



**KARAKTERISASI *SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE* (SPS1)
DARI TEBU PADA *Escherichia coli* STRAIN BL21**

SKRIPSI

Oleh

**Ahmad Fudhaili
NIM 071810401069**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**KARAKTERISASI *SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE (SPS1)*
DARI *TEBU* PADA *Escherichia coli* STRAIN BL21**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

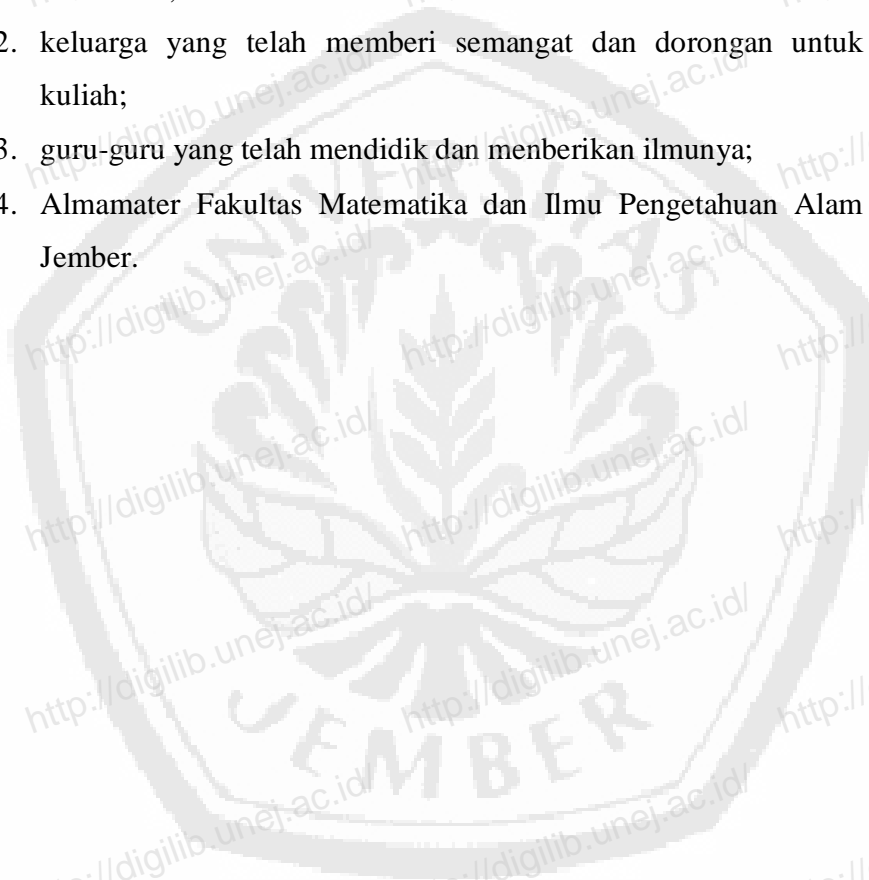
Ahmad Fudhaili
NIM 071810401069

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2012

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Babun dan Ibunda Aminah tersayang, kuucapkan terima kasih sebesar-besarnya atas segala kasih sayang dan doa yang senantiasa diberikan selama ini;
2. keluarga yang telah memberi semangat dan dorongan untuk menempuh kuliah;
3. guru-guru yang telah mendidik dan memberikan ilmunya;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.



MOTTO

Wahai orang-orang yang beriman! Bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap-siaga (di perbatasan negerimu) dan bertawakalalah kepada Allah agar kamu beruntung.

(terjemahan Surat Al-Imron ayat 200)*)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2009. Al-Qur'an dan Terjemahan. Jakarta Timur: CV. Pustaka Al-Kautsar.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Ahmad Fudhaili

NIM : 071810401069

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Karakterisasi Sucrose-Phosphate Synthase (SPS1) dari Tebu pada Escherichia coli strain BL21* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh program Hibah Kompetensi (HIKOM) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas nama Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isisnya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat saksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 12 Juni 2012

Yang menyatakan,

Ahmad Fudhaili
NIM 071810401069

SKRIPSI

**KARAKTERISASI *SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE (SPS1)*
DARI *TEBU* PADA *Escherichia coli* STRAIN BL21**

