

MYTHYLAMINES

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KK
KKA
TKD. 19 / 11
Pur
P

TESIS

PENINGKATAN STABILITAS – ALKALI ENZIM β -XILOSIDASE MELALUI METODA *SITE DIRECTED MUTAGENESIS* TERHADAP GEN pET_{xyl2}



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**NI MADE DWI PURWADI
090710004M**

**DEPARTEMEN BOKIMIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**PENINGKATAN STABILITAS – ALKALI ENZIM β -XILOSIDASE
MELALUI METODA *SITE DIRECTED MUTAGENESIS*
TERHADAP GEN pETxyl2**

TESIS
Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh:

NI MADE DWI PURWADI
090710004M

DEPARTEMEN BOKIMIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DIUJI
PADA TANGGAL 22 FEBRUARI 2010

Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. Retno Handajani, dr.,MS.,Ph.D
NIP. 130541984

Pembimbing



Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr. MS
NIP. 130532940

Mengetahui/menyetujui :
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar



Prof. Retno Handajani, dr.,MS.,Ph.D
NIP. 130541984

Telah diuji pada
Tanggal 22 Februari 2010

Panitia Penguji,

1. Prof.Dr. Suhartati, dr. MS
2. Prof. Retno Handajani, dr. MS. Ph.D
3. Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr. MS
4. Tri Martini, dr. Sp. BK
5. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr. MS. SPMK
6. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji syukur yang tiada terhingga ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Tesis ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, dan saran dari pembimbing, karena itu dengan segala kerendahan hati perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

Prof. Retno Handajani, dr. MS. Ph.D, sebagai ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Pasacasarjana Universitas Airlangga sekaligus sebagai pembimbing ketua, yang penuh kesabaran dan meluangkan waktu untuk berdiskusi dan memberi masukan.

Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr. MS, sebagai ketua minat studi biokimia Universitas Airlangga dan sekaligus sebagai pembimbing, yang telah memberikan masukan dan arahan.

Prof. Dr. Suhartati, dr. MS, sebagai ketua tim penguji tesis, yang telah mendukung dan memberikan masukan dalam penulisan tesis ini.

Tri Martini, dr. Sp. BK, sebagai anggota tim penguji tesis, yang telah mendukung dan memberikan masukan dalam penulisan tesis ini.

Dr. Eddy Bagus Wasito, dr, MS SpMK, sebagai anggota tim penguji tesis, yang telah memberikan dukungan moril, dan dorongan agar bisa cepat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, sebagai direktur pendidikan Universitas Airlangga dan juga sebagai anggota tim penguji tesis, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Kedokteran Dasar, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, dan atas segala dukungan, dan bimbingannya selama ini.

Prof. Dr. Fashicul Lisan, Apt, sebagai rektor Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan program magister Ilmu Kedokteran Dasar , Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr Harjanto JM, dr, AIF, Ketua Tim Koordinasi Pascasarjana Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam proses pelaksanaan ujian tesis.

Teman-teman seperjuangan saya, Sri Sayekti , S.Si, M.Kes, dan Dina Isfentiani, Skep, M.Kes. Ners, atas dukungan moril dan kekompakannya selama ini.

One Asmarani, S.Si, M.Si dan Anita Kurniati, S.Si, atas dukungan dan semangat yang diberikan kepada saya agar bisa cepat menyelesaikan penelitian.

I Nengah Wirajana, S.Si, M.Si, Yang telah memberikan dukungan, semangat, dan masukan kepada saya selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Wahyu Hidayatiningsih, S.Si, M.Kes, dan Heri Setio Bekti, atas dukungan dan bantuannya selama saya melakukan penelitian di laboratorium gastroenteritis, ITD, Universitas Airlangga.

Orang tua saya tercinta, ayahanda Nyoman R. Wirjana dan ibunda Ni Made Sukartini yang telah mengasuh, membimbing, mendukung, dan memberikan semangat dan kasih sayang. Kedua saudara kandung yang saya sayangi, Wayan Eka Purwati, dan Komang Sri Purtini, yang telah memberikan dukungan dan semangat. Ida Bagus Surya, ST, yang dengan kesabaran telah memberikan dukungan moril, dan semangat.

Semua saudara-saudara saya dari Sri Sri Radha Gopinatha Ashram Surabaya, Syama Prbji, Srivatsa Prbji, Sandya Prbji, Wiweka Prbj, Sankar Prbji, Angalata Mtj, Chandra Mtj, Saci Mtj, dan Nalini Mtj atas dukungan dan doanya kepada Yang Maha Berkarunia Sri Sri Gauranitai.

Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu dan memberikan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

RINGKASAN**PENINGKATAN STABILITAS - ALKALI ENZIM β -XILOSIDASE
MELALUI METODA *SITE DIRECTED MUTAGENESIS*
TERHADAP GEN pETxyI2**

Xilan adalah komponen utama dari hemiselulosa yang menyusun dinding sel tumbuhan. Enzim β -xilosidase merupakan kelompok enzim xilanolitik yang berperan mendegradasi xilan menjadi xilosa. Aplikasi enzim β -xilosidase sangat berperan dalam industri pulp dan kertas. Proses pemutihan (*bleaching*) pulp dan kertas pada umumnya dilakukan menggunakan bahan-bahan kimia contohnya klorin. Limbah yang dihasilkan dari proses tersebut sangat berbahaya bagi lingkungan karena senyawa organik yang terklorinasi bersifat toksik, mutagenik, dan terakumulasi dalam sistem biologis (Horikoshi, 1999).

Penggunaan enzim β -xilosidase dalam proses pemutihan pulp dan kertas dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai pemutih. Enzim β -xilosidase berperan membuka struktur kayu sehingga memudahkan masuknya bahan pemutih, dengan demikian penggunaan bahan kimia sebagai pemutih dapat dikurangi jumlahnya. Proses pemutihan pulp dan kertas berlangsung pada pH alkali sehingga enzim yang digunakan harus stabil pada kondisi alkali.

Enzim β -xilosidase pETXyI2 memiliki aktivitas optimum pada pH 6 dan kestabilan pada pH 5-7. (Puspaningsih, 2003) Untuk bisa

diaplikasikan dalam industri pulp dan kertas, enzim tersebut harus memiliki stabilitas terhadap pH > 8. *Site-directed mutagenesis* atau mutasi terarah merupakan teknik untuk mengubah nukleotida tertentu pada suatu gen secara *in vitro*. Perubahan yang dilakukan tersebut bertujuan untuk memperoleh ekspresi protein yang diinginkan (Dably, 2003). Gen penyandi β -xilosidase pETxyl2 telah berhasil disekuensing. Target mutasi dipilih berdasarkan homologi sekuen β -xilosidase pETxyl2 dengan β -xilosidase yang lain yang tahan alkali dari *Protein Data Bank* (PDB).

Asam amino yang potensial dimutasi adalah pada posisi 88, 121, 132, dan 139. Pada penelitian ini dipilih asam amino nomor 121 dan 139, masing-masing mutasi dilakukan pada plasmid terpisah.

pETxyl2 yang digunakan sebagai cetakan pada penelitian ini diisolasi DNA plasmidnya dengan menggunakan Kit dari *Qiagen*. Hasil isolasi dicek dengan pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRV*. Posisi pemotongan enzim *EcoRV* terletak pada nukleotida 545 dan 4775 sehingga didapatkan dua pita dengan ukuran 4230 bp dan 3059 bp.

Site directed mutagenesis dilakukan dengan PCR menggunakan primer mutagenik. Mutasi pada posisi D121N menggunakan urutan primer forward: D121N: 5'-GGATTGATGGATGGGGAGGCATTAATCC-3' dan untuk reverse: iD121N: 5'-GGATTAATGCCTCCCCA-TCCATCAATCC-3'. Mutasi pada posisi D139N menggunakan primer forward: D139N: 5'-CCGGGACAAATAAATAA-TGCTAGGGGTG-3' dan primer reverse : iD139N: 5'-CACCC-CTAGCATTATIATTTGTCCCGG-3'.

Hasil PCR-*site directed mutagenesis* yang berupa plasmid sirkular, dipotong dengan enzim restriksi *DpnI* untuk memotong DNA cetakan, selanjutnya dimurnikan menggunakan Kit dari *Qiagen*. Hasil PCR yang sudah dimurnikan ditransformasi ke dalam sel inang *E.coli* Top 10. Dari koloni bakteri diisolasi DNA plasmid hasil transformasi yang tumbuh pada media LB agar yang mengandung ampicillin selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi *EcoRV*. Dari 10 koloni yang diisolasi dan direstriksi, untuk mutasi pada D121N terdapat 6 koloni yang menghasilkan ukuran pita yang benar setelah direstriksi dengan enzim *EcoRV* yaitu pada urutan 1, 2, 3, 6, 7, dan 10. Untuk mutasi pada D139N terdapat 8 koloni yang menghasilkan 2 pita dengan ukuran yang sesuai setelah direstriksi dengan enzim *EcoRV* yaitu pada urutan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8.

Koloni dari masing –masing mutasi pada D121N dan D139N yang sesuai hasil restriksinya dipilih salah satu untuk disekuensing menggunakan *primer T7 forward*: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3', dan *reverse*: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'. Hasil sekuensing untuk *primer* dan *reverse* digabung sehingga diperoleh sekuen yang utuh. *Alignment* sekuen hasil mutasi pada posisi asam amino 121 dengan *wild type* menunjukkan tidak terdapat mutasi asam amino pada urutan 121, sedangkan pada posisi 139 terjadi mutasi asam amino sehingga asam amino yang disandikan berubah dari asam aspartat menjadi asparagin.

Eksresi dari plasmid mutan pETxyl2 (D139N) diketahui setelah DNA plasmid mutan ditransformasi ke sel inang *E.coli* BL21 *Star*. Enzim

β -xilosidase yang diekspresikan oleh mutan pETxyl (D139N) menunjukkan aktivitas optimum pada pH 7 sedangkan enzim β -xilosidase dari *wild type* memiliki pH optimum 6 (Puspaningsih,2003) . Hasil penelitian stabilitas enzim menunjukkan enzim β -xilosidase yang diekspresikan oleh mutan pETxyl (D139N) memiliki stabilitas pada pH 6-8.

Untuk dapat diaplikasikan pada di industri pulp dan kertas masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan mutasi pada posisi yang berbeda, agar dapat lebih meningkatkan stabilitas enzim terhadap alkali.

SUMMARY**IMPROVING THE ALKALISTABILITY OF β -XYLOSIDASE pETxyl2 BY
SITE DIRECTED MUTAGENESIS ON pETxyl2 GENE**

Xylan is the main component of hemicelluloses that composed the plant cell wall. β -xylosidase is xylanolytic enzymes group that degrades xylan into xylose. β -xylosidase application has important role in pulp and paper industry. Bleaching process of pulp and paper usually use chemical stuff for example chlorine. Organochlorine waste that is produced by that process is very dangerous for the environment because it has characteristic of toxic, mutagenic, and accumulated in biologic system (Horikoshi, 1999).

The application of β -xylosidase in pulp and paper industry bleaching process can reduce the using of chemical stuff as bleacher. β -xylosidase react to open wood structure, so the insertion of bleaching agent become easier. Bleaching of pulp and paper is done at alkaline condition, hence requiring enzyme to be operationally stable under such condition.

β -xylosidase from pETxyl2 has optimum pH at 6 for its activity, and stable at pH range 5-7 (Puspaningsih, 2003). For application in pulp and paper industry should be stable at pH>8. Site directed mutagenesis is a method to change certain nucleotide in a gene by in vitro. The purpose is to reach the expected protein expression (Dably, 2003). Encoding gene β -xylosidase from pETxyl2 has been succesfully sequenced. Mutation target site were selected by structural alignment between β -xylosidase

from pETxyl2 and other β -xylosidase having high alkalistability in Protein Data Bank (PDB).

In this research, amino acid at position 88, 121, 132, and 139, are potential amino acid to be mutated, but we choose only two mutation at position 121 and 139 and done in separate plasmid.

The template plasmid DNA from pETxyl2 were isolated using kit (Qiagen). The result was checked by cutting with *EcoRV* restriction enzyme. The restriction site were at the position 545 and 4775, so that two band sizing 4230 bp and 3059 bp were obtained. Site directed mutagenesis was done by using PCR (Polymerase Chain Reaction). The sequence of mutagenic primer for amplification at position 121 are: forward D121N: 5'-GGATTGATGGATGGGGAGGCATTATCC-3', reverse iD121N 5'-GGATTATGCCTC- CCCATCCATCAATCC-3'. Mutation at position 139 using primer forward: D139N: 5'-CCGGGAC-AAATAAAATGCTAGGGGTG-3', reverse : iD139N: 5'-CACCCCTAGC-ATTATTATTTGTCCCGG-3'.

PCR-site directed mutagenesis products were in sirkular plasmid form. The template DNA then were degraded using *DpnI* restriction enzyme. The PCR product was purified using Qiagen kit. The pure PCR product was transformed into *E.coli* Top 10 host cell. The plasmid DNA from transforman growth on LB agar medium that contain ampicillin were isolated and then was cut using *EcoRV* restriction enzyme. Among ten colonies for substitution at D121N, the colonie number 1, 2, 3, 6, and 7

showed the correct size and, the colonie number 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 showed the correct size for substitution at D139N.

One of that transforman was sequenced using T7 primer forward 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3' and reverse 5'-TAATACGACTC-ACTATAGGG-3'. Sequencing result for forward and reverse primer for each mutation were merged and we obtained the whole sequence. Alignment result between the wild type sequence with mutation D121N showed there is no mutation amino acid at position 121, but at position 139 was found the mutation, therefore aspartic residue replace with asparagin.

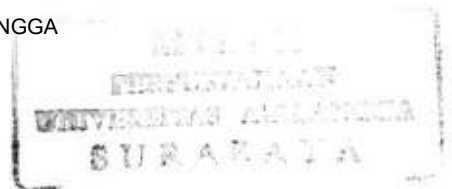
Mutan plasmid pETxyl2 (D139N) could be expressed in *E.coli* BL21 Star. β - xylosidase expressed by mutan plasmid pETxyl2 (D139N) showed optimum pH at 7 for its activity, while the wild type having optimum pH at 6 (Puspaningsih, 2003). The pH stability showed by the mutan at pH range 6-8.

For application in pulp and paper industry, mutation at another site might be effective in improvement of enzyme alkalistability.

ABSTRACT**IMPROVING THE ALKALISTABILITY OF β -XYLOSIDASE pETxyl2
BY SITE DIRECTED MUTAGENESIS**

Improving the alkalistability of β -xylosidase from pETxyl2 is of important for pulp and paper industrial application. The wild type of this enzyme has optimum pH at 6 for its activity, and the activity of this enzyme is stable at pH range 5-7. Improving the alkalistability of β -xylosidase from pETxyl2 has been done by site directed mutagenesis. Target mutation sites were selected by multiple alignment between β -xylosidase from pETxyl2 and other β -xylosidase having high alkalistability from Protein Data Bank (PDB) and the substitutions D121N and D139N were selected for mutation. The substitution of D139N was obtained from this study, but there is no mutation amino acid at position 121. The D139N mutation raised the optimum pH from 6 to 7, and pH stability reached at pH range 6-8. Mutation at another site might be effective in improvement of enzyme alkalistability.

Keyword: alkalistability, β -xylosidase, site directed mutagenesis, pETxyl2



DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	vi
Penetapan Panitia.....	ix
Ucapan Terima Kasih	xii
Ringkasan	xiii
<i>Summary</i>	xvi
DAFTAR ISI	
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
DAFTAR SINGKATAN	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Hemiselulosa.....	7
2.2 Enzim	11
2.2.1 Enzim β -xilosidase	14
2.3 Mutasi Gen	15
2.4 <i>PCR- site directed mutagenesis</i>	17
2.4.1 PCR	17
2.4.2 <i>Site directed mutagenesis</i>	20
2.5 Stabilitas Terhadap Alkali dari Suatu Enzim.....	24
2.6 Plasmid	24
2.7 Plasmid pET101/DTOPO.....	27
2.8 Transformasi	28
2.9 Endonuklease Restriksi <i>DpnI</i>	30
2.10 Sekuensing	32
2.11 <i>Alignment</i> urutan asam amino β -xilosidase pETxyl2 dengan β -xilosidase <i>Protein Data Bank</i> (PDB)	34
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	36
BAB 4 METODA PENELITIAN	39
4.1 Rancangan Penelitian	39
4.2 Sampel Penelitian	39
4.3 Bahan Penelitian	39
4.3.1 Reagen Penelitian	39
4.3.1.1 Isolasi DNA plasmid pETxyl2	39
4.3.1.2 <i>PCR-site directed mutagenesis</i>	39

4.3.1.3	Elektroforesis gel agarosa	40
4.3.1.4	Transformasi	40
4.3.1.5	<i>Culture transforman</i>	40
4.3.1.6	Isolasi DNA plasmid	40
4.3.1.7	Sekuensing	40
4.3.1.8	Isolasi enzim β -xilosidase	41
4.3.1.9	Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase	41
4.3.1.10	Uji stabilitas terhadap alkali enzim β -xilosidase	41
4.3.2	Bahan Lain Penelitian	41
4.3.2.1	Isolasi DNA plasmid pETxyl2	41
4.3.2.2	<i>PCR-site directed mutagenesis</i>	41
4.3.2.3	Elektroforesis gel agarosa	41
4.3.2.4	Transformasi	42
4.3.2.5	<i>Culture transforman</i>	42
4.3.2.6	Isolasi DNA plasmid	42
4.3.2.7	Sekuensing	42
4.3.2.8	Isolasi enzim β -xilosidase	42
4.3.2.9	Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase	42
4.3.2.10	Uji stabilitas terhadap alkali enzim β -xilosidase	42
4.4	Instrumen Penelitian	43
4.4.1	Isolasi DNA plasmid	43
4.4.2	<i>PCR-site directed mutagenesis</i>	43
4.4.3	Elektroforesis gel agarosa	43
4.4.4	Transformasi	43
4.4.5	<i>Culture transforman</i>	43
4.4.6	Sekuensing	43
4.4.7	Isolasi enzim β -xilosidase	43
4.4.8	Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase	44
4.4.9	Uji stabilitas terhadap alkali enzim β -xilosidase	44
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian	44
4.5.1	Lokasi penelitian	44
4.5.2	Waktu penelitian	44
4.6	Persiapan Penelitian	44
4.6.1	Isolasi DNA plasmid pETxyl2	44
4.6.1.1	Pembuatan media inokulum	44
4.6.2	<i>PCR-site directed mutagenesis</i>	45
4.6.3	Elektroforesis gel agarosa	45
4.6.3.1	Pembuatan buffer TBE 10X pH 8	45
4.6.3.2	Pembuatan buffer TBE 0,5X pH8	45
4.6.3.3	Pembuatan gel agarosa	45
4.6.4	Transformasi	45
4.6.4.1	Pembuatan media LB(Luria bertani)	45
4.6.4.2	Pembuatan media padat	46
4.6.4.3	Pembuatan sel kompeten	46
4.6.5	Isolasi DNA plasmid	46
4.6.6	Sekuensing	47
4.6.7	Isolasi enzim β -xilosidase	47
4.6.7.1	Pembuatan media produksi	47

4.6.8	Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase	47
4.6.8.1	Pembuatan buffer fosfat sitrat	47
4.6.8.2	Pembuatan buffer fosfat	48
4.6.8.3	Pembuatan buffer glisin-NaOH	48
4.6.8.4	Pembuatan larutan substrat pNP-xilopiranosida	48
4.7	Pelaksanaan Penelitian	49
4.7.1	Isolasi DNA plasmid pETxyl2	49
4.7.2	PCR-site directed mutagenesis.....	50
4.7.3	Transformasi ke sel kompeten <i>E.coli</i>	51
4.7.4	Isolasi DNA plasmid dari <i>E.coli</i> Top 10.....	52
4.7.5	Sekuensing	53
4.7.5.1	Labeling dengan proses PCR	53
4.7.5.2	Pemurnian hasil PCR labeling	53
4.7.5.3	Elektroforesis dengan mesin <i>sekuenser</i>	54
4.7.6	Transformasi plasmid mutan pETxyl2 ke <i>E.coli</i> BL21 <i>Star</i>	54
4.7.7	Isolasi enzim β -xilosidase	55
4.7.8	Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase.....	56
4.7.9	Uji stabilitas terhadap alkali enzim β -xilosidase	56
4.8	Kerangka Operasional Penelitian	58
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	59
5.1	Isolasi DNA Plasmid pETxyl2	59
5.2	PCR-Site Directed Mutagenesis	60
5.3	Transformasi Ke <i>E.coli</i> Top 10	61
5.4	Isolasi DNA Plasmid	62
5.5	Sekuensing.....	63
5.6	Transformasi Plasmid Mutan pETxyl2 Ke <i>E.coli</i> BL21 <i>Star</i>	64
5.7	Pengukuran pH Optimum Enzim β -xilosidase	64
5.8	Uji Stabilitas Terhadap Alkali Enzim β -xilosidase	65
BAB 6	PEMBAHASAN	67
6.1	Isolasi DNA Plasmid pETxyl2	67
6.2	PCR-Site Directed Mutagenesis	68
6.3	Transformasi Ke <i>E.coli</i> Top 10	71
6.4	Sekuensing Plasmid pETxyl2 (D121N dan D139N) ...	73
6.5	Transformasi Plasmid Mutan pETxyl2 (D139N) Ke <i>E.coli</i> BL21 <i>Star</i>	73
6.6	Pengukuran pH Optimum Enzim β -xilosidase	75
6.7	Uji Stabilitas Terhadap Alkali Enzim β -xilosidase dari Mutan pETxyl2 (D139N)	75
BAB 7	PENUTUP	77
7.1	Kesimpulan	77
7.2	Saran	77
DAFTAR PUSTAKA	70

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	Komposisi monomer (%) berbagai sumber xilan 9

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Lokasi heteroxilan sebagai salah satu penyusun dinding sel tumbuhan	8
Gambar 2.2 Struktur xilan tumbuhan.....	10
Gambar 2.3 Model <i>Lock and key</i> ikatan enzim substrat.....	13
Gambar 2.4 Model <i>induced fit</i> ikatan enzim substrat.....	13
Gambar 2.5 Mekanisme reaksi β -xilosidase dari <i>Geobacillus Stearothermophillus</i>	14
Gambar 2.6 Skema reaksi amplifikasi DNA dengan teknik PCR.....	20
Gambar 2.7 Skema <i>site directed mutagenesis</i>	23
Gambar 2.8 Peta pET101/DTOPO.....	27
Gambar 2.9 Skematis proses pemotongan enzim DpnI terhadap DNA <i>template</i> termetilasi	31
Gambar 2.10 Hasil alignment urutan asam amino β -xilosidase pETxyl2 dengan β -xilosidase PDB	35
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual penelitian.....	38
Gambar 5.1 Hasil isolasi dan restriksi pETxyl2	59
Gambar 5.2 Hasil elektroforesis produk PCR- <i>site directed mutagenesis</i>	60
Gambar 5.3 Kultur hasil transformasi produk PCR- <i>site directed mutagenesis</i> ke sel inang <i>E.coli</i> Top 10.....	61
Gambar 5.4 Hasil pemotongan DNA plasmid pETxyl2 untuk mutasi pada D121N dengan enzim <i>EcoRV</i>	62
Gambar 5.5 Hasil pemotongan DNA plasmid pETxyl2 untuk mutasi pada D139N dengan enzim <i>EcoRV</i>	63
Gambar 5.6 Hasil transformasi plasmid pETxyl2 yang mengandung mutasi D139N ke dalam sel inang <i>E.coli</i> BL21 <i>Star</i>	64
Gambar 5.7 Grafik hasil pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase dari <i>wild type</i> dan mutan pETxyl2 (D139N)	65
Gambar 5.8 Grafik aktivitas residu enzim β -xilosidase dari mutan pETxyl2 (D139N)	66
Gambar 6.1 Struktur asam aspartat dan asparagin.....	69
Gambar 6.2 Pengikatan dan pengambilan plasmid oleh sel Kompeten dengan metoda CaCl_2	71

DAFTAR LAMPIRAN

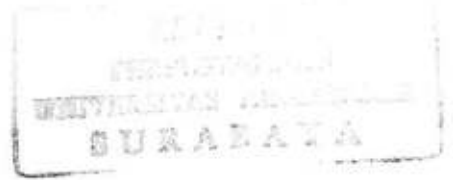
	Halaman
LAMPIRAN 1 : Metoda Isolasi DNA Plasmid	81
LAMPIRAN 2 : Metoda Pemurnian DNA Plasmid	82
LAMPIRAN 3 : Hasil <i>Alignment</i> mutasi pada D121N dengan <i>wild type</i> (xyl)	83
LAMPIRAN 4 : Hasil <i>Alignment</i> mutasi pada D139N dengan <i>wild type</i> (xyl)	85
LAMPIRAN 5 : Pembuatan kurva standar paranitrophenol	87
LAMPIRAN 6 : Data Pengukuran pH Optimum Enzim β -xilosidase mutan pETxyl2 (D139N)	89
LAMPIRAN 7 : Data Pengukuran pH Optimum Enzim β -xilosidase <i>wild Type</i> (pETxyl2)	93
LAMPIRAN 8 : Data Pengukuran stabilitas Enzim β -xilosidase mutan pETxyl2 (D139N) terhadap alkali	94

DARTAR SINGKATAN

A	: Adenin
dATP	: deoksiribo Adenin Triposfat
dCTP	: deoksiribo Cytosin Triposfat
dGTP	: deoksiribo Guanin Triposfat
dNTP	: deoksiribo Nucleotida Triposfat
dTTP	: deoksiribo Timin Triposfat
EMS	: Ethyl Methanol Sulfonat
G	: Guanin
GH	: Glycosil Hydrolase
ORI	: Origin of Replication
mRNA	: messenger Ribonucleic acid
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDB	: Protein Data Base
pNP	: para Nitro Phenol
tRNA	: transfer Ribonucleic acid
TBE	: Tris Borat EDTA
U	: Urasil

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Hemiselulosa merupakan senyawa yang paling melimpah di alam setelah selulosa. Hemiselulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tumbuhan dan banyak terdapat pada limbah pertanian (Herman *et.al.*,1997). Indonesia merupakan negara yang menghasilkan limbah industri hutan/pertanian dalam jumlah yang sangat melimpah. Pengolahan limbah ini untuk menghasilkan produk yang bermanfaat tentunya akan sangat menguntungkan dari segi ekonomi, karena limbah hemiselulosa bisa dikonversi menjadi produk yang bermanfaat seperti prebiotik, bioetanol, dan xilitol yang merupakan bahan pemanis dan banyak digunakan oleh industri (Herman *et.al.*,1997).

