



KLONING DAN KARAKTERISASI LIPASE-FOSFOLIPASE THRAUSTOCHYTRIDS PADA *E. coli* BL21 (DE3)

MUTIA ANIKA



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**

- 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



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.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Kloning dan Karakterisasi Lipase-Fosfolipase Thraustochytrids pada *E. coli* BL21 (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, Juli 2024
Mutia Anika
P0501211009

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



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.



RINGKASAN

MUTIA ANIKA. Kloning dan Karakterisasi Lipase-Fosfolipase *Thraustochytrids* pada *E. coli* BL21 (DE3). Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO dan NISA RACHMANIA MUBARIK .

Lipase-fosfolipase merupakan enzim multifungsi yang menggabungkan peran lipase dan fosfolipase dalam satu protein yang ditemukan pada *thraustochytrids*. Enzim ini ditemukan pada *Aurantiochytrium limacinum* yang berperan penting dalam kompetisi mikroba serta perolehan asam lemak dari lingkungan. Kemampuan enzim yang unik memiliki potensi untuk pengaplikasian lebih luas terutama dalam industri bioteknologi. Informasi detail terkait enzim dibutuhkan untuk efisiensi dalam pemanfaatannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengkloning gen lipase-fosfolipase ke *E. coli* BL21 (DE3) dan mengkarakterisasi enzim lipase-fosfolipase dengan metode spektrofotometri dan titrasi.

Gen lipase-fosfolipase dari *thraustochytrids* dikloning pada vektor ekspresi pET28a yang ditransformasi ke *E. coli* BL21 (DE3). Koloni *E. coli* BL21 yang terkonfirmasi membawa gen target diuji secara kualitatif menggunakan *agar plate* dengan substrat lesitin dan tributirin. Setelah ekspresi heterolog, enzim lipase-fosfolipase mampu menghidrolisis substrat tributirin dan lesitin pada *agar plate*. *E. coli* BL21 rekombinan yang memiliki aktivitas pada uji kualitatif digunakan untuk menghasilkan ekstrak kasar enzim. Lipase-fosfolipase diekspresikan secara intraseluler. Ekstrak enzim digunakan untuk karakterisasi enzim berdasarkan suhu, pH, substrat preferensi lipase dan fosfolipase. Enzim memiliki karakteristik biokimia optimal pada suhu 50 °C, pH 9,5, preferensi substrat lipase yaitu *p*-nitrofenil laurat (112,8 U/mL) yang termasuk asam lemak bebas rantai sedang dengan aktivitas spesifik lipase 10,26 U/mg, dan preferensi substrat fosfolipase yaitu fosfatidilserin (1149,3 U/mL) dengan aktivitas spesifik 104,48 U/mL. Aktivitas spesifik enzim fosfolipase 10 kali lebih besar dari aktivitas spesifik lipase. Penelitian awal menunjukkan bahwa enzim lipase-fosfolipase berhasil dikloning pada *E. coli* BL21 (DE3) dan enzim memiliki karakteristik dengan suhu tinggi, pH basa, dan karakteristik spesifik substrat yang variatif.

Kata kunci: kloning, karakterisasi enzim, lipase-fosfolipase, *thraustochytrids*



SUMMARY

MUTIA ANIKA. Cloning and Characterization of Lipase-Phospholipase Thraustochytrids in *E. coli* BL21 (DE3). Supervised by ANTONIUS SUWANTO, and NISA RACHMANIA MUBARIK.

Lipase-phospholipase is a multifunctional enzyme that combines the roles of lipase and phospholipase in one protein found in thraustochytrids. This enzyme found in *Aurantiochytrium limacinum* plays an important role in microbial competition as well as fatty acid acquisition from the environment. The unique ability of the enzyme has the potential for wider applications, especially in the biotechnology industry. Detailed information related to the enzyme is needed for efficiency in its utilization. This study aims to clone the lipase-phospholipase gene into *E. coli* BL21 (DE3) and characterize the lipase-phospholipase enzyme by spectrophotometric and titration methods.

The lipase-phospholipase gene from thraustochytrids was cloned on pET28a expression vector transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Confirmed *E. coli* BL21 colonies carrying the target gene were tested qualitatively using agar plates with lecithin and tributyrin substrates. After heterologous expression, the lipase-phospholipase enzyme was able to hydrolyze tributyrin and lecithin substrates on agar plates. Recombinant *E. coli* BL21 that had activity in the qualitative assay was used to produce the crude extract of the enzyme. Lipase-phospholipase was expressed intracellularly. The enzyme extract was used for enzyme characterization based on temperature, pH, substrate preference of lipase and phospholipase. The enzyme has optimal biochemical characteristics at 50 °C, pH 9.5, lipase substrate preference is *p*-nitrophenyl laurate (112.8 U/mL) which includes medium chain free fatty acids with lipase specific activity of 10.26 U/mg, and phospholipase substrate preference is phosphatidylserine (1149.3 U/mL) with specific activity of 104.48 U/mL. The specific activity of phospholipase enzyme is 10 times greater than the specific activity of lipase. Preliminary research showed that the lipase-phospholipase enzyme was successfully cloned in *E. coli* BL21 (DE3) and the enzyme has characteristics with high temperature, alkaline pH, and varied substrate specific characteristics.

Keywords: cloning, enzyme characterization, lipase-phospholipase, thraustochytrids



@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, Tahun 2024
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 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.