Oleh

Ahmad Fudhaili
NIM 071810401069

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. rer. nat Kartika Senjarini, S. Si, M. Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Karakterisasi Sucrose-Phosphate Synthase (SPS1) dari Tebu pada Escherichia coli strain BL21* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada:

hari :

tanggal :

tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua,

Sekretaris,

Dr. rer. nat Kartika Senjarini, S. Si, M. Si.
NIP 197509132000032001

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr, Sc.
NIP 195510221982121001

Anggota

Penguji I,

Penguji II,

Esti Utarti, S.P, M. Si.
NIP 197003031999032001

Sattya Arimurti, S.P, M. Si.
NIP 197403311999032001

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA. Ph.D.
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Karakterisasi *Sucrose-Phosphate Synthase* (SPS1) dari Tebu pada *Escherichia coli* strain BL21; Ahmad Fudhaili, 071810401069; 2012, 31 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Sukrosa merupakan produk akhir dari poses fotosintesis yang terjadi di daun. Pada sebagian besar tanaman sukrosa dibentuk di sitosol dan ditransportasikan melalui floem dari jaringan pembentuk ke jaringan penyimpan. Metabolisme sukrosa pada tanaman dipengaruhi oleh beberapa enzim yaitu *Invertase*, *Sucrose Synthase*, dan *Sucrose-Phosphate Synthase*. *Sucrose-Phosphate Synthase* (SPS; E.C. 2. 4.1.14) adalah enzim yang mempunyai peranan penting dalam proses biosintesis sukrosa pada tanaman. Karakterisasi enzim SPS pada tanaman tebu dalam bentuk murni belum pernah dilakukan karena keberadaan enzim ini sangat rendah dan mudah mengalami degradasi selama purifikasi. Saat ini tersedia cDNA *SoSPS1* yang dikonstruksi pada vektor plasmid pTrc99A, maka karakterisasi enzim yang dikode SPS1 dapat dikarakterisasi. Karakterisasi gen dapat dilakukan dengan sel biologi misalnya *E. coli*. *E. coli* sering digunakan sebagai inang vektor dikarenakan dapat tumbuh pada medium sederhana, pertumbuhannya cepat, pengetahuan tentang informasi genetik dan sifat biokimianya sudah banyak dipelajari

Penelitian ini bertujuan untuk mentransformasi dan mengetahui kondisi optimal ekspresi serta karakterisasi gen pengkode SPS1 dari tanaman tebu yang telah disisipkan pada vektor ekspresi pTrc99A dalam *E. coli* strain BL21. Penelitian ini akan dilakukan transformasi, konfirmasi keberadaan gen pengkode SPS1, dan pengaruh suhu terhadap ekspresinya serta karakterisasi protein yang dihasilkan oleh *E. coli*. Transformasi plasmid pTrc99A-*SoSPS1* ke dalam *E. coli* dilakukan dengan perlakuan CaCl_2 dan *Heat-shock*. Konfirmasi keberadaan gen pengkode SPS1 dengan penambahan antibiotik pada media dan analisis enzim restriksi. Pengujian ekspresi dilakukan dengan menumbuhkan *E. coli* dalam media dengan perlakuan suhu.

Karakterisasi enzim dilakukan dengan substrat SPS1 yaitu *Uridine Diphosphoglucose* (UDPGlc) dan *Fructose-6-Phosphate* (Fru6P).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *E. coli* BL21 tertransformasi dan mengandung plasmid pTrc99A-*SoSPS1*. Penambahan antibiotik dan analisis enzim restriksi telah dilakukan untuk konfirmasi keberadaannya. *E. coli* mampu mengekspresikan gen pengkode SPS1 dan menghasilkan aktivitas enzim optimal pada suhu induksi 22 °C. Analisis dengan *Western Blot* menunjukkan bahwa protein SPS1 dari *E. coli* transforman berhasil dideteksi. Nilai K_m dan V_{maks} enzim SPS1 dengan substrat UDPGlc adalah 16,69 mM dan 3,06 μg sukrosa/ menit/ μg protein. Sedangkan nilai K_m dan V_{maks} enzim SPS menggunakan substrat Fru6p sebesar 0,927 mM dan 1,20 μg sukrosa/ menit/ μg protein.

PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul *Karakterisasi Sucrose-Phosphate Synthase (SPS1) dari Tebu pada Escherichia coli strain BL21* skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. rer. nat Kartika Senjarini, S. Si, M. Si., selaku dosen pembimbing utama dan Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc., selaku dosen pembimbing anggota yang dengan kesabaran memberi bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
2. Esti Utarti, S.P, M.Si., dan Sattya Arimurti, S.P, M.Si., selaku dosen penguji yang memberikan masukan dan kritikan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Drs. Sutoyo M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan dukungan dan saran selama menjadi Mahasiswa;
4. Purnama Oktaviandari M.Si., selaku teknisi Laboratorium Biologi Dasar terima kasih atas bantuan dan masukannya;
5. Pengelola Program Hibah Kompetensi (HIKOM) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah membiayai penelitian ini;
6. rekan kerja; Ryza Aditya Priatama S. Si., Hilda Safitri S. Si., Bernet Agung Saputra S.P., Septyan Christanto S.P., Triliani Farlisa., Anandang., Mutik., Adit., Aji., Yunianzi., Mahasiswa Angkatan 2007., terima kasih atas dukungan dan bantuan kalian. Kalian adalah rekan kerja sekaligus teman belajar, bermain dan bergurau setiap waktu yang sulit dilupakan;

7. Nina Oktaria yang selalu memotivasi dan menemani baik dalam keadaan suka maupun duka;

8. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis telah berusaha dengan sungguh-sungguh dalam menyelesaikan penelitian ini. Semoga ada manfaat yang bisa diambil oleh pembaca, namun demikian penulis mengharapkan adanya masukan yang membangun dari pembaca untuk kesempurnaan laporan penelitian ini.

Jember, 12 Juni 2012

Penulis



DAFTAR ISI

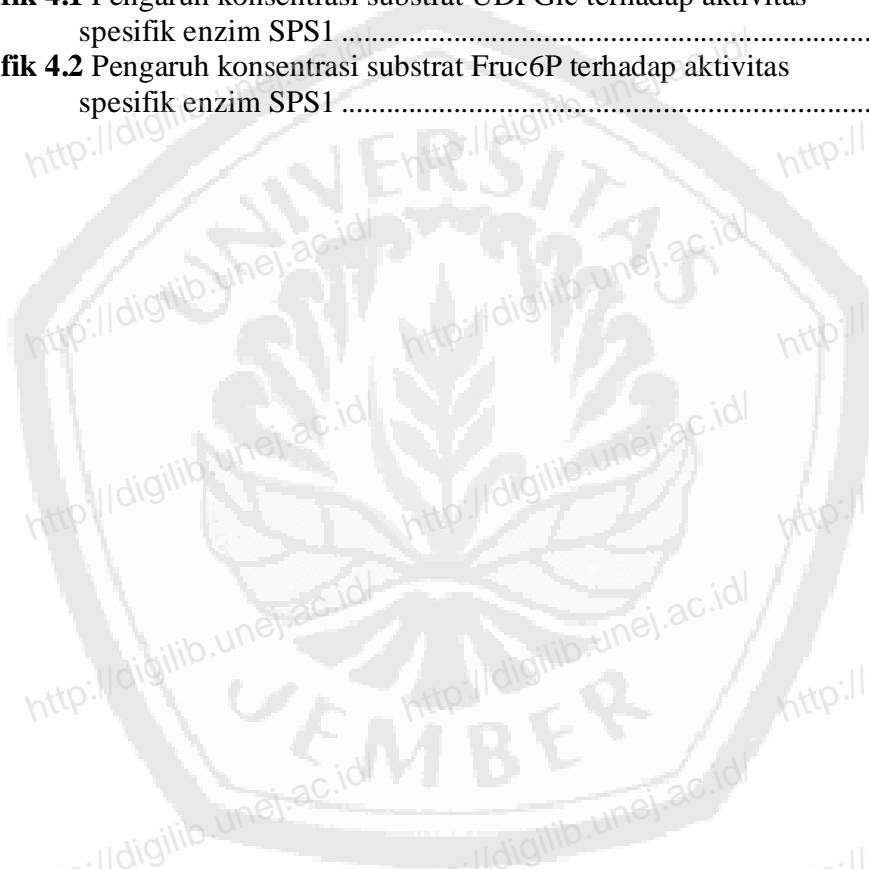
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat.....	3
1.3.1 Tujuan.....	3
1.3.2 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Sucrose-Phosphate Synthase (SPS)</i> pada Tanaman.....	4
2.2 Ekspresi Gen <i>SPS</i> pada <i>E. coli</i>.....	6
2.3 Karakterisasi Enzim.....	7
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	10
3.2 Bahan Penelitian.....	10

