METAGENOMIK FUNGSIONAL: KERAGAMAN GEN AMILASE DARI *Axis kuhlii* DAN RANCANGAN SELEKSI PROTEIN REKOMBINANNYA

Arief Muammar*, Arnetta Tiara, Endah Retnaningrum
[1]

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

*Email: arief.muammar@ugm.ac.id

Abstrak

Metagenomik fungsional terbukti efektif dalam menemukan enzim baru langsung dari sampel lingkungan tanpa bergantung pada kultur mikroba. Penelitian sebelumnya berhasil mengidentifikasi delapan enzim selulase aktif (lima endoglukanase dan tiga ß-glukosidase) dari feses *Axis kuhlii* menggunakan *workflow* cepat berbasis multiplex PCR, *Rolling Circle Amplification* (RCA), dan ekspresi langsung pada *Komagataella phaffii*. Penelitian ini melanjutkan pendekatan tersebut dengan fokus pada skrining *amilase* dari metagenom feses *A. kuhlii*. Tahapan meliputi multiplex PCR, rekombinasi ke vektor pPICZaA dengan Gibson Assembly, RCA, transformasi ke *K. phaffii*, serta analisis karakter enzim. Hasil yang diperoleh dari penelitian selanjutnya menunjukkan adanya keragaman gen amilase pada sampel feses *A. kuhlii* serta rancangan plasmid rekombinan dengan insert berupa *amilase* terpilih. Luaran ini diharapkan dapat memberikan langkah awal untuk menghasilkan kandidat amilase fungsional baru yang berpotensi sebagai biokatalis industri sekaligus mendukung konservasi keanekaragaman hayati.

Kata kunci: Axis kuhlii, Gibson Assembly, Komagataella phaffii, metagenomik fungsional, multiplex PCR, rancangan plasmid rekombinan, RCA

Abstract

Functional metagenomics has proven effective in discovering novel enzymes directly from environmental samples without relying on microbial cultures. In our previous study, we successfully identified eight active cellulase enzymes (five endoglucanases and three β-glucosidases) from *Axis kuhlii* feces using a rapid workflow based on multiplex PCR, rolling circle amplification (RCA), and direct expression in *Komagataella phaffii*. This study continues that approach with a focus on screening amylases from the fecal metagenome of *A. kuhlii*. The workflow includes multiplex PCR, recombination into the pPICZaA vector using Gibson Assembly, RCA, transformation into *K. phaffii*, and enzyme characterization. Results from subsequent analyses revealed the diversity of amylase genes in *A. kuhlii* fecal samples as well as the design of recombinant plasmids carrying selected amylase inserts. This output is expected to provide an initial step toward generating new functional Amylase candidates with potential as industrial biocatalysts while simultaneously supporting biodiversity conservation.

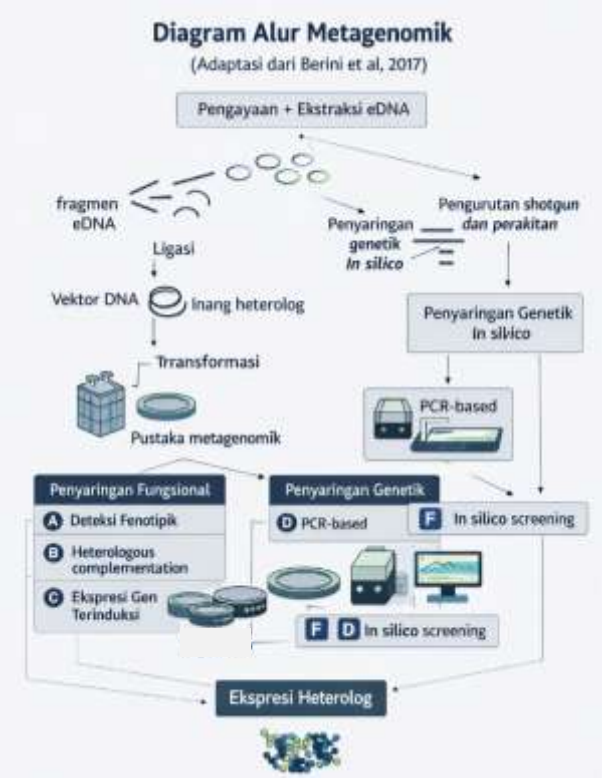
***Keywords**: Axis kuhlii, Gibson Assembly, Komagataella phaffii, functional metagenomics, multiplex PCR, recombinant plasmid design, RCA*

