

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI 2-HALOACID
DEHALOGENASE DARI *Bacillus cereus* STRAIN LOKAL**

TESIS

**Karya tulis sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Magister dari
Institut Teknologi Bandung**

Oleh:

SITI NURFAJRIAH

NIM: 20510018

(Program Studi Kimia)



**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
2013**

ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI 2-HALOACID DEHALOGENASE DARI *Bacillus cereus* STRAIN LOKAL

Oleh

Siti Nurfajriah

NIM: 20510018

Senyawa organohalogen digunakan secara luas di bidang industri sebagai pelarut dan di bidang pertanian sebagai herbisida dan fungisida. Senyawa ini bersifat persisten dan racun di lingkungan sehingga berpotensi sebagai polutan. Asam monokloroasetat (MCA) merupakan salah satu senyawa organoklor alifatik yang banyak digunakan sebagai herbisida. Beberapa bakteri dari genus *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, dan *Alcaligenes* mampu mendegradasi asam monokloroasetat dengan menghasilkan 2-haloacid dehalogenase. Enzim ini mengkatalisis pemutusan ikatan karbon-halogen dalam asam 2-haloalkanoat menghasilkan asam 2-hidroksialkanoat dan ion halida. Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa bakteri *Bacillus sp.* mampu mendegradasi asam monokloroasetat dan asam 2,2-dikloropropionat. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi haloacid dehalogenase dari *Bacillus cereus* strain lokal. *B. cereus* ditumbuhkan dalam medium *Luria Bertani* dan *minimal salt medium* tanpa atau dengan penambahan asam monokloroasetat dengan konsentrasi akhir 1-80 mM. Hasil isolasi dan karakterisasi 2-haloacid dehalogenase dari *B. cereus* menunjukkan bahwa enzim ini merupakan enzim intraseluler, bersifat konstitutif, memiliki pH optimum 7, dan suhu optimum 30 °C. Untuk substrat asam monokloroasetat, enzim ini memiliki konstanta Michaelis-Menten (K_{mapp}) 6,64 mM dan *maximum velocity* (V_{maxapp}) 166,67 nmol min⁻¹ mg⁻¹.

Kata kunci: asam monokloroasetat, haloacid dehalogenase, *Bacillus cereus*, biodegradasi

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 2-HALOACID DEHALOGENASE FROM *Bacillus cereus* LOCAL STRAIN

by

SITI NURFAJRIAH

NIM: 20510018

Organohalogen is group of compounds widely used as solvent, herbicide, and fungicide in agriculture and industries. These compounds are persistent and toxic to environment, so they are potential to be pollutants. Monochloroacetic acid (MCA) is one of aliphatic chlorinated organic acid widely used as herbicide. Some bacteria from genus *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, and *Alcaligenes* are known as able to degrade MCA by utilizing 2-haloacid dehalogenase. This enzyme catalyzes carbon-halogen breakage on 2-haloalkanoic acid and produces 2-hydroxyalkanoic acid and halide ion. Recently it has been known that *Bacillus sp.* able to degrade monochloroacetic acid and 2,2-dichloropropionic acid. In this research, isolation and characterization of 2-haloacid dehalogenase from *Bacillus cereus* local strain by performed *B. cereus* was grown on *Luria Bertani* medium and *minimal salt medium* with or without MCA with concentration of 1-80 mM. Research results indicated that 2-haloacid dehalogenase from *B. cereus* is intracellular, constitutive, an optimum pH of 7, and optimum temperature of 30 °C. When using monochloroacetic acid as a substrate, this enzyme have K_{mapp} and V_{maxapp} value of 6.64 mM and 166.67 nmol min⁻¹mg⁻¹.

Keywords: Monochloroacetic acid, 2-haloacid dehalogenase, *Bacillus cereus*, biodegradation

Program Studi Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Bandung

Oleh

SITI NURFAJRIAH

NIM: 20510018

(Program Studi Kimia)

Institut Teknologi Bandung

Menyetujui

Tanggal, 3 Juni 2013

Pembimbing I



Dr. Enny Ratnaningsih

NIP. 195809011984032002

Pembimbing II



Dr. Dessy Natalia

NIP.196708191990092001

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis S2 yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Institut Teknologi Bandung, dan terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang dengan mengikuti aturan HaKI yang berlaku di Institut Teknologi Bandung. Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh tesis haruslah seizin Dekan Sekolah Pascasarjana, Institut Teknologi Bandung.

KATA PENGANTAR

Pada kesempatan kali ini, penulis bersyukur ke hadirat Allah SWT atas berkah dan rahmat-Nya, serta karunia kesabaran yang diberikan selama penulis melakukan penelitian, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis ini.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan rasa syukur dan terimakasih pada berbagai pihak yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian ini :

1. Ibu Dr. Enny Ratnaningsih selaku pembimbing yang senantiasa sabar dalam membimbing, memberi pengetahuan, semangat, dan pengarahan bagi penulis.
2. Ibu Dr. Dessy Natalia selaku pembimbing II yang senantiasa membimbing dan memberikan masukan dan pengetahuan kepada penulis.
3. Seluruh dosen Program Studi Kimia yang telah memberikan bekal pengetahuan yang sangat bermanfaat bagi penulis.
4. Orang tua dan suami yang selalu memberi dukungan moral dan do'a .
5. Ibu Dr. Fernita Puspasari, Mas Fean Davisunjaya, M.Si, Sari Dewi Kurniasih, M.Si, dan teman-teman seperjuangan (Ayu, Tiwi, Jia, Fatiha, dan Fitri) atas bantuan, semangat, diskusi-diskusi ilmiah, dan kebersamaannya di laboratorium.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan dan bantuan yang telah diberikan. Akhir kata, semoga hasil penelitian ini bermanfaat dan dapat menambah wawasan pengetahuan bagi kita semua.

Bandung, 3 Juni 2013

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar belakang penelitian	1
I.2 Tujuan Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Polutan lingkungan	4
II. 2 Asam Monokloroasetat	6
II.3 2-Haloacid Dehalogenase	8
II. 4 <i>Bacillus cereus</i>	15
II. 5 Aplikasi 2-Haloacid Dehalogenase.....	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	19
III.1 Alat.....	19
III.2 Bahan.....	20

III.2.1	Bakteri.....	20
III.2.2	Bahan Kimia.....	20
III.3	Metodologi Penelitian	20
III.3.1	Pembuatan larutan.....	20
III.3.2	Pembuatan <i>Mineral Salt Medium</i>	22
III.3.3	Pembuatan Medium Luria Bertani	23
III.3.4	Peremajaan Kultur Bakteri <i>B. cereus</i>	23
III.3.5	Pewarnaan Gram Bakteri <i>B. cereus</i>	23
III.3.6	Kurva Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh <i>B. cereus</i> pada Medium MSM	24
III.3.7	Kurva Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh <i>B. cereus</i> pada Medium LB.....	24
III.3.8	Isolasi 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase.....	25
III.3.9	Pemurnian Parsial 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase dengan Fraksinasi Ammonium Sulfat.....	25
III.3.10	Dialisis	26
III.3.11	Uji Kuantitatif 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase.....	27
III.3.12	Penentuan Kadar Protein dengan Metode Bradford.....	28
III.3.13	Penentuan pH Optimum 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase	28
III.3.14	Penentuan Suhu Optimum 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase	28
III.3.15	Penentuan K_{mapp} dan V_{maxapp} 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase	29
III.3.16	<i>Native</i> PAGE.....	29
III.3.17	SDS PAGE	30
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
IV.1	Pewarnaan Gram Bakteri <i>B. cereus</i>	31
IV.2	Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh <i>B. cereus</i> di Berbagai Medium Tumbuh	31
IV.2.1	Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh <i>B. cereus</i> pada Medium MSM.....	32
IV.2.2	Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh <i>B. cereus</i> pada Medium LB	34

IV.3 Pengujian Aktivitas 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase pada <i>Crude Extract</i> Intrasel dan Ekstrasel pada Berbagai Medium Tumbuh	36
IV.4 Produksi dan Pemurnian Parsial 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase	38
IV.5 Karakterisasi 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase	39
IV.5.1 Waktu Inkubasi Enzim	40
IV.5.2 pH Optimum	41
IV.5.3 Suhu Optimum	42
IV.5.4 Kinetika Enzim 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase	43
IV.6 <i>Native</i> PAGE	45
IV.7 SDS PAGE	46
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	48
V.1 Kesimpulan	48
V.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Struktur asam monokloroasetat	6
Gambar II.2	Reaksi katalisis oleh dehalogenase.....	9
Gambar II.3	Reaksi pemutusan karbon-halogen yang dikatalisis oleh 2- <i>haloacid</i> dehalogenase.....	11
Gambar II.4	Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh L-2- <i>haloacid</i> dehalogenase.....	12
Gambar IV.1	Pewarnaan gram bakteri <i>Bacillus cereus</i>	31
Gambar IV.2	Kurva pertumbuhan <i>B. cereus</i> dalam medium MSM tanpa atau dengan penambahan asam monokloroasetat 5 dan 10 mM	32
Gambar IV.3	Pengaruh konsentrasi MCA terhadap pertumbuhan <i>B. cereus</i> dan penentuan biodegradasi MCA oleh <i>B. cereus</i>	35
Gambar IV.4	Jumlah produk ion klorida yang terbentuk pada berbagai waktu inkubasi.....	40
Gambar IV.5	Aktivitas 2- <i>haloacid</i> dehalogenase <i>B. cereus</i> strain lokal pada berbagai pH.....	41
Gambar IV.6	Pengaruh suhu terhadap aktivitas 2- <i>haloacid</i> dehalogenase <i>B.</i> <i>cereus</i>	42
Gambar IV.7	Kurva hubungan antara V terhadap [S]	43
Gambar IV.8	Kurva hubungan 1/V terhadap 1/[S].....	44
Gambar IV.8	Elektroforegram <i>native</i> PAGE.....	45
Gambar IV.9	Elektroforegram SDS PAGE.....	46

DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Macam- macam polutan di air dan tanah	5
Tabel II.2	Karakterisasi 2- <i>haloacid</i> dehalogenase dari berbagai bakteri.....	13
Tabel IV.1	Hasil uji aktivitas 2- <i>haloacid</i> dehalogenase <i>crude extract</i> intrasel dan ekstrasel	37
Tabel IV.2	Aktivitas enzim 2- <i>haloacid</i> dehalogenase <i>crude extract</i> intrasel dan hasil fraksinasi ammonium sulfat	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A	Data dan Kurva Standar Ion Klorida Bebas dan Kadar Protein.....	57
Lampiran B	Data Pengaruh pH, Suhu, Nilai K_{mapp} dan V_{maxapp} 2- <i>Haloacid</i> Dehalogenase <i>B. cereus</i>	59
Lampiran C	Rumus Perhitungan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim.....	73

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang penelitian

Masalah lingkungan telah menjadi perhatian yang menarik bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat sejak 50 tahun terakhir. Pertumbuhan industri pertanian dan industri kimia mendorong pelepasan senyawa organik ke biosfer yang sebagian besar berupa polutan. Salah satu polutan yang cukup membahayakan lingkungan dan makhluk hidup adalah golongan organohalogen. Organohalogen digunakan secara luas di bidang industri sebagai pelarut dan sebagai herbisida dan fungisida di bidang pertanian (Fetzner dan Lingens, 1994). Senyawa organohalogen bersifat persisten dan toksik karena dapat bertahan lama di lingkungan, dan tidak mudah didegradasi oleh mikroorganisme. Oleh karena itu, senyawa organohalogen merupakan polutan bagi lingkungan.

Saat ini penggunaan asam monokloroasetat (MCA) sebagai bahan industri kimia semakin luas. MCA merupakan salah satu senyawa organoklor alifatik yang digunakan sebagai bahan aktif dalam produksi herbisida. MCA diproduksi sebanyak 706.000 ton pada tahun 2010, setengahnya diproduksi oleh negara Cina (Malveda, 2011). MCA termasuk asam kuat, mudah menguap, dan memiliki kelarutan tinggi di dalam air (Vos dan Bodar, 2008). Senyawa ini dapat terakumulasi di air permukaan, sehingga berbahaya bagi tanaman, alga, hewan, dan manusia. Oleh karena itu, degradasi MCA diperlukan agar dapat mengurangi efek toksik dan persistensi dari polutan ini.

Senyawa organohalogen yang mencemari lingkungan dapat ditangani secara fisika, kimia, dan biologi. Penanganan senyawa organohalogen secara fisika dan kimia dinilai tidak ekonomis karena semakin luas daerah yang tercemar maka

semakin tinggi biaya yang diperlukan. Selain itu, penanganan secara fisika dan kimia dapat menimbulkan pencemaran yang lebih kompleks karena kemungkinan dapat terbentuk senyawa baru yang dapat bersifat lebih toksik dibandingkan senyawa asal. Penanganan secara biologi dengan memanfaatkan mikroorganisme merupakan langkah yang aman untuk mengatasi pencemaran senyawa organohalogen. Mikroorganisme memiliki kemampuan adaptasi yang baik karena menghasilkan enzim tertentu yang dapat mengubah dan memineralisasi senyawa organohalogen (Jing, 2010).

Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa beberapa bakteri mampu mendegradasi senyawa organohalogen antara lain genus *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, dan *Hyphomicrobium* (Slater, 1994). Bakteri yang mampu memutuskan halogen dari senyawa organohalogen memiliki enzim yang disebut dehalogenase (Hardman, 1991). Bakteri ini mudah diisolasi karena senyawa organohalogen banyak terdapat di lingkungan. Senyawa ini digunakan oleh bakteri sebagai sumber karbon dan energi. Mikroorganisme yang dapat mendegradasi senyawa organohalogen memainkan peranan penting untuk mengurangi polutan organohalogen di tanah dan air.

Penelitian terhadap strain tertentu dari genus *Bacillus* diisolasi dari Gunung Sibayak menunjukkan bahwa mikroorganisme ini mampu mendegradasi asam 2,2-dikloropropionat pada suhu 40 °C (Roslan dkk, 2011). Fakta ini mengindikasikan bahwa strain *Bacillus* dapat menghasilkan dehalogenase yang mampu mengkatalisis penguraian senyawa organohalogen. Berdasarkan data di *gene bank*, *Bacillus cereus* diketahui memiliki gen dehalogenase. Penelitian mengenai 2-haloacid dehalogenase dari strain *Bacillus cereus* strain lokal masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi 2-haloacid dehalogenase dari *Bacillus cereus* strain lokal.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang akan dilakukan adalah untuk:

1. Mengisolasi *2-haloacid* dehalogenase dari *B. cereus* strain local menggunakan MCA sebagai substrat.
2. Mengkarakterisasi sifat-sifat *2-haloacid* dehalogenase *B. cereus* melalui uji aktivitas, pengaruh pH, pengaruh suhu, dan analisis untuk menentukan nilai K_{mapp} dan V_{maxapp} nya.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Polutan lingkungan

Di alam, senyawa organohalogen diproduksi dalam jumlah terbatas oleh berbagai organisme seperti organisme laut, bakteri, jamur, tanaman tingkat tinggi, serangga, maupun mamalia (Gribble, 1994). Senyawa alkana terhalogenasi (kloro dan bromometana) telah diisolasi dari alga laut. Mikroorganisme biotik menghasilkan hidrokarbon terhalogenasi antara lain fenol terkloronasi, terpena terhalogenasi, asam amino terkloronasi, dan pirol tersubstitusi kloro dan bromo. Hidrokarbon yang mengandung bromo disintesa oleh mikroorganisme laut (Gschwend dkk., 1985; Gribble, 1994).

Sintetik senyawa organohalogen banyak ditemukan di biosfer dengan penggunaan paling besar terjadi pada bidang industri dan pertanian. Senyawa ini bersifat racun dan persisten sehingga dapat menimbulkan masalah bagi lingkungan dan kesehatan pada manusia. Pada konsentrasi organohalogen yang cukup kecil dapat menyebabkan kontaminasi karena terjadi bioakumulasi pada rantai makanan yang kemudian menumpuk menjadi besar. Beberapa polutan yang mengkontaminasi air dan tanah, antara lain *Polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAHs), *Polychlorinated biphenyls* (PCBs), Pestisida (DDT, linden), dan turunan kloro (Tabel II.1) (Gianfreda dan Bollag, 2002).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), telah lama dikenal sebagai polutan lingkungan, hal ini dikarenakan senyawa tersebut terikat kuat pada material organik tanah dan memiliki kelarutan yang rendah sehingga sulit didegradasi oleh mikroorganisme (Gianfreda dan Bollag, 2002; Fetzner, 1998). Trikloroetana (TCE) merupakan senyawa organohalogen yang bersifat persisten, hal ini disebabkan karena senyawa tersebut memiliki densitas yang tinggi, larut dalam

air, reaktivitas kimia rendah, dan sulit terdegradasi oleh mikroorganisme (Gianfreda dan Bollag, 2002). *Pentachlorophenol* (PCP) dilepaskan ke udara oleh industri kayu, dan berada di tanah sebagai penggunaan pestisida. Senyawa ini berbahaya bagi mikroorganisme karena dapat merusak fungsi membran yang disebabkan menghambat proses fosforilasi oksidatif (Copley, 2000).

Organohalogen dari golongan asam haloasetat umumnya ditemukan di air permukaan dan distribusi sistem air minum. Asam haloasetat terdiri atas beberapa senyawa, yaitu asam monokloroasetat, asam dikloroasetat, asam trikloroasetat, dan asam trifluoroasetat (McRae dkk., 2004). Senyawa tersebut menyebabkan polusi lingkungan dan masalah kesehatan pada manusia sebagai akibat dari sifat toksik, persisten, dan bertransformasi menjadi metabolit yang berbahaya.

Tabel II.1 Macam- macam polutan di air dan tanah

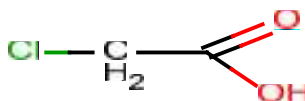
Bahan Kimia	Potensi Sumber Polutan	Lokasi
Senyawa organik berbahaya (benzena, toluen, xilena, diklorometana, triklorometana, trikloroetilena)	Limbah industri	Tanah
Pestisida (DDT, linden)	Pestisida	Tanah, air, dan sedimen
<i>Polychlorinated biphenyls</i> (PCBs)	Insulator pada peralatan listrik	Tanah dan air
Turunan kloro (klorofenol, klorobenzena)	Industri kayu, pelarut dalam industri pestisida, limbah pabrik kertas	Tanah dan air
<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> (PAHs) (seperti: naftalena, antrasena, penantrena)	Limbah bahan bakar fosil	Tanah dan air

Beberapa senyawa organohalogen dapat dengan mudah didegradasi oleh mikroorganisme, diantaranya asam monokloroasetat, metil klorida, dan

klorobenzena. Senyawa diklorometana, 1,2-dikloroetana, 1,2-dibromoetana, 1,3-dikloropropilena, dan heksakloroheksana sangat sulit didegradasi oleh bakteri. Tetapi, belum ada bakteri yang mampu mendegradasi senyawa kloroform, 1,2-dikloropropana, 1,1,1-trikloroetana dan trikloroetilena (Jansen dkk., 2005).

