

KLONING DAN EKSPRESI GEN LIPASE *Ganoderma boninense* DI *Escherichia coli*

M. MUSTAVA



PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2026

@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.

Perpustakaan IPB University



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul “Kloning dan Ekspresi Gen Lipase *Ganoderma boninense* di *Escherichia coli*” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. 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 tesis ini.

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

Bogor, Juli 2026

M. Mustava
P0501232035



RINGKASAN

M. MUSTAVA Kloning dan Ekspresi Gen Lipase *Ganoderma boninense* di-*Escherichia coli*. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO dan RIKA INDRI ASTUTI

Lipase merupakan enzim hidrolitik yang memiliki aplikasi luas di berbagai industri, namun lipase yang berasal dari jamur patogen masih belum banyak dikarakterisasi pada tingkat molekuler dan biokimia. *Ganoderma boninense*, sebagai penyebab penyakit busuk pangkal batang pada kelapa sawit, diketahui mensekresikan berbagai enzim hidrolitik, tetapi informasi mengenai lipasena masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengkloning, mengekspresikan, dan mengarakterisasi gen lipase (*gblip1*) dari *G. boninense* menggunakan sistem ekspresi heterolog.

Gen *full-length* (*gblip1-FL*) dan konstruksi tanpa *signal peptide* N-terminal (*gblip1ΔSP*) diamplifikasi dari cDNA dan diklon ke dalam vektor ekspresi, kemudian ditransformasikan ke *Escherichia coli*. Ekspresi protein rekombinan dianalisis menggunakan SDS-PAGE, sedangkan aktivitas enzim ditentukan menggunakan substrat p-nitrofenil ester. Selain itu, analisis molecular docking dilakukan untuk mengkaji interaksi antara enzim dan substrat.

Konstruksi *Gblip1-FL* tidak menunjukkan ekspresi protein rekombinan yang terdeteksi, yang diduga disebabkan oleh keberadaan *signal peptide* N-terminal yang tidak kompatibel dengan sistem ekspresi prokariotik, sehingga menyebabkan kesalahan pelipatan atau degradasi protein di dalam sel *E. coli*. Sebaliknya, penghilangan *signal peptide* pada konstruksi *Gblip1ΔSP* memungkinkan ekspresi protein rekombinan yang larut dan aktif. Di antara strain yang diuji, *E. coli* BL21 (DE3) menunjukkan aktivitas enzimatis tertinggi. Protein *Gblip1ΔSP* yang telah dipurifikasi menunjukkan preferensi terhadap substrat p-nitrofenil ester rantai sedang, dengan aktivitas spesifik maksimum pada p-nitrofenil oktanoat, sementara aktivitas terhadap substrat rantai panjang sangat rendah. Hasil analisis *molecular docking* mendukung temuan ini, yang menunjukkan interaksi yang lebih stabil antara enzim dan substrat rantai sedang pada konformasi *lid* terbuka.

Sebagai kesimpulan, penelitian ini berhasil mengekspresikan lipase fungsional dari *G. boninense* secara heterolog dan menunjukkan bahwa penghilangan *signal peptide* merupakan langkah penting untuk produksi protein rekombinan pada *E. coli*. Hasil ini memberikan wawasan baru mengenai hubungan struktur dan fungsi lipase dari Basidiomycota serta potensi pemanfaatannya dalam bidang bioteknologi.

Kata kunci: *Ganoderma boninense*, lipase jamur, ekspresi heterolog, pemotongan *signal peptide*, *molecular docking*

SUMMARY

M. MUSTAVA. Cloning and Expression of Lipase Gene from *Ganoderma boninense* in *Escherichia coli*. Supervised by ANTONIUS SUWANTO and RIKA INDRI ASTUTI.

Lipases are hydrolytic enzymes with broad applications in various industries; however, lipases derived from pathogenic fungi remain poorly characterized at the molecular and biochemical levels. *Ganoderma boninense*, the causal agent of basal stem rot in oil palm, is known to secrete various hydrolytic enzymes, yet information regarding its lipases is still limited. This study aimed to clone, express, and characterize a lipase gene (*gblip1*) from *G. boninense* using a heterologous expression system.

