



KLONING GEN TRIASILGLISEROL LIPASE (TGA) DAN KARBOKSILESTERASE (CES) *Bacillus velezensis* mlp-2 UNTUK MODIFIKASI KAIN POLIESTER

IKA RAHMATUL LAYLY



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2023**

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



PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul Kloning Gen Triasilgliserol Lipase (*TGA*) dan Karboksilesterase (*CES*) *Bacillus velezensis* mlp-2 untuk Modifikasi Kain Poliester 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 laporan disertasi ini.

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

Bogor, Februari 2023

Ika Rahmatul Layly
G361170011



RINGKASAN

IKA RAHMATUL LAYLY. Kloning Gen Triasilgliserol Lipase (*TGA*) dan Karboksilesterase (*CES*) *Bacillus velezensis* mlp-2 untuk Modifikasi Kain Poliester. Dibimbing oleh ANJA MERYANDINI, IS HELIANTI dan RIKA HENDRI ASTUTI.

Poliester adalah polimer yang mengandung gugus fungsional ester dalam rantai utamanya. Sebagai serat sintetis poliester memiliki keunggulan jika dibandingkan dengan serat sintetis lainnya. Kuat, tidak mudah kusut, mudah dibersihkan dan murah adalah beberapa keunggulannya, dibalik kelebihan tersebut kelembapan yang rendah serta sifat hidrofobik menjadi kekurangannya apabila digunakan sebagai bahan baku tekstil. Untuk mengubah sifat hidrofobik poliester menjadi hidrofilik dilakukan modifikasi permukaan, sehingga poliester menjadi lebih mudah menyerap air, pewarna dan nyaman digunakan sebagai bahan baku tekstil. Modifikasi permukaan secara enzimatik menggunakan enzim hidrolase lipolitik adalah metode yang efektif, efisien dan ramah lingkungan. Enzim lipolitik triasilgliserol lipase (EC 3.1.1.3) dan karboksilesterase (EC 3.1.1.1) bekerja pada ikatan ester karboksil, dihasilkan oleh mikroba dan sudah diaplikasikan untuk berbagai bidang industri termasuk industri tekstil. Bakteri dari genus *Bacillus* diketahui sebagai penghasil enzim hidrolase lipolitik. Pada penelitian ini dilakukan kloning gen triasilgliserol lipase (*TGA*) dan karboksilesterase (*CES*) dari *Bacillus velezensis* mlp-2 untuk mendapatkan enzim triasilgliserol lipase serta karboksilesterase yang mampu diaplikasikan untuk modifikasi permukaan poliester.

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap. Tahap pertama adalah isolasi dan kloning gen triasilgliserol lipase (*TGA*) dan karboksilesterase (*CES*) dari *B. velezensis* mlp-2. Kloning gen *TGA*, *CES* beserta promotornya pada vektor plasmid pJET 1.2 blunt dan pGEMT dan transformasi pada sel inang *Escherichia coli* DH5 α . Hasil ekspresi gen *TGA* dan *CES* yang berupa protein enzim triasilgliserol lipase dan karboksilesterase dianalisa sekuen asam amino untuk mengetahui hubungan kekerabatan, motif sekuen asam amino, struktur model dan triad katalitiknya. Analisa sekuen asam amino protein *TGA* dan *CES* dilakukan dengan mensejajarkan terhadap protein enzim yang sama dari bakteri pembanding dilanjutkan dengan prediksi struktur model 3D menggunakan server online <https://swissmodel.expasy.org/>.

Tahap kedua adalah produksi enzim intraseluler rekombinan triasilgliserol lipase dan karboksilesterase pada media Luria Bertani. Enzim yang dihasilkan diuji aktivitasnya hidrolisisnya, diukur kadar proteinnya dan dikarakterisasi spesifisitasnya terhadap substrat, pengaruh pH, suhu, inhibitor, aktivator, deterjen, pelarut organik dan ion. Tahap ketiga adalah aplikasi enzim triasilgliserol lipase dan karboksilesterase untuk modifikasi kain poliester. Aplikasi modifikasi permukaan kain poliester dilakukan dengan merendam kain poliester pada masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan meliputi enzim rekombinan triasilgliserol lipase, karboksilesterase, enzim lipase komersial *C. rugosa* (Amano), enzim lipase non rekombinan *B. velezensis* mlp-2, kontrol positif (NaOH) serta kontrol negatif (Air). Parameter yang diamati antara lain

hidrofilisitas, penyerapan warna, kandungan karboksil dan pengamatan morfologi permukaan kain menggunakan mikroskop electron

