

KLASIFIKASI DAN PURIFIKASI PROTEIN ISLAT TIAMIN  
DARI KACANG ERJAU

TESIS

HANITA RAKRE  
NPM: 018060001



UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS SERTA JURUSAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BROMEDIA  
JAKARTA  
DESEMBER 2011

**ISOLASI DAN PURIFIKASI PROTEIN IKAT TIAMIN  
DARI KACANG HIJAU**

**TESIS**

**HANIFAH RAHMI  
NPM: 0906494523**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
DESEMBER 2011**

**ISOLASI DAN PURIFIKASI PROTEIN IKAT TIAMIN  
DARI KACANG HIJAU**

**TESIS**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Ilmu Biomedik

**HANIFAH RAHMI  
NPM: 0906494523**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
DESEMBER 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Hanifah Rahmi

NPM : 0906494523

Tanda Tangan :   
METERAI  
TEMPEL  
JALAK PEMANANGAN BANGGA  
TGL  
74A10AAF664998764  
ENAM RIBU RUPIAH  
6000 DJP

Tanggal : 13 Desember 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Hanifah Rahmi  
NPM : 0906494523  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judultesis : Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Tiamin dari Kacang Hijau.

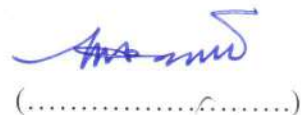
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI:

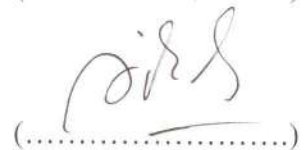
Pembimbing I : drg. Dwirini Retno Gunarti, MS

  
(.....)

Pembimbing II : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc

  
(.....)

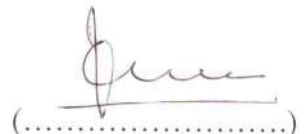
Penguji I : Dr. dr. Sriwidia A. Jusman, MS

  
(.....)

Penguji II : Dra. Sri Handayani, MBiomed

  
(.....)

Penguji III : Prof. dr. Frans D. Suyatna, SpFK, PhD

  
(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 13 Desember 2011

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI:  
Dr. rer. physiol, dr. Septelia Inawati Wanandi



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah ini. Kegiatan penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari hingga November 2011 di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada drg.Dwirini Retno G, MS selaku pembimbing I atas bantuan materi dalam membiayai penelitian ini, bimbingan, curahan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini serta kesempatan yang diberikan kepada saya untuk terlibat dalam penelitian beliau. Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. dr. Mohamad Sadikin selaku pembimbing II atas dukungan, bimbingan, curahan waktu, tenaga, saran dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis.

Tak lupa penulis ucapkan terimakasih kepada Ketua Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, Dr. dr. Sri widya A. Jusman, MS yang telah mengizinkan penulis memakai fasilitas departemen selama penelitian. Terima kasih juga kepada dr. Ani Retno Prijanti, MS selaku ketua kekhususan Biokimia dan Biologi Molekuler beserta seluruh staf pengajar, dr Febri, dr Reni, Pak Ondi, Mas Arif, Pak Yatin, Pak Usman, Mba Erna, dan Nia. Terimakasih juga kepada Mas Subandrate, Kak Raafqi, Mba Lindi, Mba Yurika, Mba Tiwuk, Mba Ayu, Mba Uji yang bekerja sama selama masa kuliah dan penelitian.

Terimakasih juga penulis ucapkan kepada ayah dan mama selaku orang tua yang telah memberi dukungan materi, non materi, semangat dan doa yang tidak henti-hentinya kepada penulis dalam penelitian dan penulisan karya ilmiah ini. Terimakasih juga kepada Yulia dan Sabili selaku adik yang memberi dukungan non materi dan doanya. Akhir kata, semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Jakarta, 13 Desember 2011

Hanifah Rahmi

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hanifah Rahmi  
NPM : 0906494523  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekular  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-eksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Rights*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Tiamin dari Kacang Hijau**

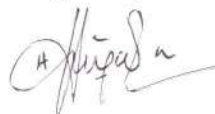
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan hak bebas royalti non-eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 13 Desember 2011

Yang menyatakan



Hanifah Rahmi

## ABSTRACT

**Name** : Hanifah Rahmi  
**Study Program** : Biomedical Science  
**Title** : Isolation and Purification Thiamine Binding Protein from Mung Bean.

