



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	ii
<b>PERNYATAAN</b>	iii
<b>PRAKATA</b>	iv
<b>DAFTAR PUBLIKASI DAN SEMINAR</b>	vi
<b>DAFTAR ISI</b>	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	x
<b>DAFTAR TABEL</b>	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b>	xiv
<b>INTISARI</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	1
I.1 Latar Belakang Penelitian	1
I.2 Tujuan Penelitian	5
I.3 Manfaat Penelitian	6
I.4 Keaslian dan Kebaruan Penelitian	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN PERUMUSAN HIPOTESIS</b>	11
II.1 Tinjauan Pustaka	11
II.1.1 Bakteri <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	11
II.1.2 Gen pengkode lipase	12
II.1.3 Lipase dengan karakter <i>ATP Binding Cassette</i> (ABC) transporter	15
II.1.4 Reaksi kimia terkatalisis lipase dan aplikasinya	17
II.1.5 Amplifikasi DNA dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	20
II.1.6 Karakterisasi gen lipase dengan metode sekuensing DNA	24
II.1.7 Kloning dan overekspresi dari dna rekombinan lipase mikroba	26
II.1.8 Analisis homologi dan struktur protein lipase	30
II.2 Perumusan Hipotesis dan Rancangan Penelitian	33
II.2.1 Perumusan hipotesis 1	33
II.2.2 Perumusan hipotesis 2	33
II.2.3 Perumusan hipotesis 3	33
II.2.4 Perumusan hipotesis 4	34
II.2.5 Rancangan penelitian	34
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	37
III.1 Bahan-bahan Penelitian	37
III.2 Alat-alat Penelitian	38



III.3	Prosedur Penelitian	38
III.3.1	Pembuatan pereaksi	38
III.3.2	Peremajaan kultur bakteri <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	40
III.3.3	Isolasi DNA genomik <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	41
III.3.4	Amplifikasi gen lipase <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	42
III.3.5	Purifikasi hasil amplifikasi DNA	43
III.3.6	Pembiakkan <i>E. coli</i> kompeten	44
III.3.7	Kloning gen lipase dengan vektor pGEM-T ke dalam <i>E. coli</i> JM109	43
III.3.8	Isolasi DNA plasmid	45
III.3.9	Konstruksi hasil DNA rekombinan gen lipase ke dalam vektor pQE-30	46
III.3.10	Kloning gen lipase dalam vektor ekspresi (pQE-30/Lipeks) dalam <i>E. coli</i> M15[pREP4]	47
III.3.11	Overekspresi gen lipase pQE-30/LipJG3	47
III.3.12	Analisis protein dengan elektroforesis SDS-PAGE	48
III.3.13	Penentuan aktivitas lipase JG3 dalam reaksi hidrolisis	49
III.3.14	Studi homologi dan struktur protein lipase JG3 berbasis komputer	50
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	51
IV.1	Amplifikasi Gen Lipase	51
IV.1.1	Isolasi DNA	51
IV.1.2	Amplifikasi DNA lipase dengan PCR	52
IV.1.3	Amplifikasi dengan primer internal	55
IV.2	Kloning Gen Lipase	56
IV.2.1	Pembiakkan sel kompeten <i>E. coli</i>	56
IV.2.2	Ligasi lipase JG3 dengan vektor pGEM-T dan transformasi ke dalam <i>E. coli</i> JM109	57
IV.2.3	Isolasi plasmid pGEM-T/LipJG3	60
IV.2.4	Sekuensing DNA lipase JG3	60
IV.3	Overekspresi Lipase JG3	68
IV.3.1	Konstruksi plasmid rekombinan pQE-30/Lipeks	68
IV.3.2	Overekspresi lipase JG3	72
IV.4	Uji Aktivitas Lipase Hasil Ekspresi	73
IV.4.1	Isolasi dan pemurnian lipase hasil overekspresi	73
IV.4.2	Analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap lipase hasil ekspresi	75
IV.4.3	Aktivitas lipase JG3 pada reaksi hidrolisis	79



