

INTRODUKSI GEN LIPASE BAKTERI TERMOFILIK *Aneurinibacillus thermoaerophilus D2B* KE *Komagataella phaffii*

FAIZA NAJLA NUR HANIFAH



DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026



PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Introduksi Gen Lipase Bakteri Termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* D2B ke *Komagataella phaffii* ” 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 skripsi ini.

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

Bogor, Agustus 2026

Faiza Najla Nur Hanifah
G3401221086



ABSTRAK

FAIZA NAJLA NUR HANIFAH. Introduksi Gen Lipase Bakteri Termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* D2B ke *Komagataella phaffii*. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO dan IVAN PERMANA PUTRA.

Lipase merupakan enzim yang menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol, serta banyak digunakan dalam industri. Aplikasinya yang luas pada bidang industri mendorong peningkatan kebutuhan produksi lipase dalam skala besar dengan karakteristik biokimia yang dapat mempertahankan aktivitas dan stabilitas dalam kondisi industri. Lipase dari mikroorganisme menjadi salah satu sumber potensial, contohnya bakteri termofilik seperti *Aneurinibacillus thermoaerophilus* yang menghasilkan lipase D2B. Selain itu, mikroorganisme juga dimanfaatkan secara luas sebagai sistem ekspresi untuk produksi lipase heterolog, salah satunya *Komagataella phaffii*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengonstruksi gen lipase D2B ke dalam *K. phaffii*, yang dipilih karena sistem ekspresi ekstraselulernya efektif untuk produksi skala besar. Konstruksi dilakukan melalui amplifikasi dan restriksi pGEM-T_d2b serta plasmid pPIC9K menggunakan *EcoRI* dan *NotI*, diikuti ligasi (*insert:vektor* = 3:1) dan transformasi ke *Escherichia coli* DH5 α menghasilkan 7 klon positif berukuran $\pm$ 1600 bp. Plasmid kemudian dilinearisasi dengan *SacI*, ditransformasikan ke *K. phaffii*, dan klon putatif diverifikasi menggunakan primer AOX1 serta kombinasi primer AOX1 dan d2b_pPIC9K. Hasil menunjukkan gen lipase D2B berhasil diintegrasikan ke dalam genom *K. phaffii* melalui rekombinasi homolog. Rekombinasi homolog ditunjukkan dari ukuran ampikon yang terbentuk, yaitu 2,2 kb dan 1,6 kb, 1,5 kb, serta 1,2 kb.

Kata kunci: *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Komagataella phaffii*, Lipase D2B, pPIC9K



ABSTRACT

FAIZA NAJLA NUR HANIFAH. Introduction of the Lipase Gene of Thermophilic Bacteria *Aneurinibacillus thermoaerophilus* D2B to *Komagataella phaffii*. Supervised by ANTONIUS SUWANTO and IVAN PERMANA PUTRA.

Lipase is an enzyme that hydrolyzes triglycerides into fatty acids and glycerol, and is widely used in industry. Its wide application in the industrial field is driving the increasing need for large-scale lipase production with biochemical characteristics that can maintain activity and stability under industrial conditions. Lipase from microorganisms is one of the potential sources, for example thermophilic bacteria such as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* that produce D2B lipase. In addition, microorganisms are also widely used as an expression system for the production of heterologous lipases, one of which is *Komagataella phaffii*. Therefore, this study aimed to construct the D2B lipase gene into *K. phaffii*, which was chosen because its extracellular expression system is effective for large-scale production. Construction was carried out through amplification and restriction of pGEM-T_d2b and pPIC9K plasmids using *EcoRI* and *NotI*, followed by ligation (insert:vector = 3:1) and transformation to *Escherichia coli* DH5α produced 7 positive clones measuring ± 1600 bp. The plasmid was then legalized with *SacI*, transformed into *K. phaffii*, and the putative clone was verified using AOX1 primers as well as a combination of AOX1 and d2b_pPIC9K primers. The results showed that the D2B lipase gene was successfully integrated into the genome of *K. phaffii* through homologous recombination. Homologous recombination is shown from the size of the amplicon formed, namely 2.2 kb and 1.6 kb, 1.5 kb, and 1.2 kb.

