

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



BERITA BIOLOGI

Vol. 16 No. 3 Desember 2017

**Terakreditasi Berdasarkan Keputusan Kepala Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
No. 636/AU3/P2MI-LIPI/07/2015**

Tim Redaksi (*Editorial Team*)

Andria Agusta (Pemimpin Redaksi, *Editor in Chief*)
(Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Kusumadewi Sri Yulita (Redaksi Pelaksana, *Managing Editor*)
(Sistematika Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Gono Semiadi
(Taksonomi Mamalia, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Atit Kanti
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Siti Sundari
(Ekologi Lingkungan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Evi Triana
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Kartika Dewi
(Taksonomi Nematoda, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dwi Setyo Rini
(Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Desain dan Layout (*Design and Layout*)

Muhamad Ruslan, Fahmi

Kesekretariatan (*Secretary*)

Nira Ariasari, Enok, Budiarjo, Liana

Alamat (*Address*)

Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)
Jalan Raya Jakarta-Bogor KM 46,
Cibinong 16911, Bogor-Indonesia
Telepon (021) 8765066 - 8765067
Faksimili (021) 8765059
Email: berita.biologi@mail.lipi.go.id
jurnalberitabiologi@yahoo.co.id
jurnalberitabiologi@gmail.com

Keterangan foto cover depan: Jenis Begonia liar di kawasan hutan sisa Kebun Raya Cibodas. (A) *B. cucullata*, (B) *B. isoptera*, (C) *B. robusta*, (D) *B. longifolia*, (E) *B. multangula variasi 1*, (F) *B. multangula variasi 2*. (*The wild Begonia in remnant forest of Cibodas Botanic Gardens*), sesuai dengan halaman 235. (as in page 235)



P-ISSN 0126-1754

E-ISSN 2337-8751

636/AU3/P2MI-LIPI/07/2015

Volume 16 Nomor 3, Desember 2017

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

Berita Biologi	Vol. 16	No. 3	Hlm. 219 – 330	Bogor, Desember 2017	ISSN 0126-1754
----------------	---------	-------	----------------	----------------------	----------------

Ucapan terima kasih kepada
Mitra Bebestari nomor ini
16(3) – Desember 2017

Dr. Rugayah, M.Sc.
(Taksonomi Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Dono Wahyuno
(Mikologi-Fitopatologi, Balitetro - Badan Litbang Pertanian)

Dr. Fikarwin Zuska
(Ekologi, FISIP - Universitas Sumatera Utara)

Dr. Rudhy Gustiano
(Pemuliaan dan Genetika ikan, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan)

Dr. Siti Sundari, M.Si.
(Ekologi Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Himmah Rustami, M.Sc.
(Taksonomi Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Drs. Muhammad Mansur, M.Sc.
(Ekologi Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Prof. Dr. Ir. Yohanes Purwanto
(Etnobotani, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Prof. Dr. I Made Sudiana, M.Sc.
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Ika Roostika Tambunan, SP. MSi.
(Bioteknologi Tanaman, BB Biogen - Badan Litbang Pertanian)

Prof. Ir. Moh. Cholil Mahfud, PhD
(Ilmu Penyakit Tumbuhan, BPTP Jawa Timur - Badan Litbang Pertanian)

Dra. Hartutiningsih M. Siregar
(Fisiologi Tumbuhan, Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor - LIPI)

Evi Triana, S.Si., M.Kes.
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Annisa Satyanti S.Hut., M.Sc.
(Ekologi dan Evolusi, Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor - LIPI)

KERAGAMAN BAKTERI PENGHASIL ENZIM PENGHIDROLISIS NITRIL DI PULAU ENGGANO BENGKULU

[Diversity of Nitrilase Producing Bacteria in Enggano Island, Bengkulu]

Rini Riffiani[✉] dan Nunik Sulistinah
Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong
email : riniriffiani@gmail.com

ABSTRACT

Potential nitrile degrading microbes have been isolated from marine sponge, marine water and soil in Enggano Island. Nitrilase enzyme has a function in degrading nitrile compound. Nitrilases are important industrial enzymes because of their ability to produce biologically active to degrade enantiomers, such as S-(+)-1-(4'-isobutylphenyl) propionic acid (S-(+)-ibuprofen) and R-(+) mandelic acid. Mandelic acids, which are important as pharmaceutical intermediates, can be produced in enantiomerically pure form by the hydrolysis of their corresponding nitrile. The aim of the study was to explore the diversity of nitrile degrading bacteria in Enggano Island, and their ability to utilize nitrile as a substrate growth. Screening of such microbes were carried out by using *microtitter plate* method based on growth ability tested by INT (Iodonitrotetrazoliumchloride). Degradation product was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Seventy nine bacteria were able to grow on acetamide, acetonitrile, benzonitrile, adiponitrile, mandelonitrile, succinonitrile, lactonitrile, and benzilcyanide as the sole source of carbon and nitrogen. Two isolates, YIM 56238 and PO69, have shown to enantioselectively hydrolyze racemic mandelonitrile to mandelic acid. Based on 16S rRNA gene identification, these bacteria have the highest sequence similarity to *Micrococcus endophyticus* strain YIM 56238 and *Rhodococcus pyridinivorans* strain PO69.

Key words: nitrile, sponge, marine bacteria, microtitter plate, nitrile-degrading enzymes, (R)-(+)mandelic acid

ABSTRAK

Beberapa mikroba potensial pendegradasi senyawa nitril telah diisolasi dari berbagai sumber, yaitu *sponge* laut, air laut, dan tanah di Pulau Enggano. Enzim yang terlibat dalam degradasi senyawa nitril yaitu enzim nitrilase. Enzim nitrilase merupakan Nitrilases adalah enzim yang penting dalam industri karena kemampuan menghasilkan enantiomer biologis aktif, seperti S - (+) - 1- (4'-isobutilfenil) propionat (S - (+) - ibuprofen) dan R - (-) mandelic acid. Asam mandelic merupakan produk farmasi dalam bentuk intermediet, dapat diproduksi dalam bentuk enantiomer murni oleh hidrolisis senyawa nitril. Tujuan dari kegiatan penelitian ini mengetahui keragaman bakteri di Enggano, terutama bakteri pendegradasi nitril dan mempelajari potensinya dalam menggunakan senyawa nitril sebagai substrat pertumbuhannya. Penapisan mikroba berpotensi dalam mendegradasi senyawa nitril (RCN) dilakukan menggunakan metode *microtitter plate*, berdasarkan kemampuan tumbuh yang diuji dengan INT (Iodo nitrotetrazoliumchloride). Produk degradasi di analisa menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Pengujian pada media selektif tersebut menghasilkan 79 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada 8 senyawa nitril (asetamida, asetonitril, benzonitril, adiponitril, mandelonitril, suksinonitril, laktonitril dan bensilsianida) sebagai sumber karbon dan nitrogen, bahkan dua isolat yaitu YIM 56238 dan PO69 menunjukkan kemampuan menghidrolisis secara enansioselektif senyawa rasemat mandelonitril menjadi (R)-(+)asam mandelat yang merupakan senyawa kiral penting untuk produksi farmaseutikal dan agen pemecah (*resolving agent*). Berdasarkan gen 16S rRNA, bakteri tersebut teridentifikasi sebagai *Micrococcus endophyticus* strain YIM 56238 dan *Rhodococcus pyridinivorans* strain PO69.

Kata kunci : nitril, *sponge*, bakteri laut, *microtitter plate*, enzim-pendegradasi nitril, (R)-(+)asam mandelat

PENDAHULUAN

Peran enzim sebagai biokatalis dalam sintesis senyawa kimia semakin meningkat dalam sepuluh tahun terakhir. Enzim dianggap sebagai katalis yang bersih, ekonomis dan dalam beberapa hal mampu menjembatani reaksi-reaksi yang tidak mudah dilakukan dengan metode kimia biasa. Senyawa nitril dan produk hidrolisisnya (amida dan asam karboksilat turunannya), terutama dalam bentuk enantiomer murni telah dan akan diaplikasikan secara luas dalam industri farmasi dan kimia (Kaul, 2007).

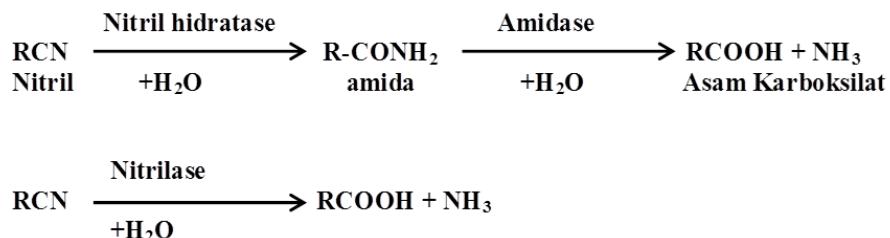
Sampai saat ini telah banyak dilaporkan tentang eksplorasi beberapa mikroba pendegradasi nitril dan amida untuk mensintesis senyawa-senyawa penting secara komersial, misalnya akrilamida, asam nikotinat, L-alanin, R-(+)asam mandelat, dan S-(+)-

Ibuprofen (Yamamoto *et al.*, 1990).

