

**IDENTIFIKASI RESIDU-RESIDU KATALITIK
 β -XILOSIDASE ASAL *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*
LX-11**

SKRIPSI



NABIILA NUR SHADI

**PROGRAM STUDI S1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

IDENTIFIKASI RESIDU-RESIDU KATALITIK
 β -XILOSIDASE ASAL *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*

LX-11

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia
Pada Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Airlangga

Nabiila Nur Shadi
NIM 081811533081

Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si

NIP. 196306151987012001

Pembimbing II,



Ali Rohman, M.Si, Ph.D

NIP. 196808071994031003

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Identifikasi Residu-Residu Katalitik β -Xilosidase
Asal *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11
Penyusun : Nabila Nur Shadi
NIM : 081811533081
Pembimbing I : Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si
Pembimbing II : Ali Rohman, M.Si, Ph.D
Tanggal Seminar : 22 Juli 2022

Disetujui oleh,

Pembimbing I,



Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si

NIP. 196306151987012001

Pembimbing II,



Ali Rohman, M.Si, Ph.D

NIP. 196808071994031003

Mengetahui,

Ketua Departemen
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga



Mochammad Zaki Fahmi, S.Si, M.Si, Ph.D.

NIP. 198307022009121005

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Nabiila Nur Shadi

NIM : 081811533081

Program Studi : S1 Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa tidak melakukann plagiat dalam pennulisan skripsi saya yang berjudul :

IDENTIFIKASI RESIDU-RESIDU KATALITIK β -XILOSIDASE ASAL *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11

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, 31 Juli 2022



Nabiila Nur Shadi

NIM. 081811533081

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan petunjuk dan rahmat-Nya sehingga penyusunan naskah skripsi yang berjudul **“Identifikasi Residu-Residu Katalitik β -Xilosidase Asal *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11”** dapat diselesaikan tepat waktu. Naskah skripsi ini ditulis dalam rangka memenuhi persyaratan pengajuan skripsi sebagai kewajiban akademik menjadi sarjana sains dalam bidang kimia di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

Dalam penyusunan dan penulisan naskah skripsi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu, membimbing dan mendukung, khususnya kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si selaku dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu untuk berdiskusi, memberikan bimbingan, dan masukan dalam proses penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Ali Rohman, M.Si, Ph.D selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan ilmu, kritik, nasehat, dan saran yang membangun selama penyusunan naskah skripsi ini.
3. Ibu Siti Wafiroh selaku dosen wali yang selalu memberikan motivasi dan arahan selama penulis menjalankan kehidupan perkuliahan hingga penulisan naskah skripsi ini.
4. Bapak Mochammad Zakki Fahmi, M.Si., Ph.D., selaku Ketua Departemen sekaligus Kepala Program Studi S1 Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga yang senantiasa mendukung penulis dalam menyelesaikan naskah skripsi ini.
5. Bapak dan Ibu dosen Program Studi S1 Kimia Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu, nasihat dan pengalaman selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi S1 Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya.
6. Kedua orang tua saya, Bapak Ir. Priambodo selaku ayah penulis tersayang yang senantiasa menjaga dan mendoakan kesuksesan bagi penulis dari surga serta Ibu

Shakuntala Kartikasari selaku ibu penulis beserta keluarga tercinta di rumah yang tiada hentinya memberikan semangat, dukungan, kasih sayang, dan do'a kepada penulis.

7. Fia, Lia, Tiara, Alicia, Covid-19 Entertainment, serta teman-teman H18RID selalu memberikan semangat, mendengarkan keluh kesah, dan senantiasa berbagi tawa bersama penulis selama penyusunan naskah skripsi ini.
8. Naufal, Faqih, Risa, Rahma, dan Chumaira selaku teman-teman seperjuangan skripsi biokimia yang membuat hari-hari kegiatan lab menjadi ringan dan lebih menyenangkan.
9. Samuel Christian Wihartono yang senantiasa bersedia memberikan telinga untuk mendengarkan segala keluh kesah, bahu untuk menangis, tenaga untuk menyemangati, serta perhatian kepada penulis selama penulisan naskah skripsi ini.
10. Mbak Yesi Maysita selaku mentor yang senantiasa membantu, melatih, dan menemani kegiatan penelitian penulis.
11. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan yang telah memberikan motivasi, dukungan, semangat dan saran dalam pembuatan naskah skripsi ini hingga akhir.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam penyusunan naskah skripsi ini sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan bagi naskah skripsi ini dapat lebih baik lagi dan bagi penulis sendiri.

