

KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PENDEGRADASI FRAKSI ASPALTIK HIDROKARBON LUMPUR MINYAK BUMI

Novi Febrianti¹, Irfan D Prijambada^{1,2}, Langkah Sembiring^{1,3}, dan
Donny Widiyanto²

INTISARI

Febrianti, N., I.D. Prijambada, L. Sembiring, dan D. Widiyanto. 2003. Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Pendegradasi Fraksi Asfaltik Hidrokarbon Lumpur Minyak Bumi. *Biologi 3 (2) : 115 - 128.*

Bakteri pendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon minyak bumi diisolasi dari habitat yang belum terpapar minyak bumi yaitu tanah hutan, kompos serta sedimen hutan bakau, lalu dikarakterisasi dan diidentifikasi secara fenotipik dan genotipik. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri yang potensial mendegradasi fraksi asfaltik. Bakteri diisolasi dari sampel tanah dengan menggunakan medium Bushell-Haas yang mengandung fraksi asfaltik sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Selanjutnya isolat yang diperoleh diuji kemampuannya mendegradasi fraksi asfaltik dalam media pertumbuhan. Seleksi isolat dilakukan berdasarkan kecepatan pertumbuhan dan kemampuan mendegradasi fraksi asfaltik.

Dalam penelitian ini diperoleh 7 isolat, yaitu 3 isolat (H1, H2 dan H3) berasal dari sampel tanah hutan, 2 isolat (K1 dan K2) berasal dari sampel kompos, dan 2 isolat (B1 dan B2) berasal dari sampel sedimen hutan bakau. Berdasarkan kemampuan mendegradasi fraksi asfaltik, diseleksi 5 isolat (H1, K1, K2, B1 dan B2) untuk diuji kemampuan degradasinya serta dikarakterisasi untuk tujuan identifikasi. Uji degradasi menunjukkan bahwa isolat H1 adalah yang paling potensial dalam mendegradasi fraksi asfaltik (52,5 %) lalu diikuti oleh isolat B1 (11%), isolat K1 (8,5%), isolat K2 (7,5%) dan isolat B2 (1,5%). Uji kecepatan pertumbuhan juga menunjukkan bahwa isolat H1 adalah yang paling unggul ($\mu = 0,109 \text{ jam}^{-1}$) lalu diikuti oleh isolat B1 ($\mu = 0,091 \text{ jam}^{-1}$), isolat K1 ($\mu = 0,080 \text{ jam}^{-1}$), isolat K2 ($\mu = 0,076 \text{ jam}^{-1}$) dan isolat B2 ($\mu = 0,080 \text{ jam}^{-1}$). Berdasarkan karakterisasi fenotipik dan genotipik, empat isolat (H1, K1, K2 dan B1) diidentifikasi sebagai anggota genus *Acinetobacter*. Dengan demikian, bakteri pendegradasi fraksi asfaltik dapat diperoleh dari habitat alami yang belum tercemar oleh minyak bumi karena adanya kemiripan struktur kimiawi antara fraksi asfaltik dengan asam humat yang merupakan hasil degradasi lignin.

Kata kunci: fraksi asfaltik, lumpur minyak bumi, pendegradasi, *Acinetobacter*.

¹) Pascasarjana Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²) Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta

³) Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UGM Yogyakarta

ABSTRACT

Febrianti, N., I.D. Prijambada, L. Sembiring, and D. Widiyanto. 2003. Characterisation and Identification of Asphaltic Hydrocarbon Fraction of Oilsludge-Degrading Bacterial Isolates. *Biologi* 3 (2) : 115 - 128.

Asphaltic fraction-degrading bacteria were isolated from natural habitats of forest soils, composts and mangrove forest sediments, which were not contaminated by oil. The isolates were characterized and identified by phenotypic and genotypic methods. The objective of the study was to obtain potential asphaltic fraction-degrading bacterial isolates. The bacteria were isolated from samples by using Bushell-Hass media, which was containing asphaltic fraction as a sole carbon and energy sources. The bacterial isolates obtained were tested for the ability to degrade asphaltic fraction in the growth media. The isolates were selected on the basis of their growth rate and ability to degrade asphaltic fraction.

