

**PENGARUH PEMBERIAN BERBAGAI KONSENTRASI GULA PASIR
TERHADAP PRODUKSI BIOMASSA DAN ASAM 5-AMINOLEVULINAT
(ALA) OLEH ISOLAT BAKTERI BD-16**

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



**SHEILLA ANGELINA
3425111408**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

2015

ABSTRAK

SHEILLA ANGELINA. **Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Gula Pasir Terhadap Produksi Biomassa dan Asam 5-Aminolevulinat (ALA) oleh Isolat Bakteri BD-16.** Skripsi. Jakarta: Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Isolat bakteri BD-16 hasil isolasi dari tanah masam gambut Sulawesi Barat diketahui dapat menghasilkan asam 5-Aminolevulinat (ALA). Senyawa ini diaplikasikan dalam berbagai bidang baik pertanian maupun medis. Penggunaan gula pasir sebagai sumber karbon diharapkan dapat menurunkan biaya produksi ALA yang dihasilkan oleh bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai konsentrasi gula pasir terhadap biomassa dan konsentrasi ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16, serta mengetahui konsentrasi gula pasir yang optimum dalam produksi ALA. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan desain rancangan acak lengkap. Faktor yang diujikan adalah konsentrasi gula pasir dalam media kultivasi yang terdiri dari 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah biomassa (g/l) dan konsentrasi ALA (μM). Produksi ALA dideteksi oleh metode kolorimetri yang didasarkan pada reaksi Ehrlich. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa konsentrasi gula pasir berpengaruh terhadap produksi biomassa dan ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16. Media tanpa pemberian gula pasir (0 g/l) menghasilkan biomassa terendah yaitu 2,56 g/l, yang juga diikuti dengan konsentrasi ALA terendah yaitu 26,99 μM . Sementara media dengan pemberian 50 g/l gula pasir menghasilkan biomassa tertinggi yaitu 6,29 g/l, yang diikuti dengan konsentrasi ALA terendah yaitu 260,79 μM . Uji ANAVA satu arah menunjukkan pengaruh konsentrasi gula pasir yang signifikan terhadap produksi biomassa dan ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.

Kata Kunci : isolat bakteri BD-16, gula pasir, biomassa, ALA.

ABSTRACT

SHEILLA ANGELINA. **The Effect of Various Sugar Concentrations For Biomass Production And 5-Aminolevulinic Acid (ALA) By BD-16 Bacterial Isolate**. Thesis. Jakarta: Biological Studies Program, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Jakarta.

Bacterial isolates BD-16 was isolated from acidic peat soil of West Sulawesi known to produce 5-aminolevulinic acid (ALA). This compound is applied in various sector of agriculture and medicine. The utilization of sugar as a carbon source is expected to lower cost of produced ALA by bacteria. The aim of this research was to determine the effect of sugar concentration to biomass and ALA production by BD-16 bacterial isolate, and determine the optimum of sugar concentration in the production of ALA. This research was an experimental study design with a completely randomized design. Factors tested is sugar concentration in the cultivation medium that consists of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 g/l. The parameters in this study are the biomass (g/l) and the concentration of ALA (μM). ALA production was detected by colorimetric method based on Ehrlich reaction. The result showed that the sugar concentration effect on biomass production and ALA produced by BD-16 bacterial isolate. Media without giving sugar (0 g/l) resulted in low biomass, namely 2.56 g/l, which is also followed by a low concentration of ALA is 26.99 μM . While the media by giving 50 g/l of sugar to produce the highest biomass of 6.29 g/l, which is followed by a high concentration of ALA is 260.79 μM . One-way ANOVA test showed the effect of sugar concentration significantly to the production of biomass and ALA produced by BD-16 bacterial isolate.

Keywords: BD-16 bacterial isolate, sugar, biomass, ALA.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan yang Maha Esa yang telah memberikan berkat dan rahmat-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Gula Pasir Terhadap Produksi Biomassa dan Asam 5-Aminolevulinat (ALA) oleh Isolat Bakteri BD-16” dengan sebaik-baiknya.

Penulis telah banyak mendapat bimbingan, arahan dan saran dari berbagai pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dra. Tri Handayani Kurniati, M.Si selaku Dosen Pembimbing I, yang telah banyak memberikan bimbingan, motivasi, masukan serta kesabaran untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Dra. Diana Nurani, M.Si selaku Pembimbing II, yang telah memberi kesempatan untuk mempelajari tentang bakteri penghasil ALA, dan meluangkan waktunya untuk sabar memberi bimbingan, arahan, kritik dan saran untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Dra. Yoswita Rustam, M. Si dan Ibu Dr. Rini Puspitaningrum, M. Biomed selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan masukan untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

4. Alm. Bapak Dr. Ir. Koesnandar, M.Eng yang telah memberi tema untuk penelitian ini dan pengetahuan tentang ALA.
5. Bapak Drs. M. Nurdin Matondang S. M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA UNJ.
6. Ibu Eka Putri Azrai, S.Pd. M. Si. selaku Ketua Program Studi Biologi FMIPA UNJ atas segala informasi yang telah membantu dalam pembuatan laporan ini.
7. Kepala Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB) yang telah memberikan izin untuk melaksanakan Penelitian.
8. Keluarga besar Biologi Angkatan 2011, teman-teman seperjuangan yang saling memberikan semangat dalam penyelesaian skripsi ini.

Kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca dan dapat digunakan sebaik-baiknya. Atas semua perhatian dari segala pihak yang telah membantu penulis dalam menyusun skripsi ini, penulis ucapkan terima kasih.

Jakarta, Juli 2015

Sheilla Angelina

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar belakang	1
B. Perumusan masalah	4
C. Tujuan	4
D. Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Kajian Pustaka	5
1. Asam 5-aminolevulinat (ALA).....	5
2. Biosintesis ALA	6
3. Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi ALA	7
4. Aplikasi ALA dibidang pertanian dan medis	11
5. Deteksi ALA dengan Metode Kolorimetri.....	14
6. Pengukuran pertumbuhan bakteri dengan metode berat kering sel	15
B. Kerangka berpikir	16
C. Hipotesis penelitian	17
BAB III METODOLOGI	
A. Tujuan operasional penelitian.....	18
B. Tempat dan waktu penelitian.....	18
C. Metode penelitian.....	18
D. Alat dan bahan	21
E. Cara kerja	22
1. Pembuatan media	22
2. Sterilisasi alat dan bahan	22
3. Peremajaan bakteri	22
4. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri	23
5. Pembuatan kurva standar ALA	24
6. Proses produksi ALA.....	26
7. Perhitungan produksi biomassa melalui metode berat kering sel	26
8. Deteksi ALA dengan metode kolorimetri	27
9. Pengukuran konsentrasi ALA menggunakan	

spektrofotometer	28
10. Teknik pengumpulan data	28
F. Hipotesis statistik	29
G. Teknik analisa data	30

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pertumbuhan dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16	
a. Pertumbuhan isolat bakteri BD-16	31
b. Produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16.....	34
2. Produksi biomassa dalam berbagai konsentrasi gula pasir	36
3. Produksi ALA dalam berbagai konsentrasi gula pasir	41

BAB V KESIMPULAN, IMPLIKASI, DAN SARAN

A. Kesimpulan.....	49
B. Implikasi	49
B. Saran	49

DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	56
SURAT IZIN PENELITIAN	65
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	66
RIWAYAT HIDUP	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur molekul asam 5-aminolevulinat	5
2. Biosintesis ALA pada jalur C4 dan jalur C5	6
3. Perbedaan pertumbuhan tanaman antara tanaman kontrol dengan tanaman yang diberikan 10 ppm ALA pada tanah yang mengandung 0,5% NaCl	13
4. Reaksi kolorimetri.....	15
5. Kurva biomassa (g/l) dan konsentrasi ALA (μM) terhadap waktu pertumbuhan (jam).....	24
6. Kurva standar persamaan regresi linier konsentrasi ALA	25
7. Pertumbuhan dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16 selama 96 jam	31
8. Produksi biomassa dalam berbagai konsentrasi gula pasir.....	37
9. Proses osmosis pada bakteri dalam kondisi hipertonik	39
10. Produksi ALA dalam berbagai konsentrasi gula pasir.....	42
11. Jalur pemecahan sukrosa pada bakteri	44
12. Jalur biosintesis ALA	45
13. Kurva standar persamaan regresi linier konsentrasi ALA	58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kombinasi perlakuan yang diujikan dalam penelitian.....	20
2. Disain penelitian produksi biomassa dan ALA oleh isolat Bakteri BD-16	21
3. Komposisi larutan standar ALA	25
4. Hasil uji Duncan Multiple Range Test 5% pada produksi biomassa yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.....	40
5. Hasil uji Duncan Multiple Range Test 5% pada produksi ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.....	47
6. Hasil pengukuran biomassa dan konsentrasi ALA oleh isolat bakteri BD-16	57
7. Hasil pengukuran konsentrasi larutan standar ALA	57
8. Perhitungan ANAVA satu arah produksi biomassa pada berbagai konsentrasi gula pasir yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16	60
9. Uji Duncan produksi biomassa oleh isolat bakteri BD-16.....	60
10. Perhitungan ANAVA satu arah produksi ALA pada berbagai konsentrasi gula pasir yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.....	62
11. Uji Duncan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan bufer asetat	56
2. Pembuatan reagen Ehrlich	56
3. Pertumbuhan dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16	57
4. Kurva Standar ALA.....	57
5. Produksi biomassa oleh isolat bakteri BD-16	58
6. Produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16	61
7. Pengujian gula pasir	64

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Asam 5-aminolevulinat atau *5-aminolevulinic acid* (ALA) adalah turunan dari asam amino 5-karbon yang memiliki berat molekul 131 dan terdapat pada semua organisme hidup (Jordan, 2003). ALA merupakan metabolit antara yang digunakan untuk biosintesis tetrapireol seperti heme, klorofil, dan vitamin B12 pada hewan, tumbuhan, alga, dan bakteri (Choorit *et al.*, 2011).

ALA memiliki potensi untuk digunakan dalam bidang pertanian sebagai herbisida yang dapat terurai, insektisida, dan beberapa aplikasi medis (Sasaki *et al.*, 1997). Konsentrasi ALA yang rendah (10-300 μM) mampu meningkatkan pertumbuhan dan fotosintesis tanaman gandum, kentang, lobak, bawang putih dan kacang merah (Hotta *et al.*, 1987). Selain itu, pada konsentrasi 4 mM, ALA dapat menghambat pertumbuhan gulma (*Trifolium repens*). ALA digunakan dalam bidang medis untuk terapi kanker melalui efek fotodinamik yang mengakibatkan kematian sel kanker tanpa merusak sel normal.

Mengingat potensi ALA dalam berbagai bidang pertanian dan medis maka produksi ALA dalam jumlah besar perlu dilakukan. ALA dapat diproduksi secara kimia dan biologis. Produksi ALA secara kimia memiliki tahapan yang kompleks dan biaya yang mahal. Sementara itu, produksi ALA secara biologis menggunakan bakteri terus

dikembangkan karena memiliki tahapan produksi yang lebih mudah dan biaya yang murah.

Bakteri mampu menghasilkan ALA dalam jumlah besar karena bakteri dapat dimanipulasi dan memiliki pertumbuhan yang cepat (Sasaki *et al.*, 1993). Pertumbuhan bakteri dapat diukur melalui metode berat kering sel (Scragg, 1991). Selama pertumbuhan, bakteri menghasilkan metabolit primer ataupun sekunder (Rahman, 2007). Menurut Tangprasittipap & Prasertsan (2002) ALA merupakan metabolit primer yang dihasilkan pada akhir fase logaritmik.

Penelitian Choorit *et al.*, (2011) menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara konsentrasi ALA dengan biomassa pada bakteri *Rhodopseudomonas palustris* KG31. Konsentrasi ALA terendah (4,76 μM) terdapat pada medium dengan penambahan asam asetat (dalam kondisi gelap) yang diikuti dengan penurunan biomassa (0,9 g/l), sedangkan konsentrasi ALA tertinggi (12,62 μM) terdapat pada medium dengan penambahan mixed *volatile fatty acids* (dalam kondisi terang) yang diikuti dengan peningkatan biomassa (3,6 g/l).

Konsentrasi ALA yang dihasilkan bakteri sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel bakteri. Sumber karbon merupakan salah satu faktor yang dibutuhkan bakteri untuk pertumbuhan, metabolisme dan pembentukan sel baru (Vandekar & Dulmage, 1982). Menurut Sukenda *et al.*, (2007) sumber karbon yang sedikit dalam medium pertumbuhan akan menghambat

laju pertumbuhan bakteri secara umum. Ketika laju pertumbuhan bakteri terhambat maka metabolisme bakteri akan terganggu (Pelczar & Chan, 1986).

Gula pasir merupakan sumber karbon yang baik untuk pertumbuhan bakteri karena terdiri dari glukosa, fruktosa, dan senyawa organik serta anorganik lain yang mudah untuk didegradasi menjadi energi (Ruth *et al.*, 2014). Selain itu, gula pasir adalah sumber karbon alternatif yang mudah diperoleh (Cahyati, 2009).

Hardi (2002) menyatakan bahwa penggunaan gula pasir sebanyak 40 g/l dalam medium pertumbuhan bakteri *Pseudomonas denitrificans* terbukti dapat meningkatkan konsentrasi ALA sebanyak 263,6 μM . Sedangkan penggunaan 40 g/l sukrosa, hanya dapat memproduksi ALA sebanyak 242,37 μM . Oleh karena itu penggunaan sukrosa dalam medium pertumbuhan bakteri dapat digantikan oleh gula pasir.

Isolat bakteri BD-16 yang merupakan hasil isolasi dari tanah masam gambut Sulawesi Barat, diketahui dapat memproduksi ALA sebanyak 112,42 μM . Penelitian ini dilakukan dalam rangka mendapatkan sumber karbon yang mudah diperoleh untuk meningkatkan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dituliskan, maka rumusan masalah yang diajukan adalah:

1. Bagaimanakah pengaruh konsentrasi gula pasir terhadap produksi biomassa dan ALA yang dihasilkan oleh bakteri BD-16?
2. Berapakah konsentrasi gula pasir yang optimum untuk meningkatkan produksi ALA oleh bakteri BD-16?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi gula pasir terhadap produksi biomassa dan ALA oleh bakteri BD-16.
2. Mengetahui konsentrasi gula pasir yang optimum untuk meningkatkan produksi ALA oleh bakteri BD-16.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh konsentrasi gula pasir terhadap produksi biomassa dan ALA. Selain itu, konsentrasi gula pasir yang optimal dalam meningkatkan produksi ALA dapat dijadikan acuan penggunaan gula pasir sebagai sumber karbon alternatif yang mudah diperoleh untuk produksi ALA.

BAB II

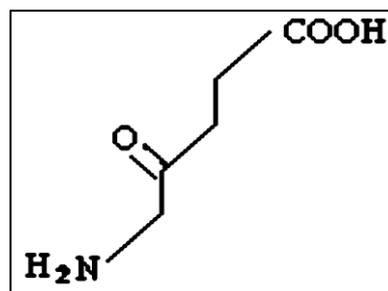
KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR, DAN HIPOTESIS PENELITIAN

A. Kajian Pustaka

1. Asam 5-aminolevulinat (ALA)

Asam 5-Aminolevulinat (ALA) adalah asam amino non-protein yang merupakan senyawa antara atau metabolit intermediet yang dihasilkan untuk biosintesis tetrapirrol. Menurut Pu *et al.*, (2013) tetrapirrol memiliki peran utama dalam transpor elektron dan pigmentasi jaringan organisme. Tetrapirrol memiliki tiga kelas penting yaitu heme, klorofil, dan vitamin B12 yang secara luas terdapat pada bakteri, jamur, hewan, dan tumbuhan.

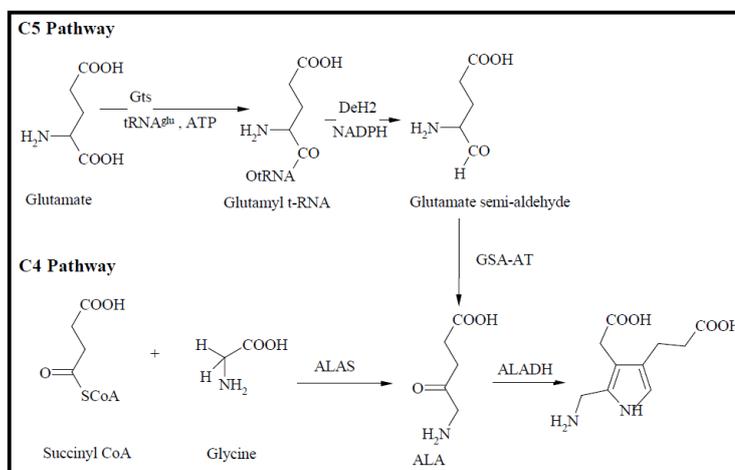
ALA memiliki lima atom karbon yang terdiri dari campuran mono-karboksil, mono-amino, dan mono-keto, yang ada di semua organisme hidup (Kang *et al.*, 2012). Adapun struktur molekul senyawa ALA adalah seperti Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Struktur molekul asam 5-aminolevulinat (Francis, 2000)

2. Biosintesis ALA

ALA dibentuk dalam 2 jalur metabolisme yang berbeda yaitu jalur Sherrin atau C4 dan jalur Beale atau C5 (Gambar 2).



Gambar 2. Biosintesis ALA pada jalur C4 dan jalur C5 (Lin *et al.*, 2009)

Jalur Sherrin atau C4 terdapat pada sel mamalia, ragi, jamur dan bakteri fotosintetik ungu non-sulfur (Sasaki *et al.*, 1987). Enzim kunci yang terlibat dalam jalur C4 adalah *5-aminolevulinic acid sintetase* (ALAS), yang merupakan katalisator kondensasi suksinil-CoA dan glisin (Lin *et al.*, 2009).

Jalur Beale atau C5 terdapat pada tanaman tingkat tinggi, alga dan beberapa bakteri sulfur ungu dan hijau (Sasikala & Ramana, 2001). Dalam jalur C5, ALA dibentuk dari glutamat atau α -ketoglutarat melalui jalur yang tidak melibatkan reaksi ALAS (Moser *et al.*, 2004). Glutamat diubah menjadi ALA dalam 3 tahap yaitu; 1) Ligasi t-RNA ke glutamat yang dikatalisis oleh glutamil-t-RNA sintetase, 2) Pengurangan glutamil-t-RNA menghasilkan

glutamat-1-semialdehid (GSA) dikatalisis oleh glutamil-t-RNA reduktase, 3) Transaminasi dari GSA untuk menghasilkan ALA dikatalisis oleh GSA amino transferase (Kang *et al.*, 2011)

3. Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi ALA oleh bakteri

a. Sumber karbon

Sumber karbon merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan bakteri untuk pertumbuhan, metabolisme dan pembentukan sel baru (Vandekar & Dulmage, 1982). Berbagai sumber karbon yang dapat digunakan untuk produksi ALA yaitu :

1) Glutamat

Glutamat dapat digunakan untuk media pertumbuhan bakteri dalam memproduksi ALA melalui media; Glutamate-malate (GM), Glutamate-glucose (GG), Monosodium glutamate glucose salt (MGS) dan Monosodium glutamate glucose salt yeast extract (MGSY). Bakteri *Rubrivivax benzoatilyticus* strain PS-5 yang dikultivasi dengan media GM menunjukkan produksi ALA tertinggi (45,10 μM) pada kultivasi 48 jam dan produktivitas 0,94 $\mu\text{M h}^{-1}$ (Sattayasamitsathit & Prasertsan, 2013).

2) Asam lemak volatil (VFA)

Rhodobacter sphaeroides dapat memanfaatkan asam lemak volatil (VFA) seperti asetat, propionat dan butirat

sebagai sumber karbon (Sasaki *et al.*, 1995). Produksi ALA oleh bakteri *Rhodobacter sphaeroides* sebesar 12,45 μM didapatkan dengan penambahan 1.80 g/l asam asetat, 13,06 μM ALA didapatkan dengan penambahan 0,2 g/l propionat dan 11,70 μM ALA didapatkan dengan penambahan 1.0 g/l butirat (pada kondisi terang) (Choorit *et al.*, 2011).

3) Glukosa

Glukosa merupakan sumber karbon yang paling sering digunakan dalam media kultivasi. Strain mutan *Rhodopseudomonas sphaeroides* CR606 dapat mengakumulasi ALA sebanyak 20 mM setelah 18 jam dengan laju produksi 1,1 mMh^{-1} (Nishikawa *et al.*, 1999). Bakteri rekombinan *Escherichia coli* BL21 (DE3) menghasilkan 9,7 mM dengan penambahan 20 g/l glukosa dalam medium Luria-Berthani (LB).

4) Gula pasir

Gula pasir merupakan sumber karbon alternatif yang mudah didapat dengan harga yang relatif murah. Penggunaan gula pasir sebanyak 40 g/l pada media PS4 oleh bakteri *Pseudomonas denitrificans* meningkatkan produksi ALA sebesar 263,6 μM , sedangkan penambahan 40 g/l sukrosa hanya meningkatkan produksi ALA sebesar

242,37 μM (Hardi, 2002). Menurut Yulianingsih (2006), gula pasir selain dominan mengandung sukrosa, juga mengandung gula invert 2 mg/ 100 g, kalsium 5 mg/ 100 g, fosfor 1 mg/ 100 g, besi 0,1 mg/ 100 g, dan mineral lainnya 0,5 mg/ 100 g. Oleh karena itu, gula pasir baik untuk pertumbuhan sel karena mengandung senyawa organik dan anorganik.

b. Prekursor

Penambahan prekursor suksinat dan glisin pada kisaran 20-60 mM ke dalam media memberikan efek positif untuk produksi ALA pada *Rhodobacter sphaeroides*, tetapi penambahan di atas 80 mM menghasilkan dampak negatif. Ketersediaan glisin di atas 80 mM akan membatasi pembentukan ALA (Sasaki *et al.*, 1990).

c. Asam levulinat atau *Levulinic acid* (LA)

Levulinic Acid (LA) atau asam levulinat, merupakan analog ALA dan inhibitor kompetitif yang dapat menghambat aktivitas ALAD (*Aminolevulinic acid dehidratase*) yang akan meningkatkan pembentukan ALA ekstraseluler (Sasaki *et al.*, 1993). Penambahan LA dalam media kultur dapat meningkatkan produksi ALA dan menekan pertumbuhan sel bakteri. Penambahan 50 mM LA akan menyebabkan pertumbuhan sel berhenti dan ALA tidak diekskresikan (Sasaki *et al.*, 1997).

d. Ion logam

Ion logam terutama Fe^{2+} dan Co^{2+} adalah elemen penting untuk mengatur biosintesis tetrapyrrole pada bakteri *Rhodobacter sphaeroides*. Medium kultur yang mengandung zat besi atau kobalt akan meningkatkan akumulasi ALA (Sasikala *et al.*, 1994).

e. Intensitas cahaya

Intensitas cahaya merupakan faktor penting untuk meningkatkan pembentukan ALA. Produksi ALA mencapai nilai maksimum pada 3 Klux. Pencahayaan tinggi (lebih dari 5 Klux) tidak efektif untuk produksi ALA dan pencahayaan rendah (di bawah 1 Klux) menghasilkan pertumbuhan yang rendah dan hampir tidak ada pembentukan ALA (Sasaki *et al.*, 1990).

f. Aerasi

Oksigenasi adalah salah satu faktor penting yang mempengaruhi aktivitas ALAS (5-aminolevulinic acid synthetase) dalam hilangnya pigmentasi akibat penurunan aktivator ALAS, seperti sistein trisulfide dan glutathione trisulfide (Sandy *et al.*, 1985). Oleh karena itu, kondisi kultur yang berubah dari aerobik menjadi mikroaerobik akan meningkatkan aktivitas ALAS 2-4 kali.

g. pH

Pengaruh pH (6,0-8,0) terhadap produksi ALA oleh *Rhodobacter sphaeroides* pada media kultur VFA telah dipelajari. Pada pH netral (6,8 dan 7,0) produksi ALA ekstraseluler mencapai 16 mM. Pada pH 5,5 dan penambahan 5 mM LA, aktivitas ALAD terhambat sebesar 85% (*in vitro*), sedangkan pada pH 7,5 dan penambahan 100 mM LA, aktivitas ALAD hanya terhambat sebesar 45% (Sasaki *et al.*, 1995).

4. Aplikasi ALA dalam bidang pertanian dan medis

Beberapa aplikasi ALA telah digunakan dalam bidang pertanian dan medis, diantaranya yaitu :

a. Herbisida

Percobaan laboratorium telah menunjukkan bahwa ALA sangat efektif terhadap banyak spesies gulma. pada konsentrasi 4 mm, ALA dapat menghambat pertumbuhan gulma *Trifolium repens*. Selain itu, media kultur dari *Rhodobacter sphaeroides* dalam produksi ALA dapat langsung digunakan sebagai herbisida (Sasaki *et al.*, 1990).

b. Insektisida

Pencampuran antara ALA (30 Mm) dengan 30 Mm 2-2'-Dipyridyl (pH 3,5) menyebabkan kematian pada larva serangga *Trichoplusia* sp. akibat akumulasi dari protoporfirin IX.

ALA memiliki keunggulan yaitu tidak bersifat toksik pada organisme yang bukan target (Nishikawa *et al.*, 1999).

c. Stimulator Pertumbuhan

ALA dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman, fotosintesis, merangsang fiksasi karbondioksida (CO₂), hasil panen dari beberapa tanaman, menekan respirasi dan pelepasan CO₂ di bawah kondisi gelap (Hotta *et al.*, 1997). Aplikasi ALA yang tepat menunjukkan pengaruh (10-60%) dalam meningkatkan pertumbuhan lobak, kacang merah, barley, kentang, bawang putih, beras dan jagung (Sasikala *et al.*, 1994).

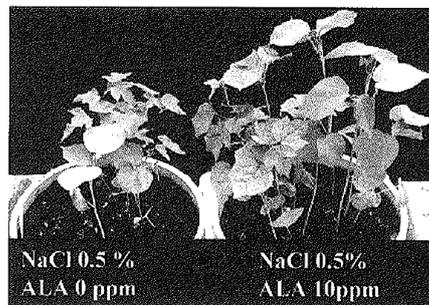
d. Ketahanan dingin tanaman

Tanaman padi yang diberikan 1 ppm ALA dalam waktu 5 hari (setelah perlakuan dingin selama 30 hari dengan suhu 5°C) memiliki rasio kelangsungan hidup 85%, dibandingkan dengan tanaman kontrol yang hanya 65%. Hasil ini membuktikan bahwa ALA memiliki efek protektif terhadap stres dingin pada bibit padi (Hotta *et al.*, 1997).

e. Toleransi Tanaman Terhadap Garam

Watanabe *et al.*, (2000) mengemukakan bahwa ALA dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap garam pada bibit kapas. Bibit kapas yang telah diberikan ALA dapat tumbuh di tanah yang mengandung kadar garam (NaCl) setinggi 1,5%.

Analisis komposisi mineral dari bagian tanaman menunjukkan bahwa ALA menyebabkan serapan terhadap Na^+ berkurang sehingga konsentrasi Na^+ di akar rendah.



Gambar 3. Perbedaan pertumbuhan tanaman antara tanaman kontrol dengan tanaman yang diberikan 10 ppm ALA pada tanah yang mengandung 0,5% NaCl, Nishikawa & Murooka (2001).

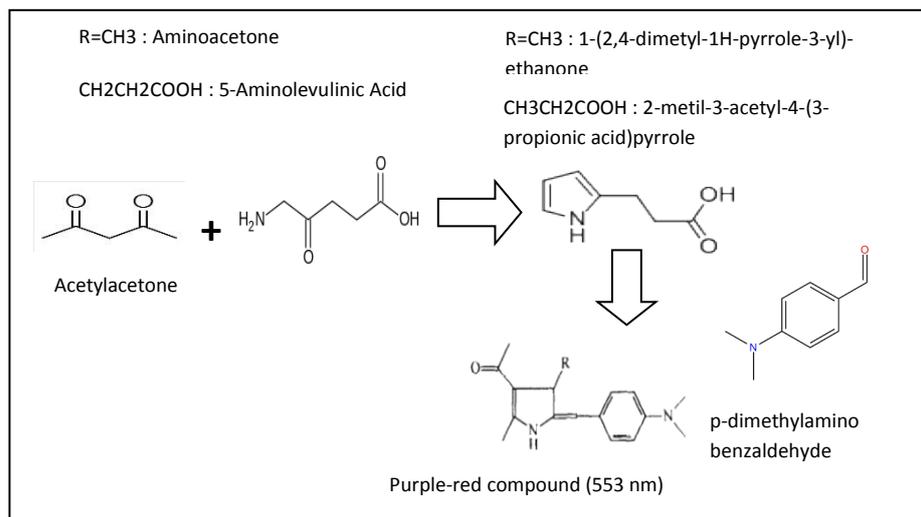
f. Terapi fotodinamik

Photodynamic therapy (PDT) atau terapi fotodinamik dapat digunakan untuk terapi kanker dengan melibatkan penggunaan fotosensitizer (molekul yang peka terhadap cahaya) (Bhowmick dan Girotti, 2010; Mikolajewska *et al.*, 2010; Sakamoto *et al.*, 2012). Fotosensitizer akan bereaksi dengan foton (unit energi laser) dan bersama oksigen akan mengakibatkan kematian sel kanker secara selektif tanpa merusak sel normal. Penambahan ALA pada penderita kanker akan menyebabkan akumulasi PpIX dalam biosintesis heme yang merupakan fotosensitizer yang efisien (Haedersdal *et al.*, 2014).

5. Deteksi ALA dengan Metode Kolorimetri (Colorimetric method)

Metode kolorimetri merupakan cara untuk mendeteksi ALA secara cepat, murah dan akurat. Secara umum metode ini digunakan untuk perhitungan atau perkiraan kuantitatif ALA yang diproduksi oleh bakteri (Tomokuni & Ogata, 1972). Adapun yang diperlukan untuk deteksi ALA melalui metode kolorimetri adalah bufer asetat dan reagen Ehrlich. Bufer asetat (mengandung sodium asetat, asam asetat dan asetil aseton) digunakan dalam metode ini untuk mengkondensasi ALA dengan asetil aseton sehingga menghasilkan 2-metil-3-asetil-5-asam propionat pirol. Kondensasi antara ALA dengan asetil aseton hanya dapat berlangsung pada kondisi panas, oleh sebab itu setelah supernatan ditambahkan bufer asetat harus dipanaskan. Proses deteksi ALA (Gambar 4) akan menghasilkan senyawa pirol 1(2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-yl)-ethanone yang merupakan kompleks senyawa kimia berwarna ungu kemerahan (Tomokuni & Ogata, 1972).

Reagen Ehrlich dengan berbagai modifikasi telah dapat digunakan untuk deteksi ALA dalam urin seseorang yang terpapar timbal (Aronsen, 1960). Terjadi peningkatan produksi ALA pada urin seseorang yang keracunan timbal.



Gambar 4. Reaksi kolorimetri

6. Pengukuran pertumbuhan bakteri dengan metode berat kering sel

Pertumbuhan sel bakteri dapat dihitung dengan dua cara yaitu perhitungan langsung dan tidak langsung. Jutono *et al.*, (2009) menyatakan bahwa perhitungan langsung dapat dilakukan dengan membuat preparat dari suatu bahan (preparat sederhana diwarnai atau tidak diwarnai) dan penggunaan ruang hitung (counting chamber). Menurut Dwidjoseputro (1994) yang termasuk dalam perhitungan tidak langsung yaitu: perhitungan pada cawan petri (total plate count/TPC), perhitungan melalui pengenceran, kalorimeter (cara kekeruhan atau turbidimetri) dan perhitungan jumlah terkecil atau terdekat (Most Probable Number Method).

Biomassa sel dapat dihitung melalui perhitungan tidak langsung dengan metode berat kering sel (cara yang paling cepat untuk mengukur jumlah sel). Metode ini relatif mudah dilakukan, yaitu

kultur disaring atau disentrifugasi, kemudian bagian yang tersaring atau yang mengendap hasil sentrifugasi dikeringkan pada suhu 103°C (Chaikritsadakarn *et al.*, 2004). Kelemahan pada metode ini adalah tidak dapat membedakan sel yang hidup dan yang mati. Akan tetapi, keterbatasan itu tidak menutup manfaat metode ini dalam hal mengukur efisiensi fermentasi, karena pertumbuhan diukur dengan satuan berat, sehingga dapat diperhitungkan dengan parameter konsumsi substrat dan produksi senyawa yang diinginkan.

B. Kerangka Berpikir

Asam 5-aminolevulinat (ALA) adalah metabolit antara yang ada di semua organisme hidup dan berperan dalam biosintesis tetrapirrol. ALA dapat digunakan sebagai herbisida yang mudah terurai, insektisida dan terapi kanker. Produksi ALA dalam jumlah besar perlu dilakukan karena potensi ALA yang menjanjikan.

Bakteri dapat dimanipulasi baik secara molekuler maupun konvensional untuk menghasilkan ALA dalam jumlah yang besar. Penambahan sumber karbon untuk mengoptimalkan produksi ALA merupakan manipulasi bakteri secara konvensional. Gula pasir merupakan sumber karbon yang mengandung glukosa dan fruktosa (sebagai molekul penyusun sukrosa) yang mudah untuk didegradasi menjadi sumber energi, serta mengandung senyawa anorganik yang baik untuk pertumbuhan sel. Ketika pertumbuhan bakteri tercukupi oleh nutrisi maka metabolit yang dihasilkan pun akan meningkat.

Isolat bakteri BD-16 merupakan salah satu isolat bakteri koleksi LAPTIAB, BPPT, yang dapat menghasilkan ALA sebanyak 112,42 μM pada tahap seleksi bakteri penghasil ALA. Penelitian tentang penggunaan gula pasir dalam produksi ALA ini dilakukan sebagai upaya mendapatkan sumber karbon yang murah dan mudah didapat.

C. Hipotesis penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka berpikir diatas, maka dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi gula pasir terhadap produksi biomassa dan ALA oleh isolat bakteri BD-16.
2. Terdapat konsentrasi gula pasir yang optimal untuk meningkatkan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16.

BAB III

METODOLOGI

A. Tujuan Operasional Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengukur produksi biomassa isolat bakteri BD-16 melalui metode berat kering sel (g/l) pada konsentrasi gula pasir 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l.
2. Mengukur konsentrasi ALA (μM) yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16 melalui metode kolorimetri pada konsentrasi gula pasir 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l.
3. Menentukan waktu inkubasi bakteri melalui pembuatan kurva pertumbuhan isolat bakteri BD-16.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi LAPTIB, PUSPIPTEK, Serpong dan dilaksanakan pada bulan Januari 2015 - Maret 2015.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Parameter yang diamati meliputi biomassa (g/l) dan konsentrasi ALA (μM). Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi gula pasir

yang terdiri dari sembilan perlakuan yaitu 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l. Variabel terikat pada penelitian ini adalah produksi biomassa (g/l) dan konsentrasi ALA (μM).

Banyaknya ulangan ditentukan berdasarkan rumus berikut (Nainggolan, 1965) :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$9(n-1) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 24/9$$

$$n \geq 2,667 \text{ (dibulatkan menjadi 3)}$$

Keterangan:

t = treatment (perlakuan)

n = ulangan

Berdasarkan perhitungan diatas, banyaknya minimal ulangan yang digunakan adalah 3 kali ulangan.

Berdasarkan kombinasi perlakuan yang diujikan terdapat 27 unit percobaan (Tabel 1). Tata letak (disain penelitian) dilakukan secara acak (Tabel 2).

Tabel 1. Kombinasi perlakuan yang diujikan dalam penelitian

Jenis Bakteri	Konsentrasi Gula Pasir	Ulangan		
		1	2	3
Isolat BD-16 (X)	A	X1A	X2A	X3A
	B	X1B	X2B	X3B
	C	X1C	X2C	X3C
	D	X1D	X2D	X3D
	E	X1E	X2E	X3E
	F	X1F	X2F	X3F
	G	X1G	X2G	X3G
	H	X1H	X2H	X3H
	I	X1I	X2I	X3I

*Keterangan Tabel

- X : Isolat bakteri BD-16
- A : Konsentrasi gula pada media LB 0 g/l
- B : Konsentrasi gula pada media LB 10 g/l
- C : Konsentrasi gula pada media LB 20 g/l
- D : Konsentrasi gula pada media LB 30 g/l
- E : Konsentrasi gula pada media LB 40 g/l
- F : Konsentrasi gula pada media LB 50 g/l
- G : Konsentrasi gula pada media LB 60 g/l
- H : Konsentrasi gula pada media LB 70 g/l
- I : Konsentrasi gula pada media LB 80 g/l

Tabel 2. Disain penelitian produksi biomassa dan ALA oleh isolat bakteri BD-16

X1A	X1H	X2F	X2C	X1I	X3A	X3H	X2D	X1D
X3E	X3F	X2A	X1E	X3C	X2G	X1F	X2B	X2I
X3B	X1G	X3D	X3G	X1B	X2H	X1C	X3I	X2E

D. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari: tabung reaksi, erlenmeyer, *microtube*, *stirer*, kompor listrik, lemari pendingin, oven, autoklaf, pipet mikro, pemanas air, pH meter, kuvet, spektrofotometer, timbangan analitik, dan vortex. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri BD-16 yang diisolasi dari tanah masam gambut Sulawesi Barat (merupakan salah satu kultur koleksi laboratorium bakteriologi), media nutrisi agar (NA) [Acumedia], *tryptone* [Acumedia], *yeast extract* [Himedia], NaCl [Merck], gula pasir lokal [berwarna kuning]. Bahan kimia lain yang digunakan yaitu asam klorida 0,1 M (HCl), asam asetat, sodium asetat, *p-dimethylaminobenzaldehyde*, asetil aseton, asam perklorat 70%.

E. Cara Kerja

1. Pembuatan Media

Media yang digunakan terdiri dari media Nutrien Agar (NA) dan media Luria-Bertani (LB). Media NA digunakan untuk peremajaan bakteri, yang dibuat dengan melarutkan 28 gr serbuk NA dalam 1 liter akuades. Media LB merupakan media yang umum digunakan sebagai media kultivasi untuk bakteri penghasil ALA. Komposisi media LB per liter berdasarkan modifikasi Sambrook & Russel (2001) dan Gerhardt *et al.*, (1994) sebagai berikut: 10 gram *tryptone* [Acumedia], 5 gram *yeast extract* [Himedia], 10 gram NaCl [Merck], dan 10 gram glukosa. Penelitian ini menggunakan sembilan variasi konsentrasi gula pasir sebagai sumber karbon pengganti glukosa pada media LB. Gula pasir yang digunakan memiliki derajat kemanisan/brix 94% (Lampiran 7).

2. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dicuci bersih dan dikeringkan. Alat kaca yang telah disiapkan, dimasukkan ke dalam autoklaf bersamaan dengan bahan lainnya, seperti *microtips* dan media. Proses sterilisasi berlangsung pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 - 20 menit.

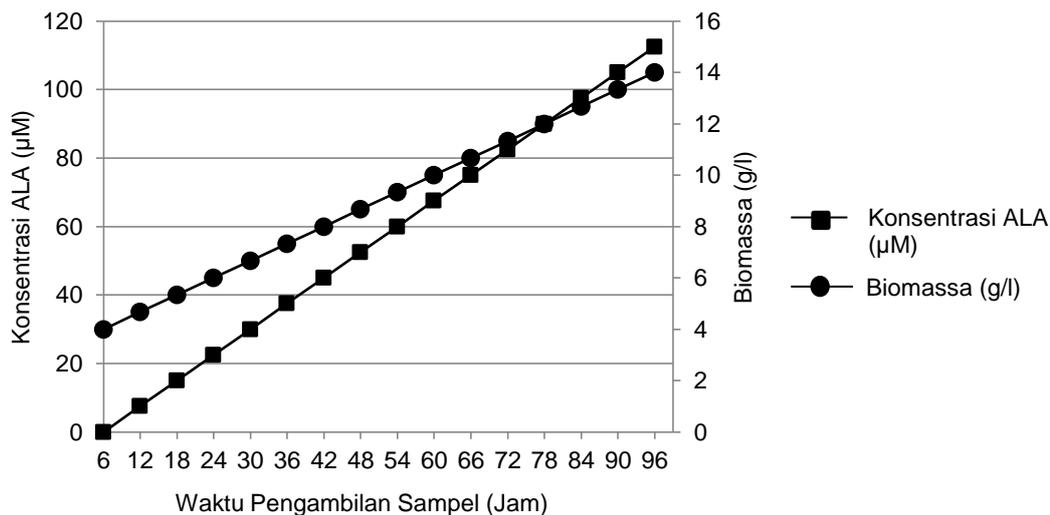
3. Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri BD-16 diperoleh dari koleksi stok laboratorium bakteriologi, LAPTIAB. Isolat ini merupakan hasil isolasi dari tanah

masam gambut Sulawesi Barat. Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara sebagai berikut; sebanyak satu ose kultur bakteri diambil secara aseptis untuk digoreskan secara zig-zag pada permukaan agar NA. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24 jam.

4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri bertujuan untuk menentukan waktu inkubasi bakteri yang tepat dalam mengukur produksi ALA. Pembuatan kurva pertumbuhan didasarkan pada penelitian Chaikritsadakarn *et al.*, (2004) yaitu: sebanyak satu ose kultur bakteri BD-16 dipindahkan secara aseptis ke dalam 50 ml medium LB dalam Erlenmeyer bervolume 100 ml dan diinkubasi dengan mesin *shaker* pada kecepatan 150 rpm. Selanjutnya setiap enam jam sekali selama empat hari, pertumbuhan sel diukur melalui metode berat kering sel. ALA yang dihasilkan oleh bakteri dideteksi melalui metode kolorimetri. Pengukuran konsentrasi ALA yang dihasilkan dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 553 nm (Tomokuni & Ogata, 1972). Data biomassa dan konsentrasi ALA yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva biomassa (g/l) dan konsentrasi ALA (μM) terhadap waktu pertumbuhan (jam). Dengan demikian, pertumbuhan bakteri, waktu pemanenan sel bakteri, dan hubungan antara biomassa dan konsentrasi ALA dapat diketahui.



Gambar 5. Kurva biomassa (g/l) dan konsentrasi ALA (μM) terhadap waktu pertumbuhan (jam)

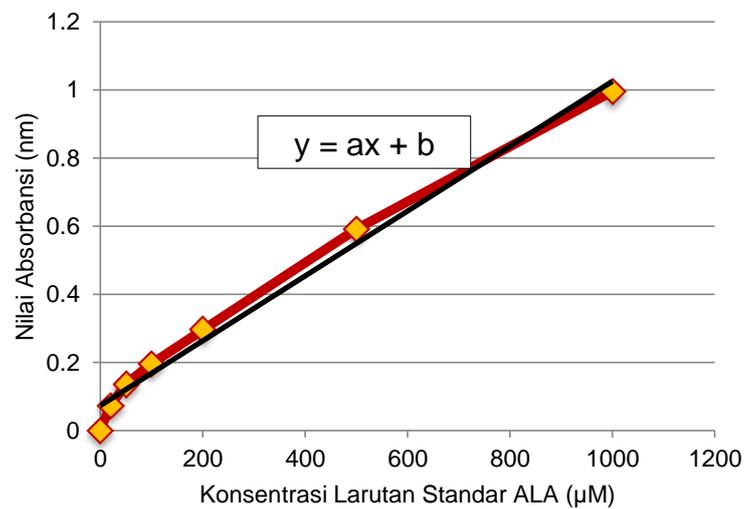
5. Pembuatan Kurva Standar ALA

Kurva standar ALA dibuat dengan menyiapkan 10 mM larutan standar ALA dan HCL 0,1 M sesuai komposisi pada Tabel 3. Sebanyak 100 μl dari larutan standar ALA dimasukkan ke dalam *microtube*, selanjutnya ditambahkan 2 ml bufer asetat dan dihomogenisasi menggunakan vortex selama 10 detik. Kemudian *microtube* diinkubasi selama 15 menit pada suhu 90°C di dalam *waterbath*. *Microtube* kemudian didinginkan dalam es batu selama 10 menit. Setelah itu dilakukan homogenisasi kembali menggunakan vortex. Tahap berikutnya sebanyak 350 μl reagen Ehrlich ditambahkan ke dalam *microtube* dan dihomogenisasi kembali menggunakan vortex. Larutan standar ALA diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 553 nm (Tomokuni & Ogata, 1972) dan larutan HCL 1 M digunakan sebagai blanko.

Tabel 3. Komposisi larutan standar ALA

No	Konsentrasi larutan stok ALA (μM)	Volume larutan stok ALA (μl) yang ditambahkan	Volume larutan HCL 0,1 M (μl) yang ditambahkan	Konsentrasi akhir dari larutan standar ALA (μM)
1	10000	100	900	1000.0
2	1000	500	500	500.0
3	500	400	600	200.0
4	200	500	500	100.0
5	100	500	500	50.0
6	50	400	600	20.0
7	-	-	Hanya larutan HCL 0,1 M	0.0 (Blank)

(Sumber: Van der Werf, M. J. & Zeikus, J. G. 1996)

**Gambar 6.** Kurva standar persamaan regresi linier konsentrasi ALA

Data absorbansi yang diperoleh selanjutnya dibuat menjadi kurva standar persamaan regresi linier konsentrasi ALA (Gambar 6) dengan Microsoft Excel. Suatu persamaan regresi linier didapatkan

untuk mengkonversi data absorbansi pada tiap perlakuan dalam bentuk *micromolar* (μM).

Persamaan yang didapatkan yaitu $y = ax + b$.

Keterangan :

y = data absorbansi pada tiap perlakuan.

x = konsentrasi ALA yang diperoleh pada tiap perlakuan.

6. Proses Produksi ALA

Sebanyak satu ose bakteri diinokulasikan dari medium nutrisi agar (NA) ke dalam 10 ml medium Luria Bertani (LB) secara aseptis. Selanjutnya inkubasi dilakukan dalam mesin *shaker* pada kecepatan 150 rpm. Waktu inkubasi ditentukan berdasarkan kurva hubungan antara produksi ALA dengan waktu yang telah diperoleh sebelumnya.

7. Perhitungan produksi biomassa melalui metode berat kering sel

Produksi biomassa dianalisa dengan menggunakan metoda berat kering sel (Sattayasamitsathit & Prasertsan, 2013) yang dimodifikasi. Sebanyak 1 ml cairan kultivasi disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 10.000 rpm dalam *microtube* yang telah dikeringkan dengan oven dan ditimbang sebelumnya. Setelah supernatan dibuang, secara hati-hati ditambahkan 5 ml NaCl 0,9% ke endapan sel (pelet) untuk membersihkan sel dari media. Sentrifugasi kembali dilakukan pada kondisi yang sama dengan sebelumnya. Endapan sel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 103°C

selama 24 jam atau sampai beratnya konstan. Tabung berisi sel kering selanjutnya dimasukkan ke dalam desikator, setelah dingin tabung berisi sel kering ditimbang. Biomassa dihitung berdasarkan rumus berikut ini (Yuliana, 2008) :

$$\text{Biomassa (g/l)} = \frac{T - T_0}{V} \times 10^3$$

Keterangan:

T = Berat tabung berisi sel kering (g)

T₀ = Berat kosong tabung (g)

V = Volume sampel (ml)

8. Deteksi ALA dengan metode kolorimetri

Produksi ALA ekstrasel ditentukan melalui metode kolorimetri (Sasaki *et al.*, 1997). Sebanyak 1 ml kultur cair bakteri hasil dari kultivasi pada medium LB, dimasukkan kedalam *microtube* dengan menggunakan *micropipet*. Supernatan diperoleh melalui sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam *microtube*. Sebanyak 200 µl buffer asetat dan 1% asetil aseton ditambahkan dan campuran tersebut dihomogenisasi menggunakan vortex selama 10 detik. *Microtube* diinkubasi selama 15 menit ke dalam air mendidih (90°C) menggunakan *waterbath*. Inkubasi dilanjutkan dalam es batu selama 10 menit. Setelah diinkubasi *microtube* dihomogenisasi kembali menggunakan vortex selama 10 detik. Selanjutnya ditambahkan 350 µl reagen Ehrlich dan dihomogenisasi kembali menggunakan

vortex selama 10 detik. Perubahan warna larutan menjadi ungu kemerahan mengindikasikan adanya produksi ALA (hasil positif).

9. Pengukuran produksi ALA menggunakan spektrofotometer

Produksi ALA untuk tiap sampel dideteksi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 553 nm (Tomokuni & Ogata, 1972) dan larutan HCL 1 M digunakan sebagai blanko. Data absorbansi yang didapatkan pada spektrofotometer akan dikonversikan dalam bentuk *micromolar* (μM) menggunakan kurva standard ALA.

10. Teknik Pengumpulan Data

Konsentrasi ALA dalam *micromolar* (μM) didapatkan dengan mengkonversikan data absorbansi yang diperoleh dari hasil spektrofotometri dengan kurva standar ALA. Pertumbuhan bakteri diketahui melalui produksi biomassa yang diukur dengan perhitungan berat kering sel (g/l) (Yuliana, 2008).

F. Hipotesis Statistik

Berdasarkan rancangan penelitian yang telah disusun, maka dibuat hipotesis statistik sebagai berikut :

1. Hubungan antara konsentrasi gula pasir terhadap produksi ALA.

Ho: Jika rata-rata produksi ALA sama pada sembilan perlakuan

H1: Jika salah satu rata-rata produksi ALA berbeda pada sembilan perlakuan

Keterangan:

Ho: Tidak terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi gula pasir (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l) terhadap produksi ALA.

H1: Terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi gula pasir (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l) terhadap produksi ALA.

2. Hubungan antara konsentrasi gula pasir terhadap biomassa.

Ho: Jika semua rata-rata produksi biomassa sama pada sembilan perlakuan

H1: Jika salah satu rata-rata produksi biomassa berbeda pada sembilan perlakuan

Keterangan:

Ho: Tidak terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi gula pasir (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l) terhadap biomassa.

H1: Terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi gula pasir (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l) terhadap biomassa.

G. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji F melalui ANAVA satu arah dengan $\alpha = 0,05$, untuk mengetahui pengaruh konsentrasi gula pasir terhadap produksi biomassa dan ALA. Jika F hitung $>$ F tabel 5% maka perhitungan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5% untuk mengetahui perbedaan perlakuan terhadap parameter yang diukur.

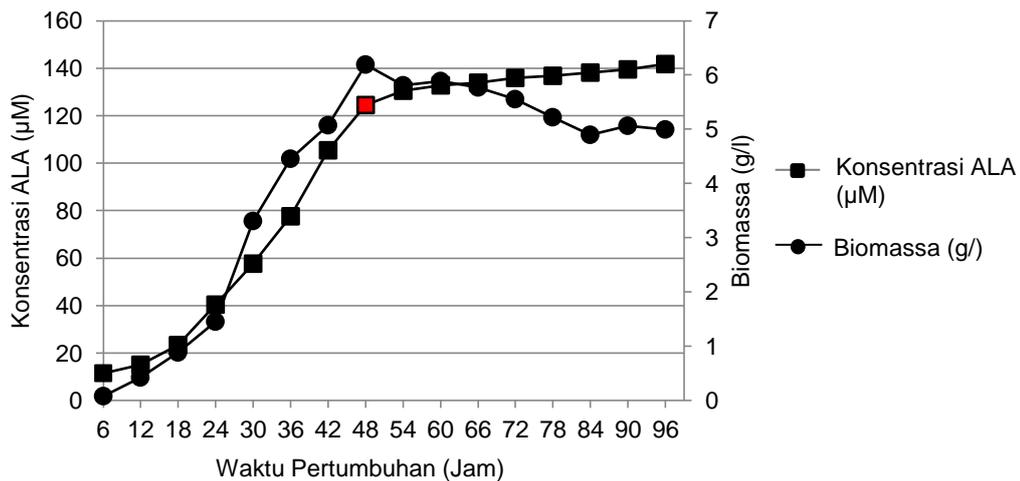
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pertumbuhan dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16

a. Pertumbuhan isolat bakteri BD-16

Pertumbuhan isolat bakteri BD-16 didapatkan dengan mengukur produksi biomassa melalui metode berat kering sel, setiap 6 jam selama 96 jam (Gambar 7). Kurva pertumbuhan yang diperoleh memperlihatkan 3 fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase logaritmik dan fase stasioner. Dwidjoseputro (1994) menyatakan bahwa kurva pertumbuhan bakteri terdiri atas beberapa fase yaitu fase lag, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian.



Gambar 7. Pertumbuhan dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16 selama 96 jam

Berdasarkan hasil pengukuran, isolat bakteri BD-16 memiliki fase lag (fase adaptasi) yang relatif pendek, yaitu pada jam ke-6 hingga jam ke-12 (Gambar 7). Fase lag merupakan fase awal

pertumbuhan bakteri ketika dipindahkan ke dalam suatu media. Bakteri mempersiapkan enzim-enzim pendegradasi nutrisi dalam media pada fase lag.

Bakteri yang dipindahkan ke dalam media, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan di sekitarnya (Waluyo, 2008). Panjang atau pendeknya fase adaptasi sangat ditentukan oleh jumlah sel yang diinokulasikan, kondisi fisiologis bakteri dan media kultivasi yang digunakan (Scragg, 1991).

Kondisi fisiologis bakteri dapat dipertahankan, salah satunya melalui peremajaan bakteri. Setelah ditumbuhkan pada media peremajaan, umur bakteri menjadi penting karena akan mempengaruhi kondisi fisiologis bakteri tersebut. Bakteri yang ditumbuhkan selama 24 – 48 jam akan memiliki kondisi fisiologis yang lebih baik jika dibandingkan dengan bakteri yang telah ditumbuhkan selama satu bulan. Sebelum diinokulasikan pada media Luria Bertani (LB), isolat bakteri BD-16 ditumbuhkan pada nutrien agar (NA) selama 24 jam. Diperkirakan bakteri ini masih aktif membelah sehingga fase lag menjadi relatif pendek.

Selain itu, kesamaan komposisi antara media NA (sebagai media peremajaan bakteri) dengan LB (sebagai media kultivasi) akan menyebabkan bakteri mudah untuk beradaptasi. Kandungan yang sama pada kedua media akan mempermudah bakteri dalam

mendegradasi nutrisi sehingga memiliki fase lag yang relatif pendek yaitu pada jam ke-6 hingga jam ke-12. Ali & Fozia (2011) menyatakan bahwa media NA dan LB merupakan media kaya yang secara umum memiliki kandungan sumber karbon, nitrogen, protein, vitamin dan mineral yang sama.

Fase logaritmik isolat bakteri BD-16 terjadi pada jam ke-18 hingga jam ke-48. Berdasarkan hasil pengamatan, biomassa meningkat menjadi dua kali lipat pada jam tersebut (Lampiran 3). Hal ini sesuai dengan pendapat Middelbeek *et al.*, (1992) yang menyatakan bahwa fase logaritmik dicirikan dengan adanya peningkatan berat kering sel menjadi dua kali lipat. Peningkatan jumlah sel bakteri pada fase logaritmik didukung dengan ketersediaan nutrisi yang masih cukup melimpah pada media kultivasi (Kabinawa, 1983). Ketika nutrisi dalam media cukup melimpah maka bakteri akan menghasilkan energi yang cukup banyak untuk melakukan pembelahan (memperbanyak diri) secara maksimal. Oleh karena itu, fase logaritmik dapat dikatakan sebagai fase pembelahan maksimal (Pelczar & Chan, 1986).

Isolat bakteri BD-16 mengalami fase stasioner pada jam ke-54 hingga jam ke-96. Hasil pengamatan menunjukkan pada kisaran waktu tersebut biomassa hanya mengalami sedikit peningkatan (Lampiran 3). Biomassa yang terus meningkat sampai jam ke-96 disebabkan karena pengukuran dilakukan menggunakan metode berat kering sel yang

menghitung baik sel hidup maupun sel mati. Oleh karena itu, peningkatan biomassa akan terjadi sampai akhir pengukuran. Menurut Gaman & Sherrington (2004) selama fase stasioner, laju pertumbuhan menurun yang disebabkan oleh berkurangnya beberapa nutrisi esensial dalam media atau karena terjadinya akumulasi autotoksin dalam media atau kombinasi dari keduanya. Berdasarkan kurva pertumbuhan (Gambar 7), laju pertumbuhan isolat bakteri BD-16 mengalami penurunan pada jam ke-54 hingga jam ke-96, sedangkan laju pertumbuhan mengalami peningkatan pada jam ke-18 hingga ke-48 (fase logaritmik).

b. Produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16

Produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16 dideteksi melalui metode kolorimetri dan diukur menggunakan spektrofotometer setiap 6 jam selama 96 jam. Pengukuran konsentrasi ALA bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi optimal dari bakteri dalam menghasilkan ALA.

Konsentrasi ALA terendah ($1,83 \mu\text{M}$) dihasilkan pada fase lag yaitu pada jam ke-6 (Lampiran 3). Konsentrasi ALA selanjutnya mulai mengalami peningkatan pada jam ke-12 hingga jam ke-48. Konsentrasi ALA tertinggi ($141,48 \mu\text{M}$) dihasilkan pada akhir fase logaritmik yaitu pada jam ke-48 (Gambar 7). Berdasarkan hasil pengamatan, konsentrasi ALA terendah terdapat pada fase lag (jam ke-6 hingga jam ke-12). Michele *et al.*, (2012) mengatakan bahwa

rendahnya konsentrasi ALA pada fase lag disebabkan karena bakteri perlu menyesuaikan diri dengan lingkungan baru untuk dapat memanfaatkan nutrisi yang tersedia.

Produksi ALA menunjukkan peningkatan pada fase logaritmik yaitu pada jam ke-18 hingga jam ke-48 (Lampiran 3). Puncak produksi ALA terjadi pada akhir fase logaritmik (48 jam) dengan konsentrasi 141,48 μM . Hasil ini sesuai dengan penelitian Nishikawa *et al.*, (1999) yang mengukur produksi ALA pada bakteri *Rhodobacter shaeroides* setelah masa kultivasi ke-48 jam karena diperkirakan bakteri tersebut telah mencapai akhir fase logaritmik. Waktu inkubasi 48 jam selanjutnya dijadikan dasar untuk mengukur produksi ALA dalam berbagai konsentrasi gula pasir yang berbeda (sesuai perlakuan yang telah ditetapkan pada penelitian).

Produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16 mengalami penurunan pada fase stasioner yaitu pada jam ke-54 hingga jam ke-96 (Lampiran 3). Menurut Kang *et al.*, (2012) pada fase stasioner nutrisi yang tersedia tidak sama dengan jumlah sel bakteri yang ada. Karena terjadi ketidakseimbangan, maka metabolisme sel bakteri mengalami gangguan dan mengakibatkan menurunnya produksi ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.

Berdasarkan hasil pengukuran selama 96 jam, peningkatan produksi ALA berbanding lurus dengan peningkatan biomassa pada fase logaritmik (jam ke-18 hingga jam ke-48). Sementara itu, produksi

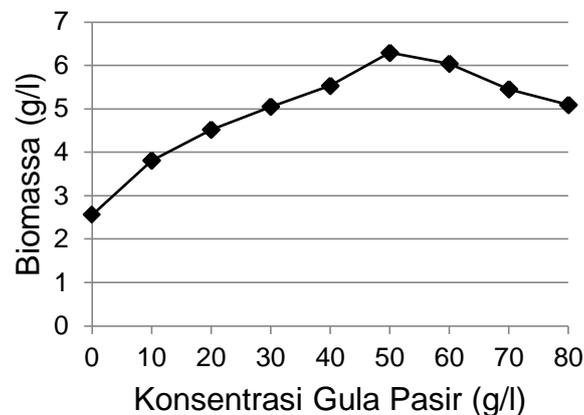
ALA mengalami penurunan saat bakteri memasuki fase stasioner (jam ke-54 hingga jam ke-96). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ALA telah dihasilkan sejak awal fase pertumbuhan dan produksinya mengikuti kurva pertumbuhan bakteri. Selain itu, produksi ALA yang terus mengalami peningkatan pada fase logaritmik dan mengalami penurunan pada fase stasioner menegaskan bahwa ALA merupakan suatu metabolit primer. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Monika & Klemme (2009) yang menyatakan bahwa ALA merupakan suatu metabolit primer, yaitu senyawa yang dihasilkan mengikuti kurva pertumbuhan bakteri dan berperan dalam pertumbuhan sel.

2. Produksi biomassa dalam berbagai konsentrasi gula pasir

Gula pasir sebagai sumber karbon merupakan bahan utama untuk mensintesis sel baru. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa variasi konsentrasi gula pasir (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l) dalam media kultivasi berpengaruh terhadap produksi biomassa oleh Isolat bakteri BD-16 (Gambar 8).

Data pengukuran berat kering sel memperlihatkan bahwa produksi biomassa terendah terdapat pada media kultivasi tanpa pemberian gula pasir (0 g/l) yaitu 2,56 g/l (Lampiran 5). Perbanyakan sel bakteri sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dalam media. Senyawa karbon pada umumnya merupakan salah satu nutrisi yang mudah digunakan untuk menghasilkan energi yang akan digunakan untuk proses biosintesis sel.

Media LB tanpa penambahan gula pasir hanya menyediakan tripton sebagai komponen yang akan digunakan untuk menghasilkan energi.



Gambar 8. Produksi biomassa dalam berbagai konsentrasi gula pasir

Menurut Winarno (1997) protein dapat digunakan sebagai sumber energi ketika sel kekurangan karbohidrat. Akan tetapi, protein sebelumnya harus dipecah berdasarkan asam amino pembentuknya. Asam amino-asam amino tersebut diubah oleh enzim sehingga gugus karboksil ($-\text{COOH}$) dari asam amino tersebut dapat menjadi asam piruvat, asetil KoA, atau masuk dalam siklus Krebs. Suksinil Co-A dan α -ketoglutarat merupakan senyawa intermediet dari siklus Krebs yang selanjutnya akan digunakan sebagai bahan baku dalam biosintesis ALA. Choorit *et al.*, (2011) menyatakan bahwa pertumbuhan sel akan mempengaruhi produksi ALA, karena selama sel bakteri tumbuh maka ALA akan dihasilkan.

Tidak tersedianya sumber karbon dalam media LB menyebabkan bakteri hanya menghasilkan energi dari proses pemecahan protein. Oleh karena itu, media tanpa pemberian gula pasir menghasilkan biomassa

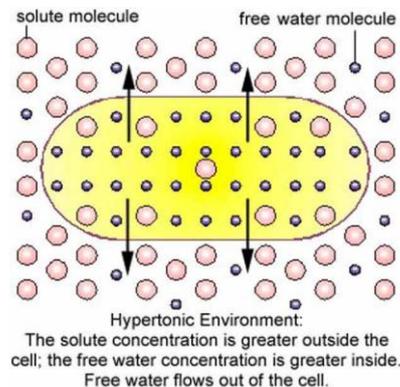
terendah. Banyak sedikitnya energi yang dimiliki oleh bakteri akan mempengaruhi jumlah sel yang dihasilkan pada proses pembelahan.

Produksi biomassa tertinggi terdapat pada media kultivasi dengan pemberian 50 g/l gula pasir yaitu 6,29 g/l (Lampiran 5). Gula pasir dalam konsentrasi 50 g/l dapat digunakan secara maksimal oleh isolat bakteri BD-16, sehingga pertumbuhan sel pesat dan menghasilkan biomassa yang banyak jika dibandingkan dengan konsentrasi gula pasir lain. Media dengan penambahan gula pasir, menghasilkan biomassa yang lebih tinggi dibandingkan dengan media tanpa pemberian gula pasir. Hal ini disebabkan karena gula pasir mengandung sukrosa yang dibentuk dari monomer-monomer glukosa dan fruktosa. Pemecahan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa akan menghasilkan ATP yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. Glukosa dan fruktosa selanjutnya akan masuk jalur respirasi yang akan menghasilkan banyak energi sehingga pertumbuhan sel menjadi pesat dan menghasilkan biomassa yang banyak.

Sementara itu, penurunan produksi biomassa terjadi pada media kultivasi dengan pemberian gula pasir diatas 50 g/l yaitu 6,04 g/l (untuk pemberian 60 g/l gula pasir), 5,45 g/l (untuk pemberian 70 g/l gula pasir) dan 5,09 g/l (untuk pemberian 80 g/l gula pasir). Pemberian gula pasir diatas 50 g/l diduga menyebabkan media kultivasi dalam kondisi yang pekat (hipertonik).

Oleh karena konsentrasi zat terlarut lebih tinggi (tekanan osmotik yang lebih tinggi) dari pada yang lain maka air bergerak ke luar sel

(Gambar 9). Jika proses ini terus menerus terjadi maka sitoplasma akan mempunyai konsentrasi air yang sedikit sehingga sel tidak berfungsi lagi.



Gambar 9. Proses osmosis pada bakteri dalam kondisi hipertonik

Hal ini sesuai dengan penelitian Rodrigues *et al.*, (2006) yang menyatakan bahwa konsentrasi gula pasir yang melebihi 50 g/l pada media kultivasi akan menurunkan pertumbuhan bakteri karena terjadi dehidrasi sel. Bila dehidrasi terus berlangsung, maka sel-sel bakteri akan mengkerut dan mengalami gangguan fungsi.

Menurut Young (2010) gula pasir merupakan sumber karbon yang akan dirombak dan digunakan untuk membangun massa sel. Pirt (1975) menyatakan bahwa gula pasir yang berfungsi sebagai substrat merupakan salah satu faktor penghambat pertumbuhan bila keberadaannya berlebih.

Data produksi biomassa yang telah diperoleh kemudian dilanjutkan dengan pengujian hipotesis melalui ANAVA satu arah (Lampiran 5). Uji hipotesis melalui anava satu arah digunakan untuk mengetahui apakah pemberian berbagai konsentrasi gula pasir pada media kultivasi berpengaruh secara signifikan terhadap produksi biomassa yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.

Berdasarkan uji ANAVA satu arah dapat diketahui bahwa pemberian berbagai konsentrasi gula pasir pada media kultivasi berpengaruh terhadap produksi biomassa yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16. Hal ini dapat dilihat dari nilai $F_{Hitung} > F_{Tabel}$ yaitu $72,9029 > 2,51$ pada level 5%.

Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5% (Tabel 4) dilakukan untuk mengetahui perbedaan perlakuan (konsentrasi gula pasir) terhadap produksi biomassa yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16. Perhitungan selengkapnya pada Lampiran 5.

Tabel 4. Hasil Uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) 5% pada produksi biomassa yang dihasilkan isolat bakteri BD-16

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	Berat Kering Sel (g/l)
0	2,56 ^a
10	3,81 ^b
20	4,52 ^c
30	5,05 ^d
40	5,53 ^e
50	6,29 ^f
60	6,04 ^f
70	5,45 ^{de}
80	5,09 ^d

Berdasarkan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5%, pemberian gula pasir sebanyak 50 g/l dan 60 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang sama yaitu "f", yang artinya kedua perlakuan tidak berbeda nyata. Namun kedua perlakuan tersebut berbeda nyata terhadap perlakuan lain (0, 10, 20, 30, 40, 70, 80 g/l). Pemberian gula pasir sebanyak 0 g/l, 10 g/l dan 20 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang berbeda, yang berarti ketiga perlakuan tersebut berbeda nyata.

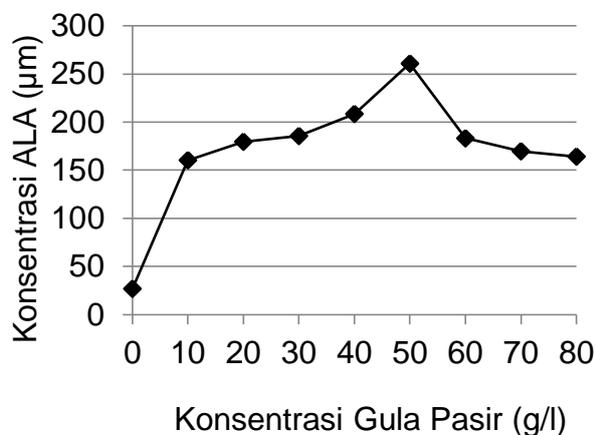
Produksi biomassa tertinggi diantara ketiga perlakuan (0 g/l, 10 g/l dan 20 g/l), terdapat pada media kultivasi dengan pemberian 20 g/l gula pasir, yaitu sebesar 4,52 g/l. Sedangkan produksi ALA terendah terdapat pada media kultivasi tanpa pemberian gula pasir (0 g/l) yaitu sebesar 2,56 g/l. Dengan demikian, ketersediaan gula pasir pada media kultivasi memiliki pengaruh yang nyata terhadap produksi biomassa yang dihasilkan isolat bakteri BD-16.

Pemberian gula pasir 30 g/l dan 40 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang sama yaitu "d", yang artinya tidak berbeda nyata. Pemberian gula pasir sebanyak 30 g/l, 20 g/l, 60 g/l dan 70 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang sama yaitu "d", yang artinya keempat perlakuan tidak berbeda nyata. Pemberian gula pasir sebanyak 40 g/l dan 70 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang sama yaitu "e", yang artinya kedua perlakuan tidak berbeda nyata. Pengertian tidak berbeda nyata pada perlakuan yang diujikan memiliki arti bahwa rata-rata produksi ALA antar tiap perlakuan memiliki selisih yang dekat. Berdasarkan hasil pengukuran, dengan demikian dapat diketahui bahwa konsentrasi gula pasir memberikan pengaruh yang nyata terhadap rata-rata produksi biomassa yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.

3. Produksi ALA dalam berbagai konsentrasi gula pasir

Gula pasir sebagai sumber karbon merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi produksi ALA. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa variasi konsentrasi gula pasir (0, 10, 20, 30, 40,

50, 60, 70 dan 80 g/l) dalam media kultivasi berpengaruh terhadap produksi ALA oleh Isolat bakteri BD-16 (Gambar 8).



Gambar 10. Produksi ALA dalam berbagai konsentrasi gula

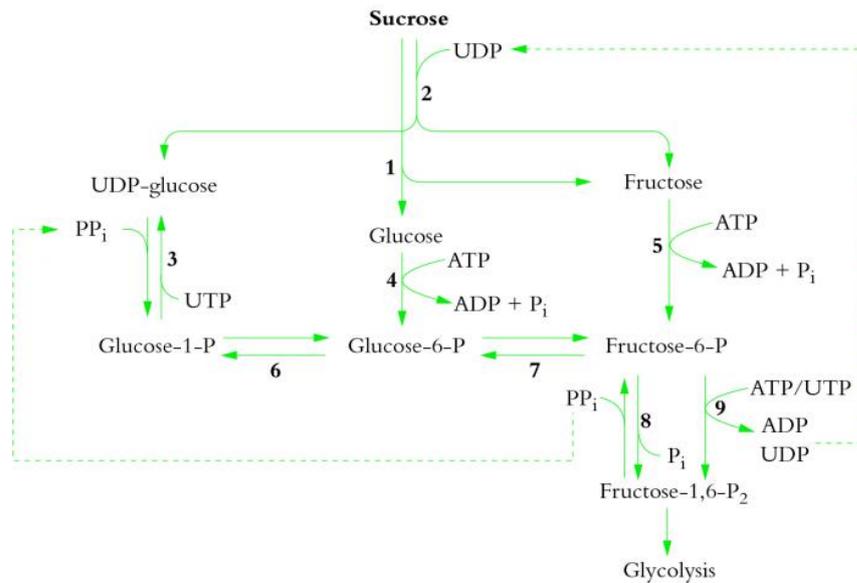
Berdasarkan gambar diatas, produksi ALA terendah terdapat pada media kultivasi tanpa pemberian gula pasir (0 g/l). Konsentrasi ALA yang dihasilkan pada media tanpa pemberian gula pasir yaitu sebesar 26,99 μM (Lampiran 5). Hal ini menunjukkan bahwa ALA tetap diproduksi oleh isolat bakteri BD-16 meskipun dalam konsentrasi yang rendah. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa pertumbuhan bakteri akan mempengaruhi produksi ALA sehingga media kultivasi tanpa pemberian gula pasir menghasilkan biomassa dan konsentrasi ALA terendah.

Produksi ALA tertinggi yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16 terdapat pada media kultivasi dengan pemberian 50 g/l gula pasir. Konsentrasi ALA pada media dengan pemberian 50 g/l gula pasir adalah 260,79 μM . Media dengan penambahan gula pasir menghasilkan ALA yang lebih tinggi dibandingkan media tanpa pemberian gula pasir karena pada media dengan penambahan gula pasir, suksinil Co-A dan

α -ketoglutarat tidak hanya dihasilkan melalui jalur pemecahan protein, tapi juga melalui jalur pemecahan karbon (jalur glikolisis).

Secara umum, bakteri mengangkut sukrosa (sebagai kandungan dominan di dalam gula pasir) dan karbohidrat lainnya ke dalam sel melalui protein transport membran spesifik, dan mengkatabolisasi mereka (Stanbury & Whitaker, 2003). Setelah sukrosa masuk ke dalam sel maka langkah pertama dalam jalur pemecahan sukrosa (Gambar 11) adalah pemutusan ikatan glikosidik dengan enzim invertase yaitu: sukrosa + H₂O → D-glukosa + D-fruktosa atau sukrosa sintase yaitu sukrosa + UDP (Uridine difosfat) → UDP-glukosa + D-fruktosa.

Menurut Purwoko (2007) dua molekul ATP yang diperlukan untuk metabolisme heksosa terbentuk dari pemecahan sukrosa menjadi D-glukosa + D-fruktosa dengan bantuan enzim invertase. Namun, ketika sukrosa pecah menjadi UDP-glukosa + D-fruktosa oleh enzim sukrosa sintase, bagian dari energi dalam ikatan glikosidik disimpan dalam pembentukan UDP-glukosa dan hanya satu molekul ATP yang diperlukan untuk metabolisme fruktosa. UDP-glukosa dapat dikonversi menjadi glukosa-1-P oleh UDP-glukosa pirofosforilase. Glukosa 1-P diubah menjadi glukosa-6-P, dan glukosa-6-P menjadi fruktosa-6-P, oleh fosfoglukomutase dan fosfoheksosa isomerase. Selanjutnya fruktosa-6-P diubah menjadi fruktosa-1,6-P oleh fosfofrukto fosfotransferase yang kemudian masuk ke dalam jalur glikolisis.



Keterangan Gambar:

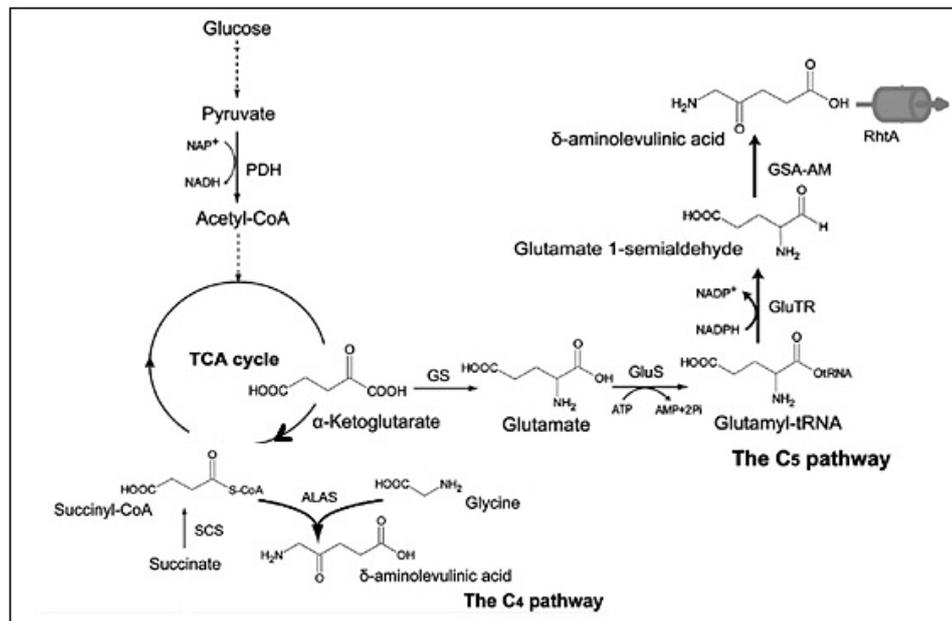
- 1) Invertase; 2) Sukrosa sintase; 3) UDP-glukosa pirofosforilase;
- 4) Heksokinase; 5) Fruktokinase; 6) fosfoglukomutase; Isomerase;
- 7) fosfoheksose; 8) fosfofrukto fosfotransferase; 9) fosfofruktokinase.

Gambar 11. Jalur pemecahan sukrosa pada bakteri.

Jalur glikolisis akan memecah glukosa menjadi asam piruvat, ATP dan NADH. Selanjutnya asam piruvat diubah menjadi asetil Co-A pada tahapan reaksi antara. Asetil masuk ke dalam siklus Krebs sedangkan Co-A keluar dari siklus tersebut. Suksinil Co-A dan α -ketoglutarat yang dihasilkan dalam siklus Krebs, selanjutnya akan dijadikan bahan utama dalam biosintesis ALA (Gambar 12).

Smith & Rogers (2008) menyatakan bahwa ALA dibentuk melalui dua jalur metabolisme yaitu jalur Shemin atau C4 dan Beale atau C5. Jalur C4 menggunakan suksinil-CoA dan glisin dengan bantuan enzim *5-aminolevulinic acid sintetase* (ALAS) untuk menghasilkan ALA. Sedangkan jalur C5 menggunakan asam α -ketoglutarat tanpa melibatkan

reaksi ALAS. Produksi ALA pada jalur C5 dipengaruhi oleh 3 enzim utama yaitu glutamil-tRNA^{glu} sintase, glutamil-tRNA^{glu} dehidrogenase dan glutamat 1-semialdehid aminotransferase (GSA) (Choi *et al.*, 2008).



Gambar 12. Jalur biosintesis ALA

Diperkirakan laju enzimatik ALAS (C4) atau Glutamil-tRNA^{glu} sintase glutamil-tRNA^{glu} dehidrogenase dan glutamat 1-semialdehid aminotransferase (C5) mencapai maksimum pada konsentrasi 50 g/l gula pasir. Laju enzimatik yang mencapai maksimum menyebabkan ALA dihasilkan dalam jumlah yang banyak. Media dengan pemberian 50 g/l gula pasir menghasilkan konsentrasi ALA tertinggi yaitu 260,79 μ M. Sedangkan pada konsentrasi gula pasir diatas 50 g/l, enzim ALAS atau Glutamil-tRNA^{glu} sintase, glutamil-tRNA^{glu} dehidrogenase dan glutamat 1-semialdehid aminotransferase (GSA) telah dalam kondisi “jenuh” oleh substrat. Oleh karena itu produksi ALA tidak lagi mengalami peningkatan. Berdasarkan pengukuran, produksi ALA mengalami

penurunan pada pemberian gula pasir 60 g/l (183,2 μ M), 70 g/l (169,76 μ M), dan 80 g/l (164,24 μ M).

Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Lehninger (1997) yang menyatakan kecepatan reaksi enzimatik dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Namun ketika laju enzimatik mencapai maksimum dan enzim telah dalam kondisi “jenuh” oleh substrat, peningkatan konsentrasi substrat tidak akan memberikan perbedaan dalam aktivitas enzim.

Selain itu, seperti yang telah dijelaskan, pemberian gula pasir diatas 50 g/l menyebabkan media kultivasi dalam kondisi yang pekat (hipertonik). Kondisi tersebut menyebabkan metabolisme sel mengalami gangguan. Diperkirakan produksi enzim yang berperan dalam sintesis ALA juga menjadi terhambat.

Data hasil pengukuran produksi ALA yang telah diperoleh, kemudian dilanjutkan pada uji hipotesis melalui ANAVA satu arah (Lampiran 6). Pengujian hipotesis dilakukan untuk mengetahui apakah pemberian berbagai konsentrasi gula pasir pada media kultivasi berpengaruh secara signifikan terhadap produksi ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.

Berdasarkan uji ANAVA satu arah (Lampiran 6) dapat diketahui bahwa pemberian berbagai konsentrasi gula pasir pada media kultivasi berpengaruh secara signifikan terhadap produksi ALA yang dihasilkan

oleh isolat bakteri BD-16. Hal ini dapat dilihat dari nilai $F_{\text{Hitung}} > F_{\text{Tabel}}$ yaitu $91,86 > 2,51$ pada level 5%. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 5.

Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5% dilakukan untuk mengetahui perbedaan pada tiap perlakuan terhadap parameter yang diukur (Tabel 5). Perhitungan selengkapnya pada Lampiran 6.

Tabel 5. Hasil Uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) 5% pada produksi ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16.

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	Produksi ALA (μM)
0	26,99 ^a
10	160,45 ^b
20	179,64 ^{bcd}
30	185,60 ^d
40	208,50 ^e
50	260,79 ^f
60	183,20 ^{cd}
70	169,76 ^{bcd}
80	164,24 ^{bc}

Berdasarkan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5%, pemberian gula pasir sebanyak 0 g/l, 40 g/l dan 50 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang berbeda, yang berarti ketiga perlakuan tersebut berbeda nyata. Konsentrasi ALA tertinggi di antara ketiga perlakuan (0 g/l, 40 g/l dan 50 g/l), terdapat pada media kultivasi dengan pemberian 50 g/l gula pasir, yaitu sebesar 260,79 μM . Konsentrasi ALA terendah terdapat pada media kultivasi tanpa pemberian gula pasir (0 g/l) yaitu sebesar 26,99 μM .

Pemberian gula pasir sebanyak 10 g/l, 20 g/l, 70 g/l dan 80 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang sama yaitu “b”, yang artinya tidak

berbeda nyata. Pemberian gula pasir sebanyak 20 g/l, 60 g/l, 70 g/l dan 80 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang sama yaitu "c", yang artinya tidak berbeda nyata. Pemberian gula pasir sebanyak 30 g/l, 20 g/l, 60 g/l dan 70 g/l pada media kultivasi diikuti oleh huruf yang sama yaitu "d", yang artinya tidak berbeda nyata. Pengertian tidak berbeda nyata pada perlakuan yang diujikan memiliki arti bahwa rata-rata produksi ALA antar perlakuan memiliki selisih yang dekat. Namun, dari keseluruhan data yang didapatkan, konsentrasi gula pasir berpengaruh nyata terhadap produksi ALA yang dihasilkan isolat bakteri BD-16.

Berdasarkan hasil penelitian ini, produksi biomassa dan ALA yang dihasilkan oleh isolat bakteri BD-16 memiliki korelasi positif, yaitu ketika produksi biomassa rendah maka produksi ALA yang dihasilkan pun rendah, demikian pula sebaliknya. Pertumbuhan sel yang terhambat akan menyebabkan gangguan dalam metabolisme sel. Ketika metabolisme sel terganggu maka produksi ALA yang dihasilkan juga rendah. Menurut Shoji *et al.*, (2010) pertumbuhan sel yang optimal akan menguntungkan metabolisme sel bakteri, sehingga produksi ALA yang dihasilkan pun tinggi.

BAB V

KESIMPULAN, IMPLIKASI DAN SARAN

A. Kesimpulan

Isolat bakteri BD-16 mampu tumbuh dan menghasilkan ALA pada media kultivasi dengan pemberian gula pasir. Konsentrasi gula pasir dalam media kultivasi berpengaruh terhadap produksi biomassa dan ALA yang dihasilkan. Produksi ALA tertinggi (260,79 μM) terdapat pada media dengan pemberian 50 g/l gula pasir. Produksi biomassa tertinggi (6,29 g/l) terdapat pada media dengan pemberian 50 g/l gula pasir.

B. Implikasi

Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa konsentrasi gula pasir dalam media kultivasi sangat berpengaruh terhadap produksi biomassa dan ALA dari isolat bakteri BD-16. Gula pasir dengan demikian dapat digunakan sebagai sumber karbon alternatif ALA untuk isolat bakteri BD-16.

C. Saran

Perlu dilakukan uji lanjutan mengenai kemampuan fisiologis bakteri dan aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis ALA agar data dapat lebih dikembangkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A & Fozia, N. (2011). Isolation, cultivation, purification and identification of bacterial species from microfauna of soil. *Italian journal of public health*.
- Aronsen, H. B. (1960). Studies on urinary excretion of deltaamino-levulinic acid and other haem precursors in lead workers and lead intoxicated rabbits. *Scand. J. Gun. Lab. Invest., Suppi.* 12, (47).
- Bhowmick, R. & Girotti, A. W. (2010). *Cytoprotective induction of nitric oxide synthase in a cellular model of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy*. *Free Radic Biol Med.* 48:1296–301.
- Cahyati, A. (2009). Optimasi Media Sumber Karbon dan Nitrogen pada Produksi Bahan Aktif Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Chaikritsadakarn, A., Prasertsan, P & Boonsawang, P. (2004). Production of 5-Aminolevulinic Acid from Monosodium Glutamate Effluent by Halotolerant Photosynthetic Bacterium (*Rhodobacter capsulatus* SS3). The Joint International Conference on “Sustainable Energy and Environment (SEE)”. Hua Hin, Thailand.
- Choi, C., Hong, B. S., Sung, H. Y., Lee, H. S., & Kim, J. H. (2008). Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biotechnol. Lett.* 21, 551–554.
- Choorit, W., Saikur, A., Chodok, P., Prasertsan, P & Kantachote. D. (2011). Production of biomass and extracellular 5 aminolevulinic acid by *Rhodopseudomonas palustris* KG31 under light and dark conditions using volatile fatty acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 111, (6), 658–664.
- Dwidjoseputro, D. (1994). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta
- Francis, S.J. (2000). *Willey Encyclopedia of Food Science and Tech.*, Jhow Willey and Sons. Inch., USA, vol. 4, 2559.
- Gaman, P.M & K.B. Sherrington. (2004). *Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi*. Universitas Gadjah Mada press. Yogyakarta.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A & Krieg, N. R. (1994). *Methods for General and Moleclular Bacteriology*. ASM Press, Washington, D. C.

- Haedersdal, M., Sakamoto, F. H., Farinelli, W. A., Doukas, A. G., Tam, J. & Anderson (2014). RR. *Pretreatment with ablative fractional laser changes kinetics and biodistribution of topical 5-aminolevulinic acid (ALA) and methyl aminolevulinate (MAL)*. *Lasers Surg Med.* 46, (6), 462-9.
- Hardi, M. Yusuf. (2002). *Produksi Asam 5-aminolevulinat oleh Pseudomonas denitrificans*. [Tesis]. Universitas Andalas Padang.
- Hotta, Y., Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y. & Konnai, M. (1997). *New physiological effect of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis chlorophyll and plant growth*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 2025-2028.
- Jutono, J., Soedarsono, S., Hartadi, S., Kabirun, S., Suhadi & D., Soesanto. (2009). *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Jordan, P.M. (2003). *Biosynthesis of 5-Aminolevulinic acid and its transformation into coproporphyrinogen in animals and bacteria*. *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. McGraw-Hill. 55-151.
- Kabinawa. (1983). *Spirulina Penggempur Aneka Penyakit*. PT Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Kang Z, Wang Y, Wang Q, Qi QS. (2011). *Metabolic engineering to improve 5-aminolevulinic acid production*. *Bioeng Bugs.* 2, 342–5.
- Kang, Z., Zhang, J., Zhou, J., Qi, Q., Du, G. & Chen, J. (2012). *Recent Advances in Microbial Production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B12*. *Biotech adv.* 30, 1533-42.
- Lehninger. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Jakarta : Erlangga.
- Lin, D., Nishio, H. & Nagai, S. (2009). *Production of 5-aminolevulinic acid by methanogen*. *J. Ferment. Bioeng.* 68 : 88-91.
- Michele, F. G. & Jenny, C. M. (2012). *Aminolevulinic acid synthetase of Rhodopseudomonas spheroids*. *J. Biochem.* 40, 13–18.
- Mikolajewska, P., Donnelly, R. F., Garland, M. J., Morrow, D. I., Singh, T. R., Iani, V., Moan, J. & Juzeniene, A. (2010). *Microneedle pretreatment of human skin improves 5-aminolevulinic acid (ALA) and 5 aminolevulinic acid methyl ester (MAL)-induced PpIX production for topical photodynamic therapy without increase in pain or erythema*. *Pharm Res.* 27, (10), 2213-20.

- Middlebeek, E. J., R.O. Jenkins & J.S. Drijver-de Haas. (1992). Growth in batch culture. In *Vitro Cultivation of Micro-organisms. Biotechnology by Open Learning*.
- Monika, K. & Klemme, J. H. (2009). Inhibition of Bacteriochlorophyll Biosynthesis by Gabaculin (3-Amino, 2,3-dihydrobenzoic Acid) and Presence of an Enzyme of the C5-Pathway of 5-Aminolevulinate Synthesis in *Chloroflexus aurantiacus*. 44, 77–80.
- Moser, J., Schubert, W., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. & Heinz, d. (2004). *V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis*. EMBO J;20:6583–90.
- Nainggolan, M. (1965). *Experimental Design*. Universitas Sumatera Utara.
- Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyashr, N. & Murooka, Y. (1999). *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark condition. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 798-804.
- Nishikawa, S & Murooka, Y. (2001). 5-Aminolevulinic Acid Production By Fermentation And Agricultural And Biomedical Application. *Bioengineering and Genetic Engineering Reviews*. 18.
- Pelczar, M. J. & E. C. S. Chan. (1986). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.
- Pirt, S. J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific Publication. London.
- Pu, W., Chen, J., Sun, C., Chen, N., Sun, J., Zheng, P. & Ma, Y. (2013). Deficiency of Succinic Dehydrogenase or Succinyl CoA Synthetase Enhances the Production of 5-Aminolevulinic Acid in Recombinant *Escherichia coli*. *J Biotech.* 29(10): 1494-1503.
- Purwoko, T. (2007). *Fisiologi Mikroba*. Penerbit PT Bumi Aksara. Jakarta.
- Sakamoto FH, Izikson L, Tannous Z, Zurakowski D & Anderson RR. (2012). *Surgical scar remodelling after photodynamic therapy using aminolaevulinic acid or its methylester: a retrospective, blinded study of patients with field cancerization*. Br J Dermatol. 166, (2),413-6.
- Sambrook, J & D. W. Russell. (2001). *Molecular Cloning, a laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.

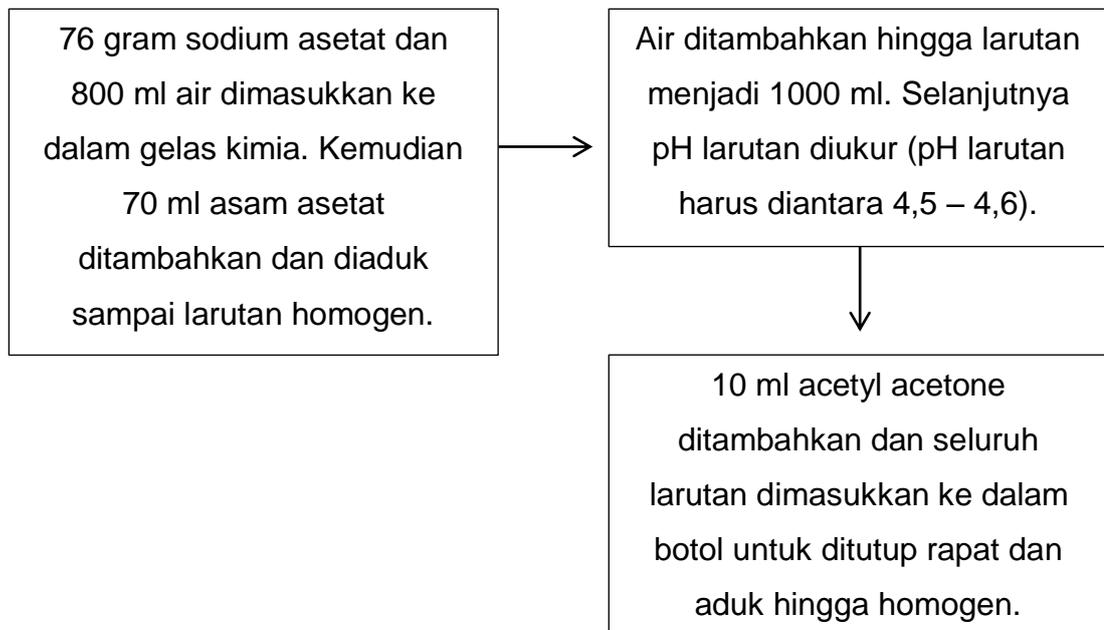
- Sandy, J. D., Davies, R. C. & Neuberger, A. (1985). Control of 5-aminolevulinic synthetase activity in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. A role of trisulphides. *Biochem. J.* 150, 245-257.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Nishizawa, Y & Hayashi, M. (1987). Production of 5 Aminolevulinic Acid by Photosynthetic Bacteria. *J. Ferment. Technol.* 65, 511-515.
- Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. & Hayashi, Y. (1990). Production of herbicide, 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine wastes from an anaerobic digester. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 727-731.
- Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. & Nagai, S. (1993). Effect of pH on the extracellular production of 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from volatile fatty acid. *Biotechnol Lett.* 15, 859-864.
- Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., Hotta, Y. & Nagai, S. (1995). 5-Aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark. *World. J. Microbial. Biotechnol.* 11, 361-362.
- Sasaki, K., Watanabe, M. & Nishio, N. (1997). Inhibition of 5 aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Lett.* 19, 421-424.
- Sasikala, C & Ramana, C. V. (2001). Influence of Precursors and Inhibitor on the Production of Extracellular 5-Aminolevulinic Acid and Biomass by *Rhodopseudomonas palustris* KG31. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 73, (5), 987-992.
- Sasikala, C., Ramana, CV & Rao, PR. (1994). 5-Aminolevulinic acid: a potential herbicide/insecticide from miroorganism. *Biotechnol Prog.* 10, (9).
- Sattayasamitsathit, S & Prasertsan, P. (2013). P. Characterization of a newly isolated *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 with self-flocculation property and optimization pathway for 5-aminolevulinic acid production. *African Journal of Biotechnology.* 12, (16), 2069-2081.
- Scragg, A. H. (1991). *Bioreactors in Biotechnology A Practical Approach.* Ellis Horwor. NewYork.
- Shoji, K. A., Nishio, N. & Nagai, S. (2010). Production of extracellular 5-aminolevulinic acid by *Clostridium thermoaceticum* grown in minimal medium. *Biotechnol.* 11, 567-572.

- Smith, A. J. & Rogers, L. J., Tetrapyrrole biosynthesis- the C5 pathway. (2008). *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*, eds. Rogers, L. J., and Gallon, J. R., Clarendon Press, Oxford. 69-96.
- Stanbury, P. F. & Whitaker. (2003). *Principle of Fermentation Technology*. Pergamon Press, Ltd., Oxford.
- Sukenda, Y. T., Trianggoro, D., Wahyuningrum & Rahman. (2007). Penggunaan kitosan untuk pengendalian infeksi *vibrio harveyi* pada udang putih *Litopenaeus vannamei*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 6 (2), 205-209.
- Tangprasittipap, A & Prasertsan, P. (2002). 5-aminolevulinic acid from photosynthetic bacteria and its applications. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 24, (4), 717-725.
- Rahman, A. (2007). *Teknologi Fermentasi*. Penerbit Arcan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Rodrigues, L., A. Moldes, Jos´e Teixeira & R. Oliveira. (2006). Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*. 28: 109–116.
- Ruth, S., Moisés S., Edgardo, G & Agustino, M. (2014). Regulatory switches for hierarchical use of carbon sources in *E. Coli*. *Network Biology*. 4, (30), 95-108.
- Tomokuni, K & Ogata, M. (1972). Simple Method for Determination of Urinary 5-Aminolevulinic Acid as an Index of Lead Exposure. *Clinical Chemistry*. 18, (12).
- Vandekar, M., & H.T Dulmage. (1982). Guidelines for Production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, Switzerland.
- Van der Werf, M. J & Zeikus J. G. (1996). 5-aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides* hemA gene. *Appl. Env. Microbiol.* 62, (10), 3560-3566.
- Waluyo L. (2008). *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.

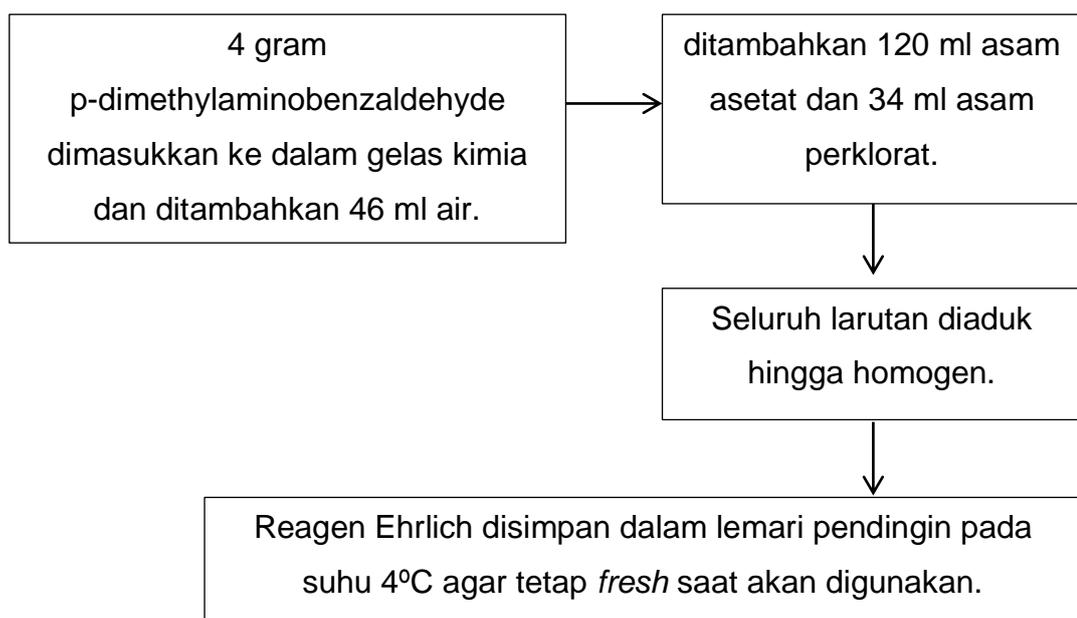
- Watanabe, K., Tanaka, T., Hotta, Y., Kuramochi, H & Taekuchi, Y. (2000). Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. *Plant Growth Regulation*. 32, 97-101.
- Winarno, F. G. (1997). *Kimia Pangan dan Gizi*. PT Gramedia Pustaka Umum. Yogyakarta.
- Young, M.M. (2010). The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. *Comprehensive Biotechnology*. 1: 189-213.
- Yuliana, N. (2008). Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 Yang berasal Dari Tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13, (2), 108-115.
- Yulianingsih. (2006). Analisa pengaruh gula tebu dan sukrosa terhadap karies gigi pada mencit. [Thesis]. PPS. Jakarta: Universitas Indonesia.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan bufer asetat



Lampiran 2. Pembuatan reagen Ehrlich



Lampiran 3. Pertumbuhan dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16

Biomassa (g/l) dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16 yang diukur setiap 6 jam selama 4 hari dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil pengukuran biomassa dan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16.

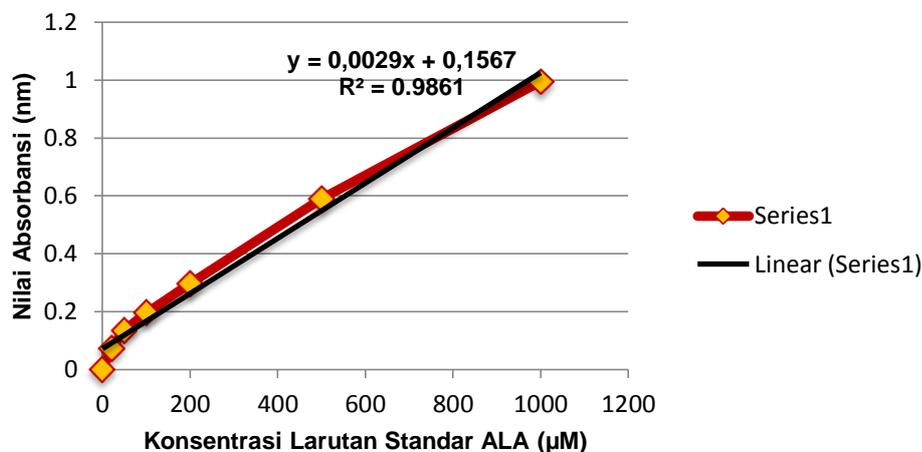
No	Waktu Pertumbuhan (Jam)	Biomassa (g/l)	Produksi ALA (μM)
1	6	0,50	1,83
2	12	0,66	9,76
3	18	1,02	20,10
4	24	1,76	33,21
5	30	2,52	75,62
6	36	3,40	101,82
7	42	4,61	115,96
8	48	5,45	141,48
9	54	5,71	132,86
10	60	5,80	134,58
11	66	5,86	131,83
12	72	5,95	127,00
13	78	5,98	119,41
14	84	6,04	111,83
15	90	6,10	115,62
16	96	6,20	114,24

Lampiran 4. Kurva standar ALA

Hasil pengukuran larutan standar ALA dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar 13.

Tabel 7. Hasil pengukuran konsentrasi larutan standar ALA (μM).

