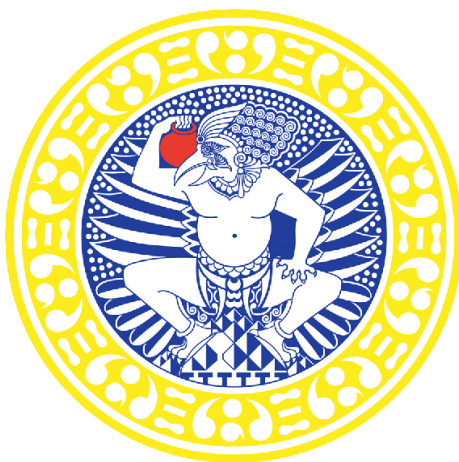


TESIS

**KARAKTERISASI ENZIM α -L-Arabinofuranosidase dari BAKTERI
PSIKROTOLERAN *Paenibacillus antarcticus***



YESI MAYSITA

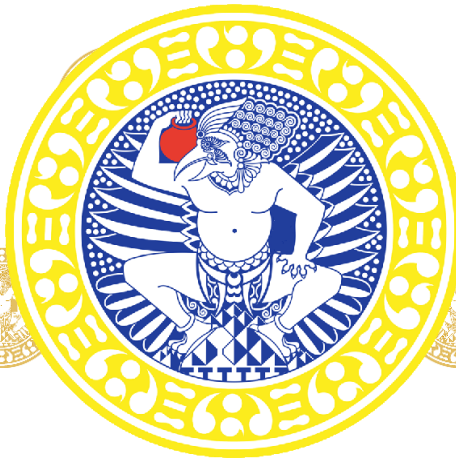
NIM 081924253005

**PROGRAM STUDI S2 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
IR- PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

TESIS

**KARAKTERISASI ENZIM α -L-Arabinofuranosidase dari BAKTERI
PSIKROTOLERAN *Paenibacillus antarcticus***



YESI MAYSITA
NIM 081924253005

PROGRAM STUDI S2 KIMIA

DEPARTEMEN KIMIA

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2022

ii

TESIS
THESIS

KARAKTERISASI ENZIM α -L-Arabinofuranosidase... MAYSITA, Y

Karakterisasi Enzim α -L-Arabinofuranosidase dari
Bakteri Psikrotoleran *Paenibacillus antarcticus*

Yesi Maysita10/1

**KARAKTERISASI ENZIM α -L-Arabinofuranosidase dari BAKTERI
PSIKROTOLERAN *Paenibacillus antarcticus***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Magister Kimia
pada Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Oleh:

YESI MAYSITA

NIM 081924253005

**PROGRAM STUDI S2 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2022

HALAMAN PENGESAHAN NASKAH TESIS

TESIS

KARAKTERISASI ENZIM α -L-Arabinofuranosidase dari BAKTERI
PSIKROTOLERAN *Paenibacillus antarcticus*

Disusun Oleh:

YESI MAYSITA

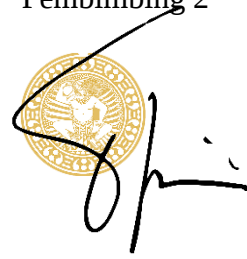
NIM 081924253005

Disetujui Oleh :

Pembimbing 1

Pembimbing 2


Ali Rohman, M.Si., Ph.D
NIP. 196808071994031003


Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
NIP. 196306151987012001

Mengetahui
Ketua Departemen Kimia
Universitas Airlangga


Mochammad Zak Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 1983302022009121005

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga naskah proposal tesis yang berjudul “Karakterisasi Enzim α -L-Arabinofuranosidase dari Bakteri Psikrotoleran *Paenibacillus antarcticus*” dapat terselesaikan. Naskah tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) pada jurusan S2 Kimia, Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

Penyusunan naskah tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Bapak Mochamad Zakki Fahmi, S.Si, M.Si., Ph.D. selaku ketua Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
2. Bapak Ali Rohman, M.Si., Ph.D., selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian selama penyusunan ide penelitian, penelitian, dan penyusunan naskah baik proposal maupun tesis.
3. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penelitian, dan penyusunan naskah baik proposal maupun tesis.
4. Bapak Yanuardi Raharjo, S.Si., M.Sc., Ph.D. selaku dosen wali dan ketua prodi S2 kimia yang telah memberikan bimbingan, saran dan nasehat selama menjadi mahasiswa
5. Kedua orang tua saya bapak Suwino dan ibu Supriyatin yang telah membimbing, memberi dukungan serta semangat hingga saat ini dan seterusnya, dan saudari tercintaku Zulida Ulfarida dan Nana Septina Rohmah.
6. Teman-temanku Theavana, Triza Giri, Annisa Fami, Nova, Kartika, Rifdiana, Ismi, Via, dan Dinda.
7. Teman-temanku S2 Kimia Refka, Mbak Titah, Ulfa, dan Erlinda.
8. Saudara-saudaraku yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, yang memberikan suport dalam penelitian dan penulisan naskah ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan tesis ini. Akhirnya penulis berharap, semoga isi dalam naskah tesis ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Januari 2022

