

TESIS

**KONSTRUKSI FUSI GEN PENYANDI *CARBOHYDRATE BINDING*
MODULE -GbtXyl43B DARI *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 DENGAN GEN
PENYANDI α -AMILASE DARI *Anoxybacillus flavithermus* TP-01**



**REFKA REVINA MELYATA EKWANDA
NIM. 081924253001**

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

TESIS

**KONSTRUKSI FUSI GEN PENYANDI *CARBOHYDRATE BINDING*
MODULE -GbtXyl43B DARI *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 DENGAN GEN
PENYANDI α -AMILASE DARI *Anoxybacillus flavithermus* TP-01**



REFKA REVINA MELYATA EKWANDA
NIM. 081924253001

PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

2022

**KONSTRUKSI FUSI GEN PENYANDI CARBOHYDRATE BINDING
MODULE -GbtXyl43B DARI *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 DENGAN GEN
PENYANDI α -AMILASE DARI *Anoxybacillus flavithermus* TP-01**

TESIS

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

Oleh:

**REFKA REVINA MELYATA EKWANDA
NIM. 081924253001**

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

HALAMAN PENGESAHAN NASKAH TESIS

TESIS

Konstruksi Fusi Gen Penyandi *Carbohydrate Binding Module* -Gbtxl43b dari *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08 dengan Gen Penyandi α -amilase dari *Anoxybacillus Flavithermus* TP-01

Disusun Oleh:

REFKA REVINA MELYATA EKWANDA

NIM. 081924253001

Disetujui oleh:

Pembimbing II

Pembimbing I


Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S.
NIP. 195610141983032001


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

Mengetahui
Ketua Departemen Kimia
Universitas Airlangga


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

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis berjudul “Konstruksi Fusi Gen Penyandi *Carbohydrate Binding Module* -Gbt_{xyl43b} dari *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08 dengan Gen Penyandi α -Amilase dari *Anoxybacillus Flavithermus* TP-01” dengan baik.

Selama menempuh studi S2 khususnya pada proses pengerjaan tesis baik dalam penelitian maupun penyusunan naskah tesis, penulis tidak akan selesai tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dosen pembimbing I, Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si. Terima kasih telah berkenan dengan sangat sabar meluangkan waktu untuk membimbing, berdiskusi, memberikan saran, memberikan motivasi hebat, memberikan kesempatan bekerja dan belajar dibawah bimbingan beliau, serta memberikan pengalaman berharga kepada penulis.
2. Dosen pembimbing II, Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S. Terima kasih telah berkenan dengan sabar meluangkan waktu untuk membimbing, berdiskusi, memberikan saran, memberikan kesempatan belajar dibawah bimbingan beliau serta memberikan pengalaman penelitian sehingga tesis ini dapat selesai dengan baik.
3. Tim penguji, Prof. Dr. Purkan, M.Si., Dr. Mulyadi Tanjung, M.S., Dr. rer. Nat. Ganden Suprayitno, M.Sc. Terima kasih telah berkenan memberikan evaluasi dan saran kepada penulis terkait penelitian dan penulisan tesis.
4. Dosen wali, Yanuardi Raharjo, S. Si., M.Sc., Ph.D. Terima kasih telah berkenan dengan sabar memberikan masukan, arahan, motivasi dan memberi bantuan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi S2.
5. Ketua Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Mochamad Zaki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D. Terima kasih telah berkenan memberi kesempatan dan kemudahan selama studi S2.
6. Seluruh staf pengajar, Bapak/Ibu Dosen Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan banyak pelajaran, pengalaman, arahan, dan bantuan kepada penulis selama studi S2.
7. Keluarga tercinta, Ayah, Mamah, Adik, mbak Vivi. Terima kasih tak terhingga untuk segala doa, motivasi, kesempatan, kepercayaan, kasih sayang, dukungan,

bantuan, kesabaran, pengalaman, dan segala hal yang diberikan kepada penulis selama studi S2 hingga terselesaikannya tesis ini.