The study was able to obtain 7 bacterial isolates, namely 3 isolates (H1, H2 and H3) from forest soil samples, 2 isolates (K1 and K2) from compost samples, and 2 isolates (B1 and B2) from mangrove forest sediments. Based on their ability to degrade asphaltic fraction, 5 isolates (H1, K1, K2, B1 and B2) were selected for further biodegradability and characterization tests. The result of biodegradability test indicated that the isolate H1 was found to be the best asphaltic degrader (52%) followed by the isolate B1 (11%), K1 (8.5%), K2 (7.5%) and the isolate B2 (1.5%). Growth rate test also showed that the isolate H1 was the best, with the instantaneous growth rate constant (μ) of 0.109 h^{-1} followed by the isolates B1 ($\mu = 0.091 \text{ h}^{-1}$), K1 ($\mu = 0.080 \text{ h}^{-1}$), K2 ($\mu = 0.076 \text{ h}^{-1}$) and the isolate B2 ($\mu = 0.080 \text{ h}^{-1}$). On the basis of phenotypic and genotypic characterization, four isolates (H1, K1, K2 and B1) were assigned to the genus *Acinetobacter*. Therefore, it was assumed that the asphaltic fraction-degrading bacteria could be obtained from natural habitats, which were not contaminated by oil because of similarity of molecular structure between the asphaltic fraction and lignin degradation product (humic acid).

Key words: asphaltic fraction, oil sludge, biodegrading, *Acinetobacter*

PENDAHULUAN

Minyak bumi merupakan sumber bahan bakar minyak dan sumber penting untuk minyak pelumas, pelarut dan berbagai senyawa kimia (Bartha dan Bossert, 1984). Kegiatan pengolahan minyak bumi menghasilkan lumpur minyak yang merupakan salah satu jenis limbah berbahaya karena bersifat toksik terhadap mikrobial, tumbuhan, hewan dan

manusia (Rosenberg dan Ron, 1996).

Lumpur minyak adalah limbah pengolahan minyak bumi yang terdiri atas minyak, air dan padatan mineral (Dibble dan Bartha, 1979). Komponen minyak dari lumpur tersebut adalah campuran berbagai golongan senyawa hidrokarbon, antara lain senyawa alifatik, aromatik dan asfaltik (Harayama *et al.*, 1999). Fraksi asfaltik minyak bumi merupakan

golongan senyawa hidrokarbon yang mempunyai struktur kimia yang kompleks karena tersusun atas senyawa poliaromatik dan sikloalkana serta mengandung unsur N, S dan O sehingga membuatnya sulit didegradasi. Penambahan kompos dan berbagai jenis tanah yang belum pernah terpapar minyak bumi (tanah gambut, tanah hutan, tanah bakau) mampu meningkatkan proses degradasi hidrokarbon lumpur minyak (Kastner dan Mahro, 1996; Prijambada *et al.*, 2002). Beberapa jenis tanah, khususnya tanah yang berdekatan dengan jalan beraspal mempunyai mikrobial yang mampu mendegradasi aspal (McGill *et al.*, 1988).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang mampu mendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon lumpur minyak bumi, mengetahui kecepatan pertumbuhan dan kemampuan degradasi, menentukan karakteristik, serta mengklasifikasi dan mengidentifikasi isolat-isolat bakteri tersebut secara fenetik dan filogenetik (berdasar sekuen 16S rDNA)

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan adalah tanah hutan dari Kabupaten Gunungkidul, Yogyakarta, tanah sedimen hutan bakau dari pantai Kabupaten Kendal, Jawa

Tengah, tanah gambut dari Rawa Pening Kabupaten Semarang, Jawa Tengah dan kompos sampah kota dari unit pengolahan sampah kota Kabupaten Sleman, Yogyakarta.

Ekstraksi hidrokarbon dari lumpur minyak bumi

Lumpur minyak yang berasal dari unit penampung lumpur minyak pada Pertamina Unit V - Balikpapan, Kalimantan Timur sebanyak 40 ml dimasukkan ke dalam kantong kertas saring. Kantong tersebut dimasukkan ke dalam ekstraktor SOKHLET, lalu 50 ml dietil eter dimasukkan ke dalam labu SOKLHET. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan penangas air bersuhu 60°C selama 4-5 siklus atau sampai cairan yang keluar dari SOKHLET menjadi jernih.

Fraksinasi hidrokarbon lumpur minyak bumi

Fraksinasi dilakukan dalam kolom gelas yang berisi Kiesel gel 60. Elusi dilakukan berturut-turut dengan menggunakan *n*-heksana untuk mendapatkan fraksi alifatik, benzena untuk fraksi aromatik, dan campuran kloroform:metanol (1:1) untuk mendapatkan fraksi asfaltik.

Isolasi bakteri pendegradasi fraksi asfaltik

Suspensi tanah sebanyak 1 ml diinokulasikan ke dalam 5 ml medium

mineral Bushnell-Haas cair (KH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 1 g, NH_4NH_3 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, FeCl_3 0,05 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, akuades 1000 ml) (Atlas, 1995) yang mengandung 0,02 g fraksi asfaltik. Inkubasi dilakukan sambil digojog pada suhu kamar sampai terlihat adanya degradasi asfaltik (minyak pecah dan media menjadi keruh). Isolasi bakteri dari biakan yang tumbuh dilakukan dengan metode taburan pada medium nutrisi agar.

Seleksi isolat bakteri pendegradasi fraksi asfaltik

Seleksi isolat bakteri dilakukan dalam dua tahap. Seleksi tahap pertama dilakukan berdasarkan kemampuan kualitatif dalam mendegradasi fraksi asfaltik yang ditandai dengan terpecahnya fraksi asfaltik dan media yang menjadi keruh. Seleksi berikutnya dilakukan berdasarkan kecepatan pertumbuhan dan kemampuan kuantitatif dalam mendegradasi fraksi asfaltik. Pertumbuhan bakteri diukur berdasarkan nilai konstanta kecepatan pertumbuhan spesifik (μ), konstanta kecepatan pertumbuhan rerata (k) dan waktu generasi (g). Isolat bakteri yang mempunyai kecepatan tumbuh dan kemampuan degradasi tinggi dipilih untuk ditentukan karakteristiknya.

Ekstraksi residu fraksi asfaltik

Residu fraksi asfaltik diekstraksi dengan menggunakan metanol-kloroform (1:1). Fraksi asfaltik yang terekstraksi dikumpulkan, dikeringkan pada temperatur 40°C dan kemudian ditimbang.

Karakterisasi

Karakter isolat bakteri yang diuji meliputi empat kelompok, yaitu morfologi koloni, morfologi sel, sifat biokimiawi dan sifat fisiologis.

Identifikasi fenetik

Identifikasi fenetik dilakukan dengan metode kesamaan profil (*profile matching*) berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Identifikasi ini dilakukan dalam upaya menentukan strain acuan untuk identifikasi filogenetik

Identifikasi filogenetik

DNA bakteri diekstraksi dan dipurifikasi berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989). DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan metode PCR dengan menggunakan primer 20F (5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3' = posisi 8-27 pada *E. coli*) dan 1500R (CGATCCTACTTGCGTAG = posisi 1510-1492 pada *E. coli*) (Triyanto *et al.*, 1997). Hasil amplifikasi 16S rDNA

dikirim ke *Biotechnology Research Center, The University of Tokyo* untuk dianalisis urutan basa 16S rDNAny. Klasifikasi filogenetik dilakukan dengan mengkonstruksi pohon filogeni, menentukan nilai similaritas urutan basa 16S rDNA dan jumlah nukleotida yang berbeda antara urutan basa 16S rDNA isolat-isolat bakteri uji dan urutan basa 16S rDNA strain acuan. Strain acuan ditentukan berdasarkan hasil identifikasi fenetik isolat bakteri. Data urutan basa 16S rDNA strain acuan diperoleh dari bank data internasional (<http://www.ncbi>). Data urutan basa 16S rDNA isolat bakteri dan strain acuan diolah dengan program PFE (*Programmer File Editor*) dan selanjutnya *dialign* dengan menggunakan program ClustalX (Thompson *et al.*, 1997 *cit.* Sembiring, 2002). Konstruksi pohon filogeni dilakukan menggunakan program Phylip (*Phylogeny Inference Package*) (Felsenstein, 1993) yang kemudian divisualisasi dengan program *Treeview*. Untuk mencari similaritas dan jumlah nukleotida yang berbeda antar isolat dan strain dalam genus yang sama digunakan program *Phylogenetic Editor* (Chun, 1999). Identifikasi filogenetik dilakukan berdasarkan hasil analisis pohon filogeni, nilai similaritas 16S rDNA dan jumlah nukleotida yang berbeda antara urutan basa 16S rDNA isolat bakteri dan strain acuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri pendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon lumpur minyak bumi