Proses hidrolisis nitril secara enzimatik dapat dilakukan melalui beberapa tahapan reaksi yang melibatkan nitrilase (EC. 3.5.5.1), atau nitril hidratase/NH-ase (EC. 4.2.1.83), dan amidase (EC. 3.5.1.4). Nitrilase mengkatalis hidrolisis nitril secara langsung menjadi asam karboksilat dan ammonia. Sedangkan nitril-hidratase mengkatalis hidrolisis nitril secara bertahap menjadi amida, dan selanjutnya amida dikonversi menjadi asam karboksilat oleh enzim amidase. Secara umum reaksi hidrolisis senyawa nitril dapat dilihat pada Gambar 1.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keragaman dan untuk mengungkap potensi bakteri asli dari Enggano sebagai bakteri penghidrolisis senyawa nitril, baik alifatik maupun aromatik. Selain

*Diterima: 30 Juni 2015 - Diperbaiki: 30 September 2016 - Disetujui: 24 Maret 2017



Gambar 1. Reaksi hidrolisis nitril secara enzimatis (*Nitrile enzymatic hydrolysis reaction*) (Asano *et al.*, 1980)

itu dalam penelitian ini juga dipelajari enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis tersebut.

Pemilihan lokasi eksplorasi untuk mengkoleksi bakteri penghidrolisis senyawa nitril dilakukan berdasarkan mempertimbangkan berbagai aspek. Enggano merupakan pulau yang tidak pernah bersatu dengan pulau-pulau besar seperti Sumatera, sehingga diharapkan tingkat endemisitasnya tinggi. Namun data mengenai mikroba di Pulau Enggano belum pernah dilaporkan. Dari kegiatan penelitian ini diharapkan diperoleh informasi mengenai data mikroba potensial khususnya pendekradasi senyawa nitril dari ekosistem pulau Enggano. Kedepannya diharapkan mikroba-mikroba tersebut dapat diaplikasikan dan dimanfaatkan sebagai biokatalis untuk produksi enzim dalam bidang lingkungan, industri farmaka dan kimia.

BAHAN DAN CARA KERJA

Koleksi sampel di lapangan

Sampel yang dikoleksi dari Pulau Enggano adalah berupa tanah, air laut, sedimen laut, pasir laut, dan sponge. Untuk mengisolasi mikroba penghidrolisis nitril, sampel langsung diperkaya menggunakan media mineral dalam eppendorf volume 1,5 ml dan kemudian ditambahkan senyawa nitril (asetonitril, benzonitril, adiponitril, mandelonitril, suksinonitril, laktionitril, dan benzilsianida) dengan konsentrasi tertentu tergantung dari toksisitas senyawa nitril yang digunakan.

Pengujian Laboratorium

Isolasi Mikroba Laut dari sponge

Isolasi mikroba laut dilakukan dengan menggunakan berbagai metode sebagai berikut :

Metode 1 : Isolasi langsung dari *sponge* (tanpa

sterilisasi) melalui pengenceran bertingkat (10^{-1} s/d 10^{-7}). Selanjutnya, 100 μl sampel diinokulasikan pada media *Marine Agar* dan diinkubasi pada suhu ruang ($28 - 30^\circ\text{C}$).

Metode 2 : Sampel *sponge* direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit, kemudian dibilas dua kali menggunakan aquades steril. Sampel sponge sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 9 ml NaCl Fisiologis. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan NaCl fisiologis, dan diinokulasi pada media *Marine Agar* dengan metode *spread*.

Metode 3 : Sponge yang telah disterilkan dengan alkohol 70% dipotong-potong, kemudian langsung ditanam secara aseptis pada media *Marine Agar* dan diinkubasi pada suhu ruang.

Media Isolasi dan Kultivasi Mikroba Laut

Media yang digunakan untuk isolasi mikroba laut adalah *Marine Agar*, dengan komposisi: 5,0 g pepton, 1,0 g *yeast extract*, 0,1 g ferri sitrat, 19,45 g sodium klorida, 8,8 g MgCl₂, 3,24 g sodium sulfat, 1,88 g kalsium klorida, 0,55 potassium klorida, 0,16 g sodium bikarbonat, 15,0 g agar, 34,0 mg strontium klorida, 22,0 mg asam borat, 4,0 mg sodium sillikat, 2,4 mg sodium flourid, 1,6 mg ammonium nitrat, dan 8 mg disodium fosfat, dan aquadest 1000 ml. pH media diatur $7,4 \pm 0,2$.

Media Penapisan Mikroba Pendekradasi Nitril

Media penapisan yang digunakan adalah media mineral dengan komposisi: Na₂HPO₄ 0,357 g, KH₂PO₄ 0,1 g, MgSO₄.7H₂O 0,1 g, CaCl₂.2H₂O 0,01 g, FeSO₄.7H₂O 0,001 g, *yeast extract* 0,01 g,

mikroelemen 1,0 ml, dan aquadest hingga mencapai volume 1000 ml (Meyer dan Schlegel, 1983; Pfennig, 1974). Adapun komposisi mikroelemen adalah sebagai berikut: 0,1 g Zn SO₄.7H₂O, 0, 1 g MnCl₂.4H₂O, 0,3 g H₃BO₃, 0,2 g CoCl₂.6H₂O, 0,2 g CuCl₂.2H₂O, 0,02 g NiCl₂.6H₂O, 0,020 Na₂MO₄.2H₂O, 0,02 g Na₂SeO₃ dilarutakan dalam aquadest 1000 ml.

Penapisan Mikroba Pendegradasi Nitril dan Amida secara cepat

Penapisan mikroba pendegradasi nitril dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri hasil isolasi ke dalam *macrotitter plate steril* (24 well) yang berisi 1000 µl media mineral dengan substrat asetonitril/asetamida 100 mM dan benzonitril/benzamida 25 mM. *Macrotitter plate* tersebut diinkubasi pada suhu ruang ± 28 °C menggunakan mesin pengocok dengan kecepatan 110 rpm selama 72 jam. Setelah 72 jam inkubasi, pertumbuhan mikroba diuji dengan penambahan larutan Iodonitrotetrazolium (INT) sementara aktivitasnya diuji dengan reagen Nessler (Oliver *et al.*, 1989).

Pengujian Pertumbuhan Mikroba secara Kualitatif

Sebanyak 100 µl kultur ditambah dengan 14 µl larutan INT (0,5 mg/ml). Perubahan warna yang terbentuk mengindikasikan adanya pertumbuhan mikroba.

Pengujian Aktivitas Enzim Pendegradasi Nitril berdasarkan penentuan NH₄⁺

Sebanyak 198 µl NaOH 0,1 N ditambahkan ke dalam 2 µl kultur, kemudian dihomogenkan dan setelah itu ditambahkan 4 µl reagen Nessler. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu ruang

± 28 °C selama 20 menit. Aktivitas yang tinggi ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga kuning kecoklatan.

Produksi Biomassa

Biomassa dari isolat bakteri terpilih diproduksi dalam erlenmeyer volume 1000 ml yang berisi 500 ml media tumbuh yang mengandung 100 mM asetonitril atau benzonitril (25 mM) dan 4-6% (v/v) isolat terseleksi. Campuran diinkubasi pada *shaker* dengan suhu ruang (± 28 °C) selama 72 jam (fase eksponensial). Sel dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Sel yang diperoleh dicuci dua kali dengan 50 mM fosfat buffer (KH₂PO₄, pH 7,2). Sel yang diperoleh kemudian disimpan pada -4 °C sebelum digunakan untuk pengujian berikutnya.

Biotransformasi (R,S)-Mandelonitril dan Analisis Produk

Biotransformasi senyawa rasemat mandelonitril dilakukan dengan menggunakan media degradasi (50 mM buffer fosfat KH₂PO₄, pH 7,2) yang ditambahkan 50 mM mandelonitril (6µl/ml). Sel utuh bakteri uji dimasukkan ke dalam media biotransformasi dengan konsentrasi 0,3 g sel basah/ml media degradasi. Proses biotransformasi berlangsung selama 17 jam, dan selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada sampel yang dihasilkan Supernatan kemudian diekstraksi untuk mengisolasi asam mandelat berdasarkan metode Banerjee *et al.* (2003). Selanjutnya produk biotransformasi yang dihasilkan dianalisis dengan HPLC Agilent 1100 menggunakan kolom C₁₈ (Supelco, 5 µm; 15 cm x 4,6 mm) dengan komposisi fase gerak buffer fosfat 0,1 M pH 4,8 : methanol adalah 70:30, *flow rate* diatur pada 1 mL/menit 254 nm.

Tabel 1. Primer spesifik untuk mendeteksi gen nitrilase (*Specific primer for detecting nitrilase gene*)

Primer (<i>Primers</i>)	Urutan (<i>Sequence</i>)	Tm (°C)	% GC	Σ (Pb) base
P1	5'-AGGTACGCATATGGTCGAATACACAA---3'	63	42.3	26
P2	5'-TACAAGCTTCGAGTCAGATGGAGGC-3'	66	52	25

Identifikasi dan Analisis Filogenetik Isolat Terpilih

Identifikasi isolat bakteri unggulan dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis sekuens parsial 16S rRNA. Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan primer universal yaitu Primer 27F dan Primer 1492R (Lane, 1991). Pencarian homologi dilakukan secara on-line pada pusat data DNA DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>).

Dekripsi Penyandi Gen Nitrilase Menggunakan Real Time PCR

Isolat-isolat bakteri yang mampu mendegradasi senyawa nitril akan dilakukan uji konfirmasi untuk mendeteksi adanya gen nitrilase menggunakan primer spesifik seperti yang tercantum pada Tabel 1.

