

**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**

**EKSPLORASI GEN ENZIM LIPASE PADA TANAH PENGOLAHAN
LIMBAH KELAPA SAWIT DENGAN PENDEKATAN METAGENOMIK**

SKRIPSI



ANDRE PRATAMA
NIM. 081211532029

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

**EKSPLORASI GEN ENZIM LIPASE PADA TANAH PENGOLAHAN
LIMBAH KELAPA SAWIT DENGAN PENDEKATAN METAGENOMIK**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia
Di Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Oleh:

ANDRE PRATAMA

NIM. 081211532029

Tanggal Lulus : 28 Juli 2016

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



Dr. Sri Sumarsih, M.Si
NIP. 196001101 1988102 001

Pembimbing II,



Prof. Dr. Afaf Baktir, MS
NIP. 19561014 1983031 001

HALAMAN PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : **Eksplorasi Gen Enzim Lipase Pada Tanah Pengolahan Limbah Kelapa Sawit dengan Pendekatan Metagenomik**
Penyusun : Andre Pratama
Pembimbing I : Dr. Sri Sumarsih, M.Si
Pembimbing II : Prof. Dr. Afaf Baktir, MS
Tanggal Ujian : 28 Juli 2016

Disetujui oleh:

Pembimbing I,





Dr. Sri Sumarsih, M.Si
NIP. 196001101 1988102 001

Pembimbing II,



Prof. Dr. Afaf Baktir, MS
NIP. 19561014 1983031 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S-1 Kimia,
Departemen Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Dr. Purkan, M.Si
NIP. 19721116 199702 1 001

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

Pratama, Andre, 2016, Eksplorasi Gen Enzim Lipase Pada Tanah Pengolahan Limbah Kelapa Sawit Dengan Pendekatan Metagenomik. Skripsi dibawah bimbingan Dr. Sri Sumarsih, M. Si. dan Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S., Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

ABSTRAK

Enzim lipase merupakan bagian dari enzim hidrolase yang bekerja pada ikatan ester. Enzim ini juga mengkatalisis beberapa jenis reaksi sehingga merupakan enzim yang potensial diaplikasikan ke berbagai bidang seperti industri tekstil, kulit, deterjen, makanan, dan lain-lain. Salah satu cara mendapatkan enzim *novel* ialah dengan pendekatan secara metagenomik dari sampel lingkungan tanpa melalui kultur di dalam laboratorium. Sampel lingkungan yang biasa diteliti ialah memiliki keadaan ekstrem atau memiliki sumber substrat enzim yang ingin dieksplorasi. Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi gen enzim lipase pada tanah hasil pengolahan limbah kelapa sawit (POME) melalui pendekatan metagenomik menggunakan desain primer *degenerate* untuk gen enzim lipase untuk golongan HSL. Didapatkan fragmen gen lipase yang memiliki ukuran 250-300 pasang basa dan dilakukan kloning ke dalam plasmid pET-30a(+) dengan sel inang *E. coli* TOP10 menghasilkan pustaka fragmen lipase limbah sawit (PFL2S) sebanyak 26 klon.

Kata kunci: *Lipase, metagenomik, primer degenerate.*

Pratama, Andre, 2016, Eksplorasi Gen Enzim Lipase Pada Tanah Pengolahan Limbah Kelapa Sawit Dengan Pendekatan Metagenomik. Skripsi dibawah bimbingan Dr. Sri Sumarsih, M. Si. dan Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S., Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

ABSTRACT

Lipase is a hydrolase enzymes that cleavage on the ester bond. This enzyme is catalyze several reactions so this is a potential enzyme that applied to various fields such as textile, leather, detergents, food, and others. One of the method to get a novel enzyme is metagenomic approach from environmental samples without culturing in the laboratory. Environmental sample commonly studied is have an extreme environment or have a source of the enzyme substrate that researcher want explored. In this research, exploration lipase gene on the soil the processing of palm oil mill effluent (POME) through metagenomic approach using design of degenerate primers for lipase gene fragment for HSL group. Obtained lipase gene fragment size of 250-300 base pairs and cloned into pET-30a(+) plasmid with the *E. coli* TOP10 as a host cells to produce libraries of lipase fragment gene of palm oil mill effluent (PFL2S) that have a 26 clones.

Keywords: *Lipase, metagenomic, degenerate primer.*

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis mampu menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul **“Eksplorasi Gen Enzim Lipase Pada Tanah Pengolahan Limbah Kelapa Sawit dengan Pendekatan Metagenomik”**. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi persyaratan akademik pendidikan sarjana sains dalam bidang kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

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

1. Dr. Sri Sumarsih, M.Si., selaku dosen pembimbing I dan Prof. Dr. Afaf Baktir, MS, selaku dosen pembimbing II serta Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M. Si yang telah membantu fasilitas laboratorium dalam penyelesaian penelitian ini.
2. Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si. selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan, saran, dan nasihat dalam penyusunan naskah skripsi ini.
3. Bapak, ibuku dan kedua adikku yang telah memberikan motivasi, dukungan doa, semangat, dan juga materi sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan naskah skripsi ini.
4. Rekan-rekan angkatan 2012, adik angkatan 2013 terutama Nur Humaidah Muwafiqi, rekan-rekan seperjuangan penelitian biokim Miranti, Meilisa, Maylina, Sanjaya, dan Anita yang telah memberikan banyak bantuan dan doa untuk kelancaran penulisan naskah skripsi ini serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih belum sempurna. Sehingga kritik dan saran demi sempurnanya naskah skripsi ini sangat diharapkan.

Surabaya, 19 Juli 2016

Andre Pratama

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| LEMBAR JUDUL | i |
| LEMBAR PERNYATAAN | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI | iii |
| PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI | iv |
| ABSTRAK | v |
| ABSTRACT | vi |
| KATA PENGANTAR | vii |
| DAFTAR ISI | viii |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 5 |
| 1.3. Tujuan Penelitian | 5 |
| 1.3.1. Tujuan umum | 5 |
| 1.3.2. Tujuan khusus | 5 |
| 1.4. Manfaat Penelitian | 6 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 7 |
| 2.1. Enzim Lipase | 7 |
| 2.2. Metagenomik | 10 |
| 2.3. Konstruksi Pustaka DNA dari Tanah | 13 |
| 2.3.1. Isolasi DNA dari tanah | 16 |
| 2.3.2. Pemotongan DNA metagenomik | 17 |
| 2.3.3. Plasmid sebagai vektor | 18 |
| 2.3.4. Ligasi dengan enzim ligase | 20 |
| | |
| BAB III METODE PENELITIAN | 22 |
| 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian | 22 |
| 3.1.1. Tempat penelitian | 22 |
| 3.1.2. Waktu penelitian | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Bahan dan Alat Penelitian | 22 |
| 3.2.1. Bahan penelitian | 22 |
| 3.2.2. Alat penelitian..... | 23 |
| 3.3. Diagram Alir Penelitian | 23 |
| 3.4. Cara Kerja | 24 |
| 3.4.1. Pengambilan sampel | 24 |
| 3.4.2. Ekstraksi DNA metagenom | 24 |
| 3.4.3. Elektroforesis gel agarosa..... | 25 |
| 3.4.4. Pembuatan media padat untuk pemeliharaan <i>E. coli</i> TOP10 | 26 |
| 3.4.5. Pembuatan media cair untuk pemeliharaan <i>E. coli</i> pembawa plasmid pET-30a(+) | 26 |
| 3.4.6. Peremajaan isolat <i>E. coli</i> TOP10 pembawa plasmid pET-30a(+) | 27 |
| 3.4.7. Pembuatan Inokulum <i>E. coli</i> Yang Mengandung Plasmid rekombinan dan pET-30a(+) | 27 |
| 3.4.8. Isolasi DNA plasmid <i>E. coli</i> pembawa plasmid rekombinan dan pET-30a(+) | 27 |
| 3.4.9. Desain primer gen fragmen lipase | 28 |
| 3.4.10. Amplifikasi gen fragmen lipase menggunakan teknik PCR.. | 29 |
| 3.4.11. Pemurnian DNA hasil PCR | 29 |
| 3.4.12. Pemotongan DNA dengan enzim restriksi | 30 |
| 3.4.13. Ligasi gen fragmen lipase dengan plasmid pET-30a(+) | 31 |
| 3.4.14. Pembuatan sel kompeten <i>E. coli</i> TOP10 | 31 |
| 3.4.15. Transformasi plasmid rekombinan ke <i>E. coli</i> TOP 10 | 32 |
| 3.4.16. Identifikasi transforman koloni <i>E. coli</i> Top10 pembawa plasmid rekombinan | 33 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 34 |
| 4.1. Ekstraksi DNA Metagenom | 34 |
| 4.2. Desain Primer dan amplifikasi fragmen gen lipase | 39 |
| 4.3. Restriksi dan Ligasi fragmen gen lipase ke dalam plasmid pET-30a(+) | 43 |
| 4.4. Transformasi plasmid pET-30a(+) rekombinan ke dalam <i>E. coli</i> TOP10..... | 44 |
| 4.5. Seleksi transforman <i>E. coli</i> TOP10 pembawa plasmid pET-30a(+) rekombinan | 47 |

| | |
|---|-----|
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 49 |
| 5.1. Kesimpulan | 49 |
| 5.2. Saran..... | 49 |
| DAFTAR PUSTAKA | 50 |
| LAMPIRAN | 506 |

DAFTAR TABEL

| No. | Judul Tabel | Halaman |
|------------|--|----------------|
| 2.1 | Mikroorganisme penghasil enzim lipase (Momsia and Momsia, 2013) | 8 |
| 2.2 | Beberapa sumber pustaka metagenomik (Glick <i>et al.</i> , 2012) | 11 |
| 2.3 | Beberapa konstruksi pustaka DNA dari tanah dengan metagenomik (Daniel, 2005) | 14 |
| 4.1 | Hasil spektrofotometri <i>Nanodrop</i> | 37 |
| 4.2 | Primer <i>degenerate</i> lipase golongan HSL | 39 |

DAFTAR GAMBAR

| No. | Judul Gambar | Halaman |
|------|---|---------|
| 2.1 | Beberapa reaksi katalisis oleh enzim lipase. (a) Asidolisis, (b) Inter-esterifikasi, (c) alkoholisis (Momsia and Momsia, 2013) | 9 |
| 2.2 | Konstruksi pustaka metagenomik (Glick <i>et al.</i> , 2012) | 12 |
| 2.3 | Langkah eksplorasi dan eksploitasi diversitas genom dari komunitas mikroba tanah dengan metode metagenomik (Daniel, 2005) | 13 |
| 2.4 | Peta plasmid pET-30a(+) (Addgene) | 18 |
| 2.5 | Ligasi, langkah terakhir dalam konstruksi DNA rekombinan. (a) ligasi molekul ujung tumpul, (b) ligase molekul ujung lengket (Brown, 2010) | 20 |
| 4.1 | Peta limbah pengolahan kelapa sawit PT. Agro Bukit Central Kalimantan pencitraan satelit (Google Maps) | 33 |
| 4.2 | Tanah limbah kelapa sawit (kiri) pinggir kolam dan (kanan) dasar kolam | 34 |
| 4.3 | Struktur asam humat | 35 |
| 4.4 | Elektroforegram ekstraksi DNA metagenom dari sampel tanah limbah pengolahan kelapa sawit. | 37 |
| 4.5 | Pensejajaran asam amino dari mikroorganisme penghasil golongan HSL pada GenBank (NCBI) dengan ClustalW | 38 |
| 4.6 | Siklus amplifikasi PCR fragmen gen lipase | 40 |
| 4.7 | Hasil amplifikasi PCR sampel DNA metagenom R ¹ , R ² , T ¹ , dan T ² dengan variasi suhu <i>annealing</i> | 41 |
| 4.8 | Hasil purifikasi produk PCR | 41 |
| 4.9 | Peta sisi restriksi dari plasmid pET-30a-c(+) | 42 |
| 4.10 | Pengikatan dan pengambilan DNA oleh sel bakteri yang telah kompeten (Brown, 2010) | 44 |
| 4.11 | Hasil transformasi | 45 |
| 4.12 | Hasil <i>replica plating</i> klon PFL2S | 46 |
| 4.12 | Hasil amplifikasi plasmid dengan primer CLF dan CLR | 47 |

DAFTAR LAMPIRAN

| No. | Judul |
|------------|--|
| 1 | Pembuatan larutan stok |
| 2 | Pembuatan larutan denaturan |
| 3 | Pembuatan larutan buffer ekstraksi DNA |
| 4 | Desain primer CLF dan CLR untuk amplifikasi fragmen gen lipase |
| 5 | Pembuatan larutan untuk isolasi plasmid |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Industri besar dan industri rumahan yang menggunakan katalis sekarang ini sangat bergantung dengan yang namanya enzim. Enzim dapat melakukan konversi dalam hitungan menit maupun detik (Otten dan Quax, 2005). Selain itu, enzim juga dapat mengkatalis reaksi yang sulit dilakukan metode kimiawi seperti hidrolisis atau adisi enansioselektif maupun regioselektif senyawa kiral. Kondisi reaksi dari enzim pun secara umum bisa dalam temperatur ruang dan ada enzim yang tahan pada suhu yang ekstrem serta kebanyakan bereaksi dalam pelarut air sehingga penelitian dan permintaan biokatalis terus berkembang pesat (Schoemaker, 2003).

Permintaan enzim pada industri dinegara-negara maju seperti Amerika, Eropa Barat, Jepang, dan Kanada relatif stabil, namun negara-negara berkembang seperti Asia Pasifik, Eropa Timur, Afrika, dan Timur Tengah menunjukkan pasar dengan pertumbuhan tercepat untuk enzim pada industri (Sarrouh *et al.*, 2012). Ada beberapa produk enzim utama yang mempunyai pangsa pasar global terbesar, salah satunya ialah enzim lipase. Permintaan untuk lipase telah meningkat secara signifikan dalam beberapa tahun terakhir. Pasar global lipase memiliki prospek pertumbuhan yang tinggi dan memiliki potensi untuk pendatang baru dipasar ini yang diproyeksikan mencapai 590 juta dolar Amerika pada tahun 2020 (ResearchandMarket, 2015). Penggunaan enzim di Indonesia sendiri mencapai 2.500 ton per tahun dan 99% masih impor, menghabiskan uang 187,5 miliar per

tahun dan enzim lipase salah satu yang paling banyak digunakan selain protease dan xylanase (BPPT, 2014).

Enzim lipase merupakan bagian dari enzim hidrolase yang bekerja pada ikatan ester. Lipase dapat menghidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak, dan gliserol. Selain menghidrolisis ikatan ester, lipase juga dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi, interesterifikasi, dan transesterifikasi pada media tanpa air (Momsia dan Momsia, 2013). Kegunaan enzim lipase ini membuatnya menjadi enzim yang potensial untuk diaplikasikan ke berbagai bidang. Berbagai bidang yang memanfaatkan enzim lipase ialah industri tekstil dan bahan kulit (Andualema dan Gessesse, 2012), biokatalis dalam sintesis senyawa organik (Hasan *et al.*, 2006), industri deterjen (Hasan *et al.*, 2010), industri makanan (Ray, 2012; Sharma *et al.*, 2011), industri farmasi dan medis (Momsia dan Momsia, 2013; Ray, 2012), industri kosmetik dan parfum (Andualema dan Gessesse, 2012; Metzger dan Bornscheuer, 2006), pengolahan limbah dan biodegradasi limbah minyak (Momsia dan Momsia, 2013; Verma *et al.*, 2012), dan pengolahan biodiesel (Dutra *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2012; Fjerbaek *et al.*, 2009; Ghaly *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015). Sehingga, sangat menarik untuk menemukan enzim lipase dengan aktivitas tertentu.

Sebagian besar lipase yang saat ini digunakan industri berasal dari mikroba yang dikultur (Houde *et al.*, 2004). Namun, sulit untuk mendapatkan varian enzim lipase yang berbeda dengan metode mikroba yang dikultur dalam laboratorium. Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, maka digunakan strategi rekayasa genetika dan biologi molekuler seperti evolusi terarah (Jaeger *et al.*, 2001), desain rasional

(Liu *et al.*, 2010; Syrén *et al.*, 2010), dan metagenomik (Lämmle *et al.*, 2007; Liaw *et al.*, 2010; Steele *et al.*, 2009). Pendekatan secara metagenomik merupakan aplikasi dari genomik molekular untuk konsorsium mikroba yang tidak dapat dibudidayakan dan dapat dipergunakan untuk mencari enzim industri yang baru karena keragaman materi genetik yang dianalisis (JunGang *et al.*, 2010; Kakirde *et al.*, 2010; Lämmle *et al.*, 2007; Lorenz dan Eck, 2005; Steele *et al.*, 2009). Lebih dari 99% mikroorganisme tidak dapat dikultur (Handelsman *et al.*, 1998), akibat kondisi pertumbuhannya yang belum diketahui atau pertumbuhannya memerlukan konsorsium mikroba.

Berbagai macam lipase telah diisolasi melalui pendekatan metagenomik selama beberapa dekade (Glogauer *et al.*, 2011; JunGang *et al.*, 2010; Kakirde *et al.*, 2010; Lämmle *et al.*, 2007; Liaw *et al.*, 2010; Lorenz dan Eck, 2005; Simon dan Daniel, 2009; Uchiyama dan Miyazaki, 2009). Pendekatan metagenomik berguna untuk memperoleh enzim lipolitik *novel* dari sampel lingkungan dan beberapa gen yang menyandi lipase telah diisolasi dalam pustaka metagenomik dari beragam komunitas mikroba yaitu sedimen laut (Jeon *et al.*, 2009), tanah (Handelsman *et al.*, 1998; Kakirde *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2004), kolam dan air danau (Ranjan *et al.*, 2005), sedimen air sungai (Sun, 2009), dan lumpur (JunGang *et al.*, 2010; Liaw *et al.*, 2010). Beberapa enzim yang didapatkan dari pendekatan ini menunjukkan peningkatan karakteristik enzim lipase.

Salah satu sampel lingkungan yang menarik untuk dianalisis enzim lipase dengan pendekatan metagenomik ialah sampel tanah dari limbah pengolahan kelapa sawit atau biasa disebut POME (*Palm Oil Mill Effluent*). Karakteristik limbah ini

sebagai berikut berupa suspensi koloid panas berwarna coklat yang memiliki kandungan senyawa organik, minyak dan lemak, COD, BOD, serta memiliki keasaman (pH 4-5) (Rupani dan Singh, 2010; Soleimaninanadegani dan Manshad, 2014). Salah satu metode konvensional penanganan limbah ini ialah dengan proses anaerob dikolam terbuka (Rupani dan Singh, 2010). Untuk penanganan limbah pengolahan kelapa sawit dengan kolam terbuka biasanya menerapkan sistem gravitasi selama berbulan-bulan dan hasil degradasi oleh mikroorganisme ini digunakan sebagai pupuk karena mengandung N, P, K, Mg, dan Ca (Habib *et al.*, 1997). Metode ini sebagian besar digunakan oleh pabrik kelapa sawit di Indonesia dan buangan limbah ini banyak sekali karena Indonesia merupakan negara produksi minyak kelapa sawit terbesar di dunia (Obidzinski, 2013).

Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi gen enzim lipase pada tanah hasil pengolahan limbah kelapa sawit (POME) melalui pendekatan metagenomik. Sampel diambil dari tanah milik PT. Agro Bukit Central Kalimantan, Sampit, Kalimantan Tengah, yang merupakan tempat proses biologis dari limbah pengolahan kelapa sawit yang salah satunya mengandung minyak. Metode yang digunakan ialah metode ekstraksi DNA berbasis SDS (Hurt *et al.*, 2001) termodifikasi, DNA metagenom diekstraksi secara langsung dari sampel tanah dengan pengayaan mikroba terlebih dahulu dalam media Luria Bertani. Konstruksi pustaka metagenom dilakukan dengan cara kloning gen hasil PCR menggunakan vektor plasmid pET-30a(+) dan sel inang *E. coli* TOP10. Koleksi klon merupakan pustaka fragmen gen lipase dari sumber tanah limbah pengolahan kelapa sawit.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut.

1. Bagaimanakah tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi sampel tanah pengolahan limbah kelapa sawit dengan metode Hurt *et al.* (2001) termodifikasi?
2. Apakah primer *degenerate* dapat mengamplifikasi fragmen gen penyandi lipase?
3. Berapakah klon pustaka fragmen gen lipase secara metagenom?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum pada penelitian ini adalah mengeksplorasi gen enzim lipase dari tanah limbah industri pengolahan kelapa sawit melalui pendekatan metagenomik.

1.3.2. Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengukur tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan dari ekstraksi DNA pada sampel dengan metode Hurt *et al.* (2001) termodifikasi.
2. Mendapatkan fragmen gen penyandi enzim lipase.
3. Mendapatkan pustaka klon fragmen gen lipase pada tanah pengolahan limbah kelapa sawit secara metagenomik.

1.4. Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini dapat diperoleh klon fragmen gen penyandi enzim lipase yang berasal dari limbah industri pengolahan kelapa sawit (POME). Fragmen gen enzim lipase yang diperoleh selanjutnya diharapkan dapat dikarakterisasi dan dilakukan penelitian untuk mendapatkan fragmen gen lengkap penyandi enzim lipase dari mikroorganisme yang tidak dapat dikultur.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim Lipase

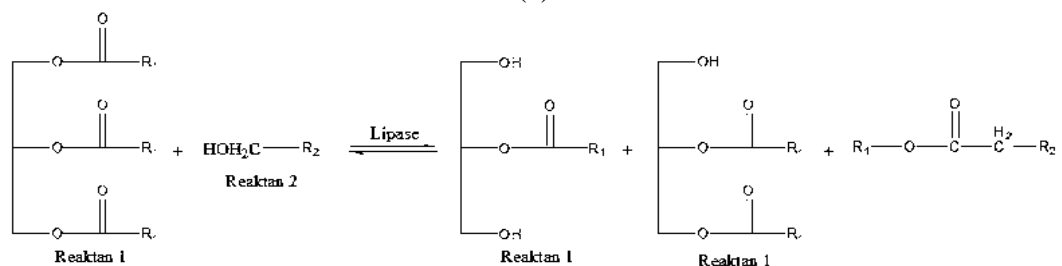
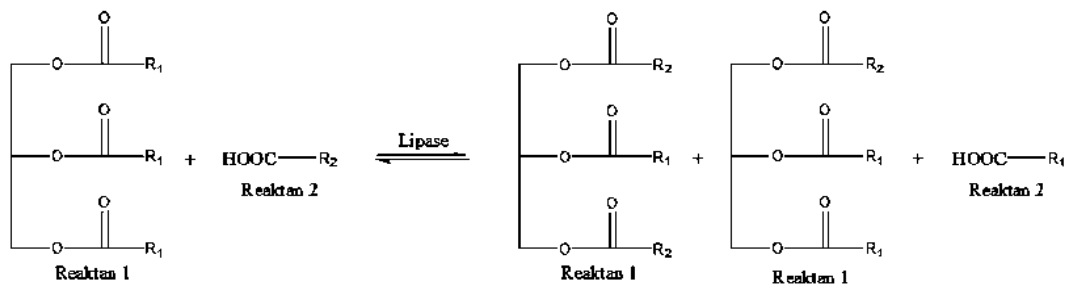
Lipase (E.C 3.1.1.3 triasilgliserol asilhidrolase) adalah enzim yang mengkatalisis berbagai reaksi dan memiliki berbagai potensi aplikasi industri (Soberón-Chavez dan Palmeros, 1994). Lipase terdapat pada bakteri, ragi dan jamur (Dalmau *et al.*, 2000; Gaoa *et al.*, 2000; Jaeger *et al.*, 1999). Meskipun lipase telah ditemukan pada banyak spesies hewan dan tumbuhan, enzim dari sumber mikroba (seperti bakteri ragi dan jamur) lebih banyak digunakan karena aplikasi aktual dan potensinya dalam industri terutama pada deterjen, minyak dan lemak, susu dan farmasi industri (Cardenas *et al.*, 2001).

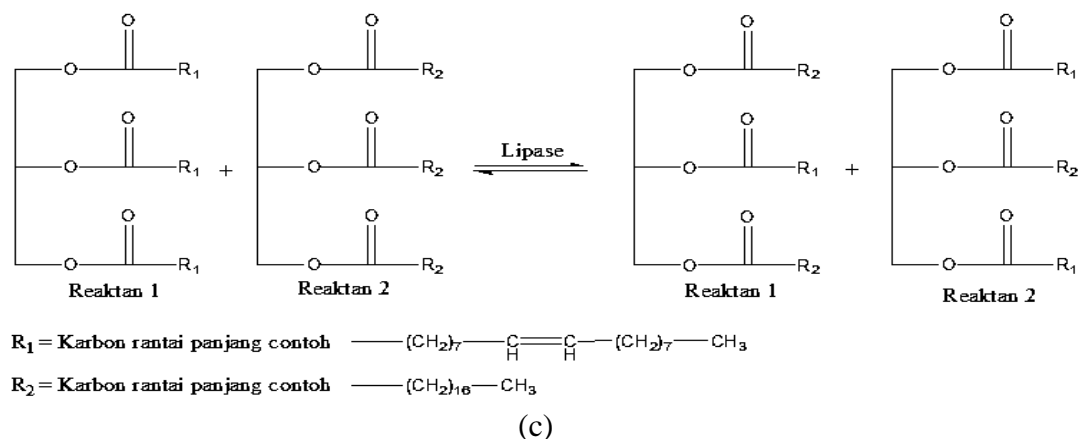
Lipase mikroba juga lebih stabil daripada lipase pada tumbuhan dan hewan karena produksi lebih mudah, aman dan dapat diperoleh dalam jumlah besar dengan biaya rendah (Vakhlu dan Kour, 2006). Lipase mikroba memiliki diversitas yang luas dalam sifat enzimatik dan spesifisitas substrat yang membuatnya sangat menarik untuk aplikasi industri. Penggunaan lipase secara komersil adalah bisnis miliaran dolar yang terdiri dari berbagai macam aplikasi yang berbeda (Jaeger *et al.*, 1999). Beberapa spesies bakteri, ragi, dan jamur menghasilkan lipase (Tabel 2.1). Taksonomi strain dekat dapat menghasilkan lipase dari jenis yang beragam.

Tabel 2.1 Mikroorganisme penghasil enzim lipase (Momsia dan Momsia, 2013)

| Mikroorganisme | Referensi |
|--------------------------------|--|
| <i>Bacillus</i> sp. | (Imamura <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | (Ruiz <i>et al.</i> , 2005; Eggert, 2003) |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | (Mosbah <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Penicillium cyclopium</i> | (Chahinian <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Aspergillus niger</i> | (Namboodiri <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Trichosporon laibacchii</i> | (Liu <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Rhizopus</i> sp. | (Macedo <i>et al.</i> , 2003, Momsia <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | (Herrgoard <i>et al.</i> , 2000) |

Enzim lipase merupakan bagian dari enzim hidrolase yang bekerja pada ikatan ester (gambar 2.1). Lipase dapat menghidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak, dan gliserol. Selain menghidrolisis ikatan ester, lipase juga dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi, interesterifikasi, dan transesterifikasi pada media tanpa air (Momsia dan Momsia, 2013). Banyak kegunaan enzim lipase ini membuatnya menjadi enzim yang potensial untuk diaplikasikan keberbagai bidang.





Gambar 2.1 Beberapa reaksi katalisis oleh enzim lipase. (a) Asidolisis, (b) Inter-esterifikasi, (c) alkoholisis (Momsia dan Momsia, 2013)

Berbagai bidang yang memanfaatkan enzim lipase ialah industri tekstil dan bahan kulit (Andualema dan Gessesse, 2012), biokatalis dalam sintesis senyawa organik seperti poliester aromatis yang merupakan polimer *biodegradable* (Hasan *et al.*, 2006), industri deterjen yang menjadi pasar terbesar untuk berbagai enzim salah satunya lipase (Hasan *et al.*, 2010), pada pengolahan, pengembangan, peningkatan kualitas industri makanan yang modern (Ray, 2012; Sharma *et al.*, 2011), industri farmasi dan medis sangat penting peran enzim lipase dengan kemampuannya untuk melakukan reaksi transesterifikasi dan hidrolisis (Momsia dan Momsia, 2013; Ray, 2012), industri kosmetik dan parfum karena menunjukkan aktifitas pada produksi surfaktan dan aroma parfum (Andualema dan Gessesse, 2012; Metzger dan Bornscheuer, 2006), pengolahan limbah dan biodegradasi limbah minyak (Momsia dan Momsia, 2013; Verma *et al.*, 2012), dan pengolahan biodiesel dengan enzim lipase yang dapat melakukan reaksi transesterifikasi untuk

produksi yang ekonomis (Dutra *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2012; Fjerbaek *et al.*, 2009; Ghaly *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015).

Sebagian besar lipase yang saat ini digunakan industri berasal dari mikroba yang dapat dikultur (Houde *et al.*, 2004). Namun, sulit untuk mendapatkan variasi enzim lipase dari mikroba yang dapat dikulturkan. Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, maka digunakan strategi rekayasa genetika dan biologi molekuler seperti evolusi terarah (Jaeger *et al.*, 2001), desain rasional (Liu *et al.*, 2010; Syrén *et al.*, 2010), dan metagenomik (Lämmle *et al.*, 2007; Liaw *et al.*, 2010; Steele *et al.*, 2009)

2.2. Metagenomik

Selama lebih dari 100 tahun, identifikasi mikroorganisme dan karakterisasi fungsi biologis telah dilakukan dengan cara kultur di laboratorium. Pada 1990-an, dengan munculnya teknik untuk mengekstrak DNA langsung dari sampel lingkungan, seperti tanah dan air laut, peneliti mulai meneliti keragaman urutan mikroorganisme menggunakan 16S rRNA sebagai penanda taksonomi (Glick *et al.*, 2012). Terungkap bahwa kurang dari 1% dari semua spesies bakteri yang bisa dikultur (Handelsman *et al.*, 1998). Oleh sebab itu, menemukan gen baru untuk penelitian dasar dan terapan dengan menggunakan metode yang tidak bergantung pada pertumbuhan bakteri di laboratorium sangat menarik. Mengingat kekayaan gen bioteknologi sangat penting dan protein yang telah diperoleh dari mikroorganisme yang dapat dikulturkan relatif sedikit.

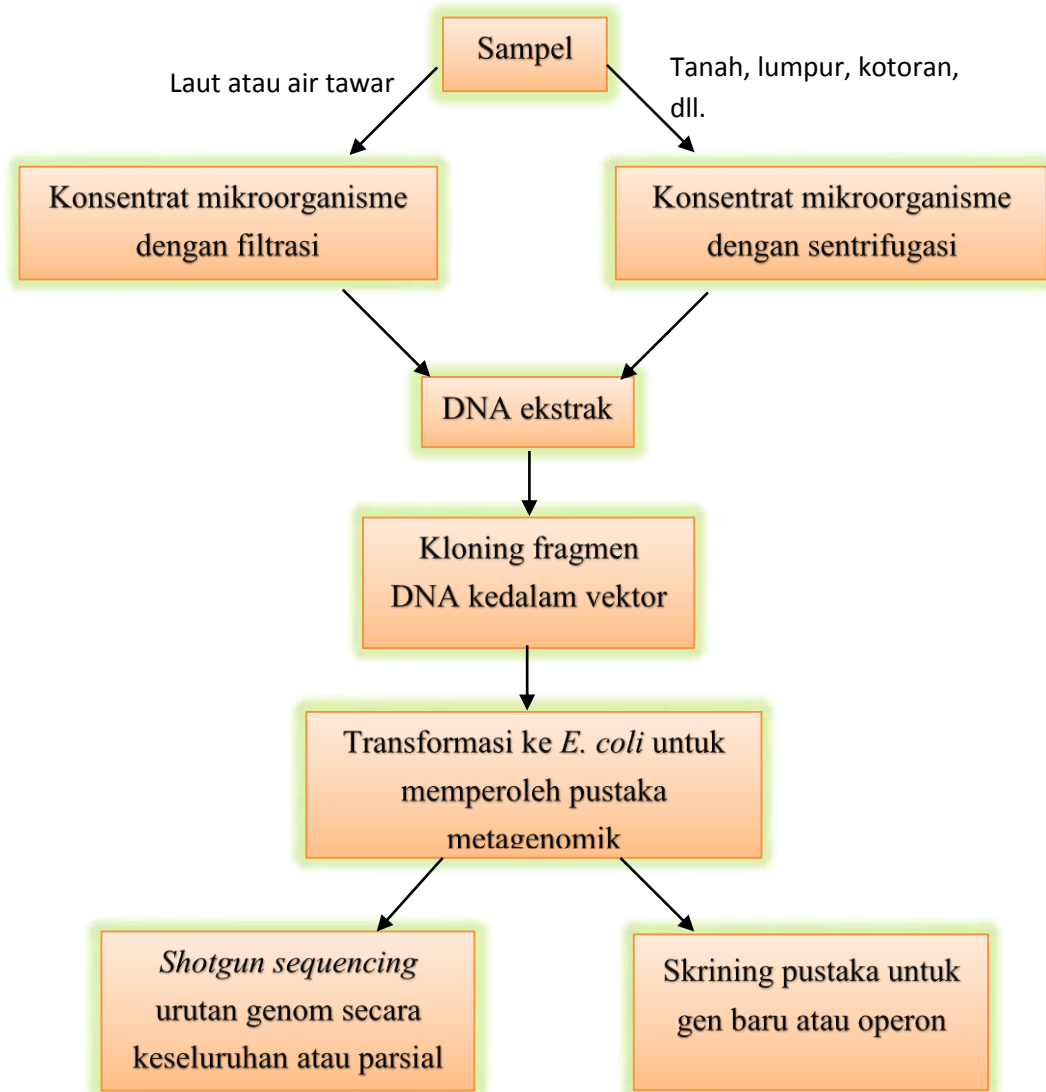
Pendekatan secara metagenomik merupakan aplikasi dari genomik molekular untuk konsorsium mikroba yang tidak dapat dikulturkan dan dapat dipergunakan untuk mencari enzim industri yang baru karena keragaman materi genetik yang di analisis (JunGang *et al.*, 2010; Kakirde *et al.*, 2010; Lämmle *et al.*, 2007; Lorenz dan Eck, 2005; Steele *et al.*, 2009). Tujuan utama dari proyek metagenomik adalah untuk membangun sebuah pustaka DNA komprehensif dari semua mikroorganisme dari ekosistem atau lokasi tertentu (Tabel 2.2). Klon metagenomik dapat diidentifikasi dengan berbagai cara (Gambar 2.2). Salah satu strategi memerlukan sekuensing seluruh pustaka menggunakan strategi *shotgun sequencing* dengan tujuan perakitan urutan DNA yang bersebelahan (*contigs*) dari sebanyak genom yang mungkin berbeda dan mengidentifikasi kedua *novel* dan urutan gen homolog.

Tabel 2.2 Beberapa sumber pustaka metagenomik (Glick *et al.*, 2012)

| |
|--|
| Lahan bekas tambang logam dan batu bara |
| Air sungai dan danau |
| Laut |
| Plankton arktik |
| Spons laut |
| Segala jenis sedimen |
| Segala jenis tanah |
| Komunitas mikroba dari kotoran insekta, manusia, dan tikus |

Berbagai macam lipase telah diisolasi melalui pendekatan metagenomik selama beberapa dekade (Glogauer *et al.*, 2011; JunGang *et al.*, 2010; Kakirde *et al.*, 2010; Lämmle *et al.*, 2007; Liaw *et al.*, 2010; Lorenz dan Eck, 2005; Simon dan

Daniel, 2009; Uchiyama dan Miyazaki, 2009). Pendekatan metagenomik ini memang berguna untuk menambang enzim *novel* lipolitik dari sampel lingkungan dan beberapa gen yang menyandi lipase telah di isolasi dalam pustaka metagenomik dari beragam komunitas mikroba yaitu sedimen laut (Jeon *et al.*, 2009), tanah (Handelsman *et al.*, 1998; Kakirde *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2004), kolam dan air danau (Ranjan *et al.*, 2005), sedimen air sungai (Sun, 2009), dan lumpur (JunGang *et al.*, 2010; Liaw *et al.*, 2010). Beberapa enzim yang didapatkan dari pendekatan ini menunjukkan peningkatan karakteristik enzim lipase sehingga eksplorasi enzim dengan pendekatan ini sangat menarik.

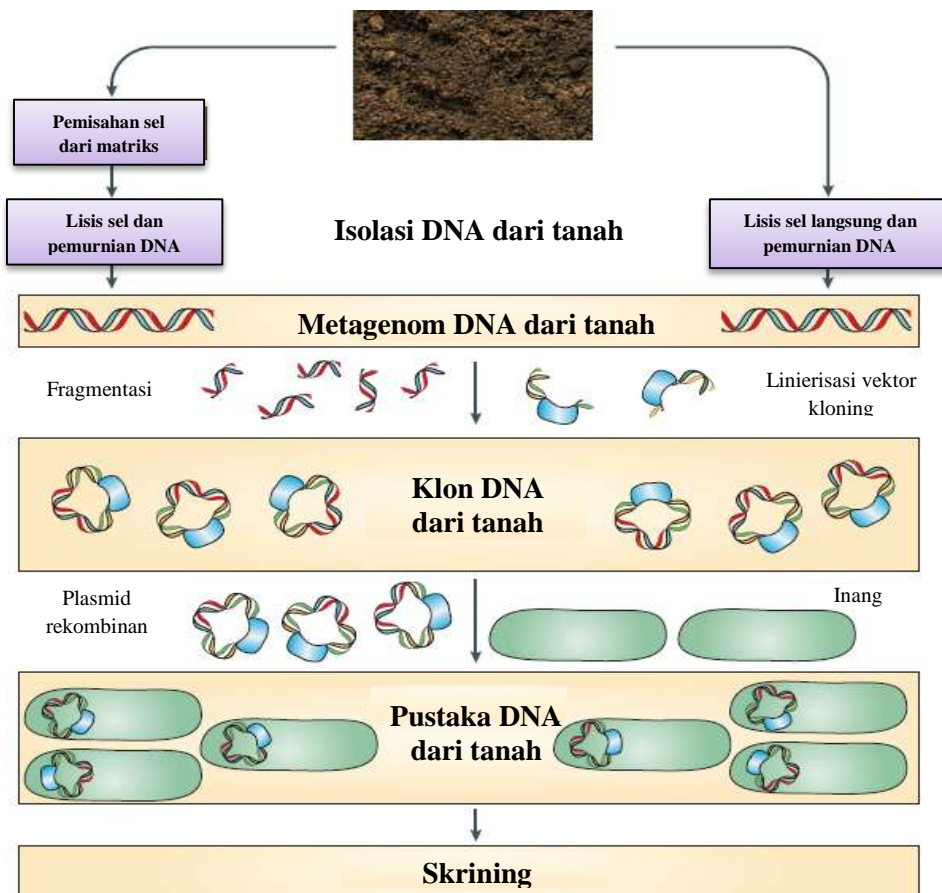


Gambar 2.2 Konstruksi pustaka metagenomik (Glick *et al.*, 2012).

2.3. Konstruksi Pustaka DNA dari Tanah

Membangun pustaka DNA dari tanah melibatkan metode yang sama seperti kloning DNA genom dari suatu mikroorganisme yaitu fragmentasi DNA tanah dengan enzim restriksi, penyisipan fragmen DNA ke dalam sistem vektor yang sesuai, dan transformasi vektor rekombinan dalam inang yang sesuai. Meskipun secara konseptual membangun pustaka tanah ini sederhana, namun ukuran

metagenomnya yang besar dan klon yang dihasilkan sangat banyak. Terobosan besar dalam metagenomik tanah adalah konstruksi DNA dari tanah (Gambar 2.3) dan skrening pustaka dengan pendekatan fungsional dan urutan gen (Daniel, 2005).



Gambar 2.3 Langkah eksplorasi dan eksploitasi diversitas genom dari komunitas mikroba tanah dengan metode metagenomik (Daniel, 2005)

Teknologi ini membuka jalan untuk menjelaskan fungsi komunitas organisme dalam tanah, untuk analisis genom mikroorganisme tanah yang tidak dapat dikultur dan untuk mendapatkan produk alami yang sama sekali baru dari komunitas mikroba tanah. Gen baru yang mengkodekan enzim yang berguna dan antibiotik ditemukan oleh kloning langsung dari DNA tanah ke vektor plasmid,

kosmid atau BAC (kromosom buatan bakteri) dan menghasilkan beberapa pustaka (Tabel 2.3).

Tabel 2.3 Beberapa konstruksi pustaka DNA dari tanah dengan metagenomik (Daniel, 2005)

| Sumber tanah | Tipe Vektor | Jumlah Klon | Ukuran basa (kb) | Total DNA (Gb) | Gen target | Referensi |
|-----------------|-------------|-------------|------------------|----------------|------------------|------------------------------|
| Tanah alkalis | Plasmid | 100,000 | 8–12 | 1.0 | Protease | (Gupta <i>et al.</i> , 2002) |
| Tanah hutan | Fosmid | 33,700 | 35 | 1.18 | Enzim Lipolitik | (Lee <i>et al.</i> , 2004) |
| Tanah berlumut | Plasmid | 30,000 | 3.5 | 0.11 | Enzim amilolitik | (Yun <i>et al.</i> , 2004) |
| Tanah pertanian | Plasmid | 80,000 | 5.2 | 0.42 | Amidase | (Gabor <i>et al.</i> , 2004) |

Gen yang diidentifikasi menggunakan skrining fungsional dan memiliki sedikit homologi gen yang diketahui, menggambarkan potensi yang besar untuk pustaka metagenomik dari tanah. Pendekatan yang sama telah digunakan untuk mengkloning gen dari tanah yang mengkode untuk lipase (Elend *et al.*, 2006; Glogauer *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004), protease (Gupta *et al.*, 2002), amylase (Yun *et al.*, 2004), antibiotik, dan enzim resisten antibiotik. Keberhasilan proyek untuk menghasilkan dan skrining tanah pustaka metagenomik tergantung pada beberapa faktor: Komposisi sampel tanah; pengumpulan dan penyimpanan sampel tanah; metode ekstraksi DNA; apakah hasil DNA yang diisolasi mewakili komunitas mikroba dalam sampel asli; sistem vektor dan inang yang digunakan untuk kloning, pemeliharaan dan skrining; dan strategi skrining (Daniel, 2005).

2.3.1. Isolasi DNA dari tanah

Konstruksi pustaka metagenomik dimulai dengan pengumpulan sampel (Gambar 2.3). Sampel tanah yang heterogen, secara fisik, kimia dan faktor biotik seperti ukuran partikel, jenis tanah, kadar air, pH, suhu dan tanaman yang terikut menjadi hal yang berguna untuk evaluasi dan perbandingan hasil dari penelitian ekstraksi DNA dari tanah (Daniel, 2005). Sampling lebih mudah dilakukan pada permukaan tanah. Karena populasi mikroba yang besar, volume sampel dapat kecil (≤ 500 g dikebanyakan penelitian) (Gabor *et al.*, 2004; Glogauer *et al.*, 2011; Gottschalk *et al.*, 2000; Lämmle *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004). Merusak tanah selama pengambilan sampel mungkin mengubah komposisi komunitas mikroba tanah, sehingga waktu sampel disimpan dan diangkut harus dibuat sesingkat mungkin (Paul, 2015)

Konstruksi pustaka metagenomik memerlukan jumlah DNA yang cukup tinggi dan berkualitas sehingga dapat menjadi perwakilan dari komunitas mikroba tanah. Karena heterogenitas tanah, tingkat keragaman mikroba dan partikel tanah menjadikan ekstraksi DNA cukup sulit (Martin-Laurent *et al.*, 2001). Ekstraksi DNA tanah sering sulit karena adanya zat humat, yang mengganggu enzim restriksi, amplifikasi, dan mengurangi efisiensi kloning, efisiensi transformasi dan spesifitas hibridisasi DNA (C. C. Tebbe dan Vahjen, 1993).

Metode ekstraksi DNA dapat dibagi menjadi dua kategori (Gambar 2.3) lisis sel secara langsung yang terkandung dalam matriks sampel diikuti dengan pemisahan DNA dari matriks dan sel debris (Schneegurt dan Dore, 2003) atau pemisahan sel dari matriks tanah diikuti oleh lisis sel (Gabor *et al.*, 2003).

Campuran DNA oleh kedua metode dimurnikan dengan prosedur standar. Jumlah DNA diisolasi dari jenis tanah yang berbeda sekitar 500 ug DNA per gram tanah. Lebih banyak DNA yang didapat menggunakan pendekatan lisis langsung, misalnya, *Gabor et al* (2003) mencatat 10 sampai 100 kali lipat penurunan hasil DNA menggunakan pendekatan pemisahan sel dibandingkan dengan pendekatan lisis langsung.

2.3.2. Pemotongan DNA metagenomik

Setelah isolasi dan pemurnian DNA metagenomik ialah memotong DNA menjadi fragmen-fragmen DNA. Ada 2 metode yang bisa digunakan yaitu secara kimia dan secara mekanik. Pemotongan DNA secara kimia dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi yang memotong dan mengenali urutan DNA yang spesifik. Setiap salinan dari molekul DNA yang diberikan dari organisme tertentu akan memberikan fragmen yang sama ketika dipotong dengan enzim restriksi tertentu (Wilson dan Walker, 2010).

Adapun pemotongan DNA secara mekanik dilakukan dengan beberapa cara yaitu dengan pipet tip, nebulisasi, sonikasi, *point-sink shearing*, *needle shearing*, *French pressure cell*, dan fragmentasi oleh transposome. Pemotongan secara mekanik ini lebih bias hasil fragmen DNA dibandingkan dengan enzim restriksi. Hasil fragmentasi nantinya diperbaiki menjadi ujung yang tumpul dengan beberapa cara yaitu dengan nuklease mungbean, nuklease bal31, atau campuran dari Klenow dan T4 DNA polimerase (Quail, 2010). Dipilih metode secara mekanik karena faktor sampel tanah yang mengandung asam humat akan mempengaruhi kinerja

enzim restriksi untuk memotong DNA. Ukuran DNA berkisar 30-50 kb juga lebih cocok menggunakan metode secara mekanik yaitu tip pipet (Quail, 2010). Fragmen DNA ukuran 40 kb dipilih karena vektor fosmid dapat tersisipi gen sebesar 40 kb. Selain itu, diharapkan juga ada gen lain yang apabila terekspresi dapat berfungsi sebagai pembantu enzim target yang kita inginkan.

2.3.3. Plasmid sebagai vektor

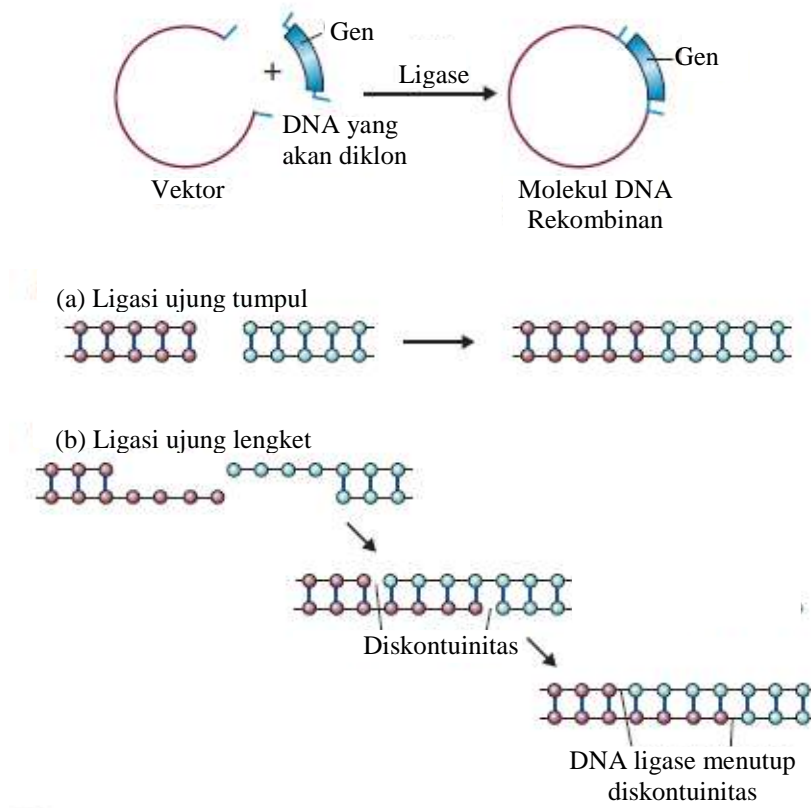
Plasmid adalah vektor yang paling umum digunakan pada vektor kloning bakteri. Vektor plasmid dapat menampung gen hingga 15 kbp. Plasmid juga memiliki daerah dimana fragmen DNA bisa disisipi ke dalam plasmid yang biasa disebut *Multiple Cloning Site* (MCS). Dimana daerah ini memiliki sisi restriksi pengenalan beberapa enzim restriksi. Setelah sisi ini dipotong dengan enzim restriksi maka fragmen DNA bisa disambungkan kedalam plasmid dengan menggunakan enzim ligase. Plasmid memiliki daerah marker untuk seleksi, biasanya ialah gen resisten antibiotik. Bakteri yang dapat bertahan dalam medium pertumbuhan selektik yang mengandung antibiotik maka bakteri membawa vektor plasmid yang telah di transformasi.

Vektor plasmid yang digunakan dalam penelitian ini ialah plasmid pET-30a(+). Merupakan suatu vektor untuk kloning dan ekspresi protein rekombinan pada *E. coli*. Memiliki signal translasi dan transkripsi T7 bakteriofag. Memiliki MCS dari *NcoI* (158) hingga *XhoI* (217) serta His-Tag (140-157) untuk purifikasi protein rekombinan satu langkah. Marker selektif antibiotik pada vektor ini ialah

2.3.4. Ligasi dengan enzim ligase

Semua sel hidup menghasilkan enzim ligase, tetapi enzim yang digunakan dalam rekayasa genetika biasanya dimurnikan dari bakteri *E. coli* yang telah terinfeksi dengan T4 fag. Dalam sel, enzim ligase menjalankan fungsi yang sangat penting dalam memperbaiki setiap diskontinuitas yang mungkin timbul di salah satu helai molekul untai ganda. Sebuah diskontinuitas berada pada posisi di mana ikatan fosfodiester antara nukleotida yang berdekatan hilang. Meskipun diskontinuitas mungkin timbul secara kebetulan karena kerusakan molekul DNA sel, mereka juga merupakan hasil alami dari proses seperti replikasi DNA dan rekombinasi (Brown, 2010).

Ligase memainkan beberapa peran penting. Memperbaiki diskontinuitas untai tunggal, juga dapat menggabungkan molekul DNA yang kedua ujung molekulnya sama. Reaksi kimia yang terlibat dalam ligasi dua molekul ini persis sama dengan perbaikan diskontinuitas, kecuali bahwa dua ikatan fosfodiester harus dibuat, satu untuk setiap helai (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Ligasi, langkah terakhir dalam konstruksi DNA rekombinan. (a) ligasi molekul ujung tumpul, (b) ligasi molekul ujung lengket (Brown, 2010).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia Departemen Kimia FST Universitas Airlangga, Surabaya.

3.1.2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari 2016 - Juni 2016.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

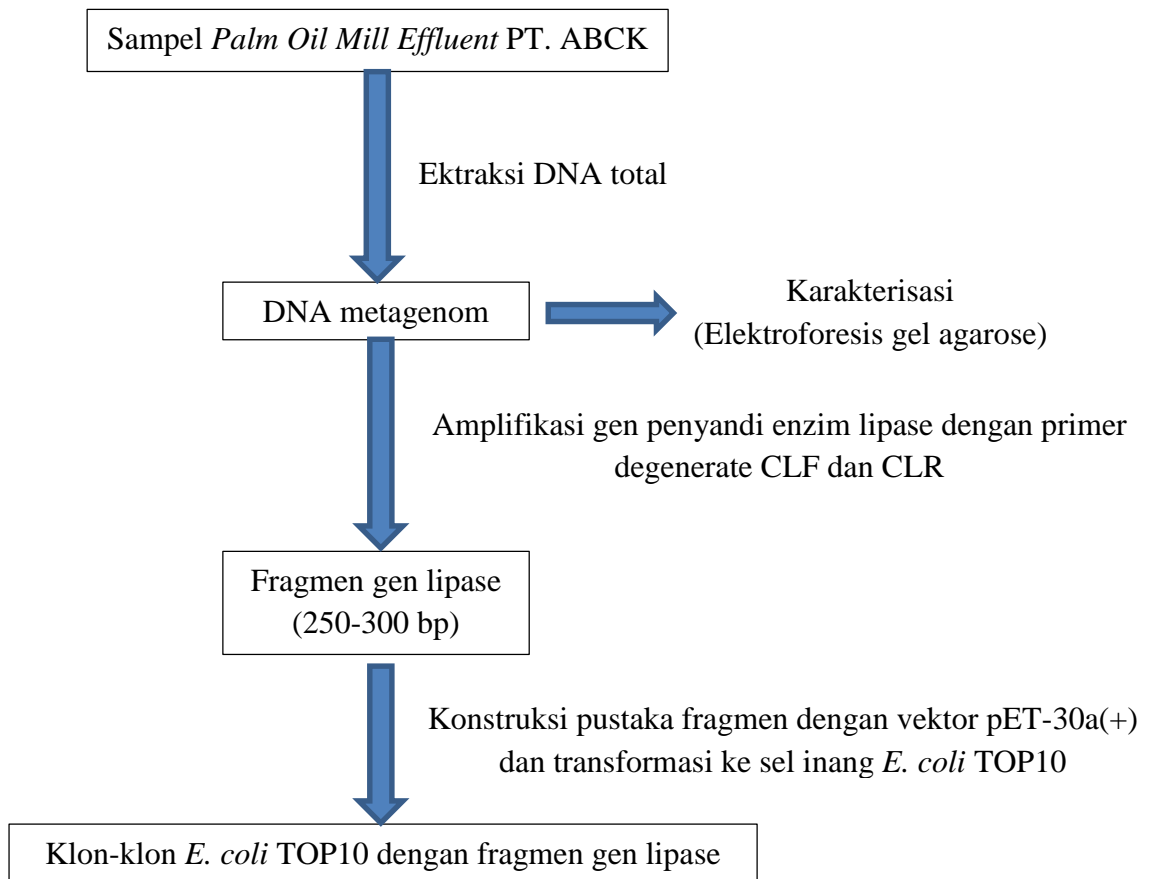
3.2.1. Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah guanidine isotiosianat, 2-merkaptotanol, Tris-HCl, NaCl, *cetyltrimethylammonium bromide* [CTAB], NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, EDTA, *sodium dodecyl sulphate* (SDS), nitrogen cair, isopropanol, polietilen glikol (PEG 6000), kloroform, isoamil alkohol, *GenElutetm Bacterial Genomic DNA Kit*, *KAPA2G Fast ReadyMix with Dye*, *QIAquick PCR purification kit*, *E. coli* TOP10, tripton, *yeast extract*, *bacto agar*, *gel loading buffer*, *marker DNA*, agarosa, etidium bromida (EtBr), asam asetat glasial, glukosa, NaOH, CaCl₂, natrium asetat, etanol 70%, minyak zaitun, dH₂O, dan ddH₂O,

3.2.2. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, tabung sentrifus, tabung Eppendorf, pipet mikro berbagai ukuran, vortex, sentrifugator, tip berbagai ukuran, hotplate, perangkat alat elektroforesis gel agarosa mini, *UV transilluminator*, *waterbath*, *shaker incubator*, *laminar air flow cabinet*, *pH meter*, *Nanodrop Spektrofotometer*, dan *Polymerase Chain Reaction* (BioRad)

3.3. Diagram Alir Penelitian



3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pengambilan sampel

Sampel Tanah dari *Palm Oil Mill Effluent* diambil dari pabrik pengolahan kelapa sawit milik PT. Agro Bukit Central Kalimantan yang terletak di jalan Sudirman Km 106 Sampit, Kalimantan Tengah pada bulan Januari 2016.

3.4.2. Ekstraksi DNA metagenom

Ekstraksi DNA metagenom dilakukan dengan metode Hurt *et al.* (2001). Dua gr sampel tanah dicampur dengan 2 gr pasir yang telah disterilisasi kering dalam mortir. Sampel dijenuhkan dengan 1 ml larutan denaturasi (10 mM Tris-HCl [pH 7.0], 1 mM EDTA, 0,5% 2-merkaptotanol) lalu dibekukan dalam nitrogen cair. kemudian tanah tersebut digerus hingga mencair. Proses pembekuan dalam nitrogen cair dan penggerusan sampai mencair diulang dua kali. Sampel tanah dipindahkan ke tabung sentrifus lalu dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada suhu -40°C. Selain itu, sampel tanah sebanyak 5 gr juga dilakukan pengayaan terlebih dahulu menggunakan 100 ml media LB (Luria Bertani) cair dengan minyak zaitun 1% dan shaker selama semalam.

Sampel tanah dan hasil pengayaan ditambahkan 9 ml buffer ekstraksi (100 mM natrium fosfat [pH 7,0], 100 mM Tris-HCL [pH 7,0], 100 mM EDTA [pH 8,0], 1,5 M NaCl, 1% CTAB dan 2% SDS) dan diinkubasi selama 30 menit pada 65°C sambil diaduk tiap 10 menit lalu disentrifugasi pada 1800 x g selama 10 menit. Supernatan ekstraksi langsung sampel tanah dituangkan ke dalam tabung berpenangas es yang mengandung 20 ml aliquot dari 25:24:1 fenol-kloroform-

isoamil alkohol. Sedangkan supernatan ekstraksi dari hasil pengayaan dimurnikan dengan *GenElute[™] Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma Aldrich). Pelet tanah diekstraksi dua kali dengan menambahkan 5 ml buffer ekstraksi dan dicampur selama 10 detik. Inkubasi pada 65°C selama 10 menit dan disentrifugasi seperti sebelumnya. Supernatan gabungan disentrifugasi pada 1800 x g selama 20 menit. Fase air dipindahkan ke tabung lalu diendapkan dengan 1x volume 20% PEG6000 selama 2 jam pada suhu kamar dan disentrifugasi pada 16.000 x g selama 20 menit pada 20-25 ° C. Pelet ekstrak kasar asam nukleat disuspensi dengan 500 µL bufer TE. Konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA metagenom dengan membandingkan serapan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3.4.3. Elektroforesis gel agarosa

Gel agarosa 1% dibuat dengan cara 0,4 g agarosa dilarutkan ke dalam 40 mL bufer TAE 1x dan dididihkan hingga larut sempurna. Perangkat elektroforesis gel agarosa disiapkan. Jika suhu larutan agarosa sudah turun hingga sekitar 50-60°C, larutan dituangkan ke dalam baki gel agarosa dan dibiarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat. Baki yang telah berisi gel agarosa padat dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis dan diisi dengan buffer TAE 1x (pastikan bahwa gel terendam seluruhnya dalam TAE). Sebanyak 2 µL DNA metagenom dan 2 µL *loading dye* 6x dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Kabel dihubungkan dari tangki elektroforesis ke sumber arus (pastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada di dekat sumur). Sumber arus dinyalakan, voltase 100 V dan waktu running 90 menit. Elektroforesis dijalankan dengan cara

menekan tombol run pada sumber arus. Setelah elektroforesis selesai, sumber arus dimatikan dan baki diangkat dari tangki elektroforesis. Gel dikeluarkan dan direndam dalam larutan EtBr selama 5 menit dan kemudian gel dicuci dengan akuades. Pita-pita DNA diamati menggunakan UV transluminator dan difoto menggunakan *GelDoc*.

3.4.4. Pembuatan media padat untuk pemeliharaan *E. coli* TOP10

Media yang digunakan merupakan media LB. Media padat digunakan untuk meremajakan isolat *E. coli* TOP10 dari stok gliserol suhu -80°C . Dibuat media padat 20 mL, menimbang 0,4 gram bacto agar, 0,2 gram tripton, 0,2 gram NaCl, dan 0,1 gram yeast extract, dilarutkan dalam 20 mL aquades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Media steril yang telah hangat kemudian dituang ke dalam cawan petri.

3.4.5. Pembuatan media cair untuk pemeliharaan *E. coli* pembawa plasmid pET-30a(+)

Media cair yang digunakan adalah media LBK. Dibuat 20 mL media cair dengan melarutkan 0,2 gram tripton, 0,2 gram NaCl, dan 0,1 gram yeast extract dalam akuades serta 20 μL kanamisin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Media cair tersebut kemudian dituangkan kedalam Erlenmeyer, sebaiknya mengisi 1/5 dari bagian Erlenmeyer. Hal ini dilakukan untuk mencukupi kebutuhan udara pada pertumbuhan bakteri.

3.4.6. Peremajaan isolat *E. coli* TOP10 pembawa plasmid pET-30a(+)

Proses peremajaan bakteri dimulai dari mengambil biakan isolat *E. coli* TOP10 dari kultur sebelumnya. Isolat diambil dengan menggunakan kawat ose. Lalu kawat yang mengandung biakan ini digoreskan pada media padat (LBK) yang baru. Selanjutnya biakan diinkubasi pada oven dengan suhu 37°C selama 16 jam.

3.4.7. Pembuatan Inokulum *E. coli* Yang Mengandung Plasmid rekombinan dan pET-30a(+)

Media cair yang digunakan adalah media LB. Dibuat media cair 20 mL, ditimbang 0,2 gram tripton, 0,2 gram NaCl, dan 0,1 gram yeast extract, dilarutkan dalam 20 mL akuades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Media cair steril yang telah dingin tersebut di tambahkan 20 µl kanamisin 50 µg/ml. Satu koloni tunggal *E. coli* TOP10 diinokulasikan ke dalam 5 mL medium cair LB yang mengandung kanamisin tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan pengocokan 150 rpm selama 16 jam.

3.4.8. Isolasi DNA plasmid *E. coli* pembawa plasmid rekombinan dan pET-30a(+)

Inokulum yang telah dibuat kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit dengan suhu 4°C dan didapatkan pellet yang mengandung *E. coli* plasmid rekombinan dan pET-30a(+). Supernatan dibuang, pellet sel diresuspensi dengan 100 µl larutan I (50 mM glukosa, 25 mM tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0). Dicampur dengan baik dan diamkan selama 5 menit. Tambahkan 200 µl larutan II

(0,2 M NaOH, SDS 1%, H₂O), homogenkan dengan membolak-balik tabung kemudian inkubasi di es selama 15 menit. Tambahkan 150 µl larutan III (5 M Na-asetat, asam asetat glasial, H₂O), homogenkan kemudian inkubasi di es selama 10 menit. Sentrifugasi campuran pada 12.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung baru yang steril. Tambahkan fenol : kloroform : isoamil alkohol (25:24:1) sebanyak 1x volume. Sentrifugasi 12.000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C. Supernatan pada fasa atas dipindahkan tabung baru yang steril. ulangi langkah penambahan larutan fenol : kloroform : isoamil alkohol lalu sentrifugasi 12.000 rpm selama 20 menit dan supernatan fasa atas dipindahkan lagi ke tabung baru yang steril. Tambahkan etanol absolut sebanyak 2x volume, diamkan dalam es selama 1 jam lalu sentrifugasi 12.000 rpm selama 5 dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang, kemudian pellet dicuci dengan etanol 70% sebanyak 1x volume lalu sentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit lalu dikeringkan. Pellet dikeringkan kemudian dilarutkan dengan 30 µl air akuades.

3.4.9. Desain primer fragmen gen lipase

Untuk mendapatkan gen target pada proses amplifikasi gen dengan PCR, dibutuhkan sepasang primer yang spesifik yaitu dengan cara dilakukan desain primer forward dan primer reverse (Shi et al., 2009). Primer degenerate yang di desain untuk amplifikasi fragmen gen lipase berdasarkan lipase golongan HSL yang telah dipublikasikan pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>). Daerah lestari asam amino yang potensial diidentifikasi menggunakan ClustalW.

Kemudian di awal basa dari primer yang didesain, ditambahkan beberapa basa pijakan dan urutan basa dari enzim restriksi *SacI* untuk forward dan *HindIII* untuk reverse. Sepasang primer *degenerate* yang didesain diharapkan dapat mengamplifikasi banyak fragmen gen lipase golongan HSL yang terdapat pada sampel DNA metagenom hasil ekstraksi DNA yang berasal dari tanah pengolahan limbah kelapa sawit.

3.4.10. Amplifikasi gen fragmen lipase menggunakan teknik PCR

Proses amplifikasi gen fragmen lipase menggunakan teknik PCR dan kit *KAPA2G Fast ReadyMix with Dye* (Boston, Massachusetts, United States). Komponen reaksi PCR dilakukan dengan mencampurkan ke dalam tabung PCR 12,5 µl 2x *KAPA2G Fast ReadyMix*, 1,25 µl primer *forward* (10 µM), 1,25 µl primer reverse (10 µM), DNA template 2,5 µl (90 ng), dan *PCR-grade water* 7,5 µl. Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan ke mesin PCR. Kemudian dilakukan menggunakan kondisi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus sebagai berikut: pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi suhu 95°C selama 15 detik, *annealing* suhu 63,2°C; 64,4°C; 66,8°C; 68°C, dan 69,5°C selama 15 detik, elongasi suhu 72°C selama 15 detik dan pasca-elongasi suhu 72°C selama 1 menit.

3.4.11. Pemurnian DNA hasil PCR

Pemurnian DNA hasil PCR dilakukan dengan menggunakan *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen), Pertama-tama sebelum purifikasi sampel, dilakukan

terlebih dahulu beberapa preparasi reagen dari kit. Menambahkan etanol absolut ke dalam buffer PE sebelum digunakan. Menambahkan larutan pH indikator ke dalam buffer PB dengan perbandingan 1:250. Setelah selesai lakukan purifikasi dengan cara menambahkan 5x volume buffer PB ke dalam 1x volume hasil campuran PCR. Apabila campuran larutan berwarna kuning maka pH kurang dari 7,5 dan ini pH terbaik untuk efisiensi pengikatan DNA pada membran dan apabila larutan berwarna oranye atau violet, maka tambahkan 10 µl natrium asetat 3M (pH 5). Masukkan sampel yang telah dicampur kedalam kolom *QIAquick* dan sentrifus 13.000 rpm selama 30-60 detik. Kemudian cuci kolom dengan 750 µl buffer PE dan sentrifus 13.000 rpm selama 30-60 detik. Sentrifus kembali kolom untuk menghilangkan sisa-sisa buffer PE. Pindahkan kolom ke dalam tabung steril baru dan tambahkan 50 µl buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ke dalam tengah kolom dan sentrifus selama 1 menit. Untuk meningkatkan konsentrasi DNA, tambahkan 30 µl buffer elusi dan diamkan 1 menit lalu sentrifus. Hasil purifikasi dicek menggunakan elektroforesis agarose.

3.4.12. Pemotongan DNA dengan enzim restriksi

Amplikon yang telah dimurnikan dan DNA plasmid yang telah diisolasi dilakukan proses restriksi yaitu proses pemotongan DNA oleh enzim restriksi yang digunakan yaitu *SacI* dan *HindIII* dan reagen-reagen tertentu. Ke dalam tabung eppendorf 1.5 mL, DNA plasmid sebanyak 2 µL, dicampur dengan 2 µL buffer *SureCut A*, enzim restriksi *SacI* 1µL dan *HindIII* 1µL dan ddH₂O 14 µL untuk plasmid rekombinan sehingga volume total 20 µL dan penambahan ddH₂O 24 µL

untuk produk PCR, sehingga volume total 30 μL . Campuran tersebut diinkubasi dalam waterbath suhu 37°C selama 1 jam.

3.4.13. Ligasi gen fragmen lipase dengan plasmid pET-30a(+)

Dimasukkan ke dalam tabung Eppendof baru dan steril ddH₂O 11 μL , kemudian DNA sisipan dan DNA plasmid pET-30a(+) yang telah dipurifikasi dan direstriksi masing-masing 1 μL DNA plasmid dan 5 μL DNA sisipan, kemudian ditambahkan buffer ligase 2 μL , spin down campuran tersebut dan terakhir ditambahkan enzim T4 DNA ligase 1 μL sehingga volume total reaksi sebanyak volume 20 μl . Inkubasi dalam pengangas es yang kemudian ditaruh dalam suhu 16°C selama 16 jam.

3.4.14. Pembuatan sel kompeten *E. coli* TOP10

E. coli TOP10 yang telah diremajakan diinokulasikan dalam 5 mL media LB cair *overnight* (16-18 jam). Diambil 1 % dari kultur dan diinokulasikan kedalam media LB cair 30 mL diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 2-2,5 jam dengan syarat kultur ditumbuhkan sampai OD_{600 nm} = 0,4 - 0,5. Setelah kultur mencapai OD, kultur diletakkan di penangas es selama 30 menit. di ambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1 mL kultur yang telah dingin dan dimasukkan kedalam tabung Eppendorf 1,5 mL yang baru dan steril. Sentrifugasi 1 menit kecepatan 12.000 rpm suhu 4°C, buang supernatannya. Kemudian kultur dilarutkan pada 1 mL CaCl₂ 0,1 M. Larutan CaCl₂ tersebut harus dalam keadaan dingin dan dihomogenkan dengan cara membolak

balikkan tabung. Campuran tersebut diinkubasi dalam es selama 30 menit lalu disentrifugasi selama 1 menit 10.000 rpm suhu 4°C dan supernatannya dibuang. Pelet yang didapat diresuspensikan dengan menggunakan 50 µL larutan CaCl₂ 0,1 M dingin dan fresh. Untuk membuat stok gliserol, larutan sel setelah diberi larutan CaCl₂ dingin, ditambahkan 14,5 % 50 µL gliserol, kemudian dihomogenkan dengan cara membolak balik tabung dan disimpan dalam suhu -80°C

3.4.15. Transformasi plasmid rekombinan ke *E. coli* TOP 10

Proses transformasi dilakukan dengan mencampurkan 5 µL plasmid rekombinan ke dalam 50 µL sel kompeten *E. coli* TOP10. Campuran diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan menginkubasi campuran sel dalam *waterbath* pada suhu 42°C selama 1 menit, kemudian segera dipindah ke *icebath* selama 2 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan 250 µL media LB cair ke dalam masing-masing campuran sel, selanjutnya diinkubasi dalam shaker incubator suhu 37°C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah menumbuhkan sel hasil transformasi ke media agar *plate* yang mengandung kanamisin, yaitu dengan cara memipet 100 µL suspensi sel kemudian disebar ke permukaan media dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Plasmid yang ada dalam sel inang *E. coli* TOP10 ditumbuhkan pada media agar LBK, karena plasmid pET30a memiliki gen resisten kanamisin sedang inang *E. coli* Top10 tidak memiliki gen resisten kanamisin.

3.4.16. Identifikasi transforman koloni *E. coli* Top10 pembawa plasmid rekombinan

Identifikasi transforman untuk mendapatkan koloni pembawa plasmid yang mengandung gen fragmen lipase dilakukan dengan cara isolasi plasmid rekombinan yang selanjutnya dilakukan PCR. Dari koloni yang tumbuh hasil transformasi produk ligasi antara DNA sisipan dan plasmid pET-30a diambil koloni yang tumbuh dan dilakukan isolasi plasmid. Dari hasil isolasi plasmid kemudian dilakukan PCR dengan primer CLF dan CLR pada suhu *annealing* 64,4°C. untuk mengetahui adanya DNA sisipan yang telah masuk dalam plasmid pET30a(+) lalu dilakukan analisis dengan elektroforesis gel agarose dan dibandingkan dengan control.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Ekstraksi DNA Metagenom

Sampel tanah diambil dari limbah kolam pengolahan kelapa sawit PT. Agro Bukit Central Kalimantan, Sampit, Kalimantan Tengah ($2^{\circ}33'55.3''S$, $112^{\circ}46'03.5''E$). Sampel diambil sedalam 3 cm dari permukaan tanah dan berasal dari 2 titik yaitu dasar kolam dan pinggir kolam. Pengambilan pada 2 titik ini bertujuan agar mikroorganisme yang didapatkan merupakan mikroorganisme *aerob* dan *anaerob*. Karakteristik tanah secara fisik berupa tanah liat berwarna hitam (dasar kolam) dan coklat (pinggir kolam).



Gambar 4.1 Peta limbah pengolahan kelapa sawit PT. Agro Bukit Central Kalimantan pencitraan satelit (Google Maps).

Sampel tanah dicampur dan diekstraksi menggunakan metode Hurt *et al.* (2001). Metode ini merupakan metode ekstraksi DNA metagenom secara langsung dan ekstraksi dilakukan secara fisik dan kimia. Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel tanah ditambahkan larutan *denaturant* terlebih dahulu. Hal ini dilakukan

untuk mendenaturasi nuklease untuk mencegah degradasi asam nukleat saat ekstraksi. Secara fisik, digunakan *heat shock* dengan nitrogen cair pada sampel tanah dan inkubasi pada suhu 60°C sambil digerus sehingga sel-sel yang berisi DNA dapat pecah atau lisis. Setelah itu, ekstraksi secara kimia dilakukan dengan larutan ekstraksi yang berisi buffer fosfat, EDTA, Tris-HCl, NaCl, CTAB, dan SDS. CTAB atau *cetyltrimethylammonium bromide* disini berguna untuk membentuk kompleks dan menghilangkan kontaminan pada sampel tanah dari DNA yang akan diekstraksi terutama asam humat. SDS atau sodium dodecyl sulfat disini yang berguna untuk melisis sel mikroorganisme. Setelah inkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan sampel tanah dan supernatant yang mengandung DNA metagenom.

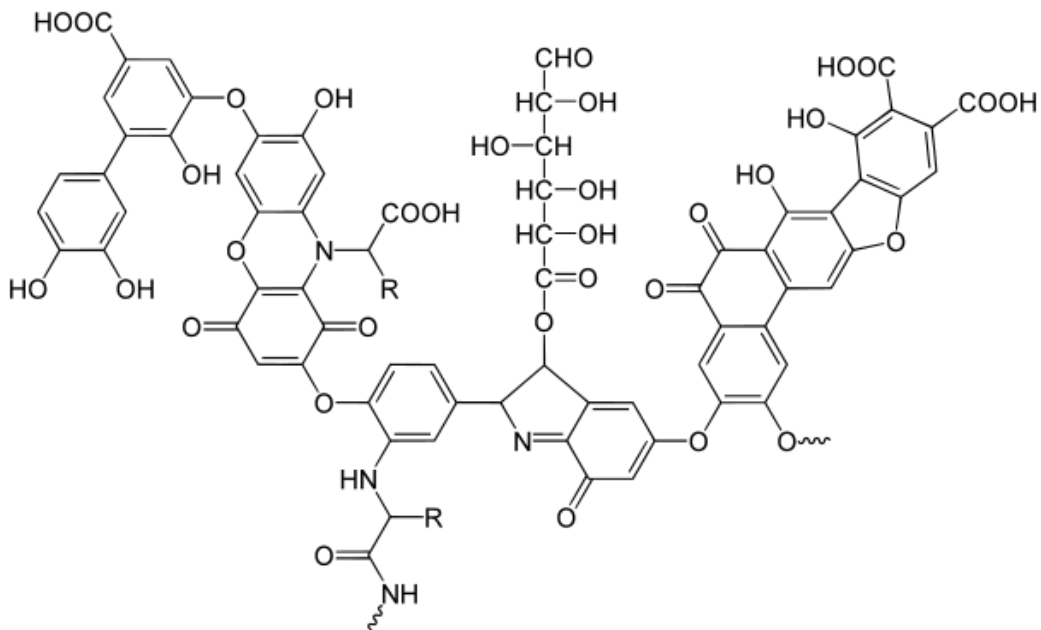


Gambar 4.2 Tanah limbah kelapa sawit (kiri) pinggir kolam dan (kanan) dasar kolam.

Supernatan yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemurnian dengan fenol, kloroform, dan isoamil alkohol dengan perbandingan 25:24:1. Setelah sentrifugasi, akan terbentuk 2 fasa dimana yang bawah merupakan fasa organik dan atas merupakan fasa air. Fasa air diambil dan ditambahkan isopropyl alkohol untuk mengendapkan DNA metagenom selama 30 menit. hasil pengendapan disentrifuge dengan kecepatan tinggi untuk mendapatkan pellet DNA pada dasar tabung.

Supernatan dibuang, pellet dicuci dengan etanol 70% dingin. Setelah dikeringkan dari alkohol, pellet dielusi menggunakan buffer TE.

Namun, cara ini tidak berhasil untuk mendapatkan DNA metagenom. Terlihat secara kasat mata larutan hasil elusi berwarna coklat dan saat elektroforesis agarose tidak menghasilkan pita DNA. Hal ini disebabkan oleh tingginya kandungan asam humat pada sampel tanah. Asam humat ini memang dapat mengganggu pengukuran dan pendeteksian DNA (Zhou *et al.*, 1996). Kontaminasi asam humat yang tinggi dapat menghambat aktivitas *Taq* DNA polymerase dalam PCR (Smalla *et al.*, 1993; Tsai and Olson, 1992), menginterferensi aktivitas pemotongan oleh enzim restriksi (Porteous and Armstrong, 1991), dan dapat mereduksi efisiensi transformasi (Christoph C Tebbe and Vahjen, 1993).



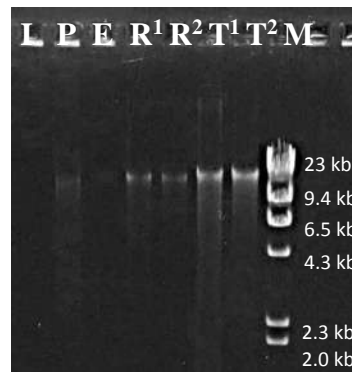
Gambar 4.3 Struktur asam humat

Sehingga, dilakukan modifikasi metode pada pengendapan DNA untuk menekan pengendapan asam humat. Digunakan metode pengendapan DNA

menggunakan PEG 6000 atau Polietilen glikol saat pengendapan DNA metagenom (Biver and Vandenbol, 2012). Hasilnya ialah, didapatkan DNA metagenome namun dengan hasil yang sangat sedikit dan masih memiliki kandungan pengotor asam humat. Dimana rasio 260/280 untuk kemurnian DNA ialah 1,7-1,9 agar DNA bisa dikatakan murni sedangkan hasil pengendapan PEG ialah 1,37.

Sehingga, untuk mendapatkan DNA metagenom yang murni dari sampel tanah yang memiliki kandungan asam humat yang tinggi dilakukan modifikasi metode pada Hurt *et al.* (2001) menjadi ekstraksi secara tidak langsung dan dilakukan pengayaan terlebih dahulu dengan lipid (López-lópez *et al.*, 2014). Media pengayaan menggunakan media LB atau luria bertani serta minyak zaitun sebagai sumber karbon dan lipid. Sampel tanah dikayakan pada 2 media yang sama namun dengan kondisi suhu yang berbeda yaitu pada suhu ruang dan pada suhu tinggi (60°C). sampel diinkubasi *overnight* pada orbital shaker 155 rpm. Setelah satu malam, dipanen pellet dari media kultur dengan sentrifugasi.

Hasil panen pelet dilakukan ekstraksi menggunakan buffer ekstraksi DNA tanpa melalui ekstraksi DNA secara fisik serta dilakukan perbandingan hasil dengan menggunakan kit. Supernatant diambil dan dilakukan pemurnian DNA metagenom menggunakan kolom *GenElute[™] Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma Aldrich). Didapatkan DNA metagenome dari kedua media kultur pada kondisi yang berbeda. Dapat dilihat dari hasil elektroforesis berupa elektroforegram dengan band DNA berkisar ~20 kb (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Elektroforegram ekstraksi DNA metagenom dari sampel tanah limbah pengolahan kelapa sawit. (I) Pengendapan dengan isopropyl alkohol, (P) Pengendapan dengan PEG 6000, (E) pengendapan dengan etanol, (R¹, R²) DNA metagenome pada media suhu ruang, (T¹, T²) DNA metagenome pada media suhu tinggi, dan (M) Marker DNA λ *Hind*III.

Tingkat kemurnian sampel DNA metagenom dari kedua media kultur bisa dikatakan murni karena memenuhi rentang kemurnian DNA yang baik (Tabel 4.1). sehingga dapat digunakan pada tahap selanjutnya. Jumlah konsentrasi DNA pada media bersuhu tinggi lebih besar dibandingkan media pada suhu ruang. Hal ini bisa disebabkan karena lingkungan asli tanah pada kolam limbah ialah bersuhu tinggi (Rupani and Singh, 2010; Soleimaninanadegani and Manshad, 2014) sehingga lebih banyak mikroorganismenya berkembang pada suhu tinggi (60°C).

Tabel 4.1 Hasil Spektrofotometri *Nanodrop*

| Sample | 230 | 260 | 280 | 260/280 | 260/230 | ng/ μ l |
|-----------------|-------|--------|--------|---------|---------|-------------|
| T ¹ | 6,854 | 5,264 | 3,413 | 1,54 | 0,77 | 263,2 |
| T ² | 4,489 | 6,342 | 3,312 | 1,91 | 1,41 | 317,1 |
| R ¹ | 0,977 | 0,674 | 0,387 | 1,74 | 0,69 | 33,7 |
| R ² | 0,67 | 0,669 | 0,347 | 1,93 | 1 | 33,4 |
| Manual PEG 6000 | 32,77 | 60,508 | 44,126 | 1,37 | 1,85 | 3025,4 |

4.2. Desain Primer dan amplifikasi fragmen gen lipase

Untuk mendapatkan gen penyandi lipase, digunakan primer degenerate yang berasal dari lipase golongan HSL atau *hormone sensitive lipase* (Shi *et al.*, 2009). Primer degenerate didesain berdasarkan gen lipase golongan HSL dengan pencarian Entrez pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>). Daerah lestari yang berpotensi diidentifikasi dengan menggunakan ClustalW.

```

gi|83596414|gb|ABC25547.1|      LDVTICRPAGKEFN-----LPVIMFFHGGGGLG-NVDTHELFR
gi|2853612|gb|AAC38151.1|      LDARLYRPLEEDN-----LPLVFFHGGGGLVGNLDTHDNLC
gi|148791449|gb|ABR12515.1|     MTVRCYQSKQNN-----EGKSTDEVALFFHGGGFCIGDIDITHHEFC
gi|296842|emb|CAA37862.1|      MIVRCYQKSTQNS-----ERKSTDEAALFFHGGGFCIGDIDITHHEFC
gi|7839595|gb|AAF70342.1|AF260  MIIRCYQSDASSHGLGFKKADTHNSDETVLYFHGGGFCIGDVNTHHEFC
gi|72385306|gb|AAZ67909.1|     PASWIGEKALEAAG-----TLYIHGGGAWCLHAPAYARLA
                                . . . . .
                                : : : : :
                                : : : : :

gi|83596414|gb|ABC25547.1|      --LVSGTEAAAVSVKYPAPEMHQPDAILGHYAATYVWVEHKGEINVTGP
gi|2853612|gb|AAC38151.1|      RSLASQTEAVVSVAYRLAPENHFPAAPLDCYAATCWLVEHAELGVDR
gi|148791449|gb|ABR12515.1|     HTVCAQTGWAVVSVDYRMAPEYPAPTALKKDCLSAYAWLTEHSQSLGALPS
gi|296842|emb|CAA37862.1|      HTVCAQTGWAVVSVDYRMAPEYPAPTALKKDCLSAYAWLTEHSQSLGALPS
gi|7839595|gb|AAF70342.1|AF260  HAVCEQTGWPIVSVDYRLAPEHPAPAALKDCITAYAWLAEHCHTLGALPS
gi|72385306|gb|AAZ67909.1|     TSLSAATGMVLLIDYRLAPEHRFPAGSDDCLGVYRWLIEQG----YHER
                                : * : : * *** * . . . * : :
                                : * : : * *** * . . . * : :

gi|83596414|gb|ABC25547.1|      RLAVAILMTRSAQGDSVGGNMLVVGNLAKQ-----
gi|2853612|gb|AAC38151.1|      RLALAG-----DSAGGNLALAVSRLAAQ-----
gi|148791449|gb|ABR12515.1|     RIVLSG-----DSAGGCLALVAQQVIKPIDALWQDNNQATETDKKA
gi|296842|emb|CAA37862.1|      RIVLSG-----DSAGGCLALVAQQVIKPIDALWQDNNQAPAADKKV
gi|7839595|gb|AAF70342.1|AF260  RIVLAG-----DSAGGGLSLIAQQLSAPSQVAWSDLG-----SA
gi|72385306|gb|AAZ67909.1|     PIVVAG-----DSAGGNLTLVTLQRARD-----
                                : : :
                                : : :
                                : : :

```

Gambar 4.5 Pensejajaran asam amino dari mikroorganisme penghasil lipase golongan HSL pada GenBank (NCBI) dengan ClustalW. (AAC38151) *Pseudomonas* sp. B11-1; (ABC25547) *Pseudomonas* sp. CL-61; (CAA37862) *Moraxella* sp. TA144; (ABR12515) *Psychrobacter* sp. 2-17; (AAF70342) *Psychrobacter* sp. St1; (AAZ67909) *uncultured* bacteria dari sedimen laut. Dua daerah lestari pada lubang oksianion dan sisi aktif berada pada kotak biru.

Dua daerah lestari pada H-G dan G-X-S-X-G (X merupakan asam amino) ditemukan pada kebanyakan lipase yaitu daerah lestari untuk lubang oksianion dan sisi aktif enzim (Jaeger *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2004). Pada lipase golongan HSL berdasarkan 6 mikroorganisme yang disejajarkan urutan asam aminonya. Didapat

2 daerah lestari pada lubang oksianion yaitu [V/L]-[F/Y/D]-[F/I]-H-G-G-[G/A] dan sisi aktif enzim HSL lipase yaitu G-[D/V]-S-[A/V]-G-G-[N/C]-[L/M/I]. Setelah itu, didesain primer yang komplemen dengan dua daerah lestari tersebut. Untuk mengecek primer yang didesain, dilakukan tes pada susunan gen lipase yang diketahui dan membandingkan hasil primer dengan susunan gen lipase yang telah terpublikasi menggunakan BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Setelah beberapa kali dioptimasi, didapatkan primer degenerate CLF (*Cold Lipase Forward*) dan CLR (*Cold Lipase Reverse*) (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Primer Degenerate lipase golongan HSL

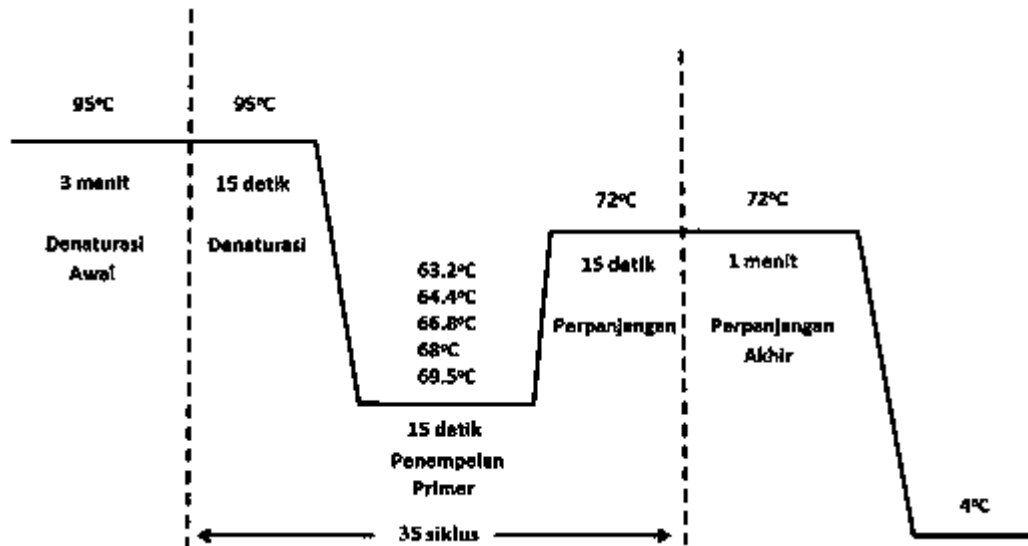
| Primer | Susunan (5' ke 3') ^{a, b} |
|--------|---|
| CLF | ACG <u>GAGCTC</u> GTGGTGTAYTTYCAYGGBGG |
| CLR | TGTA <u>AAGCTT</u> CAGGTTGCCRCCSGCRCTRTCNCC |

^aB: C, G/T; N: A, C, G/T; R: A/G; S: G/C; Y: C/T.

^bSisi restriksi ditandai dengan catak miring dan garis bawah.

Kedua primer ditambahkan sisi restriksi *SacI* (GAGCTC) dan *HindIII* (AAGCTT) yang berguna untuk tahapan kloning pada vektor plasmid pET30a. Proses amplifikasi dengan PCR menggunakan kit *KAPA2G Fast ReadyMix with Dye* (Boston, Massachusetts, United States). Menggunakan DNA polymerase yang telah direkayasa dinamakan *KAPA2G Fast DNA Polymerase* lebih cepat dalam amplifikasi dibandingkan dari *Taq* DNA polymerase yang biasa digunakan kebanyakan reaksi PCR. Buffer yang telah dioptimasi untuk mendapatkan hasil yang baik dan mengandung 1,5 mM MgCl₂ untuk 1x reaksi. Serta telah dilengkapi

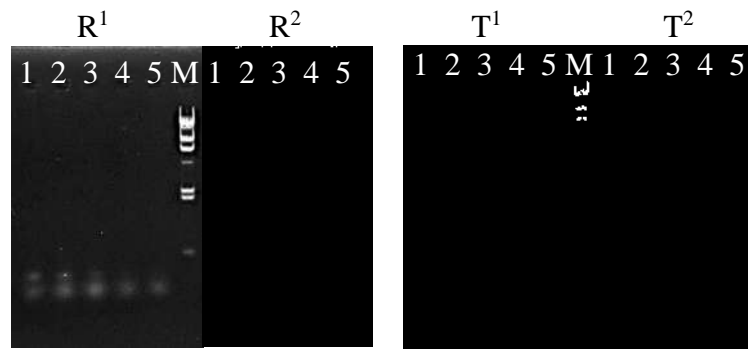
dengan *loading dye* sehingga hasil PCR bisa langsung dicek menggunakan elektroforesis agarose.



Gambar 4.6 Siklus amplifikasi PCR fragmen gen lipase.

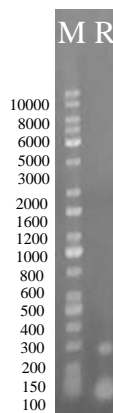
Proses amplifikasi gen penyandi fragmen lipase dilakukan dengan memvariasi suhu penempelan primer atau *annealing* yaitu pada suhu 63,2°C; 64,4°C; 66,8°C; 68°C, dan 69,5°C. Variasi suhu dilakukan dengan tujuan untuk menentukan suhu optimal dari primer agar dapat menempel pada DNA template secara sempurna sehingga didapatkan fragmen DNA dari gen penyandi lipase. Dari hasil variasi tersebut, fragmen gen lipase dapat teramplifikasi dengan suhu *annealing* 63,2°C dan 64,4°C (Gambar 4.7). Amplikon yang di dapatkan dari hasil PCR dengan menggunakan primer CLF dan CLR memiliki ukuran basa sebesar 250-300 pasang basa. Hal ini sesuai pada penelitian yang telah dilakukan oleh Shi *et al.* (2009) dan Yan *et al.* (2016). Dari 4 sampel DNA metagenom, hanya sampel dari pengayaan pada suhu ruang yang positif menghasilkan amplikon fragmen gen

lipase golongan HSL. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada mikroorganisme penghasil lipase golongan HSL pada suhu tinggi karena mikroorganisme golongan HSL ini hidup pada suhu rendah (Shi *et al.*, 2009).



Gambar 4.7 Hasil amplifikasi PCR sampel DNA metagenom R¹, R², T¹, dan T² dengan variasi suhu *annealing*. (M) Marker DNA λ HindIII, (1) suhu 63.2°C, (2) suhu 64.4°C, (3) suhu 66.8°C, (4) suhu 68°C, dan (5) suhu 69.5°C.

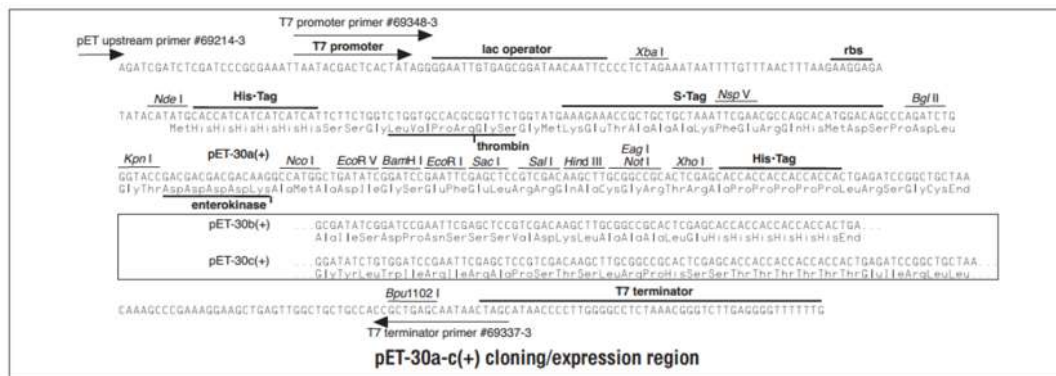
Hasil PCR kemudian dipurifikasi menggunakan kolom *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen). Tujuan pemurnian ini untuk menghilangkan sisa-sisa zat dari reagen PCR, sehingga yang tertinggal hanya DNA saja. Hal ini diperlukan untuk tahapan restriksi dan ligase DNA ke dalam vektor bisa dilakukan. Hasil pemurnian produk PCR dapat dilihat pada gambar 4.8.



Gambar 4.8 Hasil purifikasi produk PCR. (R) DNA metagenom, (M) Marker DNA Kapa ladders

4.3. Restriksi dan Ligasi fragmen gen lipase ke dalam plasmid pET-30a(+)

Pada kloning gen tahap yang paling penting adalah proses restriksi molekuler DNA dan vektor dengan posisi yang tepat dan juga proses penempelan vektor dengan gen insert untuk mendapatkan plasmid rekombinan yaitu dinamakan dengan proses ligasi. Saat restriksi vektor harus dipotong pada posisi tunggal untuk membuka lingkaran sehingga molekul DNA dapat diinsersikan. Tipe pemotongan pada enzim restriksi sangat berpengaruh. Dalam kloning gen yang umum digunakan adalah tipe II yaitu enzim memotong pada tempat yang spesifik pada molekul DNA pada urutan pengenalan dan tidak pada tempat lain. Endonuklease restriksi tipe II digunakan dengan alasan karena dapat memotong DNA pada sisi spesifik, sehingga dihasilkan pola potongan yang spesifik pula. Enzim restriksi yang digunakan pada penelitian ini adalah *SacI* dan *HindIII* dengan model pemotongannya yaitu ujung lengket (*sticky end*).



Gambar 4.9 Peta sisi restriksi dari plasmid pET-30a-c(+)

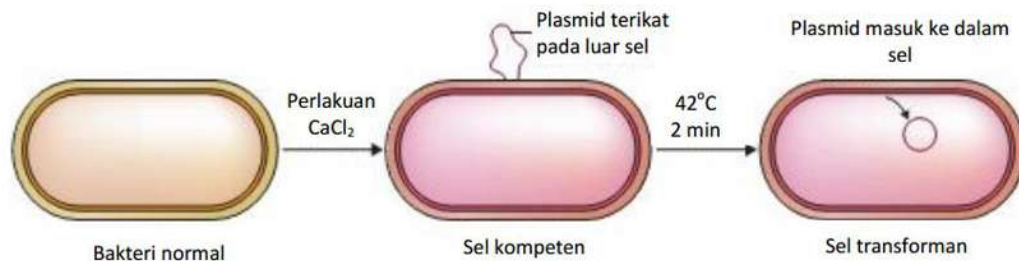
Plasmid pET-30a(+), hasil isolasi dan fragmen DNA lipase hasil amplifikasi dengan PCR yang keduanya telah dilakukan purifikasi, masing-masing dilakukan restriksi dengan menggunakan enzim *SacI* dan *HindIII*. Untuk menjaga pH pada

DNA saat proses restriksi berlangsung ditambahkan Buffer *SureCut A*. Inkubasi restriksi dilakukan pada suhu 31°C dalam waterbath dengan lama inkubasi 1 jam. Setelah 1 jam enzim dinonaktifkan dengan pemanasan 80°C dalam penangas air selama 5 menit. Dalam proses untuk mendapatkan plasmid rekombinan yang nantinya akan ditransformasikan ke dalam sel inang, dilakukan proses ligasi dengan menggunakan enzim ligase. Ligase dikode oleh bakteriofage T4 yang dapat menyambung dua fragmen DNA double helix yang berbeda. T4 DNA ligase, dapat mengkatalisis pembentukan ikatan fosodiester antara ujung 5'-fosfat dan ujung 3'-hidroksil antara plasmid pET-30a(+) dengan fragmen gen lipase. Waktu optimal dalam proses ligasi diperlukan inkubasi selama 16 jam dan enzim T4 ligase akan bekerja secara optimal pada suhu 16°C.

4.4. Transformasi plasmid pET-30a(+) rekombinan ke dalam *E. coli* TOP10

Analisis adanya koloni positif dapat dilakukan setelah DNA plasmid pET-30a(+) rekombinan ditransformasi ke dalam sel inang *E. coli* TOP10. *E. coli* TOP10 merupakan sel inang yang khusus dirancang untuk penggandaan dan penyimpanan plasmid rekombinan dalam proses transformasi. Sebelumnya *E. coli* TOP10 terlebih dahulu di perlakukan secara fisik dan kimiawi dengan penambahan suatu garam yaitu CaCl₂, MnCl₂ atau MgCl₂. Pemberian garam tersebut berguna untuk meningkatkan permeabilitas membran sel dan meningkatkan porositas membran karena terdapat interaksi antara mineral garam dengan bagian hidrofilik dari membran sel inang. Penambahan CaCl₂ menyebabkan presipitasi DNA pada

permukaan luar sel sehingga menyebabkan perubahan permukaan pada dinding sel. Hal ini memungkinkan DNA dapat masuk ke dalam sel inang (Brown, 2010).



Gambar 4.10 Pengikatan dan pengambilan DNA oleh sel bakteri yang telah kompeten (Brown, 2010)

Proses transformasi berawal dari mencampurkan plasmid rekombinan (fragmen gen lipase ke dalam plasmid pET-30a(+)) dengan sel kompeten yang kemudian ditempatkan dalam penangas es selama 30 menit karena ketika sel kompeten dimasukkan dalam air dingin, dalam proses pengambilan DNA ke sel inang akan lebih efisien (Brown, 2010). Plasmid rekombinan yang sebelumnya telah menempel pada dinding sel *E. coli* TOP10 akan dibawa masuk ke dalam sitoplasma sel inang *E. coli* TOP10. Proses tersebut distimulasi dengan menaikkan temperatur sampai 42°C dalam waktu singkat. Proses ini dinamakan *heat shock* terjadi pada suhu 42°C selama 1 menit. Untuk mencegah kembalinya plasmid rekombinan keluar dari inang, campuran langsung dimasukkan dalam penangas es selama 2 menit. Selain itu, dilakukan regenerasi sel dari sel kompeten *E. coli* TOP10 yaitu dengan penambahan 250 µl media LB air dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 1 jam suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Proses regenerasi sel dilakukan karena sebelumnya membran sel kompeten *E. coli* TOP10 telah mendapat perlakuan secara fisik dan kimiawi dengan penambahan garam CaCl₂,

sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas membran sel. Setelah 1 jam inkubasi, kultur disebar kedalam media LB padat yang mengandung antibiotik kanamisin. Penambahan antibiotik tersebut karena plasmid rekombinan pET-30a yang membawa fragmen gen lipase memiliki gen yang resisten terhadap kanamisin, diinkubasi lakukan suhu 37°C *overnight*. Klon-klon yang tumbuh sebanyak 26 klon disebut sebagai PFL2S (Pustaka Fragmen Lipase Limbah Sawit).



Gambar 4.11 Hasil transformasi. (kiri) klon plasmid rekombinan, (tengah) kontrol negatif, (kanan) kontrol positif.

Keberhasilan atau tidaknya saat transformasi, biasanya dapat dilihat dari kontrol negatif dan kontrol positif. Pada Gambar 4.11, kontrol negatif yang digunakan adalah *E. coli* TOP10 dan kontrol positif adalah transformasi plasmid pET-30a(+) sirkuler tanpa insert yang ditransformasikan ke dalam *E. coli* TOP10. Kontrol negatif tidak tumbuh koloni dalam media LB+kanamisin, hal ini dikarenakan pada kontrol negatif hanya terdapat *E. coli* TOP10 kosong yang tidak membawa atau memiliki plasmid yang resisten terhadap kanamisin. Untuk kontrol positif adalah plasmid pET-30a(+) tanpa insert yang di transformasikan dalam *E. coli* TOP10 tumbuh banyak koloni dalam media LB+kanamisin, hal ini karena pET-30a(+) memiliki resisten terhadap kanamisin. Sedangkan koloni yang

di dapatkan dari hasil ligasi yaitu plasmid rekombinan fragmen gen lipase dalam *E. coli* TOP10. koloni yang positif adanya gen insert fragmen gen lipase dapat dilakukan dengan seleksi transforman.

4.5. Identifikasi transforman *E. coli* TOP10 pembawa plasmid pET-30a(+) rekombinan

Identifikasi sel yang telah mengalami transformasi dapat dilakukan berbagai macam cara. Cara yang paling umum digunakan adalah dengan melakukan seleksi biru putih, restriksi *single digest*, *double digest*, dan amplifikasi PCR. Identifikasi yang digunakan disini ialah menggunakan amplifikasi PCR, Koloni yang didapatkan dari tahapan transformasi, terlebih dahulu dilakukan *replica plating* dengan tujuan untuk pertama, menghindari kontaminasi antar koloni, yang kedua, untuk memudahkan pengambilan isolat rekombinan saat akan dilakukan isolasi plasmid.



Gambar 4.12 Hasil *replica plating* klon PFL2S.

Koloni diambil secara acak yaitu koloni nomor 1, 5, 8, dan 20. Dengan *KAPA2G Fast ReadyMix with dye* dan suhu *annealing* 64.4°C, dilakukan amplifikasi pada 4 plasmid koloni 1, 5, 8, dan 20. Hasilnya dari keempat plasmid, menunjukkan adanya gen tersisipi sekitar 250-300 bp.



Gambar 4.12 Hasil amplifikasi plasmid dengan primer CLF dan CLR. (K) control, (1) plasmid rekombinan klon 1, (5) plasmid rekombinan klon 5, (8) plasmid rekombinan klon 8, dan (20) plasmid rekombinan klon 20

Plasmid rekombinan disekuensing di laboratorium 1st Base Kuala Lumpur Malaysia terjadi degradasi plasmid saat pengiriman sampel. Oleh karena itu, dalam penelitian ini belum bisa mengetahui tingkat homologi fragmen gen terhadap golongan lipase HSL yang telah diketahui dan mengamplifikasi gen lengkap penyandi lipase. Sehingga, diperlukan penelitian lanjutan untuk sekuensing hingga karakterisasi enzim lipase.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Tingkat kemurnian hasil ekstraksi DNA sampel tanah pengolahan limbah kelapa sawit menggunakan metode Hurt *et al.* (2001) termodifikasi mempunyai rasio absorbansi 260/280 sebesar 1,93 serta ukurannya berkisar 20 bp.
2. Primer *degenerate* CLF dan CLR dapat mengamplifikasi fragmen gen lipase dari sampel tanah pengolahan limbah kelapa sawit dengan ukuran 250-300 bp.
3. Hasil transformasi plasmid pET-30a(+) tersisipi fragmen gen lipase menghasilkan pustaka klon sebanyak 26 klon yang disebut pustaka fragmen lipase limbah sawit (PFL2S).

5.2. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan sekuensing ulang terhadap plasmid rekombinan untuk mendapatkan sekuen susunan fragmen gen lipase dan dapat analisis tingkat homologinya dengan lipase golongan HSL yang telah dipublikasi. Sehingga, dapat dilakukan penelitian selanjutnya untuk mendapatkan susunan gen lengkap penyandi lipase golongan HSL dengan menggunakan *Thermal Asymmetric Interlaced PCR* dan primer *arbitrary degenerate* serta dilakukan kloning gen hingga ekspresi untuk karakterisasi enzim lipase golongan HSL dari tanah limbah kelapa sawit.

DAFTAR PUSTAKA

- Andualema, B., Gessesse, A., 2012. microbial lipase and their industrial applications: Review. *Biotechnology* **11**, 100–118.
- Biver, S., Vandebol, M., 2012. Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **40**, 191-200
- BPPT, 2014. Kepala BPPT dan Menristek Resmikan Pembangunan Bio Center Plant dan Ground Breaking Unit Produksi Enzim di Gresik. <http://www.bppt.go.id>. 15 Desember 2015
- Brown, T.A., 2010. Gene Cloning & DNA Analysis: An Introduction 6th Edition, *wiley-blackwell*.
- Cardenas, F., Alvarez, E., De Castro-Alvarez, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Valmaseda, M., Elson, S.W., Sinisterra, J.V., 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J. Mol. Catal. B, Enzym.* **14**, 111–123.
- Dalmau, E., Montesinos, J., Lotti, M., Casas, C., 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 657–663.
- Daniel, R., 2005. The Metagenomics of Soil. *Nature* **3**, 470–478.
- Dutra, A., Paula, V., Kaori, K., Maltempi, E., Souza, D., Oliveira, F., Glogauer, A., Maria, G., Alexander, D., Krieger, N., 2015. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Immobilization of LipC12 , a new lipase obtained by metagenomics , and its application in the synthesis of biodiesel esters. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* **116**, 45–51.
- Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J.D., Steele, H.L., Reymond, J., Jaeger, K., Streit, W.R., 2006. Isolation and Biochemical Characterization of Two Novel Metagenome-Derived Esterases. *Applied and environmental microbiology* **72**, 3637–3645.
- Fan, X., Niehus, X., Sandoval, G., 2012. Chapter 27 Lipases as Biocatalyst for Biodiesel Production. In: *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Method in Molecular Biology*. pp. 471–483.
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V, Norddahl, B., 2009. R EVIEW A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1298–1315.

- Gabor, E.M., De Vries, E.J., Janssen, D.B., 2004. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ. Microbiol.* **6**, 948–958.
- Gabor, E.M., Vries, E.J., Janssen, D.B., 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 153–163.
- Gaoa, X.G., Cao, S.G., Zhang, K.C., 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 74–82.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Brooks, M.S., Budge, S., 2010. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification : Review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **6**, 54–76.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L., 2012. Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA 4th Edition, *ASM press*.
- Glogauer, A., Martini, V.P., Faoro, H., Couto, G.H., Müller-santos, M., Monteiro, R.A., Mitchell, D.A., Souza, E.M. De, Pedrosa, F.O., Krieger, N., 2011. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microb. Cell Fact.* **10**, 54.
- Gottschalk, G., Henne, A., Schmitz, R.A., Bo, M., Daniel, R., 2000. Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **66**, 3113–3116.
- Gupta, R., Q., B., P., L., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 15–32.
- Habib, M.A.B., Yusoff, F.M., Phang, S.M., Ang, K.J., Mohamed, S., 1997. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and algal culture. *Aquaculture* **158**, 95–105.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, R245–R249.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 235–251.
- Hasan, F., Shah, A.A., Javed, S., Hameed, A., 2010. Enzymes used in detergents : Lipases. *African J. Biotechnol.* **9**, 4836–4844.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., 2004. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**, 155–170.

- Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Tiedje, J.M., Zhou, J., Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y.U.L., Palumbo, A. V, 2001. Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**.
- Jaeger, K., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., 1994. Bacterial lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **15**, 29–63.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 315–51.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, a., Reetz, M.T., 2001. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 519–530.
- Jeon, J.H., Kim, J.-T., Kim, Y.J., Kim, H.-K., Lee, H.S., Kang, S.G., Kim, S.-J., Lee, J.-H., 2009. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 865–874.
- JunGang, L., KeGui, Z., WenJun, H., 2010. Cloning and biochemical characterization of a novel lipolytic gene from activated sludge metagenome, and its gene product. *Microb. Cell Fact.* **9**, 83.
- Kakirde, K.S., Parsley, L.C., Liles, M.R., 2010. Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 1911–1923.
- Kim, H.K., Oh, T., Lee, J., 2004. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiology Letters* **235**, 349–355.
- Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., Rupp, S., 2007. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J. Biotechnol.* **127**, 575–592.
- Lee, S.-W., Won, K., Lim, H.K., Kim, J.-C., Choi, G.J., Cho, K.Y., 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 720–726.
- Liaw, R.-B., Cheng, M.-P., Wu, M.-C., Lee, C.-Y., 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. *Bioresour. Technol.* **101**, 8323–9.
- Liu, D., Trodler, P., Eiben, S., Koschorreck, K., Müller, M., Pleiss, J., Maurer, S.C., Branneyby, C., Schmid, R.D., Hauer, B., 2010. Rational design of pseudozyma antarctica lipase B yielding a general esterification catalyst. *ChemBioChem* **11**, 789–795.

- López-lópez, O., Cerdán, M.E., Siso, M.I.G., 2014. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. *Current Protein and Peptide Science* 445–455.
- Lorenz, P., Eck, J., 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nature* **3**, 510–516.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA Extraction from Soils : Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods DNA Extraction from Soils : Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2354–2359.
- Metzger, J.O., Bornscheuer, U., 2006. Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 13–22.
- Momsia, T., Momsia, P., 2013. A Review on Microbial Lipase-Versatile Tool For Industrial Applications. *Int. J. life Sci. Biotechnol. pharma Res.* **2**.
- Obidzinski, K., 2013. FACT FILE – Indonesia world leader in palm oil production. <http://news.trust.org/> 10 September 2015
- Otten, L.G., Quax, W.J., 2005. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng.* **22**, 1–9.
- Paul, E.A., 2015. Soil Microbiology , Ecology , and Biochemistry : An Exciting Present and Great Future Built on Basic Knowledge and Unifying Concepts, 4th ed, Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. *Elsevier Inc.*
- Porteous, L.A., Armstrong, J.L., 1991. *Current Microbiology Recovery of Bulk DNA from Soil by a Rapid , Small-Scale Extraction Method* **22**, 345–348.
- Quail, M.A., 2010. DNA : Mechanical Breakage. *Encycl. Life Sci.* 1–5.
- Ranjan, R., Grover, A., Kapardar, R.K., Sharma, R., 2005. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 57–65.
- Ray, A., 2012. Application of Lipase in Industry. *Asian J. Pharm. Tech* **2**, 33–37.
- ResearchandMarket, 2015. Lipase Market by Source, Application, & by Geography - Global Forecast to 2020. <http://www.marketsandmarkets.com/> 27 Oktober 2015
- Rupani, P., Singh, R., 2010. Review of current palm oil mill effluent (POME) treatment methods: Vermicomposting as a sustainable practice. *World Appl. Sci.* **11**, 70–81.

- Sarrouh, B., Santos, T.M., Miyoshi, A., Dias, R., Azevedo, V., 2012. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *J. Bioprocess. Biotech.* **S4**, 1–10.
- Schneegurt, M.A., Dore, S.Y., 2003. Direct Extraction of DNA from Soils for Studies in Microbial Ecology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 1–8.
- Schoemaker, H.E., 2003. Dispelling the Myths--Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science* **299**, 1694–1697.
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A.K., 2011. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A review. *Biotechnology* **10**, 23–40.
- Shi, P., Liu, W., Meng, K., Bai, Y., Wang, G., Zhan, Z., Yao, B., 2009. Lipase Diversity in Glacier Soil Based on Analysis of Metagenomic DNA Fragments and Cell Culture. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 888–897.
- Simon, C., Daniel, R., 2009. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 265–276.
- Smalla, K., Cresswell, N., Wolters, A., Eisas, J.D. Van, 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification.
- Soberón-Chavez, G., Palmeros, B., 1994. Pseudomonas Lipases: Molecular Genetics and Potential Industrial Applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 95–105.
- Soleimaninanadegani, M., Manshad, S., 2014. Enhancement of Biodegradation of Palm Oil Mill Effluents by Local Isolated Microorganisms. *Int. Sch. Res. Not.* 2014, 1–8.
- Steele, H.L., Jaeger, K.-E., Daniel, R., Streit, W.R., 2009. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 25–37.
- Sun, B., 2009. Identification of Novel Esterase from Metagenomic Library of Yangtze River. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 187–193.
- Syrén, P.O., Lindgren, E., Hoeffken, H.W., Branneby, C., Maurer, S., Hauer, B., Hult, K., 2010. Increased activity of enzymatic transacylation of acrylates through rational design of lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **65**, 3–10.
- Tebbe, C.C., Vahjen, W., 1993. Interference of Humic Acids and DNA Extracted Directly from Soil in Detection and Transformation of Recombinant DNA from Bacteria and a Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2657–2665.

- Tsai, Y., Olson, B.H., 1992. Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol* **58**, 2292–2295.
- Uchiyama, T., Miyazaki, K., 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 616–622.
- Vakhlu, J., Kour, A., 2006. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron. J. Biotechnol.* **9**, 69–85.
- Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A.K., 2012. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (Review). *Int. Res. J. Biol. Sci.* **1**, 88–92.
- Wilson, K., Walker, J., 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology Seventh edition, *Cambridge University Press*.
- Yan, Q., Duan, X., Liu, Y., Jiang, Z., Yang, S., 2016. Biotechnology for Biofuels Expression and characterization of a novel 1, 3 - regioselective cold - adapted lipase from *Rhizomucor endophyticus* suitable for biodiesel synthesis. *Biotechnol. Biofuels* 1–13.
- Yun, J., Kang, S., Park, S., Yoon, H., Kim, M.J., Heu, S., Ryu, S., 2004. Characterization of a novel amyolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7229–7235.
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., Liu, D., 2015. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **44**, 182–197.
- Zhou, J., Bruns, M.A.N.N., Tiedje, J.M., 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol* **62**, 316–322.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan larutan stok

- Pembuatan larutan stok 0,1 M Tris-HCl pH 7.0 (Mr Tris = 121,14 gr/mol)

$$0,1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr Tris}} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$0,1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{121,14} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$\text{gram} = 1,2114$$

Sebanyak 1,2114 gr Tris dilarutkan terlebih dahulu dalam 70 ml aquades lalu ditambahkan HCl 4N hingga pH 7.0 dan ditambahkan aquades kembali hingga 100 ml.

- Pembuatan larutan stok 0,1 M EDTA pH 8.0 (Mr EDTA = 292,24 gr/mol)

$$0,1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr EDTA}} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$0,1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{292,24} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$\text{gram} = 2,9224$$

Sebanyak 2,9224 gr Tris dilarutkan terlebih dahulu dalam 70 ml aquades lalu ditambahkan NaOH 4N hingga pH 8.0 dan ditambahkan aquades kembali hingga 100 ml.

- Pembuatan larutan stok buffer fosfat pH 7.0

Dibuat larutan A yang mengandung 1 M NaH_2PO_4 (13,8 gr dalam 100 ml), dan larutan B yang mengandung 1 M Na_2HPO_4 (14,2 gr dalam 100 ml). Untuk mendapatkan bufer dengan pH 7.0, campurannya seperti tabel berikut.

| A (X ml) | B (Y ml) | pH |
|------------|------------|-----|
| 39 | 61 | 7.0 |

- Pembuatan larutan stok glukosa 0,1 M (Mr Glukosa = 180,16 gr/mol)

$$0,1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr Glukosa}} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$0,1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{180,16} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$\text{gram} = 1,8016$$

Sebanyak 1,8016 gr glukosa dilarutkan dengan 100 ml aquades.

Lampiran 2. Pembuatan larutan denaturan

- 10 mM Tris-HCl pH 7.0

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ ml} \times 0,01 \text{ M}$$

$$V1 = 10 \text{ ml (Tambahkan aquades hingga 100 ml)}$$

- 1 mM EDTA

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ ml} \times 0,001 \text{ M}$$

$$V1 = 1 \text{ ml (Tambahkan aquades hingga 100 ml)}$$

- 0,5% 2-Merkaptoetanol

Sebanyak 2,5 ml dari stok larutan 2% 2-merkaptoetanol diencerkan dengan menambahkan aquades hingga 10 ml.

Lampiran 3. Pembuatan larutan buffer ekstraksi DNA

- 100 mM buffer fosfat pH 7.0

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 1 \text{ M} = 100 \text{ ml} \times 0,1 \text{ M}$$

$$V1 = 10 \text{ ml (Tambahkan aquades hingga 100 ml)}$$

- 100 mM Tris-HCl pH 7.0
- 100 mM EDTA pH 8.0
- 1,5 M NaCl (Mr = 58,44 gr/mol)

$$1,5 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr NaCl}} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$1,5 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{58,44} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$\text{gram} = 8,766$$

Sebanyak 8,766 gr NaCl dilarutkan dengan 100 ml aquades.

- 1% CTAB


Sebanyak 1 gr CTAB dilarutkan dalam 100 ml aquades.

- 2% SDS

Sebanyak 2 gr SDS dilarutkan dalam 100 ml aquades.

Lampiran 4. Desain primer CLF dan CLR untuk amplifikasi fragmen gen lipase

- Primer Forward



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

SPECIFICATION SHEET WWW.IDTDNA.COM

10-May-2016 Order No. **8405259**

Ref. No. **98265494**

Sequence - CLF 25 nmole DNA Oligo, 29 bases

5'- ACG GAG CTC GTG GTG TAY TTY CAY GGB GG -3'

| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|---|------------------------|--|
| <i>T_m</i> (50mM NaCl): 66.8 °C | 7.9 = 28.6 = 0.26 | SRI SUMARSIH |
| GC Content: 59.2% | OD 260 nmols mg | UNIVERSITAS AIRLANGGA |
| Molecular Weight: 8,991.7 | For 100 µM: add 286 µL | KAMPUS C MULYOOREJO |
| nmols/OD260: 3.6 | | SURABAYAJAWATIMUR, INDONESIA 60 |
| ug/OD260: 32.6 | | INDONESIA |
| Ext. Coefficient: 275,513 L/(mole·cm) | | 081553104765 |
| | | Customer No. 4420542 PO No. 3306-DA-1605 |

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.53 at 25 °C
Strongest Folding *T_m*: 47.2 °C

| Oligo Base Types | Quantity | Disclaimer |
|----------------------------|----------|---|
| DNA Bases | 29 | See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties |
| Modifications and Services | Quantity | |
| Standard Desalting | 1 | |

Mfg. ID 200507028

Labels - Peel Here

98265494 IDT

S. SUMARSIH

200507028

CLF

5'-ACG GAG CTC GTG GTG TAY TTY CAY GGB GG-3'

25 nmols

286 µL

7.900 = 28.600 nmols = 0.260 mg

98265494 IDT

S. SUMARSIH

200507028

CLF

5'-ACG GAG CTC GTG GTG TAY TTY CAY GGB GG-3'

25 nmols

286 µL

7.900 = 28.600 nmols = 0.260 mg

I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The *T_m* shown takes no account of Mg²⁺ and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/scitools to calculate accurate *T_m* for your reaction conditions.

M

- Primer Reverse



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

SPECIFICATION SHEET WWW.IDTDNA.COM

10-May-2016 Order No. **8405259**

Ref. No. **98265495**

Sequence - CLR 25 nmole DNA Oligo, 33 bases

5'- TGT AAG CTT CAG GTT GCC RCC SGC RCT RTC NCC -3'

| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|--|------------------------|--|
| <i>T_m</i> (50mM NaCl)*: 69.9 °C | 7.1 = 24.2 = 0.24 | SRI SUMARSIH |
| GC Content: 60.6% | OD 260 nmoles mg | UNIVERSITAS AIRLANGGA |
| Molecular Weight: 10,049.3 | For 100 µM: add 242 µL | KAMPUS C MULYOUREJO |
| nmoles/OD260: 3.4 | | SURABAYAJAWATIMUR, INDONESIA 60 |
| ug/OD260: 34.0 | | INDONESIA |
| Ext. Coefficient: 295,300 L/(mole·cm) | | 081553104765 |
| | | Customer No. 4420542 PO No. 3306-DA-1605 |

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.09 at 25 °C
 Strongest Folding T_m: 26.5 °C

| Oligo Base Types | Quantity | Disclaimer |
|-----------------------------------|----------|---|
| DNA Bases | 33 | See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties |
| Modifications and Services | Quantity | |
| Standard Desalting | 1 | |

Mfg. ID200506384 Labels - Peel Here

98265495 10-May-2016

S.SUMARSIH

200506384

CLR

5'-TGT AAG CTT CAG GTT GCC RCC SGC RCT RTC NCC-3'

MW: 10,049.3g/mol T_m: 69.9°C

7,100 = 24.2nmol = 0.24mg

98265495 10-May-2016

S.SUMARSIH

200506384

CLR

5'-TGT AAG CTT CAG GTT GCC RCC SGC RCT RTC NCC-3'

MW: 10,049.3g/mol T_m: 69.9°C

7,100 = 24.2nmol = 0.24mg

I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg²⁺ and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/scitools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

M

Lampiran 5. Pembuatan larutan untuk isolasi plasmid

- Larutan I

- 50 mM glukosa

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ ml} \times 0,05 \text{ M}$$

$$V1 = 50 \text{ ml (Tambahkan aquades hingga 100 ml)}$$

- 25 mM Tris-HCl pH 8.0

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ ml} \times 0,025 \text{ M}$$

$$V1 = 25 \text{ ml (Tambahkan aquades hingga 100 ml)}$$

- 10 mM EDTA pH 8.0

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 0,1 \text{ M} = 100 \text{ ml} \times 0,01 \text{ M}$$

$$V1 = 10 \text{ ml (Tambahkan aquades hingga 100 ml)}$$

- Larutan II

- 0,2 M NaOH

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 4 \text{ M} = 100 \text{ ml} \times 0,2 \text{ M}$$

$$V1 = 5 \text{ ml (Tambahkan aquades hingga 100 ml)}$$

- 1% SDS

- Larutan III

- 5 M Na-asetat (Mr = 82,0343 gr/mol)

$$5 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr Na - aasetat}} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$5 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{82,0343} \times \frac{1000}{20 \text{ ml}}$$

$$\text{gram} = 8,2034$$

Sebanyak 8,2034 gr Na-asetat dilarutkan dengan 20 ml aquades.