Isolasi bakteri pendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon lumpur minyak bumi menghasilkan delapan isolat yang mampu tumbuh pada medium mineral yang mengandung fraksi asfaltik sebagai satu-satunya sumber karbon, yaitu tiga isolat dari tanah hutan (H1, H2, H3), dua isolat dari kompos sampah kota (K1, K2), dua isolat dari tanah bakau (B1, B2) dan satu isolat dari tanah gambut (G).

Keempat jenis tanah sumber isolat adalah tanah yang belum pernah terpapar minyak bumi tetapi memiliki kandungan bahan organik yang tinggi. Menurut Fulthorpe dan Schofield (1999), bahan organik tanah yang berasal dari sisa tumbuhan mempengaruhi kemampuan metabolik komunitas mikrobia. Salah satu bahan organik sisa tumbuhan yang jumlahnya cukup melimpah adalah lignin. Lignin merupakan salah satu komponen penyusun dinding sel tumbuhan yang penting dan merupakan sumber komponen aromatik yang paling kaya di alam (Coyne, 1999). Adanya kemiripan struktur lignin dengan struktur fraksi asfaltik yang sama-sama mengandung cincin aromatik diduga merupakan penyebab ditemukannya bakteri pendegradasi fraksi asfaltik di lingkungan

yang kaya lignin. McGill *et al.* (1988) menyatakan bahwa hasil degradasi senyawa asfaltik sangat mirip dengan asam humat yang merupakan hasil degradasi lignin.

Seleksi isolat bakteri pendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon lumpur minyak bumi

Kedelapan isolat yang diperoleh diseleksi untuk mengetahui kemampuannya dalam mendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon lumpur minyak bumi secara kualitatif. Seleksi tersebut menghasilkan lima isolat bakteri, yaitu isolat H1, K1, K2, B1 dan B2. Seleksi lebih lanjut dilakukan berdasarkan kemampuan pertumbuhannya. Pertumbuhan isolat-isolat dalam medium Bushnell-Haas cair ditunjukkan dalam Tabel 1. Isolat H1, K1, K2 dan B1 mempunyai kecepatan pertumbuhan yang cukup tinggi dan waktu

generasi yang pendek. Isolat-isolat ini dikarakterisasi secara fenotipik dan molekular.

Kemampuan isolat mendegradasi fraksi asfaltik

Kemampuan degradasi isolat-isolat bakteri ditentukan secara kuantitatif dengan metode gravimetri. Dalam uji degradasi ini terlihat bahwa isolat H1 mempunyai kemampuan degradasi tertinggi (52,5%) diikuti oleh isolat B1, K1, K2 dan B2 (Tabel 2.).

Berdasarkan kemampuan mendegradasi fraksi asfaltik isolat H1 adalah yang paling potensial karena dapat mendegradasi lebih dari 50% fraksi asfaltik dalam media pertumbuhan (Tabel 2.). Isolat H1 diperoleh dari sampel tanah hutan yang diperkirakan tidak terpaparkan oleh bahan yang mengandung fraksi asfaltik. Hasil ini menunjukkan bahwa mikrobia yang belum terpaparkan

Tabel 1. Parameter kinetika pertumbuhan isolat bakteri pendegradasi fraksi asfaltik.

