

**LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN HIBAH BERSAING**



**Produksi biohidrogen secara langsung dari media  
berbahan limbah lignoselulosa melalui peningkatan  
kualitas strain *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23**

**Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun**

**TIM PENGUSUL**

**Dr. Dra. Mariana Wahjudi, M.Si. (NIDN 0723076301)**

**Yusnita Liasari, S.TP., M.P. (NIDN 0737038504)**

**UNIVERSITAS SURABAYA**

**November 2014**

**LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN HIBAH BERSAING**



**Produksi biohidrogen secara langsung dari media  
berbahan limbah lignoselulosa melalui peningkatan  
kualitas strain *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23**

**Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun**

**TIM PENGUSUL**

**Dr. Dra. Mariana Wahjudi, M.Si. (NIDN 0723076301)**

**Yusnita Liasari, S.TP., M.P. (NIDN 0737038504)**

**UNIVERSITAS SURABAYA**

**November 2014**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Produksi biohidrogen secara langsung dari media  
berbahan limbah lignoselulosa melalui  
peningkatan kualitas strain *Bacillus subtilis*  
subsp. spizizenii W23

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 113 / Biologi (dan Bioteknologi Umum)

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dra. Mariana Wahjudi, M.Si., PhD  
b. NIDN : 0723076301  
c. Jabatan Fungsional : Lektor 200  
d. Nomor HP : 087752686056  
e. Alamat surel (e-mail) : mariana\_wahyudi@staff.ubaya.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Yusnita Liasari., S.TP., M.P  
b. NIDN : 0727038504  
c. Perguruan Tinggi : Universitas Surabaya

Penelitian Tahun ke : 1

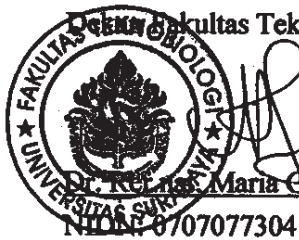
Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp. 65.000.000,-

Biaya Tahun Berjalan : - diusulkan ke DIKTI Rp. 65.000.000,-  
- dana internal PT Rp. 0,-  
- dana instritusi lain Rp. 0,-  
- inkind Rp. 0,-

Surabaya, 07 November 2014

Mengetahui,

Dean Fakultas Teknobiologi



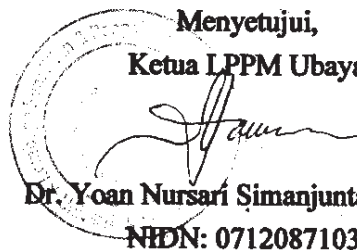
Dr. Maria Goretti M. Purwanto  
NIDN: 0707077304

Ketua Peneliti,

Dr. Dra. Mariana Wahjudi, M.Si.  
NIDN 0723076301

Menyetujui,

Ketua LPPM Ubaya



Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, S.H., M.Hum.  
NIDN: 0712087103

## RINGKASAN

Menipisnya cadangan minyak bumi dan isu pemanasan global telah meningkatkan minat pengembangan sumber energi alternatif terbarukan yang lebih ramah lingkungan, seperti etanol dan hidrogen. Di Indonesia limbah pertanian dan rumah tangga terdapat berlimpah dengan komponen utamanya adalah bahan lignocelulosa. Limbah ini tidak bisa digunakan secara langsung oleh bakteri penghasil H<sub>2</sub>. Sedangkan *Bacillus subtilis*, bakteri pengurai lignoselulase telah dimanfaatkan secara komersial untuk produksi enzim selulase, tetapi belum dimanfaatkan secara maksimal untuk menghasilkan H<sub>2</sub>. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan mutasi *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23 dengan transposon, melakukan pengujian awal transformasi dalam hal kemampuannya menghasilkan H<sub>2</sub> dan menganalisis posisi penyisipan transposon pada mutant. Mutasi acak dilakukan dengan transformasi protoplas sel *B. subtilis* subsp. *spizizenii* W23 dengan plasmid pUTmini-Tn5-*luxCDABE*-Km. Proses skrining dilakukan berdasarkan penurunan pH media seleksi oleh mutan secara visual dan spektrofotometri. Produksi biogas oleh mutan dilakukan pada media kompleks. Penentuan posisi penyisipan transposon pada DNA genomik ditentukan secara *inverse polymerase chain reaction* (i-PCR) dan sekuensing urutan DNA hasil amplifikasi. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa mutan-mutan *B. subtilis spizizenii* W23 telah berhasil dikonstruksi melalui *transposon mutagenesis*, diperoleh 131 koloni *B. subtilis spizizenii* W23 mutan *transposon*, yang mengindikasikan penurunan produksi asam dan dua diantaranya yaitu mutan no. 99 dan 126 menunjukkan peningkatan produksi biogas dibandingkan *wild-type*. Penentuan posisi transposon pada genome mutant 99 dan 126 menunjukkan bahwa transposon kemungkinan menyisip di 2 lokasi, sedang urutan DNA sebelah kiri transposon sedang dianalisa secara sequencing.

## PRAKATA

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmatNya penelitian ini dapat terlaksana.

Masalah energi telah menjadi isu global di seluruh dunia tidak hanya di Indonesia. Kebutuhan manusia modern akan energi melonjak pesat di abad 21 ini, disebabkan oleh kemajuan teknologi dan gaya hidup modern yang menyerap sumber daya energy secara besar-besaran. Namun kebutuhan energi ini tidak diimbangi dengan ketersediaan sumber daya alam konvensional yang ada. Penggalian sumber daya alam secara besar-besaran dan tidak bijaksana di masa lampau menyebabkan ketersediaan sumber energi konvensional ini menipis bahkan terancam habis. Sumber daya alam yang ada di seluruh dunia saat ini diprediksi akan habis dalam kurun waktu yang singkat, kurang dari 50 tahun bahkan bisa lebih cepat dari prediksi tersebut.

