

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan.....	6
1.3. Keaslian Penelitian.....	7
1.4. Tujuan Penelitian	9
1.5. Manfaat Penelitian	10
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1. Bakteri Proteolitik	11
2.1.1. Eksopeptidase.....	12
2.1.2. Endopeptidase.....	12
2.2. Protease yang Dihasilkan oleh Bakteri.....	13
2.3. Ekosistem Mangrove dan Keragaman Mikroba.....	16
2.4. Budidaya Udang Vaname (<i>L. vannamei</i>).....	19
2.5. Penyakit.....	21
2.6. Pencemaran Tambak Udang.....	21
2.7. Biodegradasi Bahan Organik dalam Tambak Udang.....	25
2.8. Konsorsium <i>Water Probiotic</i>	28
2.9. Bioremediasi.....	32
2.10. Pengendalian Hayati (biokontrol).....	34
2.11. Landasan Teori.....	36
2.12. Hipotesa.....	38
BAB III. METODE PENELITIAN.....	40
3.1. Pengambilan Sampel dan Skrining Bakteri <i>Water Probiotic</i> Berdasarkan Aktivitas Enzimatik dan Antibakteri.....	40
3.1.1. Sampling sedimen ekosistem mangrove	40
3.1.2. Isolasi dan purifikasi bakteri	42
3.1.3. Uji aktivitas proteolitik	43
3.1.4. Uji aktivitas amilolitik	44
3.1.5. Uji aktivitas lipolitik	44
3.1.6. Uji aktivitas selulolitik	44
3.1.7. Uji aktifitas lignolitik	45
3.1.8. Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>Vibrio</i>	45
3.2. Pembentukan Konsorsium <i>Water Probiotic</i>	46

3.2.1. Uji antagonis antar isolat hasil seleksi	46
3.2.2. Seleksi sumber karbon dan nitrogen	46
3.2.3. Pengaruh konsentrasi karbon dan nitrogen	47
3.2.4. Pengaruh pH.....	48
3.2.5. Pengaruh salinitas	48
3.2.6. Pengaruh suhu	49
3.2.7. Uji kuantitatif hidrolisis protein	49
3.2.8. Rep-PCR dan analisis kelompok (<i>cluster analysis</i>).....	51
3.2.8.1. Isolasi dan purifikasi DNA	52
3.2.8.2. Amplifikasi rep-PCR	52
3.2.8.3. Analisis kelompok (<i>cluster analysis</i>).....	52
3.2.9. Identifikasi genotipik (gen 16S-rRNA).....	54
3.2.9.1. Isolasi dan purifikasi DNA	54
3.2.9.2. Amplifikasi gen 16S-rRNA	54
3.2.9.3. Elektroforesis dan sekuensing.....	55
3.2.9.4. Analisis BLAST homologi.....	55
3.2.9.5. Analisa pohon filogenetik	55
3.2.10. Uji infeksi.....	55
3.2.11. Pembuatan konsorsium <i>water probiotic</i>	56
3.3. Studi Kinetika Pertumbuhan Bakteri Isolat Terpilih pada Fermentor	56
3.3.1. Preparasi inokulum... ..	57
3.3.2. Kultur di fermentor <i>biocontroller</i>	57
3.3.3. Pengukuran kadar protein	57
3.3.4. Pengukuran aktivitas protease.....	57
3.3.5. Pengukuran gula reduksi	58
3.3.6. Pengukuran kadar nitrat	58
3.3.7. Pengukuran turbiditas bakteri	58
3.3.8. Produksi kultur <i>water probiotic</i>	58
3.4. Pemurnian dan Karakterisasi Protease Isolat Terpilih	59
3.4.1. Presipitasi protein dengan amonium sulfat	59
3.4.2. Dialisis	60
3.4.3. Kromatografi	60
3.4.4. Karakterisasi protease	61
3.4.4.1. Analisa profil protein (berat molekul)	61
3.4.4.2. pH dan suhu optimum	62
3.4.4.3. Penentuan harga konstanta Michaelis-Menten (Km) dan kecepatan reaksi (Vmaks)	63
3.5. Uji Aplikasi Konsorsium <i>Water Probiotic</i> dalam Bioremediasi.....	63
3.5.1. Penyiapan udang uji	63
3.5.2. Uji aplikasi konsorsium <i>water probiotic</i> pada bioremediasi.....	64
3.5.3. Pengukuran kualitas air	65
3.5.4. Perhitungan koloni bakteri	65
3.5.5. Laju pertumbuhan spesifik.....	66
3.5.6. Tingkat kelangsungan hidup (<i>survival rate</i> atau SR).....	66
3.6. Uji Aplikasi Konsorsium <i>Water Probiotic</i> pada Pengendalian Hayati (Biokontrol)	67

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	68
4.1. Pengambilan Sampel dan Skrining Bakteri <i>Water Probiotic</i>	68
4.1.1. Pengambilan sampel sedimen ekosistem mangrove	68
4.1.2. Uji aktivitas proteolitik dan yang mempunyai aktivitas (amilolitik, selulolitik, lipolitik dan lignolitik), antibakteri serta studi pertumbuhan isolat bakteri sedimen ekosistem mangrove.	70
4.2. Pembentukan Konsorsium <i>Water Probiotic</i>	75
4.2.1. Uji antagonis isolat bakteri sedimen ekosistem mangrove	75
4.2.2. Seleksi nutrien sumber C dan N.....	76
4.2.3. Pengaruh nutrien sumber C dan N	81
4.2.4. Pengaruh kondisi lingkungan (pH, salinitas, suhu dan agitasi)	84
4.2.5. Uji kuantitatif hidrolisis protein.....	89
4.2.6. Rep-PCR dan analisis kelompok (<i>cluster analysis</i>).....	91
4.2.7. Identifikasi genotipik (gen 16S-rRNA).....	93
4.2.8. Uji infeksi.....	96
4.3. Studi Kinetika Pertumbuhan Bakteri Isolat Terpilih pada Fermentor	97
4.3.1. Hidrolisis protein.....	98
4.3.2. Aktivitas protease.....	101
4.3.3. Reduksi glukosa	103
4.3.4. Reduksi nitrat	106
4.3.5. Pertumbuhan sel bakteri pada fermentor.....	107
4.3.6. Respon bakteri dalam fermentor (laju hidrolisis protein, aktivitas protease, reduksi glukosa, reduksi nitrat dan pertumbuhan sel).....	111
4.4. Pemurnian dan Karakterisasi Protease Isolat Terpilih	113
4.4.1. Presipitasi protein dengan amonium sulfat	113
4.4.2. Fraksinasi protein dengan kromatografi.....	115
4.4.3. Analisa profil protein	119
4.4.4. Stabilitas enzim terhadap suhu.....	121
4.4.5. Stabilitas enzim terhadap pH	121
4.4.6. Penentuan harga konstanta Michaelis-Menten (Km) dan kecepatan reaksi (Vmaks).....	124
4.5. Uji Aplikasi Bioremediasi dan Pengendalian Hayati (Biokontrol).....	127
4.5.1. Bahan Organik Terlarut (BOT).....	128
4.5.2. Kadar protein.....	129
4.5.3. Amoniak (NH ₃)	130
4.5.4. Nitrit (NO ₂)	132
4.5.5. Nitrat (NO ₃).....	134
4.5.6. Kepadatan total bakteri pada media budidaya	136
4.5.7. Kepadatan bakteri <i>Vibrio</i>	138
4.5.8. Aktivitas protease.....	140
4.5.9. Pertumbuhan panjang udang vaname (<i>L. vannamei</i>)	141
4.5.10. Pertumbuhan berat udang vaname (<i>L. vannamei</i>).....	143
4.5.11. <i>Survival rate</i> (SR) udang vaname (<i>L. vannamei</i>)	144
4.6. Uji Aplikasi Pengendalian Hayati (Biokontrol).....	145
4.6.1. <i>Survival rate</i> (SR) larva udang hasil uji pengendalian hayati (Biokontrol)	146
4.6.2. Kepadatan bakteri pada media budidaya.....	147
4.6.3. Kepadatan bakteri <i>Vibrio</i>	148



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

KAJIAN BAKTERI PROTEOLITIK DARI EKOSISTEM MANGROVE SEBAGAI KONSORSIUM WATER PROBIOTIC

DRA. WILIS ARI SETYATI, MSI, Prof. Dr. Ir. Erni Martani; Dr. Ir. Triyanto, M.Si

Universitas Gadjah Mada, 2017 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

4.7. Pembahasan umum	150
BAB V. PENUTUP.....	178
5.1. Kesimpulan	178
5.2. Saran	179
DAFTAR PUSTAKA	180

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Akumulasi material terendapkan pada dasar tambak selama 1 siklus budidaya udang	22
Tabel 2.	Perkiraan konsentrasi komponen kimia dalam air dan tanah dasar tambak	23
Tabel 3.	Jenis <i>water probiotic</i> untuk bioremediasi komersial dan komposisi bakterinya	31
Tabel 4.	Jenis probiotik komersial di Indonesia	32
Tabel 5.	Pengukuran parameter kualitas air	65
Tabel 6.	Zona aktivitas proteolitik 20 isolat terbaik	72
Tabel 7.	Pertumbuhan sel bakteri pada perbedaan sumber karbon	76
Tabel 8.	Pertumbuhan sel bakteri pada perbedaan sumber nitrogen	78
Tabel 9.	Pertumbuhan sel bakteri pada optimasi kadar glukosa (Sumber C).	81
Tabel 10.	Pertumbuhan sel bakteri pada amonium nitrat (Sumber N)	83
Tabel 11.	Pertumbuhan sel bakteri pada pH media.	85
Tabel 12.	Pertumbuhan sel bakteri pada salinitas media	86
Tabel 13.	Pertumbuhan sel bakteri pada suhu inkubasi	89
Tabel 14.	Aktivitas protease bakteri pada agitasi 150 rpm dan inkubasi 6 jam	90
Tabel 15.	BLAST homologi NCBI isolat 13.C, 30.K dan 33.K	94
Tabel 16.	Uji patogenitas isolat 13.C, 30.K dan 33.K terhadap larva udang vaname (<i>L. vannamei</i>)	97
Tabel 17.	Laju hidrolisis protein, aktivitas protease, reduksi glukosa, reduksi nitrat dan pertumbuhan sel	112
Tabel 18.	Aktivitas spesifik pada perlakuan presipitasi protein dengan amonium sulfat	114
Tabel 19.	Purifikasi parsial protease	118
Tabel 20.	Aktivitas protease pada suhu yang berbeda	121
Tabel 21.	Aktivitas protease pada pH yang berbeda	123
Tabel 22.	Bahan Organik Terlarut (BOT) pada media uji bioremediasi	128
Tabel 23.	Kadar protein pada media aplikasi bioremediasi	130
Tabel 24.	Amoniak pada media uji bioremediasi	131
Tabel 25.	Nitrit pada media uji bioremediasi	133
Tabel 26.	Nitrat pada media uji bioremediasi	135
Tabel 27.	Kepadatan bakteri di media budidaya	137
Tabel 28.	Kepadatan bakteri <i>Vibrio</i> (TCBSA) pada media uji bioremediasi	138
Tabel 29.	Aktivitas protease probiotik pada aplikasi bioremediasi	140
Tabel 30.	Pertumbuhan panjang udang vaname (<i>L. vannamei</i>)	142
Tabel 31.	Pertumbuhan berat udang vaname (<i>L. vannamei</i>)	143
Tabel 32.	Kepadatan bakteri pada media uji pengendalian hayati (biokontrol)	147
Tabel 33.	Kepadatan bakteri <i>Vibrio</i> pada media uji pengendalian hayati (biokontrol)	149

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur kimia protein dan reaksi hidrolisis enzimatis oleh protease ...	11
Gambar 2. Jalur hidrolisis oleh protease	14
Gambar 3. <i>Nutrient budget</i> pada tambak udang dengan sistem tertutup.....	24
Gambar 4. Diagram alir penelitian pengembangan konsorsium <i>water probiotic</i> untuk bioremediasi dan pengendalian hayati (biokontrol) pada budidaya udang (<i>L. vannamei</i>)... ..	41
Gambar 5. Isolasi dan seleksi bakteri proteolitik pada sedimen ekosistem mangrove	71
Gambar 6. Uji aktivitas enzimatis isolat bakteri sedimen ekosistem mangrove	73
Gambar 7. Aktivitas antivibrio isolat bakteri sedimen ekosistem mangrove.....	74
Gambar 8. Uji antagonis antar isolat.....	75
Gambar 9. Profil DNA rep-PCR menggunakan penanda BOX- A1R terhadap Isolat Terpilih	91
Gambar 10. Analisis kelompok data binomial hasil rep-PCR Isolat Terpilih	92
Gambar 11. Produk amplifikasi gen 16S-rRNA (isolat 13.C, 30.K, dan 33.K).....	94
Gambar 12. Filogenetik tree isolat 13.C, 30.K dan 33.K.....	95
Gambar 13. Hidrolisis protein oleh isolat 13.C pada media Zobel 2216E	98
Gambar 14. Hidrolisis protein oleh isolat 30.K pada media Zobel 2216E	99
Gambar 15. Hidrolisis protein oleh isolat 33.K pada media Zobel 2216E	99
Gambar 16. Aktivitas protease oleh isolat 13.C pada media Zobel 2216E.....	101
Gambar 17. Aktivitas protease oleh isolat 30.K pada media Zobel 2216E	102
Gambar 18. Aktivitas protease oleh isolat 33.K pada media Zobel 2216E	102
Gambar 19. Reduksi glukosa oleh isolat 13.C pada media Zobel 2216E	104
Gambar 20. Reduksi glukosa oleh isolat 30.K pada media Zobel 2216E.....	104
Gambar 21. Reduksi glukosa oleh isolat 33.K pada media Zobel 2216E.....	105
Gambar 22. Reduksi nitrat oleh isolat 13.C pada media Zobel 2216E	106
Gambar 23. Reduksi nitrat oleh isolat 30.K pada media Zobel 2216E.....	106
Gambar 24. Reduksi nitrat oleh isolat 33.K pada media Zobel 2216E.....	107
Gambar 25. Pertumbuhan isolat 13.C pada media Zobel 2216E	108
Gambar 26. Pertumbuhan isolat 30.K pada media Zobel 2216E.....	109
Gambar 27. Pertumbuhan isolat 33.K pada media Zobel 2216E.....	110
Gambar 28. Fraksinasi protease isolat 13.C pada media Zobel 2216E.....	116
Gambar 29. Fraksinasi protease isolat 30.K pada media Zobel 2216E	116
Gambar 30. Fraksinasi protease isolat 33.K pada media Zobel 2216E	117
Gambar 31. Berat molekul protease (kDa) pada SDS-PAGE.....	118
Gambar 32. Lineweaver-Burk protease isolat 13.C	126
Gambar 33. Lineweaver-Burk protease isolat 30.K.....	126
Gambar 34. Lineweaver-Burk protease isolat 33.K.....	127
Gambar 35. Nilai prosentase SR larva udang vaname pada uji bioremediasi	145
Gambar 36. Nilai prosentase SR larva udang vaname hasil uji pengendalian hayati (Biokontrol)	146

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Peta penelitian	197
Lampiran 2.	Data rata – rata aktivitas enzimatik dan antivibrio 60 isolat dari stasiun Cilacap dan Rembang.....	198
Lampiran 3.	Data rata - rata aktivitas enzimatik dan antivibrio 60 isolat dari Karimunjawa dan Banyuwangi	199
Lampiran 4.	Kriteria pembobotan dan skoring pada 60 isolat.....	200
Lampiran 5.	Ranking 20 isolat terbaik dari 60 isolat.....	201
Lampiran 6.	Data rata – rata aktivitas protease (IU), kadar protein (mg), Sumber C – N, total aktivitas protease, aktivitas spesifik (IU/mg).....	201
Lampiran 7.	Aktivitas protease bakteri pada perbedaan agitasi.....	202
Lampiran 8.	Aktivitas protease bakteri pada agitasi 150 rpm.....	202
Lampiran 9.	Kriteria pembobotan dan skoring pada 10 isolat terbaik dari 20 isolat terpilih.....	203
Lampiran 10.	Rangking 10 isolat terbaik dari 20 isolat.....	203
Lampiran 11.	Similaritas pada analisis kelompok (<i>cluster analysis</i>).....	204
Lampiran 12.	BLAST homologi NCBUI isolat 13.C ; 30.K; dan 33.K.....	204
Lampiran 13.	Proyeksi variabel pada faktor 1 dan 2 (f1 x f2) pada isolat 13.C.....	206
Lampiran 14.	Korelasi person antar variabel pada isolat 13.C	206
Lampiran 15.	Hubungan kadar protein pada isolat 13.C terhadap A. kadar glukosa; B. kadar nitrat; C. aktivitas protease	207
Lampiran 16.	Hubungan aktivitas protease terhadap pertumbuhan sel bakteri pada isolat 13.C	207
Lampiran 17.	Proyeksi variabel pada faktor 1 dan 2 (f1 x f2) pada isolat 30.K.....	208
Lampiran 18.	Korelasi person antar variabel pada isolat 30.K.....	208
Lampiran 19.	Hubungan kadar protein pada isolat 30.K terhadap A. kadar glukosa; B. kadar nitrat; C. aktivitas protease.....	209
Lampiran 20.	Hubungan aktifitas protease terhadap pertumbuhan sel bakteri pada isolat 30.K.....	209
Lampiran 21.	Proyeksi variabel pada faktor 1 dan 2 (f1 x f2) pada isolat 33.K.....	210
Lampiran 22.	Korelasi person antar variable pada isolat 33.K.....	210
Lampiran 23.	Hubungan kadar protein pada isolat 33.K. terhadap A. kadar glukosa; B. kadar nitrat; C. aktivitas protease.....	211
Lampiran 24.	Hubungan aktivitas protease terhadap pertumbuhan sel bakteri pada isolat 33.K.....	211
Lampiran 25.	Proyeksi variabel pada faktor 1 dan 2 (f1 x f2) pada perlakuan Pro-1	212
Lampiran 26.	Korelasi person antar variabel pada perlakuan Pro-1	213
Lampiran 27.	Hubungan antara kadar protein, TSS dan BOT pada perlakuan Pro-1	213
Lampiran 28.	Hubungan antara nitrit, nitrat dan amonia pada perlakuan Pro-1.....	214
Lampiran 29.	Hubungan kepadatan bakteri pada media budidaya, kepadatan bakteri Vibrio dan kepadatan bakteri non Vibrio pada perlakuan Pro-1	214
Lampiran 30.	Hubungan panjang terhadap berat udang vaname pada perlakuan Pro – 1	214