PENDAHULUAN

Saat ini, permintaan terhadap enzim baru yang berkinerja tinggi untuk proses industri terus meningkat, seiring dengan dorongan untuk mengganti bahan kimia konvensional dengan pendekatan yang lebih ramah lingkungan. Mikroorganisme merupakan sumber paling kaya biokatalis industri, namun potensi mikrobiota yang ada belum dimanfaatkan secara optimal karena keterbatasan pendekatan isolasi dan kultur konvensional. Diperkirakan hanya sekitar 0,1–1% prokariota yang dapat dibudidayakan dengan metode mikrobiologi tradisional (Berini *et al*. 2017).

Metagenomik dapat dilakukan untuk melakukan pendekatan riset mikrobia tanpa memerlukan kultur untuk mengidentifikasi enzim dari mikroorganisme. Pendekatan ini akan menggunakan ekstraksi langsung DNA dari lingkungan, fragmentasi, dan kloning tanpa perlu mengkultur mikroorganisme. Berini *et al*. (2017) menyajikan daftar komprehensif 332 enzim yang relevan secara industri yang ditemukan dari metagenom pada periode 2014 -2017. Beberapa strategi yang digunakan dari sekian banyak penelitian tersebut diantaranya Skrining fungsional: deteksi fenotipik (misalnya skrining zona jerrnih degradasi

substrat pada plate agar), komplementasi heterolog, dan ekspresi gen yang diinduksi. Skrining genetik: pendekatan berbasis PCR untuk mengamplifikasi gen dari DNA lingkungan, atau analisis *in silico*. Analisis metagenomik dengan shotgun sekuensing: pendekatan yang secara langsung menganalisis sampel DNA lingkungan. Metode ini memungkinkan penemuan gen yang lebih beragam dan langka. Mikroorganisme merupakan sumber biokatalis industri yang sangat kaya, namun keterbatasan metode kultur konvensional menyebabkan sebagian besar mikrobiota belum dimanfaatkan. Metagenomik memungkinkan eksplorasi DNA lingkungan (eDNA) untuk menemukan gen dan enzim baru dari mikroorganisme non-kultur. Kesemua strategi tersebut dijelaskan secara komprehensif pada Gambar 1, dimulai dari pemilihan sampel lingkungan, skrining fungsional, skrining genetik dan juga sekuensing shotgun.



Gambar 1. Skema strategi metagenomik untuk identifikasi enzim novel dari DNA lingkungan (Diadaptasi dari Berini *et al*, 2017).

Penelitian terdahulu oleh Muammar *et al*. (2026) menunjukkan bahwa workflow berbasis multiplex PCR dan RCA dapat mempercepat ekspresi gen metagenomik langsung pada *K. phaffii*, sehingga dalam waktu singkat berhasil diperoleh delapan enzim selulase aktif dari feses *A. kuhlii*. Temuan ini membuktikan bahwa pendekatan metagenomik fungsional dapat menjembatani prediksi komputasional dengan validasi eksperimental. Melanjutkan hasil tersebut, penelitian ini diarahkan untuk mengidentifikasi protein fungsional lain dari metagenom feses *A. kuhlii*, sebagai upaya memperluas bioprospeksi enzim dan mendukung konservasi keanekaragaman hayati.

METODE

Sampel feses dikoleksi dari individu *Axis kuhlii* yang hidup bebas (*wild*) di Cagar Alam Pulau Bawean (sampel 1–3), serta dari hewan yang dipelihara di dua fasilitas berbeda (*captive* A dan *captive* B) dalam kawasan konservasi tersebut (sampel 4–6 dan 7–9). DNA metagenom dari sampel feses diekstraksi menggunakan Quick-DNA™ HMW MagBead Kit (Zymo Research). Kemudian dilakukan Next-

Generation Sequencing (NGS) shotgun sequencing dengan ONT PromethION terhadap metagenom feses *Axis kuhlii* untuk memperoleh informasi mengenai diversitas dan kemelimpahan gen.

