

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Peremajaan Bakteri *Paenibacillus* sp. dan *Bacillus subtilis* RRM-1

Bakteri *Paenibacillus* sp. dan *Bacillus subtilis* RRM-1 yang sudah dilakukan peremajaan pada media LB Agar miring dan diinkubasi selama 24 jam didapatkan hasil yang dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil peremajaan bakteri A) *Bacillus subtilis* RRM-1, B) *Paenibacillus* sp.

Peremajaan bakteri bertujuan untuk membuat isolat tetap hidup dengan cara memindahkan bakteri ke media lain (Murtiyaningsih, 2017). Peremajaan bakteri juga bertujuan untuk meregenerasi atau memperbarui sel bakteri, menjaga ketersediaan nutrisi dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari kultur murni yang ditanam (Saropah, *et al.* 2012). Peremajaan bakteri penting dilakukan setelah penyiapan kultur agar bakteri memulai metabolismenya kembali (Wijayati, 2014).

4.2 Mutasi Bakteri *Paenibacillus* sp. dan *Bacillus subtilis* RRM-1 dengan Sinar Ultraviolet (UV)

Bakteri *Paenibacillus* sp. dan *Bacillus subtilis* RRM-1 yang sudah dimutasi dengan sinar ultraviolet (UV) pada jarak 15 cm kemudian didapat hasil *Total Plate Count* (TPC). Hasil *Total Plate Count* (TPC) dapat dilihat pada Lampiran 8.

Selanjutnya dihitung nilai *survival rate* dari tiap-tiap perlakuan lama paparan sinar ultraviolet (UV) (0, 30, 60, 90 dan 120 menit). Tujuan dilakukannya perhitungan *survival rate* adalah untuk mendapatkan bakteri mutan dengan nilai *survival rate* 1%. Perhitungan nilai *survival rate* ditunjukkan Lampiran 14. Hasil perhitungan *survival rate* terhadap mutagenesis bakteri perlakuan waktu penyinaran sinar ultraviolet (UV) ditunjukkan pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil *Survival Rate* Bakteri *Paenibacillus* sp.

Sampel	Waktu (menit)	Survival Rate %
PS C	0	100
PS 30	30	3.89
PS 60	60	4.46
PS 90	90	3.31
PS 120	120	1.15*

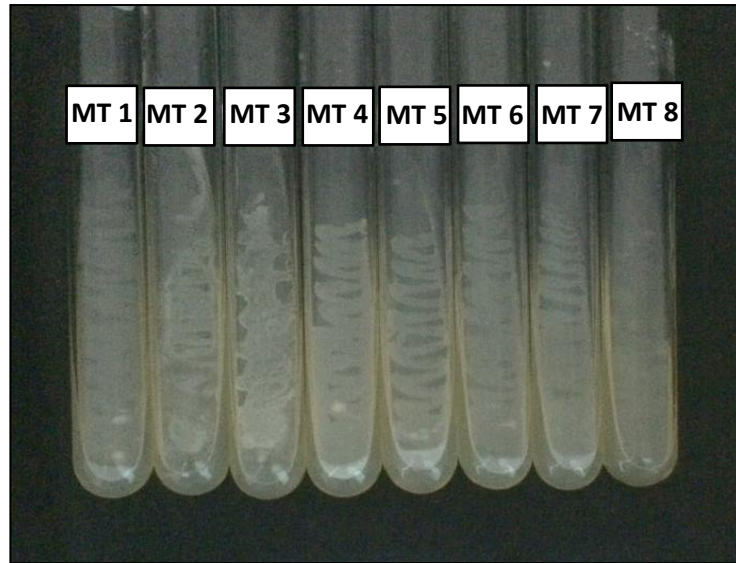
Keterangan: **survival rate* terbaik

Tabel 2. Hasil *Survival Rate* Bakteri *Bacillus subtilis* RRM-1

Sampel	Waktu (menit)	Survival Rate (%)
BS C	0	100
BS 30	30	4.36
BS 60	60	3.80
BS 90	90	3.95
BS 120	120	0.90*

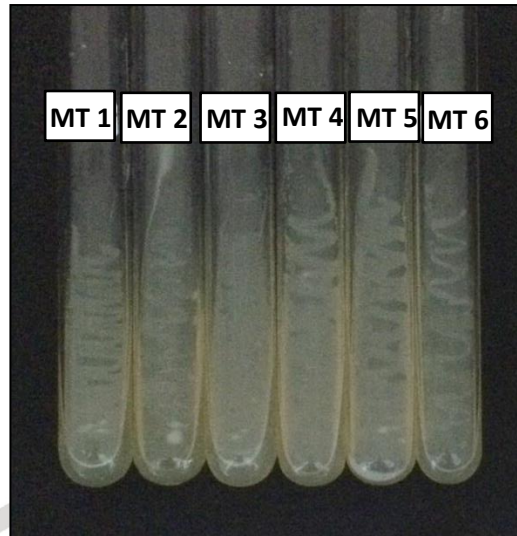
Keterangan: **survival rate* terbaik

Pada Tabel 1, hasil perhitungan *survival rate* pada bakteri *Paenibacillus* sp. setelah dimutasi dengan sinar ultraviolet (UV) pada jarak 15 cm dengan perlakuan waktu (0, 30, 60, 90 dan 120 menit) menunjukkan bahwa perlakuan waktu paparan sinar ultraviolet antara 30-90 menit bakteri yang masih hidup berkisar 3,88%. Nilai *survival rate* 1% adalah perlakuan waktu paparan sinar ultraviolet (UV) selama 120 menit dengan nilai *survival rate* 1,15%, kode sampel (PS 120). Sampel (PS 120) menghasilkan 8 koloni bakteri mutan *Paenibacillus* sp. (MT 1, MT 2, MT 3, MT 4, MT 5, MT 6, MT 7 dan MT 8). Isolat murni bakteri mutan *Paenibacillus* sp. dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9.Isolat murni bakteri mutan *Paenibacillus* sp.

Pada Tabel 2, hasil perhitungan *survival rate* pada bakteri *Bacillus subtilis* RRM-1 setelah dimutasi dengan sinar ultraviolet (UV) pada jarak 15 cm dengan perlakuan waktu (0, 30, 60, 90 dan 120 menit) juga menunjukkan hal yang tidak terlalu berbeda yaitu sampel bakteri dengan perlakuan paparan sinar ultraviolet (UV) antara 30-90 menit memiliki nilai *survival rate* berkisar 4,45%. Bakteri *Bacillus subtilis* RRM-1 yang memiliki nilai *survival rate* mencapai 1% adalah perlakuan waktu paparan sinar UV selama 120 menit dengan nilai *survival rate* 0,90%, kode sampel (BS 120). Sampel (BS 120) menghasilkan 6 koloni bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1 (MT 1, MT 2, MT 3, MT 4, MT 5 dan MT 6). Isolat murni bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1 dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10.Isolat murni bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1

Berdasarkan hasil *survival rate* pada kedua bakteri tersebut yang memiliki nilai *survival rate* mencapai 1% adalah pada perlakuan mutasi dengan paparan sinar ultraviolet (UV) selama 120 menit, hal ini dapat terjadi karena semakin lama bakteri terpapar dengan sinar ultraviolet (UV) maka semakin banyak sel dalam bakteri tersebut yang akan bermutasi sehingga dapat memperlemah atau bahkan merusak fungsi-fungsi vital dan menyebabkan kematian pada bakteri. Hasil penelitian Ariyadi dan Dewi (2009), juga melaporkan hal yang sama, dimana jumlah bakteri *Bacillus subtilis* RRM-1 setelah disinari dengan sinar ultraviolet (UV) dengan intensitas waktu yang semakin lama memiliki hasil koloni bakteri yang semakin sedikit atau bahkan tidak ada lagi bakteri yang tumbuh.

Sinar ultraviolet mempunyai kemampuan untuk melakukan penetrasi kedinding sel mikroorganisme dan mengubah komposisi asam nukleatnya. Absorpsi ultraviolet oleh DNA mikroorganisme dapat menyebabkan mutasi gen dimana mikroorganisme tidak mampu melakukan replikasi akibat pembentukan ikatan rangkap dua pada molekul-molekul pirimidin (Cahyonugroho, 2010). Miller, *et al.* (1999) juga menambahkan bahwa cahaya UV merusak DNA mikroorganisme dengan membentuk dimer timin. Dimer tersebut mencegah

mikroorganisme dari transkripsi dan replikasi DNA yang akhirnya akan menyebabkan kematian sel.

Nilai *survival rate* 1% bakteri yang masih hidup merupakan bakteri mutan yang terbentuk dari hasil mutagenesis menggunakan sinar ultraviolet karena adanya DNA atau kromosom berubah. Susunan kromosom atau DNA bakteri yang sudah berubah dapat menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap sinar ultraviolet (UV). Hal tersebut telah di jelaskan oleh McManus (1997) bahwa bakteri dapat menjadi resisten terhadap agen antibiotik karena terjadi evolusi vertikal. Evolusi vertikal terjadi akibat adanya mutasi kromosom atau mutasi spontan dan proses seleksi oleh agen antibiotik. Bakteri yang sensitif terhadap antibiotik akan mati, sedangkan yang resisten akan bertahan dan memperbanyak diri.

Mutasi kromosom sendiri menurut Sutapa dan Kasmawan (2016), mutasi kromosom merupakan struktur didalam sel berupa deret panjang molekul yang terdiri dari satu molekul DNA yang menghubungkan gen. Kromosom memiliki dua lengan, yang panjangnya kadang sama dan kadang tidak sama, lengan-lengan itu bergabung pada sentromer (lokasi menempelnya benang *spindel* selama pembelahan mitosis dan meiosis). Pengaruh bahan mutagen, khususnya radiasi, yang paling banyak terjadi pada kromosom tanaman adalah pecahnya benang kromosom (*Chromosome breakage* atau *chromosome aberration*).

4.3 Aktivitas Enzim L-Asparaginase Bakteri Mutan *Paenibacillus* sp. dan *Bacillus subtilis* RRM-1

4.3.1 Bakteri Mutan *Paenibacillus* sp.

Bakteri mutan *Paenibacillus* sp. dengan nilai *survival rate* terbaik (PS 120) dilakukan skrinning enzim dengan cara menumbuhkan bakteri pada media M9 *broth* yang mengandung L-asparagin untuk mengetahui aktivitas hidrolisis yang ditunjukkan dengan perubahan warna biru pada media M9 *broth* sebagai media

tumbuh bakteri mutan selama 3 hari pengamatan. Pada bakteri mutan *Paenibacillus* sp. dari 8 bakteri mutan didapatkan hasil hanya 1 bakteri mutan saja yang mengalami perubahan warna hampir sama dengan kontrol (*wild type*) pada hari ke-3. Kontrol (*wild type*) merupakan bakteri *Paenibacillus* sp. yang tidak mendapat perlakuan mutasi. Hasil aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Paenibacillus* sp. pada hari ke-1 sampai hari ke-3 dapat dilihat pada Lampiran 10. Hasil aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Paenibacillus* sp. pada hari ke-3 dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Hasil Aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Paenibacillus* sp. hari ke-3

Berdasarkan Gambar 11, mutan *Paenibacillus* sp. yang memiliki warna hijau kebiruan terpekat yaitu isolat WT. Mutan UV-7 dan UV-8 menunjukkan warna yang hampir sama dengan isolat WT yaitu kuning kehijauan. Sedangkan mutan lain seperti UV-6, UV-4, UV-1, UV-3, UV-2 dan UV-5 tidak menunjukkan adanya perubahan warna (kuning). *Bromothymol blue* (BTB) sebagai indikator perubahan warna apabila medium dalam kondisi asam akan berwarna kuning dan apabila kondisi pH basa akan berubah warna menjadi biru. Semakin besar zona berwarna biru yang dihasilkan maka semakin tinggi aktivitas hidrolisisnya (Mahajan, *et al.* 2013). Skoring aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Paenibacillus* sp. ditunjukkan pada Lampiran 11. Hasil skor aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Paenibacillus* sp. ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3.Skor aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Paenibacillus* sp.