The full-length gene (*gblip1-FL*) and a truncated construct lacking the N-terminal signal peptide (*gblip1ΔSP*) were amplified from cDNA and cloned into an expression vector, followed by transformation into *Escherichia coli*. Recombinant protein expression was analyzed using SDS-PAGE, while enzymatic activity was determined using p-nitrophenyl ester substrates. In addition, molecular docking analysis was performed to investigate enzyme–substrate interactions.

The Gblip1-FL construct did not produce detectable recombinant protein, which is likely due to the presence of an N-terminal signal peptide that is incompatible with the prokaryotic expression system, resulting in improper folding or protein degradation within *E. coli* cells. In contrast, removal of the signal peptide in the Gblip1ΔSP construct enabled the expression of a soluble and active recombinant protein. Among the tested strains, *E. coli* BL21 (DE3) exhibited the highest enzymatic activity. The purified Gblip1ΔSP protein showed substrate preference toward medium-chain p-nitrophenyl esters, with maximum specific activity toward p-nitrophenyl octanoate, while activity toward long-chain substrates was negligible. Molecular docking analysis supported these findings, indicating more stable interactions between the enzyme and medium-chain substrates in the open-*lid* conformation.

In conclusion, this study successfully expressed a functional lipase from *G. boninense* in a heterologous system and demonstrated that removal of the signal peptide is a crucial step for recombinant protein production in *E. coli*. These findings provide new insights into the structure–function relationship of basidiomycete lipases and highlight their potential applications in biotechnology.

Keywords: *Ganoderma boninense*, fungal lipase, heterologous expression, signal peptide truncation, molecular docking



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 2026
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.

KLONING DAN EKSPRESI GEN LIPASE *Ganoderma boninense* DI *Escherichia coli*

M. MUSTAVA

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

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2026**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Perpustakaan 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.

Tim Penguji pada Ujian Tesis:

1. Prof. Dr. Aris Tri Wahyudi, M. Si.

- 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 Ekspresi Gen Lipase *Ganoderma boninense*
di *Escherichia coli*
Nama : M. Mustava
NRP : P0501232035

Disetujui oleh

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



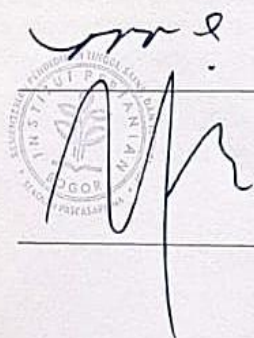
Pembimbing 2:
Dr. Rika Indri Astuti, S. Si., M. Si.



Diketahui oleh

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

Dekan Sekolah Pascasarjana
Prof. Dr. Ir. Yusli Wardiatno, M. Sc.
NIP. 196607281991031002



Tanggal Ujian: 22 Juni 2026

Tanggal Lulus: 13 JUL 2026

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini berhasil diselesaikan. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan pada Januari 2025 sampai bulan Januari 2026 dengan judul "*Kloning dan Ekspresi Gen Lipase dari Ganoderma boninense di Escherichia coli*." Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc. selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. Rika Indri Astuti, S.Si., M.Si. selaku anggota komisi pembimbing atas bimbingan, arahan, serta motivasi yang diberikan selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Kementerian Keuangan Republik Indonesia, atas dukungan pendanaan melalui program beasiswa yang diberikan.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh pihak yang telah membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung, selama proses penelitian. Secara khusus, penulis mengucapkan terima kasih kepada staf laboratorium dan rekan-rekan di Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana IPB, serta anggota Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia (MB) dan Laboratorium Sel dan Jaringan Tanaman, atas bantuan, dukungan, dan kerja sama selama penelitian berlangsung, serta kepada keluarga tercinta atas doa, dukungan, dan semangat yang tiada henti.

Akhirnya, penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang membutuhkan serta berkontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang bioteknologi molekuler.

