

**PENINGKATAN AKTIVITAS D-allulose 3-epimerase DARI
Arthrobacter Psychrolactophilus MENGGUNAKAN TEKNIK
Site-Directed Mutagenesis DALAM SISTEM EKSPRESI
Escherichia coli STRAIN BL21 STAR DE3**

KHAERUNNISA



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@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.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Peningkatan Aktivitas D-allulose 3-epimerase dari *Arthrobacter psychrolactophilus* menggunakan Teknik *Site-Directed Mutagenesis* dalam Sistem Ekspresi *Escherichia coli* Strain BL21 Star DE3” adalah karya saya dengan arahan dari dosen 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 tesis ini.

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

Bogor, Mei 2025

Khaerunnisa
P0501211018



RINGKASAN

KHAERUNNISA. Peningkatan Aktivitas D-allulose 3-epimerase dari *Arthrobacter psychrolactophilus* menggunakan Teknik *Site-Directed Mutagenesis* dalam Sistem Ekspresi *Escherichia coli* Strain BL21 Star DE3. Dibimbing oleh MULYORINI RAHAYUNINGSIH dan FINA AMRETA LAKSMI.

D-allulose merupakan salah satu jenis gula langka yang semakin mendapat perhatian secara global sebagai pemanis rendah kalori, dengan keunggulan tidak memiliki *after taste* dan tidak menimbulkan efek laksatif pada dosis konsumsi normal seperti xylitol dan mannitol (alkohol gula), sehingga lebih aman dan nyaman digunakan sebagai alternatif gula dalam produk diet dan diabetes. Senyawa ini dapat diproduksi dari D-fruktosa melalui proses enzimatik menggunakan D-allulose 3-epimerase (DAEase).

Studi sebelumnya telah berhasil memperoleh DAEase dari *Arthrobacter psychrolactophilus* (ApDAEase) dan mengekspresikannya dalam sistem *Escherichia coli*. Meskipun ApDAEase menunjukkan stabilitas termal yang baik, peningkatan aktivitas katalitik masih diperlukan agar lebih optimal untuk aplikasi industri pangan. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan aktivitas ApDAEase melalui teknik *site-directed mutagenesis* (SDM), dengan menargetkan residu asam amino di sekitar substrat pada sisi aktif enzim.

Tujuh kandidat mutan pada mutasi spesifik ApDAEase diperkenalkan (H6D, E35H, S63D, V105A, V105D, M110D, M110H), berhasil dikonstruksi dan diekspresikan dalam sistem *Escherichia coli* strain BL21 Star DE3. Berdasarkan hasil analisis, konsentrasi *yield* protein paling rendah terdapat pada mutan E35H dan V105D yang masing-masing sebesar 4.29% dan 4.16% dan konsentrasi *yield* protein paling tinggi terdapat pada mutan H6D sebesar 122.44%. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi pada residu tertentu dapat memengaruhi *yield* protein secara signifikan, menandakan bahwa residu ini berperan penting dalam menjaga stabilitas struktural dan fungsi enzim.

Mutasi pada ApDAEase menunjukkan peningkatan aktivitas enzim yang signifikan, terutama pada mutan E35H, yang memiliki peningkatan aktivitas spesifik katalitik tertinggi sebesar 134,4% dibandingkan dengan enzim *wild type*. Peningkatan ini terjadi karena perubahan pada residu asam amino E35H dapat meningkatkan kestabilan lokal di sekitar sisi aktif enzim, sehingga mendukung interaksi yang lebih optimal dengan substrat dan meningkatkan afinitasnya. Selain itu, mutan V105A juga menunjukkan peningkatan aktivitas sebesar 109,3%. Peningkatan ini disebabkan oleh perubahan struktur enzim yang meningkatkan fleksibilitas di situs aktif, sehingga memungkinkan orientasi substrat yang lebih efektif selama proses katalisis.

