

EKSPRESI LIPASE DAN KONSTRUKSI PLASMID UNTUK MUTASI *degQ* DI *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1

PRIMA SALIM WIDI OKTAPIANSYAH



PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
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.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Ekspresi Lipase dan Konstruksi Plasmid untuk Mutasi *degQ* di *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1” 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 2026

Prima Salim Widi Oktapiansyah
G3501231012

RINGKASAN

PRIMA SALIM WIDI OKTAPIANSYAH. Ekspresi Lipase dan Konstruksi Plasmid untuk Mutasi *degQ* di *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO dan ARIS TRI WAHYUDI.

Produksi protein rekombinan sangat dipengaruhi oleh karakteristik inang ekspresi yang digunakan. Salah satu faktor yang dapat membatasi efisiensi produksi adalah keberadaan protease inang yang berpotensi mendegradasi protein rekombinan. *C. sphaeroides* 2.4.1 merupakan bakteri fototrof fakultatif yang berpotensi dikembangkan sebagai inang ekspresi alternatif karena mampu tumbuh pada kondisi aerob maupun anaerob. Namun, kemampuan mengekspresikan protein heterolog dan upaya rekayasa genetik untuk mengurangi pengaruh protease endogen dari inang ini masih memerlukan kajian lebih lanjut. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengevaluasi aktivitas volumetrik *crude extract* dari ekspresi heterolog lipase D2B dan T12 pada *C. sphaeroides* 2.4.1 serta mengonstruksi perangkat genetik untuk inaktivasi gen *degQ* sebagai langkah awal pengembangan galur defisien protease.

Gen penyandi lipase D2B dari *Aneurinibacillus thermoaerophilus* dan T12 dari *Geobacillus stearothermophilus* dikloning ke dalam vektor pRK415 di bawah kendali promotor *lacZ* dan ditransfer ke *C. sphaeroides* 2.4.1 melalui konjugasi triparental. Keberhasilan konstruksi dikonfirmasi menggunakan PCR dan analisis restriksi, sedangkan aktivitas volumetrik *crude extract* lipase dievaluasi pada media agar tributirin dan dikuantifikasi menggunakan substrat *p*-nitrofenil kaprilat. Selain itu, plasmid bunuh diri pSAW (pSUP202_ *degQ*::*sp/sm^R*) dikonstruksi melalui penyisipan kaset *degQ*::*sp/sm^R* ke dalam pSUP202 sebagai perangkat untuk inaktivasi gen *degQ* melalui rekombinasi homolog.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua gen lipase berhasil diekspresikan pada *C. sphaeroides* 2.4.1, dengan lipase T12 secara konsisten memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan D2B. Akan tetapi, aktivitas volumetrik *crude extract* kedua lipase pada *C. sphaeroides* 2.4.1 jauh lebih rendah dibandingkan pada *Escherichia coli* DH5 α , yang menunjukkan bahwa karakteristik inang masih membatasi efisiensi produksi lipase rekombinan. Penelitian ini juga berhasil mengonstruksi plasmid bunuh diri pSAW sebagai perangkat genetik untuk inaktivasi *degQ*. Secara keseluruhan, penelitian ini menunjukkan potensi *C. sphaeroides* 2.4.1 sebagai inang ekspresi alternatif sekaligus menyediakan dasar bagi pengembangan galur defisien protease untuk menunjang peningkatan stabilitas dan efisiensi produksi protein rekombinan di inang alternatif.

Kata kunci: *C. sphaeroides* 2.4.1, *degQ*, ekspresi heterolog lipase, inang defisien protease, pSAW

SUMMARY

PRIMA SALIM WIDI OKTAPIANSYAH. Lipase Expression and Plasmid Construction for *degQ* Mutagenesis in *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1. Supervised by ANTONIUS SUWANTO and ARIS TRI WAHYUDI.

Recombinant protein production is strongly influenced by the characteristics of the expression host. One factor that may limit production efficiency is the presence of host proteases capable of degrading recombinant proteins. *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 is a facultative phototrophic bacterium with potential as an alternative expression host because of its ability to grow under both aerobic and anaerobic conditions. However, its capacity to express heterologous proteins and the feasibility of genetic engineering approaches to mitigate the effects of endogenous host proteases remain to be investigated. Therefore, this study aimed to evaluate the relative performance of heterologously expressed lipases D2B and T12 in *C. sphaeroides* 2.4.1 and to construct a genetic tool for *degQ* inactivation as an initial step toward developing a protease-deficient strain.

The genes encoding lipases D2B from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* and T12 from *Geobacillus stearothermophilus* were cloned into the pRK415 vector under the control of the *lacZ* promoter and introduced into *C. sphaeroides* 2.4.1 via triparental conjugation. Successful construct assembly was confirmed by PCR and restriction analysis. Lipase activity was qualitatively assessed on tributyrin agar and quantitatively determined using *p*-nitrophenyl caprylate as the substrate. In addition, the suicide plasmid pSAW (pSUP202_ *degQ*::*sp/smR*) was constructed by inserting the *degQ*::*sp/smR* cassette into pSUP202 as a genetic tool for *degQ* inactivation through homologous recombination.

Both lipase genes were successfully expressed in *C. sphaeroides* 2.4.1, with T12 consistently exhibiting higher activity than D2B. However, the lipase activities measured from crude enzyme extracts of *C. sphaeroides* 2.4.1 were substantially lower than those observed in *Escherichia coli* DH5 α , indicating that host-specific characteristics may constrain the efficiency of recombinant lipase production. This study also successfully constructed the suicide plasmid pSAW, providing a genetic tool for *degQ* inactivation. Overall, these findings highlight the potential of *C. sphaeroides* 2.4.1 as an alternative expression host and provide a foundation for developing a protease-deficient strain to enhance recombinant protein stability and production efficiency in alternative hosts.

Keywords: *C. sphaeroides* 2.4.1, *degQ*, lipase heterologous expression, protease-deficient host, pSAW



@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



@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.

© 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. merugikan kepentingan 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.

Perpustakaan IPB University

EKSPRESI LIPASE DAN KONSTRUKSI PLASMID UNTUK MUTASI *degQ* DI *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1

PRIMA SALIM WIDI OKTAPIANSYAH

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

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
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.

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tesis:
Dr. Naswandi Nur M.Si.



@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 Tesis : Ekspresi Lipase dan Konstruksi Plasmid untuk Mutasi *degQ* di *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1
Nama : Prima Salim Widi Oktapiansyah
NIM : G3501231012

Disetujui oleh

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

Pembimbing 2:
Prof. Dr. Aris Tri Wahyudi M.Si.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini M.S.
NIP 19620327 198703 2001

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam:
Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si.
NIP. 19780723 200701 1001

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. Sholawat serta salam dihaturkan kepada junjungan alam, Baginda Rasulullah Muhammad Shallallahu 'Alaihi Wasallam. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Januari 2025 sampai bulan Mei 2026 ini ialah ekspresi dan rekayasa genetika bakteri, dengan judul "Ekspresi Lipase dan Konstruksi Mutan *degQ* di *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1".

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc dan Prof. Dr. Aris Tri Wahyudi, M.Si yang telah membimbing dengan sangat baik dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada penguji luar komisi pembimbing yang telah menguji dan memberikan masukan perbaikan atas tesis penulis. Penulis menyampaikan penghargaan kepada RIIM BRIN yang telah memberikan pendanaan untuk riset yang telah dilaksanakan. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada staf Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia yang penulis anggap sebagai mentor dalam hal praktik kerja molekuler (Ramdhan Putrasetya, Noer Syahbani, Titus Trias Trapsila, Elaine Rosalie, Muhammad Mustava) beserta para staf Laboratorium Rekayasa Sel dan Kultur Jaringan Tanaman yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu. Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih untuk Handika Dwi Prasetyo yang telah membantu dalam mengolah dan menganalisis data hasil penelitian serta secara sukarela senantiasa memberikan *insight* dalam hal dunia pendidikan dan riset. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah (Salim), ibu (Euis Kartika), serta seluruh keluarga (Meilani Salim Rakasiwie dan Rissa Salim Gustianeu) yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya.

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

Bogor, Juli 2026

Prima Salim Widi Oktapiansyah



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
1.5 Kebaruan (<i>novelty</i>)	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Lipase	4
2.2 Inang Ekspresi Fotosintetik	4
2.3 Inang Defisien Protease	5
2.4 Protease DegQ	6
2.5 Rekombinasi Homolog untuk <i>Gene Knockout</i>	6
III METODE	8
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	8
3.2 Alat dan Bahan	8
3.3 Prosedur Kerja	8
3.4 Analisis Data	11
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	12
4.1 Konfirmasi Plasmid Rekombinan	12
4.2 Aktivitas Lipase di <i>E. coli</i> DH5α	14
4.3 Konjugasi ke <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1	15
4.4 Aktivitas Volumetrik <i>Crude Extract</i> Lipase di <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1	16
4.5 Karakteristik Pertumbuhan di <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1	18
4.6 Konstruksi pGEMT_ <i>degQ</i> :: <i>sp/sm</i> ^R	19
4.7 Konstruksi pSAW (pSUP202_ <i>degQ</i> :: <i>sp/sm</i> ^R)	20
4.8 Prediksi Genetik Pasca Rekombinasi	21
V SIMPULAN DAN SARAN	22
5.1 Simpulan	22
5.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	27
RIWAYAT HIDUP	30



DAFTAR TABEL

1	Efisiensi transfer plasmid rekombinan ke <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1.	15
---	---	----

DAFTAR GAMBAR

1	Hasil elektroforesis gel agarosa (1%) fragmen DNA	12
2	Konfirmasi plasmid rekombinan pRK415_D2B dan pRK415_T12	13
3	Aktivitas volumetrik <i>crude extract</i> lipase kualitatif (kiri) dan kuantitatif (kanan) pada <i>E. coli</i> DH5 α rekombinan	14
4	Konfirmasi PCR terhadap koloni <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1 rekombinan yang resisten terhadap tetrasiklin	15
5	Aktivitas volumetrik <i>crude extract</i> lipase kualitatif dan kuantitatif pada <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1 rekombinan pada kultivasi aerob maupun anaerob	16
6	Kurva pertumbuhan rekombinan <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1 rekombinan	18
7	Hasil konfirmasi secara PCR dan analisis restriksi terhadap pGEMT_ <i>degQ</i> dan pGEMT_ <i>degQ</i> :: <i>sp/sm</i> ^R	19
8	Konfirmasi plasmid pSAW dengan PCR dan analisis restriksi	20
9	Ilustrasi strategi penggantian alel <i>degQ</i> melalui rekombinasi homolog menggunakan plasmid bunuh diri pSAW	21

DAFTAR LAMPIRAN

1	Plasmid pRK415	27
2	Plasmid pUTmini Tn5 <i>sp/sm</i> ^R	27
3	Plasmid pSUP202	28
4	Anotasi gen <i>degQ</i>	28
5	Kultur <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1	28



@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.