Komponen utama hemiselulosa adalah xilan (Herman *et.al.*,1997). Penguraian xilan merupakan proses bertahap yang melibatkan kerja sinergis sejumlah enzim xilanolitik yaitu: β -xilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, glukuronidase, dan asetil xilan esterase.

Enzim β -xilosidase merupakan kelompok enzim xilanolitik yang berperan mendegradasi xilan menjadi xilosa. Aplikasi β -xilosidase yang menarik perhatian adalah dalam industri *pulp* dan kertas, karena penggunaan enzim ini dapat mengurangi jumlah klorin dan bahan kimia lainnya yang dipakai sebagai agen pemutih (*bleaching*). Enzim β -xilosidase berperan membuka struktur kayu sehingga memudahkan masuknya agen

pemutih, dengan demikian penggunaan bahan kimia sebagai pemutih dapat dikurangi jumlahnya. Proses pemutihan *pulp* dan kertas yang menggunakan klorin dapat menghasilkan limbah yang berbahaya bagi lingkungan karena senyawa organik yang terklorinasi bersifat toksik, mutagenik, dan terakumulasi dalam sistem biologis (Horikoshi, 1999).

Sebagian besar proses degradasi hemiselulosa terutama pada industri *pulp* dan kertas dilakukan pada pH dan suhu yang tinggi, sehingga penggunaan enzim menjadi kendala karena enzim menjadi tidak aktif pada suhu dan pH tinggi. Oleh karena itu adanya enzim dengan stabilitas terhadap alkali dan suhu yang tinggi akan sangat berguna pada proses tersebut (Vieille, 2001).

Enzim xilanolitik dapat ditemukan pada berbagai macam bakteri dan jamur. Puspaningsih (2003) telah berhasil mengklon gen penyandi enzim xilanolitik dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08 ke dalam sel inang *E.coli* DH5 α , dan diperoleh satu klon positif yang diberi nama pTP510. Klon ini mampu mengekspresikan tiga macam enzim xilanolitik yaitu: β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, dan ekso-xilanase. Gen penyandi β -xilosidase telah berhasil diklonkan dari pTP510 ke sistem pET101/DTOPO dalam inang *E.coli* BL21 (DE3 star) dan disebut pETxyl2.

Stabilitas terhadap alkali dari suatu enzim merupakan kemampuan enzim tersebut untuk tetap stabil dan fungsional pada kondisi pH alkali (pH>8) tanpa atau dengan adanya substrat. Hal ini berkaitan dengan kemampuan enzim tersebut untuk mempertahankan struktur tiga dimensi

(3D) rantai polipeptidanya pada pH tinggi. Faktor yang mempengaruhi stabilitas terhadap alkali suatu enzim adalah komposisi asam amino yang bersifat basa dan distribusi asam amino tersebut pada molekul enzim tersebut (Vieille, 2001).

Enzim β -xilosidase dari pETxyl2 bersifat stabil terhadap panas, yakni menunjukkan kestabilan pada suhu 50°C (Puspaningsih, 2003), namun enzim tersebut masih bersifat labil terhadap alkali dan menunjukkan aktivitas optimum pada pH 6. Oleh karena itu untuk memperoleh enzim yang stabil terhadap alkali, maka pada penelitian ini akan dilakukan peningkatan stabilitas terhadap alkali dari β -xilosidase yang diekspresikan oleh pETxyl2 dengan metode *site-directed mutagenesis*.

Site-directed mutagenesis atau mutasi terarah merupakan teknik untuk mengubah nukleotida tertentu pada suatu gen secara *in vitro*. Perubahan yang dilakukan tersebut bertujuan untuk memperoleh ekspresi protein yang diinginkan (Dably, 2003). *Site directed mutagenesis* yang akan dilakukan pada penelitian ini menggunakan metoda PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Gen penyandi β -xilosidase yang terdiri dari 1536 nukleotida dari pETxyl2 telah berhasil disekuensing, dan berdasarkan analisis homologinya dengan β -xilosidase dari *Protein Data Bank* (PDB), sifat stabilitas terhadap alkali dari protein diperkuat oleh asam amino yang bersifat asam yang potensial untuk dimutasi menjadi asam amino yang bersifat basa. Pada tahap penelitian ini hanya akan dilakukan mutasi

terhadap 2 asam amino dari β -xilosidase yaitu asam aspartat (kodon GAU) pada posisi 121 dan 139 menjadi menjadi 2 asparagin (kodon AAU) yang bersifat basa. Penggantian asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 121 dan 139 dari enzim ini akan memungkinkan proses katalisis dapat berlangsung pada pH tinggi, karena rantai samping dari asparagin dapat bertindak sebagai pendonor dan juga penerima ikatan hidrogen (Kim et al., 2008). Mutasi akan dilakukan pada dua plasmid secara terpisah. Dengan adanya penggantian nukleotida G (Guanin) pada kodon asam aspartat menjadi A (Adenin) pada kodon asparagin, maka asam amino asam aspartat diganti menjadi asparagin dan diharapkan enzim memiliki ketahanan terhadap pH tinggi (stabil terhadap alkali).

1.2 Rumusan Masalah

Adapun yang menjadi rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Apakah dengan metoda *site directed mutagenesis* didapatkan mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 121?
2. Apakah dengan metoda *site directed mutagenesis* didapatkan mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 139?
3. Bagaimana stabilitas terhadap alkali dari enzim β -xilosidase yang dihasilkan oleh mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 121?
4. Bagaimanakah stabilitas terhadap alkali dari enzim β -xilosidase yang dihasilkan oleh mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 139?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mendapatkan enzim β -xilosidase yang bersifat lebih stabil terhadap alkali yang dihasilkan mutan pETxyl2 dengan metoda *site directed mutagenesis*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mendapatkan mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 121 dengan metoda *site directed mutagenesis*.
2. Mendapatkan mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 139 dengan metoda *site directed mutagenesis*.
3. Mengetahui stabilitas terhadap alkali dari enzim β -xilosidase yang dihasilkan oleh mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 121.
4. Mengetahui stabilitas terhadap alkali dari enzim β -xilosidase yang dihasilkan oleh mutan pETxyl2 dengan perubahan asam amino asam aspartat menjadi asparagin pada posisi 139.

1.4 Manfaat penelitian

Dari penelitian ini diharapkan didapatkan enzim β -xilosidase yang lebih stabil terhadap alkali yang dihasilkan mutan pETxyl2 dengan metoda *site directed mutagenesis* sehingga bisa diaplikasikan dalam industri yang memanfaatkan bahan baku hemiselulosa.

BAB 2

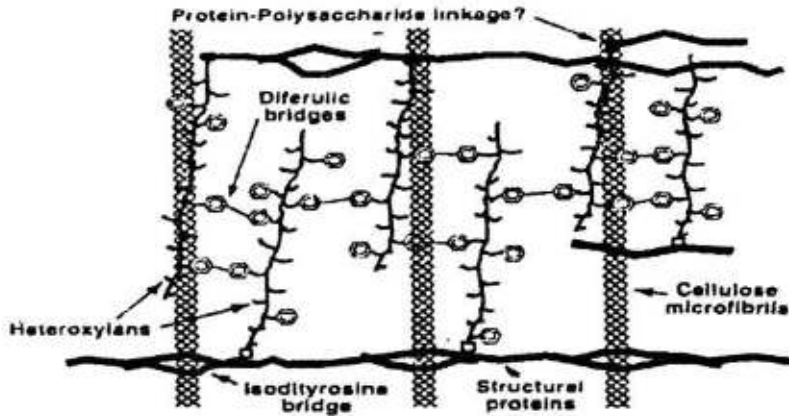
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hemiselulosa

Tumbuhan mengandung sekitar 20 sampai 30% hemiselulosa. Komponen ini merupakan sumber daya alam yang dapat diperbaharui yang keberadaannya sangat melimpah karena menduduki urutan kedua terbanyak setelah selulosa. Sebagai sumber daya alam yang tersedia secara melimpah, hemiselulosa mempunyai potensi yang sangat besar untuk diuraikan menjadi produk akhir yang berguna. Hemiselulosa tersusun atas heteroxilan, manan, arabinogalaktan dan arabinan (Beg *et al.*, 2001).

Pada umumnya, monomer-monomer penyusun hemiselulosa ialah unit pentosa (xilosa, arabinosa), heksosa (manosa, glukosa, galaktosa), dan gula-gula asam. Hemiselulosa mempunyai struktur yang amorf, random dan kekuatan strukturnya lebih lemah dibanding selulosa. Oleh karena itu, hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis oleh enzim, asam atau basa. Hidrolisis enzim mempunyai nilai ekonomis dan komersial yang lebih tinggi dan penting karena pembelahan struktur kayu oleh enzim akan lebih mudah dalam proses pemutihan pulp dan kertas secara industri. Hemiselulosa sangat dekat asosiasinya dengan selulosa dalam dinding sel tanaman. Lima gula netral yaitu heksosa (glukosa, manosa, galaktosa) dan pentosa (xilosa dan arabinosa) merupakan konstituen utama

hemiselulosa (Saha, 2003). Keberadaan heteroxilan sebagai salah satu penyusun dinding sel tanaman dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Lokasi heteroxilan sebagai salah satu penyusun dinding sel tumbuhan (Saha, 2003)

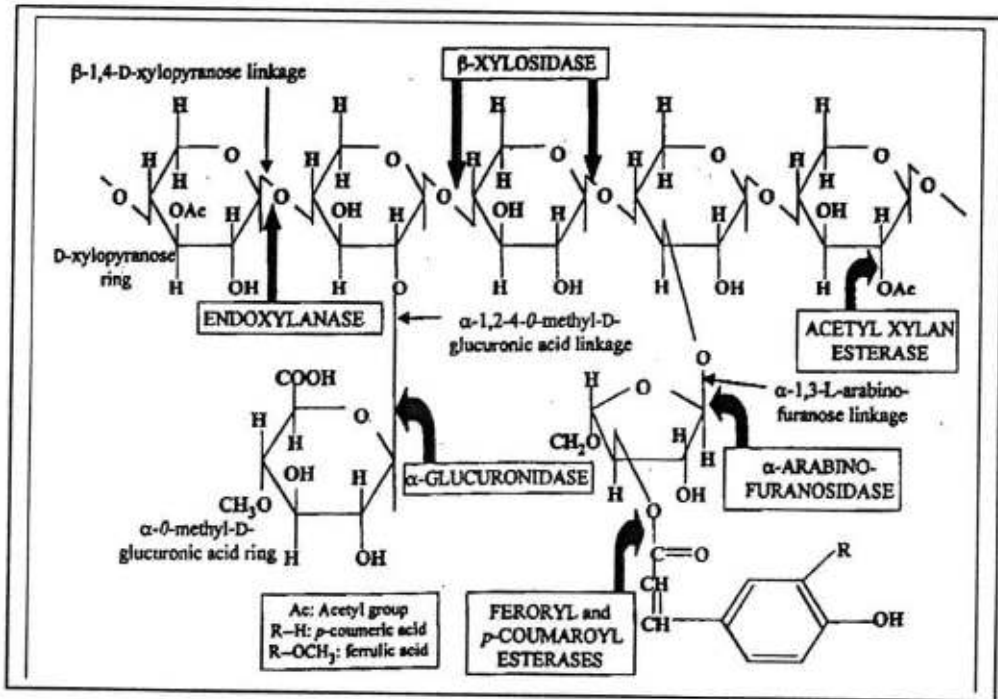
Xilan merupakan komponen utama dari hemiselulosa pada dinding sel tanaman yang terikat pada selulosa, pektin, lignin dan polisakarida lainnya untuk membentuk dinding sel. Enzim yang berperan dalam mendegradasi xilan mendapat perhatian besar karena mempunyai kegunaan dalam berbagai proses industri, terutama dalam konversi bahan lignoselulosa menjadi bahan bakar dan dalam pemrosesan hemiselulosa menjadi kertas (Kulkarni *et al.*, 1999; Chen, 1998; Gibbs *et al.*, 1995). Xilan adalah heteropolisakarida kompleks dengan rantai tulang punggung homopolimer unit-unit D-xilopiranososa yang terikat β -1,4 (Kulkarni *et al.*, 1999, Subramanian *et al.*, 2002). Tulang punggung ini mengikat substituen-substituen seperti O-asetil, α -L-arabinofuranosil, ikatan α -1,2 glukuronat atau asam 4-o-metilglukuronat (Kulkarni *et al.*, 1999, Liu *et al.*,

1998). Kelimpahan xilan di biosfer menjadikan peran enzim xilanolitik sangat penting (Dung, 1993).

Xilan sebagai komponen utama hemiselulosa, memiliki kerangka dasar residu ikatan 1,4- β -D-xilopiranosil yang rantai sampingnya disubstitusi dengan asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan α -arabinofuranosil (Subramanian *et al.*, 2002). Struktur xilan terlihat seperti Gambar 2.2. Komposisi monomer penyusun xilan dari berbagai sumber tumbuhan berbeda-beda. Persentase kandungan monomer dari sumber xilan yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi monomer (%) berbagai sumber xilan (Saha, 2003)

Jenis xilan	Xilosa	Arabinosa	Glukosa	Manosa	galaktosa	Asam anhidro uronat	Asam glukuronat
<i>Birchwood</i>	89,3	1	1,4	-	-	8,3	-
<i>Rice bran</i>	46	44,9	1,9	-	6,1	1,1	-
<i>Wheat arabinoxylan</i>	65,8	33,5	0,3	0,1	0,1	-	-
<i>Corn fiber</i>	46-54	33-35	-	-	5-11	-	3-6



Gambar 2.2 Struktur xilan tumbuhan (Beg *et al.*, 2001)

Lokasi pemotongan oleh masing-masing enzim xilanolitik juga ditunjukkan pada gambar 2.2, selain itu ditunjukkan pula lokasi pengikatan xilan dengan lignin melalui pengikatan residu L-arabinosa yang merupakan rantai cabang xilan dengan residu ferulil dan kumarin dari lignin (Beg *et al.*, 2001).

2.2 Enzim

Di dalam sel, semua reaksi diregulasi oleh aktivitas enzim. Enzim merupakan suatu protein yang bertindak sebagai biokatalis (Wilson dan Walker, 2005). Terdapat tiga karakteristik enzim yaitu:

1. Spesifik

Enzim menunjukkan karakteristik spesifik untuk reaksi yang dikatalisis dan substrat yang digunakan.

2. Kecepatan katalitik tinggi

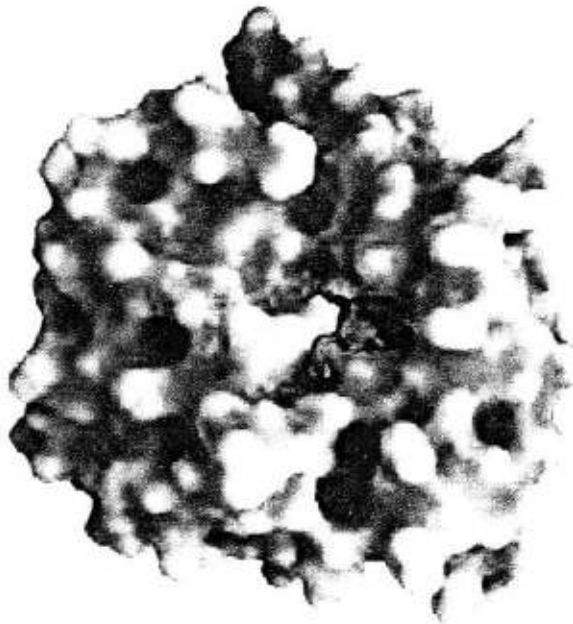
Reaksi yang dikatalisis oleh enzim dapat berlangsung 10^{12} kali lebih cepat daripada reaksi yang tidak dikatalisis oleh enzim. Kecepatan ini dicapai dengan menurunkan energi aktivasi, tanpa mengubah posisi keseimbangan.

3. Daya regulasi tinggi

Aktivitas enzim dalam mengendalikan kecepatan reaksi di dalam jalur metabolik, dapat ditingkatkan maupun dikurangi sebagai respon terhadap perubahan kebutuhan didalam maupun diluar sel.

Enzim meningkatkan reaksi dengan memfasilitasi bentuk keadaan transisi. Sebagai katalis, enzim menurunkan energi bebas aktivasi dari reaksi kimia. Enzim meningkatkan reaksi dengan suatu langkah-langkah reaksi di mana keadaan transisi (jenis energi tertinggi) mempunyai energi bebas yang lebih rendah, oleh karena itu terjadi terbentuk produk yang lebih cepat daripada reaksi yang tidak dikatalisis. Langkah pertama katalisis adalah pembentukan kompleks enzim-substrat. Substrat terikat

pada celah sisi aktif (gambar 2.3). Sisi aktif enzim merupakan daerah tempat pengikatan substrat. Daerah tersebut mengandung residu-residu asam amino yang berperan langsung terhadap pembentukan dan pemutusan ikatan. Residu pada sisi katalitik enzim disebut gugus katalitik (Berg *et al.*, 2003).

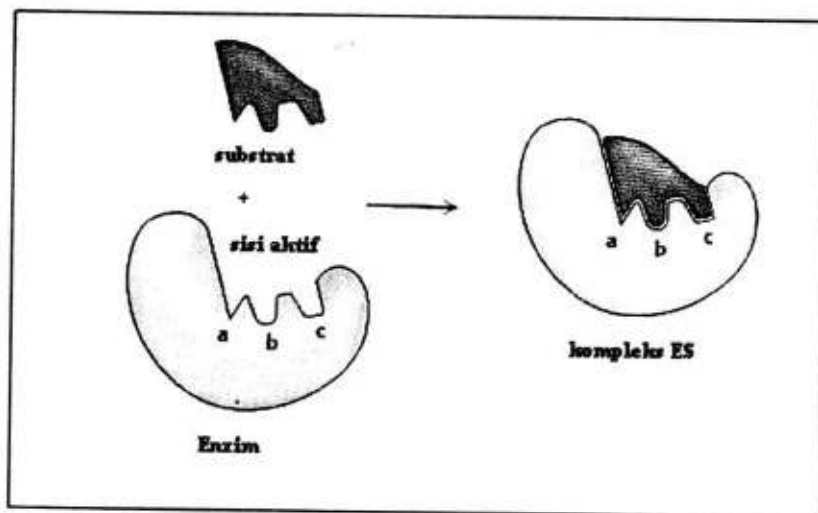


Gambar 2.3. Pengikatan substrat pada sisi aktif enzim (Nelson *et al.*, 2005)

Interaksi spesifitas enzim-substrat terutama terbentuk dari ikatan hidrogen, dan bentuk sisi aktif menolak molekul yang tidak memenuhi sebagai komplemennya. Pengenalan substrat oleh enzim yang diiringi dengan perubahan konformasi sisi aktif tersebut memfasilitasi bentuk keadaan transisi. Model interaksi enzim-substrat dijelaskan pada Gambar 2.3 yaitu model *Lock and Key* dan Gambar 2.4 yaitu model *Induced Fit*. Pada model *Lock and Key* sisi aktif enzim yang terikat komplementer

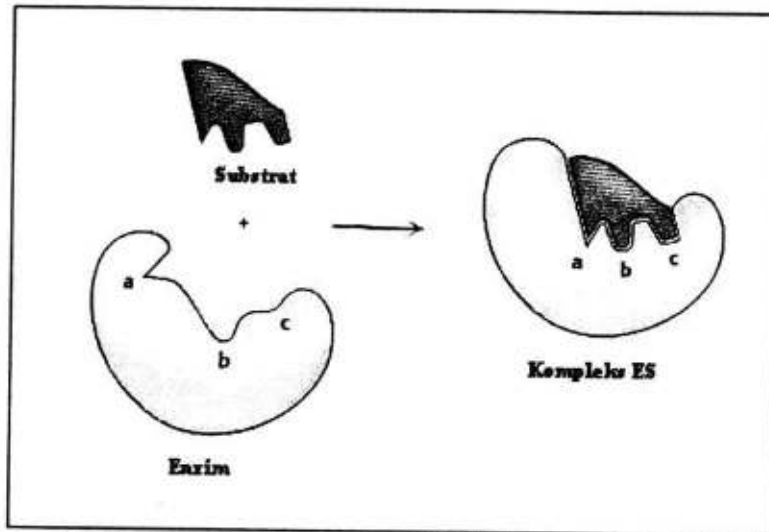
dengan bentuk substratnya sedangkan model *Induced Fit* memperlihatkan bahwa enzim mengubah bentuk pada ikatan substratnya, sehingga sisi aktif komplementer terhadap substrat yang terikat (Berg *et al.*, 2003).

