

**SELEKSI TRANSFORMAN BAKTERI *Streptomyces thermoviolaceus*  
HASIL REKAYASA GENETIKA PENGHASIL ENZIM LIPASE**

**SKRIPSI**



**UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A**

**Disusun oleh:**

**Humayra Qurrata Aini**

**NIM: H91219046**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL  
SURABAYA**

**2023**

## PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Humayra Qurrata Aini

NIM : H91219046

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2019

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penelitian skripsi saya yang berjudul "SELEKSI TRANSFORMAN BAKTERI *Streptomyces thermoviolaceus* HASIL REKAYASA GENETIKA PENGHASIL ENZIM LIPASE". Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 06 April 2023  
Yang menyatakan,

  
Humayra Qurrata Aini  
NIM. H91219046

**HALAMAN PERSETUJUAN**

Skripsi

Seleksi Transforman Bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* Hasil Rekayasa  
Genetika Penghasil Enzim Lipase

Diajukan oleh:

Humayra Qurrata Aini

NIM: H91219046

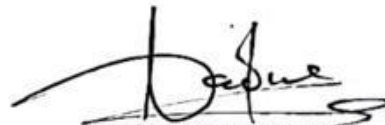
Telah diperiksa dan disetujui  
di Surabaya, 06 April 2023

Dosen Pembimbing Utama



Saiku Rokhim, M.KKK.  
NIP. 198612212014031001

Dosen Pembimbing Pendamping



Yuanita Rachmawati, M.Sc.  
NIP. 198808192019032009

**LEMBAR PENGESAHAN**

Skripsi Humayra Qurrata Aini ini telah dipertahankan  
di depan tim penguji skripsi  
di Surabaya, 13 April 2023

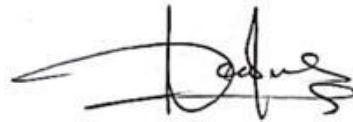
Mengesahkan,  
Dewan Penguji

Penguji I



Saiku Rokhim, M.KKK.  
NIP. 198612212014031001

Penguji II



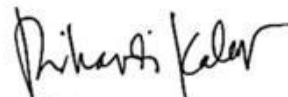
Yuanita Rachmawati, M.Sc.  
NIP. 198808192019032009

Penguji III



Esti Tyastirin, M.KM.  
NIP. 198706242014032001


Penguji IV



Prihardi Kahar, Ph.D.  
NIP. -

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi  
Sunan Ampel Surabaya



  
Supul Hamdani, M.Pd.  
NIP. 198507312000031002



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA  
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300  
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : HUMAYRA QURRATA AINI  
NIM : H91219046  
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI / BIOLOGI  
E-mail address : humayraqurrata@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Sekripsi  Tesis  Desertasi  Lain-lain (.....)

yang berjudul :

Seleksi Transformasi Bakteri Streptomyces thermotolerans Hasil  
Rekayasa Genetika Penghasil Enzim Lipase

berserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya,

Penulis

(Humayra Qurata Aini )

## ABSTRAK

### SELEKSI TRANSFORMAN BAKTERI *Streptomyces thermoviolaceus* HASIL REKAYASA GENETIKA PENGHASIL ENZIM LIPASE

Enzim merupakan protein kompleks yang diproduksi oleh organisme. Enzim lipase berperan sebagai penghidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak, dan gliserol. Salah satu mikroorganisme penghasil enzim lipase yaitu *Streptomyces thermoviolaceus*. Teknik rekayasa genetika yang dapat dilakukan adalah modifikasi genetik untuk mengoptimalkan jalur produksi protein dan menambahkan gen heterologous ke bakteri untuk produksi enzim yang efektif. *Streptomyces* termasuk sebagai bakteri termofilik sehingga enzim yang dihasilkan juga berfungsi dengan baik walaupun berada dalam kondisi suhu ekstrem. Tahap transformasi genetik meliputi seleksi terhadap sel-sel transforman yang memiliki tujuan untuk pemisahan sel transforman dari sel yang non transforman sehingga produksi enzim akan lebih efektif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberhasilan seleksi transforman *Streptomyces thermoviolaceus* dan aktivitas enzim lipase yang diproduksi. Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimental laboratorium. Metode seleksi transforman menggunakan antibiotik Apramisin, Kanamisin, dan Asam Nalidiksik sebagai agen penyeleksi. Sedangkan, uji aktivitas enzim menggunakan *p*-nitrophenyl butyrate sebagai substrat. Hasil seleksi transforman pada 4 sampel yaitu sampel 6, 8, 14, dan 15 berhasil dilakukan, sehingga dapat dikonfirmasi bahwa tahap transformasi sukses. Aktivitas enzim lipase tertinggi Bakteri rekombinan *Streptomyces thermoviolaceus* diperoleh sampel 15 pada masa inkubasi 24 jam sebesar 8,29 U/ml. Sedangkan, aktivitas enzim terendah diperoleh sampel 8 pada masa inkubasi 16 jam sebesar 1,14 U/ml.

**Kata kunci:** seleksi transforman, *Streptomyces thermoviolaceus*, rekayasa genetika enzim lipase, aktivitas enzim,

## ABSTRACT

### TRANSFORMANT SELECTION OF GENETICALLY ENGINEERED BACTERIA *Streptomyces thermoviolaceus* TO PRODUCE LIPASE ENZYME

Enzymes are complex proteins produced by organisms. The lipase enzyme acts as a hydrolyzer of triglycerides into diglycerides, monoglycerides, fatty acids, and glycerol. *Streptomyces thermoviolaceus* is one of the microorganisms that produce lipase enzyme. Genetic engineering techniques that can be carried out are genetic modifications to optimize protein production pathways and add heterologous genes to bacteria for effective enzyme production. *Streptomyces* is classified as a thermophilic bacteria therefore, the enzymes it produces also function properly even under extreme temperature conditions. The genetic transformation stage includes the selection of transformant cells with the aim of separating transformed cells from non-transformed cells to make enzyme production more effective. This study aims to undergo selection of *Streptomyces thermoviolaceus* transformants and the activity of the lipase enzymes produced. The research method used was laboratory experimental. The transformant selection used the antibiotics Apramycin, Kanamycin, and Nalidixic Acid as selection agents. Meanwhile, the enzyme activity test used p-nitrophenyl butyrate as a substrate. The results of the selection of transformants on 4 samples, namely samples 6, 8, 14, and 15 were successfully carried out, therefore it can be confirmed that the transformation stage was successful. The highest lipase activity of recombinant bacteria *Streptomyces thermoviolaceus* was obtained by sample 15 during the 24 hour incubation period resulting 8.29 U/ml enzyme activity. Meanwhile, the lowest enzyme activity was obtained in sample 8 at 16 hours of incubation period resulting 1.14 U/ml of enzyme activity.

**Key words:** transformant selection, *Streptomyces thermoviolaceus*, genetic engineering, lipase, enzyme activity.



## DAFTAR ISI

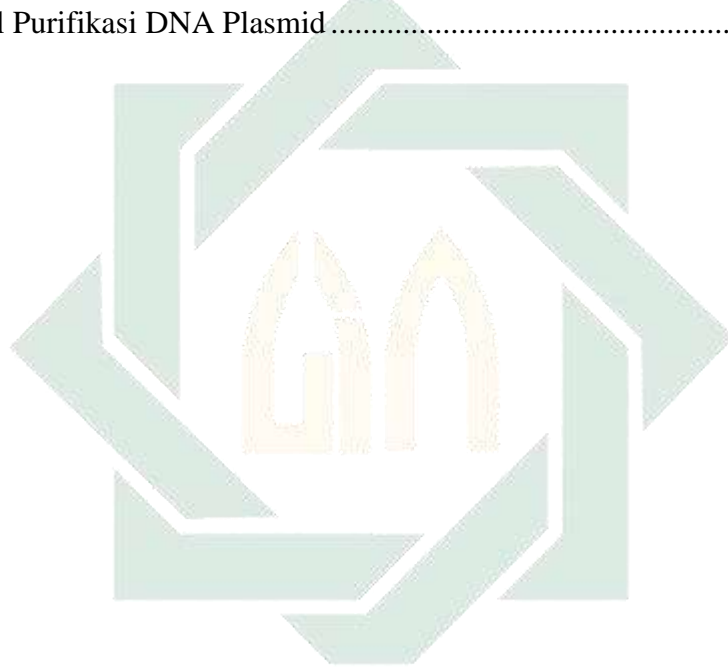
Halaman Sampul .....	i
Halaman Judul.....	ii
Lembar Persetujuan.....	iii
Lembar Pengesahan .....	iv
Lembar Pernyataan Keaslian Karya Ilmiah .....	vi
Motto .....	vii
Halaman Persembahan .....	ix
Abstrak .....	x
Kata Pengantar .....	xi
Daftar Isi.....	xiii
Daftar Tabel .....	xv
Daftar Gambar.....	xvi
Daftar Lampiran .....	xvii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	8
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
1.5 Batasan Masalah.....	8
1.6 Hipotesis Penelitian.....	9
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	10
2.1 Lipase .....	10
2.1.1 Pengertian Enzim Lipase.....	10
2.1.2 Klasifikasi Enzim Lipase .....	11
2.1.3 Sumber Enzim Lipase .....	12
2.1.4 Fungsi dan Aplikasi Enzim Lipase .....	13
2.2 Bakteri Termofilik.....	14
2.2.1 Pengertian Bakteri Termofilik.....	14
2.2.2 Klasifikasi Bakteri Termofilik .....	15
2.2.3 Bakteri Menurut Al-Qur'an.....	16
2.3 Bakteri <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> .....	17
2.3.1 Karakteristik Bakteri <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> .....	17
2.3.2 Klasifikasi <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> .....	18
2.3.3 Manfaat Bakteri Rekombinan dalam Produksi Enzim.....	19
2.4 Rekayasa Genetika Bakteri .....	20
2.5 Seleksi Transforman Bakteri dalam Transformasi Genetik.....	22
2.5.1 Syarat Seleksi Transforman .....	22
2.5.2 Faktor yang Mempengaruhi Transformasi.....	22
2.6 Aktivitas Enzim Lipase .....	23
2.6.1 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi dan Aktivitas Enzim.....	23
2.6.2 Penentuan Aktivitas Enzim Lipase .....	25





## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Waktu Penelitian .....	28
Tabel 3.2 Sekuen Primer untuk Konfirmasi Plasmid Rekombinan pada Bakteri <i>S. thermoviolaceus</i> .....	30
Tabel 3.3 PCR Mix Konfirmasi Plasmid .....	33
Tabel 3.4 PCR Mix Tahap Koloni PCR Hasil Kultur E.Coli .....	35
Tabel 3.5 PCR Mix Tahap Konfirmasi Koloni Melalui PCR .....	39
Tabel 4.1 Hasil Seleksi Transforman Konfirmasi Plasmid.....	50
Tabel 4.2 Hasil Purifikasi DNA Plasmid .....	54



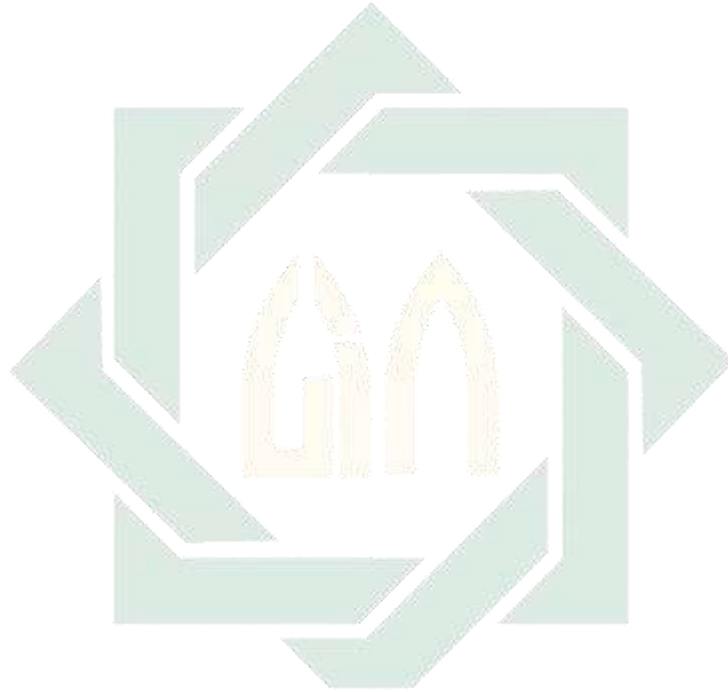
UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Proses Hidrolisis Triglisiril Menjadi Asam Lemak dan Gliserol	10
Gambar 2.2 Pengamatan Morfologi <i>Streptomyces</i> sp. Menggunakan SEM....	18
Gambar 2.3 Pengamatan SEM <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> yang Ditumbuhkan pada Media Oatmeal Agar .....	19
Gambar 3.1 Kerangka Operasional Penelitian .....	31
Gambar 3.2 Kurva Kalibrasi PNP Uji Aktivitas Enzim Lipase .....	42
Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis PCR Sampel 6 & 14 .....	45
Gambar 4.2 Hasil Elektroforesis PCR Sampel 15 .....	46
Gambar 4.3 Gen <i>Insert</i> (PCR) dan <i>Template Cut</i> .....	47
Gambar 4.4 Proses Ligasi Antara Gen <i>Insert</i> dengan <i>Template Cut</i> (vektor) .	47
Gambar 4.5 Tahap Kultur E.Coli Mengandung Plasmid pada Media LB.....	49
Gambar 4.6 Hasil Elektroforesis PCR Koloni Sampel 6 .....	52
Gambar 4.7 Hasil Elektroforesis PCR Koloni Sampel 14 .....	52
Gambar 4.8 Hasil Elektroforesis PCR Koloni Sampel 15 .....	52
Gambar 4.9 Hasil <i>Alignment</i> Sekuensing Sampel 6.....	56
Gambar 4.10 Hasil <i>Alignment</i> Sekuensing Sampel 14.....	56
Gambar 4.11 Hasil <i>Alignment</i> Sekuensing Sampel 15.....	57
Gambar 4.12 Hasil Transformasi Plasmid pTYM18-esterase ke <i>E. coli</i> HST04 .....	58
Gambar 4.13 Seleksi Transforman HST04 + JM109.....	59
Gambar 4.14 Hasil Elektroforesis PCR Koloni Sampel 8 dan 14.....	60
Gambar 4.15 Hasil Elektroforesis PCR Koloni Sampel 6 dan 15.....	61
Gambar 4.16 Seleksi Transforman Tahap Konjugasi ke Bakteri <i>Streptomyces</i> <i>thermoviolaceus</i> pada Media ISP4 .....	62
Gambar 4.17 Kolonisasi Bakteri <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> .....	64
Gambar 4.18 Hasil SDS-PAGE Sampel 8 dan 14. ....	66
Gambar 4.19 Hasil SDS-PAGE Sampel 6 dan 15 .....	67
Gambar 4.20 Hasil Uji Aktivitas Enzim .....	70

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Two Way ANOVA .....	91
Lampiran 2 Dokumentasi Tahap Pra-Kultur dan Kultur.....	92



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim didefinisikan sebagai biokatalis dalam reaksi biokimia. Enzim merupakan protein kompleks yang diproduksi oleh organisme. Peran enzim sebagai katalisator telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri, farmasi, dan bioteknologi. Berbagai kelebihan enzim dibandingkan katalisator lainnya yaitu menghasilkan produk yang spesifik sesuai target sehingga mencegah reaksi yang tidak diinginkan (Borrelli & Trono, 2015). Salah satu enzim yang efektif digunakan sebagai biokatalis adalah enzim lipase (Zahan & Kano, 2018).