Analisis parameter kinetik menggunakan plot Michaelis-Menten menunjukkan bahwa mutan E35H meningkatkan efisiensi katalitik enzim melalui peningkatan rasio k_{cat}/K_m , sehingga lebih efektif dalam mengonversi substrat pada konsentrasi rendah. Di sisi lain, mutan V105A menunjukkan peningkatan aktivitas

pada konsentrasi substrat tinggi, meskipun efisiensi katalitiknya menurun, yang mengindikasikan adanya perubahan kinetika enzim pada mutan tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa karakteristik kinetik masing-masing mutan bervariasi, memberikan potensi aplikasi yang berbeda dalam berbagai kondisi reaksi.

Analisis ekspresi protein dilakukan menggunakan SDS-PAGE dan *Western blot*. Hasil analisis mengkonfirmasi bahwa enzim hasil mutasi berhasil diekspresikan dengan berat molekul sekitar 34 kDa. Penelitian ini membuktikan bahwa *site-directed mutagenesis* dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas ApDAEase dan menjadi pendekatan yang efektif untuk mengoptimalkan aktivitasnya, serta memberikan wawasan lebih lanjut dalam desain enzim yang sistematis untuk produksi D-allulose skala industri.

Kata Kunci: Aktivitas enzim, D-allulose 3-epimerase, *Escherichia coli* BL21 Star DE3, *site-directed mutagenesis*

SUMMARY

KHAERUNNISA. Enhancing the Activity of D-allulose 3-epimerase from *Arthrobacter psychrolactophilus* Using Site-Directed Mutagenesis in the *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) Expression System. Supervised by MULYORINI RAHAYUNINGSIH dan FINA AMRETA LAKSMI.

D-allulose as a rare sugar has received more attention on a global scale as a non-caloric sweetener, with the advantages of having no aftertaste and no laxative effect at normal consumption doses, such as xylitol and mannitol (sugar alcohols), making it safer and more convenient to use as a sugar alternative in diet and diabetes products. D-allulose can be produced through the synthesis of D-fructose using the enzyme D-allulose 3-epimerase (DAEase).

Previous study successfully obtained DAEase from *Arthrobacter psychrolactophilus* (ApDAEase) and overexpressed in *Escherichia coli* system. Although ApDAEase showed excellent thermostability, higher catalytic activity is desirable for further use in food industrial. This study presents a novel approach by employing site-directed mutagenesis (SDM) technique by targeting amino acid residues around the substrate on the active site of the enzyme to improve the activity of ApDAEase.

Seven mutant candidates with specific ApDAEase mutations were introduced (H6D, E35H, S63D, V105A, V105D, M110D, M110H), successfully constructed, and expressed in the *Escherichia coli* BL21 Star DE3 system. Based on the analysis, the lowest protein yield concentration was found in mutants E35H and V105D, with 4,29% and 4,16%, respectively, and the highest protein yield concentration was found in mutant H6D at 122,44%. The results showed that mutations in certain residues can significantly affect protein yield, signaling that, these residues play an important role in maintaining structural stability and enzyme function.

Mutations in ApDAEase showed a significant increase in enzyme activity, especially in the E35H mutant, which had the highest catalytic specific activity increase of 134.4% compared to the wild-type enzyme. This increase occurred because the change in amino acid residue E35H could increase the local stability around the active site of the enzyme, thus favoring a more optimal interaction with the substrate and increasing its affinity. In addition, the V105A mutant also showed an increase in activity of 109.3%. This increase is due to the change in enzyme structure that increases flexibility in the active site, thus allowing for more effective substrate orientation during the catalysis process.

Analysis of kinetic parameters using Michaelis-Menten plots showed that E35H mutant increased the catalytic efficiency of the enzyme through an increase in the k_{cat}/K_m ratio, making it more effective in converting substrates at low concentrations. On the other hand, the V105A mutant showed increased activity at high substrate concentrations, although its catalytic efficiency decreased, indicating a change in enzyme kinetics in the mutant. This suggests that the kinetic

characteristics of each mutant vary, providing different potential applications under various reaction conditions.