Surabaya, 22 Juli 2022

Nabiila Nur Shadi

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

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

Shadi, N. N. 2022, Identifikasi Residu-Residu Katalitik β -Xilosidase Asal *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11. Skripsi ini di bawah bimbingan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si. dan Ali Rohman, M.Si., Ph. D. Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

β -D-xilosidase yang berasal dari bakteri termofil *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11 (Txy-xyl) merupakan enzim xilanolitik yang berperan dalam proses degradasi xilan. Berdasarkan basis data CAZy, Txy-xyl ditemukan di dalam sub famili glikosida hidrolase 43 (GH43). Mekanisme katalitik enzim sub famili GH43 menggunakan dua residu katalitik yang berperan sebagai nukleofil dan asam-basa. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi residu-residu katalitik Txy-xyl. Residu katalitik Txy-xyl diidentifikasi secara bioinformatika dengan cara melakukan pensejajaran residu katalitik Txy-xyl dengan β -D-xilosidase yang berasal dari famili GH43 lainnya. Hasil pensejajaran menunjukkan bahwa asam amino aspartat pada urutan ke-121 dan glutamat pada urutan ke-171 diduga merupakan residu-residu katalitik Txy-xyl. Asam amino yang diduga merupakan residu katalitik dilakukan mutasi menjadi asam amino alanin sehingga dihasilkan dua mutan, yaitu D121A dan E171A. Txy-xyl *wild type* dan mutan diproduksi dalam sistem ekspresi *E. coli* BL21(DE3) dan dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas dan kolom HisTrap. Uji aktivitas enzim Txy-xyl *wild type* dan mutan yang telah murni dilakukan terhadap substrat *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosit (*p*NP-X). Perbandingan hasil uji aktivitas antara Txy-xyl *wild type* dan mutan menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas. Hal ini mengkonfirmasi bahwa asam amino aspartat 121 dan asam amino glutamat 171 merupakan residu-residu katalitik Txy-xyl.

Kata kunci : β -D-xilosidase, *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11, Residu Katalitik, *Site Directed Mutagenesis*

Shadi, N. N. 2022, Identification of Catalytic Residues of β -Xylosidase from *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11. This thesis is under the supervision of Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si. and Ali Rohman, M.Si., Ph. D. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

β -D-xylosidase from a thermophilic bacterium *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11 (Txy-xyl) is a xylanolytic enzyme which plays a role in the degradation of xylan. Txy-xyl is found in glycoside hydrolase family 43 (GH43) based on Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) database. The catalytic mechanism of GH43 enzymes involved two catalytic residues which act as a nucleophile and an acid-base. The purpose of this research is to identify the catalytic residues of Txy-xyl that is carried bioinformatically with multiple sequence alignment analysis. The alignment result showed that amino acids of aspartate in the 121st and glutamate in the 171st are suspected as catalytic residues of Txy-xyl. The suspected amino acids are converted to alanine which resulted in two mutants, named D121A and E171A. Txy-xyl wild-type and mutants are produced in *E. coli* BL21(DE3) expression systems then purified using affinity chromatography and HisTrap column. Enzyme activity assays for purified Txy-xyl wild type and mutants were performed using *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (*p*NP-X) substrate. Comparison of activity results between Txy-xyl wild-type and mutants showed a decrease in activity. This confirmed that amino acids of aspartate in the 121st and glutamate in the 171st are the catalytic residues of Txy-xyl.

Keywords : β -D-xylosidase, *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11, Catalytic Residues, Site Directed Mutagenesis

DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL.....	i
LEMBAR PERNYATAAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
KATA PENGANTAR.....	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Biomassa.....	5
2.2 Xilan.....	6
2.3 Enzim Xilanolitik.....	7
2.4 <i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i> LX-11.....	9
2.5 Mutagenesis.....	11
2.5.1 Random Mutagenesis.....	12
2.5.2 Site-Directed Mutagenesis.....	13
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	14
3.2.1. Sampel Penelitian.....	14