Keywords: *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Komagataella phaffii*, Lipase D2B, pPIC9K



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.

INTRODUKSI GEN LIPASE BAKTERI TERMOFILIK *Aneurinibacillus thermoaerophilus D2B* KE *Komagataella phaffii*

FAIZA NAJLA NUR HANIFAH

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana pada
Program Studi Biologi

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@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 Skripsi : Introduksi Gen Lipase Bakteri Termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus D2B* ke *Komagataella phaffii*

Nama : Faiza Najla Nur Hanifah

NIM : G3401221086

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc.

Pembimbing 2:

Dr. Ivan Permana Putra, S.Si., M.Si.

Diketahui oleh

Ketua Departemen:

Prof. Dr. Ir. Iman Rusmana, M.Si.

NIP. 196507201991031002

Tanggal Ujian: 10 Agustus 2026

Tanggal Lulus:



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan November 2025 sampai bulan Juli 2026. Tema yang diangkat dalam penelitian ini adalah rekayasa genetika untuk pengembangan sistem ekspresi enzim, dengan judul “Introduksi Gen Lipase Bakteri Termofilik *Aneurinibacillus thermoaerophilus* D2B ke *Komagataella phaffii*”.

Penelitian dan penulisan karya ilmiah ini tentunya melibatkan banyak pihak dalam penyempurnaannya. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang terlibat didalamnya. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa syukur karena telah diberi kesehatan, kekuatan dan kesabaran oleh Allah SWT sehingga penulis dapat menuntaskan penelitian dan karya ilmiah ini. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada dosen pembimbing, Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc. selaku pembimbing pertama dan Dr. Ivan Permana Putra S.Si., M.Si. selaku pembimbing kedua yang senantiasa membimbing, memberikan saran ataupun masukan, dukungan serta motivasi selama proses penelitian dan penulisan karya ilmiah ini. Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada Ibu Dr. Kanthi Arum Widayati, S.Si., M.Si. selaku pembimbing akademik, Bapak Muhammad Farhan Aidira, S.T., M.Sc. selaku moderator seminar hasil, Ibu Dr. Maria Ulfah, S.Pt., M.Sc.Agr. selaku penguji pada sidang tugas akhir, Mas Endan dan jajarannya, serta seluruh dosen dan tendik yang telah memberikan ilmunya selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Biologi.

Selain itu, penulis juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada papa, bunda, dan Hafizh atas doa, kasih sayang, dukungan, dan motivasi yang tiada henti kepada penulis. Ucapan terima kasih turut penulis ucapkan kepada kakak-kakak Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia atas saran, bantuan, motivasi, dan semangat selama penulis menjalankan penelitian. Selanjutnya, penulis juga menyampaikan rasa terima kasih kepada Mbak Pepi dan Teh Neneng selaku laboran yang telah banyak membantu penulis selama penelitian. Apresiasi dan rasa terima kasih juga penulis sampaikan kepada Almarhumah Mahira atas semangat dan dukungannya, Jane, Ulung, Anin, Yasmin, Vivi, BioGas, dan teman dekat penulis lainnya yang senantiasa memberikan saran, masukan, motivasi dan dukungan kepada penulis selama proses penelitian dan penulisan karya ilmiah. Rasa terima kasih juga penulis sampaikan kepada keluarga besar Biologi angkatan 59 (Orcinus Aegis) atas kebersamaan serta dukungan yang diberikan selama perkuliahan dan penelitian.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2026

Faiza Najla Nur Hanifah



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	x
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
METODE	3
2.1 Waktu dan Tempat	3
2.2 Alat dan Bahan	3
2.3 Prosedur Kerja	4
2.3.1 Konstruksi Gen <i>d2b</i>	4
2.3.2 Pembuatan Sel Kompeten dan Transformasi ke <i>Escherichia coli</i> DH5α	4
2.3.3 PCR Koloni	5
2.3.4 Pembuatan Sel Kompeten dan transformasi ke <i>Komagataella phaffii</i>	5
2.3.5 Verifikasi Keberhasilan Rekombinasi Gen	5
III HASIL DAN PEMBAHASAN	6
3.1 Hasil	6
3.1.1 Konstruksi Gen <i>d2b</i>	6
3.1.2 Transformasi ke <i>Escherichia coli</i> DH5α	7
3.1.3 PCR Koloni	8
3.1.4 Transformasi ke <i>Komagataella phaffii</i>	8
3.1.5 Verifikasi Keberhasilan Integrasi Gen	10
3.2 Pembahasan	12
3.2.1 Konstruksi Gen <i>d2b</i>	12
3.2.2 Pembuatan Sel Kompeten dan Transformasi ke <i>Escherichia coli</i> DH5α	14
3.2.3 PCR Koloni	16
3.2.4 Pembuatan Sel Kompeten dan Transformasi ke <i>Komagataella phaffii</i>	17
3.2.5 Verifikasi Keberhasilan Integrasi Gen	17
IV SIMPULAN DAN SARAN	19
4.1 Simpulan	19
4.2 Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20





DAFTAR TABEL

1	Sekuen primer untuk verifikasi <i>insert</i>	3
2	Kuantifikasi hasil purifikasi digesti dengan <i>MaestroNano Pro Spectrophotometer</i>	6
3	Hasil transformasi ke <i>Escherichia coli</i> DH5a	7

DAFTAR GAMBAR

1	Elektroforegram	6
2	Transforman <i>Escherichia coli</i> pada media LA+kanamisin 50 µg/mL	7
3	Elektroforegram verifikasi transforman kontrol positif	8
4	Elektroforegram verifikasi transforman positif	8
5	Transforman <i>Komagataella phaffii</i> pada media YPDA+geneticin 250 µg/mL inkubasi 1 jam	9
6	Transforman <i>Komagataella phaffii</i> pada media YPDA+geneticin 250 µg/mL inkubasi 2 jam	10
7	Transforman <i>Komagataella phaffii</i> pada media YPDA+geneticin 250 µg/mL inkubasi 4 jam	10
8	Elektroforegram amplikon isolasi genom klon putatif menggunakan primer AOX1	11
9	Elektroforegram amplikon isolasi genom klon putatif menggunakan kombinasi primer	12
10	Peta amplifikasi pGEM-T_ <i>d2b</i> dengan primer d2b_pPIC9K_ <i>EcoRI</i> _F dan d2b_pPIC9K_ <i>NotI</i> _R	13
11	Simulasi bioinformatik subkloning gen <i>d2b</i> ke pPIC9K menggunakan A dan B	14
12	Situs resistensi kanamisin pada plasmid pPIC9K	15
13	Peta amplifikasi pPIC9K_ <i>d2b</i> dengan primer AOX1-F dan AOX1-R	16
14	Skema integrasi plasmid rekombinan ke dalam <i>Komagataella phaffii</i> .	18
15	Peta amplifikasi genom klon putatif dengan kombinasi primer AOX1 dan d2b_pPIC9K	18

DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi campuran amplifikasi pGEM-T_ <i>d2b</i> dan kondisi PCR	24
2	Perhitungan volume komposisi campuran digesti plasmid	25
3	Perhitungan volume komposisi campuran ligasi	26
4	Peta plasmid pGEM-T	27
5	Peta plasmid pPIC9K	28
6	Peta plasmid pPIC9K rekombinan	29
7	Komposisi campuran PCR koloni dan kondisi PCR koloni	30
8	Perhitungan volume komposisi campuran linearisasi plasmid	31

9	Koloni putatif hasil transformasi <i>Komagataella phaffii</i>	32
10	Komposisi campuran PCR genom klon positif menggunakan primer	33
11	Komposisi campuran PCR genom klon positif menggunakan primer	34
12	Komposisi campuran PCR genom klon positif menggunakan primer	35

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