Aktivitas enzim dapat dihambat oleh ikatan molekul dan ion kecil yang spesifik. Pengikatan ini merupakan pengaturan yang besar pada mekanisme sistem biologi. Inhibisi enzim dapat dilakukan oleh *inhibitor irreversible* yang mengikat enzim target sangat lambat karena terikat sangat kuat terhadap enzim, baik secara kovalen atau nonkovalen. Sedangkan *inhibitor reversible* dikarakterisasi oleh kecepatan disosiasi kompleks enzim-*inhibitor* (Berg *et al.*, 2003).



Gambar 2.3. Model *Lock-and-key* ikatan enzim-substrat

(Berg *et al.*, 2003).



Gambar 2.4 Model *Induced-fit* ikatan enzim-substrat

(Berg *et al.*, 2003).

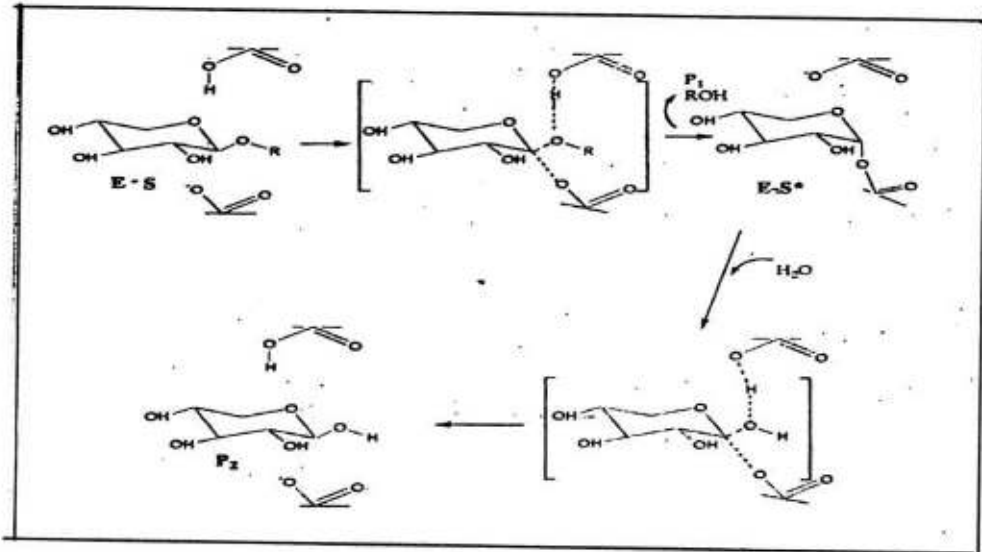
Aktivitas enzim sangat tergantung pada pH. Enzim memiliki pH optimum dimana aktivitasnya maksimal. Aktivitas enzim akan turun pada pH yang lebih tinggi atau lebih rendah dari pH optimum. Rantai samping asam amino pada sisi aktif enzim bertindak sebagai asam dan basa lemah yang fungsinya masing-masing tergantung pada derajat ionisasi. Ionisasi rantai samping asam amino memegang peranan penting dalam interaksi yang menjaga struktur protein (Nelson *et.al*,2005).

2.2.1 Enzim β -xilosidase

Enzim β -xilosidase menghidrolisis 1,4- β -D-xilooligosakarida dari ujung non-pereduksi dan melepaskan xilosa. Enzim ini mampu pula menghidrolisis substrat aril-xilosida. Selain itu, beberapa enzim β -xilosidase juga memiliki aktivitas α -L-arabinofuranosidase (13% dari

β -xilosidase), namun tidak memiliki aktivitas glikosidase yang lain, seperti β -glukosidase, β -galaktosidase atau β -N-asetilglukosaminidase (Yaw *et al.*, 2000 ; Bravman *et al.*, 2003).

Dua tipe mekanisme reaksi enzim β -xilosidase ialah retensi atau inversi pada konfigurasi anomerik C1 dari substrat. Mekanisme reaksi β -xilosidase dari *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (Famili GH52) yang terlihat pada gambar 2.5 diawali dengan pengikatan β -xilosidase yang diikuti dengan asam dan serangan nukleofilik ke residu esensial pada C.



Gambar 2.5 Mekanisme reaksi β -xilosidase dari *Geobacillus stearothermophilus* (Bravman *et al.*, 2003)

2.3 Mutasi Gen

Mutasi gen adalah perubahan yang bersifat menurun dalam urutan basa asam nukleat dari suatu organisme. Strain yang membawa perubahan tersebut disebut mutan. Mutasi dapat terjadi secara spontan maupun diinduksi. Mutasi spontan terjadi sebagai akibat dari paparan

radiasi secara alami seperti sinar kosmik, radikal bebas, dan sebagainya. Urutan DNA dari gen dapat mengalami perubahan dengan beberapa cara. Mutasi gen memiliki berbagai pengaruh, tergantung pada di daerah mana mutasi itu terjadi, serta apakah mutasi tersebut menggantikan fungsi protein yang esensial. Mutasi yang menyebabkan perubahan dalam satu pasang basa disebut *point* mutasi. *Point* mutasi berasal dari penggantian pasang basa di dalam DNA. Jenis-jenis *point* mutasi antara lain: (Madigan dan Martinko, 2006)

1. *Missense*

Mutasi tipe ini merupakan perubahan satu pasang basa dari DNA yang menghasilkan penggantian satu asam amino dengan asam amino yang lain di dalam protein yang dibuat oleh gen.

2. *Nonsense*

Mutasi *nonsense* juga merupakan perubahan satu pasang basa DNA. Selain menggantikan satu asam amino dengan asam amino yang lain, mutasi ini menyebabkan berhentinya sintesis protein sehingga protein yang dihasilkan lebih pendek dan protein menjadi tidak berfungsi.

3. *Insersi*

Insersi mengubah jumlah pasangan DNA dalam gen dengan penambahan DNA baru. Akibatnya protein yang terbentuk kehilangan fungsinya.

4. Delesi

Delesi mengubah jumlah pasangan DNA dengan menghilangkan sebuah DNA. Delesi kecil bisa menghilangkan satu atau beberapa pasang basa dalam gen, sedangkan delesi yang lebih besar dapat menghilangkan sejumlah gen atau beberapa gen tetangga. DNA yang mengalami delesi bisa menimbulkan perubahan fungsi terhadap protein yang terbentuk.

5. Duplikasi

Duplikasi terdiri dari sebuah DNA yang secara abnormal dikopi sebanyak satu atau lebih. Mutasi ini juga menyebabkan perubahan fungsi protein yang dihasilkan.

6. *Frameshiff*

Mutasi tipe ini terjadi ketika penambahan atau penghilangan basa DNA mengubah *frame* baca dari gen. Sebuah *frame* baca terdiri dari kumpulan tiga basa yang masing-masing menyandikan satu asam amino. Mutasi *frameshiff* mengubah kumpulan tiga basa tersebut sehingga mengubah sandi untuk asam amino. Protein yang dihasilkan menjadi tidak fungsional.

2.4 PCR-Site Directed Mutagenesis

Mutagenesis adalah suatu metode pendekatan untuk mempelajari fungsi fisiologis atau struktural suatu protein/enzim atau suatu asam nukleat tertentu misalnya tRNA. Metoda klasik untuk melakukan mutagenesis adalah dengan menggunakan agen fisik atau kimia tertentu,

misalnya radiasi ultraviolet, etil methano sulfonat (EMS), dan lain-lain. Kelemahan metoda tersebut adalah mutasi terjadi secara acak sehingga sulit untuk diarahkan pada bagian gen tertentu (Yuwono, 2006). Metoda alternatif untuk melakukan mutagenesis adalah dengan mutagenesis *in vitro* secara terarah (*site directed mutagenesis*). Metode *site directed mutagenesis* dengan menggunakan prinsip PCR, pertama kali dikembangkan oleh Herlitze dan Koenen (1990).

2.4.1 PCR

PCR merupakan teknik perbanyakan DNA secara *in vitro*. Teknik ini memungkinkan adanya amplifikasi antara dua region DNA yang diketahui, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). Sistem kerja PCR dilandasi oleh struktur DNA. DNA pada keadaan natif merupakan *double helix* yang terdiri dari dua buah pita yang berpasangan antipararel antara satu dengan yang lain dan berikatan dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terbentuk antara basa yang komplementer, yaitu antara basa Adenin (A) dengan Timin (T), dan Guanin (G) dengan sitosin (C) (Ernawati dan Rachman, 2004).

Konsep asli teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses pelipatgandaan tersebut dilakukan. Sekuen yang diketahui tersebut penting untuk menyediakan *primer*, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek yang mengawali sintesis rantai DNA dalam PCR (Gelfand *et. al.*, 1990).

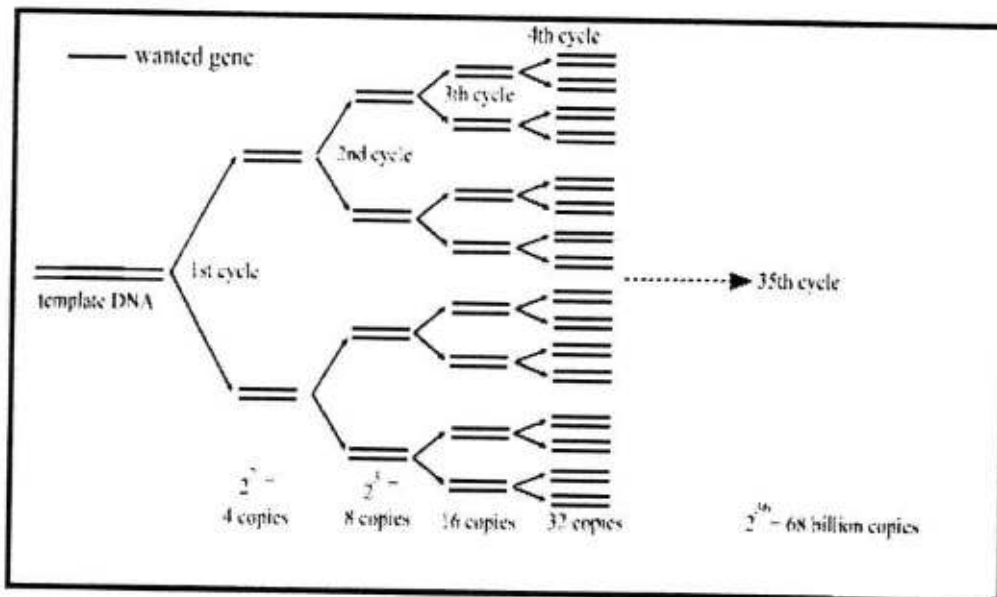
Empat komponen utama yang digunakan pada proses PCR adalah:

1. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan digandakan.
2. *primer* oligonukleotida, yaitu urutan nukleotida pendek (15-25 basa) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA.
3. deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP.
4. enzim DNA polymerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA.
5. *buffer*

Reaksi penggandaan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan sehingga rantai DNA yang berantai ganda akan terpisah menjadi rantai tunggal. *Denaturasi* DNA dilakukan dengan menggunakan pemanasan pada suhu 95°C selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 50^o-55^oC sehingga terjadi proses *annealing* yaitu penempelan *primer* pada DNA cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. *Primer* akan membentuk ikatan hidrogen dengan DNA cetakan pada daerah yang urutannya komplemen dengan DNA cetakan. Setelah dilakukan *annealing* oligonukleotida *primer* dengan DNA cetakan, suhu inkubasi dinaikkan menjadi 72^oC selama 2 menit. Pada tahap ini DNA polymerase akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Setelah terjadi polimerasi, rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan. DNA rantai ganda yang terbentuk tersebut

akan didenaturasi kembali dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 95°C. Rantai DNA yang baru tersebut akan berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerasi berikutnya (Yuwono, 2006).

Reaksi-reaksi seperti yang sudah dijelaskan tersebut diulangi lagi sampai 20-35 kali sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul DNA rantai ganda yang baru hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target di dalam campuran reaksi. Paling sedikit diperlukan 25 siklus untuk menggandakan satu kopi sekuen DNA target di dalam DNA genom mamalia agar hasilnya dapat dilihat secara langsung yaitu dengan elektroforesis gel agarosa. Prinsip dasar PCR seperti yang sudah dijelaskan dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6. Skema reaksi amplifikasi DNA dengan teknik PCR
(Yuwono, 2006)

2.4.2 *Site Directed Mutagenesis*

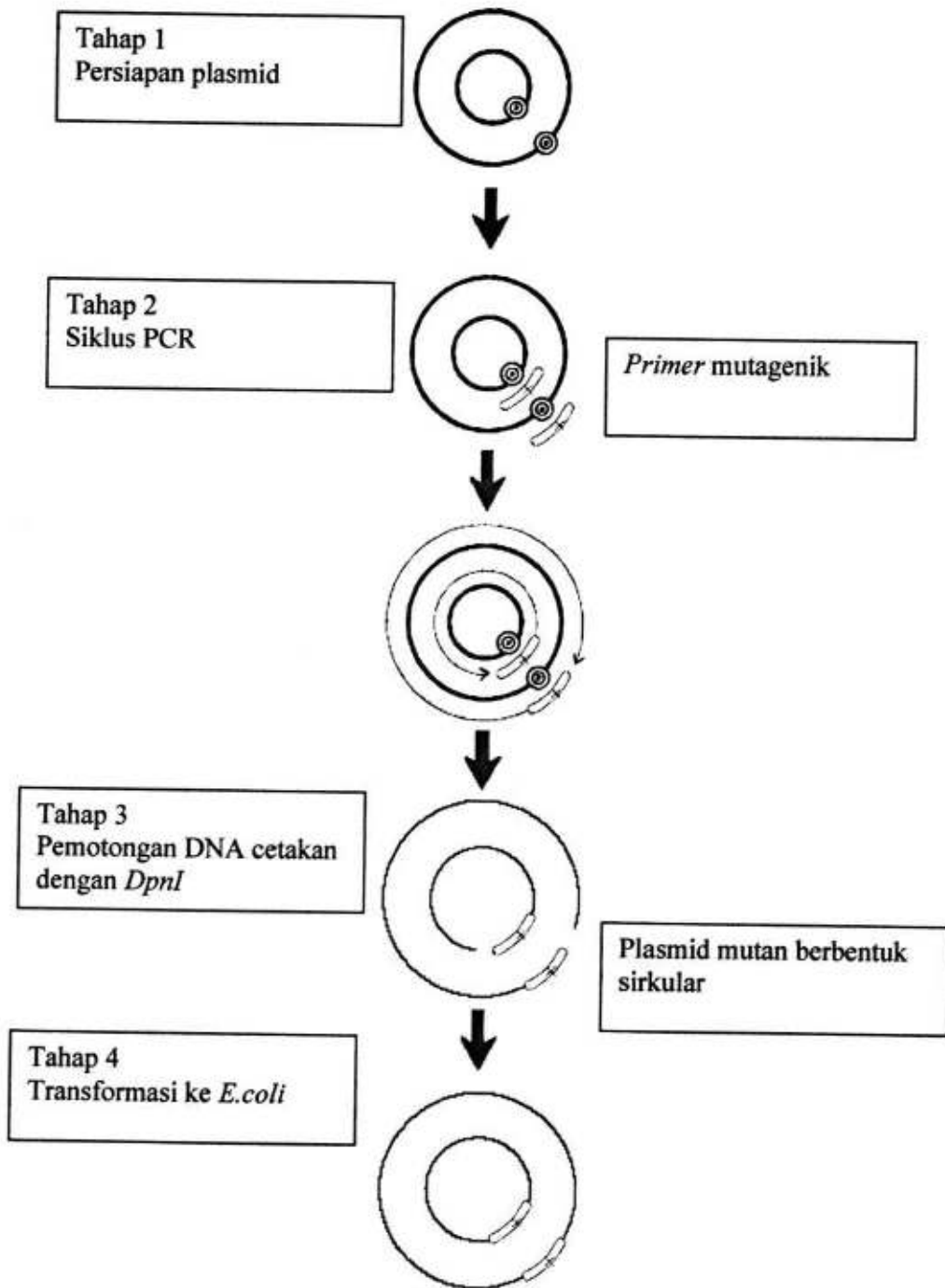
Site directed mutagenesis berkembang menjadi metoda dasar dalam manipulasi gen. *Site directed mutagenesis* atau mutasi terarah merupakan teknik untuk mengubah nukleotida tertentu pada suatu gen secara *in vitro*. Modifikasi urutan DNA dengan metode *in vitro site directed mutagenesis* telah menjadi metoda sentral dalam bidang biologi molekuler serta berpengaruh besar terhadap penelitian akademik maupun tekrobiologi komersial. Penentuan spektrum dari substitusi asam amino fungsional suatu protein memungkinkan suatu perbandingan dari varian protein yang diisolasi dari alam. Hal ini memungkinkan untuk memperkenalkan beberapa substitusi asam amino yang diinginkan pada posisi tertentu dari urutan DNA. Urutan DNA yang menyandikan protein dapat dimodifikasi untuk memperoleh karakteristik dasar dari protein yang meliputi stabilitas, pelipatan protein, spesifitas enzim serta mekanismenya. Varian dari protein juga dapat dirancang atau diseleksi untuk tujuan pemurnian dan identifikasi (Ong *et al.*, 1989).

Seiring dengan perkembangan teknik manipulasi genetik, saat ini metode yang paling banyak digunakan untuk *site directed mutagenesis* adalah metode berbasis PCR. Teknik *site directed mutagenesis* dengan metoda PCR telah berkembang menggunakan DNA untai ganda. Dalam PCR, terjadi denaturasi oleh pemanasan untuk memisahkan DNA untai tunggal. Pasangan *primer* untuk amplifikasi mempunyai urutan yang komplemen dan mengandung nukleotida yang akan dimutasi. *Primer*

mutagenesis memperlihatkan mutasi yang dipilih sehingga harus diperhatikan desain *primer* yang dilakukan (Yuwono, 2006).

Reagen yang diperlukan dalam PCR-*site directed mutagenesis* terdiri dari: *Taq DNA polymerase*, dNTP, sel kompeten *E. coli*, *primer* mutagenesis, DNA cetakan, dan *buffer*. Optimasi reaksi PCR sebelum memulai proses PCR-*site directed mutagenesis* sangat diperlukan. Peneliti harus menetapkan kondisi PCR yang diperlukan untuk sintesis produk dengan rantai DNA yang panjang (Weiner, 1994).

Site directed mutagenesis dapat digunakan untuk mutasi titik, pergantian asam amino, serta penghilangan atau penyisipan satu atau lebih asam amino. Prosedur dasar dari metoda ini menggunakan DNA plasmid untai ganda yang mengandung *insert*. Sepasang *primer* oligonukleotida yang mengandung mutasi diperlukan dalam metoda ini. Masing-masing *primer* tersebut berkomplemen dengan rantai vektor yang berlawanan. *Primer* yang menempel tersebut mengalami perpanjangan rantai selama siklus reaksi dengan bantuan enzim *DNA polymerase*. Setelah siklus PCR selesai akan dihasilkan plasmid mutan yang mengandung *nicks*. Tahap selanjutnya adalah penambahan enzim *DpnI* pada hasil PCR yang bertujuan untuk memotong DNA cetakan induk (Gambar 2.7). DNA plasmid yang masih mengandung *nicks* selanjutnya ditransformasi ke sel kompeten *E. coli*. (Stratagene, 2007)



Gambar 2.7 Skema site directed mutagenesis (Stratagene, 2007)

2.5 Stabilitas terhadap alkali dari suatu enzim

Stabilitas terhadap alkali dari suatu enzim merupakan kemampuan enzim tersebut untuk tetap stabil dan fungsional setelah disimpan pada kondisi pH alkali tanpa adanya substrat. Hal ini berkaitan dengan kemampuan enzim tersebut untuk mempertahankan struktur tiga dimensi (3D) rantai polipeptidanya pada pH tinggi. Faktor yang mempengaruhi stabilitas terhadap alkali dari suatu enzim adalah komposisi asam amino yang bersifat basa dan distribusinya pada molekul enzim tersebut. (Vieille, 2001).

Kestabilan suatu enzim dipengaruhi oleh struktur tersier molekul enzim tersebut (Matthew et al., 1972). Suatu enzim yang berada dalam larutan diinaktivasi oleh modifikasi spesifik dari sisi aktif atau oleh perubahan struktur tersier yang mempengaruhi sisi aktif enzim. Struktur tersier enzim dipengaruhi oleh pH dan suhu. Stabilitas terhadap pH ditentukan dengan inkubasi enzim pada variasi pH tertentu dalam waktu tertentu pula (Wiseman, 1975).

2.6 Plasmid

Plasmid merupakan molekul DNA sirkuler yang terdapat secara bebas di dalam sel bakteri. Plasmid hampir selalu membawa satu atau lebih gen. dan seringkali gen tersebut berperan terhadap karakteristik bakteri sel inang. Sebagai contoh, bakteri yang mengandung plasmid yang membawa gen resisten antibiotik bisa bertahan hidup di lingkungan yang mengandung antibiotik seperti klorampenikol atau ampisillin.

Resisten antibiotik seringkali digunakan *selectable marker* untuk menentukan bahwa bakteri di dalam biakan terdapat plasmid tertentu (Brown, 2004).

Semua plasmid paling sedikit memiliki satu urutan DNA yang berfungsi sebagai ORI (*origin of replication*), sehingga plasmid tersebut bisa membelah di dalam sel. Plasmid juga mengandung *multiple cloning site*, yaitu sisi spesifik yang bisa dipotong oleh *endonuklease* restriksi sehingga DNA asing bisa disisipkan. Beberapa plasmid juga bisa bereplikasi dengan menyisipkan dirinya ke dalam kromosom bakteri, plasmid tersebut bernama plasmid integratif atau episom. Plasmid integratif bisa memperbanyak diri melalui pembelahan sel (Brown, 2004).