Enzim lipase merupakan salah satu enzim yang sering diaplikasikan dalam bidang industri. Enzim lipase dinobatkan sebagai enzim komersil tertinggi di dunia mengikuti protease. Hal ini karena cabang industri pengguna enzim lipase yang bervariasi seperti makanan, biodiesel, detergent hingga pemanfaatan bioremediasi (Borrelli & Trono, 2015). Enzim lipase atau *triacylglycerol acyl hydrolase* yang bekerja pada ikatan ester karboksilat adalah bagian dari hidrolase. Enzim lipase berperan sebagai penghidrolisis. Trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak, dan gliserol (Chandra *et al.*, 2020). Aktivitas yang dimiliki oleh enzim lipase yaitu mampu menghidrolisis lemak dan minyak. Hal ini dibuktikan dengan proses hidrolisis 1  $\mu\text{mol}$  asam lemak bebas per menit oleh setiap satu unit per mL (U/mL) enzim lipase. Kondisi optimum enzim lipase dapat diperoleh dengan pengukuran aktivitas enzim pada suhu dan pH yang dimodifikasi. Berbagai metode digunakan untuk menguji aktivitas enzim lipase, seperti metode tensiometri, *interfacial*, kromatografi, titrimetric, konduktometri, dan spektrofotometri (Fatimah, 2021).







(Shivlata & Satyanarayana, 2015). *Streptomyces* adalah salah satu genus bakteri di bawah actinomycetes yang memiliki peran penting dalam industri bioteknologi dan medis. *Streptomyces* merupakan bakteri aerobik sekaligus bakteri gram positif berfilamen yang mampu menghasilkan enzim ekstraseluler (Sevillano *et al.*, 2016). Bakteri ini merupakan bakteri saprofit tanah non-patogen. Berdasarkan data genomik, bakteri *Streptomyces* mengkode sekitar 50-80 gen yang diduga sebagai enzim lipolitik (Boran *et al.*, 2019).

Strain bakteri *Streptomyces* dikenal memiliki aktivitas lipolitik yang tinggi, namun genus ini kurang diteliti secara intensif dibandingkan genus bakteri lainnya. Lipase yang telah dikarakterisasi berasal dari *Streptomyces exfoliatus* dan *Streptomyces albus* (Magda *et al.*, 2012). *Streptomyces* termasuk sebagai bakteri termofilik sehingga enzim yang dihasilkan juga berfungsi dengan baik walaupun berada dalam kondisi suhu ekstrem. Bakteri termofilik seperti *Streptomyces* dapat bekerja pada suhu yang relatif tinggi sekitar 40 hingga 80°C (Shivlata & Satyanarayana, 2015). Kemampuan termofilik ini menjadi kelebihan yang dimiliki *Streptomyces* karena dapat mempercepat kadar pertumbuhan sehingga terjadi penghematan biaya dalam proses Industri (James & Edwards, 1988). Salah satu strain bakteri *Streptomyces* yaitu *Streptomyces thermoviolaceus* yang merupakan Streptomycetes yang tahan temperature tinggi (*thermotolerant*). *S. thermoviolaceus* biasanya tumbuh pada suhu sekitar 25-57°C. Bakteri *S. thermoviolaceus* dikenal sebagai penghasil enzim ekstraseluler dan antibiotic. Produksi enzim ekstraseluler dipengaruhi oleh faktor seperti suhu, kadar pertumbuhan (*growth rate*), dan substrat yang digunakan (Brabban & Edwards, 1997).

Walaupun bakteri mampu menghasilkan berbagai protein termasuk enzim secara alami. Namun, produksi protein heterologous dalam bakteri sering terhambat oleh berbagai faktor seperti rendahnya produksi, kerusakan protein, serta aktivitas enzim yang rendah. Rekayasa genetika menjadi solusi untuk mengatasi hambatan-hambatan tersebut dengan meningkatkan produksi protein heterologous. Teknik rekayasa genetika yang dapat dilakukan adalah modifikasi genetik untuk mengoptimalkan jalur produksi protein dan menambahkan gen heterologous ke bakteri. Semakin meningkat produksi protein heterologous, maka produksi enzim industri dapat dihasilkan dengan lebih cepat dan efisien. Contoh pengaplikasian teknik ini yaitu pada bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (Lee, *et al*, 2018). Rekayasa genetika pada bakteri dapat menjadi alternatif yang efektif untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi. Salah satu metode yang digunakan yaitu PCR berbasis kesalahan untuk membuat variasi acak pada gen enzim dan menghasilkan mutan-mutan yang mempunyai aktivitas lebih tinggi dari enzim asli (Kang, *et al*, 2018).

Produksi enzim dari bakteri rekombinan merupakan salah satu contoh proses rekayasa genetika yang melibatkan berbagai tahap. Beberapa tahapan dalam produksi enzim lipase rekombinan yaitu kloning DNA gen, tahap ekspresi protein, fermentasi atau produksi enzim, dan purifikasi protein (Contesini *et al.*, 2020). Menurut (Contesini *et al.*, 2020), produksi enzim yang tinggi dari bakteri seperti *Streptomyces* dapat dihasilkan dengan mengaplikasikan teknologi rekombinan. Hal ini dapat dilakukan dengan cara menyisipkan *copy* gen pada inang melalui plasmid yang mengandung gen lipase. Proses ini juga biasa disebut dengan *Genetic Modification* yang meliputi beberapa tahapan seperti

kloning gen dalam vektor yang mempunyai penanda spesifik (*plasmid construction*), tahapan transformasi plasmid ke strain inang, dan tahapan ekspresi gen dengan kehadiran inducer ataupun promotor. Teknologi rekombinan DNA ini telah terbukti meningkatkan kualitas produk enzim yang ingin dihasilkan, baik digunakan dalam bidang akademik maupun industri. Seleksi transforman merupakan tahapan penting dalam rekayasa genetika produksi enzim lipase, Tahap transformasi genetik meliputi seleksi terhadap sel-sel transforman. Tahap seleksi transforman memiliki tujuan untuk pemisahan sel transforman dari sel yang non transforman sehingga produksi enzim akan lebih efektif (Aisyah & Anggraito, 2015).

Seleksi transforman secara *in vitro* biasa dilakukan menggunakan agen seleksi berupa antibiotik. Beberapa jenis antibiotik yang sering digunakan sebagai agen seleksi yaitu ampisilin, apramisin, dan kanamisin. Mekanisme seleksi transforman terjadi dengan menyisipkan gen resistensi antibiotik *marker* ke dalam vektor ekspresi. Gen penanda seleksi yang juga mengkode enzim mampu mendetoksifikasi antibiotik dengan cara fosforilasi gugus hidroksil dari antibiotik. Dalam penelitian produksi enzim, antibiotik yang sering digunakan yaitu apramisin dan kanamisin. Beberapa contoh vektor yang memiliki gen resistensi kanamisin yaitu pG10-90 dan p35SGUSintnptII untuk transformasi *Agrobacterium* (Aisyah & Anggraito, 2015). Setelah proses seleksi transforman, gen penyandi enzim harus diekspresikan pada sel inang seperti *Escherichia coli* sebelum akhirnya diproduksi pada strain bakteri target. *Escherichia coli* merupakan bakteri yang sering digunakan untuk ekspresi protein rekombinan. Seleksi transforman juga bertujuan untuk memastikan gen target penyandi enzim

yang diinginkan telah berhasil ditransformasikan ke bakteri (Masfuroh *et al.*, 2017).

Penelitian terdahulu yang meneliti terkait aktivitas optimum enzim rekombinan yang berasal dari mikroorganisme masih terbilang sedikit dan jarang dilakukan terutama di Indonesia. Namun, terdapat beberapa penelitian internasional yang berhasil menjalankan penelitian ini. Menurut penelitian oleh Ragel (2018), yang menggunakan mikroba *Rhizopus oryzae* rekombinan, mendapatkan hasil aktivitas enzim yang optimal pada suhu 30-40°C dibandingkan dengan suhu 50°C pada masa inkubasi 10 jam masing-masing. Sementara, penelitian lainnya yang menggunakan mikroorganisme *Pseudomonas fluorescens* mendapat hasil optimal pada suhu 70°C, 80°C, dan 90°C (W. Liu *et al.*, 2017). Selain suhu, faktor masa inkubasi juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Penelitian oleh Murtius, Hari and Putri (2022), menunjukkan bahwa masa inkubasi enzim optimal adalah pada 30 jam, jika dibandingkan dengan 15, 20, 25, dan 35 jam.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah;

- a. Bagaimana hasil seleksi transforman bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* hasil rekayasa genetika penghasil enzim lipase?
- b. Bagaimana perbandingan nilai aktivitas enzim Lipase pada variasi masa inkubasi dari rekombinan *Streptomyces thermoviolaceus*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan pada penelitian ini adalah;

- a. Untuk mengetahui hasil seleksi transforman bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* hasil rekayasa genetika penghasil enzim lipase.
- b. Untuk mengetahui perbandingan nilai aktivitas enzim Lipase pada variasi masa inkubasi dari rekombinan *Streptomyces thermoviolaceus*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Apabila penelitian ini menunjukkan bahwa seleksi transforman berhasil dan enzim lipase hasil rekayasa genetika dapat diproduksi, maka:

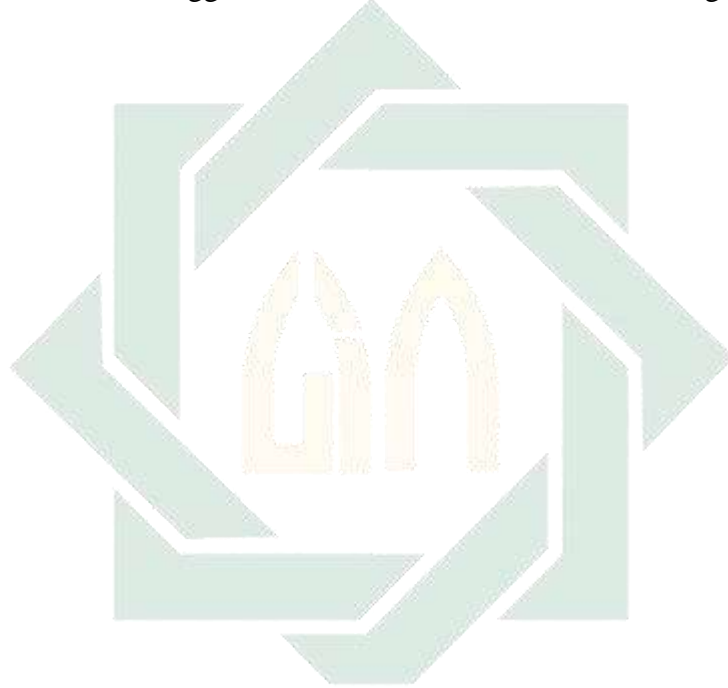
- a. Berpotensi untuk menjadi rujukan teoritis penelitian transformasi enzim rekombinan.
- b. Teknologi yang digunakan dapat diterapkan dalam bidang industri dan aplikatif.
- c. Berpotensi untuk dihasilkan paten.

### 1.5 Batasan Masalah

- a. Strain *Streptomyces* yang digunakan pada penelitian ini dipilih dari *NITE Biological Resource Center (NBRC)* di *National Institute of Technology and Evaluation*, Jepang yaitu *Streptomyces thermoviolaceus* NBRC 13905.
- b. Penelitian ini merupakan tahapan lanjut berupa konfirmasi transforman dari penelitian sebelumnya (konstruksi gen dan desain primer), sehingga pada penelitian ini tidak dilakukan desain primer maupun konstruksi gen.
- c. Sampel tahap konfirmasi plasmid meliputi 3 sampel yaitu sampel 6, 14, dan 15. Sementara, sampel tahap transformasi terdiri atas 4 sampel, dengan tambahan sampel 8 dari peneliti sebelumnya.

### 1.6 Hipotesis Penelitian

- a. Seleksi transforman yang tumbuh koloni menandakan keberhasilan proses transformasi *Streptomyces thermoviolaceus* rekombinan.
- b. Semakin lama masa inkubasi enzim Lipase maka semakin banyak produk yang dihasilkan, sehingga nilai aktivitas enzim semakin meningkat.



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A





*Bacillus pyocyaneus*, *B. prodigiosus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Pseudomonas fluorescens*. Lipase dihasilkan secara tradisional melalui pancreas hewan. Namun, pada saat ini dapat dihasilkan oleh mikroorganisme dalam bentuk *crude* atau bahkan murni. Oleh karena itu, enzim lipase banyak digunakan sebagai biokatalisator dalam proses sintesis senyawa kimia (Chandra *et al.*, 2020).

### **2.1.2 Klasifikasi Lipase**

Enzim dapat diklasifikasi berdasarkan karakteristik tertentu yang dimiliki. Menurut López-Fernández, Benaiges and Valero, (2020), pada dasarnya enzim lipase dapat diklasifikasi berdasarkan dua hal yaitu spesifisitas dan sumbernya. Klasifikasi enzim berdasarkan spesifisitas dapat dibagi menjadi tiga jenis. Pertama, lipase spesifik substrat yang mampu bereaksi pada substrat spesifik apabila dicampurkan dengan bahan mentah. Kedua, lipase enansioselektif yang mampu menghidrolisis secara cepat salah satu isomer dibanding isomer lainnya. Ketiga, lipase regioselektif yang memiliki aktivitas berdasarkan posisi khusus dan dapat dibagi menjadi tiga subkelas yaitu lipase non-spesifik, lipase spesifik asam lemak, dan lipase spesifik 1,3. Lipase spesifik asam lemak berfungsi dalam menghidrolisis ikatan ester yang mengandung asam lemak berantai panjang.

Sementara, klasifikasi enzim lipase berdasarkan sumbernya dibagi menjadi empat kelompok yaitu lipase bersumber dari hewan, tumbuhan, serangga, dan mikroorganisme. Lipase bersumber dari mikroba dapat ditemukan pada khamir, bakteri, dan fungi. Enzim lipase yang berasal dari mikroba juga terbukti memiliki karakteristik yang unggul dibandingkan dari

sumber lainnya. Antaranya yaitu, stabilitas tinggi, tidak memiliki syarat kofaktor, selektivitas kimia, dan selektivitas enansio (López-Fernández *et al.*, 2020).

### 2.1.3 Sumber Enzim Lipase

Enzim lipase dapat ditemukan di berbagai sumber seperti hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Lipase dari tumbuhan terdapat pada berbagai jenis tanaman seperti biji, gandum, buah, dan daun. Namun, lipase bersumber dari biji diketahui memiliki kemampuan hidrolisis lebih baik dibandingkan pada bagian tumbuhan yang lain. Lipase berasal dari tumbuhan memiliki keuntungan seperti lebih stabil pada proses interesterifikasi dan biaya produksi yang rendah. Sedangkan, lipase bersumber dari hewan umumnya berasal dari pankreas babi, domba, sapi, dan manusia. Kekurangan lipase bersumber dari hewan yaitu enzim yang tidak murni sehingga proses ekstraksi dan purifikasi yang sulit untuk mendapatkan produk hasil (Santos *et al.*, 2022).

Sumber produksi lipase terbanyak didapatkan dari mikroorganisme, contohnya bakteri, fungi, archea, dan eukariot. Lipase bersumber dari fungi sering digunakan dalam bidang industri karena berbagai keuntungan dibandingkan lipase dari sumber lainnya (Patel *et al.*, 2018). Lipase berasal dari mikroba juga dimanfaatkan secara luas di bidang bioteknologi karena modifikasi genetik mikroba yang cenderung mudah serta menghasilkan produk enzim dengan jumlah maksimal, lipase yang berstabilitas tinggi, memiliki kemampuan untuk mentolerir pelarut organik (Santos *et al.*, 2022). Salah satu lipase mikroba yang sering digunakan yaitu lipase dari bakteri. Lipase bersumber dari bakteri pertama kali ditemukan pada tahun 1901 pada *Bacillus*

*prodigiosus* dan *B. fluorescens*. Kebanyakan lipase dari bakteri bersifat *thermostable* atau tahan panas dan sebagian lipase bakteri diketahui bersifat tidak spesifik pada spesifisitas substrat. Beberapa spesies lipase bakteri yang sering digunakan adalah *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., dan *Arthrobacter* sp. (Chandra *et al.*, 2020).

