

EKSPRESI, PURIFIKASI, DAN KARAKTERISASI ENZIM TREHALOSE SYNTHASE DARI *Arthrobacter alpinus* (AaTreS) UNTUK PRODUKSI TREHALOSA

RAHMAH MUTHMAINNAH AZAM



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Ekspresi, Purifikasi, dan Karakterisasi Enzim Trehalose Synthase dari *Arthrobacter alpinus* (AaTreS) untuk Produksi Trehalosa” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal dari atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Juni 2026

Rahmah Muthmainnah Azam
P0501221011



RINGKASAN

RAHMAH MUTHMAINNAH AZAM. Ekspresi, Purifikasi, dan Karakterisasi Enzim Trehalose Synthase dari *Arthrobacter alpinus* (AaTreS) untuk Produksi Trehalosa. Dibimbing oleh MULYORINI RAHAYUNINGSIH dan FINA AMRETA LAKSMI.

Trehalosa merupakan disakarida non-reduksi yang banyak dimanfaatkan dalam industri pangan, farmasi, dan kosmetik karena memiliki stabilitas termal dan kimia yang tinggi serta kemampuan melindungi biomolekul. Produksi trehalosa secara enzimatis melalui jalur trehalose synthase (TreS) menjadi alternatif yang menjanjikan karena prosesnya lebih spesifik, sederhana, dan berlangsung pada kondisi reaksi yang relatif ringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengekspresikan, memurnikan, serta mengarakterisasi enzim TreS dari *Arthrobacter alpinus* (AaTreS) secara biokimia dan kinetika guna mengevaluasi potensinya sebagai biokatalis dalam produksi trehalosa.

Gen *treS* dari *A. alpinus* diekspresikan secara heterolog dalam *Escherichia coli* BL21 StarTM (DE3), kemudian enzim rekombinan yang dihasilkan dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas logam terimobilisasi. Hasil optimasi ekspresi menunjukkan bahwa kondisi induksi pada suhu rendah menghasilkan enzim AaTreS dalam fraksi larut dengan tingkat ekspresi yang lebih baik. Enzim hasil purifikasi terdeteksi sebagai protein berukuran sekitar 67 kDa berdasarkan analisis SDS-PAGE dan *Western blot*. Karakterisasi biokimia menunjukkan bahwa AaTreS memiliki aktivitas optimum pada suhu 30 °C dan pH 6,5. Enzim ini juga menunjukkan stabilitas yang lebih baik pada suhu 20 °C dengan waktu paruh sekitar 11 jam dibandingkan dengan suhu 30 °C. Pengujian pengaruh ion logam menunjukkan bahwa AaTreS tidak memerlukan ion logam sebagai kofaktor utama, dengan aktivitas relatif yang tetap tinggi pada perlakuan EDTA dan sedikit peningkatan aktivitas pada perlakuan Ca²⁺.

Analisis kinetika menunjukkan bahwa aktivitas AaTreS terhadap maltosa mengikuti model Michaelis – Menten dengan nilai afinitas sedang terhadap substrat. Uji biokonversi berbasis waktu menunjukkan bahwa AaTreS mampu mengkatalisis konversi maltosa menjadi trehalosa, dengan efisiensi konversi yang lebih tinggi pada konsentrasi substrat rendah. Profil biokonversi yang diperoleh mencerminkan karakter reaksi TreS yang reversibel dan sejalan dengan karakteristik kinetika enzim. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa TreS dari *A. alpinus* memiliki karakteristik ekspresi, aktivitas, dan stabilitas yang mendukung potensinya sebagai biokatalis dalam produksi trehalosa pada kondisi reaksi ringan dan hemat energi.

Kata kunci: *Arthrobacter alpinus*, biokonversi, ekspresi rekombinan, karakterisasi enzim, trehalosa, trehalose synthase (TreS).

SUMMARY

RAHMAH MUTHMAINNAH AZAM. *Expression, Purification, and Characterization of Trehalose Synthase Enzyme from Arthrobacter alpinus (AaTreS) for Trehalose Production. Supervised by MULYORINI RAHAYUNINGSIH and FINA AMRETA LAKSMI.*

Trehalose is a non-reducing disaccharide widely used in the food, pharmaceutical, and cosmetics industries due to its high thermal and chemical stability and ability to protect biomolecules. Enzymatic trehalose production via the trehalose synthase (TreS) pathway is a promising alternative because the process is more specific, simpler, and occurs under relatively mild reaction conditions. This study aims to biochemically and kinetically characterize the TreS enzyme from Arthrobacter alpinus (AaTreS) and evaluate its potential as a biocatalyst for trehalose production.

The treS gene from A. alpinus was heterologously expressed in Escherichia coli BL21 Star™ (DE3), and then the resulting recombinant enzyme was purified using immobilized metal affinity chromatography. The results of expression optimization showed that low-temperature induction conditions produced the AaTreS enzyme in the soluble fraction with a better expression level. The purified enzyme was detected as a protein of approximately 67 kDa based on SDS-PAGE and Western blot analysis. Biochemical characterization showed that AaTreS had optimum activity at 30 °C and pH 6.5. This enzyme also showed greater stability at 20 °C, with a half-life of approximately 11 hours, compared to 30 °C. Testing the effect of metal ions showed that AaTreS does not require metal ions as a primary cofactor, with relatively high activity observed in the EDTA treatment and a slight increase in the Ca²⁺ treatment.

Kinetic analysis showed that AaTreS's activity toward maltose follows the Michaelis-Menten model with moderate substrate affinity. Time-series bioconversion assays demonstrated that AaTreS catalyzes the conversion of maltose to trehalose, with higher conversion efficiency at lower substrate concentrations. The obtained bioconversion profile reflects the reversible nature of the TreS reaction and aligns with the enzyme's kinetics. Overall, the results of this study indicate that TreS from A. alpinus exhibits expression, activity, and stability characteristics that support its potential as a biocatalyst for trehalose production under mild, energy-efficient reaction conditions.

Keywords: *Arthrobacter alpinus, bioconversion, recombinant expression, enzyme characterization, trehalose, trehalose synthase (TreS).*



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, 2026
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

EKSPRESI, PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM TREHALOSE SYNTHASE DARI *Arthrobacter alpinus* (AaTreS) UNTUK PRODUKSI TREHALOSA

RAHMAH MUTHMAINNAH AZAM

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Bioteknologi

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tim Penguji pada Ujian Tesis:
Prof. Dr. Ir. Khaswar Syamsu, M.Sc.St.

Perpustakaan IPB University



Judul : Ekspresi, Purifikasi, dan Karakterisasi Enzim Trehalose Synthase dari
Arthrobacter alpinus (AaTreS) untuk Produksi Trehalosa
Nama : Rahmah Muthmainnah Azam
NIM : P0501221011

Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Dr. Ir. Mulyorini Rahayuningsih, M.Si.

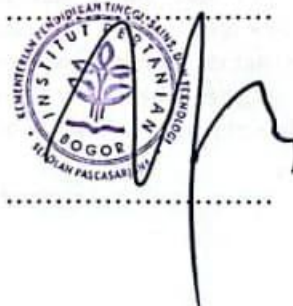


Pembimbing 2:
Fina Amreta Laksmi, Ph.D.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi Bioteknologi:
Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.
NIP. 196204191989031001

Dekan Sekolah Pascasarjana:
Prof. Dr. Ir. Yusli Wardiatno, M.Sc.
NIP. 196607281991031002



Tanggal Ujian: 03 Juni 2026

Tanggal Lulus: 06 JUL 2026



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini dapat diselesaikan. Judul yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Januari 2024 sampai bulan September 2025 ini ialah “Ekspresi, Purifikasi, dan Karakterisasi Enzim Trehalose Synthase dari *Arthrobacter alpinus* (AaTreS) untuk Produksi Trehalosa”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada ibu Dr. Ir. Mulyorini Rahayuningsih, M.Si. dan ibu Fina Amreta Laksmi, S.T.P., M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing dan kepada Prof. Dr. Ir. Khaswar Syamsu, M.Sc.St., selaku dosen penguji, yang telah membimbing, banyak memberi kiritikan dan saran serta dukungan. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada bapak Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si sebagai Ketua Program Studi Bioteknologi, Sekretaris Program Studi Bioteknologi bapak Dr. Prayoga Suryadarma, S.T.P, M.T, seluruh dosen pengajar di Program Studi Bioteknologi, serta bapak Keresyanto Kaparang, A.Md., yang telah banyak membantu. Selain itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian, serta kepada tim-tim peneliti Kelompok Riset Enzim Ekstremofil (KREE) mbak Isa, pak Panji, pak Andi, pak Aryo, pak Des, dan teman-teman seperjuangan kak Khaerunisa, David, pak Wiga, Widaad, Fauziah, Farah, Azriel, Nida, Andika, Wito, yang telah kebersamai selama penelitian dilaksanakan. Ungkapan terimakasih juga disampaikan kepada Keluarga tercinta abi Nurul Azam, umi Nurdania, adik-adikku tersayang Taufik, Azzahra, Aida, dan Khiar, bibi Idar, Indah, om Izul, kak Fiskar serta keluarga besar atas semangat, doa, kasih sayang, dan dukungan yang tiada henti selama penulis menempuh pendidikan dan menyelesaikan tesis ini. Penghargaan juga penulis berikan kepada sahabat seperjuang Hildani yang telah menemani penulis selama menempuh pendidikan. Teman-teman bioteknologi 2022 kak Adam, Afrida, kak Jidah, kak Yogi, kak Fauzan, kakak-kakak senior bioteknologi kak Yati, kak Wija, kak Mutia, kak Eka, adik-adik bioteknologi Rezka, Atma, Yutri, Ilham, Farij, teman-teman omda impastra, teman-teman Forum Wacana, sahabat-sahabatku Ledi, Anggi, Fira, Astina, Hera, Devi, Nita, Filda, dan Rezki yang selalu mendukung dan membantu selama ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga tesis ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Juni 2026