II. 2 Asam Monokloroasetat

Asam monokloroasetat merupakan senyawa organoklor alifatik. Senyawa ini dikenal sebagai asam kloroasetat atau asam kloroetanoat. Nama IUPAC untuk asam monokloroasetat adalah asam 2-kloroetanoat.



Gambar II.1. Struktur asam monokloroasetat

Asam monokloroasetat memiliki massa molekul 94,5 g/mol. Senyawa ini memiliki nilai pKa 2,86 merupakan asam yang lebih kuat daripada asam asetat dengan nilai pKa 4,75. Asam monokloroasetat memiliki titik didih yang cukup tinggi yaitu 187 °C sehingga asam monokloroasetat tidak mudah menguap pada suhu kamar (Vos dan Bodar, 2008). Pada suhu kamar asam monokloroasetat berbentuk padat, berwarna putih, dan memiliki titik leleh 62 °C (Vos dan Bodar, 2008). Asam monokloroasetat merupakan senyawa yang berbahaya, beracun, dan bersifat korosif.

Asam monokloroasetat banyak digunakan dalam industri pertanian dan industri kimia. Salah satu negara produsen asam monokloroasetat adalah Cina. Pada tahun 2010 asam monokloroasetat diproduksi sebanyak 706.000 ton, setengahnya diproduksi oleh Cina (Malveda, 2011). Asam monokloroasetat digunakan sebagai bahan aktif dalam herbisida, seperti *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), *2,4,5-trichlorophenoxyacid* (2,4,5-T), dan *2-methyl-4-phenoxyacetic acid* (EU Commision, 2005). Asam monokloroasetat banyak digunakan dalam pembuatan

carboxymethylcellulosa. Selain itu, asam monokloroasetat juga digunakan sebagai komponen dalam produk lem, detergen, dan kertas. Turunan asam monokloroasetat diantaranya adalah *thioglycolic acid*, digunakan sebagai penstabil *polyvinil chloride*. Di dunia industri, asam monokloroasetat digunakan sebagai senyawa intermediat dalam sintesis asam fenoksiasetat dan glisin (EU Commission, 2005).

Limbah asam monokloroasetat yang dibuang ke alam tidak dapat langsung terurai secara alami. Senyawa ini memiliki efek yang cukup berbahaya terhadap makhluk hidup, termasuk manusia. Menurut EU Commission (2005), senyawa ini dapat terabsorpsi melalui kulit, sistem pencernaan, dan pernafasan. Kontak langsung dengan senyawa ini dapat menyebabkan terbakarnya kulit dan mata. Efek lainnya dapat menyebabkan gangguan pernapasan, kebutaan, kerusakan paru-paru, dan mengganggu susunan saraf pusat). Asam monokloroasetat dan metabolitnya dapat bertindak seperti asam fluoroasetat yang dapat menghambat siklus asam trikarboksilat (siklus Krebs) (Gosselin dkk., 1984).

Asam monokloroasetat umumnya ditemukan dengan konsentrasi ≥ 450 ng/L pada air hujan dan 250 ng/L di air danau Kanada (Scott dkk., 2000). Akumulasi asam monokloroasetat di lingkungan dapat membahayakan organisme di lingkungan tersebut, terutama di lingkungan akuatik. Konsentrasi asam monokloroasetat sebesar 25 $\mu\text{g/L}$ di perairan dapat merusak alga, yaitu *Scenedesmus subspicatus* (Hanson dkk., 2002). Selain itu, beberapa makrofita yang hidup di lingkungan akuatik, seperti *Lemna gibba*, *Mynophyllum sibiricum*, dan *Myriophyllum spicatum* tidak dapat hidup pada konsentrasi asam monokloroasetat sebesar 100 mg/L (Hanson dkk., 2002). Indikator yang dipakai oleh Hanson untuk mengukur tingkat keracunan asam monokloroasetat pada ketiga makrofita adalah panjang akar, panjang daun, jumlah akar, dan warna pigmen dengan konsentrasi asam monokloroasetat sebesar 10, 30, dan 100 mg/L. *M. sibiricum* merupakan makrofita yang paling sensitif, hal ini ditandai dengan matinya *M. sibiricum* pada hari keempat setelah terpapar asam monokloroasetat. Kemudian, diikuti oleh *L. gibba* yang mati pada hari ketujuh setelah terpapar asam monokloroasetat 100 mg/L (Hanson dkk., 2002).

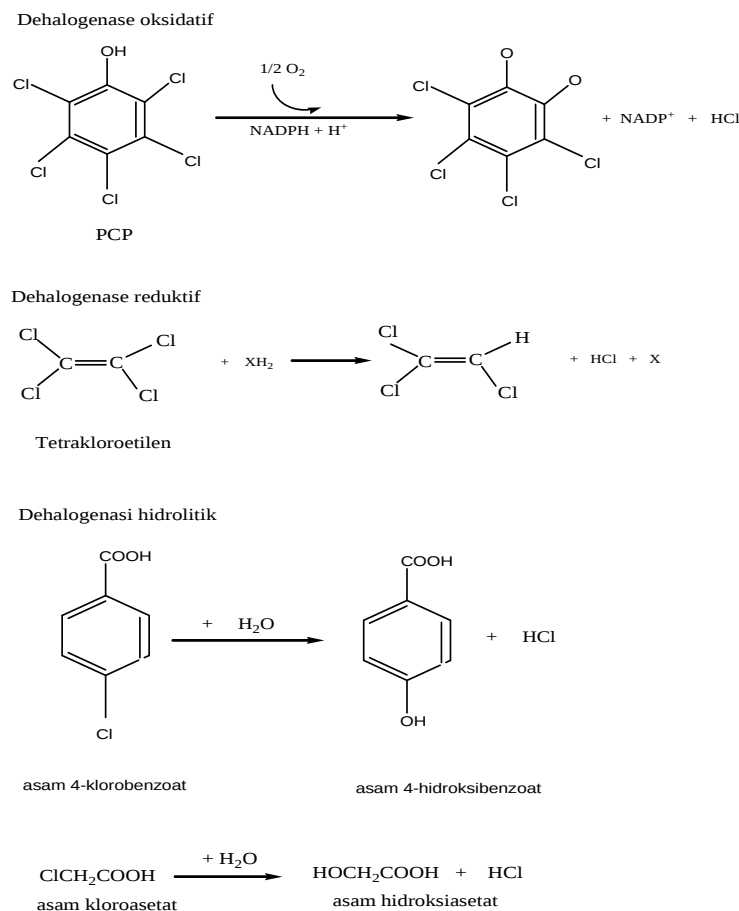
Beberapa bakteri yang mampu mendegradasi asam monokloroasetat telah berhasil diisolasi oleh banyak peneliti. Penelitian yang dilakukan oleh Schwarze (1997) telah berhasil mengisolasi beberapa bakteri seperti *Alcaligenes xylosoxidans*, *Camamonas acidovorans*, *Xanthomonas maltophilia*, dan *Agrobacterium tumeficiens* dapat menggunakan asam monokloroasetat untuk pertumbuhan hidupnya. *Pseudomonas cepacia* mampu mendegradasi asam monokloroasetat, asam monobromoasetat, asam 2-kloropropionat, dan asam 2-bromopropionat (Tsang dan Sam, 1999). *Bacillus sp.* dan *Corynebacterium sp.* mampu mendegradasi asam monokloroasetat dan asam trikloroasetat (Olaniran dkk., 2002). *Afipia spp.* mampu tumbuh dalam medium yang mengandung asam monokloroasetat, dikloroasetat, dan trikloroasetat dengan konsentrasi ≤ 1 mM (Zhang dkk., 2009). *Burkholderia sp.* telah berhasil diisolasi dari *water treatment* Tereangganu mampu tumbuh pada medium yang mengandung asam monokloroasetat dengan konsentrasi 10,6 mM (Horisaki dkk., 2011).

II.3 2-Haloacid Dehalogenase

Dehalogenase termasuk dalam kelompok enzim yang mampu memutuskan ikatan karbon-halogen (Hardman, 1991). Mekanisme pemutusan halogen dari senyawa haloaromatik dan halo alifatik dapat berlangsung secara oksidatif, hidrolitik, dan reduktif (Gambar II.2). Dehalogenase oksidatif merupakan enzim yang mengkatalisis pelepasan halogen, yang kemudian digantikan oleh oksigen (Commandeur dan Parson, 1994). Bakteri yang memiliki dehalogenase oksidatif yaitu *Pseudomonas aeruginosa* (Romanov dan Hausinger, 1994). Dehalogenase reduktif adalah enzim yang mengkatalisis pelepasan halogen dari senyawa organohalogen yang melibatkan penggantian satu atom halogen dengan satu atom hidrogen atau melibatkan reaksi reduksi (Smidth dan de Vos, 2004). Beberapa bakteri yang memiliki aktivitas dehalogenase reduktif diantaranya *Desulfitobacterium hafniense* (Bisaillon dkk., 2010), *Desulfitobacterium chlororespirans* (Krasotkina dkk., 2001), dan *Dehalococcoides ethenogenes* (Magnuson dkk., 2000). Dehalogenase hidrolitik adalah enzim yang mengkatalisis

pelepasan halogen dari senyawa organik terhalogenasi, yang kemudian digantikan oleh gugus hidroksil dari air (Goldman dkk., 1968).

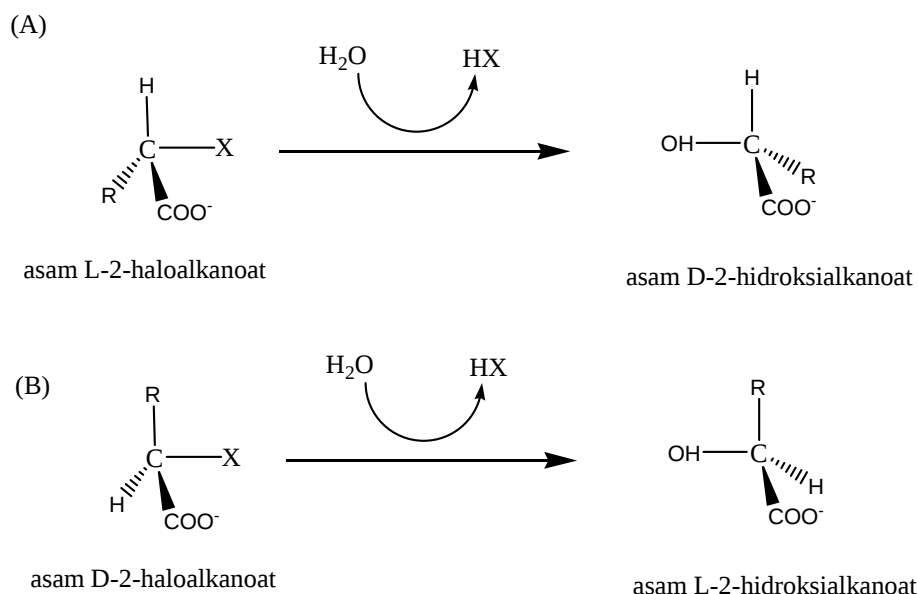
Berdasarkan substratnya, dehalogenase hidrolitik dibedakan atas haloalkana dehalogenase dan *haloacid* dehalogenase. Haloalkana dehalogenase (EC 3.8.1.5) merupakan enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan karbon-halogen pada substrat organohalogen dengan menghasilkan alkohol dan ion halida (Fetzner dan Lingens, 1994). *Haloacid* dehalogenase, *2-haloacid* dehalogenase atau *2-haloacid* halidohydrolase (EC 3.8.1.2) merupakan enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan karbon-halogen dari substrat asam 2-haloalkanoat menghasilkan asam 2-hidroksialkanoat dan ion halida (Kenji dkk., 1996).



Gambar II.2 Reaksi katalisis oleh dehalogenase (Fetzner dan lingens, 1994)

2-*Haloacid* dehalogenase diklasifikasikan ke dalam tiga kelompok berdasarkan pada spesifisitas steriokimia substratnya (Kurihara dkk., 2000) (Gambar II.3) yaitu L-2-*haloacid* dehalogenase, D-2-*haloacid* dehalogenase, dan DL-2-*haloacid* dehalogenase.

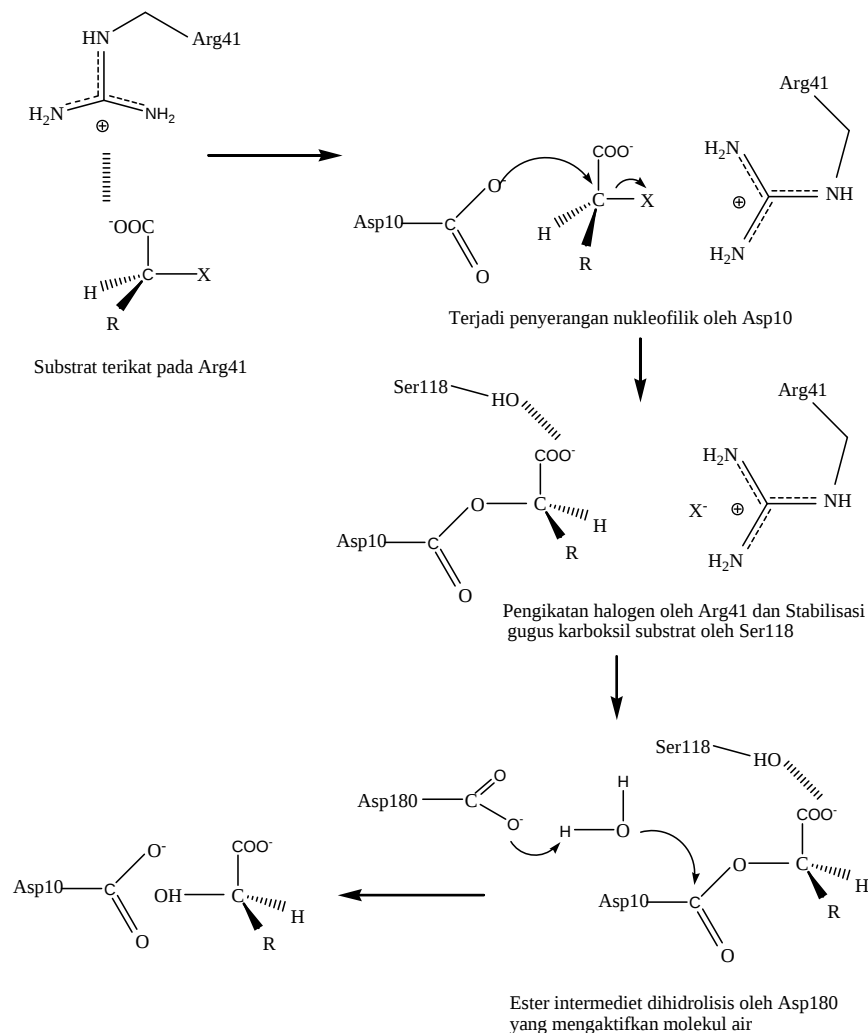
- L-2-*haloacid* dehalogenase mengkatalisis pelepasan karbon-halogen dari substrat asam L-2-haloalkanoat. *Pseudomonas* YL menghasilkan L-2-*haloacid* dehalogenase bersifat termostabil yang diinduksi oleh 2-kloropropionat. Aktivitas optimum enzim tersebut pada suhu 65 °C dan pH 9,5, serta memiliki berat molekul 28 kDa.
- D-2-*haloacid* dehalogenase mengkatalisis pelepasan karbon-halogen dari substrat asam D-2-haloalkanoat. Smith dkk (1990) telah berhasil mengisolasi enzim D-2-*haloacid* dehalogenase dari *Pseudomonas putida* AJ1/23 dengan berat molekul 135 kDa dan aktivitas optimum pH 9,5 dan suhu 50 °C.
- DL-2-*haloacid* dehalogenase mengkatalisis pemutusan karbon-halogen pada kedua enantiomer dari substrat asam D- dan L-2-haloalkanoat. Enzim ini telah diisolasi dari *Pseudomonas* sp.113 yang menunjukkan bahwa pH optimum enzim 9,5 dan berat molekul 68 kDa. Nilai K_m enzim tersebut adalah 5 mM untuk substrat asam monokloroasetat, 1,1 mM untuk asam L-2-kloropropionat, dan 4,8 mM untuk asam D-2-kloropropionate. Enzim ini dapat diinhibisi oleh $HgCl_2$, $ZnSO_4$, dan $MnSO_4$, tetapi tidak terpengaruh oleh reagen thiol seperti p-kloromerkuribenzoat dan iodoasetamida (Motosugi dkk, 1982).



Gambar II.3 Reaksi pemutusan karbon-halogen yang dikatalisis oleh 2-haloacid dehalogenase. (A) menunjukkan reaksi katalisis L-2- haloacid dehalogenase, (B) menunjukkan reaksi katalisis D 2-haloacid dehalogenase. R mengindikasikan gugus alkil. X merupakan atom halogen.

Reaksi dehalogenasi hidrolitik oleh 2-haloacid dehalogenase melibatkan residu katalitik Asp10, Ser118, dan Asp180 (Kurihara dkk., 2000). Arg41 merupakan residu asam amino yang berperan sebagai sisi pengenalan substrat. Arg41 yang bermuatan positif membentuk ikatan elektrostatik dengan gugus karboksil dari substrat. Kemudian Asp10 pada residu katalitik melakukan serangan nukleofilik terhadap atom karbon α yang mengikat atom halogen, sehingga ion halida (X^-) terlepas dari substrat. Selanjutnya terbentuk ikatan intermediet ester antara gugus karboksil dari Asp10 pada residu katalitik dengan substrat. Ion halida yang terlepas dari substrat akan berinteraksi dengan gugus guanidin dari Arg41. Gugus guanidin pada Arg41 bertindak sebagai akseptor ion halida yang terlepas dari substrat, hal ini disebabkan karena residu tersebut merupakan satu-satunya residu fungsional yang terletak pada posisi yang tepat dengan semua intermediet ester. Ser118 berperan untuk menstabilkan gugus karboksil pada substrat karena residu ini berada dekat gugus karboksil substrat pada saat struktur intermediet ester terbentuk. Pada tahap selanjutnya, intermediet ester yang terbentuk dihidrolisis oleh molekul air yang diaktifkan oleh residu Asp180. Pada akhir reaksi terbentuk

asam 2-hidroksialkanoat (Kurihara dkk., 2000). Mekanisme reaksi 2-*haloacid* dehalogenase dapat dilihat pada Gambar II.3 (Kurihara dkk., 2000). Berdasarkan mekanisme reaksi ini, maka degradasi asam monokloroasetat akan menghasilkan asam glikolat. Asam glikolat dapat dimetabolisme lebih lanjut oleh mikroba menghasilkan glisin dan asam format (Jacobsen dkk., 1984).



