



**TRANSFORMASI DAN EKSPRESI pET-ENDO- β -1,4-XILANASE
DALAM *Escherichia coli* BL21**

SKRIPSI

Oleh :

**Eka Yuni Kurniawati
NIM 101810301003**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**TRANSFORMASI DAN EKSPRESI pET-ENDO- β -1,4-XILANASE
DALAM *Escherichia coli* BL21**

SKRIPSI

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

Oleh :

**Eka Yuni Kurniawati
NIM 101810301003**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Fatmawati dan ayahanda Mu'i Rianto.
2. Dosen pembimbing Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si dan Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si.
3. Guru-guruku sejak sekolah dasar sampai perguruan tinggi.
4. Almamater Fakultas MIPA Universitas Jember.

MOTTO

Belajarlal untuk tenang dan sabar dalam meraih ilmu.*)

Tegarlal dan akhiri yang kau mulai.**)

*) Umar bin khatab

***) Ball, W. (Director). 2014. *The maze Runner* [Film]. USA: Gotham Group/
Temple Hill Production.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eka Yuni Kurniawati

NIM : 101810301003

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa tugas akhir (skripsi) yang berjudul “*Transformasi dan ekspresi pET-endo- β -1,4-xilanase dalam Escherichia coli BL21*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2015

Yang menyatakan,

Eka Yuni Kurniawati

NIM 101810301003

SKRIPSI

**TRANSFORMASI DAN EKSPRESI pET-ENDO- β -1,4-XILANASE
DALAM *Escherichia coli* BL21**

Oleh

Eka Yuni Kurniawati
NIM 101810301003

Pembimbing

Dosen pembimbing utama : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si

Dosen pembimbing anggota : Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “*Transformasi dan Ekspresi pET-endo- β -1,4-xilanase dalam Escherichia coli BL21*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua (DPU)

Sekretaris (DPA)

Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si, M.Si.
NIP 197012251997022001

Agung Budi Santoso, S.Si, M.Si.
NIP 197104301998031003

Penguji I

Penguji II

drh. Hj. Wuryanti Handayani, M.Si.
NIP 196008221985032002

Ika Oktavianawati, S.Si, M.Sc.
NIP 198010012003122001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

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

Eka Yuni Kurniawati

Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Jember

ABSTRAK

Endo- β -1,4-xilanase adalah enzim yang menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa. Gen endo- β -1,4-xilanase asal *Bacillus sp.* dalam abdominal rayap tanah dikloning menggunakan pET-30a(+) sehingga diperoleh pET-Endo- β -1,4-xilanase. pET-Endo- β -1,4-xilanase dikloning dalam *E. coli* TOP10. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh Endo- β -1,4-xilanase rekombinan melalui transformasi dan ekspresi pET-Endo- β -1,4-xilanase dalam *E. coli* BL21. pET-Endo- β -1,4-xilanase berhasil diisolasi dari *E. coli* TOP10 dan ditransformasi ke *E. coli* BL21. Ukuran plasmid rekombinan tersebut adalah 6022 bp. Keberhasilan transformasi diuji menggunakan uji resistensi antibiotik. *E. coli* BL21 yang mengandung pET-Endo- β -1,4-xilanase mampu bertahan hidup pada media yang mengandung kanamisin. Ekspresi gen dilakukan dengan penambahan IPTG dengan konsentrasi akhir 0,5 mM pada saat bakteri memasuki fase log. Ekstrak kasar endo- β -1,4-xilanase rekombinan memiliki aktivitas spesifik 0,762 U/mg. Elektroforegram dan zimogram menunjukkan ukuran enzim tersebut adalah 30 kDa.

Kata kunci: *E. coli* BL21, ekspresi, endo- β -1,4-xilanase, transformasi.

RINGKASAN

Transformasi dan Ekspresi pET-endo- β -1,4-xilanase dalam *Escherichia coli* BL21; Eka Yuni Kurniawati, 101810301003; 2014: 46 halaman; Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

Isolasi pET-Endo dari *E. coli* TOP10 dilakukan dengan metode alkali lisis (Sambrook *et al.*, 1989). Alkali lisis merupakan metode isolasi DNA plasmid dimana proses pemecahan membran sel bakteri menggunakan SDS (*Sodium Dodosil Sulfat*) dalam suasana basa. Elektroforegram menunjukkan pET-Endo berhasil diisolasi dengan ukuran 6022 bp.

pET-Endo yang telah berhasil diisolasi kemudian ditransformasikan dalam sel kompeten *E. coli* BL21. Metode transformasi yang digunakan adalah *heat shock*. Keberhasilan transformasi dapat diketahui menggunakan uji resistensi antibiotik. Antibiotik yang digunakan adalah kanamisin karena pET-Endo mengandung gen yang resisten terhadap kanamisin. Hasil uji resistensi antibiotik dari transformasi pET-Endo menunjukkan terdapat koloni transforman *E. coli* BL21 yang tumbuh pada media padat yang mengandung kanamisin. Hasil uji resistensi antibiotik dari kontrol menunjukkan bahwa *E. coli* BL21 tidak tumbuh pada media padat yang mengandung kanamisin dan tumbuh pada media padat yang tidak mengandung kanamisin. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat dinyatakan transformasi pET-Endo ke *E. coli* BL21 berhasil.

