

LIGASI KONSTRUK GEN GLUKOSA OKSIDASE DENGAN VEKTOR EKSPRESI *Pichia pastoris* pPICZ α DAN TRANSFORMASI *Escherichia coli* DH5 α

MAHATMA ROTA KURNIA



**DEPARTEMEN BIOKIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



IPB University

IPB University
— Bogor Indonesia —

PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Ligasi Konstruksi Gen Glukosa Oksidase dengan Vektor Ekspresi *Pichia pastoris* pPICZα dan Transformasi *Escherichia coli* DH5α” adalah karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

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

Bogor, April Tahun 2024

Mahatma Rota Kurnia
G84170073

- 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.



— Bogor Indonesia —

IPB University

ABSTRAK

MAHATMA ROTA KURNIA. Ligasi Konstruk Gen Glukosa Oksidase dengan Vektor Ekspresi *Pichia pastoris* pPICZ α dan Transformasi *Escherichia coli* DH5 α . Dibimbing oleh Dr. POPI ASRI KURNIATIN dan Dr. ASRUL MUHAMAD FUAD.

Glukosa oksidase (GOx, EC 1.1.3.4) adalah sebuah enzim serbaguna dengan potensi aplikasi di banyak industri. Sebuah konstruk sebesar 1787bp gen penyandi enzim ini telah dihasilkan dari isolat lokal *Aspergillus niger* IPBCC 08.610 dari penelitian pendahulu. Konstruk ini didesain supaya dapat disisipkan ke dalam plasmid pPICZ α untuk memanfaatkan sistem ekspresi *Pichia pastoris* yang telah dioptimasi untuk mengekspresikan protein heterolog. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan ligasi terhadap konstruk gen glukosa oksidase tersebut dengan vektor ekspresi *P. pastoris* pPICZ α (3593 bp) sampai memperoleh plasmid rekombinan yang dapat digunakan untuk transformasi sel kompeten *Escherichia coli* DH5 α . Pola pita elektroforesis gel sampel reaksi restriksi-ganda *XhoI-XbaI* mengindikasikan aktivitas sub-optimal enzim *XbaI*. Kondisi tersebut menjadi penyebab utama tidak dihasilkan koloni transforman *Escherichia coli* DH5 α . Masalah-masalah penyerta lain seperti kesalahan penaksiran kuantitas DNA campuran reaksi ligasi dan efisiensi transformasi yang tidak diketahui juga dikaji.

Kata kunci: *Aspergillus niger* IPBCC 08.610, glukosa oksidase, ligasi, restriksi-ganda

ABSTRACT

MAHATMA ROTA KURNIA. Ligation of Glucose Oxidase Gene Construct into *Pichia pastoris* Expression Vector pPICZ α and The Transformation of *Escherichia coli* DH5 α . Supervised by Dr. POPI ASRI KURNIATIN and Dr. ASRUL MUHAMAD FUAD.

Glucose oxidase (GOx, EC 1.1.3.4) is a versatile enzyme with potential applications in many industries. A 1787bp construct of the gene encoding this enzyme had been generated from a local isolate of *Aspergillus niger* IPBCC 08.610 in a previous study. This construct was designed to be inserted into the pPICZ α plasmid to utilize the *Pichia pastoris* expression system, which has been optimized for expressing heterologous protein. This study aimed to ligate the glucose oxidase gene construct with the *P. pastoris* pPICZ α (3593bp) expression vector to obtain a recombinant plasmid capable of transforming competent *Escherichia coli* DH5 α cells. The electrophoresis gel band patterns of the *XhoI-XbaI* double-digestion reaction indicated sub-optimal activity of the *XbaI* enzyme. This condition was the primary reason for the absence of *E. coli* DH5 α transformant colonies. Other contributing factors, such as errors in estimating the quantity of DNA in the ligation reaction mix and unknown transformation efficiency were also examined.

Keywords: *Aspergillus niger* IPBCC 08.610, double-digestion, glucose oxidase, ligation



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, tahun 2024¹
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.

**LIGASI KONSTRUK GEN GLUKOSA OKSIDASE DENGAN
VEKTOR EKSPRESI *Pichia pastoris* pPICZα DAN
TRANSFORMASI *Escherichia coli* DH5α**

MAHATMA ROTA KURNIA

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana pada
Program Studi Biokimia

**DEPARTEMEN BIOKIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik 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.