Komposisi reaksi untuk amplifikasi gen nitrilase adalah SsoAdvanced SYBR green supermix (10 μ L), 1 μ L primer P1-F (10 μ M), 1 μ L primer P2-R (10 μ M), RT-PCR grade water (7 μ L) dan DNA template (1 μ L), ddH₂O untuk NTC (kontrol negatif). Profil reaksi *real time* PCR adalah denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, annealing pada suhu 55 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 60 °C selama 45 detik dengan jumlah siklus mencapai 40 siklus.

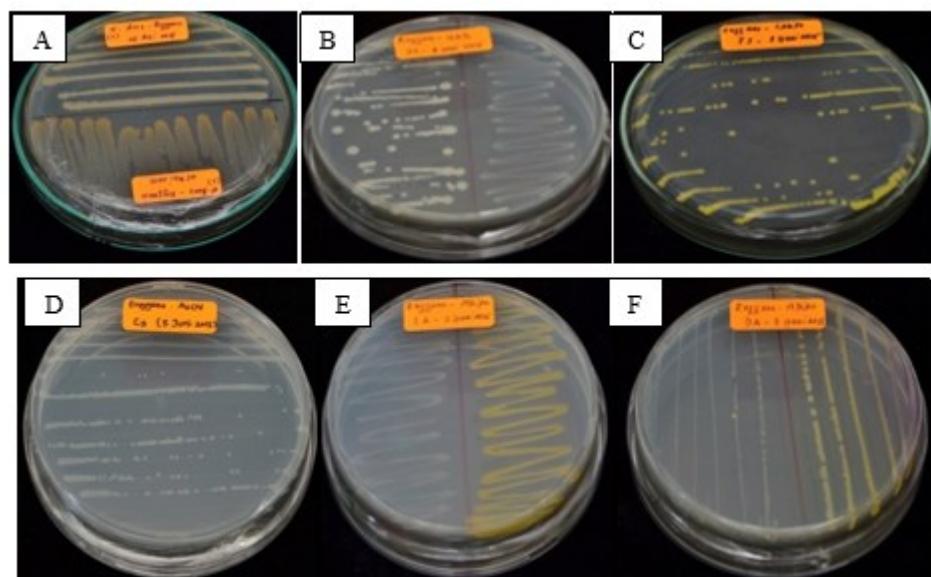
HASIL

Isolasi dan Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Penghidrolisis Nitril

Berdasarkan isolasi bakteri pendegradasi nitril dari berbagai sumber yang berbeda (tanah, sedimen, sponge dan air laut), diperoleh sebanyak 79 isolat bakteri (Gambar 2 dan Tabel 3). Seluruh isolat dapat tumbuh, baik pada media mineral yang mengandung asetonitril maupun benzonitril.

Pertumbuhan ditandai oleh kekeruhan pada media tumbuh setelah kultur diinkubasi selama 72 jam. Sedangkan warna yang timbul merupakan refleksi warna dari koloni isolat bakteri yang diinokulasikan (Gambar 3). Isolat-isolat tersebut selanjutnya diamati pertumbuhannya secara visual dan diseleksi/ditapis secara kualitatif (*rapid screening*) berdasarkan kemampuan pertumbuhannya, menggunakan *microtitter plate* (96 well) dengan menambahkan senyawa iodonitrotetrazolium (INT).

Hasil penapisan tersebut menunjukkan, bahwa dari seluruh isolat, 47 isolat diantaranya menunjukkan reaksi positif. Reaksi positif ditunjukkan oleh adanya perubahan warna menjadi pink setelah penambahan INT (Gambar 4 A dan B). Sedangkan uji aktivitas enzim penghidrolisis nitril



Gambar 2. Pertumbuhan Bakteri yang diisolasi dari sampel yang telah diperkaya dengan senyawa nitril seperti benzonitrile (A), laktonitrile (B,C), asetonitril (D), dan adiponitrile (E-F) (*Bacterial growth of samples enriched with nitrile compounds, such as benzonitrile (A), laktonitrile (B,C), acetonitrile (D), adiponitrile (E-F)*)

Tabel 1. Jumlah bakteri yang tumbuh pada media pengkayaan dengan penambahan berbagai senyawa nitril.
(*The number of bacteria grown on media enriched by nitrile compounds*)

No	Lokasi (location)	Substrat (substrate) (Nitrile)					Jumlah bakteri (Number of bacteria)
		Asetonitril (C ₂ H ₃ N)	Laktonitril (C ₃ H ₅ NO)	Benzonitril (C ₇ H ₅ N)	Suksinonitril (C ₄ H ₄ N ₂)	Adiponitril (C ₆ H ₈ N ₂)	
1	Desa Meog	2	3	1	3	2	11
2	Taman Buru	3	-	3	1	1	9
3	Sungai Kuala Besar	1	-	1	-	3	5
4	Perkebunan Jengkol	4	2	1	-	2	9
5	Perairan Kahabi	3	-	2	2	1	8
6	Air Terjun Pulau Buru	4	1	1	1	3	10
7	Lamun Payau Kahabi	-	2	1	-	-	3
8	Lamun	5	3	3	-	3	17
9	Peraian Banjarsari	2	1	2	4	2	11
Jumlah (Total)							79

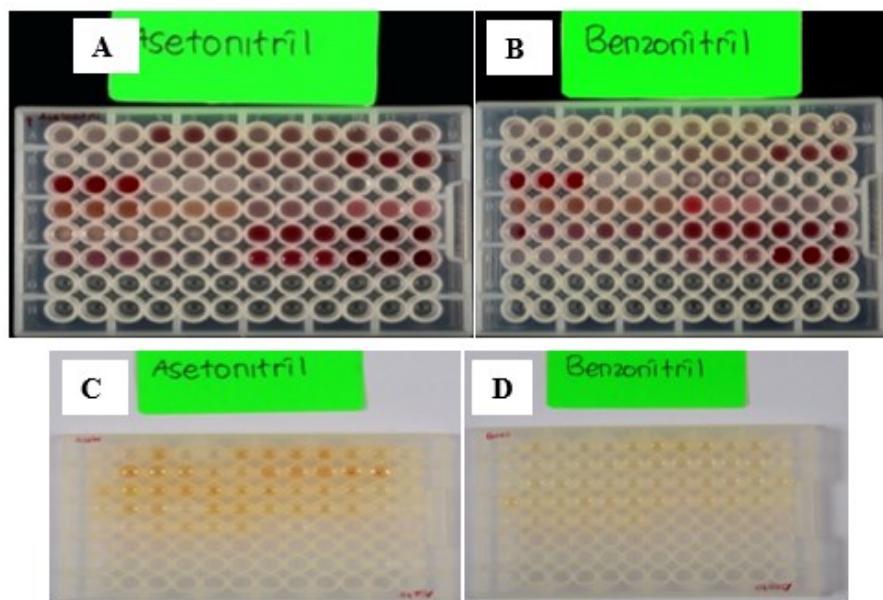


Gambar 3. Pertumbuhan mikroba hasil isolasi pada medium mineral yang mengandung asetonitril (100 mM) dan benzonitril (25 mM) dalam *macrotitter plate* (*Growth of microbial isolated in mineral medium containing acetonitrile (100 mM) and benzonitrile (25mM) in macrotitter plate*)

dilakukan berdasarkan terbentuknya ammonium sebagai salah satu produk hidrolisis senyawa nitril. Hasil positif ditandai oleh perubahan warna dari kuning hingga kecoklatan setelah pemberian reagen Nessler (Gambar 4 C dan D).

Hasil pengujian juga menunjukkan bahwa pertumbuhan dan aktivitas isolat-isolat bakteri uji pada asetonitril relatif lebih baik dibandingkan pada

benzonitril (Tabel 2). Dari 30 isolat yang menunjukkan reaksi positif, sebanyak 2 isolat dengan kode *strain* 11 Eng dan 12 Eng menunjukkan hasil yang paling baik dibanding isolat-isolat lainnya. Oleh karena itu pengujian selanjutnya difokuskan pada isolat bakteri *strain* 11 Eng dan 12 Eng karena dianggap potensial sebagai pendegradasi senyawa nitril.



Gambar 4. Penapisan cepat berdasarkan uji pertumbuhan dengan INT (A dan B) dan pengujian aktivitas enzim penghidrolisis nitril dengan Nessler reagent (C dan D) [Rapid screening based on growth testing by using INT (A and B) and Nitrile-hydrolyzing enzymes activity testing by using Nessler reagent (C and D)].

Tabel 2. Pertumbuhan dan aktivitas 47 isolat yang menunjukkan reaksi positif pada asetonitril 100 mM dan benzonitril 25 mM (Bacterial growth and activity of 47 isolates showing positive reaction on mineral media containing 100 mM acetonitrile and 25 mM benzonitrile in macrotitter plate)

No	Isolat (Isolates)	Asetonitril		Benzonitril	
		Pertumbuhan (Growth)	Aktivitas (Activity)	Pertumbuhan (Growth)	Aktivitas (Activity)
1	Strain 11. Eng	++++	+++++	++++	++++
2	Strain.12. Eng	++++	+++	++++	++++
3	Strain.71. Eng	+++++	+++++	+++	+++
4	Strain.70. Eng	++	++	++	++
5	Strain.76. Eng	++	++	++	++
6	Strain.55. Eng	++++	++++	++	++
7	Strain.56. Eng	++++	++++	++	++
8	Strain.48. Eng	++++	++++	++++	++++
9	Strain.49. Eng	++++	++++	++++	++++
10	Strain.08. Eng	++++	++	++	++
11	Strain 37 Eng	++	++	++	++
12	Strain.05. Eng	++++	++	++	++
13	Strain.19. Eng	++++	++	++	++
14	Strain.33. Eng	+++++	++	++	++
15	Strain.43. Eng	++++	++++	++	++

Tabel 2. Pertumbuhan dan aktivitas 47 isolat yang menunjukkan reaksi positif pada asetonitril 100 mM dan benzonitril 25 mM (*Bacterial growth and activity of 47 isolates showing positive reaction on mineral media containing 100 mM acetonitrile and 25 mM benzonitrile in macrotitter plate*) (continued)

No	Isolat (Isolates)	Asetonitril		Benzonitril	
		Pertumbuhan (Growth)	Aktivitas (Activity)	Pertumbuhan (Growth)	Aktivitas (Activity)
16	Strain 44. Eng	++++	++++	+++	+++
17	Strain.15. Eng	+++	++	+++	+++
18	Strain.07. Eng	+++	++	+++	++
19	Strain 32 Eng	+++	++	+++	+++
20	Strain 37 Eng	+++	++	+++	+++
21	Strain01. Eng	+++	++	++	+
22	Strain 59 Eng	+++	++	++	++
23	Strain 47 Eng	+++	+++	-	-
24	Strain 04. Eng	++	++	++	++
25	Strain 06. Eng	++	++	++	++
26	Strain 02 Eng	++	+	++	+
27	Strain 18. Eng	++	++	+	+
28	Strain 20. Eng	++	+	+	+
29	Strain 26 Eng	++	++	+	+
30	Strain 40 Eng	++	++	+	+
31	Strain 45 Eng	++	++	+	+
32	Strain 52 Eng	++	++	+	+
33	Strain 53 Eng	++	++	++	++
34	Strain 54 Eng	++	++	+	+
35	Strain 58 Eng	++	++	++	++
36	Strain 64 Eng	++	++	++	++
37	Strain 68 Eng	++	++	-	-
38	Stain 69 Eng	++	+	-	-
39	Strain 03 Eng	+	+	+	+
40	Strain 10 Eng	+	+	+	+
41	Strain 17 Eng	+	+	+	+
42	Strain 24 Eng	+	+	+	+
43	Strain 35 Eng	+	+	+	+
44	Strain 38 Eng	+	+	+	+
45	Strain 63 Eng	+	+	+	+
46	Strain 65 Eng	+	+	+	+
47	Strain 67 Eng	+	+	-	-

Keterangan: ++++ : tumbuh sangat baik ; +++ : baik ; ++ : sedang ; + : kurang
(Notes): ++++ Grow very well ; +++ : good ; ++ : moderate ; + : less

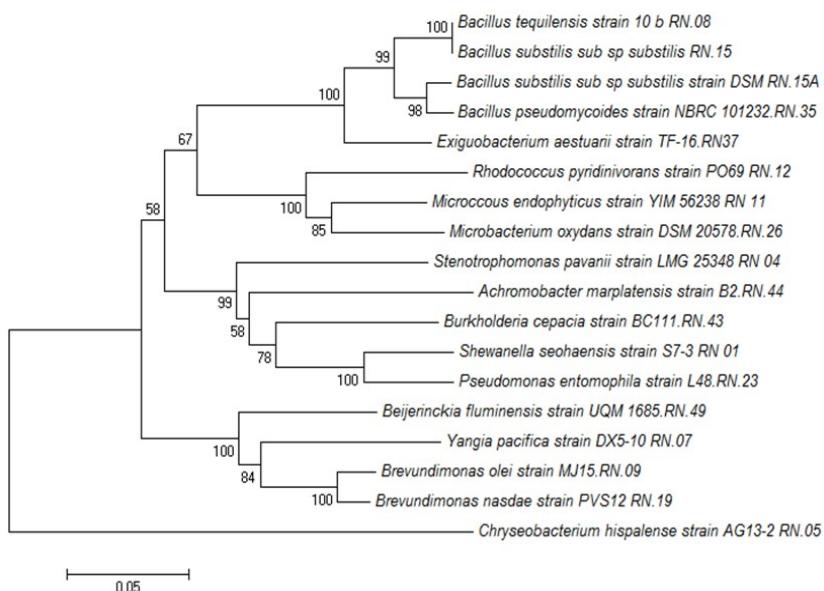
Identifikasi Isolat Enggano Terpilih dan Deteksi Gen Nitrilase Menggunakan Real Time PCR

Analisis penjajaran berdasarkan urutan nukleotida parsial gen pengkode 16S rDNA menunjukkan bahwa isolat unggulan yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa nitril dengan kode *strain 11 Eng* dan *12 Eng* berturut-turut teridentifikasi sebagai *Microccous endophyticus strain YIM 56238* dan *Rhodococcus pyridinivorans strain PO69* (Gambar 5). Untuk mengkonfirmasi

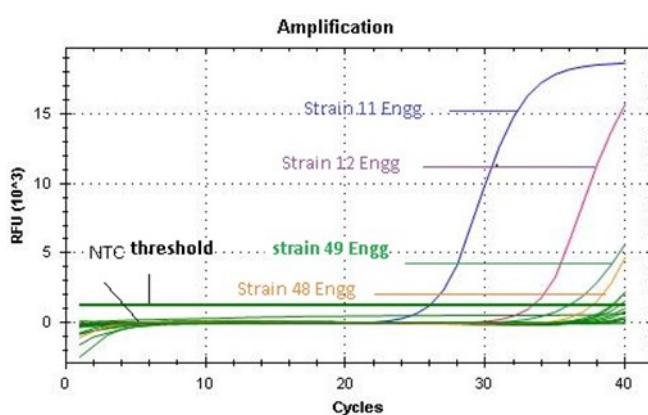
isolat bakteri yang memiliki gen nitrilase, dilakukan amplifikasi dengan primer spesifik menggunakan real time PCR. Hasil dari real time PCR belum dipaparkan pada bagian ini (Gambar 6).

Pertumbuhan Isolat Bakteri terpilih (*strain 11 Eng* dan *12 Eng*) pada Benzonitril serta pembentukan ammonium selama pertumbuhan

Pengujian pengaruh penambahan berbagai konsentrasi benzonitril sebagai substrat terhadap



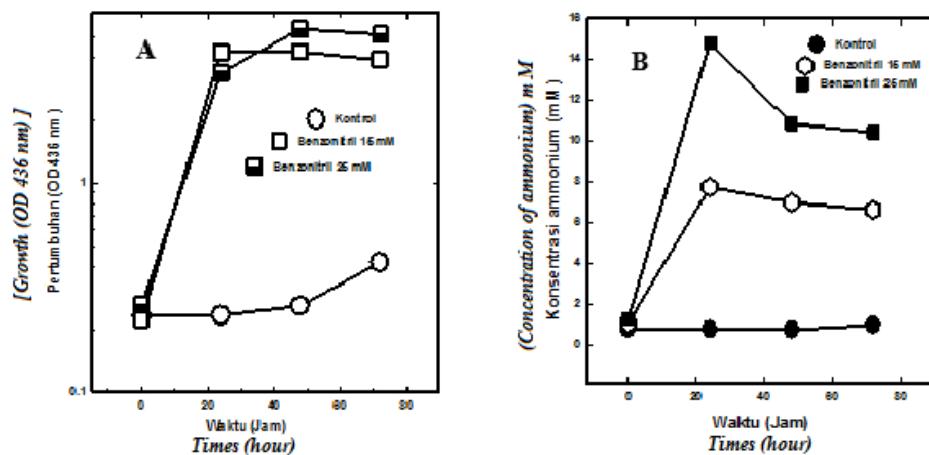
Gambar 5. Pohon kekerabatan bakteri potensial bakteri pendegradasi senyawa nitril yang dianalisis dengan metode Neighbor-Joning dan analisis *bootstrap* dengan pengulangan 1000 kali menggunakan software Mega 5 (*Family tree of potential degrading nitrile bacteria were analyzed by using Neighbor-Joning and bootstrap analysis with 1000 repetitions using software Mega 5*)



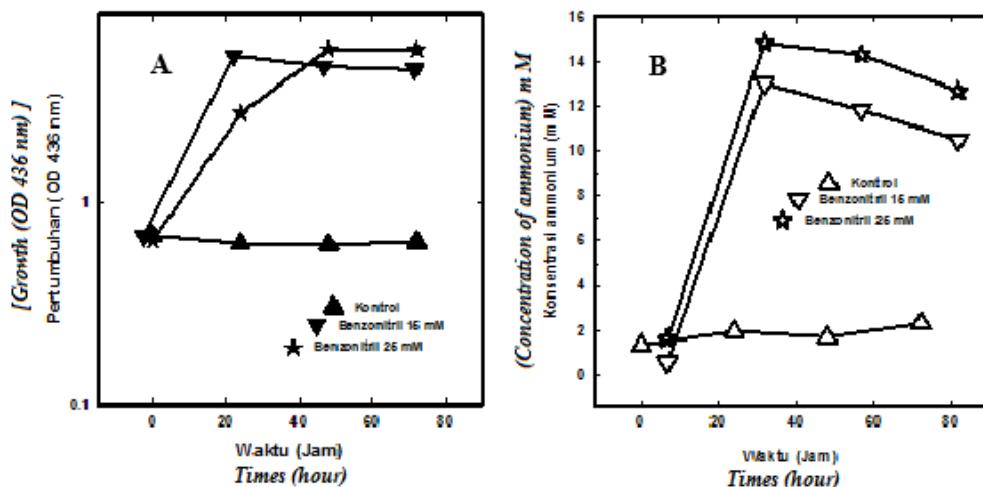
Gambar 6. Grafik amplifikasi gen nitrilase menggunakan real Time PCR (*Amplification of nitrilase gen using Real Time PCR*)

pertumbuhan kedua isolat (*strain* 11 dan 12) menunjukkan bahwa pertumbuhan terbaik kedua isolat dicapai bila isolat-isolat tersebut ditumbuhkan pada 25 mM benzonitril. Isolat mampu menggunakan senyawa tersebut sebagai satu-satunya sumber karbon dan nitrogen. Konsentrasi ammonium yang terbentuk selama pertumbuhan (Gambar 7 dan 8) menunjukkan bahwa NH_4^+ yang dihasilkan oleh

kedua isolat mempunyai pola yang sama. Beberapa pustaka menunjukkan bahwa NH_4^+ merupakan salah satu produk dari hidrolisis senyawa nitril. Dengan demikian, ada indikasi bahwa enzim yang berperan dalam hidrolisis bekerja dengan baik. Aktivitas enzim pendegradasi benzonitril secara kuantitatif umumnya ditentukan dengan mengukur konsentrasi substrat dan menganalisis produk hidrolisis yang dihasilkan menggunakan GC, HPLC.



Gambar 7. Profil pertumbuhan *Micrococcus endophyticus* strain 11 Eng (A), dan konsentrasi ammonium selama pertumbuhan pada bezonitril (B) [Growth profile of *Micrococcus endophyticus* strain 11 Eng (A), and ammonium concentration during growth on benzonitrile (B)]



Gambar 8. Profil pertumbuhan *Rhodococcus pyridinivorans* strain 12 Eng (A), dan konsentrasi ammonium selama pertumbuhan pada benzonitril (B) [Growth profile of *Rhodococcus pyridinivorans* strain 12 Eng (A), and ammonium concentration during growth on benzonitrile(B)]

Biotransformasi Senyawa Rasematis Mandelonitril

Biotransformasi mandelonitril oleh isolat bakteri terpilih yaitu strain 11 Eng (*Micrococcus endophyticus*) dan 12 Eng (*Rhodococcus pyridinivorans*) menunjukkan, bahwa asam mandelat terdeteksi dalam ekstrak (Gambar 9), meskipun dalam konsentrasi yang relatif rendah.

PEMBAHASAN

Isolasi dan Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Penghidrolisis Nitril

Isolasi dan seleksi bakteri penghasil enzim penghidrolisis nitril dilakukan secara kualitatif berdasarkan pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Perubahan warna yang terbentuk menjadi kemerahan atau pink tua mengindikasikan kemampuan tumbuh mikroba. Semakin pekat warna yang terbentuk, kemampuan tumbuh mikroba pada substrat juga semakin tinggi. Perubahan warna yang terjadi berkorelasi positif dengan pertumbuhan.

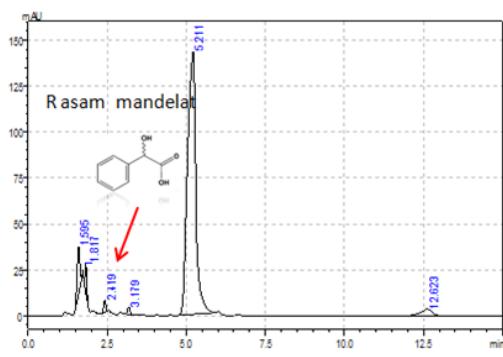
Pengujian pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan senyawa nitril alifatik yaitu asetonitril dan senyawa nitril aromatik yaitu benzonitril. Proses hidrolisis nitril aromatik umumnya menggunakan hidrolisis secara langsung yang melibatkan enzim nitrilase, sedangkan hidrolisis nitril alifatik secara bertahap yaitu melibatkan nitril hidratase menjadi amida dan selanjutnya menkonversi menjadi asam karboksilat oleh enzim amidase. Bakteri *Rhodococcus* sp.,

Bacillus smithii dan *Rhodococcus rhodochrous* memiliki kemampuan dalam menghidrolis senyawa nitril dalam bentuk alifatik dan aromatik (Almwatah et al., 1999)

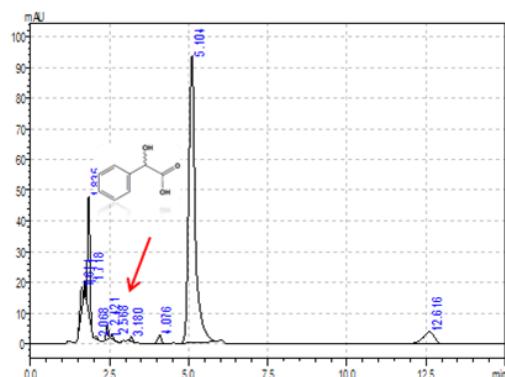
Secara umum, hasil pengujian mikroba pada asetonitril memperlihatkan lebih banyak reaksi positif dibandingkan benzonitril. Hal ini dapat dipahami karena asetonitril (CH_3CN) merupakan senyawa alifatik yang paling sederhana dengan rantai karbon yang pendek sehingga mudah dihidrolisis oleh mikroba, sedangkan benzonitril ($\text{C}_7\text{H}_5\text{N}$) merupakan salah satu senyawa nitril aromatik yang toksitasnya lebih tinggi dibandingkan asetonitril.

Dilaporkan juga bahwa benzonitril merupakan salah satu bahan aktif pestisida/herbisida (3,5-dichloro-4-hydroxybenzonitril, 3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitril), sehingga hanya sedikit mikroba yang mampu tumbuh dan memanfaatkan benzonitril sebagai sumber karbon dan nitrogen. Beberapa mikroba yang dilaporkan mampu menghidrolisis benzonitril, antara lain *Fusarium*, *Rhodococcus rhodochrous* PA-34, *Rhodococcus* sp. NDB 1165, *Nocardia globerula* NHB-2 (Harper et al., 1977; Vesela et al., 2010). Adapun bakteri yang mampu menghidrolisis asetonitril antara lain *Pseudomonas putida* (Nawaz et al., 1989), *Corynebacterium* sp. (Martíkova et al., 1992), *Microbacterium imperiale* (Chutchat et al., 2016). Dalam penelitian ini strain 11 Eng dan 12 Eng yang teridentifikasi secara molekular sebagai *Micrococcus endophyticus* dan

•Ekstrak strain Engg 11



•Ekstrak strain Engg 12



Gambar 9. Kromatogram ekstrak produk biotransformasi mandelonitril dari isolat strain Eng. 11 dan Eng 12
(Chromatogram extract biotransformation mandelonitrile product of Enggano isolates strain 11 and 12)

Rhodococcus pyridinivorans juga mampu tumbuh dengan baik baik pada benzonitril 25 mM.

Pertumbuhan isolat bakteri terpilih (*strain* Eng 11 dan Eng 12) pada benzonitril serta pembentukan ammonium selama pertumbuhan

Penambahan konsentrasi benzonitril sampai dengan 25 mM mampu meningkatkan pertumbuhan isolat strain 11 dan 12 karena keduanya mampu memanfaatkan benzonitril sebagai substrat untuk pertumbuhan. Kemampuan tumbuh dan membentuk NH_4^+ merupakan indikasi adanya proses hidrolisis benzonitril sekaligus mengindikasikan kemampuan isolat dalam sintesis enzim penghidrolisis nitril, khususnya benzonitril. Metabolisme senyawa benzonitril pada mikroba melibatkan enzim nitrilase yang mengkatalisis hidrolisis benzonitril langsung menjadi asam benzoat dan ammonium tanpa membentuk senyawa antara yaitu amida (Nagasawa *et al.*, 1988; Agarwal *et al.*, 2010). Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa selama pertumbuhan mikroba terjadi peningkatan pH pada media tumbuh. Peningkatan pH mengindikasikan telah terjadi akumulasi ion-ion NH_4^+ yang merupakan salah satu produk hidrolisis/degradasi senyawa nitril (Nagasawa *et al.*, 1988; Sunarko, 1995).

Identifikasi Isolat Enggano Terpilih dan Deteksi Gen Nitrilase Menggunakan Real Time PCR

Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer 27F dan 1510 R menunjukkan bahwa sekuen 16S isolat dengan kode strain 12 Eng terdiidentifikasi sebagai *Rhodococcus pyridinivorans*, *Micrococcus endophyticus* (Strain 11 Eng), *Burkholderia* sp. (Strain 43 Eng) *Bacillus substillis* (Strain RN 15), *Brevundimonas* sp. (Strain RN 19), dan *Pseudomonas entolophila* (Stain RN 23). Coffey *et al.* (2009) melaporkan bahwa bakteri-bakteri tersebut memiliki gen fungsional nitrilase yaitu *nit1* yang terdeteksi menggunakan *real time* PCR. Dari beberapa isolat yang diuji aktivitas enzim nitrilasenya, isolat bakteri 11 Eng memiliki homologi sebesar 100% dengan *Micrococcus endophyticus* dan 12 Eng memiliki 99% homologi dengan *Rhodococcus pyridinivorans*. *Rhodococcus* spp. diketahui merupakan genus bakteri yang dilaporkan mampu menghasilkan enzim pendegradasi nitril, terutama

R. rhodochrous dan *R. erythropolis* (Kobayashi, *et al.*, 1992; Luo, *et al.*, 2010). Namun demikian, *R. pyridinivorans* relatif jarang dilaporkan sebagai pentransformasi nitril.

Sejauh ini hanya Precigou *et al.* (2004) yang melaporkan bahwa *R. pyridinovorans* mampu menghasilkan enzim nitril-hidratase. *Rhodococcus* merupakan genus bakteri gram positif, non-motil, tidak menghasilkan spora, dan bersifat aerob. *Rhodococcus* tumbuh cepat dan siklus perkembangannya relatif sederhana, sehingga sering dianggap sebagai sarana penelitian yang efisien. Hasil deteksi gen nitrilase isolat 11 Eng (*M. endophyticus*) dan 12 Eng (*R. pyridinovorans*) menggunakan *real time* PCR menunjukkan hasil positif, yaitu memiliki gen nitrilase, yang ditandai oleh adanya akumulasi pada sinyal fluoresens hingga melintasi *base line threshold*. Makin tinggi tingkat ekspresi target gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Kubista *et al.*, 2006).

Biotransformasi Senyawa Rasemat Mandelonitril

Kemampuan tumbuh *Micrococcus endophyticus* strain 11 Eng dan *Rhodococcus pyridinovorans* strain 12 Eng juga diuji pada senyawa (R,S)-mandelonitril. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut tidak mampu tumbuh dengan memanfaatkan senyawa rasemat mandelonitril sebagai substrat tumbuhnya. Meskipun demikian, data menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri tersebut ternyata mampu menghidrolisis senyawa (R,S)-mandelonitril menghasilkan mandelamida dan asam mandelat. Terdeteksinya senyawa asam mandelat mengindikasikan bahwa konversi senyawa (R,S)-mandelonitril oleh kedua isolat bakteri tersebut melibatkan enzim nitril-hidratase dan amidase dan bukan enzim nitrilase. Rendahnya konsentrasi asam mandelat mungkin disebabkan oleh proses biotransformasi yang belum optimal. Dilaporkan juga bahwa jenis induktor sangat berpengaruh terhadap pembentukan asam mandelat yang dihasilkan.

Liu *et al.*, 2011 melaporkan bahwa strain bakteri *Alcaligenes faecalis* ZJUTB10 memiliki kemampuan aktivitas nitrilase yang tinggi yaitu mencapai 350,8 U/g. Dengan aktivitas nitrilase yang tinggi, bakteri tersebut mampu mengkonversi rasemat mandelonitril menjadi R(-) asam mandelat. Asam mandelat

tersebut telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi, sehingga bakteri *Alcaligenes faecalis* ZJUTB10 merupakan bakteri potensial untuk diaplikasikan di industri untuk memproduksi asam mandelat dan asam karboksilat. Adapun Bakteri *Pseudomonas putica* MTCC5110 dilaporkan juga memiliki kemampuan dalam menghidrolisis rasematis mandelonitril menjadi (R) asam mandelat. Gen penyandi nitrilase yang diisolasi dari bakteri *Pseudomonas putica* MTCC5110 telah berhasil diisolasi dan diekspresikan. Bakteri rekombinan nitrilase tersebut telah berhasil memproduksi asam mandelat dalam skala bioreaktor (Banerjee *et al.*, 2009)

Beberapa pustaka menginformasikan bahwa beberapa strain *Rhodococcus* mampu mendegradasi senyawa-senyawa toksik yang bersifat karsinogenik, misalnya piridin, stiren, biphenil (Warhurst and Fewson, 1994; Yoon *et al.*, 2000). Meskipun kemampuan strain 11 Eng dan 12 Eng dalam memproduksi asam mandelat masih rendah, namun keduanya merupakan mikroba indigenous pendegradasi nitril potensial dari pulau Enggano, Indonesia. Rendahnya konsentrasi asam mandelat mungkin disebabkan oleh proses biotransformasi yang belum optimal. Namun, paling tidak telah memperlihatkan indikasi bahwa kedua isolat tersebut mampu menghasilkan asam mandelat.

KESIMPULAN

Sebanyak 79 isolat bakteri pendegradasi senyawa nitril dari Enggano mampu tumbuh pada delapan senyawa nitril, yaitu asetamida, asetonitril, benzonitril, adiponitril, mandelonitril, suksinonitril, laktionitril dan bensilsianida sebagai sumber karbon dan nitrogen. Dua isolat bakteri menunjukkan kemampuan menghidrolisis secara enantioselektif senyawa rasematis mandelonitril menjadi (R)-(-)-asam mandelat yang merupakan senyawa kiral penting untuk produksi farmasetikal dan agen pemecah (*resolving agent*). Berdasarkan gen 16S rRNA bakteri 11 Eng dan 12 Eng teridentifikasi berturut-turut sebagai *Micrococcus endophyticus* strain YIM 56238 dan *Rhodococcus pyridinivorans* strain PO69.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Projek Unggulan IPH, Eksplorasi Pulau Terluar Enggano yang telah mendanai kegiatan penelitian. Terima kasih juga disampaikan kepada Resti yang telah membantu eksperimen di laboratorium dalam rangka pengumpulan data penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., Nigam, V.K. and Vidyarthi, A.S., 2012. Nitrilases attractive nitrile-degrading biocatalyst. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 3 (14), pp. 232-246.
- Almatawah, Q.A., Cramp, R. and Cowan, D.A., 1999. Characterization of an inducible nitrilase from Thermophilic *Bacillus Extremophiles*, 3, pp. 283-291.
- Asano, Y., Tani, Y. and Yamada, H., 1980. A new enzyme nitrile hydratase which degrades acetonitrile in combination with amidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, pp. 2251-2255.
- Benerjee, A., Kaul, P. and Banerjee, U.C., 2006. Enhancing the catalytic potential of nitrilase from *Pseudomonas putida* for stereoselective nitrile hydrolysis. *Applied Microbiology Biotechnology*, 72, pp. 77-78.
- Benerjee, A., Dubey, S., Kaul, P., Barse, B., Piotrowski, M. and Banerjee, U.C., 2009. Enantioselective nitrilase from *Pseudomonas putica*: Cloning, heterologous expression, and bioreactor studies. *Journal of Molecular Biotechnology*, 41, pp. 34-41.
- Coffey, L., Clarke, A., Duggan, P., Tambling, K., Horgan, S., Dowling, D. and O'Reilly, C., 2009. Isolation of identical nitrilase genes from multiple bacterial strains and real-time PCR detection of the genes from soils provides evidence of horizontal gene transfer. *Archives of Microbiology*, 191, pp. 761-771.
- Chuchat, N., Pasquarelli, F., Spera, A., Cantarella, L. and Cantarella, M., 2016. Acetonitrile Biotransformation into Less Toxic Compound by a Bioprocess Based on Nitrile Hydratase/Amidase Sequential Enzymatic Reaction.
- Harper, D.B., 1977. Microbial Metabolism of Aromatic Nitriles: Enzymology of C-N Cleavage by *Nocardia* sp. (*Rhodochrous* group) N.C.I.B. 11216. *Biochemical Journal*, 165, pp. 309-319.
- Kaul, P., Banerjee, A. and Banerjee, U.C., 2007. Nitrile hydrolase. *Industrial Enzymes*, pp. 531-547.
- Kobayashi, M., Komeda, H., Yanaka, N., Nagasawa, T. and Yamada, H., 1992. Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* JI: sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (29), pp. 20746-20751.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A.A., J Jonak, J. and Lind, K., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine Journal*, 27, pp. 95-125.
- Lane D.J., 1991. 16/23 rRNA Sequencing in Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. Eds. Pp. 115-175. Wiley, Chichester, UK.
- Liu, Z.Q., Dong, L.Z., Cheng, F., Xue, Y.P., Wang, Y.S., Ding, J.N., Zheng, Y.G. and Shen, Y.C., 2011. Gene cloning, expression, and characterization of nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ZJUTB10. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp. 11560-11570.
- Luo, H., Fan, L., Chang, Y., Ma, J., Yu, H., and Shen, Z., 2010. Gene cloning, overexpression, and characterization of the nitrilase from *Rhodococcus*

- rhodochrous* tgl-a6 in *E. Coli*. *Applied Biochemical Biotechnology*, 160, pp. 393–400.
- Martinova, L, Hruzova, J., Machek, F., Seichert, L., J Panos. and Juzlova, P., 1992. Isolation of acetonitrile-utilizing Bacteria. *Folia Microbiologica*, 37 (5), pp. 372 -376.
- Nawaz, M.S., Chapatwala, K.D. and Wolfram, J.H., 1989. Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. *Applied Environmental Microbiology*, 55 (9), pp. 2276 -2274.
- Oliver, M.H., Harison, N.K., Bishop, J.E., Cole P.J. and G.J., 1989. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plate: Application for assessment of growth factors. *Journal of Cell Science*, 92, pp. 513-518.
- Precigou, S., Wieser, M., Pommares, P., Goulsd, P. and Duran, R., 2004. *Rhodococcus pyridinivorans* MW3, a bacterium producing a nitrile hydratase. *Biotechnology Letter Journal*, 26 (17), pp. 1379-1384.
- Secades, P. and Guijarro, J.A., 1999. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Condition on Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9), pp. 3969-3975.
- Sunarko, B., 1995. Kemampuan berbagai isolat bakteri dalam mendegradasi asetonitril. *Jurnal Mikrobiologi Tropika*, pp. 13-19.
- Sunarko, B, Adityarini, Tambunan U.S.F. dan Sulistinah. N., 2000. Isolasi, seleksi, dan karakterisasi mikroba pendegradasi asetonitril. *Berita Biologi*, 5 (2), pp. 177-18.
- Vesela, A.B., Franc, M., Pelantova, H., Kubacc, D., Vejvoda, V., Sule, M., Bhalla, T.C., Mackova, M., P Lovecka, P Janu, K Demnerova, and L Martinkova., 2010. Hydrolysis of benzonitrile herbicides by soil actinobacteria and metabolite toxicity. *Biodegradation*, 21, pp. 761-770.
- Warhurst, A.M. and Fewson, C.A., 1994. Biotransformation catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical Reviews in Biotechnology Journal*, 14, pp. 29-73.
- Yamamoto, K., Ueno, Y., Otsubo, K., Kawakami K. and Komatsu. K., 1990. Production of S-(+)-Ibuprofen from a nitrile compound by *Acinetobacter* sp. Strain AK226. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 56, pp. 3125-3129.
- Yoon, J.H., Kang, S.S., Cho, Y.G., Lee, S.T., Kho, Y.H., Kim, C.J. and Park, Y.H., 2000. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, pp. 2173-2180.

Pedoman Penulisan Naskah Berita Biologi

Berita Biologi adalah jurnal yang menerbitkan artikel kemajuan penelitian di bidang biologi dan ilmu-ilmu terkait di Indonesia. Berita Biologi memuat karya tulis ilmiah asli berupa makalah hasil penelitian, komunikasi pendek dan tinjauan kembali yang belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain. Masalah yang diliput harus menampilkan aspek atau informasi baru.

Tipe naskah

1. Makalah lengkap hasil penelitian (*original paper*)

Naskah merupakan hasil penelitian sendiri yang mengangkat topik yang *up to date*, tidak lebih dari 15 halaman termasuk tabel dan gambar. Pencantuman lampiran seperlunya, namun redaksi berhak mengurangi atau meniadakan lampiran.

2. Komunikasi pendek (*short communication*)

Komunikasi pendek merupakan makalah hasil penelitian yang ingin dipublikasikan secara cepat karena hasil temuan yang menarik, spesifik dan baru, agar dapat segera diketahui oleh umum. Artikel yang ditulis tidak lebih dari 10 halaman. Hasil dan pembahasan boleh digabung.

3. Tinjauan kembali (*review*)

Tinjauan kembali merupakan rangkuman tinjauan ilmiah yang sistematis-kritis secara ringkas namun mendalam terhadap topik penelitian tertentu. Hal yang ditinjau meliputi segala sesuatu yang relevan terhadap topik tinjauan yang memberikan gambaran '*state of the art*', meliputi temuan awal, kemajuan hingga issue terkini, termasuk perdebatan dan kesenjangan yang ada dalam topik yang dibahas. Tinjauan ulang ini harus merangkum minimal 30 artikel.

Struktur naskah

1. Bahasa

Bahasa yang digunakan adalah Bahasa Indonesia atau Inggris yang baik dan benar.

2. Judul

Judul diberikan dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Judul harus singkat, jelas dan mencerminkan isi naskah dengan diikuti oleh nama serta alamat surat menyurat penulis dan alamat email. Nama penulis untuk korespondensi diberi tanda amplop cetak atas (*superscript*).

3. Abstrak

Abstrak dibuat dalam dua bahasa, bahasa Indonesia dan Inggris. Abstrak memuat secara singkat tentang latar belakang, tujuan, metode, hasil yang signifikan, kesimpulan dan implikasi hasil penelitian. Abstrak berisi maksimum 200 kata, spasi tunggal. Di bawah abstrak dicantumkan kata kunci yang terdiri atas maksimum enam kata, dimana kata pertama adalah yang terpenting. Abstrak dalam Bahasa Inggris merupakan terjemahan dari Bahasa Indonesia. Editor berhak untuk mengedit abstrak demi alasan kejelasan isi abstrak.

4. Pendahuluan

Pendahuluan berisi latar belakang, permasalahan dan tujuan penelitian. Perlu disebutkan juga studi terdahulu yang pernah dilakukan terkait dengan penelitian yang dilakukan.

5. Bahan dan cara kerja

Bahan dan cara kerja berisi informasi mengenai metoda yang digunakan dalam penelitian. Pada bagian ini boleh dibuat sub-judul yang sesuai dengan tahapan penelitian. Metoda harus dipaparkan dengan jelas sesuai dengan standar topik penelitian dan dapat diulang oleh peneliti lain. Apabila metoda yang digunakan adalah metoda yang sudah baku cukup ditulis sitasinya dan apabila ada modifikasi maka harus dituliskan dengan jelas bagian mana dan hal apa yang dimodifikasi.

6. Hasil

Hasil memuat data ataupun informasi utama yang diperoleh berdasarkan metoda yang digunakan. Apabila ingin mengacu pada suatu tabel/grafik/diagram atau gambar, maka hasil yang terdapat pada bagian tersebut dapat diuraikan dengan jelas dengan tidak menggunakan kalimat 'Lihat Tabel 1'. Apabila menggunakan nilai rata-rata maka harus menyertakan pula standar deviasinya.

7. Pembahasan

Pembahasan bukan merupakan pengulangan dari hasil. Pembahasan mengungkap alasan didapatkannya hasil dan arti atau makna dari hasil yang didapat tersebut. Bila memungkinkan, hasil penelitian ini dapat dibandingkan dengan studi terdahulu.

8. Kesimpulan

Kesimpulan berisi infomasi yang menyimpulkan hasil penelitian, sesuai dengan tujuan penelitian, dan penelitian berikutnya yang bisa dilakukan.

9. Ucapan terima kasih

Bagian ini berisi ucapan terima kasih kepada suatu instansi jika penelitian ini didanai atau didukungan oleh instansi tersebut, ataupun kepada pihak yang membantu langsung penelitian atau penulisan artikel ini.

10. Daftar pustaka

Pada bagian ini, tidak diperkenankan untuk mensitis artikel yang tidak melalui proses *peer review*. Apabila harus menyitir dari "laporan" atau "komunikasi personal" dituliskan '*unpublished*' dan tidak perlu ditampilkan di daftar pustaka. Daftar pustaka harus berisi informasi yang *up to date* yang sebagian besar berasal dari *original papers* dan penulisan terbitan berkala ilmiah (nama jurnal) tidak disingkat.

Format naskah

1. Naskah diketik dengan menggunakan program Microsoft Word, huruf New Times Roman ukuran 12, spasi ganda kecuali Abstrak. Batas kiri-kanan atas-bawah masing-masing 2,5 cm. Maksimum isi naskah 15 halaman termasuk ilustrasi dan tabel.

2. Penulisan bilangan pecahan dengan koma mengikuti bahasa yang ditulis menggunakan dua angka desimal di belakang koma. Apabila menggunakan Bahasa Indonesia, angka desimal ditulis dengan menggunakan koma (,) dan ditulis dengan menggunakan titik (.) bila menggunakan bahasa Inggris. Contoh: Panjang buku adalah 2,5 cm. Length of the book is 2,5 cm. Penulisan angka 1-9 ditulis dalam kata kecuali bila bilangan satuan ukur, sedangkan angka 10 dan seterusnya ditulis dengan angka. Contoh lima orang siswa, panjang buku 5 cm.

3. Penulisan satuan mengikuti aturan international system of units.

4. Nama takson dan kategori taksonomi ditulis dengan merujuk kepada aturan standar yang diajukan. Untuk tumbuhan menggunakan *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN), untuk hewan menggunakan *International Code of Zoological Nomenclature* (ICZN), untuk jamur *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plant* (ICNFP), *International Code of Nomenclature of Bacteria* (ICNB), dan untuk organisme yang lain merujuk pada kesepakatan Internasional. Penulisan nama takson lengkap dengan nama author hanya dilakukan pada bagian deskripsi takson, misalnya pada naskah taksonomi. Penulisan nama takson untuk bidang lainnya tidak perlu menggunakan nama author.

5. Tata nama di bidang genetika dan kimia merujuk kepada aturan baku terbaru yang berlaku.

6. Ilustrasi dapat berupa foto (hitam putih atau berwarna) atau gambar tangan (*line drawing*).

7. Tabel

Tabel diberi judul yang singkat dan jelas, spasi tunggal dalam bahasa Indonesia dan Inggris, sehingga Tabel dapat berdiri sendiri. Tabel diberi nomor urut sesuai dengan keterangan dalam teks. Keterangan Tabel diletakkan di bawah Tabel. Tabel tidak dibuat tertutup dengan garis vertikal, hanya menggunakan garis horizontal yang memisahkan judul dan batas bawah. Paragraf pada isi tabel dibuat satu spasi.

8. Gambar

Gambar bisa berupa foto, grafik, diagram dan peta. Judul gambar ditulis secara singkat dan jelas, spasi tunggal. Keterangan yang menyertai gambar harus dapat berdiri sendiri, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Gambar dikirim dalam bentuk .jpeg dengan resolusi minimal 300 dpi, untuk *line drawing* minimal 600dpi.