Kurva pertumbuhan transforman *E. coli* BL21 menunjukkan Fase log berlangsung pada 2 sampai 4 jam setelah inkubasi. *E. coli* BL21 mengalami pertumbuhan secara cepat pada fase log. Ketika bakteri berada pada fase inilah waktu yang tepat untuk menambahkan IPTG untuk ekspresi gen dan menghasilkan protein. Protein endo- β -1,4-xilanase rekombinan telah berhasil diekspresikan dengan berat molekul sekitar 30 kDa dan aktivitas spesifik sebesar 0,762 U/mg.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan judul “Transformasi dan Ekspresi pET-endo- β -1,4-xilanase dalam *Escherichia coli* BL21”. Skripsi ini disusun guna menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Kimia Fakultas MIPA.

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 MIPA Universitas Jember dan Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si, selaku ketua jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember sekaligus Dosen Pembimbing Akademik penulis.
2. Dr. A. A. I. Ratnadewi, S.Si., M.Si dan Agung Budi Santoso, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak membantu penulis menyelesaikan skripsi/tugas akhir.
3. drh. Wuryanti Handayani, M.Si dan Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan banyak kritik dan saran untuk menyempurnakan skripsi/tugas akhir ini.
4. Prof. Bambang Sugiharto selaku ketua CDAST dan Prof. Tri Agus Siswoyo selaku ketua divisi Nutraceutical.
5. Orang tua, ibunda Fatmawati dan Ayahanda Mu’i Rianto yang selalu memberi semangat dan dukungan baik secara moril maupun materiil, serta pengorbanannya selama membesarkan dan membimbing saya selama ini.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca.

Penulis

Jember, 2 Februari 2015

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
PERSEMBAHAN	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN	iv
PEMBIMBINGAN	v
PENGESAHAN	vi
ABSTRAK	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Plasmid pET30a(+)	5
2.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	7
2.3 Transformasi	8
2.4 Ekspresi Endo-1,4-β-xilanase Rekombinan	9
2.5 Endo-1,4-β-xilanase	13
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17

3.2	Alat Penelitian.....	17
3.3	Bahan Penelitian.....	18
3.4	Diagram Alir Penelitian.....	19
3.5	Prosedur Penelitian	20
3.5.1	Isolasi pET-Endo dari <i>E. coli</i> TOP10.....	20
3.5.2	Analisa pET-Endo menggunakan elektroforesis gel agarosa	21
3.5.3	Preparasi sel kompeten <i>E. coli</i> BL21 menggunakan CaCl ₂	21
3.5.4	Transformasi pET-Endo ke <i>E. coli</i> BL21	22
3.5.5	Pembuatan kurva pertumbuhan Transforman <i>E. coli</i> BL21	22
3.5.6	Ekspresi dan Isolasi Endo- β -1,4-Xilanase Rekombinan.....	22
3.5.7	Penentuan Kurva Standar Xilosa.....	23
3.5.8	Penentuan Aktivitas Enzim	24
3.5.9	Pembuatan Kurva Standar BSA	24
3.5.10	Penentuan Kadar Protein	25
3.5.11	Analisis <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide</i> <i>Gel Electrophoresis</i> (SDS-PAGE) dan Zimograf	26
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1	pET-Endo dari <i>E. coli</i> TOP10.....	29
4.2	Transforman <i>E. coli</i> BL21.....	32
4.3	Profil Kurva Pertumbuhan Transforman <i>E. coli</i> BL21.....	35
4.4	Protein Endo-β-1,4-xilanase Rekombinan.....	36
4.5	Aktivitas spesifik Endo-β-1,4-xilanase Rekombinan	39

BAB 5. PENUTUP	41
5.1 Kesimpulan.....	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Peta Plasmid pET-30a(+)	6
2.2 Morfologi <i>E. coli</i>	7
2.3 Pengikatan dan Pengambilan DNA oleh Sel Bakteri yang Kompeten	9
2.4 Model operon Jacob-Monod	11
2.5 Pengaruh penambahan IPTG terhadap ekspresi gen	12
2.6 Struktur allolaktosa dan IPTG	13
2.7 Enzim xilanolitik	14
2.8 Struktur Endo- β -1,4xilanase Asal <i>Bacillus circulans</i>	15
2.9 Mekanisme Reaksi Hidrolisis Xilan oleh Endo- β -1,4-xilanase secara <i>Retaining</i>	16
4.1 Elektroforegram isolasi pET-Endo	32
4.2 Hasil transformasi (Transforman <i>E. coli</i> BL21)	34
4.3 Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> BL21	35
4.4 Regulasi ekspresi gen	36
4.5 Elektroforegram dan zimogram endo- β -1,4-xilanase	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Pembuatan Reagen.....	47
2. Kurva Larutan Standar Xilosa dan BSA.....	53
3. Hasil Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim.....	55
4. Data <i>Optical Density</i> (OD) <i>E. Coli</i> BL21 Per Jam.....	56
5. Hasil Uji Resistensi Antibiotik	56