

**SKRINING, PRODUKSI, DAN KARAKTERISASI ENZIM
FOSFATASE DARI BAKTERI ASAL TANAH
MANGROVE JENU TUBAN**

TESIS

**untuk memenuhi sebagian syarat
mencapai gelar akademik Magister Sains (M. Si.)**



**Dela Dwi Alawiyah
NIM. 081924153001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**SKRINING, PRODUKSI, DAN KARAKTERISASI ENZIM FOSFATASE
DARI BAKTERI ASAL TANAH MANGROVE JENU TUBAN**

yang dipersiapkan dan disusun oleh
Dela Dwi Alawiyah
NIM. 081924153001
telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 24 Januari 2022

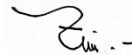
Susunan Dewan Penguji

Pembimbing utama



Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes
NIP. 197410152002122001

Penguji I



Prof. Dr. Ir. Tini Surtiningsih, DEA
NIP. 195110121980032001

Pembimbing pendamping



Dr. Salamun., M.Kes
NIP. 196111101987031003

Penguji II



Almando Geraldi, S.Si., Ph.d
NIP. 198704212018093101

Penguji III



Dr. Hamidah, M.Kes
NIP. 196306101987012001

Tesis ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
Untuk memperoleh gelar Magister Sains

Mengetahui,
Ketua Departemen Biologi
Magister Biologi



Prof. Dr. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si
NIP. 196602211992032001

Koordinator Program Studi
Magister Biologi



Prof. Dr. Alfiah Hayati, Dra., M.Kes.
NIP. 196404181988102001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 31 Januari 2022

Yang Menyatakan



Dela Dwi Alawiyah

KATA PENGANTAR

Puji syukur bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul ‘Skrining, Produksi, dan Karakterisasi Enzim Fosfatase dari Bakteri Asal Tanah Mangrove Jenu Tuban’ dengan baik.

Penyusunan tesis ini adalah untuk memenuhi sebagian syarat mencapai gelar akademik Magister Sains. Selain itu, tesis ini juga bertujuan untuk menambah wawasan tentang potensi isolat TBN13 asal tanah Mangrove Jenu Tuban dalam menghasilkan enzim fosfatase dan memberikan khasanah keilmuan mengenai proses purifikasi, nilai aktivitas enzim, serta karakterisasi enzim fosfatase yang dihasilkan. Diharapkan hasil dari penelitian pada tesis ini dapat bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya dan kebutuhan industri pada khususnya.

Ketercapaian penulisan tesis ini tidak lepas dari dukungan-dukungan berbagai pihak terkait yang tidak bisa penulis tulis satu – persatu. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh sebab itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan tulisan ini.

Penulis

UCAPAN TERIMAKASIH

Ketercapaian penulisan tesis ini tidak lepas dari dukungan – dukungan berbagai pihak terkait. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Fatimah., S.Si., M.Si dan Dr. Salamun., M.Kes selaku dosen pembimbing I dan dosen pembimbing II yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian ini;
2. Prof. Dr. Tini Surtiningsih, DEA dan Almando Geraldi., Ph,D selaku dosen penguji I dan dosen penguji II yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan tesis;
3. Dr. Hamidah, M.Kes selaku dosen penguji III yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan tesis;
4. Prof. Dr. Hj. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan ilmu, bimbingan, dan arahan kepada penulis selama proses perkuliahan;
5. segenap Bapak dan Ibu dosen staf pengajar Departemen Biologi Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu yang sangat bermanfaat dalam penyusunan tesis ini;
6. kedua orang tua penulis, Ayah Ir. Misto., M.Si dan Ibu Rahayu Sutarti, Kakak Sindu Widolaris, Ipar Anik Hilyah S.Si., M.T, Sepupu saya Eries Diah Permatasari, Helmi Singgih, dan Helmi Madiwa Kadafi yang telah memberikan doa, motivasi, materi, dan juga semangat yang tiada henti kepada Penulis sehingga tesis ini dapat terselesaikan;
7. rekan peneliti, Rizky Danang Susetyo, Farah Aisyah Nafidiastri, Nailah Insani, Rasyidah, Qurrotun A'yun, Nazil Dwi Rahayuningtyas, Syarifah Salsabila, Silvia Kurnia yang selalu membantu dan menyemangati selama proses penyelesaian tesis penulis;
8. adik – adik laboratorium mikrobiologi terkhususkan Azzahra Yurfasah, Dian Ayu Apsarini, Christoper Clement, dan Nur Aula yang selalu membantu dan menyemangati selama proses penyelesaian tesis penulis

9. seluruh laboran terkhusus Mbak Fitri selaku laboran laboratorium mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah banyak membantu penulis selama penelitian;
10. sahabat seperjuangan Magister Biologi angkatan 2019 semester genap yang tidak dapat disebut satu persatu,
11. rekan kos melati, Elmi Triana, Rahma Nurul Ramadhani, Ika Sari, Mbak Nurin Cholifatul Ma'rifa yang telah menjadi bagian hidup penulis selama 2 tahun ini di Surabaya dan senantiasa memberikan doa, dukungan, serta semangat;
12. semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam penyelesaian tesis yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan tesis ini. Akhir kata penulis berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca pada umumnya.