Judul Skripsi : Ligasi Konstruksi gen glukosa oksidase dengan Vektor Ekspresi
Pichia pastoris pPICZα dan Transformasi *Escherichia coli* DH5α

Nama : Mahatma Rota Kurnia

NIM : G84170073

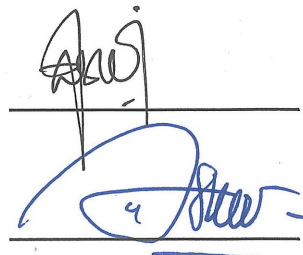
Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Dr. Popi Asri Kurniatin, S.Si, Apt., M.Si

Pembimbing 2:

Dr. Asrul Muhamad Fuad, M.Si



Diketahui oleh

Ketua Departemen Biokimia:

Dr. Mega Safithri, S.Si, M.Si

197709152005012002



Tanggal Ujian:
14 Juni 2024

Tanggal Lulus:



- 

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah berjudul “Ligasi Konstruksi Gen Glukosa Oksidase dengan Vektor Ekspresi *Pichia pastoris* pPICZα dan Transformasi *Escherichia coli* DH5α” dapat diselesaikan. Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Dr. Dra. Laksmi Ambarsari yang sudah mempercayakan proyek pengembangan dan rekayasa enzim glukosa oksidase dari isolat lokal untuk saya kerjakan. Selanjutnya, saya juga ucapkan terima kasih kepada pembimbing akademik saya, Dr. Popi Asri Kurniatin, yang dengan keluasan sabar dan pemaklumannya telah mengakomodasi saya untuk terus belajar dan memperbaiki kesalahan saya selama proses penelitian hingga saat manuskrip ini diselesaikan. Sama besarnya juga, saya sampaikan terima kasih kepada Dr. Asrul Muhamad Fuad yang, melalui kerendahan hati dan kepakaran Beliau, telah menuntun saya bekerja di laboratorium yang Beliau pimpin.

Saya menyadari apa yang berhasil saya capai akan mustahil terjadi tanpa doa dan dukungan orang-orang terdekat saya terutama Ibu saya. Dukungan moral dan material juga terus Dindaputri, Bayu, Hakim, Almira, Cepty, Shobiroh dan dosen-dosen Departemen Biokimia, melalui Ibu dr. Husnawati, M.Si, percayakan kepada saya. Selamanya saya bersyukur atas kemurahan hati mereka. Semoga karya Ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, April 2024

Mahatma Rota Kurnia



- 

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sistem Ekspresi <i>Pichia pastoris</i>	4
2.2 Enzim Glukosa Oksidase	5
2.3 Vektor Ekspresi pPICZ α dan Konstruksi Gen GOx	6
2.4 Parameter Penting Pengklonaan Molekuler Klasik	7
III METODE	8
3.1 Waktu dan Tempat	8
3.3 Alat dan Bahan	8
3.4 Prosedur	9
IV HASIL	13
4.1 <i>Insert</i>	13
4.2 Vektor	14
4.3 Restriksi Plasmid Vektor pPICZ α -IA dengan <i>XhoI</i> dan <i>XbaI</i>	15
4.4 Ligasi dan Transformasi	16
V PEMBAHASAN	18
5.1 Aktivitas Sub-optimal <i>XbaI</i> dan Petunjuknya dari Elektroforegram	18
5.2 Campuran Ligasi Empat Fragmen	20
5.3 Resolusi Elektroforesis Gel yang Rendah dan Kesalahan Penaksiran Kuantitas DNA Ligasi	21
5.4 Kurangnya Uji-Uji Kontrol Tahap Transformasi	23
5.5 Solusi-Solusi	24
VI SIMPULAN	25
VII SARAN	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	29
RIWAYAT HIDUP	34

DAFTAR GAMBAR

1	Peta plasmid pPICZ α , B, dan C	6
2	Bagan alur penelitian	8
3	Elektroforegram sampel DNA gen GOx dari penelitian terdahulu	13
4	Hasil perbanyakan konstruk gen GOx menggunakan <i>template</i> sampel DNA terdahulu	14
5	Elektroforegram hasil isolasi plasmid rekombinan pPICZ α -IA (± 4100 bp)	14
6	Elektroforegram hasil restriksi dari plasmid vektor pPICZ α -IA	15
7	Elektroforegram produk restriksi-ganda <i>XhoI-XbaI</i> terhadap plasmid vektor dan gen GOx (<i>insert</i>) yang telah dipurifikasi	16
8	Hasil analisis ImageJ terhadap produk-produk restriksi ganda	17
9	Hasil transformasi <i>E. coli</i> DH5 α dengan plasmid rekombinan pPICZ α -Konstruk gen GOx	17
10	Pola migrasi DNA dalam konformasi berbeda	18
11	Pita-pita plasmid sirkuler pada produk restriksi <i>XbaI</i> bukti aktivitas enzim sub-optimal	19
12	Fragmen-fragmen dalam campuran reaksi ligasi	20
13	Kejadian ligasi intermolekuler tak diinginkan	21
14	Sinyal-sinyal yang terdeteksi oleh <i>software</i> ImageJ	22
15	Puncak kedua dari sinyal pertama	22

DAFTAR LAMPIRAN

1	Kurva Hasil Analisis ImageJ	31
2	Tabel Pengolahan Luasan Kurva ImageJ	32
3	Sekuens Primer	32
4	Cara Penaksiran Kuantitas DNA	32
5	Penaksiran Kuantitas Vektor 3593 bp dengan Sinyal ~ 500 bp	33
6	Buffer Optimal <i>XhoI</i> dan <i>XbaI</i>	34