



**SNB**  
*Seminar Nasional Bioteknologi 2014*

# PROSIDING SNB 2014

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES  
TO BLUE ECONOMY IMPLEMENTATION



**UBAYA**  
UNIVERSITAS SURABAYA

Perpustakaan Nasional : Katalog Dalam Terbitan (KDT)

PROSIDING SNB 2014

*Biotechnological Approaches to Blue Economy Implementation*

UBAYA Press, 2014

I + 295 hal : 23 X 31,5 cm

ISBN : 978-602-14714-2-5

PROSIDING SNB 2014

*Biotechnological Approaches to Blue Economy Implementation*

Editor : Dr.rer.nat. Maria Goretti M. Purwanto,  
Dr. Tjandra Pantjajani,  
Theresia Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech,  
Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.,  
Nurul Azizah, S.Si.

Percetakan : Universitas Surabaya

Cetakan : Pertama, 2014

Penerbit : Universitas Surabaya (Ubaya Press)  
Jalan Ngagel Jaya Selatan 169, Surabaya  
Telp 031 2981039

**“ SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI 2014”**

***Biotechnological Approaches to Blue Economy  
Implementation***

**Diselenggarakan oleh:  
Program Studi Biologi - Fakultas Teknobiologi  
Universitas Surabaya**

**Perpustakaan Lantai 5 Universitas Surabaya  
Surabaya-Indonesia**

**27 - 28 Febuari 2014**

**“ SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI 2014”**

***Biotechnological Approaches to Blue Economy  
Implementation***

**PROSIDING**

**Ketua:**

Theresia Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech

**Editor:**

Dr.rer.nat. Maria Goretti M. Purwanto

Dr. Tjandra Pantjajani

Theresia Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech

Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.

Nurul Azizah, S.Si.

**Diselenggarakan oleh:**

**Program Studi Biologi - Fakultas Teknobiologi  
Universitas Surabaya**

**27 - 28 Febuari 2014**

**“ SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI 2014”**

***Biotechnological Approaches to Blue Economy  
Implementation***

**PROSIDING**

ISBN : 978-602-14714-2-5

Editor : Dr.rer.nat. Maria Goretti M. Purwanto  
Dr. Tjandra Pantjajani  
Theresia Desy Askitosari, S.Si., M.Biotech  
Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.  
Nurul Azizah, S.Si.

Diterbitkan oleh : UBAYA Press

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur kami haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat yang telah diberikan sehingga Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi (SNB) Universitas Surabaya (UBAYA) 2014 dapat diselesaikan. SNB UBAYA 2014 merupakan seminar nasional pertama yang diselenggarakan oleh Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, sekaligus mengawali rangkaian kegiatan peringatan lustrum pertama Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya yang jatuh pada tanggal 1 Februari 2015. Tema seminar nasional ini adalah '*Biotechnological Approaches to Blue Economy Implementation*' yang diadakan pada tanggal 27-28 Februari 2014, bertempat di Gedung Perpustakaan lantai V, Universitas Surabaya, serta dihadiri oleh enam pembicara utama yang pakar di bidang Industri dan Bisnis, Kesehatan dan Forensik, serta Pangan dan Pertanian. Peserta yang berpartisipasi dalam presentasi oral maupun poster berasal dari berbagai perguruan tinggi negeri maupun swasta di Indonesia serta instansi pemerintah maupun industri.

Prosiding ini dibuat dengan tujuan memberikan pengetahuan bagi masyarakat luas terkait dengan penelitian di bidang bioteknologi untuk mendukung implementasi *Blue economy* di Indonesia. Prosiding SNB UBAYA 2014 ini berisi makalah dan hasil penelitian dari para pembicara utama maupun peserta presentasi oral. Adanya sesi diskusi pada sesi oral yang dibagi menjadi 4 kelas paralel, yaitu kelas Bioteknologi Kesehatan dan Forensik, Bioteknologi Pangan, Bioteknologi Tanaman, dan Bioteknologi Lingkungan, maupun sesi poster diharapkan dapat menjadi motivasi bagi pemakalah untuk terus berkarya di bidang bioteknologi untuk mendukung implementasi *Blue economy* di Indonesia.

Kami menyadari bahwa Prosiding ini tentu saja tidak luput dari kekurangan, untuk itu segala saran dan kritik kami harapkan demi perbaikan Prosiding pada terbitan tahun yang akan datang. Kami berharap Prosiding ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Hormat saya,

Theresia Desy Askitosari

## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b>	iv
<b>Keynote Speaker</b>	
<i>Blue Economy</i> sebagai Pilar Kedaulatan Ekonomi Indonesia Jaya Suprana	3
Aplikasi Teknologi DNA sebagai Metode Identifikasi di Bidang Forensik Agung Sosiawan	4
Solusi Saintifik terhadap Berbagai Permasalahan dalam Industri Bioproses (Lingkungan) yang Menunjang Implementasi <i>Blue Economy</i> Lieke Riadi	5
Aplikasi Bioteknologi Pangan dari Pertanian untuk Menunjang Implementasi <i>Blue Economy</i> Anton Apriyantono	6
<i>Technology Development of Microscope from Cell Biology to Nano Biology</i> Sutiman B. Sumitro	8
Solusi Saintifik terhadap Berbagai Permasalahan dalam Bioteknologi Tanaman yang Menunjang Implementasi <i>Blue Economy</i> Xavier Daniel	9
<b>Bidang Bioteknologi Kesehatan dan Forensik</b>	
Deteksi Transovarial Virus Dengue pada Nyamuk Vektor Demam Berdarah Kasus KLB di Kabupaten Merauke Provinsi Papua : Sebuah Pendekatan Molekular Hana Krismawati <sup>*1)</sup> , Hanna Kawulur <sup>1)</sup> , Antonius Oktavian <sup>1)</sup> , Neville Raymon M <sup>2)</sup> , Arif <sup>2)</sup> , John Master Saragih <sup>3)</sup> , Jan Lewier <sup>1)</sup>	13
Deteksi Mutasi Fragmen DNA Integrase HIV-1 pada Subyek Odha di Jayapura Hotma Hutapea <sup>1</sup> , Arie Ardiansyah <sup>2</sup>	17
Karakterisasi DNA <i>Escherichia coli</i> C600 Lisogenik Menggunakan Teknik Hibridisasi <i>Dot Blotting</i> dan <i>Southern Blotting</i> Aline Puspita Kusumadjaja	22
Optimasi dan Aplikasi <i>Multiplex Polymerase Chain Reaction</i> untuk Deteksi <i>Salmonella</i> sp., <i>Vibrio cholerae</i> , dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Air Minum Kemasan sebagai Pengganti Metode Deteksi Konvensional Vicky Chu*, Maria Goretti M. Purwanto, Xavier-Daniel	32

# Konstruksi Mutan *Enterobacter ludwigii* Strain Lokal secara Acak Menggunakan Transposon Mutagenesis untuk Menurunkan Produksi Asam dan Meningkatkan Produksi Biogas

Junus Rangan<sup>1)</sup>, Yusnita Liasari<sup>2)</sup>, Mariana Wahjudi<sup>1)\*</sup>

1) Laboratorium Purifikasi dan Biologi Molekuler, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia

\*Email: mariana\_wahjudi@yahoo.com

2) Laboratorium Bioteknologi Mikroorganisme, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia

## ABSTRAK

Penggunaan bahan bakar fosil sebagai sumber energi utama dapat menyebabkan terjadinya perubahan iklim global akibat pembakaran dan emisi gas yang berlebihan serta memicu timbulnya krisis energi. Diperlukan adanya pengembangan sumber energi alternatif yang ramah lingkungan, seperti biogas yang dihasilkan melalui proses fermentasi pada bakteri fermentatif seperti *Bacillus* spp., dan *Enterobacter* spp. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkonstruksi mutan *Enterobacter ludwigii* strain lokal hasil isolasi dari sedimen muara sungai Kalimas Surabaya secara transposon mutagenesis serta memperoleh mutan yang mengalami penurunan produksi asam-asam organik dan peningkatan produksi biogas dibanding dengan galur murninya. Transposon yang digunakan adalah mini-Tn5 yang terdapat pada plasmid rekombinan pUTmini-Tn5-luxCDABE-Km. Proses transfer plasmid dilakukan secara konyugasi dengan menggunakan *Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir sebagai sel donor. Dari hasil konyugasi, total transkonyugan yang telah diseleksi pada media LB agar-Km 100  $\mu$ g/ml adalah 524 koloni. Dari kuantifikasi produksi asam organik pada media PRDB secara spektrofotometri, diperoleh jumlah mutan yang mengalami penurunan produksi asam adalah 12 (A8), 18 (B8), 30 (A24), dan 29 (B24) dari total 31 mutan tiap variasi yang diuji. Sedangkan dari uji produksi biogas pada media kompleks, mutan yang mengalami peningkatan produksi tertinggi adalah B24-37 dengan rata-rata peningkatan sebesar 15 kali dibandingkan galur murninya. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pada penelitian telah berhasil dikonstruksi mutan *E. ludwigii* strain lokal Surabaya yang mengalami penurunan produksi asam organik dan peningkatan produksi biogas.

**Kata Kunci:** Transposon Mutagenesis, Konyugasi, pUTmini-Tn5-luxCDABE-Km, *Enterobacter ludwigii*, Biogas

## Pendahuluan

Energi merupakan salah satu faktor penting bagi kehidupan semua makhluk di dunia. Namun, penggunaan bahan bakar fosil secara terus menerus dapat menyebabkan terjadinya perubahan iklim global akibat pembakaran dan emisi gas yang berlebihan. Selain itu, ketersediaan bahan bakar fosil yang semakin menipis, khususnya di Indonesia, juga turut menjadi perhatian. Menurut data tahun 2012, ketersediaan minyak bumi di Indonesia tidak lagi sebanding dengan peningkatan kebutuhan energi masyarakat yang telah mencapai angka 7% per tahun [16].

Dengan adanya berbagai permasalahan akibat penggunaan bahan bakar fosil sebagai sumber energi utama, maka diperlukan adanya sumber energi alternatif lainnya seperti biogas [3]. Biogas (umumnya terdiri dari campuran gas seperti CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>, dll.) merupakan salah satu energi yang menjanjikan. Hal ini disebabkan karena sifatnya yang bebas polusi, efisien, serta tidak menghasilkan emisi karbon yang berlebihan [16]. Umumnya, biogas dihasilkan melalui proses fermentasi pada bakteri anaerobik seperti *Clostridium* dan *Enterobacter*, maupun bakteri aerobik seperti *Bacillus* dan *Alcaligenes* [3].

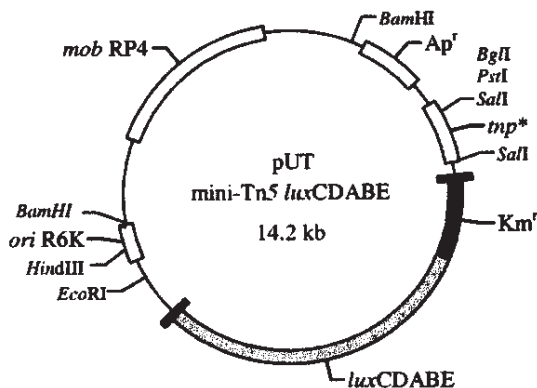
Transposon merupakan sekuen pendek DNA yang secara struktural mengandung gen penanda (*marker gene*) seperti gen pengkode sifat resistensi antibiotik, serta memiliki ujung pendek berulang (*inverted terminal repeats*) dengan ukuran maksimal 20 bp. Transposon dapat mengalami perpindahan tempat (transposisi) di dalam DNA genom suatu sel [5]. Transposisi dapat terjadi akibat adanya aktivitas suatu enzim yang disebut transposase. Transposase merupakan enzim hidrolitik yang berperan untuk memotong untaian transposon secara spesifik [6].

Secara umum, terdapat lima tahapan yang mengawali reaksi transposisi, yakni: (1) adanya penempelan enzim transposase pada situs spesifik yang terletak di kedua ujung transposon (*inverted repeats area*); (2) pemotongan kedua untai DNA pada tiap ujung transposon; (3) pertemuan kedua ujung akibat aktivitas transposase; (4) penangkapan untai DNA target penyisipan; dan (5) perpindahan transposon ke untai DNA target penyisipan [7].



Salah satu jenis transposon adalah mini-Tn5 yang terdapat dalam pUTmini-Tn5-luxCDABE-Km, suatu plasmid rekombinan yang dirancang khusus untuk tujuan transformasi bakteri. Sejauh ini, mayoritas proses transformasi plasmid rekombinan ini dilakukan secara konjugasi (*conjugative transformation*). Jenis bakteri yang pada umumnya mengandung plasmid ini dan seringkali digunakan sebagai donor dalam proses konjugasi adalah *Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir [8].

Secara struktural, plasmid rekombinan dengan ukuran sekitar 14,2 kb ini terdiri dari dua komponen, yakni plasmid pUT dan transposon mini-Tn5-luxCDABE yang dikonstruksi dengan gen resistensi kanamisin ( $Km^R$ ) [8].



Gambar 1. Plasmid Rekombinan pUTmini-Tn5-luxCDABE-Km [9].

Konjugasi merupakan suatu proses transfer materi genetik secara horisontal dari sel donor ke sel resipien [10]. Proses konjugasi pada bakteri memerlukan adanya kontak fisik yang dekat antara sel donor dan sel resipien. Biasanya, hal tersebut diperantarai oleh adanya struktur pili seks pada bakteri dan protein transfer yang merupakan hasil ekspresi gen *tra* [11]. Secara umum, protein transfer berperan dalam proses transfer materi genetik dan membentuk struktur terasosiasi membran yang berfungsi untuk menjaga kestabilan kontak antara permukaan sel donor dengan sel resipien [11].

Konjugasi memiliki sistem replikasi DNA yang unik. Selama konjugasi berlangsung, molekul DNA plasmid akan direplikasi. Hasilnya, satu salinan DNA akan tetap tinggal di dalam sel donor, sedangkan salinan DNA yang lainnya akan ditransfer ke sel resipien. Pada kebanyakan kasus, replikasi yang terjadi diinisiasi dengan membentuk torehan/celah pada salah satu untai DNA di daerah *origin of transfer (oriT)* [12].

Melalui transfer secara konjugasi, diharapkan dapat terjadi mutasi pada DNA genom sel resipien akibat adanya penyisipan fragmen transposon. Mutasi tersebut dikenal dengan istilah *transposon mutagenesis*. Penyisipan fragmen transposon dapat terjadi pada berbagai posisi dalam genom. Apabila penyisipan terjadi pada intron (region non-pengkode sifat), ekson (region pengkode sifat), ataupun region di luar *coding sequence* yang masih berkaitan dengan promoter dan regulator suatu gen, maka mutasi dapat mengubah ekspresi dari gen tersebut. Perubahan yang dimaksud adalah dapat meningkatkan atau menghambat produksi protein dari gen fungsional tersebut. Selain itu, proses transposisi juga dapat mengganggu proses meiosis pada sel inang karena adanya urutan yang berulang-ulang (*inverted repeats*) pada transposon [5].

Seperti uraian sebelumnya, bakteri yang seringkali digunakan sebagai donor plasmid rekombinan adalah *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir. Secara fisik, strain rekombinan ini memiliki ciri-ciri dan struktur yang sama dengan strain *E. coli* pada umumnya, yakni merupakan bakteri Gram-negatif, fakultatif anaerob, serta memiliki sel yang berbentuk batang (*rod*) [13].

Pada *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir, terdapat gen *pir*, suatu gen pengkode protein pi. Terdapat dua fungsi utama dari protein pi yang dihasilkan, yakni: (1) sebagai *enhancer* yang mampu meningkatkan tingkat replikasi dari DNA plasmid yang terkandung di dalamnya [14] serta (2) meningkatkan kekuatan penempelan sel pada permukaan sel target [14]. Dengan adanya protein pi, maka proses konjugasi dengan sel target akan berlangsung maksimal.

Selain memiliki gen *pir*, sel *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir juga memiliki sistem transfer materi genetik yang dikenal dengan istilah *RP4 transfer function* [15]. Dampak dari sistem ini adalah dapat memungkinkan terjadinya

perpindahan DNA melalui proses konjugasi antara dua jenis sel yang berbeda, misalnya antara bakteri Gram-negatif dengan bakteri Gram-positif [15].

Dalam penelitian ini, dilakukan konstruksi mutan dari *Enterobacter ludwigii* strain lokal koleksi Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, hasil isolasi di sungai Kalimas Surabaya, melalui mutasi acak dengan bantuan transposon (*transposon mutagenesis*). Transposon yang digunakan terdapat pada sekuen plasmid rekombinan pUTmini-Tn5-*luxCDABE*-Km [4]. Proses transfer plasmid dilakukan secara konjugasi dengan *Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir sebagai sel donor.

Pemilihan *E. ludwigii* sebagai bakteri objek penelitian dilatarbelakangi oleh fakta bahwa gas hidrogen merupakan salah satu produk utama dari proses fermentasinya [17]. Selain itu, *E. ludwigii* yang digunakan juga memiliki kemampuan khusus untuk bertahan pada lingkungan dengan kandungan logam berat seperti tembaga (Cu) hingga kadar sebesar 100 ppm [18].

## Metodologi

### Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah kultur bakteri *Enterobacter ludwigii* strain lokal hasil isolasi di sungai Kalimas Surabaya (koleksi Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya) [18] dan kultur bakteri *Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir [4]. Media yang digunakan adalah *Luria-Bertani Agar* (Difco®), *Luria-Bertani Broth* (Difco®), *Simmons Citrate Agar* (SCA) (Merck®), *Phenol Red Dextrose Agar* (PRDA) (Merck®), dan *Phenol Red Dextrose Broth* (PRDB) (Merck®). Larutan penyangga (*buffer*) yang digunakan adalah *buffer* PBS (*Phosphate Buffered Saline*) dengan komposisi 8,01 g/l NaCl (Merck®); 0,2 g/l KCl (Merck®); 1,78 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck®); dan 0,27 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck®) pada pH 7,4. Media kompleks biohidrogen dengan komposisi 5 g/l pepton (Merck®); 14 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck®); 6 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck®); 1 g/l Na-sitrat (Merck®); 2 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck®); dan 0,2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck®). Bahan lainnya yang digunakan adalah antibiotik kanamisin sulfat (AMRESCO®), etanol 70%, gliserol (Pro Pure®), akuades, dan spiritus.

### Alat

Alat-alat yang digunakan adalah kompor listrik (MASPION® S-302), mesin autoklaf (MY LIFE® MA-672), oven (YENACO® YNCOV 53L), mikroskop (OLYMPUS®), timbangan analitik (OHAUS®), *microplate reader* (OMEGA®), mesin sentrifuge (HERMLE® Z 233 M-2), pH meter (Accumet® BASIC), *laminar air flow cabinet*, *orbital shaker incubator* (YIN DER LM-4200), mikropipet (GILSON®), tabung *Eppendorf*, spektrofotometer UV-Vis (GENESYS 10S), *spreade*, jarum ose, kuvet (BRAND), dan peralatan gelas (PYREX®).

## Prosedur

### 1. Persiapan Kultur

Kultur *E. ludwigii* strain lokal dan *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir diambil dari penyimpanan bersuhu -80°C dan diinokulasikan secara terpisah pada media LB *broth* (*E. ludwigii*) dan LB *broth*-Km 30 µg/ml (*E. coli*). Hasil inokulasi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan agitasi 120 rpm untuk memberikan waktu pemulihan sel. Dengan demikian, dapat diperoleh sel dengan kondisi fisiologis dan anatomi yang siap dikonyugasikan.

### 2. Konfirmasi Morfologis Sel dengan Pewarnaan Gram

Untuk memastikan kesesuaian sel-sel bakteri yang digunakan, baik resipien maupun donor, dilakukan karakterisasi berdasarkan sifat morfologisnya menggunakan teknik pewarnaan Gram menurut metode Brock (1999) [19].

### 3. Konfirmasi Fisiologis Sel dengan UjiBiokimia

Media yang digunakan adalah SCA, media untuk pengujian penggunaan sitrat oleh suatu bakteri. Satu koloni tunggal dari kedua bakteri digoreskan pada permukaan media dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Sel donor (*E. coli*) tidak akan mengubah warna media, sedangkan sel resipien (*E. ludwigii*) akan mengubah warna media dari hijau menjadi biru.

#### 4. Optimasi Kadar Kanamisin

Koloni kedua bakteri (donor dan resipien) yang telah diremajakan, diinokulasikan ke media LB agar-Km dengan variasi kadar kanamisin sebesar 50 µg/ml dan 100 µg/ml. Hasil inokulasi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

#### 5. Proses Mutasi

Konstruksi mutan secara *transposon mutagenesis* dalam penelitian ini dilakukan sesuai dengan metode Winson *et al.* (1998) [8]. Proses mutasi diawali dengan konyugasi antara sel donor (*E. coli* S17-1  $\lambda$ pir pUTmini-Tn5-*luxCDABE*-Km) dengan sel resipien (*E. ludwigii* strain lokal Surabaya). Sebelum konyugasi, sel donor ditumbuhkan pada media LB *broth*-Km 30 µg/ml, sel resipien pada media LB *broth*, dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan agitasi 120 rpm hingga nilai OD<sub>540</sub> sebesar 0,8 [20].

Sesaat sebelum konyugasi, sel resipien diberi dua perlakuan berbeda, yakni tanpa adanya inkubasi (variasi A) dan dengan inkubasi selama 15 menit pada suhu 42°C (variasi B). Kemudian, campuran kultur sel donor dan resipien dengan perbandingan 1:2 (400 µl : 800 µl) dihomogenkan dan disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan 50 µl media LB *broth*. Hasil resuspensi diteteskan pada permukaan media LB agar, dibiarkan meresap, dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan variasi waktu selama 8 jam (A8 & B8) dan 24 jam (A24 & B24).

Setelah diinkubasi, dilakukan *sampling* terhadap koloni yang tumbuh dan diresuspensi dengan larutan PBS. Hasil resuspensi diencerkan menggunakan larutan PBS hingga beberapa seri pengenceran. Tiap seri pengenceran disebarkan pada permukaan media LB agar-Km 100 µg/ml dengan menggunakan teknik *spread plate*. Selanjutnya, hasil sebaran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setiap koloni tunggal yang tumbuh, diinokulasikan ke media seleksi LB agar-Km 100 µg/ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Dari koloni yang tumbuh, disub-kultur lagi pada media yang sama dan diinkubasi dengan kondisi yang sama pula.

#### 6. Karakterisasi Mutan dengan Uji Biokimia

Sebelum digunakan untuk pengujian, mutan disub-kultur terlebih dahulu pada media LB agar-Km 100 µg/ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tiap mutan yang tumbuh, dipindahkan ke media-media uji seperti PRDA, SCA-Km 100 µg/ml, dan PRDB-Km 100 µg/ml. kemudian, tiap media diinkubasi pada kondisi yang berbeda-beda. Media PRDA diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C, media SCA-Km 100 µg/ml pada suhu 37°C selama 48 jam, dan media PRDB-Km 100 µg/ml pada suhu 37°C dengan agitasi sebesar 120 rpm selama 48 jam.

#### 7. Kuantifikasi Produktivitas Asam Organik Mutan

Sebanyak 1 ml dari tiap tabung reaksi yang berisikan hasil pengujian mutan pada media PRDB-Km 100 µg/ml dipindahkan ke dalam tabung *Eppendorf* steril. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Sebanyak 250 µl supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *well* pada *microplate* yang digunakan. Sebagai blanko, digunakan media PRDB-Km 100 µg/ml tanpa mutan. Sebagai kontrol negatif, digunakan media PRDB berisi *E. ludwigii* galur murni yang ditumbuhkan dengan kondisi yang sama. Sedangkan sebagai pembanding lainnya, digunakan pula media PRDB berisi *E. aerogenes* dan *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir pUTmini-Tn5-*luxCDABE*-Km.

Kemudian, *microplate* yang telah berisikan sampel uji, dibaca absorbansinya pada *range* panjang gelombang antara 300-600 nm. Kuantitas asam organik akan sebanding dengan nilai absorbansi sampel pada  $\lambda$  420 nm. Sebaliknya, kuantitas metabolit alkalin akan sebanding dengan nilai absorbansi sampel pada  $\lambda$  550 nm.

#### 8. Pengujian Produksi Biohidrogen Mutan

Setelah diremajakan terlebih dahulu, mutan target hasil seleksi (*E. ludwigii* pUTmini-Tn5-*luxCDABE*-Km) diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam tabung ulir berisi 5 ml media kompleks biohidrogen untuk pembuatan *starter*. Hasil inokulasi diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C dengan agitasi 120 rpm. Kemudian, *starter* dipindahkan ke dalam botol 500 ml berisi 45 ml media yang sama dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dengan agitasi 120 rpm.

Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran volume gas hidrogen yang dihasilkan menggunakan instrumen respirometer.

## Hasil dan Pembahasan

### Konfirmasi Morfologis Sel dengan Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan Gram mengindikasikan bahwa sel donor (*E. coli* S17-1  $\lambda$ pir pUTmini-Tn5-*luxCDABE-Km*) dan sel resipien (*E. ludwigii* strain lokal Surabaya) sama-sama merupakan bakteri Gram-negatif. Hal ini terlihat dari kenampakan sel yang berwarna merah pada mikroskop. Sedangkan untuk bentuk sel, keduanya sama-sama tampak berbentuk batang (*rod*). Hasil ini telah sesuai dengan teori yang ada [13].

Tahapan ini bertujuan untuk menjamin tidak adanya kontaminasi dari sel bakteri lain, serta mengonfirmasi sel bakteri yang akan digunakan. Dari hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat kontaminasi sel bakteri lain yang berbeda bentuk maupun jenis Gram.

### Konfirmasi Fisiologis Sel dengan Uji Biokimia

Tahapan ini bertujuan untuk memastikan kesesuaian sel-sel bakteri yang akan digunakan, baik sebagai donor maupun resipien dalam konyugasi, berdasarkan sifat fisiologis yang dimilikinya. Pemilihan jenis uji biokimia yang dilakukan, didasarkan pada perbedaan kemampuan penggunaan sitrat sebagai sumber karbon tunggal oleh kedua jenis bakteri.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, diketahui bahwa bagian media yang diinokulasikan dengan *E. ludwigii* mengalami perubahan warna dari hijau menjadi biru. Hal ini disebabkan karena adanya gen pengkode enzim permease yang memungkinkan terjadinya transfer sitrat ke dalam sel dan dimanfaatkan sebagai karbon tunggal dalam merabolismenya. Hasilnya, terbentuk senyawa alkali (natrium karbonat) dari degradasi sitrat dan mengubah warna indikator pada media.

Sebaliknya, pada media yang diinokulasikan dengan *E. coli* tidak tampak ada perubahan warna yang terjadi. Hal ini disebabkan karena ketidakmampuan *E. coli* dalam memanfaatkan sitrat, sehingga tidak ada metabolit alkalin yang dihasilkan.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa hasil yang diperoleh telah sesuai dengan teori yang ada [1].

### Optimasi Kadar Kanamisin

Dengan adanya dugaan resistensi sel *E. ludwigii* galur murniterhadap kanamisin [2], maka tahapan ini perlu dilakukan untuk memperoleh kadar kanamisin yang optimal untuk menyeleksi mutan dengan galur murninya.

Dari hasil optimasi, diketahui bahwa masih terdapat sejumlah kecil koloni *E. ludwigii* galur murni pada media LB agar-Km 50  $\mu$ g/ml. Sebaliknya, pada LB agar-Km 100  $\mu$ g/ml, tidak tampak koloni *E. ludwigii* galur murni yang tumbuh.

Dengan demikian, disimpulkan bahwa kadar kanamisin yang optimal untuk seleksi adalah 100  $\mu$ g/ml.

### Proses Mutasi

Dari koloni yang tumbuh pada media LB agar, terlihat bahwa ada dua jenis koloni dengan kesamaan ciri, yakni berbentuk bulat dan berwarna putih. Yang menjadi perbedaan hanyalah koloni yang satu tampak lebih mukoid (cembung) dibandingkan dengan koloni lainnya. Koloni yang lebih mukoid tersebut diduga merupakan *E. ludwigii* [1]. Sedangkan koloni lainnya diduga merupakan *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir [1, 13]. Kesamaan ciri morfologis tersebut dapat dijadikan sebagai konfirmasi awal koloni hasil *sampling* konyugasi.

Setelah diinokulasikan ke media Lb agar-Km 100  $\mu$ g/ml, tampak bahwa semua koloni dapat tumbuh. Hal ini mengindikasikan bahwa terkandung plasmid rekombinan pUTmini-Tn5-*luxCDABE-Km* di dalam sel-sel tersebut. Dengan demikian, dapat dipastikan bahwa koloni-koloni tersebut merupakan mutan *E. ludwigii* pUTmini-Tn5-*luxCDABE-Km* dan sel donor yang tersisa. Hal ini didasarkan pada kemampuan resistensi kanamisin yang dimilikinya.

### Karakterisasi Mutan dengan Uji Biokimia

Dari pengujian menggunakan media PRDA, diperoleh bahwa hampir semua mutan uji mengalami penurunan produksi asam organik (tabel 1). Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah di sekitar koloni. Warna merah tersebut mengindikasikan adanya metabolit alkalin ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) yang dihasilkan oleh mutan dari hasil degradasi pepton (gambar 2).

Bila dibandingkan antar variasi waktu inkubasi, terlihat bahwa variasi 24 jam (A24 & B24) memiliki jumlah mutan uji yang mengalami penurunan yang lebih besar dibandingkan mutan hasil inkubasi 8 jam (A8 & B8). Meskipun demikian, tidak dapat dikatakan bahwa lamanya waktu konyugasi mempengaruhi proses mutasi, karena sifat mutasi dari *transposon mutagenesis* yang acak.

Untuk hasil uji *E. ludwigii* galur murni, tampak terjadi perubahan warna media menjadi kuning. Hal ini mengindikasikan adanya senyawa asam organik yang dihasilkan. Bila dibandingkan dengan galur murninya, mutan *E. ludwigii* pUTmini-Tn5-luxCDABE-Km mengalami penurunan produksi asam organik.

**Tabel 1.** Data Hasil Uji Produksi Asam dan Uji Penggunaan Sitrat oleh Berbagai Variasi Mutan

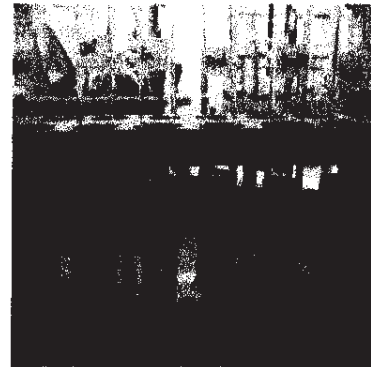
Variasi Mutan	Uji pada PRDA		Uji pada SCA-Km 100 µg/mL		Total Koloni Mutan
	Asam (kuning)	Basa (Merah)	+ (Biru)	- (Hijau)	
A8	11 kol	109 kol	103 kol	17 kol	120 kol
B8	10 kol	110 kol	105 kol	15 kol	120 kol
A24	2 kol	118 kol	97 kol	23 kol	120 kol
B24	7 kol	113 kol	98 kol	22 kol	120 kol



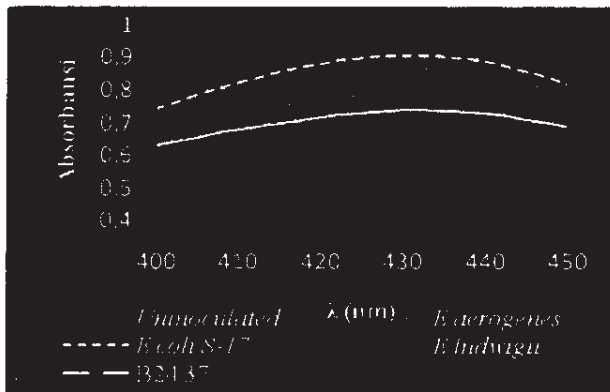
**Gambar 2.** Hasil Uji Mutan No. 31-60 (Kotak 1-30) Campuran B24 pada Media PRDA. Kotak 31 = *E.coli* S17-1  $\lambda$ pir; 32 = *E.ludwigii* (wild-type)



**Gambar 3.** Hasil Uji Mutan No. 31-60 (Kotak 1-30) Campuran B24 pada Media SCA-Kana 100 µg/ml. Kotak 31 = *E.coli* S17-1  $\lambda$ pir; 32 = *E.ludwigii* (wild-type)



**Gambar 4.** Hasil Uji Mutan No. 36 dan 37 Campuran B24 pada Media PRDB. Eco = *E.coli* S17-1  $\lambda$ pir; Uni = Uninoculated; Ea = *E.aerogenes*; Elud = *E.ludwigii*



**Gambar 5.** Kurva Absorbansi Mutan B24-37 yang Menunjukkan Penurunan Produksi Asam Organik



**Gambar 6.** Hasil Pengukuran Volume Gas Hidrogen yang Dihasilkan oleh Mutan B24-37 pada Respirometer. Volume Terukur = 15 ml

Dari pengujian menggunakan media SCA-Km 100 µg/ml, diperoleh bahwa sebagian besar mutan uji menunjukkan hasil positif (tabel 1). Ini ditunjukkan dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru akibat adanya metabolit alkalin seperti pada uraian sebelumnya (gambar 3).

Sedangkan dari hasil pengujian menggunakan media PRDB-Km 100 µg/ml, tampak bahwa hampir semua mutan uji tidak menghasilkan gas. Belum diketahui penyebabnya, namun diduga hal ini diakibatkan oleh kondisi media yang digunakan tidak sesuai untuk produksi gas oleh mutan tersebut. Meskipun demikian, *E. aerogenes* dan *E. ludwigii* galur murni yang diuji pada media yang sama, tampak menghasilkan gas sebagai produk sampingnya (gambar 4).

#### Kuantifikasi Produktivitas Asam Organik dan Pengujian Produksi Biohidrogen Mutan

Dari hasil pengujian produksi biohidrogen terhadap mutan-mutan yang telah diseleksi sebelumnya, diperoleh bahwa mutan dengan produktivitas biohidrogen tertinggi adalah B24-37. Volume gas hidrogen yang dihasilkannya adalah sebesar 15 ml untuk kedua replikasi yang dilakukan (gambar 6). Sedangkan sebagai pembandingan, volume gas hidrogen yang dihasilkan oleh *E. aerogenes* dan *E. ludwigii* galur murni secara berturut-turut adalah 70 ml dan 0 ml. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa mutan B24-37 tersebut mengalami peningkatan produksi gas hidrogen sebesar 15 kali dibandingkan galur murninya.

Hal ini juga diperkuat dengan hasil kuantifikasi secara spektrofotometri yang menyatakan bahwa absorbansi sampel mutan B24-37 pada  $\lambda$  420 nm (daerah asam) tampak lebih kecil dibanding galur murninya. Artinya, mutan tersebut telah mengalami penurunan produksi asam organik yang berdampak pada peningkatan produksi biohidrogen (gambar 5).

#### Kesimpulan

Melalui metode *transposon mutagenesis*, telah berhasil diperoleh mutan *E. ludwigii* strain lokal Surabaya yang mengalami penurunan produksi asam organik dan peningkatan produksi biogas. Diantara mutan-mutan target yang diperoleh, mutan dengan produktivitas biogas tertinggi adalah mutan B24-37.

#### Ucapan Terima Kasih

Penulis ingin mengucapkan terima kasih terhadap Wiradinata dan De Lorenzo *et al.* atas suplai bakteri (donor dan resipien) serta plasmid rekombinan terhadap penelitian ini.

#### Daftar Pustaka

1. Cappuccino, J.G., and Sherman, N. Microbiology: A Laboratory Manual. Addison-Wesley. California, 2005.
2. Mezzatesta, M.L., Gona, F., and Stefani, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.*, 2012; 7 (7): 887-902.
3. Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F., Cecchi, F., and Poggi-Varaldo, H.M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2005; 30 (1): 1383-1391.
4. De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K.N. Mini-Tn5 transposons derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.*, 1990; 172: 6568-6572.
5. Feschotte, C., and Pritham, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Reviews in Genetics*, 2007; 41: 331-348.
6. Naumann, T.A., and Reznikoff, W.S. Tn5 transposase with an altered specificity for transposon ends. *Journal of Bacteriology*, 2002; 184 (1): 233-240.
7. Richardson, J.M., Dawson, A., O'Hagan, N., Taylor, P., Finnegan, D.J., and Walkinshaw, M.D. Mechanism of Mos1 transposition: insight from structural analysis. *The EMBO Journal*, 2006; 25 (6): 1324-1334.
8. Lewenza, S., Falsafi, R.K., Winsor, G., Gooderham, W.J., McPhee, J.B., Brinkman, F.S.L., and Hancock, R.E.W. Construction of a mini-Tn5-*luxCDABE* mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a tool for identifying differentially regulated genes. *Genome Research*, 2005; 15: 583-589.
9. Weitz, H.J., Ritchie, J.M., Bailey, D.A., Horsburgh, A.M., Killham, K., and Glover, L.A. Construction of a modified mini-Tn5 *luxCDABE* transposon for the development of bacterial biosensors for ecotoxicity testing. *FEMS Microbiology Letters*, 2001; 197: 159-165.

10. Phornphisutthimas, A., Thamchaipenet, A., and Panijpan, B. Conjugation in *Escherichia coli*: a laboratory exercise. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 2007; 35 (6): 440-445.
11. Errington, J., Bath, J., and Wu, L.J. DNA transport in bacteria. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001; 2: 538-544.
12. Bingle, L.E., and Thomas, C.M. Regulatory circuits for plasmid survival. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001; 4: 194-200.
13. Doyle, M.P., and Padhye, V.S. *Escherichia coli* in foodborne bacterial pathogens. Marcel Decker, Inc., New York; 1989.
14. Wu, F., Goldberg, I., and Filutowicz, M. Roles of a 106-bp origin enhancer and *Escherichia coli* DNA-A protein in replication of plasmid R6K. *Nucleic Acids Research*, 1992; 20: 811-817.
15. Grahn, A.M., Haase, J., Bamford, D.H., and Lanka, E. Components of the RP4 conjugative transfer apparatus from an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecules transport systems. *Journal of Biotechnology*, 2000; 182 (6): 1564-1574.
16. Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral. (2012). Laporan Akuntabilitas Kinerja Pemerintah (LAKIP) KESDM. [online] (diakses dari <http://prokum.esdm.go.id/Lain-lain/Lakip/Lakip%202012%20Komplit.pdf> pada tanggal 21 Desember 2013).
17. Kosaric, N., and Lyng, R.P. Microbial production of hydrogen. *Biotechnology*, 1988; 6B: 101-134.
18. Wiradinata, H. Isolasi dan karakterisasi bakteri penyisih tembaga dari muara sungai Kalimas Surabaya. Skripsi (belum dipublikasikan), Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya; 2013.
19. Mardigan, M.T., and Martinko, J.M. Brock Biology of Microorganisms. Pearson Education, Inc., USA; 2006.
20. Liams, I., Argandona, M., Quesada, E., and Del Moral, A. Transposon mutagenesis in *Halomonas eurihalina*. *Res. Microbiol.*, 2000; 151: 13-18.