KARAKTERISASI PROTEASE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DAN EKSPRESINYA DI *Escherichia coli*

SISWI SEKAR SARI

BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2023

IPB University
Bogor Indonesia
@Hak cipta milik IPBUniversity
IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
Perpustakaan IPBUniversity

@Hak cipta milik IPBUniversity

IPBUniversity

IPB University
Bogor Indonesia

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniveristy.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Perpustakaan IPBUnivserity

IPB University
Bogor Indonesia

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul Karakterisasi Protease *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan Ekspresinya di *Escherichia coli* adalah benar karya saya bersama komisi 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 dan Badan Riset dan Inovasi Nasional.

Bogor, September 2023

Siswi Sekar Sari
NIM P0501202026

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
© Hak cipta milik IPBUniversity
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

IPB University
Bogor Indonesia

RINGKASAN

SISWI SEKAR SARI. Karakterisasi Protease *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan Ekspresinya di *Escherichia coli*. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO, dan APON ZAENAL MUSTOPA.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (Lac3) merupakan salah satu bakteri yang ditemukan dalam makanan tradisional Indonesia "Dadih". *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* menghasilkan serine protease, yang antara lain dapat digunakan dalam industri makanan dan industri sabun. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi protease yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lac3) serta mengkloning gen penyandi serine protease dari Lac3.

Gen penyandi serine protease dikloning dalam plasmid pGEM-T Easy dengan inang *E. coli* DH5α dan dilakukan subkloning dalam plasmid pET-SUMO dengan inang ekspresi pada *E. coli* BL21(DE3). Ekspresi protein rekombinan dilakukan dengan sejumlah sumber gula (glukosa, laktosa, sukrosa, sorbitol) untuk mendapatkan jumlah gula optimal dalam meningkatkan kepadatan sel. Induksi dilakukan menggunakan *isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* IPTG (0,1, 0,5, 1 mM) dan variasi suhu pasca-induksi (20°C, 25°C, 30°C, 37°C). Hasil ekspresi protein rekombinan dimurnikan menggunakan metode IMAC *(immobilized metal affinity chromathography)* dan hasilnya dikarakterisasi.

Aktivitas protease Lac3 dihambat oleh PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride)* dengan berat molekul 35,5 kDa yang diduga sebagai serine protease. Protein ini termasuk dalam *C-terminal processing peptidase* keluarga S41-peptidase. Gen serine protease Lac3 berhasil diisolasi dan diekspresikan dengan baik dalam *E. coli* dengan induser 0.1 mM IPTG pada suhu 37°C. Serine protease rekombinan dimurnikan menggunakan metode IMAC menghasilkan konsentrasi protein 7,8-7,9 mg/mL dengan aktivitas protease 11,43 U/mL.

Kata Kunci: Ekspresi, Kloning, *Lactococcus lactis*, Purifikasi, Serine protease

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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

©Hak cipta milik IPB University

IPBUniversity

Perpustakaan IPBUniversity

IPB University
Bogor Indonesia
@Hak cipta milik IPBUniversity
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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

SUMMARY

SISWI SEKAR SARI. Characterization of Protease from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and Its Expression in *Escherichia coli*. Supervised by ANTONIUS SUWANTO, and APON ZAENAL MUSTOPA.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (Lac3) is one of the bacteria found in traditional Indonesian food called "Dadih." *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produces serine protease, which can be utilized in the food industry and soap industry, among other applications. This research aims to isolate and characterize the protease produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lac3) and to clone the gene encoding serine protease from Lac3.

The gene encoding serine protease was cloned into the pGEM-T Easy plasmid with *E. coli* DH5α as the host and subsequently subcloned into the pET-SUMO plasmid with an expression host in *E. coli* BL21(DE3). Recombinant protein expression was carried out using various sugar sources (glucose, lactose, sucrose, sorbitol) to determine the optimal sugar source for increasing cell density. Induction was performed using isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at concentrations of 0.1, 0.5, and 1 mM, along with post-induction temperature variations (20°C, 25°C, 30°C, 37°C). The results of recombinant protein expression were purified using the IMAC (immobilized metal affinity chromatography) method and subsequently characterized.