Kode isolat	k (jam ⁻¹)	μ (jam ⁻¹)	g (jam)
H1*	0,158	0,109	6,329
K1*	0,115	0,080	8,686
K2*	0,110	0,076	9,091
B1*	0,132	0,091	7,576
B2	0,079	0,055	12,658

Keterangan: * isolat yang dipilih untuk dikarakterisasi

oleh asfaltik dapat memiliki kemampuan mendegradasi substansi ini. Fakta ini mungkin dapat dijelaskan dengan dasar pemikiran bahwa kemiripan struktur kimiawi antara fraksi asfaltik dengan komponen penyusun bahan organik sisa-sisa tumbuhan yang banyak terdapat dalam tanah hutan telah dihadapkan kepada komunitas mikrobial yang terdapat dalam tanah hutan. Dengan demikian, potensi mendegradasi fraksi asfaltik sudah ada pada isolat tersebut sebelum terpapar dengan substansi yang mengandung asfaltik. Dugaan ini sesuai dengan hasil yang ditemukan oleh Boyle dan Sahn (1995) yang mengisolasi bakteri dari daerah rizosfer.

Karakteristik fenotipik

Empat isolat terpilih, yaitu H1, K1, K2 dan B1 selanjutnya dikarakterisasi secara fenotipik yang meliputi morfologi koloni, morfologi sel, sifat-sifat

biokimiawi dan sifat-sifat fisiologis. Keempat isolat memiliki karakter fenotipik yang hampir sama yaitu mempunyai bentuk koloni sirkular, bentuk sel batang pendek, bersifat gram negatif, *non motile*, aerob, oksidase negatif, katalase positif serta beberapa sifat-sifat lain yang sama (Tabel 3).

Analisis fenotipik keempat isolat bakteri pendegradasi fraksi asfaltik menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut memiliki beberapa sifat fenotipik yang sama, yaitu berbentuk batang, bersifat aerob, oksidase negatif dan katalase positif. Berdasarkan persamaan karakter fenotipik di atas, maka identifikasi menggunakan metode kesamaan profil menyimpulkan bahwa keempat isolat termasuk dalam genus *Acinetobacter*. Reaksi oksidase negatif merupakan karakter pembeda genus ini dengan anggota famili Neisseriaceae yang lain. (Holt *et al.*, 1994; Towner, 1992).

Tabel 2. Kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi fraksi asfaltik.

Kode isolat	Kemampuan degradasi (%)
H1	52,5
K1	8,5
K2	7,5
B1	11
B2	1,5

Tabel 3. Karakter fenotipik isolat bakteri pendegradasi fraksi asfaltik

Pengamatan	Kode Isolat			
	H1	K1	K2	B1
A. Morfologi koloni:				
Bentuk	Sirkular	Sirkular	Sirkular	Sirkular
Elevasi	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>	<i>Flat</i>	<i>Low convex</i>
Tepi	<i>Entire</i>	<i>Lobate</i>	<i>Undulate</i>	<i>Entire</i>
Struktur dalam	<i>Opaque</i>	<i>Finely granular</i>	<i>Coarsely granular</i>	<i>Smooth</i>
Warna	Krem	Krem	Krem	Krem
B. Morfologi sel:				
Bentuk	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
Susunan sel	Berpasangan	Berpasangan	Berpasangan	Rantai
Reaksi gram	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Ukuran (um)				
Fase logaritmik	1,0-1,3x1,6-2,2	1,2-1,5x1,6-2,4	1,2-1,5x1,8-2,6	0,9-1,2x1,5-2,5
Fase stasioner	0,6-0,8x 1,0-1,2	0,6-0,9x 1,0-1,3	0,6-0,8x 1,3-1,5	0,5-0,7x1,0-1,3
Motilitas	<i>Non motile</i>	<i>Non motile</i>	<i>Non motile</i>	<i>Non motile</i>
C. Karakter biokimiawi:				
Oksidase	-	-	-	-
Katalase	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-
Fenilalanin deaminase	-	-	-	-
Reduksi nitrat	-	-	-	+
Pembentukan indol	-	-	-	-
Pembentukan H ₂ S	-	-	-	-
Hidrolisis gelatin	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-
Hidrolisis pati	-	-	-	-
Fermentasi karbohidrat:				
Glukosa	+	+	+	+
Maltosa	-	-	+	+
Laktosa	-	-	-	+
Silosa	+	+	+	+
D. Karakter fisiologis:				
Kebutuhan O ₂	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob
Pertumbuhan pada 20°C	+	+	+	+
Pertumbuhan pada 37°C	+	+	+	+
Pertumbuhan pada 42°C	-	-	-	-

Identifikasi fenetik isolat bakteri

Identifikasi fenetik dengan metode *profile matching* berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) menunjukkan bahwa sifat-sifat gram negatif, aerob, berbentuk batang, oksidase negatif dan katalase positif merupakan karakter kunci strain anggota genus *Acinetobacter*.

