridges Event Series, Aquaporin Water Channels, The Nobel Lecture by Dr. Peter Agree, FMIPA ITB.
- 2017 Sertifikat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITB, sebagai Dosen Pembimbing Pelatnas Tahap IV IChO ke-49 Tahun 2017.
- 2017 Sertifikat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITB, sebagai Dosen Pembimbing Pelatnas 50th IChO Tahun 2018.
- 2018 Sertifikat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITB, sebagai Dosen Pembimbing Pelatnas II 50th IChO, Tahun 2018.





- 2018 Sertifikat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITB, sebagai Dosen Pembimbing Pelatnas III 50th IChO, Tahun 2018.
- 2019 Sertifikat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITB, sebagai Dosen Pembimbing Pelatnas I 51th IChO, Tahun 2019.
- 2023 Sertifikat Nomor: 0024/E3.1/TU.00.01/2023, dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi, Kementerian Pendidikan Kebudayaan, Riset, dan Teknologi, sebagai: Narasumber Bimbingan Teknis Penyusunan Aktivitas Berbasis Output.
- 2023 Certificate as Plenary Speaker in The 7<sup>th</sup> Gruber-Soedigdo Lecture 2023, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, ITB.

**ITB PRESS**

📍 Gedung STP ITB, Lantai 1,  
Jl. Ganesa No. 15F Bandung 40132  
☎ +62 22 20469057  
🌐 [www.itbpress.id](http://www.itbpress.id)  
✉ [office@itbpress.id](mailto:office@itbpress.id)  
📄 Anggota Ikapi No. 043/JBA/92  
APPTI No. 005.062.1.10.2018

**Forum Guru Besar  
Institut Teknologi Bandung**

Jalan Dipati Ukur No. 4, Bandung 40132  
E-mail: [sekretariat-fgb@itb.ac.id](mailto:sekretariat-fgb@itb.ac.id)  
Telp. (022) 2512532

🌐 [fgb.itb.ac.id](http://fgb.itb.ac.id)     [FgbItb](#)     [FGB\\_ITB](#)  
 [@fgbitb\\_1920](#)     [Forum Guru Besar ITB](#)

ISBN 978-623-297-382-4

