

IDENTIFIKASI DAN ISOLASI HALOALKANA DEHALOGENASE DARI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAIN LOKAL

Adri Nora¹, Enny Ratnaningsih², Dessy Natalia²

¹Program Studi Bioteknologi, FIKES, Universitas Esa Unggul, Jakarta.

²Program Studi Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Bandung, Bandung

Jalan Arjuna Utara No.9, Jakarta

adri.nora@esaunggul.ac.id

Abstrak

Senyawa organohalida banyak digunakan dalam industri sebagai pestisida dan aditif untuk bensin. Salah satu senyawa organohalida yang banyak diproduksi adalah 1,2-dikloroetana (DCE). Namun, senyawa organohalida merupakan polutan yang dapat membahayakan lingkungan karena senyawa ini sulit terdegradasi dan bersifat karsinogenik. Beberapa bakteri diketahui mampu mendegradasi DCE seperti bakteri dari genus *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, dan *Xantobacter*. Bakteri-bakteri tersebut menghasilkan haloalkana dehalogenase yang mampu mengkatalisis pemutusan ikatan antara karbon dengan halogen. Pada DCE katalisis dehalogenase menghasilkan 2-kloroetanol, ion halida, dan proton. Dalam penelitian ini dilakukan identifikasi dan isolasi haloalkana dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* strain lokal. *Pseudomonas aeruginosa* diidentifikasi dengan PCR16S ribosomal DNA menggunakan Unibi (5'-GGT TAC (GC) TTG TTA CGA CTT-3) sebagai primer maju dan BactF-1 (5'-AGA GTT TGA TCA CTG GCT CAG-3') sebagai primer mundur. *Pseudomonas aeruginosa* dapat tumbuh dalam medium Luria Bertani dan minimal medium yang mengandung DCE 1–10mM. Haloalkana dehalogenase yang dihasilkan merupakan enzim intrasel dengan aktivitas spesifik 8,809 unit/mg protein (unit = $\mu\text{mol Cl}^-$ / menit). Isolasi dan fraksinasi haloalkana dehalogenase menghasilkan aktivitas spesifik menjadi 32,108 unit/mg protein (naik 3,5 kali dibandingkan ekstrak kasarnya). Jika dibandingkan dengan *Pseudomonas aeruginosa* OK1, *Pseudomonas aeruginosa* strain lokal ini lebih berpotensi untuk digunakan dalam bioremediasi karena *Pseudomonas aeruginosa* strain lokal memiliki aktivitas spesifik yang lebih besar dan kemampuan tumbuh yang lebih cepat dibandingkan OK1.

Kata Kunci : 1,2-dikloroetana, *Pseudomonas aeruginosa*, haloalkana dehalogenase

Pendahuluan

Senyawa organohalida merupakan senyawa yang banyak digunakan di dalam industri sehingga produksi dan pemakaiannya terus meningkat setiap tahunnya. Senyawa organohalida banyak digunakan sebagai pestisida (insektisida, herbisida, dan fungisida), sebagai pelarut, intermediet dalam sintesis senyawa kimia, aditif bahan bakar (Idris dan Ratnaningsih, 2015). Senyawa organohalida termasuk ke dalam senyawa xenobiotik yang sulit didegradasi di lingkungan, bersifat karsinogenik pada manusia, dan mampu bertransfromasi menjadi senyawa toksik lainnya (Huyop dkk, 2004) Oleh karena itu, limbah senyawa organohalida berpotensi menjadi polutan yang sangat membahayakan lingkungan dan manusia.

Salah satu senyawa organohalida yang paling banyak diproduksi adalah 1,2-dikloroetana (DCE) dengan jumlah produksi 12 juta ton per tahun di seluruh dunia (Govender and Pillay, 2011). DCE banyak digunakan pada industri pestisida (Govender and Pillay, 2011). Selain digunakan dalam industri pestisida, DCE juga digunakan sebagai aditif bahan bakar (Govender and Pillay, 2011). Dari data yang didapatkan (www.eia.gov) pemakaian bahan bakar di seluruh dunia tiap tahunnya mengalami

peningkatan sehingga produksi 1,2-dikloroetana juga akan semakin meningkat.