Isolasi gen Triasilgliserol lipase (*TGA*) dan Karboksilesterase (*CES*) dari *B. velezensis* mlp-2 mendapatkan gen *TGA* berukuran 645 bp dan gen *CES* berukuran 1449 bp. Kloning dan ekspresi gen *TGA* serta *CES* beserta *native* promotornya pada inang *Escherichia coli* DH5 α menghasilkan enzim lipase dan karboksilesterase rekombinan intraseluler. Aktivitas enzim *TGA* dan *CES* rekombinan intraseluler adalah 0.25 U/mL dan 0.23 U/mL dengan berat molekul 25 kDa dan 50kDa. Enzim *TGA* mempunyai spesifisitas pada substrat lemak ester p-nitrophenyl-octanoat (C10) dan p-nitrophenyl-palmitate (C16). Enzim *CES* mempunyai spesifitas pada substrat p-nitrophenyl-asetate (C2) dan p-nitrophenyl-butirat (C4). *TGA* optimal pada pH 8 suhu 40 °C sedangkan *CES* optimal pada pH 7 dan suhu 40 °C. Ion logam Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺ dan Zn²⁺ menurunkan aktivitas enzim *TGA* dan *CES*, sedangkan ion Ca²⁺ meningkatkan aktivitas pada kedua enzim tersebut. Penambahan inhibitor EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid), β -mercaptoethanol, PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) menurunkan aktivitas enzim baik *TGA* dan *CES*. Dithiothreitol (DTT) dan DMSO (Dimethylsulfoxide) meningkatkan aktivitas pada *CES* hingga aktivitas relatif mencapai 120 dan 111 %, terhadap enzim *TGA* penambahan DTT dan DMSO tidak berpengaruh terhadap aktivitas.

Penambahan pelarut organik aseton, isopropanol, n- heksan, methanol dan kloroform dengan konsentrasi 1% pada enzim *TGA* dan *CES* tidak berpengaruh terhadap aktivitas kedua enzim. Pengaruh deterjen non ionik tween 20, dan triton x-100 jika dibandingkan dengan pengaruh deterjen anionik SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) terhadap enzim *TGA* dan *CES* menunjukkan deterjen anionik menurunkan aktivitas enzim lebih tajam jika dibandingkan dengan pengaruh deterjen non ionik. Deterjen anionik menurunkan aktivitas enzim hingga 50% dari aktivitas enzim awal, sedangkan deterjen non ionik tween 20 dan triton-x menyisakan aktivitas relatif lebih dari 85%. Modifikasi permukaan secara enzimatis pada kain poliester menunjukkan terjadinya proses perubahan sifat kain dari hidrofobik menjadi hidrofilik. Perubahan sifat kain ditunjukkan oleh meningkatnya penyerapan air, warna dan kandungan karboksil serta perubahan morfologi permukaan serat kain. Waktu yang dibutuhkan dalam penyerapan air dan warna pada kain poliester yang diperlakukan dengan enzim *TGA*, *CES*, lipase non rekombinan *B. velezensis* mlp-2, lipase komersial, kontrol positif (NaOH) dan kontrol negatif (air) berturut-turut adalah 3, 3.5, 5, 3.2, 12 dan 80 menit. Untuk waktu yang dibutuhkan dalam penyerapan warna berturut-turut adalah 52, 58, 178, 50, 196 dan 2968 detik. Kandungan karboksil pada kelompok perlakuan berturut-turut adalah 30.9, 30.5, 28.6, 31.9, 12.4 dan 3 meq/100g. Kain yang mengalami proses hidrolisis perlakuan enzim *TGA*, *CES*, lipase non rekombinan *B. velezensis* mlp-2, lipase komersial, kontrol positif (NaOH) menunjukkan pilinan pada permukaan serat kain menjadi tidak teratur serta terdapat retakan, lubang, pori-pori, sedangkan pada perlakuan kontrol negatif (air) tidak terjadi perubahan pada permukaan serat dan struktur pilinan.

Kata kunci: kloning gen, karboksilesterase, modifikasi permukaan, poliester, triasilgliserol lipase





SUMMARY

IKA RAHMATUL LAYLY. Cloning of Triacylglycerol Lipase (*TGA*) and Carboxylesterase (*CES*) *Bacillus velezensis* mlp-2 for Modification of Polyester Fabrics. Supervised by ANJA MERYANDINI, IS HELIANTI and RIKA INDRI ASTUTI.

