

SKRIPSI

**PRODUKSI DAN PEMURNIAN ENZIM 1,3- β -
GLUKANASE MKAFGlu1 DARI *Pichia pastoris*
KM71H REKOMBINAN**



CHOLIFAH FITRIANA

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2022



LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul	Produksi dan Pemurnian Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGLuI dari <i>Pichia pastoris</i> KM71H Rekombinan
Penyusun	Cholifah Fitriana
NIM	081811533003
Pembimbing I	Prof. Dr. Afaf Bakhtir, M.S.
Pembimbing II	Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si.
Tanggal Sidang	21 Juli 2022

	Disetujui oleh	
Pembimbing I		Pembimbing II
		
<u>Prof. Dr. Afaf Bakhtir, M.S.</u> NIP. 195610141983032001		<u>Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si.</u> NIP. 197211161997021001

Mengetahui,
Ketua Departemen Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga


Mochamad Zakki Fahmi, S.Si, M.Si, Ph.D
NIP. 198307022009121005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh. Segala puji dan syukur kepada Allah SWT Tuhan Semesta Alam. Karena atas segala rahmat, karunia, dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul **“PRODUKSI DAN PEMURNIAN ENZIM 1,3- β GLUKANASE MKAFGlu1 DARI *Pichia pastoris* KM71H REKOMBINAN”**. Shalawat serta salam semoga Allah senantiasa limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya. *Aamiin Yaa Rabbal Alamiin.*

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk kelulusan program studi Sarjana Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. terselesaikannya naskah skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S., selaku dosen pembimbing I atas seluruh waktu, bimbingan, saran, nasihat, masukan, dan motivasi yang telah diberikan selama penyusunan hingga terselesaikannya naskah skripsi ini.
2. Bapak Prof.Purkan, selaku dosen pembimbing II atas seluruh waktu, bimbingan, saran, masukan, dan motivasi yang telah diberikan selama proses penyusunan hingga terselesaikannya naskah skripsi ini.
3. Bapak Mochamad Zakki Fahmi, M.Si., Ph.D., selaku Ketua Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
4. Bapak Drs. Tokok Ardiarto, M.Si. selaku dosen wali atas nasihat, motivasi, inspirasi, dan dukungan yang selalu diberikan selama menjalani proses perkuliahan.
5. Seluruh dosen dan staff pengajar Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga atas ilmu yang telah diberikan selama ini.

6. Orang tua tercinta Ayah Suyitno dan Ibu Sri Narsih, serta Adik tersayang Retno Yuniarti dan Nafisa Salsabila Ramadhine yang telah memberikan doa, dukungan, nasihat, semangat, dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan naskah naskah skripsi ini.
7. Mbak Zaida, Mbak Harini, Mbak Yesi dan Mbak Mas lain yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu atas waktu yang diberikan untuk mengajari, diskusi, memberi masukan, saran, nasihat, dan motivasi sehingga dapat terselesaikannya naskah skripsi ini.
8. Teman seperjuangan sesama anak bimbing Bu Afaf, Khotimah, teman-teman kost, serta teman-teman penelitian Biokimia ruang 318 yang selalu memberikan dukungan, kerja sama, diskusi, dan semangat.
9. Teman-teman kimia angkatan 2018 “H18RID” atas segala waktu, bantuan, dukungan, doa, semangat, dan motivasi yang selalu menemani selama proses perkuliahan sampai penyusunan dan terselesaikannya naskah skripsi ini.
10. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu atas doa, dukungan, dan bantuan yang telah diberikan untuk kelancaran dalam penulisan dan penyusunan naskah skripsi ini.

Penulis sadar bahwa dalam naskah skripsi ini jauh dari kesempurnaan, baik dalam hal isi maupun penulisannya. Sehingga kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat penulis harapkan demi penelitian selanjutnya yang lebih baik. Semoga naskah ini dapat bermanfaat bagi penulis sendiri pada khususnya dan pembaca pada umumnya. *Walahit Taufik wal Hidayah. Wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh*