Surabaya, 5 Januari 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
UCAPAN TERIMAKASIH.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Manfaat Penulisan.....	7
1.4.1 Manfaat ilmiah	7
1.4.2 Manfaat aplikatif	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Fosfor	9
2.1.1 Fosfat organik (Po).....	10
2.1.2 Fosfat inorganik (Pi)	11
2.2 Bakteri Pelarut Fosfat.....	11
2.3 Mekanisme Pelarutan Fosfat oleh Bakteri Pelarut Fosfat.....	13
2.3.1 Mekanisme pelarutan fosfat organik.....	13
2.3.1.1 Produksi asam organik.....	14
2.3.1.2 Pelepasan ion H ⁺	15
2.3.1.3 Sintesis sideropor.....	15
2.3.2 Mekanisme pelarutan fosfat inorganik.....	16
2.4 Enzim Fosfatase	17

2.4.1 Uji aktivitas fosfatase	18
2.5 Mekanisme Pengaturan Fosfat oleh Bakteri Pelarut Fosfat	19
2.6 Faktor – Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Fosfatase.....	21
2.6.1 Suhu	22
2.6.2 pH	22
2.6.3 Ion logam berat	23
2.6.4 Surfactan.....	23
2.7 Aplikasi Enzim Fosfatase dalam Berbagai Bidang.....	24
2.7.1 Enzim fosfatase sebagai alat diagnostik penyakit	24
2.7.2 Enzim fosfatase sebagai agen bioremediasi	25
2.8 Identifikasi 16S rRNA	26
2.9 Purifikasi Protein	28
2.9.1 Presipitasi	28
2.9.2 Dialisis	31
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	33
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	33
3.2 Hipotesis Penelitian	36
3.2.1 Hipotesis penelitian	36
BAB IV. METODE PENELITIAN	37
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	37
4.2 Alat dan Bahan.....	37
4.2.1 Alat.....	37
4.2.2 Bahan	37
4.3 Rancangan Penelitian.....	38
4.4 Variabel Penelitian.....	39
4.4.1 Variabel Penelitian.....	39
4.4.2 Definisi Operasional	39
4.5 Cara Kerja	40
4.5.1 Pembuatan media pertumbuhan.....	40
4.5.1.1 Pembuatan media NA (<i>Nutrient Agar</i>)	40
4.5.1.2 Pembuatan media NB (<i>Nutrient Broth</i>)	40

4.5.1.3 Pembuatan media Pikovskaya Agar.....	40
4.5.1.4 Persiapan media inokulum dan media produksi enzim.	40
4.5.2 Peremajaan isolat bakteri.....	41
4.5.3 Uji skrining bakteri pelarut fosfat.....	41
4.5.4 Pewarnaan Gram.....	42
4.5.5 Identifikasi bakteri pelarut fosfat dengan penanda molekuler gen 16S rRNA	43
4.5.5.1 Isolat gen 16S rRNA	43
4.5.5.2 PCR	44
4.5.5.3 Elektroforesis gel agarosa	44
4.5.5.3.1 Pembuatan gel agarosa.....	44
4.5.5.3.2 Elektroforesis	45
4.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	45
4.7 Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Fosfatase oleh TBN13.....	46
4.7.1 Uji aktivitas <i>crude</i> enzim fosfatase.....	47
4.7.2 Pembuatan kurva standar larutan p – nitrofenol (p - NP)	47
4.8 Produksi <i>Crude</i> Enzim Fosfatase.....	48
4.9 Purifikasi Parsial <i>Crude</i> Enzim Fosfatase.....	49
4.9.1 Presipitasi ammonium sulfat.....	49
4.9.2 Dialisis	49
4.10 Kuantifikasi Kemurnian Protein <i>Crude</i> Enzim dan Purifikasi Parsial.....	50
4.10.1 Pembuatan larutan standar BSA	50
4.11 Karakterisasi Enzim Fosfatase	51
4.11.1 Pengaruh suhu terhadap aktivitas fosfatase	51
4.11.2 Pengaruh pH terhadap aktivitas fosfatase.....	52
4.11.3 Pengaruh ion – ion logam terhadap aktivitas fosfatase	52
4.11.4 Pengaruh biosurfaktan terhadap aktivitas fosfatase.....	52
4.12 Kerangka Operasional.....	53
4.13 Analisis Data.....	54

