

- 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.

TESIS

EKSPRESI GEN LIPASE T1.2RQ DARI *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 PADA *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 MENGGUNAKAN PROMOTOR TERINDUKSI ANAEROBIOSIS

TITUS TRIAS TRAPSILA



**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@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 Gen Lipase T1.2RQ dari *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 pada *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 Menggunakan Promotor Terinduksi Anaerobiosis” 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, November 2025

Titus Trias Trapsila



RINGKASAN

TITUS TRIAS TRAPSILA. Ekspresi Gen Lipase T1.2RQ dari *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 pada *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 Menggunakan Promotor Terinduksi Anaerobiosis. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO dan ARIS TRI WAHYUDI.

Lipase (EC 3.1.1.3) adalah enzim hidrolase yang menjadi komoditas penting dalam industri makanan, industri minyak, pengolahan air limbah, industri kosmetik, industri kulit, hingga deterjen. Permintaan lipase asal mikroba diperkirakan akan mengalami pertumbuhan yang signifikan dalam waktu dekat, karena beragamnya aplikasi pengolahan makanan, sehingga menjadikan enzim lipase sebagai salah satu enzim yang paling dibutuhkan saat ini. Salah satu mikroorganisme penghasil lipase adalah bakteri *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 yang diisolasi dari Pulau Seram, Maluku. Gen yang menyandikan lipase dari strain ini (gen lipase T1.2RQ) sudah berhasil diekspresikan pada sistem inang *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Meskipun demikian, produksi lipase menggunakan inang aerobik konvensional seperti *E. coli* dan *B. subtilis* menghadapi isu skalabilitas dan efektivitas biaya yang signifikan. Tantangan utama adalah tingginya konsumsi energi listrik untuk aerasi dan agitasi yang diperlukan guna mempertahankan kadar oksigen optimal dalam bioreaktor skala besar. Alternatif sel inang yang menjanjikan adalah menggunakan bakteri fotosintetik, seperti *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1. Kemampuan uniknya untuk tumbuh secara anaerobik fotoheterotrof memungkinkan sistem produksi berbasis cahaya sebagai sumber energi, sekaligus mengurangi kebutuhan energi akan aerasi dan agitasi.

Cereibacter sphaeroides 2.4.1 yang termasuk bakteri ungu non-sulfur merupakan organisme inang yang menjanjikan berkat metabolismenya yang serbaguna, memungkinkan pertumbuhan baik dalam kondisi aerobik maupun anaerobik. Kemampuannya yang unik untuk kultur fotoheterotrofik anaerobik—memanfaatkan energi cahaya tanpa oksigen—menawarkan potensi untuk aplikasi bioteknologi berkelanjutan. Lipase T1.2RQ dapat diekspresikan secara heterolog pada *C. sphaeroides* 2.4.1. Namun, sistem inang *C. sphaeroides* 2.4.1 perlu dikembangkan dan dioptimasi. Pengembangan yang dapat dilakukan adalah dengan optimasi ekspresi lipase T1.2RQ pada vektor pRK415 menggunakan promotor *indigenous* dari *C. sphaeroides* yakni *puf*. Penelitian ini dilakukan untuk menguji kelayakan *C. sphaeroides* 2.4.1 sebagai inang untuk ekspresi heterolog gen lipase T1.2RQ dari *G. stearothermophilus* T1.2 menggunakan vektor ekspresi pRK415. Gen lipase T1.2RQ dikloning dan diekspresikan di bawah kendali promotor *puf* (*photosynthetic unit fixed*), yang dapat diinduksi dalam kondisi fotosintesis anaerobik dan aerobik, dan dibandingkan dengan promotor *lac* konvensional.

Metode pertama yang dilakukan adalah konstruksi vektor ekspresi pRK415-*puf* yang dimulai dengan isolasi DNA genom *C. sphaeroides* 2.4.1, diikuti oleh amplifikasi promotor *puf* (459 pb) melalui PCR *High-Fidelity*. Produk PCR ini kemudian dikloning ke vektor pGEMT-*Easy* menggunakan metode TA-Cloning; keberhasilan insersi diverifikasi melalui PCR koloni dan restriksi *EcoRI*. Selanjutnya, fragmen promotor *puf* direstriksi dari pGEMT-*puf* menggunakan enzim *EcoRI* dan diligasasi ke dalam vektor pRK415 yang telah direstriksi dengan enzim yang sama (*EcoRI*) dan difosforilasi untuk mencegah religasi. Hasil ligasi

ini, plasmid pRK415-*puf*, ditransformasikan ke *E. coli* DH5 α dan dikonfirmasi orientasinya menggunakan PCR.