Cebrian (1960) melaporkan bahwa *Acinetobacter* merupakan salah satu jenis bakteri yang mampu tumbuh pada bahan-bahan yang mengandung aspal. Bakteri anggota genus *Acinetobacter* ini juga diketahui mampu mendegradasi berbagai senyawa organik, antara lain senyawa aromatik seperti benzoat dan kuinat, senyawa alisiklik seperti sikloheksanol dan senyawa hidrokarbon (Krieg dan Holt, 1982; Huy *et al.*, 1999; Prescott, 1999). Dengan demikian, hasil penelitian ini mendukung penelitian yang dilakukan sebelumnya mengenai anggota genus *Acinetobacter* yang mampu mendegradasi berbagai senyawa organik, termasuk dalam penelitian ini mampu mendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon lumpur minyak bumi.

Karakteristik molekular isolat bakteri

Karakteristik molekular isolat-isolat bakteri pendegradasi fraksi asfaltik

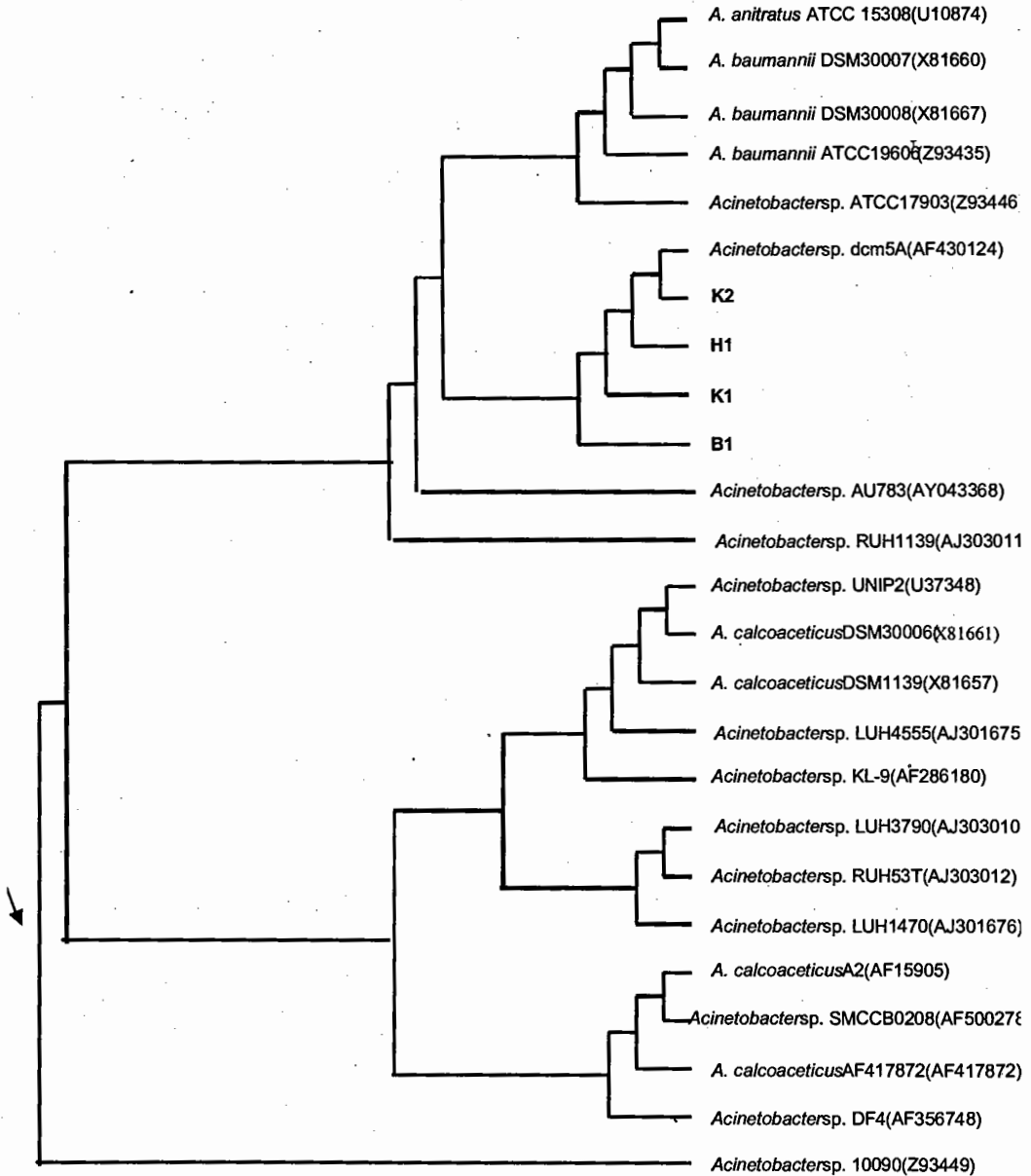
hidrokarbon lumpur minyak bumi dilakukan dengan menganalisis urutan basa 16S rDNANYa. Pohon filogeni yang dihasilkan (Gambar 1.) menunjukkan bahwa keempat isolat terkumpul dalam satu kelompok dengan *Acinetobacter* sp. dcm5A (Gonzales, 2001). Identifikasi filogenetik dengan membandingkan nilai similaritas 16S rDNA isolat bakteri uji dengan urutan basa 16S rDNA strain acuan (Tabel 4.) menunjukkan bahwa isolat H1, K1 dan K2 memiliki similaritas 16S rDNA paling tinggi dengan *Acinetobacter* sp. dcm5A (92,18-94,02%), sedangkan isolat B1 memiliki similaritas 16S rDNANYa paling tinggi dengan *A. baumannii* DSM 30007 dan *A. baumannii* DSM 30008 (92,74 %). Hasil perhitungan jumlah nukleotida yang berbeda (Tabel 4.) juga menunjukkan isolat H1, K1 dan K2 memiliki jumlah perbedaan nukleotida paling sedikit dengan *Acinetobacter* sp. dcm5A. Hasil ini mendukung hasil identifikasi fenetik bahwa keempat isolat merupakan anggota genus *Acinetobacter*.