Ukuran dan *copy number* dari plasmid sangat penting dalam proses kloning. Plasmid yang digunakan sebagai vektor kloning berukuran kurang dari 10 kb. *Copy number* merupakan jumlah molekul plasmid yang terdapat dalam suatu sel bakteri. Faktor yang mengendalikan *copy number* plasmid belum dimengerti sepenuhnya, tetapi masing-masing plasmid memiliki *copy number* paling sedikit satu dan paling banyak 50 atau lebih (Brown, 2004). Plasmid yang ideal sebagai vektor kloning harus mempunyai sifat-sifat antara lain:

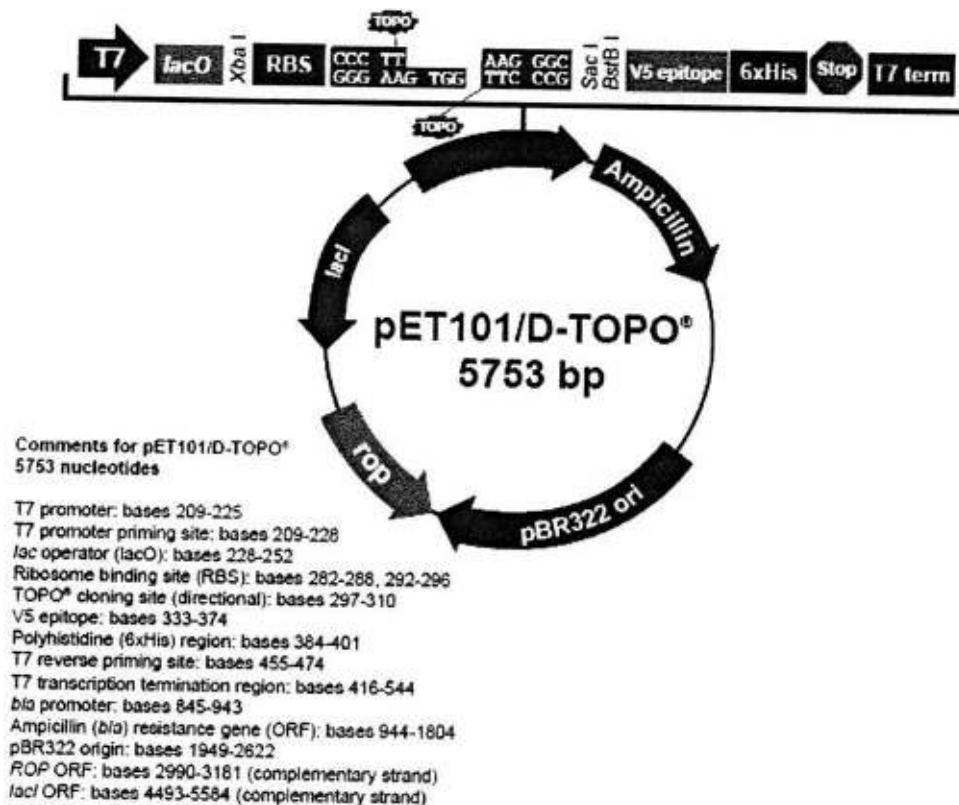
1. Mampu mereplikasi diri secara autonom dalam sel bakteri.
2. Mempunyai satu atau lebih penanda (*marker*), misalnya resistensi antibiotik.
3. Mempunyai sisi pengenalan terhadap enzim restriksi, terutama pada sisi penanda

4. Sebagai pertimbangan biologis, plasmid sebaiknya tidak bersifat *transmissible* dan juga *mobilisable*.
5. Ukuran plasmid sebaiknya kecil (< 10 kb), karena efisiensi transformasi akan menurun dengan meningkatnya ukuran plasmid.
6. Mempunyai multikopi per sel, sehingga beberapa plasmid harus mempunyai replikon dibawah kondisi *relaxed control*.

Plasmid dikelompokan menjadi dua golongan yaitu plasmid konjugatif dan non-konjugatif. Plasmid konjugatif dicirikan oleh kemampuannya untuk melakukan konjugasi secara seksual antara dua sel bakteri. Konjugasi dan perpindahan plasmid dikendalikan oleh suatu set transfer atau gen *tra* yang terdapat pada plasmid konjugatif dan tidak terdapat pada plasmid non-konjugatif. Beberapa jenis plasmid yang berbeda bisa ditemukan dalam satu sel, termasuk lebih dari satu jenis plasmid konjugatif. Sel *E. coli* diketahui mengandung lebih dari tujuh jenis plasmid berbeda dalam satu bakteri. Agar dapat eksis dalam sel yang sama, plasmid yang berbeda tersebut harus bersifat kompatibel. Jika dua plasmid yang berbeda tidak kompatibel satu terhadap yang lain, maka salah satunya akan hilang dari sel dengan cepat (Brown, 2004).

2.7 Plasmid pET101/D-TOPO

Vektor pET101/D-TOPO dirancang untuk memfasilitasi *direct cloning* dari *blunt-end product* PCR (*Invitrogen*, 2006) yang diekspresikan dalam *E.coli* seperti yang dapat dilihat pada gambar 2.8. Vektor pET101/D-TOPO mempunyai ukuran 5753 bp dan tersedia dalam bentuk linier, sehingga proses ligasi dapat langsung dilakukan (*direct cloning*) tanpa terlebih dahulu melakukan restriksi plasmid (umumnya dilakukan pada plasmid berbentuk sirkular).



Gambar 2.8 Peta pET101/D-TOPO (*Invitrogen*, 2006)

2.8 Transformasi

Sebagian besar spesies bakteri bisa mengambil molekul DNA dari media dimana mereka tumbuh. Molekul DNA yang diambil dalam hal ini akan didegradasi, tetapi molekul DNA tersebut bisa juga bertahan hidup dan bereplikasi didalam sel inang. Hal ini bisa terjadi jika molekul DNA tersebut adalah plasmid yang memiliki ORI (*origin of replication*) yang dikenali oleh sel inang (Brown, 2004).

Plasmid yang stabil dapat dideteksi dengan melihat ekspresi dari gen yang dibawa oleh plasmid. Sebagai contoh, *E. coli* normalnya sensitif terhadap efek penghambat pertumbuhan dari antibiotik tetrasiklin dan ampicillin, tetapi sel yang mengandung plasmid pBR322 (merupakan vektor kloning yang dikembangkan pada tahun 1970an) menjadi resisten terhadap kedua antibiotik tersebut. Hal ini disebabkan oleh karena pBR322 membawa dua set gen, yaitu gen yang mengkode enzim β -lactamase yang memodifikasi ampicillin menjadi bentuk yang tidak toksik bagi bakteri, dan set gen kedua mengkode enzim yang mendetoksifikasi tetrasiklin. Masuknya plasmid pBR322 ke dalam sel inang dapat dideteksi karena sel *E. coli* yang ditransformasi dari sensitif ampicillin dan tetrasiklin ($amp^s tet^s$) menjadi resisten terhadap ampicillin dan tetrasiklin ($amp^R tet^R$) (Brown, 2004).

Transformasi diartikan sebagai pengambilan DNA molekul oleh beberapa tipe sel. Sebagian besar spesies bakteri, termasuk *E.coli* hanya mengambil DNA dalam jumlah terbatas dibawah kondisi lingkungan yang normal. Agar proses transformasi berlangsung efisien, bakteri harus

mengalami beberapa bentuk perlakuan fisik dan atau kimia yang bertujuan untuk meningkatkan kemampuannya dalam pengambilan DNA. Sel dengan perlakuan seperti itu disebut sel kompeten (Brown, 2004).

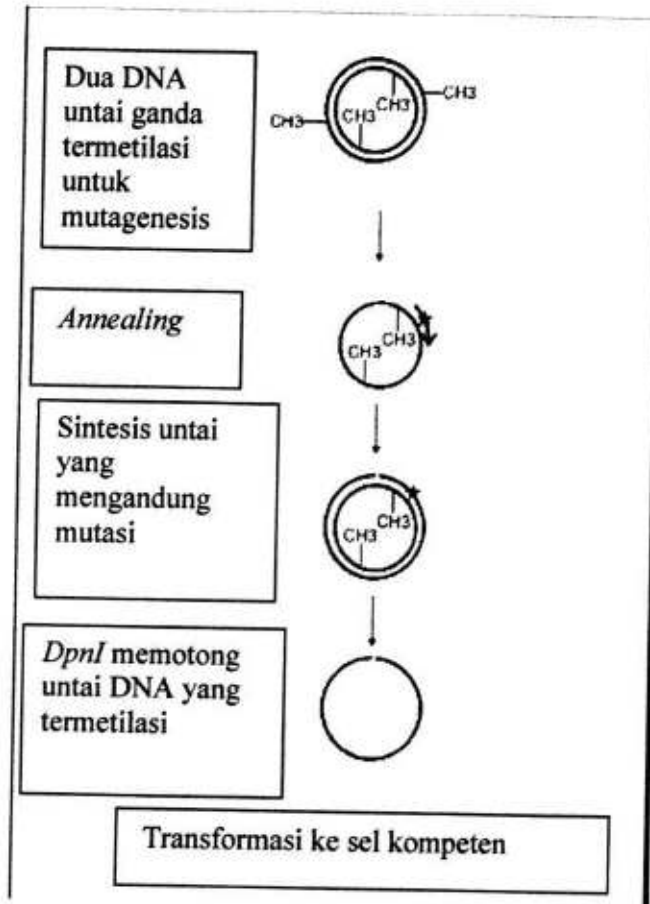
Pembuatan sel kompeten *E.coli* dilakukan dengan perlakuan menggunakan CaCl_2 . Membran sel bakteri permeabel terhadap ion klorida, tetapi tidak permeabel terhadap ion kalsium. Ion klorida yang masuk ke dalam sel bakteri disertai pula masuknya molekul air menyebabkan penggembungan sel. Hal ini memudahkan masuknya DNA dari luar sel. Mekanisme secara pasti dari masuknya DNA ini masih belum diketahui (Guangyuan *et al.*, 2005).

Cara yang digunakan untuk membedakan sel transforman yang membawa plasmid dengan yang tidak adalah dengan memanfaatkan *selectable marker* yang dibawa oleh plasmid. *Selectable marker* merupakan gen yang memberikan karakteristik baru pada sel transforman, yang tidak dimiliki oleh sel bukan transforman. Sebagai contoh, *selectable marker* gen resisten ampisillin yang dimiliki oleh pBR322. Setelah transformasi, hanya *E.coli* yang membawa plasmid amp^Rtet^R yang bisa tumbuh pada media yang mengandung ampisillin dan tetrasiklin, sedangkan yang membawa gen amp^Stet^S tidak bisa tumbuh (Brown, 2004).

2.9 Endonuklease Restriksi *DpnI*

Dalam kloning gen diperlukan pemotongan terhadap molekul DNA dengan cara yang tepat. Endonuklease restriksi murni memungkinkan ahli biologi molekuler memotong molekul DNA dengan cara yang tepat. Ciri utama endonuklease restriksi adalah bahwa tiap enzim mengenal urutan spesifik pada molekul DNA yang akan dipotong. Enzim tertentu akan memotong DNA pada urutan pengenal dan tidak pada tempat lain (Brown, 2004).

DpnI (*Diplococcus pneumoniae*) merupakan salah satu contoh endonuklease restriksi yang mengenali urutan G^mATC dan menghasilkan fragmen dengan ujung tumpul. *DpnI* memerlukan metilasi pada residu adenin untuk aktivitasnya dan memotong urutan G^mATC yang mengandung N⁶-methyl-adenin (gambar 2.9). *Deoxyadenosin methyltransferase* (Dam) adalah suatu enzim yang secara spesifik memetilasi residu *deoxyadenosin* dari urutan 5'-GATC-3' di dalam DNA. Proses ini sangat penting dalam hal replikasi DNA serta regulasi ekspresi gen (Alonso *et al.*, 2005).



Gambar 2.9 Skematis proses pemotongan enzim *DpnI* terhadap DNA cetakan termetilasi (Shenoy dan Visweswariah, 2003)

2.10 Sekuensing

Sekuensing merupakan metoda yang sangat penting dalam bidang biologi molekuler karena melalui sekuensing dapat diketahui urutan nukleotida yang tepat dari molekul DNA. Dua macam teknik telah dikembangkan hampir secara bersamaan yaitu cara pengakhiran rantai oleh F. Sanger, serta cara degradasi kimiawi oleh Maxam dan Gilbert (Brown, 2006).

1. Pengakhiran rantai oleh Sanger

Cara terminasi atau pengakhiran rantai memerlukan DNA untai tunggal sehingga molekul yang akan disekuensing biasanya diklon ke dalam vektor M13, karena cara terminasi rantai melibatkan sintesis enzimatik untai DNA kedua yang komplementer terhadap cetakan yang ada. Langkah pertama adalah penggabungan *primer* ke dalam molekul M13 rekombinan. *Primer* ini bertindak sebagai titik permulaan reaksi sintesis untai komplemen yang dikatalisis oleh fragmen *Klenow* DNA polymerase I. Reaksi sintesis untai DNA dimulai dengan penambahan DNA *polymerase* dan masing-masing dari keempat deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Selain itu, ditambahkan pula nukleotida yang dimodifikasi yang disebut dideoksinukleotida misalnya dideoksi ATP (ddATP). Nukleotida ini menyebabkan penghentian sintesis untai selanjutnya karena dideoksi tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 3' komponen gula. Gugus ini diperlukan untuk perlekatan nukleotida berikutnya dan oleh karena itu terminasi rantai terjadi jika dideoksinukleotida digabungkan oleh enzim pada polinukleotida yang sedang tumbuh.

Reaksi sintesis untai dilakukan empat kali secara paralel. Hasilnya akan merupakan empat kelompok polinukleotida baru yang berbeda. Satu kelompok akan mengandung untai yang berakhir pada ddATP, satu untai berakhir pada ddTTP, dan seterusnya. Langkah selanjutnya adalah memisahkan komponen

tiap-tiap kelompok sehingga panjang tiap untai dapat ditentukan. Hal ini dapat dilakukan dengan elektroforesis gel poliakrilamid.

2. Cara kimiawi oleh Maxam-Gilbert

Metoda ini memerlukan fragmen DNA untai ganda, sehingga tidak memerlukan kloning ke dalam vektor M13. Selain itu tidak dibutuhkan *primer* karena dasar cara ini bukan sintesis untai baru, melainkan pemotongan molekul DNA yang ada menggunakan reagen kimia yang bekerja secara spesifik pada nukleotida tertentu. Fragmen DNA untai ganda yang akan ditentukan urutannya mula-mula dilabel menggunakan gugus fosfor radioaktif pada ujung 5' tiap untai, kemudian ditambahkan dimetil sulfoksid dan sampel DNA yang dilabel dipanaskan sampai 90°C. Hal ini menyebabkan putusya untai molekul DNA menjadi dua untai. Kedua untai saling dipisahkan dengan elektroforesis gel yang bekerja atas dasar bahwa salah satu untai akan lebih banyak mengandung nukleotida purin daripada nukleotida yang lain dan oleh karena itu akan lebih berat. Untai yang berat dimurnikan dari gel dan dibagi menjadi lima sampel kemudian diberi reagen pemotong. Reagen pertama yang ditambahkan menyebabkan modifikasi nukleotida yang spesifik terhadap reagen tersebut sehingga untai mudah terpotong pada nukleotida ini pada waktu penambahan piperidin. Setelah elektroforesis, pita-pita yang terlihat dengan autoradiografi akan menunjukkan fragmen-fragmen

yang dilabel tersebut. Ukuran nukleotida kemudian dapat dibaca dari autoradiograf (Brown, 2006).

2.11 Alignment urutan asam amino β -xylosidase pETxyl2 dengan β -xylosidase Protein Data Bank (PDB)

Untuk melakukan analisis residu-residu asam amino β -xylosidase pETxyl2 yang potensial untuk di mutasi, maka urutan asam amino β -xylosidase pETxyl2 dibandingkan dengan urutan asam amino dari β -xilosidase lain famili GH43 yang bersifat stabil terhadap alkali yang ada di PDB. Beberapa enzim β -xilosidase famili GH43 yang bersifat stabil terhadap alkali (menunjukkan stabilitas pada kisaran pH 8.5 – 11,0) (PDB, www.rcsb.org/pdb/), yaitu β -xilosidase yang berasal dari *Bacillus halodurans* C-125 (1YRZ), *B. subtilis* (1YIF), *Clostridium acetobutylicum* (1YI7).

Alignment dilakukan dengan menggunakan program *CloneManager*. Hasil analisis dapat ditunjukkan pada gambar 2.10

16 Feb 2010

Alignment Results

Alignment: Global Protein alignment against reference molecule
 Parameters: Scoring matrix: BLOSUM 62

Reference molecule: 1Y17, Region 1-180
 Number of sequences to align: 4
 Settings: Similarity significance value cutoff: >= 50

Summary of Percent Matches:

Reference:	1Y17	1 -	180	(180	aa)	--
Sequence 1:	1y1F	1 -	180	(180	aa)	77
Sequence 3:	1YR2	1 -	175	(175	aa)	64
Sequence 4:	XVL	1 -	171	(171	aa)	41

```

1Y17      1 -mi--knpllgfnpdpdicradcdyyiatstfewfpgvqihhskdlvnhlvahplartslldkgnpnsoggiwapdlsyhdgkfwliy
1y1F      1 nki--tnpvlkgfnpdpdicragedyyiarstfewfpgvqihhskdlvnhlvahplqrusqldkgnpnsoggiwapdlsyhdgkfwliy
1YR2      1 -mvrnqnpilpgfnpdpdsvrvgsdyiatstfewfpgvrihhsrdlthwrfvsspltrtsqldkgnnsoggiwapdlsyhdgtfylii
XVL       1 mey--snpvikgfypdpdicrvgsdyylvtssfyfpgvpihfstnlvnmkigyclirpsqlmnnatnrsqifaptlryhagifylit

1Y17      88 tdvkvtdgmkdchnyltcoesvsgvwsdpitldg-sgfnaslfhdndgkkylnmymdqrtymhnyfygvlqeysdkekkligkakiy
1y1F      89 tdvkvvdgaskdchnyltcoetingdweepikids-sgfnaslfhdtdgkkylnmlndhridrbsfggiviqeysdteqkligkpkwif
1YR2      90 tdvkvqhgafkdahnylvtagniegpwsdpyids-sgfnpslfhdtdgrkdlvnmindyrkgnhpfagillqeyseaeqklvgpkh---
XVL       89 tsvtk-----knfimsedlqgkewsepiwidgwggidpslffnddgkvyitgtdncharge---lgiyqaeidlkgsiigerkliu

1Y17      177 kgt-
1y1F      178 egt-
1YR2      176 ----
XVL       169 kgt-

```

Gambar 2.10 Hasil *alignment* urutan asam amino β -xylosidase pETxyl2 dengan β -xylosidase PDB

BAB 3

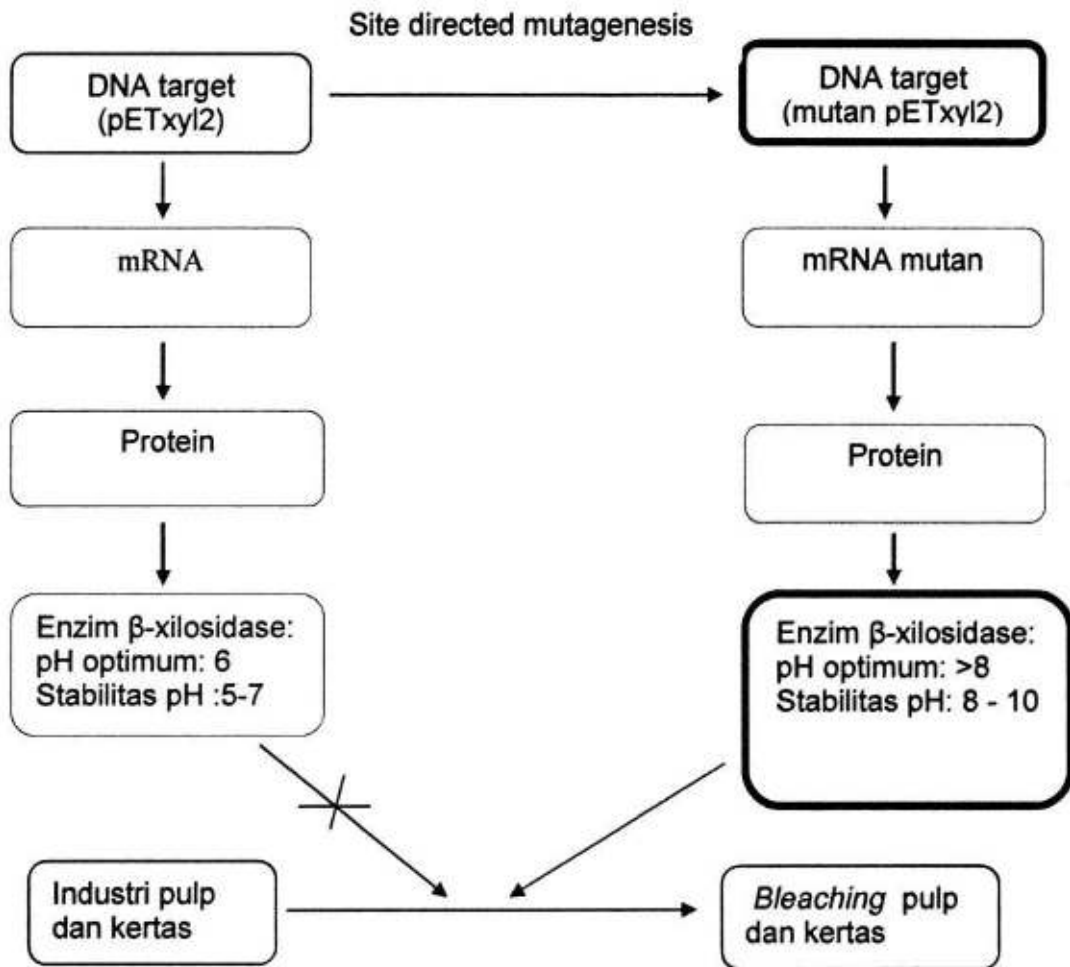
KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

Keberadaan hemiselulosa yang melimpah di alam sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk dikonversi menjadi produk yang bermanfaat contohnya bioetanol, xilitol, dan prebiotik. Konversi senyawa hemiselulosa ini dapat dilakukan dengan proses biokatalisis menggunakan enzim β -xilosidase. Dalam industri pulp dan kertas, pemakaian enzim β -xilosidase dapat mengurangi penggunaan klorin dan bahan kimia lainnya yang digunakan sebagai agen pemutih pulp dan kertas, karena bahan kimia tersebut sangat berbahaya bagi lingkungan. Beberapa proses industri pengolahan hemiselulosa berlangsung pada pH alkali sehingga enzim yang digunakan harus bersifat stabil terhadap alkali.

Stabilitas terhadap alkali suatu enzim merupakan kemampuan enzim tersebut untuk tetap stabil dan fungsional pada kondisi pH alkali tanpa atau dengan adanya substrat. Hal ini berkaitan dengan kemampuan enzim tersebut untuk mempertahankan struktur tiga dimensi (3D) rantai polipeptidanya pada pH tinggi.

DNA target yang digunakan pada penelitian ini merupakan gen yang berasal dari pETxyl2. Untuk bisa mengekspresikan proteinnya, gen ini akan ditranskripsi menjadi mRNA yang selanjutnya ditranslasi menjadi asam amino-asam amino yang akan bergabung membentuk protein. Gen pETxyl2 mengekspresikan protein berupa enzim β -xilosidase.

Enzim β -xilosidase yang diekspresikan oleh pETxyl2 memiliki aktivitas optimum pada pH 6 serta menunjukkan tingkat kestabilan terhadap pH 5-7, sehingga untuk meningkatkan stabilitas terhadap alkali β -xilosidase dapat dilakukan dengan cara mengganti asam amino yang bersifat asam menjadi asam amino yang bersifat basa dengan metode *site-directed mutagenesis*. Dengan metoda ini diharapkan dihasilkan mutan pETxyl2 yang bisa mengekspresikan enzim β -xilosidase yang memiliki aktivitas optimum dan stabil pada pH basa.



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual penelitian

Keterangan:

— : bagian yang diteliti

BAB 4**METODA PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksplorasi laboratorium.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNA plasmid yang diisolasi dari plasmid rekombinan pETxyl2 dari sel inang *Escherichia coli* (*E.coli*) Top 10 hasil dari penelitian sebelumnya (Puspaningsih, 2003).

4.3 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk tahap-tahap penelitian ini adalah:

4.3.1 Reagen Penelitian**4.3.1.1 Isolasi DNA Plasmid pETxyl2**

- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) (CAT no: 27104)

4.3.1.2 PCR-site directed mutagenesis

- dNTP (Roche)

- Primer mutagenesis (Euregentec):

D121N: 5'-GGATTGATGGATGGGGAGGCATTAATCC-3'

iD121N:5'-GGATIAATGCCTCCCCATCCATCAATCC-3'

D139N: 5'-CCGGGACAAATAATAATGCTAGGGGTG-3'

iD139N: 5'-CACCCCTAGCATTATIATTTGTCCCGG-3'

4.3.1.3 Elektroforesis gel agarosa

- Agarosa (*Biomedical*) (CAT no: 424069)
- Etidium bromide (*Biomedical*) (CAT no: 802511)
- Tris (*Merck*) (CAT no: 8382T012 442)
- Asam borat (*Merck*) (CAT no: A646565 603)
- Na₂EDTA (*Etilene Diamine tetra Acetat*) (*Merck*) (CAT no: K33774018 443)
- Loading buffer (*Fermentas*) (CAT no: 00016787)
- Marker HindIII (*Fermentas*) (CAT no: 00000201)

4.3.1.4 Transformasi

- Enzim restriksi *DpnI* (*Roche*) (CAT no: 2005225)
- Sel kompeten *E. coli* Top 10 (*Invitrogen*)
- Sel kompeten *E. coli* BL21 *Star* (*Invitrogen*)

4.3.1.5 Culture Transforman

- NaCl (*Merck*) (CAT no: K35855004 611)
- Trypton (*Oxoid*) (CAT no : 639829)
- Yeast Extract (*Oxoid*) (CAT no : 212750)
- Bacto Agar (*Oxoid*) (CAT no : 214016)

4.3.1.6 Isolasi DNA plasmid

- QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) (CAT no: 27104)

4.3.1.7 Sekuensing

- Primer T7 (*Zigma*)

reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

forward: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

4.3.1.8 Isolasi enzim β -xilosidase

- Na_2HPO_4 (Merck) (CAT no : K 37807280 744)
- Asam sitrat (Merck) (CAT no : K 91568044 409)

4.3.1.9 Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase

- Na_2HPO_4 (Merck) (CAT no : K 37807280 744)
- Na_2HPO_4 (Merck) (CAT no : K 37807280 744)

4.3.1.10 Uji stabilitas enzim β -xilosidase terhadap alkali

- *p*-nitrophenol (*para*-nitrophenol)-xilopiranosida (Biomedical)
- Na_2HPO_4 (Merck) (CAT no : K 37807280 744)
- Asam sitrat (Merck) (CAT no : K 91568044 409)

4.3.2 Bahan Lain Penelitian**4.3.2.1 Isolasi DNA plasmid pETxyl2**

- *Microtube* (Eppendorf) (1,5 mL, 0,5 mL)
- *Yellow tip*
- *Blue tip*
- *White tip*

4.3.2.2 PCR-site directed mutagenesis

- *Microtube* (Eppendorf) (0,5 mL)
- *Yellow tip*
- *White tip*

4.3.2.3 Elektroforesis gel agarosa

- *Yellow tip*
- *White tip*

4.3.2.4 Transformasi

- Labu Erlenmeyer (pyrex)
- Blue tip

4.3.2.5 Culture transforman

- Petri dish
- Labu Erlenmeyer (pyrex)

4.3.2.6 Isolasi DNA plasmid

- Microtube (Eppendorf) (1,5 mL, 0,5 mL)
- Yellow tip
- Blue tip

4.3.2.7 Sekuensing

- Microtube (Eppendorf) (1,5 mL, 0,5 mL)
- Yellow tip
- Blue tip

4.3.2.8 Isolasi enzim β -xilosidase

- Labu Erlenmeyer (pyrex)
- Blue tip

4.3.2.9 Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase

- Microtube (Eppendorf) (1,5 mL)
- Yellow tip
- Blue tip

4.3.2.10 Uji stabilitas enzim β -xilosidase terhadap alkali

- Microtube (Eppendorf) (1,5 mL)
- Yellow tip
- Blue tip

4.4 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini antara lain:

4.4.1 Isolasi DNA plasmid

- *Microsentrifugator (Jouan, A-14)*
- *Micropipet (Gilson) (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L)*
- *Vortex (Labinco, L46)*

4.4.2 PCR-site directed mutagenesis

- *Thermal cycler (Bio Rad, 10431)*
- *Micropipet (Gilson) (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L)*
- *Microsentrifugator (Jouan, A-14)*

4.4.3 Elektroforesis gel agarosa

- *Seperangkat alat elektroforesis agarosa (Gibco, 250)*
- *UV transluminator (Bio Rad, 465BR)*
- *Micropipet (Gilson) (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L)*

4.4.4 Transformasi

- *Waterbath (Gemyco, YCW-010)*
- *Shaker incubator (Sibata, RMS-225)*

4.4.5 Culture transforman

- *Laminar Air flow cabinet (Dalton, PAU-850BG)*

4.4.6 Sekuensing

- *Mesin sekuenser (Applied Biosystems, ABI PRIMS 310)*

4.4.7 Isolasi enzim β -xilosidase

- *Laminar airflow cabinet (Dalton, PAU-850BG)*
- *shaker Incubator (Sibata, RMS-225)*

4.4.8 Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase

- pH meter (*Metrohm*, 713)
- *Waterbath* (*Gemyco*, YCW-010)
- *Micropipet* (*Gilson*) (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L)

4.4.9 Uji stabilitas enzim β -xilosidase terhadap alkali

- *Waterbath* (*Gemyco*, YCW-010)
- *Micropipet* (*Gilson*) (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L)
- Spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu*, A1005)
- pH meter (*Metrohm*, 713)

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium *Proteomic* dan *Gastroenteritis* *Institut of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya.

4.5.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret 2009 -Desember 2009

4.6 Persiapan Penelitian

4.6.1 Isolasi DNA plasmid pETxy12

4.6.1.1 Pembuatan media inokulum

NaCl sebanyak 1 gram, 1 gram tripton, 0,5 gram *yeast extract*, ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu *Erlenmeyer*

250 mL. Campuran ditambahkan aquades 100 ml kemudian ditutup lalu di sterilisasi dengan *autoclave*.

4.6.2 PCR-site directed mutagenesis

Dilakukan pengenceran *primer* dari stok primer dengan konsentrasi 100 μ M menjadi larutan kerja dengan konsentrasi 0,5 μ M.

4.6.3 Elektroforesis Gel Agarosa

4.6.3.1 Pembuatan *buffer* TBE 10X pH 8

Tris sebanyak 54 gram, 27,7 gram asam borat, dan 3,722 gram Na₂EDTA ditimbang, kemudian dicampur dalam gelas beker 1 liter, selanjutnya dilarutkan dengan 1 liter aquades kemudian *diautoclave*.

4.6.3.2 Pembuatan *buffer* TBE 0,5X pH 8

Buffer TBE 10X dipipet sebanyak 1 mL kemudian diencerkan dengan aquades steril sebanyak 19 mL, sehingga total volume menjadi 20 mL.

4.6.3.3 Pembuatan gel agarosa

Agarosa sebanyak 0,2 gram ditimbang kemudian dilarutkan dengan penambahan 20 ml *buffer* TBE 0,5X sambil dipanaskan sampai bubuk agarosa larut sempurna. Larutan agarosa dituang ke dalam cetakan dan ditunggu sampai membeku.

4.6.4 Transformasi

4.6.4.1 Pembuatan media LB (Luria Bertani)

NaCl sebanyak 1 gram, 1 gram tripton, 0,5 gram *yeast extract*, ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu Erlenmeyer 250

ml. Campuran ditambahkan aquades 100 ml kemudian ditutup lalu di sterilisasi dengan *autoclave*.

4.6.4.2 Pembuatan media padat

NaCl sebanyak 1 gram, 1 gram tripton, 0,5 gram *yeast extract*, dan 2 gram *bacto agar* ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Pada campuran ditambahkan *aquades* 100 ml kemudian ditutup lalu di sterilisasi dengan *autoclave*. Setelah steril dan suhunya sekitar 50°C, pada media lalu ditambahkan larutan ampicillin 100 µl (100 mg/ml), kemudian dituang ke dalam 5 cawan Petri steril masing-masing sebanyak 20 ml dan dibiarkan membeku.

4.6.4.3 Pembuatan sel kompeten

Sel kompeten dibuat dengan cara menumbuhkan terlebih dahulu 5 ml sel inang *E.coli* dalam *shaker* inkubator 37°C selama 16-18 jam. Sebanyak 0,5 ml suspensi sel yang sudah tumbuh dimasukkan ke dalam media LB 50 ml, kemudian di *shaker* sampai OD_{600nm} = 0,4. Sebanyak 1 ml suspensi sel tersebut dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml, lalu di *centrifuge* 1 menit ,12000 *rpm*. Supernatan dibuang, pelet sel dilarutkan dengan 50 µl 0,1 M CaCl₂ dingin, kemudian ditaruh di *icebath* selama 30 menit. Campuran disentrifugasi 12000 *rpm*, 1 menit, kemudian supernatan dibuang dan pelet sel dilarutkan dengan 50 µl campuran 0,1 M CaCl₂ + 14,5% glicerol.

4.6.5 Isolasi DNA plasmid

Isolasi DNA plasmid menggunakan kit (*Qiagen*), sehingga reagen – reagen yang dipakai sudah tersedia pada kit. Metoda isolasi terdapat pada protokol yang disediakan oleh kit. Uraian metoda isolasi DNA plasmid

terdapat pada lampiran 1 halaman 81. Koloni bakteri yang dipilih untuk diisolasi DNANYA adalah koloni bakteri yang tumbuh di media padat yang mengandung ampicillin, karena plasmid yang dipakai yaitu pET101/DTOPO memiliki gen resisten ampicillin.

4.6.6 Sekuensing

Sekuensing merupakan metoda pengurutan nukleotida pada molekul DNA. Pada penelitian ini sekuensing dilakukan menggunakan *primer* T7 yaitu *forward* atau *reverse* dengan urutan sebagai berikut:

reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

forward: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

4.6.7 Isolasi Enzim β -xilosidase

4.6.7.1 Pembuatan media produksi

NaCl sebanyak 2 gram, 2 gram tripton, 1 gram *yeast extract*, ditimbang, selanjutnya dicampur menjadi satu dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Campuran ditambahkan *aquades* 200 ml kemudian ditutup lalu di sterilisasi dengan *autoclave*.

4.6.8 Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase

4.6.8.1 Pembuatan *buffer* phosfat sitrat

Dibuat larutan A yang mengandung asam sitrat 0,1 M (1,92 gram dalam 100 mL) dan larutan B yang berisi Na_2HPO_4 0,2 M (5,37 gram dalam 100 mL). Campuran X mL larutan A ditambah Y mL larutan B kemudian diencerkan dengan akuades sampai volume 100 mL. Untuk mendapatkan *buffer* dengan pH tertentu seperti tabel di bawah ini:

X(mL)A	Y(mL)B	pH
24,3	25,7	5
17,9	32,1	6

4.6.8.2 Pembuatan *buffer* fosfat

Dibuat larutan A yang mengandung 0,2 M NaHPO₄ (27,8 g dalam 1 liter), dan larutan B yang mengandung 0,2 M Na₂HPO₄ · 7H₂O (27,8 g dalam 1 liter). Untuk mendapatkan *buffer* dengan pH tertentu, campurannya seperti tabel berikut:

X(mL)A	Y(mL)B	pH
39	61	7
5,3	94,7	8

4.6.8.3 Pembuatan *buffer* glisin-NaOH

Dibuat larutan A yang mengandung 0,2 M glisin (15,01 g dalam 1 liter), dan larutan B yang mengandung 0,2 M NaOH. Untuk mendapatkan *buffer* dengan pH tertentu, campurannya seperti tabel berikut:

X(mL)A	Y(mL)B	pH
50	8,8	9
50	32	10

4.6.8.4 Pembuatan larutan substrat pNP-xilopiranosida

Substrat p-nitrophenol-xilopiranosida ditimbang sebanyak 2,71 mg kemudian dilarutkan dengan 10 ml *buffer* fosfat sitrat pH 7. Proses penimbangan substrat dilakukan lagi sebanyak lima kali untuk membuat substrat dengan pH 5, 6, 8, 9, dan 10.

4.7 Pelaksanaan Penelitian

4.7.1 Isolasi DNA plasmid pETxyl2

DNA plasmid pETxyl2 diisolasi dari dari *E. coli* TOP 10 menggunakan *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* sesuai dengan petunjuk yang tercantum pada lampiran 1 halaman 81. DNA hasil isolasi kemudian dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran DNA plasmid pETxyl2 sirkuler adalah sebesar 7289 bp. Kemurnian DNA yang diperoleh diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, jika rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dengan 280 lebih atau sama dengan 1,8 menunjukkan bahwa tidak terdapat protein pengotor pada DNA, tetapi jika kurang dari rasio tersebut menunjukkan bahwa DNA masih ada pengotor seperti protein (Brown, 2004). DNA hasil isolasi selanjutnya dicek dengan pemotongan enzim restriksi *EcoRV*. Komposisi campuran untuk pelaksanaan restriksi dengan enzim *EcoRV* sebagai berikut:

<i>Distilled water</i>	: 7,5 μ L
<i>Buffer</i>	: 1 μ L
Sampel	: 1 μ L
Enzim <i>EcoRV</i>	: 0,5 μ L

Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37^oC selama 1 jam, kemudian dielektroforesis gel agarosa 1%. Sisi pemotongan enzim restriksi *EcoRV* pada urutan 545 da 4775. Hasil restriksi yang benar menunjukkan ukuran pita 4230 bp dan 3059 bp.

4. 7. 2 PCR-site directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis terhadap pETxyl2 dilakukan dengan teknik PCR menggunakan dua pasang *primer* DNA mutagenik untuk mutasi pada asam amino posisi 121 *primernya* adalah :

D121N: 5'-GGATTGATGGATGGGGAGGCATTAATCC-3' , dan

ID121N:5'-GGATTAATGCCTCCCCATCCATCAATCC-3'

Sedangkan untuk mutasi pada asam amino posisi 139 *primernya*:

D139N: 5'-CCGGGACAAATAATAATGCTAGGGGTG-3' dan

ID139N: 5'-CACCCCTAGCATTATIATTTGTCCCGG-3'

Huruf yang digarisbawahi menunjukkan nukleotida yang dimutasi. Pada penelitian ini mutasi dilakukan pada dua plasmid (pETxyl2), jadi proses PCR dilakukan sebanyak satu kali pada dua tabung PCR yang berbeda untuk masing-masing mutasi, sehingga dalam satu kali PCR terdapat dua kelompok sampel yaitu kelompok sampel ke satu untuk mutasi pada posisi 121 dan kelompok sampel ke dua untuk mutasi pada posisi 139. Masing-masing sampel dibuat duplo. PCR dilakukan dengan mencampurkan ke dalam tabung PCR 0,5 ml : 5 μ l dNTP *mix* (10 mM), *primer forward* 1 μ l (0,5 μ M), *primer reverse* 1 μ l (0,5 μ M), DNA cetakan 1 μ l (10 ng), *distilled water* 43 μ l, enzim *Taq DNA polymerase* 0,5 μ l (5U/ml). Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan ke mesin PCR. *PCR-site directed mutagenesis* dilakukan menggunakan kondisi PCR Sebagai berikut:

Pre denaturasi : 95⁰C, 2 menit

Denaturasi : 95⁰C, 30 detik

Annealing : 53⁰C, 30 detik

Elongasi : 72⁰C, 3 menit

Post elongasi : 72⁰C, 5 menit

PCR dilakukan sebanyak 20 siklus. Tahap selanjutnya adalah restriksi hasil PCR yaitu dengan cara menambahkan 1 μ l enzim *DpnI* kedalam hasil PCR lalu campuran diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1 jam, tujuannya adalah untuk memotong DNA cetakan pada posisi G^mATC dimana A termetilasi. Produk PCR selanjutnya dimurnikan dengan metoda seperti yang tercantum pada lampiran 2 halaman 82.

4.7.3 Transformasi ke sel kompeten *E.coli* TOP 10

Proses transformasi dilakukan dengan mencampurkan hasil PCR yang sudah direstriksi dengan enzim restriksi *Dpn I* ke dalam 50 μ L sel kompeten *E.coli* TOP 10. Campuran diinkubasi di es selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan menginkubasi campuran sel dalam *waterbath* pada suhu 42⁰C selama 30 detik, kemudian segera dipindah ke *icebath* selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan 0,5 ml media LB cair ke dalam masing-masing campuran sel, selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* suhu 37⁰C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media *agar plate* yang mengandung ampisillin, yaitu dengan cara memipet masing-masing 250 μ l suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media, lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 16 jam. Plasmid yang ada dalam sel inang *E.coli* Top 10 ditumbuhkan pada media agar LB (Luria Bertani) yang mengandung ampisillin, karena pET101/DTOPO merupakan vektor yang memiliki gen resisten terhadap ampisillin sedang inang *E.coli* TOP 10 tidak memiliki gen resisten terhadap ampisillin

4.7.4 Isolasi DNA plasmid dari *E. coli* TOP 10

Transforman yang tumbuh dari hasil transformasi ke sel inang *E. coli* TOP 10, dipilih 10 koloni tunggal secara acak masing-masing untuk mutasi pada D121N dan D139N. Sebanyak satu ose koloni ditumbuhkan ke dalam 10 ml media LB cair yang mengandung ampicillin, kemudian diinkubasi dalam *shaker inkubator* pada suhu 37°C selama 16 jam. DNA plasmid diisolasi dari *E. coli* TOP 10 menggunakan *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* sesuai prosedur pada lampiran 1 halaman 81.

DNA hasil isolasi kemudian dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran DNA plasmid sirkuler adalah sebesar 7289 bp, dan setelah elektroforesis akan tampak pita yang sejajar dengan marker di posisi 7000 bp. Hasil isolasi DNA plasmid selanjutnya direstriksi dengan enzim restriksi *EcoRV* untuk mengecek ukuran plasmid.

Komposisi campuran untuk pelaksanaan restriksi dengan enzim *EcoRV* sebagai berikut:

<i>Distilled water</i>	: 7,5 μ L
<i>Buffer</i>	: 1 μ L
Sampel	: 1 μ L
Enzim <i>EcoRV</i>	: 0,5 μ L

Campuran dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian dielektroforesis gel agarosa 1%. Hasil restriksi yang benar menunjukkan ukuran pita 4230 bp dan 3059 bp. Proses ini hanya untuk mengecek ukuran DNA sampel.

Tahap selanjutnya adalah sekuensing. Hasil sekuensing dianalisa untuk menentukan proses transformasi ke sel inang *E. coli* BL21 *Star*.

4.7.5 Sekuensing

4.7.5.1 Labeling dengan proses PCR

DNA plasmid pETxyl2 yang masih sirkular dan akan disekuensing, terlebih dahulu dimurnikan menggunakan kit dari *Qiagen*. Metoda pemurnian terdapat pada lampiran 2 halaman 82. DNA plasmid pETxyl2 yang sudah dimurnikan tersebut selanjutnya dicampur dengan komposisi reagen:

- *big dye terminator ready reaction mix* : 4 μ l
- cetakan : 1 μ l (150-300 ng)
- *primer (forward atau reverse)*: 1 μ l (3,2 pmol)
- *distilled water* : 4 μ l
- total volume : 10 μ l

Urutan primer T7 untuk sekuensingnya adalah:

reverse: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

forward: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

Semua campuran dihomogenkan dengan penggunaan pipet secara perlahan kemudian dimasukkan ke mesin PCR dengan kondisi:

- *pre PCR* : 96⁰C : 1 menit
- denaturasi: 96⁰C: 10 detik
- annealing: 50⁰C : 5 detik
- elongasi : 60⁰C: 4 menit

Siklus PCR *labeling* dilaksanakan sebanyak 25 siklus.

4.7.5.2 Pemurnian hasil PCR *labeling*

Hasil PCR *labeling* selanjutnya dimurnikan dengan proses dipresipitasi, yaitu dengan penambahan 2 μ l EDTA 125 mM kemudian ditambahkan pula 2 μ l natrium asetat 3 M. Tahap selanjutnya adalah

penambahan 50 μ l etanol 100 % kemudian campuran dihomogenkan dengan membolak-balik tabung sebanyak 4X, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Tabung *dicentrifuge* dengan kecepatan 1500-2000 rpm selama 30 menit kemudian supernatannya dibuang. Selanjutnya ditambahkan etanol 70% dan *disentrifuge* kembali dengan kecepatan 1500-2000 rpm selama 15 menit, lalu supernatannya dibuang. Pelet DNA dikeringkan selama 15 menit.

4.7.5.3 Elektroforesis dengan mesin sekuenser

Untuk sekali proses sekuensing hanya menggunakan satu primer yaitu *forward* atau *reverse* saja, sehingga dengan adanya dua sampel yang akan disekuensing dalam penelitian ini dilakukan empat kali sekuensing.

Pelet DNA hasil pemurnian selanjutnya dilarutkan dengan 25 μ l HD *formamide*. Kemudian dipanaskan pada suhu 95⁰C selama 5 menit, lalu dipindahkan ke es 10 menit. Tahap selanjutnya adalah memindahkan campuran ke dalam tabung sekuensing kemudian dimasukkan ke mesin sekuenser.

4.7.6 Transformasi plasmid mutan pETxyl2 ke *E.coli* BL21 Star

Hasil analisis sekuensing yang menunjukkan terjadinya mutasi dilanjutkan dengan proses transformasi ke sel inang *E.coli* BL21 Star. Proses transformasi dilakukan dengan mencampurkan 3 μ L DNA plasmid yang masih sirkuler ke dalam 50 μ L sel kompeten *E.coli* BL21 Star. Campuran diinkubasi di es selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan menginkubasi campuran sel dalam *waterbath* pada suhu 42⁰C selama 30 detik, kemudian segera dipindah ke *icebath* selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan 0,5 ml media LB cair ke dalam masing-

masing campuran sel, selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* suhu 37°C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media *agar plate* yang mengandung ampicillin, yaitu dengan cara memipet masing-masing 250 µl suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Plasmid mutan yang ada dalam sel inang *E.coli* BL21 *Star* ditumbuhkan pada media agar LB yang mengandung ampicillin, (tahap ini sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya) karena pET101/DTOPO merupakan vektor yang memiliki gen resisten terhadap ampicillin sedang inang *E.coli* BL21 *Star* tidak memiliki gen resisten terhadap ampicillin.

4.7.7 Isolasi enzim β-xilosidase

Enzim β-xilosidase diproduksi dengan menumbuhkan plasmid mutan pada 50 mL media LB cair kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam dengan pengocokan 150 *rpm*. Sebanyak 2,5 mL biakan mutan yang sudah tumbuh tersebut dipindah ke dalam 250 mL LB cair yang sudah mengandung IPTG, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 6 jam dengan pengocokan 150 *rpm*. Enzim dipanen dengan mensentrifugasi biakan mutan pada kecepatan 10.000 *rpm* selama 10 menit, dimana enzim terdapat pada pellet sel. Pelet sel yang diperoleh dilarutkan dengan *buffer* posfat pH 7 kemudian selnya dipecah dengan sonikator. Sel yang sudah pecah tersebut disentrifugasi 10.000 *rpm* 10 menit kembali untuk mengisolasi enzimnya yang terdapat pada supernatan dan dipakai untuk analisis selanjutnya.

4.7.8 Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase

Pengukuran pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim yaitu dengan cara mencampur 100 μ L enzim dengan 300 μ L substrat *pNP-xilopiranosida* pada berbagai variasi pH yaitu dari pH 5,6 (*buffer* posfat sitrat), 7,8 (*buffer* posfat), 9, dan 10 (*buffer* glisin-NaOH), kemudian diinkubasi dalam *waterbath* suhu 50⁰C selama 30 menit.. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μ L Na₂CO₃ 0,4 M kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 405 nm. Sebagai kontrol digunakan campuran yang sama tetapi tanpa enzim dan enzim diganti dengan *aquades*. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μ mol produk (*p*-nitrofenol) per menit (Weng et al.,2005).

4.7.9 Uji stabilitas enzim β -xilosidase terhadap alkali

Stabilitas terhadap alkali enzim β -xilosidase diuji dengan cara menginkubasi enzim pada berbagai variasi pH yaitu dari pH 5,6 (*buffer* posfat sitrat), 7,8 (*buffer* posfat), 9, dan 10 (*buffer* glisin-NaOH), kemudian diinkubasi dalam *waterbath* suhu 50⁰C selama 1 jam. Setelah diinkubasi, pH enzim diatur ke pH optimumnya yang diketahui setelah pengukuran pH optimum, kemudian dilakukan uji aktivitas enzim. Stabilitas terhadap alkali enzim diketahui setelah dihitung aktivitas residu enzim .

Kurva standar *p*-nitrofenol dibuat pada konsentrasi berkisar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mM *p*-nitrofenol/mL dari stok *p*-nitrofenol 10 mM/ml dalam pelarut *buffer* posfat sitrat pH 7. Masing-masing sebanyak 100 μ L larutan

standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 100 μL *buffer* posfat sitrat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 50⁰ C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 μL Na_2CO_3 0,4 M. Absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada λ 405 nm.

Dari kurva standar *p*-nitrofenol akan diperoleh persamaan regresi linier:

$$y = ax + b$$

Unit aktivitas enzim akan dihitung menggunakan persamaan berikut:

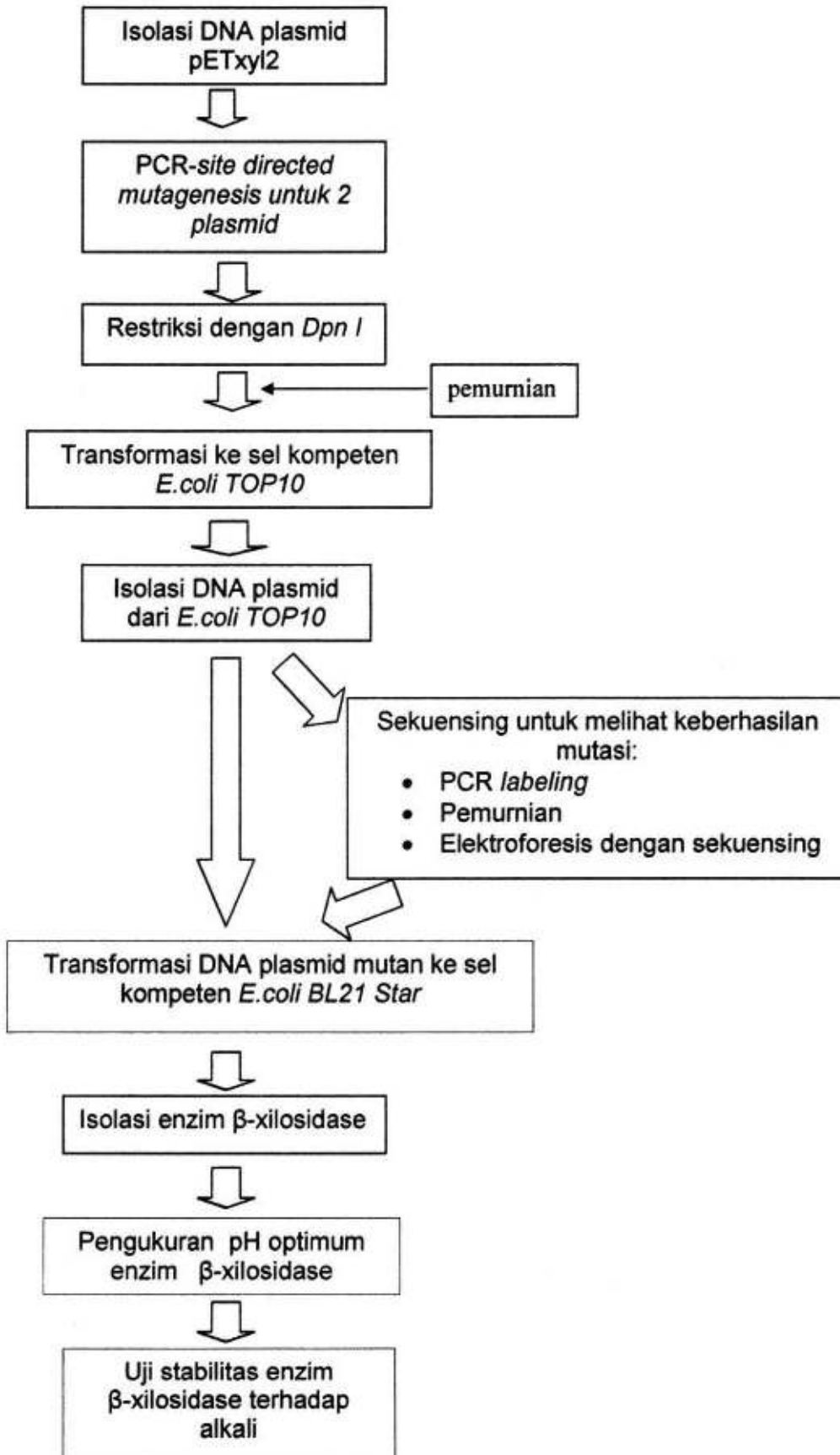
$$\text{Aktivitas} = \frac{\text{M x faktor pengenceran}}{\text{T}}$$

Keterangan:

M = Konsentrasi pNP- xilopiranosida (mM)

T = Waktu inkubasi (menit)

4.8 Kerangka operasional penelitian

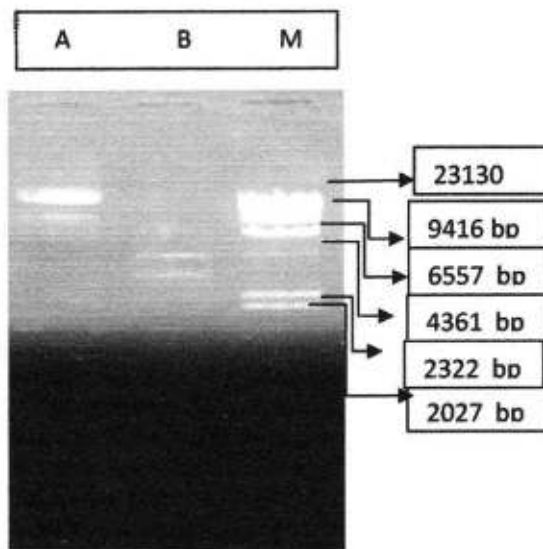


BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Isolasi DNA Plasmid pETxyl2

DNA plasmid pETxyl2 diisolasi dari sel inang *E.coli* TOP 10 menggunakan *Qiaquick miniprep spin kit* dari *Qiagen*. Hasil isolasi DNA plasmid selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi *EcoRV* kemudian dicek dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Fragmen DNA plasmid pETxyl2 hasil isolasi berada pada posisi yang sejajar dengan ukuran 7289 bp. Nilai ini berasal dari penjumlahan dari plasmid asalnya yaitu pET101/DTOPO sebesar 5753 bp dan insert sebesar 1536 bp. Titik potong enzim *EcoRV* terletak pada urutan nukleotida 545 dan 4775, sehingga hasil pemotongannya menghasilkan ukuran 4230 bp dan 3059 bp seperti yang dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1. Hasil isolasi dan restriksi pETxyl2 (M: marker *HindIII*, A: DNA plasmid pETxyl2 yang belum dipotong B: DNA plasmid pETxyl2 yang sudah dipotong dengan *EcoRV*)

5.2 PCR-Site Directed Mutagenesis

Proses *Site-Directed Mutagenesis* terhadap gen β -xilosidase dari pETxyl2 dilakukan dengan metoda PCR. Mutasi dilakukan terhadap dua titik dari urutan asam amino yaitu posisi 121 dan 132 dengan menggunakan primer mutagenik yaitu:

-D121N: 5'-GGATTGATGGATGGGGAGGCATTATCC-3'

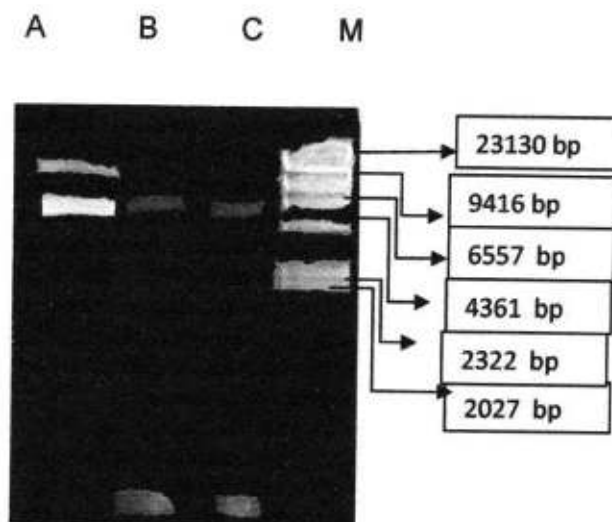
iD121N:5'-GGATTAATGCCTCCCCATCCATCAATCC-3'

-D139N: 5'-CCGGGACAAATAATAATGCTAGGGGTG-3'

iD139N: 5'-CACCCCTAGCATTATTATTTGTCCCGG-3'

Huruf yang digarisbawahi merupakan basa yang dimutasi pada *primer*.

Hasil elektroforesis produk PCR seperti terlihat pada gambar 5.2.



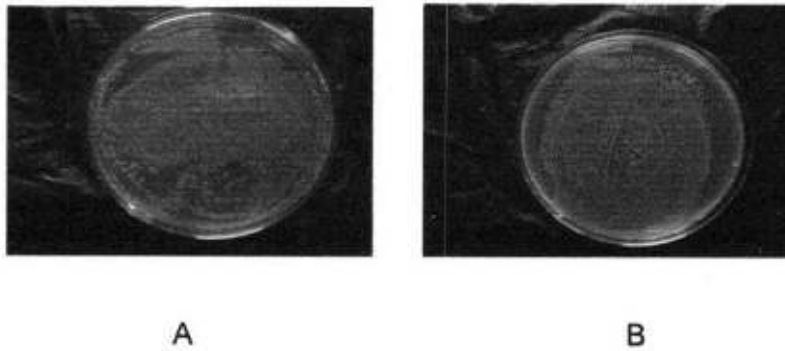
Gambar 5.2. Hasil elektroforesis produk PCR-site directed mutagenesis

(A: *template* pETxyl2, B: Hasil PCR D121N, C: Hasil PCR D139N, M: *marker* HindIII)

Produk PCR-*site directed mutagenesis* didegradasi dengan enzim *DpnI* selama 1 jam pada suhu 37°C, bertujuan untuk mendigest DNA cetakan pada posisi A yang termetilasi (G^mATC). Pada elektroforesis hasil restriksi tidak bisa dilihat adanya pita DNA, karena produk PCR *site directed mutagenesis* konsentrasinya rendah (gambar tidak ditampilkan).

5.3 Transformasi ke *E.coli* TOP 10

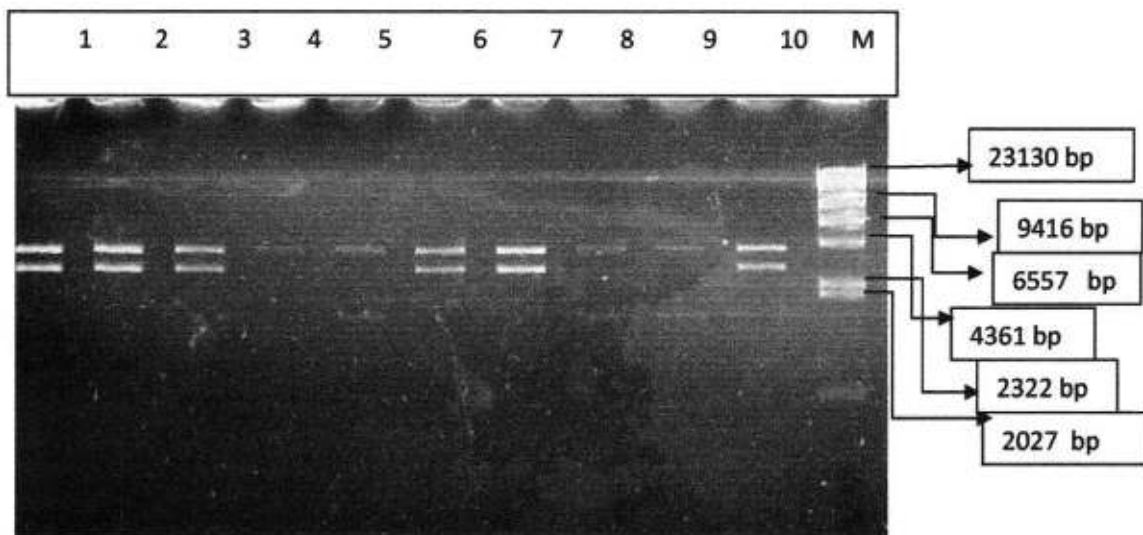
Produk PCR-*site directed mutagenesis* setelah dipotong dengan *DpnI*, selanjutnya ditransformasi ke sel kompeten *E.coli* TOP 10. Transformasi ini bertujuan untuk memperbanyak DNA plasmid. Transformasi berhasil jika terdapat koloni yang tumbuh pada media LB agar yang mengandung ampisillin. Hasil transformasi yang tumbuh pada media LB agar ampisillin seperti ditunjukkan pada gambar 5.3



Gambar 5.3. *Culture* hasil transformasi produk PCR *site directed mutagenesis* kedalam sel inang *E.coli* TOP 10 pada media LB agar ampisillin (A : D121N, B : D139N)

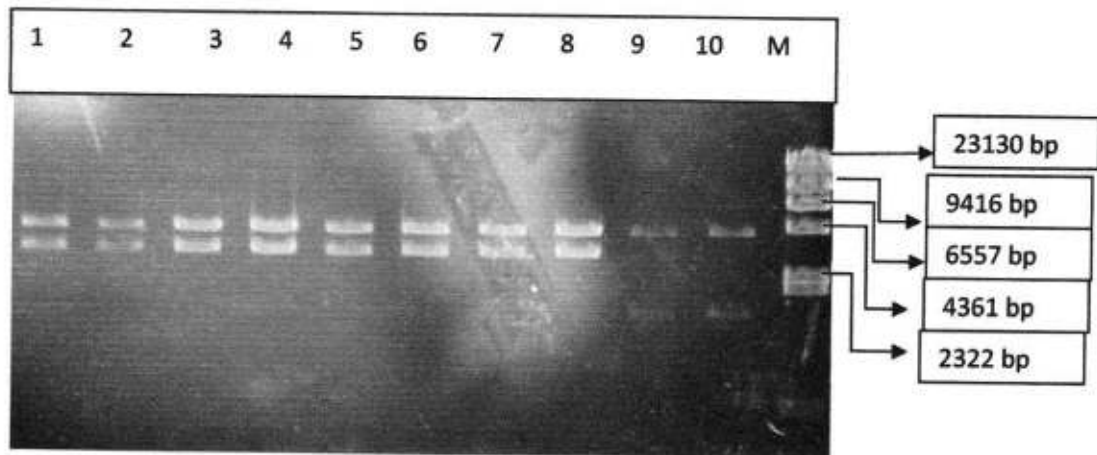
5.4 Isolasi DNA plasmid

Sebanyak masing-masing 10 koloni dari transforman untuk mutasi pada D121N dan D139N dipilih secara acak untuk diisolasi DNA plasmidnya menggunakan *qiaquick miniprep spin kit* dari *Qiagen*. Hasil isolasi dianalisis dengan memotong DNA dengan enzim restriksi *EcoRV*. Titik potong enzim ini terletak pada nukleotida urutan 545 dan 4775 sehingga menghasilkan fragmen positif berukuran 4230 bp dan 3059 bp seperti terlihat pada gambar 5.4. dan 5.5.



Gambar 5.4 Hasil pemotongan DNA plasmid pETxyl2 untuk mutasi pada D121N dengan *EcoRV* (1-10: Hasil restriksi dengan *EcoRV*, M: marker *HindIII*)

Berdasarkan hasil restriksi pada Gambar 5.4 menunjukkan bahwa untuk mutasi pada D121N terdapat 6 koloni yang menghasilkan 2 pita dengan ukuran yang sesuai setelah direstriksi dengan enzim *EcoRV* yaitu pada urutan 1, 2, 3, 6, 7, dan 10



Gambar 5.5 Hasil pemotongan DNA plasmid pETxyl2 untuk mutasi pada D139N dengan *EcoRV* (1-10: Hasil restriksi dengan *EcoRV*, M: marker *HindIII*)

Berdasarkan hasil restriksi pada Gambar 5.5 menunjukkan bahwa untuk mutasi pada D139N terdapat 8 koloni yang menghasilkan 2 pita dengan ukuran yang sesuai setelah direstriksi dengan enzim *EcoRV* yaitu pada urutan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8.

5.5 Sekuensing

Analisis mutasi yang terjadi dapat dilakukan sekuensing DNA plasmid untuk mutasi pada D121N dan D139N. Sekuensing dilakukan menggunakan primer T7 *reverse* atau *forward* pada dua tabung yang berbeda. Dengan adanya dua sampel, jadi didapatkan empat hasil sekuensing. Hasil sekuensing yang menggunakan *primer reverse*, dikomplemenkan terlebih dahulu, selanjutnya digabung dengan hasil sekuensing untuk *primer forward* sehingga diperoleh sekuen secara keseluruhan. Hasil sekuen selanjutnya dihomologikan dengan sekuen setakan (pETxyl2) untuk mengetahui ada tidaknya mutasi yang terjadi.

Dari hasil homologi dengan sekuen cetakan, didapatkan terjadi mutasi pada urutan asam amino 139 (Lampiran 4, halaman 85), sedangkan untuk asam amino 121 tidak ditemukan adanya mutasi (Lampiran 3, halaman 83).

5.6 Transformasi Plasmid Mutan pETxyl2 (D139N) ke *E.coli* BL21 Star

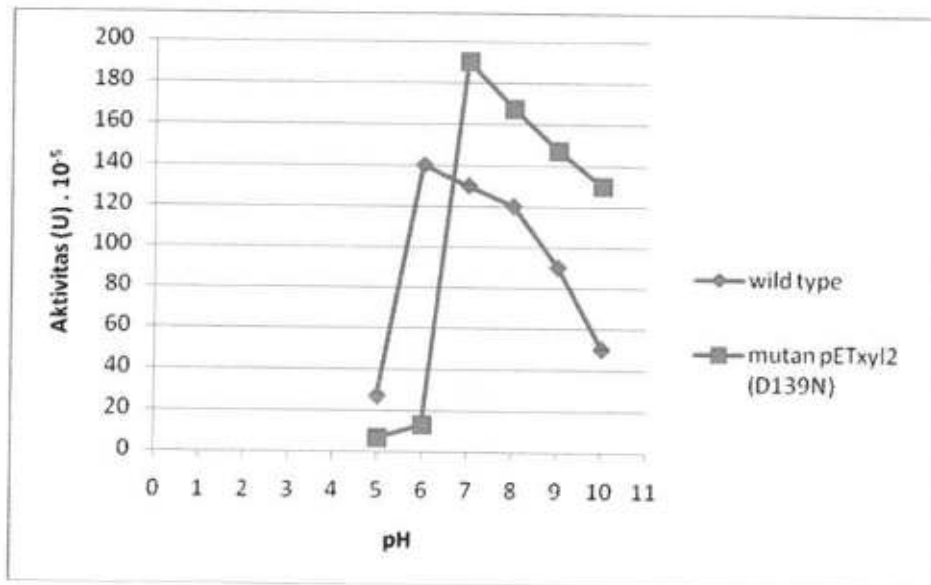
Transformasi plasmid mutan pETxyl2 (D139N) ke sel kompeten *E.coli* BL21 Star bertujuan untuk melihat ekspresi dari mutan, karena *E.coli* BL21 Star merupakan *host* untuk ekspresi gen. Hasil transformasi menunjukkan pertumbuhan koloni setelah diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37⁰C pada media agar yang mengandung ampisillin.



Gambar 5.6 Hasil transformasi plasmid pETxyl2 yang mengandung mutasi D139N ke dalam sel inang *E.coli* BL21 Star.

5.7 Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase dari *wild type* dan mutan pETxyl2 (D139N)

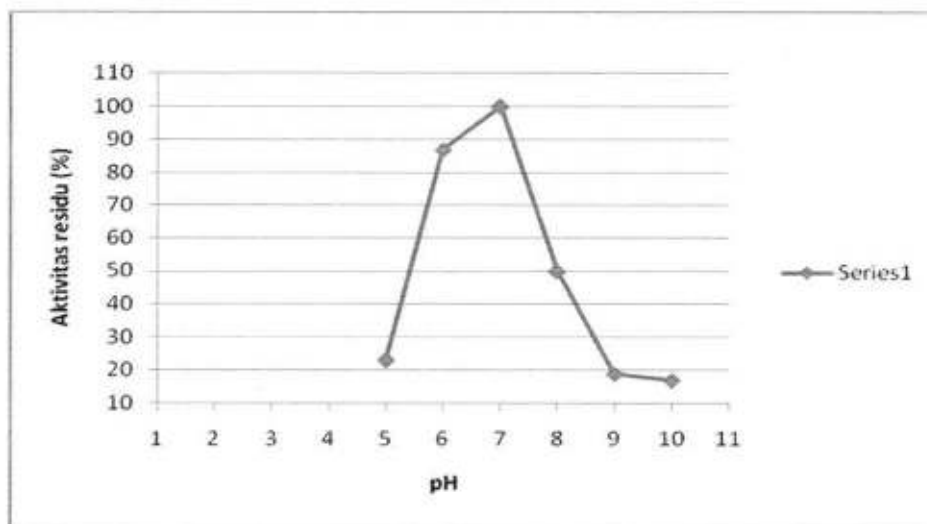
Berdasarkan hasil penelitian pada pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase menunjukkan bahwa pH optimum enzim β -xilosidase dari plasmid mutan pETxyl2 (D139N) adalah 7 dengan aktivitas sebesar $190 \cdot 10^{-5}$ unit (lampiran 6 hal 89), sedangkan enzim β -xilosidase yang berasal dari *wild type* memiliki aktivitas optimum pada pH 6 dengan aktivitas sebesar $140 \cdot 10^{-5}$ unit (Lampiran 7 hal 93). Grafik dari pengukuran pH optimum seperti pada gambar 5.7.



Gambar 5.7 Grafik hasil pengukuran pH optimum *wild type* dan mutan pETxyl2 (D139N)

5.8 Uji Stabilitas Terhadap Alkali Enzim β -xilosidase

Stabilitas pH ditentukan dengan mengatur enzim pada pH 4 sampai 10 menggunakan pH meter, kemudian enzim diinkubasi pada suhu optimum yaitu 50°C selama 1 jam. Selanjutnya masing-masing enzim pada variasi pH tersebut diatur ke pH optimum dari mutan yaitu pH 7 untuk mutasi D139N, kemudian diukur aktivitasnya. Aktivitas residu enzim dari mutan pETxyl2 (D139N) seperti grafik dibawah ini.



