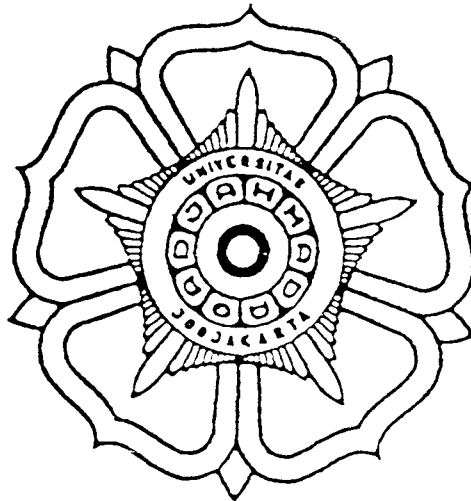


**BIODEHALOGENASI 4-KLOROFENOL (4-CP)
OLEH BAKTERI AEROBIK**

**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

**Program Studi Biologi
Jurusan Ilmu-ilmu Matematika dan
Ilmu Pengetahuan Alam**



Diajukan Oleh :

**Agus Purwanto
10677/I-2/419/98**

**Kepada
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2001**

Tesis

BIODEHALOGENASI 4-KLOROFENOL (4-CP) OLEH BAKTERI AEROBIK

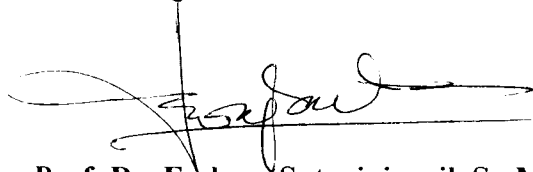
dipersiapkan dan disusun oleh
AGUS PURWANTO
10677/I-2/419/98

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

pada tanggal 14 Mei 2001

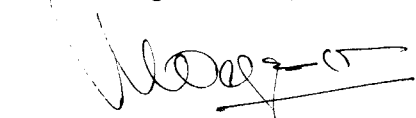
Susunan Dewan Penguji

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Endang Sutariningsih S., M.Sc.

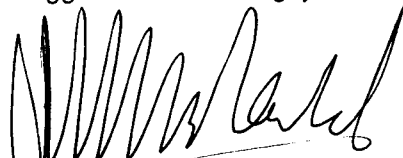
Pembimbing Pendamping I



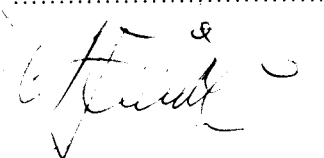
Dr. Sri Noegrohati, Apt.

Pembimbing Pendamping II

Anggota Dewan Penguji Lain

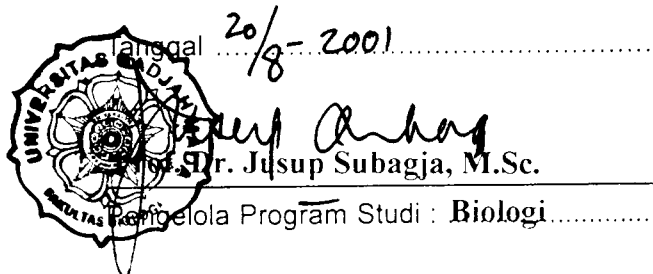


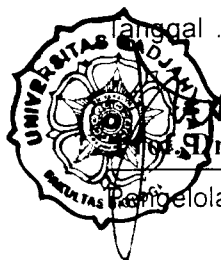
Dr. Hari Hartiko



Prof. Dr. Shalihuddin Djalal Tandjung, M.Sc.

Tesis ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar Magister

tanggal 20/8-2001

Dr. Jusup Subagja, M.Sc.
Ketua Pengelola Program Studi : Biologi



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, ..20..AGUSTUS..2001..