Gambar II.4 Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh L-2-*haloacid* dehalogenase (Kurihara dkk., 2000)

2-*haloacid* dehalogenase telah banyak diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai macam bakteri umumnya bakteri yang berasal dari tanah, seperti *P. cepacea*, *P. putida*, *Rhizobium* sp., *P. fluorescens*, *Methylobacterium* sp. HJ1, dan *Corynebacterium* sp. (Tabel II.2) (Sutrisno, 1997; Hamid dkk., 2011; Donelly,

2009; Motosugi dkk., 1982; Huyop dkk., 2010). Penelitian mengenai 2-haloacid dehalogenase yang diisolasi dari bakteri laut masih jarang dilakukan, salah satunya bakteri *Paracoccus sp.* dari batu karang yang berasal dari Laut kuning Cina yang tercemar industri klorin (Huang dkk., 2011). *Paracoccus sp.* ini mampu mendegradasi asam 2-kloropropionat konsentrasi 10 mM sebesar 97% dengan waktu inkubasi 12 jam. 2-haloacid dehalogenase yang diisolasi dari bakteri ini memiliki aktivitas tertinggi pada substrat asam iodoasetat, diikuti asam 2-kloropropionat, dan asam 2-bromopropionat. Enzim ini bekerja optimum pada suhu 30 °C (Huang dkk., 2011).

Tabel II.2 Karakterisasi 2-haloacid dehalogenase dari berbagai bakteri

Bakteri	pH opt	Suhu opt (°C)	BM (kDa)	V _m (μmol/min/mL)	K _m (mM)	Referensi
<i>Pseudomonas sp</i>	8	30	56	-	0.25 (3CP)	Hamid dkk., 2011
<i>Pseudomonas cepacea</i>	10	40	-	0,75 (MCA)	1,4 (MCA)	Sutrisno, 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8	30	38	38 (MFA)	0,7 (MFA)	Donnelly, 2009
<i>Pseudomonas putida</i>	9,5	30	68	-	5 (MCA)	Motosugi dkk., 1982
<i>Rhizobium sp</i>	7,2	40	-	-	16,4 (MCA)	Huyop dkk., 2010
<i>Corynebacterium sp</i>	7,6	30	-	-	-	Olaniran dkk., 2001
<i>Methylobacterium sp</i> HJ1	7,2	35	36		0,25 (2,2-D DCP)	Jing dkk., 2008

Catatan: substrat yang digunakan untuk menentukan nilai K_m 3CP= asam 3-kloropropionat, MFA= asam monofluoroasetat, MCA= asam monokloroasetat, 2,2-DCP= asam 2,2-dikloropropionat

Beberapa peneliti telah melakukan teknologi DNA rekombinan maupun kloning untuk meningkatkan produksi 2-*haloacid* dehalogenase dan mengembangkan kemampuan katalitiknya, antara lain:

- Tsang dan Sam (1999) melakukan isolasi gen *haloacid* dehalogenase (*hdlIva*) dari *Burkholderia cepacia* MBA4 yang diklon dan diekspresikan ke dalam *E. coli*. *haloacid* dehalogenase yang dihasilkan sangat aktif terhadap substrat asam monobromoasetat tetapi tidak aktif terhadap substrat asam dikloroasetat dan asam klorobutana. Nilai K_m dan V_{max} untuk substrat asam monobromoasetat (0,1-3 mM) adalah 1,13 mM dan $30 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. Suhu dan pH optimum enzim ini adalah 30 °C dan 6,5. Enzim ini diinhibisi sebagian oleh CuSO_4 , RbCl_2 , p-merkuri klorobenzoat dan diinhibisi total oleh. Enzim ini memiliki berat molekul 28 kDa.
- Gen *haloacid* dehalogenase (Dehl) dari *Rhizobium* sp. telah diekspresikan ke dalam *E. coli* (Huyop dkk., 2008). Enzim ini memiliki berat molekul 61 kDa dan 31 kDa dengan menggunakan gel filtrasi dan SDS-PAGE. Enzim ini bekerja spesifik terhadap asam L-2-kloropropionat dan asam dikloroasetat, tetapi tidak dapat bekerja pada asam 2,2-dikloropropionat dan asam trikloroasetat. Nilai K_m untuk substrat asam L-2-kloropropionat adalah 0,15 mM; untuk substrat asam D,L-2-kloropropionat adalah 0,12 mM; untuk substrat asam D,L-2,3-dikloropropionat adalah 0,03 mM; dan untuk substrat asam dikloroasetat adalah 0,13 mM (Huyop dkk., 2008).
- Daunert dkk (2009) telah mengisolasi gen L-2-*haloacid* dehalogenase dari archaea termofilik *Sulfolobus tokodaii* yang diklon dan diekspresikan ke dalam *E. coli*. Enzim ini bersifat termostabil dengan aktivitas optimum pada suhu 60 °C, waktu paruh inkubasi lebih dari 1 jam pada suhu 70 °C, dan pH 9,5. Enzim ini memiliki aktivitas tertinggi terhadap substrat asam kloropropionat. Nilai K_m dan V_{max} untuk substrat asam L-2-kloropropionat adalah 1,7 mM dan $0,35 \mu\text{M min}^{-1}$; substrat asam 2-bromopropionat adalah 2,1 mM dan $0,27 \mu\text{M min}^{-1}$; substrat asam 2-bromoheksanoat 0,41 mM dan $0,13 \mu\text{M min}^{-1}$. Enzim ini berbentuk homodimer dengan masing-masing monomer tersusun atas domain utama β -sheet yang dikelilingi oleh α -heliks dan subdomain α -heliks (Rye dkk., 2009).

- Novak dkk (2013) telah berhasil mengisolasi gen *L-haloacid* dehalogenase (*DehRhb*) dari *family Rhodobacteraceae* yang diklon dan diekspresikan ke dalam *E. coli*. Protein *DehRhb* menunjukkan bahwa *L-2-haloacid* dehalogenase memiliki aktivitas tertinggi terhadap rantai karbon pendek terbromonasi ($\leq C_3$). Enzim ini memiliki suhu optimum 55 °C, V_{max} 175 $\mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ dan K_m 6,72 mM dengan menggunakan substrat asam monokloroasetat.

II. 4 *Bacillus cereus*

B. cereus umumnya ditemukan di tanah (Tallent dkk., 2012). Bakteri ini memiliki ukuran 1x3-4 μm , gram positif, berbentuk batang, membentuk endospora, dan bakteri anaerob fakultatif (Vilain dkk., 2002). Bakteri anaerob fakultatif, artinya dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen. *B. cereus* termasuk bakteri mesofilik, tumbuh optimum di suhu 20-40 °C dan pH 4,3-9 (Vilain dkk., 2002). Bakteri ini bergerak dengan menggunakan flagella (Senesi dkk., 2002). Spora dari *B. cereus* dapat mengkontaminasi makanan, termasuk produk susu dan daging (Tallent dkk., 2012). Produk makanan yang terkontaminasi *B. cereus* dapat mengakibatkan penyakit diare dan muntah, hal ini dikarenakan bakteri tersebut menghasilkan racun enterotoksin (hemolisin BL, non-hemolitik enterotoksin, dan sitotoksin) (Kotiranta dkk., 2000; Tallent dkk., 2012).

Taksonomi *B. cereus* (NCBI, 2013) adalah:

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Familia	: <i>Bacillaceae</i>
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>Bacillus cereus</i>

Beberapa strain *B. cereus* yang tidak menghasilkan racun HBL dapat digunakan sebagai agen pengendali biologis yang berperan dalam menekan jumlah jamur dan penyakit pada tanaman, diantaranya *B. cereus* Strain B4, *B. cereus* DGA3, *B. cereus* strain UW85. *B. cereus* Strain B4 menghasilkan tiga tipe metabolite yaitu

kanosamin, 3,4-dihidroksibenzoat, dan 2-keto-4metilthiobutarat yang dapat digunakan sebagai pestisida untuk menghilangkan jamur pada akar tanaman, menghambat penyakit pada tanaman, dan meningkatkan ketahanan tanaman (Sunaina, 2005). *B. cereus* DGA3 menghasilkan antibiotik *zwittermicin A* yang digunakan untuk menghilangkan jamur dan bakteri yang dapat menimbulkan penyakit pada tanaman (Handelsman dkk., 1998). *B. cereus* strain UW85 menghasilkan *zwittermicin A* dan antibiotik B yang berperan untuk melindungi benih tanaman dari pembusukan yang disebabkan oleh *Pythium aphanidermatum* (Siloh-Suh dkk., 1994).

Beberapa peneliti diketahui telah berhasil mengisolasi strain *Bacillus* yang mampu mendegradasi senyawa organohalogen dan menghasilkan *2-haloacid* dehalogenase, antara lain:

- Strain *Bacillus* yang diisolasi dari daerah merapi Gunung Sibayak mampu tumbuh dan mendegradasi asam 2,2-dikloropropionat (Roslan dkk, 2011). Bakteri tersebut ditumbuhkan dalam *Basal salt medium* yang mengandung asam 2,2-dikloropropionat 20 mM pada suhu 30, 40, dan 60 °C. Isolat bakteri dapat tumbuh dengan baik pada suhu 40 °C, tetapi tidak dapat tumbuh pada suhu 60 °C (Roslan dkk., 2011).
- Zulkifly dkk (2010) telah mengisolasi strain *Bacillus* dari *water treatment* Terengganu yang mampu mendegradasi asam monokloroasetat. Isolat bakteri tersebut mampu tumbuh pada medium PJC cair dengan konsentrasi asam monokloroasetat 0,5 mM pada suhu 30 °C dan pH 6,5. Jumlah maksimum klorida yang dilepaskan ke dalam medium cair sebesar 0,32 $\mu\text{mol Cl}^-\text{mL}^{-1}$.
- Strain *Bacillus* telah berhasil diisolasi dari sedimen laut oleh Chiba. *Bacillus* ini mampu mendegradasi asam monobromoasetat 0,3-1,8 mg/mL (Chiba dk.k, 2009). Hal ini menunjukkan bahwa strain *Bacillus* menghasilkan enzim yang mampu menguraikan senyawa organohalogen yaitu *haloacid* dehalogenase. *Haloacid* dehalogenase yang dihasilkan dari strain *Bacillus* ini memiliki aktivitas optimum pada suhu 41 °C dan pH 10. Enzim tersebut memiliki relatif aktivitas tertinggi terhadap substrat asam monobromoasetat (213%), diikuti asam

monokloroasetat (100%), asam DL-2-kloropropionat (14,9%), asam L-2-kloropropionat (14,7%), asam dikloroasetat (8,4%), asam D-2-kloropropionat (6,5%), dan asam DL-2-klorobutirat (1,3%) (Chiba dkk., 2009).

- Olaniran dkk (2001) telah mengisolasi tiga strain *Bacillus* dari tanah dan limbah lumpur di Nigeria yang diberi kode *Bacillus* GBB 412, GBB 414, dan GBB 415. Tiga *Bacillus* tersebut mampu mendegradasi asam monokloroasetat, asam trikloroasetat, triklorometana, dan tetraklorometana. Aktivitas *Crude extract* 2-haloacid dehalogenase optimum pada suhu 30 °C untuk GBB 414 dan GBB 415, sedangkan GBB 412 pada suhu 35 °C. Enzim ini memiliki pH optimum 7,6 (GBB 412 dan GBB 415) dan 8 (GBB 414).
- Strain *Bacillus* yang berasal dari humus tempat pembuangan sampah di Ile-Ile Nigeria telah diisolasi oleh Olaniran (Olaniran dkk., 2002). Isolat bakteri tersebut mampu mendegradasi asam monokloroasetat, asam trikloroasetat, triklorometana, dan tetraklorometana. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim 2-haloacid dehalogenase. *Crude extract* enzim diuji aktivitas pH dan suhu dengan menggunakan substrat asam trikloroasetat. Aktivitas optimum enzim terjadi pada pH 7 dan suhu 30 °C (Olaniran dkk., 2002).

II. 5 Aplikasi 2-Haloacid Dehalogenase

Aplikasi 2-Haloacid dehalogenase umumnya digunakan dalam proses biokatalisis dan bioremediasi lingkungan. Penggunaan 2-haloacid dehalogenase untuk proses kimia secara komersial pertama kali terjadi pada akhir tahun 1980. Target pasar baru mendorong pengembangan optik aktif untuk industri farmasi dan agrokimia. Enzim yang digunakan adalah R-2-haloacid dehalogenase dari *Pseudomonas putida* AJ1/23, yang dikembangkan untuk mengubah rasemik asam 2-kloropropionat menjadi optik aktif S-asam kloropropionat, yang berperan sebagai *building block* pada sintesa herbisida dan agen anti inflamasi. R-2-haloacid dehalogenase merupakan enzim yang mengkatalisis dehalogenasi stereoselektif dengan mengubah konfigurasi asam 2-kloropropionat menghasilkan R-asam laktat dan S-asam kloropropionat (Swanson, 1999). Hal yang sama juga terjadi pada

produksi optik aktif 3-halolaktat dari 2,3-dihalopropionat dengan menggunakan 2-*haloacid* dehalogenase dari *P. putida* (Fetzner dan Lingens, 1994).

Bioremediasi merupakan proses mengubah senyawa pencemar organohalogen yang berbahaya menjadi senyawa lain yang lebih aman dengan memanfaatkan mikroorganisme, tanaman, maupun enzimnya (Gianfreda dan Bollag, 2002). Salah satu strategi untuk membatasi penggunaan mikroorganisme dalam proses detoksifikasi daerah tercemar, maka digunakan enzim *crude extract*. Beberapa enzim bekerja spesifik untuk limbah tertentu seperti limbah kertas dan pulp, senyawa organohalogen, pestisida, logam berat, limbah padat dan lumpur, dan limbah proses makanan. Dalam proses bioremediasi biasanya enzim yang digunakan dapat digunakan kembali (*must be reused*) dan stabilitas enzim meningkat, oleh karena itu digunakan teknik immobilisasi. Immobilisasi D-2-*haloacid* dehalogenase dari *P. putida* AJ1/23 telah dilakukan oleh Parker dan Colby (1995). Enzim immobilisasi dari bakteri ini memiliki aktivitas optimum pada suhu 30-45 °C dan pH 5-9. Nilai K_m enzim immobilisasi adalah 45 mM dengan menggunakan substrat asam D- 2-kloropropionat (Parker dan Colby, 1995). Enzim immobilisasi ini diterapkan dalam *flow bioreactor*.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Alat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Kimia FPMIPA ITB. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah peralatan gelas standar seperti Erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, gelas kimia, botol reagen, tabung reaksi, batang pengaduk, jarum Ose, pipet seukuran, dan pipet tetes (*Pyrex, Germany, Duran Schott*), tabung mikrosentrifuga volume 1,5 mL, pipet mikro (*Eppendorf dan Socorex*) berbagai ukuran antara lain 1–10 μL , 10–100 μL , 20–200 μL , 100–1000 μL , beserta tipnya.

Penyiapan pereaksi pada pH tertentu dilakukan dengan menggunakan pH meter (*Orion*). Pengukuran massa zat-zat kimia dilakukan dengan menggunakan neraca analitik (*Sartorius, Ohaus*). Sterilisasi bahan-bahan dan peralatan gelas tahan panas dilakukan dengan menggunakan autoklaf (*Sturdy, SA-232X*). Pengujian aktivitas enzim terhadap pengaruh suhu dilakukan dengan menggunakan *waterbath (Precesion)*.

Biakan *Bacillus cereus* diinkubasi dalam *incubated shaker (Jelo Tech SI-600R)*. Pengukuran absorbansi dan nilai OD kultur bakteri cair dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (spektrofotometer *Genesys 20*). Pemisahan sel dari medium biakan cair dan pemisahan supernatan dari endapan dilakukan secara sentrifugasi menggunakan sentrifuga (*Boeco U-320R, Beckman J2-HS*). Sebagai alat pemecah sel digunakan sonicator (*Fischer*).

III.2 Bahan

III.2.1 Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah *B. cereus* yang diperoleh dari laboratorium Biogen Kementerian Pertanian, Bogor.

III.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah Na_2HPO_4 (Merck), KH_2PO_4 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), tripton (Bio Basic Canada Inc), ekstrak ragi (Bio Basic Canada Inc), NaOH (Merck), asam asetat glasial (Merck), Na-asetat (Merck), agar bakto (Bio Basic Canada Inc), asam monokloroasetat (Merck), BaCl_2 (Merck), $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (Merck), $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ (Merck), HNO_3 (Merck), BaCl_2 (Merck), etanol p.a (Merck), NaCl (Merck), reagen Bradford (BioRad), BSA (Merck), bis-akrilamid 40% (BioRad), amonium persulfat (Bio Basic Inc), TEMED (Merck), SDS (Merck), glisin (Merck), H_2SO_4 (Merck), HCl (Merck), basa tris (Merck), Na-asetat (Merck), dan *broad range protein molecular weight marker* (Promega).

III.3 Metodologi Penelitian

III.3.1 Pembuatan larutan

- Larutan $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 0,1%
1 gram $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ dilarutkan dalam 100 mL etanol 95% p.a. Larutan tersebut didiamkan selama 24 jam, kemudian disaring. Larutan disimpan dalam botol kaca coklat pada suhu ruang.
- Larutan $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 1 M
 $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ ditimbang sebanyak 12,056 gram (A). Asam sulfat pekat sebanyak 2,5 mL ditambahkan dengan 5 mL aquades (B). Bahan kimia A

dicampurkan dengan larutan B hingga larut, kemudian diencerkan dengan aquades sampai volumenya 30 mL.

- 0,25 mM $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ dalam 9 M HNO_3
25 mL $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 1 M dilarutkan dalam 60 mL HNO_3 15 M, kemudian ditambahkan 15 mL aquades.
- Larutan BaCl_2 5%
5 gram BaCl_2 dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian ditetesi HCl 2 tetes.
- Larutan APS 10%
0,1 gram amonium persulfat dilarutkan dalam 1 mL aquades.
- Larutan iodin
0,67 gram KI dan 0,33 gram iodin dihaluskan di dalam mortar, kemudian dilarutkan secara perlahan dengan 100 mL aquades. Larutan ini disimpan dalam botol coklat.
- Larutan MCA 100 mM
MCA sebanyak 0,945 gram dilarutkan ke dalam 100 mL aquades.
- Larutan Tris 200 mM
2,43 gram basa Tris dilarutkan ke dalam 100 mL aquades.
- Buffer Tris-asetat 50 mM pH 7,5
25 mL larutan Tris 200 mM ditambahkan 60 mL aquades. pHnya diadjust sampai 7,5 dengan asam asetat glasial. Kemudian diencerkan sampai volumenya 100 mL.
- Buffer Tris-asetat 10 mM pH 7,5
5 mL larutan Tris 200 mM ditambahkan 80 mL aquades. pHnya diadjust sampai 7,5 dengan asam asetat glasial. Kemudian diencerkan sampai volumenya 100 mL.