Proses *basecalling* dilakukan dengan Guppy v2.2.3, dan hasil bacaan mentah diekspor dalam format FASTQ sebelum dikonsolidasikan per sampel. Analisis kontrol kualitas terhadap bacaan mentah dilakukan menggunakan longQC.py v1.2.1 (Fukasawa *et al*., 2020), dengan hasil yang diperiksa secara manual. Perakitan bacaan mentah dilakukan menggunakan Canu v2.2 (parameter: -nanopore, genomeSize = 3.5 m) (Koren *et al*., 2017) dan Flye v2.9.3 (parameter: --meta) (Kolmogorov *et al*., 2020). Kontig hasil perakitan kemudian dipoles ulang menggunakan racon v1.5.0 dengan parameter default (Vaser *et al*., 2017).

Prediksi gen dari hasil perakitan metagenom dilakukan menggunakan Prodigal v2.6.3 (Hyatt *et al*., 2010). Tahap klasterisasi gen dilakukan dengan MMseqs2 v15.6f452 (Steinegger & Söding, 2017). Katalog gen yang dihasilkan kemudian dianotasi menggunakan modifikasi alur kerja FunTraits (Zoccarato *et al.,* 2022). Analisis fungsional dilakukan dengan pendekatan berbasis HMM yang menargetkan KEGG Orthologs untuk gen amilase.

Data metagenom yang didapat digunakan sebagai pustaka target dalam pemilihan gen fungsional yang akan diamplifikasi (Quince *et al*., 2017). Tahapan berikutnya adalah analisis dry lab, berupa perancangan plasmid rekombinan dengan menyisipkan gen *Amilase* terpilih ke dalam vektor ekspresi pPICZαA menggunakan metode Gibson Assembly, dengan bantuan perangkat lunak NEBuilder sebagai tools perancangan (Gibson *et al.,* 2009). Hal ini telah dilakukan dan menjadi fokusan pembahasan penelitian awal pada manuskrip ini.

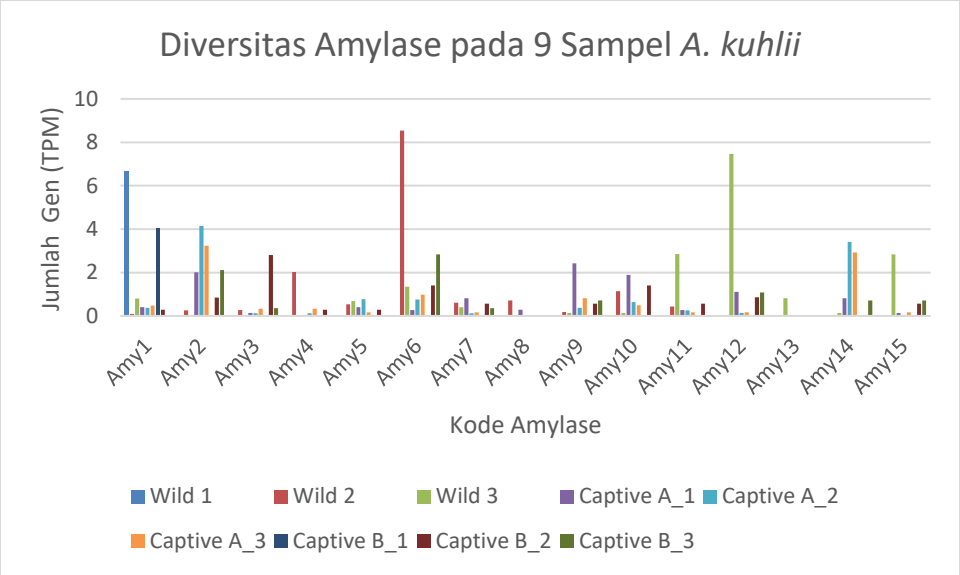
Pada tahap wet lab yang akan dilakukan kemudian, akan dilakukan beberapa prosedur eksperimental. Pertama, multiplex PCR digunakan untuk mengamplifikasi gen target dari eDNA feses *A. kuhlii* dengan delapan set primer spesifik (Edwards & Logan, 2019). Kedua, hasil amplifikasi disisipkan ke dalam vektor pPICZαA melalui teknik Gibson/HiFi *Assembly*. Ketiga, plasmid rekombinan diperbanyak menggunakan *Rolling Circle Amplification* (RCA) dengan enzim Phi29 DNA polymerase, yang dikenal memiliki kemampuan amplifikasi DNA berukuran panjang dengan fidelitas tinggi (Dean *et al*., 2001). Keempat, plasmid linear hasil RCA ditransformasi ke dalam sel ragi *Komagataella phaffii* strain X-33 melalui metode elektroporasi untuk integrasi ke kromosom inang (Cregg *et al*., 2000). Tahap terakhir adalah skrining karakter enzim, yaitu induksi ekspresi protein rekombinan dan analisis sekresi untuk mengidentifikasi aktivitas amilase yang dihasilkan (Ahmad *et al*., 2014).