KESIMPULAN

Bakteri pendegradasi fraksi asfaltik hidrokarbon lumpur minyak bumi berhasil diisolasi dari berbagai jenis tanah yang belum pernah terpapar minyak bumi. Diantara isolat tersebut, ada satu (isolat H1) yang mampu mendegradasi lebih dari 50% fraksi asfaltik yang terdapat

Tabel 4. Nilai Similaritas 16S rDNA (%) dan jumlah nukleotida yang berbeda antara strain acuan dan isolat bakteri pendegradasi fraksi aspalitik yang berada dalam satu kluster.

Kode strain/isolat	<i>Acinetobacter</i> sp. ATCC 17903	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T	<i>A. anitratus</i> ATCC 15308	<i>A. baumannii</i> DSM 30007	<i>A. baumannii</i> DSM 30008	<i>Acinetobacter</i> sp. RUH 1139	<i>Acinetobacter</i> sp. AU 783	Isolat B1	<i>Acinetobacter</i> sp. dcm5A	Isolat K2	Isolat H1	Isolat K1
<i>Acinetobacter</i> sp. ATCC 17903	-----	51/1415	6/1416	3/1402	3/1402	29/1396	23/1415	56/758	750/1320	562/1407	556/1048	558/1054
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T	99,65	-----	5/1415	2/1402	2/1402	28/1395	22/1414	57/757	751/1319	564/1046	557/1047	560/1053
<i>A. anitratus</i> ATCC 15308	99,58	99,65	-----	2/1459	2/1459	30/1465	30/1458	63/767	826/1422	564/1048	557/1049	559/1055
<i>A.bauma</i> DSM 30007	99,79	99,86	99,86	-----	0/1459	28/1453	20/1437	54/744	793/1377	562/1047	556/1048	558/1054
<i>A. baumannii</i> DSM 30008	99,79	99,86	99,86	100	-----	28/1453	20/1437	54/744	793/1377	562/1047	556/1048	558/1054
<i>Acinetobacter</i> sp. RUH 1139	97,92	97,99	97,95	98,07	98,07	-----	14/1432	63/738	797/1389	559/1047	551/1048	555/1054
<i>Acinetobacter</i> sp. AU 783	98,37	98,44	97,94	98,61	98,61	99,02	-----	69/766	775/1355	561/1047	554/1048	556/1054
Isolat B1	92,61	92,47	91,79	97,74	97,74	91,46	90,99	-----	357/672	363/684	365/693	363/634
<i>Acinetobacter</i> sp. dcm5A	43,18	43,06	41,91	42,41	42,41	42,62	42,80	42,88	-----	65/1087	73/1086	85/1087
Isolat K2	46,32	46,08	46,18	46,32	46,32	46,61	46,42	46,93	94,02	-----	59/1084	53/1069
Isolat H1	46,96	46,80	46,90	46,95	46,95	47,42	47,14	45,56	93,28	94,56	-----	46/1079
Isolat K1	47,06	46,82	47,01	47,06	47,06	47,34	47,25	46,93	92,18	95,04	95,74	-----



