



**PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI ENDO- -1,4-D-XILANASE
REKOMBINAN (pET-Endo) ASAL *Bacillus* sp.**

SKRIPSI

Oleh

Ani Harfilia Hafidah

NIM 101810301002

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI ENDO- -1,4-D-XILANASE
REKOMBINAN (pET-Endo) ASAL *Bacillus* sp.**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1) dan mencapai gelar sarjana sains

Oleh

Ani Harfilia Hafidah

NIM 101810301002

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Titin Eliya, Ayahanda Hartono dan Adinda Dwi Ichsan Firdaus, serta semua keluarga terima kasih atas doa, motivasi, perhatian dan kasih sayang yang tiada henti tercurahkan;
2. Guru-guru di TK Candijati, SDN Arjasa 2, SMPN 1 Arjasa, dan SMAN 2 Jember serta dosen-dosen di jurusan kimia FMIPA UNEJ yang telah memberikan ilmu, mendidik, dan membimbing dengan penuh kesabaran;
3. Almamater tercinta Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Barang siapa yang menghendaki kehidupan dunia maka wajib baginya memiliki ilmu, dan barang siapa yang menghendaki kehidupan akhirat, maka wajib baginya memiliki ilmu, dan barang siapa menghendaki keduanya maka wajib baginya memiliki ilmu (HR. Turmudzi).^{*)}

Banyak kegagalan dalam hidup ini dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah.^{**)}

Kebanggaan kita yang terbesar adalah bukan tidak pernah gagal, tetapi bangkit kembali setiap kali kita jatuh.^{**)}

^{*)} Bahreisj, S. 1977. Tarjamah Riadhus Shalihin II Cetakan ke-3. Bandung: PT. Al-Ma'arif

^{**)} Tersingelisasi. 2015. *Motto Hidup*, [kumpulan motto untuk skripsi, Tesis, desertasi]. [http://MottoHidup](http://MottoHidup.com), [kumpullan motto untuk skripsi, Tesis, desertasi] _ R-82.htm. 19 Januari 2015

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Ani Harfilia Hafidah

NIM : 101810301002

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pemurnian dan Karakterisasi Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan (pET-Endo) asal *Bacillus* sp.” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya 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 sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Januari 2015

Yang menyatakan,

Ani Harfilia Hafidah

101810301002

SKRIPSI

PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI ENDO- -1,4-D-XILANASE REKOMBINAN (pET-Endo) ASAL *Bacillus* sp.

Oleh

Ani Harfilia Hafidah

NIM 101810301002

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : drh. Wuryanti Handayani, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pemurnian dan Karakterisasi Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan (pET-Endo) asal *Bacillus* sp.” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Tim Penguji;

Ketua (DPU),

Sekretaris (DPA),

Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si., M.Si

drh. Wuryanti Handayani, S.Si., M.Si

NIP. 197012251997022001

NIP. 196008221985032002

Penguji I,

Penguji II,

Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si

I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si

NIP. 197104301998031003

NIP. 197105011998021002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember

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

NIP. 196101081986021001

RINGKASAN

Pemurnian dan Karakterisasi Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan (pET-Endo) asal *Bacillus* sp.: Ani Harfilia Hafidah, 101810301002; 2015; 56 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan adalah enzim intraseluler yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan sedikit xilosa. Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan dalam penelitian ini diperoleh dari pET-Endo dalam *Escherichia coli* BL21 DE3 dengan gen asal dari *Bacillus* sp. yang diisolasi dari sistem abdomen rayap tanah. Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan dapat diaplikasikan dalam industri makanan, misalnya dalam industri gula digunakan untuk menghidrolisis xilan menjadi gula xilosa yang dapat dikonsumsi oleh penderita diabetes. Industri non makanan, seperti industri kertas memanfaatkan endo- -1,4-D-xilanase rekombinan untuk menghilangkan hemiselulosa dalam proses *bleaching* sehingga mengurangi penggunaan klorin atau klorin dioksida pada proses *bleaching* tersebut.