9. Daftar Pustaka
Situs dalam naskah adalah nama penulis dan tahun. Bila penulis lebih dari satu menggunakan kata ‘dan’ atau et al. Contoh: (Kramer, 1983), (Hamzah dan Yusuf, 1995), (Premachandra *et al.*, 1992). Bila naskah ditulis dalam bahasa Inggris yang menggunakan sitasi 2 orang penulis maka digunakan kata ‘and’. Contoh: (Hamzah and Yusuf, 1995). Penulisan daftar pustaka, sebagai berikut:
 - a. **Jurnal**
Nama jurnal ditulis lengkap.
Agusta, A., Maehara, S., Ohashi, K., Simanjuntak, P. and Shibuya, H., 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(12), pp.1565-1569.
 - b. **Buku**
Merna, T. and Al-Thani, F.F., 2008. *Corporate Risk Management*. 2nd ed. John Welly and Sons Ltd. England.
 - c. **Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya**
Fidiana, F., Triyuwono, I. and Riduwan, A., 2012. Zakah Perspectives as a Symbol of Individual and Social Piety: Developing Review of the Meadian Symbolic Interactionism. *Global Conference on Business and Finance Proceedings. The Institute of Business and Finance Research*, 7(1), pp. 721 - 742
 - d. **Makalah sebagai bagian dari buku**
Barth, M.E., 2004. Fair Values and Financial Statement Volatility. Dalam: Borio, C., Hunter, W.C., Kaufman, G.G., and Tsatsaronis, K. (eds.) *The Market Discipline Across Countries and Industries*. MIT Press. Cambridge.
 - e. **Thesis, skripsi dan disertasi**
Williams, J.W., 2002. Playing the Corporate Shell Game: The Forensic Accounting and Investigation Industry, Law, and the Management of Organizational Appearance. *Dissertation*. Graduate Programme in Sociology. York University. Toronto. Ontario.
 - f. **Artikel online.**
Artikel yang diunduh secara online ditulis dengan mengikuti format yang berlaku untuk jurnal, buku ataupun thesis dengan dilengkapi alamat situs dan waktu mengunduh. Tidak diperkenankan untuk mensitis artikel yang tidak melalui proses peer review misalnya laporan perjalanan maupun artikel dari laman web yang tidak bisa dipertangung jawabkan kebenarannya seperti wikipedia.
Himman, L.M., 2002. A Moral Change: Business Ethics After Enron. San Diego University Publication. <http://ethics.sandiego.edu/LMH/oped/Enron/index.asp>. (accessed 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa inggris atau (diakses 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa indonesia

Formulir persetujuan hak alih terbit dan keaslian naskah

Setiap penulis yang mengajukan naskahnya ke redaksi Berita Biologi akan diminta untuk menandatangani lembar persetujuan yang berisi hak alih terbit naskah termasuk hak untuk memperbanyak artikel dalam berbagai bentuk kepada penerbit Berita Biologi. Sedangkan penulis tetap berhak untuk menyebarkan edisi cetak dan elektronik untuk kepentingan penelitian dan pendidikan. Formulir itu juga berisi pernyataan keaslian naskah yang menyebutkan bahwa naskah adalah hasil penelitian asli, belum pernah dan tidak sedang diterbitkan di tempat lain.

Penelitian yang melibatkan hewan

Setiap naskah yang penelitiannya melibatkan hewan (terutama mamalia) sebagai obyek percobaan / penelitian, wajib menyertakan '*ethical clearance approval*' terkait animal *welfare* yang dikeluarkan oleh badan atau pihak berwenang. Penelitian yang menggunakan mikroorganisme sebagai obyek percobaan, mikroorganisme yang digunakan wajib disimpan di koleksi kultur mikroorganisme dan mencantumkan nomor koleksi kultur pada makalah.

Lembar ilustrasi sampul

Gambar ilustrasi yang terdapat di sampul jurnal Berita Biologi berasal dari salah satu naskah yang dipublikasi pada edisi tersebut. Oleh karena itu, setiap naskah yang ada ilustrasinya diharapkan dapat mengirimkan ilustrasi atau foto dengan kualitas gambar yang baik dengan disertai keterangan singkat ilustrasi atau foto dan nama pembuat ilustrasi atau pembuat foto.

Proofs

Naskah *proofs* akan dikirim ke penulis dan penulis diwajibkan untuk membaca dan memeriksa kembali isi naskah dengan teliti. Naskah *proofs* harus dikirim kembali ke redaksi dalam waktu tiga hari kerja.

Naskah cetak

Setiap penulis yang naskahnya diterbitkan akan diberikan 1 eksemplar majalah Berita Biologi dan *reprint*. Majalah tersebut akan dikirimkan kepada *corresponding author*

Pengiriman naskah

Naskah dikirim secara online ke website berita biologi: http://e-journal.biologi.lipi.go.id/index.php/berita_biologi

Alamat kontak

Redaksi Jurnal Berita Biologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Cibinong Science Centre, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911
Telp: +61-21-8765067, Fax: +62-21-87907612, 8765063, 8765066,
Email: jurnalberitabiologi@yahoo.co.id atau
jurnalberitabiologi@gmail.com

BERITA BIOLOGI

Vol. 16 (3)

Isi (Content)

Desember 2017

P-ISSN 0126-1754

E-ISSN 2337-8751

MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

SINOPSIS <i>Begonia</i> LIAR DI SUMATERA BARAT [Synopsis of Wild <i>Begonia</i> in West Sumatra] Deden Girmansyah	219 – 231
KERAGAMAN JENIS DAN PREFERENSI EKOLOGI <i>Begonia</i> LIAR DI KAWASAN HUTAN SISA KEBUN RAYA CIBODAS [The Diversity and Ecological Preference of Wild <i>Begonia</i> in Remnant Forest Cibodas Botanic Gardens] Muhammad Efendi, Nur Azizah, Ateng Supriyatna dan Destri	233 – 241
CATATAN BEBERAPA JAMUR MAKRO DARI PULAU ENGGANO: DIVERSITAS DAN POTENSINYA [Notes on Some Macro Fungi From Enggano Island: Diversity and its Potency] Dewi Susan dan Atik Retnowati	243 – 256
ANALISA GENETIK PISANG HIBRID DIPLOID BERDASARKAN MARKA RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [Genetic Analysis of Diploid Banana Hybrid Based on RAPD Markers] Diyah Martanti, Yuyu S Poerba dan Herlina	257 – 264
KERAGAMAN BAKTERI PENGHASIL ENZIM PENGHIDROLISIS NITRIL DI PULAU ENGGANO BENGKULU [Diversity of Nitrilase Producing Bacteria in Enggano Island, Bengkulu] Rini Riffiani dan Nunik Sulistinah	265 – 277
KOMPOSISI DAN DOMINASI PATOTIPE <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , PENYEBAB PENYAKIT HAWAR DAUN BAKTERI PADA TANAMAN PADI DENGAN SISTEM PENGAIRAN BERBEDA DI KABUPATEN KARAWANG [The Composition and Domination of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> Pathotype, The Cause of Bacterial Leaf Blight on Rice Plants with Different of Irrigation System at Karawang District] Dini Yuliani dan Sudir	279 – 287
STRATIFIKASI SIMPANAN KARBON DIATAS PERMUKAAN TANAH PADA LAHAN GAMBUT PASANG SURUT DAN LEBAK [The Stratification of Above Ground C-Stock in Tidal Peatland and Fresh Water Swampland] Siti Nurzakiah, Nur Wakhid dan Dedi Nursyamsi	289 – 296
KAJIAN ETNOBOTANI PERUBAHAN FUNGSI LAHAN, SOSIAL DAN INISIATIF KONSERVASI MASYARAKAT PULAU ENGGANO [The Ethnobotanical Study of Land Use Change, Social Change and The Conservation Initiative of People in Enggano Island] Mohammad Fathi Royyani, Vera Budi Lestari Sihotang dan Oscar Efendy	297 – 307
REPRODUCTIVE BIOLOGY OF STRIPED SNAKEHEAD (<i>Channa striata</i> Bloch, 1973) IN BOGOR AND BEKASI, WEST JAVA [Biologi Reproduksi Ikan Gabus (<i>Channa striata</i> Bloch, 1973) di Bogor dan Bekasi, Jawa Barat] Adang Saputra, M.H. Fariduddin Ath-thar dan Reza Samsudin, Fera Permata Putri, and Vitas Atmadi Prakoso	309 – 314
PENGUJIAN FERTILITAS PATIN PASUPATI SECARA INTERNAL DAN EKSTERNAL MENGGUNAKAN PATIN SIAM <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Sauvage, 1878) DAN PATIN JAMBAL <i>Pangasius djambal</i> Bleeker, 1846 [Fertility Evaluation of Pasupati Pangasiid Catfish Internaly and Externaly Using Striped Pangasiid Catfish <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Sauvage, 1878) and Jambal Pangasiid Catfish <i>Pangasius djambal</i> Bleeker, 1846] Evi Tahapari dan Bambang Iswanto	315 – 323
<u>KOMUNIKASI PENDEK (SHORT COMMUNICATION)</u>	
STRUKTUR STOMATA DAUN BEBERAPA TUMBUHAN KANTONG SEMAR (<i>Nepenthes</i> spp.) [Structure of Leaves Stomata on Some Pitcher Plants (<i>Nepenthes</i> spp.)] Lince Meriko dan Abizar	325 – 330