

## TESIS

# DETEKSI GEN SERTA UJI AKTIVITAS ENZIM KATABOLIK PADA *Bacillus subtilis* 3KP TERHADAP SUBSTRAT HIDROKARBON



**MEILISA RUSDIANA SURYA EFENDI**  
**NIM. 081414253003**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**2016**

**TESIS**

**DETEKSI GEN SERTA UJI AKTIVITAS ENZIM KATABOLIK  
PADA *Bacillus subtilis* 3KP TERHADAP SUBSTRAT  
HIDROKARBON**



**MEILISA RUSDIANA SURYA EFENDI  
NIM. 081414253003**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2016**

**DETEKSI GEN SERTA UJI AKTIVITAS ENZIM KATABOLIK  
PADA *Bacillus subtilis* 3KP TERHADAP SUBSTRAT  
HIDROKARBON**

**TESIS**

Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Magister Kimia  
Pada Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga



Oleh :

**MEILISA RUSDIANA SURYA EFENDI**  
NIM. 081414253003

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**Tanggal 4 Agustus 2016**

iii

**HALAMAN PENGESAHAN**


**TESIS**

**DETEKSI GEN SERTA UJI AKTIVITAS ENZIM KATABOLIK  
PADA *Bacillus subtilis* 3KP TERHADAP SUBSTRAT  
HIDROKARBON**


Disusun oleh  
**MEILISA RUSDIANA SURYA EFENDI**  
NIM. 081414253003

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
Dan diterima sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Kimia  
Pada tanggal 4 Agustus 2016

Pembimbing II

  
Dr. Ni matuzahroh,  
NIP. 19680105 1992030 2 003

Pembimbing I

  
Dr. Sri Sumarsih, M.Si.  
NIP. 19600110 198810 2 001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Magister Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

  
Mochamad Zaki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D.  
NIP. 19830702200912 1 005

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan karunia, nikmat, dan segala kemudahan sehingga penyusun dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul **“Deteksi Gen serta Uji Aktivitas Enzim Katabolik pada *Bacillus subtilis* 3KP terhadap Substrat Hidrokarbon”**. Naskah tesis ini dibuat untuk memenuhi persyaratan akademis pendidikan S2 dalam bidang Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

Naskah proposal ini dapat diselesaikan atas bantuan berbagai pihak, oleh karena itu, penyusun mengucapkan terima kasih kepada :

- 1 Dr. Sri Sumarsih, M.Si., selaku pembimbing I yang telah memberikan arahan dan masukan serta meluangkan waktu bagi penyusun untuk berkonsultasi.
- 2 Dr. Ni'matuzahroh, selaku pembimbing II yang telah memberikan arahan dan masukan serta meluangkan waktu bagi penyusun untuk berkonsultasi.
- 3 Dr. Sri Sumarsih, M.Si., selaku dosen pembimbing akademik S2 Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- 4 Dosen-dosen Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan banyak ilmu, masukan, dan pembelajaran selama ini.
- 5 Ayah, ibu dan adik-adik yang selalu memberikan dukungan dan doa restu kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa naskah tesis ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan dan kesempurnaan naskah tesis ini.

Surabaya, 4 Agustus 2016

Meilisa Rusdiana Surya Efendi

## ABSTRAK

### **Deteksi Gen serta Uji Aktivitas Enzim Katabolik pada *Bacillus subtilis* 3KP terhadap Substrat Hidrokarbon**

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen serta uji aktivitas enzim katabolik pada *Bacillus subtilis* 3KP terhadap substrat hidrokarbon. Isolat ditumbuhkan pada media *Sea Salt* diperkaya *yeast extract* dan hidrokarbon, yaitu heksadekana, toluena dan naftalena. Gen katabolik diamplifikasi menggunakan metode PCR dengan primer spesifik. *Bacillus subtilis* 3KP memiliki gen *alk*, *ndo* dan *tod* dengan ukuran berturut-turut sebesar 400 bp, 1200 bp dan 1100 bp. Gen-gen ini menyandi alkana hidroksilase, naftalen dioksigenase dan toluen dioksigenase. Uji aktivitas enzim dilakukan menggunakan NADH diukur pada panjang gelombang 340 nm. Aktivitas enzim alkana hidroksilase sebesar 3,859 U/ml terhadap substrat heksadekan, aktivitas enzim dioksigenase sebesar 5,402 U/ml terhadap substrat naftalen dan sebesar 6,174 U/ml terhadap substrat toluena.

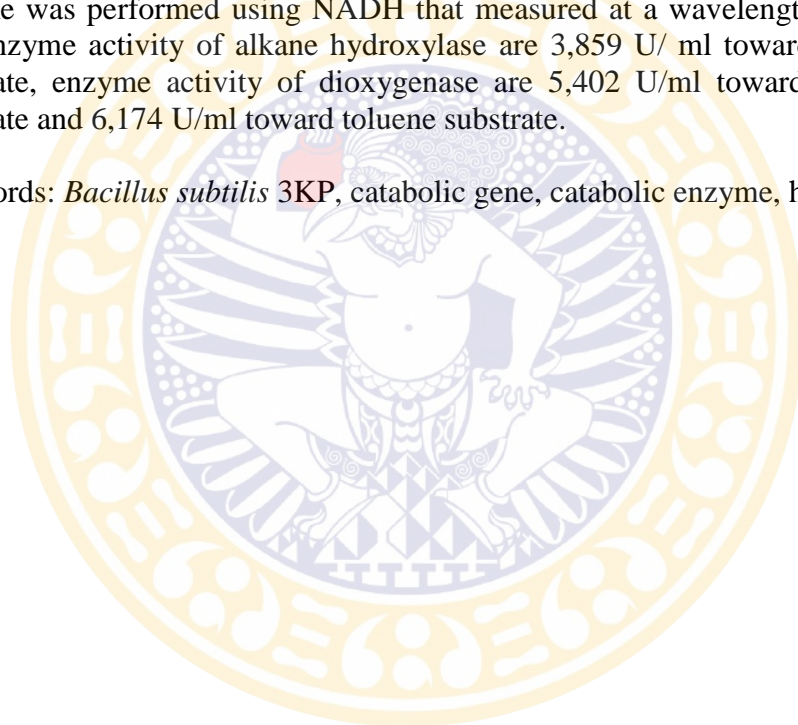
Kata kunci : *Bacillus subtilis* 3KP , gen katabolik, enzim katabolik, hidrokarbon

## ABSTRACT

### **Detection of Gen and Activity Assay of Catabolic Enzyme Isolated from *Bacillus subtilis* 3KP toward Hydrocarbons Substrates**

This research aims to detect the genes and catabolic enzymes activity assay in *Bacillus subtilis* 3KP against hydrocarbon substrates. The isolate grown on Sea Salt media enriched with yeast extract and hydrocarbons, namely hexadecane, toluene, and naphthalene. Catabolic gene was amplified using PCR method with specific primers. *Bacillus subtilis* 3KP has gene *alk*, *ndo* and *tod* with consecutive size of 400 bp, 1200 bp and 1100 bp. These genes encode alkane hydroxylase, naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. Activity test of enzyme was performed using NADH that measured at a wavelength of 340 nm. The enzyme activity of alkane hydroxylase are 3,859 U/ ml toward hexadecane substrate, enzyme activity of dioxygenase are 5,402 U/ml toward naphthalene substrate and 6,174 U/ml toward toluene substrate.

Keywords: *Bacillus subtilis* 3KP, catabolic gene, catabolic enzyme, hydrocarbons.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
Sampul Luar	i
Sampul Dalam	ii
Halaman Prasyarat Gelar	iii
Halaman Pengesahan	iv
Ucapan Terimakasih	v
Abstrak	vi
Abstract	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
<b>BAB 1    PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1.    Latar Belakang Permasalahan	1
1.2.    Rumusan Masalah	5
1.3.    Tujuan Penelitian	5
1.4.    Manfaat Penelitian	5
<b>BAB II    TINJAUAN PUSTAKA</b>	<b>6</b>
2.1    Bakteri Hidrokarbonoklastik	6
2.2    Biodegradasi Hidrokarbon	7
2.3    Metabolisme Bakteri	7
2.4    Mekanisme Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi oleh Bakteri	7 10
2.5 <i>Bacillus subtilis</i>	11
2.6    Enzim Oksigenase	12
2.6.1    Enzim Alkana Hidroksilase	13
2.6.2    Enzim Dioksigenase	14
2.7    Gen Penyandi Enzim Alkana Hidroksilase dan Dioksigenase	15 15
<b>BAB III    KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS           PENELITIAN</b>	<b>16</b>
3.1    Kerangka Konseptual	16
3.2.    Hipotesis Penelitian	17
<b>BAB IV    METODE PENELITIAN</b>	<b>19</b>
4.1.    Tempat dan Waktu Penelitian	19
4.2.    Sampel, Alat dan Bahan Penelitian	19
4.3.    Diagram Alir Penelitian	20



4.3.	Prosedur Kerja	21
4.4.1	Pembuatan media	21
4.4.1.1	Pembuatan media <i>nutrient agar</i> (NA) untuk peremajaan isolat bakteri	21
4.4.1.2	Pembuatan media <i>nutrient broth</i> (NB) untuk inokulum bakteri	21
4.4.1.3	Pembuatan media air mineral sintetik (AMS) untuk kultivasi dan produksi enzim	21
4.4.1.4	Pembuatan media untuk preparasi DNA <i>template</i> dalam proses PCR	21
4.4.2	Peremajaan isolat bakteri	22
4.4.3	Pembuatan inokulum bakteri	22
4.4.4	Kultivasi mikroba dalam media AMS + substrat hidrokarbon	22
4.4.5	Kultivasi mikroba dalam media LB	22
4.4.6	Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri	23
4.4.7	Uji aktivitas enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase	23
4.4.7.1	Pembuatan larutan buffer 20mM Tris-HCl	23
4.4.7.2	Panen sel	23
4.4.7.3	Uji aktivitas enzim alkana hidroksilase	23
4.4.7.4	Uji aktivitas enzim dioksigenase	24
4.4.8	Penentuan Kadar Protein	25
4.4.9	Ekstraksi DNA genom bakteri <i>Bacillus subtilis</i> 3KP	25
4.4.10	Penentuan konsentrasi DNA genom bakteri <i>Bacillus subtilis</i> 3KP	26
4.4.11	Pembuatan gel agarose	26
4.4.12	Elektroforesis	26
4.4.13	Amplifikasi gen penyandi enzim oksigenase (alkana hidroksilase dan dioksigenase) dengan PCR	27
<b>BAB V</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>28</b>
5.1	Isolasi DNA Genom <i>Bacillus subtilis</i> 3KP	28
5.2	Optimasi dan Amplifikasi Gen <i>alk, ndo, tod</i> pada <i>Bacillus subtilis</i> 3KP	28
5.3	Respon Pertumbuhan (OD) <i>Bacillus subtilis</i> 3KP pada Substrat Heksadekan, Naftalen dan Toluena	31
5.4	Uji Aktivitas Enzim Alkana Hidroksilase dan Dioksigenase	35
<b>BAB VI</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>42</b>
6.1	Kesimpulan	42
6.2	Saran	42

DAFTAR PUSTAKA  
LAMPIRAN

43



## DAFTAR TABEL

No.	Judul Tabel
<hr/>	
Halaman	
Tabel 4.1.	Primer yang digunakan dalam penelitian .....27
Tabel 5.1.	Ukuran fragmen gen <i>alk</i> , <i>ndo</i> , <i>tod</i> hasil amplifikasi.....30



## DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Sel <i>Bacillus subtilis</i> .....	11
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian.....	18
Gambar 4.1	Diagram alir penelitian.....	20
Gambar 5.1	Amplifikasi DNA genom <i>Bacillus subtilis</i> 3KP pada gel agarosa....	28
Gambar 5.2	Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Fragmen Gen <i>alk</i> , <i>ndo</i> , <i>tod</i> .....	29
Gambar 5.3	Kurva pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i> 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, toluena dan naftalen .....	32
Gambar 5.4	Kurva biomasa sel <i>Bacillus subtilis</i> 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, toluena dan naftalen.....	33
Gambar 5.5	Perubahan nilai pH <i>Bacillus subtilis</i> 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, naftalen, dan toluene selama waktu kultivasi 14 hari.....	35
Gambar 5.6	Aktivitas enzim alkana hidroksilase <i>Bacillus subtilis</i> 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan .....	36
Gambar 5.7	Aktivitas enzim naftalen dioksigenase <i>Bacillus subtilis</i> 3KP yang ditumbuhkan pada substrat naftalen.....	36
Gambar 5.8	Aktivitas enzim toluen dioksigenase <i>Bacillus subtilis</i> 3KP yang ditumbuhkan pada substrat toluen.....	37
Gambar 5.9	Reaksi yang terjadi saat <i>Bacillus subtilis</i> 3KP mengoksidasi heksadekana, naftalena dan toluene.....	40
Gambar 5.10	Kadar protein enzim <i>Bacillus subtilis</i> 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, toluen dan naftalen.....	40

## DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul Lampiran
Lampiran 1.	Ekstraksi DNA genom bakteri <i>Bacillus subtilis</i> 3KP
Lampiran 2.	Data OD heksadekan, naftalen dan toluen
Lampiran 3.	Data Biomasa sel
Lampiran 4.	Data pH
Lampiran 5.	Data Uji Aktivitas Enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase
Lampiran 6.	Data Kadar Protein



## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang Permasalahan**

Salah satu masalah utama yang dihadapi oleh industri minyak adalah lumpur minyak yang dihasilkan selama pengolahan minyak mentah. Akumulasi lumpur minyak pada bagian bawah tangki penyimpanan minyak dapat menyebabkan penurunan kapasitas operasional dan mempercepat proses korosi pada tangki. Akumulasi lumpur minyak akan menimbulkan kerugian bagi industri perminyakan, sehingga membutuhkan upaya pembersihan lumpur minyak dari penyimpanan bahan bakar minyak. Lumpur minyak digolongkan ke dalam bahan beracun dan berbahaya sehingga harus diolah terlebih dahulu sebelum dibuang. Lumpur minyak terdiri dari minyak, air, abu, karat tangki, pasir dan bahan-bahan lainnya. Kandungan senyawa hidrokarbon dalam lumpur minyak seperti benzena, toluena, etilbenzena, xylene, dan logam-logam berat berpotensi karsinogenik (Banat dan Rancich, 2009).

Hidrokarbon merupakan kelompok bahan pencemar yang sulit terdegradasi, bersifat non polar, dan memiliki kelarutan yang rendah dalam air. Hidrokarbon terdiri dari golongan alifatik dan aromatik yang unturnya dapat digunakan sebagai sumber karbon oleh bakteri. Bakteri dalam aktivitas hidupnya memerlukan molekul karbon sebagai salah satu sumber nutrisi dan energi untuk melakukan metabolisme dan perkembangbiakannya. Atlas dan Bartha (1998) menyebutkan bahwa bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon untuk kepentingan metabolisme dan perkembangbiakannya disebut kelompok bakteri hidrokarbonoklastik. Bakteri-bakteri yang berpotensi mendegradasi senyawa hidrokarbon diantaranya *Bacillus subtilis* 3KP, *Pseudomonas putida* T1-8, *Micrococcus* sp. L II 61, *Acinetobacter* sp. P(2)1, dan *Actinobacillus* sp. P3-7 (Ni'matuzahroh *et al.*, 2009).

Proses biodegradasi hidrokarbon adalah proses alam yang membantu mengurai senyawa hidrokarbon dari lingkungan berdasarkan metabolisme mikroorganisme, termasuk oksidasi cincin aromatik, diikuti oleh pemecahan senyawa secara sistematis membentuk produk karbon dioksida dan air. Biodegradasi hidrokarbon secara aerobik merupakan proses degradasi oleh mikroorganisme dengan cara memotong rantai hidrokarbon tersebut menjadi lebih pendek dengan melibatkan berbagai enzim. Degradasi pada senyawa hidrokarbon dapat dimediasi oleh sistem enzim yang spesifik. Sistem enzim tersebut dikode oleh kromosom atau plasmid, tergantung pada jenis bakterinya. Dua hal yang mendasari kecepatan degradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme, yaitu adanya proses transport alkana dan aromatik melalui sel dan adanya aktivitas enzim metabolik untuk proses oksidasi alkana dan aromatik (Mishra dan Singh, 2012).

Kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon dipengaruhi oleh adanya enzim katabolik yang mampu memecah senyawa hidrokarbon menjadi senyawa metabolit yang mampu masuk ke dalam siklus asam sitrat. Enzim katabolik yang paling berperan penting dalam proses katabolisme hidrokarbon yang masuk ke dalam sel bakteri adalah enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi hidrokarbon tahap pertama. Tahap pertama katabolisme alkana dan aromatik oleh bakteri masing-masing diinisiasi oleh enzim alkana hidroksilase dan aromatik dioksigenase. Alkana hidroksilase merupakan enzim kunci dalam degradasi alkana (Jauhari *et al.*, 2014).