Berbagai upaya pencarian alternative sumber daya alami telah banyak diupayakan. Di sisi lain, perlu dipikirkan mengenai pemanasan global dan pencemaran lingkungan. Sumber energi alternative yang diidamkan adalah yang bisa terbarukan, aman bagi lingkungan dan terjangkau oleh masyarakat luas.

*Bacillus subtilis* telah banyak dimanfaatkan di industry untuk menghasilkan berbagai produk seperti enzim-enzim (termasuk lignoselulase), berbagai protein dan metabolit sekunder seperti antibiotika. Di bidang ekologi lingkungan, bakteri ini banyak dimanfaatkan untuk mengolah sampah, yang dipandang aman bagi lingkungan sesuai dengan habitat alaminya. Pada penelitian ini, strain *Bacillus subtilis* spizizenii W23 akan dikonstruksi agar memiliki sifat tambahan lainnya, yaitu menguraikan limbah lignoselulosa sekaligus juga menghasilkan biogas.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini jauh dari sempurna. Segala saran dan masukan akan sangat bermanfaat bagi penyempurnaan hasil penelitian ini. Akhir kata, penulis mengucapkan terima kasih pada pemerintah Indonesia yang memberikan dana bagi penelitian ini, melalui Dana Penelitian Hibah Bersaing.

Surabaya, November 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL .....	1
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
Transposon dan proses mutasi .....	3
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> W23.....	3
Gas Hidrogen (H <sub>2</sub> ) dan Pemanfaatannya .....	4
Produksi Gas H <sub>2</sub> .....	5
Produksi Biohidrogen melalui Fermentasi Gelap.....	5
Bakteri Penghasil Gas H <sub>2</sub> .....	6
Jalur Metabolisme Glukosa dalam Produksi Gas H <sub>2</sub> oleh bakteri melalui Fermentasi Gelap.....	7
Mutasi untuk pembentukan H <sub>2</sub> pada bakteri <i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> ADH43 .....	7
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	9
Tujuan Penelitian .....	9
Manfaat Penelitian .....	9
BAB 4. METODE PENELITIAN .....	10
4.1 Bahan dan Alat .....	10
4.2 Media dan Pereaksi .....	11
4.3 Proses Mutasi Sel <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 Dengan Transposon.....	12
4.4 Seleksi Mutan Spesifik.....	13
4.5 Pengujian Kemampuan Transforman Menghasilkan Biogas.....	13
4.6 Penyimpanan / Pengoleksian Kultur Mutant .....	14
4.7 Penentuan Lokasi Penyisipan Transposon pada Genom Mutant.....	14
BAB 5. HASIL YANG DICAPAI.....	17
5.1 Hasil Transformasi dan Seleksi <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 Transforman .....	17
5.2 Hasil Uji Awal Produksi Biogas oleh <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 Mutan pada Media Kompleks .....	25
5.3 Analisa Posisi Transposon pada DNA Genomik Mutan .....	29

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....	32
DAFTAR PUSTAKA .....	33
LAMPIRAN .....	36

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1 Pengaturan kondisi PCR.....	15
4.2 Primer yang digunakan .....	15
5.1 Pembentukan Biogas Sel <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 <i>wild type</i> dan mutan-mutan serta <i>E. aerogenes</i> ADH43 pada Media Kompleks .....	26
5.2 Kadar DNA genomik hasil ekstraksi dari sel <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 <i>Wild-Type</i> , Mutan 99 dan Mutan 126.....	30

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
4.1. Skema kerja penelitian.....	16
5.1 Koloni <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 Transforman pada Media LB-Kan .....	18
5.2 Transforman <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 No. 1-56 pada Media <i>Phenol Red Glucose Agar</i> Sebelum dan Setelah Inkubasi 6 Jam . .....	19
5.3 Kultur sel <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 <i>Wild-Type</i> dan beberapa Mutan pada Media PRTB .....	23
5.4 Spektrogram kultur <i>B. subtilis</i> W23 <i>Wild-Type</i> , Mutan 4, 87, 88, 99, 119 dan 126 pada media PRGB pada Panjang Gelombang 500-600 nm .....	24
5.5 Pembentukan Biogas oleh sel <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 <i>Wild-Type</i> dan Mutan 99 dan 126 pada Media Kompleks. ....	27
5.6 <i>Scaled up</i> produksi biogas oleh sel <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 <i>Wild-Type</i> , Mutan 99 dan 126 pada media kompleks.....	28
5.7 DNA genomik hasil ekstraksi dari sel <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 <i>Wild-Type</i> , Mutan 99 dan 126 .....	29
5.8 Hasil amplifikasi secara PCR urutan DNA disebelah kanan dan kiri transposon pada DNA genomik Mutan 99 dan 126 .....	30
5.9 Hasil amplifikasi secara PCR urutan DNA di sebelah kiri transposon pada DNA genomik Mutan 99 dan 126 .....	31

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b>	<b>Halaman</b>
1 Koleksi kultur <i>B. subtilis spizizenii</i> W23 mutant transposon .....	36
2 Bukti pengiriman sampel <i>sequencing</i> DNA produk PCR bagian kiri transposon .....	37
3 Artikel Ilmiah pada seminar internasional .....	38
4 Sertifikat sebagai pembicara.....	44
5 Schedule Acara ICMR2014 .....	45