

**DETEKSI GEN BIOSINTESIS SURFAKTIN DAN OPTIMALISASI
PRODUKSI *CRUDE* BIOSURFAKTAN OLEH *Bacillus* sp. ES4.3 HASIL
ISOLASI DARI ENDAPAN TEMPAT PERINDUKAN
*LARVA Aedes aegypti***

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



**Farah Aisyah Nafidiastri
NIM. 082014153004**

**Program Studi Magister Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga
Surabaya
2022**

TESIS

Deteksi Gen Biosintesis Surfaktin dan Optimalisasi Produksi *Crude* Biosurfaktan oleh *Bacillus* sp. ES4.3 Hasil Isolasi dari Endapan Tempat Perindukan Larva *Aedes aegypti*

yang dipersiapkan dan disusun oleh
Farah Aisyah Nafidiastri
NIM. 082014153004
telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 24 Januari 2022

Susunan Dewan Penguji

Pembimbing Utama

Dr. Salamun, M.Kes.

NIP. 196111101987031003

Penguji I

Dr. Ni'matuzahroh

NIP. 196801051992032003

Pembimbing Pendamping

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

NIP. 197410152002122001

Penguji II

Almando Geraldi, S.Si., Ph.D.

NIP. 198704212018093101

Penguji III

Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.

NIP. 195504051982031004

Tesis ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
Untuk memperoleh gelar Magister Sains
Tanggal 24 Januari 2022

Mengetahui
Ketua Departemen Biologi

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

NIP. 196602211992032001

Koordinator Program Studi
Magister Biologi

Prof. Dr. Affiah 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, 15 Januari 2022

Yang Menyatakan

A handwritten signature in black ink is written over a red official stamp. The stamp is rectangular and contains the text 'METERAN' and 'TAMPEL' in a stylized font, along with a small emblem of the Indonesian government. To the left of the stamp, the number '10000' is visible, indicating the value of the stamp. Below the stamp, the text 'PD3A/JK50002183' is printed.

Farah Aisyah Nafidiastri, S.Si.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu Wata'ala karena atas rahmat, karunia, dan hidayah-Nya, Tesis yang berjudul “Deteksi Gen Biosintesis Surfaktin dan Optimalisasi Produksi *Crude* Biosurfaktan oleh *Bacillus* sp. ES4.3 Hasil Isolasi dari Endapan Tempat Perindukan Larva *Aedes aegypti*” ini dapat selesai pada waktunya. Tesis ini disusun sebagai syarat wajib kelulusan untuk menyelesaikan pendidikan Magister Sains Prodi S2 Biologi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini dapat berjalan dengan baik karena arahan, bimbingan, dan bantuan berbagai pihak. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kata sempurna, untuk itu kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak sangat diharapkan untuk perbaikan pada masa yang akan datang. Semoga tesis ini bermanfaat bagi pembaca.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini dapat berjalan dengan baik karena adanya arahan, bimbingan, dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Salamun, M.Kes. selaku dosen pembimbing I yang telah membimbing dengan sabar dan cermat memberikan arah dan bimbingan pada tesis ini,
2. Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes., sebagai pembimbing II yang dengan cermat dan teliti memberikan bimbingan dan review pada tesis ini,
3. Dr. Ni'matuzahroh, sebagai penguji I, yang telah bersedia menguji dan memberikan masukan pada tesis ini,
4. Almando Geraldi, S.Si., Ph.D., selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran dan masukan terhadap kesempurnaan naskah tesis ini,
5. Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc., selaku dosen penguji III yang telah bersedia menguji, memberikan saran dan masukan untuk kesempurnaan naskah tesis ini,
6. Prof. Dr. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si., selaku ketua departemen dan dosen wali yang telah memberikan izin penggunaan sarana dan prasarana selama penelitian berlangsung, hingga memberikan bimbingan dan arahan selama proses perkuliahan,
7. Prof. Dr. Alfiah Hayati, M.Kes., selaku koordinator program studi yang telah memberikan arahan dan motivasi selama perkuliahan dan penelitian ini berlangsung,
8. Pihak Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yaitu Fitriana Martiani, S.Si., yang selalu memfasilitasi kegiatan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi,
9. Teman-teman seperjuangan yang kooperatif Qurrotu A'yun MA, Nur Aini Fikriyah, Fina Syifauna M, Nadia Shoukat, atas motivasi dan kebersamaan selama studi di Prodi S2 Biologi Fakultas Sains dan

Teknologi,

10. Teman-teman S2 Biologi angkatan 2020, Hesti Nurhariyati, Azizah, Aurira, Nazil Dwi Rahayuningtiyas, Berlian Rustantina, Widi Pangestu, atas dukungan selama studi bersama di Prodi S2 Biologi Fakultas Sains dan Teknologi,
11. Tim riset penelitian payung pengembangan bioinsektisida Rizky Danang Susetyo, Rizki Amalia Zain, Jihan Sabrina, dan Rossy yang telah bekerja sama dengan baik mulai dari penelitian berlangsung hingga selesai,
12. Dela Dwi Alawiyah, Nabilatun Nisa', Silvia Kurnia Sari, Nailah Insani, Rasyidah Hafa, selaku kakak tingkat S2 Biologi angkatan 2019 atas bantuan dan dukungan kepada penulis selama masa perkuliahan dan penelitian berlangsung,
13. Bapak Ibu Dosen Fakultas Sains dan Teknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi yang telah memberikan ilmu dan bantuan selama perkuliahan hingga penulisan tesis selesai,
14. Bapak Ibu Tenaga Kependidikan Departemen Biologi dan Fakultas Sains dan Teknologi atas pelayanan akademik dan non akademik selama perkuliahan hingga penulisan tesis selesai,
15. Orang tua Ayah dan Ibu saya, Drs. Ec. Trilaksono dan Prof. Dr. Fida Rachmadiarti, M.Kes., atas doa, motivasi, dan bimbingan yang diberikan,
16. Saudara laki-laki saya, Eza Alfian Rizqita, S.Pi., atas bantuan dan dukungan yang diberikan.

Surabaya, 15 Januari 2022

Penulis,

Farah Aisyah Nafidiastri

DAFTAR ISI

Lembar Pengesahan	ii
Lembar Pernyataan.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
UCAPAN TERIMAKASIH.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.4.1 Manfaat ilmiah.....	8
1.4.2 Manfaat aplikatif	9
BAB II.....	10
TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Tinjauan Isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3	10
2.2 Tinjauan Identifikasi Jenis Bakteri Berdasarkan Sekuens Nukleotida Gen 16S rRNA.....	11
2.3 Tinjauan Biosurfaktan.....	12
2.4 Tinjauan Surfaktin.....	14
2.5 Tinjauan Uji Pendahuluan Biosurfaktan	16
2.6 Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan	18
2.7 Tinjauan Biosintesis Surfaktin	23
2.8 Tinjauan Isolasi DNA	25
2.9 Tinjauan Polymerase Chain Reaction (PCR).....	26
BAB III.....	30
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	30

3.1	Kerangka Konsep	30
3.2	Hipotesis Penelitian.....	31
3.2.1	Hipotesis Kerja	31
3.2.2	Hipotesis Statistik	32
BAB IV		34
METODE PENELITIAN.....		34
4.1	Waktu dan Tempat Penelitian	34
4.2	Alat dan Bahan Penelitian.....	34
4.2.1	Alat penelitian	34
4.3	Rancangan Penelitian	37
4.4	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	38
4.4.1	Variabel penelitian.....	38
4.4.2	Definisi operasional variabel	39
4.5	Cara Kerja	39
4.5.1	Persiapan alat.....	39
4.5.2	Pembuatan media.....	40
4.5.3	Peremajaan isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3	41
4.5.4	Penanaman isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3 dalam media cair	41
4.5.5	Uji pendahuluan aktivitas biosurfaktan	42
4.5.6	Isolasi DNA isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3	43
4.5.7	Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA.....	45
4.5.8	Amplifikasi gen 16S rRNA	46
4.5.9	Verifikasi gen 16S rRNA dengan elektroforesis	47
4.5.10	Hasil analisis sekuens gen 16S rRNA	48
4.5.11	Analisis hubungan kekerabatan	48
4.5.12	Pembuatan primer untuk amplifikasi gen <i>srfA-D</i>	49
4.5.13	Deteksi gen <i>srf</i> dengan amplifikasi PCR.....	50
4.5.14	Verifikasi gen <i>srf</i> dengan elektroforesis.....	51
4.5.16	Pembuatan air mineral sintesis.....	52
4.5.17	Produksi biosurfaktan	53
4.6	Analisis Data	54
4.7	Kerangka Operasional Penelitian	55
BAB V.....		57
HASIL DAN PEMBAHASAN.....		57
5.1	Identifikasi Nama Spesies dari Isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3 Berdasarkan Analisis 16S rRNA.....	57
5.2	Kekerabatan Filogenetik <i>Bacillus</i> sp. ES4.3 dengan <i>Bacillus</i> Jenis Lainnya ..	61
5.3	Uji Pendahuluan Aktivitas Biosurfaktan dari Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 Melalui Aktivitas Hemolitik, Analisis Tegangan Permukaan, dan Aktivitas Emulsifikasi.....	64

5.3.1 Aktivitas Hemolitik.....	64
5.3.2 Analisis tegangan permukaan	66
5.3.3 Aktivitas emulsifikasi	68
5.4 Perbedaan Hasil Produksi Biosurfaktan Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Substrat Glukosa, Gliserol, dan Molase	69
5.5 Analisis Gen <i>srf</i> yang Bertanggung Jawab dalam Biosintesis Surfaktin pada Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3	90
BAB VI	93
KESIMPULAN DAN SARAN	93
4.1 Kesimpulan	93
4.2 Saran.....	94
4.2.1 Saran Teoritis	94
4.2.2 Saran Aplikatif.....	95
DAFTAR PUSTAKA	96
LAMPIRAN	1

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Rancangan Penelitian	37
5.1	Hasil analisis <i>Basic Local Alignment Search Tools</i> <i>nucleotide</i> (BLASTn) isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3	60
5.2	Nilai tegangan permukaan dari supernatan kultur <i>B. velezensis</i> ES4.3	67
5.3	Hasil aktivitas emulsifikasi dari supernatan kultur isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat minyak tanah dan oli bekas	68
5.4	Nilai penurunan tegangan permukaan dari supernatan kultur isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat glukosa	73
5.5	Nilai penurunan tegangan permukaan dari supernatan kultur isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat gliserol	74
5.6	Nilai penurunan tegangan permukaan dari supernatan kultur isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat molase	74
5.7	Rata-rata nilai tegangan permukaan terhadap jenis substrat pada waktu inkubasi 0 jam hingga 96 jam	85
5.8	Rata-rata nilai aktivitas emulsifikasi (observasi 1 jam) terhadap jenis substrat pada waktu inkubasi 0 jam hingga 96 jam	86
5.9	Rata-rata nilai aktivitas emulsifikasi (observasi 24 jam) terhadap jenis substrat pada waktu inkubasi 0 jam hingga 96 jam	87

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Morfologi koloni dan visualisasi bentuk-letak endospora <i>Bacillus</i> sp. ES4.3	11
2.2	Struktur utama dan kimia surfaktin	16
3.1	Kerangka konsep penelitian	31
4.1	Kerangka operasional penelitian	56
5.1	Hasil elektroforesis isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3 yang ditandai dengan band ukuran 1500 bp. (S: sampel, M: marker)	58
5.2	Hasil analisis pohon filogeni isolat <i>Bacillus</i> sp. ES4.3 dengan <i>Bacillus velezensis</i> strain lain	62
5.3	Hasil positif aktivitas hemolitik isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3	65
5.4	Grafik kurva pertumbuhan isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat glukosa, gliserol, dan molase	70
5.5	Diagram nilai tegangan permukaan yang dihasilkan oleh isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3	71
5.6	Diagram nilai aktivitas emulsifikasi (1 jam) yang dihasilkan oleh isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3	77
5.7	Diagram nilai aktivitas emulsifikasi (24 jam) yang dihasilkan oleh isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3	77
5.8	Hasil emulsi pada uji aktivitas emulsifikasi isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat glukosa	78
5.9	Hasil emulsi pada uji aktivitas emulsifikasi isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat gliserol	80
5.10	Hasil emulsi pada uji aktivitas emulsifikasi isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada substrat molase	81
5.11	Diagram nilai biomassa yang dihasilkan oleh isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada proses produksi biosurfaktan	82
5.12	Hasil elektroforesis gen <i>srfA-D</i> isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 yang ditandai dengan band ukuran 722 bp. (S: sampel, M: marker)	90

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.1	Produksi Biosurfaktan Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Substrat Glukosa	L-1
1.2	Produksi Biosurfaktan Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Substrat Gliserol	L-1
1.3	Produksi Biosurfaktan Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Substrat Molase	L-2
2.1	Biomassa Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Substrat Glukosa	L-3
2.2	Biomassa Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Substrat Gliserol	L-3
2.3	Biomassa Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Substrat Molase	L-3
3	Hasil Analisis Statistik Tegangan Permukaan pada Tiga Substrat (Glukosa, Gliserol, dan Molase) dengan waktu inkubasi 0 jam hingga 96 jam	L-4
4	Hasil Analisis Statistik Aktivitas Emulsifikasi Observasi 1 jam pada Tiga Substrat (Glukosa, Gliserol, dan Molase) dengan waktu inkubasi 0 jam hingga 96 jam	L-12
5	Hasil Analisis Statistik Aktivitas Emulsifikasi Observasi 24 jam pada Tiga Substrat (Glukosa, Gliserol, dan Molase) dengan waktu inkubasi 0 jam hingga 96 jam	L-20
6	Produksi Biosurfaktan Isolat <i>B. velezensis</i> ES4.3 pada Kontrol Media AMS	L-30

Farah Aisyah Nafidiastri. 2021. Deteksi Gen Biosintesis Surfaktin dan Optimalisasi Produksi *Crude* Biosurfaktan oleh *Bacillus* sp. ES4.3 Hasil Isolasi dari Endapan Tempat Perindukan Larva *Aedes aegypti*.

Tesis ini dibawah bimbingan : Dr. Salamun, M.Kes. dan Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes., Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Biosurfaktan merupakan alternatif untuk pengganti surfaktan sintetik yang dapat diproduksi oleh mikroorganisme, salah satunya bakteri dari genus *Bacillus*. Biosurfaktan memiliki kemampuan menurunkan tegangan permukaan air dan dapat menyebabkan terjadinya emulsi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nama jenis dari *Bacillus* sp. ES4.3 dan hubungan kekerabatannya dengan *Bacillus* spesies lain. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui kemampuan *Bacillus* sp. ES4.3 dalam memproduksi biosurfaktan dengan tiga substrat berbeda dan mengetahui gen yang menyandi protein surfaktin. Nama jenis *Bacillus* sp. ES4.3 dideteksi melalui amplifikasi gen 16S rRNA, visualisasi elektroforesis, proses sekuensing, dan analisis penjajaran sekuens dengan data di GenBank. Sekuens nukleotida yang dihasilkan, dianalisis untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara *Bacillus* sp. ES4.3 dengan *Bacillus* spesies lain menggunakan software MEGA versi 6. Uji pendahuluan aktivitas biosurfaktan supernatan *Bacillus* sp. ES4.3 dilakukan melalui uji hemolitik, analisis tegangan permukaan, dan aktivitas emulsifikasi. Produksi biosurfaktan *Bacillus* sp. ES4.3 dilakukan dengan penambahan substrat glukosa, gliserol, dan molase ke dalam media AMS, dengan pengukuran parameter melalui penurunan tegangan permukaan dan aktivitas emulsifikasi. Deteksi gen biosintesis surfaktin dilakukan dengan metode amplifikasi PCR menggunakan primer *srfA-D*. Analisis tingkat homologi pada gen 16S rRNA melalui analisis BLASTn, *Bacillus* sp. ES4.3 diidentifikasi sebagai *B. velezensis*. Aktivitas biosurfaktan ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening, adanya emulsi, serta dapat menurunkan tegangan permukaan. Produksi biosurfaktan yang dihasilkan oleh *B. velezensis* ES4.3 pada ketiga jenis substrat menunjukkan hasil yang berbeda. Pada substrat glukosa, gliserol, dan molase berturut-turut *B. velezensis* ES4.3 mampu menurunkan tegangan permukaan hingga 39.64 mN/m, 42.01 mN/m, 47.47 mN/m, membentuk emulsi terhadap kerosin sebesar 53.32%, 62.76%, 49.09%. Pada deteksi gen surfaktin, setelah sekuens dianalisis dengan BLASTn dan BLASTp, *B. velezensis* mampu menghasilkan gen biosintesis surfaktin thioesterase *SrfA-D* yang identik dengan kelompok *Bacillus amyloliquefaciens*. Dari hasil tersebut, diharapkan nantinya, biosurfaktan yang dihasilkan oleh isolat *B. velezensis* ES4.3 dapat diaplikasikan sebagai agen biokontrol pada larva *Aedes aegypti* maupun sebagai agen anti mikroba terhadap bakteri dan fungi patogen pada tanaman.

Kata kunci: *Bacillus* sp., surfaktin, 16S rRNA, aktivitas hemolitik, tegangan permukaan, aktivitas emulsifikasi

Farah Aisyah Nafidiastri. 2021. Detection of Biosynthesis Surfactin Gene and Optimization Crude Biosurfactant Production of *Bacillus* sp. Isolation Results from Sediment Breeding Sites of *Aedes aegypti* Larvae.

Thesis under guidance: Dr. Salamun, M.Kes. dan Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes., Biology Department, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga.

ABSTRACT

Biosurfactants are an alternative to synthetic surfactants that can be produced by microorganisms, one of which is bacteria from the genus *Bacillus*. Biosurfactants have the ability to lower the surface tension of water and can cause an emulsion. This study aims to determine the species name of *Bacillus* sp. ES4.3 and its relationships with other *Bacillus* species. In addition, this study also aims to determine the ability of *Bacillus* sp. ES4.3 in producing biosurfactants with three different substrates and knowing the gene encoding surfactin protein. Species name *Bacillus* sp. ES4.3 was detected through 16S rRNA gene amplification, electrophoresis visualization, sequencing process, and sequence alignment analysis with data in GenBank. The resulting nucleotide sequences were analyzed to determine the relationship between *Bacillus* sp. ES4.3 with other *Bacillus* species using MEGA software version 6. Preliminary test of the biosurfactant activity of the supernatant *Bacillus* sp. ES4.3 was carried out through hemolytic test, surface tension analysis, and emulsification activity. Production of biosurfactant *Bacillus* sp. ES4.3 was carried out by adding glucose, glycerol, and molasses as substrates into AMS media, with parameter measurements by decreasing surface tension and emulsification activity. Detection of surfactin biosynthetic gene was carried out by PCR amplification method using *srfA-D* primer. Analysis of homology levels in the 16S rRNA gene through BLASTn analysis, *Bacillus* sp. ES4.3 was identified as *B. velezensis*. The biosurfactant activity was indicated by the formation of a clear zone, the presence of an emulsion, and a decrease in surface tension. The production of biosurfactant produced by *B. velezensis* ES4.3 on the three types of substrates showed different results. *B. velezensis* ES4.3 was able to reduce the surface tension up to 39.64 mN/m, 42.01 mN/m, 47.47 mN/m, and form an emulsion against kerosene by 53.32%, 62.76%, 49.09% on glucose, glycerol, and molasses substrates, respectively. In detecting the surfactin gene, after sequences were analyzed by BLASTn and BLASTp, *B. velezensis* ES4.3 was able to produce a surfactin thioesterase biosynthetic gene *SrfA-D* which was identical to the *Bacillus amyloliquefaciens* group. From these results, it is hoped that in the future, the biosurfactant produced by the isolate *B. velezensis* ES4.3 can be applied as a biocontrol agent on *Aedes aegypti* larvae and as an antimicrobial agent against pathogenic bacteria and fungi in plants.

Keywords: *Bacillus* sp., 16S rRNA, surfactin, hemolytic activity, surface tension, emulsification activity