Thiamine, also known as vitamin B1, has fundamental role in energy metabolism. The organs mostly sensitive to the lack of thiamine levels in the body are the nervous system and the heart. Thiamine deficiency causes symptoms of polyneuritis and cardiovascular diseases. Because of its importance in the metabolism of carbohydrates, we need to measure the levels of thiamine in the body fluids by using an easy and inexpensive way without compromising the sensitivity and selectivity. An option to it is thiamine measurement based on the principle of which is analogous to ELISA (Enzyme Link Immunosorbent Assay), in which a thiamine binding protein act by replacing antibodies. This study was aimed to isolate and purify thiamine binding protein from mung bean. The protein was isolated from mung bean through salting out by ammonium sulphate of 40, 70, and 90 percents. Thiamine binding protein has a negative charge as shown by cellulose acetate electrophoresis. The result obtained after salting out by ammonium sulphate was further purified by means of DEAE cellulose chromatography and affinity chromatography. In precipitation of 90% of salting out method, one peak protein was obtained by using affinity chromatography. The protein was analyzed by SDS PAGE electrophoresis. The result of SDS PAGE electrophoresis showed that the thiamine binding protein has a molecular weight of 72.63 kDa.

*Keywords : Thiamine, Mung bean, thiamine binding protein (TBP), chromatography, electrophoresis.*



## DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH .....	v
ABSTRAK .....	vi
<i>ABSTRACT</i> .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sejarah Vitamin B <sub>1</sub> (Tiamin).....	4
2.2 Sifat Kimia Vitamin B <sub>1</sub> (Tiamin) .....	4
2.3 Sumber Tiamin .....	5
2.4 Peranan Tiamin dalam Metabolisme .....	6
2.5 Defisiensi Tiamin .....	8
2.6 Metode Penentuan Tiamin .....	9
2.7 Protein Ikat Tiamin .....	10
2.8 Kacang Hijau .....	12
2.9 Isolasi dan Purifikasi .....	13
2.10 Kromatografi Pertukaran Ion.....	13

2.11	Kromatografi Afinitas.....	15
2.12	Elektroforesis.....	16
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN</b>		
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian .....	18
3.2	Isolasi Protein	
3.2.1	Bahan dan alat .....	18
3.2.2	Cara Kerja	
3.2.2.1	Isolasi protein dari Kacang Hijau .....	18
3.3	Purifikasi Protein Ikat Tiamin	
3.3.1	Bahan dan alat .....	20
3.3.2	Cara kerja	
3.3.2.1	Persiapan gel <i>DEAE</i> selulosa.....	21
3.3.2.2	Kromatografi pertukaran ion .....	21
3.3.2.3	Persiapan <i>NHS-Activated Separopore® 4B-CL</i> .....	22
3.3.2.4	Kromatografi afinitas.....	22
3.4	Liofilisasi ( <i>Freeze drying</i> )	
3.4.1	Bahan dan alat .....	23
3.4.2	Cara kerja.....	23
3.5	Penentuan Kadar Protein	
3.5.1	Bahan dan alat .....	23
3.5.2	Cara kerja	
3.5.2.1	Metode Warburg-Christian.....	23
3.5.2.2	Metode Bradford .....	24
3.6	Elektroforesis Selulosa Asetat	
3.6.1	Bahan dan alat .....	24
3.6.2	Cara kerja.....	24
3.7	Elektroforesis <i>SDS-PAGE</i>	
3.7.1	Bahan dan alat .....	24
3.7.2	Cara kerja.....	25
3.7.2.1	Pembuatan gel.....	25
3.7.2.2	Persiapan sampel .....	25

3.7.2.3	Running elektroforesis.....	25
3.7.2.4	Pewarnaan gel .....	26
3.8	Alur Penelitian .....	26
BAB 4 HASIL PENELITIAN		
4.1	Isolasi Protein dari Kacang Hijau .....	27
4.2	Kurva Standar Protein .....	28
4.3	Elektroforesis Selulosa Asetat .....	29
4.4	Hasil Kromatografi Pertukaran Ion .....	30
4.5	Hasil Kromatografi Afinitas .....	33
4.6	Elektroforesis <i>SDS PAGE</i> .....	35
BAB 5 PEMBAHASAN		
5.1	Isolasi dan Purifikasi PIT dari Kacang Hijau .....	37
5.2	Elektroforesis Selulosa Asetat .....	39
5.3	Kromatografi <i>DEAE</i> Selulosa.....	39
5.4	Kromatografi Afinitas.....	40
5.5	Elektroforesis <i>SDS PAGE</i> .....	41
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....		
DAFTAR PUSTAKA .....		43
LAMPIRAN .....		47
ARTIKEL PENELITIAN .....		60
RIWAYAT HIDUP .....		66