Polyester is a polymer containing an ester functional group in the main chain, has superior characteristics to other synthetic fibers. Some of its characteristic are strong, durable, waterproof and inexpensive. Low moisture and the hydrophobic nature are the drawbacks polyester when used as a textile raw material. The hydrophobic nature of polyester can be changed by modifying the surface to make polyester absorb water easily, easy stain and increase comfortness.

Enzymatic surface modification using lipolytic hydrolase enzyme is an effective, efficient and environmental friendly. Triacylglycerol lipase lipolytic enzyme (EC 3.1.1.3) and carboxylesterase (EC 3.1.1.1) act on carboxyl ester bonds. Produced by microbes and have been widely used for industrial biotechnology application included textile industries. Genus *Bacillus* of bacteria has been known as a hydrolase lipolytic enzyme producer. In this study, triacylglycerol lipase (*TGA*) and carboxylesterase (*CES*) genes were cloned from *Bacillus velezensis* mlp-2 to obtain triacylglycerol lipase and carboxylesterase enzymes that could be applied for surface modification of polyester.

The study was divided into three steps. The first step was cloning and isolation of the triacylglycerol lipase (*TGA*) and carboxylesterase (*CES*) genes from *Bacillus velezensis* mlp-2. Cloning of *TGA*, *CES* gene and its promoter in pJET 1.2 blunt and pGEMT plasmid vectors and transformation in *Escherichia coli* DH5 α host cells. *TGA* and *CES* gene expression as a triacylglycerol lipase and carboxylesterase enzymes were analyzed for amino acid sequences to determine the phylogeny, amino acid motifs sequence, structures model and catalytic triads. Amino acid sequence analysis of *TGA* and *CES* proteins was carried out by aligning them with the same enzyme proteins from the references bacteria followed by prediction of the 3D model structure using the online server <https://swissmodel.expasy.org/>.

The second step was production of recombinant intracellular enzymes triacylglycerol lipase and carboxylesterase in Luria Bertani media. The enzymes produced were tested for their hydrolysis activity, measured their protein content and characterized for their specificity to the substrate, the effect of pH, temperature, inhibitors, activators, detergents, organic solvents and ions. The third step was the application of triacylglycerol lipase and carboxylesterase enzymes for the modification of polyester fabrics. The application of surface modification of polyester fabric was carried out by soaking the polyester fabric in each treatment group. The treatment group included recombinant triacylglycerol lipase, carboxylesterase, commercial lipase enzyme *C. rugosa* (Amano), non-recombinant lipase enzyme *B. velezensis* mlp-2, positive control (NaOH) and negative control (water). Parameters observed included hydrophilicity, color

absorption, carboxyl content and surface morphology observation of the fabric using an electron microscope.

Isolation of triacylglycerol (*TGA*) and Carboxylesterase (*CES*) genes from *mlp-2* isolates obtained *TGA* genes measuring 645 bp while *CES* genes measuring 1449 bp. Cloning and expression of *TGA* and *CES* genes and their native promoters in host *Escherichia coli* DH5 α produce an intracellular recombinant lipase and carboxylesterase enzymes. Intracellular recombinant *TGA* and *CES* enzyme activity were 0.25 U/mL and 0.23 U/mL with molecular weight are 25 kDa and 50kDa. *TGA* enzyme has specificity on fatty ester substrate of P-nitrophenyl-octanoate (C10) and p-nitrophenyl-palmitate (C16). *CES* enzyme has specificity on the substrate of P-nitrophenyl-acetate (C2) and p-nitrophenyl-butyrate (C4). *TGA* is optimal at pH 8 and temperature at 40° C, while *CES* is optimal at pH 7 and temperature at 40 °C. Metal ions Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺ and Zn²⁺ decrease the activity of *TGA* and *CES* enzymes, while Ca²⁺ ions increase activity in both enzymes. The addition of EDTA inhibitors (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid), mercaptoethanol, PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) decreased the enzyme activity of both *TGA* and *CES*. DTT (Dithiothreitol) and DMSO (Dimethylsulfoxide) increased *CES* activity. The addition of DTT and DMSO on the *TGA* enzymes had no effect on enzyme activity.

The addition of organic solvents acetone, isopropanol, n - hexane, methanol and chloroform with a concentration of 1% on *TGA* and *CES* enzymes has no effect on the activity of both enzymes. The effect of non ionic detergent tween 20, and triton x-100 when compared with the effect of anionic detergent SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) to *TGA* and *CES* enzymes showed that anionic detergent decreased enzyme activity more sharply when compared with the effect of non ionic detergent. Anionic detergents decrease enzyme activity up to 50% from the initial enzyme activity, while non-ionic detergents tween 20 and triton-x leave a relative activity more than 85%. Enzymatic surface modification in polyester fabric shows the process of changing fabric properties from hydrophobic to hydrophilic. Changes in fabric properties are indicated by increased water absorption, color and carboxyl content as well as changes in the morphology of the fabric fiber surface. The time required of water and color absorption in polyester fabrics treated with *TGA*, *CES*, non recombinant lipase *B. velezensis* *mlp-2*, commercial lipase *C. rugosa* (Amano), positive control (NaOH) and negative control (water) were 3, 3.5, 5, 3.2, 12 and 80 minutes respectively. The time required for color absorption were 52, 58, 178, 50, 196 and 2968 seconds. Carboxyl content were 30.9, 30.5, 28.6, 31.9, 12.4 and 3 meq/100g. In treated groups, a hydrolyzed polyester using *TGA*, *CES*, non recombinant lipase, commercial lipase and positive control (NaOH) based on observations using electron microscopy showed on the surface of the twisted polyester fabric fibers become irregular and there are cracks, holes, pores, while in the negative control treatment (water) there is no change in the fiber surface and spiral structure.

Keywords: carboxylesterase, gene cloning, polyester, surface modification, triacylglycerol lipase





© Hak Cipta milik IPB, tahun 2023 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.

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.



KLONING GEN TRIASILGLISEROL LIPASE (*TGA*) DAN KARBOKSILESTERASE (*CES*) *Bacillus velezensis* mlp-2 UNTUK MODIFIKASI KAIN POLIESTER

IKA RAHMATUL LAYLY

Disertasi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi Mikrobiologi

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2023**

- 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 University

IPB University

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

1. Dr. rer.nat Niknik Nurhayati, S.Si
2. Dr. Naswandi Nur, M.Si

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:

1. Dr. rer.nat Niknik Nurhayati, S.Si
2. Dr. Naswandi Nur, M.Si



IPB University
— Bogor Indonesia —

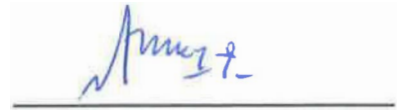
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

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.

Judul Disertasi : Kloning Gen Triasilgliserol Lipase (TGA) dan Karboksilesterase (CES) *Bacillus velezensis* mlp-2 untuk Modifikasi Kain Poliester
Nama : Ika Rahmatul Layly
NIM : G361170011

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Anja Meryandini, MS



Pembimbing 2:
Dr. Is Helianti, M.Sc



Pembimbing 3:
Dr. Rika Indri Astuti, MSi



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Anja Meryandini, MS
NIP: 196203271987032001



Dekan Fakultas MIPA:
Dr. Berry Juliandi, S.Si., MSi
NIP: 197807232007011001



Tanggal Ujian Tertutup: 18 Oktober 2022

Tanggal Lulus: 07 NOV 2022

PRAKATA

Alhamdulillahirobbil 'alamin. Segala puji penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wata'ala yang telah memberikan karunia serta rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan disertasi yang berjudul “Kloning Gen Triasilgliserol Lipase (*TGA*) dan Karboksilesterase (*CES*) *Bacillus velezensis* mlp-2 untuk Modifikasi Kain Poliester. Terimakasih yang tak terhingga penulis ucapkan kepada Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, MS, Dr. Is Helianti, M.Sc dan Dr. Rika Indri Astuti, M.Si atas waktu dan curahan ilmu yang diberikan dalam membimbing penulis selama menempuh pendidikan di Institut Pertanian Bogor.

Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, melalui Program Beasiswa SDM Iptek yang telah memberi kesempatan penulis untuk mendapatkan beasiswa, Terimakasih juga penulis ucapkan kepada Bapak Edi Wahjono, M.Si selaku purna Direktur Pusat Teknologi Bioindustri-BPPT yang telah mengizinkan penulis untuk melaksanakan tugas belajar dan Bapak Dr. Asep Riswoko B.Eng, M.Eng selaku purna Direktur Pusat Teknologi Bioindustri yang telah memberikan ijin penulis untuk memperpanjang masa tugas belajar, terimakasih kepada Kepala Laboratorium Laptiab-BPPT atas fasilitas lab yang penulis gunakan, terimakasih kepada Dr. Is Helianti, MSc melalui program insinas 2020-2021 yang memberikan dukungan terhadap pelaksanaan penelitian dan publikasi penulis, Terimakasih kepada Pusat Teknologi Bioindustri melalui program pendanaan Dipa 2018-2019 yang mendukung pelaksanaan penelitian penulis. Terimakasih kepada Bapak Ibu Dosen Program Studi Mikrobiologi atas ilmu dan wawasan yang telah diberikan selama ini, terimakasih kepada staf administrasi jurusan Biologi yang telah membantu penulis dalam memberikan informasi administrasi.