Gambar 5.8 Aktivitas residu enzim β -xilosidase dari mutan pETxyl2 (D139N)

Berdasarkan hasil penelitian, dari pengukuran stabilitas terhadap alkali enzim β -xilosidase dari mutan pETxyl2 (D139N) diperoleh data bahwa enzim tersebut memiliki stabilitas pada rentang pH 6-8. Dari grafik pada gambar 5.8 dapat dilihat bahwa enzim memiliki aktivitas residu 50% keatas adalah pada pH 6 - 8

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Isolasi dan Restriksi DNA Plasmid pETxyl2

Pada penelitian ini menggunakan DNA plasmid rekombinan yang diisolasi dari pETxyl2 (*E.coli* TOP 10) yang berasal dari penelitian sebelumnya (Puspaningsih, 2003). Hasil isolasi DNA plasmid, sebelum digunakan untuk mutasi dicek terlebih dahulu dengan melakukan pemotongan menggunakan enzim restriksi *EcoRV*, selanjutnya dielektroforesis gel agarosa 1 %. Plasmid rekombinan menunjukkan ukuran 7289 bp, karena merupakan gabungan dari plasmid asalnya yaitu pET101/DTOPO yang berukuran 5753 bp, dan DNA insert yang berukuran 1536 bp, selanjutnya DNA pETxyl2 dipotong dengan enzim restriksi. Enzim yang digunakan sebagai enzim restriksi yaitu enzim endonuklease. Terdapat tiga jenis enzim endonuklease yaitu tipe I, II, III. Enzim endonuklease tipe I memotong tidak spesifik, sedangkan enzim restriksi endonuklease tipe II paling sering digunakan dalam kloning gen dan mempunyai ciri utama (1) tidak memotong daerah termetilasi, (2) pemotongan terjadi pada ikatan fosfodiester, (3) memotong DNA pada urutan yang bersifat palindrom, (4) pemutusan hidrolitik dua rantai DNA oleh enzim ini terjadi pada pengenalannya sehingga dapat menghasilkan ujung tumpul atau ujung lengket di mana ujung 3' akan membawa gugus –OH, sedangkan ujung 5' akan membawa gugus posfat. Endonuklease tipe III mempunyai titik pengenalan yang jauh dengan titik pemotongan.

Enzim restriksi *EcoRV* yang digunakan dalam penelitian ini termasuk ke dalam enzim endonuklease tipe II (Promrose and Old, 2003).

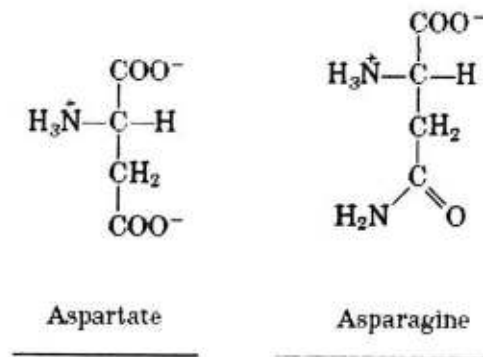
Pemilihan enzim restriksi *EcoRV* pada penelitian ini karena enzim ini dikenali oleh plasmid yang akan direstriksi, serta enzim tidak memiliki sisi pemotongan pada gen target. Enzim *EcoRV* memotong plasmid pada posisi 545 dan 4775 menghasilkan menjadi dua fragmen berukuran 4230 bp dan 3059 bp (Gambar 5.1 halaman 59).

6.2 PCR-Site Directed Mutagenesis

Peningkatan stabilitas alkali β -xilosidase dari pETxyl2 dilakukan dengan *site directed mutagenesis*. *Site directed mutagenesis* merupakan suatu metoda yang memungkinkan untuk mengubah satu atau lebih pasang basa pada gen yang diinginkan (Madigan dan Martinko, 2006). Prinsip dasar dari metoda ini adalah penggunaan *primer* yang mengandung perubahan basa yang diinginkan dan masih dapat berpasangan dengan gen target. *Primer* akan menempel komplementer dengan gen cetakan kecuali pada daerah yang termutasi. Pada penelitian ini urutan asam amino yang dimutasi adalah pada urutan 121 dan 139. Perubahan asam aminonya adalah dari asam aspartat menjadi asparagin. Asparagin merupakan asam amino yang bersifat polar. Rantai samping asparagin berupa gugus amida (gambar 6.1) membuat asparagin lebih mudah larut dalam air (hidrofilik), dan juga dapat membentuk ikatan hidrogen dengan air (Nelson, 2005). Sifat dari rantai samping asparagin

tersebut memungkinkan proses katalitik dapat berlangsung pada suasana basa (Kim et al., 2008).

Posisi asam amino tersebut dipilih untuk mutasi karena berdasarkan *alignment sequence* asam amino dari pETxyl2 dengan beberapa strain yang ada di database diperoleh daerah yang *conserve*. Daerah *conserve* merupakan daerah yang memiliki urutan yang sama pada suatu sekuen nukleotida, maupun asam amino dalam protein antara suatu mahluk hidup dengan mahluk hidup lainnya. Daerah tersebut bisa menunjukkan hubungan kekerabatan antar suatu organisme. Asam amino yang merupakan daerah *conserve* menyandakan protein yang memiliki fungsi yang sama antara satu organisme dengan organisme lainnya. Posisi mutasi asam amino pada urutan 121 dan 139, selain merupakan daerah lestari yang potensial untuk dimutasi, posisi tersebut berpengaruh terhadap struktur dan fungsi protein. Kedua residu asam amino tersebut merupakan katalitik domain yang berada di sekitar sisi aktif enzim. Urutan asam amino suatu protein berhubungan erat dengan struktur tiga dimensi protein tersebut, karena struktur tiga dimensi dapat menunjukkan fungsi biologis protein (Berg et al, 2003).



Gambar 6.1 Struktur asam aspartat dan asparagin (Nelson, 2005)

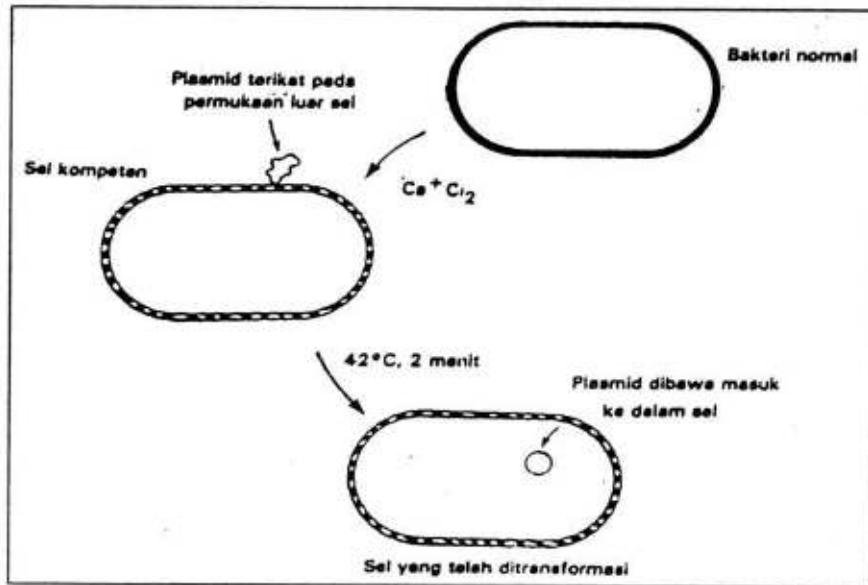
Proses *site directed mutagenesis* dilakukan dengan PCR pada plasmid pETxyl2 yang berbentuk sirkuler sehingga hasil PCR juga DNA yang berbentuk sirkular. Ukuran DNA plasmid pETxyl2 adalah sebesar 7289. Hasil PCR setelah dielektroforesis pada gel agarosa 1%, tidak menunjukkan posisi DNA sebesar 7289 bp (Gambar 5.2 halaman 60), karena DNA plasmid memiliki topologi yang bervariasi (sirkuler, superkoil, dan linier). Perbedaan topologi tersebut menyebabkan pergerakan didalam gel agarosa menjadi tidak sama (Madigan dan Martinko, 2006).

DNA hasil PCR selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi *DpnI*. *DpnI* merupakan salah satu contoh endonuklease restriksi yang mengenali urutan G^mATC dan menghasilkan fragmen dengan ujung tumpul. *DpnI* terlebih dahulu memerlukan proses metilasi pada residu adenin untuk aktivitasnya dan memotong urutan G^mATC (gambar 2.9 halaman 31). Proses metilasi Adenin dilakukan oleh *Deoxyadenosin methyltransferase* (Dam) yaitu suatu enzim yang secara spesifik memetilasi residu *deoxyadenosin* dari urutan 5'-GATC-3' di dalam DNA

sebagai upaya melindungi DNA. Proses metilasi ini merupakan proses alami dan sangat penting dalam hal replikasi DNA serta regulasi ekspresi gen (Alonso *et al.*, 2005). DNA yang diisolasi dari hampir semua strain *E.coli* telah mengalami metilasi sehingga pemotongan DNA cetakan oleh *DpnI* menyebabkan yang tersisa hanyalah DNA mutan hasil amplifikasi (Invitrogen, 2006).

6.4 Transformasi ke *E.coli* TOP 10

Analisis adanya mutasi dapat dilakukan setelah DNA plasmid pETxyl2 hasil PCR ditransformasi ke sel *E.coli* TOP 10 sebagai inangnya. Sel inang ini merupakan sel inang yang khusus dirancang untuk penggandaan dan penyimpanan plasmid rekombinan. Sel inang *E.coli* TOP 10 sebelum dipakai untuk transformasi, terlebih dahulu diperlakukan secara fisik atau kimiawi yaitu dengan penambahan CaCl_2 sehingga akan memudahkan untuk masuknya DNA dari luar sel bakteri. Sel Bakteri diperlakukan dengan penambahan CaCl_2 yang berfungsi melemahkan dinding sel sehingga memudahkan masuknya plasmid rekombinan ke dalam sel bakteri (Gambar 6.2). Sel-sel yang telah mengalami perlakuan ini disebut sebagai sel kompeten (Brown, 2004).



Gambar 6.2 Pengikatan dan pengambilan plasmid oleh sel kompeten dengan metoda CaCl_2 (Brown, 2004)

Proses transformasi diawali dengan mencampurkan plasmid rekombinan dengan sel kompeten *E.coli* TOP 10 dan ditempatkan dalam wadah es yang bertujuan untuk membuat plasmid berada dekat/menempel pada dinding sel kompeten *E.coli* TOP 10. *Heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 30 detik bertujuan untuk membuat kejutan sehingga plasmid rekombinan yang telah menempel pada dinding sel masuk ke dalam sel kompeten *E.coli* TOP 10. Campuran langsung dimasukkan ke dalam wadah berisi es segera setelah *heat shock* bertujuan untuk mencegah plasmid yang sudah masuk ke dalam sel kompeten *E.coli* TOP 10 keluar kembali. (Brown, 2004).

Di dalam sel inang *E.coli* TOP 10, plasmid mutan diperbanyak jumlahnya. Plasmid mutan yang ada dalam sel inang *E.coli* Top 10 ditumbuhkan pada media agar LB yang mengandung ampisillin, karena

pETxyl2 merupakan plasmid rekombinan yang memiliki gen resisten terhadap ampicillin sedang inang *E.coli* TOP 10 tidak memiliki gen resisten terhadap ampicillin. Plasmid yang tumbuh dikarakterisasi dengan mengisolasi DNANYa masing-masing sebanyak 10 koloni tunggal untuk mutasi yang diharapkan (D121N dan D139N), selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi *EcoRV*. Hasil restriksi dari 10 koloni untuk mutasi pada D121N menunjukkan ukuran sesuai adalah nomor 1, 2, 3, 6, 7, dan 10, kemudian dipilih salah satu untuk disekuensing, sedangkan hasil restriksi dari 10 koloni untuk mutasi pada D139N menunjukkan ukuran sesuai adalah nomor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,dan 8, kemudian dipilih salah satu untuk disekuensing.

6.6 Sekuensing Plasmid pETxyl2 untuk Mutasi pada D121N dan D139N

Adanya mutasi dapat diketahui dengan melakukan sekuensing terhadap DNA plasmid yang diisolasi dari sel inang *E.coli* TOP 10. Proses sekuensing dilakukan menggunakan primer T7 *reverse* dan *forward*, karena pETxyl2 yang digunakan pada penelitian ini berasal dari plasmid pET101/DTOPO yang didesain mempunyai terminal T7 sehingga bisa mengangkat gen insert secara utuh (Invitrogen, 2006). Hasil sekuensing dianalisis menggunakan program *needle* dari situs <http://www.ebi.ac.uk> dengan cara menyusun *alignment* hasil sekuensing dengan *wild type* (pETxyl2). Hasil *alignment* menunjukkan terjadi mutasi pada kodon asam amino 139, dengan perubahan nukleotida G menjadi A sehingga asam

amino yang disandikan dapat diprediksi berubah dari asam aspartat (kodon GAU) menjadi asparagin (AAU), sedangkan untuk asam amino posisi 121 tidak ditemukan mutasi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh posisi nukleotida yang dimutasi berada dekat dengan ujung 3' dari primer yang disintesis. Hasil alignment ditunjukkan pada lampiran 3 dan 4 halaman 83 dan 85.

6.7 Transformasi Plasmid Mutan pETxyl2 (D139N) ke *E.coli* BL21 Star

Konsekuensi dari mutasi yang terjadi dilihat dari aktivitas enzim β -xilosidase yang diekspresikan oleh gen target yang dibawa plasmid mutan pETxyl2 (D139N). Ekspresi tersebut bisa diketahui dengan mentransformasi mutan pETxyl2 (D139N) ke sel inang *E.coli* BL21 Star, karena di dalam sel inang ini terdapat promotor T7 yang berperan dalam kontrol ekspresi gen. *T7 RNA polymerase* secara spesifik mengenali promotor T7 tersebut, sehingga selanjutnya akan berikatan dengan promotor dan mentranskripsi gen target (Invitrogen, 2006). Proses transformasi pada sel inang ini memiliki tahapan yang sama seperti pada *E. coli* TOP 10. Penelitian menunjukkan, bahwa selalu terdapat ekspresi basal dari T7 RNA polymerase yang berasal dari promotor lac UV5 meskipun tanpa kehadiran induser. Hal ini merupakan suatu masalah jika gen target bersifat toksik terhadap sel inang *E.coli*, karena ekspresi basal dari gen target bisa memicu ketidakstabilan plasmid, bahkan kematian sel. Oleh karena itu, penyimpanan plasmid rekombinan tidak bisa didalam sel

inang *E.coli* BL21 *Star* tetapi di dalam *E.coli* TOP 10 karena *E.coli* TOP 10 tidak memiliki T7 RNA polymerase sehingga aman untuk penyimpanan plasmid rekombinan (Invitrogen, 2006). Mutasi yang terjadi pada pETxyl2 adalah perubahan yang terjadi pada tingkat genetik sehingga turunannya juga akan membawa mutasi. Akan tetapi mutasi tersebut bisa saja bersifat tidak stabil, karena secara alami suatu organisme akan berusaha untuk mengembalikan suatu perubahan jika hal tersebut merugikan bagi organisme yang bersangkutan.

6.8 Pengukuran pH optimum enzim β -xilosidase dari *wild type* dan mutan pETxyl2 (D139N)

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: suhu, konsentrasi substrat, dan pH (Wilson dan Walker, 2005). Dari hasil penelitian diperoleh bahwa enzim β -xilosidase dari plasmid mutan pETxyl2 (D139N) memiliki aktivitas optimum pada pH 7 (gambar 5.7 halaman 65) dengan aktivitas sebesar $190 \cdot 10^{-5}$ unit, sedangkan enzim β -xilosidase yang berasal dari *wild type* memiliki aktivitas optimum pada pH 6 dengan aktivitas sebesar $140 \cdot 10^{-5}$ unit. Pada pH 6 aktivitas enzim β -xilosidase dari mutan pETxyl2 (D139N) sebesar $13,3 \cdot 10^{-5}$ unit. Turunnya aktivitas enzim β -xilosidase pada pH 6 setelah dimutasi disebabkan oleh perubahan struktur protein enzim. Adanya penggantian salah satu asam amino pada katalitik domain menyebabkan struktur protein enzim berubah dan mempengaruhi fungsinya dalam proses pengikatan substrat. Dalam hal ini belum diketahui secara jelas

bagaimana pengaruh mutasi tersebut terhadap struktur protein enzim karena pada penelitian ini tidak dilakukan kristalisasi untuk mengetahui struktur protein enzim.

6.8 Uji Stabilitas Enzim β -xilosidase dari mutan pETxyl2 (D139N) terhadap alkali

Stabilitas dari enzim diketahui dengan menentukan aktivitas residu enzim. Dari gambar 5.8 halaman 63 dapat diketahui bahwa enzim memiliki aktivitas residu 50% keatas adalah pada pH 6 - 8, hal ini menunjukkan bahwa enzim memiliki stabilitas terhadap pH pada rentang 6 - 8, dan stabilitas terhadap alkali (pH>8) kurang dari 50%, sedangkan enzim yang berasal dari *wild type* memiliki stabilitas pH pada 5 - 7 (Puspaningsih, 2003). Aktivitas residu merupakan aktivitas sisa yang masih dimiliki oleh enzim setelah diinkubasi pada kondisi tertentu tanpa adanya substrat. Belum tercapainya kondisi stabilitas enzim β -xilosidase dari mutan pETxyl2 (D139N) terhadap alkali dapat disebabkan oleh masih ada asam amino yang belum dimutasi. Selain itu, pada penelitian hanya dilakukan mutasi tunggal pada satu plasmid. Untuk mengetahui pengaruh stabilitas enzim terhadap alkali, *multiple* mutasi perlu dilakukan. Aplikasi di industri terutama industri pabrik kertas memerlukan enzim yang stabil pada pH>8, sehingga enzim yang diperoleh pada penelitian ini belum bisa diterapkan pada pabrik kertas. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melakukan mutasi pada posisi asam amino yang lain sehingga bisa menghasilkan enzim yang memiliki kestabilan terhadap pH>8.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Dalam penelitian ini dengan metoda *site directed mutagenesis* tidak berhasil didapatkan mutan pETxyl2 dengan mutasi pada asam amino 121.
2. Dengan metoda *site directed mutagenesis* didapatkan mutan pETxyl2 dengan mutasi pada asam amino 139.
3. Sehubungan dengan tidak berhasilnya mutasi pada asam amino 121, maka tidak dapat ditentukan stabilitas enzim β -xilosidase dari pETxyl2.
4. Enzim β -xilosidase dari mutan pETxyl2 (D139N) memiliki aktivitas optimum pada pH 7 dengan stabilitas pH pada 6-8.

7.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mutasi pada posisi asam amino yang lain, baik pada primer yang berbeda maupun asam amino yang berbeda dengan penelitian ini, sehingga didapatkan mutan yang mengekspresikan enzim β -xilosidase yang memiliki stabilitas terhadap pH >8.

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso, A, Pucciarelli, M G, Bossi, F G, Portillo, F. 2005. Increased Exicision of the Salmonella Prophage ST64B Caused by a Defisiensi in Dam Methylase. *J Bacteriology*. 7901-7911
- Beg, QKM, Kapoor, L, Mahajan, G. Hoondal, S. 2001. Microbial Xylanase from the Newly Isolated *Bacillus sp.* Strain BP-23. *Can J Microbiol* 39:1162-1166.
- Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L., 2003, *Biochemistry*, Fifth Edition, United States of America.(189-221)
- Bravman, T, Zolotnitsky G, Belakhov, V, Shoham G, Henrisat, B, Baasov, T, Shoham, Y. 2003. Detailed Kinetic Analysis of a Family 52 Glycoside Hydrolase: a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*, *Biochem* 42: 10528 -10536
- Brown, TA. 2002. Gene Cloning and DNA Analysis, an introduction. Blackwell publishing. England
- Chen, CC, Westpheling J. 1998. Partial Characterization of the *Sreptomycetes lividans* xlnB Promotor and Its use For Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermotoga maritime* *Appl Environ Microbiol* 64:4217-4225
- Dably, PA. 2003. Optimising Enzyme Function by Directed Evolution, current opinion in structural biology. 13:500-505
- Dung NV. 1993. Purification and Properties of β -1,4-xylanase 2 and 3 from *Aeromonas caive* W-61. *J. Biosci. Biotech. Biochem* 57:1708-1712.
- Ernawati A, Rachman G. 2004. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Kursus Genesi Molekuler dan RT-PCR Kuantitatif Untuk Monitoring Terapi Obat Anti HIV*. ITB Bandung. Hal 20-25
- Gelfand, DH, Whirw, T J. 1990. Thermostable DNA Polymerases in: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J, White, T. J. *PCR Protocole. Aguide to method and application*. Academic Press, Inc, San Diego

- Gibbs MD, Reeves RA, Bergquist PL. 1995. Cloning , Sequencing, and Expression of a Xylanase Gene from the Extreme Thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B. and Activity of the Enzyme on Fiber-bound Substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4403-4408
- Guangyuan, H, Zhiming, T, Kexiu, XL, Mingjie, JC, Chang, J, Chen, L, Yao, Q, Liu, DP. 2005. An Improvement System for Competent Cell Preparation and High Efisiensi Plasmid Transformation Using Different *Escherechia coli* Strain. *J Biotechnology* ISSN: 0717-3458
- Hermann, NC, Vrsanka, M, Jurickova, M, Hirsch, J, Biely, P, Kubicek, CP. 1997. The β -D-xylosidase of *Trichoderma reseei* is a Multifunctional β -D-xylanxylohidrolase, *Biochem. J.* 321:375-381
- Herlitzte, S, Koenen, M. 1990. A General and Rapid Mutagenesis Method Using Polymerase Chain reaction. *Gene* 91: 143-147
- Invitrogen, 2006. Champion pET Directional TOPO Expression Kits. Five-minute, directional TOPO Cloning of blunt-end PCR product into vectors for high-level, inducible expression in *E.coli*
- Kim, HS, Pokhrel, S, Yoo, YJ. 2008. Mutation of Non-Conserve Amino Acid Surrounding Catalytic Site to Shift pH Optimum of *Bacillus circulans* Xylanase. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic* 130-136
- Kulkarni, A, Shendye, Rao, M. 1999. Molecular and Biotechnological a Spect of Xylanases. *FEMs Microbial. Rev.* 23:411-456.
- Liu, W, Zhu, W, Liu Y, Kong ,Y, Ma, G. 1998. Production Partial Purification and Characterization of Xilanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Proses biochem* 33 : 331-326.
- Madigan, MT, Martinko, JM. 2006. *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. USA. P(256-297)
- Matthew, BW, Colman, PM, Jansonius, JN. 1972. *Nature. New Biol.* 238, 41-43
- Nelson, DL, Cox, MM. 2005. *Principle of Biochemistry*. Fourth edition. University of Wisconsin. Madison
- Ong, E, Greenwood, JM, Gilkes, NR, Kilburn, DG, Miller, RC, Warrant, RAJ. 1989. *Trend Biotech.* 7;293-243
- Primrose, Old, RW. 2003. *Prinsip-Prinsip Manipulasi Gen. Suatu Pengantar Rekayasa Genetik*. Universitas Indonesia UI Press

- Puspaningsih, NNT. 2003. Kloning Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di *E. coli* DH5 α . Penelitian S3, IPB Bogor dan JSPS Short-course Program, September-November, Mie University. Jepang
- Saha BC. 2003, Hemicellulose Bioconversion, *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:279-291.
- Shenoy, AR, Vsweswariah SD. 2003. Site Directed Mutagenesis using a single Mutagenic Oligonukleotide and DpnI digestion of template DNA. *Analytical Biochemistry*. 319(335-336)
- Subramaniyan, S, Prema, P. 2002. Biotechnology of Microbial Xylanase: Enzymology, Molecular Biology, and Application. Critical rev. In *Biotech*. 22:33-64.
- Stratagene, 2007. Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual.
- Vieille, C, Zeikus, GJ. 2001. Hyperthermophilic Enzyme: Source, Uses, and Molecular Mechanism for Thermostability. *Microbial. Mol. Biol rev.* 65:1-43
- Weiner, MP., Costa, W, Schoettlin, J, Cline, E, Mathur, Bauer, JC. 1994. Rapid PCR Site Directed Mutagenesis. ISSN. 4:1054-9805
- Wilson, K, Walker, J. 2005. Principle and Technique of Biochemistry and Molecular Biology. Sixth edition. Cambridge University Press.
- Wiseman, A. 1975. Enzyme Biotechnology. John Willey and Sons inc 3th. New york. Page: 9-18
- Yaw K L, Yao, HJ, Pan, H. 2000. Mechanistic Study of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* G-39, *J Biochem* 127:315-320
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi *Polymerase chain reaction*. Andi offset. Yogyakarta

www.rcsb.org/pdb (Diakses tanggal 6/2/2010)

LAMPIRAN 1 : Metoda Isolasi DNA Plasmid

Metoda isolasi DNA plasmid menggunakan kit dari Qiagen. Sebanyak 3-5 mL suspensi sel dalam *microtube* disentrifuse selama 1 menit pada 12.000 rpm. *Pellet* sel diresuspensi dengan 250 μ l *buffer* P1 kemudian diaduk perlahan sampai semua sel tersuspensi. *Buffer* P1 mengandung RNAase yang berperan menghilangkan RNA dan meresuspensi sel. Selanjutnya ditambahkan 250 μ l *buffer* P2 yang mengandung NaOH dan dicampur perlahan dengan membolak-balikan tabung selama 4-6 kali. *Buffer* P2 berperan dalam melisis sel. Langkah selanjutnya adalah penambahan 350 μ l *buffer* N3 lalu dicampur perlahan dengan membolak-balikan tabung selama 4-6 kali. Kandungan dari *buffer* ini adalah guanidin hidroklorida dan asam asetat yang berperan mengikat DNA. Campuran lalu *disentrifuge* selama 10 menit pada 13.000 rpm. Supernatan bening yang terdapat di bagian atas selanjutnya dipipet dan dipindahkan ke dalam *QIAprep spin column*, kemudian *disentrifuge* selama 1 menit pada 13.000 rpm lalu cairannya dibuang. *QIAprep spin column* selanjutnya dicuci dengan penambahan 750 μ l *buffer* PE yang mengandung etanol yang berfungsi sebagai pencuci, kemudian *disentrifuse* selama 1 menit lalu cairannya dibuang. *Sentrifuse* tambahan selama 1 menit perlu dilakukan untuk menghilangkan sisa *buffer* N3. Tahap akhir yaitu dengan memindahkan *QIAprep column* ke dalam *microtube* 1,5 ml kemudian elusi DNA plasmid pETxy12 dengan 50 μ l *elution buffer*, biarkan selama 1 menit agar *elution buffer* benar-benar terserap ke dalam filter, lalu *disentrifuge* 1 menit.