#### **2.1.4 Fungsi dan Aplikasi Enzim Lipase**

Permintaan akan enzim lipase diprediksikan meningkat dalam 5 tahun ini. Berbagai reaksi yang dikatalisis oleh enzim lipase mampu diterapkan sebagai biokatalisis baik dalam aplikasi bioteknologi maupun industri seperti industri makanan melalui degradasi triasilgliserol yang dapat menghasilkan produk makanan ramah pencernaan. Selain itu, penggunaan enzim lipase dalam produksi detergen dapat membantu menghilangkan noda lemak pada kain pabrik. Enzim lipase juga semakin marak dimanfaatkan melalui reaksi sintetik untuk produksi biodiesel. Hal ini karena enzim lipase memiliki kemampuan mengkatalisis proses transesterifikasi minyak sayur dan alkohol (Contesini *et al.*, 2020).

Pemanfaatan enzim lipase dalam industri makanan sudah lama digunakan. Enzim lipase dimanfaatkan dalam proses penyaringan minyak dan menghilangkan asam lemak bebas (FFAs) sehingga kualitas minyak dapat ditingkatkan dengan modifikasi. Enzim lipase juga digunakan untuk meningkatkan rasa dalam makanan. Contohnya, penggunaan lipase dalam industri susu yang mampu menghidrolisis lemak susu sehingga meningkatkan kualitas rasa dan nutrisi produk susu. Selain industri makanan, lipase juga digunakan secara luas dalam industri medis. Lipase yang merupakan enzim

dasar memiliki peran besar dalam proses metabolisme lemak. Enzim lipase juga dianggap sebagai target obat dan biomarker yang efektif. Hal ini dibuktikan dengan kemampuan enzim lipase dalam memproduksi asam lemak tidak jenuh (Yao *et al.*, 2021).

Salah satu industri yang memanfaatkan enzim lipase secara maksimal yaitu industri *biofuel*. *Biofuel* merupakan energi terbarukan sebagai alternatif bahan bakar. Selama ini, produksi biodiesel hanya bergantung pada lemak hewan dan minyak sayuran seperti biomassa. Biodiesel diproduksi dari asam lemak monoester yang dihasilkan oleh proses transesterifikasi dari triasilgliserol. Menurut penelitian oleh Karmee, Patria and Lin, (2015), enzim lipase yang berasal dari mikroorganisme mampu mengkonversi methanol dan limbah minyak menjadi biodiesel dan gliserol (Yao *et al.*, 2021).

## **2.2 Bakteri Termofilik**

### **2.2.1 Pengertian Bakteri Termofilik**

Biokatalis atau biasa dikenal dengan enzim semakin diperlukan saat ini, terutama enzim yang bersifat stabil pada kondisi lingkungan ekstrem dan enzim yang berpotensi untuk mempercepat reaksi kimia konvensional. Solusi untuk mengatasi kebutuhan tinggi akan enzim ini dapat diatasi dengan memanfaatkan enzim dihasilkan oleh mikroorganisme ekstremofilik yang memiliki sifat resisten terhadap kondisi ekstrem, mampu melakukan reaksi pada kondisi pH asam maupun basa, serta pada suhu tinggi mencapai 140°C. Mikroorganisme termofilik merupakan salah satu sumber enzim yang tahan terhadap habitat ekstrem dengan kadar pH yang sangat asam maupun basa, suhu yang tinggi, kelembapan rendah, dan tekanan yang tinggi. Bakteri

termofilik dapat menghasilkan berbagai jenis enzim, antaranya yaitu selulase, xilanase, pektinase, kitinase, amilase, protease, esterase, dan lipase. (Ovando-Chacon *et al.*, 2020).

Pada umumnya, bakteri termofilik dapat ditemukan di sumber mata air panas yang dekat dengan gunung berapi. Selain itu, habitat bakteri termofilik juga berada di lapisan atas tanah dan lingkungan bersuhu panas seperti area *composting* (Ovando-Chacon *et al.*, 2020). Struktur genomik bakteri termofilik, salah satunya kandungan GC merupakan hal penting dalam penentuan stabilitas genom. Kandungan GC yang tinggi menghasilkan termostabilitas genom yang tinggi dan berpengaruh pada *Optimal Growth Rate* (OGT). Contohnya, kandungan GC pada *Thermus thermophilus* ATTC yaitu 69,41%, *Geobacillus kaustophilus* sebanyak 52,1%, dan *Thermus* sp. sebanyak 68,8% (Wang *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Klasifikasi Bakteri Termofilik**

Pada umumnya, bakteri termofilik dapat dikategorikan menjadi 2 kelompok yaitu bakteri termofilik obligatif dan fakultatif. Bakteri termofilik obligatif memiliki suhu optimal untuk hidup pada suhu  $>50^{\circ}\text{C}$  dan bahkan mencapai  $70^{\circ}\text{C}$ . Sedangkan, Bakteri fakultatif mampu berkembang dengan optimal pada suhu sekitar  $50\text{-}66^{\circ}\text{C}$  dan beberapa pada suhu  $<38^{\circ}\text{C}$ . Oleh karena itu, bakteri termofilik sering dijumpai pada lingkungan yang terpapar sinar matahari seperti sumber mata air panas dan tanah *compost* (Agustina *et al.*, 2019). Menurut Mohammad *et al.*, (2017), bakteri termofilik dapat dikategorikan berdasarkan *Optical Growth Temperature* (OGT) yaitu



ukuran lebih kecil dibandingkan nyamuk yaitu bakteri (Romadan, 2020). Menurut ahli tafsir, Ahmad Mustafa al-Maraghi, makna tersebut membuktikan keberadaan mikroorganisme termasuk bakteri sebagai makhluk ciptaan Allah yang sangat kecil (N. Saputra, 2021).

### **2.3 Bakteri *Streptomyces thermoviolaceus***

#### **2.3.1 Karakteristik Bakteri *Streptomyces thermoviolaceus***

*Streptomyces* merupakan bakteri gram positif yang memiliki kandungan GC yang tinggi dan mampu berkembang pada berbagai kondisi lingkungan. *Streptomyces* memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa antibakteri, antifungi, dan mendegradasi polisakarida seperti kitin dan xilan melalui sekresi enzim ekstraseluler (ITIS, 1957). Pada umumnya, *Streptomyces* dapat diketahui dari karakteristik fisiologi maupun morfologi, serta komposisi kimia dinding sel, jenis peptidoglikan, fosfolipid, asam lemak, persentase GC, 16 SrRNA, dan analisis DNA. *Streptomyces* adalah genus terbesar Actinobakteri. Jumlah spesies bakteri *Streptomyces* yang telah ditemukan oleh ilmuwan sampai saat ini diperkirakan mencapai 500 spesies (Hasani *et al.*, 2014).

*Streptomyces* memiliki karakteristik *chemoorganotrophic* yang berarti memerlukan sumber karbon. *Streptomyces* juga merupakan bakteri gram positif berfilamen yang berukuran kecil yaitu berdiameter kurang dari 1µm. Fragmentasi filamen membentuk spora yang lurus, berlekuk, dan spiral. Sedangkan, koloni bakteri *Streptomyces* cenderung tumbuh lambat dan bertekstur seperti miselium. Miselium akan mulai berdiferensiasi membentuk sel tipe baru, yaitu hifa. Kemudian, hifa tersebut akan mengalami pembelahan







mampu mendegradasi substrat organik kompleks. Proses sekresi ini mampu mencegah ekspresi protein rekombinan yang berlebihan dan mengurangi kadar toksisitas sel inang, Selain itu, *Streptomyces* tumbuh relatif cepat, pada media yang harganya terjangkau, tidak menghasilkan endotoksin dan *pylogenic lipopolysaccharide*, bersifat non-patogenik, dan mampu mengekspresi gen Guanin dan Sitosin tanpa optimasi codon. Oleh karena itu, *Streptomyces* dianggap sebagai strain yang kokoh dalam bidang industri, sehingga berbagai metode modifikasi genetik *Streptomyces* mulai tersedia untuk menghasilkan *Streptomyces* rekombinan yang berkualitas (Berini *et al.*, 2020b).

Berbagai penelitian mengenai produksi enzim lipase rekombinan telah dilakukan oleh para peneliti. Penelitian oleh Khurana *et al.*, (2015), menemukan bahwa gen lipase rekombinan yang berasal dari *Bacillus* sp. menghasilkan aktivitas optimal pada suhu 35°C dan pH 8.0. Penelitian oleh Kaur (2017), menyiasati beberapa faktor yang dapat berpengaruh pada produksi lipase rekombinan seperti variasi sel inang, vektor, dan nutrisi media. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan produksi enzim lipase didapatkan dengan adanya pemilihan sel inang, vektor ekspresi, dan media yang tepat pada masa inkubasi atau fermentasi enzim.

#### **2.4 Rekayasa Genetika Bakteri**

Berbagai metode telah dikembangkan untuk meningkatkan produktivitas mikroorganisme dalam bidang industri. *Genetic* atau *Metabolic Engineering* merupakan salah satu teknik yang bertujuan untuk memaksimalkan produk hasil dari mikroorganisme industri. Modifikasi genetik dilakukan melalui teknologi DNA rekombinan untuk mendapatkan

produk hasil yang maksimal. Rekayasa Genetik terdiri dari berbagai tahap menggunakan alat yang dapat dimodifikasi sesuai keperluan peneliti sehingga mampu menargetkan perubahan genetik. Pada umumnya, rekayasa genetika meliputi tahapan; 1) pemilihan metode transfer gen, sel inang untuk ekspresi, dan metode untuk ekspresi gen biosintetik; 2) kloning dan sekuensing gen biosintetik; 3) penentuan teknik rekayasa yang tepat untuk menghasilkan bioproduk yang diharapkan (Bekker *et al.*, 2014).

Menurut Berini, Marinelli and Binda, (2020), metode biologi molekular seperti sintesis gen, sekuens DNA/RNA, teknik kloning DNA fragment berkontribusi dalam menghasilkan berbagai bakteri rekombinan yang dapat memproduksi protein dan senyawa molekular yang bersumber dari mikroorganisme seperti bakteri, jamur, archaea, eukariot, dan lainnya. Rekayasa genetika pada mikroorganisme menggunakan alat genetika untuk memutuskan, memotong, dan menyambungkan gen target kepada sel baru. Gen rekombinan tersebut ditransfer ke sel inang untuk proses ekspresi sehingga dapat menghasilkan produk yang diinginkan. *Genetically Modified Bacteria* dapat dikonstruksi dengan 2 tahapan utama yaitu tahap akuisisi gen target dan tahap ekspresi heterogen. Proses modifikasi gen berfragmen kecil (<10kb) dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu PCR konvensional, DNA sintesis, dan penggunaan enzim restriksi. Hal ini berbeda untuk gen berfragmen besar (>50kb) yang menggunakan metode rekombinan seperti CRISPR-Cas9 atau Red/ET. Secara umum, rekayasa genetika bakteri seperti konstruksi plasmid meliputi tahapan kloning gen, purifikasi gen, ligase, sekuensing, dan transformasi.

## 2.5 Seleksi Transforman Bakteri dalam Transformasi Genetik

### 2.5.1 Syarat Seleksi Transforman

Seleksi transforman yang efisien merupakan tahap penting yang menentukan keberhasilan transformasi genetik. Oleh karena itu, perlu adanya seleksi pra transformasi sehingga proses transformasi dan proses seleksi pasca transformasi bisa dilakukan dengan mudah dan efisien. Syarat utama seleksi transforman yaitu konsentrasi antibiotik yang optimal. Konsentrasi antibiotik memiliki pengaruh yang besar terhadap proses seleksi transforman. Hal ini karena konsentrasi antibiotik yang terlalu rendah menyebabkan sel non transforman tumbuh dalam medium seleksi. Sementara, konsentrasi antibiotik yang terlampaui tinggi dapat mengakibatkan kematian pada sel transforman. Antibiotik menjadi faktor utama yang paling penting karena merupakan agen seleksi (Aisyah & Anggraito, 2015).

Mekanisme antibiotik sebagai agen seleksi transforman yaitu dengan membunuh atau menghentikan pertumbuhan sel non transforman (non-target) pada medium seleksi. Sementara, sel transforman (target) akan tetap dibiarkan tumbuh. Sel transforman merupakan sel yang mengandung gen resisten terhadap antibiotik agen seleksi. Sehingga, sel transforman bersifat resisten dan tidak mengalami hambatan dalam pertumbuhan (Fakruddin *et al.*, 2013).

### 2.5.2 Faktor yang Mempengaruhi Transformasi

Transformasi menjadi tahap penting dalam rekayasa genetika dan produksi enzim lipase rekombinan. Proses transformasi berhasil apabila DNA penyandi berhasil disisipkan dan diekspresikan ke dalam genom sel inang. Berbagai faktor mempengaruhi keberhasilan tahap transformasi, antaranya

yaitu konsentrasi DNA, konsentrasi antibiotik, dan kadar kompetensi sel inang. Konsentrasi DNA menjadi faktor penting karena konsentrasi DNA yang terlalu rendah akan menyebabkan koloni tidak tumbuh. Konsentrasi DNA yang optimal untuk transformasi yaitu sekitar 1-10  $\mu\text{g}$ . Sedangkan, konsentrasi antibiotik yang digunakan harus sesuai dengan jenis vektor yang dipilih sehingga koloni dapat tumbuh dengan efektif pada media. Sel kompeten merupakan sel inang yang digunakan untuk ekspresi gen. Sel inang yang kompeten dihasilkan dengan penambahan larutan Kalsium Klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) yang bertujuan agar kalsium dalam membran sel terganggu sehingga membrane terbuka dan DNA *insert* mampu masuk ke dalam sel inang (Masfuroh *et al.*, 2017).

## **2.6 Aktivitas Enzim Lipase**

### **2.6.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi dan Aktivitas Enzim**

Sintesis enzim dari mikroorganisme dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain yaitu temperatur (suhu), pH, sumber karbon, sumber nitrogen, jenis fermentasi, dan masa inkubasi. Faktor sumber karbon (C) dan sumber nitrogen (N) menjadi ketertarikan di bidang industri karena menggunakan media dengan harga yang terjangkau. Optimasi kondisi bioproduksi enzim menjadi satu hal yang paling penting dalam menghasilkan enzim yang sesuai dengan kebutuhan industri (Al-Dhabi *et al.*, 2020).

Temperatur atau suhu pada saat sintesis terjadi merupakan faktor yang paling berpengaruh dan penting. Apabila suhu meningkat, maka reaksi kimia yang terjadi juga akan meningkat. Namun, terdapat batas maksimal peningkatan yang dialami reaksi kimia. Oleh karena itu, suhu yang optimal



menjadi faktor yang krusial dalam produksi enzim. Suhu optimal terjadi apabila sintesis enzim berada pada titik puncak atau tertinggi reaksi. Setiap jenis enzim memiliki suhu optimal tertentu. Pada umumnya, suhu optimal enzim bervariasi diantara 37-40°C. Jika enzim telah mencapai suhu optimal, aktivitas enzim akan menurun karena denaturasi protein (Whitaker, 2004).

Selain suhu, pH juga memiliki pengaruh besar dalam aktivitas enzim. Setiap enzim memiliki nilai pH yang optimal yang menghasilkan efisiensi lebih maksimal. pH terbukti sebagai faktor yang krusial dalam suatu reaksi enzim karena pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dibandingkan optimal pH akan mengurangi aktivitas enzim. pH diyakini mempengaruhi ikatan ion dan hidrogen yang merupakan faktor penting dalam produksi enzim (Whitaker, 2004). Pertumbuhan mikroba yang menghasilkan enzim juga memerlukan pH yang optimal, sehingga pH harus disesuaikan dengan strain mikroba yang digunakan.

Seterusnya, waktu fermentasi atau masa inkubasi enzim juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas dan produksi enzim (Al-Dhabi *et al.*, 2020). Masa inkubasi merupakan faktor penting dalam produksi enzim bersumber dari mikroorganisme. Hal ini karena proses inkubasi dalam jangka waktu tertentu diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Masa inkubasi dapat mempengaruhi aktivitas enzim lipase yang diproduksi oleh mikroba penghasil enzim lipolitik. Semakin lama masa inkubasi, maka semakin lama waktu bagi mikroorganisme menjalani pembelahan sel sehingga enzim yang diproduksi semakin meningkat. Namun, sama halnya dengan faktor suhu dan pH, masa inkubasi mikroorganisme akan mencapai titik



maksimum tertentu atau pada fase stasioner, dan akan menurun pada fase kematian (*death phase*) (Murtius *et al.*, 2022).