Terimakasih yang tak terhingga penulis ucapkan kepada kedua orangtua penulis, Bapak A. Effendy dan Ibu (Almh) Hj Wiwik Qurrotul Aini atas segala doa dan dukungan, serta terimakasih tak terhingga kepada suami penulis M. Ilhami, ST yang dengan sabar memberikan dukungan dan perhatian, serta terimakasih kepada anak-anak tersayang Fathi MSA dan Ammar MIA yang sangat pengertian dan mandiri. Kepada rekan-rekan staf Pusat Teknologi Bioindustri terutama Maria Ulfah M.Sc, Lina Mulyawati S.Si penulis ucapkan banyak terimakasih atas segenap bantuan dan dukungannya selama ini, juga kepada rekan-rekan S3 IPB angkatan 2017 terimakasih untuk motivasinya selama ini. Semoga disertasi ini memberikan manfaat.

Bogor, Februari 2023

Ika Rahmatul Layly

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	4
1.6 Kebaruan (<i>Novelty</i>)	4
II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Bacillus velezensis</i>	5
2.2 Enzim Lipolitik Mikroba	6
2.3 Enzim Triasilgliserol lipase atau Lipase	8
2.3.1 Definisi dan Mikroba Penghasil Lipase	8
2.3.2 Klasifikasi Lipase dari Bakteri	10
2.4 Karakteristik Lipase yang Meliputi pH dan Suhu	13
2.5 Pengaruh Ion Logam	14
2.6 Spesifisitas terhadap Substrat	14
2.7 Situs Aktif Lipase	15
2.8 Penggunaan Lipase untuk Industri Tekstil	16
2.9 Definisi dan Mikroba Penghasil Enzim Karboksilesterase	16
2.10 Klasifikasi Karboksilesterase	18
2.11 Hidrolisis Ester	18
2.12 Karakteristik Karboksilesterase yang Meliputi pH dan Suhu	20
2.13 Pengaruh Ion Logam	20
2.14 Spesifisitas Terhadap Substrat	20
2.15 Situs Aktif Karboksilesterase	21
2.16 Penggunaan Karboksilesterase untuk Industri Tekstil	22
2.17 Kloning dan Ekspresi Gen	22
2.17.1 Kloning Gen	22
2.17.2 Ekspresi Gen	26
2.17.3 Sistem Ekspresi Bakteri	28
2.18 Poliester	29
2.19 Modifikasi Permukaan Serat Sintetis secara Enzimatis	32
III METODE PENELITIAN	35
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.2 Alat dan Bahan	36
3.3 Tahapan Penelitian	37
3.3.1 Isolasi Gen Triasilgliserol lipase (<i>TGA</i>) dan Karboksilesterase (<i>CES</i>)	37
3.3.2 Kloning Gen <i>TGA</i> dan Gen <i>CES</i> ke Vektor pGEM-T Easy	38

