

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SKRIPSI
PRODUKSI, PURIFIKASI SATU TAHAP, DAN
KARAKTERISASI ENZIM LIPASE REKOMBINAN DARI
***Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip**



AYU YANUARDANI

PROGRAM STUDI S-1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

2022

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SKRIPSI
PRODUKSI, PURIFIKASI SATU TAHAP, DAN
KARAKTERISASI ENZIM LIPASE REKOMBINAN DARI
Escherichia coli BL21 (DE3)-pET28b-SmLip



AYU YANUARDANI

PROGRAM STUDI S-1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

2022

SKRIPSI PRODUKSI, PURIFIKASI SATU... AYU YANUARDANI

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**PRODUKSI, PURIFIKASI SATU TAHAP, DAN
KARAKTERISASI ENZIM LIPASE REKOMBINAN DARI
Escherichia coli BL21 (DE3)-pET28b-SmLip**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia
pada Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Oleh

Ayu Yanuardani
081911533011

Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Dr. Sri Sumarsih, M.Si.

NIP. 196001101988102001

Pembimbing II,



Drs. Sofijan Hadi, M.Kes.

NIP. 196507141992031001

SKRIPSI

PRODUKSI, PURIFIKASI SATU...

AYU YANUARDANI

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Produksi, Purifikasi Satu Tahap, dan Karakterisasi Enzim
Lipase Rekombinan dari *Escherichia coli* BL21 (DE3)-
pET28b-SmLip
Penyusun : Ayu Yanuardani
NIM : 081911533011
Pembimbing I : Dr. Sri Sumarsih, M.Si.
Pembimbing II : Drs. Sofijan Hadi, M.Kes.
Tanggal Sidang : 7 Februari 2023

Disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dr. Sri Sumarsih, M.Si.

Drs. Sofijan Hadi, M.Kes.

NIP. 196001101988102001

NIP. 196507141992031001

Mengetahui,

Ketua Departemen Kimia

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Airlangga

Mochamad Zakki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D.

NIP. 198307022009121005

ii

SKRIPSI

PRODUKSI, PURIFIKASI SATU...

AYU YANUARDANI

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Ayu Yanuardani
NIM : 081911533011
Program studi : Kimia
Fakultas : Fakultas Sains dan Teknologi
Jenjang : Sarjana (S-1)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan naskah skripsi saya yang berjudul :

PRODUKSI, PURIFIKASI SATU TAHAP, DAN KARAKTERISASI ENZIM LIPASE REKOMBINAN DARI *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 23 Februari 2023



Yanuardani
NIM.081911 533011

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas kelimpahan rahmat-Nya penulis mampu menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul “Produksi, Purifikasi Satu Tahap, dan Karakterisasi Enzim Lipase Rekombinan dari *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*”.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu, memberikan bimbingan, dan motivasi kepada penulis, khususnya kepada:

1. Ibu Dr. Sri Sumarsih, M.Si. selaku dosen pembimbing I dan Bapak Drs. Sofijan Hadi, M.Kes. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan ilmu, bimbingan, pengarahan, dan nasihat dalam penyusunan naskah skripsi.
2. Bapak Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, M.Sc. selaku dosen wali yang telah memberikan motivasi dan restu dalam penyusunan skripsi.
3. Bapak Mochamad Zakki Fahmi S.Si, M.Si., Ph.D. selaku Ketua Departemen Studi Kimia dan Bapak/Ibu dosen kimia yang telah memberikan waktu dan restu kepada semua mahasiswa.
4. Bapak dan ibu penulis yang telah memberikan dukungan do’a dan materi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi.
5. Teman-teman angkatan 2019 yang telah bekerja bersama dan saling membantu.

Tulisan ini masih belum sempurna sehingga kritik dan saran untuk penulisan naskah skripsi ini sangat diharapkan.

Surabaya, 30 Januari 2023

Ayu Yanuardani

Yanuardani, Ayu, 2022, Produksi, Purifikasi Satu Tahap, dan Karakterisasi Enzim Lipase Rekombinan dari *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*, skripsi ini dibawah bimbingan Dr. Sri Sumarsih, M.Si. dan Drs. Sofijan Hadi, M.Kes., Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan produksi, purifikasi satu tahap, dan karakterisasi enzim lipase rekombinan dari *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*. Enzim lipase rekombinan diproduksi dalam media produksi Luria Bertani (LB) cair dan penambahan induser *Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside* (IPTG). Ekstrak kasar enzim lipase rekombinan dimurnikan dengan metode purifikasi satu tahap menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein*. Aktivitas enzim lipase rekombinan ditentukan menggunakan substrat p-nitrofenilpalmitat (p-NPP) dan karakterisasi enzim meliputi analisis *Sodium Dodesil Sulfat Polyacrylamide Gel* (SDS PAGE), pengujian pH dan suhu optimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim lipase rekombinan dapat dimurnikan menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein* menghasilkan aktivitas enzim sebesar 35,09 U/mL. Analisis SDS PAGE enzim yang telah dimurnikan diperoleh pita target dengan berat molekul 64 KDa. Karakter enzim lipase rekombinan bekerja optimum pada pH 7 dan suhu 37°C.

Kata kunci: Enzim lipase rekombinan, kit purifikasi *his-tagged protein*, IPTG, *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*

Yanuardani, Ayu, 2022, Production, One Step Purification, and Characterization of Recombinant Lipase Enzyme from *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip, this final project is under guidance of Dr. Sri Sumarsih, M.Si. dan Drs. Sofijan Hadi, M.Kes., Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRACT

This study aims to carry out production, one-step purification, and characterization of recombinant lipase from *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip. Recombinant lipase enzymes were produced in liquid Luria Bertani (LB) production medium and the addition of inducer Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). The crude extract of the recombinant lipase enzyme was purified by a one-step purification method using a his-tagged protein purification kit. The activity of the recombinant lipase enzyme was determined using p-nitrophenylpalmitate (p-NPP) substrate and the enzyme characterization included analysis of Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel (SDS PAGE), testing the optimum pH and temperature. The results showed that the recombinant lipase enzyme could be purified using a his-tagged protein purification kit resulting in an enzyme activity of 35.09 U/mL. SDS PAGE analysis of the purified enzyme obtained a target band with a molecular weight of 64 KDa. The character of the recombinant lipase enzyme works optimally at pH 7 and a temperature of 37°C.

Keywords: Recombinant lipase enzyme, his-tagged protein purification kit, IPTG, *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip

DAFTAR ISI

SKRIPSI.....	i
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Enzim Lipase.....	4
2.2. Bakteri Escherichia coli BL21 (DE3)-pET28b-SmLip.....	7
2.3. Faktor yang Memengaruhi Produksi Enzim	8
2.4. Elektroforesis Protein.....	10

2.5. Purifikasi enzim menggunakan poly-Histidine tag.....	12
BAB III METODE PENELITIAN.....	16
3.1. Tempat dan Waktu penelitian	16
3.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	16
3.2.1. Bahan penelitian.....	16
3.2.2. Alat penelitian	16
3.3. Prosedur Penelitian.....	17
3.3.1. Diagram alir penelitian.....	17
3.3.2. Pembuatan media	18
3.3.3. Peremajaan Escherichia coli BL21 (DE3)-pET28b-SmLip.....	18
3.3.4. Pembuatan inokulum Escherichia coli BL21 (DE3)-pET28b-SmLip	19
3.3.5. Produksi enzim lipase rekombinan	19
3.3.6. Purifikasi enzim lipase rekombinan dengan kit purifikasi his-tagged protein	19
3.3.7. Pembuatan kurva standar p-nitrofenol (p-NP)	21
3.3.8. Uji aktivitas enzim lipase rekombinan.....	21
3.3.9. Penentuan kadar protein.....	21
3.3.10. Pengujian pH optimum	22
3.3.11. Pengujian suhu optimum.....	22
3.3.12. Analisis SDS-PAGE	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1. Peremajaan bakteri E. coli BL21 (DE3)-pET28b-SmLip	24
4.2. Produksi enzim lipase rekombinan	25
4.3. Purifikasi enzim lipase menggunakan kit purifikasi his-tagged protein	26
4.3.1. Aktivitas enzim lipase rekombinan.....	28
4.3.2. Kadar Protein	29

4.3.3. Analisis SDS PAGE enzim lipase rekombinan.....	31
4.5. Karakterisasi enzim lipase rekombinan	32
4.5.1. pH optimum	32
4.5.2. Suhu optimum	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
5.1. Kesimpulan	35
5.2. Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN.....	40

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
Tabel 4.1.	Aktivitas enzim lipase rekombinan	32
Tabel 4.2.	Kadar protein enzim lipase rekombinan	33
Tabel 4.3.	Aktivitas spesifik enzim lipase rekombinan	34

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Stuktur lipase LipA dari <i>Serratia marcescens</i>	6
Gambar 2.2	Reaksi-Reaksi Enzim lipase	7
Gambar 2.3	Koloni <i>Escherichia coli</i>	9
Gambar 2.4	Peta plasmid rekombinan pET-28b-lip	11
Gambar 2.5	Struktur <i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i> (IPTG)	13
Gambar 2.6	Alat Elektroforesis SDS-PAGE	15
Gambar 2.7	Struktur Asam nitrilotriasetat	19
Gambar 2.8	Interaksi senyawa kompleks Ni-NTA dengan protein	20
Gambar 3.1	Diagram alir penelitian	22
Gambar 4.1	Hasil peremajaan bakteri <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)-pET28b- <i>SmLip</i>	31
Gambar 4.2	Inokulum <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)-pET28b- <i>SmLip</i>	28
Gambar 4.3	A. Suspensi sel; B. Ekstrak kasar enzim lipase rekombinan	29
Gambar 4.4	Reaksi enzim lipase dengan substrat <i>p</i> -NPP	32
Gambar 4.5	Hasil elektroforesis SDS PAGE. A. pita elektroforesis <i>flowthrough</i> , B. pita elektroforesis ekstrak kasar enzim lipase, C. pita elektroforesis enzim lipase setelah pemurnian	35
Gambar 4.6	Kurva aktivasi enzim lipase rekombinan terhadap variasi pH	37
Gambar 4.7	Kurva aktivasi enzim lipase rekombinan terhadap variasi suhu	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul
Lampiran 1	Pembuatan Larutan
Lampiran 2	Pengujian Aktivitas Enzim Lipase
Lampiran 3	Pengujian Kadar Protein Enzim Lipase
Lampiran 4	Perhitungan aktivitas spesifik enzim lipase
Lampiran 5	Pengujian pH optimum
Lampiran 6	Pengujian suhu optimum

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi mendorong perkembangan industri pangan dan non pangan. Berdasarkan data dan informasi dari Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), permintaan enzim industri naik 5–6% setiap tahunnya. Saat ini, sebagian besar enzim industri diperoleh dari impor Eropa, Cina, dan India. Oleh karena itu, banyak penelitian mendorong pengembangan teknologi enzim untuk pemenuhan kebutuhan enzim di berbagai industri. Enzim merupakan biokatalisator yang berperan penting dalam industri bioteknologi. Pemenuhan kebutuhan enzim untuk industri semakin tinggi karena enzim memiliki efisiensi dan efektivitas yang tinggi, tanpa menghasilkan produk samping, dan dapat digunakan berulang kali. Enzim dapat meningkatkan kecepatan proses kimia 10^8 hingga 10^{11} kali lebih cepat (Aryani, 2012).

Salah satu enzim yang berperan dalam bioteknologi yakni enzim lipase. Enzim lipase merupakan salah satu enzim hidrolisis yang menarik karena memiliki kestabilan tinggi pada media organik dan suhu tinggi. Enzim lipase mempunyai sifat spesifik memecah ikatan ester menjadi asam lemak dan gliserol serta mengkatalisis reaksi organik pada media air maupun non air (Bharathi *and* Rajalakshmi, 2019). Hal ini mendorong banyak peneliti untuk memproduksi enzim lipase dalam jumlah banyak dan menggunakan biaya ekonomis.

Enzim lipase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme misalnya bakteri, khamir, dan kapang. Penghasil enzim lipase dari kelas fungi yakni *Rizhopus sp.*, *Aspergillus sp.* (Idiawati *et al.*, 2015). Bakteri penghasil lipase seperti *Bacillus sp.* (Tran *et al.*, 2017), dan *Staphylococcus sp.* (Mosbah *et al.*, 2005). Enzim lipase dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti industri tekstil,

biokatalis sintesis senyawa organik, pengolahan limbah dan biodegradasi limbah minyak (Pratama, 2016), industri detergen (Layly dan Wiguna, 2016), industri parfum (Murni *et al.*, 2011), dan industri farmasi (Ramadhani *et al.*, 2015).

Strain bakteri mempunyai potensi lebih besar dalam memproduksi enzim lipase (Ramani *et al.*, 2010). Kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim dan didorong oleh permintaan enzim jumlah besar memungkinkan adanya produksi enzim dari bakteri rekombinan. *Serratia marcescens* LII61 merupakan isolat bakteri yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi enzim lipase, mannanase, selulase, amilase, dan protease (Cahyani *et al.*, 2017). Penelitian sebelumnya berhasil melakukan subkloning gen penyandi lipase dari *Serratia marcescens* ke dalam inang *Escherichia coli* BL21 (DE3) menggunakan *plasmid* pET28b(+) (Sumarsih *et al.*, 2022). Penelitian selanjutnya, dilakukan produksi enzim lipase rekombinan dari *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* dengan memvariasikan induser laktosa dan IPTG diperoleh hasil bahwa penggunaan induser IPTG lebih baik daripada laktosa (Pramesti, 2021).

Hasil produksi enzim perlu untuk dimurnikan dengan tujuan memisahkan dan mengisolasi enzim dari lisat sel sehingga diperoleh enzim dengan aktivitas spesifik tinggi. Pengembangan teknik purifikasi enzim dari bakteri rekombinan dilakukan untuk menghasilkan kemurnian produk enzim yang tinggi. Salah satu teknik purifikasi enzim rekombinan adalah *poly-Histidine* Tag merupakan salah satu teknik purifikasi enzim rekombinan melalui pengikatan spesifik penanda histidin protein dengan metal-kelat resin Ni-NTA (Tallet *et al.*, 2001). Enzim lipase rekombinan dari *E.coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* memiliki penanda histidin sehingga dapat dilakukan purifikasi menggunakan *Histidine* tag. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan produksi enzim lipase rekombinan dari bakteri *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* dengan induser IPTG, purifikasi enzim menggunakan teknik *poly-Histidine* tag, dan karakterisasi enzim lipase rekombinan.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

1. Berapakah aktivitas enzim lipase rekombinan hasil produksi dari bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip menggunakan induser *isoprophyl- β -D-thiogalactoside* (IPTG)?
2. Apakah enzim lipase rekombinan dapat dipurifikasi dengan metode satu tahap kit purifikasi *his-tagged protein*?
3. Bagaimana karakter enzim lipase rekombinan yang telah dipurifikasi menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein*?

1.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, tujuan penelitian ini adalah:

1. Menentukan aktivitas enzim lipase rekombinan hasil produksi dari bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip menggunakan induser *isoprophyl- β -D-thiogalactoside* (IPTG).
2. Melakukan purifikasi satu tahap kit purifikasi *his-tagged protein* hasil produksi enzim lipase rekombinan dari *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-SmLip.
3. Menentukan karakter enzim lipase rekombinan yang telah dipurifikasi menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein*.

1.4. Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai karakter enzim lipase rekombinan dan pengetahuan mengenai purifikasi enzim rekombinan menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein* yang dapat dikembangkan lebih luas.

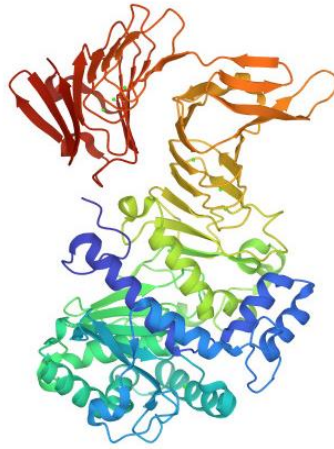
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim Lipase

Enzim adalah biomolekul yang berfungsi sebagai biokatalisator reaksi kimia, yang artinya mampu mempercepat proses kimia dengan menurunkan energi aktivasi dan diperoleh kembali pada akhir reaksi. Enzim merupakan reaktan yang bereaksi dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat (ES) dan terurai kembali membentuk produk dan enzim bebas. Sebagian besar enzim adalah protein. Enzim dibagi menjadi beberapa bagian yakni apoenzim dan gugus prostetik. Apoenzim adalah bagian protein yang tidak stabil secara termal, sedangkan gugus prostetik adalah bagian enzim yang mengandung logam atau senyawa organik. Enzim memiliki sifat spesifik sebagai biokatalis dan labil terhadap panas (Murni *et al.*, 2015).

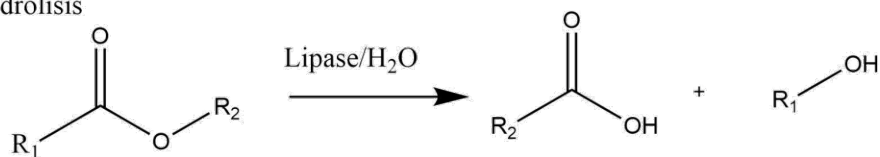
Enzim lipase adalah enzim hidrolase-esterase yang memecah lemak menjadi gliserol dan asam lemak. Enzim hidrolase merupakan enzim katalisis melalui reaksi pemecahan hidrolitik atau sebaliknya. Lipase bertindak mengkatalisis reaksi dua arah. Enzim lipase dapat digunakan sebagai katalis untuk sintesis ester dan transesterifikasi untuk produksi biodiesel (Layly *and* Wiguna, 2016). Karakteristik spesifik enzim lipase memiliki reaktivitas yang lambat pada air dan mampu bekerja tanpa media air. Aktivitas enzim lipase dipengaruhi pH, suhu, dan tidak adanya garam dalam substrat. Enzim lipase memiliki pH optimum sekitar 4,5-8,0 dan suhu optimum antara 35°C-50°C. Aktivitas enzim lipase optimal pada pH 5 dan suhu 50°C (Bharathi *and* Rajalakshmi, 2019). Aktivitas enzim berjalan sebanding dengan jumlah substrat, suhu dan pH optimum enzim. Suhu yang terlalu tinggi akan mengakibatkan enzim terdenaturasi termal dan mengalami penurunan fungsi katalitik.



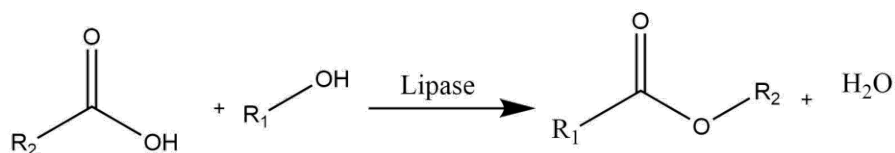
Gambar 2.1. Struktur lipase LipA dari *Serratia marcescens* (Meier *et al.*, 2007)

Enzim lipase dapat mengkatalisis berbagai macam reaksi hidrolisis seperti esterifikasi, transesterifikasi, alkoholisis, asidolisis, dan aminolisis (Vakhlu *and* Kour, 2006). Enzim lipase dapat diproduksi dari biji tumbuhan, hewan, dan berbagai mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan khamir. Biji tanaman memiliki aktivitas lipolitik yang tinggi seperti jagung, timun, dan kapas. Lipase hewan dapat ditemukan di beberapa bagian organ seperti pankreas, lambung, dan limpa. Jamur merupakan sumber penghasil lipase yang tinggi (Riwayati *et al.*, 2012). Lipase diperoleh pada bakteri, jamur, dan khamir dalam bentuk enzim intraseluler dan ekstraseluler. Beberapa mikroorganisma penghasil enzim lipase adalah jamur (*Rizhopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Geothricum sp.*, *Mucor sp.*, *Thricordema reseei*, *Fusarium sp.*, dan *Rizhomucor sp.*), Khamir (*Candida sp.*, *Rhodotorula sp.*) dan bakteri (*Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderi sp.* Dan *Staphylococcus sp.*) (Rigo *et al.*, 2010).

Reaksi Hidrolisis



Reaksi Esterifikasi



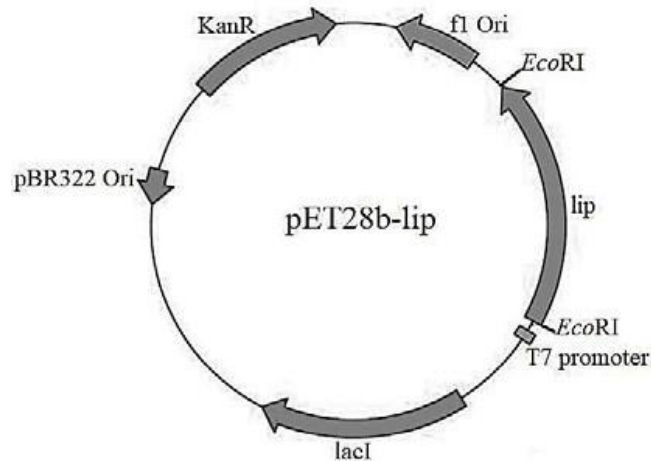
Gambar 2.2. Reaksi-reaksi enzim lipase

Penggunaan dan pengaplikasian enzim lipase dalam industri sangat besar yaitu sebagai katalis produk oleokimia seperti trigliserida rendah kalori, minyak kaya EPA dan DHA (Salgado *et al.*, 2022), biodetergen (Layly & Wiguna, 2016), biodiesel (Hala *et al.*, 2009), bidang tekstil, dan bidang farmasi. Lipase digunakan sebagai bahan industri deterjen karena memiliki spesifisitas substrat yang mampu menghidrolisis lemak, kemampuan bertahan pada kondisi pencucian yang ekstrim pH 10-11, dan stabilitas tinggi terhadap surfaktan yang mampu merusak fungsi enzim lipase. Begitu pula penggunaan enzim lipase pada biodiesel melalui reaksi transesterifikasi menghasilkan dua fasa, dimana fasa bawah berupa gliserol dan fasa atas berupa metil ester atau biodiesel (Hala *et al.*, 2009). Produk dipisahkan dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana. Aplikasi lipase dalam industri oleokimia adalah produksi asam lemak dari minyak melalui hidrolisis. Asam lemak bebas dapat diaplikasikan luas dalam pembuatan sabun, industri makanan, dan bidang biomedis. Penggunaan enzim lipase ini mampu sebagai alternatif penghematan energi karena dapat dilakukan pada suhu yang lebih rendah, selektivitas yang tinggi, menghasilkan produk dengan kemurnian tinggi, mengurangi dampak pencemaran bahan kimia, tidak beracun, dan tidak meninggalkan residu yang berbahaya.

2.2. Bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*

Escherichia coli merupakan kelompok bakteri gram negatif yang bersifat aerobik maupun anaerobik fakultatif. *E.coli* memiliki karakteristik morfologi tidak berspora, berbentuk batang, dan memiliki motil berbentuk flagel peritrik. Bakteri *E.coli* membentuk koloni bundar, cembung, dan memiliki tepi yang nyata. Bakteri *E. coli* memiliki suhu maksimum pertumbuhan 40°- 45°C. Bakteri *Escherichia coli* tumbuh memiliki fase log dan fase lag dan kondisi steady state pada OD₆₀₀ berkisar 0,3 hingga 0,7 (Donovan *et al.*, 1996).

Escherichia coli BL21 (DE3) merupakan hasil kloning gen *E.coli* BL21 yang memiliki lisogen DE3 yang mengekspresikan T7 RNA polimerase dan diinduksi oleh IPTG (Tran *et al.*, 2017). BL21 merupakan strain *E.coli* yang kuat dan mampu tumbuh dalam media minimal serta tidak menyebabkan penyakit. Pada penelitian sebelumnya, *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* rekombinan membawa gen penyandi lipase dari bakteri *Serratia marcescens* (Sumarsih *et al.*, 2022).



Gambar 2.4. Peta plasmid rekombinan pET-28b-lip(Sumarsih *et al.*, 2022)

Eksresi lipase diperoleh dengan menumbuhkan sel *E. coli* rekombinan dalam media spesifik lipolitik yang mengandung IPTG sebagai penginduksi. IPTG berfungsi untuk menginduksi ekspresi T7 RNA sebagai *starting* transkripsi gen. Klon positif

menyimpan pET-28b-lip yang mampu mengekspresikan gen lipase dan memberikan fluoresen oranye pada kultur bakteri (Sumarsih *et al.*, 2022).

2.3. Faktor yang Memengaruhi Produksi Enzim

Produksi enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti media produksi, induser, aerasi, dan suhu, pH, waktu inkubasi.

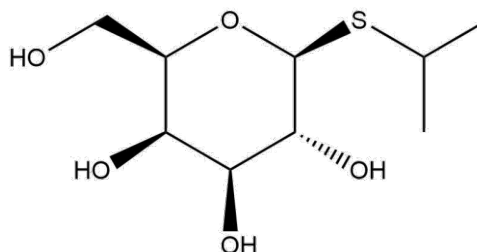
1. Media Produksi

Media produksi merupakan syarat utama dalam produksi enzim. Media produksi harus memiliki komposisi sesuai kebutuhan sumber makanan mikroorganisme seperti karbon, nitrogen, fosfor, sulfur, dan mineral lainnya. Media produksi untuk bakteri umumnya kaya unsur karbon dan nitrogen. Sumber unsur dapat diperoleh dari *tryptone*, ammonium sulfat, *beef extract*, dan *yeast extract*. Media produksi dipengaruhi oleh konsentrasi medium. Konsentrasi medium sebanding dengan produksi enzim lipase (Indah *et al.*, 2017). Semakin tinggi konsentrasi, kandungan, dan jumlah substrat maka produksi enzim yang dihasilkan semakin banyak dan memiliki nilai aktivitas enzim yang tinggi. Bakteri yang menyandi gen enzim lipase dapat diproduksi dalam media Luria Bertani (LB) mengandung tripton. Media Luria Bertani tidak memiliki gula yang dapat dikatabolisme tetapi memiliki konsentrasi tinggi dari amino yang dapat dikatabolisme (Sezonov *et al.*, 2007). Bakteri *Escherichia coli* berhenti tumbuh pada saat sumber karbon habis, meskipun nutrisi anorganik tetap berlimpah.

2. Induser

Induser merupakan suatu zat yang ditambahkan dalam media produksi untuk meningkatkan kerja mikroorganisme menghasilkan suatu enzim. Induser yang umum digunakan untuk produksi enzim lipase yakni mengandung minyak atau asam lemak (Murni *et al.*, 2015). *Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) merupakan salah satu agen penginduksi. Dalam penelitian sebelumnya, dengan membandingkan penggunaan induser IPTG dan laktosa menunjukkan IPTG lebih

baik daripada laktosa karena bukan substrat yang tepat untuk jalur metabolisme laktosa (Pramesti, 2021).



Gambar 2.5. Struktur *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG)

Proses kerja induker IPTG terhadap *Escherichia coli* yakni dalam sel *Escherichia coli* yang ditransformasi, tanpa IPTG, LacI berikatan dengan LacO. Pengikatan LacI memblokir T7 RNA polimerase sehingga tidak ada produksi protein. Ketika IPTG ditambahkan, IPTG mengeluarkan LacI dari LacO sehingga T7 RNA polimerase berikatan dengan promotor T7 dan memulai transkripsi gen penyandi enzim. Konsentrasi IPTG yang efektif ditambahkan untuk induksi berkisar 500-1000 μM untuk menjaga represor LacI dari sisi pengikatannya.

3. Aerasi

Aerasi merupakan suatu proses penambahan udara yang disirkulasikan dalam kontak dekat. Aerasi bertujuan untuk pengaliran udara di sekitar media dan menjaga pasokan oksigen untuk pertumbuhan sel. Apabila sistem aerasi terganggu selama produksi akan mengakibatkan ketidakmaksimalan hingga kegagalan produksi enzim. Umumnya penggunaan aerasi ini disertai perlakuan pengadukan untuk menghomogenkan.

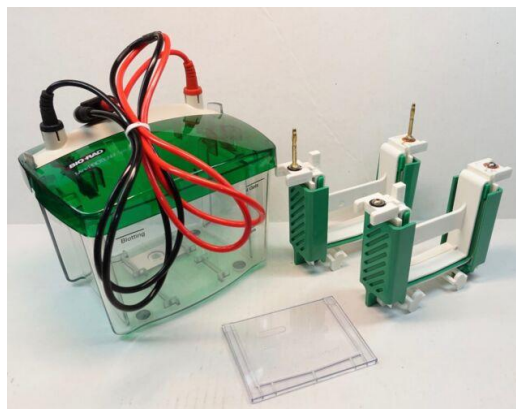
4. Suhu, pH, dan Waktu Produksi

Produksi suatu enzim juga dipengaruhi oleh suhu, pH, dan waktu optimal produksi. Suhu dan pH yang digunakan dalam produksi enzim yakni suhu dan pH optimal aktivitas enzim. Setiap isolat bakteri rekombinan memiliki suhu dan pH optimal produksi yang berbeda-beda. Waktu optimal produksi dapat ditentukan sebelum produksi membuat kurva produksi. Bila suatu enzim diproduksi dengan

substrat pada kondisi pH, suhu, dan waktu optimal produksi yang sesuai, enzim yang akan diperoleh semakin banyak sebanding dengan waktu optimal produksi (Ramadhani *et al.*, 2015). Suhu mempengaruhi aktivitas enzim dimana meningkatnya suhu akan meningkatkan kecepatan reaksi karena terjadinya peningkatan energi aktivasi dan meningkatnya tumbukan antar molekul. Pada suhu ekstrem tinggi, protein enzim mengalami denaturasi yang mengakibatkan perubahan struktur protein sehingga sisi aktif berubah dan penurunan aktivitas enzim (Aryani, 2012). Enzim akan inaktif pada suhu tinggi dan lingkungan pH sangat rendah (asam kuat) dan pH tinggi (basa kuat). Enzim sebagai protein memiliki banyak tempat pengikatan proton sehingga terjadi ionisasi dengan pengikatan dan melepaskan proton pada gugus amino, karboksil, dan gugus fungsional lainnya. Perubahan pH enzim akan menyebabkan ionisasi pada molekul protein berubah dan dapat mengakibatkan struktur tiga dimensi protein enzim berubah sehingga fungsi katalitik enzim terganggu (Murni *et al.*, 2015).

2.4. Elektroforesis Protein

Elektroforesis gel merupakan sebuah metode pemisahan molekul besar seperti protein, fragmen DNA, dan RNA berdasarkan perbedaan tingkat migrasi dan ukuran molekul pada medan listrik. Apabila molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium (misal agarosa), maka molekul berjalan memisah dimana muatan negatif menuju muatan positif. Gel yang digunakan yaitu agarose gel (elektroforesis DNA) dan poliakrilamid gel (elektroforesis protein).



Gambar 2.6. Alat Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis gel poliakrilamid memisahkan protein atau enzim dalam keadaan terdenaturasi menggunakan penambahan sodium dodesil sulfat (SDS). Bagian hidrofobik SDS mengikat sisi hidrofobik protein atau enzim dan terjadi pemisahan. Penambahan β -merkaptotanol bertujuan memecah protein sebagai sub unit terkecilnya (Sambrook *and* Russell, 2006). SDS atau *sodium dodecyl sulfate* berfungsi memberikan muatan negatif protein atau enzim. SDS juga mendenaturasi protein, membantu menyeimbangkan kondisi dan menyederhanakan protein (bentuk, ukuran, muatan). Muatan negatif SDS sebagian mengganggu struktur kompleks protein dan tertarik kuat ke anoda. SDS-PAGE adalah metode tepat untuk menentukan berat molekul (MW) protein yang tidak diketahui. Laju pergerakan protein berlapis SDS berbanding terbalik dengan logaritma MW. Berat molekul (simbol m) diwakili oleh Dalton (Da). Dalton didefinisikan sebagai 1/12 massa C-12. Makromolekul biasanya berukuran kilodalton (kDa).

Bahan-bahan yang digunakan untuk elektroforesis SDS-PAGE yaitu akrilamida, bisakrilamida, *Ammonium persulfate*, *sodium dodesil sulfate*, tetrametiletildiamin (TEMED), larutan buffer, bromophenol blue, dan arus listrik. Gel akrilamida berfungsi mencegah difusi akibat peningkatan panas dari arus. Selain itu, gel akrilamida digunakan untuk memisahkan molekul protein kecil. Konsentrasi total akrilamida dalam gel dapat mempengaruhi migrasi protein. Gel akrilamida secara spontan berpolimerisasi tanpa adanya oksigen (Onishi *et al.*, 2015). Bisakrilamida berfungsi sebagai agen pengikat silang dan membentuk kisi dengan polimer akrilamida. Grid atau kisi-kisi adalah filter protein. Rasio akrilamida terhadap bisakrilamida disesuaikan menurut berat molekul protein. Semakin rendah berat molekul suatu protein, semakin tinggi konsentrasi akrilamida untuk memperkecil kisi. Karakteristik poliakrilamida adalah tidak bereaksi dengan sampel, tidak membentuk matriks, tidak mengganggu pergerakan, dan memiliki daya pisah yang tinggi.

Stacking gel merupakan gel pengumpul yang terdapat pada bagian atas alat elektroforesis. *Stacking* gel memiliki resolusi pemisahan yang lebih tinggi. *Stacking*

gel dibuat dari campuran 30% akrilamida, Tris HCl 1M pH 6,8, akuades steril, 10% SDS, 10% amonium fosfat (APS), dan TEMED. *Stacking* gel digunakan untuk mencetak sumur. Selama elektroforesis, protein atau enzim tertarik ke dasar arus. Protein dengan berat molekul terendah bergerak lebih cepat dan tertarik ke bagian bawah gel, sedangkan protein dengan berat molekul tertinggi berada di bagian atas gel (Harahap, 2018).

Larutan Buffer berfungsi untuk mempertahankan pH di dalam medium pemisah, dan penyedia elektrolit. Pemisahan terjadi pada titik isolistrik yaitu titik ketika pH suatu makromolekul bermuatan nol akibat bertambahnya atau kehilangan muatan. Pada kekuatan ionik yang rendah terjadi pergerakan molekul yang cepat sedangkan pada kekuatan ionik yang tinggi, diperoleh pita-pita yang tajam, namun terjadi produksi panas yang lebih tinggi dan pergerakan jarak pendek. Pewarnaan gel terdiri dari pewarnaan commasive brilliant blue dan pewarnaan *silver salt staining*. *Commasive brilliant blue* mengikat spesifik dengan ikatan kovalen. Pada suhu kamar, kekuatan ion medan listrik dalam kisaran 2-8 V/cm, apabila kekuatan medan magnet melebihi 10 V/cm dapat terjadi efek pemanasan dan proses evaporasi dapat mengakibatkan hilangnya air pada media penyangga hingga menyebabkan senyawa terdenaturasi.

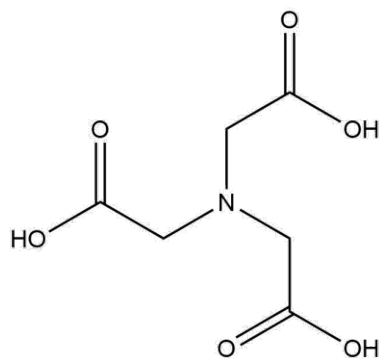
2.5. Purifikasi enzim menggunakan poly-Histidine tag

Purifikasi enzim merupakan proses memisahkan enzim dari debris dan mengisolasi enzim untuk meningkatkan aktivitas enzim, stabilitas, dan umur simpan. Purifikasi enzim dapat dibedakan menjadi 2 metode yakni metode *one-step* purifikasi dan *multi-step* purifikasi. Metode *multi-step* purifikasi enzim seperti presipitasi amonium sulfat, ultrafiltrasi, ultrasentrifugasi, dan dialisis. Presipitasi amonium sulfat umum digunakan dalam purifikasi enzim ekstraseluler, diikuti oleh beberapa pemisahan kromatografi. Teknik kromatografi yang dapat digunakan untuk purifikasi enzim yakni pertukaran anion-kation, filtrasi gel, kromatografi kolom afinitas, kromatografi cair protein cepat (FPLC), kromatografi interaksi hidrofobik, dan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Namun proses kompleks ini menimbulkan kerugian seperti waktu yang lama,

kurang efisien, dan tidak berkelanjutan. Sedangkan metode *one-step* purifikasi yaitu metode satu tahap purifikasi yang memiliki kelebihan hemat waktu, diperoleh kemurnian yang tinggi, dan proses yang efisien.

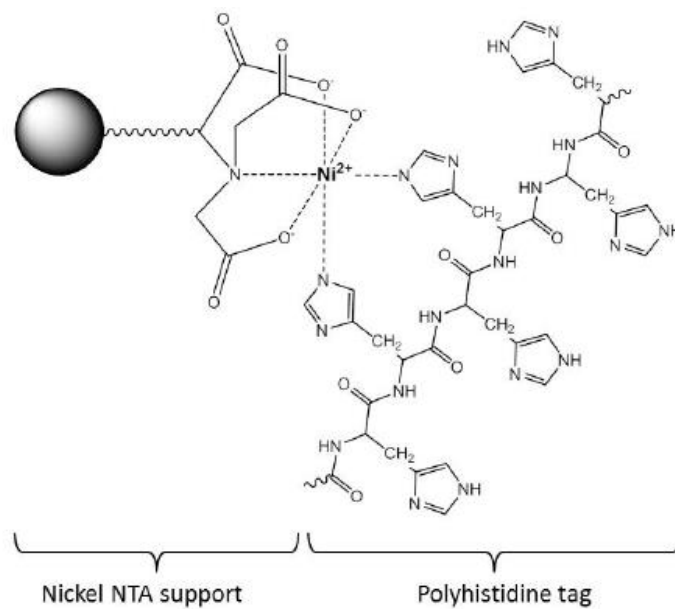
Poly-histidine tag merupakan salah satu teknik satu tahap purifikasi enzim yang diperoleh dari strain rekombinan melalui pengikatan spesifik dengan metal-kelat (Hohenfeld *et al.*, 1999). Metode ini memiliki afinitas kation logam yang tidak dipengaruhi oleh lipatan struktur sekunder protein didasarkan pada interaksi ion logam transisi (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) diimobilisasi pada matriks dan rantai samping asam amino spesifik. Tag yang biasa digunakan antara lain *poly-histidine* (His-tag), glutathione S-transferase, protein pengikat maltosa, dan tioredoksin (Magdeldin and Moser, 2012). Histidine adalah asam amino yang menunjukkan interaksi kuat dengan matrik sebagai kelompok donor elektron pada cincin imidazole dan histidine mudah membentuk ikatan koordinasi dengan logam transisi bergerak. Untuk purifikasi protein rekombinan, asam amino tambahan sering ditambahkan adalah 6xHis atau *poly-His* tag pada N- atau C- terminal protein dan mengikat ion logam transisi.

Enzim yang memiliki histidine tag mengikat ion logam yang diimobilisasi pada matriks kolom dalam kondisi buffer tertentu dan protein terikat dielusi dengan mengubah pH atau dengan menambahkan molekul kompetitif seperti imidazol. Asam nitrilotriasetat (NTA) merupakan asam aminopolikarboksilat yang mampu membentuk ikatan koordinatif dengan ion logam divalen dalam jenis ikatan yang disebut khelat. Ni-NTA juga sebagai khelator tetradentat karenan menempati 4 dari 6 sisi pengikat dalam koordinasi ion Ni^{2+} . Dua sisi tersisa ditempati oleh molekul air dan dapat digantikan dengan tag histidine dari protein rekombinan. Kompleks ion logam NTA dapat secara khusus berinteraksi dengan residu asam amino tertentu yang kompatibel secara kimia (Bhardwaj *et al.*, 2020). Imidazole memiliki struktur yang sama dengan cincin rantai samping residu histidine hal inimenjadikan imidazole dapat menggantikan protein untuk berikatan dengan lgan sehingga protein target dapat terelusi dari kolom.



Gambar 2.7. Struktur Asam nitrilotriasetat

Agarosa Ni-NTA menggunakan NTA sebagai ligan pengkelat dalam matriks agarosa 6% yang terikat silang. Kit purifikasi *his-tagged protein* digunakan untuk purifikasi cepat protein rekombinan. Kit ini berisi kolom siap pakai 0,2 ml resin agarosa Ni-NTA dalam etanol 30%. Prinsip kerja adalah kit *poly-His* tag mengikat ligan logam pada sekitar kondisi pH 7-8 karena gugus donor elektron pada cincin histidin imidazol membentuk ikatan koordinasi dengan logam transisi yang tidak bergerak. Setelah itu, protein dielusi dengan menurunkan pH hingga 4-5 dengan mengatur pH buffer kolom atau menambahkan imidazol bebas ke buffer kolom. Setelah diimobilisasi, imidazol digunakan untuk mengganggu daya tarik muatan antara resin kromatografi afinitas logam yang diimobilisasi (Tallet *et al.*, 2001). Protein mengandung histidin yang dielusi dibersihkan menggunakan kolom *desalting* untuk menghilangkan imidazol. Kemudian dielusi dengan buffer pengelusi untuk memutus ikatan protein atau enzim hingga lepas dan keluar bersama eluen.



Gambar 2.8. Interaksi kompleks Ni-NTA dengan protein (Magdeldin and Moser, 2012).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga selama enam bulan dalam jangka waktu Agustus-Desember 2022.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan penelitian

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*. Bahan-bahan kimia yang digunakan yaitu *bacto-triptone*, *yeast* ekstrak, NaCl, *bacto-agar*, akuades, akuabides, *water free nucleus*, alkohol 70%, antibiotik kanamisin, buffer tris-HCl 0,05M pH 8, Na₂CO₃, *isopropil-β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG), substrat *p*-nitrofenilpalmitat (*p*-NPP), *p*-nitrofenol (*p*-NP), buffer fosfat pH 7, isopropanol, larutan BSA, pereaksi Bradford, buffer imidazol, *HIS-tagged bacterial protein purification kit spin column*(HigenoMB), NaOH, akrilamid, N-N' bis metilen-akrilamid, sodium dodesil sulfat (SDS), ammonium persulfat (APS), N,N,N',N'-Tetramethylenetilendiamine (TEMED), HCl, Tris-base, gliserol, β-merkaptotanol, *bromophenol blue*, glisin, asam asetat pekat, *comassie brilliant blue* R250, dan methanol.

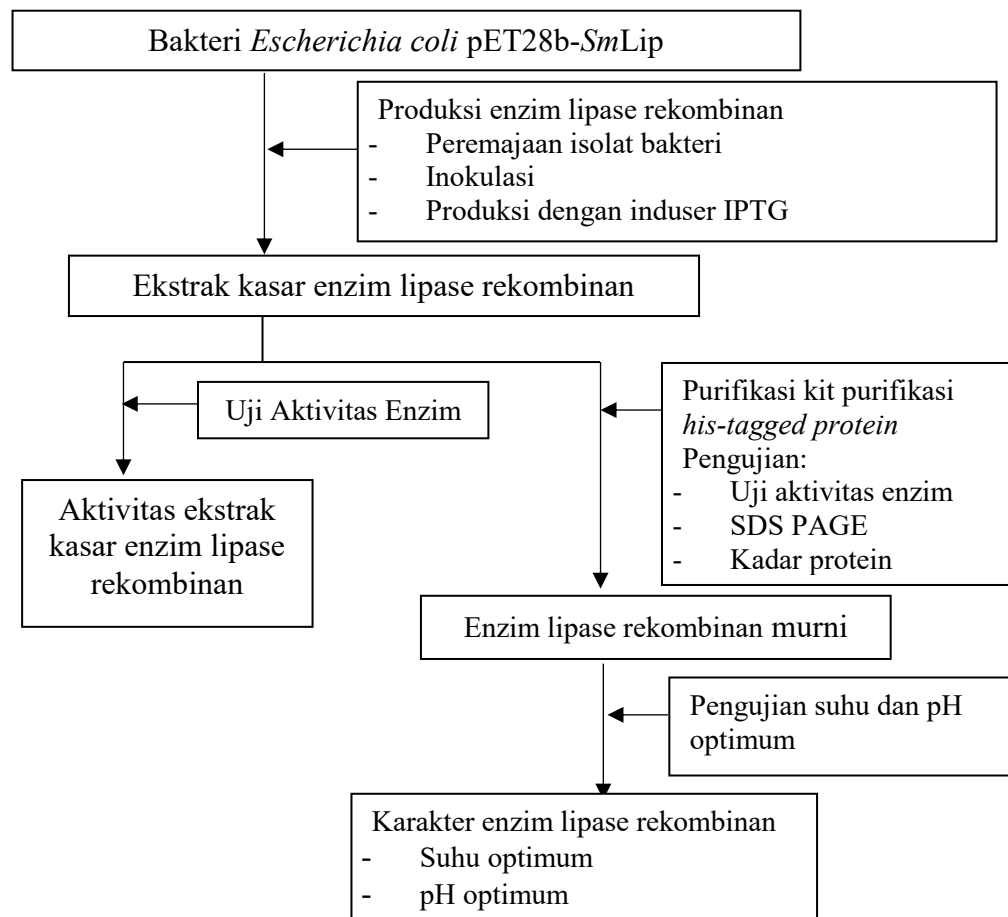
3.2.2. Alat penelitian

Peralatan gelas dan instrumen yang digunakan dalam penelitian adalah timbangan analitik, bunsen, *petridish dispossable*, erlenmeyer, mikrotube, spatula, *magnetic stirrer*, oven, mikropipet, jarum ose, autoklaf, penangas air, kuvet plastik, lemari pendingin, microplate, hot plate, sentrifugator, tabung eppendorf, tip berbagai ukuran, spektrofotometer UV-Vis Bio Rad, inkubator shaker KS4000i, vortex Velp Wizard,

laminar air flow cabinet, sonikator Ultrasonic Homogenizer, *waterbath*, pH meter Mettler Toledo, dan seperangkat alat elektroforesis SDS PAGE.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Diagram alir penelitian



Gambar 3.1. Diagram alir penelitian

3.3.2. Pembuatan media

3.3.2.1. Media Luria Bertani (LB) padat

Media Luria Bertani padat digunakan sebagai media biakan *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* yang dibuat dari 0,5% (b/v) ekstrak *yeast*, 1% (b/v) NaCl, 1% (b/v) tripton, dan 2% (b/v) bacto-agar. Semua bahan dimasukkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades. Campuran media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah itu, penambahan 50 µg/mL antibiotik kanamisin. Media dituang ke cawan petri steril dan dibiarkan hingga memadat. Media dalam cawan petri dimasukkan oven suhu 37°C selama 18 jam.

3.3.2.2. Media Luria Bertani (LB) cair

Media Luria Bertani cair digunakan sebagai media inokulasi dan produksi. Media ini dibuat dari 0,5% (b/v) ekstrak *yeast*, 1% (b/v) NaCl, dan 1% (b/v) *bacto trypton*. Semua bahan dimasukkan dalam Erlenmeyer, dilarutkan dengan akuades, dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media LB cair untuk inokulasi ditambah dengan kanamisin 50 µg/mL dan disimpan di lemari pendingin hingga media akan digunakan.

3.3.3. Peremajaan *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*

Peremajaan isolat *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* dilakukan untuk menghasilkan koloni tunggal dengan metode cawan gores (streak plate method). Langkah pertama, mengambil stok isolat bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* rekombinan menggunakan kawat ose dan digoreskan secara zig zag dalam 4 kuadran, dilakukan dalam laminar air flow. Setelah itu, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diperoleh hasil biakan berupa koloni tunggal pada permukaan agar.

3.3.4. Pembuatan inokulum *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*

Hasil biakan *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* rekombinan diambil satu koloni menggunakan kawat ose. Kemudian biakan bakteri diinokulasikan dalam labu Erlenmeyer yang berisi 20 mL media cair LB-kanamisin dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan pengocokan 150 rpm selama 16 jam dengan waktu sesuai dengan fase log yang didapatkan dari kurva pertumbuhan.

3.3.5. Produksi enzim lipase rekombinan

Produksi enzim lipase rekombinan dari *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* dilakukan pada media LB cair 2x150mL. Langkah awal, menambahkan inokulum sebanyak 2% dalam media LB cair kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator 150 rpm, suhu 37°C. Penambahan inducer IPTG 1mM dilakukan setelah 2 jam inkubasi. Setelah itu, media diinkubasi kembali selama 20 jam. Pemanenan enzim dilakukan melalui pemisahan pelet sel dengan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit dan didapatkan pelet sel untuk proses lisis dengan ultrasonikator. Pellet sel dihomogenkan dengan buffer fosfat pH 7 menggunakan vortex. Suspensi sel kemudian dilisis menggunakan ultrasonikator dengan pengaturan system 60s on - 60s off selama 20 menit. Kemudian ekstrak kasar enzim dipisahkan dari debris sel dengan sentrifugasi 6000 rpm selama 6 menit. Hasil lisis diperoleh supernatant atau ekstrak kasar enzim lipase rekombinan intraselular.

3.3.6. Purifikasi enzim lipase rekombinan dengan kit purifikasi *his-tagged protein*

Tahapan purifikasi enzim lipase rekombinan menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein* sebagai berikut:

1. Penghilangan bahan pengawet, dilakukan dengan membuka tutup bawah kolom dan memasukkan ke dalam tabung pengumpul 2 ml. Sentrifugasi pada 500 x g selama 1 menit.

2. Menyeimbangkan kolom spin dengan 0,4 ml buffer kesetimbangan dan aduk secara manual. Sentrifugasi pada 500 x g selama 1 menit dan mengulangi langkah 1x. Buffer kesetimbangan yakni buffer imidazole 10mM.
3. Penambahan sampel, menutup outlet spin kolom dengan tutup dan tambahkan sampel yang mengandung protein his-tag untuk dimurnikan melalui bagian atas spin kolom. Tutup tutupnya dan pertahankan sampel dan resin dalam kontak setidaknya selama 30 menit sebelum melepas tutup bawah. Mencampurkan secara manual dengan membalik kolom spin. Sentrifugasi pada 500 x g selama 1 menit.
4. Pencucian kolom, memindahkan kolom spin ke tabung pengumpul yang baru. Tambahkan 0,4 ml buffer pencuci untuk menghilangkan semua protein yang belum tertahan di kolom. Mencampur secara manual dengan membalik kolom spin. Sentrifugasi pada 500 x g selama 1 menit dan buang alirannya. Mengulangi langkah pencucian dua kali. Buffer pencuci yang digunakan mengandung imidazole 20mM.
5. Elusi protein murni, memindahkan kolom spin ke tabung pengumpul baru dan tutup outlet kolom dengan penutup. Menambahkan 0,4 ml buffer elusi dan tutup penutupnya. Mengaduk rata selama 10 menit sebelum melepas tutup bawah. Sentrifugasi pada 500x g selama 1 menit, mengumpulkan eluat dan beri label. Mengulangi langkah eluasi dua kali untuk total tiga eluat. Buffer pengelusi mengandung imidazole 250mM.
6. Regenerasi dan penyimpanan kolom. Regenerasi kolom diperlukan ketika akan mengubah protein. Apabila menggunakan protein yang sama, regenerasi dilakukan saat terjadi penurunan hasil yang cukup besar dengan mencuci resin dengan 0,5 M NaOH selama 30 menit, menghilangkan NaOH dengan mencuci dengan 10 ml aquades, dicuci dan disuspensikan kembali dengan etanol 30%, terakhir disimpan pada 2-8°C.

3.3.7. Pembuatan kurva standar *p*-nitrofenol (*p*-NP)

Pembuatan kurva standar dibuat dari pengenceran larutan induk *p*-NP dan penambahan buffer Tris-HCl pH 8 pada labu ukur 10 mL (Aryani, 2012). Variasi perbandingan konsentrasi *p*-NP interval 10 μ M yaitu konsentrasi 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M. Larutan *p*-NP diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 410 nm. Kurva standar *p*-NP dibuat dengan konsentrasi *p*-NP sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y.

3.3.8. Uji aktivitas enzim lipase rekombinan

Aktivitas enzim lipase diuji menggunakan *p*-nitrofenilpalmitat (*p*-NPP) sebagai substrat dengan metode spektrofotometri UV-Vis (Tripathi *et al.*, 2014). Langkah awal, membuat larutan substrat *p*-NPP dari 0,377 gr *p*-NPP yang dilarutkan dalam 10 mL isopropanol. Selanjutnya, membuat campuran 100 μ L larutan substrat *p*-NPP 0,01M, 100 μ L larutan enzim dan 800 μ L buffer Tris HCl pH 8 dalam tabung mikro. Campuran dipanaskan sampai suhu 37°C menggunakan *waterbath* selama 15 menit. Setelah itu, penambahan 250 μ L Na₂CO₃ 0,1M. Campuran disentrifugasi selama 6 menit dengan kecepatan 6000 rpm dan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 410 nm. Satu unit aktivitas (U) didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat membentuk 1 μ M produk *p*-nitrofenol (*p*-NP).

3.3.9. Penentuan kadar protein

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Bradford dengan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA). Langkah awal penentuan kadar protein dengan membuat kurva standar protein yakni menyiapkan lima buah tabung reaksi yang berisi larutan BSA 1 mg/mL dengan varian volume 3, 6, 12, 18, dan 24 μ L. Selanjutnya, penambahan hingga 600 μ L akuades dan larutan Bradford 500 μ L. Tabung didiamkan dalam suhu ruang selama 5 menit. Larutan standar diukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Sampel berupa ekstrak enzim yang telah dimurnikan ditambahkan 600 μ L akuades, larutan Bradford 500 μ L, dan didiamkan dalam suhu ruang selama 5

menit. Sampel diukur absorbansi pada panjang gelombang 595nm. Sampel yang diuji yakni ekstrak kasar enzim lipase rekombinan, enzim lipase rekombinan setelah purifikasi dan flowthrough enzim selama purifikasi menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein*.

3.3.10. Pengujian pH optimum

Pengukuran aktivitas enzim pada pH optimum dilakukan dengan mencampurkan buffer tris HCl 800 μL , substrat *p*-NPP 100 μL , dan enzim lipase rekombinan murni 100 μL . Buffer Tris-HCl yang digunakan yakni pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, dan pH 10. Kemudian campuran diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah inkubasi selesai, campuran ditambahkan larutan Na_2CO_3 0,5M untuk menghentikan reaksi. Kemudian campuran disentrifus dengan kecepatan 6000rpm selama 6 menit dan dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 410nm. Larutan blanko yang digunakan yakni buffer Tris-HCl berbagai pH dan substrat *p*-NPP tanpa menambahkan sampel enzim. Diperoleh hasil pH optimum dengan absorbansi paling tinggi.

3.3.11. Pengujian suhu optimum

Pengukuran aktivitas enzim pada suhu tertentu diperoleh dengan pengukuran variable suhu 35°C, 45°C, 55°C, dan 65°C. Campuran untuk pengujian ini yaitu buffer Tris-HCl pH optimum 800 μL , substrat *p*-NPP 100 μL , dan sampel enzim lipase rekombinan 100 μL . Campuran diinkubasi pada variable suhu tertentu selama 15 menit. Setelah inkubasi selesai, campuran ditambahkan larutan Na_2CO_3 0,5M 250 μL . Campuran disentrifus 6000rpm selama 6 menit, lalu pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 410nm. Hasil diperoleh absorbansi tertinggi sebagai suhu optimum kinerja enzim lipase rekombinan.

3.3.12. Analisis SDS-PAGE

Elektroforesis SDS-PAGE terdiri dari dua gel yaitu separating gel 12% dan *stacking* gel 5%. Langkah pertama, persiapan cetakan gel berupak dua lembar kaca

yang dipisahkan dengan spacer. *Separating* gel 12% dibuat dengan cara mencampurkan 3,3 mL akuades, 4 mL poliakrilamid 30%, 2,5 mL Tris-HCl pH 8,8 1,5M, 100 μ L SDS 10%, 25 μ L APS 15%, dan 15 μ L TEMED. *Separating* gel 12% yang sudah dibuat dimasukkan dalam cetakan gel hingga 1 cm dibawah comb dan penambahan akuades hingga penuh. Gel dibiarkan memadat. Sisa air diatas *separating* gel kemudian dibuang dan gel dikeringkan dengan kertas saring.

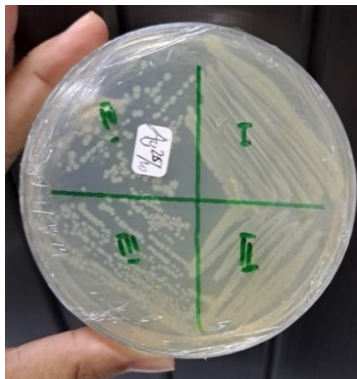
Stacking gel 5% dibuat dengan mencampurkan 3,4 mL akuades, 0,85 mL poliakrilamid 30%, 0,625 mL Tris-HCl H 8,8 1,5 M, 50 μ L SDS 10%, 15 μ L APS 15%, dan 7 μ L TEMED. *Stacking* gel 5% yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam cetakan yang telah dipasang comb. Gel dibiarkan memadat dan setelah memadat comb dilepaskan dengan gerakan lurus ke atas. Selanjutnya cetakan gel diletakkan di box elektroforesis yang diisi running buffer 1x. Sampel sebanyak 20 μ L dicampurkan dengan 5 μ L loading buffer dan dipanaskan pada suhu air 90°C selama 5 menit. Campuran sampel sebanyak 20 μ L menggunakan mikro pipet dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Elektroforesis SDS-PAGE dihubungkan dengan power supplay yang di set pada tegangan 90 Volt dan dihentikan ketika protein sudah mencapai sekitar 1 cm dari batas bawah atau dasar *separating* gel. Gel hasil elektroforesis dilepas dari cetakan dan direndam larutan staining selama 3 jam, kemudian dipindahkan ke dalam larutan destaining untuk menghilangkan warna biru sehingga gel kembali jernih dan yang tampak berwarna biru hanya pita-pita protein.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Peremajaan bakteri *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*

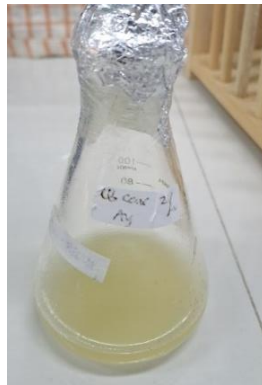
Ekspresi enzim lipase rekombinan dari bakteri *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* ditumbuhkan dalam media padat LB-kanamisin. Media Luria Bertani (LB) merupakan media kompleks yang kaya sumber nitrogen dan minim sumber karbon, mengandung *yeast* ekstrak, tripton, dan NaCl. Bakteri yang tumbuh dalam media LB menggunakan sumber nitrogen sebagai sumber utama metabolisme. Media padat LB-kanamisin digunakan sebagai media peremajaan bakteri untuk diperoleh koloni tunggal. Peremajaan isolat bakteri *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* dilakukan dengan menggoreskan isolat pada media padat LB-kanamisin dengan metode *streak* empat kuadran. *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* dapat tumbuh dalam media LB-kanamisin karena mengandung gen penyandi resisten antibiotik kanamisin. Inkubasi dalam oven suhu 37°C digunakan karena merupakan suhu optimum pertumbuhan *E. coli*. Hasil peremajaan *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* rekombinan pada media padat LB-kanamisin ditampilkan pada Gambar 4.1. menunjukkan setelah inkubasi selama 24 jam, permukaan LB padat-kanamisin tampak pertumbuhan koloni tunggal *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip* rekombinan pada kuadran empat.



Gambar 4.1. Hasil peremajaan bakteri *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*

4.2. Produksi enzim lipase rekombinan

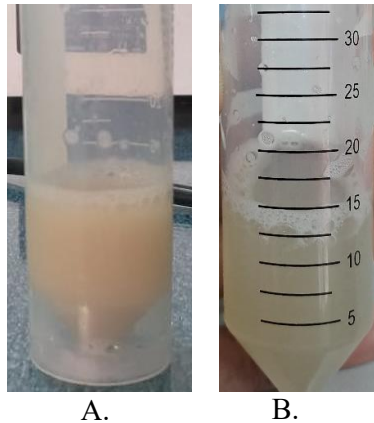
Hasil peremajaan berupa koloni tunggal digunakan untuk inokulasi selama 16 jam sesuai dengan kurva pertumbuhan *E. coli* penelitian sebelumnya (Pramesti, 2021). Setelah inokulasi dalam media cair LB-kanamisin tampak peningkatan kekeruhan yang menunjukkan pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*. Hasil inokulasi pada media cari LB-kanamicin ditampilkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Inokulum *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28b-*SmLip*

Inokulum digunakan untuk produksi enzim. Sekali produksi dilakukan dengan volume 2x150mL dengan penambahan induser IPTG. Adanya pertumbuhan isolat *E.coli* ditandai dengan mulai keruhnya media produksi LB cair sehingga mulai ditambahkan IPTG sebagai induser. Pada penelitian ini, IPTG 1mM ditambahkan setelah 2 jam inkubasi atau OD₆₀₀ telah mencapai 0,5–0,6 yakni sel berada dalam fase pertumbuhan eksponensial. Sel membelah diri dengan cepat dalam waktu generasi pendek dan konstan, juga kondisi tersebut memungkinkan metabolisme sel paling aktif. Induser IPTG ditambahkan untuk menginduksi ekspresi protein rekombinan dengan berikatan pada repressor lac dan mengubah konformasinya sehingga tidak berikatan dengan lac operator. Hal ini menginaktivasi protein repressor sehingga proses transkripsi RNA polimerase dapat berlangsung dan berlanjut proses translasi. Media produksi kembali diinkubasi selama 20 jam. Hasil produksi kemudian dipanen dengan sentrifugasi diperoleh supernatan dan pellet sel. Enzim lipase rekombinan yang akan dipurifikasi dan karakterisasi merupakan enzim lipase intraselular. Untuk

memperoleh enzim lipase rekombinan, pellet sel dilisis dengan ultrasonikasi. Metode sonikator dipilih karena memanfaatkan getaran gelombang suara frekuensi tinggi untuk melisis sel. Lisis berfungsi sebagai proses pemecahan dinding sel *Escherichia coli* secara fisika. Ekstrak kasar berupa supernatant yang diperoleh sebagai enzim intraselular ditampilkan sebagai berikut.



Gambar 4.3. A. Suspensi sel; B. Ekstrak kasar enzim lipase rekombinan

Hasil produksi menunjukkan bahwa enzim lipase hasil produksi berwarna putih kecoklatan keruh dan setelah lisis ekstrak kasar enzim lipase berwarna putih kekuningan tidak keruh. Dalam proses lisis, penambahan buffer fosfat pH 7 yakni pellet sel hasil 150 mL produksi ditambahkan 7mL buffer fosfat.

4.3. Purifikasi enzim lipase menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein*

Ekstrak kasar enzim lipase rekombinan dimurnikan untuk menghilangkan debris, meningkatkan konsentrasi, dan menjaga kestabilan protein sehingga dapat digunakan pemanfaatannya lebih lanjut di beberapa bidang. Hasil sekali produksi enzim lipase rekombinan yakni 300mL menghasilkan kurang lebih 12-15mL enzim lipase rekombinan. Purifikasi enzim dilakukan dengan metode kromatografi afinitas menggunakan Kit purifikasi *his-tagged protein*. Metode purifikasi ini merupakan purifikasi satu tahap pada protein yang mengandung sekuens Histidin tag dan prinsip purifikasi ini pengikatan spesifik protein mengandung His-tag terhadap ligan. Ligan yang digunakan yaitu ligan NTA. Kompleks ligan Ni-NTA memiliki sifat pengikatan yang kuat dan banyak untuk berinteraksi dengan ion logam.

Kit purifikasi *his-tagged protein* (HigenoMB) terdiri atas kolom membran filtrasi dan padatan kompleks Ni-NTA. Ada tiga tahap dalam proses kromatografi afinitas menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein* yaitu pengikatan protein rekombinan pada resin Ni-NTA, pencucian, dan elusi. Langkah awal yakni ekuilibrium kit sebelum digunakan agar menyeimbangkan suasana kit dan menghilangkan pengawet. Buffer yang digunakan yakni buffer imidazole 10mM. Kemudian sampel ekstrak kasar enzim ditambahkan dan digoyangkan perlahan dengan menjaga kestabilan kondisi selama minimum 30 menit. Hal ini dilakukan 3x atau lebih pengulangan penambahan sampel agar lebih banyak enzim yang tertampung dan berikatan dengan kompleks ligan Ni-NTA. Kemudian disentrifus untuk memperoleh *flowthrough* dengan kecepatan $500\times g$ atau setara 3148 rpm selama 1 menit. Kemudian proses pencucian dengan buffer imidazole 20mM, 3x pengulangan. Selanjutnya proses elusi dengan buffer imidazole 250mM, 3x pengulangan. Cara lain elusi enzim dapat dilakukan dengan elusi bertingkat mulai dari buffer imidazole 50mM hingga 300mM atau yang disebut *degradation elution*.

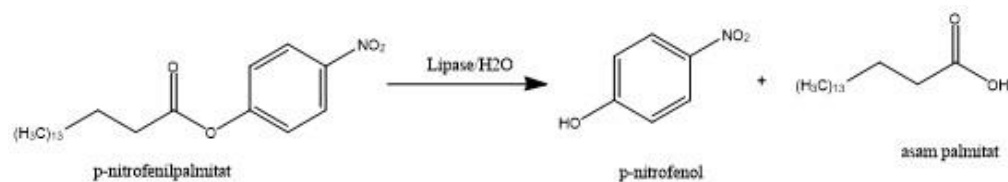
Ligan NTA akan menempati empat sisi pengikatan ligan terhadap ion nikel, dua sisi kosong dalam ion nikel akan berinteraksi dengan histidine tag protein target. NTA mengikat ion logam dengan kuat membentuk kompleks bersama histidine tag melalui linker pendek ke C- atau N- terminal. Pengikatan ini dipertahankan selama proses pengikatan dalam kit minimal 30 menit dengan kondisi stabil. Protein yang tidak berikatan dengan kompleks Ni-NTA akan terelusi sebagai *flowthrough*. Protein target mengandung histidine tag akan berikatan dengan kompleks Ni-NTA dan tidak terelusi pada proses *washing*. Proses pengelusan protein target menggunakan buffer imidazole yang memiliki struktur hampir samadengan histidine sehingga posisi histidine dalam kompleks Ni-NTA akan digantikan oleh imidazole dan protein target terelusi sebagai eluat. Eluat merupakan enzim lipase rekombinan murni yang akan dikarakterisasi lebih lanjut.

Hasil purifikasi enzim lipase rekombinan yaitu protein yang tidak terikat ligan (*flowthrough*) dan protein yang terikat (eluat). Hasil setelah 3x penambahan sampel supernatan enzim lipase rekombinan diperoleh *flowthrough* berwarna kekuningan lebih pucat sedangkan eluat berwarna bening sedikit kekuningan.

Volume sekali purifikasi menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein* dengan 3x penambahan sampel yakni 3,5mL dengan diperoleh 2,7mL *flowthrough* dan 0,8mL enzim lipase rekombinan murni, memerlukan waktu 2,5-3,5 jam.

4.3.1. Aktivitas enzim lipase rekombinan

Hasil purifikasi enzim lipase rekombinan ditentukan aktivitas enzimnya menggunakan substrat *p*-NPP (*para-nitrophenyl palmitate*). Prinsip kerja substrat *p*-NPP yakni ekstrak kasar enzim lipase rekombinan akan bereaksi menghidrolisis substrat *p*-NPP menjadi para nitrofenol dan asam palmitate. Aktivitas spesifik enzim ditentukan dengan mengukur jumlah *p*-nitrofenol yang terbentuk dalam satu kali reaksi. Aktivitas ini ditandai dengan perubahan campuran tidak berwarna menjadi kuning yang menentukan terbentuknya *p*-nitrofenol dari hasil reaksi hidrolisis. Pengujian aktivitas enzim menggunakan reagen *p*-NPP diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 410nm. Reaksi hidrolase ekstrak kasar enzim lipase rekombinan dengan substrat *p*-NPP ditampilkan sebagai berikut.



Gambar 4.4. Reaksi enzim lipase dengan substrat *p*-NPP

Kurva standar *p*-NP dibuat dari para-nitrofenil (*p*-NP) dengan variabel konsentrasi 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, dan diinkubasi dalam *waterbath* suhu 37°C selama 15 menit. Penambahan dinatrium karbonat (Na₂CO₃) yang bersifat alkali berfungsi untuk menghentikan reaksi dengan menggeser pH optimum enzim dan membentuk warna kuning *p*-nitrofenol dengan pengikatan muatan negative membentuk basa konjugat. Aktivitas enzim lipase (U/mL) didefinisikan sebagai banyaknya enzim lipase yang dibutuhkan untuk membentuk 1 μ M *p*-nitrofenol dalam satu menit. Aktivitas enzim dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[p-NP] \times 1000 \times Fp}{\text{waktu inkubasi} \times \text{Volume enzim (mL)}}$$

Keterangan: []= Konsentrasi; t= waktu inkubasi (menit); Fp= faktor pengenceran

Tabel 4.1. Aktivitas enzim lipase rekombinan

Sampel	Absorbansi rata-rata	Konsentrasi (μ M)	Aktivitas enzim (U/mL)
Ekstrak kasar enzim lipase	0,282	16,706	11,13
<i>flowthrough</i>	0,689	41,078	27,38
Enzim lipase setelah purifikasi	0,882	52,635	35,09

Dari Tabel 4.1. menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase rekombinan hasil produksi sebesar 11,13 U/mL dan aktivitas enzim setelah purifikasi sebesar 35,09 U/mL yang menunjukkan peningkatan aktivitas enzim dari sebelum purifikasi dan setelah purifikasi. Peningkatan aktivitas enzim menunjukkan keberhasilan purifikasi menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein* dimana protein target yang memiliki histidine tag mampu mengikat Ni-NTA secara spesifik. Aktivitas enzim lipase yang tidak terikat pada Ni-NTA yakni *flowthrough* memiliki aktivitas sebesar 27,38 U/mL. Aktivitas *flowthrough* cukup besar dikarenakan masih banyak enzim lipase yang tidak terikat dengan Ni-NTA karena keterbatasan padatan Ni-NTA dalam kolom kit sehingga banyak enzim yang terelusi sebagai *flowthrough*. Volume enzim lipase setelah purifikasi yang cukup sedikit memungkinkan bahwa histidine tag dalam enzim lipase yang sedikit sehingga untuk pemurniannya perlu dilakukan penambahan sampel enzim berulang dan purifikasi lebih dari sekali untuk memperoleh enzim lipase rekombinan yang banyak.

4.3.2. Kadar Protein

Pengujian kadar protein dilakukan dengan metode Bradford dengan variasi konsentrasi Bovine Serum Albumin (BSA). Metode Bradford didasarkan pada pergeseran absorbansi pewarna Coomassie Brilliant Blue G-250 yang dalam kondisi asam bentuk merah pewarna diubah menjadi bentuk yang lebih biru untuk mengikat protein yang sedang diuji. Peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 595 nm sebanding dengan jumlah pewarna terikat dan jumlah konsentrasi sampel. Pengujian kadar protein dilakukan dengan 3 sampel yakni enzim lipase rekombinan sebelum purifikasi, *flowthrough*, dan enzim lipase rekombinan murni. Perubahan warna yang tampak merupakan hasil reaksi enzim

lipase rekombinan dengan pereaksi Brafford yaitu warna biru kehijauan menjadi biru terang.

Tabel 4.2. Kadar protein enzim lipase rekombinan

Sampel	A ₅₉₅	Kadar protein (mg/mL)
Ekstrak kasar enzim Lipase	1,191	4,01
<i>Flowthrough</i>	1,110	3,74
Enzim lipase setelah purifikasi	0,284	0,956

Dari data diatas, diperoleh bahwa kadar protein enzim lipase rekombinan murni sebesar 0,956 mg/mL karena memiliki spesifitas enzim lipase cukup tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim lipase sebesar 4,01 mg/mL yang masih mengandung banyak enzim. Kadar protein *flowthrough* pun termasuk cukup tinggi sebesar 3,74 mg/mL karena dalam proses purifikasi pengikatan histidine tag dengan Ni-NTA terbatas karena ketersediaannya cukup sedikit sehingga tidak banyak histidine tag enzim target yang terikat. Hasil kadar protein selanjutnya digunakan dalam menentukan aktivitas spesifik enzim lipase. Aktivitas spesifik enzim lipase menentukan besarnya faktor pemurnian menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein*. Berikut perhitungan aktivitas spesifik enzim lipase rekombinan.

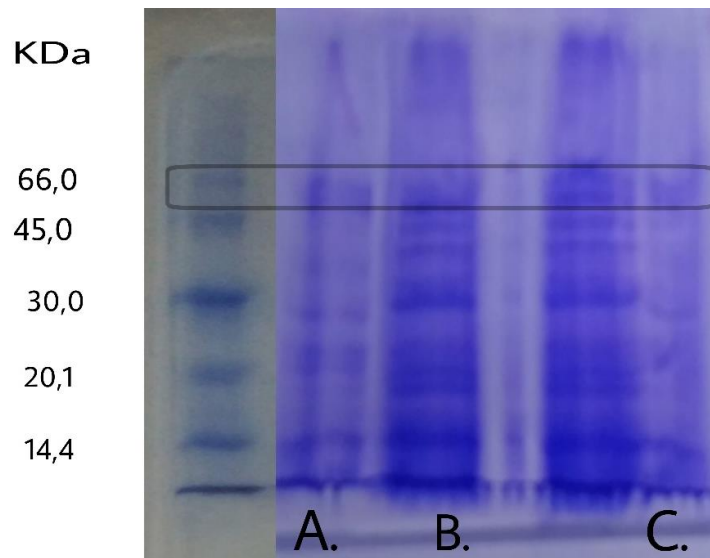
Tabel 4.3 Aktivitas spesifik enzim lipase rekombinan

Sampel	Volume (mL)	Aktivitas enzim total (Unit)	Kadar protein total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Faktor pemurnian
Ekstrak kasar enzim lipase	3,5	38,98	14,04	2,77	1
<i>Flowthrough</i>	2,7	73,94	10,09	7,32	2,638
Enzim lipase setelah pemurnian	0,8	28,07	0,76	36,70	13,23

Aktivitas spesifik dihitung dengan membagi aktivitas enzim dan kadar protein. Ekstrak kasar enzim lipase memiliki aktivitas spesifik 2,77 U/mg dan enzim lipase setelah pemurnian memiliki tingkat pemurnian 13x lebih tinggi dengan aktivitas spesifik 36,70 U/mg. Aktivitas spesifik dan faktor kemurnian menjadi kriteria keberhasilan pemurnian menggunakan kit purifikasi *his-tagged protein*.

4.3.3. Analisis SDS PAGE enzim lipase rekombinan

Hasil purifikasi enzim lipase rekombinan divisualisasikan dengan elektroforesis SDS PAGE untuk mengetahui estimasi berat molekul enzim lipase rekombinan. Elektroforesis SDS PAGE dilakukan dengan pembuatan gel, terdiri atas *separating* gel 12% dan *stacking* gel 5%. Buffer sampel yang digunakan yakni buffer sampel 4x dan didenaturasi dalam penangas air suhu 95°C selama 7 menit. *Running* elektroforesis diatur dengan tegangan 100Volt. Hasil elektroforesis SDS PAGE menunjukkan bahwa enzim lipase rekombinan sebelum purifikasi memiliki banyak pita, kemudian beberapa pita menunjukkan pita hasil *flowthrough* (protein yang tidak terikat ligan). Enzim target yang menunjukkan enzim lipase rekombinan setelah purifikasi diperoleh 3 pita yakni sekitar 64 KDa, 35 KDa, dan 14 KDa. Namun, dalam penelitian sebelumnya prediksi berat molekul enzim lipase rekombinan adalah 64,8 KDa. Hasil elektroforesis SDS PAGE yang menunjukkan tiga pita tersebut memungkinkan perlu purifikasi lebih lanjut dengan metode yang berbeda sehingga memperoleh enzim lipase rekombinan murni yang memiliki 1 pita elektroforesis.



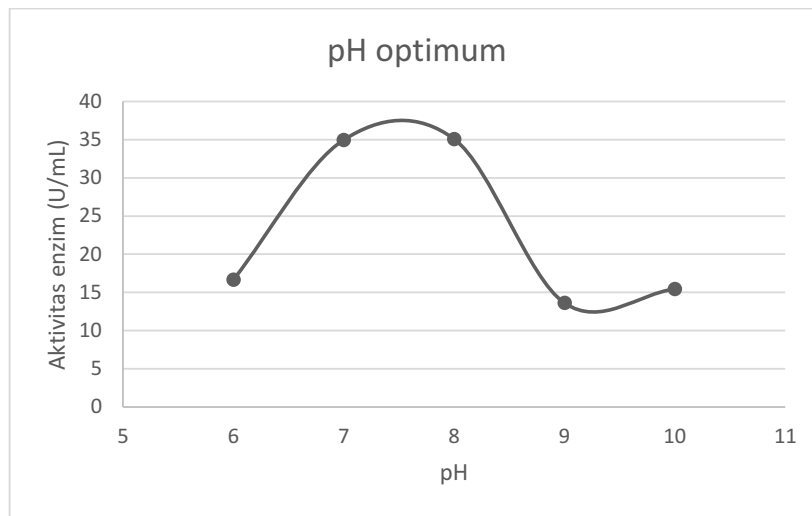
Gambar 4.5. Hasil elektroforesis SDS PAGE. A. pita elektroforesis *flowthrough*, B. pita elektroforesis ekstrak kasar enzim lipase, C. pita elektroforesis enzim lipase setelah pemurnian

Metode purifikasi kit purifikasi *his-tagged protein* samadengan kromatografi afinitas kolom Ni-NTA dengan perbedaan ukuran kolom dan lama prosesnya. Kit purifikasi *his-tagged protein* hanya mampu menampung sampel ekstrak kasar maksimal 1,5mL dalam sekali penambahan ekstrak dalam kit sedangkan kolom Ni-NTA mampu menampung 20-30 mL dalam sekali proses. Penggunaan kit purifikasi *his-tagged protein* cukup mudah karena sudah tersedia dalam paket bersama buffer dan imidazole sesuai prosedur, prosesnya yang cukup mudah hanya dengan sentrifugasi, aplikatif dalam skala kecil atau laboratorium, dapat digunakan berulang-ulang, dan harganya yang cukup terjangkau. Namun, kekurangan kit purifikasi *his-tagged protein* yaitu volume kolom yang sedikit, proses pengikatan yang lama, sehingga apabila dipakai berulang akan memerlukan waktu yang cukup lama. Hampir samadengan penggunaan kolom Ni-NTA yang mampu menampung 20-30mL sampel enzim namun untuk mendapatkan *flowthrough* memerlukan waktu yang cukup lama hingga 2 jam dan biaya kolom yang cukup mahal untuk satu kolom. Sehingga penggunaan kit purifikasi *his-tagged protein* menjadi pilihan untuk penelitian dalam skala kecil.

4.5. Karakterisasi enzim lipase rekombinan

4.5.1. pH optimum

pH optimum merupakan kondisi pH paling baik yang menghasilkan energi dan aktivitas optimal. Perbedaan pH suatu senyawa memengaruhi ionisasi gugus fungsi pada asam amino yang mampu menyebabkan perubahan konformasi enzim. Hal ini mampu menyebabkan turunnya aktivitas enzim karena perbedaan konformasi dengan substrat. Pengujian pH optimum enzim lipase rekombinan dilakukan pada variasi buffer Tris-HCl pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, dan pH 10. Substrat yang digunakan untuk proses ini adalah *p*-NPP dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 410nm. Kurva aktivitas enzim lipase rekombinan terhadap variasi pH ditampilkan pada Gambar 4.6.

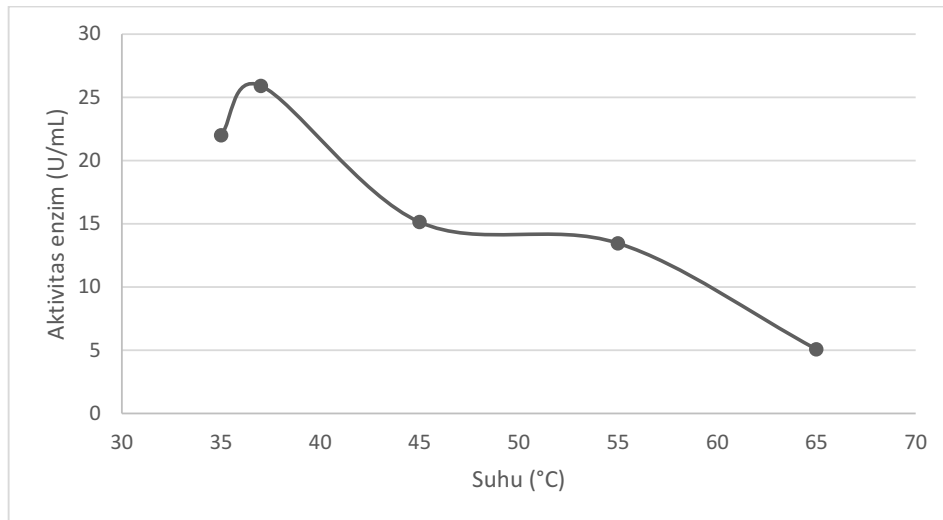


Gambar 4.6. Kurva aktivasi enzim lipase rekombinan terhadap variasi pH

Hasil menunjukkan bahwa pH optimum enzim lipase rekombinan yakni pada pH 7 karena memiliki nilai absorbansi yang baik dengan aktivitas 34,97 U/mL. Pada pH optimum 8, enzim lipase rekombinan memiliki muatan gugus pemberi dan penerima proton yang banyak pada sisi katalitiknya sehingga mempercepat reaksi yang spesifik. Pada pH 7-8 enzim lipase rekombinan juga memiliki aktivitas enzim yang cukup besar. Namun, pada pH 6 atau pH 10, enzim lipase rekombinan mengalami penurunan aktivitas yang cukup besar dikarenakan pH yang terlalu asam atau basa.

4.5.2. Suhu optimum

Suhu optimum merupakan keadaan suhu yang paling baik untuk memberikan energi kinetik molekul sehingga mempercepat reaksi dan memiliki aktivitas yang tinggi. Semakin meningkatnya suhu, energi kinetik molekul-molekul akan bertambah sehingga produk yang dihasilkan besar. Suhu yang terlalu rendah, energi yang dikeluarkan untuk suatu reaksi tidak cukup sehingga reaksi tidak berjalan dengan baik, dan begitu juga sebaliknya apabila suhu tinggi, suatu senyawa akan mudah mengalami kerusakan atau denaturasi protein yang menyebabkan perubahan struktur sehingga enzim kehilangan sifat katalitik.



Gambar 4.7 Kurva aktivitas enzim lipase rekombinan terhadap variasi suhu

Pengujian suhu optimum enzim lipase rekombinan menggunakan buffer Tris-HCl pH 7 pada variasi kondisi suhu 35°C, 45°C, 55°C, dan 65°C. Hasil diperoleh suhu optimum enzim lipase rekombinan pada suhu 37°C dengan nilai aktivitas 25,90 U/mL. dimungkinkan aktivitas suhu akan naik kemudian turun pada suhu 45°C. Pada suhu 55°C enzim lipase rekombinan mengalami penurunan aktivitas karena energi yang cukup besar untuk bergerak sehingga menyebabkan perubahan struktur enzim. Untuk suhu dan pH optimum diperlukan kembali pengujian stabilisasi aktivitas enzim pada suhu dan pH optimum dengan masa inkubasi lebih lama kembali atau memvariasikan waktu inkubasi agar diperoleh suhu dan pH optimum yang stabil.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Enzim lipase rekombinan diproduksi dalam media LB cair dan induser IPTG 1mM menghasilkan aktivitas enzim sebesar 11,138 U/mL.
2. Enzim lipase rekombinan dapat dimurnikan dengan kit purifikasi *his-tagged protein* dibuktikan dengan aktivitas enzim lipase murni sebesar 35,09 U/mL, kadar protein 0,96 mg/mL, aktivitas spesifik total 36,70 U/mg, dan pita target elektroforesis protein yakni 64 KDa.
3. Karakter enzim lipase rekombinan memiliki pH optimum 7 dengan aktivitas sebesar 35,08 U/mL dan suhu optimum 37°C.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tentang produksi, purifikasi satu tahap dan karakterisasi enzim lipase rekombinan, maka perlu dipertimbangkan saran yaitu perlunya melakukan purifikasi enzim lipase rekombinan lebih lanjut dengan metode purifikasi yang berbeda seperti kromatografi ion *exchange* untuk menghasilkan enzim lipase yang lebih murni dan/atau menghasilkan satu pita elektroforesis SDS PAGE.

DAFTAR PUSTAKA

- Aryani, S. W. (2012). Isolasi Dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase dari Kapang Selulolitik *Mucor* sp.B2. *Skripsi, Universitas Airlangga*, 1–76.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22(June), 101368.
- Bhardwaj, N., Verma, V. K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Cloning, expression and characterization of a thermo-alkali-stable xylanase from *Aspergillus oryzae* LC1 in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Protein Expression and Purification*, 168(June 2019), 105551.
- Cahyani, P., Wijanarka, & Raharjo, B. (2017). Aktivitas Spesifik Selulase *Serratia marcescens* dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat ((NH₄)₂SO₄) dan pH. *Jurnal Biologi*, 6(2), 41–49.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Click, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3), 145–154.
- Hala, Y., Astri, Jufri, M. Z., & Tambung, A. (2009). Proses Transesterifikasi Biji Minyak Jarak Dengan Bantuan Enzim Lipase Sebagai Penghasil Biodiesel. *Jurnal Administrasi Dan Kebijakan Kesehatan Indonesia*, 2(1), 31–38.
- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1), 21–26.
- Hohenfeld, I. P., Wegener, A. A., & Engelhard, M. (1999). Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 442(2–3), 198–202.
- Idiawati, N., Harfinda, E. M., & Arianie, L. (2015). Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* pada Ampas Sagu. *Jurnal Natur Indonesia*, 16(1), 1.
- Indah, I., Mappiratu, M., & Musafira, M. (2017). Produksi Enzim Lipase Dari

- Aspergillus niger* Isolat Kapang Kopra Dengan Menggunakan Medium Kelapa Parut. *Kovalen*, 3(3), 269.
- Layly, I. R., & Wiguna, N. O. (2016). Studi Potensi Lipase *Alcaligenes faecalis* Untuk Aplikasi Biodeterjen. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 3(2), 66.
- Magdeldin, S., & Moser, A. (2012). Affinity Chromatography: Principles and Applications. *Affinity Chromatography*, May.
- Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K. E., & Baumann, U. (2007). A calcium-gated lid and a large β -roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31477–31483.
- Mosbah, H., Sayari, A., Mejdoub, H., Dhouib, H., & Gargouri, Y. (2005). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1723(1–3), 282–291.
- Moula Ali, A. M., & Bavisetty, S. C. B. (2020). Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1498–1517.
- Murni, S. W., Kholisoh, S. D., L., T. D., & M., P. E. (2011). Lipase Production, Characterization, and Isolation from *Aspergillus niger*. *Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, 1–7.
- Murni, S. W., Kholisoh, S. D., L., T. D., & M., P. E. (2015). *Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari Aspergillus niger menggunakan Minyak Goreng Sawit sebagai Induser. XII*, 1-4 Volume 12(1).
- Onishi, Y., Prihanto, A. A., Yano, S., Takagi, K., Umekawa, M., & Wakayama, M. (2015). Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 5(5), 783–789.
- Pramesti, F. E. (2021). Pengaruh Induser Laktosa Dan Isopropil- β -D-Tiogalaktopiranosida (IPTG) Pada Produksi Enzim Lipase Dari *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rekombinan. *Skripsi, Universitas Airlangga*, 21.

- Pratama, A. (2016). *Lembar Judul Eksplorasi Gen Enzim Lipase Pada Tanah Pengolahan Limbah Kelapa Sawit Dengan Pendekatan Metagenomik Skripsi Andre Pratama Program Studi S-1 Kimia Departemen Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Airlangga 2016*.
- Ramadhani, P., Rukmi, I., & Pujiyanto, S. (2015). Produksi Enzim Protease Dari a.Niger Pam18a Dengan Variasi Ph Dan Waktu Inkubasi. *Jurnal Akademika Biologi*, 4(2), 25–34.
- Ramani, K., John Kennedy, L., Ramakrishnan, M., & Sekaran, G. (2010). Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45(10), 1683–1691.
- Rigo, E., Ninow, J. L., Di Luccio, M., Vladimir Oliveira, J., Polloni, A. E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., de Oliveira, D., & Treichel, H. (2010). Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1132–1137.
- Riwayati, I., Hartati, I., & Kurniasari, L. (2012). Teknologi Imobilisasi Sel Mikroorganisme pada Produksi Enzim Lipase. *Prosiding SNST Ke-3*, 55–59.
- Salgado, C. A., dos Santos, C. I. A., & Vanetti, M. C. D. (2022). Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience*, 45(September 2021), 101509. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101509>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(4), pdb.prot4540.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749.
- Sumarsih, S., Hadi, S., Geraldi, A., Fitri, R. D., & Illavi, G. (2022). Expression of Recombinant Lipase from *Serratia marcescens* LII61 in *Escherichia coli*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(2), 199–203.
- Tallet, B., Astier-Gin, T., Castroviejo, M., & Santarelli, X. (2001). One-step chromatographic purification procedure of a His-tag recombinant carboxyl half

part of the HTLV-I surface envelope glycoprotein overexpressed in *Escherichia coli* as a secreted form. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(1), 17–22.

- Tran, D. T. M., Phan, T. T. P., Huynh, T. K., Dang, N. T. K., Huynh, P. T. K., Nguyen, T. M., Truong, T. T. T., Tran, T. L., Schumann, W., & Nguyen, H. D. (2017). Development of inducer-free expression plasmids based on IPTG-inducible promoters for *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–10.
- Tripathi, R., Singh, J., Bharti, R. K., & Thakur, I. S. (2014). Isolation, purification and characterization of lipase from microbacterium sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia*, 54, 518–529.
- Vakhlu, J., & Kour, A. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–85.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Larutan

No	Larutan	Keterangan
1	Larutan stok kanamisin 1mg/mL	Membuat 10mg/10mL kanamisin yang dilarutkan dalam akuades steril. Dalam penggunaannya di media padat LB 25mL sebagai berikut. $M.V \text{ kanamisin} = M.V \text{ media}$ $\frac{1000 \mu\text{g}}{\text{mL}} \times V \text{ kan} = 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 25\text{mL}$ $V \text{ kan} = 1,25\text{mL}$
2	Larutan stok IPTG 100mM	Membuat IPTG 100mM dalam 10mL akuades steril. $0,1M = \frac{m}{238,3} \times \frac{1}{0,01}$ Maka massa IPTG = 0,2383 gram Penggunaan IPTG dalam media produksi $M.V \text{ IPTG} = M.V \text{ media}$ $100\text{mM} \times V \text{ IPTG} = 1\text{mM} \times 150\text{mL}$ $V \text{ IPTG} = 1,5\text{mL}$
3	Larutan buffer Tris-HCl 1M	Membuat larutan Tris 1M dalam 100mL akuades dan disterilkan $1M = \frac{m}{121,136} \times \frac{1}{0,1}$ Massa Tris Base = 12,11gram. Kemudian ditambahkan HCl hingga pH yang diinginkan.

4	Buffer imidazole	Terdapat larutan buffer stok dan imidazole 3M. Membuat buffer imidazole 250mM sebagai berikut. $M.Vimidazole = M.V\ buffer\ imidazole$ $3M.Vimidazole = 250mM.30mL$ $V = 2,5mL\ imidazole$
5	Larutan <i>p</i> -NPP 0,01M	Membuat <i>p</i>-NPP 0,01M dalam 10 mL isopropanol. $0,01M = \frac{m}{377} \times \frac{1}{0,01}$ Maka massa <i>p</i>-NPP adalah 0,0377 gram
6	Larutan Na ₂ CO ₃ 0,1M	Membuat Na₂CO₃ 0,1M dalam 10mL akuades sebagai berikut. $0,1M = \frac{m}{106} \times \frac{1}{0,01}$ Maka massa Na₂CO₃ = 0,106 gram
7	Larutan untuk Elektroforesis	• Larutan A : 29,2 gram akrilamid (30% b/v) + 0,8 gram bis-akrilamid (0,8% b/v) dilarutkan dalam H₂O hingga volume 100 ml • Larutan B : 75 ml larutan Tris-HCl (pH 8,8) + 4 ml larutan SDS 10% + 21 ml H₂O • Larutan C : 50 ml larutan Tris-HCl (pH 6,8) + 4 ml larutan SDS 10% + 46 ml H₂O • Buffer elektroforesis : : 3 gram Tris + 14,4 gram glisin + 1 gram SDS dilarutkan dalam H₂O hingga volume 1 liter • Buffer loading sampel : 0,6 ml larutan Tris-HCl pH 6,8 + 5 ml gliserol + 2 ml SDS 10%

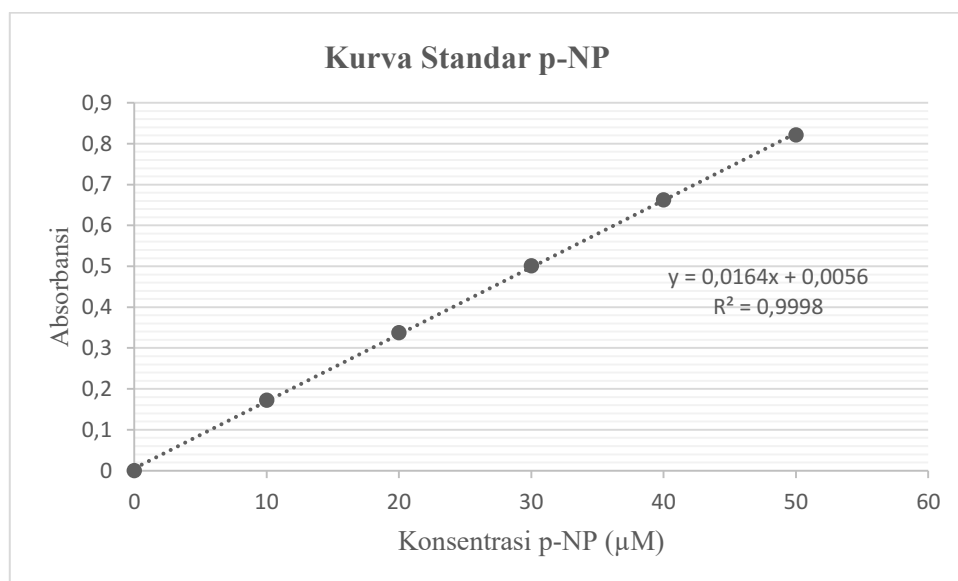
		+ 0,5 ml 2-merkaptotanol + 1 ml bromophenol blue 1% + 0,9 ml H₂O • Staining gel : 1 gram Coomassie blue R-250 + 450 ml metanol + 450 ml H₂O + 100 ml asam asetat glasial
--	--	---

Lampiran 2. Pengujian aktivitas enzim lipase

Data pengukuran absorbansi larutan standar *p*-nitrofenol (p-NP):

Konsentrasi p-NP (μM)	A ₄₁₀
0	0
10	0,172
20	0,337
30	0,501
40	0,662
50	0,821

Kurva regresi linear larutan standar *p*-NP sebagai berikut.



Aktivitas enzim lipase rekombinan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas enzim U/mL} = \frac{[p\text{-NP}] \times 1000 \times Fp}{\text{waktu inkubasi} \times \text{Volume enzim } (\mu\text{L})}$$

$$\text{Absorbansi} = 0,0164[p - \text{NP}] + 0,0056$$

Keterangan:

[p-NP]= Konsentrasi p-NP

t= waktu inkubasi (menit)

Fp= faktor pengenceran

Hasil pengujian aktivitas enzim ditampilkan dalam table dibawah ini.

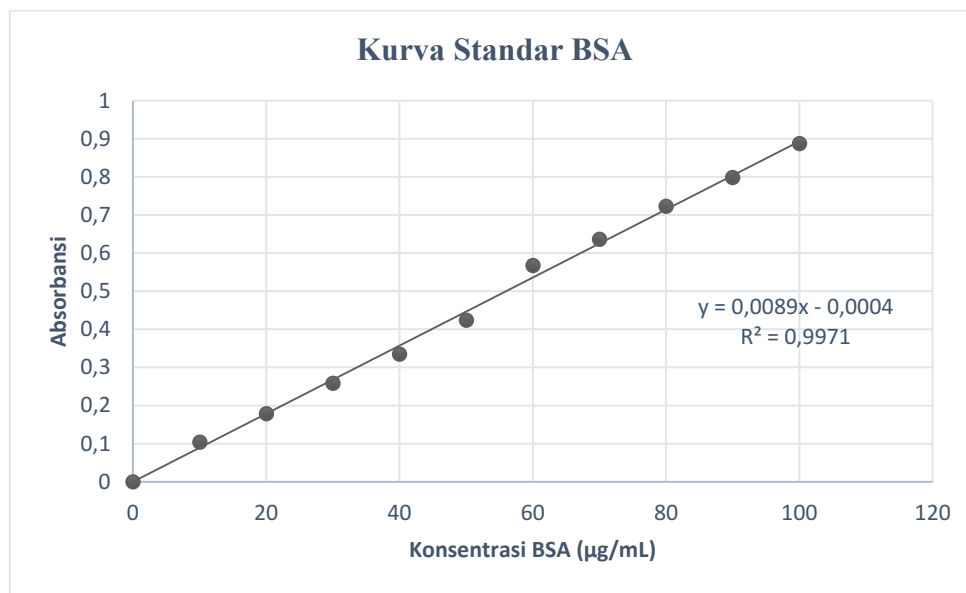
Sampel	A1	A2	A3	A ₄₁₀ rata- rata	Konsentrasi p-NP (μM)	Aktivitas enzim (U/mL)
Ekstrak kasar enzim Lipase	0,223	0,342	0,280	0,282	16,70	11,14
<i>flowthrough</i>	0,676	0,702	0,686	0,689	41,07	27,38
Enzim lipase murni	0,839	0,862	0,946	0,882	52,63	35,09

Lampiran 3. Pengujian kadar protein enzim lipase

Data Absorbansi kurva standar BSA

Konsentrasi BSA ($\mu\text{g/mL}$)	A_{595}
0	0
10	0,104
20	0,179
30	0,258
40	0,335
50	0,424
60	0,567
70	0,636
80	0,723
90	0,798
100	0,887

Dari data diatas, diperoleh kurva standar BSA sebagai berikut.



Persamaan regresi linear $Absorbansi = 0,0089 [C] - 0,0004$

Hasil perhitungan kadar protein sebagai berikut.

Sampel	A ₅₉₅	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor pengen- -ceran	Kadar protein ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar protein (mg/mL)
Ekstrak kasar enzim Lipase	1,191	133,77	30x	4013,26	4,01
<i>Flowthrough</i>	1,110	124,67		3740,22	3,74
Enzim lipase murni	0,284	31,864		955,95	0,956

Lampiran 4. Perhitungan aktivitas spesifik enzim lipase

Aktivitas spesifik enzim lipase dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas spesifik } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Aktivitas enzim } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right)}{\text{kadar protein } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

Hasil perhitungan aktivitas spesifik enzim lipase rekombinan sebagai berikut.

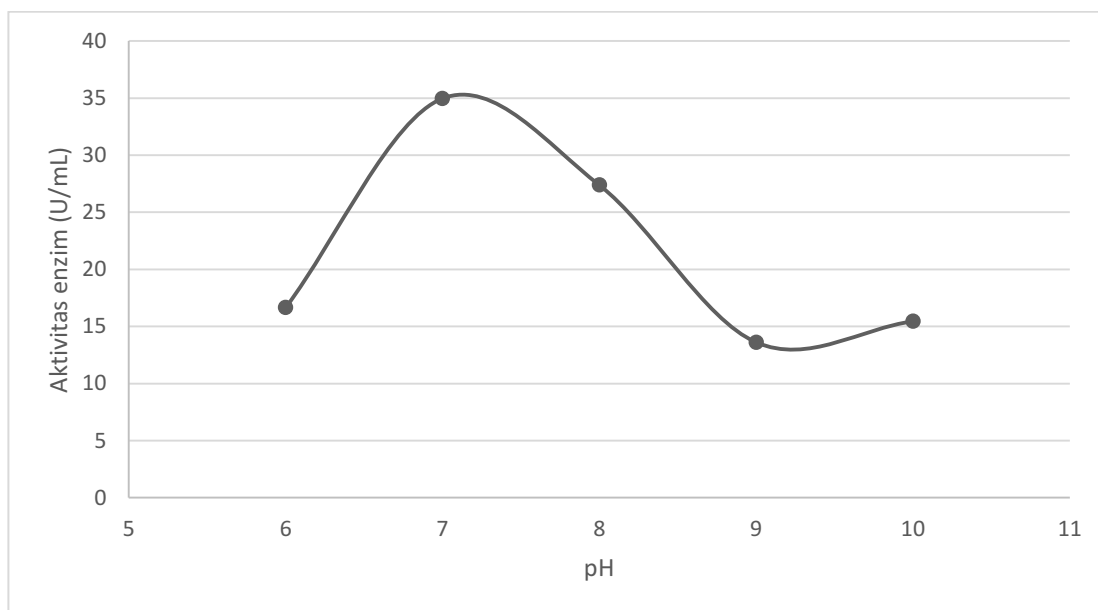
Sampel	Kadar protein (<i>mg/mL</i>)	Aktivitas enzim (<i>U/mL</i>)	Volume (<i>mL</i>)	Aktivitas enzim total (Unit)	Kadar protein total (<i>mg</i>)	Aktivitas spesifik (<i>U/mg</i>)	Faktor pemurnian
Ekstrak kasar Enzim Lipase	4,01	11,13	3,5	38,98	14,04	2,77	1
<i>Flowthrough</i>	3,74	27,38	2,7	73,94	10,09	7,32	2,638
Enzim lipase murni	0,96	35,09	0,8	28,07	0,76	36,70	13,23

Lampiran 5. Pengujian pH optimum

Data pengujian aktivitas enzim terhadap variasi pH sebagai berikut.

pH	Absorbansi pH	Konsentrasi p-NP (μ M)	Aktivitas enzim (U/ mL)
pH 6	0,42	24,97	16,64
pH 7	0,879	52,45	34,97
pH 8	0,689	41,07	27,38
pH 9	0,344	20,41	13,61
pH 10	0,39	23,17	15,44

Dari data diatas, diperoleh kurva aktivitas enzim pada variasi pH untuk menentukan pH optimum ditampilkan dibawah ini:



Lampiran 6. Pengujian suhu optimum

Data perhitungan aktivitas enzim terhadap suhu

Suhu	A kontrol	A uji	Absorbansi	Konsentrasi p-NP (μM)	Aktivitas enzim (U/mL)
35°C	1,404	1,958	0,554	32,99	21,99
37°C	0,783	1,435	0,652	38,86	25,90
45°C	0,886	1,268	0,382	22,69	15,13
55°C	0,96	1,3	0,34	20,18	13,45
65°C	1,129	1,259	0,13	7,60	5,07

Dari data diatas, diperoleh kurva aktivitas enzim pada variasi suhu untuk menentukan suhu optimum ditampilkan dibawah ini:

