

IDENTIFIKASI MOLEKULAR DAN PROFIL PEROKSIDASE
Phanerochaete chrysosporium ISOLAT ITB,
OPTIMASI PRODUKSI, KARAKTERISASI DAN EKSPLORASI POTENSI
LIGNIN PEROKSIDASENYA UNTUK DEKOLORISASI REAKTIF *BLACK 5*

DISERTASI

Oleh
EVI SUSANTI
127090100111002



PROGRAM DOKTOR BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017

**IDENTIFIKASI MOLEKULAR DAN PROFIL PEROKSIDASE
Phanerochaete chrysosporium ISOLAT ITB,
OPTIMASI PRODUKSI, KARAKTERISASI DAN EKSPLORASI POTENSI
LIGNIN PEROKSIDASENYA UNTUK DEKOLORISASI REAKTIF *BLACK 5***

DISERTASI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor dalam Bidang Biologi

Oleh
EVI SUSANTI
127090100111002



**PROGRAM DOKTOR BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

HALAMAN PENGESAHAN DISERTASI

**IDENTIFIKASI MOLEKULAR DAN PROFIL PEROKSIDASE
Phanerochaete chrysosporium ISOLAT ITB,
OPTIMASI PRODUKSI, KARAKTERISASI DAN EKSPLORASI POTENSI
LIGNIN PEROKSIDASENYA UNTUK DEKOLORISASI REAKTIF *BLACK 5***

**EVI SUSANTI
127090100111002**

Telah dipertahankan di depan majelis Penguji
Pada tanggal 16 Juni 2017 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Doktor dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Promotor

Prof. Dr.drh. Aulanni'am, DES
NIP 19600903 198802 2 001

Ko-promotor I

Ko-promotor II

Dr. Suharjono, M.Si
NIP. 19630223 198802 1 001

Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D
NIP. 19671213 199103 2 001

Mengetahui
Ketua Program Studi Doktor Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Prof. Dr.Ir. Estri Laras Arumingtyas, M.Sc.St.
NIP. 19630818 198802 2 001

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI DISERTASI

Judul Disertasi

IDENTIFIKASI MOLEKULAR DAN PROFIL PEROKSIDASE *Phanerochaete chrysosporium* ISOLAT ITB, OPTIMASI PRODUKSI, KARAKTERISASI DAN EKSPLORASI POTENSI LIGNIN PEROKSIDASENYA UNTUK DEKOLORISASI REAKTIF *BLACK 5*

Nama : Evi Susanti
NIM : 127090100111002

KOMISI PROMOTOR :
Promotor : Prof. Dr.drh. Aulanni'am, DES
Ko Promotor : Dr. Suharjono, M.Si
Ko promotor : Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D

TIM DOSEN PENGUJI :
Dosen Penguji I : Prof. Dr.drh. Aulanni'am, DES
Dosen Penguji II : Dr. Suharjono, M.Si
Dosen Penguji III : Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D
Dosen Penguji IV : Prof. Dr. Subandi, M.S
Dosen Penguji V : Akhmad Sabaruddin, D. Sc
Dosen Penguji VI : Dr. Sasangka Prasetyawan, M.S

Tanggal Seminar Hasil : 16 Januari 2017
Tanggal Ujian kelayakan : 16 Januari 2017

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Disertasi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, Januari 2017

Nama : Evi Susanti
NIM : 127090100111002

RIWAYAT HIDUP

Evi Susanti, lahir di Malang, 16 Mei 1975, putri dari Bapak Soegito dan Ibu Fatimah, lulus SMA di Malang tahun 1993, menempuh pendidikan S-1 pada Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawajaya tahun 1997, menempuh pendidikan S-2 di Bidang Biokimia Program Studi Kimia Program Pascasarjana Institut Teknologi Bandung lulus tahun 2002. Sejak tahun 1998 (hingga sekarang) penulis menjadi staf pengajar PNS di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Malang

Malang, Januari 2017

Penulis,

Evi Susanti

PEDOMAN PENGGUNAAN DISERTASI

Disertasi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

RINGKASAN

Identifikasi Molekular dan Profil Peroksidase *Phanerochaete chrysosporium* isolat ITB, Optimasi Produksi, Karakterisasi dan Eksplorasi Potensi Lignin Peroksidasinya untuk Dekolorisasi Reaktif *Black 5*

Evi Susanti, Aulanni'am, Suharjono, Tri Ardyati
Program Pascasarjana Universitas Brawijaya
2017

Limbah industri tekstil yang tidak dikelola dengan baik dapat menimbulkan permasalahan bagi ekosistem di sekitarnya. Perairan menjadi berwarna yang menyebabkan turunnya nilai estetika. Fitoplankton di perairan tercemar pewarna tekstil mengalami perubahan warna yang abnormal dan proses fotosintesis akan tereduksi karena cahaya yang memasuki perairan akan diserap oleh pewarna. Pewarna yang terakumulasi di dasar perairan, khususnya pewarna yang mengandung gugus azo, mengalami degradasi secara anaerob menghasilkan senyawa amina aromatik yang lebih toksik dan dapat membahayakan organisme di perairan tersebut. Dekolorisasi pewarna tekstil secara enzimatis menggunakan enzim lignin peroksidase memiliki keunggulan dibandingkan metoda mikrobiologis, tetapi aplikasinya masih dianggap sulit dan mahal karena terbatasnya informasi mengenai sumber, produksi dan karakterisasi lignin peroksidase serta optimasi proses dekolourisasi oleh lignin peroksidase. *Phanerochaete chrysosporium* diketahui memiliki kemampuan mendegradasi lignin dan berbagai polutan aromatik termasuk pewarna tekstil karena kapang tersebut menghasilkan enzim-enzim ligninolitik diantaranya lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP) dan enzim-enzim penghasil H₂O₂ ekstraselular. Produksi enzim-enzim ligninolitik tersebut dipengaruhi oleh strain dan media produksi yang digunakan. Pada penelitian ini dipilih *Phanerochaete chrysosporium* isolat ITB karena kapang ini sejak tahun 90an telah menjadi koleksi Laboratorium Mikrobiologi ITB tetapi belum dieksplorasi baik sebagai sumber enzim peroksidase maupun diaplikasikan untuk dekolourisasi pewarna tekstil secara enzimatis. Reaktif *black 5* digunakan sebagai model pewarna tekstil karena banyak digunakan untuk pewarnaan katun, wool dan nilon, merupakan pewarna diazo sulfonat yang berukuran besar dan sulit terdegradasi karena di sekitar gugus kromofornya terikat beberapa cincin aromatik sehingga sulit memasuki sel. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari karakter genotip dan biokimiawi *Phanerochaete chrysosporium* isolat ITB berdasarkan sekuen daerah ITS, profil peroksidase, optimasi produksi dan karakteristik lignin peroksidase yang dihasilkan serta potensi lignin peroksidase tersebut untuk mendegradasi reaktif *black 5*.

Tahapan penelitian yang dilakukan yaitu: (1) identifikasi *P. chrysosporium* isolat ITB, (2) penentuan profil peroksidase *P. chrysosporium* isolat ITB, (3) optimasi produksi lignin peroksidase (LiP) *P. chrysosporium* isolat ITB, (4) karakterisasi ekstrak kasar enzim LiP *P. chrysosporium* isolat ITB, (5) penentuan kondisi optimum dekolourisasi reaktif *black 5* oleh enzim LiP *P. chrysosporium* isolat ITB, dan (6) Identifikasi perubahan struktur reaktif *black 5* sebelum dan setelah dekolourisasi oleh enzim LiP *P. chrysosporium* isolat ITB

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Phanerochaete chrysosporium* isolat ITB memiliki karakter genotip dan biokimiawi yang berbeda dengan isolat *P. chrysosporium* lainnya, Sekuen daerah ITS hanya memiliki similaritas tertinggi sebesar 99,6 % dengan *P. chrysosporium* BKM-F-1767, RP78, PVI, KCTC 6728, SF-4, ATCC MYA-476, FCL208, FCL236 dan Gold-9-419-4. Konsisten menghasilkan enzim lignin peroksidase (LiP) optimum dalam medium Kirk dengan sumber karbon serbuk kayu 1% (w/v), amonium sulfat 20 mM, Tween-80 0,025 %, dan veratril alkohol 300 ppm, diinokulasi dengan

jumlah spora awal 1.10^5 spora/mL dan diinkubasi pada $37\text{ }^\circ\text{C}$ dan 50 rpm selama lima hari, menghasilkan enzim LiP dengan aktivitas spesifik LiP rata-rata $77,4 \pm 13,1$ U/mg. Enzim LiP tersebut diduga merupakan isoenzim LiP baru memiliki ukuran 34 kDa; tidak dapat diendapkan dengan ammonium sulfat; fraksinasi dengan pengendapan etanol optimum pada kejenuhan etanol 64 % meningkatkan aktivitas spesifiknya sebesar 2,3 kali dan memperkecil volume hingga 3,3 kali; penyimpanan ekstrak kasar pada suhu $0\text{ }^\circ\text{C}$ lebih stabil dibandingkan endapan hasil fraksinasi etanol maupun resuspensi hasil fraksinasi etanol; mampu mengoksidasi veratril aldehid dengan aktivitas tinggi pada pH 3 -5 dan suhu $26 - 32\text{ }^\circ\text{C}$; memiliki stabilitas termal yang baik; aktivitasnya dipengaruhi oleh berbagai ion logam dan inhibitor. Sebanyak satu milliliter ekstrak kasar enzim LiP dengan inisiator 50 mM H_2O_2 , mampu mendekolorisasi 20 ppm reaktif *black* 5 hingga 80 %, efektif pada pH 5 hingga 7, suhu antara 37 hingga $80\text{ }^\circ\text{C}$, selama 24 jam dan menghasilkan produk dekolorisasi yang tidak toksik.

SUMMARY

Molecular Identification and Peroxidase Profiles of *Phanerochaete chrysosporium* ITB isolate, Production Optimization, Characterization and Exploration The Potential of Lignin Peroxidase to Decolorize Reactive Black 5

Evi Susanti, Aulanni'am, Suharjono, Tri Ardyati
Program Pascasarjana Universitas Brawijaya
2017

Waste textile industry has become a problem issue for the surrounding ecosystem. Aquatic environment become colored causing a decline in the value of aesthetics. Phytoplankton in the polluted waters of textile dyes is abnormal and the process of photosynthesis is reduced because of the light entering the water will be absorbed by the dye. Anaerobic degradation of group-containing azo dyes that accumulates in the bottom waters especially produces aromatic amine compounds are more toxic and can harm the organism in these aquatic environments. Decolorization of textile dyes enzymatically using lignin peroxidase enzyme (LiP) has advantages over the microbiological method, but the application is still considered difficult and expensive because of the limited information on resources, production and characterization of LiP and optimization decolorization process by LiP. *Phanerochaete chrysosporium* known to have the ability to degrade lignin and various aromatic pollutants including textile dyes because the fungus produces ligninolytic enzymes including lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and enzymes producing extracellular H₂O₂. Production of ligninolytic enzymes are influenced by strain and production medium. *P. chrysosporium* ITB isolate has become a collection of Microbiology Laboratory ITB since the 90s, but have not been investigated both as a source of peroxidase and applied for enzymatic decolorization of textile dyes. Reactive Black 5 is used as a textile dye model because it's used for dyeing cotton, wool and nylon, a sulfonic diazo dyes that are large and difficult to be degraded as around the chromophore group attached several aromatic rings. The aims of this research were to study the genotype and biochemical character of *Phanerochaete chrysosporium* ITB isolate based on ITS region sequences, peroxidase profiles, optimization of production and the characteristics of the resulting lignin peroxidase and the potential to degrade reactive black 5.

The stages of the research conducted are: (1) identification of *P. chrysosporium* ITB isolate, (2) the determination of peroxidase profile of *P. chrysosporium* ITB isolate, (3) optimization of the production of lignin peroxidase (LiP) of *P. chrysosporium* ITB isolate, (4) the characterization of LiP crude extract enzyme of *P. chrysosporium* ITB isolate, (5) the determination of the optimum conditions decolorization of reactive black 5 by LiP enzyme of *P. chrysosporium* ITB isolate, and (6) identification of changes in the structure of the reactive black 5 before and after decolorization by LiP enzyme of *P. chrysosporium* ITB isolate.

The results showed that *Phanerochaete chrysosporium* ITB isolate have genotype and biochemical characters that are different from other isolates. Sequences of ITS region only has the highest similarity of 99.6% with *P. chrysosporium* BKM-F-1767, Rp78, PV1, KCTC 6728, SF-4, ATCC MYA-476, FCL208, FCL236 and Gold-9-419-4. Consistently produce of lignin peroxidase (LiP) enzymes, optimized for medium Kirk with a carbon source sawdust 1% (w / v), ammonium sulphate 20 mM, Tween-80 0.025%, and veratril alcohol 300 ppm, inoculated with the number of spores beginning of 1.10⁵ spores/mL and incubated at 37 ° C and 50 rpm for five days, producing the enzyme with a specific activity of LiP as 77.4 ± 13.1 U/mg. The LiP enzyme is thought to be a new LiP isoenzymes has a size of 34 kDa; can not be precipitated with ammonium sulfate; fractionated by ethanol precipitation optimum saturation of ethanol 64% increase specific activity of 2.3 times and

decrease the volume of up to 3.3 times; storage of crude extract at a temperature of 0 °C more stable than sediment resuspension result of fractionation of ethanol and ethanol fractionation results; veratril capable of oxidizing aldehydes with high activity at pH 3 to 5 and a temperature of 26-32 ° C; have good thermal stability; its activity is influenced by a variety of metal ions and inhibitors. As many as one milliliter of crude extract with an initiator reaction (50 mM H₂O₂), capable decolorize 20 ppm of reactive black 5 to 80 %, effective at pH 5 to 7, a temperature between 37 to 80 °C, for 24 hours and produce not toxic products.