Penggunaan endo- -1,4-D-xilanase rekombinan dalam bidang industri makanan dan non makanan membutuhkan endo- -1,4-D-xilanase rekombinan dalam jumlah banyak, murni dan memiliki karakteristik spesifik. Pemurnian endo- -1,4-D-xilanase rekombinan dalam penelitian ini dilakukan secara kromatografi afinitas dengan resin Ni-NTA. Karakterisasi yang dilakukan meliputi pH dan suhu optimum, stabilitas pH dan suhu serta pengaruh kation logam (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} dan Fe^{3+}) terhadap aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat kemurnian endo- -1,4-D-xilanase rekombinan dengan berat molekul 30 kDa secara kromatografi afinitas dengan resin Ni-NTA ialah 10 kali lebih murni dari ekstrak kasar endo- -1,4-D-xilanase rekombinan. Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan pada penelitian ini

memiliki pH optimum 4.6 dan suhu optimum 40°C. Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan paling stabil pada pH 4 hingga waktu pre-inkubasi 120 menit dengan aktivitas relatifnya sebesar 83% dan stabil pada suhu 30 - 40°C selama waktu pre-inkubasi 80 menit dengan aktivitas relatif lebih dari 50%. Penambahan senyawa kimia yang mengandung K⁺ dan Na⁺ dapat meningkatkan aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan, sedangkan penambahan Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ dan Fe³⁺ menurunkan aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pemurnian dan Karakterisasi Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan (pET-Endo) asal *Bacillus* sp.”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si, selaku Dosen Pembimbing Utama, dan drh. Wuryanti, M.Si, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
4. Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si, selaku Dosen Penguji I dan I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si, selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktunya guna menguji, serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Ir. Neran, M.Kes dan Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. bapak dan ibu dosen-dosen FMIPA UNEJ, dan dosen-dosen Jurusan Kimia khususnya yang telah banyak memberikan ilmu dan pengetahuan;

7. Prof. Tri Agus Siswoyo dan Prof. Bambang Sugiharto, terima kasih atas bantuan, semangat dan telah menerima penulis untuk melaksanakan penelitian di laboratorium *Centre for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember;
8. teman-teman angkatan 2010, terima kasih atas semangat, bantuan, saran, perhatian, dan kenangan yang telah diberikan;
9. Aswi Susanto, Putri Zakiah Bellaninda, Yeni Patmawati, Eva Majidah Nugrahani, S.Si dan Sarnam, terima kasih atas doa, dorongan, semangat dan perhatian yang diberikan selama ini;
10. teman-teman seperjuangan *xylanase group*, Eka Yuni Kurniawati, Andika Ade Kurniawan, S.Si, dan Luluk Masnia, S.Si, terima kasih atas saran, kerjasama dan bantuannya;
11. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Jember, Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Enzim.....	6
2.2 Plasmid pET-Endo	6
2.3 Struktur Endo- -1,4-D-xilanase.....	10
2.4 Mekanisme Hidrolisis Xilan oleh Endo- -1,4-D-xilanase....	12
2.5 Karakterisasi Endo- -1,4-D-xilanase	13
2.6 Kromatografi Afinitas dengan Resin Ni-NTA.....	16