Konsentrasi Larutan Standar ALA (μM)	Nilai Absorbansi (nm)
0	0
20	0,073
50	0,136
100	0,196
200	0,296
500	0,590
1000	0,995



Gambar 13. Kurva standar persamaan regresi linier konsentrasi ALA

Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi larutan standar ALA (μM) didapatkan persamaan regresi linier yaitu: $y = 0,0029x + 0,1567$, Persamaan regresi linier ini selanjutnya digunakan untuk mengkonversikan data absorbansi (y) produksi ALA dalam nanometer menjadi *micromolar* (x) (Gambar 13).

Lampiran 5. Produksi biomassa oleh isolat bakteri BD-16

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	Ulangan			Jumlah	Rata-rata/ Produksi biomassa (g/l)
	1	2	3		
0	2,76	2,34	2,57	7,67	2,56
10	3,79	3,66	3,97	11,42	3,81
20	4,49	4,83	4,23	13,55	4,52
30	5,11	4,86	5,18	15,15	5,05
40	5,79	5,54	5,27	16,6	5,53
50	6,44	6,34	6,08	18,86	6,29
60	5,86	6,03	6,25	18,14	6,04
70	5,87	5,42	5,08	16,37	5,45
80	5,09	4,97	5,23	15,29	5,09
Jumlah	45,2	43,99	43,86	133,05	44,34

$$\begin{aligned}
1. \text{ Faktor koreksi} &= \frac{1}{txn}(\sum r)^2 = \frac{1}{27}(15,29)^2 = 8,66 \\
2. \text{ Jumlah kuadrat (JK)} & \\
\text{JK (Total)} &= \{(2,76)^2 + (3,79)^2 + \dots + (5,23)^2\} - FK \\
&= 33,51 \\
\text{JK (Perlakuan)} &= \frac{\{(45,2)^2 + (43,99)^2 + (43,86)^2\}}{3} \\
&= 32,51 \\
\text{JK (Error)} &= JKT - JKP \\
&= 33,51 - 32,51 \\
&= 1,00 \\
3. \text{ Derajat bebas (DB)} & \\
\text{DB (Total)} &= tn - 1 = 26 \\
\text{DB (Perlakuan)} &= t - 1 = 8 \\
\text{DB (Error)} &= 26 - 8 = 18 \\
4. \text{ Rata-rata jumlah kuadrat} & \\
\text{RJK (Perlakuan)} &= \frac{JKP}{DBP} = \frac{32,51}{8} \\
&= 4,06 \\
\text{RJK (Error)} &= \frac{JKE}{DBE} = \frac{1,00}{18} \\
&= 0,05 \\
5. F_{hitung} &= \frac{RJKP}{RJKE} = \frac{4,06}{0,05} \\
&= 72,90
\end{aligned}$$

Tabel 8. Perhitungan ANAVA satu arah produksi biomassa pada berbagai konsentrasi gula pasir yang dihasilkan isolat bakteri BD-16

Sumber Variansi	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel 5%
Perlakuan	8	32,51	4,06	72,90	2,51
Galat	18	1,00	0,05		
Total	26	33,51			

6. Kriteria Pengujian

Terima H_0 jika $X^2_{hitung} < X^2_{tabel}$

Tolak H_0 jika $X^2_{hitung} > X^2_{tabel}$

7. Kesimpulan

Karena $X^2_{hitung} > X^2_{tabel}$ yaitu $72,90 > 2,51$ (5%), maka tolak H_0 , artinya pemberian gula pasir pada media kultivasi berpengaruh sangat signifikan terhadap produksi biomassa oleh isolat bakteri BD-16.

Tabel 9. Uji Duncan produksi biomassa oleh isolat bakteri BD-16

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	0	10	80	70	20	60	30	40	50
0	a 0								
10	1,25*	b 0							
20	1,96*	0,71*	c 0						
30	2,49*	1,24*	0,53*	d 0					
80	2,53*	1,28*	0,57*	0,04 ^{tn}	0	e 0			
70	2,89*	1,64*	0,93*	0,4 ^{tn}	0,36 ^{tn}	0			
40	2,97*	1,72*	1,01*	0,48*	0,44*	0,08 ^{tn}	0	f 0	
60	3,48*	2,23*	1,52*	0,99*	0,95*	0,59*	0,51*	0	
50	3,73*	2,48*	1,77*	1,24*	1,2*	0,84*	0,76*	0,25 ^{tn}	0

Keterangan: tn = Berbeda tidak nyata
* = Berbeda nyata

Tabel 9.1. Produksi biomassa oleh isolat bakteri BD-16

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	Berat Kering sel (g/l)
0	2,56 ^a
10	3,81 ^b
20	4,52 ^c
30	5,05 ^d
40	5,53 ^e
50	6,29 ^f
60	6,04 ^f
70	5,45 ^{de}
80	5,09 ^d

Lampiran 6. Produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	Ulangan			Jumlah	Rata-rata/ Konsentrasi ALA (µm)
	1	2	3		
0	29,06	27,00	24,93	80,99	26,99
10	147,69	170,45	163,21	481,35	160,45
20	189,07	187,34	162,52	538,93	179,64
30	193,55	185,62	177,69	556,86	185,62
40	220,45	201,14	203,9	625,49	208,50
50	259,07	278,72	244,58	782,37	260,79
60	180,79	182,86	185,96	549,61	183,20
70	167,00	169,76	172,52	509,28	169,76
80	147,34	181,48	163,9	492,72	164,24
Jumlah	1534,02	1584,37	1499,21	4617,6	1539,19
Rata-rata	170,45	176,04	166,58	513,07	171,02

- Faktor koreksi = $\frac{1}{txn}(\sum r)^2 = \frac{1}{27}(4617,6)^2 = 789712,21$
- Jumlah kuadrat (JK)
 - JK (Total) = $\{(29,06)^2 + (147,69)^2 + \dots + (163,9)^2\} - FK$
= 94666,43
 - JK (Perlakuan) = $\frac{\{(1534,02)^2 + (1584,37)^2 + (1499,21)^2\}}{3}$
= 92403,33

$$\begin{aligned}
 \text{JK (Error)} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\
 &= 94666,43 - 92403,33 \\
 &= 2263,10
 \end{aligned}$$

3. Derajat bebas (DB)

$$\begin{aligned}
 \text{DB (Total)} &= \text{tn} - 1 = 26 \\
 \text{DB (Perlakuan)} &= \text{t} - 1 = 8 \\
 \text{DB (Error)} &= 26 - 8 = 18
 \end{aligned}$$

4. Rata-rata jumlah kuadrat

$$\begin{aligned}
 \text{RJK (Perlakuan)} &= \frac{\text{JKP}}{\text{DBP}} = \frac{92403,33}{8} \\
 &= 11550,41
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{RJK (Error)} &= \frac{\text{JKE}}{\text{DBE}} = \frac{2263,10}{18} \\
 &= 125,73
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 5. F_{\text{hitung}} &= \frac{\text{RJKP}}{\text{RJKE}} = \frac{11550,41}{125,73} \\
 &= 91,86
 \end{aligned}$$

Tabel 10. Perhitungan ANAVA satu arah produksi ala pada berbagai konsentrasi gula pasir yang dihasilkan isolat bakteri BD-16

Sumber Variansi	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel 5%
Perlakuan	8	92403,33	11550,41	91,86	2,51
Galat	18	2263,10	125,73		
Total	26	94666,43			

6. Kriteria Pengujian

Terima H_0 jika $X^2_{\text{hitung}} < X^2_{\text{tabel}}$

Tolak H_0 jika $X^2_{\text{hitung}} > X^2_{\text{tabel}}$

7. Kesimpulan

Karena $X^2_{hitung} > X^2_{tabel}$ yaitu $91,86 > 2,51$ (5%), maka tolak H_0 , artinya pemberian gula pasir pada media kultivasi berpengaruh sangat signifikan terhadap produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16.

Tabel 11. Uji Duncan Produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	0	10	80	70	20	60	30	40	50
0	a 0	b	c	d					
10	133,46*	0							
80	137,25*	3,79 ^{tn}	0						
70	142,77*	9,31 ^{tn}	5,52 ^{tn}	0					
20	152,65*	19,19 ^{tn}	15,4 ^{tn}	9,88 ^{tn}	0				
60	156,21*	22,75*	18,96 ^{tn}	13,44 ^{tn}	3,56 ^{tn}	0			
30	158,63*	25,17*	21,38*	15,86 ^{tn}	5,98 ^{tn}	2,42 ^{tn}	0	e	
40	181,51*	48,05*	44,26*	38,74*	28,86*	25,3*	22,88*	0	f
50	233,8*	100,34*	96,55*	91,03*	81,15*	77,59*	75,17*	52,29*	0

Keterangan: tn = Berbeda tidak nyata
* = Berbeda nyata

Tabel 11.1. Uji Duncan produksi ALA oleh isolat bakteri BD-16

Konsentrasi Gula Pasir (g/l)	Produksi ALA (μm)
0	26,99 ^a
10	160,45 ^b
20	179,64 ^{bcd}
30	185,62 ^d
40	208,5 ^e
50	260,79 ^f
60	183,2 ^{cd}
70	169,76 ^{bcd}
80	164,24 ^{bc}

Lampiran 7. Pengujian gula pasir

Fakultas Teknologi Pertanian
Program Studi Teknologi Pangan
 Jl. Pawiyatan Luhur IV/1 Bendan Duwur Semarang 50234
 Telp. (024) 8441555 (hunting) Fax. (024) 8415429 - 8445265
 e-mail: unika@unika.ac.id http://www.unika.ac.id

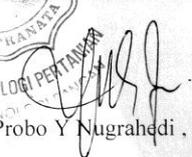


Laporan Hasil Analisa

1. Asal Sampel : Sheilla (Universitas Negeri Jakarta)
2. Jenis Sampel : Gula Pasir
3. Kode Sampel : Gula Pasir Serpong Tangerang
4. Parameter : Kadar gula dan kadar abu
5. Tanggal Penerimaan : 11 Mei 2015
6. Keadaan sampel : Dalam plastik tertutup rapat
7. Hasil Pengujian :

No	Kode	Brix %	Abu %
1	Gula Pasir Serpong Tangerang	94,00	0,082

Semarang, 25 Juni 2015
 Ka. Balai Penelitian Mutu dan Keamanan Pangan



Dr. Probo Y Nugrahedi, STP, MSc



Surat Izin Penelitian



BADAN PENGKAJIAN DAN PENERAPAN TEKNOLOGI

Gedung LAPTIAB No. 610
Telepon (021) 7560729, 7560723 ext. 106, Fax. (012) 7560694
PUSPIPTEK Serpong, 15314

Nomor : B-38 /PTB/TAB/02/2015
Hal : Persetujuan Penelitian

Jakarta, 4 Februari 2015

Kepada Yth.
Dr. Muktiningsih, M.Si
Pembantu Dekan I
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Jakarta
Di
Tempat

Dengan hormat,

Sehubungan dengan surat Saudara No 82/6.FMIPA/DT/2015 tertanggal 21 Januari 2015 dan No 150/6.FMIPA/DT/2015 tertanggal 2 Februari 2015 tentang permohonan ijin melaksanakan penelitian, bersama ini kami sampaikan bahwa pada prinsipnya kami dapat menyetujui permohonan Saudara bagi mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta yang bernama :

No	Nama	NPM	Judul Penelitian	Pembimbing
1	Rizal Yoga Saputra	3425111420	Pengaruh konsentrasi inhibitor Asam Levulinat (LA) terhadap produksi Asam Amino Levulinat (ALA) oleh isolat bakteri BK-3	1. Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed 2. Diana Nurani, M.Si
2	Mega Ginarsih	3425111425	Pengaruh pemberian glisin dan glutamat sebagai prekursor terhadap produksi Asam 5-Aminolevulinat (ALA) oleh isolat bakteri BK-6	1. Dra. Yoswita Rustam, M.Si 2. Diana Nurani, M.Si
3	Sheilla Angelina	3425111408	Pengaruh pemberian berbagai konsentrasi gula pasir sebagai sumber karbon terhadap produksi biomassa dan Asam 5-Aminolevulinat (ALA) ekstrak oleh isolat bakteri BD-16	1. Dra. Tri Handayani Kurniati, M.Si 2. Diana Nurani, M.Si

Untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium Pusat Teknologi Bioindustri - BPPT Puspiptek, Serpong dengan ketentuan sebagai berikut :

1. HAKI hasil penelitian tersebut menjadi milik BPP Teknologi
2. Mengikuti aturan dan SOP yang berlaku.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih

Direktur Pusat Teknologi Bioindustri



Ir. Priyo Atmaji, M.Eng. Ir.
NIP. 19620101 198803 1 001

Tembusan :

1. Kepala Lab. Tekn. Bioindustri
2. Ka.Bid. Teknologi Produksi Agrokimia
3. Ka. Pengelola LAPTIAB

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Sheilla Angelina

No. Registrasi : 3425111408

Jurusan : Biologi

Program studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "**PENGARUH PEMBERIAN BERBAGAI KONSENTRASI GULA PASIR TERHADAP PRODUKSI BIOMASSA DAN ASAM 5-AMINOLEVULINAT (ALA) OLEH ISOLAT BAKTERI BD-16**" adalah:

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian pada bulan April – Juni 2015.
2. Bukan merupakan duplikasi skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan ini tidak benar.

Jakarta, 10 Juli 2015

Yang membuat pernyataan

Sheilla Angelina

RIWAYAT HIDUP



SHEILLA ANGELINA. Dilahirkan di Jakarta pada tanggal 27 Agustus 1993. Anak kedua dari dua bersaudara pasangan Bapak Rambat dan Ibu Kristina, pernah menempuh pendidikan di SD Negeri 10 Jakarta (1999-2005), SMP Negeri 52 Jakarta (2005-2008), dan SMA Santo Antonius Jakarta (2008-2011).

Pada tahun 2011 melanjutkan pendidikan di Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Penulis mendapatkan beasiswa Nagao Natural Environment Foundation pada semester 097-102. Selama perkuliahan pernah mengikuti rangkaian kegiatan seperti Cakrawala Biologi (2011) di Gunung Bunder, Studi Ilmiah Biologi (2013) dan Kuliah Kerja Lapangan (2014) di Pangandaran.

Pada tahun 2014 berkesempatan melakukan Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro Dan Biomedika, BPPT, PUSPIPTEK, Serpong. Penelitian yang dilakukan berjudul **“Produksi 5-Aminolevulinic Acid (ALA) Pada Isolat BK-3, BK-6 Dan BD-16 Dengan Penambahan Inhibitor Levulinic Acid”**. Pada tahun 2015 berkesempatan melakukan penelitian skripsi di Laboratorium

Pengembangan Teknologi Industri Agro Dan Biomedika, BPPT, PUSPIPTEK, Serpong dengan judul **“Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Gula Pasir Terhadap Produksi Biomassa Dan Asam 5-Aminolevulinat (ALA) Oleh Isolat Bakteri BD-16”**.