3.3 Transformasi Plasmid pTrc99A-SoSPS1 kedalam <i>E. coli</i> strain BL21.....	11
3.4 Konfirmasi Keberadaan Konstruk Plasmid pTrc99A-SoSPS1 pada <i>E. coli</i>.....	11
3.4.1 Isolasi DNA Plasmid.....	11
3.4.2 Pemotongan DNA Plasmid dengan enzim restriksi	
<i>Hind</i> III	12
3.4.3 Gel Agarose Elektroforesis.....	12
3.5 Uji Ekspresi <i>SoSPS1</i> pada <i>E. coli</i>.....	13
3.6 Ekstraksi Protein Rekombinan dari <i>E. coli</i>.....	13
3.7 Presipitasi Parsial Protein dari <i>E. coli</i>	13
3.7.1 Presipitasi dengan PEG 6000	13
3.7.2 Presipitasi dengan Amonium Sulfat 30-80 <i>saturation</i> % ...	14
3.8 Pengukuran Aktivitas Enzim SPS1	14
3.9 Karakteri Enzim SPS1.....	15
3.10 Penentuan Kandungan Protein Terlarut.....	17
3.11 SDS-PAGE dan <i>Western Blot</i>.....	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Transformasi pTrc99A-<i>SoSPS1</i> pada <i>E. coli</i>	18
4.2 Konfirmasi Keberadaan Konstruk pTrc99A-<i>SoSPS1</i> pada <i>E. coli</i> Transforman.....	19
4.3 Uji Ekspresi <i>SoSPS1</i> pada <i>E. coli</i>.....	20
4.4 Karakter Enzim SPS1	23
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	26
5.2 Saran.....	26
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR GRAFIK

Halaman

Grafik 3.1 Penentuan nilai K_m dan V_{maks} enzim SPS1 pada substrat UDPGlc dengan menggunakan kurva <i>Lineweaver-Burk</i>	16
Grafik 3.2 Penentuan nilai K_m dan V_{maks} enzim SPS1 pada substrat Fruc6P dengan menggunakan kurva <i>Lineweaver-Burk</i>	16
Grafik 4.1 Pengaruh konsentrasi substrat UDPGlc terhadap aktivitas spesifik enzim SPS1	23
Grafik 4.2 Pengaruh konsentrasi substrat Fruc6P terhadap aktivitas spesifik enzim SPS1	25