Penulis

Maysita, Y, 2022, Karakterisasi Enzim α -L-Arabinofuranosidase dari Bakteri Psikrotoleran *Paenibacillus antarcticus*, Tesis dibawah bimbingan Ali Rohman, M.Si., Ph.D. dan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si., Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

ABSTRAK

Paenibacillus antarcticus merupakan bakteri psikrofilik yang diisolasi dari sedimen Antartika. *P. antarcticus* dilaporkan menghasilkan enzim glukosida hidrolase famili (GH51) dari α -L-arabinofuranoside (Pan-Abf). Penelitian sebelumnya menyebutkan, enzim Pan-Abf aktif pada rentang suhu 20-40 °C. Analisis zat aditif menjelaskan bahwa aktivitas Pan-Abf tidak dipengaruhi oleh penambahan 10 mM garam dan 100 mM monosakarida. Gen sintetik pET-15b-Pan-Abf pada penelitian ini berhasil diekspresikan dalam *Escherichia coli* BL21 (DE3) dan dimurnikan dengan kromatografi afinitas. Selanjutnya, dilakukan penentuan karakter biokimia enzim Pan-Abf. Analisis Pan-Abf murni (MW ~5.9 kDa) menunjukkan aktivitas yang tinggi terhadap para-nitrofenil- α -L-arabinofuranoside (pNPA). Parameter kinetika terhadap substrat pNPAs secara berturut-turut yaitu V_{max} dan nilai K_M sebesar $24,3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ dan $1,9 \text{ mM}$ dengan Nilai k_{cat} dan k_{cat}/K_M masing-masing adalah $189,6 \text{ det}^{-1}$ dan $97,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{det}^{-1}$. Aktivitas enzim Pan-abf menunjukkan toleransi dengan adanya NaCl dan monosakarida (arabinosa, xilosa dan glukosa) dalam campuran reaksi. Hidrolisis Wheat arabinoxylan dilakukan dengan adanya enzim Pan-Abf, xilanase dan β -xylosidase baik secara individu maupun dalam reaksi campuran. Reaksi dilakukan untuk menentukan efek sinergi enzim Pan-Abf bersama enzim xilanase dan β -xylosidase pada proses hidrolisis struktur Wheat arabinoxylan.

Kata Kunci: Biomassa, Xilan, Enzim Xilanolitik, α -L-Arabinofuranoside.

Maysita, Y, 2022, Characterization Of α -L-Arabinofuranosidase Enzyme from Psychrotolerant Bacterium *Paenibacillus antarcticus*, Thesis under guidance Ali Rohman, M.Si., Ph.D. and Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si., Chemistry Department, Faculty of Sains and Technology, Universitas Airlangga.

ABSTRACT

Paenibacillus antarcticus is a psychrophilic bacteria isolated from Antarctic sediment. *P. antarcticus* has been reported to produce glycoside hydrolase family (GH51) enzyme of α -L-arabinofuranoside (Pan-Abf). Previous research reported that the Pan-Abf was active at a temperature range of 20-40 °C. The analysis of additives explained that the Pan-Abf activity was not affected by the addition of some 10 mM salts and 100 mM monosaccharides. In this study, synthetic gene pET-15b-Pan-Abf was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) under mild-condition and purified by chromatography affinity. The analysis of purified Pan-Abf (MW ~5.9 kDa) was mainly active against para-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside presenting the following kinetic parameters V_{max} and K_M value of 24.3 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ and 1.9 mM with the k_{cat} and k_{cat}/K_M value is 189.6 sec^{-1} and 97.3 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$ respectively. Pan-Pan-Abf activity exhibite tolerant toward the presence of a high concentration of NaCl and monosaccharides (arabinose, xylose and glucose) in the reaction mixture. Hydrolysis of wheat arabinoxylan was performed in the presence of purified enzymes of Pan-Abf, xylanase and β -xylosidase in individual and in the association of three enzymes. Associated of three enzymes reaction was performed in the sequential and simultaneous reaction made to verify the cooperation between these xylanolytic enzymes in the xylan's structure hydrolysis.