- 5 mM MCA dalam 50 mM buffer Na-asetat pH 4
10 mL larutan Na-asetat 500 mM ditambahkan 5 mL MCA 100 mM dan 70 mL aquades. Campuran ini diadjust pHnya dengan asam asetat glasial sampai pHnya 4. Kemudian, campuran ini tambahkan aquades sampai volumenya 100 mL. Perlakuan yang sama dilakukan pada 5 mM MCA dalam 50 mM buffer Na-asetat pH 5.
- 5 mM MCA dalam 50 mM buffer Tris-asetat pH 8
25 mL larutan basa Tris 200 mM ditambahkan 5 mL larutan MCA 100 mM dan 55 mL aquades. Campuran ini diadjust pHnya dengan asam asetat glasial sampai pHnya 8. Kemudian, campuran ini diencerkan sampai volumenya 100 mL. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada pembuatan 5 mM MCA dalam 50 mM buffer Tris-asetat pH 6-7.
- 5 mM MCA dalam 50 mM buffer glisin-NaOH pH 9
10 mL larutan glisin 500 mM ditambahkan 5 mL MCA 100 mM dan 70 mL aquades. Campuran ini diadjust pHnya dengan NaOH sampai pHnya 9. Kemudian, campuran ini tambahkan aquades sampai volumenya 100 mL. Perlakuan yang sama dilakukan pada 5 mM MCA dalam 50 mM buffer Glisin-NaOH pH 10.
- Larutan safranin
2,5 gram safranin O dilarutkan ke dalam 100 mL etanol 95%. Larutan ini sebagai larutan stok safranin. Untuk larutan kerja, 10 mL larutan safranin stok ditambahkan 90 mL aquades.

III.3.2 Pembuatan *Mineral Salt Medium*

Mineral salt medium (MSM) cair sebanyak 100 mL dibuat dengan mencampurkan Na_2HPO_4 0,54 gram, KH_2PO_4 0,14 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% gram dan ekstrak ragi 0,1 gram dengan 100 mL aquades. Untuk membuat MSM padat sebanyak 100 mL ditambahkan agar bakto 1,5 gram. Campuran

disterilisasi pada suhu 121 °C tekanan 1,5 Kg/cm³ selama 15 menit. Medium yang telah steril dituang ke dalam cawan petri secara aseptik. Setelah padat, medium siap digunakan atau disimpan pada suhu 4 °C sampai diperlukan.

III.3.3 Pembuatan Medium Luria Bertani

Medium Luria Bertani (LB) sebanyak 100 mL dibuat dengan mencampurkan tripton 1 gram dan ekstrak ragi 0,5 gram. Untuk membuat medium LB padat 100 mL ditambahkan 1,5 gram agar bakto. Semua bahan dilarutkan dalam 100 mL aquades. Campuran disterilisasi pada suhu 121 °C tekanan 1,5 Kg/cm³ selama 15 menit. Medium yang telah steril dituang ke dalam cawan petri secara aseptik. Setelah padat, medium siap digunakan atau disimpan pada suhu 4 °C sampai diperlukan.

III.3.4 Peremajaan Kultur Bakteri *B. cereus*

Kultur bakteri *B. cereus* yang disimpan dalam agar miring diremajakan dengan menotolkan kawat Ose pada agar miring dan menggoreskannya pada MSM padat secara aseptik. MSM padat kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C *overnight*. Kultur yang sudah tumbuh disimpan pada suhu 4 °C. Peremajaan berkala dilakukan dengan menggoreskan Ose pada kultur dan dipindahkan ke MSM padat baru secara aseptik.

III.3.5 Pewarnaan Gram Bakteri *B. cereus*

Kultur bakteri cair segar dicuplik sebanyak 2 µL, diteteskan pada kaca objek. Kultur pada kaca objek (preparat) dipanaskan dengan bunsen sampai kering. Preparat diteteskan pewarna kristal violet dan didiamkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan aquades, kemudian diteteskan dengan iodine, dan dicuci kembali dengan aquades. Selanjutnya, preparat dicuci dengan alkohol 70%, ditambahkan

pewarna safranin kemudian dicuci dengan aquades. Preparat siap diamati di bawah mikroskop.

III.3.6 Kurva Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh *B. cereus* pada Medium MSM

Koloni tunggal *B. cereus* dari MSM padat diambil dengan menggunakan kawat Ose, kemudian dipindahkan ke dalam MSM cair secara aseptik dan diinkubasi pada suhu 30 °C, didalam *shaking incubator* 200 rpm selama 16-18 jam. Sebanyak 5% (v/v) inokulum dipindahkan secara aseptik ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 100 mL MSM cair tanpa dan adanya penambahan asam monokloroasetat dengan konsentrasi akhir 5 mM dan 10 mM, diinkubasi pada suhu 30 °C, 200 rpm di dalam *shaking incubator*. Sebanyak 1 mL sampel diambil secara aseptik pada jam ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28, 32, 36 dan 48 untuk diukur OD selnya pada λ 600 nm.

Biodegradasi asam monokloroasetat oleh bakteri ditentukan dengan metode Iwasaki (1952). Kultur bakteri sebanyak 250 μ L disentrifugasi untuk memisahkan pelet dan supernatan. Supernatan direaksikan dengan 700 μ L $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 0,1% dan 100 μ L 0,25 mM $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$. dalam 9 M HNO_3 Sampel didiamkan selama 10 menit. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 460 nm.

III.3.7 Kurva Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh *B. cereus* pada Medium LB

Koloni tunggal *B. cereus* dari MSM padat diambil dengan menggunakan kawat ose, kemudian dipindahkan ke dalam LB cair secara aseptik dan diinkubasi pada suhu 30 °C, didalam *shaking incubator* 200 rpm selama 16-18 jam. Sebanyak 5% (v/v) inokulum dipindahkan secara aseptik ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 20 mL LB cair tanpa dan adanya penambahan asam monokloroasetat dengan konsentrasi akhir 1, 5, 10, 20, 40 dan 80 mM, diinkubasi pada suhu 30 °C, 200 rpm di dalam *shaking incubator*. Sebanyak 1 mL sampel diambil secara aseptik pada jam ke-0 dan 24 untuk diukur OD selnya pada λ 600 nm.

Untuk mengukur biodegradasi asam monokloroasetat oleh *B. cereus* dilakukan pencuplikan 250 μ L kultur bakteri. Kemudian, Kultur bakteri disentrifugasi untuk memisahkan pelet dan supernatan. Supernatan direaksikan dengan 700 μ L $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 0,1% dan 100 μ L 0,25 mM $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ dalam 9 M HNO_3 Sampel didiamkan selama 10 menit. Sampel diukur absorbansinya pada λ 460 nm

III.3.8 Isolasi 2-Haloacid Dehalogenase

Koloni tunggal *B. cereus* dari MSM padat diambil dengan menggunakan kawat ose, kemudian dipindahkan ke dalam 20 mL LB cair secara aseptik kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C, didalam *shaking incubator* dengan pengocokan pada 200 rpm selama 16-18 jam sebagai starter. Sebanyak 5% (v/v) inokulum dipindahkan secara aseptik ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 100 mL LB cair diinkubasi pada suhu 30 °C, dengan pengocokan 200 rpm selama 24 jam. Kultur tersebut dipanen kemudian disentrifuga pada kecepatan 10000 x g selama 25 menit pada suhu 4 °C. Pelet dicuci dengan 10 mL 50 mM buffer Tris-asetat (pH 7,5) sebanyak 2 kali. Pelet sel diresuspensi dengan buffer yang sama (pelet: buffer= 1:3) dan disentrifuga dengan kondisi yang sama. Pelet sel dipecah dengan sonikator (*Fisher*) sebanyak 20 siklus (30 detik disonikasi, 30 detik istirahat), 50 Hertz. Pelet sel (dinding sel dan sel yang tidak pecah) dihilangkan dengan sentrifugasi 12000 x g selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan (*Crude extract*) intrasel didekantasi dan disimpan pada suhu 4 °C untuk dianalisis selanjutnya.

III.3.9 Pemurnian Parsial 2-Haloacid Dehalogenase dengan Fraksinasi Ammonium Sulfat

Crude extract intrasel yang diperoleh dari hasil sonikasi sebanyak 100 mL ditambahkan garam ammonium sulfat sebanyak 10,6 gram, kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Campuran disentrifuga pada kecepatan 12000 x g selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan 50 mM

buffer Tris-asetat pH 7,5 (pelet: buffer= 1:2). Supernatan I (fraksi I 0-20%) diukur volume, kadar protein, dan diuji aktivitas enzimnya.

Supernatan yang diperoleh dari fraksi I ditambahkan ammonium sulfat sebanyak 11,3 gram. Campuran diaduk sampai larut kemudian disentrifuga pada 12000 x g selama 20 menit. Endapan dilarutkan dengan 50 mM buffer Tris-asetat pH 7,5 (pelet: buffer= 1:2). Supernatan II (fraksi II 20- 40%) diukur volume, kadar protein, dan diuji aktivitas enzimnya.

Ammonium sulfat sebanyak 12 gram ditambahkan ke dalam supernatan dari fraksi II. Campuran diaduk sampai larut kemudian disentrifuga pada 12000 x g selama 20 menit. Endapan dilarutkan dengan 50 mM buffer Tris-asetat pH 7,5 (pelet: buffer= 1:3). Supernatan III (fraksi III 40- 60%) diukur volume, kadar protein, dan diuji aktivitas enzimnya.

Supernatan yang diperoleh dari fraksi III ditambahkan ammonium sulfat sebanyak 12,9 gram. Campuran diaduk sampai larut kemudian disentrifuga pada 12000 x g selama 20 menit. Endapan dilarutkan dengan 50 mM M buffer Tris-asetat pH 7,5 (pelet: buffer= 1:3). Supernatan IV (fraksi IV 60- 80%) diukur volume, kadar protein, dan diuji aktivitas enzimnya.

Supernatan dari fraksi IV dilarutkan dengan 13,9 gram ammonium sulfat. Kemudian campuran disentrifuga dengan kecepatan 12000 x g selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan 0,2 M buffer Tris-asetat pH 7,5 (pelet: buffer= 1:3). Supernatan dinamakan fraksi V (80- 100%). Fraksi ini diukur volume, kadar protein, dan diuji aktivitas enzim dehalogenase.

III.3.10 Dialisis

Membran selofan direbus dengan aquades selama 20 menit, kemudian dicuci dengan aquades. Salah satu ujung selofan diikat dengan benang, kemudian ke dalam membran selofan diisi dengan enzim fraksi I. Setelah itu, ujung lainnya diikat dengan benang. Hal yang sama juga dilakukan untuk enzim fraksi II-V. Masing-masing membran selofan yang telah berisi enzim fraksi I-V direndam di

dalam 1000 mL buffer Tris-asetat 10 mM pH 7,5. Larutan buffer/ dialisat diganti setiap 2 jam sekali dan diuji kandungan ammonium sulfatnya dengan BaCl_2 5% (w/v).

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil 1 mL dialisat setiap 2 jam sekali, kemudian ditetesi dengan BaCl_2 5%. Dialisat yang masih mengandung garam ammonium sulfat akan berwarna putih bila direaksikan dengan BaCl_2 . Dialisis dihentikan ketika tidak terbentuk lagi endapan putih BaSO_4 pada dialisat.

III.3.11 Uji Kuantitatif 2-Haloacid Dehalogenase

Metode kolorimetri digunakan untuk mendeteksi dan mengetahui jumlah halida (Iwasaki, 1952). Pengujian ini didasarkan pada ketidaklarutan HgCl_2 yang terbentuk ketika Cl^- direaksikan dengan $\text{Hg}(\text{SCN})$. Pelepasan SCN^- membentuk kompleks berwarna merah dengan Fe^{2+} . Kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ yang terbentuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 460 nm.

Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan larutan standar NaCl. Sebanyak 250 μL NaCl dengan berbagai variasi konsentrasi (0,5-1,75 mM) direaksikan dengan 700 μL $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 0,1% dan 100 μL 0,25 mM $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ dalam 9 M HNO_3 . Campuran dihomogenisasi dengan *vortex* dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Campuran diukur absorbansinya pada λ 460 nm. Aquades digunakan sebagai blanko.

Sampel disiapkan dengan mereaksikan 25 μL enzim, 100 μL buffer Tris-asetat 50 mM pH 7,5 dan 125 μL substrat (asam monokloroasetat 5 mM dalam 50 mM buffer Tris-asetat pH 7,5). Campuran kemudian ditambahkan 700 μL $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 0,1% dan 100 μL 0,25 mM $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ dalam 9 M HNO_3 . Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 460 nm. Satu unit aktivitas dehalogenase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu membebaskan satu nmol ion halida per menit pada suhu 30 °C.

III.3.12 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Bradford

Total protein ditentukan berdasarkan metoda Bradford (Bradford, 1976). Ke dalam 200 μL enzim ditambahkan 800 μL reagen Bardford (BioRad). Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada λ 595 nm. Larutan BSA digunakan sebagai standar dengan konsentrasi 0-0,1 mg/mL.

Konsentrasi protein diplotkan terhadap absorbansi sehingga menghasilkan kurva standar yang digunakan untuk menentukan protein dalam sampel yang tidak diketahui.

III.3.13 Penentuan pH Optimum 2-*Haloacid* Dehalogenase

pH optimum 2-*haloacid* dehalogenase ditentukan dengan mereaksikan 25 μL enzim, 100 μL buffer Tris-asetat 50 mM pH 7,5, dan 125 μL substrat asam monokloroasetat 5 mM dalam 50 mM buffer Na-asetat pH 4-5, buffer Tris-asetat pH 6-8, dan buffer glisin-NaOH pH 9-10 selama 10 menit pada suhu 30 °C. Setelah itu, campuran reaksi ditambahkan 700 μL $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 0,1% dan 100 μL 0,25 mM $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ dalam 9 M HNO_3 , dihomogenisasi dengan *vortex*, didiamkan selama 10 menit, dan diukur absorbansinya pada λ 460 nm.

III.3.14 Penentuan Suhu Optimum 2-*Haloacid* Dehalogenase

Suhu optimum 2-*haloacid* dehalogenase ditentukan dengan mereaksikan 25 μL enzim, 100 μL buffer Tris-asetat 50 mM pH 7, dan 125 μL substrat (asam monokloroasetat 5 mM dalam 50 mM buffer Tris-asetat pH 7) selama 10 menit pada suhu 20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 °C. Setelah itu, campuran reaksi ditambahkan 700 μL $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 1% dan 100 μL 0,25 mM $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ dalam 9 M HNO_3 , dihomogenisasi dengan *vortex*, didiamkan selama 10 menit, dan diukur absorbansinya pada λ 460 nm.

III.3.15 Penentuan K_{mapp} dan V_{maxapp} 2-Haloacid Dehalogenase

Penentuan kinetika 2-haloacid dehalogenase dilakukan dengan mereaksikan 25 μ L enzim, 100 μ L buffer Tris-asetat 50 mM pH 7, dan 125 μ L substrat asam monokloroasetat 1, 2, 4, 8, 16, dan 32 mM dalam 50 mM buffer Tris-asetat pH 7 selama 10 menit pada suhu 30 °C. Setelah itu, campuran reaksi ditambahkan 700 μ L $Hg(SCN)_2$ 0,1% dan 100 μ L 0,25 mM $FeNH_4(SO_4)_2$ dalam 9 M HNO_3 , dihomogenisasi dengan vortex, didiamkan selama 10 menit, dan diukur absorbansinya pada λ 460 nm. Nilai K_{mapp} dan V_{maxapp} didapatkan dari plot laju pembentukan produk terhadap konsentrasi substrat pada kondisi reaksi di atas.

III.3.16 Native PAGE

Gel yang digunakan untuk native PAGE dibuat dengan komposisi 12% *separating gel* dan 5% *stacking gel*. *Separating gel* dibuat dengan mencampurkan 2,1 mL aquades, 1,5 mL 40% bis-akrilamid, 1,3 mL buffer Tris-Cl 1,5 M pH 8,8, 2,5 mL asam monokloroasetat 100 mM, 50 μ L APS 10%, dan 5 μ L TEMED. Larutan dituangkan ke dalam cetakan dan dibiarkan memadat. *Stacking gel* dibuat dengan mencampurkan 1,452 mL aquades, 255 μ L 40% bis-akrilamid, 250 μ L buffer Tris-Cl 1 M pH 6,8, 20 μ L APS 10%, dan 3 μ L TEMED. *Stacking gel* dituangkan di atas *separating gel*. Sumur sampel dibuat dengan memasukkan sisir pada bagian atas *stacking gel* sebelum memadat. Gel yang telah memadat dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis dan ditambahkan *running buffer*. *Running buffer* untuk native PAGE dibuat dengan mencampurkan 18,8 gram glisin dan 3,03 gram Tris base ke dalam 1 Liter aquades.

Sampel protein dicampurkan dengan *loading buffer native* (50 mM buffer Tris-Cl pH 6,8, *bromophenol blue* 0,1% (w/v), dan gliserol 10% (w/v) dan kemudian dimasukkan ke dalam sumur sampel. Elektroforesis dijalankan pada 120V, 400 A selama kurang lebih 80 menit. Setelah selesai, gel dipindahkan ke dalam wadah plastik, dicuci dengan aquades 1x 5 menit. Kemudian sampel dalam gel direndam dalam 100 mM $AgNO_3$ selama 10-20 menit. Selanjutnya, gel dicuci dengan aquades selama 20 detik. Kemudian, gel direndam dalam asetat 5% (v/v).

III.3.17 SDS PAGE

Gel yang digunakan untuk SDS PAGE dibuat dengan komposisi 12% *separating gel* dan 5% *stacking gel*. *Separating gel* dibuat dengan mencampurkan 2,1 mL aquades, 1,5 mL 40% bis-akrilamid, 1,3 mL buffer Tris-Cl 1,5 M pH 8,8, 50 μ L SDS 10%, 50 μ L APS 10%, dan 5 μ L TEMED. Larutan dituangkan ke dalam cetakan dan dibiarkan memadat. *Stacking gel* dibuat dengan mencampurkan 1,452 mL aquades, 255 μ L 40% bis-akrilamid, 250 μ L buffer Tris-Cl 1 M pH 6,8, 20 μ L SDS 10%, 20 μ L APS 10%, dan 3 μ L TEMED. *Stacking gel* dituangkan di atas *separating gel*. Sumur sampel dibuat dengan memasukkan sisir pada bagian atas *stacking gel* sebelum memadat. Gel yang telah memadat dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis dan ditambahkan *running buffer*. *Running buffer* untuk SDS PAGE dibuat dengan mencampurkan 3,03 gram Tris base, 18,8 gram glisin, dan 0,9 gram SDS ke dalam 1 Liter aquades.

Sampel protein dicampurkan dengan *loading buffer* SDS (50 mM buffer Tris- Cl pH 6,8, *bromophenol blue* 0,1% (w/v), gliserol 10% (w/v), SDS 2% (w/v), dan 100 mM merkaptoetanol). Sampel dipanaskan selama 10 menit. Sampel dibiarkan dingin selama beberapa saat, kemudian dimasukkan ke dalam sumur sampel. Elektroforesis dijalankan pada 120V, 400 A selama kurang lebih 80 menit. Setelah selesai, gel dipindahkan ke dalam wadah plastik, dicuci dengan aquades selama 2 x 10 menit. Kemudian gel direndam dalam larutan *coomassive brilliant blue*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Pewarnaan Gram Bakteri *B. cereus*

Pewarnaan gram bakteri merupakan salah satu prosedur yang bermanfaat di dalam identifikasi bakteri. Gram bakteri dikelompokkan ke dalam dua jenis yaitu Gram positif dan Gram negatif. Berdasarkan pewarnaan gram bakteri, sampel bakteri berwarna ungu. Hal ini menunjukkan bahwa *B. cereus* merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk batang.