### 2.6.2 Penentuan Aktivitas Enzim Lipase

Pada umumnya, penentuan aktivitas enzim dilakukan secara *in vitro*. Pengukuran aktivitas enzim memiliki tujuan untuk menentukan jumlah enzim yang terdapat pada kondisi tertentu dan sebagai perbandingan dari beberapa sampel yang bervariasi. Aktivitas enzim dievaluasi pada tingkat awal pemanfaatan substrat tanpa adanya produk (Scopes, 2002). Peningkatan minat dan kebutuhan industri akan enzim lipase dengan kadar aktivitas tinggi dan spesifisitas substrat yang baik, membuat berbagai metode analisis untuk evaluasi aktivitas enzim yang cepat, akurat, spesifik, dan selektif bermunculan. Beberapa contoh teknik analisis aktivitas enzim yaitu volumetri, spektrometri, uji radioaktif, kromatografi, dan biosensor (Stoytcheva *et al.*, 2012). Penjelasan teknik evaluasi aktivitas enzim lipase sebagai berikut:

#### a. Metode volumetri

Metode volumetri merupakan teknik evaluasi aktivitas enzim yang sering digunakan, metode ini berbasis uji titrimetri asam lemak bebas yang berasal dari triasilgliserol enzim lipase. Metode ini melalui tahap inkubasi sampel dan titrasi alkali. Substrat yang biasa digunakan dalam metode ini yaitu triolein dan minyak zaitun yang merupakan triasilgliserol berantai panjang. Namun, kekurangan metode ini yaitu waktu analisis yang lama, sensitivitas rendah, dan kegagalan yang disebabkan oleh titrasi (Stoytcheva *et al.*, 2012).

#### b. Metode Kolorimetri

Uji kolorimetri merupakan uji kuantifikasi produk lipolysis. Mekanisme uji ini melibatkan asam lemak bebas yang diubah menjadi senyawa berwarna (produk), kemudian diekstraksi menggunakan pelarut organik dan dievaluasi secara spektrofotometri. Metode ini digunakan secara spesifik untuk asam lemak. Kekurangan dari metode ini yaitu penggunaan pelarut organik yang bersifat toksik (Stoytcheva *et al.*, 2012).

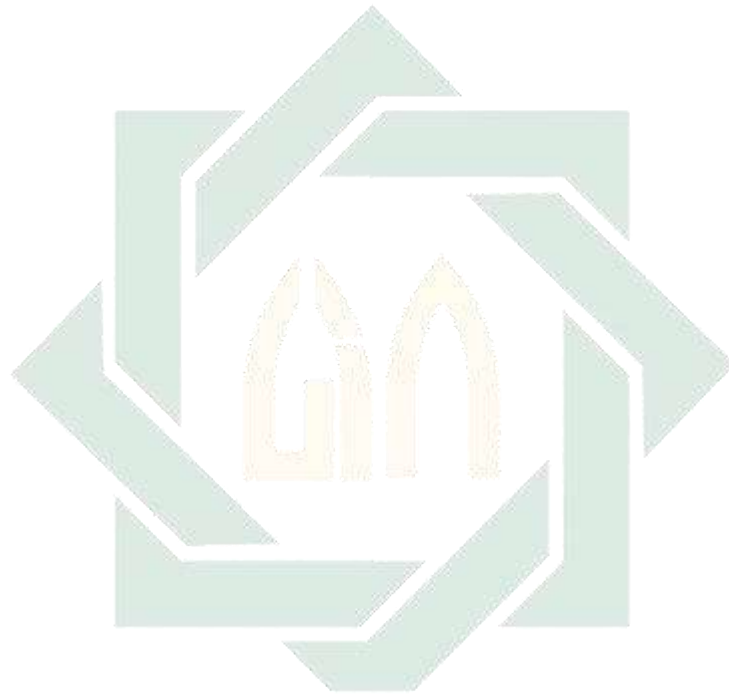
#### c. Metode Kromatografi

Teknik kromatografi merupakan metode yang bagus untuk menguji matriks kompleks. Metode ini biasa diterapkan untuk mengukur lipid dan lipolysis atau asam lemak bebas. Berbagai jenis kromatografi dapat digunakan seperti kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Namun, kromatografi memiliki kekurangan dari segi harga yang terlalu tinggi dan memakan waktu yang lama serta sumber daya manusia operator yang berpengalaman (Stoytcheva *et al.*, 2012).

#### d. Metode *Visible* Spektrofotometri

Metode spektrofotometri dalam pengujian aktivitas lipase memanfaatkan substrat lipase sintetik yang ditransformasikan melalui hidrolisis enzim. Pada umumnya, substrat yang digunakan yaitu *p*-nitrophenyl dan ester naphthyl dari rantai asam lemak (Stoytcheva *et al.*, 2012). Salah satu substrat artifisial yang banyak digunakan yaitu *p*-nitrophenyl-butyrate (*p*NPB) (Iglesias *et al.*, 2016). Mekanisme pada metode ini yaitu proses lipolysis *p*-nitrophenyl akan menghasilkan warna kuning yang dapat terdeteksi dan diukur pada 405-410 nm. Walaupun metode ini sering digunakan, namun spesifisitas

substrat yang rendah dari enzim terhadap substrat sintetis menjadi salah satu kekurangan metode ini (Stoytcheva *et al.*, 2012).



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk sebagai penelitian eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Jumlah sampel pada penelitian ini untuk tahap seleksi transformasi plasmid yaitu sebanyak 3 sampel (6, 14, dan 15). Sedangkan, untuk tahap transformasi hingga produksi enzim terdapat 4 sampel (6, 8, 14, dan 15).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai bulan Maret 2023 di *Applied Chemistry Bioproduction Laboratory, Faculty of Engineering Kobe University, Kobe, Jepang*. Waktu penelitian disajikan dalam tabel sebagai berikut:

Tabel 3.1. Waktu Penelitian

No	Kegiatan	Bulan			
		1	2	3	4
1	Persiapan	■			
2	Seleksi transformasi gen plasmid	■	■		
3	Transformasi			■	
4	Kultur dan Produksi Enzim			■	
5	Pengujian SDS-PAGE dan aktivitas enzim			■	
6	Analisis Data				■
7	Sidang skripsi				■

### 3.3 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu mikropipet, PCR konvensional (Takara, Japan), Elektroforesis (Mupid ExU, Japan), FAS V Gel Imaging System, sentrifus, timbangan digital, gelas ukur, gelas beaker,

Erlenmeyer, *magnetic stirrer*, spatula, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), Bunsen, *heat incubator*, tabung uji, *incubator shaker*, *Bioshaker*, cawan petri, *spreader*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, pH meter, spektrofotometer UV-Vis, oven, kulkas, spons steril, *vortex mixer*, jarum suntik, lemari incubator, NanoDrop Microvolume Spectrophotometre (ThermoFisher Scientific, USA), Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), Protein Electrophoresis (Bio-Rad, USA), ImageQuant™ LAS 4000, dan Envision Multilaber Reader (Perkin Elmer, USA).

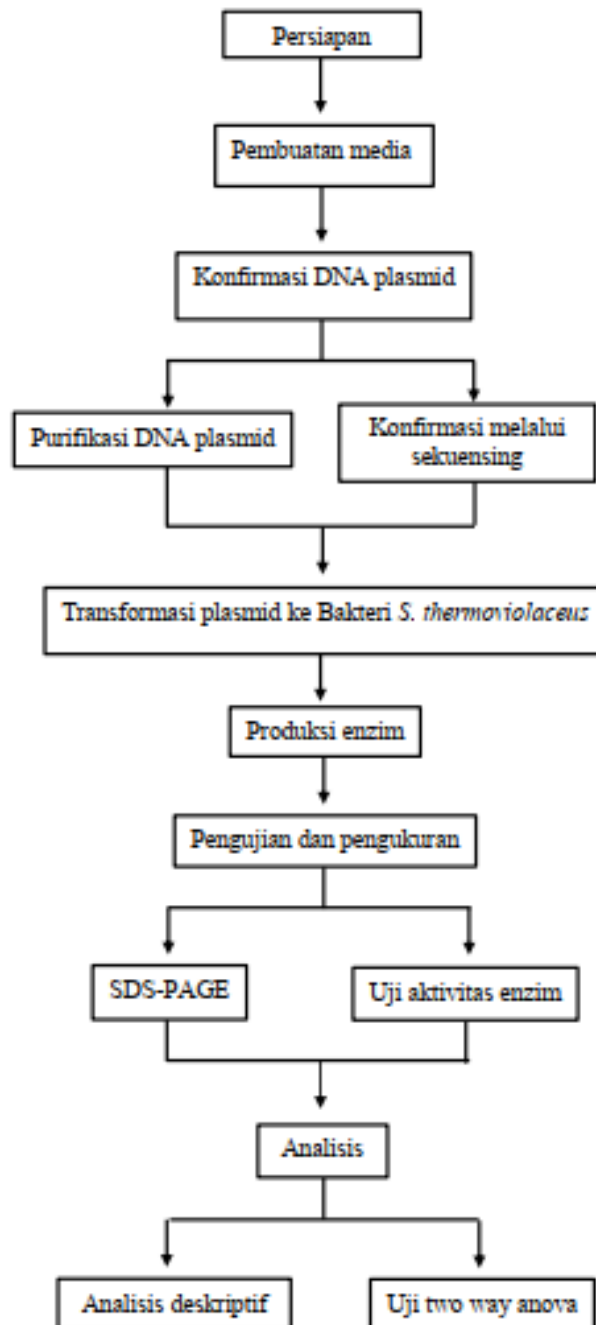
### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* 13905 yang berasal dari *NITE Biological Resource Center* (NBRC). Kemudian yaitu PCR *tube*, 1,5 ml Eppentube, 2 ml Eppentube, mikrotip, KOD One™ PCR master mix (Toyobo, Japan), MilliporeSigma Milli-Q™ *Ultrapure water*, Primer, Gel Red® Nucleic Acid Stain 10000x, DNA loading dye, buffer TAE, FastGene Gel/PCR Extraction Kit, NheI, XbaI, Cut Smart Buffer (New England Biolabs), Tryptone, Ekstrak Yeast, NaCl, serbuk agar, Apramycin, NovaBlue Singles™ Competent Cells – Novagen, media SOC, LaboPass™ Plasmid DNA Purification Kit Mini, HSTO4, Beberapa bahan media seperti Bacto™ Tryptone (GIBCO, USA), Difco ISP Medium4, dan *Tryptic Soy Broth* (TSB). Selanjutnya, BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix, BigDye™ 5X sequencing buffer, Dimetil sulfoksida (DMSO), primer sekuensing, X Terminator™ Solution Buffer (Applied Biosystems, USA), SAM™ Solution (Applied Biosystems, USA). Selain itu, juga diperlukan Kanamycin, SDS-PAGE gel (ATTO, Japan),



- c. Variabel terikat meliputi transforman yang tumbuh, kemampuan produksi enzim lipase yang dievaluasi berdasarkan berat molekular dan uji aktivitas enzim (u/ml).

### 3.5 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka operasional penelitian  
(Dokumen pribadi, 2023)



### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan Media

##### a. Media LB Agar

Trytone ditimbang sebanyak 10 g, ekstrak yeast ditimbang sebanyak 5 g, NaCl 10 g dicampur dan dilarutkan dalam 1 L akuades sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut, diukur pH dan diatur hingga pH 7.0 (apabila pH kurang dari 7.0, ditambahkan NaOH). Kemudian, ditambahkan bubuk agar ke dalam media dan disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C. Selanjutnya, media ditambahkan antibiotik (Apr/KM) sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Seterusnya, media dituangkan ke cawan petri steril dan ditunggu hingga padat.

##### b. Media LB cair

Media LB cair dibuat dengan menimbang Tryptone sebanyak 10 g, ekstrak yeast 5 g, dan NaCl 10 g. Kemudian, pH diukur dan diatur sehingga pH 7.0. Setelah itu, media disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C.

##### c. Media ISP4

Media ISP4 dibuat dengan menimbang Difco™ ISP Medium4 (Beckton Dickinson, USA) sebanyak 37 g dan dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian, disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C. Lalu, media dituangkan ke cawan petri steril dan ditunggu hingga padat.



mix (Toyobo, Japan), primer *forward* dan *reverse*, dH<sub>2</sub>O menggunakan MilliporeSigma Milli-Q™ Ultrapure water, dan template berasal dari Strain *S. thermoviolaceus* 13905 (NBRC, Japan). Kondisi PCR dilakukan pada denaturasi awal 98°C selama 1 menit, denaturasi kedua 98°C selama 10 detik, suhu *annealing* dilakukan berbeda-beda berdasarkan T<sub>m</sub> (*melting point*) primer setiap sampel dengan waktu selama 5 detik (rata-rata suhu *annealing* 70-77°C). Kemudian, elongasi (pemanjangan) pada suhu 68°C selama 5 detik dan penyimpanan pada suhu 4°C. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarose dengan 100 volt selama 20 menit, lalu divisualisasikan menggunakan FAS V *Gel Imaging system*.

**b. Purifikasi Gen PCR menggunakan FASTGENE™ Gel/PCR Extraction Kit**

Sampel PCR dicampur dengan GP1 (buffer) dengan rasio volume 1:5. Lalu, disentrifugasi 13,000 rpm selama 30 detik, supernant dibuang. Kemudian, larutan GP2 ditambahkan dan disentrifugasi, supernatant dibuang lagi. Selanjutnya, sentrifugasi 13,000 rpm selama 2 menit, supernatant dibuang. Seterusnya, larutan elusi (GP3) ditambahkan dan disentrifugasi. Konsentrasi dan Kemurnian DNA diuji dengan menggunakan NanoDrop Microvolume Spectrophotometres dengan larutan GP3 sebagai larutan blanko.

**c. Pembuatan kasOP *Template Cut* sebagai Pemotong Gen dan Tahap**

**Penyisipan Gen dengan DNA ligase**

Campuran kasOP *template cut* mengandung enzim restriksi yaitu NheI dan XbaI, serta CutSmart® Buffer, *template*, dan dH<sub>2</sub>O. Kemudian,



dicelupkan ke dalam tube yang mengandung PCR mix. Ketentuan PCR dilakukan dengan suhu dan waktu yang sama seperti PCR pertama. Selanjutnya, gen dikonfirmasi dengan memvisualisasikan pada FAS V Gel Imaging System.

#### **f. Tahap Peremajaan Kultur**

Koloni yang tumbuh dipilih sebanyak 3 koloni dari setiap sampel, lalu dikultur ke dalam media LB cair yang mengandung antibiotik Apramycin di dalam tabung reaksi. Tabung reaksi diinkubasi pada *incubator shaker* 37°C selama 24 jam.

#### **g. Purifikasi DNA Plasmid**

Tahap purifikasi DNA plasmid menggunakan LaboPass™ Plasmid DNA Purification Kit Mini. Sampel hasil kultur pada tahap sebelumnya diambil sebanyak 1 ml, lalu disentrifugasi 13,000 rpm selama 7 menit. Kemudian, ditambahkan larutan *Cell Resuspension*, larutan *Cell Lysis*, dan larutan *Alkaline protease* dengan menginversi tube setelah penambahan larutan. Setelah itu, diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, dan ditambahkan larutan *Neutralization*, diinversi, dan disentrifugasi 13,000 rpm. Supernatan diambil dan disentrifugasi 13,000 rpm selama 1 menit, buang supernatan. *Wash solution* ditambahkan, lalu disentrifugasi 1 menit, supernatan dibuang. Proses sentrifugasi pada kecepatan tertinggi diulang selama 2 menit sampai tidak tersisa supernatan. Seterusnya, tambahkan *Nuclease-free water* dan disentrifugasi selama 1 menit. Konsentrasi dan Kemurnian DNA diukur menggunakan NanoDrop Microvolume Spectrophotometres dengan *Nuclease-free water* sebagai larutan blanko.

DNA plasmid yang berhasil dikonstruksi kemudian disimpan pada freezer -20°C.

#### **h. Konfirmasi Plasmid DNA melalui Analisis Sekuensing**

Plasmid DNA yang sudah dipurifikasi selanjutnya dilakukan preparasi sampel untuk tahap sekuensing yang diawali dengan PCR sekuensing. Tahap PCR sekuensing menggunakan Big Dye™ Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, USA), Big Dye 5X sequencing Buffer (Applied Biosystems, USA), Sequencing Primer (Thermo Scientific, Japan), DNA Plasmid yang telah dipurifikasi, dH<sub>2</sub>O., dan Dimethyl Sulfoxida (DMSO) (Necalai Tasque, Japan). Kemudian, dilakukan PCR dengan pengaturan denaturasi awal 98°C selama 5 menit, denaturasi kedua 98°C selama 10 detik, *annealing* 50°C selama 5 detik, dan elongasi 60°C selama 4 menit, lalu suhu penyimpanan 4°C. Setelah itu, ditambahkan BigDye XTerminator™ purification kit yang mengandung SAM™ Solution dan XTerminator™ Solution. Kemudian, diinkubasi pada *Bioshaker* 180 rpm selama 15 menit dan disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Setelah itu, proses sekuensing dilakukan dengan mesin BDX3500-SEQ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) menggunakan menu Rapid Seq Assay 3.1. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis dengan cara *alignment* pada aplikasi SnapGene.

### 3.6.3 Transformasi Plasmid ke Bakteri *Streptomyces thermoviolaceus*

#### a. Tahap transfer konjugatif secara *heat shock* dan transformasi ke HST04

Sel kompeten HST04 yang telah cair ditambahkan 1  $\mu$ l plasmid DNA dan diinkubasi pada 42°C selama 1 menit. Kemudian, diletakkan pada es kembali sambil ditambahkan 100  $\mu$ l SOC medium (Takara, Japan). Lalu, diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Seterusnya, dikultur secara *spread method* pada media agar LB yang mengandung antibiotik Apramycin dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. JM109 dalam bentuk stok gliserol dikultur pada media agar LB yang mengandung Kanamycin. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### b. Peremajaan Kultur HST04 dan JM109

Koloni yang dihasilkan dari tahap sebelumnya dikultur ke dalam tabung uji berisi media LB dan antibiotic Kanamycin serta Apramycin. Setelah itu, tabung uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### c. Tahap Konjugasi dengan E.Coli (HST04) dan Kultur

Kultur dari tahap sebelumnya diambil sebanyak 1 ml, lalu disentrifugasi pada 5500 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan supernatan. Kemudian, dibilas dua kali dengan media LB dan disentrifugasi pada 5500 rpm selama 5 menit setelah setiap bilasan. Selanjutnya, ditambahkan media LB baru dan dilakukan 200x pengenceran. Seterusnya, sampel HST04 dan JM109 yang telah diencerkan dicampur masing-masing sebanyak 200 $\mu$ l dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit pada bioshaker incubator. Kemudian, 50 $\mu$ l dari total 400 $\mu$ l campuran dikultur pada media





Selanjutnya, ditambahkan media LB baru. Gliserol stok *S. thermoviolaceus* Wild type disentrifugasi pada 8000 rpm selama 5 menit, supernatant dibuang. Media 2xYT ditambahkan ke dalam tabung yang berisi *S. thermoviolaceus* Wild type, lalu diinkubasi pada 50°C selama 10 menit. Dicampurkan Spora *S. thermoviolaceus* dan sampel kultur masing-masing sebanyak 100 µl. Selanjutnya, dikultur dengan metode sebar pada media ISP4, lalu diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

### **3.6.4 Tahap Produksi Enzim**

#### **a. Tahapan *Overlay* dengan Milli Q dan antibiotik**

Campuran Milli Q dengan antibiotik Apramycin (Apr) dan asam Nalidixat (Na) dilapisi diatas kultur pada media ISP4 dengan cara dituang perlahan. Kemudian, dilanjutkan inkubasi selama 24 jam pada 45°C.

#### **b. Konfirmasi koloni pada Media TSB**

Koloni yang terbentuk di tahap sebelumnya diambil sebanyak 4 koloni lalu dipindahkan ke media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dengan kandungan antibiotik Apramycin (Apr) dan asam nalidixat (Na). Kemudian, media TSB diinkubasi kembali pada suhu 45°C selama 24 jam.

#### **c. Tahap Pre-Kultur**

Koloni yang terbentuk di tahap sebelumnya dipilih sebanyak 3 koloni, lalu dilanjutkan tahap pre-kultur dengan menggunakan media TSB cair dengan tambahan Apr dan Na. Kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* 45°C dengan kecepatan *shaker* 160 rpm.

#### **d. Pengukuran OD dan Kultur Produksi Enzim**

Pengukuran OD berdasarkan nilai absorbansi (ABS) hasil pre-kultur dilakukan dengan 10x pengenceran untuk setiap sampel, dengan media TSB murni sebagai larutan blanko dan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu, Japan). Setelah itu, hasil pengukuran disesuaikan dengan OD 0.6 sebelum dilanjutkan ke tahap kultur.

Selanjutnya, tahap kultur menggunakan media *Tryptic Soy Broth* (TSB) yang mengandung antibiotik Apramycin dan Kanamycin. Kultur dilakukan pada suhu 45°C dengan kecepatan 160 rpm. Kemudian, sampling dilakukan dengan variasi masa yaitu 16 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam.

### **3.6.5 Uji SDS-PAGE**

#### **a. Preparasi Sampel Protein**

Hasil kultur setiap masa inkubasi disentrifugasi 5500 rpm selama 5 menit. Supernatan dan pellet dipisah lalu dimasukkan ke dalam *microtube* masing-masing. Kemudian, supernatan digunakan dalam uji SDS-page dan uji aktivitas lipase. Lalu, 20 µl supernatan dicampur dengan 4 µl buffer sampel SDS (Necalai Tasque, Japan). Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan vortex dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 1 menit. Lalu, dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit.

#### **b. Elektroforesis SDS-PAGE**

Berat molekular protein dilakukan dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan beberapa tahapan yaitu preparasi sampel protein, perakitan chamber dan glass plate, injeksi sampel protein bakteri, tahap running SDS-PAGE,



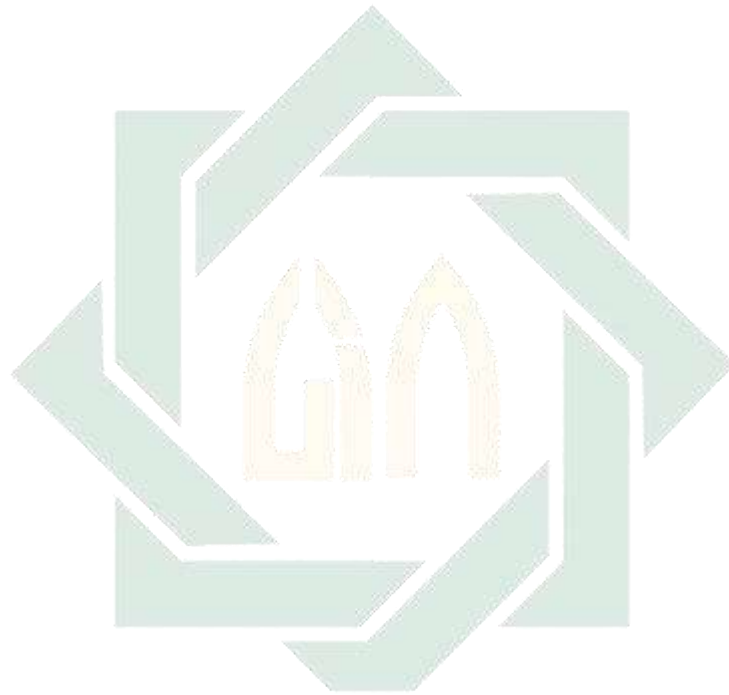
500  $\mu$ l ethanol 96% dalam 100 ml akuades Milli-Q® (Merck, German). Larutan 1M buffer Fosfat (pH 7.0) dibuat dengan mencampurkan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Sementara, larutan 200mM buffer fosfat dibuat dengan mengencerkan larutan 1M buffer fosfat menggunakan akuades Milli-Q® (Merck, German).

Aktivitas lipase diukur dengan mencampur 0,75 ml larutan substrat dengan 0,1 ml 200mM larutan buffer fosfat dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 10 menit. Kemudian, ditambahkan 0,15 ml supernatan sampel (enzim) dan diinkubasi lagi pada suhu 45°C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan asam trikloroasetat sebanyak 0,05 ml untuk menghentikan reaksi. Larutan 1M buffer fosfat sebanyak 0,1 ml ditambahkan di akhir. Standar blanko sampel dibuat dengan mencampur 0,75 ml larutan substrat dengan 0,1 ml 200mM larutan buffer fosfat, lalu ditambahkan larutan asam trikloroasetat sebanyak 0,05 ml. Lalu, 0,15 ml supernatan sampel (enzim) ditambahkan dan 1 M buffer fosfat juga ditambahkan di akhir. Masing-masing reaksi aktivitas enzim dan standar blanko dimasukkan ke dalam 96-well plates untuk diuji. Absorbansi sampel dan standar blanko diukur menggunakan spektrofotometri Envision Multilabel Reader (Perkin Elmer, USA) pada  $\lambda$  400 nm.

### 3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Analisis deskriptif kualitatif dilakukan berdasarkan pengamatan hasil seleksi transforman, hasil PCR, hasil sekuensing, dan hasil SDS-PAGE. Sementara, analisis kuantitatif dilakukan berdasarkan uji aktivitas lipase berupa hasil

spektrofotometri yang diuji dengan uji two way ANOVA menggunakan IBM Statistics SPSS. Faktor yang digunakan dalam penelitian ini yaitu variasi masa inkubasi kultur (16 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam).



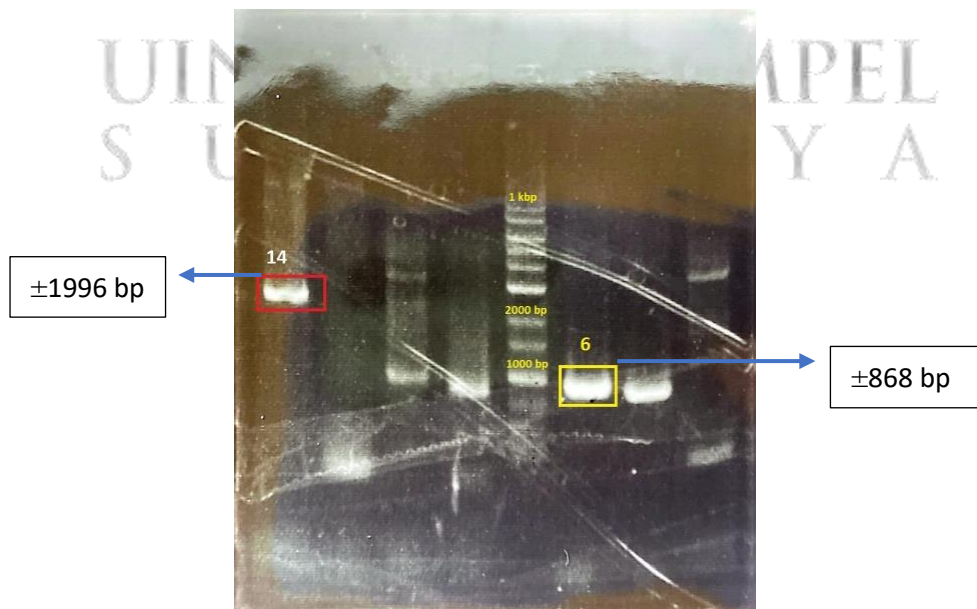
UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Konfirmasi Gen Plasmid

Konfirmasi gen plasmid pTYM18 diawali dengan tahap PCR yang bertujuan untuk mengamplifikasi gen target yang akan disisipkan. Hasil dari amplifikasi fragmen gen *S.thermoviolaceus*-esterase dengan metode PCR dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan 4.2. Visualisasi tersebut menunjukkan adanya pita DNA yang tebal dan jelas pada jalur 1 (sampel 14) dan 6 (sampel 6) (Gambar 4.1), serta jalur 3 untuk sampel 15 (Gambar 4.2). Marker yang digunakan berukuran 1 kilo pasang basa (kbp). Berdasarkan Gambar 4.1, sampel 14 menunjukkan pita berukuran  $\pm 1996$  pasang basa (bp) dan sampel 6 menunjukkan pita berukuran  $\pm 868$  bp. Sementara, Gambar 4.2 menunjukkan sampel 15 yang memiliki pita jelas berukuran  $\pm 1996$  bp. Hal ini menandakan bahwa konfirmasi plasmid melalui tahap PCR berhasil dan ukuran DNA yang ditunjukkan sesuai dengan ukuran DNA *template* gen pada aplikasi *SnapGene*.



Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis PCR Sampel 6 & 14  
(Dokumen Pribadi, 2023)







XbaI dan NheI adalah contoh dari enzim restriksi atau enzim endonuclease. Enzim restriksi merupakan enzim yang berfungsi untuk memotong DNA pada sekuens nukleotida spesifik (Buckhout-White *et al.*, 2018). Enzim restriksi XbaI dapat memotong DNA pada sekuens TCTAGA (S. L. Liu *et al.*, 1993). Sementara, enzim NheI memiliki situs pemotongan pada sekuens (5'-GCTAGC-3') (Bautsch, 1993). Pemanfaatan enzim restriksi sudah digunakan secara pesat dalam bidang bioteknologi atau kloning DNA. Enzim ini mampu mengenali sekuens DNA berjumlah antara 4-8 pasang basa. Enzim restriksi dapat memotong DNA beruntai ganda dan menghasilkan DNA untai tunggal yang memiliki ujung yang panjang sebelah atau biasa disebut dengan *sticky ends*. Selain itu, enzim ini juga mampu memotong DNA pada situs yang sama sehingga menghasilkan ujung dengan panjang yang sama atau *blunt ends* (Buckhout-White *et al.*, 2018).

*Sticky ends* memiliki sekuens “bergantung” yang tidak memiliki pasangan nukleotida, sementara *blunt ends* merupakan sekuens yang memiliki pasangan nukleotida. Kondisi ujung DNA ini berpengaruh pada tahap ligasi atau penempelan gen *insert* pada vektor. Enzim T4 DNA ligase yang berperan dalam proses ligase lebih efektif dalam mengkatalisis DNA dengan ujung *sticky ends* dibandingkan *blunt ends*. Sehingga, jenis enzim restriksi yang menghasilkan bentuk ujung DNA dapat mempengaruhi efisiensi ligasi (Gao *et al.*, 2015). Teknik DNA ligasi berfungsi untuk menyatukan molekul DNA rekombinan. Proses ini melibatkan katalisis ikatan fosfodiester antara 3'-hidroksil dan 5'-fosfat, lalu menyambungkan dan menempelkan fragmen DNA dengan ikatan kovalen. Ujung DNA yang *sticky ends* mampu menempel dan terikat dengan lebih efektif karena kloning yang searah (Ng & Sarkar, 2014).







Seleksi transforman pada tabel 4.1 dianggap berhasil karena koloni tunggal yang resisten terhadap Apramycin dapat tumbuh. Tahap kolonisasi atau isolasi koloni ke media baru bertujuan agar seleksi lebih akurat dan koloni yang diperoleh benar-benar mampu bertahan pada lingkungan apramycin (Masfuroh *et al.*, 2017). Media *Luria Broth* (LB) mengandung Apramycin yang merupakan antibiotik sebagai marker dalam seleksi plasmid. Hal ini karena *Escherichia coli* (*E. coli*) mengandung plasmid yang bersifat resisten terhadap apramycin (Apr). Sehingga, antibiotik ini akan membantu dalam proses menyeleksi koloni *E. coli* yang mengandung plasmid target dan akan membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri lain yang bukan target (Vandermeulen *et al.*, 2011). Apramycin merupakan antibiotik berasal dari kelompok aminosilitol yang diproduksi oleh bakteri strain *Streptomyces tenebrarius* (Walton, 1978). Apramycin dikenal sebagai antibiotik yang memiliki aktivitas terhadap berbagai patogen klinis (Hao *et al.*, 2020).