Surabaya, 27 Juli 2022



Cholifah Fitriana

Fitriana, Cholifah , 2022, Produksi dan Pemurnian Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 dari *Pichia pastoris* KM71H Rekombinan , Prof.Dr.Afaf Baktir,M.S. DAN Prof.Dr.Purkan, M.Si., Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Enzim 1,3- β -glukanase termasuk enzim yang menghidrolisis ikatan 1,3- β -glukosidik pada 1,3- β -glukan (seperti laminarin). Untuk pengembangan riset, pada penelitian ini akan dilakukan pemurnian enzim 1,3- β -glukanase yang diekstraksi dari *Pichia pastoris* KM71H dengan fraksinasi ammonium sulfat dan pemurnian menggunakan kit Ni-NTA. Melalui perhitungan aktivitas spesifik, dapat diketahui peningkatan faktor kemurnian enzim. SDS-PAGE dilakukan untuk menguji keberadaan enzim 1,3- β -glukanase dengan berat molekul 25 kDa. Hasil pemurnian parsial fraksinasi ammonium sulfat menunjukkan aktivitas spesifik enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 tertinggi terdapat pada fraksi 40-60% yaitu 1,52 U/mg. Adapun aktivitas spesifik ekstrak enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 hasil proses pemurnian menggunakan kolom Ni-NTA yaitu 1,48 U/mg. Pada proses pemurnian parsial pada fraksinasi enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1 (fraksi 40-60%) mengalami peningkatan faktor kemurnian 1,53x, sedangkan pada pemurnian menggunakan kolom Ni-NTA faktor kemurnian meningkat 1,44x lebih besar daripada ekstrak enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1.

Kata kunci: , enzim 1,3- β -glukanase, *Pichia pastoris*, fraksinasi, kolom Ni-NTA.

Fitriana, Cholifah , 2022, Production and Purification Of 1,3- β -Glucanase MKAFGlu1 Enzyme from *Pichia pastoris* KM71H Recombinant, this final project is under guidance of Prof.Dr.Afaf Baktir,M.S. and Prof.Dr.Purkan, M.Si., . Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRACT

1,3- β -glucanase enzymes include enzymes that hydrolyze 1,3- β -glycosidic bonds in 1,3- β -glucans (such as laminarin). For research development, in this research, the 1,3- β -glucanase enzyme will be purified and extracted from *Pichia pastoris* KM71H by ammonium sulfate fractionation and purification using a Ni-NTA kit. By calculating the specific activity, it can be seen the increase in the purity factor of the enzyme. SDS-PAGE was carried out to test the presence of 1,3- β -glucanase enzyme with a molecular weight of 25 kDa. The results of partial purification of ammonium sulfate fractionation showed the highest specific activity of the 1,3- β -glucanase MKAFGlu1 enzyme was found in the 40-60% fraction, namely 1.52 U/mg. The specific activity of the 1,3- β -glucanase MKAFGlu1 enzyme extract from the purification process using a Ni-NTA column was 1.48 U/mg. In the partial purification process, the 1,3- β -glucanase enzyme MKAFGlu1 (fraction 40-60%) had an increase in the purity factor of 1.53x, while in the purification using a Ni-NTA column the purity factor increased by 1.44x greater than the enzyme extract 1,3- β -glucanase MKAFGlu1.

Keywords: 1,3- β -glucanase enzymes, *Pichia pastoris*, fractionation, Ni-NTA column

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Cholifah Fitriana
NIM : 081811533003
Program Studi : S1 Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

Produksi dan Pemurnian Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 dari *Pichia pastoris* KM71H Rekombinan

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan Tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 27 Juli 2022

Cholifah Fitriana
NIM. 081811533003

DAFTAR ISI

SKRIPSI.....	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
DAFTAR ISTILAH	xvi
BAB I.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II	6
2.1. Enzim.....	6
2.2. Enzim 1,3-β-Glukanase	8
2.3. Pichia pastoris.....	11
2.3.1 Karakteristik Pichia pastoris	11
2.3.2 Sistem Ekspresi Pichia pastoris	13
2.5 Pemurnian Protein	14
2.5.1 Fraksinasi Ammonium Sulfat	14
2.5.2 Dialisis	16
2.5.3 Kit Nickel-Nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)	17
2.6 Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	19
BAB III.....	21

3.1. Tempat dan Waktu penelitian	21
3.2. Bahan dan Alat Penelitian	21
3.2.1. Bahan dan sampel penelitian	21
3.2.2. Alat penelitian.....	21
3.3. Prosedur Penelitian	23
3.3.1. Diagram Alir penelitian	23
3.4 Prosedur Kerja	24
3.4.1 Kultivasi Pichia pastoris KM71H Rekombinan	24
3.4.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan	24
3.4.3 Produksi Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 yang Diekspresikan oleh Pichia pastoris KM71H Rekombinan.....	24
3.4.4 Uji Aktivitas Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1	25
3.5 Pemurnian Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 dari Ekstrak Enzim1,3- β -Glukanase MKAFGlu1	25
3.5.1 Fraksinasi Ammonium sulfat.....	25
3.5.2 Dialisis	26
3.5.3 Penentuan Kadar Protein	26
3.5.5 Pemurnian Enzim Menggunakan kit Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA).....	26
3.6 Penentuan Berat Molekul Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 dengan SDS-PAGE	27
BAB IV	28
4.1. Kultivasi Pichia pastoris KM71H Rekombinan.....	28
4.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan	29
4.3 Produksi Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 dari Pichia pastoris KM71H Rekombinan.....	30
4.4 Uji Aktivitas Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1	33
4.5 Pemurnian Enzim 1,3- β -glukanase MKAFGlu1	34
4.5.1 Fraksinasi Ammonium Sulfat	34
4.5.2 Pemurnian Enzim Menggunakan Kolom Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA)37	
4.6 Penentuan Berat Molekul Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 dengan SDS-PAGE	38
BAB V.....	40
5.1. Kesimpulan.....	40
5.2. Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	46

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.1	Daftar % kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ untuk fraksinasi protein (Scopes, 2013)	16
4.1	Data hasil pemurnian dengan fraksinasi ammonium sulfat	36
4.2	Data hasil pemurnian dengan kolom Ni-NTA	37

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Interaksi enzim dengan substrat. (A) Model <i>Lock and Key</i> , (B) Model <i>Induced-Fit</i> (M M Bloomfield & J Stephens., 1996).	7
2.2	Struktur laminarin (Sanjeewa K & Jeon Y., 2018)	9
2.3	Koloni <i>Pichia pastoris</i> pada media padat YPD (Herawati, 2015)	12
2.4	Mekanisme salting out protein (Scopes., 2013)	15
2.5	Metode dialisis (Chirgadze., 2001)	16
2.6	Skema kerja kromatografi afinitas dengan kolom Ni-NTA (Pina AS, <i>et al.</i> , 2014)	18
2.7	Skema elektroforesis dengan SDS-PAGE (Wangler & Bellen, 2017)	19
4.1	Hasil peremajaan <i>Pichia pastoris</i> KM71H rekombinan pada media YPDS + Zeosin	28
4.2	Kurva pertumbuhan <i>Pichia pastoris</i> KM71H rekombinan pada media BMGY	29
4.3	Hubungan antara aktivitas ekstrak enzim 1,3- β -glukanase MKAFGl1 dengan waktu panen. (Umam., 2019)	32
4.4	Reaksi glukosa dengan asam 3,5-dinitrosalisilat (Miloski <i>et al.</i> , 2008)	32
4.5	Kurva stabilitas penyimpana ekstrak enzim 1,3- β -glukanase MKAFGl1 pada suhu dingin (5-10°C)	33
4.6	Hasil analisis SDS-PAGE hasil fraksinasi ammonium sulfat.	37
4.7	Hasil analisis SDS-PAGE hasil pemurnian dengan kolom Ni-NTA	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul
1	Pembuatan Media
2	Pembuatan Reagen dan Larutan Stok
3	Pembuatan Larutan dan Kurva Standar
4	Uji Aktivitas Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 untuk Tahap Fraksinasi Ammonium Sulfat
5	Analisis Perhitungan untuk Tahap Fraksinasi Ammonium Sulfat
6	Penentuan Berat Molekul (BM) Enzim 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 pada SDS-PAGE

DAFTAR SINGKATAN

AOX1	: Alkohol oksidase
APS	: Ammonium persulfate
BM	: Berat molekul
BMGY	: <i>Buffered Glycerol-complex Medium</i>
BMMY	: <i>Buffered Methanol-complex Medium</i>
bp	: base pair
<i>C.albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
DNS	: 3,5-Dinitrosalicylic acid
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetraacetic acid</i>
KDa	: Kilo dalton
kb	: kilo basa
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>P.pastoris</i>	: <i>Pichia pastoris</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TEMED	: <i>Tetramethylethylenediamine</i>
YPD	: <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
YNB	: <i>Yeast Nitrogen Base</i>

DAFTAR ISTILAH

DNA	: Materi genetik yang mengkode informasi yang dibutuhkan dalam proses metabolisme makhluk hidup
Gen	: Unit molekul DNA yang bertanggungjawab terhadap sifat tertentu makhluk hidup
Inokulum	: Bahan padat/cair yang mengandung mikrobia/spora/enzim yang ditambahkan kedalam substrat/media fermentasi
Koloni	: Kumpulan mikroorganisme yang dibiakkan dalam suatu media padat
Laminarin	: Polisakarida yang tersusun dari ikatan 1,3- β -glikosidik dan beberapa cabang ikatan 1,6- β -glikosidik
Ligan	: Molekul sederhana yang dalam senyawa kompleks bertindak sebagai donor pasangan elektron
Metagenomik	: Suatu teknik analisis materi genetik yang diambil langsung dari suatu lingkungan dan tidak bergantung pada kondisi kultur mikroorganisme dengan keragaman materi genetik yang tinggi
Mikroorganisme	: Organisme yang berukuran sangat kecil dan hanya bisa diamati dengan bantuan mikroskop
Plasmid	: DNA sirkular yang terdapat dalam sel mikroorganisme
Presipitasi	: Proses pengendapan protein target sehingga terpisah dari protein-protein lainnya
Vektor	: Molekul DNA yang digunakan sebagai pembawa gen asing kedalam sel mikroorganisme