3.2.2. Bahan Penelitian.....	14
3.2.3. Alat Penelitian.....	15
3.3 Diagram Alir Penelitian.....	16
3.4 Prosedur Penelitian.....	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Studi Bioinformatik.....	24
4.2. Transformasi dan Ekspresi Txy-Xyl- <i>WT</i> , Txy-Xyl- <i>D121A</i> , dan Txy-Xyl- <i>E171A</i>	26
4.3. Purifikasi Enzim Txy-Xyl- <i>WT</i> , Txy-Xyl- <i>D121A</i> , dan Txy-Xyl- <i>E171A</i>	29
4.4. Aktivitas Enzim Txy-Xyl- <i>WT</i> , Txy-Xyl- <i>D121A</i> , dan Txy-Xyl- <i>E171A</i>	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	32
5.2. Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.4.1	Taksonomi Bakteri <i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i> LX-11 (NCBI Taxonomy ID: 858215)	10

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.2.1	Struktur xilan	7
2.3.1	(A) Keterlibatan enzim xilanolitik dalam degradasi xilan (B) Hidrolisis xilan oleh β -xilosidase	8
2.4.1	Mekanisme enzim famili GH43	11
2.5.1.1	Mutagenesis acak dengan metode <i>error-prone</i> PCR (epPCR)	12
4.1.1	Peta Plasmid pET-15b (Novagen)	24
4.1.2	Superposisi model struktur 3D enzim Txy-Xyl dan struktur β -xilosidase asal <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08 (Xyl; PDB ID 5Z5D) A) Model 3D Txy-Xyl ditunjukkan dengan warna merah muda dan struktur Xyl ditunjukkan dengan warna biru B) Residu *D121 dan *E171 dari Txy-Xyl masing-masing berada pada posisi yang ekivalen dengan D121 dan E177 dari Xyl. Superposisi menggunakan <i>software</i> PyMOL	26
4.2.1	Hasil Transformasi pET-15b- <i>WT</i> , pET-15b- <i>D121A</i> , dan pET-15b- <i>E171A</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3)	27
4.2.2	Protein Marker Ladder Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein MW Marker	28
4.2.3	SDS-PAGE Hasil Ekspresi Txy-Xyl- <i>WT</i> , Txy-Xyl- <i>D121A</i> , dan Txy-Xyl- <i>E171A</i> . (M: marker; (1) : Txy-Xyl- <i>D121A</i> sebelum ditambahkan IPTG ; (2) : Txy-Xyl- <i>D121A</i> setelah ditambahkan IPTG ; (3) : Txy-Xyl- <i>E171A</i> sebelum ditambahkan IPTG ; (4) : Txy-Xyl- <i>E171A</i> setelah ditambahkan IPTG ; (5) : Txy-	29

- Xyl-*WT* sebelum ditambahkan IPTG ; (6) : Txy-Xyl-*WT* setelah ditambahkan IPTG)
- 4.3.1 SDS-PAGE Hasil Purifikasi Txy-Xyl-*WT* dan Txy-Xyl-*E171A*. 30
- (M : *marker*; (1) : Txy-Xyl-*WT crude* ; (2) : Txy-Xyl-*WT flowthrough* ; (3) : Txy-Xyl-*WT* fraksi purifikasi no. 5 ; (4) : Txy-Xyl-*E171A crude* ; (5) : Txy-Xyl-*E171A flowthrough* ; (6) : Txy-Xyl-*E171A* fraksi purifikasi no. 5)
- 4.3.2 SDS-PAGE Hasil Purifikasi Txy-Xyl-*D121A*. 31
- (M : *marker*; (1) : Txy-Xyl-*D121A crude* ; (2) : Txy-Xyl-*D121A* fraksi purifikasi no. 5)

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1	<i>Sequence</i> dan Karakteristik Fisiko-Kimia Txy-Xyl
2	<i>Coding Sequence</i> (CDS) Txy-Xyl
3	Hasil <i>Multiple Sequence Alignment</i> (MSA) struktur Txy-Xyl dengan beberapa β -xilosidase dari famili GH43
4	Hasil <i>Multiple Sequence Alignment</i> (MSA) struktur Txy-Xyl <i>wildtype</i> dan Txy-Xyl-mutan
5	Peta Konstruksi pET-15b- <i>Txy-Xyl</i>
6	Pembuatan Media
7	Pembuatan Larutan
8	Kromatogram Purifikasi Txy-Xyl- <i>WT</i>
9	Kromatogram Purifikasi Txy-Xyl- <i>D121A</i>
10	Kromatogram Purifikasi Txy-Xyl- <i>E171A</i>
11	Kurva Standar <i>p</i> -Nitrofenol
12	Penentuan Aktivitas Txy-Xyl- <i>WT</i> , Txy-Xyl- <i>D121A</i> , dan Txy-Xyl- <i>E171A</i>