Gambar IV.1 Pewarnaan gram bakteri *B. cereus*

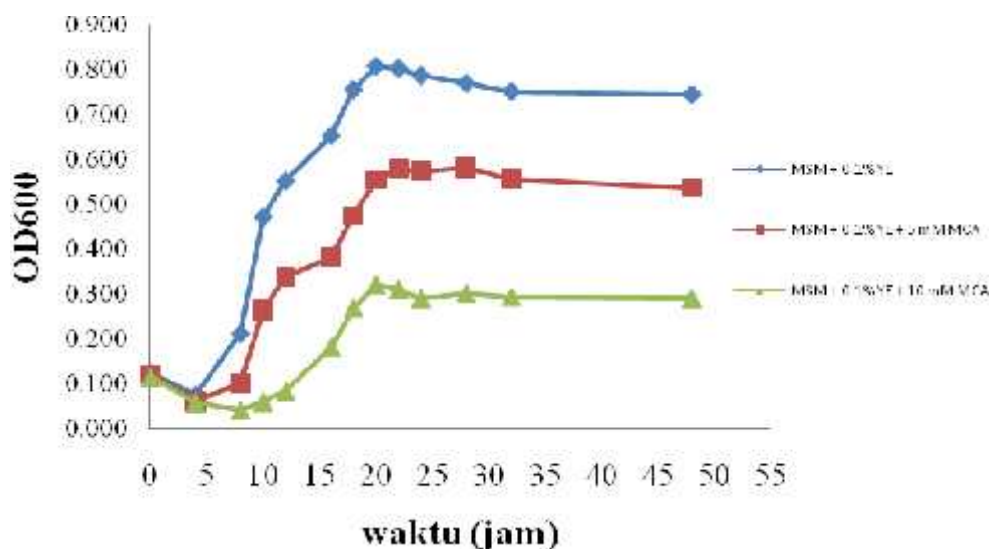
IV.2 Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh *B. cereus* di Berbagai Medium Tumbuh

Asam monokloroasetat merupakan senyawa organoklor alifatik. Senyawa ini bersifat racun dan korosif. *Bacillus* sp. diketahui mampu mendegradasi asam monokloroasetat dan asam trikloroasetat (Olaniran dkk, 2001). Kadar polutan yang terakumulasi di lingkungan sekitar bakteri dapat mempengaruhi

pertumbuhan bakteri karena polutan itu sendiri bersifat racun bagi bakteri. Oleh karena itu, perlu ditentukan konsentrasi maksimum polutan yang masih bisa ditoleransi oleh bakteri.

IV.2.1 Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh *B. cereus* pada Medium MSM

Pada penelitian ini bakteri *B. cereus* ditumbuhkan pada *mineral salt medium* (MSM) tanpa atau dengan adanya penambahan asam monokloroasetat (5 dan 10 mM). Hal ini bertujuan untuk mengetahui ketahanan bakteri untuk tumbuh dalam medium yang mengandung asam monokloroasetat. *B. cereus* diinkubasi pada suhu 30 °C di dalam *shaking incubator* 200 rpm. Berdasarkan kurva pertumbuhan diketahui bahwa penambahan konsentrasi asam monokloroasetat dapat menurunkan kemampuan tumbuh *B. cereus* (Gambar IV.2).



Gambar IV.2 Kurva pertumbuhan *B. cereus* dalam medium MSM tanpa atau dengan penambahan asam monokloroasetat 5 dan 10 mM

Berdasarkan kurva pertumbuhan yang diperoleh, *B. cereus* yang ditumbuhkan dalam medium MSM tanpa adanya penambahan asam monokloroasetat memiliki fase lag (adaptasi) yang cukup cepat sekitar 3 jam. Kemudian pada jam ke-6 sampai jam ke-20 berlangsung fase logaritma yang menunjukkan terjadinya

pembelahan secara konstan. Pola pertumbuhan bakteri ini terlihat berbeda saat ditambahkan asam monokloroasetat 5 dan 10 mM.

Pada Gambar IV.2 , *B. cereus* yang ditumbuhkan dalam MSM dengan adanya penambahan asam monokloroasetat 5 mM mengalami penurunan jumlah sel terlebih dahulu sampai jam ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri mengalami fase adaptasi terlebih dahulu. Log fase terjadi pada jam ke-8 sampai jam ke-22, hal ini menunjukkan bahwa keberadaan asam monokloroasetat dalam MSM cair pada konsentrasi 5 mM tidak mempengaruhi *B. cereus* untuk melakukan pembelahan sel. Fase stasioner terjadi mulai jam ke-24, hal ini kemungkinan terjadi akibat terakumulasinya sampah metabolisme yang mulai menumpuk dalam sistem, sehingga dapat meracuni sel bakteri.

Bakteri *B. cereus* yang ditumbuhkan pada medium cair MSM dengan penambahan asam monokloroasetat 10 mM membutuhkan waktu adaptasi yang cukup lama yaitu sekitar 8 jam. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan asam monokloroasetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada waktu adaptasi tidak terjadi pertumbuhan bakteri yang cukup signifikan. Bakteri lebih cenderung mempertahankan selnya untuk dapat hidup daripada melakukan pembelahan sel terlebih dahulu. Fase log terjadi pada jam ke-12 sampai jam ke-22. Pada jam ke-24 jumlah sel bakteri sudah menurun, hal ini dikarenakan sifat racun dari asam monokloroasetat sulit didegradasi oleh bakteri.

Dapat diamati bahwa penambahan konsentrasi asam monokloroasetat di dalam medium MSM cair mengakibatkan kenaikan waktu adaptasi bakteri *B. cereus*. Hal ini disebabkan karena toksisitas asam monokloroasetat harus terlebih dahulu diatasi oleh bakteri untuk melangsungkan kehidupannya. Diperlukan rentang waktu tertentu bagi bakteri tersebut untuk beradaptasi dengan sifat racun asam monokloroasetat guna mempertahankan hidupnya. Salah satu cara bakteri mempertahankan hidupnya adalah mengekspresikan enzim untuk mendegradasi senyawa toksik tersebut, sehingga dihasilkan senyawa yang tidak toksik.

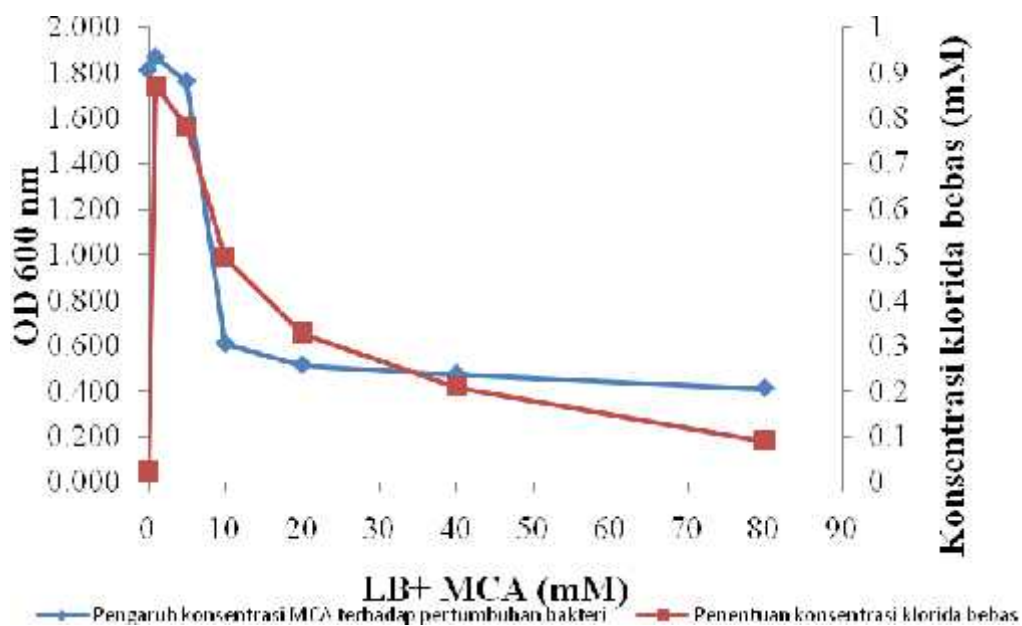
Pada penelitian ini, enzim yang berperan dalam degradasi adalah 2-haloacid dehalogenase. Enzim ini dapat mendegradasi asam 2-monokloroasetat menjadi

asam glikolat yang kurang atau tidak toksik bagi bakteri. Pada biodegradasi yang dikatalisis enzim ini, terjadi pemutusan ikatan karbon-halogen pada C α sehingga menghasilkan ion klorida. Jumlah ion klorida yang terlepas dapat dianalisis secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri. Dimana ion Cl⁻ yang terlepas direaksikan dengan Hg(SCN)₂. Kemudian terjadi pelepasan ion SCN⁻ yang akan berikatan Fe²⁺ membentuk kompleks Fe(SCN)₂ berwarna merah. Kompleks yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 460 nm.

Biodegradasi bakteri *B. cereus* yang ditumbuhkan dalam medium cair MSM yang mengandung asam monokloroasetat 5 mM dapat dilihat pada Gambar IV.2. Jumlah ion klorida yang terlepas dari asam monokloroasetat pada waktu inkubasi 24 jam sekitar 8,112%. Hal ini berarti bakteri belum mampu mendegradasi secara total asam monokloroasetat 5 mM.

IV.2.2 Pertumbuhan dan Biodegradasi Asam Monokloroasetat oleh *B. cereus* pada Medium LB

B. cereus ditumbuhkan dalam medium LB tanpa atau dengan adanya penambahan asam monokloroasetat (MCA). Hal ini bertujuan untuk mengetahui ketahanan bakteri untuk tumbuh dengan adanya asam monokloroasetat. Pada Gambar IV.3 kurva menunjukkan hubungan antara pertumbuhan dan ion klorida yang dilepaskan oleh bakteri di dalam medium LB cair tanpa atau adanya penambahan asam monokloroasetat.



Gambar IV.3 Pengaruh konsentrasi MCA terhadap pertumbuhan *B. cereus* dan penentuan biodegradasi MCA oleh *B. cereus*

Berdasarkan Gambar IV.3 terlihat bahwa bakteri masih dapat tumbuh dengan baik dan cepat dalam medium LB cair yang mengandung asam monokloroasetat sebesar 1 dan 5 mM. Pada medium LB cair dengan penambahan asam monokloroasetat 10 dan 20 mM, bakteri masih dapat tumbuh meskipun mengalami penurunan populasi bakteri. Pada medium LB cair dengan penambahan asam monokloroasetat sebesar 40 dan 80 mM tidak ditemukan adanya perkembangan populasi *B. cereus*. Hal ini disebabkan karena asam monokloroasetat sudah dianggap bersifat toksik sehingga senyawa tersebut tidak dapat didegradasi oleh bakteri.

Dari Gambar IV.3 dapat diketahui kemampuan biodegradasi asam monokloroasetat oleh *B. cereus* di dalam medium LB yang mengandung asam monokloroasetat sebesar 1, 5, 10, 20, 40, dan 80 mM. Pada konsentrasi asam monokloroasetat yang relatif rendah, senyawa ini dapat terhalogenasi relatif sempurna dimana ion klorida yang terkandung dalam senyawa ini dapat terlepas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi asam monokloroasetat 1

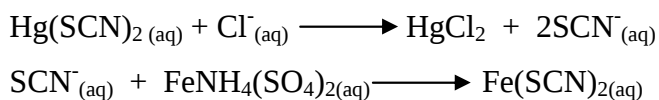
mM, ion Cl^- yang terlepas sekitar 87 %. Ion Cl^- yang terlepas dari asam monokloroasetat 5, 10, dan 20 mM sebesar 15%, 4%, dan 1%. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *B.cereus* belum mampu mendegradasi secara total asam monokloroasetat pada konsentrasi 5, 10, dan 20 mM. Bakteri *B. cereus* tidak dapat tumbuh dalam medium LB cair yang mengandung asam monokloroasetat 40 dan 80 mM. Kemampuan bakteri untuk melepaskan ion Cl^- dari senyawa tersebut relatif kecil yaitu 0,5% dan 0,1%.

Berdasarkan Gambar IV.3 terlihat bahwa dengan adanya peningkatan konsentrasi asam monokloroasetat di dalam medium tumbuh bakteri, kemampuan bakteri untuk melepaskan ion Cl^- dari senyawa tersebut semakin kecil. Hal ini disebabkan karena tingkat toksisitas asam monokloroasetat merupakan faktor utama yang mempengaruhi ketahanan hidup bakteri *B. cereus*.

IV.3 Pengujian Aktivitas 2-Haloacid Dehalogenase pada Crude Extract Intrasel dan Ekstrasel pada Berbagai Medium Tumbuh

Bakteri *B. cereus* ditumbuhkan dalam medium cair LB dan MSM yang mengandung asam monokloroasetat 5 mM pada suhu 30 °C selama 24 jam. Selanjutnya, sel dipanen dengan cara sentrifugasi untuk memisahkan supernatan (*crude extract* ekstrasel) dan pelet. Pelet yang diperoleh disonikasi, kemudian disentrifugasi untuk memisahkan debris sel dan supernatan (*crude extract* intrasel). Pada *crude extract* intrasel maupun ekstrasel dilakukan pengujian aktivitas 2-haloacid dehalogenase.

Pengujian aktivitas 2-haloacid dehalogenase secara kuantitatif ditentukan dengan menggunakan metode Iwasaki (Iwasaki, 1952). Reaksi hidrolisis asam monokloroasetat dengan enzim dehalogenase menghasilkan asam 2-hidroksiasetat dan ion klorida. Ion klorida yang terlepas bereaksi dengan $\text{Hg}(\text{SCN})_2$. Kemudian terjadi pelepasan ion SCN^- yang akan berikatan Fe^{2+} membentuk kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_2$ berwarna merah. Kompleks yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 460 nm. Reaksi yang terjadi dapat dituliskan sebagai berikut:



Metode ini dapat mendeteksi ion klorida sebesar 0,05-5 ppm. Dengan membandingkan serapan dari larutan sampel dengan kurva standar yang telah dibuat, jumlah ion klorida bebas yang dilepaskan dari sampel dapat ditentukan.

Berdasarkan Tabel IV.1 diketahui bahwa *crude extract* ekstrasel tidak memiliki aktivitas enzim 2-*haloacid* dehalogenase. Aktivitas 2-*haloacid* dehalogenase terlihat pada *crude extract* intrasel. Hal ini menunjukkan bahwa enzim ini merupakan enzim intrasel.

Tabel IV.1 Hasil uji aktivitas 2-*haloacid* dehalogenase *crude extract* intrasel dan ekstrasel

Medium tumbuh bakteri	[Cl ⁻] bebas mM <i>Crude extract</i>	
	Intrasel	Ekstrasel
LB	0.752	0
MSM + 5 mM MCA	0.721	0

Crude extract intrasel dari *B. cereus* yang ditumbuhkan dalam medium LB dan MSM yang mengandung 5 mM MCA diuji aktivitas 2-*haloacid* dehalogenase. *Crude extract* intrasel menunjukkan kemampuan yang hampir sama untuk melepaskan ion klorida dari substrat MCA 5 mM dalam buffer Tris-asetat 50 mM pH 7,5 sebesar 0,752 mM dan 0,721 mM. Hal ini menunjukkan bahwa enzim 2-*haloacid* dehalogenase yang dihasilkan oleh *B. cereus* bersifat konstitutif artinya tidak diperlukan inducer (asam monokloroasetat) untuk menghasilkan enzim tersebut. Beberapa dehalogenase yang bekerja pada asam alkanoat terhalogenasi bersifat induksi, tetapi beberapa ada yang diekspresikan secara konstitutif (Kawasaki dkk., 1981). Penelitian yang dilakukan oleh Chiba menunjukkan

bahwa 2-*haloacid* dehalogenase dari bakteri laut *Bacillus sp* bersifat konsitutitif (Chiba dkk., 2009).

IV.4 Produksi dan Pemurnian Parsial 2-*Haloacid* Dehalogenase

Untuk keperluan produksi dehalogenase, bakteri *B. cereus* ditumbuhkan dalam medium LB dengan menggunakan *shaking incubator* 200 rpm pada suhu 30 °C selama 24 jam. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi. Sel dicuci dengan buffer Tris-asetat 50 mM pH 7,5 untuk menghilangkan sisa media pertumbuhan yang masih tercampur. Sel diresuspensi dalam buffer yang sama, kemudian disonikasi. Enzim dehalogenase diperoleh dengan cara sentrifugasi suspensi sel dalam buffer Tris-asetat 50 mM pH 7,5 yang telah disonikasi. Supernatan yang diperoleh merupakan *crude extract* intrasel.

Crude extract intrasel yang diperoleh kemudian dimurnikan secara parsial dengan menggunakan ammonium sulfat. Fraksinasi ammonium sulfat dilakukan dengan saturasi 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Fraksinasi ammonium sulfat bertujuan untuk memisahkan dan memurnikan protein 2-*haloacid* dehalogenase secara parsial dari protein-protein lain. Penambahan ammonium sulfat ke dalam *crude extract* akan menarik molekul air dari permukaan molekul protein sehingga menyebabkan sesama molekul protein saling berinteraksi dan mengendap. Larutan enzim didialisis dengan menggunakan larutan buffer 10 mM Tris-asetat pH 7,5. Dialisis enzim dilakukan sampai garam ammonium sulfat seluruhnya hilang dalam larutan protein, hal ini ditandai dengan tidak ada pembentukan endapan ketika larutan dialisis ditambahkan BaCl₂.

Berdasarkan data pengujian aktivitas 2-*haloacid* dehalogenase pada *crude extract* intrasel dan hasil fraksinasi ammonium sulfat (Tabel IV.2) terlihat bahwa pada semua fraksi ammonium sulfat memiliki aktivitas enzim 2-*haloacid* dehalogenase. Hal ini dapat disebabkan karena pemisahan protein dengan ammonium sulfat masih belum sempurna atau bisa dikarenakan aktivitas enzim 2-*haloacid* dehalogenase ada di semua fraksi.

Pada Tabel IV.2 Fraksi ammonium sulfat 40-60% memiliki nilai unit aktivitas yaitu 1134 nmol/menit/mL enzim yang paling besar dibandingkan fraksi ammonium sulfat lainnya dan *crude extract* intrasel. Tetapi bila dilihat aktivitas spesifik enzim fraksi saturasi 40-60% sebesar 10,632 unit/mg dengan tingkat kemurnian 18. Tingkat kemurnian diperoleh dengan membandingkan aktivitas spesifik enzim fraksi tertentu per aktivitas enzim *crude extract* intrasel. Fraksi ammonium sulfat 40-60% digunakan untuk tahap karakterisasi enzim, dikarenakan jumlah enzim yang tersedia cukup banyak.