IV.5	Analisis Urutan Nukleotida dan Asam Amino dari Lipase JG3	81
IV.5.1	Analisis homologi asam amino	81
IV.5.2	Prediksi struktur sekunder dari lipase JG3	84
IV.5.3	Prediksi struktur tersier dari lipase JG3	86
IV.5.4	Analisis situs katalitik dari lipase JG3	92
<b>BAB V</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	96
V.1	Kesimpulan	96
V.2	Saran	96
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	98
	<b>LAMPIRAN</b>	113
	<b>PUBLIKASI ILMIAH</b>	139

## DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Sel bakteri <i>Alcaligenes</i> sp. JG3 yang diamati dengan <i>Scanning Electron Microscope</i>	11
Gambar II.2	Kurva pertumbuhan <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	12
Gambar II.3	Representasi molekul enzim lipase	13
Gambar II.4	Ilustrasi mekanisme reaksi hidrolisis dan transesterifikasi dengan katalis lipase	14
Gambar II.5	Struktur sekunder dari lipatan $\alpha/\beta$ hydrolase, $\alpha$ -helix direpresentasikan oleh silinder putih dan $\beta$ -strand oleh panah abu-abu	15
Gambar II.6	Reaksi (a) lipase non-spesifik dan (b) reaksi lipase 1-3 regiospesifik	18
Gambar II.7	Tahapan proses amplifikasi dengan PCR	21
Gambar II.8	Plasmid pada sel bakteri	27
Gambar II.9	Proses pembentukan DNA rekombinan	28
Gambar II.10	Struktur lipase dari <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> (a) prediksi situs katalitik tiga serangkai (b) prediksi struktur 3-D lipase	32
Gambar II.11	Skema penelitian	36
Gambar IV.1	Visualisasi gel elektroforesis isolat DNA <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	52
Gambar IV.2	Posisi urutan nukleotida primer Fjg3 dan Rjg3 pada gen lipase <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> NCIB 8687	53
Gambar IV.3	Visualisasi hasil elektroforesis dari (a) amplifikasi DNA LipJG3, (b) Ekstraksi gel dari DNA LipJG3	54
Gambar IV.4	Visualisasi hasil amplifikasi antara primer Fi dan Rjg3 (A), antara primer Fjg3 dan Ri (B) serta DNA marker (M)	55
Gambar IV.5	Hasil kloning pGEM-T/LipJG3, dimana koloni putih merupakan klon positif pembawa gen LipJG3 dan koloni biru merupakan klon negatif	58
Gambar IV.6	Ilustrasi mekanisme skrining biru-putih dengan IPTG dan X-Gal	59
Gambar IV.7	Visualisasi isolat plasmid pGEM-T/LipJG3 (+) dan DNA marker (M)	61
Gambar IV.8	Hasil translasi dari analisis sekuensing gen lipase JG3, warna biru: kodon start (ORF), warna hijau: kodon stop, dan warna ungu adalah daerah gen fungsional (diapit antara kodon start dan stop)	63
Gambar IV.9	Urutan nukleotida gen lipase dari <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	64
Gambar IV.10	Hasil pensejajaran urutan nukleotida gen lipase <i>Alcaligenes</i> sp. JG3 (jg3) dan gen lipase <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> NCIB 8687 (fae).	65



