

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Tanaman biji pada sereal, legum, dan *oilseed plant* banyak digunakan sebagai sumber nutrisi yang penting bagi hewan. Selain sebagai sumber karbohidrat, protein dan lemak, biji-bijian tersebut merupakan sumber mineral yang penting bagi pertumbuhan seperti Phosphor (P), Kalsium (Ca), Besi (Fe), dan Zinc (Zn). Namun pada tanaman biji-bijian tersebut banyak mengandung asam fitat yang menyebabkan nilai nutrisinya menjadi rendah. Dalam penelitian (Steiner *et al.*, 2007) melaporkan bahwa terdapat sekitar 67% dari total P dalam biji legum, sereal, *oilseed plant* dan limbah sereal yang berikatan dengan asam fitat. Asam fitat dalam bahan makanan sangat stabil terhadap berbagai perlakuan dalam pengolahan dan bersifat mengikat mineral dan logam sehingga dapat mengganggu penyerapan unsur-unsur hara dan dapat menyebabkan defisiensi dalam tubuh (Anggi Restianti, 2016). Seperti pada kedelai yang juga mengandung senyawa anti gizi yaitu asam fitat dapat menghambat availibilitas protein serta mineral di dalam tubuh (Perdani and Utama, 2020). Hal tersebut dikarenakan asam fitat mampu membentuk kompleks dengan protein dan mineral menjadi protein tak larut sehingga daya cernanya turun (Yao *et al.*, 2012). Salah satu upaya untuk mengatasi permasalahan dalam kandungan asam fitat yang terdapat dalam pakan yakni dengan ditambahkan enzim eksogenus antara lain enzim fitase. Enzim fitase diharapkan dapat menghambat zat anti nutrisi yang disebabkan oleh asam fitat sehingga dapat meningkatkan efisiensi pemanfaatan pakan dan pertumbuhan.

Enzim fitase banyak dihasilkan dari berbagai mikroorganisme seperti khamir (Pandey *et al.*, 2000). Hasil penelitian (Yu, Wang and Liu, 2015) mengungkapkan bahwa *Rhodotorula mucilaginosa* merupakan spesies khamir yang mampu menghasilkan enzim fitase dengan tingkat stabilitas pH yang baik, dan mempunyai ketahanan terhadap protease yang kuat, serta memiliki aktivitas katalitik pada suhu rendah (Janatlan *et al.*, 2021). *R. mucilaginosa* dapat dijadikan sebagai kandidat yang baik untuk aplikasi industri, khususnya dalam industri pakan (Yang *et al.*, 2015). Memproduksi fitase memiliki beberapa kelemahan yaitu, produksi yang dihasilkan dalam jumlah yang sedikit serta protein yang dihasilkan oleh enzim fitase juga bercampur dengan protein dan target dalam jumlah yang cukup banyak, sehingga adanya kontaminasi pada produk. Selain itu dalam proses pemurnian nya cukup sulit dilakukan karna memerlukan beberapa langkah dalam pemurniannya, sehingga perlu dilakukan sentuhan teknologi rekayasa molekular. Yaitu dengan melakukan kloning gen dan ekspresi penyandi gen

fitase pada bakteri yang mudah untuk dikultur seperti *E. coli*. Proses pemurnian juga dilakukan dengan cara efisien yang nantinya dapat diterapkan untuk perbaikan kualitas pakan ternak, salah satunya sebagai probiotik. Pemanfaatan probiotik menjadi salah satu solusi untuk menghasilkan pertumbuhan dan efisiensi pakan yang optimal, serta dapat mengurangi biaya produksi dan dapat mengurangi pencemaran lingkungan terutama pada limbah dibidang industri pakan (Endang Setiawati, 2013).

Rekayasa genetika menawarkan beberapa keuntungan dalam produksi industri, seperti memungkinkan overekspresi dengan induser, menambahkan fusi protein untuk proses pemurnian, dan mencegah bakteri patogen menjadi sumber enzim dengan mengkloning gen penyandi protein target ke sel inang. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian dalam mendeteksi gen penyandi fitase yang berasal dari yeast *R. mucilaginosa* galur RG-PK 20. Diharapkan dapat menghasilkan fitase rekombinan sehingga dapat diproduksi dalam skala pabrik percontohan (*pilot plant*) dan proses pemurnian yang dilakukan secara efisien untuk perbaikan nutrisi pada pakan ternak. Penelitian ini menggunakan strain yeast *Rhodotorula* untuk ditingkatkan produksi enzim fitase dengan metode kloning dan ekspresi gen penyandi fitase, yang berasal dari yeast *R. mucilaginosa* galur RG-PK20 ke dalam *Escherichia coli*. Melalui penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan fitase yang rekombinan sehingga dapat diproduksi untuk perbaikan nutrisi pada pakan ternak.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Perkembangan bidang industri probiotik terutama dalam pengembangan produk pakan fungsional yang dihasilkan memerlukan variabilitas berbagai jenis mikroorganisme yang digunakan sebagai sumber utama dalam menghasilkan probiotik, selain itu kemampuan mikroorganisme dalam menghasilkan enzim tertentu yang diinginkan agar dapat efektif dalam penyerapan nutrisi dan perbaikan mutu pada pakan ternak. Di Indonesia sendiri penelitian mengenai yeast *R. mucilaginosa* belum ada dilaporkan dengan riset sebagai salah satu mikroorganisme penghasil enzim fitase dan memiliki kemampuan dalam produksi karotenoid yang mana senyawa ini dilaporkan mempunyai kemampuan aktivitas anti mikroba. Hal ini diperoleh karena banyak peneliti yang beranggapan bahwa masih banyak spesies mikroba yang belum diketahui di alam dibandingkan dengan yang telah diketahui. Oleh sebab itu, untuk mengeksplorasi potensi-potensi yang dimiliki oleh yeast *R. mucilaginosa* Galur RG-PK20 asli Indonesia salah satunya kemampuan dalam menghasilkan enzim fitase yang dapat diterapkan dalam pengembangan pakan dan pangan yang efektif, baik dalam makanan maupun minuman probiotik.

### **1.3. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan yeast *R. mucilaginosa* dalam menghasilkan enzim fitase. Mendesain sebuah primer spesifik yang bertujuan dalam mendeteksi gen penyandi enzim fitase dari *R. mucilaginosa*. Serta melakukan kloning gen fitase ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diharapkan pada penelitian ini dapat memberikan kemudahan dalam menentukan yeast *R. mucilaginosa* dalam menghasilkan enzim fitase, serta merupakan tahapan awal dalam memproduksi suatu enzim fitase rekombinan. Sehingga dapat memudahkan dalam proses purifikasi dan peningkatan produksi enzim fitase.

### **1.5 Batasan Masalah**

Batasan masalah pada penelitian ini hanya pada tahap insersi gen fitase ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  serta diverifikasi dengan pemotongan plasmid rekombinan menggunakan Enzim Retriksi.