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tiamin hidroklorida dan tiamin mononitrat.....	5
Gambar 2.2a	Lima koenzim yang berpartisipasi dalam reaksi yang dikatalisis kompleks enzim piruvat dehidrogenase.....	7
Gambar 2.2b	Reaksi dekarboksilasi $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenase pada siklus asam sitrat .....	7
Gambar 2.3	Reaksi transketolase yang terjadi pada jalur pentosa fosfat memerlukan koenzim <i>TPP</i> .....	8
Gambar 2.4	Ilustrasi pengenalan protein ikat terhadap tiamin .....	10
Gambar 2.5	Struktur protein ikat tiamin pada <i>E. coli</i> .....	11
Gambar 2.6	Situs pengikatan <i>TP</i> ( <i>TMP</i> ) dengan PIT .....	11
Gambar 2.7	Bentuk fisik kacang hijau beserta polongnya.....	12
Gambar 2.8	Skema elusi protein dari kromatografi penukar anion .....	15
Gambar 2.9	Prinsip dasar kromatografi afinitas .....	16
Gambar 3.1	Tahapan isolasi protein dari kacang hijau.....	19
Gambar 4.1	Endapan putih sulfat.....	28
Gambar 4.2	Kurva standar albumin serum sapi pada panjang gelombang 280 nm .....	28
Gambar 4.3	Kurva standar albumin serum sapi pada panjang gelombang 595 nm .....	29
Gambar 4.4	Hasil elektroforesis selulosa asetat .....	30
Gambar 4.5	Hasil kromatografi <i>DEAE</i> Selulosa presipitat 40% .....	31
Gambar 4.6	Hasil kromatografi <i>DEAE</i> Selulosa presipitat 70% .....	31
Gambar 4.7	Hasil kromatografi <i>DEAE</i> Selulosa presipitat 90% .....	32
Gambar 4.8	Hasil kromatografi afiitas presipitat 90% .....	33

Gambar 4.9	Hasil kromatografi afiitas presipitat 70% .....	34
Gambar 4.10	Hasil kromatografi afiitas presipitat 40% .....	35
Gambar 4.11	Kurva standar pita protein <i>marker</i> .....	36
Gambar 4.12	Hasil elektroforesis <i>SDS PAGE</i> .....	36

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Rata-rata kandungan tiamin pada beberapa sumber makanan .....	6
Tabel 4.1	Kadar protein setelah penggaraman pada panjang gelombang 280 nm.....	27
Tabel 4.2	Kadar protein setelah dialisis pada panjang gelombang 280 nm .....	28
Tabel 4.3	Konsentrasi purifikasi protein presipitat 90%.....	34
Tabel 4.4	Hasil penentuan Rf pada protein <i>marker</i> .....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan untuk pengendapan pada suhu 4°C.....	47
Lampiran 2	Kadar protein setelah penggaraman pada panjang gelombang 280 nm dengan faktor pengenceran 100x. ....	48
Lampiran 3	Kadar protein setelah dialisis pada panjang gelombang 280 nm dengan faktor pengenceran 100x .....	48
Lampiran 4	Nilai absorbansi kromatografi <i>DEAE</i> -Selulosa untuk presipitat 40%.....	49
Lampiran 5	Nilai absorbansi kromatografi <i>DEAE</i> -Selulosa untuk presipitat 70%.....	51
Lampiran 6	Nilai absorbansi kromatografi <i>DEAE</i> -Selulosa untuk presipitat 90%.....	53
Lampiran 7	Nilai absorbansi kromatografi afinitas untuk presipitat 40%.....	56
Lampiran 8	Nilai absorbansi kromatografi afinitas untuk presipitat 70%.....	57
Lampiran 9	Nilai absorbansi kromatografi afinitas untuk presipitat 90%.....	58