Bogor, Juli 2026

M. Mustava

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Enzim Lipase	4
2.2 Struktur dan Mekanisme Katalitik Enzim Lipase	4
2.3 Klasifikasi Enzim Lipase	6
2.4 Lipase Pada Jamur	6
2.5 Lipase Pada Jamur <i>G. boninense</i>	7
2.6 Perkembangan Studi Lipase pada <i>G. boninense</i>	9
III METODE	10
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.2 Alat dan Bahan	10
3.3 Diagram Alir Penelitian	12
3.4 Prosedur Penelitian	13
3.4.1 Desain Primer Penyandi Gen Lipase <i>G. boninense</i>	13
3.4.2 Pemodelan Struktur dan Analisis <i>Molecular Docking</i>	14
3.4.3 Peremajaan Isolat <i>G. boninense</i>	14
3.4.4 Ekstraksi RNA Total, Sintesis cDNA, dan Purifikasi	14
3.4.5 Amplifikasi, Kloning Gen <i>gblip1</i> ke Vektor pGEM-T Easy, serta Transformasi Vektor Rekombinan ke <i>Escherichia coli</i> DH5α	15
3.4.6 Subkloningn Gen <i>gblip1</i> ke dalam Vektor Ekspresi pET-28a(+) serta Transformasi ke Berbagai <i>Host</i> Ekspresi	16
3.4.7 Ekspresi Heterolog, Seleksi <i>Host</i> dan Analisis Kelarutan Protein	17
3.4.8 Pemurnian Protein Rekombinan	18
3.4.9 Determinasi Konsentrasi Protein dengan Metode Bradford	18
3.4.10 Determinasi Berat Molekul Protein dengan SDS-PAGE	19
3.4.11 Uji Aktivitas Enzim Lipase Rekombinan	19
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Analisis Filogenetik serta Struktur Sekunder dan Struktur Tiga Dimensi (3D) <i>Gblip1</i>	21
4.2 Perbandingan Konformasi <i>Lid</i> dan Aksesibilitas Kantong Aktif <i>Gblip1</i>	23
4.3 Analisis <i>Molecular Docking</i> dan Aksesibilitas Ligan pada Konformasi <i>Lid</i> <i>Gblip1</i>	25
4.4 Peremajaan Isolat <i>Ganoderma boninense</i> B29	27
4.5 Ekstraksi RNA Total, Sintesis cDNA dan Amplifikasi Gen Target	28
4.6 Kloning Gen <i>gblip1-Fl</i> ke Vektor pGEM-T Easy dan Transformasi Vektor Rekombinan ke <i>Escherichia coli</i> DH5α	30

4.7 Subkloningn Gen <i>gblip-FL</i> ke Vektor Ekspresi pET-28a(+) dan Transformasi Vektor Rekombinan ke <i>Escherichia coli</i> DH5 α	33
4.8 Analisis SDS-PAGE Protein Rekombinan Gblip1-FL	35
4.9 Hasil Amplifikasi Gen <i>gblip1-FL</i> dari pGEM-T Easy <i>gblip1-FL</i>	39
4.10 Subkloning Gen <i>gblip1ΔSP</i> ke Vektor Ekspresi pET-28a(+) dan Transformasi ke DH5 α	40
4.11 Transformasi dan Konfirmasi Vektor Rekombinan pET-28a(+) <i>gblip1ΔSP</i> pada Berbagai <i>Host Escherichia coli</i>	42
4.12 Ekspresi dan Evaluasi Protein Rekombinan Gblip Δ SP	43
4.13 Analisis Kelarutan Protein Rekombinan Gblip1 Δ SP	46
4.14 Purifikasi Protein Rekombinan Gblip1 Δ SP	49
4.15 Aktivitas Enzim Gblip1 Δ SP terhadap Substrat p-Nitrofenil Ester	50
V KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	62
RIWAYAT HIDUP	70