8. Seluruh staf di lingkungan Universitas Airlangga, khususnya di Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi yang telah membantu penulis selama kuliah, penelitian dan administrasi hingga penulis lulus S2.
9. Staf dan anggota laboratorium Proteomik, Kartika, Mbak Puput, Mbak Galih, Mbak Mamik dan Ibu Fatiha. Terima kasih untuk segala bantuan, dukungan, doa, motivasi, keceriaan dan suka duka selama penulis menyelesaikan penelitian di laboratorium proteomik.
10. Teman-teman studi S2, Ulfah, Mbak Titah, Yesi, dan Anis. Terima kasih untuk segala bantuan, motivasi dan kerjasama selama penulis menempuh S2.
11. Pihak-pihak yang telah membantu penulis selama studi S2 yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Terima kasih untuk bantuan, saran, pengalaman, dan segala hal sehingga penulis dapat menyelesaikan studi S2.

Penelitian ini juga masih jauh dari kesempurnaan, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi perbaikan tesis dan kemajuan penelitian di masa yang akan datang. Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya biokimia. Penulis juga memohon maaf atas segala kesalahan baik yang disengaja maupun tidak disengaja.

Surabaya, 18 Januari 2022

Penulis

Ekwanda, R.R.M, 2022, Konstruksi Fusi Gen Penyandi *Carbohydrate Binding Module* -GbtXyl43b dari *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08 dengan Gen Penyandi α -Amilase dari *Anoxybacillus Flavithermus* TP-01, Tesis dibawah bimbingan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si., dan Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S., Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

ABSTRAK

CBM-GbtXyl43B merupakan modul non katalitik yang terdapat dalam enzim β -xilosidase famili GH43 dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. CBM memediasi enzim dengan substrat lebih lama sehingga aktivitas katalitik enzim menjadi lebih optimal. α -amilase merupakan enzim yang berhasil diisolasi dari bakteri *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 dari Sumber Air Panas Gunung Pancar, Bogor. Salah satu fungsi amilase adalah sebagai agen delignifikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi fusi dari gen penyandi CBM-GbtXyl43B dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dengan gen penyandi α -amilase dari *Anoxybacillus flavithermus* TP-01. Penggabungan dua fragment DNA yang berbeda dilakukan melalui perancangan primer secara tumpah tindih. Serta disisipkan enzim restriksi yaitu *EcoRI* dan *SalI* agar dapat memotong secara spesifik DNA target *cbm*-amilase. Fusi ini dilakukan dengan tiga tahapan dengan teknik *overlapping* PCR. Elektroforegram produk PCR-1 menunjukkan pita 468 bp merupakan gen *cbm*-GbtXyl43B dan elektroforegram produk PCR-2 menunjukkan pita 1519 bp merupakan gen α -amilase. Pada tahap ketiga produk PCR menunjukkan pita 1987 bp yang merupakan hasil fusi gen *cbm*-amilase.

Kata Kunci: *carbohydrate binding module*, α -amilase, fusi.

Ekwanda, R.R.M, 2022, Construction of Fusion Gene Carbohydrate Binding Module-GbtXyl43b from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 with α -amilase from *Anoxybacillus flavithermus* TP-01, Thesis under guidance Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si., and Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S., Chemistry Department, Faculty of Sains and Technology, Universitas Airlangga.

ABSTRACT

CBM-GbtXyl43B is a non catalytic modules belongs to β -xilosidase enzymes of GH43 family from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. CBMs ensure an intimate and prolonged contact with the substrate, which generally leads to higher enzyme activities. α -amylase is an enzyme that bacterium was successfully isolated from *Anoxybacillus flavithermus* TP-01 from the Hot Spring of Mount Pancar, Bogor. One of amylase fuction is a delignification agent. The study aims to construct fusion of CBM-GbtXyl43B from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 with α -amylase from *Anoxybacillus flavithermus* TP-01. Two different DNA fragments can be combined by overlapping primary designs. As well as inserted restriction enzymes namely, EcoRI and SalI in order to cut specifically the DNA of the target cbm-amylase. This fusion was successfully with three steps overlapping PCR technique. The electroforegram of PCR-1 products shows a 468 bp band suspected to be the *cbm*-GbtXyl43B gene and the PCR-2 product electroforegram shows a 1519 bp band suspected to be the α -amylase gene. In the third stage the PCR product showed a 1987 bp band that is thought to be fusion of the *cbm*-amylase gene.

Key words: carbohydrate binding module, laccase, fusion.

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Refka Revina Melyata Ekwanda

NIM : 081924253001

Program Studi : S2 Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Jenjang : Magister (S2)

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

Konstruksi Fusi Gen Penyandi *Carbohydrate Binding Module* -Gbt_{xyl43b} dari *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08 dengan Gen Penyandi α -Amilase dari *Anoxybacillus Flavithermus* TP-01

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



Refka Revina Melyata Ekwanda
NIM. 081924253001

DAFTAR ISI

LEMBAR COVER.....	i
LEMBAR JUDUL.....	ii
LEMBAR PRASYARAT GELAR.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN NASKAH TESIS.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTACT.....	viii
SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan umum	5
1.3.2. Tujuan khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat keilmuan	5
1.4.2. Manfaat praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Enzim Amilase.....	6
2.1.1. α -amilase	6
2.1.2. β -amilase	8
2.1.3. Glukoamilase	8
2.2. Aplikasi Enzim α -amilase	9
2.3. Bakteri termofilik.....	10
2.4. <i>Anoxybacillus flavithermus</i>	11
2.5. Gen α -amilase dari <i>Anoxybacillus flavithermus</i> TP-01.....	12
2.6. <i>Carbohydrate Binding Module</i> (CBM).....	13
2.7. CBM-GbtXyl43B.....	15
2.8. Fusi Gen	17
2.9. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	19
2.10. Kloning Gen.....	21
2.11. Sekuensing DNA	23
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	26
3.1. Kerangka Konseptual.....	26
3.2. Hipotesis Penelitian	28
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1. Waktu dan tempat penelitian	30
4.2. Bahan dan peralatan.....	30
4.2.1. Sampel penelitian.....	30
4.2.2. Bahan penelitian.....	30
4.2.3. Alat penelitian.....	30
4.3. Diagram Alir Penelitian	33

4.4. Prosedur Kerja	35
4.4.1. Pembuatan reagensia dan medium.....	35
4.4.1.1. Pembuatan media LBA padat.....	35
4.4.1.2. Pembuatan media LBA padat	35
4.4.1.3. Pembuatan media LB cair.....	35
4.4.2. Peremajaan dan inokulasi.....	36
4.4.2.1. Peremajaan dan inokulasi isolat <i>E. coli</i>	36
4.4.2.2. Peremajaan dan inokulasi isolat <i>E. coli</i>	36
4.4.3. Isolasi DNA plasmid	37
4.4.4. Desain primer F1, R1, F2, dan R2	38
4.4.5. Amplifikasi fragmen gen.....	39
4.4.5.1. Amplifikasi fragmen gen CBM.....	39
4.4.5.2. Amplifikasi fragmen gen α -amilase	39
4.4.5.3. Amplifikasi fragmen gen <i>cbm</i> -amilase.....	40
4.4.5.4. Amplifikasi hasil fusi <i>cbm</i> -amilase.....	40
4.4.6. Elektroforesis gel agarosa	40
4.4.7. Pemurnian produk PCR.....	41
4.4.8. Pemotongan DNA dengan <i>SalI</i> dan <i>EcoRI</i>	42
4.4.9. Ligasi gen penyandi CBM-amilase.....	42
4.4.10. Transformasi pGEX-(<i>cbm</i> -amilase).....	42
4.4.11. Sekuensing DNA genom.....	43
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	44
5.1. Desain Konstruksi fusi gen	44
5.2. Desain primer 1-F, 1-R, 2-F dan 2-R.....	49
5.3. Isolasi DNA plasmid	51
5.4. Amplifikasi gen <i>cbm</i> -GbtXyl43B (PCR 1)	53
5.5. Amplifikasi gen α -amilase (PCR 2)	55
5.6. Amplifikasi gen fusi <i>cbm</i> -amilase (PCR 3).....	57
5.7. Amplifikasi gen fusi <i>cbm</i> -amilase (PCR 4)	59
5.8. Pemurnian produk PCR	61
5.9. Pemotongan dengan enzim restriksi	61
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1. Kesimpulan.....	63
6.2. Saran.....	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	69

DAFTAR TABEL

No.	Judul Gambar	Halaman
Tabel 5.1.	Desain Primer <i>Forward</i> dan Primer <i>Reverse</i>	51

DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1.	Mekanisme SN ₂ pemutusan ikatan oleh α -amilase	8
Gambar 2.2.	Hidrolisis pati oleh enzim α -amilase.....	8
Gambar 2.3.	Kurva pertumbuhan mikroorganisme (Prescott, 2005).....	10
Gambar 2.4	Posisi CBM pada protein GbtXyl43B (Ratnadewi, 2013)	15
Gambar 2.5.	Model Struktur 3 Dimensi CBM (Ratnadewi, 2013).....	17
Gambar 2.6.	Langkah dasar dari PCR (Brown, 2010)	21
Gambar 2.7.	Sekuensing DNA (Janitz, 2008).....	23
Gambar 2.8.	Langkah dasar dalam kloning gen (Brown, 2010)	25
Gambar 3.1.	Kerangka konseptual penelitian	29
Gambar 4.1.	Diagram alir fusi gen <i>cbm</i> -amilase.....	32
Gambar 4.2.	Strategi fusi gen <i>cbm</i> -GbtXyl43B dan amilase	33
Gambar 4.3.	Gen <i>cbm</i> -GbtXyl43B dalam plasmid pET-30a.....	34
Gambar 4.4.	Gen α -amilase dalam plasmid pGEX.....	34
Gambar 5.1.	Konstruksi fusi gen <i>cbm</i> -amilase.....	48
Gambar 5.2.	Elektroforegram DNA Plasmid.....	53
Gambar 5.3.	Elektroforegram PCR-1.....	55
Gambar 5.4.	Elektroforegram PCR-2.....	57
Gambar 5.5.	Elektroforegram PCR-3.....	59
Gambar 5.6.	Elektroforegram PCR-4.....	60
Gambar 5.7.	Pemurnian produk PCR-4.....	61
Gambar 5.8.	Pemotongan dengan enzim restriksi	62

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul Gambar	Halaman
Lampiran 1.	Jadwal kegiatan penelitian.....	70
Lampiran 2.	Dana penelitian.....	70
Lampiran 3.	Desain primer 1-F.....	71
Lampiran 4.	Desain primer 1-R.	72
Lampiran 5.	Desain primer 2-F.....	73
Lampiran 6.	Desain primer 2-R.	74

DAFTAR SINGKATAN

DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	: <i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i>
CBM	: <i>Carbohydrate Binding Module</i>
cbm36GbtXyl43B	: Gen Carbohydrate Binding Module36 β -xilosidase 43B
CBM36GbtXyl43B	: Protein Carbohydrate Binding Module36 β -xilosidase 43B
GbtXyl43B	: Gen β -xilosidase 43B dari <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08
GH	: Glikosida Hidrolase
GST	: Glutathione S-transferases
CM	: <i>Catalytic Module</i>
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria Bertani
LBA	: Luria Bertani Ampicilin
MCS	: <i>Multiple Cloning Site</i>
rpm	: <i>rotation per minutes</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>