The activity of Lac3 protease is inhibited by PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) with a molecular weight of 35.5 kDa, suspected to be a serine protease. This protein belongs to the S41-peptidase family of C-terminal processing peptidase. The serine protease gene of Lac3 was successfully isolated and expressed well in *E. coli* using 0.1 mM IPTG as the inducer at 37°C. The recombinant serine protease was purified using the IMAC method, resulting in a protein concentration of 7.8-7.9 mg/mL with a protease activity of 11.43 U/mL.

Keywords: Cloning, Expression, *Lactococcus lactis*, Purification, Serine protease

IPB University
Bogor Indonesia
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
Perpustakaan IPBUniversity

© 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 dan BRIN

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB dan BRIN

IPB University
Bogor Indonesia

KARAKTERISASI PROTEASE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DAN EKSPRESINYA DI *Escherichia coli*

SISWI SEKAR SARI

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

BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2023

@Hak cipta milik IPBUniversity
IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
Perpustakaan IPBUniversity

IPB University
Bogor Indonesia
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniveristy.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

Tim Penguji pada Ujian Tesis:
Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si.

Judul Tesis : Karakterisasi Protease *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan Ekspresinya di *Escherichia coli*

Nama : Siswi Sekar Sari

NIM : P0501202026

Disetujui oleh

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

Digitally signed by Antonius Suwanto
Date: 1 Nov 2023 16:43:45 WIB
Verify at diskgn.ipb.ac.id

Pembimbing 2:
Dr. Apon Zaenal Mustopa, M.Si.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.
NIP 1962041919890310

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

Tanggal Ujian:
20 September 2023

Tanggal Lulus: 07 NOV 2023

IPB University
Bogor Indonesia
@Hak cipta milik IPBUniversity
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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
@Hak cipta milik IPB University
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Agustus 2021 ini adalah kloning dan ekspresi gen serine protease, dengan judul "Karakterisasi Protease *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan Ekspresinya di *Escherichia coli*". Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak Almarhum Prof. Dr. Ir. Suharsono, DEA yang digantikan oleh Bapak Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc. sebagai pembimbing pertama, dan Bapak Dr. Apon Zaenal Mustopa, M.Si. selaku pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan kesempatan yang sangat berharga bagi penulis.

Penghargaan turut penulis sampaikan kepada seluruh staff Pusat Riset Bioteknologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong Jawa Barat terkhusus kepada Bapak Apon Zaenal Mustopa, Ibu Nurlaili, Ibu Ai, Ibu Lita, Ibu Arizah, Kak Maritsa, Kak Kiki, Kak Tika yang senantiasa membantu penulis dalam menjalankan kegiatan penelitian. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada rekan se-penelitian Mahasiswa RGTDP (AZM *Squad*). Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada suami penulis Fais Nasrullah yang membantu dan mensuport dalam pelaksanaan penelitian ini, terimakasih pula untuk almarhum anak penulis (Arshaka Nasrullah bin Fais Nasrullah) yang sudah menemani dan berjuang bersama selama 9 bulan dalam kandungan. Ucapan terima kasih penulis tujukan untuk seluruh teman BTK angkatan 57 genap yang memberikan dukungan dan bantuan selama penelitian. Akhirnya ucapan terima kasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada keluarga tercinta, teruntuk mama, bapak, dan adik untuk semua dukungan, semangat dan doa kepada penulis selama menyelesaikan pendidikan magister di IPB. Tulisan ini penulis persembahkan untuk kedua orang tua yang selalu mendukung mimpi-mimpi penulis.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat dan memberikan sumbangsi bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Bogor, September 2023

Siswi Sekar Sari

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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
© Hak cipta milik IPBUniversity
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL vi
DAFTAR GAMBAR vi
DAFTAR LAMPIRAN vii
I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Perumusan Masalah 2
1.3 Tujuan 2
1.4 Manfaat 2
II TINJAUAN PUSTAKA 3
2.1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3
2.2 Serine Protease 4
2.3 *C-terminal processing peptidase* 6
2.4 Kloning dan Ekspresi Gen 6
III METODE 9
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 9
3.2 Alat dan Bahan 9
3.3 Prosedur Penelitian 10
IV HASIL DAN PEMBAHASAN 13
4.1 Kurva Pertumbuhan 13
4.2 Isolasi dan Pemurnian Protease Ekstraseluler *Lactococcus lactis* (Lac3) 14
4.3 Analisis *Cluster* dan Isolasi Gen Penyandi Serine Protease pada *Lactococcus lactis* (Lac3) 16
4.4 Subkloning Gen Penyandi Serine Protease *Lactococcus lactis* (Lac3) pada pET-SUMO 18
4.5 Purifikasi dan Karakterisasi Serine Protease Rekombinan 21
V SIMPULAN 25
5.1 Simpulan 25
DAFTAR PUSTAKA 27
LAMPIRAN 33
RIWAYAT HIDUP 37