Secara paralel, gen yang menyandikan lipase T1.2RQ diamplifikasi dari plasmid template melalui PCR dan dikloning terlebih dahulu ke dalam vektor pGEMT-*Easy* menggunakan metode TA-Cloning. Setelah keberhasilan insersi diverifikasi, langkah selanjutnya adalah merestriksi gen lipase T1.2RQ dari pGEMT-T1.2RQ menggunakan enzim restriksi *NotI*. Fragmen lipase T1.2RQ ini kemudian diligasikan ke vektor pSL301 yang juga telah direstriksi dengan *NotI*, sehingga menghasilkan plasmid pSL301-T1.2RQ. Integrasi gen lipase ke dalam vektor ekspresi (pRK415-*puf*) merupakan tahapan penentu dalam keberhasilan konstruksi. Untuk itu, fragmen lipase T1.2RQ direstriksi dari pSL301-T1.2RQ dengan restriksi ganda menggunakan *XbaI* dan *HindIII*. Secara simultan, plasmid pRK415-*puf* direstriksi dengan enzim yang sama. Fragmen gen lipase T1.2RQ kemudian diligasikan ke pRK415-*puf* linier untuk menghasilkan plasmid rekombinan akhir: pRK415-*puf*-T1.2RQ. Plasmid ini diverifikasi dengan restriksi ganda dan selanjutnya plasmid ditransfer ke sel inang *C. sphaeroides* 2.4.1 melalui proses konjugasi *triparental mating*, menggunakan *E. coli* HB101_pRK2013 sebagai *helper*, dengan seleksi antibiotik (rifampisin dan tetrasiklin).

Produksi lipase rekombinan dilakukan dalam dua kondisi kultivasi yang berbeda untuk membandingkan efisiensi inang: aerobik heterotrof dan anaerobik fotoheterotrof. Protein diekstrak secara intraseluler melalui pemecahan sel secara ultrasonik. Karakterisasi enzim dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif; SDS-PAGE digunakan untuk mengonfirmasi keberadaan protein, zimogram Native-PAGE dengan substrat tributirin digunakan untuk memverifikasi aktivitas lipolitik fungsional, dan uji spektrofotometri dengan substrat p-nitrophenyl palmitat digunakan untuk mengukur aktivitas spesifik lipase secara kuantitatif.

Plasmid rekombinan (pRK415-*puf*-T1.2RQ) telah berhasil ditransfer ke inang *C. sphaeroides* 2.4.1 melalui konjugasi dengan efisiensi $2,9 \times 10^{-6}$. Uji kualitatif *spot test* menunjukkan bahwa baik *C. sphaeroides* (pRK415-*puf*-T1.2RQ) maupun kontrol positif (*C. sphaeroides* yang mengekspresikan gen lipase T1.2RQ di bawah promotor *lac*) membentuk zona bening pada media LA+tributirin setelah 24 jam, mengonfirmasi aktivitas lipolitik yang berhasil diekspresikan. Sebaliknya, kontrol negatif (*C. sphaeroides* tanpa gen lipase T1.2RQ) tidak membentuk zona bening. Hasil kuantitatif menunjukkan bahwa aktivitas lipase yang dikendalikan oleh promotor *puf* dalam kondisi anaerobik ($4,37 \pm 1,34$ U/mL) secara signifikan lebih tinggi daripada ekspresi yang diatur oleh promotor *lac* ($1,77 \pm 0,16$ U/mL). Sebaliknya, dalam kondisi aerobik, promotor *lac* menghasilkan ekspresi yang jauh lebih tinggi ($10,16 \pm 0,06$ U/mL) bila dibandingkan dengan promotor *puf* ($4,81 \pm 0,11$ U/mL). Analisis protein menggunakan SDS-PAGE dan zimogram mengonfirmasi ekspresi lipase T1.2RQ dengan massa molekul konsisten sekitar 43 kDa. Secara keseluruhan, studi ini menunjukkan bahwa promotor *puf* dapat secara efektif mendorong ekspresi gen heterolog pada *C. sphaeroides*, menyoroti potensinya sebagai sistem regulasi fotoinduksibel untuk pengembangan proses biokatalitik anaerobik dan aplikasi biosintesis berbasis cahaya lainnya.