LAMPIRAN 2 :Metoda Pemurnian DNA Plasmid

Pemurnian DNA plasmid menggunakan Kit dari *Qiagen*, prosedurnya adalah sebagai berikut: Sebanyak 800 μ L sampel DNA dimasukkan ke dalam *Qiaquick* kolom untuk mengikat DNA pada matrik yang ada pada kolom, selanjutnya *centrifuge* 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatannya dibuang dan kolom dimasukkan kembali ke tabung koleksi. Untuk pencucian ditambahkan 750 μ L *buffer* PE yang mengandung alkohol, didiamkan selama 2-5 menit kemudian *centrifuge* 12.000 rpm 1 menit. *Centrifuge* tambahan selama 1 menit perlu dilakukan untuk menghilangkan sisa etanol. *Qiaquick* kolom ditempatkan pada microtube 1,5 ml kemudian elusi dengan 50 μ L *elution buffer* yang mengandung *buffer* 10 mM tris pH 8,5, didiamkan 1 menit selanjutnya *centrifuge* 12.000 rpm 1 menit.

LAMPIRAN 3 : Hasil Alignment mutasi pada D121N dengan wild type (xyl)

xyl	151	ATAGGATATTGTTTAATTAGACCAAGTCAACTTATGTTAAATAATGCAAC	200
D121N_	147	ATAGGATATTGTTTAATTAGACCAAGTCAACTTATGTTAAATAATGCAAC	196
xyl	201	AAATAGAAGTGGTATATTTGCACCTACCCTTCGTTATCATGAGGGAATTT	250
D121N_	197	AAATAGAAGTGGTATATTTGCACCTACCCTTCGTTATCATGAGGGAATTT	246
xyl	251	TTTATTTAATAACAACAAACGTAACACTAAAGAAGAAGCTTTATTGTTATG	300
D121N_	247	TTTATTTAATAACAACAAACGTAACACTAAAGAAGAAGCTTTATTGTTATG	296
xyl	301	TCCGAAGATCTACAAGGGGAATGGTCTGAACCGATTGGATTGATGGATG	350
D121N_	297	TCCGAAGATCTACAAGGGGAATGGTCTGAACCGATTGGATTGATGGATG	346
xyl	351	GGGAGGCATTGATCCATCACTATTTTTGATAACGATGGGAAGGTTTATA	400
D121N_	347	GGGAGGCATTGATCCATCACTATTTTTGATAACGATGGGAAGGTTTATA	396
xyl	401	TTACCGGGACAAATGATAATGCTAGGGGTGAAGAATTAGGAATTTACCAA	450
D121N_	397	TTACCGGGACAAATGATAATGCTAGGGGTGAAGAATTAGGAATTTACCAA	446
xyl	451	GCAGAAATAGATTTAAAGAAAGGAAGTATTATAGGTGAAAGAAAACAT	500
D121N_	447	GCAGAAATAGATTTAAAGAAAGGAAGTATTATAGGTGAAAGAAAACAT	496
xyl	501	ATGGAAAGGTACAGGCGGCTCTTACCCGGAAGCCCCCATTATATAAAG	550
D121N_	497	ATGGAAAGGTACAGGCGGCTCTTACCCGGAAGCCCCCATTATATAAAG	546
xyl	551	TTAATGGCTGGTATTATTTATTAATCGCAGAAGGAGGTACAGATATGGT	600
D121N_	547	TTAATGGCTGGTATTATTTATTAATCGCAGAAGGAGGTACAGATATGGT	596
xyl	601	CATATGGTGACCGTTGCAAGGAGTAAATATCCCTTCGGTCCTTTCGAAAG	650
D121N_	597	CATATGGTGACCGTTGCAAGGAGTAAATATCCCTTCGGTCCTTTCGAAAG	646
xyl	651	TTGTCCTTTAATCCAATATTAACATAGAAAGCACAACCATCCTCTTC	700
D121N_	647	TTGTCCTTTAATCCAATATTAACATAGAAAGCACAACCATCCTCTTC	696
xyl	701	AGGCAATCGGTCATGCTGATATTGTTTCAGTATCATGACGGAAGTTGGTGG	750
D121N_	697	AGGCAATCGGTCATGCTGATATTGTTTCAGTATCATGACGGAAGTTGGTGG	746
xyl	751	GCAGTTTTTCACGGTACTCGTCCCATCTCTTATCCACCGAAACACCATT	800
D121N_	747	GCAGTTTTTCACGGTACTCGTCCCATCTCTTATCCACCGAAACACCATT	796
xyl	801	GGGCAGAGAGACTTGTTTAGCTCCTATCAAGTGGACAGACGATGGTTGGC	850
D121N_	797	GGGCAGAGAGACTTGTTTAGCTCCTATCAAGTGGACAGACGATGGTTGGC	846

LAMPIRAN 4 : Hasil Alignment mutasi pada D139N dengan wild type (xyl)

xyl	151	ATAGGATATTGTTTAATTAGACCAAGTCAACTTATGTAAATAATGCAAC	200
D139N_	142	ATAGGATATTGTTTAATTAGACCAAGTCAACTTATGTAAATAATGCAAC	191
xyl	201	AAATAGAAGTGGTATATTTGCACCTACCCTTCGTTATCATGAGGGAATTT	250
D139N_	192	AAATAGAAGTGGTATATTTGCACCTACCCTTCGTTATCATGAGGGAATTT	241
xyl	251	TTTATTTAATAACAACAAACGTAACACTAAAGAAGAACTTATTGTTATG	300
D139N_	242	TTTATTTAATAACAACAAACGTAACACTAAAGAAGAACTTATTGTTATG	291
xyl	301	TCCGAAGATCTACAAGGGGAATGGTCTGAACCGATTGGATTGATGGATG	350
D139N_	292	TCCGAAGATCTACAAGGGGAATGGTCTGAACCGATTGGATTGATGGATG	341
xyl	351	GGGAGGCATTGATCCATCACTATTTTTGATAACGATGGGAAGGTTTATA	400
D139N_	342	GGGAGGCATTGATCCATCACTATTTTTGATAACGATGGGAAGGTTTATA	391
xyl	401	TTACCGGGACAAATGATAATGCTAGGGGTGAAGAATTAGGAATTTACCAA	450
D139N_	392	TTACCGGGACAAATGATAATGCTAGGGGTGAAGAATTAGGAATTTACCAA	441
xyl	451	GCAGAAATAGATTTAAAGAAAGGAAGTATTATAGGTGAAAGAAAACATCAT	500
D139N_	442	GCAGAAATAGATTTAAAGAAAGGAAGTATTATAGGTGAAAGAAAACATCAT	491
xyl	501	ATGGAAAGGTACAGGCGGCTCTTACCCGGAAGCCCCCATTATATAAAG	550
D139N_	492	ATGGAAAGGTACAGGCGGCTCTTACCCGGAAGCCCCCATTATATAAAG	541
xyl	551	TTAATGGCTGGTATTATTTATTAATCGCAGAAGGAGGTACAGAGTATGGT	600
D139N_	542	TTAATGGCTGGTATTATTTATTAATCGCAGAAGGAGGTACAGAGTATGGT	591
xyl	601	CATATGGTGACCGTTGCAAGGAGTAAATATCCCTTCGGTCTTTCGAAAG	650
D139N_	592	CATATGGTGACCGTTGCAAGGAGTAAATATCCCTTCGGTCTTTCGAAAG	641
xyl	651	TTGTCCTTTTAATCCAATATTAACCTCATAGAAGCACAAACCATCCTCTTC	700
D139N_	642	TTGTCCTTTTAATCCAATATTAACCTCATAGAAGCACAAACCATCCTCTTC	691
xyl	701	AGGCAATCGGTCATGCTGATATTGTTTCAGTATCATGACGGAAGTTGGTGG	750
D139N_	692	AGGCAATCGGTCATGCTGATATTGTTTCAGTATCATGACGGAAGTTGGTGG	741
xyl	751	GCAGTTTTTCACGGTACTCGTCCCATCTCTTATCCACCGAAACACCATT	800
D139N_	742	GCAGTTTTTCACGGTACTCGTCCCATCTCTTATCCACCGAAACACCATT	791

xyl	801	GGGCAGAGAGACTTGTTTAGCTCCTATCAAGTGGACAGACGATGGTTGGC	850
D139N_	792	GGGCAGAGAGACTTGTTTAGCTCCTATCAAGTGGACAGACGATGGTTGGC	841
xyl	851	CTATTATTGGTTACAACGGAAGAATTGATATTAATGGATGCTGGTTAT	900
D139N_	842	CTATTATTGGTTACAACGGAAGAATTGATATTAATGGATGCTGGTTAT	891
xyl	901	CTGCCTGTGAAAGAAAAAATATTGGGGATGAGATCATTGAAGATGATTT	950
D139N_	892	CTGCCTGTGAAAGAAAAAATATTGGGGATGAGATCATTGAAGATGATTT	941
xyl	951	TAACAGTGATATTTTTCTACAGATTGGAATTTATTCAAACCCCTCGCC	1000
D139N_	942	TAACAGTGATATTTTTCTACAGATTGGAATTTATTCAAACCCCTCGCC	991
xyl	1001	TTGAACACTATTCCTTGAAGGGACGTCCTAGTTGGTTAAAAATGC	1045
D139N_	992	TTGAACACTATTCCTTGAAGGGACGTCCTAGTTGGTTAAAAATGC	1036

LAMPIRAN 5 : Pembuatan kurva standar paranitrophenol

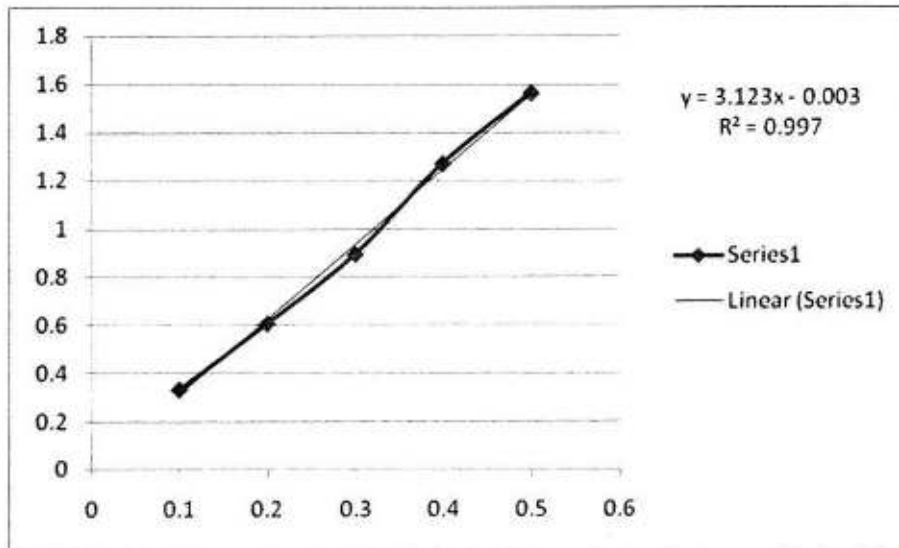
Kurva standar *p*-nitrofenol dibuat pada konsentrasi berkisar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mM *p*-nitrofenol/mL dari stok *p*-nitrofenol 10 mM/ml dalam pelarut *buffer* posfat sitrat pH 7. Masing-masing sebanyak 100 μ L larutan standar *p*-nitrofenol dicampur dengan 100 μ L *buffer* posfat sitrat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 50⁰ C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 μ L Na₂CO₃ 0,4 M. Absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada λ 405 nm.

Tabel absorbansi

Konsentrasi(mM)	Absorbansi
0,1	0,333
0,2	0,606
0,3	0,894
0,4	1,260
0,5	1,563

Dari data tabel diatas dapat dibuat grafik regresi linear antara konsentrasi terhadap substrat.

Grafik regresi linearnya adalah sebagai berikut:



Berdasarkan grafik diatas dapat diketahui persamaan garis regresinya adalah:

$$Y=3,123x-0,003$$

**LAMPIRAN 6 : Data Pengukuran pH Optimum Enzim β -xilosidase mutan pETxyl2
(D139N)**

1. Data absorbansi optimasi pH

pH	Absorbansi		
	sampel	kontrol	sampel-kontrol
5	0,043	0,04	0,003
6	0,141	0,041	0,01
7	0,216	0,04	0,176
8	0,183	0,03	0,153
9	0,176	0,041	0,135
10	0,158	0,038	0,12

2. Perhitungan konsentrasi sampel

Dari persamaan regresi linear $Y=3,123x-0,003$ dapat dihitung konsentrasi sampel berdasarkan data absorbansi optimasi pH setelah dikurangi kontrol . Y merupakan absorbansi, sedangkan x merupakan konsentrasi produk yang dihitung. Perhitungannya adalah sebagai berikut:

1. pH 5

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,003 = 3,123x - 0,003$$

$$0,006 = 3,123x$$

$$X = 0,002 \text{ mM}$$

2. pH 6

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,01 = 3,123x - 0,003$$

$$0,013 = 3,123x$$

$$X = 0,004 \text{ mM}$$

3. pH 7

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,176 = 3,123x - 0,003$$

$$0,179 = 3,123x$$

$$X = 0,057 \text{ mM}$$

4. pH 8

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,153 = 3,123x - 0,003$$

$$0,156 = 3,123x$$

$$X = 0,050 \text{ mM}$$

5. pH 9

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,135 = 3,123x - 0,003$$

$$0,138 = 3,123x$$

$$X = 0,044 \text{ mM}$$

6. pH 10

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,120 = 3,123x - 0,003$$

$$0,123 = 3,123x$$

$$X = 0,039 \text{ mM}$$

Berdasarkan perhitungan konsentrasi diatas dapat disusun tabel berikut:

pH	Konsentrasi (mM)
5	0,002
6	0,004
7	0,057
8	0,050
9	0,044
10	0,039

3. Perhitungan aktivitas enzim

Aktivitas enzim dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{unit Aktivitas} = \frac{\text{Konsentrasi (mM)} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{waktu inkubasi}}$$

Keterangan:

Faktor pengenceran = 1x

Waktu inkubasi = 30 menit

- pH 5

$$\begin{aligned} \text{aktivitas} &= 0,002/30 \\ &= 6,7 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml} \end{aligned}$$

- pH 6

$$\begin{aligned} \text{aktivitas} &= 0,004/30 \\ &= 13,3 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml} \end{aligned}$$

- pH 7

$$\begin{aligned} \text{aktivitas} &= 0,057/30 \\ &= 190 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml} \end{aligned}$$

- pH 8

$$\begin{aligned} \text{aktivitas} &= 0,05/30 \\ &= 166,7 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml} \end{aligned}$$

- pH 9

$$\begin{aligned} \text{aktivitas} &= 0,044/30 \\ &= 146,7 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml} \end{aligned}$$

- pH 10

$$\begin{aligned} \text{aktivitas} &= 0,039/30 \\ &= 130 \cdot 10^{-5} \text{ U/ml} \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan konsentrasi diatas dapat disusun tabel berikut:

pH	Aktivitas (Unit/ml)
5	$6,7. 10^{-5}$
6	$13,3. 10^{-5}$
7	$190. 10^{-5}$
8	$166,7. 10^{-5}$
9	$146,7. 10^{-5}$
10	$130. 10^{-5}$

LAMPIRAN 7 : Data Pengukuran pH Optimum Enzim β -xilosidase *wild type* (pETxyl2)

1. Data absorbansi optimasi pH

pH	Absorbansi		
	sampel	kontrol	sampel-kontrol
5	0,042	0,02	0,022
6	0,150	0,021	0,129
7	0,141	0,02	0,121
8	0,125	0,01	0,115
9	0,110	0,03	0,08
10	0,090	0,04	0,05

2. Perhitungan konsentrasi sampel

Dari persamaan regresi linear $Y=3,123x-0,003$ dapat dihitung konsentrasi sampel berdasarkan data absorbansi optimasi pH setelah dikurangi kontrol . Y merupakan absorbansi, sedangkan x merupakan konsentrasi produk yang dihitung.

3. Perhitungan aktivitas enzim

Aktivitas enzim dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{unit Aktivitas} = \frac{\text{Konsentrasi (mM)} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{waktu inkubasi}}$$

Keterangan:

Faktor pengenceran = 1x

Waktu inkubasi = 30 menit

Berdasarkan perhitungan konsentrasi dan aktivitas enzim diatas dapat disusun tabel berikut:

pH	Konsentrasi (mM)	Aktivitas (Unit)
5	0,008	$27 \cdot 10^{-5}$
6	0,042	$140 \cdot 10^{-5}$
7	0,040	$130 \cdot 10^{-5}$
8	0,038	$120 \cdot 10^{-5}$
9	0,027	$90 \cdot 10^{-5}$
10	0,017	$50 \cdot 10^{-5}$

LAMPIRAN 8 : Data Pengukuran stabilitas Enzim β -xilosidase mutan pETxyl2 (D139N) terhadap alkali

Tahapan pengukuran stabilitas enzim adalah sebagai berikut:

1 Menghitung konsentrasi produk

pH	Absorbansi		
	D139N	kontrol	D139N-kontrol
5	0,160	0,031	0,129
6	0,520	0,030	0,490
7	0,590	0,029	0,561
8	0,320	0,040	0,280
9	0,137	0,031	0,106
10	0,129	0,041	0,088

Konsentrasi produk dapat dihitung berdasarkan hasil absorbansi menggunakan persamaan regresi linier.

1. pH 5

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,129 = 3,123x - 0,003$$

$$0,132 = 3,123x$$

$$X = 0,042 \text{ mM}$$

2. pH 6

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,490 = 3,123x - 0,003$$

$$0,493 = 3,123x$$

$$X = 0,158 \text{ mM}$$

3. pH 7

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,561 = 3,123x - 0,003$$

$$0,564 = 3,123x$$

$$X = 0,181 \text{ mM}$$

4. pH 8

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,280 = 3,123x - 0,003$$

$$0,283 = 3,123x$$

$$X = 0,091 \text{ mM}$$

5. pH 9

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,106 = 3,123x - 0,003$$

$$0,109 = 3,123x$$

$$X = 0,035 \text{ mM}$$

6. pH 10

$$Y = 3,123x - 0,003$$

$$0,088 = 3,123x - 0,003$$

$$0,091 = 3,123x$$

$$X = 0,029 \text{ mM}$$

2. Menghitung aktivitas enzim

• pH 5

$$\text{aktivitas} = 0,042/30$$

$$= 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$$

• pH 6

$$\text{aktivitas} = 0,158/30$$

$$= 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$$

• pH 7

$$\text{aktivitas} = 0,181/30$$

$$= 6 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$$

• pH 8

$$\text{aktivitas} = 0,091/30$$

$$= 3 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$$

• pH 9

$$\text{aktivitas} = 0,035/30$$

$$= 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$$

• pH 10

$$\text{aktivitas} = 0,029/30$$

$$= 1 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$$

4. Menghitung aktivitas residu enzim

Rumus digunakan yang:

$$\text{Aktivitas residu} = \frac{\text{Aktivitas yang dihitung}}{\text{Aktivitas tertinggi}} \times 100\%$$

- pH 5

$$\begin{aligned} \text{aktivitas residu} &= \frac{1,4 \cdot 10^{-3}}{6 \cdot 10^{-3}} \times 100\% \\ &= 23\% \end{aligned}$$

- pH 6

$$\begin{aligned} \text{aktivitas residu} &= \frac{5,3 \cdot 10^{-3}}{6 \cdot 10^{-3}} \times 100\% \\ &= 88\% \end{aligned}$$

- pH 7

$$\begin{aligned} \text{aktivitas residu} &= \frac{6 \cdot 10^{-3}}{6 \cdot 10^{-3}} \times 100\% \\ &= 100\% \end{aligned}$$

- pH 8

$$\begin{aligned} \text{aktivitas residu} &= \frac{3 \cdot 10^{-3}}{6 \cdot 10^{-3}} \times 100\% \\ &= 50\% \end{aligned}$$

- pH 9

$$\begin{aligned} \text{aktivitas residu} &= \frac{1,2 \cdot 10^{-3}}{6 \cdot 10^{-3}} \times 100\% \\ &= 20\% \end{aligned}$$

- pH 10

$$\begin{aligned} \text{aktivitas residu} &= \frac{1 \cdot 10^{-3}}{6 \cdot 10^{-3}} \times 100\% \\ &= 17\% \end{aligned}$$

Berdasarkan data penghitungan diatas dapat disusun tabel berikut:

pH	Konsentrasi (mM)	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas residu (%)
5	0,042	$1,4 \cdot 10^{-3}$	23
6	0,158	$5,3 \cdot 10^{-3}$	88
7	0,181	$6 \cdot 10^{-3}$	100
8	0,091	$3 \cdot 10^{-3}$	50
9	0,035	$1,2 \cdot 10^{-3}$	20
10	0,029	$1 \cdot 10^{-3}$	17