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	55
5.1 Hasil Penelitian	55
5.1.1 Skrining bakteri pelarut fosfat.....	55
5.2.1 Identifikasi bakteri pelarut fosfat TBN13	57
5.2.2 Produksi enzim fosfatase oleh <i>Bacillus cereus</i> TBN13.....	59
5.2.3 Uji aktivitas dan kadar protein crude enzim fosfatase oleh <i>Bacillus cereus</i> TBN13	64
5.2.4 Hasil Purifikasi Enzim Fosfatase	66
5.2.4.1 Aktivitas enzim hasil presipitasi amonium sulfat	66
5.2.4.2 Aktivitas enzim hasil dialisis	67
5.3.1 Karakterisasi Enzim	70
5.3.1.1 Karakterisasi enzim terhadap suhu	70
5.3.1.2 Karakterisasi enzim terhadap ph	71
5.3.1.3 Karakterisasi enzim terhadap ion – ion logam.....	73
5.3.1.4 Karakterisasi enzim terhadap surfaktan	74
5.4 Pembahasan Hasil Penelitian	76
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	83
6.1 Kesimpulan	83
6.2 Saran	84
DAFTAR PUSTAKA	85
Lampiran	95

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Daftar penyakit yang menggunakan fosfatase sebagai alat diagnostik	25
2.2 Jenis agen presipitasi protein	28
5.1 Indeks Pelarutan Fosfat dari Isolat Bakteri asal Mangrove Jenu Tuban	56
5.2 Aktivitas <i>crude</i> enzim, kadar protein, dan aktivitas crude enzim <i>Bacillus cereus</i> TBN13	65
5.3 Aktivitas enzim fosfatase dan konsentrasi protein dari berbagai tingkat purifikasi	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Reaksi Katalis oleh Fosfatase pada p – nitrofenilfosfat	19
2.2 Proses Aktivasi dan Aktivasi PhoB pada <i>Escherichia coli</i>	21
2.3 Mekanisme Mineralisasi Logam Berat oleh Bakteri Pelarut Fosfat.....	26
2.4 Kurva Ammonium Sulfat terhadap Kelarutan Protein.....	30
2.5 Proses Dialisis Protein menggunakan Kantong Dialisis	31
3.1 Skema kerangka konsep penelitian	35
4.1 Alur penelitian.....	53
5.1 Indeks pelarutan oleh isolat bakteri kode TBN13.....	57
5.2 Bakteri <i>Bacillus cereus</i> TBN13	59
5.2.A Pengamatan mikroskopis perbesaran 1000x	59
5.2.B Pengamatan makroskopis pada media NA	59
5.3 Aktivitas fosfatase dan pertumbuhan isolat <i>B. cereus</i> TBN13	60
5.4 Aktivitas fosfatase asam dengan dinamika pH selama masa inkubasi 196 jam.....	61
5.5 Karakterisasi enzim fosfatase terhadap faktor suhu.....	70
5.6 Karakterisasi enzim fosfatase terhadap faktor pH	71
5.7 Karakterisasi enzim fosfatase terhadap faktor penambahan ion – ion logam	73
5.8 Karakterisasi enzim fosfatase terhadap faktor surfaktan dan deterjen	75

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Skrining Bakteri Pelarut Fosfat asal Tanah Mangrove Jenu Tuban	L-91
2	Pembuatan Kurva Baku Bovine Serum Albumin (BSA) untuk Uji Kadar Protein.....	L-92
3	Pembuatan Kurva Baku pNP untuk Uji Aktivitas Fosfatase.....	L-100
4	Pertumbuhan <i>Bacillus cereus</i> TBN13 pada media PKV <i>Broth</i> masa inkubasi 196 jam.....	L-100
5	Dokumentasi Penentuan Waktu Optimum Produksi Fosfatase oleh TBN13.....	L-101
6	Rumus Perhitungan Aktivitas Fosfatase Asam	L-103
7	Komposisi Media NA (<i>Nutrient Agar</i>)	L-103
8	Komposisi Media NB (<i>Nutrient Broth</i>).....	L-104
9	Komposisi Media Pikovskaya Agar	L-104
10	Pembuatan Reagen Lowry	L-105
11	Tabel Presipitasi	L-105
12	Kegiatan Penelitian	L-106

Dela Dwi Alawiyah. 2021. Skrining, Produksi, dan Karakterisasi Enzim Fosfatase dari Bakteri Asal Tanah Mangrove Jenu Tuban. Tesis ini dibawah bimbingan Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes dan Dr. Salamun., M.Kes., Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Fosfor merupakan makronutrien utama setelah nitrogen yang dibutuhkan oleh organisme. Bakteri pelarut fosfat adalah kelompok bakteri dengan kemampuan pelarutan fosfat tidak terlalu menjadi fosfat terlarut melalui mekanisme solubilisasi fosfat inorganik oleh asam organik dan mineralisasi fosfat organik oleh enzim fosfatase. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining bakteri pelarut fosfat (BPF) asal tanah Mangrove Jenu Tuban, identifikasi spesies secara molekuler dari isolat yang menghasilkan pelarutan fosfat tertinggi, produksi enzim fosfatase, purifikasi parsial enzim fosfatase, dan karakterisasi enzim fosfatase yang dihasilkan. Skrining BPF dilakukan dengan mengukur indeks pelarutan (IP) fosfat yang dihasilkan oleh 20 isolat bakteri menggunakan media Pikovskaya Agar. Identifikasi BPF dengan IP fosfat tertinggi dilakukan secara molekuler melalui amplifikasi gen 16s rRNA dibantu dengan pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis. Pengujian aktivitas enzim fosfatase dilakukan dengan metode Tabatabai dan Bremner (1969) menggunakan p – nitrofenil (p – NPP) sebagai substrat. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan metode Lowry *et al.*, (1951). Produksi enzim fosfatase dilakukan menggunakan media Pikovskaya *Broth*, dilanjutkan dengan purifikasi parsial enzim dengan presipitasi ammonium sulfat dan dialisis. Enzim hasil purifikasi parsial dilakukan karakterisasi terhadap faktor suhu, pH, penambahan ion – ion logam, dan surfaktan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat TBN13 menghasilkan IP fosfat tertinggi dengan nilai 4,89. Identifikasi secara molekuler menggunakan 16s rRNA menyatakan TBN13 adalah *Bacillus cereus*. Isolat *B. cereus* menghasilkan enzim fosfatase secara maksimum pada masa inkubasi ke 168 jam dengan penurunan pH kultur optimum sebesar 4,21 pada masa inkubasi ke 120 jam. Aktivitas fosfatase ditinjau dari tingkat kemurnian protein dimulai dari *crude* enzim, enzim hasil presipitasi ammonium sulfat, dan enzim hasil dialisis yaitu 60 U/ml, 70,58 U/ml, dan 82,06 U/ml. Enzim hasil purifikasi parsial menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada suhu 40 °C, pH 7, dengan penambahan ion logam Mg^{2+} , dan Pb^{2+} sebagai aktivator dan ion logam Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} serta surfaktan (SDS, Tween – 20, EDTA) sebagai inhibitor aktivitas enzim.

Kata kunci: *Bacillus cereus*, ekosistem mangrove, fosfatase asam, purifikasi enzim, karakterisasi enzim

Dela Dwi Alawiyah. 2021. Isolation of phosphate solubilizing bacteria, Production, and Characterization of its Phosphatase Enzyme from Soil of Tuban Mangrove Center East Java. This thesis under guidance: Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes dan Dr. Salamun., M.Kes., Departement of Biology, Faculty of Sains and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is the main macronutrients after nitrogen that essential for organism. Phosphate solubilizing bacteria are a group of bacteria with the ability to dissolve insoluble forms of P to accessible forms through two mechanisms, solubilization of inorganic phosphate by organic acids, and mineralization of organic phosphate by phosphatase enzymes. The purpose of this research are consist of: isolation of phosphate solubilizing bacteria (PSB) from soil of Tuban Mangrove Center, identification the species of PSB with the highest potential of dissolving phosphate through molecular and morphological identification, production of phosphatase enzyme, partial purification of the enzyme, and characterization of the enzyme produced by the isolate. PSB screening was done by determined the halo zone produced by 20 bacteria isolates on Pikovskaya Agar. Phosphatase activity was assayed according to the method outline by Tabatabai and Bremner (1969). Protein concentration was measured by the method of Lowry et al., (1951). Production of phosphatase enzyme was done by using Pikovskaya Broth media, followed by partial purification of the enzyme with ammonium sulphate precipitation and dialysis. The results showed that the isolate TBN13 produced the highest IP phosphate with a value of 4.89. Molecular identification using 16s rRNA revealed that TBN13 was *Bacillus cereus*. The isolate produced maximum phosphatase enzyme at 168 hours of incubation with a decrease in optimum culture pH of 4.21 at 120 hours of incubation. The phosphatase activity in terms of protein purity starting from crude enzymes, enzymes resulting from precipitation of ammonium sulfate, and enzymes resulting from dialysis were 60 U/ml, 70.58 U/ml, and 82.06 U/ml. Partially purified enzymes showed the highest enzyme activity at 40 °C, pH 7, with the addition of metal ions Mg^{2+} , and Pb^{2+} as activators and metal ions Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} and surfactants (SDS, Tween – 20, EDTA) as activity inhibitors enzyme.

Keyword: *Bacillus cereus*, mangrove ecosystem, acid phosphatase, enzyme purification, enzyme characterization