Kata kunci: *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1, ekspresi anaerobik, lipase T1.2RQ, pRK415, promotor *puf*



SUMMARY

TITUS TRIAS TRAPSILA. Expression of Lipase T1.2RQ Gene from *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 in *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 Using Anaerobiosis-Inducible Promoter. Supervised by ANTONIUS SUWANTO, and ARIS TRI WAHYUDI.

Lipase (EC 3.1.1.3) is a hydrolase enzyme that is an important commodity in the food industry, oil industry, wastewater treatment, cosmetics industry, leather industry, and detergents. Demand for microbial lipase is expected to experience significant growth in the near future, due to the variety of food processing applications, making lipase one of the most needed enzymes today. One of the microorganisms that produces lipase is bacteria. *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 isolated from Seram Island, Maluku. The T1.2RQ lipase gene has been successfully expressed in the *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* host systems. However, lipase production uses a host *E. coli* and *B. subtilis* has certain challenges, such as the high cost of organic carbon substrates. An attractive alternative host cell is to use photosynthetic bacteria, such as *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 due to its ability to photosynthesize. The use of photosynthetic hosts can offer a more cost-effective production system by utilizing light as an energy source for growth and reducing reliance on expensive organic carbon sources as the primary substrate.

Cereibacter sphaeroides 2.4.1, which belongs to the non-sulfur purple bacteria, is a promising host organism due to its versatile metabolism, allowing growth under both aerobic and anaerobic conditions. Its unique ability for anaerobic photoheterotrophic culture—harnessing light energy in the absence of oxygen—offers potential for sustainable biotechnological applications. Lipase T1.2RQ can be expressed heterologously in *C. sphaeroides* 2.4.1. However, the host system of *C. sphaeroides* 2.4.1 needs to be developed and optimized. One possible development is optimizing the expression of T1.2RQ lipase in the pRK415 vector using the indigenous promoter from *C. sphaeroides* namely *puf*. This research was conducted to test the feasibility of *C. Sphaeroides* 2.4.1 as a host for heterologous expression of the lipase gene T1.2RQ from *G. stearothermophilus* T1.2 using the pRK415 expression vector. The T1.2RQ lipase gene was cloned and expressed under the control of the *puf* (photosynthetic unit fixed) promoter, which can be induced under anaerobic and aerobic photosynthetic conditions, and compared with conventional *lac* promoter.

The first method used was the construction of the pRK415-*puf* expression vector which begins with the isolation of genomic DNA of *C. sphaeroides* 2.4.1, followed by amplification of *puf* promoter (459 bp) via PCR. This PCR product was then cloned into the pGEMT-Easy vector using the TA-Cloning method; successful insertion was verified through colony PCR and restriction *EcoRI*. Next, the promoter fragment of *puf* was restricted from pGEMT-*puf* using enzymes of *EcoRI* and ligated into the pRK415 vector which has been restricted with the same enzyme (*EcoRI*) and dephosphorylated to prevent religation. The result of this ligation, the plasmid pRK415-*puf*, transformed to *E. coli* DH5α and its orientation was confirmed using PCR.

In parallel, the gene encoding the T1.2RQ lipase was amplified from the template plasmid by PCR and cloned first into the pGEMT-Easy vector using the

TA-Cloning method. After successful insertion was verified, the next step was to restrict the T1.2RQ lipase gene from pGEMT-T1.2RQ using the restriction enzyme of *NotI*. The T1.2RQ lipase fragment was then ligated into the pSL301 vector which had also been restricted with *NotI*, resulting in plasmid pSL301-T1.2RQ. Integration of the lipase gene into the expression vector (pRK415-*puf*) is a crucial step in the success of the construction. For this purpose, the T1.2RQ lipase fragment was restricted from pSL301-T1.2RQ by double restriction using *XbaI* and *HindIII*. Simultaneously, plasmid pRK415-*puf* was restricted with the same enzyme. The T1.2RQ lipase gene fragment was then ligated into pRK415-*puf* linearly to produce the final recombinant plasmid: pRK415-*puf*-T1.2RQ. This plasmid was verified by double restriction and then the plasmid was transferred into the host cell of *C. sphaeroides* 2.4.1 through the triparental mating conjugation, using *E. coli* HB101_pRK2013 as a helper, with antibiotic selection (rifampicin and tetracycline). Recombinant lipase production was carried out under two different cultivation conditions to compare host efficiency: aerobic heterotrophs and anaerobic photoheterotrophs. Protein was extracted intracellularly by ultrasonic cell disruption. Enzyme characterization was performed qualitatively and quantitatively; SDS-PAGE was used to confirm the presence of protein, Native-PAGE zymogram with tributyrin substrate was used to verify functional lipolytic activity, and spectrophotometric assay with p-nitrophenyl palmitate substrate was used to measure specific lipase activity quantitatively.

Recombinant plasmid (pRK415-*puf*-T1.2RQ) has been successfully transferred to the host *C. sphaeroides* 2.4.1 via conjugation with an efficiency of 2.9×10^{-6} . Qualitative test (spot test) shows that *C. sphaeroides* (pRK415-*puf*-T1.2RQ) and positive control (*C. sphaeroides* which expresses the lipase gene T1.2RQ under the *lac* promoter) formed a clear zone in LA+tributyrin media after 24 hours, confirming successful lipolytic activity. In contrast, the negative control (*C. sphaeroides* without the lipase gene T1.2RQ) did not form a clear zone. Quantitative results showed that the lipase activity controlled by the *puf* promoter under anaerobic conditions (4.37 ± 1.34 U/mL) was significantly higher than the expression regulated by the *lac* promoter (1.77 ± 0.16 U/mL). In contrast, under aerobic conditions, the *lac* promoter resulted in significantly higher expression (10.16 ± 0.06 U/mL) when compared to the *puf* promoter (4.81 ± 0.11 U/mL). Protein analysis using SDS-PAGE and zymogram confirmed the expression of T1.2RQ lipase with a consistent molecular mass of approximately 43 kDa. Overall, this study indicates that the *puf* promoter can effectively induce heterologous gene expression in *C. sphaeroides*, highlighting its potential as a photoinducible regulatory system for the development of anaerobic biocatalytic processes and other light-based biosynthesis applications.

Keywords: Anaerobic expression, *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1, lipase T1.2RQ, pRK415, *puf* promoter

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 2025
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.

**EKSPRESI GEN LIPASE T1.2RQ DARI *Geobacillus*
stearothermophilus T1.2 PADA *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1
MENGUNAKAN PROMOTOR TERINDUKSI
ANAEROBIOSIS**

TITUS TRIAS TRAPSILA

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
2025**



@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:

1. Dr. Naswandi Nur, M.Si.

Judul Tesis : Ekspresi Gen Lipase T1.2RQ dari *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 pada *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 Menggunakan Promotor Terinduksi Anaerobiosis

Nama : Titus Trias Trapsila

NIM : G3501231023

Disetujui oleh

Pembimbing 1

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



Digitally signed by:
Antonius Suwanto
Date: 13 Dec 2025 08:53:50 WIB
Verify at [dsign.ipb.ac.id](#)

Pembimbing 2

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



Digitally signed by:
Aris Tri Wahyudi
Date: 12 Dec 2025 17:13:46 WIB
Verify at [dsign.ipb.ac.id](#)

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S.

NIP 196203271987032001



Digitally signed by:
Anja Meryandini
Date: 15 Dec 2025 09:27:36 WIB
Verify at [dsign.ipb.ac.id](#)

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam:

Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si.

NIP 197807232007011001



Digitally signed by:
Berry Juliandi
Date: 15 Dec 2025 09:27:36 WIB
Verify at [dsign.ipb.ac.id](#)

Tanggal Ujian: 3 Desember 2025

Tanggal pengesahan:



@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.

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 ini adalah Rekayasa Genetika Mikroba, dengan judul “Ekspresi Gen Lipase T1.2RQ dari *Geobacillus stearothermophilus* T1.2 pada *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 Menggunakan Promotor Terinduksi Anaerobiosis”.

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 dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ketua Program Studi Mikrobiologi Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S., sekretaris Program Studi Mikrobiologi Dr. Rika Indri Astuti, S.Si., M.Si., dan seluruh dosen pengajar di Program Studi Mikrobiologi. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah, ibu, serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Kak Gris dari Universitas Katolik Atma Jaya serta rekan-rekan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia yakni Kak Ramdhan, Mba Dayu, Prima, Bani, Elaine, Kak Yogi, dan Mustava yang telah ikut membantu dan memberi saran bagi penulis untuk menyelesaikan tesis ini.