3.3.3	Transformasi Hasil Ligasi ke Sel Inang <i>E. coli</i> DH5 α Menggunakan Metode Kejut Panas (<i>Heat Shock</i>)	38
3.3.4	Konfirmasi Keberhasilan Proses Sub Kloning dan Transformasi	39
3.3.5	Isolasi Plasmid Rekombinan pGEM-T Easy menggunakan kit (<i>Thermo Scientific Gene JET Plasmid Miniprep Kit</i>)	39
3.3.6	Konfirmasi DNA Sisipan pada Plasmid pGEM-T Easy Rekombinan Menggunakan Enzim Restriksi <i>EcoRI</i>	40
3.3.7	Analisis Sekuen Gen Triasilgliserol Lipase (<i>TGA</i>) dan Karboksilesterase (<i>CES</i>)	40
3.3.8	Isolasi <i>Native</i> Promotor Gen Triasilgliserol Lipase (<i>TGA</i>) dan <i>Native</i> Promotor Gen Karboksilesterase (<i>CES</i>)	40
3.3.9	Ligasi Produk PCR <i>Native</i> Promotor Gen <i>TGA</i> ke Vektor pJET 1.2 Blunt dan <i>Native</i> Promotor Gen <i>CES</i> ke Vektor pGEM-T	41
3.3.10	Konfirmasi Keberhasilan Proses Kloning dan Transformasi	41
3.3.11	Verifikasi Plasmid Rekombinan Hasil Kloning dengan Enzim Restriksi	42
3.3.12	Pemodelan Molekuler Triasilgliserol lipase dan Karboksilesterase	42
3.3.13	Produksi Enzim Lipolitik Intraseluler Rekombinan Triasilgliserol Lipase (<i>TGA</i>) dan Karboksilesterase (<i>CES</i>)	42
3.3.14	Produksi Enzim Lipase Non Rekombinan dari Isolat Terpilih	43
3.3.15	Pemekatan Enzim	43
3.3.16	Uji Aktivitas Enzim	43
3.3.17	Pengukuran Kadar Protein Enzim	44
3.3.18	Penentuan Suhu Optimum Enzim Rekombinan dan Stabilitasnya	44
3.3.19	Pengaruh pH Optimum dan Stabilitasnya	44
3.3.20	Pengaruh Ion terhadap Aktivitas Enzim	44
3.3.21	Pengaruh Deterjen terhadap Aktivitas Enzim	45
3.3.22	Pengaruh Inhibitor dan Aktivator terhadap Aktivitas Enzim	45
3.3.23	Pengaruh Pelarut Organik terhadap Aktivitas Enzim	45
3.3.24	Spesifisitas Enzim Rekombinan Terhadap Substrat Lemak Ester	45
3.3.25	Penentuan Profil Protein Enzim Rekombinan	45
3.3.26	Penentuan Berat Molekul Enzim Rekombinan Menggunakan Metode Zimogram	46
3.3.27	Modifikasi Permukaan Serat Poliester Secara Enzimatis	46
3.3.28	Penentuan Hidrofilisitas Kain Poliester	46
3.3.29	Pengukuran Penyerapan Warna Kain Poliester	46
3.3.30	Skoring Intensitas Penyerapan Warna Kain Poliester	47
3.3.31	Pengukuran Kandungan Karboksil	47
3.3.32	Pengamatan Perubahan Permukaan Poliester Menggunakan <i>Scanning Electron Microscopy</i>	47
	HASIL DAN PEMBAHASAN	48
4.1	Isolasi Genom Isolat <i>Bacillus velezensis</i> mlp-2, Isolasi Gen Triasilgliserol Lipase (<i>TGA</i>) dan Karboksilesterase (<i>CES</i>)	48

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.

4.2	Kloning Gen <i>TGA</i> dan <i>CES</i> pada Vektor pGEMT-Easy	49
4.3	Identifikasi Sekuen Fragmen DNA Gen <i>TGA</i> dan <i>CES</i> serta Analisa <i>Open Reading Frame</i> (ORF)	52
4.3.1	Triasilgliserol Lipase	52
4.3.2	Karboksilesterase	58
4.4	Kloning <i>Native</i> Promotor Gen <i>TGA</i> pada Vektor pJET 1.2 Blunt dan <i>Native</i> Promotor Gen <i>CES</i> ke Vektor pGEM-T	65
4.5	Produksi Enzim Lipolitik Intraseluler Rekombinan Triasilgliserol Lipase (<i>TGA</i>), Karboksilesterase (<i>CES</i>) serta Ekstraseluler Non Rekombinan Lipase <i>B. velezensis</i> mlp-2	70
4.6	Uji Aktivitas Enzim Lipolitik	71
4.7	Elektroforesis SDS PAGE dan zimogram enzim lipolitik rekombinan <i>TGA</i> dan <i>CES</i>	76
4.8	Spesifisitas Substrat Enzim Lipolitik Rekombinan <i>TGA</i> dan <i>CES</i>	79
4.9	Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Enzim Lipolitik Rekombinan <i>TGA</i> dan <i>CES</i>	80
4.10	Modifikasi Permukaan Kain Poliester Secara Enzimatis	88
4.11	Permukaan Serat Poliester Hasil Modifikasi Permukaan	93
V	SIMPULAN DAN SARAN	96
5.1	Simpulan	96
5.2	Saran	96
	DAFTAR PUSTAKA	97
	LAMPIRAN	110
	RIWAYAT HIDUP	130