Key Words: Biomass, Xylan, Xylanolytic Enzyme, α -L-Arabinofuranoside.

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yesi Maysita
NIM : 081924253005
Program Studi : S2 Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Magister (S2)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan kegiatan plagiat dalam penelitian tesis saya yang berjudul:

**Karakterisasi Enzim α -L-Arabinofuranosidase dari Bakteri Psikrotoleran
*Paenibacillus antarcticus***

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah diterapkan.

Demikian surat pernyataan ini yang saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 31 Januari 2022



Yesi Maysita
NIM 081924253005

DAFTAR ISI

LEMBAR COVER	i
LEMBAR JUDUL	ii
LEMBAR PRASYARAT GELAR	iii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH TESIS	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Biomassa.....	9
2.2 Xilan.....	9
2.3 Enzim Xilanolitik.....	11
2.4 Enzim α -L-Arabinofuranosidase.....	12
2.5 α -L-Arabinofuranosidase dari <i>Paenibacillus antarcticus</i>	14
2.6 Karakterisasi Enzim.....	14
2.6.1 Parameter Kinetika Enzim.....	15
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	17
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	17
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20
3.3 Skema Kerangka Konseptual Penelitian.....	21
BAB IV METODE PENELITIAN	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
4.2 Bahan dan Peralatan Penelitian.....	23
4.2.1 Sampel Penelitian.....	23
4.2.2 Bahan Penelitian.....	23
4.2.3 Alat Penelitian.....	23
4.3 Diagram Alir Penelitian.....	24
4.3.1 Diagram Alir Ekspresi Protein Rekombinan.....	24
4.3.2 Diagram Alir Karakterisasi	25
4.4 Prosedur Penelitian.....	26
4.4.1 Ekspresi dan Pemurnian Pan-Abf.....	26
4.4.1.1 Peremajaan Bakteri.....	26
4.4.1.2 Ekspresi Pan-Abf.....	26
4.4.1.3 Lisis Sel.....	27

	4.4.1.4	Pemurnian Protein Pan-Abf dengan Kromatografi Afinitas.....	27
	4.4.2	Penentuan Kadar Protein.....	28
	4.4.2.1	Pembuatan Kurva Standar Bovin Serum Albumin (BSA).....	28
	4.4.2.2	Penentuan Kadar Pan-Abf.....	28
	4.4.3	Uji Aktivitas α -L-Arabinofuranosidase.....	29
	4.4.3.1	Uji Aktivitas Pan-Abf dengan Substrat Kromogenik.....	29
	4.4.3.1.1	Uji Aktivitas.....	29
	4.4.3.1.2	Pembuatan Kurva Standar <i>p</i> -Nitrofenol.....	29
	4.4.3.2	Uji Aktivitas Pan-Abf dengan Substrat Komersial.....	30
	4.4.3.2.1	Uji Aktivitas.....	30
	4.4.3.2.2	Pembuatan Kurva Standar Arabinosa.....	31
	4.4.4	Karakterisasi Pan-Abf.....	31
	4.4.4.1	Penentuan Parameter Kinetika.....	31
	4.4.4.2	Penentuan Pengaruh Konsentrasi Garam dan Monosakarida.....	32
	4.4.4.3	Penentuan Spesifisitas Substrat.....	32
	4.4.4.4	Analisis Pengaruh Efek Kerja Sinergi Enzim....	32
BAB V		HASIL dan PEMBAHASAN.....	34
	5.1	Produksi dan Pemurnian Pan-Abf.....	34
	5.2	Spesifisitas Pan-Abf Terhadap Beberapa Substrat Sintetik, Oligosakarida dan Polimer.....	37
	5.2.1	Spesifisitas Pan-Abf Terhadap Substrat Sintetik para-Nitrophenil-Sugar (<i>p</i> NP-S).	40
	5.2.2	Spesifisitas Pan-Abf Terhadap Substrat Arabinooligosakarida (AOS) dan Xilooligosakarida (XOS).....	41
	5.2.3	Spesifisitas Pan-Abf Terhadap Substrat Oligoarabinosil (O-AOX).	42
	5.2.4	Spesifisitas Pan-Abf Terhadap Substrat Polimer.....	44
	5.3	Penentuan Parameter Kinetika Pan-Abf Terhadap Substrat <i>p</i> NP-A.	45
	5.4	Pengaruh Beberapa Monosakarida pada Aktivitas Pan-Abf Terhadap Substrat <i>p</i> NP-A.....	49
	5.5	Pengaruh Garam NaCl pada Aktivitas Pan-Abf Terhadap Substrat <i>p</i> NP-A.....	52
	5.6	Penentuan Pengaruh Sinergi Kerja Pan-Abf dengan Enzim Endo-Xilanase dan β -Xilosidase pada Hidrolisis Wheat Arabinosil.....	57
BAB VI		KESIMPULAN dan SARAN.....	62
	6.1	Kesimpulan.....	62
	6.2	Saran.....	63
		DAFTAR PUSTAKA.....	64
		LAMPIRAN.....	71