Metabolisme hidrokarbon dalam mikroorganisme secara aerobik berkaitan dengan enzim oksigenase yang membutuhkan oksigen untuk mengkatalisis reaksi enzimatik. Enzim yang terlibat dalam metabolisme hidrokarbon oleh mikroorganisme, di antaranya adalah kelompok enzim oksigenase yang mampu mendegradasi alkana ( $C_1-C_8$ ) dan alkana ( $C_{10}-C_{30}$ ) (Jahangeer dan Kumar, 2013). Keberadaan enzim memungkinkan sel bakteri dapat mengurai hidrokarbon menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon. Masuknya senyawa hidrokarbon alifatik dan aromatik ke dalam sel bakteri juga dapat dicapai dengan meningkatkan bioavailabilitas senyawa melalui proses solubilisasi dan emulsifikasi.

Biosurfaktan yang diproduksi oleh mikroba mampu meningkatkan masuknya molekul hidrokarbon ke dalam sel melalui proses pseudosolubilisasi dengan cara menurunkan tegangan permukaan sehingga tetesan hidrokarbon akan membentuk kompleks dengan daerah hidrofobik pada dinding sel (Mishra dan Singh, 2012).

Aktivitas enzim alkana hidroksilase dan aromatik dioksigenase yang diisolasi dari beberapa spesies bakteri dalam mendegradasi substrat hidrokarbon telah berhasil dilaporkan. Aktivitas alkana hidroksilase dari *Rhodococcus* sp. NJ2, *Pseudomonas aeruginosa* PSA5, dan *Ochrobactrum intermedium* P2 yang diisolasi dari petroleum sludge dalam mendegradasi heksadekana (C<sub>16</sub>) masing-masing mencapai 185 µmol/mg, 89,83 µmol/mg, dan 186 µmol/mg protein (Mishra dan Singh, 2012). Aktivitas naftalen dioksigenase dari *Pseudomonas putida* AL21, *Pseudomonas putida* NL21 dan *Pseudomonas putida* NL26 dalam mendegradasi naftalen masing-masing sebesar 31,36 U/mg protein, 67,90 U/mg protein dan 73,44 U/mg protein (Titok *et al.*, 2011). Aktivitas naftalen dioksigenase dari *Pseudomonas* sp. NC1B9816 dalam mendegradasi naftalen sebesar 0,339 µmol/menit/mg protein (Shamsuzzaman *et al.*, 1974). Aktivitas toluena dioksigenase dari *Bacillus* sp. UKMP-7T dan *Bacillus cereus* UKMP-6G dalam mendegradasi toluena masing-masing sebesar 0,166 U/mL dan 0,260 U/mL (Hamzah, A *et al.*, 2011). Aktivitas enzim alkana hidroksilase dan aromatik oksigenase dari spesies bakteri lain perlu diteliti untuk mengetahui keanekaragaman aktivitas enzimatis bakteri hidrokarbonoklastik lainnya.

Berbagai spesies bakteri hidrokarbonoklastik telah berhasil diisolasi dari tempat yang terkontaminasi oleh hidrokarbon, namun karakteristik gen yang menyandi enzim pendegradasi hidrokarbon masih belum banyak diteliti. Gen katabolik penyandi enzim yang berperan dalam tahap pertama degradasi hidrokarbon, yaitu enzim alkana hidroksilase (*alk*), naftalen dioksigenase (*ndo*), dan toluen dioksigenase (*tod*) diisolasi dari bakteri dapat diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik. Fragmen gen *alkB* yang menyandi alkana hidroksilase untuk substrat heksadekan berhasil diamplifikasi dari *Stenotrophomonas* dan



*Teskumurella* yang diisolasi dari limbah minyak yang terkontaminasi hidrokarbon di Iran (Tehran) dengan ukuran 330 bp (Tebyanian *et al.*, 2013).

*Bacillus subtilis* 3KP mampu hidup pada air yang tercemar minyak bumi sehingga diperkirakan mampu menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon untuk proses metabolisme dengan bantuan enzim-enzim katabolik. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Nastiti (2015), diketahui bahwa *Bacillus subtilis* 3KP yang telah diisolasi dari Kali Donan Cilacap, Jawa tengah mampu tumbuh dan berkembangbiak dengan menggunakan substrat *naftalene* dan *fenantrene* sebagai sumber karbon, *Bacillus subtilis* 3KP mampu mendegradasi naftalen dan fenantren. Hasil pengukuran aktivitas emulsifikasi menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* 3KP mampu melepaskan biosurfaktan dengan aktivitas tertinggi pada penambahan substrat naftalen dan fenantren. Mekanisme yang dikembangkan mikroba dalam menggunakan substrat tidak larut dalam air adalah dengan memproduksi biosurfaktan ekstraseluler yang mengubah hidrofobisitas dinding sel sebagai bentuk adaptasi sel terhadap substrat.

*Bacillus subtilis* 3KP mampu beradaptasi dan menggunakan substrat hidrokarbon alifatik dan aromatik sebagai sumber karbon (Ni'matuzahroh *et al.*, 2009). Fase pertumbuhannya, *Bacillus subtilis* 3KP menggunakan substrat untuk tumbuh dan dibuktikan dengan berkurangnya konsentrasi substrat yang dapat mentransformasi substrat menjadi lebih sederhana serta jumlah sel yang meningkat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Nastiti (2015) hasil *screening* senyawa intermediet menunjukkan bahwa terjadi proses oksidasi substrat hidrokarbon menjadi senyawa yang lebih sederhana dan penggunaan substrat oleh *Bacillus subtilis* 3KP, sehingga diduga terdapat peran enzim katabolik yaitu alkana hidroksilase dan dioksigenase dalam proses degradasi hidrokarbon oleh *Bacillus subtilis* 3KP sehingga *Bacillus subtilis* 3KP memiliki gen katabolik penyandi enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase yang berperan dalam proses metabolisme.

Uraian latar belakang di atas menunjukkan perlu dilakukannya penelitian deteksi gen dan enzim katabolik yaitu enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase

yang berperan dalam proses metabolisme. Gen katabolik diamplifikasi menggunakan metode PCR dengan primer spesifik serta perlu dilakukan uji aktivitas enzim alkana hidroksilase, naftalen dioksigenase dan toluen dioksigenase. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai gen dan enzim yang berperan dalam proses biodegradasi hidrokarbon dari bakteri hidrokarbonoklastik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, dapat dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut.

1. Berapa ukuran gen penyandi enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase dari bakteri *Bacillus subtilis* 3KP?
2. Berapa aktivitas enzim alkana hidroksilase terhadap substrat hidrokarbon alifatik dari bakteri *Bacillus subtilis* 3KP?
3. Berapa aktivitas enzim dioksigenase terhadap substrat hidrokarbon aromatik dari bakteri *Bacillus subtilis* 3KP?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Melakukan amplifikasi gen penyandi enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase pada *Bacillus subtilis* 3KP.
2. Menentukan aktivitas enzim alkana hidroksilase terhadap substrat hidrokarbon alifatik dari bakteri *Bacillus subtilis* 3KP.
3. Menentukan aktivitas enzim dioksigenase terhadap substrat hidrokarbon aromatik dari bakteri *Bacillus subtilis* 3KP.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini memberikan informasi mengenai gen-gen penyandi enzim pendegradasi hidrokarbon dan enzim-enzim dari bakteri *Bacillus subtilis* 3KP yang berperan dalam proses degradasi hidrokarbon.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Bakteri Hidrokarbonoklastik**

Bakteri dalam aktivitas hidupnya memerlukan unsur karbon sebagai salah satu sumber nutrisi dan energi untuk melakukan metabolisme dan perkembangbiakan. Secara khusus, kelompok mikroba yang mampu menggunakan sumber karbon disebut dengan bakteri hidrokarbonoklastik. Lumpur minyak yang sebagian besar komponennya dibangun oleh senyawa hidrokarbon dan sebagian kecil oleh senyawa non hidrokarbon merupakan substrat yang baik bagi pertumbuhan mikroba tertentu. Senyawa hidrokarbon dapat digunakan sebagai sumber karbon oleh beberapa jenis mikroba tertentu, sedangkan senyawa non hidrokarbon merupakan nutrisi pelengkap yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya (Sheppard, 2013).

Karakteristik bakteri hidrokarbonoklastik adalah kemampuannya dalam mengekspresikan enzim monooksigenase dan dioksigenase, sehingga bakteri ini mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon. Setiap bakteri memiliki kemampuan spesifik dalam mendegradasi senyawa yang terkandung dalam minyak mentah. Bakteri tersebut memiliki kemampuan memproduksi enzim-enzim tertentu yang dapat dimanfaatkan untuk proses degradasi. Kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon alifatik maupun aromatik melibatkan beberapa gen. Gen-gen ini berperan dalam memproduksi enzim yang dapat dimanfaatkan untuk proses degradasi. Sintesis enzim-enzim pendegradasi hidrokarbon tersebut dikode oleh gen yang terletak di kromosom atau plasmid bakteri (Mukherjee *et al.*, 2012; Malatova, 2015).

Kelompok mikroba yang umum digunakan dalam degradasi hidrokarbon adalah bakteri, karena dapat menggunakan hidrokarbon minyak bumi sebagai sumber karbon dan energi sehingga bakteri dapat tumbuh serta dapat menghasilkan biosurfaktan dan emulsifier (Harayama *et al.*, 1999). Bakteri hidrokarbonoklastik

diantaranya adalah *Mycobacterium sp*, *Corynebacterium sp*, *Aeromonas sp*, *Rhodococcus sp* dan *Bacillus sp* (Romo *et al.*, 2013).

## 2.2 Biodegradasi Hidrokarbon

Biodegradasi adalah cara alami untuk daur ulang limbah atau bahan organik menjadi nutrisi yang dapat digunakan kembali oleh organisme lain yang dilakukan oleh bakteri atau jamur. Salah satu proses yang dilakukan oleh bakteri untuk mengubah bahan kimia beracun yang berbahaya ke dalam zat yang kurang beracun, yaitu bahan organik yang rusak dirubah menjadi senyawa yang lebih kecil oleh organisme mikroba. Organisme mikroba mengubah substansi melalui proses metabolisme atau enzimatik. Polutan organik dalam pertumbuhannya pada bakteri digunakan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Keanekaragaman katabolik yang dimiliki oleh mikroba dapat menurunkan, mengubah atau menumpuk sejumlah besar senyawa hidrokarbon menjadi produk akhir karbon dioksida dan air. Proses biodegradasi ini lebih baik dari proses kimia atau fisika, karena proses ini langsung mendegradasi kontaminan tidak hanya merubah senyawa dari satu bentuk ke bentuk yang lain, tetapi melibatkan jalur degradasi metabolik dan proses yang ekonomis (Joutey *et al.*, 2013).

## 2.3 Metabolisme Bakteri

Hasil degradasi hidrokarbon akan masuk jalur metabolisme bakteri untuk kelangsungan hidup dan pertumbuhan karena bakteri dapat memanfaatkan substrat. Metabolisme ialah semua reaksi kimia yang dilakukan oleh sel yang menghasilkan energi dan menggunakan energi untuk sintesis komponen-komponen sel serta untuk kegiatan-kegiatan selular, seperti pergerakan. Metabolisme bakteri merupakan semua reaksi biokimia yang terjadi pada sel bakteri, termasuk anabolisme dan katabolisme yang dikatalisis oleh enzim metabolik. Reaksi kimia yang membebaskan energi melalui perombakan nutrisi disebut reaksi disimilasi atau peruraian yang merupakan kegiatan katabolik sel, sedangkan reaksi kimia yang menggunakan energi untuk

sintesis dan fungsi-fungsi sel lainnya disebut reaksi asimilasi atau anabolik. Jadi, reaksi disimilasi menghasilkan energi, dan reaksi asimilasi menggunakan energi. Proses katabolisme menghasilkan energi dalam bentuk ATP. Mikroorganisme, terutama bakteri menghasilkan energi melalui pemindahan elektron, yang dibagi dalam tiga kategori, yaitu produksi energi secara anaerob, produksi energi secara aerob, dan produksi energi secara fotosintetik. Berdasarkan sumber yang digunakan, bakteri dapat dibagi menjadi dua kelas, yaitu heterotrof dan autotrof. Organisme heterotrof adalah kelompok bakteri yang menggunakan molekul organik sebagai sumber energi dan disebut dengan kemoorganotrof. Organisme autotrof adalah kelompok bakteri yang menggunakan komponen anorganik sebagai sumber energi (Dinata, 2011).

Bakteri *Bacillus subtilis* 3KP merupakan bakteri heterotrof yang dalam aktivitas hidupnya memerlukan unsur karbon sebagai salah satu sumber nutrisi dan energi untuk melakukan metabolisme dan perkembangbiakan. Energi ATP yang dihasilkan oleh bakteri dalam proses katabolisme digunakan melalui berbagai macam cara, seperti biosintesis struktur sel, sintesis enzim dan zat-zat kimia lainnya. Pemeliharaan keutuhan sel secara fisik dan kimia, dan perbaikan kerusakan sel. ATP juga digunakan untuk proses pergerakan, produksi panas, serta untuk proses-proses metabolik yang tidak berkaitan dengan biosintesis bahan sel.

Produksi energi oleh bakteri melalui proses aerob dikenal juga dengan sistem sitokrom atau rantai respirasi, yaitu serangkaian reaksi oksidasi-reduksi untuk pembentukan ATP. Fungsi rangkaian ini adalah menerima elektron dari senyawa-senyawa tereduksi dan memindahkannya ke oksigen sehingga terbentuk air. Pada beberapa langkah dalam rantai ini, dibebaskan energi cukup besar untuk pembentukan ATP dari ADP dan fosfat anorganik. Sintesis ATP ini disebut fosforilasi oksidatif karena terbentuk ikatan fosfat berenergi tinggi. Atom-atom hidrogen (elektron dan proton,  $H^+$ ) yang hilang dari substansi organik dengan cara oksidasi dipindahkan oleh dehidrogenase yang mengandung NAD dan NADP dan sitokrom-sitokrom yang mengandung besi pada oksigen molekuler sehingga

terbentuk air. Selain rantai transport elektron, bakteri dapat melakukan produksi energi dengan siklus asam trikarboksilat. Siklus ini disingkat dengan TCA, yaitu *tricarboxylic acid* merupakan serangkaian reaksi yang membangkitkan energi dalam bentuk ATP dan molekul-molekul koenzim tereduksi ( $\text{NADH}_2$  dan  $\text{FADH}_2$ ). Banyak zat antara dalam siklus ini merupakan prekursor dalam biosintesis asam amino, purin dan piridin. Siklus TCA merupakan siklus amfibolik, yang berarti bahwa siklus ini tidak hanya berfungsi dalam reaksi katabolik, tetapi juga dalam reaksi anabolik.

Kegiatan metabolisme yang dilakukan sel sangat kompleks karena begitu banyaknya bahan yang digunakan sebagai nutrisi dan beragamnya substansi yang harus disintesis menjadi komponen sel. Kegiatan sel tersebut dapat terjadi karena adanya enzim yang mampu menyebabkan perubahan-perubahan yang terjadi di dalam sel. Semua kegiatan tersebut harus terkoordinasi dengan baik sehingga terbentuk dan tersedia produk-produk yang sesuai, sehingga diperlukan adanya regulasi metabolisme di dalam sel. Regulasi metabolisme sel umumnya terjadi dengan dua cara, yaitu regulasi pembentukan enzim dan regulasi aktivitas enzim.

Regulasi pembentukan enzim melibatkan tahap induksi enzim yaitu tahap pengaturan pembentukan enzim katabolik dan tahap respirasi enzim yaitu tahap pengaturan pembentukan enzim anabolik. Suatu organisme untuk mensintesis enzim yang spesifik, suatu mikroorganisme harus mempunyai gen struktural pada kromosomnya. Gen struktural menentukan struktur enzim dalam hal urutan asam aminonya. Laju sintesis enzim tersebut tidak dikendalikan oleh gen-gen struktural melainkan diarahkan oleh gen-gen pengatur, gen-gen struktural yang menentukan biosintesis enzim suatu metabolik tertentu ditempatkan menurut urutan yang pasti. Urutan reaksi pada lintasan metabolik disandi oleh kromosom. Sekelompok gen yang berurutan semacam itu sehingga membentuk suatu unit operasional dinamakan operon (Dinata, 2011).

#### **2.4 Mekanisme Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi oleh Bakteri**

Degradasi hidrokarbon minyak bumi oleh bakteri terjadi dalam kondisi aerob. Mekanisme degradasi hidrokarbon minyak bumi oleh bakteri secara umum diawali dengan bakteri mendegradasi hidrokarbon secara langsung melalui proses adhesi yang diikuti dengan penggunaan senyawa secara langsung dari antarmuka minyak-air, sehingga hidrofobisitas sel bakteri merupakan faktor penting dalam menginisiasi adhesi bakteri pada antar muka minyak-air. Kontak langsung antara sel bakteri dengan hidrokarbon target dapat meningkatkan laju difusi hidrokarbon ke dalam sel, sehingga dapat memacu pertumbuhan bakteri (Mishra dan Singh, 2012).

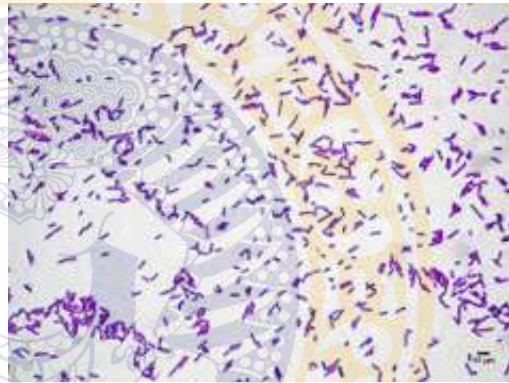
Mekanisme yang terlibat dalam penggunaan substrat hidrokarbon yang bersifat lipofilik yaitu melalui pelekatan sel bakteri pada droplet hidrokarbon dan produksi biosurfaktan. Proses biodegradasi akan terjadi jika substrat terlarut dalam fasa air, namun sebagian besar hidrokarbon bersifat hidrofobik sehingga tidak bisa larut dalam air dan terpartisi dalam fase air. Beberapa jenis bakteri memiliki kemampuan untuk mendegradasi hidrokarbon secara langsung melalui proses perlekatan yang diikuti dengan penggunaan senyawa secara langsung (Tonkova dan Gesheva, 2003).

Peningkatan jumlah molekul hidrokarbon alifatik maupun aromatik yang mampu masuk ke dalam sel bakteri juga dapat dicapai dengan cara meningkatkan kelarutan senyawa melalui proses solubilisasi dan emulsifikasi. Biosurfaktan atau bioemulsifier ekstrasellular yang diproduksi oleh mikroba mampu meningkatkan masuknya molekul hidrokarbon ke dalam sel melalui proses pseudosolubilisasi dan meningkatkan area antar muka dengan cara menurunkan tegangan permukaan untuk proses transfer massa, dimana tetesan hidrokarbon akan membentuk kompleks dengan daerah hidrofobik pada dinding sel (Mishra dan Singh, 2012).

## 2.5 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* merupakan bakteri berbentuk batang dengan ukuran 0,7-0,8 x 2,0-3,0  $\mu\text{m}$ , ada yang berantai dan ada juga yang tidak berantai, tidak berkapsul, motil, termasuk bakteri Gram positif, memproduksi endospora berbentuk silinder, elips, atau bulat, dan terletak di tengah. *Bacillus subtilis* pada media agar, berwarna putih kekuningan, kasar, dan menyebar (Dinata, 2011). Habitat asli *Bacillus subtilis* di tanah, air, maupun lingkungan akuatik. *Bacillus subtilis* dimasukkan ke dalam kelompok bakteri batang dan kokus pembentuk endospora dengan klasifikasi dan karakterisasi sebagai berikut.

Filum : Firmicutes  
 Kelas : Bacilli  
 Ordo : Bacillales  
 Famili : Bacillaceae  
 Genus : *Bacillus*  
 Spesies : *Bacillus subtilis*



(Dinata, 2011).

Gambar 2.1 Sel *Bacillus subtilis* (Cartwright, 2009)

*Bacillus subtilis* diketahui memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa hidrokarbon. *Bacillus subtilis* mampu mendegradasi toluen 20 mg/L serta dapat tumbuh pada substrat toluena sampai konsentrasi 1 mM pada kondisi suhu inkubasi 34-36°C dan waktu inkubasi 3 hari (Hamzah *et al.*, 2011).

*Bacillus subtilis* 3KP merupakan isolat yang diisolasi dari Kali Donan Cilacap, Jawa tengah oleh Ni'matuzahroh *et al.* (2009) mampu hidup pada air yang tercemar minyak bumi sehingga dapat menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon dalam proses metabolisme. *Bacillus subtilis* 3KP mampu tumbuh dan berkembangbiak dengan menggunakan substrat naftalen dan fenantren sebagai sumber karbon, *Bacillus subtilis* 3KP mampu mendegradasi naftalen dan fenantren. Hasil pengukuran aktivitas emulsifikasi menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* 3KP



mampu melepaskan biosurfaktan dengan aktivitas tertinggi pada penambahan substrat naftalen dan fenantren.

## 2.6 Enzim Oksigenase

Enzim adalah senyawa organik yang dihasilkan oleh sel-sel hidup. Inilah sebabnya enzim disebut katalis hayati atau sarana katalitik. Katalis juga menampakkan spesifisitas atau kekhususan. Artinya, suatu katalis tertentu akan berfungsi pada hanya satu jenis reaksi tertentu saja. Sekalipun semua enzim pada mulanya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekskresikan melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Dikenal dua tipe enzim yaitu enzim ekstraselular atau eksoenzim (berfungsi di luar sel) dan enzim intraselular atau endoenzim (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama eksoenzim ialah melangsungkan perubahan-perubahan pada nutrien di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel. Enzim intraselular berfungsi mensintesis bahan selular dan menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel (Pelczar, 1986).

Tahap pertama dalam mekanisme degradasi alkana oleh bakteri dalam kondisi aerob adalah oksidasi alkana oleh kelas enzim oksigenase (enzim yang mengkatalisis inkorporasi oksigen ke dalam substrat) yaitu enzim alkana hidroksilase yang mengkatalisis adisi gugus hidroksil dengan cara menyerang atom O melalui proses oksidasi saat reaksi hidroksilasi alkana berlangsung. Oksigenase adalah enzim yang keberadaannya ada di alam dan memainkan peran penting dalam metabolisme berbagai senyawa. Oksigenase adalah kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi fiksasi oksigen. Enzim ini berperan penting dalam kedua reaksi katabolik dan proses biosintesis serta degradasi pada banyak metabolit yang umumnya melibatkan senyawa hidrokarbon aromatik. Secara umum, senyawa yang kaya oksigen seperti karbohidrat, merupakan substrat yang tidak menguntungkan untuk oksigenase, karena senyawa ini mempunyai group yang mengandung oksigen, seperti hidroksil, karbonil, atau formil dan tidak membutuhkan oksigen lanjut. Di samping itu, lemak dan senyawa aromatik sering dimetabolisme dengan oksigenase, karena senyawa ini

umumnya kekurangan oksigen dan perlu oksigen agar mempunyai aktivitas biologis dan lebih larut dalam air. Enzim oksigenase ini menggunakan molekul oksigen sebagai akseptor elektron dan membentuk hidrogen peroksida sebagai produk, dalam metabolisme aerobik pada substrat aromatik, oksigenase menggunakan molekul oksigen untuk hidroksilat dan akhirnya membelah cincin aromatik (Hayaishi dan Nozaki, 1969).

Enzim oksidatif memiliki peran dalam metabolisme primer atau sekunder. Beberapa bakteri mampu menggunakan hidrokarbon aromatik sebagai sumber karbon tunggal mereka (metabolit primer) melalui aktivitas monooksigenase atau dioksigenase, sedangkan yang lain menghasilkan enzim oksidatif yang lebih jelas terlibat dalam produksi metabolit sekunder (Burton, 2013). Dua subkelas dari oksigenase dapat diklasifikasikan yaitu monooksigenase dan dioksigenase.

### **2.6.1 Enzim Alkana Hidroksilase**

Enzim alkana hidroksilase merupakan contoh enzim intraselular yang memiliki kemampuan untuk mengoksidasi berbagai jenis substrat dan mengkatalisis berbagai jenis reaksi. Enzim alkana hidroksilase mengkatalisis pengenalan satu atom oksigen ke dalam molekul substrat, umumnya memanfaatkan NADH atau NADPH untuk menyediakan potensial reduksi untuk memasok elektron pada substrat. Enzim alkana hidroksilase sering disebut juga *cytochrome* P450 yang berperan penting dalam sistem metabolik, karena enzim ini terlibat dalam pengaturan senyawa endogen seperti hormon, asam lemak dan steroid. Selain itu, enzim ini juga terlibat dalam reaksi katabolisme dan anabolisme senyawa racun (xenobiotik) seperti limbah, serta terlibat pula dalam reaksi bioaktivasi maupun detoksifikasi. Enzim sitokrom P450 monooksigenase merupakan protein dengan gugus heme dan bekerja mengkatalisis reaksi oksidasi hidrokarbon menggunakan NADPH sebagai kofaktor. Monooksigenase ditemukan di hampir semua organisme aerobik, termasuk organisme yang beragam seperti serangga, tanaman, mamalia, burung dan bakteri. Pada eukariot, kebanyakan *cytochrome* P450 ditemukan di retikulum endoplasma atau mitokondria.

*cytochrome* P450 di mitokondria menggunakan sistem transport elektron yang berbeda dari *cytochrome* P450 pada retikulum endoplasma dan lebih erat terkait dengan *cytochrome* P450 prokariot daripada *cytochrome* P450 eukariot. Monooksigenase tidak biasa mengoksidasi substrat yang beragam dan mampu mengkatalisis reaksi dalam jumlah besar karena masing-masing spesies mengandung banyak *cytochrome* P450 dan kekhususan substrat dari beberapa isoform (Scoot, 2008).

Enzim alkana hidroksilase merupakan enzim yang paling banyak ditemukan pada bakteri pendegradasi alkana dan dikode oleh gen *alk*. Enzim ini mengkatalisis oksidasi hidrokarbon dengan rantai C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>. Beberapa bakteri memiliki kemampuan untuk mengkatalisis oksidasi alkana rantai C panjang (> C<sub>20</sub>). Enzim yang berperan dalam kemampuan tersebut adalah enzim AlkM (Rojo., 2009).

Enzim AlkM mampu mengkatalisis reaksi oksidasi rantai C<sub>13</sub>-C<sub>30</sub> dan merupakan protein integral membran Fe non-heme. Enzim ini membutuhkan NADH sebagai koenzim. Enzim family AlkB memiliki dua komponen, yaitu rubredoksin (AlkG) dan rubredoksin reduktase (AlkT), serta membutuhkan kofaktor berupa Fe. Komponen hidroksilase adalah protein integral membrane sitoplasmik, sedangkan komponen rubredoksin dan rubredoksin reduktase merupakan protein sitoplasma. Kompleks enzimatik mampu mengoksidasi alkana linier rantai medium dengan adanya koenzim NADH atau NADPH (Rojo, 2009).

### 2.6.2 Enzim Dioksigenase

Enzim dioksigenase berfungsi mengkatalisis penyatuan oksigen ke dalam molekul substrat. Enzim dioksigenase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi adisi gugus hidroksil melalui inkorporasi kedua atom O pada O<sub>2</sub> melalui proses oksidasi saat reaksi hidroksilasi poliaromatik berlangsung. Enzim ini memiliki peran dalam degradasi asam amino, dioksigenase juga digunakan dalam pemutusan karbon-karbon, umumnya memanfaatkan NADH atau NADPH untuk menyediakan potensial reduksi untuk memasok elektron pada substrat. Reaksi pada oksigenase termasuk cis-

dihidroksilasi, pembelahan cincin aromatik, seperti katekol dioksigenase yang menggabungkan kedua atom sebagai kelompok hidroksil pada karbon yang berdekatan dari cincin aromatik, menghasilkan cis-dihidrodiol yang dapat teroksidasi lebih lanjut menjadi produk cincin aromatik yang terbuka (Burton, 2013).

## 2.7 Gen Penyandi Enzim Alkana Hidroksilase dan Dioksigenase

Bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon dan memanfaatkan hidrokarbon sebagai sumber karbon pasti memiliki gen-gen katabolik penyandi enzim hidrokarbon alifatik maupun aromatik dalam proses metabolisme bakteri. Gen-gen katabolik penyandi enzim pendegradasi hidrokarbon yang telah berhasil diamplifikasi dari bakteri antara lain gen *alk*, *tod*, *ndo*, *xyl* berturut-turut menyandi enzim alkana hidroksilase, toluen dioksigenase, naftalen dioksigenase dan katekol dioksigenase (Tebyanian *et al.*, 2013; Hamzah *et al.*, 2011; Titok *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). Alkana hidroksilase untuk rantai C panjang  $C_{>12}$  dikode oleh gen *alkM*. Gen *alkM* terdiri dari 3 komponen enzim yaitu alkana hidroksilase (*alkM*), rubredoksin (*rubA*), dan rubredoksin reduktase (*rubB*). Alkana hidroksilase untuk rantai C medium  $C_5$ - $C_{12}$  dikode oleh *alkB*. Gen *alkB* terdiri dari 3 komponen enzim yaitu alkana hidroksilase (*alkB*), rubredoksin (*alkG*), dan rubredoksin reduktase (*alkT*) (Van Beilen *et al.*, 2003).

## BAB III

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual

Lumpur minyak bumi (*oil sludge*) merupakan hasil samping atau limbah yang terdapat pada kegiatan pemurnian minyak bumi maupun pada kegiatan penampungan bahan bakar minyak bumi. *Oil sludge* mengandung bahan pencemar berbahaya seperti hidrokarbon alifatik, monoaromatik dan poliaromatik. Salah satu contoh hidrokarbon alifatik adalah heksadekana, hidrokarbon monoaromatik adalah toluena dan hidrokarbon poliaromatik adalah naftalena. Toluena dan naftalena merupakan salah satu jenis hidrokarbon aromatik yang penyebarannya luas di lingkungan dan bersifat toksik bagi manusia maupun hewan, maka perlu adanya pengurangan senyawa ini salah satu yang dilakukan dengan cara mikrobiologis, yaitu melalui biodegradasi oleh bakteri.

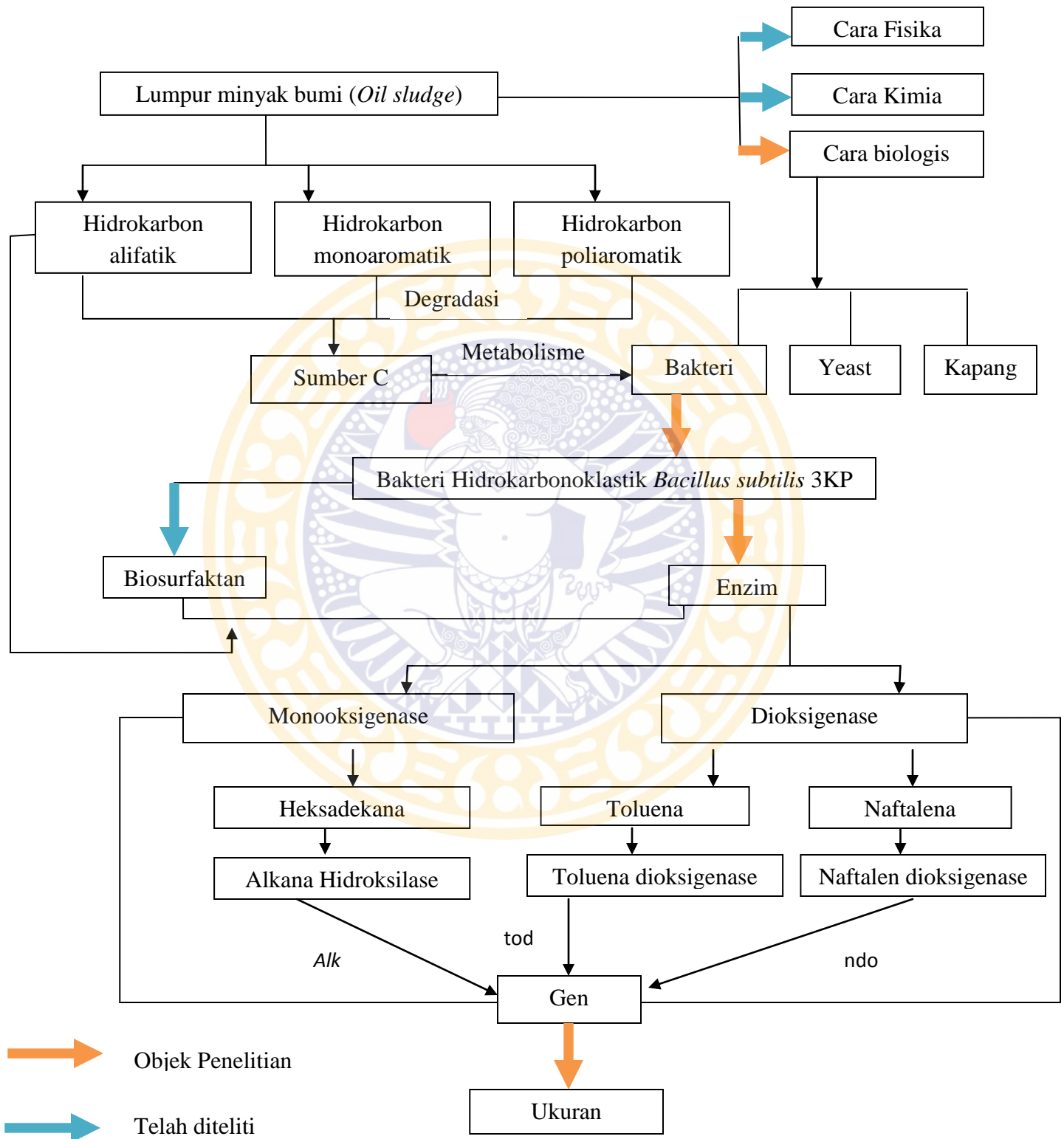
Terdapat beberapa cara yang telah dilakukan untuk pembersihan *Oil sludge* yaitu dengan cara fisika, kimia dan biologi. Pengolahan secara fisika dilakukan untuk pengolahan awal yaitu dengan cara melokalisasi tumpahan minyak menggunakan pelampung pembatas (*oil booms*), yang kemudian akan ditransfer dengan perangkat pemompa (*oil skimmers*) ke sebuah *reservoir* baik dalam bentuk tangki maupun balon dan dilanjutkan dengan pengolahan secara kimia, namun cara ini membutuhkan biaya yang mahal dan dapat menimbulkan pencemar baru. Pengolahan limbah minyak bumi secara biologis merupakan alternatif yang efektif dari segi biaya dan aman bagi lingkungan. Pengolahan dengan metode biologis disebut juga biodegradasi, yaitu bioteknologi yang memanfaatkan makhluk hidup khususnya mikroorganisme sebagai upaya pembersihan *oil sludge* (Nugroho, 2006).

Mikroorganisme, terutama bakteri *Bacillus subtilis* 3KP yang mampu mendegradasi senyawa yang terdapat di dalam hidrokarbon minyak bumi disebut dengan bakteri hidrokarbonoklastik. Bakteri ini mampu mendegradasi senyawa

hidrokarbon dengan memanfaatkan senyawa tersebut sebagai sumber karbon dan energi yang diperlukan bagi pertumbuhannya serta untuk proses metabolismenya. Mekanisme degradasi *oil sludge* oleh bakteri *Bacillus subtilis* 3KP adalah melalui sekresi biosurfaktan dan enzim-enzim ekstraselular yang mempermudah masuknya komponen hidrokarbon dari *oil sludge* ke dalam sel bakteri. Komponen *oil sludge* yang telah masuk ke dalam sel kemudian dimetabolisme oleh enzim-enzim katabolik yaitu alkana hidroksilase dan dioksigenase menghasilkan bioproduk seperti asam lemak dan asetil koA yang masuk siklus asam sitrat yang berfungsi sebagai sumber karbon. Enzim-enzim katabolik yang terlibat dalam metabolisme hidrokarbon pada *oil sludge* disandi oleh gen-gen penyandi enzim katabolik. Gen ini dapat diangkat dengan proses amplifikasi menggunakan metode PCR sehingga dapat diketahui ukuran gennya dan uji aktivitas enzim alkana hidroksilase, naftalen dioksigenase dan toluen dioksigenase.

### 3.2. Hipotesis penelitian

1. Gen penyandi enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase dapat diamplifikasi dari isolat bakteri *Bacillus subtilis* 3KP.
2. *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas enzim alkana hidroksilase terhadap substrat hidrokarbon berupa heksadekana.
3. *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas enzim dioksigenase terhadap substrat hidrokarbon berupa toluena, dan naftalena.



**Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian**

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember sampai juli 2016 di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Departemen kimia dan Laboratorium Genetika Molekuler Fakultas sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

#### **4.2 Sampel, Alat, dan Bahan Penelitian**

##### **4.2.1 Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri hidrokarbonoklastik yaitu bakteri *Bacillus subtilis* 3KP koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon yang diisolasi dari Kali Donan Cilacap, Jawa tengah.

##### **4.2.2 Alat penelitian**

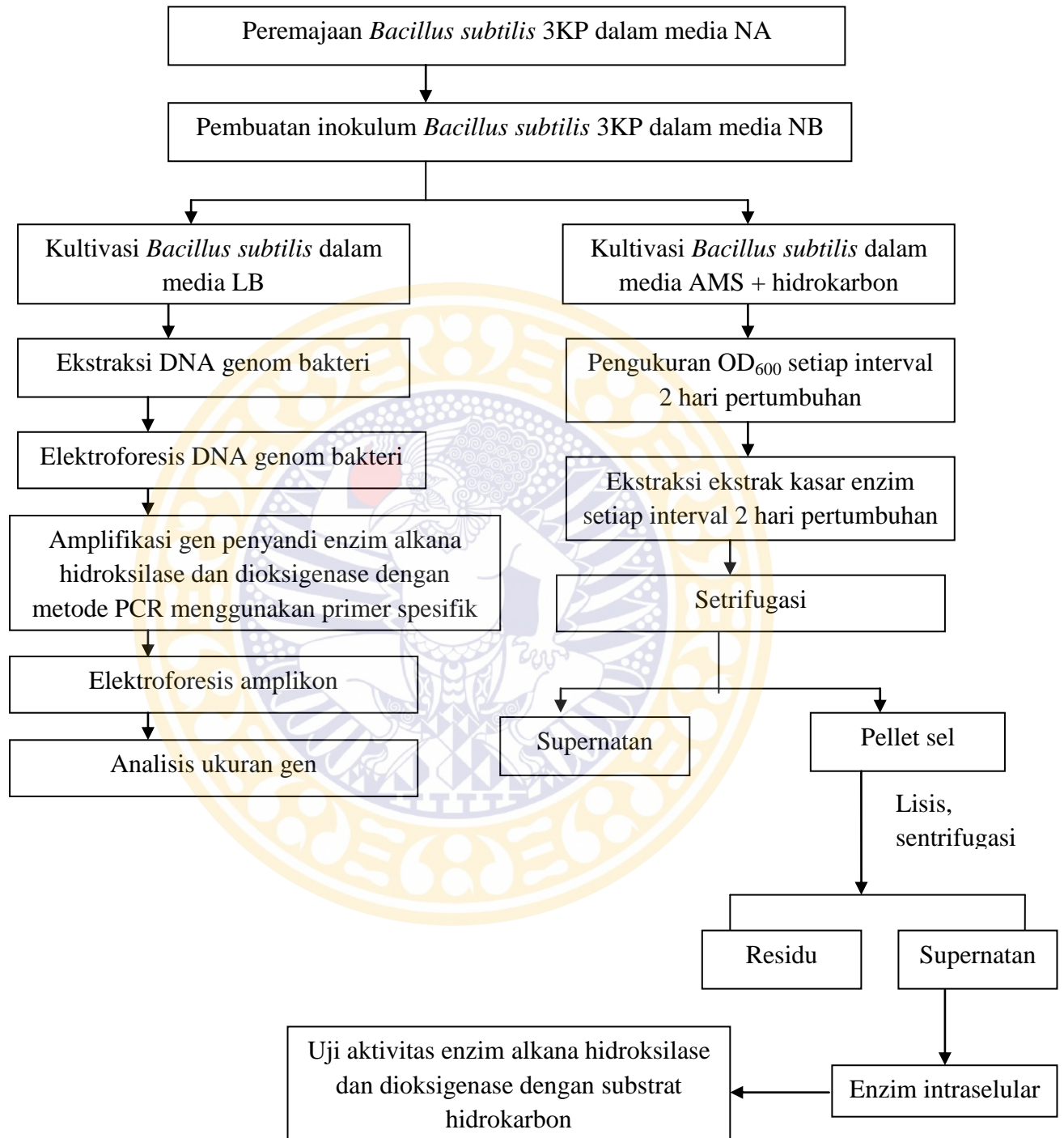
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium kimia, tabung eppendof, seperangkat elektroforesis, mesin PCR, UV-transluminator, spektrofotometri UV-VIS, sonikator, nanodrop, sentrifuse, neraca analitik, pipet mikro, inkubator, pH meter, *autoclave*, *laminar air flow cabinet*, *shaker incubator*, lemari pendingin, *waterbath*, *hot plate*, *thermocycler*, dan jarum ose.

##### **4.2.3 Bahan penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Nutrient Agar* (NA), media Air Mineral Sintetik (AMS), seperangkat bahan-bahan pada kit untuk isolasi DNA, agarose, buffer TAE 1%, DNA genom, primer, master mix, air distilasi, buffer Tris-HCl, heksadekana, toluena, naftalena, NADH, DNA marker, *loading dye*, akuades, akuabides, EtBr, BSA, Coomassie Brilliant Blue G 250, etanol 95%, dan asam fosfor.



### 4.3 Diagram Alir Penelitian



Gambar 4.1 Diagram alir penelitian

## **4.4 Prosedur Kerja**

### **4.4.1 Pembuatan media**

#### **4.4.1.1 Pembuatan media *nutrient agar* (NA) untuk peremajaan isolat bakteri**

Media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 2,8 gram dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer lalu dilarutkan ke dalam 100 mL akuades. Kemudian, dipanaskan di atas *hot plate* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Media dituang ke dalam tabung reaksi yang masing-masing diisi dengan 5 mL NA. Tabung reaksi yang berisi NA selanjutnya disumbat dengan kapas dan ditutup dengan aluminium foil. Media yang telah dibuat kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah disterilisasi, media didiamkan pada suhu kamar sampai sediaan membeku pada posisi miring, kemudian disimpan dalam lemari pendingin (Miksusanti dkk., 2011).

#### **4.4.1.2 Pembuatan media *nutrient broth* (NB) untuk inokulum bakteri**

Media *Nutrient Broth* (NB) sebanyak 0,8 gram dilarutkan ke dalam 100 mL akuades. Kemudian, dipanaskan di atas *hot plate* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Media yang telah dibuat kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Miksusanti dkk., 2011).

#### **4.4.1.3 Pembuatan media air mineral sintetik (AMS) untuk kultivasi dan produksi enzim**

Air mineral sintetik (AMS) sebanyak 3,8 gram dilarutkan ke dalam 1 L akuades dan ditambah dengan yeast ekstrak sebanyak 2 gram. Larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Media Air Mineral Sintetik cair yang telah jadi kemudian diambil 47,5 mL. Media yang telah dibuat kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **4.4.1.4 Pembuatan media untuk preparasi DNA *template* dalam proses PCR**

Media Luria Bertani sebanyak 1 L dibuat dengan komposisi: 5 g ekstrak yeast, 10 g tripton atau pepton, dan 10 g NaCl. Semua bahan dilarutkan dalam 900 mL akuades hingga volume total 1 L. Media yang telah jadi lalu disterilisasi

menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 20 menit pada tekanan 1 atm (Kohno *et al.*, 2002).

#### 4.4.2 Peremajaan isolat bakteri

Biakan murni *Bacillus subtilis* 3KP diperbanyak dengan meremajakan dalam media *Nutrient Agar* (NA) miring yang telah disiapkan untuk peremajaan. Sebanyak satu ose bakteri ditanam dengan metode gores (*streak*) pada media NA. Biakan bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh baik digunakan sebagai *stock* bakteri selama penelitian (Ni'matuzahroh, 2010).

#### 4.4.3 Pembuatan inokulum bakteri

Sebanyak dua ose biakan bakteri *Bacillus subtilis* 3KP dari media agar miring NA yang telah berumur 24 jam disuspensikan ke dalam larutan garam fisiologis NaCl 0,85 %. Suspensi bakteri dibuat hingga memiliki kekeruhan OD 0,5 pada  $\lambda = 600$  nm. Suspensi tersebut digunakan sebagai starter pada penelitian (Ni'matuzahroh, 2010).

#### 4.4.4 Kultivasi mikroba dalam media AMS + substrat hidrokarbon

Sebanyak 64 buah botol 100 mL yang berisi 47,5 mL medium Air Mineral Sintetik dan yeast ekstrak lalu dimasukkan inokulum bakteri sebanyak 2,5 mL dengan OD 0,5 pada  $\lambda = 60$  nm dan 200 ppm substrat hidrokarbon heksadekan. Campuran dikultivasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari pada suhu ruang. Botol tanpa penambahan juga diinkubasi dalam kondisi yang sama sebagai kontrol pertumbuhan. Prosedur yang sama dilakukan untuk induser toluen dan naftalen. Kultivasi mikroba digunakan untuk pembuatan kurva pertumbuhan bakteri, produksi enzim dan pengukuran kadar protein (Misha dan Singh, 2012).

#### 4.4.5 Kultivasi mikroba dalam media LB

Sebanyak 2 ose bakteri yang telah ditumbuhkan pada media NA dimasukkan ke dalam botol 100 mL yang berisi 20 mL media LB. Campuran diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada

suhu ruang. Mikroba hasil kultivasi digunakan untuk ekstraksi DNA genom bakteri (Kohno, 2002).

#### **4.4.6 Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri**

Pertumbuhan bakteri selama proses kultivasi berlangsung diukur dengan cara mengeluarkan botol dan diambil sebanyak 4 mL suspensi sel dan OD suspensi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  600 nm. Hal ini dilakukan setiap interval dua hari dan hal yang sama juga dilakukan untuk kontrol. Hasil yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan mikroba dimana sumbu  $x$  adalah waktu inkubasi, sumbu  $y$  adalah nilai OD mikroba. Hal yang sama dilakukan untuk masing-masing isolat dengan substrat yang berbeda.

#### **4.4.7 Uji aktivitas enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase**

##### **4.4.7.1 Pembuatan larutan buffer 20mM Tris-HCl**

Sebanyak 60,57 g Tris dilarutkan dalam 350 mL akuabides dan pH larutan diset hingga pH 7,4 melalui penambahan 32,57 HCl 12 M, kemudian ditambahkan akuabides hingga volume larutan mencapai 500 mL sehingga didapatkan larutan buffer 1 M Tris-HCl sebagai larutan stok. Buffer ini kemudian diencerkan untuk didapatkan buffer Tris-HCl 20 mM.

##### **4.4.7.2 Panen sel**

Sel dipanen dengan cara disentrifuse pada kecepatan 5000 rpm. Supernatan dipisah untuk uji aktivitas enzim ekstraselular, pelet kemudian diresuspensikan dalam 1 mL buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4. Pelet lalu disonikasi menggunakan *ultrasonic disintegrator*, dan disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang telah bebas sel digunakan untuk uji aktivitas enzim intraselular (Urszula *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2014).

##### **4.4.7.3 Uji aktivitas enzim alkana hidroksilase**

Supernatan yang telah bebas sel digunakan untuk uji aktivitas enzim alkana hidroksilase menggunakan *microplate reader*. Campuran reaksi mengandung buffer Tris-HCl 20 mM; NADH 0,1 mM; dan 1% larutan

heksadekana yang dilarutkan dalam DMSO, dan 10  $\mu\text{L}$  *crude* enzim sehingga volume total larutan uji adalah 200  $\mu\text{L}$ . Reaksi dimulai dengan menambahkan 2  $\mu\text{L}$  larutan heksadekana ke dalam campuran reaksi. Aktivitas enzim diukur pada panjang gelombang 340 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan besarnya aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim alkana hidroksilase dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang membutuhkan 1  $\mu\text{mol}$  NADH untuk mengoksidasi substrat (Mishra *et al.*, 2012; Jauhari *et al.*, 2014).

#### 4.4.7.4 Uji aktivitas enzim dioksigenase

Supernatan yang telah bebas sel digunakan untuk uji aktivitas enzim toluen dioksigenase dan naftalen dioksigenase menggunakan *microplate reader*. Campuran reaksi mengandung buffer Tris-HCl 20 mM; NADH 0,1 mM; dan 2  $\mu\text{L}$  larutan toluena atau naftalena (1% toluena atau naftalena dalam 80% DMSO), dan 20  $\mu\text{L}$  enzim sehingga volume total larutan uji adalah 200  $\mu\text{L}$ . Reaksi dimulai dengan menambahkan 2  $\mu\text{L}$  larutan substrat ke dalam campuran reaksi. Campuran kemudian diinkubasi pada waktu inkubasi optimum. Aktivitas enzim diukur pada panjang gelombang 340 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan besarnya aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim toluena dioksigenase atau naftalena dioksigenase dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang membutuhkan 1  $\mu\text{mol}$  NADH untuk mengoksidasi substrat (Singh *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2013).

#### ➤ Analisis data uji aktivitas enzim

Besarnya aktivitas enzim ditentukan dari nilai absorbansi yang didapat setelah pengukuran campuran reaksi enzimatik menggunakan ELISA dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Absorbansi tes absolut} = \text{Absorbansi tes} - \text{Absorbansi blanko}$$

$$\Delta A_{340} = \text{Absorbansi NADH awal} - \text{Absorbansi tes absolut}$$

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{\Delta A_{340} \times V \text{ total reaksi (mL)}}{\epsilon_{340}(\text{mL } \mu\text{mol}^{-1}\text{menit}^{-1}) \times V \text{ enzim (mL)} \times t \text{ (menit)} \times l \text{ (cm)}}$$

#### 4.4.8 Penentuan kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976). Sebanyak 0,1 gram Coomassie Brilliant Blue G 250 dilarutkan dalam 50 mL etanol 95% (v/v), kemudian ditambahkan 100 mL asam fosfor 85%, dan ditambahkan akuabides hingga volume larutan mencapai 250 mL, lalu dihomogenkan dan disaring. Larutan diencerkan 4 kali menggunakan akuabides sebelum digunakan.

Larutan stok bovine serum albumin (BSA) 500 µg/mL dibuat dengan cara melarutkan 0,005 gram BSA dalam 10 mL akuabides. Larutan standar BSA dibuat dengan cara sebanyak 0,2 mL; 0,4 mL; 0,8 mL; 1,2 mL; 1,6 mL; dan 2 mL larutan stok BSA 500 µg/mL masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas volume sehingga didapatkan larutan standar BSA dengan konsentrasi 10 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL; 60 µg/mL; 80 µg/mL; dan 100 µg/mL. Masing-masing variasi konsentrasi larutan standar dipipet sebanyak 0,08 mL kemudian ditambahkan larutan Bradford sebanyak 4 mL, lalu divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit.

Larutan standar BSA dengan variasi konsentrasi 10 µg/mL; 20 µg/mL; 40 µg/mL; 60 µg/mL; 80 µg/mL; dan 100 µg/mL dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 595 nm. Perlakuan diulang sebanyak 2 kali untuk masing-masing variasi konsentrasi. Hasil absorbansi kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi vs absorbansi dengan persamaan garis linier  $y = mx + C$ . Koefisien  $y$  pada persamaan garis menyatakan nilai absorbansi, sedangkan koefisien  $x$  menyatakan besarnya konsentrasi larutan.

Sampel *crude enzyme* sebanyak 0,08 mL kemudian ditambahkan larutan Bradford sebanyak 4 mL, lalu divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Sampel dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm. Blanko menggunakan 0,08 mL akuabides yang ditambahkan larutan Bradford sebanyak 4 mL.

#### 4.4.9 Ekstraksi DNA genom bakteri *Bacillus subtilis* 3KP

DNA bakteri diekstraksi dengan menggunakan kit dengan metode dan

bahan kimia yang disarankan oleh GenElute™ (*Bacterial Genomic DNA Kit*). Untuk metodenya ada di Lampiran 1.

#### 4.4.10 Penentuan konsentrasi DNA genom bakteri *Bacillus subtilis* 3KP

Konsentrasi DNA hasil ekstraksi dapat diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer (*Nano Drop*) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dibantu dengan software ND-1000 yang berada di dalam komputer yang terhubung dengan spektrofotometer. Kalibrasi dilakukan sebelum melakukan pengukuran dengan mengukur *blanko* berisi *buffer* kemudian sampel DNA sebanyak 2  $\mu$ L diukur konsentrasinya. Hasil yang tercantum di komputer dicatat.

Nilai kemurnian pada rentang 1,75-1,9 menandakan kualitas DNA yang bagus dengan tingkat kemurnian tinggi, sedangkan  $\leq 1,75$  menandakan adanya kontaminasi protein, dan  $\geq 1,9$  menandakan adanya kontaminasi RNA.

#### 4.4.11 Pembuatan gel agarose

Sebanyak 0,35 gram bubuk agarose dilarutkan dalam 35 mL buffer TAE. Pelarutan dilakukan dengan bantuan microwave sampai larutan jernih. Setelah larut, larutan agarose didiamkan hingga suam-suam. Selanjutnya, larutan agarose dituangkan ke dalam alat pencetak gel agarose. Larutan agarose didiamkan hingga membeku. Setelah membeku, gel agarose yang telah mengeras dimasukkan ke dalam Loyang elektroforesis. Kemudian dituangkan buffer TAE ke dalam loyang hingga gel terendam.

#### 4.4.12 Elektroforesis

Elektroforesis ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya DNA genom yang terekstrak dan mengetahui ukuran dari DNA genom yang terekstrak serta amplifikasi hasil PCR. Disiapkan 1  $\mu$ L loading dye pada lembaran parafilm. Ditambahkan 5  $\mu$ L sampel hasil isolasi DNA ke dalam loading dye sampai homogen menjadi biru tua. Kemudian dimasukkan ke dalam lubang-lubang sumur pada gel agarose. Dimasukkan marka DNA sebanyak 5  $\mu$ L pada lubang sumuran

paling ujung. Setelah itu dilakukan elektroforesis selama 45 menit pada tegangan 100 volt.

Setelah proses elektroforesis, diambil gel elektroforesis dari chamber dan direndam dalam EtBr selama 15 menit untuk proses pewarnaan. Setelah proses pewarnaan selama 15 menit, gel agarose direndam dalam air selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan pengamatan migrasi DNA pada gel agarose menggunakan lampu UV transluminator.

#### 4.4.13 Amplifikasi gen penyandi enzim oksigenase (alkana hidroksilase dan dioksigenase) dengan PCR

Deteksi gen pendegradasi hidrokarbon alifatik dan aromatik dilakukan dengan menggunakan PCR. Primer spesifik yang digunakan adalah Alk M –F/R, ndo-F/R, tod-F/R. Amplifikasi dilakukan menggunakan tabung *ependof* PCR dengan memasukkan reagen *master mix* PCR sebanyak 12,5  $\mu$ L, primer forward dan reverse masing-masing sebanyak 1,25  $\mu$ L serta larutan DNA cetakan sebanyak 1  $\mu$ L dan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 9  $\mu$ L. Selanjutnya campuran dimasukkan dalam PCR dengan pengaturan suhu prapemisahan 98°C selama 30 detik, suhu pemisahan 98°C selama 10 detik, suhu penempelan 55°C selama 30 detik dan suhu polimerisasi 72°C selama 45 detik dengan 35 siklus dan *final ekstension* pada 72°C selama 2 menit, lalu *hold* pada suhu 4°C. Reagen *master mix* PCR merupakan reagen campuran yang mengandung enzim *pfu* DNA polimerase, 4 macam dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP), dan buffer PCR.

**Tabel 4.1 Primer yang digunakan dalam penelitian**

Primer	Urutan Basa
Gen Alkana Alk M-F	5'CGGCTACTCCGATGATCGG3'
Gen Alkana Alk M-R	5'GATCCGAGTGCCGCTGAAG3'
Gen Naftalen ndo-F	5'CACTCATGATAGCCTGATTCC3'
Gen Naftalen ndo-R	5'CACAACACACCCATGCCGCTG3'
Gen Toluena tod-F	5'GGGCTTACGACACCGCCG3'
Gen Toluena tod-R	5'GCGCTCCACGCTACCCAG3'





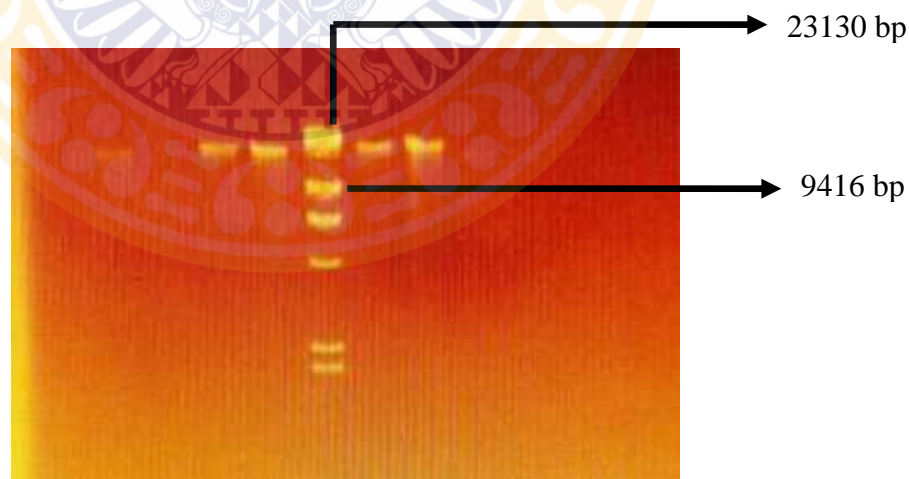
## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Isolasi DNA Genom *Bacillus subtilis* 3KP

Pada penelitian ini dilakukan amplifikasi gen dari DNA genom bakteri *Bacillus subtilis* 3KP. Amplifikasi gen dilakukan setelah ekstraksi DNA genom bakteri didapatkan nilai kemurnian pada rentang antara 1,75-1,9. DNA bakteri diekstraksi dengan menggunakan kit dengan metode dan bahan kimia yang disarankan oleh GenElute™ (*Bacterial Genomic DNA Kit*). DNA genom yang didapatkan pada penelitian ini adalah 1,85 dengan konsentrasi 58,31 ng/μl yang diukur dengan nanodrop 2000 spektrofotometer, hal ini menunjukkan bahwa DNA genom memiliki kemurnian yang tinggi. Nilai kemurnian pada rentang 1,75-1,9 menandakan kualitas DNA yang bagus dengan tingkat kemurnian tinggi, sedangkan  $\leq 1,75$  menandakan adanya kontaminasi protein, dan  $\geq 1,9$  menandakan adanya kontaminasi RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Hasil visualisasi amplifikasi DNA genom dengan elektroforesis gel agarosa (Gambar 5.1) menunjukkan pita yang terang dengan ukuran 20 kb.



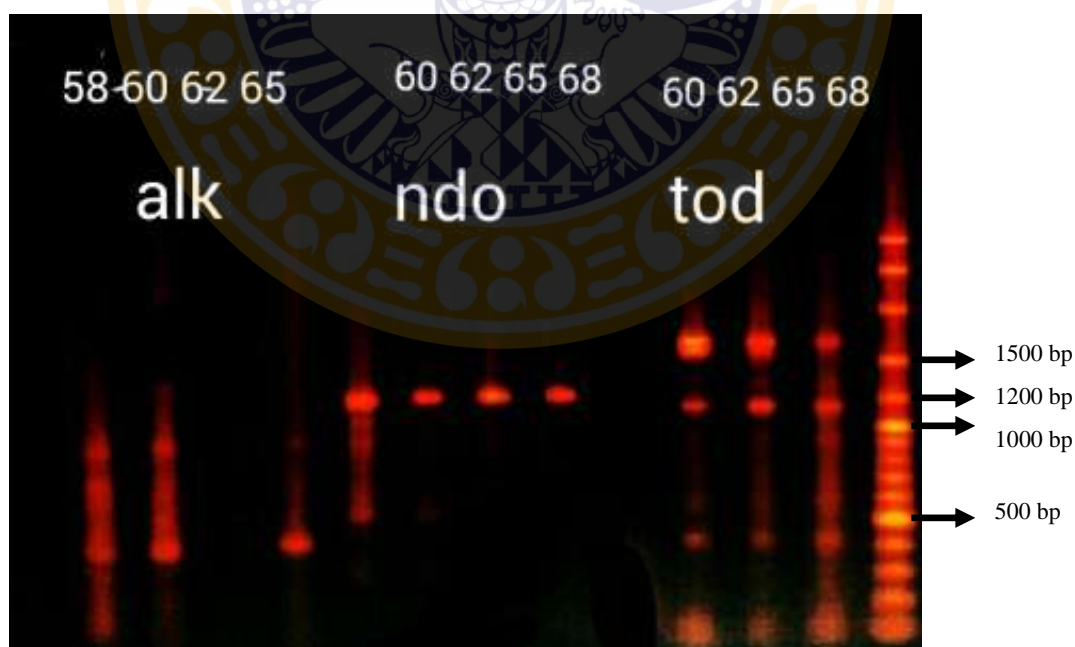
Gambar 5.1. Amplifikasi DNA genom *Bacillus subtilis* 3KP pada gel agarosa

#### 5.2 Optimasi dan Amplifikasi Gen *alk*, *ndo*, *tod* pada *Bacillus subtilis* 3KP

Hasil visualisasi optimasi suhu *annealing* (Gambar 5.2) dan ukuran pita DNA (Tabel 5.1) menunjukkan bahwa untuk fragmen gen *alk* pada suhu 65°C

terbentuk pita DNA yang paling tebal dan memisah sempurna dibandingkan dengan variasi suhu lainnya (58°C, 60°C, dan 62°C) dengan ukuran pita DNA 400 bp. Fragmen gen *ndo* pada suhu 68°C terbentuk pita DNA yang paling tebal dan memisah sempurna dibandingkan dengan variasi suhu lainnya (60°C, 62°C, dan 65°C) dengan ukuran pita DNA 1200 bp. Fragmen gen *tod* pada suhu 62°C terbentuk pita DNA yang paling tebal dan memisah sempurna dibandingkan dengan variasi suhu lainnya (60°C, 65°C, dan 68°C) dengan ukuran pita DNA 1100 bp. Penggunaan variasi suhu *annealing* tersebut dilakukan secara *gradient* saat proses PCR untuk menentukan suhu *annealing* yang optimal (Prezioso, V.R *et al.*, 2000).

Suhu *annealing* yang digunakan dalam proses optimasi ditentukan mulai dari 3°- 5°C di bawah dan di atas *melting temperature* primer (Newton, C.R, 1995). Hasil perhitungan menunjukkan  $T_m$  pada setiap primer adalah 62. Berdasarkan hasil tersebut, variasi suhu *annealing* yang digunakan dalam optimasi adalah 58-68.



Gambar 5.2. Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Fragmen Gen *alk*, *ndo*, *tod*

Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penempelan primer pada cetakan menjadi kurang optimal, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer berlekatan tidak spesifik. Waktu yang digunakan pada tahap *annealing* berkisar antara 30-60 detik (Sambrook *et al.*, 2001). Pada penelitian ini waktu *annealing* yang digunakan adalah 30 detik.

Tabel 5.1. Ukuran Fragmen Gen *alk*, *ndo*, *tod* Hasil Amplifikasi

Gen	Suhu <i>annealing</i>	Ukuran
<i>alk</i>	65	400 bp
<i>ndo</i>	68	1200 bp
<i>tod</i>	62	1100 bp

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rocha Marquez (2005) dihasilkan ukuran gen untuk *alk*, *ndo* dan *tod* berturut-turut 870, 642 dan 560 bp.

Faktor yang perlu diperhatikan saat optimasi PCR selain suhu *annealing* adalah rancangan primer (Weissensteiner *et al.*, 2004). Primer merupakan komponen penting dalam proses PCR sehingga harus dirancang secara spesifik. Primer yang terlalu pendek dapat menyebabkan primer sulit untuk menempel pada cetakan, sedangkan primer yang terlalu panjang dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak spesifik. Umumnya, panjang primer yang digunakan berkisar 18-25 nukleotida (Sambrook *et al.*, 2001; Newton, C.R, 1995). Primer tersebut dirancang oleh peneliti Rocha Marquez (2005) yang spesifik untuk *Bacillus*. Panjang primer yang digunakan pada penelitian ini berkisar 18-20 nukleotida, namun dihasilkan amplifikasi yang tidak spesifik yaitu dihasilkan band lebih dari satu. Hal ini dapat disebabkan primer yang digunakan untuk *Bacillus subtilis* 3KP kurang spesifik sehingga perlu dilakukan desain primer agar dihasilkan band yang spesifik pada penelitian yang akan datang.

Kandungan GC pada primer dapat mempengaruhi suhu denaturasi karena semakin tinggi kandungan GC pada primer, maka suhu denaturasi akan semakin tinggi. Hal tersebut berkaitan dengan ikatan hidrogen antara basa sitosin (C) dan basa guanin (G) yang memiliki tiga ikatan hidrogen. Kandungan GC yang baik

pada primer sebaiknya berada pada kisaran 40-60% (Yuwono, 2006). Kandungan GC pada penelitian ini berkisar 40%.

Enzim yang digunakan dalam reaksi PCR adalah enzim mix merupakan reagen campuran yang mengandung enzim DNA polimerase, 4 macam dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP), dan buffer PCR. Enzim DNA polimerase memiliki aktivitas *hot star* yang berarti enzim akan diaktifkan ketika suhu denaturasi mencapai suhu 98°C selama 30 detik. Enzim tersebut juga dapat meningkatkan spesifitas dan meningkatkan hasil PCR. Sambrook (2001), menyatakan bahwa denaturasi dapat dilakukan pada kisaran suhu 95-98°C, suhu denaturasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan primer sulit untuk menempel pada cetakan, sedangkan suhu denaturasi yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer berlekatan di berbagai tempat sehingga hasil PCR menjadi tidak spesifik (Rybicki, 2001).

Tahapan terakhir dari proses PCR adalah polimerisasi yang merupakan tahapan pemanjangan untai DNA. Polimerisasi berlangsung pada suhu 72°C selama 45 detik dengan 35 siklus dan *final ekstension* pada 72°C selama 2 menit yang bertujuan untuk menyempurnakan proses pemanjangan untai DNA, lalu *hold* pada suhu 4°C.

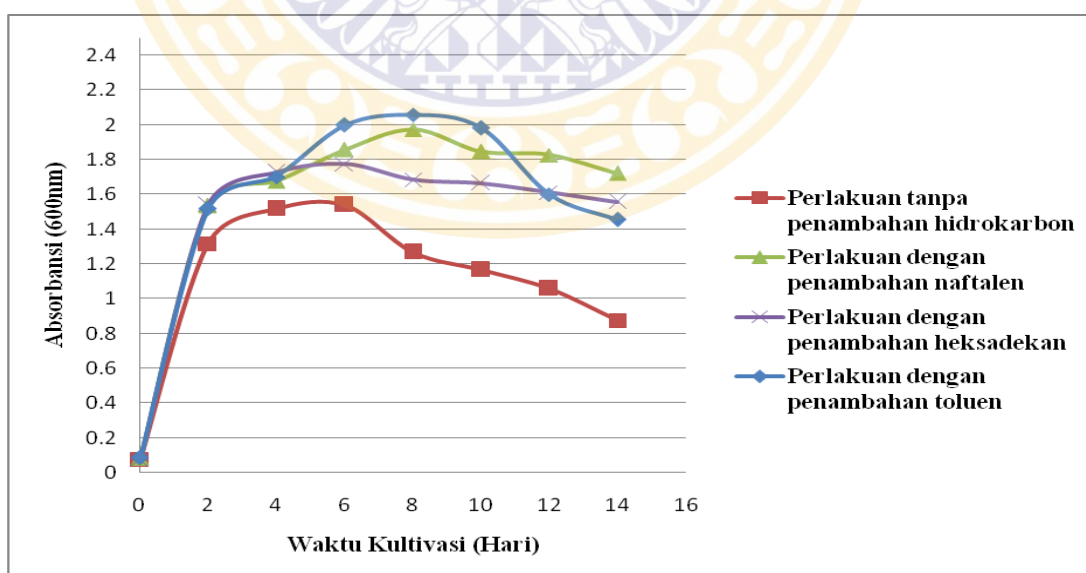
Berdasarkan hasil amplifikasi gen yang didapatkan dalam penelitian, maka perlu dilakukan kloning dengan memasukkan ke dalam plasmid sebelum dilakukan sekuensing karena dihasilkan pita lebih dari satu band. Sekuensing dilakukan untuk menentukan identitas gen dengan cara membandingkan sekuens target dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui. Keunggulan dilakukan kloning adalah mempermudah perbanyakan DNA, dan mendapatkan gen yang diinginkan agar dapat digunakan sebagai agen untuk mendegradasi hidrokarbon untuk prospek kedepannya.

### **5.3 Respon Pertumbuhan (OD) *Bacillus subtilis* 3KP pada Substrat Heksadekan, Naftalen dan Toluena**

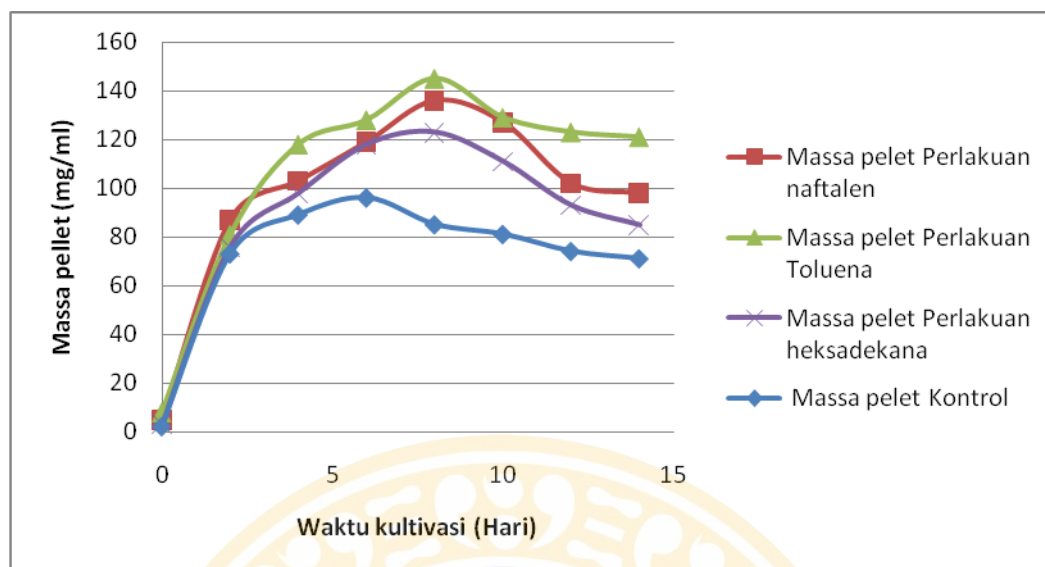
Respon pertumbuhan (OD) *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan dalam media air mineral sintetik (AMS) dengan penambahan berbagai substrat

hidrokarbon dan tanpa penambahan substrat hidrokarbon disajikan pada Gambar 5.3 . *Bacillus subtilis* 3KP memiliki respon pertumbuhan yang berbeda-beda saat ditumbuhkan pada berbagai substrat hidrokarbon. Gambar 5.3 menunjukkan bahwa, *Bacillus subtilis* 3KP dapat tumbuh pada berbagai substrat hidrokarbon.

*Bacillus subtilis* 3KP dapat menggunakan substrat hidrokarbon masing-masing dengan konsentrasi 200 ppm (heksadekana, toluena dan naftalena) sebagai substrat pertumbuhannya. *Bacillus subtilis* 3KP pada media AMS tanpa penambahan hidrokarbon dan dengan penambahan substrat heksadekan, toluen dan naftalen mengalami pertumbuhan sejak hari kedua tanpa didahului fase lag. Pada Gambar 5.3 terlihat bahwa ada perbedaan pola pertumbuhan *Bacillus subtilis* 3KP antara tanpa penambahan substrat hidrokarbon dan penambahan substrat hidrokarbon. Selain itu, biomasa sel tanpa penambahan substrat hidrokarbon lebih sedikit dibandingkan dengan biomasa sel pada penambahan substrat hidrokarbon yang disajikan pada Gambar 5.4. Hal ini menunjukkan adanya adaptasi dan penggunaan substrat oleh *Bacillus subtilis* 3KP untuk tumbuh. Meskipun tanpa substrat hidrokarbon, *Bacillus subtilis* 3KP mampu tumbuh. 2 gram yeast extract terbukti dapat digunakan *Bacillus subtilis* 3KP untuk tumbuh hingga hari keenam.



Gambar 5.3. Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, toluena dan naftalen



Gambar 5.4. Kurva biomasa sel *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekana, toluen dan naftalen.

*Bacillus subtilis* 3KP mampu beradaptasi dan menggunakan substrat hidrokarbon sebagai sumber karbon. Pada fase pertumbuhannya, *Bacillus subtilis* 3KP menggunakan substrat hidrokarbon untuk tumbuh, dibuktikan dengan meningkatnya nilai OD dan bertambahnya biomasa sel seiring bertambahnya waktu inkubasi dibandingkan dengan tanpa penambahan hidrokarbon. Fase stasioner pada bakteri terjadi ketika pertumbuhan sel terhambat karena kepadatan sel sehingga biomasa sel menjadi menurun seiring dengan bertambahnya waktu kultivasi, akumulasi metabolit sekunder yang bersifat toksik bagi sel, dan keterbatasan oksigen (Pelczar, 1986). Proses degradasi hidrokarbon oleh bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu sifat mikroba, sifat hidrokarbon dan faktor lingkungan. Kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon tergantung kemampuan bakteri beradaptasi, resistensi terhadap toksisitas substrat dan gen yang dimiliki oleh bakteri (Bayoumi *et al.*, 2009).

Selain sifat mikroba, faktor lain yang mempengaruhi proses biodegradasi hidrokarbon adalah sifat hidrokarbon. Kerumitan struktur, berat molekul, dan kelarutan hidrokarbon menjadi faktor pembatas akses mikroba terhadap hidrokarbon. Kelompok hidrokarbon dengan struktur gabungan dua atau lebih

cincin aromatik, memiliki berat molekul yang meningkat seiring dengan kerumitan struktur dan penambahan cincin karbon, serta kelarutan yang rendah dalam air. Menanggapi hal tersebut, bakteri mengembangkan upaya dalam mengakses hidrokarbon. Mekanisme yang dikembangkan oleh *Bacillus subtilis* 3KP dalam mendegradasi hidrokarbon antara lain, dapat melepaskan biosurfaktan ekstraseluler serta adanya adaptasi hidrofobisitas dinding sel untuk melekat pada substrat yang telah diteliti oleh Nastiti (2015). Kontak langsung antara bakteri dengan substrat hidrokarbon dapat menginduksi bakteri untuk melepaskan enzim. Enzim dibutuhkan dalam biodegradasi hidrokarbon untuk mengkatalisis reaksi oksidasi hidrokarbon (Malatova, 2005). Untuk mengetahui senyawa intermediet yang terbentuk selama proses degradasi hidrokarbon dapat diuji dengan GC-MS saat kultivasi pada media dengan penambahan substrat hidrokarbon selama 14 hari.

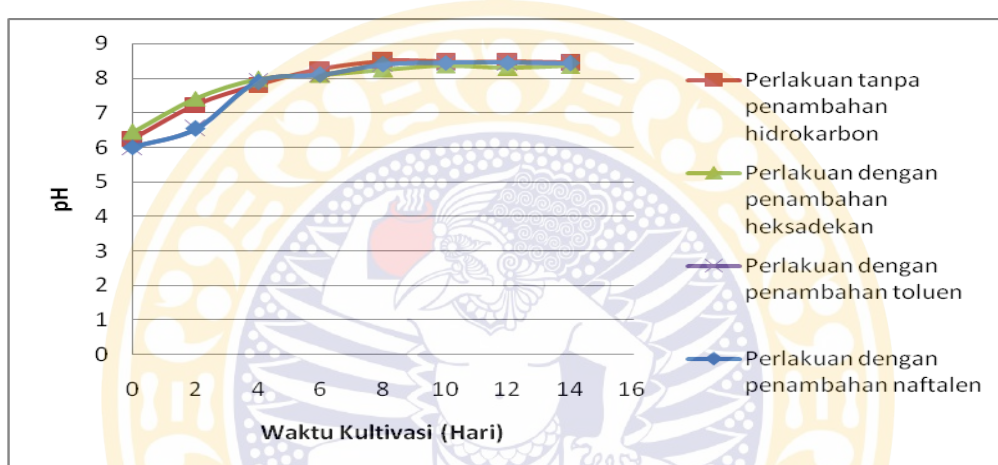
pH akhir kultur *Bacillus subtilis* 3KP mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya waktu kultivasi. Adanya perubahan pH tidak mempengaruhi pertumbuhan *Bacillus subtilis* 3KP pada penambahan substrat hidrokarbon maupun tanpa penambahan substrat hidrokarbon. Perubahan pH antara penambahan substrat hidrokarbon maupun tanpa penambahan substrat hidrokarbon relatif sama, namun pola pertumbuhan (OD) *Bacillus subtilis* 3KP tidak menunjukkan hasil yang sama. Pola pertumbuhan (OD) dipengaruhi oleh adanya keberadaan substrat hidrokarbon. Penambahan substrat hidrokarbon memungkinkan bakteri untuk beradaptasi dan menggunakan substrat hidrokarbon sebagai sumber karbon, akibatnya pola pertumbuhan (OD) terus meningkat seiring bertambahnya waktu kultivasi dibandingkan dengan tanpa penambahan substrat hidrokarbon.

pH merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri. Proses biodegradasi tidak dapat berlangsung baik apabila pH tidak berada pada kisaran optimal pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini *Bacillus subtilis* 3KP dapat tumbuh dengan baik pada kisaran pH antara 6-8. *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada media dengan penambahan hidrokarbon (heksadekan, naftalen dan toluen) menunjukkan terdapat kesamaan



nilai pH selama proses kultivasi. Menurut Leahy dan Colwell (1990) Kesamaan nilai pH diduga menghasilkan jenis senyawa metabolit yang hampir sama, sehingga perlu dilakukan uji GC-MS untuk melihat senyawa metabolit yang dihasilkan saat proses degradasi.

Hasil pengamatan perubahan pH yang terjadi selama proses pertumbuhan *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, naftalen dan toluen disajikan pada Gambar 5.5.



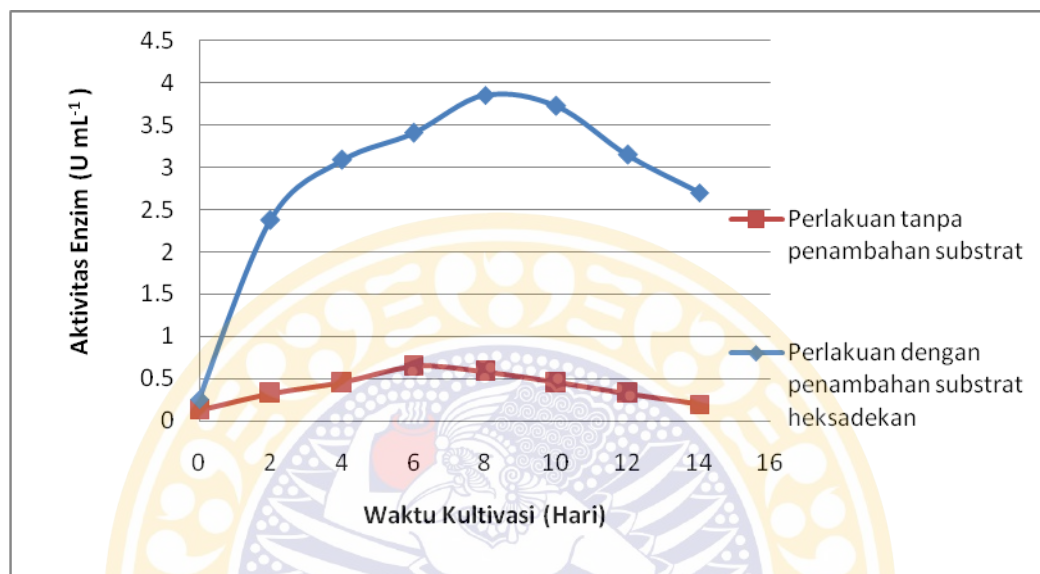
Gambar 5.5 Perubahan nilai pH *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, naftalen, dan toluene selama waktu kultivasi 14 hari.

#### 5.4 Uji Aktivitas Enzim Alkana Hidroksilase dan Dioksigenase

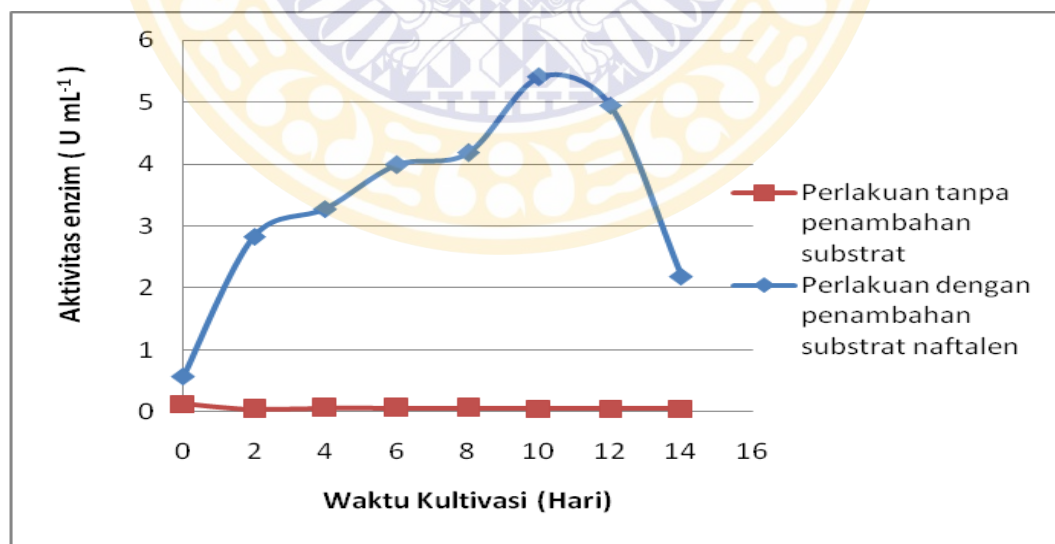
Produksi enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase dilakukan dengan menumbuhkan *Bacillus subtilis* 3KP pada media yang mengandung substrat hidrokarbon dan tanpa penambahan hidrokarbon dengan waktu kultivasi selama 14 hari. Uji aktivitas ekstrak kasar enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase dari *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, naftalen dan toluen maupun tanpa penambahan substrat hidrokarbon dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan ELISA.

Hasil uji aktivitas enzim alkana hidroksilase, naftalen dioksigenase dan toluene dioksigenase berturut-turut dapat dilihat pada Gambar 5.6; 5.7; dan 5.8.

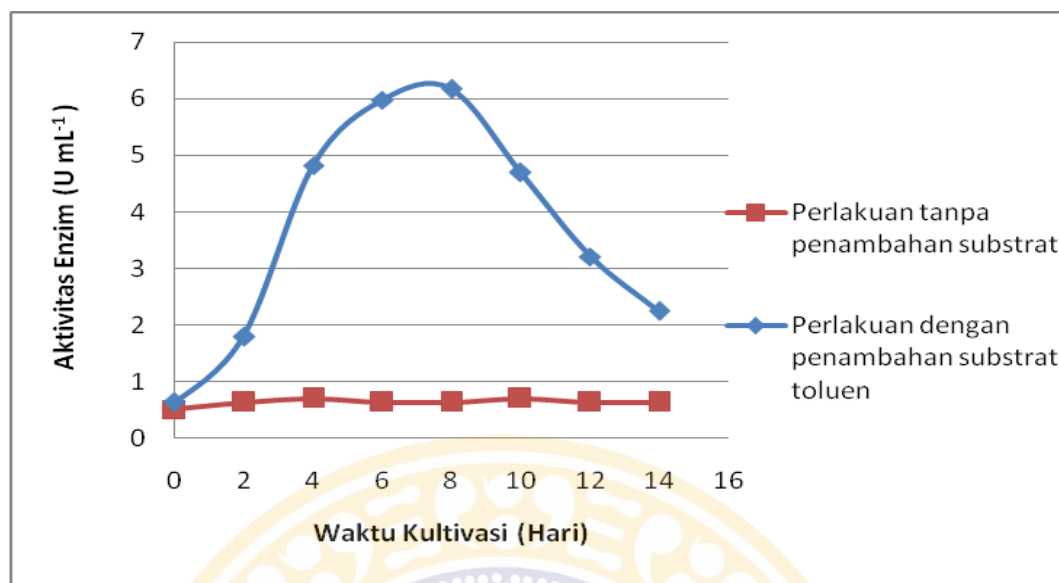
Satu unit aktivitas enzim alkana hidroksilase, toluen dioksigenase dan naftalen dioksigenase dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang membutuhkan 1  $\mu\text{mol}$  NADH untuk mengoksidasi substrat.



Gambar 5.6 Aktivitas enzim alkana hidroksilase *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan.



Gambar 5.7 Aktivitas enzim naftalen dioksigenase *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat naftalen



Gambar 5.8 Aktivitas enzim toluen dioksigenase *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat toluen.

Dari Gambar 5.6 dapat dilihat bahwa enzim alkana hidroksilase dengan penambahan substrat heksadekan memiliki aktivitas antara 0,257-3,859 U/mL. Aktivitas paling tinggi ditunjukkan saat waktu inkubasi pada hari ke-8. Pada waktu inkubasi ini, pertumbuhan (OD) *Bacillus subtilis* 3KP mengalami fase stasioner. Fase stasioner bakteri terjadi ketika pertumbuhan sel terhambat karena kepadatan sel, akumulasi metabolit sekunder yang bersifat toksik bagi sel serta keterbatasan oksigen yang menyebabkan *Bacillus subtilis* 3KP mengeluarkan enzim dengan aktivitas tertinggi dalam kondisi ini. Aktivitas terendah terjadi pada saat waktu inkubasi hari ke-0, hal ini disebabkan belum adanya penggunaan substrat oleh *Bacillus subtilis* 3KP sebagai sumber karbon dan belum adanya adaptasi *Bacillus subtilis* 3KP terhadap substrat.

Dari Gambar 5.7 dapat dilihat bahwa enzim naftalen dioksigenase dengan penambahan substrat naftalen memiliki aktivitas antara 0,579-5,402 U/mL. Aktivitas paling tinggi ditunjukkan saat waktu inkubasi pada hari ke-10. Pada waktu inkubasi ini, pertumbuhan (OD) *Bacillus subtilis* 3KP mengalami fase stasioner. Fase stasioner bakteri terjadi ketika pertumbuhan sel terhambat karena kepadatan sel, akumulasi metabolit sekunder yang bersifat toksik bagi sel serta

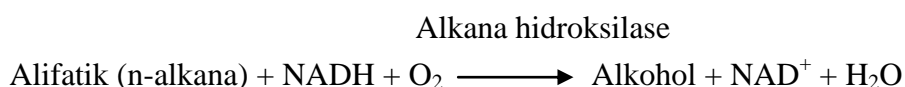
keterbatasan oksigen yang menyebabkan *Bacillus subtilis* 3KP mengeluarkan enzim dengan aktivitas tertinggi dalam kondisi ini. Aktivitas terendah terjadi pada saat waktu inkubasi hari ke-0, hal ini disebabkan belum adanya penggunaan substrat oleh *Bacillus subtilis* 3KP sebagai sumber karbon. Aktivitas enzim naftalen dioksigenase relatif lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas enzim alkana hidroksilase.

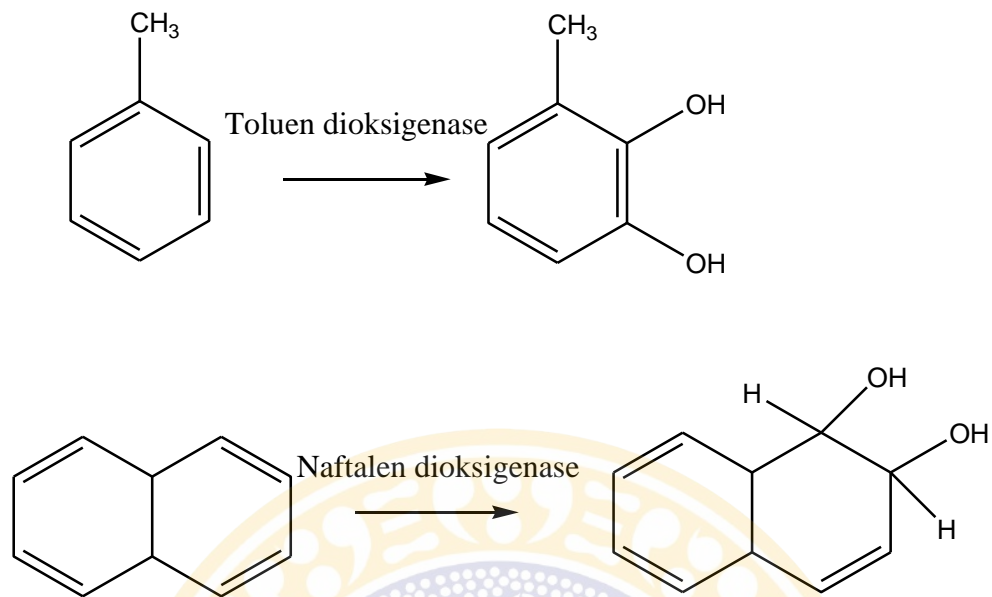
Dari Gambar 5.8 dapat dilihat bahwa enzim toluen dioksigenase dengan penambahan substrat toluen memiliki aktivitas antara 0,643-6,174 U/mL. Aktivitas paling tinggi ditunjukkan saat waktu inkubasi pada hari ke-8. Pada waktu inkubasi ini, pertumbuhan (OD) *Bacillus subtilis* 3KP mengalami fase stasioner. Fase stasioner bakteri terjadi ketika pertumbuhan sel terhambat karena kepadatan sel, akumulasi metabolit sekunder yang bersifat toksik bagi sel serta keterbatasan oksigen yang menyebabkan *Bacillus subtilis* 3KP mengeluarkan enzim dengan aktivitas tertinggi dalam kondisi ini. Aktivitas terendah terjadi pada saat waktu inkubasi hari ke-0, hal ini disebabkan belum adanya penggunaan substrat oleh *Bacillus subtilis* 3KP sebagai sumber karbon. Aktivitas enzim toluen dioksigenase relatif lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas enzim alkana hidroksilase.

Aktivitas alkana hidroksilase dari *Rhodococcus* sp. NJ2, *Pseudomonas aeruginosa* PSA5, dan *Ochrobactrum intermedium* P2 yang diisolasi dari petroleum *sludge* dalam mendegradasi heksadekana (C<sub>16</sub>) masing-masing mencapai 185 µmol/mg, 89,83 µmol/mg, dan 186 µmol/mg protein (Mishra dan Singh, 2012). Aktivitas naftalen dioksigenase dari *Pseudomonas putida* AL21, *Pseudomonas putida* NL21 dan *Pseudomonas putida* NL26 dalam mendegradasi naftalen masing-masing sebesar 31,36 U/mg protein, 67,90 U/mg protein dan 73,44 U/mg protein (Titok *et al.*, 2011). Aktivitas naftalen dioksigenase dari *Pseudomonas* sp. NC1B9816 dalam mendegradasi naftalen sebesar 0,339 µmol/menit/mg protein (Shamsuzzaman *et al.*, 1974). Aktivitas toluena dioksigenase dari *Bacillus* sp. UKMP-7T dan *Bacillus cereus* UKMP-6G dalam mendegradasi toluena masing-masing sebesar 0,166 U/mL dan 0,260 U/mL (Hamzah, A *et al.*, 2011).

Dari hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas enzim alkana hidroksilase, naftalen dioksigenase dan toluen dioksigenase. Enzim-enzim ini dibutuhkan oleh *Bacillus subtilis* 3KP dalam biodegradasi hidrokarbon untuk mengkatalisis reaksi oksidasi hidrokarbon (Malatova, 2005). Keberadaan enzim-enzim ini memungkinkan *Bacillus subtilis* 3KP dapat mengurai hidrokarbon menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon. *Bacillus subtilis* 3KP mampu tumbuh dan menghasilkan enzim dengan cara berdaptasi pada hidrokarbon yang digunakan oleh bakteri sebagai sumber energi untuk proses metabolisme. Kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon dipengaruhi oleh adanya enzim-enzim katabolik yang mampu memecah senyawa hidrokarbon menjadi senyawa metabolit yang mampu masuk ke dalam siklus asam sitrat. Enzim katabolik yang paling berperan penting dalam proses katabolisme hidrokarbon yang masuk ke dalam sel bakteri adalah enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi hidrokarbon tahap pertama. Tahap pertama katabolisme alkana dan aromatik oleh bakteri masing-masing diinisiasi oleh enzim alkana hidroksilase dan aromatik dioksigenase. Alkana hidroksilase merupakan enzim kunci dalam degradasi alkana sedangkan naftalen dioksigenase dan toluene dioksigenase merupakan enzim kunci dalam degradasi hidrokarbon aromatik (Jauhari *et al.*, 2014).

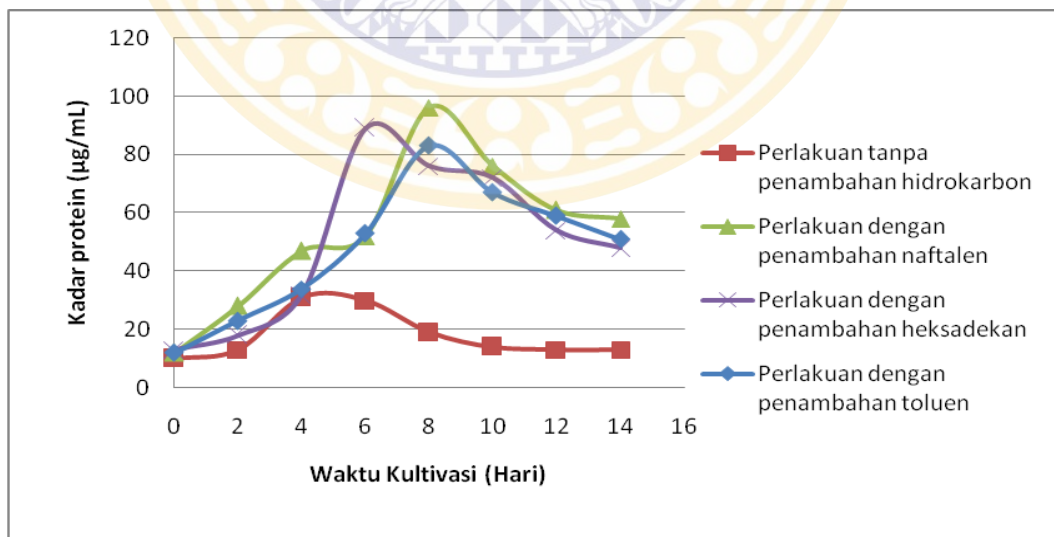
Jalur degradasi hidrokarbon alifatik yaitu melalui proses oksidasi gugus metil terminal yang melibatkan pembentukan alkohol oleh enzim alkana hidroksilase. Alkohol kemudian dihidrolisis oleh enzim alkohol dehidrogenase menghasilkan turunan aldehid dan asam lemak monokarboksilat. Asam lemak dipecah, CO<sub>2</sub> dilepaskan dan membentuk asam lemak baru yang merupakan 2 unit karbon yang lebih pendek dari molekul induk, proses ini dikenal sebagai beta oksidasi (Wentzel *et al.*, 2007). Adapun reaksi yang terjadi saat *Bacillus subtilis* 3KP mengoksidasi heksadekan, naftalen dan toluen adalah sebagai berikut.





Gambar 5.9 Reaksi yang terjadi saat *Bacillus subtilis* 3KP mengoksidasi heksadekana, naftalena dan toluena (Wentzel *et al.*, 2007).

Kadar protein enzim *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada media dengan penambahan substrat heksadekan, toluen dan naftalen serta yang ditumbuhkan pada media tanpa penambahan substrat disajikan pada Gambar 5.9.



Gambar 5.10 Kadar protein enzim *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat heksadekan, toluen dan naftalen.

Berdasarkan Gambar 5.9 dapat disimpulkan bahwa meningkatnya kadar protein *Bacillus subtilis* 3KP yang ditumbuhkan pada substrat hidrokarbon (naftalen, heksadekan dan toluene) semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu kultivasi. Kadar protein tertinggi untuk substrat heksadekan saat kultivasi pada hari ke-6, kadar protein tertinggi untuk substrat naftalen saat kultivasi pada hari ke-8 dan kadar protein tertinggi untuk substrat toluen saat kultivasi pada hari ke-8. Kadar protein tertinggi ketika pertumbuhan bakteri menunjukkan fase stasioner.

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan *Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas enzim alkana hidroksilase, naftalen dioksigenase dan toluen dioksigenase yang dibuktikan dengan meningkatnya aktivitas enzim ketika terjadi penambahan substrat hidrokarbon. Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang dimiliki oleh *Bacillus subtilis* 3KP adalah enzim induktif. Enzim induktif (adaptif) adalah enzim yang dihasilkan oleh sel hanya sebagai tanggapan terhadap adanya substrat hidrokarbon yang digunakan sebagai sumber karbon oleh bakteri.

*Bacillus subtilis* 3KP memiliki aktivitas enzim dan memiliki gen *ndo*, *tod*, dan *alk* namun belum teramplifikasi dengan baik, menghasilkan pita dengan multi band. Berdasarkan hasil amplifikasi gen yang didapatkan dalam penelitian, maka perlu dilakukan kloning dengan memasukkan ke dalam plasmid sebelum dilakukan sekuensing karena dihasilkan pita lebih dari satu band. Sekuensing dilakukan untuk menentukan identitas gen dengan cara membandingkan sekuens target dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui serta dilakukan desain primer yang spesifik untuk *Bacillus subtilis* 3KP. Keunggulan dilakukan kloning adalah mempermudah perbanyak DNA, dan mendapatkan gen yang diinginkan agar dapat digunakan sebagai agen untuk mendegradasi hidrokarbon untuk prospek kedepannya. Selain itu, perlu dilakukan kloning agar dihasilkan enzim dengan aktivitas yang tinggi.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan:

1. *Bacillus subtilis* 3KP memiliki gen *alk*, *ndo* dan *tod* dengan ukuran berturut-turut 400 bp; 1200 bp; dan 1100 bp.
2. Enzim alkana hidroksilase *Bacillus subtilis* 3KP mempunyai aktivitas enzim sebesar 3,859 U/ml terhadap substrat heksadekana.
3. Enzim dioksigenase *Bacillus subtilis* 3KP mempunyai aktivitas enzim sebesar 6,174 U/ml terhadap substrat toluena dan sebesar 5,402 U/ml terhadap substrat naftalena.

#### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh disarankan:

1. Dilakukan sekuensing fragmen gen yang telah didapatkan agar diketahui sekuen serta homologinya.
2. Dilakukan desain primer untuk *Bacillus subtilis* 3KP.
4. Dilakukan kloning agar dihasilkan enzim dengan aktivitas yang tinggi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M. dan Bartha, R., 1998, *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*, Benjamin Publishing Company, California.
- Banat, I.M dan Rancich, 2009, *No man Entry Tank Cleaning and VOC Control Using Biotechnological Interventions*, Environmental Technologies for Refineries Programme, University Ulster, Europe.
- Bayoumi et al., 2009, Bacterial Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Heavy Oil Contaminated Soil, *Journal of Applied Sciences Research*, 5(2), 197-211.
- Burton, G.S., 2013, Oxidizing Enzymes as Biocatalysts, *Journal of Biotechnology*, 21(12), 543-549.
- Cartwright, P., 2009, *Bacillus subtilis*-Identification & Safety, *Journal of Microbiology*, 2, 83-89.
- Dinata, I.D., 2011, *Bioteknologi Pemanfaatan Mikroorganisme dan Teknologi Bioproses*, EGC, Jakarta.
- Hamzah, A et al., 2011, Detection of Toluene Degradation in Bacteria Isolated from Oil Contaminated Soil, *Journal of Vet.Med.Sci*, 40(11), 1231-1235.
- Harayama et al., 1999, Petroleum Biodegradation in Marine Environments, *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*, 1(1), 63-70.
- Hayaishi, O., Nozaki, M., 1969, *Nature and Mechanism of Oxygenases*, Department of Medical Chemistry, Kyoto, Japan.
- Jahangeer dan Kumar, V., 2013, An Overview on Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants, *International Journal of Engineering and Technical Research*, 1(8), 34-37.
- Jauhari et al., 2014, Bacteria Mediated Aerobic Degradation of Hexacosane *in vitro* Conditions, *Journal of Bioresource Technology*, 170, 62-68.
- Joutey et al., 2013, Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganism, *Journal Life of Science*, 11, 289-320.
- Kohno et al., 2002, Design of Primers and Gene Probes for General Detection of Alkane-Degrading Bacteria, *Journal of Microbes and Environments*, 17 (3), 144-121.

- Malatova, K., 2015, Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Environmental Habitats in Western New York State, *Thesis*, Rochester Institute of Technology, Rochester.
- Miksusanti, dkk, 2011. Aktivitas campuran ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) secang (*Caesalpinia sappan L.*) terhadap *Bacillus cereus*. *Jurnal Penelitian Sains*, 14 (3), 141- 152.
- Mishra *et al.*, 2012, Microbial Degradation of n-hexadecane in Mineral Salt Medium as Mediated by Degradative Enzyme, *Journal of Bioresource Technology*, 111, 148-154.
- Mishra *et al.*, 2014, Bacteria Induced Degradation of Fluoranthene in Minimal Salt Medium Mediated by Catabolic Enzymes *in vitro* Condition, *Journal of Bioresource Technology*, 164, 299-308.
- Mishra, S. dan Singh, S.N., 2012, Microbial Degradation of n-Hexadecane in Mineral Salt Medium as Mediated by Degradative Enzymes, *International Journal of Bioresource Technology*, 111, 148-154.
- Mukherjee *et al.*, 2012, Biodegradation of Benzene, Toluene, and Xylene (BTX) in Liquid Culture and in Soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains and A Formulated Bacterial Consortium, *Journal of Applied Science Research*, 19, 3380-3388.
- Nastiti, 2015, Degradasi Nafthalen dan Fenantren pada *Bacillus subtilis* 3KP, *Skripsi*, Fakultas sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Newton, C.R., 1995, *PCR*, Alden Press: Oxford.
- Ni'matuzahroh *et al.*, 2009, Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Menggunakan Konsorsium Mikroba, *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
- Ni'matuzahroh *et al.*, 2010, Studi Kinetika Produksi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP pada Substrat Molase, Berk. Penel. Hayati, 16, 33-38.
- Nugroho, A., 2006, Biodegradasi *Sludge Oil* Minyak Bumi dalam Skala Mikrokosmos, *Jurnal Lingkungan*, 10(2), 82-89.
- Pelczar, J.M., 1986, *Dasar-Dasar Mikrobiologi* , Universitas Indonesia: Jakarta.
- Prezioso, V.R *et al.*, 2000, Using Gradient PCR to Determine the Optimum Annealing Temperature, *Journal of Bioresource*, 15(3), 15-19.

- Riybicki, 2001, Molecular Biology Techniques Manual: PCR Primer Design and Reaction Optimization, *Journal of Biotechnology*, 10(1), 190-195.
- Rocha, M *et al.*, 2005, Determination of the Hydrocarbon-Degrading Metabolic Capabilities of Tropical Bacterial Isolates, *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 55, 17-23.
- Rojo, F., 2009, Degradation of Alkanes by Bacteria, *Journal of Environmental Microbiology*, 11(10), 2477-2490.
- Romo *et al.*, 2013, Characterization of Hydrocarbonoclastic Marine Bacteria Using the 16S rRNA Gene: A Microcosm Case Study, *Journal of Microbiology*, 2(80), 122-129.
- Sambrook *et al.*, 1986, *Molecular Cloning*, Cold Harbor Laboratory Press, New York.
- Scott, G.J., 2008, Insect Cytochrome P450s: Thinking Beyond Detoxification, *Journal of Toxicology and Molecular Biology*, 2, 117-124.
- Shamsuzzaman *et al.*, 1974, The Regulation of Naphthalene Oxygenase in *Pseudomonas*, *Journal of General Microbiology*, 83, 165-170.
- Shepparr, J.P., 2013, Impacts of Bioremediation Strategy on the Activity and Diversity of Hydrocarbonoclastic Bacteria in a Petrogenic Contaminated Aquatic System, *Thesis*, School of Applied Science Royal Melbourne Institute of Technology.
- Singh *et al.*, 2013, Bacterial Degradation of Pyrene in Minimal Salt Medium Mediated by Catechol Dioxygenases: Enzyme Purification and Molecular Size Determination, *Journal of Bioresource Technology*, 133, 293-300.
- Tebyanian *et al.*, 2013, Hexadecane Degradation by *Teskumurella* and *Stenotrophomonas* Strains Isolated from Hydrocarbon Contaminated Soils, *Journal of Microbiology*, 6(7), 82-91.
- Titok *et al.*, 2011, Efficiency of Naphthalene Degradation by *Pseudomonas* Bearing NAH-Plasmids in Model Soil System, *Journal of Applied Science and Environmental*, 10(1), 121-129.
- Tonkova, V.E. dan Gesheva, V., 2003, Potential for Biodegradation of Hydrocarbons by Microorganisms Isolated from Antarctic Soils, *Journal of Microbiology*, 59, 140-145.
- Urszula *et al.*, 2009, Isolation and Characterization of A Novel Strain of *Stenotrophomonas Maltophilia* Possessing Various Dioxygenases for

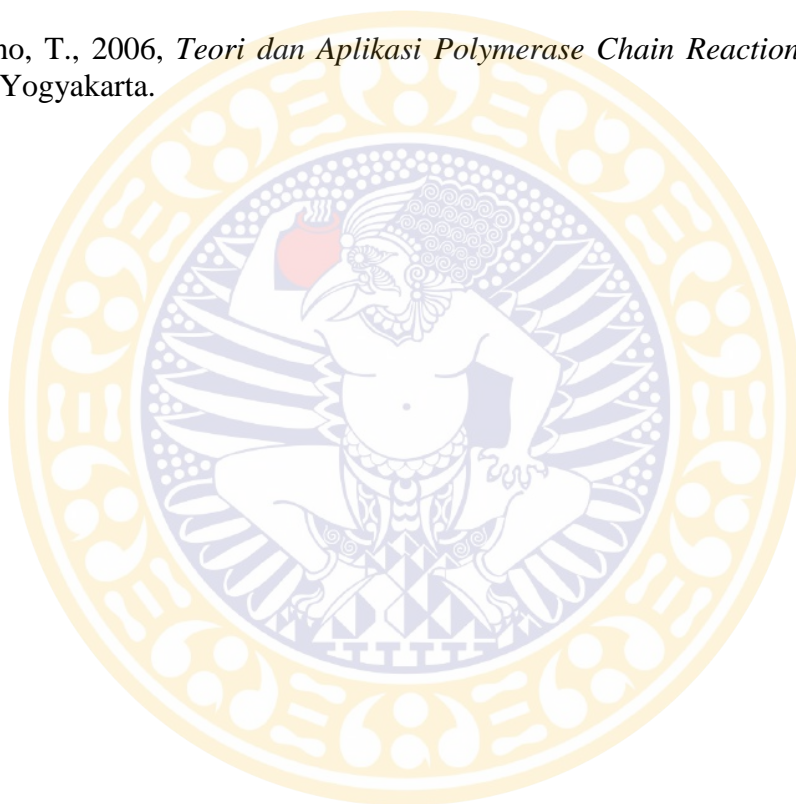
Monocyclic Hydrocarbon Degradation, *Journal of Microbiology*, 40, 285-291.

Van Beilen *et al.*, 2003, Alkane Hydroxylase Homologues in Gram Positive Strains. *Journal of Environmental Microbiology*, 4, 676-682.

Weissensteiner *et al.*, 2004, *PCR Technology Current Innovation*, CRC Press: New York.

Wentzel *et al.*, 2007, Bacterial Metabolism of Long-Chain n-Alkanes, *International Journal of Microbial Biotechnology*, 76, 1209-1221.

Yuwono, T., 2006, *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*, Andi Press: Yogyakarta.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Ekstraksi DNA genom bakteri *Bacillus subtilis* 3KP

Suspensi bakteri sebanyak 1,5 mL yang telah diambil dari koloni bakteri disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000-16.000 x g. Supernatan yang diperoleh dibuang. Pellet sel disuspensi dalam 200 µL larutan lysozyme dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Ditambahkan 20 µL RNase diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Ditambahkan 20 µL proteinase K dan 200 µL larutan lisis C ke suspensi sel, divortek atau dipipet untuk mencampurkan, diinkubasi pada 55°C selama 10 menit.

Preparasi kolom yang akan digunakan dalam proses ekstraksi dilakukan dengan cara sebagai berikut. Sebanyak 500 µL larutan *Column Preparation* ditambahkan ke dalam masing-masing GenElute *Miniprep Binding Column* yang telah diset dengan *collection tube* 2 mL kemudian disentrifuse dengan kecepatan  $12.000 \times g$  selama 1 menit. Eluat yang tertampung pada *collection tube* kemudian dibuang.

Sebanyak 200 µL etanol (95-100%) ditambahkan ke dalam lisat lalu larutan dipipet naik dan turun secara perlahan agar tercampur rata sehingga dihasilkan larutan yang homogen. Sel lisat kemudian dituang ke dalam *binding column* lalu disentrifuse dengan kecepatan  $\geq 6.500 \times g$  selama 1 menit. Eluat yang tertampung pada *collection tube* kemudian dibuang.

Sebanyak 500 µL Wash Solution 1 (W0263) ditambahkan ke dalam kolom lalu disentrifuse dengan kecepatan  $\geq 6.500 \times g$  selama 1 menit. Eluat yang tertampung pada *collection tube* kemudian dibuang.

Sebanyak 500 µL Wash Solution ditambahkan ke dalam kolom kemudian disentrifuse dengan kecepatan 12.000-16.000 x g selama 3 menit untuk mengeringkan kolom. Kolom harus dipastikan bebas dari etanol sebelum proses elusi DNA sehingga kolom disentrifuse kembali dengan kecepatan 12.000-16.000 x g selama 1 menit jika masih terdapat residu etanol. Eluat yang tertampung pada *collection tube* kemudian dibuang. *Collection tube* diganti dengan yang berukuran 1,5 mL.

Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  Elution Solution (B6803) diteteskan tepat pada bagian tengah kolom kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Kolom lalu disentrifuse pada kecepatan  $\geq 6.500 \times g$  selama 1 menit untuk melulusi DNA. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  Elution Solution (B6803) diteteskan kembali tepat pada bagian tengah kolom kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Kolom lalu disentrifuse pada kecepatan  $\geq 6.500 \times g$  selama 1 menit untuk melulusi DNA. Eluat pada collection tube mengandung DNA genom murni. Penyimpanan jangka panjang disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sedangkan penyimpanan jangka pendek disimpan pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$ .



**Lampiran 2. Data OD heksadekan, naftalen dan toluen****Naftalen**

<b>Hari ke</b>	<b>Kontrol pengenceran</b>	<b>OD Kontrol</b>	<b>Perlakuan Naftalen pengenceran</b>	<b>OD Perlakuan Naftalen</b>
0	0.026	0.078	0.028	0.084
2	0.439	1.317	0.512	1.536
4	0.506	1.518	0.559	1.677
6	0.513	1.539	0.619	1.857
8	0.423	1.269	0.658	1.974
10	0.389	1.167	0.615	1.845
12	0.353	1.059	0.609	1.827
14	0.292	0.876	0.574	1.722

**Heksadekan**

<b>Hari ke</b>	<b>Kontrol pengenceran</b>	<b>OD Kontrol</b>	<b>Perlakuan Heksadekan pengenceran</b>	<b>OD Perlakuan Heksadekan</b>
0	0.026	0.026	0.026	0.078
2	0.439	1.317	0.513	1.539
4	0.506	1.518	0.576	1.728
6	0.513	1.539	0.592	1.776
8	0.423	1.269	0.562	1.686
10	0.389	1.167	0.555	1.665
12	0.353	1.059	0.537	1.611
14	0.292	0.876	0.519	1.557

**Toluen**

<b>Hari ke</b>	<b>Kontrol pengenceran</b>	<b>OD Kontrol</b>	<b>Perlakuan Toluena pengenceran</b>	<b>OD Perlakuan Toluena</b>
0	0.026	0.026	0.029	0.087
2	0.439	1.317	0.506	1.518
4	0.506	1.518	0.567	1.701
6	0.513	1.539	0.666	1.998
8	0.423	1.269	0.686	2.058
10	0.389	1.167	0.661	1.983
12	0.353	1.059	0.533	1.599
14	0.292	0.876	0.485	1.455

**Lampiran 3. Data Biomasa sel (mg/mL)**

Hari ke	Massa pelet Kontrol	Massa pelet Perlakuan naftalen	Massa pelet Perlakuan heksadekana	Massa pelet Perlakuan Toluena
0	2	5	3	8
2	73	87	76	81
4	89	103	98	118
6	96	119	118	128
8	85	136	123	145
10	81	127	111	129
12	74	102	93	123
14	71	98	85	121

**Lampiran 4. Data pH**

Hari ke	pH kontrol	pH perlakuan Naftalen	pH perlakuan Heksadekan	pH perlakuan Fenantren
0	6.25	6.01	6.45	6.01
2	7.23	6.54	7.41	6.54
4	7.81	7.89	7.98	7.89
6	8.26	8.1	8.1	8.1
8	8.5	8.4	8.25	8.4
10	8.47	8.45	8.37	8.45
12	8.47	8.45	8.29	8.45
14	8.44	8.43	8.35	8.43



**Lampiran 5. Data Uji Aktivitas Enzim alkana hidroksilase dan dioksigenase.****Heksadekan**

Kontrol Negatif (blanko)	0.047
Kontrol Positif (NADH mula-mula)	0.132

Hari	Absorbansi Test		Absorbansi Test Absolut		$\Delta A_{340}$		Aktivitas Enzimatis (U/menit)	
	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan
0	0.177	0.175	0.130	0.128	0.002	0.004	0.129	0.257
2	0.174	0.142	0.127	0.095	0.005	0.037	0.322	2.379
4	0.172	0.131	0.125	0.084	0.007	0.048	0.450	3.087
6	0.169	0.126	0.122	0.079	0.010	0.053	0.643	3.408
8	0.170	0.119	0.123	0.072	0.009	0.060	0.579	3.859
10	0.172	0.121	0.125	0.074	0.007	0.058	0.450	3.730
12	0.174	0.130	0.127	0.083	0.005	0.049	0.322	3.151
14	0.176	0.137	0.129	0.090	0.003	0.042	0.193	2.701

**Naftalen**

Kontrol Negatif (blanko)	0.039
Kontrol Positif (NADH mula-mula)	0.124

Hari	Absorbansi Test		Absorbansi Test Absolut		$\Delta A_{340}$		Aktivitas Enzimatis (U/menit)	
	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan Naftalen
0	0.161	0.154	0.122	0.115	0.002	0.009	0.129	0.579
2	0.159	0.119	0.120	0.080	0.004	0.044	0.043	2.830
4	0.157	0.112	0.118	0.073	0.006	0.051	0.064	3.280
6	0.157	0.101	0.118	0.062	0.006	0.062	0.064	3.987
8	0.157	0.098	0.118	0.059	0.006	0.065	0.064	4.180
10	0.158	0.079	0.119	0.040	0.005	0.084	0.054	5.402
12	0.158	0.086	0.119	0.047	0.005	0.077	0.054	4.952
14	0.158	0.129	0.119	0.090	0.005	0.034	0.054	2.186

**Toluen**

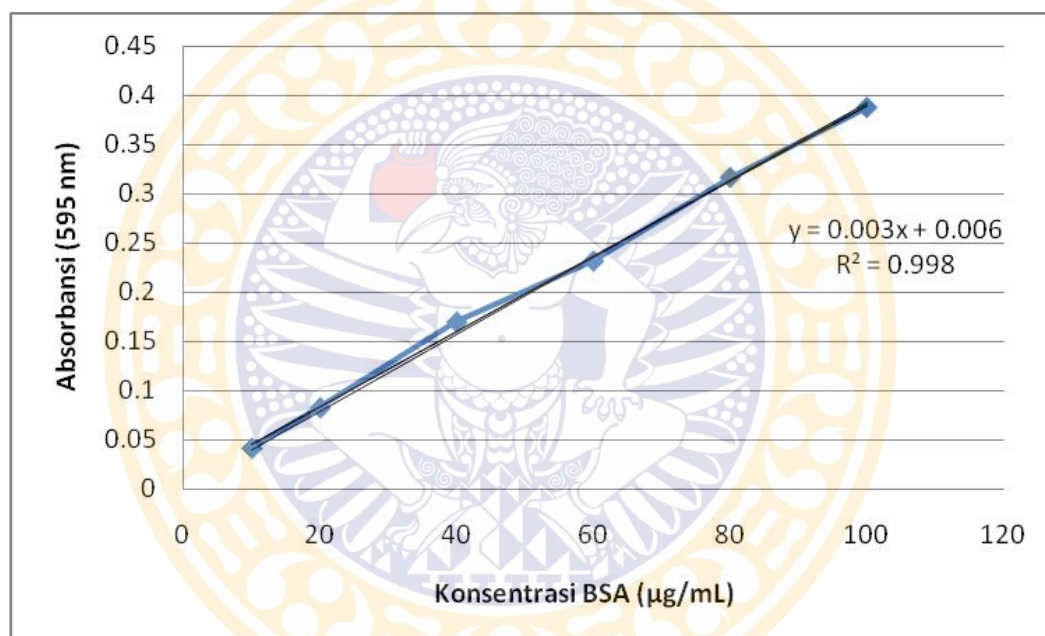
Kontrol Negatif (blanko)	0.040
Kontrol Positif (NADH mula-mula)	0.122

Hari	Absorbansi Test		Absorbansi Test Absolut		$\Delta A_{340}$		Aktivitas Enzimatis (U/menit)	
	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan
0	0.154	0.152	0.114	0.112	0.008	0.010	0.514	0.643
2	0.152	0.134	0.112	0.094	0.010	0.028	0.643	1.801
4	0.151	0.087	0.111	0.047	0.011	0.075	0.707	4.823
6	0.152	0.069	0.112	0.029	0.010	0.093	0.643	5.981
8	0.152	0.066	0.112	0.026	0.010	0.096	0.643	6.174
10	0.151	0.089	0.111	0.049	0.011	0.073	0.707	4.695
12	0.152	0.112	0.112	0.072	0.010	0.050	0.643	3.215
14	0.152	0.127	0.112	0.087	0.010	0.035	0.643	2.251

## Lampiran 6. Data Kadar Protein

### Kurva Standar BSA

Konsentrasi BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Adsorbansi (595 nm)		Rata-rata Adsorbansi
	A1	A2	
10	0.040	0.041	0.041
20	0.086	0.078	0.082
40	0.172	0.166	0.169
60	0.229	0.232	0.231
80	0.318	0.314	0.316
100	0.384	0.39	0.387



### Data Kadar Protein

Hari ke	Kadar protein Kontrol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kadar protein Naftalen ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kadar protein Heksadekan ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kadar protein Toluena ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	10	12	13	12
2	13	28	18	23
4	31	47	32	34
6	30	52	89	53
8	19	96	76	83
10	14	76	72	67
12	13	61	54	59
14	13	58	48	51