KLONING DAN KARAKTERISASI LIPASE-FOSFOLIPASE THRAUSTOCHYTRIDS PADA *E. coli* BL21 (DE3)

MUTIA ANIKA

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

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**

@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 University

IPB University

Tim Penguji pada Ujian Tesis:
Dr. Rika Indri Astuti S.Si., 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 Tesis : Kloning dan Karakterisasi Lipase-Fosfolipase *Thraustochytrids*
pada *E. coli* BL21 (DE3)
Nama : Mutia Anika
NIM : P0501211009

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

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto M.Sc



Digitally signed by:
Antonius Suwanto
Date: 17 Jul 2024 10:55:07 WIB
Verify at: dsign.ipb.ac.id

Pembimbing 2:
Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si



Digitally signed by:
Nisa Rachmania
Date: 17 Jul 2024 12:41:55 WIB
Verify at: dsign.ipb.ac.id

Diketahui oleh

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

Dekan Sekolah Pascasarjana:
Prof. Dr. Ir. Dodik Ridho Nurrochmat, M.Sc.F.Trop., IPU
NIP. 197003291996081001



Tanggal Ujian: 28 Juni 2024

Tanggal Lulus:



@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.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah tesis yang berjudul “Kloning dan Karakterisasi Lipase-Fosfolipase Thraustochytrids pada *E. coli* BL21 (DE3)”. Adapun tujuan dari penulisan naskah tesis ini adalah sebagai pra-syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains (M.Si) dalam bidang ilmu Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto M.Sc dan Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si yang telah membimbing dan memberi masukan serta saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Rika Indri Astuti S.Si., M.Si sebagai penguji luar komisi pembimbing, Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si sebagai Ketua Program Studi Bioteknologi dan moderator sidang tesis, 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 mengucapkan terima kasih kepada kepada seluruh staf PT. Wilmar Benih Indonesia divisi *Research and Development for Biotechnology*, terkhusus kepada Esti Puspitasari, Griselda Herman Natadiputri, dan Andreas Adhi Satya yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan pada penelitian ini. Terima kasih turut disampaikan kepada staf teknisi Laboratorium *Enzyme Research Group* Topik Hidayat dan Mohamad Memed Hidayatullah yang telah membantu hal teknis selama pengumpulan data, serta rekan-rekan seperjuangan Yogi, Dayu, Salma, Alhas, Jonathan, dan Michael yang banyak memberi saran serta dorongan dalam penyelesaian tesis ini. Terima kasih juga disampaikan kepada keluarga penulis terutama ayahanda, ibunda, kakak, uni, abang, dan uda yang selalu mendukung, memberikan semangat, dan kiriman do'a yang tiada henti dalam kelancaran proses pada setiap kegiatan dan perkuliahan penulis. Penghargaan penulis sampaikan kepada Eka, Wija, rekan-rekan bioteknologi, adik-adik, dan rekan-rekan BSC 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, Juli 2024

Mutia Anika



@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.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 <i>Thraustochytrids</i>	3
2.2 Lipase	4
2.3 Fosfolipase	6
III METODE	9
3.1 Diagram Alir Penelitian	9
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.3 Alat dan Bahan	10
3.4 Prosedur Kerja	10
IV HASIL	17
4.1 Kloning Gen Lipase-Fosfolipase	17
4.2 Analisis Sekuen Hasil Sekuensing	17
4.3 Ekspresi Lipase-Fosfolipase Rekombinan di <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	18
4.4 Karakterisasi biokimiawi enzim lipase-fosfolipase	20
4.5 SDS-PAGE	22
V PEMBAHASAN	23
VI SIMPULAN DAN SARAN	27
6.1 Simpulan	27
6.2 Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN	35
RIWAYAT HIDUP	39



DAFTAR TABEL

- | | | |
|----|---|----|
| 1. | Aktivitas enzim lipase-fosfolipase rekombinan | 19 |
|----|---|----|

DAFTAR GAMBAR

- | | | |
|-----|---|----|
| 1. | Taksonomi <i>Thraustochytrids</i> | 3 |
| 2. | Morfologi koloni <i>Thaustochytrids</i> | 3 |
| 3. | Reaksi yang dikatalisis oleh lipase | 5 |
| 4. | Spesifisitas pemotongan ikatan ester dari fosfolipase | 6 |
| 5. | Alur penelitian | 9 |
| 6. | Hasil elektroforesis PCR koloni transforman gen lipase-fosfolipase | 17 |
| 7. | Hasil <i>alignment</i> dan BLASTp NCBI | 18 |
| 8. | <i>Plate Agar Assay</i> lipase-fosfolipase | 19 |
| 9. | Karakterisasi aktivitas enzim lipase-fosfolipase berdasarkan suhu | 20 |
| 10. | Karakterisasi aktivitas enzim lipase-fosfolipase berdasarkan pH | 21 |
| 11. | Karakterisasi aktivitas enzim lipase-fosfolipase berdasarkan substrat lipase | 21 |
| 12. | Karakterisasi aktivitas enzim lipase-fosfolipase berdasarkan substrat fosfolipase | 22 |
| 13. | Hasil SDS-PAGE protein lipase-fosfolipase | 22 |

DAFTAR LAMPIRAN

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Kualitas dan kuantitas RNA total | 36 |
| 2 | Kualitas dan kuantitas cDNA | 36 |
| 3 | <i>Set-up</i> reaksi PCR untuk amplifikasi gen <i>mature</i> lipase-fosfolipase | 36 |
| 4 | Kualitas dan kuantitas plasmid transforman dan vektor | 36 |
| 5 | Peta plasmid pET-28a(+) | 37 |
| 6 | Kemurnian plasmid untuk sekuensing | 37 |
| 7 | Kurva standar <i>p</i> -nitrofenil isopropanol | 37 |
| 8 | Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) | 38 |
| 9 | Komposisi gel untuk SDS-PAGE | 38 |