Gambar IV.11	Hasil pensejajaran antara nukleotida lipase JG3 dengan lipase BDB4	68
Gambar.IV.12	Bagan plasmid pQE-30	68
Gambar IV.13	Visualisai gel elektroforesis (a) hasil amplifikasi Lipeks, (b) hasil pemotongan enzimatis pGEM-T/Lipeks dan DNA marker (M)	70
Gambar IV.14	Visualisasi vektor pQE (a) sebelum dilakukan pemotongan enzimatis dan (b) setelah dilakukan pemotongan enzimatis	71
Gambar.IV.15	Skema pemotongan enzimatis dan ligasi antara pQE-30 dengan Lipeks (warna kuning) menghasilkan rekombinan pQE-30/Lipeks	71
Gambar IV.16	Koloni <i>E. coli</i> M15[pREP4] hasil transformasi pQE30-Lipeks	72
Gambar IV.17	Visualisasi pemotongan pQE-30/Lipeks dengan <i>Gel Documentation System</i> ; puncak 1 adalah pQE-30 dan puncak 2 adalah DNA Lipeks (b)	73
Gambar IV.18	Interaksi antara matriks pengkhelat dengan ion Ni <sup>2+</sup> (a) dan interaksi antara residu 6xHis dengan matriks Ni-NTA (b)	75
Gambar IV.19	Visualisai analisis SDS-PAGE	77
Gambar IV.20	Skema proses kuantifikasi protein menggunakan metode BCA	78
Gambar IV.21	Reaksi hidrolisis dari minyak (a) dan reaksi perubahan warna pada titrasi asam lemak dengan NaOH (b)	80
Gambar IV.22	Urutan asam amino dari lipase <i>Alcaligenes sp. JG3</i>	82
Gambar IV.23	Pensejajaran urutan asam amino lipase dari <i>Alcaligenes sp. JG3</i> dan persentasenya terhadap lipase dari <i>Alcaligenes faecalis</i> (HCA17200.1) 93,6%, lipase dari <i>Alcaligenes faecalis</i> BDB4 (ASC91593.1) 96,91% dan ABC transporter dari <i>Alcaligenes faecalis</i> (WP_083053668.1) 96,91%.	84
Gambar IV.24	Identifikasi residu struktural dan fungsional dari LipJG3	85
Gambar IV.25	Prediksi struktur sekunder dari protein LipJG3	86
Gambar IV.26	Prediksi jumlah domain dalam protein LipJG3	87
Gambar IV.27	Model stuktur 3-D dari lipase JG3	89
Gambar IV.28	Diagram Ramachandran model 3-dimensi lipase JG3 untuk nilai C tertinggi	91
Gambar IV.29	Pensejajaran urutan asam amino dari lipase <i>Alcaligenes sp. JG3</i> (JG3) terhadap lipase ABC transporter dari <i>Serratia marcescens</i> (Ser) dan lipase dari <i>Alcaligenes faecalis</i> (Fae)	94



## DAFTAR TABEL

Tabel I.1	Studi terdahulu yang mendukung kebaruan penelitian	8
Tabel II.1	Profil biokimia lipase dari berbagai bakteri	16
Tabel II.2	Famili dari enzim lipolitik	31
Tabel IV.1	Karakteristik pasangan primer internal	55
Tabel IV.2	Rangkuman prediksi berat molekul dari lipase JG3 berbasarkan prediksi ORF	62
Tabel IV.3	Luaran hasil analisis urutan nukleotida lipase JG3 dengan BLASTn	66
Tabel IV.4	Karakteristik pasangan primer ekspresi	69
Tabel IV.5	Hasil perhitungan konsentrasi residu protein hasil pemurnian	79
Tabel IV.6	Rangkuman aktivitas lipase hasil pemurnian terhadap reaksi hidrolisis	79
Tabel IV.7	Luaran hasil analisis urutan asam amino lipase JG3 dengan BLASTp	83
Tabel IV.8	Daftar sepuluh besar struktur analog dari PDB terhadap Lipase JG3	89
Tabel IV.9	Rangkuman hasil analisis diagram Ramachandran untuk kelima model 3-dimensi lipase JG3 luaran dari I-TASSER	92



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Perhitungan Konsentrasi Isolat DNA <i>Alcaligenes</i> sp. JG3	111
Lampiran 2	Perhitungan Efisiensi Transformasi	111
Lampiran 3	Elektroferogram Hasil Analisis Sekuensing	112
Lampiran 4	Urutan Nukleotida Hasil Analisis Sekuensing	115
Lampiran 5	Urutan Nukleotida Gen Pengkode Lipase dari Bakteri <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> NCIB 8687	116
Lampiran 6	Hasil Translasi Urutan Nukleotida Lipase JG3 dengan ExPASy	118
Lampiran 7	Hasil Pemotongan Enzim Restriksi Nukleotida Lipase JG3 dengan <i>Restriction Mapper</i>	121
Lampiran 8	Perhitungan Konsentrasi Isolat Protein Hasil Overekspresi	126
Lampiran 9	Perhitungan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik dari Hidrolisis oleh Lipase JG3	127
Lampiran 10	Prediksi Model Struktur 3-Dimensi Protein Lipase JG3 oleh I-TASSER	129
Lampiran 11	Diagram Ramachandran Hasil Prediksi Model-Model Struktur 3-Dimensi Lipase JG3 dari I-TASSER	132