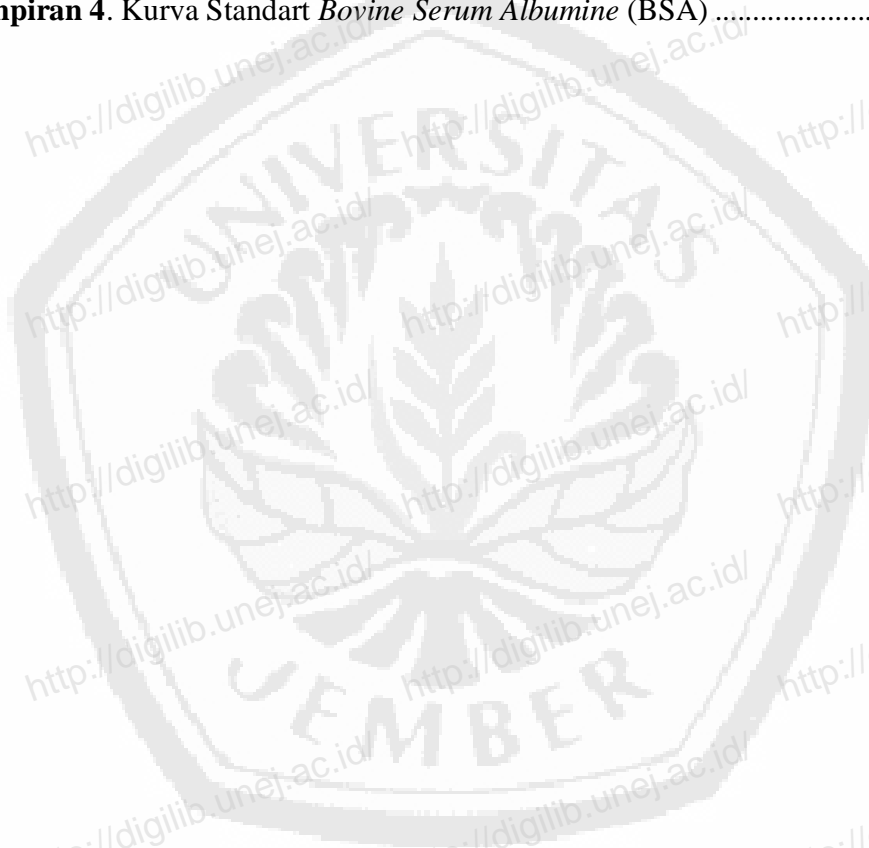
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Model skematis regulasi enzim SPS oleh protein fosforilasi dan pengaruh efektor Glc6P dan Pi.....	5
Gambar 2.2 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi dari suatu enzim.....	8
Gambar 2.3 Plot persamaan <i>Lineaweaver-Burk</i>	9
Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid pTrc99a- <i>SoSPS1</i>	10
Gambar 4.1 <i>E. coli</i> ditumbuhkan pada media LB yang mengandung ampisilin.....	18
Gambar 4.2 Hasil pemotongan DNA plasmid pTrc99a- <i>SoSPS1</i> dengan <i>HindIII</i> pada gel agarose 1 %	20
Gambar 4.3 Hasil perlakuan suhu induksi gen <i>SoSPS1</i> pada <i>E. coli</i>	21
Gambar 4.4 Purifikasi Parsial <i>Sucrose-Phosphate Synthase</i> dengan presipitasi Amonium Sulfat <i>saturation</i> 30-80 % dan Polietilen glikol 6000	22
Gambar 4.5 Analisis <i>Western Blot</i> SPS1 hasil presipitasi dengan Amonium Sulfat dengan kandungan protein 5 $\mu\text{g/lane}$ 1. Suhu induksi 22 °C 2. Suhu induksi 37 °C	23

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Data Aktivitas dan Absorbansi Pengaruh <i>uridine diphosphoglucose</i> dengan <i>Sucros-Phosphate Synthase</i> (SPS1).....	32
Lampiran 2. Data Aktivitas dan Absorbansi Pengaruh <i>fructose-6-phosphate</i> dengan <i>Sucros-Phosphate Synthase</i> (SPS1).....	32
Lampiran 3. Kurva Standart Sukrosa.....	33
Lampiran 4. Kurva Standart <i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	33



DAFTAR SINGKATAN

SoSPS1	: <i>Saccharum officinarum</i> Sucrose-Phosphate Synthase
cDNA	: <i>Complementary Deoxyribosenucleic acid</i>
TPT	: <i>Total Protein Terlarut</i>
DTT	: <i>Dithiotheritol</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	: <i>Ethyleneglycoltetraacetic acid</i>
MOPS	: <i>3 (N-Morpolino) propanol</i>
PMSF	: <i>Phenilmethilsulvinil fluoride</i>
E. C	: <i>Enzyme Commission</i>
rpm	: <i>rotation per minute</i>
IPTG	: <i>Iso Propyl Thio-β-D-Galactoside</i>
BCIP	: <i>Bromo-Chloro-Indol-Phosfate</i>
NBT	: <i>Nitroblue Tetrazolium</i>
TBS	: <i>Tris Bufer Saline</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumine</i>
PEG	: <i>Polyethylene glycol</i>
TBE	: <i>tris-borat-EDTA</i>
TE	: <i>Tris EDTA</i>
PCI	: <i>Phenol: Kloroform: Isoamil</i>
LB	: <i>Luria Bertani</i>
CaCl ₂	: <i>Calcium Chloride</i>