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul Gambar	Halaman
2.1	Struktur Xilan	12
2.2	Kurva Michaelis-Menten	15
5.1	Struktur Asam Amino Histidin dan Senyawa Imidazol	35
5.2	Elektroforegram Sodium Dodesil-Sulfat Polyacrilamide Gel Electroforesis (SDS-Page) Sampel Produksi dan Pemurnian Pan-Abf	36
5.3	Mekanisme Kerja Enzim Sub-Kelompok AXH	38
5.4	Hasil Pengujian Pan-Abf terhadap Substrat Sintetik <i>Para</i> -Nitrophenyl-Sugar (<i>Pnp</i> -S)	41
5.5	Sistem Penamaan Substrat Oligo-Arabinosilan (O-AOX)	43
5.6	Kurva Michaelis-Menten Kinetika Pan-Abf	48
5.7	Grafik Hubungan Konsentrasi Monosakarida (Arabinosa, Xilosa, Dan Glukosa) Terhadap Aktivitas Enzim Pan-Abf	50
5.8	Struktur Tim-Barrel (α 8/ β 8-barrel)	51
5.9	Grafik Hubungan Konsentrasi NaCl Terhadap Aktivitas Enzim Pan-Abf	53
5.10	Struktur Substrat Wheat Arabinoxylan (P-EDWAX)	59

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul Tabel	Halaman
5.1	Data Hasil Penentuan Spesifisitas Substrat Pan-Abf	39
5.2	Parameter Kinetika α -L-Arabinofuranosidase	46
5.3	<i>Accessible Residue</i> pada Struktur Permukaan Enzim Pan-Abf <i>Wild-Type</i> dan Rekombinan	55
5.4	Efek Sinergi Campuran Enzim pada Substrat Wheat Arabinoxylan	58

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Lampiran	Judul Lampiran
1	<i>Sequence</i> Protein Pan-Abf dan Beberapa Sifatnya
2	Coding Sequence (CDS) Pan-Abf
3	Distribusi Asam Amino pada Struktur Primer Enzim Pan-Abf <i>Wild-Type</i> dan Rekombinan
4	Peta Plasmid pET-15b dan pET-15b-Pan-Abf
5	Pembuatan Larutan dan Media
6	Kurva Standar
7	Nama dan Struktur Substrat

DAFTAR SINGKATAN

Abf	: α -L-Arabinofuranoside
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis
pNP-A	: <i>para</i> -nitrofenil- α -L-arabinofuranosa
pNP-X	: <i>para</i> -nitrofenil- β -D-xilopiranosida
pNP-Gal	: <i>para</i> -nitrofenil- α -D-galaktopiranosida
pNP-G	: <i>para</i> -nitrofenil- β -D-glukopiranosida
X2, X3, X4	: Xilobiosa, Xilotriosa, Xilotetraosa
A2, A3, A4, A5, A6, A7	: Arabinobiosa, Arabinotriosa, Arabinotetraosa, Arabinopentosa, Arabinoheksosa, Arabinoheptosa
O-A4B	: 3 ² - α -L-arabinofuranosil-(1,5)- α -L-arabinotriosa
O-A5BMIX	: 2 ² ,3 ² -di- α -L-arabinofuranosil-(1,5)- α -L-arabinotriosa plus 3 ² - α -L-arabinofuranosil-(1,5)- α -L-arabinotetraosa
O-A³X	: 3 ² - α -L-arabinofuranosil-xilobiosa)
O-A²XX	: 2 ³ - α -L-arabinofuranosil-xilotriosa
O-A²⁺³XX	: 2 ³ ,3 ³ -di- α -L-arabinofuranosil-xilotriosa
O-XA²XX	: 2 ³ - α -L-arabinofuranosil-xilotetraosa
O-XA³XX	: 3 ³ - α -L-arabinofuranosil-xilotetraosa
O-XAXXMIX	: 3 ³ - α -L- plus 2 ³ - α -L-arabinofuranosil-xilotetraosa
P-ARAB	: Arabinan (Sugar Beet)
P-DARAB	: Debranched Arabinan (Sugar Beet)
P-EDWAX	: Wheat Arabinoxylan, 30% ARA substitution
P-RAXY	: Arabinoxilan (Rye Flour)