DAFTAR TABEL

2.1	Strain <i>B. velezensis</i> sebagai penghasil enzim	6
2.2	Klasifikasi enzim lipolitik bakteri	7
2.3	Bakteri dan fungi penghasil lipase, sumber isolasi, aktivitas pada berbagai substrat	9
2.4	Klasifikasi lipase	11
2.5	Klasifikasi karboksilesterase	18
2.6	Kloning gen lipase bakteri dan aktinomisetes	25
2.7	Kloning gen karboksilesterase bakteri, kapang dan aktinomisetes	26
2.8	Sistem promotor pada <i>E. coli</i>	29
2.9	Inang dan vektor ekspresi	29
3.1	Bakteri dan plasmid yang digunakan dalam penelitian	36
3.2	Primer yang digunakan dalam penelitian ini	37
4.1	Hasil BLASTX sekuen nukleotida TGA	52
4.2	Hasil BLASTX sekuen nukleotida CES	59
4.3	Aktivitas enzim pada supernatan dan lisat sel	71
4.4	Aktivitas enzim lipolitik	75
4.5	Hidrofilisitas kain poliester pada berbagai perlakuan	89
4.6	Penyerapan warna pada kain poliester	90
4.7	Skor intensitas warna kain poliester hasil perlakuan	91
4.8	Kandungan karboksil kain poliester pada berbagai perlakuan	92

DAFTAR GAMBAR

2.1	Reaksi-reaksi katalisis lipase	8
2.2	Kesejajaran lipase <i>B. licheniformis</i> IBRL-CHS2	12
2.3	Reaksi spesifisitas lipase terhadap substrat	14
2.4	Struktur enzim hidrolase α/β	15
2.5	Bentuk sisi aktif lipase	16
2.6	Mekanisme reaksi hidrolisis karboksilesterase	19
2.7	Struktur kristalin karboksilesterase	21
2.8	Regulasi ekspresi gen lipase pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.9	Polimerisasi polietilena tereftalat (PET)	30
2.10	Serat poliester diamati menggunakan mikroskop elektron	31
2.11	Hidrolisis struktur poliester aromatik-alifatik dan poliester alifatik terhadap sisi aktif enzim	32
2.12	Hidrolisis lipase pada poliester	33

3.1	Diagram alur penelitian	35
4.1	Hasil elektroforesis genom <i>B. velezensis</i> mlp-2	48
4.2	Hasil isolasi serta pemurnian gen <i>TGA</i> dan <i>CES</i>	48
4.3	PCR koloni transforman positif	51
4.4	Hasil isolasi plasmid pGEMT-Easy	51
4.5	Pemotongan plasmid pGEMT-easy menggunakan enzim restriksi <i>EcoR1</i>	51
4.6	Pohon filogenetik <i>TGA Bacillus velezensis</i> mlp-2 (QNQ79195.1)	53
4.7	Urutan sekuen DNA dan deduksi asam amino dari <i>ORF</i> triasilgliserol lipase (<i>TGA</i>)	54
4.8	Prediksi struktur tersier <i>TGA Bacillus velezensis</i> mlp-2	55
4.9	Prediksi struktur tersier enzim <i>TGA Bacillus velezensis</i> mlp-2	56
4.10	Pensejajaran sekuen asam amino <i>TGA</i> dari <i>Bacillus velezensis</i> mlp-2 (QNQ79195.1)	56
4.11	Struktur tiga dimensi lipase <i>TGA</i> hasil prediksi menggunakan model struktur lipase <i>A Bacillus subtilis wild type</i>	58
4.12	Pohon filogenetik <i>CES Bacillus velezensis</i> mlp-2 (QNQ79194.1)	60
4.13	Urutan sekuen DNA dan deduksi asam amino dari <i>ORF</i> karboksilesterase (<i>CES</i>)	61
4.14	Prediksi struktur tersier enzim <i>CES Bacillus velezensis</i> mlp-2	61
4.15	Prediksi struktur tersier <i>CES Bacillus velezensis</i> mlp-2	62
4.16	Pensejajaran sekuen asam amino <i>CES</i> dari <i>Bacillus velezensis</i> mlp-2 (QNQ79194.1)	63
4.17	Struktur tiga dimensi karboksilesterase <i>CES</i>	64
4.18	Hasil amplifikasi <i>native</i> promotor dan <i>ORF</i>	66
4.19	Ligasi fragmen DNA pada vektor plasmid	66
4.20	PCR koloni transforman positif	68
4.21	Hasil isolasi plasmid transforman positif	68
4.22	Konfirmasi transforman menggunakan enzim restriksi	69
4.23	Aktivitas enzim dengan penambahan induser pada media produksi Luria Bertani	73
4.24	Uji spot test aktivitas enzim rekombinan pada media agar tributirin	74
4.25	Profil protein lisat	77
4.26	Profil zimogram protein enzim lipolitik	78
4.27	Spesifisitas enzim lipolitik rekombinan pada substrat p-nitrophenyl ester	79
4.28	Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipolitik rekombinan	80
4.29	Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim lipolitik rekombinan	81
4.30	Kestabilan enzim lipolitik terhadap suhu	82
4.31	Kestabilan enzim lipolitik rekombinan terhadap pH	83
4.32	Pengaruh ion terhadap aktivitas enzim lipolitik rekombinan	84