Mutan	Nama Isolat	Skor	Keterangan
<i>Paenibacillus</i> sp.	WT*	10	Lemah
	UV 1	4	Tidak Ada
	UV 2	2	Tidak Ada
	UV 3	2	Tidak Ada
	UV 4	5	Tidak Ada
	UV 5	1	Tidak Ada
	UV 6	7	Tidak Ada
	UV 7*	8	Lemah
	UV 8*	8	Lemah

Keterangan: * aktivitas enzim lemah

Berdasarkan Tabel 3, aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Paenibacillus* sp. menunjukkan aktivitas enzim yang lemah yaitu mutan UV-7 dan UV-8 dengan nilai skor 8. Mutan UV-7 menunjukkan warna yang hampir sama dengan isolat WT (kontrol). Mutan lain seperti UV-6, UV-4, UV-1, UV-3, UV-2 dan UV-5 tidak menunjukkan adanya aktivitas enzim L-Asparaginase dengan nilai skor antara 1 sampai 7, karena tidak terjadi perubahan warna (kuning).

Tidak adanya peningkatan aktivitas enzim L-Asparaginase pada 8 bakteri mutan *Paenibacillus* sp. jika dibandingkan dengan WT (kontrol) menunjukkan mutagenesis menggunakan sinar ultraviolet (UV) tidak dapat meningkatkan produksi enzim L-Asparaginase. Hasil penelitian Haq, *et al.* (2010) juga menunjukkan hasil yang sama yaitu 17 bakteri mutan *Bacillus amyloliquefaciens* yang dimutasi dengan sinar UV, tidak ada peningkatan produksi enzim alfa amilase jika dibandingkan dengan isolat murni bakteri tersebut tanpa perlakuan mutasi.

Tidak adanya peningkatan aktivitas enzim L-Asparaginase pada bakteri mutan *Paenibacillus* sp. dapat terjadi karena UV mutagenesis merupakan metode mutasi yang bersifat mutasi acak (*random mutation*). Mutasi random menurut (Amin dan Murdiyatmo, 2014) ialah perlakuan mutagenesis yang diberikan tidak terarah dan tidak dapat diketahui ataupun ditentukan perubahan

gen yang terjadi sebelum mutagenesis. Menurut Ikehata dan Ono (2011) mutasi acak oleh radiasi sinar UV akan merusak rantai DNA dan urutan dari basa nitrogen sehingga akan memacu terbentuknya cilobutana pirimidin (CPD). Adanya CPD akan merubah susunan nuklotida (C – T). Penelitian Li (2009) juga melaporkan dengan UV mutagenesis urutan basa nitrogen pada DNA endogluconase bakteri *T.viride* pada urutan ke-50 berubah dari C menjadi T, perubahan tersebut mengubah asam amino yang diekspresikan dari semula alanine menjadi valin, sehingga merubah karakteristik dan kemampuan dari bakteri mutan *T.viride*.

4.3.2 Bakteri Mutan *Bacillus subtilis* RRM-1

Bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1 dengan nilai *survival rate* terbaik (BS 120) dilakukan skринing enzim dengan cara menumbuhkan bakteri pada media M9 *broth* modifikasi yang mengandung l-asparagin untuk mengetahui aktivitas hidrolisis yang ditunjukkan dengan perubahan warna biru pada media *broth* sebagai media tumbuh bakteri mutan selama 3 hari pengamatan. Pada bakteri *Bacillus subtilis* RRM-1 dari 6 isolat bakteri mutan didapatkan hasil hanya 1 bakteri mutan saja yang mengalami perubahan warna biru pada hari ke-3 jika dibandingkan dengan kontrol (*wild type*). *Wild type* merupakan bakteri *Bacillus subtilis* RRM-1 yang tidak mendapat perlakuan mutasi. Hasil aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1 pada hari ke-1 sampai hari ke-3 dapat dilihat pada Lampiran 12. Hasil aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1 pada hari ke-3 dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Hasil Aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Bacillus subtilis RRM-1* hari ke-3

Berdasarkan Gambar 12, mutan UV-6 dan UV-1 menunjukkan perubahan warna menjadi warna biru setelah hari ke-3. Mutan UV-6 menunjukkan warna biru pekat, sedangkan mutan UV-1 menunjukkan warna biru kehijauan. Perubahan medium pertumbuhan menjadi warna biru disebabkan karena adanya aktivitas enzim L-asparaginase yang mengubah L-asparagin menjadi asam aspartat dan amonia. Pengeluaran amonia menyebabkan kenaikan pH media pertumbuhan bakteri (Gulati *et al.* 1997). Peningkatan aktivitas enzim L-Asparaginase ditandai dengan semakin pekat warna biru yang terlihat pada mutan UV-6. *Bromothymol blue* (BTB) sebagai indikator perubahan warna apabila medium dalam kondisi asam akan berwarna kuning dan apabila kondisi pH basa akan berubah warna menjadi biru. Semakin besar zona berwarna biru yang dihasilkan maka semakin tinggi aktivitas hidrolisisnya (Mahajan, *et al.* 2013). Skoring aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Bacillus subtilis RRM-1* ditunjukkan pada Lampiran 13. Hasil skor aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Bacillus subtilis RRM-1* ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4.Skor aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1

Mutan	Nama Isolat	Skor	Keterangan
<i>Bacillus subtilis</i> RRM-1	WT*	11	Lemah
	UV 1**	13	Sedang
	UV 2	6	Tidak ada
	UV 3	6	Tidak ada
	UV 4	8	Lemah
	UV 5	6	Tidak ada
	UV 6***	15	Kuat

Keterangan: * aktivitas enzim L-Asparaginase lemah

** aktivitas enzim L-Asparaginase sedang

*** aktivitas enzim L-Asparaginase kuat

Berdasarkan Tabel 4, aktivitas enzim L-Asparaginase bakteri mutan *Bacillus subtilis* RRM-1 menunjukkan aktivitas enzim L-Asparaginase yang kuat yaitu mutan UV-6 dengan nilai skor 15, selanjutnya mutan UV-1 menunjukkan aktivitas enzim L-Asparaginase yang sedang yaitu dengan nilai skor 13, sedangkan isolat WT (kontrol) dan UV-4 menunjukkan aktivitas enzim yang lemah nilai skor 11 dan 8. Mutan lain seperti UV-2, UV-3 dan UV-5 tidak menunjukkan adanya aktivitas enzim L-Asparaginase dengan nilai skor 6.

Tingginya aktivitas enzim L-Asparaginase pada mutan UV-6 jika dibandingkan dengan isolat WT (kontrol) menunjukkan mutagenesis menggunakan sinar ultraviolet dapat meningkatkan produksi enzim L-Asparaginase. Peningkatan aktivitas enzim L-Asparaginase ditandai dengan semakin pekat warna biru yang terlihat pada mutan UV-6 jika dibandingkan dengan isolate WT (kontrol). Hasil penelitian Erumalla, *et al.* (2018) juga menunjukkan hasil yang sama yaitu seluruh sampel bakteri mutan *Bacillus thuringiensis* dengan perlakuan mutasi sinar ultraviolet memiliki produksi enzim maksimum dibandingkan dengan isolat murni bakteri *Bacillus thuringiensis* sebesar 90.67 ± 0.83 IU/ml.

Aktivitas enzim L-Asparaginase yang meningkat dapat disebabkan oleh gen yang bertugas untuk memproduksi enzim L-Asparaginase meningkat pada DNA karena adanya mutasi oleh sinar ultraviolet. Penelitian Verma, *et al.* (2016), mengenai peningkatan aktivitas *lacase* oleh bakteri *Pseudomonas putida* yang sudah dimutasi dengan mutagen fisik (UV). Peningkatan aktivitas enzim oleh isolat bakteri mutan dapat terjadi karena mutasi membuat jumlah salinan gen atau ekspresi gen yang menghasilkan aktivitas enzim meningkat. Mutagen dapat membawa transisi dari tymine-guanin (AT) menjadi cytosine-adenine (GC).