Rahmah Muthmainnah Azam



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	ix
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Ruang Lingkup	3
II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Trehalosa	5
2.2 Biosintesis Trehalosa	6
2.3 <i>Arthrobacter alpinus</i>	8
2.4 Ekspresi Enzim Rekombinan	9
2.5 Purifikasi Enzim Rekombinan	11
2.6 Optimasi Produksi dan Aktivitas Trehalose Synthase (TreS)	12
2.7 Aplikasi Komersial dan Perspektif Masa Depan	13
III METODE PENELITIAN	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	14
3.3 Kerangka Penelitian	14
3.4 Prosedur Penelitian	15
3.4.1 Optimasi Suhu, Waktu, dan Konsentrasi IPTG Ekspresi AaTreS	15
3.4.2 Deteksi Ekspresi AaTreS Menggunakan SDS-PAGE	16
3.4.3 Produksi Enzim AaTreS	17
3.4.4 Purifikasi <i>Crude Extract</i> AaTreS	17
3.4.5 Dialisis AaTreS	17
3.4.6 Kuantifikasi Protein	18
3.4.7 Western Blot	18
3.4.8 Pengecekan Ukuran Berat Molekul AaTreS	18
3.4.9 Uji Aktivitas AaTreS	19
3.4.10 Karakterisasi Enzim AaTreS	19
3.4.10.1 Karakterisasi pH	19
3.4.10.2 Karakterisasi Suhu	19
3.4.10.3 Karakterisasi Ion Logam	19
3.4.11 Parameter Kinetik dan Biokonversi	20
3.4.12 Analisis Produk	20
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Optimasi Ekspresi AaTreS	21
4.2 Purifikasi dan Dialisis AaTreS	24
4.3 Kuantifikasi Protein Menggunakan Metode BCA Protein Assay	26
4.4 <i>Western Blot</i>	27
4.5 Pengukuran Berat Molekul Enzim AaTreS	28
4.6 Karakteristik AaTreS	30



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

4.6.1 Pengaruh pH terhadap Aktivitas dan Stabilitas AaTres	30
4.6.2 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas dan Stabilitas AaTres	31
4.6.3 Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas AaTreS	33
4.6.4 Parameter Kinetik	34
4.6.5 Biokonversi Maltosa menjadi Trehalosa oleh AaTreS	35
4.7 Perbandingan Karakteristik AaTreS	36
V SIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Simpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	45
RIWAYAT HIDUP	49

DAFTAR TABEL

1 Komposisi Gel SDS-PAGE	17
2 Konsentrasi AaTreS	27
3 Parameter Kinetik AaTreS	34
4 Perbandingan Karakteristik Enzim AaTreS dari Berbagai Sumber	36

DAFTAR GAMBAR

1 Struktur Trehalosa	5
2 Biosíntesis Trehalosa	7
3 Prinsip Purifikasi Enzim <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> (IMAC)	12
4 Diagram Alir Penelitian	15
5 SDS-PAGE Optimasi Ekspresi AaTreS	21
6 Protein <i>Yield</i>	23
7 Purifikasi dan Ekspresi <i>Crude Extract</i> AaTreS	25
8 SDS-PAGE Ekspresi Heterolog AaTreS	26
9 <i>Western Blot</i>	28
10 Pengukuran Berat Molekul AaTreS	29
11 Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas AaTreS	31
12 Pengaruh Suhu terhadap aktivitas dan stabilitas AaTreS	32
13 Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas AaTreS	33
14 Biokonversi menggunakan Substrat Maltosa	35

DAFTAR LAMPIRAN

1 Standar <i>Bovin Serum Albumin</i> (BSA)	45
2 Perhitungan untuk Mendapatkan Berat Molekul Enzim AaTreS	46
3 Perhitungan Stabilitas Suhu	47
4 Parameter Kinetika Aa TreS menggunakan Michaelis – Menten Plot	48