Tabel IV. 2 Aktivitas enzim 2-*haloacid* dehalogenase *crude extract* intrasel dan hasil fraksinasi ammonium sulfat

Tahap pemurnian	Volume fraksi protein (mL)	Total protein (mg)	Unit aktivitas (nmol/menit/mL enzim)	Aktivitas spesifik (unit/mg)	Tingkat kemurnian
<i>Crude extract</i> intrasel	100.00	843.816	605.063	0.717	1
Fraksi 0- 20%	2.50	20.836	190.794	9.156	12
Fraksi 20- 40%	3.50	24.556	449.328	18.298	25
Fraksi 40- 60%	9.25	85.563	1134.407	13.258	18
Fraksi 60- 80%	8.00	64.773	688.684	10.632	14
Fraksi 80- 100%	4.75	30.656	654.161	21.338	29

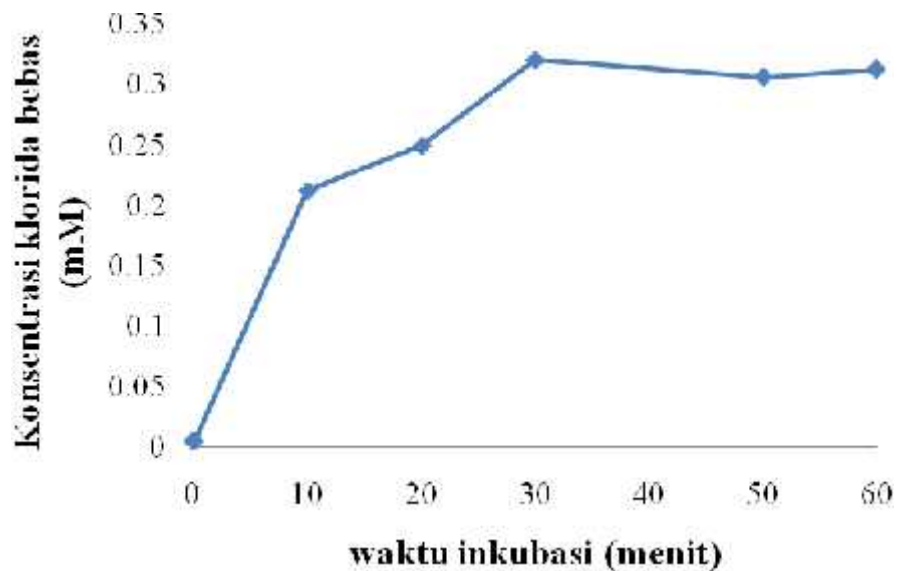
Catatan: satu unit aktivitas enzim adalah sejumlah enzim yang digunakan untuk melepaskan satu nmol ion klorida per menit. Aktivitas spesifik enzim adalah sejumlah substrat (nmol) yang diubah per mg protein per menit.

IV.5 Karakterisasi Enzim 2-*Haloacid* Dehalogenase

Kondisi optimum aktivitas enzim meliputi pH, suhu dan waktu inkubasi.

IV.5.1 Waktu Inkubasi Enzim

Pada penelitian ini dilakukan penentuan waktu inkubasi enzim, hal ini bertujuan untuk mengetahui reaksi enzimatik dapat dihentikan. Hasil uji aktivitas enzim hanya dapat digunakan bila hubungan antara hasil reaksi dengan waktu merupakan garis lurus. Diluar daerah tersebut dikhawatirkan sudah terjadi penghambatan terhadap enzim atau reaksi enzimatik sudah jenuh. Data yang diperoleh diperlihatkan pada Gambar IV.4

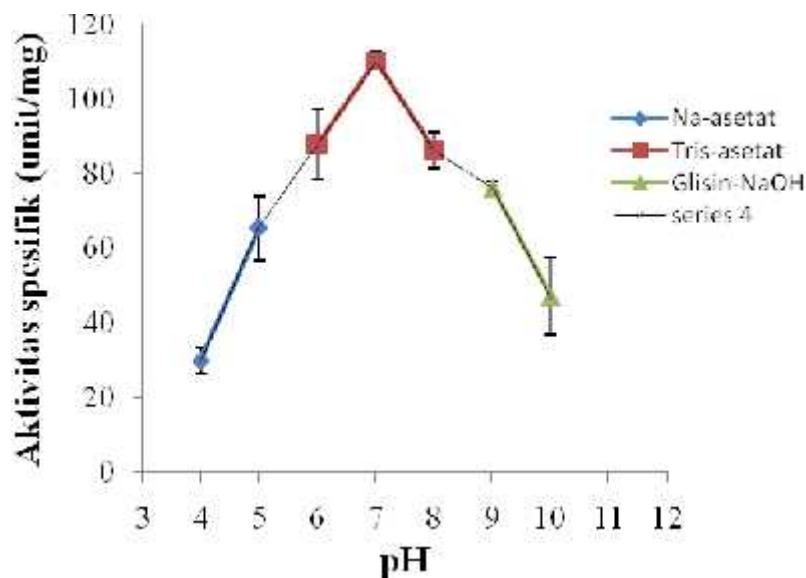


Gambar IV.4 Jumlah produk ion klorida yang terbentuk pada berbagai waktu inkubasi

Berdasarkan Gambar IV.4 terlihat bahwa produk yang terbentuk dengan waktu inkubasi 10 sampai 30 menit mempunyai hubungan yang linier, sedangkan bila waktu inkubasi melebihi waktu tersebut hubungannya sudah tidak linier lagi. Dengan demikian dapat diketahui bahwa reaksi sudah dapat dihentikan pada waktu inkubasi 10 menit.

IV.5.2 pH Optimum

Kemampuan enzim *2-haloacid* dehalogenase dalam menghidrolisis substrat diamati pada berbagai pH dari larutan buffer yaitu buffer Na-asetat pH 4-5, buffer Tris-asetat pH 6-8, dan buffer glisin-NaOH pH 9-10. Penggunaan larutan penyangga bertujuan untuk menjaga agar pH larutan relatif tetap dan tidak berubah selama reaksi berlangsung.



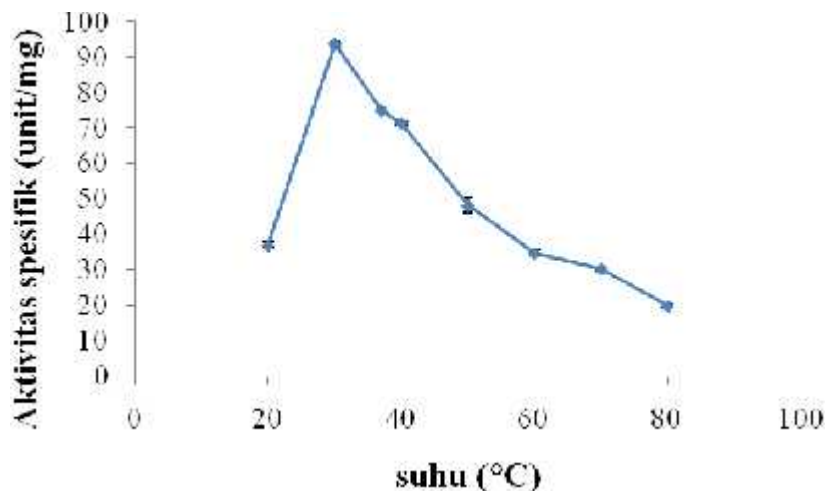
Gambar IV.5 Aktivitas *2-haloacid* dehalogenase *B. cereus* strain lokal pada berbagai pH

Dari Gambar IV.5 terlihat bahwa pH optimum enzim terletak pada pH 7, ditunjukkan dengan adanya aktivitas enzim yang paling tinggi. Perubahan pH dapat menyebabkan bentuk tersier dari enzim rusak (terdenaturasi), dalam hal ini bentuk sisi aktifnya rusak sehingga tidak terjadi pembentukan kompleks enzim-substrat. Dibandingkan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, pH optimum enzim *2-haloacid* dehalogenase yg diuji menunjukkan perbedaan. Enzim *2-haloacid* dehalogenase dari *Bacillus* sp. memiliki range pH optimum 7,6-8 (Olaniran dkk., 2002) dan pH 10 (Chiba dkk., 2009). Enzim *2-haloacid* dehalogenase yang diisolasi dari *Pseudomonas cepacea* MB4 mempunyai pH optimum 9,4. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh residu

asam amino dalam enzim *2-haloacid* dehalogenase sebagai sisi katalitik/ sisi pengendali yang berperan tidak tepat sama. Hal ini dikarenakan kedua enzim diisolasi dari bakteri yang mempunyai strain berbeda.

IV.5.3 Suhu Optimum

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi laju reaksi enzimatik. Umumnya reaksi meningkat bila suhu dinaikkan, hal ini sesuai dengan persamaan Arrhenius $k = Ae^{-E_a/RT}$. k adalah tetapan laju reaksi, E adalah energi aktivasi (kal/mol), dan R adalah tetapan gas (1,98 kal/mol K). Enzim juga dipengaruhi oleh kestabilan enzim terhadap panas, dimana setelah melebihi suhu tertentu enzim dapat menjadi tidak aktif karena mengalami denaturasi. Pada penelitian ini ditentukan suhu optimum dengan mengukur aktivitas enzim pada suhu inkubasi rentang 20-80 °C.



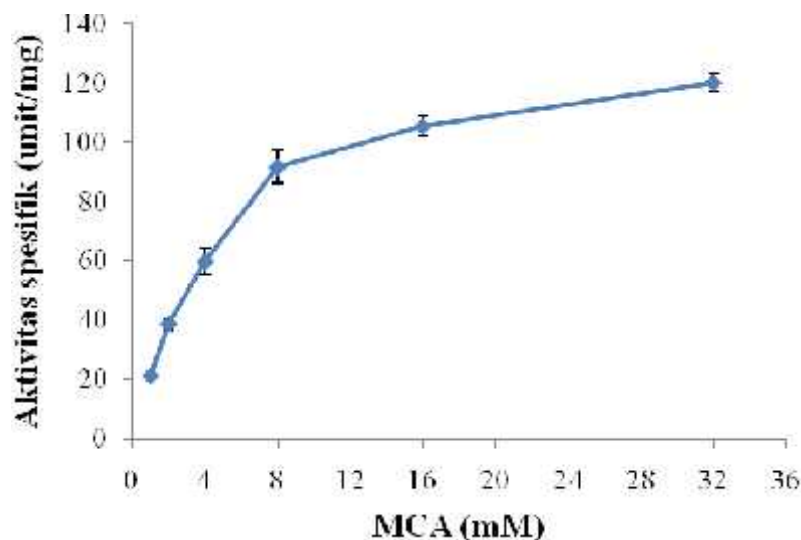
Gambar IV.6 Pengaruh suhu terhadap aktivitas *2-haloacid* dehalogenase *B. cereus*

Berdasarkan Gambar IV.6 terlihat bahwa temperatur 30 °C merupakan temperatur optimum enzim, hal ini ditandai dengan tingginya aktivitas enzim pada temperatur

tersebut. Perubahan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan proses denaturasi. Hal ini dapat dikarenakan bagian sisi aktif terganggu atau putusya ikatan non kovalen dari struktur enzim, sehingga enzim bekerja tidak efektif yang ditandai turunnya kecepatan reaksi. Enzim *2-haloacid* dehalogenase dari *Bacillus* *sp* dapat bekerja optimum pada temperatur 30-50 °C (Olaniran dkk, 2002). Enzim *2-haloacid* dehalogenase yang diuji cukup sensitif terhadap temperatur.

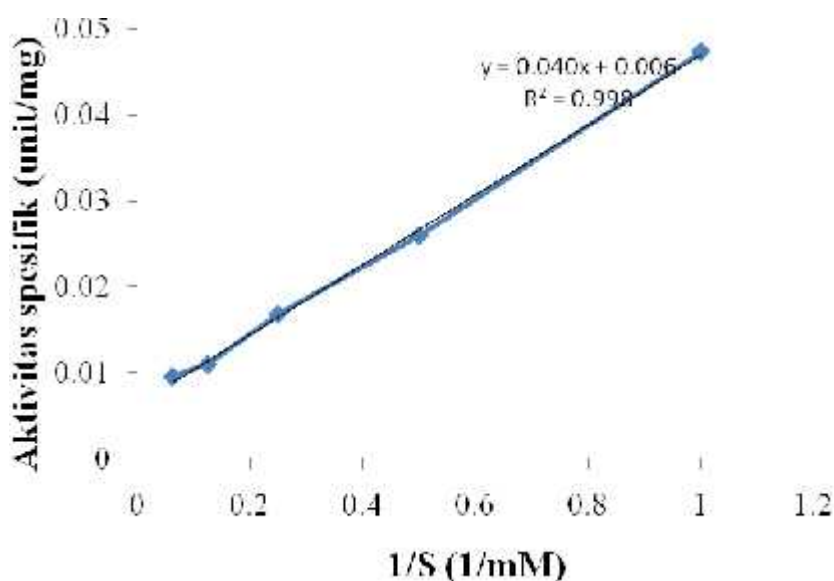
IV.5.4 Kinetika Enzim 2-Haloacid Dehalogenase

Nilai K_m dan V_{max} dapat menunjukkan spesifisitas substrat terhadap enzim. Nilai K_m menyatakan konsentrasi substrat yang diperlukan untuk reaksi katalis dapat berjalan efektif. Substrat dengan nilai K_m rendah memiliki afinitas lebih tinggi terhadap enzim atau dibutuhkan konsentrasi substrat yang kecil agar reaksi katalis cepat jenuh. Defensi V_{max} adalah kecepatan maksimal yang dicapai enzim saat konsentrasi substrat tinggi. Pada penelitian ini besaran nilai K_m dan V_{max} ditentukan dengan mengukur aktivitas spesifik enzim pada berbagai konsentrasi substrat asam monokloroasetat dan membuat kurva regresi $1/[S]$ terhadap $1/[V]$.



Gambar IV.7 Kurva hubungan antara V terhadap [S]

Dari kurva hubungan antara $1/V$ terhadap $1/[S]$, diperoleh persamaan garis lurus dengan kemiringan 0,04 dan intersep 0,006. Melalui persamaan Lineweaver-Burk $\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}}$, diperoleh nilai K_{mapp} sebesar 6,16 mM dan V_{maxapp} sebesar 166 nmol menit⁻¹ mg⁻¹ untuk substrat asam monokloroasetat. Pada penelitian ini nilai K_{mapp} 2-haloacid dehalogenase *B. cereus* kecil, hal ini menunjukkan bahwa interaksi enzim-substrat kuat yang mengakibatkan laju reaksi cepat jenuh.



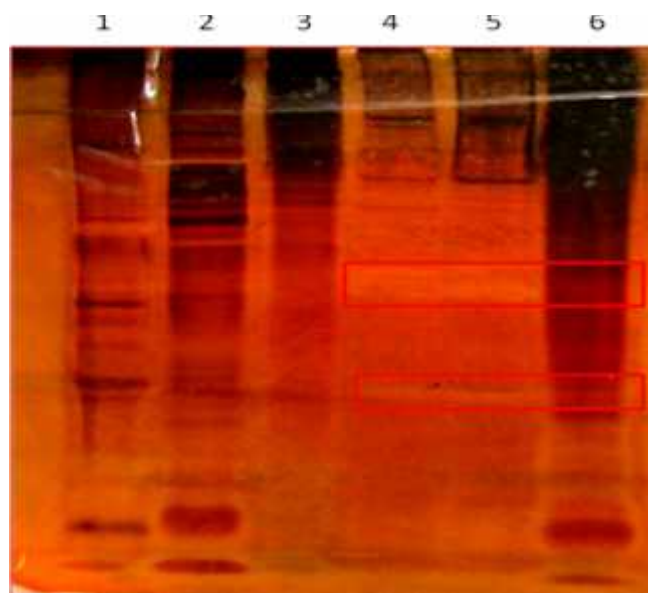
Gambar IV.8 Kurva hubungan $1/V$ terhadap $1/[S]$

Enzim 2-haloacid dehalogenase yang diisolasi dari *P. cepacea* MBA4 memiliki aktivitas spesifik sebesar 54,90 $\mu\text{mol menit}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nilai K_m dan V_{max} untuk substrat asam monokloroasetat sebesar 0,12 mM dan 70,40 $\mu\text{mol menit}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Enzim 2-haloacid dehalogenase yang diisolasi dari *Rhizobium* sp. memiliki nilai K_m sebesar 16,6 mM (Huyop dan Nemati, 2010). Dengan membandingkan data kinetik hasil penelitian ini dengan penelitian sebelumnya terlihat bahwa enzim yang diisolasi dari bakteri dengan strain berbeda mempunyai afinitas berbeda terhadap substrat yang sama.

IV.6 Native PAGE

Pada *Native PAGE* enzim yang digunakan masih aktif, tidak mengalami proses denaturasi. *Native PAGE* merupakan elektroforesis yang didasarkan pada muatan proteinnya. *Native PAGE* dilakukan untuk melihat adanya aktivitas enzim.

2-haloacid dehalogenase dari *B. cereus crude extract* intrasel dan hasil fraksinasi ammonium sulfat dianalisa aktivitasnya dengan menggunakan elektroforesis *Native PAGE*. Sampel dimasukkan ke dalam sumur, sebelumnya pada *separating gel* ditambahkan asam monokloroasetat 100 mM. Hal ini bertujuan agar enzim yang memiliki aktivitas *2-haloacid* dehalogenase dapat memutuskan ikatan karbon-klor dari substrat asam monokloroasetat. Setelah elektroforesis, gel diinkubasi dengan menggunakan AgNO_3 . Penambahan AgNO_3 berguna agar ion Cl^- yang terlepas hasil reaksi enzimatik berikatan dengan Ag membentuk pita berwarna putih. Adanya aktivitas *2-haloacid* dehalogenase ditandai dengan pita berwarna bening pada gel (Gambar IV.8).