Pada tahapan konfirmasi plasmid dengan PCR koloni dan elektroforesis, didapat hasil sebagai berikut, pita DNA plasmid sampel 6 mengindikasikan ukuran DNA sebesar  $\pm 868$  bp (Gambar 4.6). Sementara, sampel 14 dan 15 masing-masing menunjukkan ukuran DNA  $\pm 1996$  bp (Gambar 4.7 dan 4.8). Hal ini menjelaskan bahwa plasmid berhasil dikonfirmasi dan berukuran sesuai target. Namun, terdapat beberapa koloni yang tidak menghasilkan pita DNA yang sesuai dengan ukurannya. Ini terlihat pada sampel 14 jalur ke-3 (Gambar 4.7) serta sampel 15 jalur ke-4 dan 5 (Gambar 4.8). Hal ini mengindikasikan kemungkinan adanya kontaminasi pada sampel DNA plasmid sehingga DNA kurang murni dan pita tidak muncul.





Teknik PCR koloni menjadi salah satu metode konfirmasi yang digunakan untuk menganalisis ukuran plasmid rekombinan serta untuk menyeleksi koloni-koloni yang telah ditransformasikan. Teknik PCR koloni sering digunakan untuk menyeleksi transforman yang berasal dari bakteri karena efektivitasnya yang tinggi dan akurat (Hou *et al.*, 2016). Hal ini memudahkan peneliti dalam memastikan koloni bakteri yang tumbuh mengandung DNA target (plasmid) yang diinginkan (Nouemssi *et al.*, 2020).

Adapun kegagalan munculnya beberapa pita DNA koloni seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.7 dan 4.8 dapat terjadi karena berbagai faktor yaitu konsentrasi dan kemurnian genom DNA, panjang fragmen DNA, panjang primer, konsentrasi buffer PCR mix, kandungan GC primer, dan suhu annealing primer (Andreson *et al.*, 2008). Pada Gambar 4.7, pita DNA tidak muncul hanya pada jalur ke-3, sedangkan pada Gambar 4.8, pita DNA tidak muncul pada jalur ke-4 dan 5. Hal ini disebabkan oleh faktor volum DNA hasil amplifikasi yang kurang sehingga pita DNA tidak muncul pada visualisasi elektroforesis. Oleh karena itu, volum DNA hasil PCR harus ditambahkan agar memudahkan penentuan ukuran DNA (Tilawah *et al.*, 2017).

#### **4.2 Purifikasi DNA Plasmid**

Setelah tahap konfirmasi koloni melalui PCR, koloni yang berhasil tumbuh kemudian dikultur pada media LB cair dengan Apr selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil dari kultur tersebut akan disentrifugasi dan dipurifikasi menggunakan LaboPass™ Plasmid DNA Purification Kit Mini. Kit tersebut memiliki larutan *Alkaline protease*. Hasil purifikasi DNA menggunakan NanoDrop Microvolume Spectrophotometres sebagai berikut:

Tabel 4.2 Hasil Purifikasi DNA plasmid

<i>No.</i>	<i>Sampel</i>	<i>Konsentrasi (ng/μl)</i>	<i>Kemurnian A260/A280</i>
1.	6	74,7	1,89
2.	14	25,3	1,74
3.	15	33,2	1,82

Berdasarkan Tabel 4.1, sampel 6 memiliki nilai konsentrasi dan kemurnian tertinggi dibandingkan sampel lainnya yaitu konsentrasi 74,7 ng/μl dan kemurnian 1,89. Sementara, sampel 14 dan 15 memiliki konsentrasi 25,3 ng/μl dan 33,2 ng/μl. Kemurnian sampel 14 dan 15 yaitu 1,47 dan 1,82. Hasil ini membuktikan bahwa DNA plasmid dapat dilanjutkan ke tahap sekuensing karena nilai kemurnian yang optimal untuk tahap sekuensing yaitu 1,8-2,0 dan konsentrasi >20 ng/μl (Jiang *et al.*, 2015). Tujuan dari purifikasi DNA plasmid yaitu untuk menghilangkan molekul kontaminan seperti protein, dan DNA kromosom. Pada umumnya, teknik denaturasi alkali digunakan untuk menghilangkan kontaminan tersebut. Teknik lisis alkali ini terbilang mudah karena hanya menambahkan larutan alkali (200mM NaOH, 1% SDS) pada tahap ketiga berdasarkan kit yang digunakan. Penambahan larutan tersebut menyebabkan protein dan DNA untai ganda terdenaturasi menjadi untai tunggal. Prinsip dari teknik ini yaitu mengubah pH dan konsentrasi garam. Kandungan *Potassium Dodecyl Sulfate* (PDS) dalam larutan ke-3 yang ditambahkan juga berperan dalam memastikan presipitasi protein dan DNA kromosomal sehingga produk DNA yang dihasilkan murni (Sasagawa, 2018).

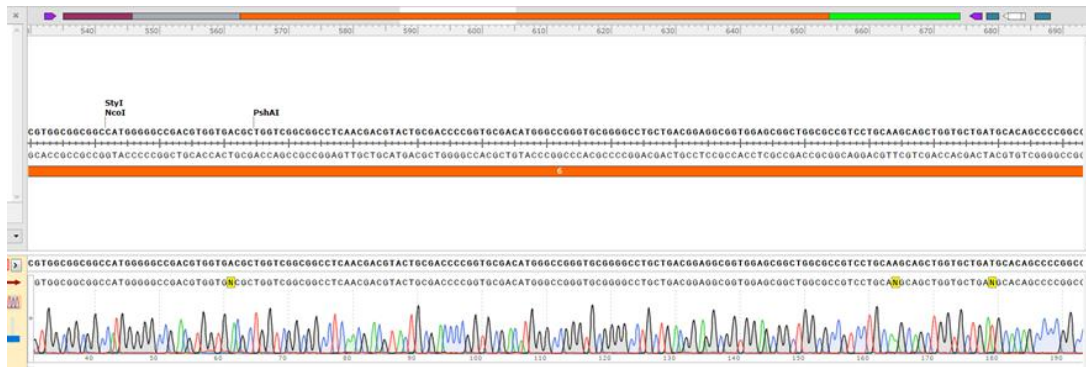
Kemurnian DNA dapat dilihat dari nilai absorbansi pada 260 nm dan 280 nm. Absorbansi 260 nm/280 nm merupakan rasio yang menunjukkan kontaminasi oleh protein dan RNA. Nilai optimal absorbansi 260 nm/280 nm yaitu 1.8. Nilai A260/A280 yang ditunjukkan sampel 6 (1.89) dan 15 (1.82) mengindikasikan tidak ada kontaminasi pada plasmid DNA yang dihasilkan kedua sampel ini. Sementara,

nilai A260/A280 yang ditunjukkan oleh sampel 14 (1.74) kurang dari 1.8, mengindikasikan adanya kemungkinan kontaminasi protein, fenol, dan senyawa lainnya namun tidak banyak (Doğan, 2021).

Pengukuran kualitas dan kuantitas plasmid DNA setelah purifikasi merupakan tahapan penting dalam menentukan kelayakan plasmid DNA untuk dilanjutkan ke tahap berikutnya yaitu sekuensing. Konsentrasi DNA yang baik untuk tahap sekuensing yaitu diantara 0.1 sampai 1.0. Sedangkan Kemurnian DNA yang baik untuk dilanjutkan tahap sekuensing yaitu sekitar 1.6 hingga 2.0 (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016). Menurut Brajkovic *et al.*, (2018), konsentrasi DNA yang optimal untuk tahap sekuensing bernilai lebih dari 20 ng/ $\mu$ l. Berdasarkan Tabel 4.1, ketiga sampel DNA plasmid sudah memenuhi kriteria konsentrasi dan kemurnian optimal untuk dilanjutkan ke tahap konfirmasi melalui sekuensing.

#### **4.3 Konfirmasi Plasmid Melalui Sekuensing**

Konfirmasi plasmid pTYM18-esterase melalui sekuensing dilakukan dengan metode Sanger. Hasil yang didapat berupa elektroferogram dan sekuens FASTA. Berdasarkan gambar elektroferogram, hasil menunjukkan puncak-puncak sinyal yang jelas dan tidak bertumpuk. Oleh karena itu, hasil sekuensing dilakukan dengan baik. Konfirmasi identitas sekuens DNA plasmid dilakukan melalui sekuensing gen pTYM18-esterase dan dianalisis hasilnya melalui tahap *alignment* dengan menggunakan perangkat lunak *SnapGene*.



Gambar 4.9 Hasil *Alignment* Sekuensing Sampel 6  
(Dokumen Pribadi, 2023)

Hasil *alignment* menunjukkan terdapat 663 pasang basa sejajar dan terdapat 3 perbedaan dengan gen pTYM18-esterase untuk sampel 6 (Gambar 4.9). Sedangkan, hasil penjajaran sampel 14 (Gambar 4.10) menunjukkan terdapat 633 pasang basa yang sejajar dan terdapat hanya 1 (satu) perbedaan dengan gen pTYM18-esterase. Sementara, hasil *alignment* sampel 15 (Gambar 4.11) menunjukkan terdapat 668 pasang basa yang sejajar dan terdapat hanya 1 (satu) perbedaan dengan gen pTYM18-esterase. Hasil ini menjelaskan bahwa DNA plasmid sesuai dengan gen target karena tidak terjadi mutasi pada sekuens nukleotida yang terindikasi apabila sekuens nukleotida yang muncul berbeda dengan *template* (Hert *et al.*, 2008).



Gambar 4.10 Hasil *Alignment* Sekuensing Sampel 14  
(Dokumen Pribadi, 2023)









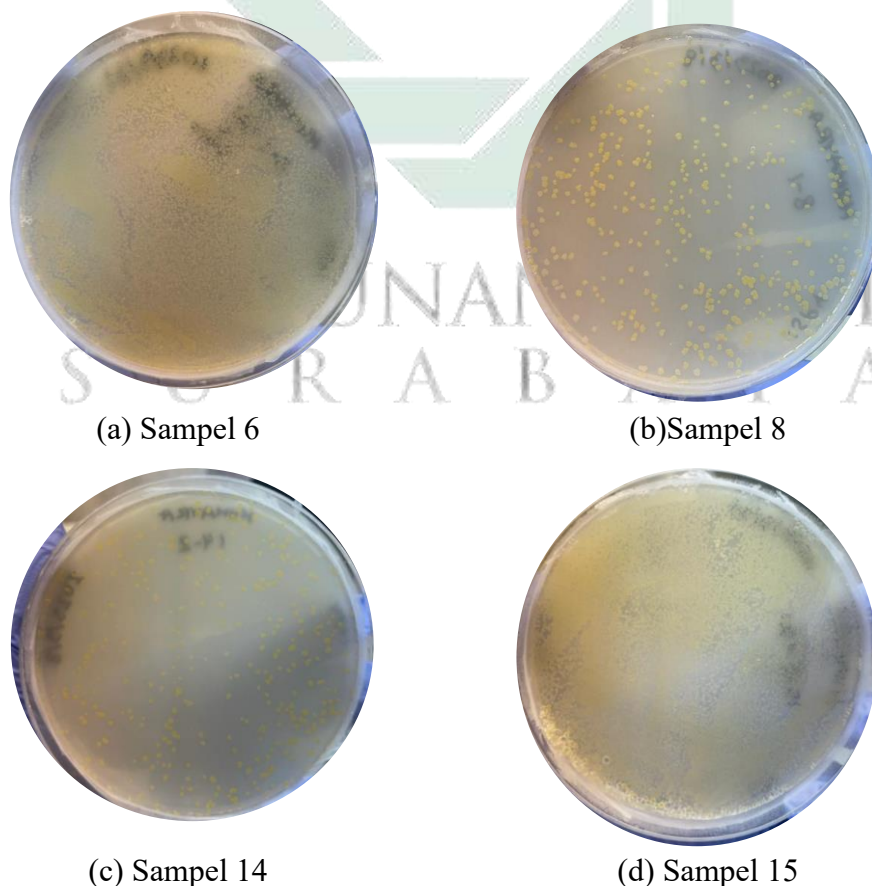






mengetahui pita DNA konjugant (Phornphisutthimas *et al.*, 2007). Namun, terdapat penelitian yang menggunakan teknologi lebih canggih seperti qPCR untuk mengkonfirmasi konjugant (Botts *et al.*, 2017). Selain itu, alasan pita DNA tidak muncul seperti pada sampel 14 (Gambar 4.12) yaitu karena ukuran plasmid yang cukup besar sehingga hasil elektroforesis menjadi *smear* (X. Liu *et al.*, 2007).

Setelah itu, sampel dikonjugasikan kepada strain bakteri *recipient* target yaitu *Streptomyces thermoviolaceus*. Untuk mengkonfirmasi keberhasilan tahap konjugasi ini, seleksi transforman menggunakan medium seleksi ISP4 dilakukan. Berdasarkan Gambar 4.16, koloni yang tumbuh pada ISP4 menunjukkan keberhasilan tahap konjugasi dengan bakteri target.



Gambar 4.16 Seleksi transforman tahap konjugasi ke bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* pada media ISP4. (a) Sampel 6, (b) sampel 8, (c) sampel 14, (d) sampel 15. (Dokumen Pribadi, 2023)

Tahap konjugasi terhadap bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* terjadi dengan adanya perpindahan plasmid DNA melalui agen berbentuk seperti benang, contohnya yaitu kontraksi pilus dan kontak fisik antara sel donor dan *recipient* (Phornphisutthimas *et al.*, 2007). Tahap konjugasi yang berhasil akan menumbuhkan koloni aktinobakteri yaitu *Streptomyces* dengan ciri-ciri koloni yang kusam, kasar, dan permukaan koloni kering yang dilapisi miselium dan spora (Nofiani *et al.*, 2021). Sementara, biasanya pada medium ISP4, *Streptomyces* menunjukkan koloni berwarna putih, kuning, atau coklat dengan warna yang pucat (Kawuri, 2016). Oleh karena itu, koloni yang ditunjukkan oleh Gambar 4.16 dapat dikonfirmasi sebagai koloni *Streptomyces thermoviolaceus* karena memiliki karakteristik yang sama.

Media ISP4 memiliki kepanjangan *International Streptomyces Project 4* (Kim *et al.*, 2003). ISP4 merupakan media khusus berstandar internasional yang digunakan untuk mengkultur bakteri *Streptomyces* (Nofiani *et al.*, 2021). Penggunaan media ISP4 dalam seleksi transforman bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* tidak memerlukan penambahan antibiotik karena bersifat khusus hanya untuk menumbuhkan koloni bakteri yang termasuk sebagai *Streptomyces* (Kawuri, 2016). Media ISP4 dikenal sebagai media yang minim nutrisi, namun mengandung banyak mineral dan pati sebagai sumber karbon (Wulandari & Sulistyani, 2016).



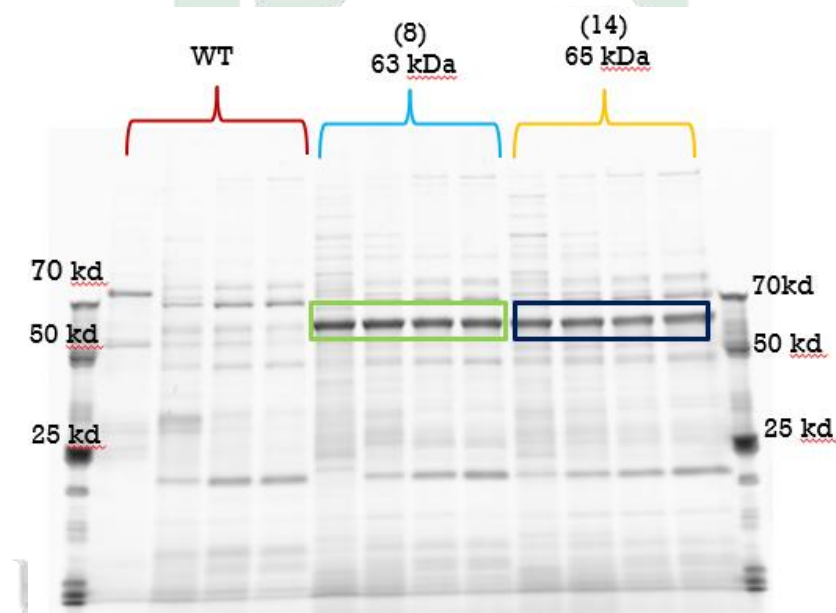


Media TSB (*Tryptic Soy Broth*) merupakan media yang sering digunakan sebagai agen seleksi pertumbuhan bakteri strain *Streptomyces* sp. Media ini mengandung nutrisi seperti glukosa, tripton, kedelai (*soy*), NaCl, dan K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Nonthakaew *et al.*, 2022). Sedangkan, penggunaan asam nalidiksat (Na) dalam media seleksi yaitu sebagai antibiotik bagi strain bakteri yang resisten. *Streptomyces* memiliki resistensi terhadap Na. Mekanisme kerja Na yaitu untuk menghentikan sintesis DNA pada sisa-sisa sel *Escherichia coli* yang merupakan sel *donor* tahap konjugasi. Namun, Na tidak menghentikan sintesis DNA pada strain *recipient* yaitu *Streptomyces* (Bouck & Adelberg, 1970). Oleh karena itu, setelah tahap kolonisasi ini, dapat dipastikan koloni yang tumbuh (Gambar 4.17) benar-benar koloni *Streptomyces thermoviolaceus* sehingga dapat dilanjutkan ke tahap pra-kultur.

Setelah tahap transformasi, sampel dibawa ke tahap pra-kultur sebelum akhirnya dikultur pada suhu 45°C dan 160 rpm. Pengambilan sampel (*sampling*) dilakukan pada variasi masa inkubasi yaitu 16, 24, 48, dan 72 jam. Variasi masa inkubasi tersebut dipilih untuk melihat aktivitas enzim menjadi optimal pada masa beberapa. Sementara, pemilihan suhu inkubasi pada 45°C karena temperature tersebut merupakan kondisi optimal untuk kultur *Streptomyces* sp. sehingga dapat menghasilkan enzim maupun metabolit target. Hal ini dibuktikan dalam penelitian oleh James, Edwards and Dawson, (1991), Akshatha and Kalyani, (2022), dan Rakesh *et al.*, (2014) yang mengkultur *Streptomyces* sp. pada 45°C. Selain itu, tahap goyangan atau *shaking* pada saat inkubasi terbukti mampu meningkatkan kadar pertumbuhan bakteri dan hasil kultur. Sintesis DNA juga meningkat pada proses *shaking* dalam kultur bakteri (Juergensmeyer *et al.*, 2007).

#### 4.5 Penentuan Berat Molekul Protein Menggunakan SDS-PAGE

Uji kualitatif dari sampel hasil kultur dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE. Berdasarkan Gambar 4.14, sampel 8 menunjukkan adanya *band* berukuran 63 kDa pada keempat masa inkubasi (dari kiri: 16, 24, 48, 72 jam). Sementara, sampel 14 juga menunjukkan *band* berukuran 65 kDa. Di sisi lain, sampel kontrol yaitu *wild type* (WT) tidak menunjukkan *band*, hal ini karena jumlah protein yang dihasilkan oleh sampel kontrol negatif sangat sedikit.



Gambar 4.18 Hasil SDS-PAGE Sampel 8 & 14

(Dokumen Pribadi, 2023)







karena kualitasnya yang unggul dalam menentukan aktivitas lipase atau esterase. Substrat PNPB memiliki keunggulan seperti pengenceran sampel hingga 1000 kali, jumlah reaksi kinetik 5 menit, dan standar deviasi 8.75% serta hasil dalam memonitor aktivitas lipase secara *real time* (Pliego *et al.*, 2015). Aktivitas enzim lipase diukur berdasarkan kemampuannya menghidrolisis *p*-nitrophenyl butyrate yang menghasilkan kromofor atau *p*-nitrophenolate yang akan terdeteksi oleh spektrofotometer pada 415 nm. Senyawa 4-nitrophenolate yang dihasilkan bersifat anion dan berwarna kuning karena memiliki pH 7.0 (Pliego *et al.*, 2015).

Penelitian oleh Gasparin, de Barros and Macedo (2020), menggunakan *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB) sebagai substrat untuk menguji aktivitas esterase secara spektrofotometri pada 405 nm. Seterusnya, Pliego *et al.*, (2015) berhasil melakukan pengujian aktivitas lipase dari *Candida antarctica* dan *Yarrowia lipolytica* menggunakan *p*-NPB yang menghasilkan nilai aktivitas kisaran 0.005-1.6 U/mL. Selain *p*-NPB, larutan TCA dan buffer fosfat juga berperan penting dalam uji aktivitas enzim lipase.

Asam trikloroasetat atau TCA merupakan sejenis asetat yang menyebabkan ukuran sel membesar, peroksidasi lipid, dan kerusakan DNA sehingga menyebabkan perubahan aktivitas enzim antioksidan dan kerusakan sel oksidatif (Hassoun & Cearfoss, 2011). TCA juga mampu untuk mengendapkan protein dengan cara memisahkan air yang terikat dengan protein. Sifat TCA yang asam juga menjadi pemicu utama dalam pengendapan protein. Hal ini karena TCA merupakan jenis asam kloroasetat yang paling asam dibandingkan yang lainnya seperti asam monokloroasetat. Kemampuan senyawa asam dalam mengendapkan protein bergantung pada stabilitas anion protein. Kemampuan TCA dalam presipitasi



Berdasarkan Gambar 4.16, hasil uji aktivitas enzim tertinggi senilai 8,29 U/ml ditunjukkan oleh sampel 15 pada waktu inkubasi 24 jam. Lalu, diikuti oleh sampel 6 pada waktu inkubasi yang sama sebesar 5,46 U/ml. Kemudian, sampel 6 pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan aktivitas enzim sebesar 4,74 U/ml, diikuti dengan sampel 15 dengan waktu yang sama sebesar 4,38 U/ml. Seterusnya, pada waktu inkubasi 16 jam, sampel 15 menunjukkan aktivitas enzim 4,36 U/ml dibandingkan sampel 6 yang hanya 3,73 U/ml. Hal ini berbanding terbalik karena terjadi penurunan aktivitas pada waktu inkubasi 72 jam, dimana sampel 6 menghasilkan aktivitas enzim lipase sebesar 3,95 U/ml dan sampel 15 hanya 3,13 U/ml.

Kedua sampel tersebut menunjukkan hasil aktivitas paling unggul dibandingkan dengan sampel 8 dan 14 serta kontrol negatif (*wild type*) yang hanya menghasilkan aktivitas enzim sebagai berikut, 0,02 U/ml (16 jam), 1,88 U/ml (24 jam), 3,06 U/ml (48 jam), dan 2,23 U/ml (72 jam). Sementara, sampel 8 tidak menunjukkan perbedaan aktivitas enzim yang signifikan karena aktivitas enzim tertingginya hanya sebesar 2,25 U/ml pada waktu inkubasi 48 jam. Sedangkan, sampel 14 memiliki aktivitas tertinggi pada waktu inkubasi 72 jam hanya sebesar 2,21 U/ml.

Aktivitas enzim pada sampel 6 dan 15 mengalami peningkatan yang pesat pada inkubasi 16 jam hingga 24 jam. Namun, menurun ketika masa inkubasi 48 jam dan 72 jam. Hal ini karena aktivitas enzim yang dipengaruhi oleh pertumbuhan bakteri. Semakin meningkat waktu inkubasi, maka biomassa sel bakteri akan bertambah sehingga meningkatkan produksi enzim hingga titik optimal (Kurniawati *et al.*, 2019). Pada inkubasi 16 jam hingga 24 jam, bakteri *S.*

*thermoviolaceus* mengalami fase log yaitu fase perkembangan dan pertumbuhan sel bakteri secara pesat, sehingga mencapai kondisi optimal. Sementara, pada inkubasi 48 jam, bakteri mengalami fase stasioner yaitu fase penurunan jumlah sel bakteri dan pertumbuhan bakteri terus menurun hingga mendekati fase kematian yaitu pada inkubasi 72 jam. Pada fase kematian, jumlah sel bakteri berkurang drastis karena sumber nutrisi telah habis (Kurniawati *et al.*, 2019).

Aktivitas enzim sampel 8 dan 14 mengalami peningkatan yang kurang signifikan dan lambat pada masa inkubasi 16 jam hingga 24 jam karena membutuhkan waktu adaptasi terhadap lingkungan yang lebih lama seperti pH, suhu, nutrisi, dan lain-lain. Lalu, pada masa inkubasi 48 jam aktivitas enzim mulai meningkat karena berada di fase log atau eksponensial dari pertumbuhan sel bakteri. Hal ini membuktikan bahwa semakin lama masa inkubasi, maka semakin banyak enzim yang diproduksi. Pada saat ini juga terjadi peningkatan jumlah enzim lipase yang menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak. Apabila sudah mencapai di atas 72 jam, aktivitas enzim yang menurun disebabkan oleh konsentrasi substrat dalam media yang berkurang (Murtius *et al.*, 2022).

Berdasarkan analisis ANOVA dua arah (lampiran I) menunjukkan bahwa nilai signifikansi (Sign.) adalah sebesar  $0,329 > 0,05$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa masa inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Hal ini seperti yang telah dijelaskan oleh (Murtius *et al.*, 2022) bahwa semakin lama masa inkubasi maka semakin meningkat aktivitas enzim hingga puncak aktivitas maksimal sebelum akhirnya menurun dikarenakan kurangnya kandungan nutrisi pada media pertumbuhan bakteri.

Penelitian oleh Al-Dhabi *et al.*, (2020), menemukan aktivitas enzim lipase optimal bakteri *Streptomyces* sp *Al-Dhabi-49* pada hari ke-5 inkubasi sebesar  $253 \pm 4.4$  U/ml. Aktivitas ini menurun menjadi  $172 \pm 2.1$  U/ml pada hari ke-6 karena kurangnya nutrisi menyebabkan fase kematian pada bakteri. Sedangkan, penelitian oleh Murtius, Hari and Putri, (2022), mendapatkan aktivitas lipase maksimal pada masa inkubasi 25 jam sebesar 2,66 U/ml, lalu mengalami penurunan setelah masa inkubasi 30 jam. Penelitian yang dilakukan Vishnupriya *et al.*, (2010), uji aktivitas lipase pada *Streptomyces griseus* dengan substrat minyak zaitun mendapat aktivitas optimal sebesar 117,88 U/ml pada inkubasi 72 jam. Sedangkan, aktivitas yang diuji pada substrat minyak matahari mendapat 51,9 U/ml (24 jam) dan substrat minyak sawit sebesar 51.9 U/ml selama inkubasi 48 jam.

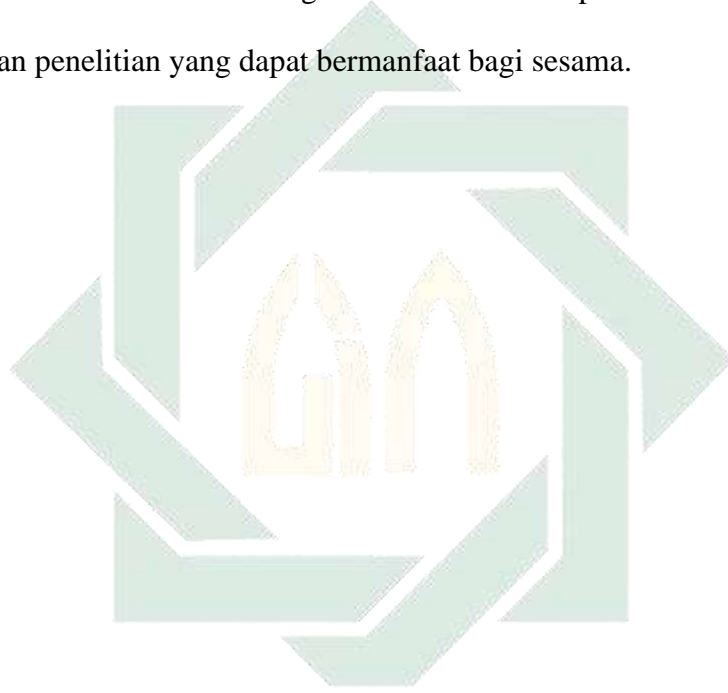
Variasi gen plasmid yang dikonstruksi juga berpengaruh pada hasil produksi protein termasuk aktivitas enzim. Ekspresi pada *Streptomyces* menyebabkan kadar pertumbuhan berkurang sehingga produksi protein terhambat yang sekaligus mempengaruhi aktivitas enzim. Oleh karena itu, banyak penelitian mengatasi masalah ini dengan menggunakan *inducer* untuk meningkatkan sistem ekspresi pada *Streptomyces*. Namun, masih minim penelitian yang membandingkan pengaruh *inducer* terhadap produksi protein dan enzim. (Berini *et al.*, 2020a).

Berdasarkan hasil aktivitas enzim yang didapat, enzim lipase yang berasal dari *Streptomyces thermoviolaceus* memiliki potensi dalam bidang industri seperti produksi biodiesel karena nilai aktivitas enzim yang cukup tinggi ditunjukkan oleh sampel 15 ( $8,29$  U/ml) pada inkubasi 24 jam. Menurut studi secara global, aktivitas enzim lipase pada *Streptomyces* sp. telah terbukti sukses dalam konversi biodiesel (Zulaikha *et al.*, 2021).





Rezeki yang dikaruniai oleh Allah SWT dapat berupa berbagai hal mulai dari kesehatan, ilmu, dan lingkungan sekitar yang cukup. Kita sebagai manusia harus mengetahui cara untuk memanfaatkan rezeki dan anugrah yang Allah SWT berikan sebaik-baiknya (Khairil & Batusangkar, 2020). Oleh karena itu, kita hendaklah menuntut ilmu dan memanfaatkan anugrah Allah SWT berupa enzim dengan terus mengembangkan penelitian yang dapat bermanfaat bagi sesama.



UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A

## BAB V PENUTUP

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Seleksi transforman bakteri *Streptomyces thermoviolaceus* sampel 6, 8, 14, dan 15 berhasil dilakukan, sehingga dapat dikonfirmasi bahwa tahap transformasi sukses.
2. Aktivitas enzim lipase tertinggi dari rekombinan *Streptomyces thermoviolaceus* diperoleh sampel 15 pada masa inkubasi 24 jam sebesar 8,29 U/ml. Sedangkan, aktivitas enzim terendah diperoleh sampel 8 pada masa inkubasi 16 jam sebesar 1,14 U/ml.

### 5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu:

1. Perlu dilakukan penelitian sejenis dengan promotor seperti media yang dimodifikasi dan *inducer*.
2. Perlu dilakukan pengujian dengan faktor lain seperti variasi temperatur, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan variasi pH.
3. Perlu dilakukan penelitian sejenis menggunakan strain bakteri yang lain.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, W., Rahman, T., Ratnawati, L., Sriharti, Salim, T., & Nursyahbani, I. (2019). Potential Isolates Characterization of Thermophilic Bacteria from Hot Springs and Waste Agricultural Production in Subang District Area. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 251(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/251/1/012006>
- Aisyah, & Anggraito, Y. (2015). Seleksi In Vitro Eksplan Setengah Biji Kedelai Varietas Tahan Tanah Kering Masam Menggunakan Kanamisin. *Jurnal MIPA*, 38(1), 1–6.
- Akshatha, S. J., & Kalyani, M. ishvara. (2022). evaluation of Mangrove Soil Streptomyces spp. exhibiting Culture and Biochemical Variation for Determination of Antibacterial Activity. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(4), 2458–2476. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.06>
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., & Arasu, M. V. (2020). Isolation and screening of Streptomyces sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.011>
- Alderliesten, J. B., Duxbury, S. J. N., Zwart, M. P., De Visser, J. A. G. M., Stegeman, A., & Fischer, E. A. J. (2020). Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: A meta-analysis. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01825-4>
- Andreson, R., Mos, T., & Remm, M. (2008). Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(11). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>
- Asad, S., Torabi, S., & Fathi-roudsari, M. (2011). Phosphate Buffer Effects on Thermal Stability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistance of Horseradish Peroxidase International Journal of Biological Macromolecules Phosphate buffer effects on thermal stability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistance of horseradish peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(4), 566–570. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.021>

- Barth, M., Schmidt, J., Wei, R., Oeser, T., Regis, M., Then, J., & Zimmermann, W. (2016). Effect of Tris , MOPS , and phosphate buffers on the hydrolysis of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases. *FEBS Press*, 6, 919–927. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12097>
- Bautsch, W. (1993). A NheI macrorestriction map of the *Neisseria meningitidis* B1940 genome. *FEMS Microbiology Letters*, 107(2–3), 191–197. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06029.x>
- Bekker, V., Dodd, A., Brady, D., & Rumbold, K. (2014). *Tools for metabolic engineering in Streptomyces*. October, 293–299.
- Berini, F., Marinelli, F., & Binda, E. (2020a). Streptomycetes : Attractive Hosts for Recombinant Protein Production. *Frontiers in Microbiology*, 11(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01958>
- Berini, F., Marinelli, F., & Binda, E. (2020b). Streptomycetes: Attractive Hosts for Recombinant Protein Production. *Frontiers in Microbiology*, 11(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01958>
- Boran, R., Ugur, A., Sarac, N., & Ceylan, O. (2019). Characterisation of *Streptomyces violascens* OC125-8 lipase for oily wastewater treatment. 3 *Biotech*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1539-x>
- Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20774–20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Botts, R. T., Apffel, B. A., Walters, C. J., Davidson, K. E., Echols, R. S., Geiger, M. R., Guzman, V. L., Haase, V. S., Montana, M. A., La Chat, C. A., Mielke, J. A., Mullen, K. L., Virtue, C. C., Brown, C. J., Top, E. M., & Cummings, D. E. (2017). Characterization of four multidrug resistance plasmids captured from the sediments of an urban coastal wetland. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01922>
- Bouck, N., & Adelberg, E. A. (1970). Mechanism of Action of Nalidixic Acid on





- Yoo, J. C. (2012). A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp . CS326. *Bioprocess Biosyst Eng*, 35, 227–234. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0598-8>
- Chua, T.-K., Tseng, M., & Yang, M.-K. (2013). Degradation of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) by thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* 76T-2. *AMB Express*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-8>
- Contesini, F. J., Davanço, M. G., Borin, G. P., Vanegas, K. G., Cirino, J. P. G., de Melo, R. R., Mortensen, U. H., Hildén, K., Campos, D. R., & Carvalho, P. de O. (2020). Advances in recombinant lipases: application in the pharmaceutical industry. *Industrial Biocatalysis: Challenges and Opportunities*, 10, 1–33. <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/9/1032/htm>
- Doğan, M. (2021). Plasmid DNA isolation and characterization studies Plazmid DNA izolasyonu ve karakterizasyon çalışmaları. *Cumhuriyet Medical Journal*, September, 226–231. <http://dx.doi.org/10.7197/cmj.987190>
- Dutoit, R., Dubois, E., & Jacobs, E. (2010). Selection systems based on dominant-negative transcription factors for precise genetic engineering. *Nucleic Acids Research*, 38(19). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq708>
- El-sheekh, M. M., Allam, N. G., Shabana, S. A., & Azab, M. M. (2017). Environmental Effects Efficiency of lipid accumulating Actinomycetes isolated from soil for biodiesel production: Comparative study with microalgae. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 00(00), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15567036.2016.1273279>
- Fakruddin, M., Mohammad Mazumdar, R., Bin Mannan, K. S., Chowdhury, A., & Hossain, M. N. (2013). Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant E. coli. *Hindawi Biotechnology*, 2013(3), 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/590587>
- Fatimah, E. (2021). Karakteristik dan Peranan Enzim Lipase pada Produksi Diacylglycerol (DAG) dari Virgin Coconut Oil (VCO). *UNESA Journal of*





- Hou, L., Zhang, X., Li, Y., Chen, S., Qu, H., Yu, J., Zhang, L., & Fan, Z. (2016). Rapid Screening of Recombinant Plasmids by Direct Colony Quantitative Real-Time PCR. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *07*(10), 428–433. <https://doi.org/10.4236/abb.2016.710041>
- Iglesias, J., Lamontagne, J., Erb, H., Gezzar, S., Zhao, S., Joly, E., Truong, V. L., Skorey, K., Crane, S., Madiraju, S. R. M., & Prentki, M. (2016). Simplified assays of lipolysis enzymes for drug discovery and specificity assessment of known inhibitors. *Journal of Lipid Research*, *57*(1), 131–141. <https://doi.org/10.1194/jlr.D058438>
- ITIS. (1957). *Streptomyces thermoviolaceus* Henssen, 1957. In *Integrated Taxonomic Information System*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00517-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00517-0)
- James, P. D. A., & Edwards, C. (1988). The effects of cultural conditions on growth and secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus*. *FEMS Microbiology Letters*, *52*(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02562.x>
- James, P. D. A., Edwards, C., & Dawson, M. (1991). The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. *Journal of General Microbiology*, *137*(7), 1715–1720. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-7-1715>
- Jiang, W., Liang, P., Wang, B., Fang, J., Lang, J., Tian, G., Jiang, J., & Zhu, T. F. (2015). Optimized DNA extraction and metagenomic sequencing of airborne microbial communities. *Nature Protocols*, *10*(5), 768–779. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.046>
- Juergensmeyer, M. A., Nelson, E. S., & Juergensmeyer, E. A. (2007). Shaking alone, without concurrent aeration, affects the growth characteristics of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(2), 179–183. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02172.x>
- Kang, D. K., Kim, J. Y., Baek, K. T., Park, J. E., Lee, H. J., & Kang, H. K. (2018). Enhancement of catalytic activity of an alkaline phytase from *Citrobacter*

braakii by directed evolution using error-prone PCR. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(8), 1355-1362.

Karmee, S. K., Patria, R. D., & Lin, C. S. K. (2015). Techno-economic evaluation of biodiesel production from waste cooking oil—a case study of Hong Kong. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4362–4371. <https://doi.org/10.3390/ijms16034362>

Kaur, J. (2017). Studies on Recombinant Lipase Production by E. Coli: Effect of Media And Bacterial Expression System Optimization. *International Journal of Molecular Biology*, 2(1), 17–23. <https://doi.org/10.15406/ijmboa.2017.02.00008>

Kawuri, R. (2016). Isolasi dan Identifikasi Streptomyces sp. Pada Rhizosfer Tanaman Pisang (Musa paradisiaca) di Desa Pendem Jembrana Bali. *Jurnal Metamorfosa*, 48(3), 752. <https://doi.org/10.2307/2257356>

Khairil, M., & Batusangkar, I. (2020). IMPLEMENTASI PEMAHAMAN AYAT AL-QURAN TENTANG. *Jurnal Ulunnuha*, 9(1), 1–15.

Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>

Khurana, J., Kumar, R., Kumar, A., Singh, K., Singh, R., & Kaur, J. (2015). New insight into old bacillus lipase: Solvent stable mesophilic lipase demonstrating enzyme activity towards cold. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 340–348. <https://doi.org/10.1159/000439276>

Kim, Y. P., Tomoda, H., Iizima, K., Fukuda, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y., & Omura, S. (2003). Takanawaenes, novel antifungal antibiotics produced by Streptomyces sp. K99-5278. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 56(5), 448–453. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.448>

Kurniawati, L., Kusdiyantini, E., & Wijanarka. (2019). Pengaruh Variasi Suhu dan







- Streptomyces sp. VN1, a producer of diverse metabolites including non-natural furan-type anticancer compound. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58623-1>
- Nofiani, R., Rizky, & Brilliantoro, R. (2021). Antibacterial and toxicity activities of streptosporangium sp. SM1P. *Molekul*, *16*(3), 208–216. <https://doi.org/10.20884/1.jm.2021.16.3.780>
- Nonthakaew, N., Panbangred, W., Songnuan, W., & Intra, B. (2022). Plant growth-promoting properties of Streptomyces spp. isolates and their impact on mung bean plantlets' rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology*, *13*(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.967415>
- Nouemssi, S. B., Ghribi, M., Beauchemin, R., Meddeb-Mouelhi, F., Germain, H., & Desgagné-Penix, I. (2020). Rapid and efficient colony-pcr for high throughput screening of genetically transformed chlamydomonas reinhardtii. *Life*, *10*(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/life10090186>
- Ovando-Chacon, S. L., Tacias-Pascacio, V. G., Ovando-Chacon, G. E., Rosales-Quintero, A., Rodriguez-Leon, A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., & Servin-Martinez, A. (2020). Characterization of thermophilic microorganisms in the geothermal water flow of El Chichón volcano crater lake. *Water (Switzerland)*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/W12082172>
- Park, J. Y., & Park, K. M. (2022). Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. *Journal of Chemistry*, *2022*(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>
- Patel, N., Rai, D., Shivam, Shahane, S., & Mishra, U. (2018). Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, *13*(1), 45–56. <https://doi.org/10.2174/1872208312666181029093333>
- Pertiwi, N. P. D., Mahardika, I. G. N. ., & Watiniasaih, N. L. (2010). OPTIMASI AMPLIFIKASI DNA MENGGUNAKAN METODE PCR ( Polymerase Chain Reaction ) PADA IKAN KARANG ANGGOTA FAMILI Pseudochromidae ( DOTTYBACK ). *Jurnal Biologi*, *19*(2), 1–5. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/BIO/article/view/21254/14017>

- Phornphisutthimas, S., Thamchaipenet, A., & Panjipan, B. (2007). Conjugation in *Escherichia coli*. *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 440–445. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a069932>
- Pirmanesh, S., Kermanshahi, R. K., Gharavi, S., & Qamsari, E. M. (2022). Cloning, Expression, and Purification of a GDSL-like Lipase/Acylhydrolase from a Native Lipase-Producing Bacterium, *Lactobacillus fermentum*. *Iranian Biomedical Journal*, 26(2), 153–159. <https://doi.org/10.52547/ibj.26.2.153>
- Pliego, J., Mateos, J. C., Rodriguez, J., Valero, F., Baeza, M., Femat, R., Camacho, R., Sandoval, G., & Herrera-López, E. J. (2015). Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using p-nitrophenyl butyrate. *Sensors (Switzerland)*, 15(2), 2798–2811. <https://doi.org/10.3390/s150202798>
- Pohanka, M. (2019). Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. *Molecules*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030616>
- Ragel, K. B. (2018). Enzymatic synthesis of biodiesel from high free fatty acid feedstock using a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. In *Universitat Autònoma de Barcelona*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/650368>
- Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J. J., & Kumar, T. K. S. (2009). Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Science*, 18, 980–993. <https://doi.org/10.1002/pro.108>
- Rakesh, K. N., Dileep, N., Junaid, S., & Prashith, K. T. R. (2014). Optimization of culture conditions for production of antibacterial metabolite by bioactive *Streptomyces* species srdp-tk-07. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 5(January), 1809–1816.
- Romadan, A. (2020). *Kajian Penafsiran Tentang Amstal Nyamuk Dalam QS. Al-Baqarah : 26* (Vol. 26). Institut Agama Islam Negeri Surakarta.



- Ruparel, H., Ulz, M. E., Kim, S., & Ju, J. (2004). Digital detection of genetic mutations using SPC-sequencing. *Genome Research*, *14*(2), 296–300. <https://doi.org/10.1101/gr.1344104>
- Samsumaharto, R. A. (2010). ISOLATION AND PURIFICATION OF LIPASE FROM COCOA BEANS (*Theobroma cacao*. L.) OF CLONE PBC 159. *Indonesian Journal of Chemistry*, *8*(1), 104–110. <https://doi.org/10.22146/ijc.21654>
- Santos, M. R., Hirata, D. B., & Angelotti, J. A. F. (2022). Lipases: Sources of Acquisition, Ways of Production, and Recent Applications. *Catalysis Research*, *2*(2), 1–1. <https://doi.org/10.21926/cr.2202013>
- Saputra, E. A., Santri, A., Studi, P., Pengetahuan, I., Islam, U., Fatmawati, N., & Bengkulu, S. (2022). Peran enzim dalam metabolisme berdasarkan al - qur'an dan hadist. *Peran Enzim Dalam Metabolisme Berdasarkan Al -Qur'an Dan Hadist*, *1*, 27–35.
- Saputra, N. (2021). *MIKROORGANISME DALAM AL-QUR'AN (Analisis Penafsiran Mustafa al-Maraghi terhadap Kata Famâ Fauqahâ Pada Surat Al-Baqarah Ayat 26)* (Issue 050) [Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau]. <http://repository.uin-suska.ac.id/id/eprint/50743>
- Sasagawa, N. (2018). Plasmid Purification. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76773>
- Scopes, R. K. (2002). Enzyme Activity and Assays. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000712>
- Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, *4*(1), 36. <https://doi.org/10.22146/ijl.v4i1.65550>
- Sevillano, L., Vijgenboom, E., van Wezel, G. P., Díaz, M., & Santamaría, R. I. (2016). New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0425-7>

- Shivlata, L., & Satyanarayana, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>
- Stoytcheva, M., Montero, G., Zlatev, R., A. Leon, J., & Gochev, V. (2012). Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review. *Current Analytical Chemistry*, 8(3), 400–407. <https://doi.org/10.2174/157341112801264879>
- Sudarshana, S., Noor, S., & Punekar, N. S. (2001). On the importance of controls in enzyme assays - an odd example. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 5, 75–77.
- Tanio, E. P., Mursyanti, E., & Pramana Yuda, I. (2017). HEAT-SHOCK TRANSFORMATION EFFICIENCY OF pTA7002-AtRKD4 INTO Escherichia coli BL21 (DE3). *Atmajaya Journal*, 21.
- Tilawah, S., Rafika, S., & Apridamayanti, P. (2017). Optimalisasi Volume DNA Marker dan Volume DNA Hasil Amplifikasi Gen tetL Resistensi Antibiotik Tetrasiklin dari Bakteri Bacillus cereus pada Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN, Vol. 5 No.(6)*.
- Vandermeulen, G., Marie, C., Scherman, D., & Pr at, V. (2011). New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Molecular Therapy*, 19(11), 1942–1949. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.182>
- Vishnupriya, B., Sundaramoorthi, C., Kalaivani, M., & Selvam, K. (2010). Production of lipase from Streptomyces griseus and evaluation of Bioparameters. *International Journal of Chemtech Research*, 2(3), 1380–1383.
- Walton, J. R. (1978). Apramycin, a new aminocyclitol antibiotic: I. In vitro microbiological studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 4(4), 309–313. <https://doi.org/10.1093/jac/4.4.309>
- Wang, Q., Cen, Z., & Zhao, J. (2015). The survival mechanisms of thermophiles at

high temperatures: An angle of omics. *Physiology*, 30(2), 97–106.  
<https://doi.org/10.1152/physiol.00066.2013>

Whitaker, J. R. (2004). Factors affecting enzyme activity in foods. *Proteins in Food Processing*, 10, 270–291. <https://doi.org/10.1533/9781855738379.2.270>

Wulandari, S., & Sulistyani, N. (2016). PENGARUH MEDIA TERHADAP PERTUMBUHAN ISOLAT ACTINOMYCETES KODE AL35 SERTA OPTIMASI PRODUKSI METABOLIT ANTIBAKTERI BERDASARKAN WAKTU FERMENTASI DAN pH. *Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi*, 13(2), 186. <https://doi.org/10.12928/mf.v13i2.7770>

Yao, W., Liu, K., Liu, H., Jiang, Y., Wang, R., Wang, W., & Wang, T. (2021). A Valuable Product of Microbial Cell Factories: Microbial Lipase. *Frontiers in Microbiology*, 12(September), 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743377>

Zahan, K. A., & Kano, M. (2018). Biodiesel production from palm oil, its by-products, and mill effluent: A review. *Energies*, 11(8), 1–25.  
<https://doi.org/10.3390/en11082132>

Zulaikha, A., Ningrum, S. S., & Guntama, D. (2021). Preliminary Study of Actinomycetes as Potential Biocatalyst in Biodiesel Production Through Microbial Lipase Activity. *Jurnal Presipitasi*, 18(3), 512–523.

S U R A B A Y A