

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENDEGRADASI
PHENANTHRENE PADA LUMPUR MANGROVE DENGAN
MENGUNAKAN GEN 16S rRNA**

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

**Disusun Oleh:
ADE DWI IFANI
H71216045**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA**

2021

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Ade Dwi Ifani

NIM : H71216045

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul "ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENDEGRADASI *PHENANTHRENE* PADA LUMPUR MANGROVE DENGAN MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA". Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 08 Januari 2021

Yang menyatakan,



(Ade Dwi Ifani)

NIM. H71216045

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Sripsi oleh

NAMA : ADE DWI IFANI

NIM : H71216045

JUDUL : ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENDEGRADASI
PHENANTHRENE PADA LUMPUR MANGROVE DENGAN
MENGUNAKAN GEN 16S rRNA

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan

Surabaya, 07 Januari 2021

Dosen Pembimbing I



Nirmala Fitria F., M. Si.
NIP. 198506252011012010

Dosen Pembimbing II



Atiqoh Zummah, M. Sc.
NIP. 199111112019032026

LEMBAR PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Ade Dwi Ifani ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 08 Januari 2021

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Dosen Penguji I



(Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si)
NIP. 198506252011012010

Dosen Penguji II



(Atiqoh Zummah, M.Sc)
NIP. 199111112019032026

Dosen Penguji III



(Dr. Moch. Irfan Hadi, M.KL.)
NIP. 198604242014031003

Dosen Penguji IV



(Drs. Abdul Manan, M.Pd.I)
NIP. 197006101998031002

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya



(Dr. Hj. Evi Fatimatur Rusydiyah, M.Ag.)
NIP. 1972312272005012003



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Ade Dwi Ifani
NIM : H71216045
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/BIOLOGI
E-mail address : adedwi.14@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

kripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENDEGRADASI *PHENANTHRENE* PADA
LUMPUR MANGROVE DENGAN MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 20 Januari 2021

Penulis



(Ade Dwi Ifani)

sebagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)” (QS 30:41).

Dari Surat Ar Rum ayat 41 di atas, menjelaskan bahwa telah terjadi kerusakan di darat maupun dilautan, contohnya terjadi kerusakan penghidupan mereka (segala makhluk hidup), dan terjadi turunnya musibah, serta turunnya penyakit yang menimpa manusia, makhluk Allah SWT yang lainnya yang disebabkan oleh perbuatan buruk yang telah dilakukan mereka yaitu manusia. Kerusakan yang dilakukan oleh tangan-tangan manusia seperti pengeboran, pengolahan, dan lain sebagainya, dapat menyebabkan pencemaran laut maupun di darat. Maka Maha Suci Allah yang mengaruniakan nikmat dengan musibah dan memberikan sebagian musibah yaitu hukuman bagi manusia agar manusia kembali sadar akan apa yang telah diperbuat buruk oleh mereka, agar mereka (manusia) bertobat dari perbuatan yang tidak baik.

Aktivitas pencemaran tersebut kemudian dapat mengakibatkan seluruh ekosistem laut ikut tercemar yang kemudian dikonsumsi oleh masyarakat melalui jenis binatang yang hidup di perairan laut. Polusi atau pencemaran minyak yang terjadi di laut ini sangatlah berbahaya. Minyak bumi yang tersusun dari beberapa senyawa-senyawa hidrokarbon yang kompleks salah satunya yaitu PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) (Farini *et al.*, 2017).

Senyawa PAH termasuk senyawa yang memiliki sifat beracun, mutagenik, dan karsinogenik. Munculnya senyawa PAH ini di lautan mampu mengancam ekosistem dan kehidupan seluruh organisme laut, karena dapat menyebabkan tumor, kanker, dan hilangnya kemampuan respon pada tubuh

manusia hingga mematikan (Yetti *et al.*, 2016a). Pada kondisi tertentu, terdapat beberapa mikroba laut yang menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon dan sumber energi. Senyawa PAH memiliki kemampuan sebagai menyebabkan karsinogenik dan sifatnya beracun terhadap biota laut seperti ikan, diatom, gastropoda, dan remis (Riffiani, 2010).

Phenanthrene merupakan salah satu jenis dari senyawa PAH yang memiliki susunan dari gabungan antara tiga cincin benzena. Struktur dari *phenanthrene* merupakan gabungan dari senyawa alkil *phenanthrene* dan *anthracene* yang memiliki empat gugus karbon (tetrametil, dietil, metilpropil) (Supriyati, 2009a). Penelitian dari Rad *et al.*, (2014) mengatakan bahwa senyawa *phenanthrene* dapat dihilangkan atau dihapuskan dengan cara kimiawi seperti adsorpsi dengan suhu yang tinggi menggunakan adsorben karbon aktif. *Phenanthrene* dapat juga dihilangkan dengan cara biologis yaitu melalui proses fitoremediasi atau bioremediasi.

Bioremediasi merupakan proses penggunaan mikroorganisme untuk mendegradasi kontaminan disuatu lingkungan untuk pembersihan ekosistem yang telah tercemar minyak bumi, logam, PAH, dan polutan-polutan lainnya menjadi bentuk yang tidak mengandung racun. Biodegradasi hidrokarbon minyak bumi dapat dilakukan dengan penambahan nutrien yang disebut dengan biostimulasi untuk merangsang aktivitas mikroba asli yang berasal dari area tercemar dalam mendegradasi polutan (Fretes *et al.*, 2019).

Terjadinya aktivitas pencemaran yang terjadi di laut diakibatkan oleh tumpahan serta pengeboran minyak yang berimbas ke lahan mangrove. Mangrove menyediakan lahan ekosistem yang sangat produktif untuk

berbagai flora, fauna, serta mikroorganisme karena mempunyai keragaman yang cukup tinggi. Adanya keragaman mikroorganisme yang semakin tinggi menyebabkan kebutuhan nutrisi yang ikut tinggi sehingga, mikroorganisme bertanggung jawab terhadap proses degradasi dan pembentukan senyawa-senyawa yang ada didalam sedimen mangrove (Fretes *et al.*, 2019). Mangrove mempunyai beragam kelompok mikroorganisme yang ada didalam sedimen, mikroorganisme tersebut mampu mendegradasi senyawa poliaromatik (Guo *et al.*, 2010). Hasil didegradasi oleh bakteri senyawa *phenanthrene* senyawa yang sederhana dan tidak berbahaya yaitu menjadi air dan karbondioksida (Iwabuchi dan Harayama, 1998).

Beberapa bakteri yang telah diketahui dapat mendegradasi senyawa PAH di dalam minyak bumi yaitu, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, dan *Sphingomonas*(Kasai *et al.*, 2002). Strain yang telah dicirikan sejauh ini dalam literatur secara taksonomi dan terutama pada Genus *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, dan *Mycobacterium*(Aitken *et al.*, 1998). Bakteri yang dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon dalam minyak bumi dapat ditemukan di laut, terutama senyawa poliaromatik hidrokarbon yang telah menyebar di daerah yang tercemar (Fretes *et al.*, 2019). Bakteri laut mempunyai kemampuan yaitu dapat mendegradasi senyawa PAH. Senyawa tersebut dapat terdegradasi oleh bakteri laut bergantung dengan faktor luar seperti kondisi lingkungannya, berupa pH, suhu, oksigen, dan sumber nutrisi yang lainnya (Yetti *et al.*, 2016a).

Bakteri poliaromatik hidrokarbon tidak dapat dengan mudah diidentifikasi secara morfologi, fisika, kimia, biokimia saja, tetapi dapat juga dengan menggunakan analisis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifikasi yang cukup tinggi, yaitu dengan menggunakan analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sekuensing gen 16S rRNA (16 *SvedbergribosomalRibonucleic Acid*) yang artinya satuan ukuran ribosom. Gen 16s rRNA juga sering disebut dengan 16S rDNA (16S *ribosomalDeoxyribosenucleic Acid*), tetapi menurut *American Society for Microbiology* (ASM), istilah 16S rRNA dinilai lebih tepat (Rinanda, 2011). Metode analisis dengan menggunakan gen 16S rRNA merupakan metode yang banyak digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri dan taksonomi. Gen 16S rRNA bakteri umumnya mengandung sembilan tempat *hypervariable* yang menunjukkan keragaman urutan yang cukup besar, diantaranya spesies bakteri yang berbeda dan dapat digunakan untuk identifikasi spesies (Chakravorty *et al.*, 2007).

Metode analisis PCR amplifikasi urutan gen target yang umumnya digunakan untuk penelitian yaitu primer universal (Chakravorty *et al.*, 2007). Teknik analisis menggunakan PCR didasarkan pada amplifikasi DNA spesifik terjadi dimana penggandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara saling terhubung dalam waktu yang relatif cukup singkat. Secara umum proses ini melalui tiga tahap yang berurutan yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan), dan *extention* atau *elongation* (pemanjangan) (Nursyirwani dan Amolle, 2007).

tetapi paling banyak umumnya 15 kelompok. PAH ditemukan secara alami dilingkungan, tetapi senyawa tersebut dapat juga buatan manusia (US EPA, 1990).