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

Bogor, November 2025

Titus Trias Trapsila



DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Struktur Lipase	4
2.2 Reaksi yang Dikatalisis Lipase	5
2.2.1 Reaksi Hidrolisis	5
2.2.2 Reaksi Esterifikasi	5
2.2.3 Reaksi Aminolisis	6
2.2.4 Reaksi Transesterifikasi	6
2.3 Aplikasi Lipase dalam Industri	6
2.3.1 Biodiesel	6
2.3.2 Industri Makanan	7
2.3.3 Industri <i>Flavour</i> dan Produk Susu	7
2.3.4 Industri Deterjen	8
2.4 Promotor Operon <i>puf</i>	8
2.5 Ekspresi Heterolog Lipase T1.2RQ	9
METODE PENELITIAN	10
3.1 Waktu dan Tempat	10
3.2 Alat dan Bahan	10
3.3 Prosedur Penelitian	11
3.3.1 Isolasi Promotor <i>puf</i>	11
3.3.2 Kloning Promotor <i>puf</i> ke pGEMT-Easy Vector	12
3.3.3 Kloning Promotor <i>puf</i> ke pRK415	13
3.3.4 Kloning Gen Lipase T1.2RQ ke pGEMT-Easy Vector	14
3.3.5 Kloning Gen Lipase T1.2RQ ke pSL301	15
3.3.6 Kloning Gen Lipase T1.2RQ ke pRK415- <i>puf</i>	15
3.3.7 Konjugasi <i>E. coli</i> DH5α ke <i>Cereibacter sphaeroides</i> 2.4.1	16
3.3.8 Produksi Lipase Rekombinan	17
3.3.9 SDS-PAGE dan Zimogram	17
3.3.10 Uji Aktivitas Lipase	18
HASIL	19
4.1 Kloning Promotor <i>puf</i> ke pGEMT-Easy Vector	19
4.2 Kloning Promotor <i>puf</i> ke pRK415	19
4.3 Kloning Gen Lipase T1.2RQ ke pGEMT-Easy Vector	20
4.4 Kloning Gen Lipase T1.2RQ ke pSL301	20

4.5	Kloning Gen Lipase T1.2RQ ke pRK415- <i>puf</i>	21
4.6	Konjugasi <i>E. coli</i> DH5 ke <i>Cereibacter sphaeroides</i> 2.4.1	21
4.7	Uji Aktivitas Lipase Rekombinan	23
V	PEMBAHASAN	25
VI	SIMPULAN DAN SARAN	29
6.1	Simpulan	29
6.2	Saran	29
	DAFTAR PUSTAKA	30

- 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 TABEL

1	Daftar primer yang digunakan dalam penelitian	11
2	Efisiensi transkonjugasi ke <i>C. Sphaeroides</i> 2.4.1	22
3	Aktivitas lipase rekombinan	24

DAFTAR GAMBAR

1	Lipatan α/β -hidrolase; Heliks α diwakili oleh spiral dan untaian β ditandai dengan panah	4
2	Mekanisme hidrolitik triasilgliserol oleh lipase	5
3	Mekanisme reaksi esterifikasi oleh lipase	5
4	Mekanisme Aminolisis oleh lipase	6
5	Mekanisme transesterifikasi trigliserida	6
6	Diagram operon <i>puf</i> <i>Cereibacter sphaeroides</i>	9
7	Wilayah promotor <i>puf</i> yang diamplifikasi dari genom <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1	11
8	Diagram plasmid pRK415- <i>puf</i>	13
9	Diagram plasmid pRK415- <i>puf</i> -T1.2RQ	16
10	Restriksi <i>EcoRI</i> pGEMT- <i>puf</i>	19
11	Restriksi pRK415- <i>puf</i>	19
12	Restriksi pGEMT-T1.2RQ	20
13	Restriksi pSL301-T1.2RQ	20
14	Restriksi pRK415- <i>puf</i> -T1.2RQ	21
15	PCR koloni <i>C. sphaeroides</i> resisten tetrasiklin. A) <i>C. sphaeroides</i> (pRK415- <i>puf</i> -T1.2RQ) dan B) <i>C. sphaeroides</i> (pRK415- <i>puf</i>)	22
16	<i>Spot test</i> bakteri pada media LB agar+tributirin+tetrasiklin. (1&2) <i>C. sphaeroides</i> (pRK415- <i>puf</i> -T1.2RQ). (K+) <i>C. sphaeroides</i> (pRK415- <i>lac</i> -T1.2RQ). (K-) <i>C.sphaeroides</i> (pRK415- <i>puf</i>)	23
17	SDS-PAGE dan zimogram ekstrak kasar intraseluler lipase T1.2RQ. A) Ekspresi anaerobik B) Ekspresi aerobik	24

DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi media Sistrof's Minimal Medium (SMM)	39
2	Perbedaan kondisi kultur produksi lipase oleh <i>C. sphaeroides</i> 2.4.1.A) Kondisi kultur aerobik heterotrof dan B) Kondisi kultur anaerobik fotoheterotrof	40

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.