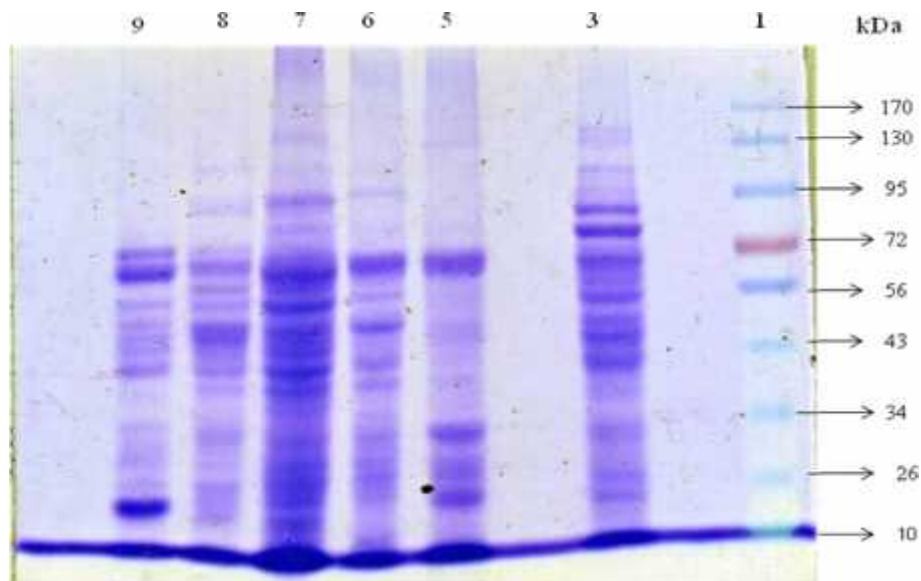


Gambar IV.8 Elektroforegram *native PAGE*. (1) *crude extract* intrasel; (2) fraksi ammonium sulfat 0-20%; (3) fraksi ammonium sulfat 20-40%; (4) fraksi ammonium sulfat 40-60%; (5) fraksi ammonium sulfat 60-80%; (6) fraksi ammonium sulfat 80-100

Berdasarkan elektroforegram *native* PAGE terdapat dua pita bening pada hasil fraksi ammonium sulfat 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Pita bening menunjukkan adanya aktivitas 2-haloacid dehalogenase. Adanya dua pita bening pada elektroforegram *native* PAGE kemungkinan mengindikasikan adanya jenis dehalogenase yang berbeda.

IV.7 SDS PAGE

Berdasarkan elektroforegram *native* PAGE terdapat dua pita bening, pola yang sama terlihat pada pita SDS PAGE. Pita SDS PAGE yang mengindikasikan ukuran molekul protein 2-haloacid dehalogenase sekitar 56 atau 34 kDa (Gambar IV.9). Ukuran molekul protein belum bisa ditentukan secara pasti karena harus dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan zimogram yaitu SDS PAGE yang direnaturasi kembali.



Gambar IV.9 Elektroforegram SDS PAGE. (1) marker; (3) *crude extract* intrasel; (5) fraksi ammonium sulfat 0-20%; (6) fraksi ammonium sulfat 20-40%; (7) fraksi ammonium sulfat 40-60%; (8) fraksi ammonium sulfat 40-60%; (9) fraksi ammonium sulfat 60-80%; (9) fraksi ammonium sulfat 80-100

Berdasarkan data *gen* bank (*accession* WP_000640438.1 dan WP_000990201.1) , panjang asam amino *2-haloacid* dehalogenase sekitar 255 dan 290 pb maka diperkirakan ukuran molekul protein sekitar 28 dan 34 kDa. Ukuran molekul protein dehalogenase memiliki rentang cukup lebar sekitar 26-79 kDa.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Biodegradasi MCA oleh *B. cereus* pada *minimal salt medium* yang ditambahkan 0,1% ekstrak ragi dan MCA 5 mM sebesar 0, 405 mM atau 8 %
2. Biodegradasi MCA oleh *B. cereus* pada medium LB yang ditambahkan MCA 5 mM sebesar 0, 8 mM atau 15 %
3. Enzim 2-*haloacid* dehalogenase *B. cereus* merupakan enzim intrasel dan bersifat konstitutif.
4. Hasil fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat menunjukkan bahwa semua fraksi memiliki aktivitas 2-*haloacid* dehalogenase.
5. Karakterisasi 2-*haloacid* dehalogenase dari *B. cereus* diperoleh:
 - a. pH optimum : 7
 - b. suhu optimum : 30°C
 - c. tetapan kinetik (k_{mapp}): 6,16 mM
 - d. laju reaksi maksimum (V_{maxapp}) : 166 nmol menit⁻¹ mg⁻¹

V.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh diharapkan adanya penelitian selanjutnya mengenai spesifisitas substrat dari 2-*haloacid* dehalogenase dari *B. cereus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bisaillon A., Beaudet R., Lepine F., Deziel E., dan Villemur R., (2010) : Identification and characterization of a novel CprA reductive dehalogenase spesific to highly chlorinated phenols from *Desulfitobacterium hafniense* strain PCP-1. *Applied and Enviromental Microbiology*. 7536-7540.
- Bradford, M. M (1976) : Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analitical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Chiba, Y., Yoshida, T., Ito, N., Nishimura, H., Imida, C., Yasuda, H., dan Sako, Y. (2009) : Isolation of a bacterium possesing a haloacid dehalogenase from marine sediment core. *Microbes Environ*. **24**(3): 276-279.
- Commandeur dan Parson. (1994). Degradation of halogenated aromatic compaunds. *Microbiology Review*. **55**: 59-79.
- Donnelly, C., dan Murphy, C. D. (2009) : Purification and properties of fluoroacetate dehalogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 8341. *Biotechnol Lett*. **31**: 245-250.
- European commision. (2005) : Summary risk assessment report, monochloroacetic acid. *Institute for health and consumer protection european chemical berau*. pp 3-25.
- Daunert, P. G. B., Law, S. A., Wei, Y. (2009) : Characterization of a recombinant thermostable dehalogenase isolated from the hot spring thermophile

Sulfolobus tokodaii. *Applied Biochemical Biotechnology*. **159**: 382-393.

Fetzner, S. R., dan Lingens, F. (1994) : Bacterial dehalogenases. *Microbiology Review*. **58**: 641-695.

Fetzner, S., (1998) : Bacterial dehalogenation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **50**: 633-657.

Goldman, P., Milne, G. W. A., dan Keister, D. B. (1968) : Carbon-halogen bond cleavage. III. Studies on bacterial halohydrases. *Journal of Biological Chemistry*. **243**: 428-434.

Gosselin, R. E., Smith, R. P., dan Hodge, H. C., (1984) : Clinical toxicology of commercial products. *5th edition*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Gianfreda, L., dan Bollag, J. M., (2002) : Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. Marcel Dekker Inc.

Gribble, G. W. (1994) : The natural production of chlorinated compounds. *Environmental Science Technology*. **28**: 310A-319A.

Gschwend, P. M., Mac Farlane, J. K., dan Newman, K. A. (1985) : Volatile halogenated organic compounds released to sea water from temperate marine macroalgae. *Science*. **227**: 1033-1035.

Hamid A., Zulkifily A. H., Hamdan S., Arifin S. H., dan Huyop F. (2011) : Purification and properties of a new dehalogenase enzyme from *Pseudomonas* sp B6P grow in 3-chloropropionate (3CP). *African Journal of Biotechnology*. **10(4)**: 610- 614.

Handelsman, J., Jacobson, L., Stabb, E. (1998) : *Bacillus cereus* strain DGA34; United States Patent 5736382. *Official gazette of the United States Patent and Trademark Office*.

- Hanson, M. L., Sibley, P. K., Ellis, D. A., Mabury, S. A., Muir, D. C., dan Solomon, K. R. (2002) : Evaluation of monochloroacetic acid (MCA) degradation and toxicity to *Lemma gibba*, *Myriophyllum spicatum* and *Myriophyllum sibiricum* in aquatic microcosms. *Aquatic Toxicology*. **61**: 251-273.
- Hardman, D. J. (1991) : Biotransformation of halogenated compound. *Critical Review in Biotechnology*. **11**: 1- 40.
- Horisaki, T., Yoshida, E., Sumiya, K., Takemura, T., Yamane, H., dan Nojiri, H. (2011) : Isolation and characterization of monochloroacetic acid-degrading bacteria. *Journal of Genetic and Applied Microbiology*. **52**: 277-284.
- Huang, J., Xin, Y., dan Zhang, W. (2011) : Isolation, characterization, and identification of a *Paracoccus* sp. haloacid-degrading bacterium from the marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. *Journal of Basic Microbiology*. **51**: 318-324.
- Huyop, F., dan Nemati, M. (2010) : Properties of dehalogenase from *Rhizobium* sp RC1. *African journal of microbiology reserach*. **4**(25): 2836-2847.
- Huyop, F., Rashid, N. A., Wahab, R. A. B, dan Cooper, R. A. (2008) : Purification and properties of *Rhizobial* DehL expressed in *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*. **7**(12): 1944-1949.
- Iwasaki, I., Utsumi, S., dan Ozawa, T. (1952) : New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion. *Letter Japan*. pp 226.
- Jacobsen, D., Ovrebo, S., Ostborg, J., dan Sejersted, O. M. (1984) : Glycolate causes the acidosis in ethylene glycol poisoning and is effectively removed by hemodialysis. *Acta Medica Scandinavica*. **216**: 409– 416.

- Janssen, D. B., Dinkla, I. J., Poelarends, G. J., dan Terpstra, P. (2005) : Bacterial degradation of xenobiotic compounds: Evolution and distribution of novel enzyme activities. *Enviromental Microbiology*. **7**: 1868-1882.
- Jing, H. N., Taha, A. M., Pakingking, R. V., Wahab, R. A. B., dan Huyop, F. (2008) : Dehalogenase from *Methylobacterium* sp. HJ1 induced by the herbicide 2,2-dichloropropionate (dalapon). *African Journal of Microbiology Research*. **2**: 32-36.
- Kenji, S., Kurihara, T., Ji-Quan, L., Vincenzo N. D., Chung P., Masaru M., Susumu T., dan Esaki N. (1996) : Bacterial 2-haloacid dehalogenase structure and catalytic properties. *Pure & Applied Chemistry*. **68**: 2097-2103.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., dan Haapasalo, M. (2000) : Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infections*. **2**(2): 189-198.
- Krasotkina, J., Walters T., Maruya K. A., dan Ragsdale S. W. (2001) : Characterization of the B12- and iron-sulfur-containing reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans*. *Journal Biology and Chemical*. **276**. 680-685.
- Kurihara, T., Esaki, N., dan Soda, K. (2000) : Bacterial 2-haloacid dehalogenase: structures and reaction mechanisms. *Jounal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **10**: 57-65.
- Mc Rae, B. M., LaPara, T. M., dan Hozalski, R. M. (2004) : Biodegradation of haloacetic acids by bacterial enrichment cultures. *Chemosphere*. **55**: 915–925.
- Magnuson, J.K., Romine, M. F., Burris, D. R., dan Kingsley, M. T.(2000) : Trichloroethane reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization. *Applied Enviromental Microbiology*. **66**: 5141-5147.

- Malveda, M. P. (2011) : CEH marketing research report: monochloroacetic acid. *Chemical Economic Handbook*.
- Motosugi, K., Esaki, N., dan Soda, K. (1982) : Purification and properties of a new enzyme, DL-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. *Journal of Bacteriology*. **150**(2): 522-527.
- Novak, H. R., Sayer, C., Isupov, M. N., Paszkiewicz, K., Gotz, D., Spragg, A. M., dan Littlechild, J. A. (2012) : Marine *Rhodobacteraceae* L-haloacid dehalogenase contains a novel His/Glu dyad that could activate the catalytic water. *The FEBS Journal*. **280**: 16640-1680.
- Olaniran, A.O., Babalola, G.O., dan Okoh, A.I. (2001) : Aerobic dehalogenation potentials of four bacterial system isolated from soil and sewage sludge. *Chemosphere*. **4**: 45-50.
- Olaniran, A. O., Okoh, A. I., Ajisebutu, S., Golyshin, P., dan Babalola, G. (2002) : The aerobic dechlorination activities of two bacterial species from a refuse dumpsite in Nigeria. *International Microbiology*. **5**: 21-24.
- Parker, K., dan Colby, J. (1995) : Immobilisation of the D-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23. *Biodegradation*. **6**: 191-201.
- Romanov, V., dan Hausinger, R. P. (1994) : *Pseudomonas aeruginosa* 142 uses a three-component ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase for metabolism of 2,4-dichloro- and 2-chlorobenzoate. *Journal of Bacteriology*. **176**: 3368-3374.
- Roslan, D. D., Gicana, R. G., Lamis, R.J., dan Huyop, F. (2011) : Characterization of *Bacillus* strains from volcanic Gunung Sibayak able to degrade 2,2-dichloropropionic acid. *Journal of Microbiology Research*. **5**(28): 4987-4992.
- Rye, C. A., Isupov, M. N., Lebedev, A. A., dan Littlechild, J. A. (2009) : Biochemical and structural studies of a L-haloacid dehalogenase from

the thermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Extremophiles*. **13**: 179-190.

Schwarze, R., Brokamp, A., dan Schmidt, F. R. J. (1997) : Isolation and characterization of dehalogenases from 2,2-dichloropropionate-degrading soil bacteria. *Current Microbiology*. **34**(2): 103-109.

Scott, B. F., Mac Tavish, D., Spencer ,C., Strachan ,W. M. J., Muir, D. C. G., (2000) : Haloacetic acids in Canadian lake waters and precipitation. *Enviromental Science Technology*. **34**: 4266-4272.

Senesi, S., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D., Wong, A., dan Ghelardi, A. (2002) : Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*. **148**: 1785-1794.

Silo-Suh, L., Lethbridge, B., Raffel, S., He, H., Clardy, J., dan Handelsman, J. (1994) : Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Environmental Microbiology*. **60**(6): 2023–2030.

Slater, J.H. (1994) : Microbial dehalogenation of haloaliphatic compound in: Ratledge C. Biochemistry of microbial degradation. *Kluwer Academic Publ.* pp 379- 421.

Smidt, H., dan de Vos, W. M. (2004) : Anaerobic microbial dehalogenation. *Annual Review Microbiology*. **58**: 48-73.

Smith, J.M., Harrison, K., dan Colby, J. (1990) : Purification and characterization of D-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23. *Journal Genetic Microbiology*. **136**: 881-886.

Sunaina, V. (2005) : Bacterial metabolites from *Bacillus cereus* B4 responsible for potato plant growth. *Journal of the Indian Potato Association*. **32** (3-4): 187-188.

- Sutrisno. (1997) : Isolasi dan karakterisasi dehalogenase dari *Pseudomonas cepacea* strain lokal. *Tesis*. Institut Teknologi Bandung.
- Swanson, P. E. (1999) : Dehalogenase applied to industrial-scale biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*. **10**(4): 365-369.
- Tallent, S. M., Kotewicz, K. M., Strain, E. A., dan Bennet, R. W. (2012) : Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International*. **95**(2): 446-451.
- Tsang, J. S. H., dan Sam, L. (1999) : Cloning and characterization of a cryptic haloacid dehalogenase from *Burkholderia cepacia* MBA4. *Journal of Bacteriology*. pp 6003-6009.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M., dan Brozel, V. (2006) : Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied Environmental Microbiology*. **72**(7): 4970–4977.
- Vos, J. H., dan Bodar, C. W. M. (2008) : Enviromental risk limits for monochloroacetic acid (MCAA). *RIVM Letter Report*.
- Zhang, P., Hozalski, R. M., Leach, L. H., Camper, A. K., Goslan, E. H., Parsons, S. A., Xie, Y. F., LaPara T. M. (2009) : Isolation and characterization of haloacetic acid-degrading *Afipia* spp. from drinking water. *FEMS Microbiology Letter*. **287**: 203-208.
- Zulkifly, A. H., Roslan, D. D., Hamid, A. A., Hamdan, S., dan Huyop, F. (2010) : Biodegradation of low concentration of monochloroacetic acid-degrading *Bacillus* sp. TW1 isolated from Terengganu water treatment and distribution plant. *Journal of Applied Science*. pp 1-5.

LAMPIRAN

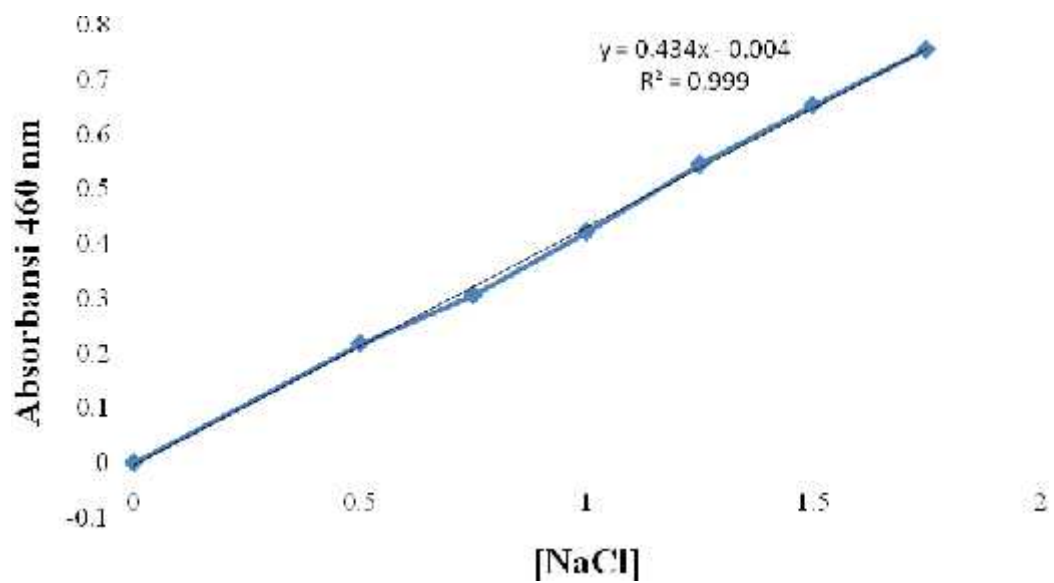
Lampiran A

Data dan Kurva Standar Ion Klorida Bebas dan Kadar Protein

A.1 Data dan Kurva Standar Ion Klorida Bebas

Tabel A.1 Data penentuan kurva standar ion klorida bebas

[NaCl] mM	Absorbansi 460 nm			
	1	2	3	Rata-rata
0	0	0	0	0
0.5	0.236	0.242	0.177	0.22
0.75	0.32	0.288	0.31	0.306
1	0.411	0.408	0.446	0.422
1.25	0.552	0.588	0.495	0.545
1.5	0.682	0.644	0.633	0.653
1.75	0.779	0.733	0.752	0.755

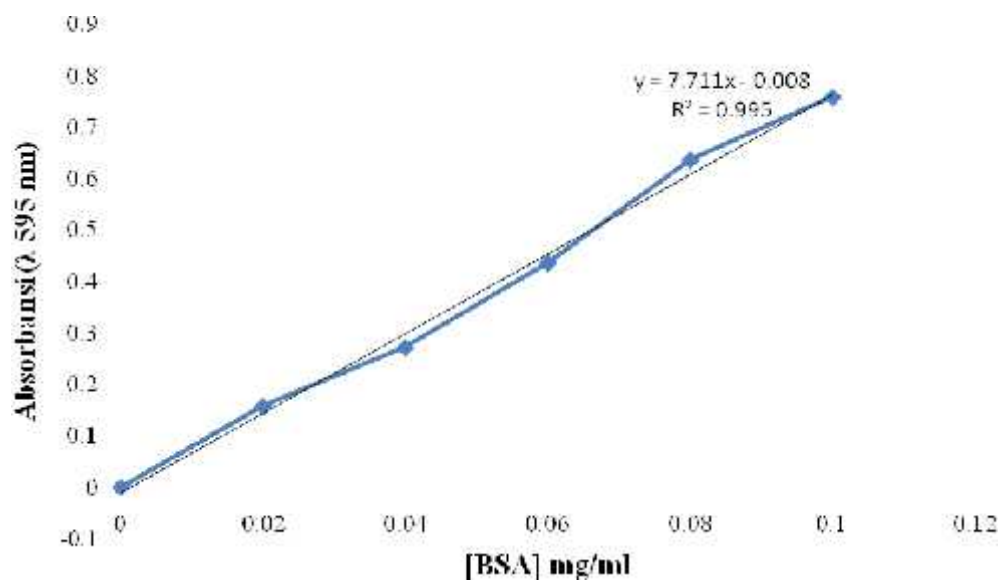


Gambar A.1 Kurva standar ion klorida bebas

A.2 Data dan Kurva Standar Kadar Protein

Tabel A.2 Data penentuan kurva standar protein

[BSA] mg/ml	Absorbansi (λ 595 nm)			
	1	2	3	Rata-rata
0	0	0	0	0.000
0.02	0.147	0.156	0.168	0.157
0.04	0.273	0.272	0.272	0.272
0.06	0.431	0.436	0.442	0.436
0.08	0.625	0.64	0.645	0.637
0.1	0.756	0.762	0.759	0.759