Senyawa PAH ini senyawa organik yang tersebar luas di alam, memiliki bentuk yang terdiri dari beberapa rantai siklik aromatik dan sifatnya hidrofobik (Ahmad, 2012). Sifat kestabilannya di alam, membuat senyawa PAH ini dapat tersebar secara meluas tanpa adanya pengurangan atas konsentrasi yang berasal dari senyawa itu sendiri (Viroso *et al.*, 2014). Nasib dari senyawa PAH di alam merupakan masalah lingkungan yang cukup besar, karena PAH memiliki sifat toksik, mutagenik, dan karsinogenik. Proses dekomposisi yang utama PAH di lingkungan ialah degradasi mikroba. PAH dengan berat molekul yang rendah seperti *naphthalene* dan *phenanthrene*, sedangkan yang relatif mudah terdegradasi seperti *acenaphthene*, *acenaphthylene*, dan *fluorene*. Salah satu jenis senyawa PAH yaitu antrasena yang memiliki ciri-ciri hampir sama dengan *phenanthrene* ialah jumlah cincin aromatik, tetapi jauh lebih sulit untuk didegradasi (Bastiaens *et al.*, 2000).

2.1.1. *Phenanthrene* (Phe)

Phenanthrene merupakan salah satu senyawa PAH trisiklik yang mengandung tiga cincin benzena menyatu, dan bahan utama untuk batubara dan bahan bakar fosil (Supaka *et al.*, 2001). Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{14}H_{10}$ dengan massa molar 17.2 g mol^{-1} . *Phenanthrene* ini juga disebut fenantrena memiliki bentuk padat yang tidak berwarna (putih) dengan titik lebur 100°C serta titik didih yaitu

mengurangi dampak dari penggunaan bahan kimia. Lingkungan yang telah terjadi pencemaran yang cukup lama serta kolam-kolam pembuangan dari olahan limbah kemungkinan terdapat bakteri pendegradasi minyak secara alamiah (Andhini *et al.*, 2018).

Bakteri yang mendegradasi senyawa hidrokarbon ialah bakteri yang mampu memutuskan ikatan karbon yang terdapat dalam senyawa hidrokarbon yang tergolong sebagai senyawa beracun, mutagenik, dan karsinogenik. Bakteri yang mampu dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon dapat diisolasi dari daerah yang telah lama terkena kontaminasi oleh senyawa hidrokarbon, seperti perairan yang ada di daerah sekitar tangki-tangki penyimpanan minyak bumi (Andhini *et al.*, 2018). Bakteri yang dapat mendegradasi senyawa PAH yang selama ini dianggap menjadi proses dekomposisi utama untuk kontaminasi di alam, dan merupakan salah satu solusi mampu untuk menyelesaikan masalah yang ada di lingkungan yang telah ditimbulkan oleh senyawa PAH tersebut (Toledo *et al.*, 2006). Bakteri laut yang dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon poliaromatik bergantung dengan kondisi lingkungannya, berupa pH, temperatur, oksigen, dan sumber nutrien, selain itu dapat ditentukan dari jumlah bakteri yang kemampuan transportasi daur hidup dan struktur dari senyawa PAH (Yetti *et al.*, 2016a).

Proses degradasi mikroorganisme muncul dengan berhasilnya ditentukan oleh adanya aktivitas enzim. Enzim tersebut dimiliki oleh mikroorganisme yang dapat mendegradasi senyawa yang berbahaya seperti PAH. Proses biodegradasi dimulai dengan atom oksigen dimasukkan ke dalam inti cincin aromatik, reaksi akan dikatalis oleh enzim yang dimiliki

Penyusunan melalui pohon filogenetik menggunakan urutan gen target 16S rRNA dengan primer 27F (5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3'") pada penelitian Freteset *et al.*, (2019) nama spesies bakteri tersebut antara lain, *Bacillus oceanisediminis*, *Vibrio alginolyticus*, dan *Halobacillus kuroshimensis*. Selain itu penelitian yang telah dilakukan oleh Andriana *et al.*, (2009) mengidentifikasi spesies bakteri yang dapat mendegradasi senyawa *phenanthrene* dengan analisis menggunakan 16S rDNA, strain mendekati Genus *Pseudomonas sp.*, dan *Marinobacter santoriniensis*.

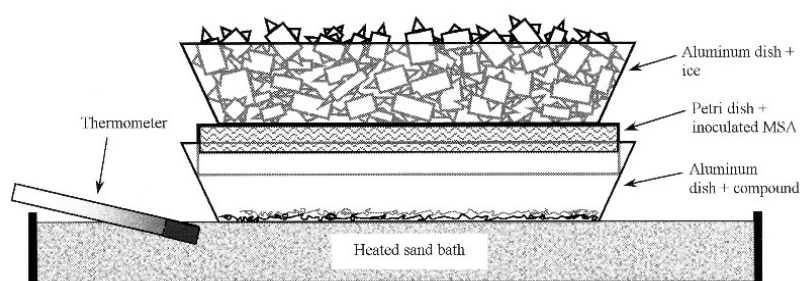
2.3. Metode Sublimasi

Metode sublimasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan zat-zat tertentu dari bentuk padat, ketika dipanaskan secara langsung menjadi uap tanpa mengalami meleleh. Uap tersebut apabila didinginkan kembali menjadi zat padat seperti mengkristal. Dengan proses sublimasi ini dapat dipisahkan antara dari padatan nonvolatil menjadi volatil, misalnya kamfer, asam benzoat, dan lain-lain (Kusumawati, 2012).

Metode ini lebih sering digunakan untuk mendeteksi kekuatan degradasi dari senyawa hidrokarbon poliaromatik (PAH) dengan kualitatif karena dalam hal penggunaannya yang sangat aman, apabila dilakukan di lemari asam dan dapat mencegah terjadinya kontaminasi (Kusumawati, 2012). Penelitian Kiyohara *et al.*, (1982), metode ini melibatkan penyemprotan atau penambahan senyawa PAH yang telah dikembangkan senyawa dengan tidak larut dalam air. Jika metode semprot diterapkan sebelumnya meleset atau tidak berhasil, karena sulit untuk menyemprotkan

pelat senyawa *phenanthrene* dengan cara aseptik, maka Alley dan Brown (2000) telah dikembangkan dengan mudah dan aman untuk menyimpan lapisan senyawa ke dalam agar-agar tanpa menggunakan pelarut. Sublimasi ini merupakan metode yang efektif dan kredibel.

Metode sublimasi memiliki tujuan untuk mengetahui kemampuan degradasi senyawa PAH oleh bakteri. Keberhasilan yang muncul ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media dengan terbentuknya zona bening disekitar isolat bakteri. Hal tersebut menunjukkan bahwa, setiap aktivitas bakteri membutuhkan sumber karbon. Salah satu sumber karbon yaitu nutrisi dan substrat, yang dibutuhkan oleh bakteri didapatkan dari media pertumbuhannya. Jika nutrisi dan substrat yang terdapat media cocok untuk pertumbuhan bakteri, maka bakteri dapat tumbuh dengan baik. Selain itu, bakteri memiliki kemampuan dalam mendapatkan sumber makanannya berasal dari, mampunya bakteri beradaptasi terhadap tempat pertumbuhannya pada media yang terdapat senyawa PAH. Tumbuhnya bakteri tersebut pada media yang mengandung senyawa PAH, menunjukkan bakteri tersebut mampu memanfaatkan sumber karbon selain nutrisi dan substrat yaitu dari senyawa PAH (Yetti *et al.*, 2016).



Gambar 2.4. Metode sublimasi untuk isolasi mikroba pendegradasi senyawa PAH
(Sumber: Alley dan Brown, 2000).

2.4. Bioremediasi

Bioremediasi ialah suatu proses yang menggunakan mikroorganisme untuk mendegradasi kontaminan di suatu lingkungan untuk pembersihan ekosistem yang telah tercemar minyak bumi, logam, senyawa PAH, serta polutan-polutan lainnya, menjadi bentuk yang tidak mengandung racun lagi (Fretes *et al.*, 2019). Penggunaan mikroorganisme yang terjadi secara alami, jamur, atau tanaman untuk mendegradasi serta mendetoksifikasi zat berbahaya bagi kesehatan manusia atau lingkungan (Kensa, 2011).

Mikroorganisme tersebut mungkin berasal dari daerah yang terkontaminasi atau dapat diisolasi dari tempat lain dan dibawa ke tempat yang terkontaminasi. Senyawa yang terkontaminasi diubah oleh mikroorganisme hidup tersebut melalui reaksi yang terjadi sebagai bagian dari proses metabolisme. Agar proses bioremediasi menjadi lebih efektif, mikroorganisme tersebut harus secara enzimatik untuk menyerang polutan dan mengubahnya menjadi produk yang tidak berbahaya lagi (Kensa, 2011).

Bioremediasi termasuk teknologi yang memiliki keterbatasan. Beberapa kontaminan, seperti hidrokarbon organik aromatik yang tahan terhadap serangan mikroba. Senyawa terdegradasi baik lambat atau tidak sama sekali, karena tidak mudah untuk memperkirakan tingkat pembersihan untuk proses bioremediasi. Teknik bioremediasi biasanya lebih ekonomis daripada metode yang lainnya, seperti pembakaran, dan beberapa polutan dapat diolah dilokasi, sehingga dapat mengurangi risiko paparan langsung (Kensa, 2011).