4.33	Pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim lipolitik rekombinan	85
4.34	Pengaruh pelarut organik terhadap aktivitas enzim lipolitik rekombinan	86
4.35	Pengaruh deterjen non ionik terhadap aktivitas enzim lipolitik rekombinan	87
4.36	Ilustrasi reaksi hidrolisis pada permukaan poliester	90
4.37	Intensitas penyerapan warna merah reaktif pada kain poliester	91
4.38	Permukaan serat kain poliester pasca perlakuan dilihat menggunakan mikroskop elektron perbesaran 100x	94
4.39	Permukaan serat kain poliester pasca perlakuan dilihat menggunakan mikroskop elektron perbesaran 500x	95

DAFTAR LAMPIRAN

1	Pensejajaran ORF gen <i>TGA</i> dari isolat bakteri <i>B. amyloliquefaciens</i> MBE1283, <i>B. amyloliquefaciens</i> XH7, <i>B. amyloliquefaciens</i> TA 208, <i>B. velezensis</i> CAU B946, <i>B. velezensis</i> LS60, <i>B. velezensis</i> JS25R untuk desain primer TGA	111
2	Pensejajaran ORF gen <i>CES</i> dari isolat bakteri <i>B. amyloliquefaciens</i> MBE1283, <i>B. amyloliquefaciens</i> XH7, <i>B. amyloliquefaciens</i> TA 208, <i>B. velezensis</i> CAU B946, <i>B. velezensis</i> LS60, <i>B. velezensis</i> JS25R untuk desain primer CES	113
3	Posisi penempelan primer untuk isolasi gen dan native promotor TGA	116
4	Posisi penempelan primer untuk isolasi gen dan native promotor CES	117
5	Pensejajaran sekuen Native promotor gen <i>TGA</i> dari isolat bakteri <i>B. amyloliquefaciens</i> XH7, <i>B. amyloliquefaciens</i> B15, <i>B. amyloliquefaciens</i> TA 208, <i>B. velezensis</i> CAU B946 dan <i>B. velezensis</i> FZB42 untuk desain primer	118
6	Pensejajaran sekuen Native promotor gen <i>CES</i> dari isolat bakteri <i>B. amyloliquefaciens</i> XH7, <i>B. amyloliquefaciens</i> B15, <i>B. amyloliquefaciens</i> TA 208, <i>B. velezensis</i> CAU B946 dan <i>B. velezensis</i> FZB42 untuk desain primer	118
7	Plasmid pGEM T Easy (A), Peta plasmid pGEM T Easy (B)	119
8	Plasmid pGEM T (A), Peta plasmid pGEM T (B)	120
9	Plasmid pJET 1.2 blunt (A), Peta plasmid pJET 1.2 blunt (B)	121
10	Peta plasmid pGEMT (A), Daerah penyisipan gen CES pada plasmid pGEMT (B)	122
11	Peta plasmid pJET 1.2 (A), Daerah penyisipan gen TGA pada plasmid pJET 1.2 (B)	123
12	Konstruksi peta plasmid pGEMT-TGA yang mengandung gen <i>TGA</i>	124
13	Konstruksi peta plasmid pGEMT-CES yang mengandung gen CES	125
14	Konstruksi peta plasmid pJET NP-TGA yang mengandung natprom promotor dan gen <i>TGA</i>	126

- 15 Konstruksi peta plasmid pGEMT NP-CES yang mengandung natprom dan gen *CES* 127
- 16 Hasil sekuensing NP TGA dari primer lpJET1.2_Forward, TTCATG-GTTATAAT: *Native* promotor TGA 128
- 17 Hasil sekuensing NP CES dari primer M13_Forward, TTCATG-GTTATAAT: *Native* promotor CES 129

@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.