DAFTAR TABEL

1	Daftar strain bakteri, plasmid dan primer yang digunakan pada penelitian	11
2	Daftar primer oligonukleotida yang digunakan dalam amplifikasi dan kloning gen <i>gblip1</i> dari <i>Ganoderma boninense</i>	13
3	Afinitas <i>docking</i> substrat pNP-ester pada konformasi <i>lid</i> terbuka dan tertutup	25
4	Hasil isolasi RNA total miselium <i>G. boninense</i>	29
5	Konsentrasi protein total hasil ekspresi rekombinan Gblip1-FL pada <i>E. coli</i> BL21 (DE3) dan BL21 (DE3) pLysS	36

DAFTAR GAMBAR

1	Struktur lipase	4
2	Jamur <i>G. boninense</i> pada kelapa Sawit	8
3	Diagram alir penelitian kloning dan ekspresi gen lipase	12
4	Pohon filogenetik protein Gblip1 dan lipase homolog yang dikonstruksi dengan metode <i>Neighbor-Joining</i> (<i>bootstrap</i> 10000)	21
5	Struktur protein Gblip1 berdasarkan analisis sekunder dan tiga dimensi	22
6	Perbandingan konformasi <i>lid</i> dan aksesibilitas kantong aktif pada lipase referensi dan Gblip1	24
7	Visualisasi ligan pada konformasi <i>lid</i> yang berbeda pada Gblip1	26
8	Analisis interaksi ligan pada konformasi <i>lid</i> Gblip1	27
9	Peremajaan isolat <i>Ganoderma boninense</i> B29	28
10	Hasil visualisasi elektroforesis RNA total dan produk PCR gen target	29
11	Hasil kloning gen <i>gblip1-FL</i> ke dalam vektor pGEM-T Easy	31
12	Hasil sekuensing <i>gblip1-FL</i>	33
13	Konfirmasi subkloning gen <i>gblip1</i> ke dalam vektor ekspresi pET-28a(+)	34
14	Hasil analisis ekspresi protein rekombinan Gblip1-FL pada <i>E. coli</i> BL21 (DE3) dan BL21 (DE3) pLysS menggunakan metode SDS-PAGE	36
15	Prediksi <i>signal peptide</i> Gblip1-FL menggunakan Phobius	38
16	Hasil amplifikasi dan verifikasi <i>gblip1ΔSP</i> dari pGEM-T Easy <i>gblip1-FL</i>	39
17	Subkloning gen <i>gblip1ΔSP</i> ke dalam vektor ekspresi pET-28a(+)	40
18	Konfirmasi transformasi plasmid rekombinan pET-28a(+)-Gblip1ΔSP pada berbagai host <i>Escherichia coli</i> menggunakan PCR	42
19	Hasil ekspresi protein rekombinan Gblip1ΔSP pada <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) menggunakan metode SDS-PAGE	44
20	Hasil ekspresi protein rekombinan Gblip1ΔSP pada berbagai host <i>E. coli</i>	44
21	Analisis kelarutan protein Gblip1ΔSP menggunakan SDS-PAGE	47
22	Purifikasi protein rekombinan Gblip1ΔSP menggunakan Ni-NTA agarose spin column yang dianalisis dengan SDS-PAGE	49
23	Aktivitas enzim Gblip1ΔSP terhadap berbagai substrat <i>p</i> -nitrofenil ester pada fraksi ekstrak kasar, hasil purifikasi, dan kontrol negatif (pET-28a(+)) tanpa sisipan).	50

DAFTAR LAMPIRAN

1	Peta plasmid pGEM-T Easy_ <i>gblip1-FL</i>	63
2	Peta plasmid rekombinan pET-28a(+) <i>gblip1-FL</i>	63
3	Analisis SPSS aktivitas volumetrik pada substrat C4	64
4	Analisis SPSS aktivitas volumetrik pada substrat C8	65
5	Analisis SPSS aktivitas volumetrik pada substrat C10	66
6	Analisis SPSS aktivitas spesifik pada substrat C4	67
7	Analisis SPSS aktivitas spesifik pada substrat C8	68
8	Analisis SPSS aktivitas spesifik pada substrat C10	69