Bioremediasi air dan tanah yang terkontaminasi lingkungan yang telah muncul sebagai teknologi yang lebih efektif, dengan berbagai keunggulan dibandingkan dengan metode yang lebih tradisional. Bioremediasi dari bahan limbah yang mengandung senyawa hidrokarbon dan turunannya, memiliki kemampuan mikroorganisme untuk meningkatkan biomassa dari mikroorganisme tersebut dan mengalami degradasi menghasilkan produk yang tidak beracun, seperti H₂O dan CO₂ (Toledo *et al.*, 2006).

Bioremediasi dapat menghilangkan, mengubah, melumpuhkan atau mendetoksifikasi berbagai bahan-bahan kimia dari lingkungan dengan cara reaksi bakteri, jamur, dan tanaman. Sebagian besar kemajuan dari dalam bioremediasi telah diwujudkan melalui bantuan dari bidang mikrobiologi, biokimia, biologi molekuler, kimia analitik, teknik kimia, dan lain-lain (Hatzikioseyan, 2010). Prinsip terpenting dari proses bioremediasi adalah mikroorganisme (terutama mikroorganisme bakteri atau jamur) yang dapat digunakan untuk menghancurkan kontaminan berbahaya atau mengubahnya menjadi bentuk yang tidak berbahaya. Dengan demikian, proses bioremediasi kontaminan merupakan aplikasi aktivitas metabolisme mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut bertindak sebagai biokatalis serta untuk menghilangkan kontaminan melalui dengan cara berbagai bahan-bahan senyawa untuk membantu menghasilkan energi dan nutrisi untuk membiakkan lebih banyak sel (Hatzikioseyan, 2010).

2.5. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode *in vitro* untuk sintesis DNA yang memiliki beragam aplikasi sangat banyak dan beragam bidang ilmu biologi dan klinis. Metode PCR memungkinkan analisis genetik dengan mudah diakses secara luas, dan telah beragam aplikasi telah berkembang (Verma *et al.*, 2014). PCR ialah sebuah alat mesin yang mampu untuk memanaskan dan mendinginkan tabung kecil (eppendorf) serta dapat merubah temperatur setiap tahapan dari reaksi PCR. Terdapat tiga tahapan utama dalam proses PCR yaitu denaturasi, *annealling*, dan *extention* (pemanjangan untai DNA) dengan siklus pengulangan dalam 30-40 siklus (Yusuf, 2010).

Sebagian besar metode PCR umumnya dapat memperkuat fragmen DNA antara 0,1 dan 10 kb, meskipun beberapa teknik kemungkinan untuk memperbesar fragmen hingga ukuran 40kb. PCR memerlukan peralatan khusus yang disesuaikan untuk proses fluktuasi diantara variasi suhu dengan waktu yang telah diatur. Sebelum PCR dilakukan, DNA diisolasi terlebih dahulu dari darah tepi, folikel rambut, sel-sel pipi, atau sampel jaringan. DNA yang diisolasi merupakan untai ganda yang artinya terdapat dua urutan huruf atau basa nukleotida (A atau adenin, G atau guanin, C atau sitosin, dan T atau timin). DNA untai ganda disatukan oleh pasangan basa komplementer dimana A mengikat T, dan C mengikat G, kemudian akan membuat untaian komplementer molekul agar mudah dimengerti (Verma *et al.*, 2014).

Prinsip dari metode PCR yaitu penggunaan DNA polimerase untuk membuat salinan DNA. Umumnya DNA berbentuk untaian ganda, tetapi

enzim hanya dapat bekerja pada DNA untai tunggal. Oleh karena itu, pada proses awal yang dilakukan ialah memisahkan untaian DNA salah satunya dengan dipanaskan untuk memisahkan untai ganda menjadi tunggal. Penambahan primer berfungsi sebagai inisiasi dalam proses amplifikasi DNA. DNA polimerase membantu katalis untuk pembentukan ikatan antara hidrogen dan fosfat pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dengan ditambahkan dNTP. Maka dengan ditambahkan dNTP yang telah dikatalis oleh DNA polimerase yang berlangsung akan terbentuk reaksi polimerase dengan arah 5'>3' (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Adapun tiga tahapan pada metode PCR yang berurutan antara lain, denaturasi (pemisahan), *annealing* (penempelan), dan elongasi (pemanjangan untai DNA), dijelaskan sebagai berikut:

1. Langkah awal PCR yaitu denaturasi, pada tahap ini dilakukan pemanasan reaksi pada suhu antara 90°-98°C selama 20-30 detik. DNA *template* untai ganda mengalami proses denaturasi pada suhu yang ditentukan sebagian oleh basa nitrogen G-C. DNA target pada proses denaturasi yang mengandung banyak basa nukleotida, maka suhu pada proses ini dinaikkan (Zein dan Prawiradilaga, 2013).
2. Langkah *annealing* biasanya dilakukan pada suhu antara 3°C-5°C yang lebih rendah dari suhu leleh dapat dihitung saat primer oligonukleotida terlepas dari templatnya. Temperatur reaksi ini diturunkan menjadi antara 36-72°C selama 20-40 detik yang memungkinkan proses *annealing* untuk penempelan primer pada

DNA akan terbelah dan menempatkan pada posisi yang tepat. Ikatan hidrogen DNA-DNA yang stabil hanya terbentuk ketika sekuens primer sangat dekat dengan sekuens *template* (Verma *et al.*, 2014).

3. *Extention* atau langkah pemanjangan primer oligonukleotida dilakukan dengan bantuan dari DNA *polymerase*, maka primer akan membentuk untaian DNA yang cocok dengan urutan DNA yang terbelah menjadi dua untaian. Suhu pada langkah ini tergantung pada DNA polimerase yang digunakan, suhu dinaikkan kembaliantara 70°-78°C. Waktu pada proses ini umumnya digunakan ialah antara 30-45 detik (Verma *et al.*, 2014).

Jumlah siklus yang diperlukan untuk proses amplifikasi tergantung pada jumlah salinan cetakan DNA yang terdapat pada proses ekstraksi dan amplifikasi PCR. Umumnya proses amplifikasi dilakukan dengan 30 siklus. Selanjutnya pada urutan target umumnya menggunakan dari panjang 100-2000 bp untuk proses amplifikasi PCR (Verma *et al.*, 2014). Komponen-komponen campuran PCR sebagai berikut:

- a. DNA *template* merupakan bahan utama dalam proses PCR. DNA *template* disiapkan untuk replikasi (salinan) dan transkripsi oleh aksi enzim yang tidak diketahui yaitu enzim helikase. Enzim ini memanfaatkan energi dari molekul seperti ATP untuk merusak ikatan hidrogen antara pasangan basa, yang mengakibatkan pemisahan dua untaian ganda. DNA beruntai tunggal dapat dengan cepat berubah menjadi bentuk ganda, oleh karena itu

sebagian besar mikroorganisme seluler yang memiliki protein pengikat DNA beruntai tunggal khusus hingga disalin atau ditranskripsi. Eksisi DNA yang rusak atau aktivitas nuklease DNA juga dapat menghasilkan DNA beruntai tunggal. DNA *template* ini dikonversi ganda selama proses perbaikan atau rekombinasi DNA (Eun, 1996).

- b. *Deoxynucleotide Triphosphate* (dNTPs) nukleotida yang mengandung kelompok trifosfat, yang memiliki tempat DNA polimerase mensintesis empat dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yang dimasukkan ke dalam reaksi, umumnya pada masing-masing dNTP dengan konsentrasi 0,2 mM (200 μ M) (Eun, 1996).
- c. Polimerase Termotabil (*Taq polymerase*) dengan suhu optimal sekitar 70°C. Awalnya dimurnikan dari *Thermus aquaticus* serta digunakan dalam bentuk aslinya, dan segera digantikan oleh versi rekombinan yang dibuat dari *Thermus aquaticus* kloning yang diekspresikan dalam *E.coli* (Eun, 1996).
- d. Primer universal, merupakan primer yang dapat di *annealing* dengan berbagai jenis *template* DNA. Primer universal digunakan dalam banyak reaksi PCR dan berhubungan dengan sekuens nukleotida dalam vektor kloning dan molekul DNA. Berbagai aplikasi PCR, primer universal cukup untuk melancarkan proses amplifikasi DNA agar sukses (Verma *et al.*, 2014).
- e. *Buffer* untuk mempertahankan pH. Larutan penyangga (*buffer*) menyediakan lingkungan yang cocok untuk aktivitas dan stabilitas

antara bakteri perbandingan urutan 16S rRNA dapat ditampilkan keterkaitan dengan evolusi diantara mikroorganismenya (Mahmoud, 2016).

Bakteri prokariotik umumnya mempunyai tiga jenis rRNA antara lain 5S, 16S, dan 23S yang tersusun atas transkripsi operon. Gen-gen yang mengkode 5S, 16S, dan 23S rRNA umumnya dapat diatur menjadi operon dengan *spacer* yang ditranskripsikan secara internal antara gen 16S dan 23S rRNA, serta dapat juga digunakan untuk membedakan antara organisme yang terkait kekerabatan. Jumlah *rrn*-operon berkisar dari satu hingga 15 operon per genom (Schmidt *et al.*, 1991).

Gen 16S rRNA memiliki ukuran yang berkisar 1550 pasang basa dan sekitar 500 pasang basa terletak di bagian ujung sekuens yang disebut dengan daerah *hypervariable region* (Rinanda, 2011). Daerah ini yang menunjukkan keragaman urutan yang cukup besar diantaranya spesies bakteri yang berbeda, serta dapat digunakan untuk identifikasi spesies. Daerah-daerah yang *hypervariable* diapit oleh sebagian besar bakteri, memungkinkan untuk proses amplifikasi PCR menggunakan urutan target primer universal (Chakravorty *et al.*, 2007). Primer PCR universal dapat dirancang untuk menargetkan kawasan konservasi 16S sehingga dapat memungkinkan untuk memperkuat gen dalam berbagai mikroorganismenya yang berbeda dari sampel tunggal (Schmidt *et al.*, 1991).

Identifikasi secara molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA digunakan sebagai alternatif karena lebih mudah dan lebih cepat dibandingkan secara identifikasi secara biokimia. Gen 16S rRNA ini memiliki kelebihan antara lain (Akihary dan Kolondam, 2020):

1. Dalam identifikasi nama spesies bakteri memiliki keakuratan yang tinggi tidak membutuhkan waktu yang lama,
2. Dapat berubah sesuai dengan jarak evolusinya maka dapat digunakan untuk mengukur evolusi waktu yang tepat dan teliti,
3. Mempunyai bagian yang bersifat konservatif untuk membuat konstruksi pohon filogenetik universal,
4. Pada daerah *hypervariable region* dapat memudahkan untuk mengidentifikasi jenis dan nama spesies.
5. Dapat melihat kemiripan antar spesies bakteri hingga 99%. Kemiripan ini dapat dilihat dalam dua kelompok yaitu kemiripan cukup tinggi dan kemiripan cukup rendah (Widyadnyana *et al*, 2015).
6. Dapat dikatakan mirip apabila suatu genus memiliki kemiripan yaitu lebih dari 97% dan dapat dikatakan mirip apabila satu spesies homolog memiliki kemiripan yaitu lebih dari 99%,
7. Identifikasi dengan pengurutan gen lebih objektif, tidak memerlukan pertumbuhan yang optimal atau bahkan mikroorganisme yang cocok, serta memiliki kemampuan tambahan untuk menentukan hubungan taksonomi antar spesies,
8. Sekuensing gen 16S rRNA dengan 500 pasang basa telah muncul sebagai metode yang lebih akurat dan lebih cepat, untuk mengidentifikasi berbagai macam bakteri aerob maupun anaerob dan telah berhasil diterapkan di laboratorium klinis (Petti, 2007).

2.7. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu cara untuk memisahkan molekul-molekul yang bermuatan berada di dalam medan listrik. Prinsip dari teknik elektroforesis ialah terjadi migrasi partikel yang bermuatan di dalam medan elektronik dalam keadaan stabil. Molekul DNA memiliki nukleotida yang bermuatan negatif, maka panjang dari molekul DNA tersebut dapat dipisahkan molekul berdasarkan berat molekul. Terdapat dua jenis alat elektroforesis berdasarkan prinsipnya yaitu, elektroforesis horizontal dan elektroforesis vertikal (Harahap, 2018; Puspitaningrum *et al.*, 2018).

Dalam proses elektroforesis, menggunakan media pemisah yaitu gel agarosa dan gel poliakrilamida. Gel agarosa umumnya digunakan untuk mengidentifikasi DNA dan RNA, dengan dilakukan pada medan listrik horizontal. Kelebihan dari gel agarosa yaitu lebih mudah dalam pembuatan, dan lebih cepat dalam laju pemisahan. Adapaun kelemahan pada gel agarosa tersebut adalah mudah rusak maka memerlukan ketelitian yang cukup tinggi dan saat mengerjakannya. Selain itu gel poliakrilamida yang memiliki proses yang cukup rumit, dalam hal hasil pemisahannya, waktu laju pemisahannya lambat, proses pembuatannya rumit serta mahal. Gel ini membutuhkan tegangan arus listrik yang cukup tinggi dengan medan listrik vertikal. Penambahan zat kimia untuk visualisasi pada gel agarosa yaitu *staining gel*, sedangkan gel poliakrilamida menggunakan *silver staining* (Harahap, 2018; Zein dan Prawiradilaga, 2013)

Elektroforesis gel *agarose* merupakan cara yang paling mudah dan efektif untuk proses memisahkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran

mulai dari 100 bp hingga 25 kb. Perpindahan molekul DNA yang bermuatan negatif, yang ditempatkan di medan listrik maka fragmen DNA akan bermigrasi ke anoda yang bermuatan positif. Laju migrasi molekul DNA melewati gel ditentukan oleh, ukuran molekul DNA, konsentrasi agarosa, tegangan arus listrik yang diterapkan, adanya *staining gel* (pewarna untuk visualisasi), jenis agarosa, dan larutan *buffer* elektroforesis (Lee *et al.*, 2012).

Selain itu penambahan zat kimia pada proses elektroforesis ini antara lain *loading dye* yang berfungsi untuk menambahkan densitas sampel hingga sampel DNA akan berada di bagian bawah sumuran gel. *Loading dye* juga berperan sebagai penanda laju migrasi DNA. DNA *Ladder* atau biasa disebut *marker* yang berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA hasil dari amplifikasi serta sebagai penanda posisi molekul DNA yang telah bermigrasi untuk dapat menentukan kira-kira panjang basa nitrogen tersebut (Nirwana, 2018).

Teknik ini biasanya menggunakan media pemisahannya yang terbuat dari gel. Faktor yang mempengaruhi pindahnya partikel (laju) seperti kekentalan medium, muatan molekul, konsentrasi gel, kekuatan medan listrik, dan sebagainya. DNA bermuatan negatif saat berada di dalam aliran listrik, maka gel akan bermigrasi menuju ke kutub positif. Molekul DNA yang memiliki muatan besar akan sulit (lambat) migrasi saat melewati media gel pada aliran listrik dengan voltase rendah, daripada molekul DNA yang bermuatan lebih kecil dilewatkan aliran listrik dengan voltase tinggi akan lebih mudah (cepat) bermigrasi (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

2.8. Pulau Lusi (Lumpur Sidoarjo)

Pulau dengan memiliki luas yaitu 94 hektar terbentuk dari endapan buangan semburan lumpur pengeboran pipa PT. Lapindo Brantas Inc. Pembuangan lumpur ini hingga ke laut, sehingga pada tahun 2011 Badan Penanggulangan Lumpur Sidoarjo melakukan pengerukan endapan tersebut hingga terbentuk pada mulut Sungai Porong. Pulau ini diberi nama Pulau Sarinah oleh warga sekitar, tetapi saat ini dikenal dengan Pulau Lusi (Lumpur Sidoarjo)(Chamdalah *et al.*, 2016).

Pulau lumpur buatan ini terletak pada jarak tempuh 20-30 menit dari Desa Kedungpandan Kecamatan Jabon Sidoarjo dengan akses menggunakan perahu warga desa tersebut. Pulau ini menjadi objek wisata yang diberi nama Wisata Bahari Tlocor, yang terletak di Dusun Tlocor. Wisata ini sekitar 21 km dari pusat Kota Sidoarjo, kurang lebih ditempuh dengan waktu 45 menit hingga satu jam (Chamdalah *et al.*, 2016).

Wisata Bahari Tlocor ini ramai pada hari Sabtu dan Minggu sekitar puluhan hingga ratusan pengunjung. Pengunjung dapat menikmati fasilitas yang disediakan misalnya, tempat duduk, dermaga yang lebih baik, panggung, toilet, gasebo, spot foto yang menarik, speed boat, bus air, dan sebagainya. Tersedianya pusat informasi dan pemandu wisata menjadi hal yang penting, agar pengunjung mendapatkan banyak informasi tentang wisata yang baru saja diresmikan tersebut (Prasenja *et al.*, 2017).

Kawasan ekosistem hutan mangrove di Pulau Lusi ini semakin berkurang. Kabupaten Sidoarjo ini telah mengalami penurunan luas hutan mangrove sebesar 1.203,35 hektar. Wilayah yang mengalami pengurangan

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1. Alat

Erlenmeyer 500 ml, gelas ukur 100 ml, spatula, petri dish, *stiring hot plate*, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari asam, *magnetic stirrer*, batang pengaduk, *conical tube*, jarum ose, bunsen, *boardmarker permanent*, neraca analitik, mesin PCR, seperangkat alat elektroforesis, *sentrifuge*, *vortex*, mikropipet, gelas pengaduk, inkubator, dan penggaris, tabung reaksi, tabung eppendorf 0,2 ml; 1,5 ml, cawan petri.

3.3.2. Bahan

Media *Marine Agar* (MA), yeast ekstrak, pepton, alkohol 70%, es batu, sampel lumpur mangrove, *Phenanthrene*, kit ekstraksi Promega[®] (*Nuclei Lysis Solution*, *RNAse Solution*, *Protein Precipitation Solution*, isopropanol, etanol 70%, *DNA Rehydration Solution*) GoTaq Green Master Mix[®], *DNA Template*, *Nuclease Free Water*(NFW), *forwardprimer 27F* (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan *reverseprimer1492R* (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), serbuk agarosa, buffer TBE, *loading dye*, *staining gel Nucleic Acid Dye*, kertas timbang, plastik warp, aluminium foil, karet gelang, tisu dan aquades.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di daerah mangrove, dengan di ambil dari tiga titik yang berbeda antara lain, lumpur air mangrove (dekat daratan), lumpur pengakaran mangrove, lumpur yang bercampur air laut. Pengambilan lumpur dilakukan di kawasan mangrove Pulau

berlekuk. Setelah itu, diinokulasi dengan metode zig-zag (*streak*) secara aseptik ke dalam media *marine agar*, kemudian diinkubasi selama 72 jam atau 3 hari pada suhu 30°C, di dalam inkubator, lakukan hingga mendapatkan isolat bakteri murni.

3.4.5. Pembuatan media *Natrient Agar* (NA)

Media NA ditimbang sebanyak 2,8 gr dilarutkan dalam 140 ml aquades, kemudian dihomogenkan dengan batang pengaduk diatas kompor listrik hingga mendidih. Mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil, lalu disterilkan di autoklaf dengan alat-alat yang lainnya pada suhu 121°C selama 15 menit. Media tersebut kemudian dituang ke dalam cawan petri setril masing-masing sebanyak 20 ml.

3.4.6. Uji Sublimasi

Diinokulasi isolat yang tumbuh diatas media NA dengan totolan kecil di atas media NA yang lain. Alat *stiring hot plate* disiapkan dan diletakkan di dalam lemari asam. Kemudian senyawa *phenanthrene* diletakkan di atas aluminium hingga membentuk bulat dan diletakkan di atas *stiring hot plate*, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah tercium bau khas dari senyawa *phenanthrene*, lalu diletakkan cawan petri yang telah terdapat isolat bakteri dengan posisi terbalik, dan didinginkan dengan diletakkan es batu di atasnya, selama satu menit. Kemudian seluruh mulut cawan petri ditutup dengan plastik warp dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Bakteri yang dapat

dimasukkan biakkan bakterisebanyak 1 mL pada tabung eppendorf. *Disentrifuge* 13.000-16.000 x g selama 2 menit dan dibuang supernatan.

Ditambahkan sebanyak 600 μ l *Nuclei Lysis Solution* sampai sel tersuspensi. Diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Ditambahkan *RNase Solution* sebanyak 3 μ l pada sel dan diinversi 2-5 kali. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dan didinginkan sampel pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan sebanyak 200 μ l *Protein Precipitation Solution*. Divortex selama 20 detik dan kemudian diinkubasi pada lemari pendingin (4°C) selama 5 menit. *Disentrifuge* selama 3 menit pada 13.000-16.000 x g. Dipindahkan supernatan yang mengandung DNA ke tabung eppendorf 1,5 mL baru yang berisi 600 μ l isopropanol pada suhu ruang. Diinversikan secara perlahan sampai terbentuk benang DNA. *Disentrifuge* selama 2 menit pada 13.000-16.000 x g. Dibuang supernatan dan dikering-aginkan tabung eppendorf. Setelah itu, ditambahkan etanol 70% (600 μ l) pada pellet dan diinversi secara perlahan. *Disentrifuge* kembali selama 2 menit pada 13.000-16.000 x g. Dibuang etanol dan tabung berisi pelet dikering-aginkan selama 10-15 menit. Ditambahkan DNA *Rehydration Solution* sebanyak 100 μ l. Kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam.

Dicampurkan larutan secara berkala dan perlahan dengan mengetuk tabung secara lembut, dan diinkubasi dalam semalam pada suhu ruang atau 4°C.

3.4.8.2. Uji kemurnian DNA

Pengukuran kemurnian DNA dilakukan dengan bantuan alat spektrofotometer BioDrop. Langkah awal dari proses ini adalah dengan cara meneteskan larutan *blanko* standar yaitu *Nuclease Free Water* (NFW) sebanyak 1 µl. Kemudian langkah selanjutnya yaitu sebanyak 2 µl hasil amplifikasi DNA diteteskan pada kuvet. Untuk mengetahui kemurnian DNA dapat menggunakan λ 260/280 nm.

3.4.8.3. Amplifikasi gen 16S rRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan protokol GoTaq Green Master Mix[®]. Pembuatan *cocktail* dengan komposisi dalam reaksi PCR ialah GoTaq Green Master Mix[®] 12,5 µl, *forward primer* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') sebanyak 1 µl, *reverse primer* 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') sebanyak 1 µl, DNA *template* 5 µl dan NFW 5,5 µl. Proses PCR total per sampel 25 µl, seluruh komposisi tersebut dimasukkan ke dalam pada tabung eppendorf PCR berukuran 0,2 ml.

Kemudian gel diangkat dan dilepaskan dari cetaknya. Kemudian adanya DNA dilihat dengan bantuan *ultraviolet transilluminator*. Setelah dielektroforesis dibaca dengan bantuan *Gel Documentation*, kemudian didapatkan pita-pita DNA.

3.4.8.5. Sekuensing

Produk PCR yang telah diamplifikasi kemudian dikirimkan ke PT. Science Genetika Indonesia untuk dipurifikasi dan disekuensing pada *sequencer FirstBase Malaysia*.

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, analisis molekuler dengan membandingkan, disimpan, dan dicocokkan hasil sekuensing yang diperoleh dengan database melalui proses BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Bakteri yang dapat dikatakan tumbuh dengan baik yaitu pertumbuhannya memerlukan unsur fisika serta kimiawi tertentu. Unsur fisik yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri yang berada di lumpur, tanah, atau air seperti suhu antara 25-40°C. Suhu untuk pertumbuhan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu 37°C, menunjukkan bahwa bakteri mampu tumbuh dengan baik pada suhu tersebut. Kebutuhan unsur kimiawi yang terkandung didalam media pada pertumbuhan bakteri juga diperlukan seperti unsur karbon, oksigen, sulfur, nitrogen, serta fosfor (Junopia, 2015).

Pertumbuhan bakteri yang diambil dari lumpur mangrove ini dilakukan dengan menggunakan media selektif *Marine Agar* (MA), dengan komposisi yeast, pepton, air laut steril, dan aquades. Isolasi yang telah dilakukan hingga tujuh kali, hasilnya menunjukkan bahwa terjadi perubahan pada media seperti keruh dikarenakan penambahan air laut steril, tetapi tidak terfiltrasi dengan baik. Terdapat tujuh isolat bakteri yang telah tumbuh pada media MA, tetapi tidak dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Pada pengamatan dan hasil tersebut, maka ketujuh bakteri yang tumbuh dipindahkan ke media yang baru yaitu NA. Media NA mengandung sumber karbohidrat sangat dibutuhkan oleh bakteri karena substrat utama untuk proses metabolisme bakteri, nitrogen, karbon, vitamin, terdapat juga kandungan NaCl (garam) yang telah diperhitungkan agar cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan bakteri (Junopia, 2015).

Tumbuhnya bakteri yang hanya diinginkan pada penelitian ini yaitu dengan menggunakan media yang lebih selektif. Pada penelitian ini menggunakan media selektif yaitu media NA yang umumnya digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme bakteri. Penggunaan media NA ini dilakukan setelah isolat bakteri yang tumbuh diatas media MA tidak tumbuh dengan baik, karena pada media MA memiliki unsur-unsur yang tidak memenuhi kebutuhan pertumbuhan serta proses metabolisme bakteri tersebut.

Media selektif yang dapat digunakan dengan untuk bakteri pendegradasi senyawa PAH yaitu media *Stone Mineral Salt Solution Extract Yeast* (SMSSE), *Artificial Sea Water* (ASW), *Artificial Seawater Mineral Salt Medium* (ONR7a), dari ketiga jenis media selektif tersebut menunjukkan bahwa memiliki konsentrasi kandungan salinitas pada air laut yang lebih baik untuk pertumbuhan bakteri laut. Menurut Riffiani dan Sulistinah (2010), konsentrasi NaCl pada air laut sangat berpengaruh daripada senyawa yang lainnya dengan salinitas 3,5% yang artinya pada konsentrasi salinitas NaCl tersebut di dalam air laut sebesar 3%. Sedangkan menurut Supriyati (2009a), umumnya bakteri dapat tumbuh dengan baik di media yang memiliki salinitas antara 1%-5%, pada salinitas 5% pertumbuhan bakteri mulai lemah dan tidak tumbuh dengan maksimal. Pada penelitian ini menggunakan air laut steril yang dicampurkan pada media MA tetapi tidak ditambahkan variasi konsentrasi salinitas NaCl dengan konsentrasi tertentu, hasilnya pada media MA tersebut terjadi perubahan pada media yaitu keruh dan berwarna kuning kecoklatan.

4.2. Uji Sublimasi

Metode sublimasi yang dilakukan tidak menggunakan adanya jenis pelarut organik apapun dan tidak ditambahkan sumber karbon yang lain, maka dapat menentukan kemampuan degradasi senyawa *phenanthrene* oleh bakteri. Pada penelitian ini menggunakan suhu dan waktu pada metode sublimasi sama halnya yang dilakukan oleh Riffiani (2010), Supriyati (2009a), dan Supriyati, (2009b) yaitu dipanaskan senyawa *phenanthrene* tersebut menggunakan suhu optimum yaitu 100°C selama 10 menit, jika dilakukan lebih dari suhu optimum, *phenanthrene* akan meleleh dan akan menguap. Penambahan es batu diatas cawan petri akan menyebabkan senyawa tersebut tetap berbentuk padat dan akan menempel di media NA.

Penelitian yang dilakukan oleh Supriyati (2009a), dengan waktu inkubasi selama 6 jam menghasilkan dua isolat bakteri yang mampu mendegradasi *phenanthrene*. Waktu inkubasi pada penelitian Supriyati (2009b) selama 48 jam menghasilkan tiga isolat bakteri, sedangkan waktu inkubasi menurut penelitian Riffiani (2010), selama 7 hari menghasilkan dua isolat bakteri yang mampu mendegradasi senyawa *phenanthrene*. Dari beberapa penelitian diatas, suhu dan waktu yang digunakan pada metode sublimasi juga digunakan pada penelitian ini. Perbedaan terlihat dari waktu inkubasi, dapat dilihat dari waktu inkubasi kemampuan bakteri yang cepat mendegradasi senyawa *phenanthrene* tersebut.

sublimasi yang terdegradasi oleh bakteri berfungsi sebagai sumber karbon dibutuhkan untuk metabolismenya. Zona bening yang terbentuk juga terjadi pada penelitian Supriyati (2009b), bahwa bakteri dalam proses metabolismenya menghidrolisis dan memanfaatkan senyawa *phenanthrene* sebagai sumber karbon. Penelitian yang dilakukan oleh Riffiani (2010), terbentuknya zona bening karena pada penelitian tersebut menggunakan senyawa *phenanthrene* untuk sumber karbon dan energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya bagi bakteri.

Semakin luas zona bening yang terbentuk, maka semakin tinggi kemampuan degradasi bakteri terhadap senyawa *phenanthrene* (Supriyati, 2009a). Pada koloni bakteri LAMg 2 selama proses inkubasi setelah dilakukan uji sublimasi tidak terjadi perubahan warna, isolat tetap berwarna kuning kecoklatan, pada media NA juga tidak terjadi perubahan warna. Hasil dari penelitian ini yang ditunjukkan pada media NA sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yetti *et al.*, (2016b) yaitu tidak terjadi perubahan pada media, media tetap berwarna kuning bening serta pada isolat bakteri juga tidak terjadi perubahan warna.

4.3. Isolasi atau Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA mempunyai tujuan yaitu untuk memisahkan DNA dari penyusun sel yang lainnya. Hasilnya terdapat satu isolat bakteri yaitu LAMg 2 telah menunjukkan kemampuan mendegradasi *phenanthrene*, kemudian diisolasi DNA (ekstraksi) genom dengan metode ekstraksi DNA umumnya dilakukan dengan tiga tahap antara lain pemecahan atau penghancuran sel, menghilangkan protein dan RNA, dan pemurnian DNA

(Patantis dan Fawzya, 2009). Pada penelitian ini proses ekstraksi DNA menggunakan Kit dari *Wizard® Genomic DNA Purification* untuk mengetahui jenis bakteri yang dapat mendegradasi senyawa *phenanthrene*. Proses ini dengan menambahkan isolat bakteri tersebut ke dalam campuran reaksi yang selanjutnya dilakukan tahap PCR.

Ekstraksi DNA menggunakan Kit dari *Wizard® Genomic DNA Purification*, dengan berbagai larutan, tahap yang rumit, serta waktu yang lama. Larutan NLS pada proses ekstraksi berfungsi untuk melisiskan sel, menjaga struktur dari DNA selama tahap lisis dan pemurnian DNA (Iqbal *et al.*, 2016). Selanjutnya DNA diinkubasi pada suhu 80°C untuk mempercepat proses pelisisan sel. Menggunakan suhu yang cukup tinggi dapat menyebabkan protein DNA akan terdegradasi dari dinding sel secara maksimal. Menggunakan larutan RNase tersebut berfungsi untuk menghilangkan RNA yang dilakukan secara enzimatik. Penambahan larutan *Protein Precipitation Solution* (PPS) tersebut berfungsi sebagai mengendapkan debris protein yang terdapat di DNA, pengendapan debris berada di dasar mikrotube. Selama proses ekstraksi dilakukan *sentrifuge* pada kecepatan 16.000 xg yang bertujuan untuk mengendapkan dan memisahkan komponen-komponen yang ada didalam DNA, setelah proses pelisisan agar dapat dipisahkan dengan mudah (Puspitaningrum *et al.*, 2018). Komponen-komponen tersebut antara lain, karbohidrat, protein, RNA yang masih terdapat didalam supernatan yang telah terbentuk (Dale dan Schantz, 2002).

Hasil uji dari kemurnian DNA yang ditunjukkan pada tabel 4.2 kode isolat LAMg 2 yaitu 1,8 yang menunjukkan bahwa DNA utuh dan murni tidak terdapat kandungan senyawa lain yang banyak, sehingga pada saat tahap elektroforesis ditandai dengan tidak adanya *smear* (Syafaruddin *et al.*, 2011). Menurut Syafaruddin *et al.*, (2011), Sulandari *et al.*, (2003), dan Sambrook dan Russel, (2001). DNA dikatakan murni menunjukkan nilai perbandingan kemurnian DNA yaitu antara 1,8-2,0. Nilai perbandingan lebih kecil yaitu $< 1,8$ maka terdapat kontaminasi protein atau fenol yang ada di dalam larutan DNA. Sedangkan menurut Tenriulo *et al.*, (2001), jika nilai perbandingan lebih rendah ($< 1,8$) artinya terdapat kontaminasi protein dan bahan-bahan organik yang lainnya, sedangkan nilai perbandingan tinggi ($> 2,0$) menandakan bahwa terdapat kontaminasi senyawa fenol. Berbeda dengan Hanum *et al.*, (2018), jika perbandingan nilai yang terlalu rendah ($< 1,8$) menunjukkan bahwa mengandung terlalu banyak RNA, sedangkan nilai yang terlalu tinggi ($> 2,0$) menunjukkan bahwa terdapat protein yang tercampur dalam larutan DNA. Nilai kemurnian DNA dengan kisaran angka tersebut maka dapat dilanjutkan pada proses PCR dalam analisis molekuler selanjutnya.

4.4. Hasil Identifikasi Molekular 16S rRNA

Dari hasil pengujian kemurnian DNA, LAMg 2 yang menunjukkan angka 1,8 maka dilakukan proses selanjutnya yaitu amplifikasi PCR. Keberhasilan dalam proses PCR salah satunya yaitu pemilihan yang tepat dalam penambahan primer. Primer merupakan sepotong untai DNA pendek yang komplementer. Panjang primer berkisaran antara 10-40 basa

nukleotida. Penambahan primer bertujuan untuk proses awal untuk reaksi polimerisasi DNA. Selain itu, primer berfungsi sebagai menandai bagian DNA (DNA *template*) pada proses amplifikasi (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Primer yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 27F dengan panjang basa nitrogen 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' atau 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3'. Dimana basa nitrogen tersebut mengalami tujuh kali lipat perubahan. Pertama CM yang sama dengan basa nitrogen A atau C, yang kedua YM yang sama dengan basa nitrogen C atau T (Frank *et al.*, 2008).

Pemilihan primer yang tidak tepat akan menghasilkan produk PCR yang tidak spesifik dan akan menyisakan primer-primer yang tidak teramplifikasi dengan baik. Kesalahan dalam pemilihan primer juga dapat mengakibatkan, penempelan basa nukleotida tidak sesuai pada bagian yang diinginkan. Setelah pemilihan primer yang sesuai, primer yang telah didapatkan dalam bentuk *freeze dried* sebelum digunakan harus diencerkan dengan konsentrasi tertentu dengan larutan ddH₂O (*double-distilled water*) steril. Larutan ini telah diketahui bahwa ddH₂O merupakan jenis air yang paling murni, walaupun proses penyaringan ddH₂O sendiri membutuhkan waktu yang lama

Tabel 4.3. Optimasi *Thermal Cycler* Amplifikasi PCR DNA bakteri pendegradasi *phenanthrene*

Reaksi	Suhu (°C)	Waktu Reaksi
Siklus (30 siklus)		
Pre-Denaturation	94	2 menit
Denaturation	94	30 detik
Annealing	58	30 detik
Elongation	72	40 detik
Post-Elongation	72	10 menit
Preservation	4	
Siklus (35 siklus)		
Pre-Denaturation	95	2 menit
Denaturation	95	30 detik
Annealing	57	30 detik
Elongation	72	40 detik
Post-Elongation	72	10 menit
Preservation	4	

Agar mendapatkan hasil yang diinginkan, maka dilakukan segala percobaan mulai dari mengatur suhu, waktu, dan siklus saat proses amplifikasi PCR yang terdapat pada tabel 4.3. Proses amplifikasi PCR ini masing-masing terdiri dari pembelahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal (denaturasi), penempelan primer pada DNA (*annealing*), dan pemanjangan primer (*elongation*). Sebelum dilakukan proses denaturasi, amplifikasi PCR melalui proses pre-denaturasi dengan suhu 95°C selama 2 menit, agar molekul DNA target yang diinginkan dapat dilipatgandakan jumlahnya hingga terdenaturasi dengan benar. Kemudian DNA mengalami denaturasi, waktu yang dibutuhkan untuk tahap ini selama 30 detik pada suhu 95°C (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Tahap selanjutnya yaitu *annealing* dengan menurunkan suhu menjadi 36-72°C selama 30 detik. Pada penelitian ini percobaan untuk menentukan suhu *annealing* yang cocok yaitu 57°C untuk amplifikasi PCR. Tahap ini terjadi penempelan primer pada DNA yang telah mengalami pembelahan untai ganda menjadi untai tunggal. Jika menentukan suhu *annealing* terlalu rendah maka akan terjadi kesalahan

penempelan primer ke tempat yang tidak diinginkan, apabila suhu terlalu tinggi maka DNA tidak akan teramplifikasi dengan baik. Suhu akan dinaikkan menjadi 72°C, primer akan memanjang dibantu oleh enzim DNA *Taq Polymerase* selama 40 detik. Setelah itu, agar hasil dari PCR akan membentuk untai ganda yang lebih baik, maka ditambahkan tahap *post-elongation* selama 10 menit pada suhu 72°C. Untuk menghasilkan produk yang optimal, maka dilakukan pengulangan ketiga tahapan yang telah disebutkan di atas disebut dengan siklus. Proses amplifikasi biasanya dilakukan dengan 30-35 siklus. Jumlah siklus tergantung dari jumlah DNA *template* dan hasil akhir dari amplifikasi PCR yang diinginkan. Pada penelitian ini siklus awal diatur sebanyak 30 siklus, hasilnya menunjukkan *band* (pita-pita) DNA yang terlihat setelah proses elektroforesis tidak tebal (*smear*). Maka amplifikasi PCR dilakukan dengan memperbanyak jumlah siklus yaitu 35 siklus (Zein dan Prawiradilaga, 2013).

Setelah dilakukan tahap amplifikasi DNA, produk PCR isolat bakteri LAMg 2 di dalam *tube* kecil dilakukan visualisasi dengan metode elektroforesis. Tahap ini akan memisahkan molekul DNA yang terdapat di produk PCR di dalam sebuah medan listrik. Prinsip dari teknik ini adalah perpindahan partikel yang bermuatan yang berada di dalam sebuah medan listrik dalam keadaan stabil (Puspitaningrum *et al.*, 2018). Metode ini juga mempunyai prinsip yang menggunakan fase stasioner berupa gel agarosa serta fase gerak yang berupa larutan penyangga *buffer Tris-acetate* EDTA (TAE) atau *Tris-borat* EDTA (TBE) (Hutahaean *et al.*, 2014).

PCR ini dapat dikatakan bahwa hasil kemurnian saat isolasi atau ekstraksi sangat baik.

Pada penelitian Thontowi dan Yopi, (2013), proses amplifikasi gen 16S rDNA dari tiga isolat bakteri yang menunjukkan pita DNA dengan ukuran sekitar 1500 bp dengan *band* yang tebal dengan sedikit *smear*. Untuk penelitian yang dilakukan oleh Fitria *et al.*, (2018), hasil visualisasi juga ditunjukkan dari ketiga isolat memiliki *band* yang tebal dan tunggal, dengan ukuran *band* yang dihasilkan sekitar 1500 bp. Hasil visualisasi pada penelitian Shaumi *et al.*, (2018), pita DNA menunjukkan bahwa ukuran fragmen DNA dari tiga isolat yaitu 1500 bp. Dari persamaan ketiga penelitian tersebut dengan penelitian ini yaitu pada proses amplifikasi gen 16S rRNA dengan hasil visualisasi *band* (pita) DNA atau molekul fragmen sekitar 1500 bp, merupakan gen sekuen yang digunakan untuk identifikasi bakteri (Istiqfarin, 2017).

Hasil amplifikasi PCR akan dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk dipurifikasi, kemudian dikirim ke 1st Base *Sequencing* Malaysia, untuk ditentukan urutan pasang basa nitrogen.

Berdasarkan hasil uji degradasi senyawa *Phenanthrene* dengan menunjukkan zona bening pada isolat sampel LAMg 2, setelah dilakukan BLAST dapat diketahui bahwa jumlah basa nukleotida memiliki kesamaan dengan *Bacillus sp.* memiliki nilai *Query cover* yaitu 97%, oleh karena itu hasil presentase tersebut menunjukkan bahwa keselarasan panjang sekuens sampel dengan data *base* dari spesies ini yang terdapat pada *GenBank*. Hasil identifikasi isolat LAMg 2 berdasarkan sekuens gen 16S rRNA dapat dikatakan mirip dengan genus *Bacillus*, dengan nilai kemiripan lebih dari 97%, pernyataan tersebut sesuai dengan Petti (2007) dengan dilihat dari sekuens acuan *GenBank*, bahwa dapat dikatakan mirip apabila termasuk dalam genus yang sama jika hasil nilai memiliki kemiripan yaitu lebih dari 97%.

Isolat bakteri LAMg 2 merupakan Genus dari bakteri *Bacillus*. Berdasarkan buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition*, klasifikasi bakteri Genus *Bacillus* antara lain:

Kingdom	: Bakteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus sp.</i>

Bakteri *Bacillus sp.* merupakan bakteri bersifat gram positif, memiliki bentuk sel batang, lebar sel antara 0,5 - >1,0 mm, bersifat motil.

Bakteri ini mampu membentuk endospora, dapat bersifat aerob maupun fakultatif anaerob. Dapat tumbuh di media dengan penambahan kandungan NaCl salinitas 0%-20%, tumbuh pada suhu 10°C-60°C (Vos *et al.*, 2009).

Spesies *Bacillus sp.* yang mampu mendegradasi senyawa *phenanthrene* yang termasuk jenis senyawa PAH ini termasuk kedalam kelas Bacillales. Hasil identifikasi pada penelitian ini sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Thontowi dan Yopi, (2013), bahwa berdasarkan hasil analisis dengan gen 16S rDNA, bakteri dari kelas Bacillales mampu mendegradasi senyawa PAH di perairan Pulau Pari di Jakarta. Klasifikasi spesies ini masuk kedalam genus *Bacillus*, hasil penelitian oleh Afianti *et al.*, (2019) terdapat enam isolat telah dianalisis dengan 16S rRNA yaitu berasal dari genus *Bacillus* yang mampu mendegradasi *phenanthrene* berasal dari empat jenis sedimen di ekosistem mangrove Bintan. Sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Doddamani dan H. Z. Ninnekar, (2000), bahwa yang menemukan pertama kali spesies *Bacillus sp.* dapat mendegradasi senyawa *phenanthrene* dengan merubah senyawa tersebut menjadi senyawa yang tidak beracun yaitu karbondioksida dan air.

Dengan hasil yang telah didapat dan dipaparkan diatas, terjadinya kerusakan lingkungan yang dilakukan oleh tangan-tangan manusia yang sengaja maupun tidak sengaja. Hendaknya manusia diperintahkan agar setiap pekerjaan atau perbuatan untuk melakukan dengan hati-hati dan baik. dalam QS. Al-Ma'idah (5: 33-34):

- Farini, N., Thontowi, A., Yetti, E., Yopi, 2017. Pertumbuhan Bakteri Laut *Shewanella indica* LBF-1-0076 dalam Naftalena dan Deteksi Gen Naftalena Dioksigenase (The Growth of Marine Bacteria *Shewanella indica* LBF-1-0076 in Naphthalene and Naphthalene Dioxygenase Gene Detection). *Biopropal Ind.* 8(1): 19–31.
- Fitria, G.U., Nursyirwani, Thamrin, 2018. Isolasi Bakteri Pendegradasi Minyak dari Sedimen Di Perairan Sungai Pakning Kabupaten Bengkalis dan Kemampuannya dalam Mendegradasi Minyak Mentah. *Fak. Perikan. Dan Kelaut. Univ. Riau.* 1–12.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J., 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Appl Env. Micro.* 74(8): 2461–2470.
- Fretes, C.E. de, Sutiknowati, L.I., Falahudin, D., 2019. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Toleran Logam Berat dari Sedimen Mangrove di Pengudang dan Tanjung Uban, Pulau Bintan, Indonesia. *Oseanologi Dan Limnol. Indones.* 4(2): 71–77.
- Guo, C., Dang, Z., Wong, Y., Tam, N.F., 2010. Biodegradation Ability and Dioxigenase Genes of PAH-Degrading *Sphingomonas* and *Mycrobacterium* Strain Isolated from Mangrove Sediments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64: 419–426.
- Hanum, L., Windusari, Y., Setiawan, A., Muharni, Adriansyah, F., Mubarak, A., 2018. Comparosin of CTAB Method and Wizard Genomic DNA Purification System Kit from Promega on DNA Isolation of Local Varieties of Rice of South Sumatera. *Sci. Technol. Indones.* 3(1): 26–29.
- Harahap, M.R., 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika terhadap Biokimia Genetika. *J. Ilm. Pendidik. Tek. Elektro.* 2(1): 21–26.
- Hatzikioseyan, A., 2010. Principles of Bioremediation Processes. *Trends Bioremediation Phytoremediation Res. Signpost Trivandrum India.* 23–54.
- Hong, P.X., Hua, Z.X., Suo, L.Y., Xiang, Z.L., 2010. Effects of a Biosurfactant and a Synthetic Surfactant on Phenanthrene Degradation by a *Sphingomonas* Strain. *Pedosphere.* 20(6): 771–779.
- Hutahaean, S., Jamilah, I., Hannum, S., 2014. *Penuntun Praktikum Bioteknologi. Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara, Medan.*
- Iqbal, M., Buwono, I.D., Kurniawati, N., 2016. Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA untuk Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *J. Perikan. Kelaut.* 7(1): 54–65.
- Istiqfarin, N., 2017. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase dari Sedimen Pantai Mandaranrejo Pasuruan. *Skripsi.* Universitas Brawijaya, Malang.
- Junopia, A.C., 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Logam Timbal (Pb) yang Bersumber dari Danau Tempe Kabupaten Wajo Sulawesi Selatan. *Skripsi.* UIN Alauddin Makassar, Makassar.

- Kasai, Y., Kishira, H., Harayama, S., 2002. Bacteria Belonging to the Genus *Cycloclasticus* Play a Primary Role in the Degradation of Aromatic Hydrocarbons Released in a Marine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11): 5625–5633.
- Kensa, V.M., 2011. Bioremediation - An Overview. *J. Ind. Pollut. Control.* 27(2): 161–168.
- Kiyohara, H., Nagao, K., Yana, K., 1982. Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbons on Agar Plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(2): 454–457.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H., 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* 1–5.
- Mahmoud, M.S.K., 2016. Characterization and Molecular Identification of Unknown Bacteria Isolated from Outlet of Arab El Madabegh Sewage Treatment Plant in Assiut City, Egypt. *J. Ecol. Oh Health Evironment.* 4(1): 1–5.
- Muktiningsih, Kurniadewi, F., R.P, I.O., 2016. Isolasi, Amplifikasi dan Sekuensing Fragmen 1,9 Kilobasa Gen *Heat Shock Protein 70 Salmonella enterica* Serovar Typhi. *J. Kim. Dan Pendidik. Kim.* 1(1): 32–40.
- Nirwana, 2018. Identifikasi Molekuler Bakteri pada Saliva Anjing (*Canis lupus*) Ras Herder Dewasa. *Skripsi.* Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar.
- Nursyirwani, Amolle, K.C., 2007. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Perairan Dumai dengan Sekuen 16S rDNA. *Ilmu Kelaut.* 12(1): 12–17.
- Patantis, G., Fawzya, Y.N., 2009. Teknik Identifikasi Mikroorganisme Secara Molekuler. *Squalen.* 4(2): 72–82.
- Petti, C.A., 2007. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Med. Microbiol.* 44: 1108–1114.
- Prasenja, Y., 2018. Peran Masyarakat dalam Pengelolaan Ekominawisata Pulau Lusi, Kabupaten Sidoarjo. *Maj. Geogr. Indones.* 32(2): 123–129.
- Prasenja, Y., Alamsyah, A.T., Bengen, D.G., 2017. Analisis Keberlanjutan Ekosistem Mangrove untuk Kegiatan Ekominawisata di Pulau Lumpur Sidoarjo (Sustainability Analysis of Mangrove Ecosystem for Ecofisherytourism in Sidoarjo Lumpur Island). *J. Ilmu Dan Teknol. Kelaut. Trop.* 9(1): 275–284.
- Puspitaningrum, R., Adhiyanto, C., Solihin, 2018. *Genetika Molekuler dan Aplikasinya.*
- Rad, R.M., Omid, L., Kakoei, H., Golbabaie, F., Hassani, H., 2014. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Activated Carbons: Kinetic and Isotherm Curve Modeling. *Int. J. Occup. Hyg.* 6(1): 43–49.
- Riffiani, R., 2010. Isolasi Bakteri Pendegradasi Phenanthrene dari Batanta-Salawati Raja Ampat Papua. *J. Biol. Indones.* 6(2): 153–161.

- Riffiani, R., Sulistinah, N., 2010. Biodegradasi PAHs Phenanthrene oleh Bakteri *Indigenous* Laut Pari Kepulauan Seribu. *Berk Penel Hayati Ed. Khusus 4F*. 31–35.
- Rinanda, T., 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *J. Kedokt. Syiah Kuala*. 11(3): 172–177.
- Rochdiana, L., 2011. Perubahan Struktur Fenantrena Selama Proses Biodegradasi oleh Bakteri *Bacillus altitudinis*. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sambrook, J.S., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Volume 1-3., Third. ed. Cold Spring Arbour Laboratory Press, New York.
- Schmidt, T.M., Delong, E.F., Pace, N.R., 1991. Analysis of a Marine Picoplankton Community by 16S rRNA Gene Cloning and Sequencing. *J. Bacteriol.* 173(14): 4371–4378.
- Shaumi, N., Nursyirwani, Feliatra, 2018. Kemampuan Degradasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Minyak secara Molekuler dengan Sekuens 16S rRNA. *Fak. Perikan. Dan Kelaut. Univ. Riau*. 1–9.
- Sulandari, S., Muladno, Zein, S.A., 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoologi Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta.
- Supaka, N., Pinphanichakam, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyanarn, S., Omori, T., Juntongjin, K., 2001. Isolation and Characterization of a Phenanthrene-Degrading *Sphingomonas* sp. Strain P2 and its Ability to Degrade Fluoranthene and Pyrene via Cometabolism. *Sci. Asia*. 27: 21–28.
- Supriyati, D., 2009a. Biodegradasi Phenantrene oleh Mikroba Laut M5 (*Alcanivorax borkumensis*) yang Diisolasi dari Teluk Jakarta. *J. Biol. Indones.* 6(1): 143–151.
- Supriyati, D., 2009b. *Stappia aggregata* G1 dan *Alteromonas* sp. G2 Bakteri Pendegradasi Phenanthrene yang Diisolasi dari Lingkungan Laut (*Stappia aggregata* G1 dan *Alteromonas* sp. G2 Phenanthrene Degrading Bacteria Isolated from Marine Environment). *Ber. Biol.* 9(6): 665–672.
- Syafaruddin, Randriani, E., Santoso, T.J., 2011. Efektivitas dan Efisiensi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada Jambu Mete. *Bul. RISTRI*. 2(2): 151–160.
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A., Rosmiat, 2001. Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. *Mar. Chim. Acta*. 2(2): 6–10.
- Thontowi, A., Yopi, 2013. Keragaman Bakteri Laut Pendegradasi Alkana dan Poliaromatik Hidrokarbon di Pulau Pari Jakarta. *J. Biol. Indones.* 9(1): 131–140.
- Tian, L., Ma, P., Zhong, J.-J., 2002. Kinetics and Key Enzyme Activities of Phenanthrene Degradation by *Pseudomonas mendocina*. *Process Biochem.* 37: 1431–1437.
- Toledo, F.L., Calvo, C., Rodelas, B., Gozales-Lopez, J., 2006. Selection and Identification of Bacteria Isolated from Waste Crude Oil with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Removal Capacities. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 244–252.

- US EPA, 1990. Phenanthrene. Chem. Assess. Summ., CASRN.
- Verma, K., Dalal, J., Sharma, S., 2014. Scientific Concepts of Polymerase Chain Reaction (PCR). *Int. J. Oh Pharm. Sci. Res.* 5(8): 3086–3095.
- Virosa, A.V., Rahman, M.F., Wardoyo, A.Y.P., 2014. Identifikasi Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) dalam Emisi Kendaraan Bermotor dengan Menggunakan Whatman Filter Paper PM 2,5. *Kim. Stud. J.* 2(2): 499–505.
- Vivikananda, E., 2014. Deteksi DNA Babi dan DNA Sapi dengan Menggunakan Metode *Insulated Isothermal Polymerase Chain Reaction* (ii-PCR). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Vos, P.D., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes, 2nd ed.* Springer, USA.
- Wahyuni, Y.A.D., 2016. Profil Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) pada Perairan dan Sedimen Hutan Mangrove Kota bandar Lampung. *Skripsi*. Universitas Lampung. Lampung.
- Yetti, E., Thontowi, A., Yopi, 2016a. Penapisan dan Optimasi Pertumbuhan Bakteri Laut yang Berpotensi sebagai Hidrokarbonoklastik PAH Fenotiazin (Screening and Growth Optimization of Potential Marine Bacteria as Hydrocarbonoclastic of Phenothiazine PAH). *JPB Kelaut. Dan Perikan.* 11(2): 127–138.
- Yetti, E., Thontowi, A., Yopi, 2016b. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria from the Indonesian Marine Environment. *Biodiversitas.* 17(2): 857–864. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d170263>
- Yusuf, Z.K., 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek* 5(6).
- Zein, M.S.A., Prawiradilaga, D.M., 2013. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Kencana Prenadamedia Group. Jakarta.