Dengan kombinasi pendekatan NGS, bioinformatika, dan tahapan awal penelitian dengan gen target amilase ini, dapat diperoleh basis data yang cukup. Dan tahapan berikutnya berupa rekayasa molekuler berbasis *yeast expression system*, Keseluruhan penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan kandidat enzim fungsional baru yang berpotensi sebagai biokatalis industri sekaligus mendukung konservasi keanekaragaman hayati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amilase sebagai Target Gen Fungsional

Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi kelompok gen target lainnya (setelah sebelumnya sukses mendapatkan selulase) dengan menggunakan librari yang sama (Muammar *et al.,* 2026). Kelompok gen target berikutnya adalah *Amilase*. Pada hasil shotgun sekuensing, didapat lima belas jenis gen *Amilase* yang berbeda pada total sembilan sampel *A. kuhlii* (Gambar 2).



Gambar 2. Diversitas Amylase pada 9 Sampel *A. Kuhlii*

Dari lima belas jenis gen *Amilase* pada *library*, difokus pada beberapa gen yang memiiki *annealing temperature* yang dekat (antara 63-65 C) agar dapat dijadikan target amplifikasi dengan menggunakan multiplex PCR; dan didapat delapan gen *Amilase* yang menjadi target utama, dan disintesis primernya yaitu *Amilase* 1, *Amilase* 2, *Amilase* 6, *Amilase* 9, *Amilase* 10, *Amilase* 11, *Amilase* 12 dan *Amilase* 15 (Tabel 1).

Tabel 1. Primer Delapan Gen *Amilase* Target

No	Gen Target	*Ann* Temperatur
1	Amilase 1	64
2	Amilase 2	64
3	Amilase 6	65
4	Amilase 9	65
5	Amilase 10	64
6	Amilase 11	63
7	Amilase 12	65
8	Amilase 15	64

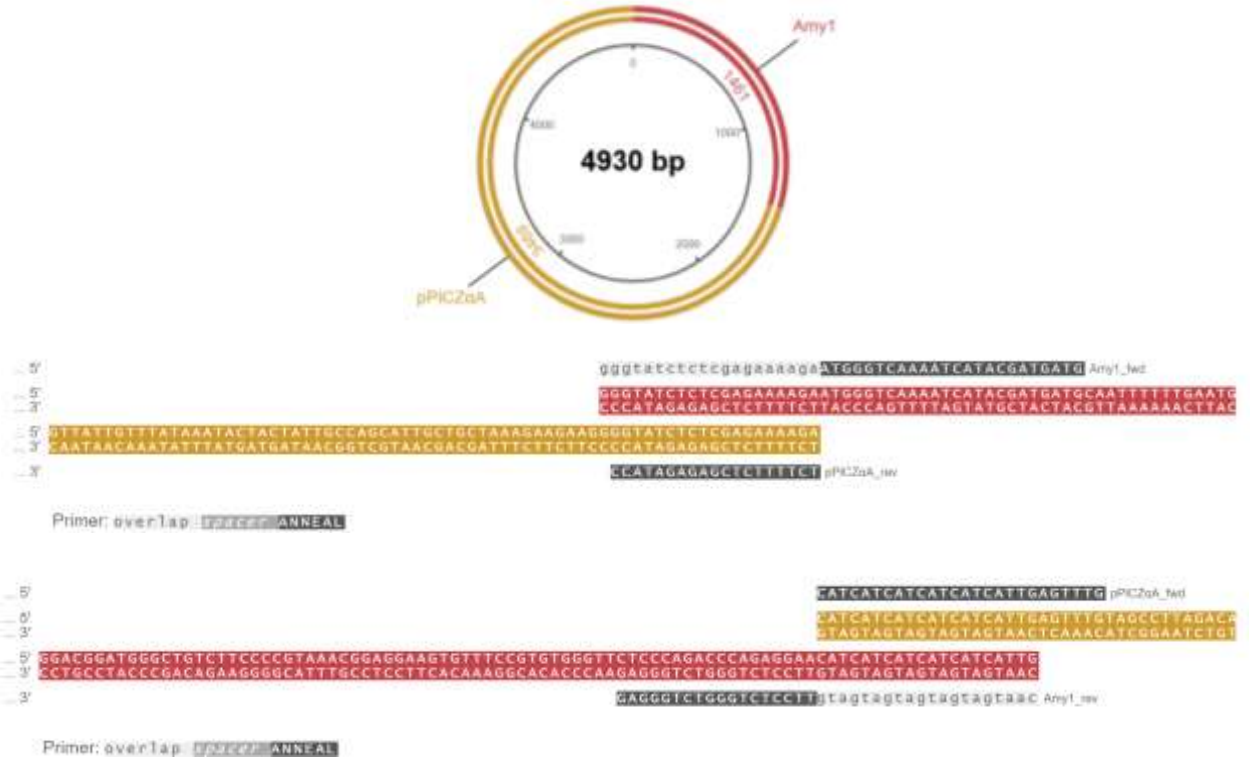
Rancangan Plasmid Rekombinan

Plasmid rekombinan ini dikonstruksi melalui metode Gibson Assembly, yaitu teknik rekombinasi in vitro yang memungkinkan penggabungan fragmen DNA dengan adanya daerah overlap komplementer (Gambar 3). Dalam penelitian ini, dua fragmen utama diamplifikasi, yaitu fragmen vektor pPICZαA dan fragmen gen Amilase. Primer dirancang sedemikian rupa sehingga ujung fragmen memiliki overlap sekitar 15–30 bp, sehingga dapat saling berpasangan dan memfasilitasi proses penyambungan. Metode ini dipilih karena fleksibilitasnya dalam menyambungkan fragmen tanpa bergantung pada situs restriksi, serta efisiensinya dalam menghasilkan konstruksi plasmid yang siap digunakan untuk transformasi ke dalam *Komagataella phaffii* (Gibson *et al*., 2009).

Tahapan Gibson Assembly dimulai dengan aktivitas *exonuclease* yang mendegradasi ujung 5’ DNA sehingga menghasilkan *single-stranded overhang*. *Overhang* tersebut kemudian mengalami annealing pada

daerah overlap yang komplementer antara fragmen vektor dan insert. Setelah itu, DNA polymerase memperpanjang ujung yang berpasangan dan mengisi celah yang ada. Proses ini diakhiri dengan aktivitas DNA ligase yang menutup nicks pada backbone DNA, sehingga terbentuk plasmid rekombinan yang utuh (Li *et al*., 2019). Dengan demikian, gen Amilase dapat terintegrasi dengan baik ke dalam vektor pPICZαA dan siap diekspresikan secara rekombinan setelah induksi dengan metanol.

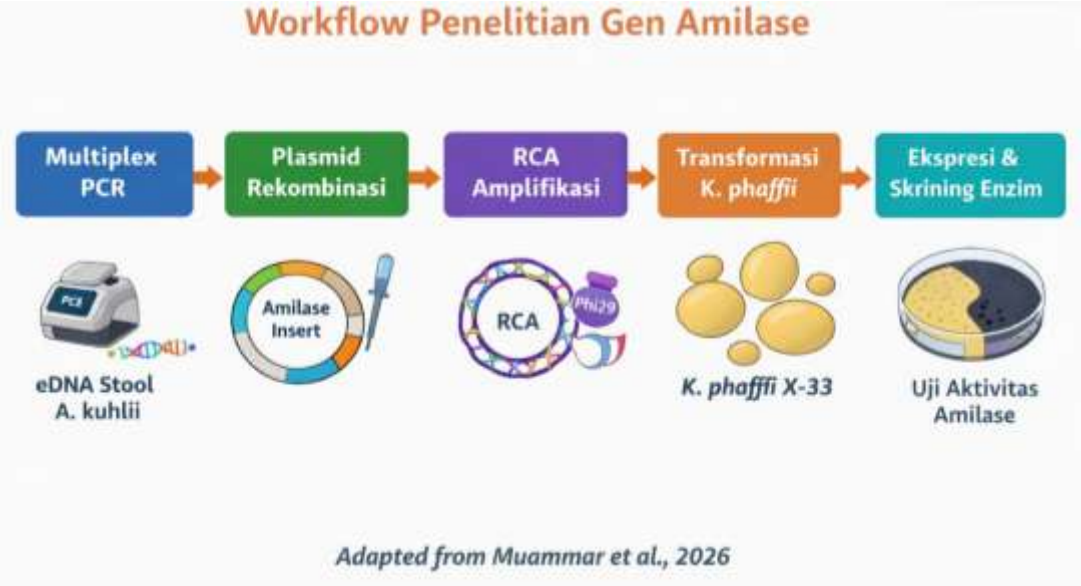
Selain itu, penggunaan vektor ekspresi yeast pPICZαA memberikan keuntungan karena sistem ini telah mapan digunakan untuk produksi protein rekombinan pada *K. phaffii*. Vektor ini memiliki promoter kuat yang diinduksi oleh metanol, sehingga memungkinkan ekspresi protein target dalam jumlah tinggi. Hal ini menjadikan pPICZαA sebagai pilihan yang sesuai untuk produksi enzim rekombinan seperti Amilase (Cereghino & Cregg, 2000).



Gambar 3. Peta plasmid rekombinan yang dikonstruksi dengan memasukkan gen *Amy1* ke dalam vektor pPICZαA (4930 bp). Primer dirancang dengan daerah overlap sehingga memungkinkan annealing dan fusi fragmen DNA secara efisien. Struktur primer ditunjukkan dengan kode warna: merah untuk sekuens gen *Amy1*, emas untuk sekuens vektor pPICZαA, dan abu-abu untuk label primer spesifik. Visualisasi dibuat dengan software NEBuilder (https://nebuilder.neb.com/#!/).

Rencana Multiplex PCR, Rekombinasi dan Amplifikasi dengan RCA Gen *Amilase*, Ekspresi Gen *Amilase* pada *K. phaffii* serta Skrining Aktifitas Enzim Amilase

Tahapan penelitian ini mengikuti alur kerja yang dikembangkan oleh Muammar *et al.* (2026), yang mengintegrasikan pendekatan bioinformatika dan rekayasa molekuler untuk eksplorasi gen fungsional dari sampel lingkungan (Gambar 4). Fokus penelitian adalah pada gen target berupa beberapa *Amilase* yang teridentifikasi dari hasil NGS metagenom feses *Axis kuhlii*. Saat ini, tahapan ini sedang dikerjakan di laboratorium, dimulai dengan multiplex PCR untuk mengamplifikasi gen *Amilase* dari eDNA menggunakan delapan set primer spesifik. Pendekatan ini memungkinkan amplifikasi simultan beberapa varian gen dalam satu reaksi, sehingga efisien dalam mengidentifikasi gen potensial dari sumber metagenom kompleks (Edwards & Logan, 2019; Muammar *et al*., 2026).



Gambar 4. Skema strategi metagenomik untuk identifikasi amilase baru dari sampel lingkungan

Produk amplifikasi yang dihasilkan kemudian disisipkan ke dalam vektor ekspresi pPICZαA menggunakan metode Gibson/HiFi Assembly, yang memungkinkan penyambungan fragmen DNA tanpa memerlukan situs restriksi dan menghasilkan konstruksi plasmid rekombinan yang presisi (Gibson *et al*., 2009). Plasmid rekombinan tersebut diperbanyak melalui *Rolling Circle Amplification* (RCA) menggunakan enzim Phi29 DNA polymerase, yang memiliki fidelitas tinggi dan mampu memperbanyak DNA berukuran panjang secara efisien (Dean *et al*., 2001). Tahapan berikutnya, yang juga akan dikerjakan di laboratorium, adalah transformasi plasmid linear hasil RCA ke dalam sel ragi *Komagataella phaffii* strain X-33 melalui metode elektroporasi. Sistem ekspresi berbasis yeast ini dipilih karena kemampuannya dalam menghasilkan protein rekombinan dengan tingkat sekresi tinggi dan post-translational modification yang mendekati sistem eukariotik (Cregg *et al*., 2000; Ahmad *et al*., 2014). Setelah transformasi berhasil, dilakukan skrining aktivitas enzim amilase melalui induksi ekspresi protein dan analisis sekresi untuk mengidentifikasi aktivitas hidrolisis substrat pati. Dengan mengikuti tahapan yang telah dirancang oleh Muammar *et al.* (2026) dan sedang diimplementasikan di laboratorium, penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan *pipeline* eksplorasi gen *Amilase* yang efisien—mulai dari identifikasi gen melalui metagenom hingga validasi aktivitas enzim rekombinan pada sistem ekspresi yeast—sebagai langkah awal menuju pengembangan biokatalis industri berbasis biodiversitas lokal.

SIMPULAN

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari studi sebelumnya yang berhasil menemukan delapan enzim selulase aktif dari feses *A. kuhlii*. Dengan pendekatan serupa, diharapkan diperoleh protein fungsional baru (amilase) yang dapat menjadi kandidat biokatalis industri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada atas dukungan Hibah Kolaborasi Dosen dan Mahasiswa 2026, fasilitas penelitian, serta tim pembimbing dan anggota penelitian yang telah berkontribusi dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in Pichia pastoris: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5

Berini, F., Casciello, C., Marcone, G.L., & Marinelli, F. (2017). Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS Microbiology Letters*, 364(21): fnx211

Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66

Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in Pichia pastoris. *Molecular Biotechnology*, 16(1), 23–52. https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23

Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., & Lasken, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Research*, 11(6), 1095–1099. https://doi.org/10.1101/gr.180501

Edwards, K. J., & Logan, J. M. J. (2019). Multiplex PCR: *Advantages, development, and applications*. In R. Rapley & J. M. J. Logan (Eds.), PCR (Methods in Molecular Biology, Vol. 1620) (pp. 15–33).

Fukasawa Y., Ermini L., Wang H., Carty K., Cheung M-S. (2020). LongQC: a quality control tool for third generation sequencing long read data. *G3 (Bethesda, Md*.), 10(4), 1193–1196. https://doi.org/10.1534/g3.119.400864.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318

Hyatt D., Chen G-L., Locascio P.F., Land M.L., Larimer F.W., Hauser L.J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11:119. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119

Kolmogorov M., Bickhart D.M., Behsaz B., Gurevich A., Rayko M., Shin S.B., … Pevzner P.A. (2020). MetaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. *Nature Methods,* 17:1103–1110. https://doi.org/10.1038/s41592-020-00971-x

Koren S., Walenz B.P., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k -mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, 27:722–736. https://doi.org/10.1101/gr.215087.116

Li, C., Wen, A., Shen, B., Lu, J., Huang, Y., & Chang, Y. (2019). FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnology*, 19(1), 9. https://doi.org/10.1186/s12896-019-0508-9

Muammar, A., Retnaningrum, E., Daryono, B.S., Prijambada, I.D., Yashima, Y., & Peterbauer, C. (2026). A fast workflow to explore active enzymes from environmental samples through functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 110:125. https://doi.org/10.1007/s00253-026-13805-1

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833–844. https://doi.org/10.1038/nbt.3935

Steinegger, M., & Söding, J. (2017). MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. Nature Biotechnology, 35(11), 1026–1028. https://doi.org/10.1038/nbt.3988

Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research*, 27(5), 737–746. https://doi.org/10.1101/gr.214270.116

Zoccarato, L., Sher, D., Miki, T., Segrè, D., & Grossart, H.-P. (2022). A comparative whole-genome approach identifies bacterial traits for marine microbial interactions. *Communications Biology*, 5(1), 276. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03184-4