2.6.1 Tag Afinitas.....	18
2.6.2 Resin Ni-NTA	18
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	20
3.2 Alat Penelitian	20
3.3 Bahan Penelitian.....	21
3.4 Diagram Alir Penelitian.....	22
3.5 Prosedur Kerja	23
3.5.1 Produksi Protein Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan	23
3.5.2 Pemurnian Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan secara Kromatografi Afinitas dengan Resin Ni-NTA.....	24
3.5.3 Penentuan Berat Molekul Relatif Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan dengan SDS-PAGE.....	24
3.5.4 Penentuan Kadar Protein Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan	26
3.5.5 Penentuan Aktivitas Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	26
3.5.6 Karakterisasi Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Ekstrak Kasar Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	29
4.1.1 Kadar Protein dan Aktivitas Ekstrak Kasar Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	32
4.2 Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan Hasil Pemurnian Kromatografi Afinitas dengan Resin Ni-NTA.....	34
4.3 Karakteristik Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan	36
4.3.1 pH Optimum Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	36
4.3.2 Suhu Optimum Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan	38
4.3.3 Stabilitas pH Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan	39
4.3.4 Stabilitas Suhu Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	40
4.3.5 Aktivitas Relati Endo- -1,4-D-xilanase rekombinan terhadap Keberadaan Kation Logam (K^+ , Na^+ , Mg^{2+})	

Cu ²⁺ , Zn ²⁺ dan Fe ³⁺)	41
BAB 5. PENUTUP	43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Matrik dan kondisi elusi pada tag afinitas.....	18
4.1 Aktivitas spesifik ekstrak kasar endo- -1,4-D-xilanase rekombinan ...	33
4.2 Data aktivitas hasil pemurnian endo- -1,4-D-xilanase rekombinan	35

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Peta plasmid pET-30a(+)	8
2.2 Sisi penyisipan gen endo- -1,4-D-xilanase pada pET-30a(+)	9
2.3 Lipatan - <i>jelly roll</i>	11
2.4 Struktur arabinosilan dari rumput.....	12
2.5 Mekanisme reaksi hidrolisis xilan oleh endo- -1,4-D-xilanase.....	13
2.6 Karakterisasi suhu, pH dan logam pada endo- -1,4-D-xilanase.....	16
2.7 Tahap purifikasi menggunakan kromatografi afinitas	17
2.8 Pengikatan tag polihistidin pada Ni-NTA.....	19
4.1 Elektroforegram SDS-PAGE ekstrak kasar endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	31
4.2 Elektroforegram SDS-PAGE endo- -1,4-D-xilanase rekombinan. C= Ekstrak kasar enzim, FT = <i>Flow Through</i> dan F ₃₀ , F ₆₀ , F ₁₀₀ , F ₃₀₀ , F ₅₀₀ = Fraksi elusi dengan konsentrasi imidazol masing - masing 30, 60, 100, 300 dan 500 mM	34
4.3 Ionisasi asam glutamat pada berbagai pH	36
4.4 Efek pH terhadap aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	36
4.5 Efek suhu terhadap aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan	38
4.6 Efek stabilitas pH terhadap aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	39
4.7 Efek stabilitas suhu terhadap aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	40
4.8 Efek senyawa kimia terhadap aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Isolat hasil transformasi pET-endo dalam <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	49
B. Kurva Standar.....	49
B.1 Kurva Standar BSA	49
B.2 Kurva Standar Xilosa.....	50
C. Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat optimasi pH.....	51
D. Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat optimasi suhu	52
E. Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas suhu.....	52
E.1 Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas suhu 30°C.....	52
E.2 Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas suhu 40°C.....	53
E.3 Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas suhu 50°C.....	53
E.4 Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas suhu 60°C.....	54
F. Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas pH..	54
F.1 Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas pH 3.....	54
F.2 Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas pH 4.....	55
F.3 Aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni saat stabilitas pH 5.....	55

G. Efek senyawa kimia terhadap aktivitas endo- -1,4-D-xilanase rekombinan murni	56
H. Persiapan Media, Reagen dan Bufer	57
H.1 Pembuatan Media Luria Bertani (LB) Padat	57
H.2 Pembuatan Media Inokulum	57
H.3 Pembuatan Reagen Miller	57
H.4 Pembuatan Reagen Bradford	57
H.5 Pembuatan Bufer Fosfat – Sitrat	58
H.6 Pembuatan Bufer Fosfat	58