Ada berbagai macam metoda yang dapat digunakan untuk mendegradasi limbah organohalida yaitu, secara fisika, kimia, dan biologi. Salah satu metoda biologi yang dapat dilakukan adalah bioremediasi dimana metoda ini menggunakan bakteri sebagai agen untuk membantu degradasi suatu polutan (Megharaj dkk, 2011). Mikroorganisme yang mampu hidup dalam medium yang mengandung organohalida biasanya memiliki enzim dehalogenase. *Pseudomonas aeruginosa* adalah salah satu bakteri yang diketahui dapat hidup di lingkungan yang mengandung senyawa organohalida karena bakteri ini mampu menghasilkan dehalogenase (dHL). Selain itu, bakteri lainnya yang mampu tumbuh menghasilkan dehalogenase adalah *Bradyrhizobium* (Sfetsas dkk, 2009), *Klebsiella* (Tahya dan Ratnaningsih, 2015), *Xantobacter* (Torz dkk, 2005). Dehalogenase sendiri merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalis untuk memutuskan ikatan kovalen antara karbon dan halogen sehingga menghasilkan alkohol, ion halida, dan proton, dimana air dapat membantu menjadi cosubstrat (Sfetsas dkk, 2009).

Dengan diketahuinya efektivitas mikroba dalam dehalogenasi serta berbagai aspek penting dalam proses tersebut, diharapkan mikroba tersebut dapat lebih banyak dipakai dalam industri untuk mendegradasi limbah senyawa organohalida. Untuk itu, diperlukan penelitian lebih lanjut, terutama karakterisasi dari enzim dehalogenase dalam mendegradasi senyawa haloalkana, sehingga dehalogenasi secara bioremediasi dapat dilakukan secara lebih luas dan efektif.

Metode Penelitian

Penumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*.

Penumbuhan dari *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan pada medium cair Luria Bertani. *Pseudomonas aeruginosa* dikultur pada medium cair Luria Bertani dengan komposisi: 0,5 g yeast extract, 1 g tripton, 0,5 g NaCl, selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam shaker. Setelah 24 jam didapatkan kultur bakteri berwarna kehijauan yang menandakan bakteri telah tumbuh. Bakteri kemudian dipindahkan ke medium Luria Bertani padat dengan cara memasukkan jarum Ose ke dalam kultur cair dan digoreskan pada media padat. Kemudian disimpan di dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam didapatkan koloni tunggal dari *Pseudomonas aeruginosa* yang kemudian akan digunakan dalam proses selanjutnya.

PCR 16S ribosomal DNA

PCR 16S rDNA dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang didapatkan dari Laboratorium SITH ITB. Dalam PCR digunakan kontrol negatif yaitu ddH₂O. Campuran reaksi untuk 1x reaksi PCR adalah 2,5 unit *dream taq* DNA Polymerase; 1x *dream taq* buffer (dari stok buffer PCR 10x yang mengandung MgCl₂ 20mM, buffer Tris-Cl 10mM pH 8,3, gelatin 0,01%); 0,1mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); primer maju 20µM; primer mundur 20µM; ±2 ng DNA template; dan ddH₂O.

Penumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dalam Minimal Medium

Sebagai starter, koloni tunggal *Pseudomonas aeruginosa* ditanam di dalam 5mL medium Luria Bertani pada suhu 37°C dan dimasukkan ke dalam shaker 150rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, 100µL kultur bakteri diambil dan dimasukkan ke dalam minimal medium. Kedalam minimal medium, ditambahkan 1,2-dikloroetana dengan berbagai konsentrasi. Kultur bakteri dalam minimal medium dimasukkan ke dalam shaker 150rpm pada suhu 37°C dan diukur

OD-nya menggunakan spektrofotometri selama 2 jam sekali hingga bakteri tidak tumbuh lagi

Uji Aktivitas Haloalkana Dehalogenase

Uji aktivitas haloalkana dehalogenase dilakukan dengan penentuan ion klorida yang terlepas dari 1,2-dikloroetana. Pengujian aktivitas dehalogenase dilakukan dengan pencampuran 100 µL 1,2-dikloroetana (5mM) dengan 100 µL enzim intraseluler pada tabung eppendorf steril. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 10menit, kemudian ditambahkan 400 µL Hg(SCN)₂ (0,1% dalam etanol p.a) dan divorteks selama 5 detik. Kemudian disentrifugasi pada 10000 xg selama 2 menit hingga didapatkan pelet dan supernatan. Supernatan dan pelet dipisahkan dan kedalam supernatan ditambahkan 400 µL Fe(NH₄)(SO₄)₂ (0,25M dalam 9M HNO₃). Adanya aktivitas dehalogenase ditandai dengan warna larutan yang berubah menjadi merah dan absorbansi dari larutan tersebut diukur dengan spektrofotometri uv vis pada λ=460 nm. Blanko yang digunakan adalah enzim yang telah dimatikan dengan inkubasi pada 100°C selama 10 menit.

Fraksinasi Amonium Sulfat dan Dialisis

Fraksinasi dengan amonium sulfat dilakukan terhadap enzim intraseluler. Enzim intraseluler sebanyak 100mL ditambahkan dengan amonium sulfat sebanyak 10,6 gram sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan stirer hingga larut. Kemudian disentrifuga pada 10000 xg selama 20 menit. Dihasilkan supernatan dan pelet dimana pelet yang didapatkan merupakan fraksi 0-20% (fraksi 1). Hal ini dilakukan berulang hingga didapatkan 5 fraksi. Dialisis dilakukan terhadap lima fraksi hasil pengendapan dengan amonium sulfat. Setiap fraksi dimasukkan ke dalam membran selofan, kemudian membran selofan diikat dan dimasukkan ke dalam 1L buffer tris-asetat 20mM pH 7,5 selama 24 jam, dimana setiap 2 jam sekali buffer diganti dengan buffer baru hingga apabila ditetaskan dengan BaCl₂ tidak ada endapan.

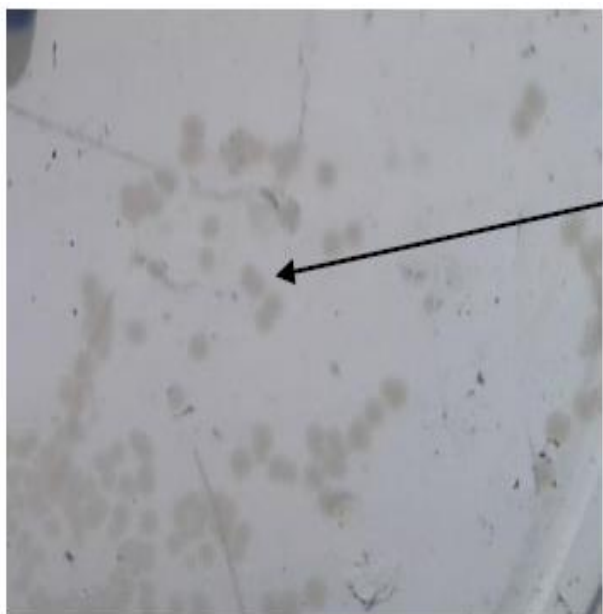
Hasil dan Pembahasan

Penumbuhan Koloni Tunggal *Pseudomonas aeruginosa*

Penumbuhan bakteri digunakan medium pertumbuhan bakteri yaitu Luria Bertani. Medium Luria Bertani merupakan salah satu medium enrichment yang mengandung semua nutrien yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Medium Luria bertani yang dipakai adalah medium padat dan medium cair. Luria bertani cair mengandung ekstrak ragi berfungsi sebagai sumber karbon, sumber nitrogen organik, dan sumber vitamin yang larut dalam air. Medium Luria Bertani juga mengandung

tripton yang berfungsi sebagai sumber vitamin dan asam amino dan NaCl yang berfungsi untuk menjaga medium dalam keadaan isotonik. Sebelum medium ini digunakan, terlebih dahulu medium ini disterilisasi menggunakan autoklaf dimana sterilisasi dilakukan selama 15 menit, pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C, sehingga dapat mematikan semua kontaminasi yang ada.

Penumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pertama kali dilakukan pada medium Luria Bertani padat, pada suhu 37° selama 12 jam, sehingga didapatkan koloni tunggal yang akan terus dipakai untuk penelitian ini. Hasil koloni tunggal yang diperoleh dapat ditunjukkan pada gambar 1. Setiap penelitian yang menggunakan bakteri, dibutuhkan satu koloni tunggal yang digunakan untuk keseluruhan penelitian. Dengan menggunakan koloni tunggal yang sama, maka kemungkinan adanya perbedaan sifat/perbedaan genetik dapat dihindari.



Gambar 1
Koloni tunggal *Pseudomonas aeruginosa*

Identifikasi *Pseudomonas Aeruginosa* dengan 16s rDNA

Prosedur PCR 16S rDNA ini merupakan prosedur umum yang sering dilakukan sehingga tidak diperlukan pengaturan suhu dan desain primer secara khusus. Hasil penentuan urutan gen secara 16S rDNA ditunjukkan pada Gambar 2. Hasil penjabaran urutan nukleotida dengan menggunakan BLAST menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*.

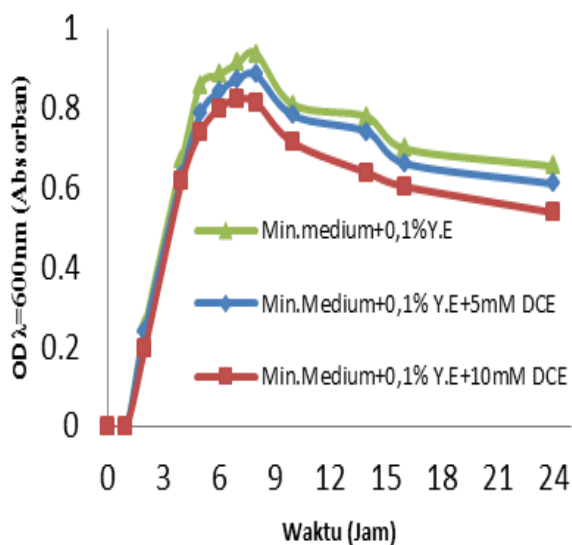
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pseudomonas aeruginosa strain LRE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF440684.1
Pseudomonas aeruginosa strain OCE5_ENT11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF420487.1
Pseudomonas aeruginosa strain CLH2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF495254.1
Pseudomonas aeruginosa strain B5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF111634.1
Pseudomonas aeruginosa strain hsd-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KJ384978.1
Pseudomonas sp. enrichment culture clone RC100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF344083.1
Pseudomonas sp. enrichment culture clone CB-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF164278.1
Pseudomonas aeruginosa strain AQ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF110815.1
Pseudomonas aeruginosa strain SY1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF322024.1
Pseudomonas sp. LCo1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF411752.1
Pseudomonas sp. RB gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	AB339949.1
Pseudomonas aeruginosa strain KDSF7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF384486.1
Pseudomonas aeruginosa strain SJL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF334774.1
Pseudomonas aeruginosa strain A7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF350980.1
Pseudomonas aeruginosa strain NRRI_P-50892 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0.0	99%	KF185110.1

Gambar 2
Hasil penjabaran 16s rDNA

Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan minimal medium (Na₂HPO₄, K₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, dan MgSO₄) yang ditambahkan 0,1% ekstrak ragi. Apabila ekstrak ragi tersebut tidak ditambahkan, bakteri tidak dapat tumbuh. ada minimal medium juga ditambahkan 1,2-dikloroetana (DCE) agar dapat diketahui kemampuan tumbuh dari bakteri tersebut dalam DCE.

Pengukuran kurva pertumbuhan dilakukan dengan memonitor OD (*Optical Density*) atau kekeruhan kultur dengan spektrofotometri pada $\lambda=600\text{nm}$. Prinsip dari pengukuran adalah membandingkan kekeruhan kultur tersebut dengan blankonya. Larutan blanko yang digunakan adalah minimal medium cair yang tidak diinokulasi dengan bakteri. Pengukuran dilakukan pada berbagai konsentrasi DCE yaitu pada 5mM, 10mM, dan tanpa penambahan DCE. Hasil pengamatan nilai OD pada $\lambda = 600\text{nm}$ dialurkan terhadap waktu pertumbuhan dan dapat ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3

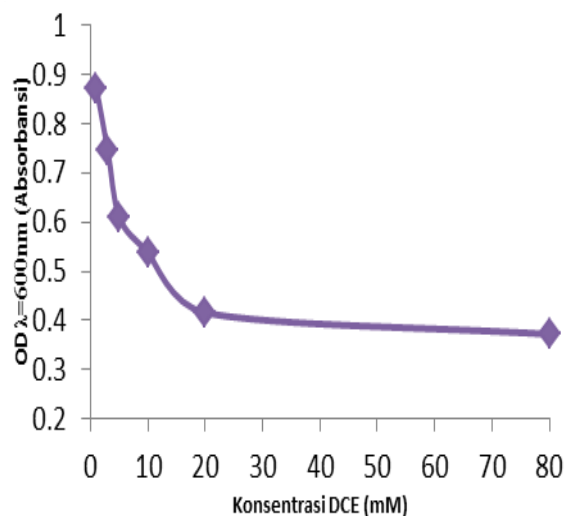
Kurva Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada 0-24 jam

Pada kurva tanpa penambahan DCE terlihat bahwa bakteri tumbuh dengan normal. Ketika ditambahkan 5mM DCE, pertumbuhan bakteri mulai melambat dan tidak sebaik tanpa penambahan DCE. Pada penambahan 10mM DCE, terlihat pertumbuhan bakteri lebih lambat lagi dibandingkan dengan penambahan 5mM. Dapat disimpulkan setelah dilakukan pengukuran selama 24 jam bahwa, semakin banyak konsentrasi DCE yang ada di dalam medium pertumbuhan maka pertumbuhan bakteri tersebut akan semakin lambat dan berkurang. Adanya fakta tersebut membuktikan bahwa adanya penambahan DCE hingga konsentrasi tertentu dapat menjadi toksik bagi bakteri.

Penumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dalam berbagai konsentrasi DCE

Penumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dalam berbagai macam konsentrasi DCE juga dilakukan. Pengukuran OD dilakukan setelah

inkubasi bakteri selama 24 jam dan hasil pengukuran dapat ditunjukkan pada gambar 4.

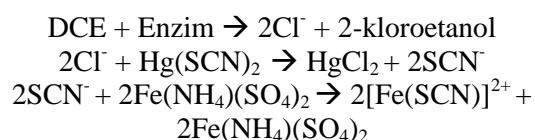


Gambar 4

Kemampuan tumbuh *Pseudomonas aeruginosa*

Uji Aktivitas Haloalkana Dehalogenase Dalam Ekstrak Kasar dan Dalam Masing-Masing Fraksi

Dilakukan uji aktivitas haloalkana dehalogenase terhadap ekstrak kasar protein dan masing-masing fraksi hasil fraksinasi. Uji aktivitas haloalkana dehalogenase dilakukan dengan menggunakan pereaksi $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ dan $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$. Reaksi yang terjadi adalah:



Ion klorida yang terlepas dari substrat DCE akibat aktivitas enzim akan bereaksi dengan $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ dan membentuk senyawa HgCl_2 dan ion tiosianat. Saat penambahan HgCl_2 akan terjadi pengendapan pada larutan karena enzim mengalami denaturasi sehingga pada fasa ini reaksi enzimatik berhenti. Penambahan $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$ yang berfungsi mengikat ion tiosianat dan membentuk $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ sehingga larutan akan berubah menjadi merah. Pengukuran ini dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan tersebut dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 460nm. Sampel hasil uji aktivitas akan berwarna lebih merah dibandingkan dengan larutan blanko.

Konsentrasi Cl^- yang terlepas dari DCE sebanding dengan konsentrasi $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ yang terbentuk. Untuk mengetahui konsentrasi Cl^-

diperlukan suatu kurva larutan standar NaCl. Pembuatan larutan standar ini dilakukan dengan cara mereaksikan NaCl pada berbagai konsentrasi dengan reagen-reagen uji aktivitas dehalogenase. Dengan adanya kurva larutan standar tersebut kita dapat menentukan konsentrasi Cl⁻ yang terlepas. Selain itu, diperlukan penentuan kadar protein dari ekstrak kasar dan kadar protein dari setiap fraksi sehingga dapat ditentukan aktivitas dari masing-masing fraksi dan ekstrak kasar protein. Dari data absorbansi yang didapatkan, dapat dihitung total aktivitasnya pada Tabel 1

Tabel 1

Total aktivitas Haloalkana dehalogenase dalam tiap fraksi dan ekstrak kasar

Fraksi (%)	Konsentrasi Protein (mg/mL)	Total Aktivitas (unit/mL enzim)
0-20	3,658	19,329
20-40	2,695	49,447
40-60	1,944	31,920
60-80	1,670	18,342
80-100	3,079	98,574
Ekstrak	6,866	59,902

1 Unit didefinisikan sebagai kemampuan substrat menghasilkan 1 μmol Cl⁻ per satuan waktu dalam konsentrasi tertentu. Untuk menghitung aktivitas spesifik dari haloalkana dehalogenase maka dapat dihitung dengan cara membandingkan total aktivitas pada Tabel 1 dengan kadar proteinnya, sehingga diperoleh data Tabel 2

Tabel 2

Aktivitas Spesifik Haloalkana Dehalogenase dari Tiap Fraksi dan Ekstrak Kasar

Fraksi (%)	Aktivitas Spesifik (unit/mg protein)	Peningkatan Aktivitas
0-20	5,925	-
20-40	18,382	1,2
40-60	16,800	2
60-80	10,983	2
80-100	32,108	3,5
Ekstrak	8,809	

Pada Tabel 2 diketahui bahwa fraksi 80%-100% memiliki aktifitas spesifik yang paling besar dibandingkan dengan fraksi lainnya. Fraksi ini memiliki peningkatan aktivitas 3,5 kali lebih besar dibandingkan dengan ekstrak kasarnya (aktivitas spesifik = 8,809 unit/mg). Sementara itu pada fraksi 20%-40% dan 40%-60% memiliki peningkatan aktivitas 2 kali dari ekstrak kasarnya, 60%-80% memiliki peningkatan aktivitas 1,2 kali dari ekstrak kasarnya. Pada fraksi 0%-20% tidak terjadi peningkatan aktivitas, hal ini dapat terjadi karena ada kemungkinan protein tersebut telah rusak.

Perbandingan Karakteristik Haloalkana Dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* Strain Lokal Dengan Strain Lain.

Pada penelitian haloalkana dehalogenase dari *Pseudomonas aeruginosa* OK1 yang dilakukan oleh Okoh dkk (Okoh, 2004) didapatkan perbandingan karakteristik pada Tabel 3:

Tabel 3

Perbandingan Karakteristik Haloalkana Dehalogenase

	Strain Lokal	Strain OK1
Aktivitas Spesifik (unit/mg protein)	32,108 (unit/mg protein)	16,1 (unit/mg protein)
Waktu Tumbuh	>12 Jam	< 24 jam

Dari perbandingan karakteristik tersebut dapat dilihat bahwa aktifitas spesifik haloalkana dehalogenase pada *Pseudomonas aeruginosa* strain lokal, jika dibandingkan dengan strain OK1 nilainya berbeda cukup jauh. Karakteristik protein yang berbeda dapat terjadi karena adanya mutasi. Dari perbandingan tersebut, dapat disimpulkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* strain lokal memiliki potensial bioremediasi yang lebih besar dibandingkan dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain OK1.

Kesimpulan

Identifikasi bakteri yang digunakan dalam penelitian ini telah berhasil dilakukan dengan pewarnaan Gram dan dengan PCR 16S rDNA. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri tersebut berhasil ditumbuhkan pada minimal medium yang mengandung DCE pada berbagai konsentrasi dan dapat hidup pada 1–10mM DCE. *Pseudomonas aeruginosa* memiliki haloalkana dehalogenase

dengan aktifitas spesifik 8,809 unit/mg protein (1 Unit = $\mu\text{mol Cl}^-/\text{menit}$). Hasil fraksinasi dengan amonium sulfat memberikan fraksi 80%-100% dengan aktivitas spesifik yang paling tinggi yaitu 32,108 unit/mg protein, aktivitas ini 3,5 kali lebih tinggi dibandingkan aktivitas spesifik pada ekstrak kasarnya. *Pseudomonas aeruginosa* strain lokal memiliki potensial bioremediasi yang lebih besar dibandingkan dengan *Pseudomonas aeruginosa* OK1.

Daftar Pustaka

- Govander, A., dan Pillay, B.. 2011). Characterization of 1,2-DCE Degradation Bacteria Isolated from South African Waste Water, *African Jour.Bio.*, 10(55), 11567-11573.
- Huyop, F.Z., Yusn, T.Y., Ismail, M., Wahab, R.A., and Cooper, R.. 2004. An Overexpressin and Characterisation of non-stereospecific haloacid dehalogenase E (DehE) of *Rhizobium sp.*, *Asia Pasific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 12(1-2), 15-20.
- Idris, Ratnaningsih, E. 2015. Cloning of haloacid dehalogenase gene from *Bacillus cereus* local strain with the addition of restriction site, *Procedia Chemistry*, 16, 314-320.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., dan Naidu, R.. 2011. Bioremediation approach for organic pollutants: A critical perspective, *Enviromental International*, 37, 1362-1375.
- Okoh, A.I., Olaniran, dan Golysin, P., 2004. Dechlorination of 1,2-Dichloroethane by *Pseudomonas aeruginosa* OK1 Isolated from a Waste Dumpsite in Nigeria, *African Jour.of Biotec.*, 3(10), 508-511.
- Tahya, C.Y., Ratnaningsih, E.. 2015. Cloning and sequencing of haloacid dehalogenase gene from *Klebsiella pneumoniae* ITB1, *Procedia Chemistry*, 16, 121-128.
- Torz, Maciej and Beschkov, Venko. 2005. Biodegradation of monochloroacetic acid used as a sole carbon and energy source by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 strain ini batch and continuous culture, *Biodegradation*, 16, 423-433.