Lampiran 31. Hubungan antara bakteri non <i>Vibrio</i> dengan aktivitas A. protease; B. kadar protein; C. nitrit; D. nitrat pada perlakuan Pro – 1	215
Lampiran 32. Proyeksi variabel pada faktor 1 dan 2 (f1 x f2) pada perlakuan Enzima.....	215
Lampiran 33. Korelasi person antar variabel pada perlakuan Enzima	216
Lampiran 34. Hubungan antara kadar protein, TSS dan BOT pada perlakuan Enzima.....	216
Lampiran 35. Hubungan antara nitrit, nitrat dan amonia pada perlakuan Enzima	217
Lampiran 36. Hubungan antara kepadatan bakteri pada media budidaya, kepadatan bakteri <i>Vibrio</i> dan kepadatan bakteri non <i>Vibrio</i> pada perlakuan Enzima	217
Lampiran 37. Hubungan panjang terhadap berat udang vaname pada perlakuan Enzima	218
Lampiran 38. Hubungan antara bakteri non <i>Vibrio</i> dengan A. aktivitas protease; B. kadar protein; C. nitrit; D. nitrat pada perlakuan Enzima.....	218
Lampiran 39. Proyeksi variabel pada faktor 1 dan 2 (f1 x f2) pada perlakuan konsorsium (bakteri isolat 13.C, 30.K dan 33.K).....	219
Lampiran 40. Korelasi person antar variabel pada perlakuan konsorsium (bakteri isolat 13.C, 30.K dan 33.K).....	219
Lampiran 41. Hubungan antara kadar protein, TSS dan BOT pada perlakuan konsorsium (bakteri isolat 13.C, 30.K dan 33.K).....	220
Lampiran 42. Hubungan antara nitrit, nitrat dan amonia pada perlakuan konsorsium (bakteri isolat 13.C, 30.K dan 33.K).....	220
Lampiran 43. Hubungan kepadatan bakteri pada media budidaya, kepadatan bakteri <i>Vibrio</i> dan kepadatan bakteri non <i>Vibrio</i> pada perlakuan konsorsium	220
Lampiran 44. Hubungan panjang terhadap berat udang, hubungan antara bakteri non <i>Vibrio</i> dengan aktifitas B. protease; C. kadar protein; D. nitrit; E. nitrat pada perlakuan konsorsium (bakteri isolat 13.C, 30.K dan 33.K).....	221
Lampiran 45. Hubungan kepadatan bakteri pada media dengan kepadatan bakteri <i>Vibrio</i> pada perlakuan kontrol negatif (-); B. Hubungan kepadatan bakteri pada media dengan kepadatan bakteri <i>Vibrio</i> pada perlakuan kontrol positif (+).....	221
Lampiran 46. Hubungan kepadatan bakteri pada media dengan kepadatan bakteri <i>Vibrio</i> pada perlakuan A. Pro-1; B. Enzima; C. konsorsium (bakteri isolat 13.C, 30.K dan 33.K).....	222
Lampiran 47. Dokumentasi penelitian tahap I. isolasi dan seleksi bakteri proteolitik dengan aktivitas selulolitik, lignolitik, amilolitik, lipolitik, dan antibakteri.....	223
Lampiran 48. Dokumentasi penelitian tahap III. Studi kinetika pertumbuhan bakteri isolat terpilih pada fermentor	224
Lampiran 49. Dokumentasi penelitian tahap IV. Pemurnian dan Karakterisasi Protease.....	224
Lampiran 50. Dokumentasi penelitian tahap V. Uji aplikasi konsorsium <i>water probiotic</i> dalam bioremediasi dan pengendalian hayati budidaya udang skala laboratorium	225



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

KAJIAN BAKTERI PROTEOLITIK DARI EKOSISTEM MANGROVE SEBAGAI KONSORSIUM WATER PROBIOTIC

DRA. WILIS ARI SETYATI, MSI, Prof. Dr. Ir. Erni Martani; Dr. Ir. Triyanto, M.Si

Universitas Gadjah Mada, 2017 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

Lampiran 51. Percobaan bioremediasi.....	225
Lampiran 52. Percobaan pengendalian hayati (biokontrol).....	226