IPB University
Bogor Indonesia
@Hak cipta milik IPBUniversity
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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

DAFTAR TABEL

1. Keragaman unit struktur serine peptidase dan mekanisme katalitiknya berdasarkan *database* MEROPS (Page dan Cera 2008) 4
2. Bakteri dan plasmid yang digunakan dalam penelitian 9
3. Aktivitas protease dan konsentrasi protein dari protease ekstraseluler *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lac3) pada suhu 37ºC selama 20 jam inkubasi 14
4. Pengaruh inhibitor, surfaktan, dan ion logam terhadap aktivitas protease 16

DAFTAR GAMBAR

1. Mekanisme pembelahan ikatan peptida oleh peptidase. N,E, dan XH yang masing-masing mewakili nukleofil, elektrofil, dan donor proton (Polgár 2005) 5
2. Peta vektor pengklonan plasmid pGEM-T Easy (Promega, USA) 7
3. Peta vektor ekspresi, plasmid pET-SUMO (Novagen, USA) 7
4. Kurva pertumbuhan OD (*optical density*) dan aktivitas protease dari *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lac3) pada suhu 37ºC 13
5. Profil (A)SDS-PAGE, dan (B) zimogram dari protease *Lactococcus lactis* (Lac3), urutan sampel sebagai berikut: 1= dialisis, 2= fraksi 1, 3= fraksi 2, 4= fraksi 3, 5= fraksi 4, 6= fraksi 5, 7= fraksi 6, dan M=marker 15
6. Analisis gen penyandi serine protease pada metabolit sekunder *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lac3) 17
7. Hasil kloning gen penyandi serine protease dalam plasmid vektor pGEM-T Easy dalam *E. coli* DH5α 18
8. Subkloning gen penyandi serine protease pada vektor pET-SUMO dalam *E. coli* BL21(DE3), (A) peta konstruksi serine protease dalam pET-SUMO; (B) hasil pemotongan tunggal konstruk serine protease dengan SUMO tag menggunakan enzim restriksi *EcoRI* 19
9. Analisis hasil optimasi ekspresi protein rekombinan serine protease fusi, (A) profil *western blot* optimasi induser dan sumber gula. 1: host BL21(DE3); M: penanda berat molekul; 3: tanpa induksi; 4: IPTG 0,1 mM; 5: IPTG 0,5 mM; 6: IPTG 1 mM; 7: 1% glukosa + IPTG 0,1 mM; 8: 1% sukrosa + IPTG 0.1 mM; 9: 1% laktosa + IPTG 0.1 mM; 10: 1% sorbitol + IPTG 0.1 mM; (B) SDS-PAGE hasil optimasi suhu produksi 20
10. Profil SDS-PAGE produksi serine protease rekombinan dengan induksi IPTG 0,1 mM dengan sumber gula 1% glukosa pada suhu 37°C 21
11. Hasil pemurnian serine protease rekombinan ditunjukkan dalam (A) kromatogram pemurnian serine protease menggunakan kromatografi afinitas dengan kolom HisPrep FF 16/10 dalam mesin AKTA; (B) profil SDS-PAGE hasil pemurnian AKTA; M= marker protein; FT= *flow-through*; E= elusi 22

IPB University
Bogor Indonesia

DAFTAR LAMPIRAN

1. Komposisi buffer lisis pH 7,8 33
2. Komposisi gel untuk SDS-PAGE (Putranto et al. 2020) 33
3. Komposisi gel untuk zimogram (Putranto et al. 2020) 33
4. Ragam protease pada metabolit sekunder Lac3 34
5. Analisis blastp serine protease ctg21_4 pada *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lac3) 34
6. Hasil analisis sekuensing gen penyandi serine protease rekombinan pada *E. coli* BL21(DE3) 35
7. Tabel purifikasi protein Lac3 dan protein rekombinan SUMO fusi 35

@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity