

# Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



Diterbitkan oleh  
Pusat Penelitian Biologi - LIPI

**Berita Biologi** merupakan Jurnal Ilmiah ilmu-ilmu hayati yang dikelola oleh Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), untuk menerbitkan hasil karya-penelitian (original research) dan karya-pengembangan, tinjauan kembali (review) dan ulasan topik khusus dalam bidang biologi. Disediakan pula ruang untuk menguraikan seluk-beluk peralatan laboratorium yang spesifik dan dipakai secara umum, standard dan secara internasional. Juga uraian tentang metode-metode berstandar baku dalam bidang biologi, baik laboratorium, lapangan maupun pengolahan koleksi biodiversitas. Kesempatan menulis terbuka untuk umum meliputi para peneliti lembaga riset, pengajar perguruan tinggi maupun pekaryasiswa sarjana semua strata. Makalah harus dipersiapkan dengan berpedoman pada ketentuan-ketentuan penulisan yang tercantum dalam setiap nomor.

Diterbitkan 3 kali dalam setahun yakni bulan April, Agustus dan Desember. Setiap volume terdiri dari 6 nomor.

## Surat Keputusan Ketua LIPI

Nomor: 1326/E/2000, Tanggal 9 Juni 2000

### Dewan Pengurus

#### Pemimpin Redaksi

B Paul Naiola

#### Anggota Redaksi

Andria Agusta, Dwi Astuti, Hari Sutrisno, Iwan Saskiawan

Kusumadewi Sri Yulita, Marlina Ardiyani, Tukirin Partomihardjo

#### Desain dan Komputerisasi

Muhamad Ruslan, Yosman

#### Sekretaris Redaksi/Korespondensi Umum

(berlangganan, surat-menyurat dan kearsipan)

Enok, Ruswenti, Budiarjo

Pusat Penelitian Biologi—LIPI  
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)

Jln Raya Jakarta-Bogor Km 46,

Cibinong 16911, Bogor - Indonesia

Telepon (021) 8765066 - 8765067

Faksimili (021) 8765059

e-mail: [berita.biologi@mail.lipi.go.id](mailto:berita.biologi@mail.lipi.go.id)

[ksama\\_p2biologi@yahoo.com](mailto:ksama_p2biologi@yahoo.com)

[herbogor@indo.net.id](mailto:herbogor@indo.net.id)

Keterangan gambar cover depan: *Pembangunan perumahan di Passo dan tumpukan sampah yang mempercepat proses sedimentasi di areal hutan mangrove daerah Passo, Teluk Ambon, Maluku, sesuai makalah di halaman 481*

Suyadi - Bogor Agricultural University-SEAMEO Biotrop.



LIPI

# Berita Biologi

**Jurnal Ilmu-ilmu Hayati**

**ISSN 0126-1754**

Volume 9, Nomor 5, Agustus 2009

Terakreditasi A

SKKepala LIPI

Nomor 180/AU1/P2MBI/08/2009

**Diterbitkan oleh  
Pusat Penelitian Biologi - LIPI**

### Ketentuan-ketentuan untuk Penulisan dalam Jurnal Berita Biologi

1. Karangan ilmiah asli, *hasil penelitian* dan belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain. Makalah yang sedang dalam proses penilaian dan penyuntingan, tidak diperkenankan untuk ditarik kembali, sebelum ada keputusan resmi dari Dewan Redaksi.
2. Bahasa Indonesia. Bahasa Inggris dan asing lainnya, dipertimbangkan.
3. Masalah yang diliput, diharapkan aspek "baru" dalam bidang-bidang
  - Biologi dasar (*pure biology*), meliputi turunan-turunannya (mikrobiologi, fisiologi, ekologi, genetika, morfologi, sistematik/ taksonomi dsbnya).
  - Ilmu serumpun dengan biologi: pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan air tawar dan biologi kelautan, agrobiologi, limnologi, agrobioklimatologi, kesehatan, kimia, lingkungan, agroforestri.
  - *Aspek/ pendekatan biologi* harus tampak jelas.
4. Deskripsi masalah: harus jelas adanya tantangan ilmiah (*scientific challenge*).
5. Metode pendekatan masalah: standar, sesuai bidang masing-masing.
6. Hasil: hasil temuan harus jelas dan terarah.
7. Kerangka karangan: standar.  
*Abstrak* dalam bahasa Inggris, maksimum 200 kata, spasi tunggal, isi singkat, padat yang pada dasarnya menjelaskan masalah dan hasil temuan. Kata kunci 5-7 buah. Hasil dipisahkan dari Pembahasan.
8. Pola penulisan makalah: spasi ganda (kecuali abstrak), pada kertas berukuran A4 (70 gram), maksimum 15 halaman termasuk gambar/foto. Gambar dan foto harus bermutu tinggi; penomoran gambar dipisahkan dari foto. Jika gambar manual tidak dapat dihindari, harus dibuat pada kertas kalkir dengan tinta cina, berukuran kartu pos. Pencantuman Lampiran seperlunya.
9. Cara penulisan sumber pustaka: tuliskan nama jurnal, buku, prosiding atau sumber lainnya secara lengkap. Nama inisial pengarang(-pengarang) tidak perlu diberi tanda titik pemisah.
  - a. Jurnal  
**Premachandra GS, H Saneko, K Fujita and S Ogata. 1992.** Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *Journal of Experimental Botany* 43,1559-1576.
  - b. Buku  
**Kramer PJ. 1983.** *Plant Water Relationship*, 76. Academic, New York.
  - c. Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya dan sebagainya:  
**Hamzah MS dan SA Yusuf. 1995.** Pengamatan beberapa aspek biologi sotong buluh (*Septoteuthis lessoniana*) di sekitar perairan pantai Wokam bagian barat, Kepulauan Am, Maluku Tenggara. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XI*, Ujung Pandang 20-21 Juli 1993. M Hasan, A Mattimu, JG Nelwan dan M Litaay (Penyunting), 769-777. Perhimpunan Biologi Indonesia.
  - d. Makalah sebagai bagian dari buku  
**Leegood RC and DA Walker. 1993.** Chloroplast and Protoplast. In: DO Hall, JMO Scurlock, HR Bohlar Nordenkamp, RC Leegood and SP Long (Eds.). *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*, 268-282. Chapman and Hall. London.
10. Kirimkan 2 (dua) eksemplar makalah ke Redaksi (alamat pada cover depan-dalam) yang ditulis dengan program Microsoft Word 2000 ke atas. Satu eksemplar tanpa nama dan alamat penulis (-penulis)nya. Sertakan juga copy file dalam CD (bukan disket), untuk kebutuhan Referee/Mitra bestari. Kirimkan juga filenya melalui alamat elektronik (e-mail) resmi Berita Biologi: [berita.biologi@mail.lipi.go.id](mailto:berita.biologi@mail.lipi.go.id) dan di-Cc-kan kepada: [ksama\\_p2biologi@yahoo.com](mailto:ksama_p2biologi@yahoo.com), [herbogor@indo.net.id](mailto:herbogor@indo.net.id)
11. Sertakan alamat Penulis (termasuk elektronik) yang jelas, juga meliputi nomor telepon (termasuk HP) yang dengan mudah dan cepat dihubungi.

## Anggota Referee / Mitra Bestari

### **Mikrobiologi**

Dr Bambang Sunarko (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Prof Dr Feliatra (*Universitas Riau*)  
Dr Heddy Julistiono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr I Nengah Sujaya (*Universitas Udayana*)  
Dr. Joko Sulistyono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Joko Widodo (*Universitas Gajah Mada*)  
Dr Lisdar I Sudirman (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Ocky Kama Radjasa (*Universitas Diponegoro*)

### **Mikologi**

Dr Dono Wahyuno (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Deptan*)  
Dr Kartini Kramadibrata (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Genetika**

Prof Dr Alex Hartana (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Warid AH Qosim (*Universitas Padjadjaran*)  
Dr Yuyu Suryasari Poerba (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Taksonomi**

Dr Ary P Keim (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Daisy Wowor (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Prof (Ris) Dr Johanis P Moge (Pusat Penelitian Biologi-LIPI)  
Dr Rosichon Ubaidillah (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Biologi Molekuler**

Dr Eni Sudarmonowati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)  
Dr Endang Gati Lestari (*BB Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian-Deptan*)  
Dr Hendig Sunarno (*Badan Tenaga Atom Nasional*)  
Dr I Made Suidiana (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Nurlina Bermawie (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Deptan*)  
Dr Yusnita Said (*Universitas Lampung*)

### **Bioteknologi**

Dr Andi Utama (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)  
Dr Nyoman Mantik Astawa (*Universitas Udayana*)

### **Veteriner**

Prof Dr Fadjar Satrija (*FKH-IPB*)

### **Biologi Peternakan**

Prof (Ris) Dr Subandryono (*Pusat Penelitian Ternak-Deptan*)

### **Ekologi**

Dr Didik Widyatmoko (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)  
Dr Dewi Malia Prawiradilaga (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Frans Wospakrik (*Universitas Papua*)  
Dr Herman Daryono (*Pusat Penelitian Hutan-Dephut*)  
Dr Istomo (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Michael L Riwu Kaho (*Universitas Nusa Cendana*)  
Dr Sih Kahono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Biokimia**

Prof Dr Adek Zamrud Adnan (*Universitas Andalas*)  
Dr Deasy Natalia (*Institut Teknologi Bandung*)  
Dr Elfahmi (*Institut Teknologi Bandung*)  
Dr Herto Dwi Ariesyadi (*Institut Teknologi Bandung*)  
Dr Tri Murningsih (*Pusat Penelitian Biologi -LIPI*)

### **Fisiologi**

Prof Dr Bambang Sapto Purwoko (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr Gono Semiadi (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Irawati (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)  
Dr Nuril Hidayati (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)  
Dr Wartika Rosa Farida (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

### **Biostatistik**

Ir Fahren Bukhari, MSc (*Institut Pertanian Bogor*)

### **Biologi Perairan Darat/Limnologi**

Dr Cynthia Henny (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)  
Dr Fauzan AH (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)  
Dr Rudhy Gustiano (*Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar-DKP*)

### **Biologi Tanah**

Dr Rasti Saraswati (*BB Sumberdaya Lahan Pertanian-Deptan*)

### **Biodiversitas dan Iklim**

Dr Rizaldi Boer (*Institut Pertanian Bogor*)  
Dr. Tania June (*Institut Pertanian Bogor*)

### **Biologi Kelautan**

Prof Dr Chair Rani (*Universitas Hasanuddin*)  
Dr Magdalena Litaay (*Universitas Hasanuddin*)  
Prof (Ris) Dr Ngurah Nyoman Wiadnyana (*Pusat Riset Perikanan Tangkap-DKP*)  
Dr Nyoto Santoso (*Lembaga Pengkajian dan Pengembangan Mangrove*)

Berita Biologi menyampaikan terima kasih  
kepada para Mitra Bestari/ Penilai (Referee) nomor ini  
9(5)-Agustus 2009

Dr. Andria Agusta - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Dr. Bambang Sunarko - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Dr. Heddy Yulistiono - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Dr. Iwan Saskiawan - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Prof. (Ris.) Dr. Johanis P. Moge - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Magdalena Litaay - *FMIPA Universitas Hasanudin*  
Dr. Rasti Saraswati - *BB Sumberdaya Lahan Pertanian-Deptan*  
Dr. Tukirin Partomohardjo - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Dr. Yuyu Suryasari Poerba - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*

#### Referee/ Mitra Bestari Undangan

Dr. Achmad Dinoto - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Drs. Edi Mirmanto, MSc. - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Dr. Herwint Simbolon - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Dr. Ibnu Maryanto - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI*  
Dr. Kuswata Kartawinata - *Pusat Penelitian Biologi-LIPI (Purnabhakti) / UNESCO*  
Dr. Niken T Murti Pratiwi - *Faperikan @ Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor*  
Dr. Ocky Kama Radjasa - *Faperikan @ Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro*  
Wellyzar Sjamsulrizal, PhD - *FMIPA Universitas Indonesia*

## DAFTAR ISI

TINJAUAN ULANG (REVIEW PAPERS)

## KONSEP JEMS PALEM: SEBUAH PENGANTAR

[Palm Species Concept: A Foreword]

*Himmah Rustiami*.....459MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)KINERJA *Saccharomyces cerevisiae* REKOMBINAN [GLOI] DALAM PROSES SIMULTAN  
HIDROLISIS PATI DAN FERMENTASI UNTUK PRODUKSI BIOETANOL[The Performance of *Saccharomyces cerevisiae* Recombinant [GLOI] in the Producing Bioethanol  
from Starch by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Conditions]*Afqf Baktir, Nur Cholifah dan Sri Sumarsih*.....465PENINGKATAN PRODUKSI GAS HIDROGEN (H<sub>2</sub>) DAN ETANOL PADA *Bacillus pumilus*  
DENGAN MUTASI MENGGUNAKAN *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS) DAN SELEKSI  
DENGAN METODAPROTON SUICIDE[Enhancement of Hydrogen Gas (H<sub>2</sub>) and Ethanol Production in *Bacillus pumilus* by Mutation  
Using Ethyl Methane Sulfonate (EMS) and Selected by Proton Suicide Method]*Trismilah dan Mahyudin AR*.....473KONDISI HUTAN MANGROVE DI TELUK AMBON: PROSPER DAN TANTANGAN  
[The Condition of Mangrove Forest in Ambon Bay: Prospect and Challenges]*Suyadi*.....481STUDI VEGETASI HUTAN RAWA AIR TAWAR DI CAGAR ALAM RIMBO PANTI,  
SUMATERA BARAT

[Vegetation Study on Freshwater Swamp forest of Rimbo Panti Nature Reserve, West Sumatera]

*Razali Yusuf dan Purwaningsih*.....491IDENTIFIKASI MOLEKULAR ISOLAT KAPANG PENGHASIL p GLUCAN BERDASARKAN  
DAERAH INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)[Molecular Identification of Fungal Isolate Produces ( Glucan Based on Internal  
Transcribed Spacer (ITS)]*Yoice Srikandace, Ines Irene CaterinaA dan Wibowo Mangunwardoyo*.....509ABSORBSI GLUKOSA DAN SUKROSA SEBAGAI SUMBER KARBON UTAMA  
OLEH KOMUNITAS MPG PADA KONDISI ANAEROBIK AEROBIK[Absorbition of Glucose and Sucrose as Main Sources of Carbon by MPG Community in  
Anaerobic Aerobic Condition!]*Dyah Supriyati*.....517UJI DAYA HAMBAT DAUN SENGGANI (*Melastoma malabathricum* L.) TERHADAP  
*Trichophyton mentagrophytees* DAN *Candida albicans*[Inhibition Potential of *Melastoma malabathricum* L. Leaves Against *Trichophyton mentagrophytees*  
and *Candida albicans*]*Djaenudin Gholib*.....523PERTUMBUHAN DAN AKUMULASI MERKURI BERBAGAI JENIS TUMBUHAN YANG DITA  
DI MEDIA LIMBAH PENAMBANGAN EMAS DENGAN PERLAKUAN BERBAGAI TINGKAT  
KONSENTRASI MERKURI DAN KELAT AMONIUM TIOSULFAT[Growth and Mercury Accumulation on Various Plant Species Grown on Gold Mine Waste Media  
Treated with Different Levels Of Mercury Concentration and Ammonium Thiosulfate  
as Chelating Agent]*Titi Juhaeti, N Hidayati, F Syarif dan S Hidayat*.....529PENINGKATAN PRODUKSI BENIH BAUNG (*Mystus nemurus*) MELALUI PERBAIKAN  
KADAR LEMAK PAKAN INDUK[Producing Good Quality Seed of Green Catfish (*Mystus nemurus*) by Improvement of Lipid Level  
of Broodstock Feed]*Ningrum Suhenda, Reza Samsudin dan Jojo Subagja*.....539

ANALISA VEGETASI HUTAN RIPARIAN DATARAN RENDAH DI TEPI SUNGAI NGGENG, TAMAN NASIONAL KAYAN MENTARANG, KALIMANTAN TIMUR [Vegetation Analysis of Lowland Riparian Forest at Nggeng River Side in Kayan Mentarang National Park, East Kalimantan] <i>Purwaningsih</i> .....	547
SISTEM SOSIAL JANTAN MONYET HITAM SULAWESI ( <i>Macaco nigra</i> ) DI CAGAR ALAM TANGKOKO-BATUANGUS, SULAWESI UTARA [Male Social System of Sulawesi Crested Black Macaques ( <i>Macaca nigra</i> ) at Tangkoko-Batuangus, North Sulawesi] <i>Saroyo</i> .....	561
STUDI FITOKIMIA <i>Baekeafrutescens</i> L: PENGARUH FAKTOR LINGKUNGAN TERHADAP KOMPOSISI KIMIA MINYAK ATSIRI [Phytochemical Study of <i>Baekeafrutescens</i> L.: Environmental Influence on Chemical Composition of its Essential Oils] <i>Tri Murningsih</i> .....	569
VARIASIINTRASPEKIES <i>Monascuspurpureus</i> DALAM BERBAGAI SAMPEL ANGKAK DARI JAWA TIMUR [Intraspecific Variation within <i>Monascus purpureus</i> in some Angkak (Chinese Red Rice) Samples from East Java] <i>Nandang Suharna</i> .....	577
KONDISI OPTIMUM FUSIPROTOPLAS ANTARA JAMUR TIRAM PUTIH ( <i>PLEUROTUS FLORIDAE</i> ) DAN JAMUR TIRAM COKLAT ( <i>PLEUROTUS CYSTIDIOSUS</i> ) [Optimizing Conditions for Protoplast Fusion between White Oyster Mushroom ( <i>Pleurotus floridae</i> ) and Brown Oyster Mushroom ( <i>Pleurotus cystidiosus</i> )] <i>Ira N. Djajanegara dan Korri El-khobar</i> .....	585
INTERSPECIFIC ASSOCIATION PATTERNS AND EDAPHIC FACTORS' INFLUENCES: A CASE STUDY OF <i>Orania regalis</i> Zippelius IN WAIGEO ISLAND, WEST PAPUA [Pola Asosiasi Antarspesies dan Pengaruh Faktor Edafik: Studi Kasus <i>Orania regalis</i> Zippelius di Pulau Waigeo, Papua Barat] <i>Didik Widyatmoko</i> .....	595
EVALUASI KARAKTER PEKA PANJANG HARI (PHOTOPERIOD) PADA TIGA GOLONGAN (subspecies) PADI ( <i>Oryza sativa</i> ) SERTA PENGARUHNYA TERHADAP KARAKTER AGRONOMIS [Evaluation of Photoperiod Sensitive Character in Three Groups (subspecies) of Rice ( <i>Oryza sativa</i> ) and The Influence of Agronomic Characters] <i>Tintin Suhartini</i> .....	609
STATUS HARA DI HUTAN GEWANG ( <i>Corypha Man</i> Lamk.), DESA USAPI SONBA'I, KUPANG, NUSA TENGGARA TIMUR [Status in The Forest Gewang Nutrients ( <i>Corypha utan</i> Lamk.), Usapi Sonba'i, Kupang, East Nusa Tenggara] <i>Laode Alhamd, T Partomihardjo dan BP Naiola</i> .....	619
TEGAKAN BAMBU DI KEBUN RAKYAT KOTAMADYA SALATIGA [Bamboo Stands in The Community Garden at Salatiga District] <i>Elizabeth A. Widjaja, Sunaryo, Hamzah</i> .....	629
EKOLOGI DAN PERSEBARAN GEWANG ( <i>Corypha utan</i> Lamk.) DI SAVANA TIMOR, NUSA TENGGARA TIMUR [Ecology and Distribution of Gewang ( <i>Corypha utan</i> Lamk.) in Timor Savannah, East Lesser Sunda Islands] <i>Tukirin Partomihardjo dan BP Naiola</i> .....	637

**PENINGKATAN PRODUKSI GAS HIDROGEN (H<sub>2</sub>) DAN ETANOL PADA *Bacillus pumilus* DENGAN MUTASI MENGGUNAKAN *Ethyl Methane Sulfonate* (EMS) DAN SELEKSI DENGAN METODA PROTON SUICIDE<sup>1</sup>**

**[Enhancement of Hydrogen Gas (H<sub>2</sub>) and Ethanol Production in *Bacillus pumilus* by Mutation Using Ethyl Methane Sulfonate (EMS) and Selected by Proton Suicide Method]**

**Trismilah<sup>N</sup> dan Mahyudin AR**

Pusat Teknologi Bioindustri-BPPT

Jin MH Thamrin No.8, Gd. II, Lt 15, Jakarta 10340

Telp. (021)3169521, Fax. (021) 3169510

**ABSTRACT**

Mutation by using Ethyl Methane Sulphonate (EMS) was carried out in the study of the enhancement of H<sub>2</sub> and ethanol production in *Bacillus pumilus*. Target mutant was selected by using proton suicide method. Bacterial suspensions was spread into agar minimal medium containing 13 or, 14, 15 and 16  $\mu$ l of Ethyl Methane Sulphonate (EMS) and incubated at 37 °C for 3, or 4, or 5, or 6 hours. The method of proton suicide was applied by the addition of equimolar of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 180, 185, 190, 195, 200 mM NaBr and NaBrO<sub>3</sub>. Triphenyl tetra chloride (TTC) was also added as indicator into agar plate in order to distinguish between wild type and mutants. Fermentation was carried out using glycerol complex medium. Hydrogen gas (H<sub>2</sub>) contain was determined by the replacement of NaCl solution in cylindrical glass and the ethanol was measured by gas chromatography. After mutation, several mutants were observed. In Mutant ( Asp8) which was obtained by treatment of 195 equimolar of NaBr and NaBrO<sub>3</sub>, production of ethanol and H<sub>2</sub> were higher 10 fold and 1.13 fold, respectively compare to the wild type while acids production decreased. The data indicated that mutation might provoke metabolic alteration especially in acid production.

**Kata kunci:** *Bacillus pumilus*, mutasi, gas hidrogen, etanol, sumber energi baru alternatif.

**PENDAHULUAN**

Pada masa mendatang telah diyakini oleh banyak negara maju seperti Amerika, Kanada, Jepang dan Eropa, untuk menjadikan khususnya H<sub>2</sub> yang oleh *fuel cell* diubah dari sumber energi kimia menjadi energi listrik, sebagai energi alternatif pada tahun 2025, dimana H<sub>2</sub> akan menjadi basis pergerakan dunia menggantikan minyak bumi. Gas H<sub>2</sub> diketahui dapat digunakan untuk pengganti minyak bumi dan gas alam (Claassen *et al.*, 1999). Untuk mengurangi ketergantungan minyak bumi, selain usaha penghematan energi karena meningkatnya kebutuhan sumber energi misal kebutuhan listrik, gas H<sub>2</sub> dan etanol merupakan sumber energi baru alternatif dan terbarukan. Gas H<sub>2</sub> berpotensi besar sebagai sumber energi masa depan yang ramah lingkungan karena tidak memiliki ikatan kimia dengan karbon, sehingga tidak menghasilkan emisi yang dapat mencemari lingkungan (Ginkel *et al.*, 2001). Menurut Levin *et al.* (2004) pembakaran H<sub>2</sub> tidak akan menimbulkan efek rumah kaca, penipisan lapisan ozon atau hujan asam karena

hanya menyisakan uap air dan energi panas di udara. Biohidrogen adalah H<sub>2</sub> yang dapat dihasilkan dengan bantuan mikroorganisme. Etanol diproduksi oleh mikroba melalui fermentasi gula dan dapat digunakan sebagai bahan bakar untuk mobil. Etanol dapat dicampur dengan bensin yang disebut bio-etanol dalam kuantitas yang bervariasi untuk mengurangi konsumsi bahan bakar minyak bumi, dan juga untuk mengurangi polusi udara.

Gliserol dapat dimanfaatkan sebagai substrat oleh beberapa mikroorganisme (Brock *et al.*, 1994). Gliserol diubah bentuknya melalui dihydroxyacetone menjadi glyceraldehyde-3-phosphate dan selanjutnya menjadi piruvat. Dari gliserol muncul produk oksidasi dari piruvat menjadi perpecahan acetyl CoA dan formate yang menghasilkan pembentukan etanol, asetat, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> (Mickelson dan Werkman, 1940). Asam piruvat dengan bantuan enzim piruvat format liase (PFL) akan membentuk asam format yang kemudian terhidrolisis menjadi H<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub> dengan bantuan enzim format hidrogenliase (Xi Chen *et al.*, 2003).

*Diterima: 4 Mei 2009 Disetujui: 5 juli 2009*

Beberapa mikroba yang dapat memanfaatkan gliserol sebagai sumber energi dan nutrisinya antara lain *Bacillus pumilus*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Enterobacter aerogenes* dan lain-lain. Mikroba-mikroba tersebut mampu mengubah gliserol menjadi H<sub>2</sub>, etanol, propandiol, asam asetat, asam laktat, asam piruvat dan asam organik lainnya (Anonymous, 2008). Mutagenesis memiliki dua cara yaitu mutagenesis secara keseluruhan dan mutagenesis pada bagian spesifik. Mutagenesis pada bagian keseluruhan adalah untuk memutasi kromosom DNA secara random dan sering dipergunakan sebagai usaha untuk mengembangkan fenotip. Sedangkan mutagenesis pada bagian yang spesifik dilakukan dengan teknik rekombinan DNA dengan mengubah pasangan basa pada kromosom (Cutting dan Horn, 1990). Perubahan metabolisme pada mikroorganisme dapat dilakukan dengan mutagenesis menggunakan suatu mutagen, antara lain mutagen kimia yang dapat menyebabkan mutasi secara acak pada basa DNA (Sambrook dan Russell, 2001). Ethyl Methane Sulfonate (EMS) merupakan mutagen kimia yang bersifat sebagai alkylating agent. Gugus alkil senyawa EMS akan berikatan dengan basa guanin (G) membentuk O6-alkilguanin, menyebabkan kesalahan pemasangan basa guanin dengan basa timin pada proses replikasi DNA (Meuth dan Arrand, 1982). Salah satu kerusakan yang ditimbulkan akibat pemberian zat kimia sebagai mutagenik adalah berasal dari proses alkilasi, yaitu proses pemindahan gugus metil atau etil ke bagian reaktif basa dan pospat dalam rantai DNA.

Seleksi dan isolasi mutan dilakukan menggunakan indikator tertentu yakni 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). Seperti dilaporkan Salem *et al.* (1985) bahwa mutan *St. mutans* yang memproduksi asam laktat rendah setelah dimutasi dengan EMS ditunjukkan dengan koloni berwarna merah muda sampai merah pada medium yang mengandung indikator tersebut, sedangkan koloni normal berwarna putih.

Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Bacillus pumilus* sebagai mikroorganisme penghasil H<sub>2</sub>-etanol karena kemampuan metabolisme untuk memproduksi senyawa tersebut menjadi beberapa metabolit yang bermanfaat dengan menggunakan

gliserol ataupun dari limbah biodiesel. Dari penelitian ini diharapkan dengan mutagen EMS serta penambahan NaBr dan NaBrO<sub>3</sub>, *B. pumilus* dapat meningkatkan produksi gas hidrogen dan etanol.

## BAHAN DAN METODA

**Mikroorganisme.** Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri *B. pumilus* BPPTCC 1-0025 yang tersimpan dalam cryo-tube pada freezer -83°C yang merupakan koleksi dari Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB), BPPT, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong.

**Pembuatan Medium.** Medium dibagi menjadi beberapa bagian, yakni medium kompleks pemeliharaan kultur *B. pumilus*, medium penapisan kontrol, medium penapisan dengan penambahan NaBr dan NaBrO<sub>3</sub> dan medium fermentasi.

**Medium kompleks pemeliharaan kultur *B. Pumilus*.** Medium kompleks pemeliharaan kultur *B. pumilus* dibuat berdasarkan Rachman *et al.* (1997). Sebanyak 0,5 ml unsur makro yang terdiri dari (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.O Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,5 ml unsur mikro terdiri dari Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, dan asam nikotinat; 0,25 g ekstrak khamir, dan 0,25 g tripton dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades hingga 35 ml. Derajat keasaman (pH) medium diukur menggunakan pH meter dan ditambahkan NaOH 0,1 N hingga tepat menjadi 6,8. Medium yang terdapat dalam erlenmeyer tersebut ditutup dengan sumbat lalu dilapisi dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam water bath selama 20 menit pada suhu 100°C. Medium didinginkan dengan memasukkan erlenmeyer ke dalam baki yang berisi es hingga suhu media tersebut sama dengan suhu ruang, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Gliserol dan buffer fosfat disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah dan ditambahkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 5 ml gliserol 10% dan 5 ml buffer setelah proses sterilisasi selesai dan agak dingin. Lalu dipindahkan ke botol serum dan disegel.

**Medium penapisan kontrol.** Medium penapisan dibuat berdasarkan modifikasi Hillman (1979). Sebanyak 2,5 g TTC dilarutkan dalam akuades hingga 1000 ml,

kemudian disterilisasi menggunakan membrane filter 0,2 $\mu$ . Sebanyak 10 ml unsur makro, 10 ml unsur mikro, **5 g ekstrak** khamir, 5 g tripton dan 20 g agar dilarutkan **dengan** akuades hingga 605 ml, kemudian dipanaskan hingga mendidih. Lalu medium didinginkan hingga suhu kurang dari 50 °C, kemudian pH medium diukur menggunakan pH meter dan ditambahkan NaOH 0,1N hingga tepat menjadi 6,8. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Buffer fosfat pH 6,8 sebanyak 100 ml dan 50 ml gliserol yang disterilisasi secara terpisah ditambahkan ke dalam medium dan diaduk hingga homogen setelah suhu kurang dari 50°C secara aseptis. Dan terakhir senyawa TTC 1% ditambahkan sebanyak 25 ml ke dalam campuran buffer, gliserol dan agar.

**Medium penapisan dengan penambahan ekuimolar NaBr dan NaBrO<sub>3</sub>.** Cara pembuatan medium ini sama seperti pembuatan medium kontrol, hanya saja ada penambahan ekuimolar NaBr dan NaBrO<sub>3</sub> yang disebut *proton suicide methode* (PSM). Penambahan toksik tersebut diberikan dengan variasi konsentrasi: 0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,75,100,125,150, 175,180,185,190,195 dan 200 mM.

**Medium fermentasi.** Medium kompleks gliserol untuk pembuatan starter pada fermentasi *B. pumilus* hasil mutasi dibuat berdasarkan Rachman *et al.* (1997). Sebanyak 5 ml unsur mikro, 5 ml unsur makro, 0,25 g ekstrak khamir, 0,25 g tripton dan akuades hingga volume total menjadi 35 ml dimasukkan kedalam erlenmeyer. Derajat keasaman (pH) medium diukur menggunakan pH meter dan ditambahkan NaOH 0,1 N hingga tepat menjadi 6,8. Medium dipanaskan dalam water bath selama 20 menit pada suhu 100°C. Medium didinginkan menggunakan es dan dipindahkan ke botol serum, kemudian diberikan gas N<sub>2</sub> selama satu menit. Botol serum ditutup dan disegel dan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. 5 ml gliserol 10% dan 5 ml buffer fosfat disterilisasi dengan autoklaf secara terpisah dan ditambahkan ke dalam botol serum menggunakan jarum suntik setelah proses sterilisasi selesai dan agak dingin.

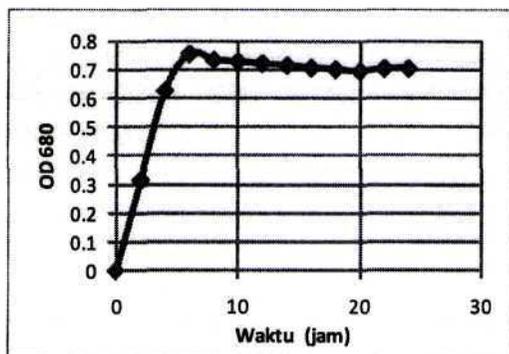
**Kurva Pertumbuhan.** Pembuatan kurva pertumbuhan sel *B. Pumilus*. Persiapan kultur sebagai starter berdasarkan Rachman *et al.* (1997). Sebanyak 5 ml *B. pumilus* dari kultur kerja berumur 24 jam diambil

menggunakan jarum suntik ke dalam 50 ml medium kompleks gliserol dalam botol serum. Kultur tersebut diinkubasi selama 20 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Sebanyak 5 ml kultur pada botol serum diambil dan dipindahkan ke dalam 50 ml medium kompleks gliserol yang baru, kemudian sebanyak 1 ml kultur tersebut dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur kerapatan sel (OD) pada panjang gelombang ( $X$ ) 680 nm dengan spektrofotometer. OD diukur setiap 2jam dari inokulasi kultur selama 24 jam. Hasil yang diperoleh kemudian diplotkan pada kurva pertumbuhan dengan menetapkan waktu pengukuran sebagai absis dan rerata OD sebagai ordinat. Penentuan titik fase logaritmik optimum dengan cara mengukur setiap 30 menit OD nya pada fasa logaritmik yang diperoleh dari kurva pertumbuhan.

**Penentuan konsentrasi EMS untuk perlakuan mutasi.** Perlakuan EMS berdasarkan metode kombinasi Hilman (1979) dan Rachman *et al.* (1997). Sebanyak 1 ml kultur yang berada pada fase logaritmik optimum diambil menggunakan jarum suntik dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pellet disuspensikan dengan 1 ml buffer fosfat pH 7, kemudian disentrifugasi. Proses tersebut dilakukan sebanyak dua kali. Supernatan dibuang dan pellet disuspensi kembali dengan buffer fosfat pH 7, kemudian ditambahkan EMS 13, 14, 15 dan 16  $\mu$ l dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 jam dalam *shaker inkubator* pada putaran 150 rpm. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan pellet disuspensikan dengan 1 ml medium kompleks gliserol dan disentrifugasi. Suspensi sel diencerkan hingga pengenceran 10<sup>6</sup> dan 10<sup>7</sup> dalam medium kompleks gliserol, kemudian 0,1 ml ditambahkan ke dalam medium penapisan yang mengandung TTC dan disebar hingga merata dengan spatel Drygalski dengan dua pengulangan. Kontrol negatif dilakukan dengan mengambil 1 ml kultur yang berada pada fase log optimum dengan menggunakan jarum suntik dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus. Kultur tersebut disebar pada medium penapisan sebanyak 0,1 ml dengan dua kali pengulangan.

**Fermentasi dan pengukuran produk.** Koloni mutan yang dipilih dari hasil mutasi dengan EMS digores ke agar miring. Starter dibuat dengan menginokulasikan satu ose mutan hasil seleksi ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml medium kompleks gliserol. Kultur untuk starter tersebut diinkubasi selama 20 jam dalam inkubator pada suhu 37°C, selanjutnya sebanyak 5 ml starter diinokulasikan kedalam botol serum 125 ml yang berisi 45 ml medium fermentasi. Fermentasi dilakukan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam pH kultur diukur menggunakan pH meter dan OD. Pengukuran jumlah H<sub>2</sub> (ml) dilakukan menggunakan respirometer. Jarum yang terdapat pada selang respirometer dimasukkan ke dalam botol serum setiap sampel melalui tutup karet pada botol. Gas yang terdapat pada botol serum akan mengalir melalui selang. Gas CO<sub>2</sub> akan berikatan dengan Ca(OH)<sub>2</sub> dalam erlenmeyer, sedangkan H<sub>2</sub> masuk ke dalam tabung respirometer yang berisi larutan NaCl jenuh. Jumlah H<sub>2</sub> yang dihasilkan ditunjukkan oleh perbedaan volume larutan NaCl antara silinder dalam (silinder kecil) dengan silinder luar (silinder besar) pada respirometer (Purwanto, 2006). Volume H<sub>2</sub> yang terukur dihitung berdasarkan perbedaan volume yang terjadi akibat tekanan gas H<sub>2</sub> antara silinder besar dan silinder kecil. Produksi H<sub>2</sub> diukur melalui perhitungan berikut:

- 1)  $Mol\ H_2\ (mol) = \frac{volume\ H_2\ yang\ terukur\ (ml) + 75}{12400}$
- 2)  $Mol\ substrat\ (mol) = \frac{massa\ gliserol\ (g)}{massa\ relatif\ gliserol}$
- 3)  $Produktivitas\ H_2 = \frac{mol\ H_2}{mol\ gliserol}$



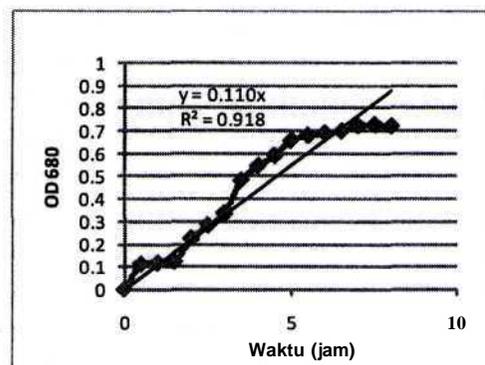
**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *B. pumilus* dengan medium kompleks gliserol.

**HASIL**

Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa fase log terjadi pada sampai dengan jam ke-8. Fase stasioner dimulai setelah jam ke-7 atau jam ke-8 dan pada jam ke-24 dianggap telah mengalami kematian. Titik fase logaritmik optimum tidak dapat diamati pada kurva, karena pergantian dari fase log optimum ke fase stasioner pada kultur *B. pumilus* terjadi sangat cepat dan diperkirakan fase tersebut terjadi setelah jam ke-7 atau jam ke-8.

Perlakuan mutasi pada kultur sel dilakukan saat kultur sel berada dalam fase logaritmik oleh karena itu transisi fase log optimum dan fase stasioner pada *B. pumilus* diamati dengan data setiap 30 menit seperti terlihat pada Gambar 2. Hasilnya fase log optimum terjadi pada jam ke-6,5 dan memiliki pertumbuhan yang sangat baik pada medium kompleks gliserol.

Variasi konsentrasi EMS yang digunakan pada penelitian yaitu 13,14,15, dan 16 µl/ml suspensi bakteri dengan waktu inkubasi selama 5 jam. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 5 jam, semakin besar konsentrasi EMS yang diberikan, maka jumlah koloni yang tumbuh semakin sedikit. Hal ini ditandai dengan kematian 100% atau tidak ada koloni yang tumbuh pada pemberian EMS sebanyak 16 µl/ml suspensi bakteri (data tidak ditampilkan). Oleh sebab itu ditetapkan konsentrasi 15 µl EMS/ml suspensi bakteri dipilih berdasarkan peluang perubahan DNA yang lebih tinggi pada gen pengkode laktat dehidrogenase akibat alkilasi yang diakibatkan oleh gugus etil pada EMS. Menurut Meuth and Arrand (1982), mutasi menggunakan EMS dapat menyebabkan



**Gambar 2.** Kurva pertumbuhan *B. pumilus* dengan medium kompleks gliserol pada fase logaritmik.

**kesalahan** pemasangan basa (mispairing), sehingga **terjadi** transisi basa GT menjadi AT pada replikasi DNA. **Mutasi** tersebut, apabila terjadi pada gen yang berperan prating dalam sintesis suatu metabolit maka dapat menyebabkan perubahan produktivitas.

Untuk memastikan pemberian EMS pada konsentrasi 15  $\mu\text{l/ml}$  suspensi bakteri terbaik dibuktikan **jumlah** koloni yang sangat sedikit mendekati kematian **100** %. Lebih lanjut juga dipelajari pada 15  $\mu\text{l/ml}$  suspensi bakteri dengan variasi perubahan waktu **inkubasi** selama 3,4, 5, dan 6 jam seperti tertera pada Tabell.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa berdasarkan hasil penelitian dengan variasi waktu inkubasi selama 3,4,5 **dan** 6 jam pada pemberian 15  $\mu\text{l}$  EMS/ml suspensi bakteri memperlihatkan jumlah koloni yang menurun dengan

bertambahnya waktu kontak antara EMS dengan kultur dari *B. pumilus*. Selanjutnya kultur bakteri hasil perlakuan mutasi pada konsentrasi 15  $\mu\text{l}$  EMS/ml suspensi bakteri dan waktu inkubasi selama 5 jam disebar pada medium penapisan yang mengandung 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 0,00025 % (W/V) dan sodium NaBr dan NaBrO<sub>3</sub> dengan variasi konsentrasi 0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,75,100, 125,150,175,180,185,190,195 dan 200 mM, diinkubasi selama 24 jam pada inkubator suhu 37 °C. Di dalam prosedur ini, garam sodium bromat dan bromid yang ditambahkan pada medium pertumbuhan akan bereaksi untuk melepaskan racun brom bagi suatu lingkungan yang asam. Sel yang memproduksi asam menjadi mati, dan yang diharapkan bertahan pada mutasi ini adalah sel yang dapat mempengaruhi sintesis asam menuju

**Tabel 1.** Hasil mutagenesis menggunakan 15 ( $\mu\text{l}$  EMS/ml suspensi bakteri dengan variasi waktu inkubasi selama 3, 4,5, dan 6 jam

Waktu inkubasi (Jam)	Jumlah Koloni			
	Pengenceran			
	$10^2$		$10^{-3}$	
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 1	Ulangan 2
3	303	328	195	194
4	72	143	33	42
5	1	0	1	0
6	0	0	0	0

**Tabel 2.** Hasil mutagenesis dengan kombinasi EMS dan *Proton Suicide Methode* (PSM)

N	Pengenceran	Jumlah koloni															
		Konsentrasi NaBr dan NaBrO <sub>3</sub> (mM)															
		0	10	20	30	35	40	45	50	100	125	150	175	180	190	195	200
1	$10^{-7}$				—	—	0	0	0								
2	$10^{-6}$				1	—	—	—	—								
3	$10^{-5}$	+++	18	14	0	—	—	—	2								
4	$10^{-4}$	+++ +	81	55	4	1	—	—	4								
5	$10^{-3}$	+++ ++	+++	++	33	4	9	16	6								
6	$10^{-2}$	0	0	+++ +	0	0	67	91	120	155	62	2	...				
7	$10^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	176	126	3	...				
8	TP	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	174	2	2	2	1	1

Keterangan: TP= tanpa pengenceran, 0 = tidak dibuat, ++ = tidak terhitung (sedikit), +++ = tidak terhitung (sedang), ++++ = tidak terhitung (banyak), +++++ = tidak terhitung (banyak sekali), — = tidak tumbuh koloni

pembentukan etanol dan H<sub>2</sub>.

Tabel 2 diatas menunjukkan bahwa semakin banyak penambahan bromat dan bromid terhadap suspensi sel bakteri pada media penapisan jumlah koloni semakin berkurang, hal ini menunjukkan peran dari pada senyawa bromine yang bersifat toksik terhadap sel-sel yang menuju kepembentukan asam. Foto 3 dibawah ini adalah gambar koloni wild type (WT) dan mutan *B. pumilus* yang dipilih berdasarkan hasil seleksi mutagenesis menggunakan kombinasi mutagen EMS dan PSM yang akan difermentasi agar

menghasilkan produk-produk metabolit dengan yield yang tinggi.

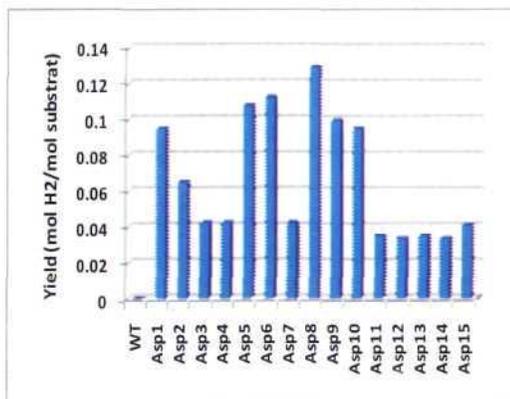
Hasil fermentasi dari mutan-mutan tersebut diatas dapat di lihat pada Tabel 3, Gambar 4 dan Gambar 5. Mutan ASP 3 memperlihatkan pH akhir fermentasi dengan koloni berwarna pink yaitu 6,23. Dan pada ASP 4 dengan koloni yang tidak memiliki warna merah secara merata yaitu 6,66; begitujuga dengan ASP 14 dengan koloni berwarna merah muda memiliki pH 6,62. sedangkan koloni yang lainnya memiliki warna merah yang merata.



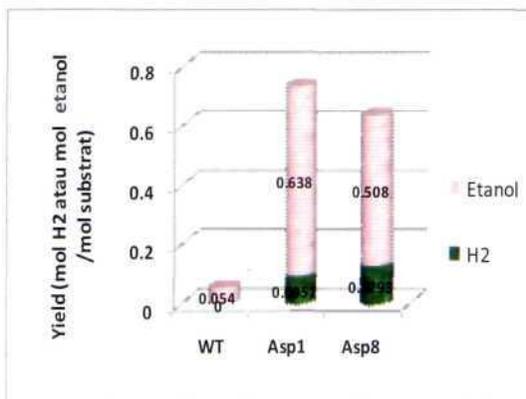
Foto 3. Koloni WT dan mutan *B. pumilus* yang dipilih berdasarkan mutagenesis menggunakan kombinasi EMS dan PSM

Tabel 3. pH akhir Wild Type (WT) dan mutan-mutan setelah fermentasi 24 jam

No.	Kode	pH rata2	No.	Kode	pH rata2	No.	Kode	pH rata2
1.	WT	5,48	7.	Asp7	5,64	12.	Asp 12	5,94
2.	Asp1	5,74	8.	Asp8	5,22	13.	Asp 13	5,56
3.	Asp2	5,47	9.	Asp9	5,85	14.	Asp 14	5,61
4.	Asp3	6,23	10.	Asp 10	5,82	15.	Asp 15	6,62
5.	Asp4	6,66	11.	Asp11	5,78	16.	Asp 16	5,66
6.	Asp5	5,73						



Gambar 4. Yield H<sub>2</sub> dari Wild Type (WT) dan mutan mutan setelah fermentasi selama 24 jam



Gambar 5. Yield H<sub>2</sub> dan etanol dari WT dan mutan Asp 1 dan Asp8 setelah fermentasi selama 24 jam

## PEMBAHASAN

Madigan *et al.* (2000) menyatakan bahwa kultur sel yang mengalami fase log sedang memperbanyak diri secara logaritmik, sehingga perubahan genetik akibat perlakuan mutasi yang diberikan dapat diwariskan kepada sebanyak mungkin keturunannya.

Perlakuan mutasi dilakukan pada jam ke- 6.5 (Gambar 2) yaitu ketika kultur sel mengalami fase log optimum yang terlihat dengan adanya perpotongan garis linear dan eksponensial. Fase log merupakan fase saat sel memiliki kondisi fisiologis yang paling baik, karena seluruh unsur biokimia yang penting bagi pertumbuhan sedang disintesis dengan waktu pembentukan yang rata-rata sama (balance growth), termasuk replikasi DNA (Brock *et al.*, 1994). Mutasi dengan EMS diharapkan terjadi saat proses replikasi DNA yang mengakibatkan adanya mispairing pada basa DNA, sehingga kesalahan basa yang terjadi setelah replikasi DNA dapat diturunkan pada generasi selanjutnya (Fairbanks dan Andersen, 1999).

Dari Tabel 1 dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi penambahan konsentrasi EMS akan didapatkan jumlah koloni yang semakin sedikit. Begitu pula dengan waktu inkubasi yang dilakukan setelah diberi perlakuan dengan EMS akan membuat jumlah koloni menjadi semakin sedikit. Pada Tabel 2 dan Foto 3 adalah mutan mutan hasil dari kombinasi PSM dan EMS dengan penambahan NaBr dan NaBrO<sub>3</sub> pada medium penapisan. Koloni yang memanfaatkan substrat dengan baik pada medium, akan menghasilkan endapan formazan lebih banyak, sehingga koloni akan berwarna lebih merah dan merata di seluruh permukaan (Bochner dan Savageau, 1977) seperti yang terlihat pada Foto 3 untuk TP (mutagenesis tanpa pengenceran).

Berdasarkan pengamatan tidak terlihat adanya perbedaan yang signifikan antara warna koloni WT dan warna koloni mutan, yaitu warna keduanya memiliki koloni merah. Hal tersebut menunjukkan bahwa mutan dan wild type memiliki kemampuan yang sama dalam mereduksi TTC menjadi formazan. Hal ini dimungkinkan bahwa *B. pumilus* memiliki mekanisme reaksi yang berbeda dengan *Streptococcus* pada kemampuan mereduksi TTC menjadi formazan, menurut Salem *et al.* (1985) warna koloni *Streptococcus* yang terbentuk pada medium TTC menunjukkan adanya

perbedaan antara koloni normal dan koloni mutan yang menghasilkan asam laktat lebih rendah. Koloni mutan akan menghasilkan warna merah atau merah muda sedangkan koloni normal berwarna putih. Satuan elektron positif (PSM) dapat menekan laju sintesis asam organik sehingga produksi H<sub>2</sub> dan etanol menjadi lebih besar. Dengan penambahan NaBr dan NaBrO<sub>3</sub> yang berlebih pada media maka mutan yang dihasilkan semakin sedikit karena mutan *B. pumilus* dalam mensintesis asam organik terjadi pergeseran atau diubah menjadi solventogenesis yang secara langsung terpilih oleh suatu metoda yang membunuh satuan elektron positif (PSM) setelah perlakuan mutagenik. Sebagai perubahan di dalam gen manapun yang melibatkan sintesis asam akan memberikan produksi yang berbeda dari wild-typenya seperti yang dilakukan Jones dan Woods (1986) terhadap mutan *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 dalam mensintesis asam asetat.

Dari pengamatan pH terakhir hasil fermentasi 15 mutan-mutan yang dipilih yaitu koloni mutan yang memiliki warna merah cukup merata atau warna pink (Bochner dan Savageau, 1977), Tabel 3 menunjukkan bahwa koloni yang tidak memiliki warna merah yang merata adalah sel yang dapat mempengaruhi sintesis asam sehingga mempunyai kisaran pH yang besar (mutan Asp4 = 6,66; Asp14 = 6,62) dan sebaliknya bila koloni berwarna merah akan memiliki kisaran pH yang lebih kecil (Asp 8 = 5,22 dan WT = 5,48). Seperti yang dilaporkan oleh Stanier *et al.* (1986), bahwa senyawa tetrazolium yang tidak berwarna direduksi secara intraselular menjadi formazan yang tidak larut dengan kisaran pH yang kecil serta berwarna merah menyala.

Mutan-mutan *B. pumilus* mampu memproduksi H<sub>2</sub> yang sebelumnya tidak diproduksi oleh wild type (Gambar 4) dan memproduksi etanol lebih tinggi dari wild type (Gambar 5), khususnya Asp1 dan Asp8. Mutan-mutan *B. pumilus* juga mampu memproduksi 1,3-propanediol dan asam-asam organik lebih rendah dari wild type (tidak dilaporkan). Sebagai akibat dari penurunan asam asetat maka metabolisme yang terjadi mengalami perubahan ke arah jalur pembentukan etanol. Kecenderungan metabolisme ke arah pembentukan etanol memungkinkan terjadi penurunan produksi metabolit lain. Hal tersebut diduga terjadi

karena piruvat hasil penguraian gliserol lebih banyak diubah menjadi etanol.

Menurut Ito *et al.* (2004) perubahan piruvat menjadi asam laktat dan 2,3-butanediol melibatkan oksidasi NADH<sub>2</sub>. Pembentukan metabolit asam laktat yang berkurang diduga menyebabkan jumlah NADH<sub>2</sub> dalam sel bertambah karena NADH<sub>2</sub> tersebut tidak mengalami oksidasi menjadi NAD. Semua itu dapat terjadi karena NADH<sub>2</sub> yang teroksidasi untuk pembentukan asam laktat berkurang, sehingga dapat digunakan untuk pembentukan H<sub>2</sub>. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada mutan menurun. Sehingga NADH<sub>2</sub> diduga digunakan oleh enzim hidrogenase untuk diubah menjadi H<sub>2</sub>. Menurut Nakashimada *et al.* (2002), H<sub>2</sub> dapat diproduksi dari kelebihan NADH<sub>2</sub>. Karena gen merupakan pengendali pembentukan enzim maka perubahan pada gen dapat menyebabkan perubahan pada enzim yang dibentuknya yaitu perubahan dalam proses metabolisme.

#### KESIMPULAN

Mutagenesis EMS dan seleksi dengan PSM terhadap *B. pumilus* dapat menghasilkan mutan dengan produksi H<sub>2</sub> dan produksi etanol yang meningkat. Meningkatnya produksi H<sub>2</sub> dan produksi etanol dimungkinkan seiring dengan terjadinya perubahan jalur metabolisme pada mutan *B. pumilus* yaitu adanya penurunan metabolit pembentukan asam laktat.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous.** 2008. **Mikroba untuk** pengolahan limbah biodiesel. <http://www.himatek.che.itb.ac.id/index.php>. Diakses 26 April 2008.
- Bochner BR and MA Savageau.** 1977. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**(2), 434-444.
- Brock TD, MT Madigan, JM Martinko and J Parker.** 1994. *Biology of Microorganism.* 7<sup>th</sup> ed. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs.
- Claassen PAM, JB Van Lier, AML Contreras, EWJ Van Niel, L Sijtsma, AJM Stains, SS deVries and RA Weusthuis.** 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 741—755.
- Cutting SM and PBV Horn.** 1990. *Genetic analysis, molecular biological methods for Bacillus*, 27-60.
- CR Harwood and SM Cutting (Eds.). John Wiley & Sons Ltd.
- Fairbanks DJ and WR Andersen.** 1999. *Genetics: The Continuity of Life.* Wadsworth Publishing Company, London.
- Ginkel S Van, S Sung and JJ Lay.** 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* **35**(24), 4726-4730.
- Hillman JD.** 1979. Method of controlling dental caries with *Streptococcus mutans* strains. *United States Patent.* **880.499.**
- Ito T, Y Nakashimada, T Kakizono and N Nishio.** 2004. High-yield production of hydrogen by *Enterobacter aerogenes* mutant with decreased cc-acetolactate synthase activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **97**(4), 227-232.
- Jones DT and DR Woods.** 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**, 484-524.
- Levin DB, L Pitt and M Love.** 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. H<sub>2</sub> Energy.* **29**, 173-185.
- Madigan MT, JM Martinko and J Parker.** 2000. *Brock Biology of Microorganism.* 9<sup>th</sup> ed. Prentice Hall Inc., Upper Saddle River.
- Meuth and JE Arrand.** 1982. Alteration of gene structure in ethyl methane sulfonate-induced mutants of mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**(11), 1459-1462.
- Mickelson MN and CH Werkman.** 1940. The dissimilation of glycerol by *coli-aerogenes* intermediates. *J Bacteriol.* **39**, 709-715.
- Nakashimada Y, MA Rachman, T Kakizono and N Nishio.** 2002. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *International Journal of Hydrogen Energy* **27**, 1399-1405.
- Purwanto J.** 2006. Optimasi konsentrasi gliserol dan pH untuk produksi biohidrogen oleh *Enterobacter aerogenes* AY-2 dengan RAL faktorial. *Skripsi SI.* Departemen Biologi FMIPA-IPB, Bogor.
- Rachman MA, Y Furutani, Y Nakashimada, T Kakizono and N Nishio.** 1997. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**(4), 358-363.
- Salem HHH, HJ Sandham and KH Chan.** 1985. Lactate dehydrogenase deficient mutants of serotype g *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **64**(10), 1191-1194.
- Sambrook JS and DW Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol 2.* 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stanier RY, Adelberg, EA and J Ingraham.** 1986. *Dunia Mikroba* 3. PT Bhratara Karya Aksara. Jakarta.
- Xi Chen, Zhilong Xiu, Jianfeng Wang, Daijia Zhang and Ping Xu.** 2003. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3- propanediol by *Klebsiella pneumonia* under microaerobic conditions. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 386-394.