

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
MOTTO	iv
PERSEMBAHAN	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	 1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	5
I.3 Manfaat Penelitian	5
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN PERUMUSAN HIPOTESIS	 6
II.1 Tinjauan Pustaka	6
II.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
II.1.2 Identifikasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
II.1.3 Enzim laccase	14
II.1.4 Uji aktivitas enzim laccase	20
II.1.5 Guaiacol sebagai substrat	21
II.1.6 Syringaldazin sebagai substrat	22
II.1.7 Penentuan protein total	22
II.1.8 Fraksinasi protein enzim	23
II.1.9 Fraksinasi enzim	23
II.1.10 Aflatoksin B1	27
II.1.11 LC-MS/MS	33
II.2 Perumusan Hipotesis dan Rancangan Penelitian	37
II.2.1 Perumusan hipotesis 1	37
II.2.2 Perumusan hipotesis 2	37
II.2.3 Perumusan hipotesis 3	38
II.2.4 Rancangan penelitian	38
 BAB III METODE PENELITIAN	 39
III.1 Bahan dan Alat Penelitian	39
III.1.1 Bahan-bahan penelitian	39

	III.1.2	Alat penelitian	39
III.2		Prosedur Penelitian	40
	III.2.1	Sterilisasi peralatan dan media	40
	III.2.2	Pembuatan agar <i>cetrimide</i> , media cair <i>pepton water</i> , dan <i>nutrien broth</i>	40
	III.2.3	Pembiakan pra kultur	41
	III.2.4	Pengenceran pra kultur untuk identifikasi biakan murni	41
	III.2.5	Identifikasi langsung koloni <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	41
	III.2.6	Identifikasi secara biomolekuler koloni teridentifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
	III.2.7	Perbanyak kultur bakteri <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	44
	III.2.8	Isolasi enzim laccase dengan metode pengendapan (NH ₄) ₂ SO ₄ bertingkat	44
	III.2.9	Penentuan aktivitas enzim laccase	45
	III.2.10	Penguraian aflatoksin B1 oleh enzim laccase	46
	III.2.11	Uji aflatoksin B1 dengan alat LC-MS/MS	48
BAB IV		HASIL DAN PEMBAHASAN	49
	IV.1	Konfirmasi Identifikasi Bakteri <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	49
		IV.1.1 Identifikasi morfologi	50
		IV.1.2 Identifikasi molekuler dengan gen 16S rRNA	51
	IV.2	Fraksinasi Enzim Laccase dari <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	59
	IV.3	Studi Degradasi Aflatoksin B1 oleh Laccase dari Fraksinasi Ammonium Sulfat	66
		IV.3.1 Prinsip analisa aflatoksin B1 dengan LC- MS/MS	66
		IV.3.2 Penguraian aflatoksin B1 oleh enzim laccase	70
BAB V		KESIMPULAN DAN SARAN	74
	V.1	Kesimpulan	74
	V.2	Saran	74
		DAFTAR PUSTAKA	75
		LAMPIRAN	81

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Koloni Berwarna Hijau dari <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Gambar II.2	Sisi aktif enzim laccase	15
Gambar II.3	Laccase dari <i>Trametes versicolor</i> dibuat dengan The Pymol Molecular Graphics System Educational Version Shrödinger (Gasparatti, 2012). Struktur tiga dimensi laccase dari <i>Trametes versicolor</i> berwarna merah (A1), hijau (B1) dan biru (C1)	17
Gambar II.4	Laccase dari <i>Trametes versicolor</i> dibuat dengan The Pymol Molecular Graphics System Educational Version Shrödinger (Gasparatti, 2012). Pusat aktif laccase <i>Trametes versicolor</i> mempunyai koordinasi antara sisi aktif Cu dengan residu His dan Cys	18
Gambar II.5	Laccase mengkatalisis reduksi 4 elektron molekul oksigen menjadi air, diikuti dengan oksidasi substrat	18
Gambar II.6	Tahap I reaksi reduksi enzim oleh substrat	19
Gambar II.7	Struktur guaiacol	22
Gambar II.8	Struktur syringaldazin	22
Gambar II.9	Distribusi muatan dan bagian hidrofobik di atas suatu protein	25
Gambar II.10	Struktur aflatoksin B1	28
Gambar II.11	Degradasi AFB1 di dalam tubuh	30
Gambar II.12	Skema kerja alat ESI-MS (a), skema alat ESI (b), dan pelepasan ion dari <i>Taylor cone</i> (c)	35
Gambar IV.1	Koloni bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada pengenceran 10 ⁻⁵	51
Gambar IV.2	Hasil elektroforesis DNA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada 1% agar dan buffer TBE, muncul pada 1390 bp (<i>base pair</i>)	55
Gambar IV.3	Hasil sequencing produk PCR dari DNA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
Gambar IV.4	Kurva standar protein total bovine serum albumin (BSA)	59
Gambar IV.5	Kandungan protein total tiap fraksi (NH ₄) ₂ SO ₄	60
Gambar IV.6	Reaksi oksidasi guaiacol oleh enzim laccase menjadi tetraguaicol	62
Gambar IV.7	Reaksi enzimatik syringaldazin menjadi quinon	64
Gambar IV.8	Aktifitas spesifik laccase dengan substrat guaiacol dan syringaldazin	65
Gambar IV.9	Spektrum massa Aflatoksin B1 dalam single MS full scan (a) dan ion scan (b)	67

Gambar IV.10	Senyawa fragmentasi aflatoksin B1 pada alat LC-MS/MS	68
Gambar IV.11	Kurva I standar aflatoksin B1 0 sampai 4,5 µg/L	69
Gambar IV.12	Kurva II standar aflatoksin B1 4 sampai 250 µg/L	69
Gambar IV.13	Penurunan kandungan aflatoksin pada kacang tanah oleh laccase	71
Gambar IV.14	Screening sampel perlakuan enzim laccase 500 uL AFB1 terdegradasi 54,11 %	72
Gambar IV.15	Perkiraan senyawa hasil degradasi AFB1	73

DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Karakteristik gen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
Tabel II.2	Hasil uji biokimia <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
Tabel II.3	Klasifikasi enzim laccase menurut Internasional Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)	15
Tabel II.4	Densitas dan molaritas larutan (NH ₄) ₂ SO ₄ pada temperatur 0 – 25 °C	26
Tabel III.1	Komposisi campuran pereaksi untuk uji aktifitas laccase pada syringaldazin	47
Tabel III.2	Komposisi perlakuan enzim laccase terhadap aflatoksin B1 pada ekstrak kacang tanah	48
Tabel IV.1	Konsentrasi dan kemurnian DNA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> terhadap protein	53
Tabel IV.2	Hasil BLAST 10 urutan teratas DNA hasil sequencing	57
Tabel IV.3	Strain <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dari tiga urutan teratas analisa BLAST	58
Tabel IV.4	Aktifitas enzim laccase terhadap guaiacol pada fraksi (NH ₄) ₂ SO ₄	62
Tabel IV.5	Aktifitas laccase dengan syringaldazin pada fraksi-fraksi (NH ₄) ₂ SO ₄	65
Tabel IV.6	Kurva I standar aflatoksin B1	68
Tabel IV.7	Kurva II standar aflatoksin B1	69
Tabel IV.8	Limit deteksi Aflatoksin total	70
Tabel IV.9	Hasil analisa residu aflatoksin B1 pada kacang tanah yang diberi laccase	70
Tabel IV.10	Penurunan AFB1 dan aktivitas laccase fraksi (NH ₄) ₂ SO ₄ 50%	70
Tabel IV.11	Perkiraan senyawa turunan aflatoksin hasil degradasi	72

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data Absorbansi Penentuan Aktivitas Enzim Laccase	81
Lampiran 2	Spektrum MS Aflatoksin Fase Gerak	82
Lampiran 3	Spektrum MS Aflatoksin Tanpa Perlakuan Enzim	82
Lampiran 4	Spektrum MS Aflatoksin dengan Enzim 100 µL	83
Lampiran 5	Spektrum MS Aflatoksin dengan Enzim 200 µL	83
Lampiran 6	Spektrum MS Aflatoksin dengan Enzim 300 µL	84
Lampiran 7	Spektrum MS Aflatoksin dengan Enzim 400 µL	84
Lampiran 8	Spektrum MS Aflatoksin dengan Enzim 500 µL	85
Lampiran 9	Spektrum MS dengan Base Peak m/z 381,35	86