Agus Purwanto

Tandatangan dan nama terang

PRAKATA

Proses degradasi senyawa terhalogenasi di lingkungan sebagian besar merupakan hasil kerja mikroorganisme. Strain-strain bakteri tertentu dapat mendegradasi dan menggunakan senyawa senobiotika sebagai sumber karbon dan sumber energi untuk pertumbuhannya. Sehingga mikroorganisme sangat berperan dalam upaya untuk detoksifikasi polutan di lingkungan. Dalam penelitian ini dimaksudkan untuk mendapatkan bakteri dengan kemampuan degradatif yang tinggi terhadap senyawa 4-klorofenol. Sehingga diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai agen pendegradasi ("*degraders*") dalam usaha untuk remediasi secara biotis di lingkungan yang tercemar.

Pada kesempatan ini disampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. Dr. Endang Sutariningsih Soetarto, MSc., yang dengan sabar membimbing dan banyak memberikan masukan selama pelaksanaan penelitian serta penyusunan naskah thesis;
2. Dr. Sri Noegrohati, yang telah banyak memberi masukan dan saran selama persiapan dan pelaksanaan penelitian sampai penyusunan laporan penelitian;
3. Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi, PAU-Bioteknologi, Analisis Kimia Organik MIPA dan Biokimia Fakultas Biologi, beserta staf.

Akhir kata diucapkan terimakasih pula kepada temanku Lenny yang telah memberi masukan dan bantuan hingga dapat diselesaikannya naskah ini.

Yogyakarta, 14 Mei 2001

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
ABSTRAKSI	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Tinjauan Pustaka	
2.1 Kejadian senyawa organik terhalogenasi (“organohalogen”) di lingkungan	6
2.1.1 Senyawa organohalogen alami	6
2.1.1.1 Biosintesis senyawa organohalogen oleh organisme non-bakteri	7
2.1.1.2 Biosintesis senyawa organohalogen oleh bakteri	8
2.1.2 Senyawa organohalogen sintetik	9
2.2 Persistensi dan biomagnifikasi senyawa organohalogen sintetik	9

2.3 Degradasi senyawa organohalogen aromatik	12
2.3.1 Dehalogenasi oksigenolitik	14
2.3.2 Dehalogenasi reduktif	15
2.3.3 Dehalogenasi hidrolitik	16
2.4 Degradasi senyawa fenol terklorinasi (klorofenol)	16
B. Landasan teori	23
C. Hipotesis	25
BAB III. CARA PENELITIAN	
3.1 Mikrobial	26
3.2 Preparasi medium	26
3.2.1 Penyiapan larutan unsur kelumit	26
3.2.2 Preparasi medium pertumbuhan bakteri	26
3.2.2.1 Larutan garam mineral dasar (SBS)	26
3.2.2.2 Medium pertumbuhan pemeliharaan	27
3.3 Kimia	28
3.4 Alat yang digunakan dalam penelitian	28
3.5 Sterilisasi alat, bahan dan media pertumbuhan	29
3.6 Purifikasi bakteri	29
3.7 Skrining biakan	30
3.8 Percobaan kultivasi	30
3.8.1 Penyiapan inokulum melalui " <i>resting cell incubation</i> "	30
3.8.2 Uji kultivasi	31
3.9 Pengukuran ion klorida yang terlepas dengan metode spektrofotometrik	31

3.10 Penentuan pertumbuhan bakteri dengan absorbansi	32
3.11 Penentuan pH	33
3.12 Karakterisasi isolat terpilih	34
3.13 Penentuan konsentrasi protein	34
3.13.1 Penyiapan kurva standar larutan protein	35
3.13.2 Penyiapan dan pengukuran konsentrasi protein sampel	36
3.14 Penyiapan sumber ensim untuk uji aktivitas ensim	37
3.15 Penentuan aktivitas dehalogenase	38
3.16 Pengamatan terhadap hasil degradasi 4-klorofenol (4-CP)	39
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1 Purifikasi mikrobial	41
4.2 Skrining mikrobial	41
4.3 Hasil uji kultivasi bakteri dengan sistem sekali unduh (“ <i>batch</i> ”)	46
4.4 Uji aktivitas ensim dehalogenase	50
4.5 Pengamatan terhadap hasil degradasi 4-klorofenol	51
BAB V. KESIMPULAN	53
RINGKASAN	54
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	62

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Pengenceran larutan BSA untuk kurva standar larutan protein	36
Tabel 2. Sifat karakteristik bakteri pengguna 4-klorofenol	46
Tabel 3. Aktivitas bakteri pengguna 4-CP dalam medium pertumbuhan selama 7 hari inkubasi pada suhu 37°C	51
Tabel 4. Aktivitas dehalogenase dengan sumber enzim ekstrak bebas sel (CFE) debris sel, supernatan kultur dan kultur cair dari ke tiga isolat bakteri	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Jalur biodegradasi secara umum senyawa organoklorin	13
Gambar 2. Degradasi monoklorofenol melalui jalur pemecahan- <i>meta</i>	18
Gambar 3. Metabolisme monoklorofenol oleh <i>Pseudomonas</i> sp B13	20
Gambar 4. Biodegradasi mono- dan diklorofenol melalui jalur pemecahan cincin- <i>ortho</i>	20
Gambar 5. Bakteri aerobik pengguna hidrokarbon terklorinasi sederhana yang tumbuh pada SBA yang mengandung 4-klorofenol	45
Gambar 6. Pertumbuhan isolat AK ₁ SC ₂ , BCl-1 dan Dn-4CP pada medium yang mengandung 4-CP	48
Gambar 7. Aktivitas isolat AK ₁ SC ₂ , BCl-1 dan Dn-4CP pada medium yang mengandung 4-CP sebagai sumber karbon dan energi	48
Gambar 8. Nilai pH medium ke tiga isolat bakteri AK ₁ SC ₂ , BCl-1 dan Dn-4CP pada uji kultivasi	50
Gambar 9. Hasil degradasi 4-klorofenol oleh isolat (a) <i>Arthrobacter</i> sp AK ₁ SC ₂ , (b) <i>Pseudomonas</i> sp BCl-1 dan (c) <i>Pseudomonas</i> sp Dn-4CP setelah 7 hari inkubasi pada medium yang mengandung 4-klorofenol	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Nilai absorbansi medium ke tiga isolat bakteri (AK ₁ SC ₂ , BCl-1 dan Dn-4CP)	62
Lampiran 2. Jumlah bakteri (/ml) ke tiga isolat bakteri (AK ₁ SC ₂ , BCl-1 dan Dn-4CP)	62
Lampiran 3. Jumlah ion Cl terlepas dalam medium dari ke tiga isolat (AK ₁ SC ₂ , BCl-1 dan Dn-4CP)	63
Lampiran 4. pH medium pertumbuhan ke tiga isolat bakteri (AK ₁ SC ₂ , BCl-1 dan Dn-4CP)	63
Lampiran 5. Absorbansi (OD ₇₅₀) larutan BSA untuk pembuatan kurva standar pengukuran protein	64
Lampiran 6. Absorbansi (OD ₄₆₀) larutan NaCl untuk pembuatan kurva standar pengukuran kadar ion Cl terlepas dalam medium	64
Lampiran 7. Kadar protein sumber enzim (CFE, Debris, Supernatan kultur dan Kultur cair) pada uji aktivitas enzim	65
Lampiran 8. Aktivitas spesifik enzim (SA) dari CFE, Debris, Supernatan kultur dan Kultur cair isolat bakteri AK ₁ SC ₂	65
Lampiran 9. Aktivitas spesifik enzim (SA) dari CFE, Debris, Supernatan kultur dan Kultur cair isolat bakteri BCl-1	66
Lampiran 10. Aktivitas spesifik enzim (SA) dari CFE, Debris, Supernatan kultur dan Kultur cair isolat Dn-4CP	66

INTISARI

Sifat rekalsitran senyawa 4-klorofenol (4-CP) menyebabkan terakumulasinya senyawa tersebut di lingkungan. Hanya beberapa bakteri tertentu mampu mendegradasi senyawa tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kemampuan tiga bakteri dehalogenating dalam menggunakan 4-klorofenol (4-CP) sebagai sumber karbon dan energi.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan *Arthrobacter* sp AK₁SC₂, *Pseudomonas* sp BCI-1 dan *Pseudomonas* Dn-4CP untuk mendeklorinasi atau mendegradasi senyawa 4-klorofenol (4-CP). Percobaan diawali dengan penyiapan kultur melalui teknik inkubasi sel istirahat untuk menentukan pertumbuhan bakteri dan ion klor yang dilepaskan ke dalam medium. Aktivitas bakteri ditentukan berdasarkan pada pertumbuhannya dan ion klor yang dilepaskan ke dalam medium. Aktivitas enzim dehalogenase dilakukan berdasarkan jumlah ion klor bebas yang dilepaskan ke dalam medium dari substrat yang diberikan dan hasil degradasi 4-CP dianalisa dengan menggunakan kromatografi gas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ke tiga bakteri dehalogenating mampu menggunakan 4-CP sebagai sumber karbon tunggal dan energi, dan dikategorikan sebagai bakteri yang tumbuh lambat. Aktivitas tertinggi dehalogenasi 4-CP ditunjukkan oleh *Pseudomonas* Dn-4CP dengan melepas ion klor sebesar 9,7 %, diikuti oleh *Arthrobacter* sp AK₁SC₂ sebesar 8,3 % serta *Pseudomonas* sp BCI-1 sebesar 5,3 %. Percobaan kinetika pertumbuhan *Arthrobacter* sp AK₁SC₂, *Pseudomonas* sp BCI-1 dan *Pseudomonas* sp Dn-4CP menghasilkan laju pertumbuhan spesifik (μ) masing-masing sebesar 0,009; 0,008 dan 0,005 jam⁻¹ dengan waktu generasi berturut-turut sebesar 50,6; 51,6 dan 88,4 jam. Aktivitas spesifik dehalogenase yang bermakna ditunjukkan pada ekstrak bebas sel (CFE) sebesar 0,0777 - 0,1259 $\mu\text{mol (mg protein)}^{-1}$.

ABSTRACT

The recalcitrant nature of 4-chlorophenol (4-CP) has led their accumulation in the environment. Only several selected bacteria have been able to degrade the compound. The aim of the experiment was study the ability of three isolate dehalogenating bacteria to use 4-chlorophenol as carbon and energy source.

The research was carried out using *Arthrobacter* sp AK₁SC₂, *Pseudomonas* sp BCI-1 and *Pseudomonas* sp Dn-4CP to dechlorinate or to degraded 4-CP. The experiment was commenced with bacterial culture preparation using resting cell incubation technique in order to determine bacterial growth and chloride ion release to the medium. The bacterial activities were determined base on their growth and chloride ions release to medium. The enzyme activity of dehalogenase was elucidated base on the number of chloride ions release from given substrate and the degradation product of 4-CP was analyzed using gas chromatography.

The result showed that three dehalogenating bacteria could utilized 4-CP as the sole carbon and energy source, and categorized as slow-growers. The highest activity for 4-CP dehalogenation was showed by *Pseudomonas* sp Dn-4CP that released free chloride ions on the medium about 9,7 %, followed by *Arthrobacter* sp AK₁SC₂ 8,3 % and *Pseudomonas* sp BCI-1 5,3 %. The growth kinetics study of isolate *Arthrobacter* sp AK₁SC₂, *Pseudomonas* sp BCI-1 and *Pseudomonas* sp Dn-4CP resulted in their spesific growth rate (μ) of 0,009; 0,008 and 0,005 h⁻¹ with generation time about 50,6; 51,6 and 88,4 h respectively. The significant specific activity of dehalogenase was demonstrated by cell free extract (CFE) of 0,777 - 0,1259 $\mu\text{mol (mg protein)}^{-1}$.