

# DAFTAR ISI

halaman

HALAMAN JUDUL	
PERNYATAAN DAN PERSETUJUAN UNGGAH TUGAS AKHIR	
PERSETUJUAN DOSEN PEMBIMBING SKRIPSI	
PERSETUJUAN TIM PENGUJI SKRIPSI	
ABSTRAK.....	v
<i>ABSTRACT</i> .....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Zat Pewarna.....	5
2.1.1 Struktur Zat Pewarna.....	6
2.1.2 Kromofor, Auksokrom dan Matriks.....	7
2.2 Dekolorisasi.....	11
2.2.1 Dekolorisasi Pewarna Secara Fisik.....	11
2.2.2 Dekolorisasi Pewarna Secara Kimiawi.....	12
2.2.2.1 Ionisasi-Deionisasi dan Sifat Tautomerik Pewarna.....	13
2.2.3 Dekolorisasi Pewarna Secara Biologis.....	14
2.2.3.1 Biosorpsi.....	15
2.2.3.2 Enzimatik.....	16
2.2.3.2.1 Oksidase dan Reaksi Oksidasi.....	16
2.2.3.2.2 Reduktase dan Reaksi Reduksi.....	17
2.2.3.2.3 Mediator Dekolorisasi.....	17

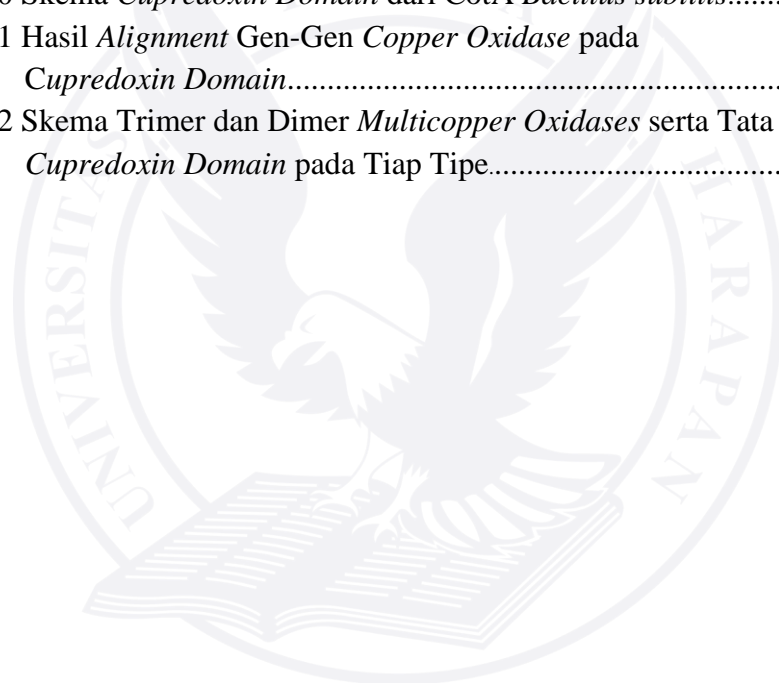
2.2.3.2.4 Enzim Intraseluler, Intramembran dan Ekstraseluler.....	18
2.2.3.2.5 Regulasi Enzim Ekstraseluler.....	20
2.2.4 Deteksi dan Kuantifikasi Senyawa Pewarna.....	20
2.2.4.1 Biosorpsi UV-Vis <i>Spectrophotometer</i> .....	21
2.2.4.2 <i>Beer-Lambert's Law</i> .....	22
2.3 Identifikasi Mikroorganisme Melalui Gen 16S rRNA.....	22
2.3.1 Amplifikasi <i>Sequence</i> 16s rRNA dengan Metode <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	23
2.3.1.1 Struktur gen 16S rRNA.....	24
2.3.1.2 Temperatur PCR.....	25
2.3.2 <i>Sequencing</i> 16S rRNA.....	27
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>29</b>
3.1 Alat dan Bahan.....	29
3.2 Prosedur Penelitian.....	30
3.2.1 Isolasi Mikroorganisme dengan Kemampuan Dekolorisasi Pewarna Tekstil.....	31
3.2.1.1 Komposisi Medium Pertumbuhan dan Larutan Stok Pewarna.....	32
3.2.1.2 Isolasi dan Purifikasi.....	32
3.2.1.3 Uji Mekanisme Dekolorisasi Enzimatik Kuantitatif dan Kualitatif.....	34
3.2.2 Uji Kemampuan Dekolorisasi.....	34
3.2.2.1 Uji Keberadaan Enzim Oksidoreduktase.....	35
3.2.2.1.1 Substrat <i>Pyrogallol</i> .....	35
3.2.2.1.2 Substrat <i>1-naphthol</i> .....	36
3.2.2.2 Uji Kemampuan Dekolorisasi Isolat BMG-G1 pada Berbagai Konsentrasi MG.....	36
3.2.2.3 Uji Kemampuan Dekolorisasi Isolat BMG-G1 pada Berbagai Konsentrasi Inokulum.....	37
3.2.3 Identifikasi Molekuler Isolat Ragi Tapai.....	37
3.2.3.1 Ekstraksi Genom Isolat.....	38
3.2.3.2 Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	40
3.2.3.3 <i>Sequencing</i> Gen 16S rRNA.....	41
3.2.3.4 Pembangunan Pohon Filogenetik Berdasarkan Gen 16S rRNA.....	42

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
4.1 Isolasi Mikroorganisme.....	43
4.1.1 Pemilahan Mikroorganisme Ragi Tapai Melalui Metode <i>Spreading</i> .....	43
4.1.2 Seleksi Mikroorganisme Ragi Tapai Melalui Metode <i>Streaking</i> .....	45
4.1.3 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Ekstraseluler .....	49
4.1.4 <i>Malachite Green</i> .....	52
4.1.5 Identifikasi Isolat Ragi Tapai Melalui Morfologi Sel .....	53
4.1.6 Uji Pertumbuhan dan Kemampuan Dekolorisasi Isolat BMG-G1...	54
4.2 Analisis Kemampuan Dekolorisasi.....	58
4.2.1 Uji Aktivitas Enzim Ekstraseluler Kuantitatif.....	58
4.2.2 Uji Keberadaan Enzim Oksidoreduktase.....	59
4.2.3 Uji Kemampuan Dekolorisasi Isolat BMG-G1 pada Berbagai Konsentrasi MG.....	63
4.2.4 Uji Kemampuan Dekolorisasi Isolat BMG-G1 pada Berbagai Konsentrasi Inokulum.....	66
4.3 Identifikasi Molekuler Isolat BMG-G1.....	70
4.3.1 Ekstraksi genom isolat BMG-G1.....	70
4.3.2 Amplifikasi 16S rRNA.....	71
4.3.3 Pencarian Kerabat Terdekat pada Isolat BMG-G1 Melalui NCBI BLAST.....	72
4.3.4 Pembangunan Pohon Filogenetik.....	73
4.3.5 Peranan Genus <i>Ralstonia</i> di Alam dan di Bioteknologi.....	75
4.3.6 Prediksi Enzim yang Berperan dalam Dekolorisasi <i>Malachite Green</i> .....	76
 BAB V KESIMPULAN.....	 83
5.1 Kesimpulan.....	83
5.2 Saran.....	83
 DAFTAR PUSTAKA .....	 85
 LAMPIRAN	

## DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1 Absorpsi dan Emisi Energi Foton oleh Sebuah Atom .....	6
Gambar 2.2 Sifat Tautomerik Senyawa <i>Benzoic-Quinoid</i> yang Dipengaruhi oleh pH.....	14
Gambar 2.3 Mekanisme Dekolorisasi oleh Enzim <i>Laccase</i> melalui Mediator.....	18
Gambar 2.4 Prinsip Kerja Spektrofotometer.....	21
Gambar 2.5 Struktur Gen 16S rRNA dengan Distribusi Bagian Variabel dan Hipervariabel.....	25
Gambar 2.6 Mekanisme Amplifikasi DNA Berdasarkan Siklus Suhu pada PCR.....	26
Gambar 3.1 Skema Penelitian.....	31
Gambar 3.2 Skema Isolasi Mikroorganisme.....	31
Gambar 3.3 Skema Uji Kemampuan Dekolorisasi.....	35
Gambar 3.4 Skema Identifikasi Molekuler.....	38
Gambar 4.1 Hasil <i>Spreading</i> Ragi Tapai <i>Batch</i> Pertama.....	44
Gambar 4.2 Hasil <i>Spreading</i> Isolat Ragi Tapai <i>Batch</i> Kedua.....	45
Gambar 4.3 Hasil Isolat Ragi Tapai <i>Batch</i> Pertama pada 11 Jenis Pewarna Sintetik.....	46
Gambar 4.4 Hasil Isolat Ragi Tapai <i>Batch</i> Kedua pada 8 Jenis Pewarna Sintetik....	47
Gambar 4.5 Hasil Uji Aktivitas Enzimatik Kualitatif pada <i>Microwell</i> .....	50
Gambar 4.6 Hasil Uji Aktivitas Enzimatik Menggunakan Supernatant Isolat MG-G1 pada Berbagai Pewarna.....	51
Gambar 4.7 Struktur <i>Malachite Green</i> yang Tergolong dalam <i>Triphenylmethane</i> ...52	
Gambar 4.8 Identifikasi Morfologi Sel Isolat MG-G1 pada Perbesaran Total 400X .....	53
Gambar 4.9 Pertumbuhan Isolat BMG-G1 pada NA dan YPD dengan dan Tanpa Penambahan <i>Malachite Green</i> Selama 24 jam.....	55
Gambar 4.10 Dekolorisasi Isolat BMG-G1 pada Medium NB dan YPD-B.....	57
Gambar 4.11 Uji Oksidasi <i>Pyrogallol</i> oleh Supernatant dan <i>Crude Enzyme</i> .....	60
Gambar 4.12 Uji Oksidasi 1- <i>Naphthol</i> oleh Supernatant dan <i>Crude Enzyme</i> .....	61
Gambar 4.13 Dekolorisasi <i>Malachite Green</i> oleh Isolat BMG-G1 pada Konsentrasi <i>Malachite Green</i> yang Beragam.....	63
Gambar 4.14 Persentase Dekolorisasi Isolat BMG-G1 pada Berbagai Konsentrasi <i>Malachite Green</i> .....	64

Gambar 4.15 Dekolorisasi 250 ppm <i>Malachite Green</i> oleh Isolat BMG-G1 pada Konsentrasi Inokulum yang Berbeda.....	66
Gambar 4.16 Dekolorisasi 500 ppm <i>Malachite Green</i> oleh Isolat BMG-G1 pada Konsentrasi Inokulum yang Berbeda.....	67
Gambar 4.17 Dekolorisasi 1.000 ppm <i>Malachite Green</i> oleh Isolat BMG-G1 pada Konsentrasi Inokulum yang Berbeda.....	68
Gambar 4.18 Grafik Peningkatan Persentase Dekolorisasi Isolat BMG-G1 dengan Konsentrasi Inokulum yang Berbeda.....	69
Gambar 4.19 Pohon Filogenetik dari Genus <i>Ralstonia</i> dan <i>Cupriavidus</i> serta Lokasi Isolat BMG-G1 Relatif Terhadap Tiap Spesies.....	74
Gambar 4.20 Skema <i>Cupredoxin Domain</i> dari CotA <i>Bacillus subtilis</i> .....	80
Gambar 4.21 Hasil <i>Alignment Gen-Gen Copper Oxidase</i> pada <i>Cupredoxin Domain</i> .....	81
Gambar 4.22 Skema Trimer dan Dimer <i>Multicopper Oxidases</i> serta Tata Letak <i>Cupredoxin Domain</i> pada Tiap Tipe.....	82



## DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi Warna Berdasarkan Struktur Kromofor.....	8
Tabel 3.1 <i>Mastermix</i> PCR.....	40
Tabel 3.2 Pengaturan Siklus Suhu pada <i>Thermal Cycler</i> .....	40
Tabel 4.1 Data Isolat Ragi Tapai dengan Kemampuan Dekolorisasi Pewarna Tekstil .....	48
Tabel 4.2 Persentase Dekolorisasi MG oleh Isolat BMG-G1 pada Medium NB dan YPD.....	57
Tabel 4.3 Uji Enzimatik Isolat BMG-G1 Terhadap MG pada Medium NB dan YPD.....	58
Tabel 4.4 Uji Enzimatik Isolat BMG-G1 Terhadap Konsentrasi MG yang Lebih Tinggi pada Medium NB.....	59
Tabel 4.5 Informasi Pengukuran Spektrofotometri Ekstrak Genom Isolat BMG-G1.....	71
Tabel 4.6 Hasil Pencarian <i>Sequence</i> yang Mirip pada NCBI BLAST.....	72
Tabel 4.7 Gen Pengkode Protein Hasil Pencarian pada Genom <i>R. mannitolilytica</i> dengan Kata Kunci <i>Oxidase</i> .....	76

## DAFTAR LAMPIRAN

halaman

Lampiran A	
Sampel Ragi Tapai yang Digunakan dalam Penelitian.....	A-1
Lampiran B	
Pembuatan Larutan Stok Pewarna 1.000 ppm.....	B-1
Pembuatan Larutan Stok Pewarna 10.000 ppm.....	B-1
Pembuatan Media YPD.....	B-1
Pembuatan <i>Nutrient Media</i> .....	B-2
Pembuatan Media dalam Uji Keberadaan <i>Oksidoreduktase</i> .....	B-2
Pembuatan <i>Nutrient Media</i> .....	B-2
Komposisi Media Pertumbuhan dengan Kandungan <i>Malachite Green</i> .....	B-3
Pembuatan TAE Buffer 1X.....	B-3
Pembuatan Agarosa.....	B-3
Pembuatan Larutan EtBr.....	B-3
Lampiran D	
Persentase Dekolorisasi MG oleh Isolat BMG-G1 pada Medium	
NB dan YPD.....	A-1
Uji Enzimatis Isolat BMG-G1 Terhadap <i>Malachite Green</i> pada Medium	
Berbeda.....	A-2
Uji Enzimatis Isolat BMG-G1 Terhadap <i>Malachite Green</i> Konsentrasi	
Berbeda.....	A-3
Grafik Spektrum Absorbansi MG Hasil Dekolorisasi Isolat BMG-G1 pada	
Medium NB dan YPD.....	A-4
Grafik Spektral dari MG 250 ppm pada Berbagai Konsentrasi Isolat.....	A-5
Grafik Spektral dari MG 500 ppm pada Berbagai Konsentrasi Isolat.....	A-6
Grafik Spektral dari MG 1000 ppm pada Berbagai Konsentrasi Isolat.....	A-7
Lampiran D	
Kromatogram Hasil <i>Sequencing</i> pada Segmen 27F.....	B-1
Kromatogram Hasil <i>Sequencing</i> pada Segmen 1492R.....	B-6
<i>Sequence</i> 16S rRNA Penggabungan dari 27F dan 1492R.....	B-11
Grafik <i>Query Cover</i> 10 <i>Sequence</i> Teratas pada Hasil NCBI BLAST	
16S rRNA.....	B-11
<i>Sequence Copper Oxidase</i> pada Genom <i>Ralstonia mannitolilytica</i> .....	B-12