Gambar A.2 Kurva standar protein

Lampiran B

Data Pengaruh pH, Suhu, Nilai K_{mapp} dan V_{maxapp} 2-Haloacid Dehalogenase *B. cereus*

B. 1 Data Pertumbuhan *B. cereus* pada Medium MSM

Tabel B.1 Data pertumbuhan *B. cereus* pada medium MSM

Jam Ke-	MSM + 0.1% YE				MSM + 0.1% YE + 5 mM MCA				MSM + 0.1% YE + 10 mM MCA			
	1	2	3	Rata-rata	1	2	3	Rata-rata	1	2	3	Rata-rata
0	0.135	0.116	0.124	0.125	0.122	0.121	0.12	0.121	0.117	0.112	0.116	0.115
4	0.078	0.071	0.081	0.077	0.059	0.063	0.065	0.062	0.054	0.063	0.062	0.060
8	0.219	0.19	0.229	0.213	0.093	0.102	0.111	0.102	0.039	0.049	0.038	0.042
10	0.495	0.476	0.449	0.473	0.248	0.264	0.284	0.265	0.079	0.057	0.047	0.061
12	0.564	0.551	0.544	0.553	0.319	0.346	0.353	0.339	0.146	0.051	0.054	0.084
16	0.667	0.634	0.66	0.654	0.381	0.366	0.401	0.383	0.29	0.127	0.131	0.183
18	0.757	0.751	0.761	0.756	0.468	0.464	0.492	0.475	0.315	0.242	0.251	0.269
20	0.807	0.812	0.807	0.809	0.538	0.563	0.561	0.554	0.347	0.3	0.32	0.322
22	0.794	0.806	0.811	0.804	0.566	0.582	0.588	0.579	0.328	0.29	0.317	0.312
24	0.782	0.796	0.786	0.788	0.563	0.582	0.578	0.574	0.313	0.266	0.295	0.291
28	0.761	0.777	0.774	0.771	0.56	0.604	0.581	0.582	0.32	0.28	0.306	0.302
32	0.745	0.752	0.76	0.752	0.558	0.566	0.541	0.555	0.314	0.27	0.3	0.295
48	0.744	0.749	0.745	0.746	0.524	0.559	0.527	0.537	0.3	0.284	0.289	0.291

B. 2 Data Biodegradasi asam monokloroasetat *B. cereus* pada Medium MSM yang Mengandung MCA 5 mM

Tabel B.2 Data biodegradasi asam monokloroasetat *B. cereus* pada medium MSM yang mengandung asam monokloroasetat 5 mM

Sampel	Absorbansi 460 nm				[Cl ⁻] bebas mM	% Klorida bebas
	1	2	3	rata-rata		
Kultur bakteri dalam medium MSM + MCA 5 mM	0.200	0.215	0.211	0.208	0.405	8.112

B.3 Data Pertumbuhan *B. cereus* dan Biodegradasi asam monokloroasetat *B. cereus* pada Medium LB dengan berbagai konsentrasi MCA

Tabel B.3 Data pertumbuhan *B. cereus* dan biodegradasi asam monokloroasetat *B. cereus* pada medium LB dengan berbagai konsentrasi asam monokloroasetat

Sampel (Kultur bakteri di dalam medium LB)	OD 600 nm		Absorbansi 460 nm				[Cl] bebas mM	% Cl bebas
	Sampel		Sampel					
	jam ke-0	jam ke- 24	1	2	3	rata- rata		
0	0.4	1.809	0.045	0.050	0.046	0.047	0.022	0
1	0.4	1.865	0.387	0.412	0.322	0.374	0.8712	87.126
5	0.4	1.760	0.309	0.327	0.367	0.334	0.7807	15.614
10	0.4	0.608	0.225	0.210	0.195	0.210	0.4945	4.945
20	0.4	0.514	0.110	0.141	0.161	0.137	0.3273	1.636
40	0.4	0.474	0.091	0.082	0.084	0.086	0.2084	0.521
80	0.4	0.411	0.012	0.066	0.025	0.034	0.0902	0.11

B. 4 Uji Aktivitas 2-Haloacid Dehalogenase Crude Extract Intrasel dan Ekstrasel

Tabel B.4 Data hasil uji aktivitas 2-haloacid dehalogenase crude extract intrasel dan ekstrasel

Sampel no	Absorbansi 460 nm				[Cl] bebas mM
	1	2	3	Rata-rata	
1	0.314	0.326	0.326	0.322	0.752
2	-0.081	-0.045	-0.022	0	0
3	0.297	0.315	0.313	0.308	0.721
4	-0.014	-0.022	-0.01	0	0

keterangan sampel no:

1. enzim *crude extract* intrasel yang menggunakan medium LB tanpa NaCl untuk tumbuhnya bakteri.
2. enzim *crude extract* ekstrasel yang menggunakan medium LB tanpa NaCl.
3. enzim *crude extract* intrasel yang menggunakan medium MSM + YE+ 5 mM MCA untuk tumbuhnya bakteri.
4. enzim *crude extract* ekstrasel yang menggunakan medium MSM + YE+ 5 mM MCA untuk tumbuhnya bakteri.

B. 5 Analisis Aktivitas 2-haloacid Dehalogenase pada *Crude extract* dan Fraksinasi Ammonium Sulfat

Tabel B.5 Data protein *crude extract* intrasel dan fraksi ammonium sulfat

Tahap pemurnian	Absorbansi 595 nm				Total protein sebelum dikalikan faktor pengenceran 100x (mg/mL)	Total protein setelah dikalikan faktor pengenceran 100x (mg/mL)
	1	2	3	Rata- rata		
Crude extract	0.62	0.676	0.632	0.643	0.084	8.438
Fraksi 0- 20%	0.66	0.643	0.601	0.635	0.083	8.334
Fraksi 20- 40%	0.528	0.515	0.556	0.533	0.070	7.016
Fraksi 40- 60%	0.834	0.818	0.801	0.818	0.107	9.250
Fraksi 60- 80%	0.627	0.619	0.603	0.616	0.081	8.097
Fraksi 80- 100%	0.454	0.488	0.483	0.475	0.063	6.264

Tabel B.6 Data uji aktivitas 2-haloacid dehalogenase crude extrac tintrasel dan fraksi ammonium sulfat

Tahap pemurnian	Absorbansi 460 nm				[Cl ⁻] bebas mM	nmol Cl ⁻ bebas
	1	2	3	rata-rata		
Crude extract	0.200	0.302	0.272	0.258	0.605	151.25
Fraksi 0- 20%	0.052	0.089	0.093	0.078	0.192	48
Fraksi 20- 40%	0.151	0.232	0.188	0.190	0.449	112.25
Fraksi 40- 60%	0.494	0.422	0.548	0.488	1.135	283.75
Fraksi 60- 80%	0.251	0.324	0.308	0.294	0.688	172
Fraksi 80- 100%	0.261	0.285	0.292	0.277	0.650	162.5

Tabel B.7 Data uji aktivitas 2-*haloacid* dehalogenase *crude extract* intrasel dan fraksi ammonium sulfat

Tahap pemurnian	Volume fraksi protein (mL)	Total protein (mg)	Unit aktivitas (nmol/menit/mL enzim)	Aktivitas spesifik (unit/mg)	Tingkat kemurnian
Crude extract	100.00	843.816	605.0632911	0.717055795	1
Fraksi 0- 20%	2.50	20.836	190.7940161	9.156925259	12
Fraksi 20- 40%	3.50	24.556	449.3287303	18.29825107	25
Fraksi 40- 60%	9.25	85.563	1134.407365	13.25823071	18
Fraksi 60- 80%	8.00	64.773	688.6843115	10.6322305	14
Fraksi 80- 100%	4.75	30.656	654.1618719	21.33849414	29

B. 6 Data Jumlah Produk Ion Klorida yang Terbentuk pada Berbagai Waktu Inkubasi

Tabel B.8 Jumlah produk ion klorida yang terbentuk pada berbagai waktu inkubasi

waktu inkubasi (menit)	Abs 460 nm	[Cl ⁻] bebas mM	[Cl ⁻] bebas mM rata-rata	standar deviasi
0	0.001 0.008 0.002	0.013578826 0.029689298 0.015880322	0.019716149	0.008713323
10	0.364 0.365 0.364	0.849021864 0.85132336 0.849021864	0.84978903	0.001328769
20	0.428 0.378 0.48	0.996317606 0.881242808 1.115995397	0.997851937	0.117383816
30	0.552 0.552 0.553	1.281703107 1.281703107 1.284004603	1.282470272	0.001328769
50	0.527 0.492 0.563	1.224165708 1.143613349 1.307019563	1.224932873	0.081705808
60	0.538 0.482 0.594	1.249482163 1.120598389 1.378365938	1.249482163	0.128883774

B. 7 Data Pengaruh pH dan suhu terhadap Aktivitas 2-Haloacid Dehalogenase *B. cereus*

Tabel B.9 Pengaruh pH terhadap aktivitas 2-haloacid dehalogenase *B. cereus*

variasi pH	Abs 460 nm	[Cl ⁻] bebas mM	nmol Cl ⁻ bebas	unit aktivitas (nmol Cl ⁻ bebas/menit)/ mL enzim	Aktivitas spesifik (unit/mg)	aktivitas spesifik rata2	standar deviasi
4	0.122	0.29206	73.01496	292.0598389	31.57403664	29.9153008	3.539176362
	0.099	0.239125	59.78136	239.1254315	25.851398		
	0.125	0.298964	74.74108	298.9643268	32.32046776		
5	0.267	0.625777	156.4442	625.7767549	67.65154107	65.3293109	8.695320447
	0.219	0.515305	128.8262	515.3049482	55.70864305		
	0.287	0.671807	167.9517	671.8066743	72.62774858		
6	0.32	0.747756	186.939	747.7560414	80.83849097	87.88811827	9.357166881
	0.334	0.779977	194.9942	779.976985	84.32183622		
	0.391	0.911162	227.7906	911.1622555	98.50402762		
7	0.449	1.044649	261.1623	1044.649022	112.9350294	110.2810521	2.504636187
	0.437	1.017031	254.2578	1017.03107	109.9493049		
	0.429	0.998619	249.6548	998.6191024	107.9588219		

variasi pH	Abs 460 nm	[Cl-] bebas mM	nmol Cl- bebas	unit aktivitas (nmol Cl -bebas/menit)/ mL enzim	Aktivitas spesifik (unit/mg)	aktivitas spesifik rata2	standar deviasi
8	0.334	0.779977	194.9942	779.976985	84.32183622	86.22938243	4.890458491
	0.327	0.763867	190.9666	763.8665132	82.58016359		
	0.364	0.849022	212.2555	849.0218642	91.78614748		
9	0.297	0.694822	173.7054	694.8216341	75.11585233	76.27696742	1.599626911
	0.299	0.699425	174.8562	699.424626	75.61347308		
	0.309	0.72244	180.6099	722.4395857	78.10157684		
10	0.162	0.38412	96.02992	384.1196778	41.52645165	47.0832167	10.27780619
	0.159	0.377215	94.3038	377.2151899	40.78002053		
	0.232	0.545224	136.3061	545.2243959	58.94317793		

Catatan: Kadar protein yang digunakan 9,25 mg/mL

Tabel B.10 Pengaruh suhu terhadap aktivitas 2-haloacid dehalogenase *B. cereus*

variasi suhu	Abs 460 nm	[Cl ⁻] bebas mM	nmol Cl ⁻ bebas	unit aktivitas (μmol Cl ⁻ bebas/menit)/ mL enzim	Aktivitas spesifik (U/mg)	aktivitas spesifik rata2	standar deviasi
20	0.147	0.349597238	87.39930955	349.5972382	37.79429602	36.88199131	0.873793322
	0.14	0.333486766	83.3716916	333.4867664	36.05262339		
	0.143	0.340391254	85.09781358	340.3912543	36.79905452		
30	0.37	0.86283084	215.70771	862.83084	93.27900973	93.69369369	0.941980878
	0.376	0.876639816	219.159954	876.6398159	94.77187199		
	0.369	0.860529344	215.132336	860.5293441	93.03019936		
37	0.297	0.694821634	173.7054085	694.8216341	75.11585233	74.94997875	0.517940099
	0.298	0.69712313	174.2807825	697.12313	75.36466271		
	0.294	0.687917146	171.9792865	687.9171461	74.3694212		
40	0.281	0.657997699	164.4994246	657.9976985	71.13488632	71.30075991	0.517940099
	0.284	0.664902186	166.2255466	664.9021864	71.88131745		
	0.28	0.655696203	163.9240506	655.6962025	70.88607595		
50	0.195	0.460069045	115.0172612	460.0690449	49.73719404	48.07845821	1.900320632
	0.19	0.448561565	112.1403913	448.561565	48.49314216		
	0.18	0.425546605	106.3866513	425.5466053	46.00503841		

variasi suhu	Abs 460 nm	[Cl ⁻] bebas mM	nmol Cl ⁻ bebas	unit aktivitas (μmol Cl ⁻ bebas/menit)/ mL enzim	Aktivitas spesifik (U/mg)	aktivitas spesifik rata2	standar deviasi
60	0.135	0.321979287	80.49482163	321.9792865	34.80857152	34.64269793	1.00555516
	0.13	0.310471807	77.61795167	310.4718067	33.56451964		
	0.138	0.328883774	82.22094361	328.8837745	35.55500264		
70	0.117	0.280552359	70.13808976	280.552359	30.32998476	30.24704797	0.380064126
	0.115	0.275949367	68.98734177	275.9493671	29.83236401		
	0.118	0.282853855	70.71346375	282.853855	30.57879514		
80	0.077	0.18849252	47.12313003	188.4925201	20.37756974	19.7970122	0.626159047
	0.075	0.183889528	45.97238205	183.8895282	19.87994899		
	0.072	0.17698504	44.24626007	176.9850403	19.13351787		

Catatan: Kadar protein yang digunakan 9,25 mg/mL

B. 7 Data Nilai Kmapp dan Vmaxapp 2-Haloacid Dehalogenase B. cereus

Tabel B.11 Data uji aktivitas 2-haloacid dehalogenase pada berbagai konsentrasi substrat asam monokloroasetat

[MCA] mM	Abs 460 nm	[Cl ⁻] bebas mM	nmol Cl bebas	unit aktivitas (μ mol Cl bebas/menit)/ mL enzim	Aktivitas spesifik (U/mg)	aktivitas spesifik rata2	standar deviasi
1	0.081 0.077 0.082	0.197698504 0.18849252 0.2	49.42462601 47.12313003 50	197.698504 188.4925201 200	21.37281125 20.37756974 21.62162162	21.12400087	0.658290377
2	0.157 0.142 0.152	0.372612198 0.338089758 0.361104718	93.15304948 84.52243959 90.27617952	372.6121979 338.0897583 361.1047181	40.28239978 36.55024415 39.0383479	38.62366394	1.900320632
4	0.226 0.223 0.255	0.53141542 0.524510932 0.598158803	132.853855 131.127733 149.5397008	531.41542 524.5109321 598.1588032	57.45031568 56.70388455 64.66581656	59.60667226	4.397214532
8	0.343 0.359 0.387	0.800690449 0.837514384 0.901956272	200.1726122 209.3785961 225.4890679	800.6904488 837.5143843 901.9562716	86.5611296 90.54209561 97.50878612	91.53733711	5.541270165
16	0.403 0.42 0.432	0.938780207 0.977905639 1.00552359	234.6950518 244.4764097 251.3808976	938.7802071 977.9056387 1005.52359	101.4897521 105.7195285 108.705253	105.3048445	3.625580691
32	0.463 0.484 0.486	1.076869965 1.125201381 1.129804373	269.2174914 281.3003452 282.4510932	1076.869965 1125.201381 1129.804373	116.4183746 121.6433925 122.1410133	120.0675935	3.170095457

Catatan: Kadar protein yang digunakan 9,25 mg/mL

Tabel B.12 Data penentuan nilai K_{mapp} dan V_{maxapp} 2-haloacid dehalogenase *B. cereus*

Substrat MCA (mM)		Laju reaksi (unit/mg)	
[S]	1/[S]	V	1/V
1	1	21.12400087	0.047339517
2	0.5	38.62366394	0.025890863
4	0.25	59.60667226	0.016776645
8	0.125	91.53733711	0.010924504
16	0.0625	105.3048445	0.009496239
32	0.03125	120.0675935	0.008328642

Lampiran C

Rumus Perhitungan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim

C.1 Penentuan Konsentrasi Cl^- bebas

Data absorbansi sampel yang diperoleh diplotkan dengan kurva standar ion Cl^- yang terlepas. Persamaan garis untuk standar Cl^- : $y = 0,4345x - 0,0049$

Contoh: nilai absorbansi yang diperoleh pada penelitian adalah 0,364, maka

$$y = 0,4345x - 0,0049$$

$$0,364 = 0,4345x - 0,0049$$

$$0,364 + 0,0049 = 0,4345x$$

$$x = 0,849 \text{ mM}$$

C.2 Penentuan nmol Cl^- Bebas

$$\text{mol} = M \times V \text{ (L)}$$

$$\text{mmol} = M \times V \text{ (mL)}$$

$$\text{nmol} = \text{mM} \times V \text{ (}\mu\text{L)}$$

Contoh: Dari data penelitian di atas diketahui bahwa konsentrasi Cl^- bebas adalah 0,849 mM dan volume larutan (enzim + substrat) adalah 250 μL .

$$\text{nmol } \text{Cl}^- \text{ bebas} = 0,849 \text{ M} \times 250 \text{ } \mu\text{L}$$

$$\text{nmol } \text{Cl}^- \text{ bebas} = 212,25 \text{ nmol}$$

C.3 Unit Aktivitas Enzim

$$\text{Unit aktivitas} = \left(\frac{\text{nmol Cl}^- \text{ bebas}}{\text{waktu inkubasi (menit)}} \right) \times \frac{1}{\text{Volume enzim (mL)}}$$

C.4 Aktivitas Spesifik Enzim

$$\text{Unit aktivitas (U/mg)} = \frac{\text{Unit aktivitas (U)}}{\text{Kadar protein (mg/mL)}}$$