Protein expression analysis was performed using SDS-PAGE and Western blot. The result confirmed that the enzyme was successfully expressed with a molecular weight of around 34 kDa were validated for wild-type and mutant variants. were validated for wild-type and mutant variants. This research offers the capability of site-directed mutagenesis to enhance DAEase activity, offering insight into the systematic design of enzyme for industrial D-allulose production.

Keywords: D-allulose 3-epimerase, enzyme activity, *Escherichia coli* BL21 Star DE3, site-directed mutagenesis



- 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, 2025
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.



**PENINGKATAN AKTIVITAS D-allulose 3-epimerase DARI
Arthrobacter Psychrolactophilus MENGGUNAKAN TEKNIK
Site-Directed Mutagenesis DALAM SISTEM EKSPRESI
Escherichia coli STRAIN BL21 STAR DE3**

KHAERUNNISA

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

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@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 : Peningkatan Aktivitas D-allulose 3-epimerase dari *Arthrobacter psychrolactophilus* menggunakan Teknik *Site-Directed Mutagenesis* dalam Sistem Ekspresi *Escherichia coli* Strain BL21 Star DE3

Nama : Khaerunnisa
NIM : P0501211018

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

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



Pembimbing 2:
Fina Amreta Laksmi, S.T.P, M.Sc., Ph.D.



Diketahui oleh

Ketua Program Studi Bioteknologi:
Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.
NIP. 19620419 198903 1 001

Dekan Sekolah Pascasarjana:
Prof. Dr. Ir. Dodik Ridho Nurrochmat, M.Sc.F.Trop., IPU
NIP. 19700329 199608 1 001



Tanggal Ujian: 14 Mei 2025

Tanggal Lulus: 04 JUN 2025



Dokumen ini ditandatangani secara elektronik menggunakan sertifikat dari BSR E, silahkan lakukan verifikasi pada dokumen elektronik yang dapat diunduh dengan melakukan scan QR Code



@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.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanaahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Judul penelitian yang dilaksanakan sejak Agustus 2023 sampai Desember 2024 ini ialah “Peningkatan Aktivitas D-allulose 3-epimerase dari *Arthrobacter psychrolactophilus* menggunakan Teknik *Site-Directed Mutagenesis* dalam Sistem Ekspresi *Escherichia coli* Strain BL21 Star DE3”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr. Ir. Mulyorini Rahayuningsih, M.Si. dan Fina Amreta Laksmi, S.T.P., M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing dan kepada Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini., M.S, selaku dosen penguji, yang telah membimbing, banyak memberi kritikan dan saran serta dukungan. Ucapan terima kasih juga disampaikan Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si sebagai Ketua Program Studi Bioteknologi, Sekretaris Program Studi Bioteknologi Dr. Prayoga Suryadarma, S.T.P., M.T, seluruh dosen pengajar di Program Studi Bioteknologi, serta Keresyanto Kaparang, A.Md yang telah banyak membantu. Selain itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada Badan Riset dan Inovasi Nasional yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian, tim-tim peneliti Kelompok riset enzim ekstremofil Mbak Isa dan Pak Panji, dan teman-teman seperjuangan David, Muti, Nida, Wiga, Widaad dan Wito yang telah kebersamai selama penelitian dilaksanakan. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada bapak Syuaib, ibu Marwani, Abang alm. Ismunandar, Abang Akbar, adik Utami, dan keluarga besar yang selalu mendukung, memberikan semangat, dan kiriman do'a yang tiada henti dalam kelancaran proses pada setiap kegiatan dan perkuliahan penulis. Penghargaan juga penulis berikan kepada Rani, Eka, Cucu, Yati, Mutia, teman-teman dan adik-adik bioteknologi, teman-teman volunteer Dompot Dhuafa, teman-teman Ruang Internasional, teman-teman lintas iman Generasi Literat, teman-teman Inklusif, teman-teman Ichinogami dan peri kertas, teman-teman PMAP, dan teman-teman Forum Wacana 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, Mei 2025

Khaerunnisa

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan 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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



- 

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
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 Enzim D-allulose 3-epimerase	5
2.2 <i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	6
2.3 Teknik <i>Site-Directed Mutagenesis</i>	7
2.4 Sistem Ekspresi <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	7
2.5 Aplikasi dan Manfaat D-allulose	8
2.6 Aktivitas Enzim DAEase	9
III METODE	11
3.1 Diagram Alir Penelitian	11
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	12
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	12
3.4 Prosedur Penelitian	13
3.4.1 Identifikasi dan Seleksi Titik Mutasi	13
3.4.2 Teknik <i>Site-Directed Mutagenesis</i>	13
3.4.3 Ekspresi dalam <i>E. Coli</i> BL21 Star DE3	14
3.4.4 Purifikasi <i>Crude Extract</i> Enzim ApDAEase	14
3.4.5 Kuantifikasi Protein menggunakan Metode BCA Protein Assay	15
3.4.6 Pengujian Aktivitas Enzim ApDAEase	15
3.4.7 Pengukuran Parameter Kinetik	15
3.4.8 Analisis Mutan	16
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Analisis Asam Amino Residu dan Sisi Aktif Enzim	17
4.2 <i>Site-Directed Mutagenesis</i> dari Residu Terpilih	18
4.3 Ekspresi Protein ApDAEase	19
4.4 Analisa Mutasi dan Purifikasi Protein ApDAEase	20
4.5 Kuantifikasi Protein ApDAEase Mutan	22
4.6 Uji Aktivitas ApDAEase Mutan	23
4.7 Parameter Kinetik	24
V SIMPULAN DAN SARAN	27
5.1 Simpulan	27
5.2 Saran	27

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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



DAFTAR PUSTAKA

29

LAMPIRAN

35

RIWAYAT HIDUP

51

@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.

DAFTAR GAMBAR

1 Reaksi Isomerisasi Enzim D-allulose 3-epimerase	5
2 Diagram alir penelitian	11
3 Amplifikasi PCR penyandi gen ApDAEase Mutan	18
4 Ekspresi protein ApDAEase <i>wild type</i> dan Mutan	19
5 Analisis <i>Multiple sequence alignment</i> ApDAEase mutan dengan <i>CrustalW</i>	20
6 Analisis SDS-PAGE dari fraksi murni protein Ap DAEase <i>wild type</i> dan mutan	21
7 <i>Western blot</i> dari fraksi murni protein Ap DAEase <i>wild type</i> dan mutan	21

DAFTAR TABEL

1 Konsentrasi Protein ApDAEase <i>Wild-type</i> dan Mutan	22
2 Analisis HPLC dari Fraksi Murni ApDAEase <i>Wild-type</i> dan Mutan	23
3 Parameter kinetik enzim ApDAEase <i>Wild-type</i> , Mutan E35H, dan V105A	24

DAFTAR LAMPIRAN

1 Desain primer kandidat mutagenik <i>site-directed mutagenesis</i>	36
2 Komposisi Gel SDS-PAGE	37
3 Konstruksi plasmid ApDAEase	38
4 Residu asam amino pada struktur <i>active site</i> dan kandidat ApDAEase mutan	39
5 Kurva standar protein BSA untuk kuantifikasi protein ApDAEase	40
6 Kuantifikasi protein ApDAEase menggunakan metode BCA	41
7 Standar uji aktivitas ApDAEase menggunakan HPLC	44
8 Kuantifikasi aktivitas Enzim ApDAEase mutan menggunakan HPLC	45
9 Parameter kinetik enzim ApDAEase <i>wild-type</i>	46
10 Analisis bioinformatika ApDAEase <i>wild-type</i> dan mutan E35H	48
11 Analisis bioinformatika ApDAEase <i>wild-type</i> dan mutan V105A	49
12 Perbandingan parameter kinetik mutan V105A	50