Gambar 13. Pohon filogeni yang dibuat berdasarkan algoritma Neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) dengan menggunakan data sekuen 16S rDNA, menunjukkan hubungan antara isolat dengan strain acuan anggota genus *Acinetobacter*. Tanda panah menunjukkan letak estimasi akar (*root*) pohon filogeni yang dikonstruksi.

dalam media pertumbuhan. Hal ini menunjukkan bahwa mikrobia yang potensial mendegradasi minyak bumi dapat diperoleh dari habitat yang belum pernah tercemar minyak bumi diduga karena adanya kemiripan struktur molekul antara fraksi asfaltik dengan asam humat (*humic acid*) yang merupakan hasil degradasi lignin. Hasil identifikasi secara fenotipik dan genotipik menunjukkan bahwa isolat yang ditemukan merupakan anggota genus *Acinetobacter*. Adanya strain anggota genus *Acinetobacter* yang mampu mendegradasi komponen minyak bumi telah ditunjukkan oleh beberapa peneliti sebelumnya.

PUSTAKA ACUAN

- Atlas, R.M. 1995. *Handbook of Environmental Microbiology*. CRC Press. Boca Raton.
- Bartha, R., and R. Bossert. 1984. The treatment and disposal of petroleum wastes, In: Atlas, R.M. (ed). *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company. New York. pp. 535-575.
- Boyle, J.J., and J.R. Sahmn. 1995. Biodegradation of phenol, 2,4-D, 2,4-D and 2,4,5-T in the field by collected rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Journal of Environmental Quality* 24: 782 - 785.
- Cebrian, J.M.M. 1960 Microbial deterioration of bituminous material: selection of microorganisms with specific metabolic capacity on hydrocarbon, In: Oxley, T.A. and S. Barry. (eds). *Biodeterioration* 5. John Wiley and Sons Ltd., Chichester. pp. 472-485.
- Chun, J. 1999. *Phylogenetic Editor (PHYDIT)*. Windows Version.
- Coyne, M.S. 1999. *Soil Microbiology: An Exploratory Approach*. Delmar Publisher. London.
- Dibble, J.T., and R. Bartha. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied Environmental Microbiology* 37: 729-739.
- Felsenstein, J. 1993. *Phylogenetic Inference Package* version 3.5 c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Fulthorpe, R.R., and L.N. Schofield. 1999. A comparison of the ability of forest and agricultural soils to mineralize chlorinated aromatic compounds. *Biodegradation* 10: 235-244.
- Gonzales, J.M., V.I. Krausova, and F.T. Robb. 2001. Bacterial degradation of dichloromethene in an estuarine environment. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Harayama, S., H. Kishira, and K. Shusubo. 1999. Petroleum biodegradation in marine environment. *Journal of Molecular and Microbial Biotechnology* 1: 63-70.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition*. Williams dan Wilkins. Baltimore.
- Huy, N.Q., S. Jin, K. Amada, M. Haruki, N.D. Huu, D T. Hang, D.T.C. Haa, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya. 1999. Characterisation of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1: 100-102.
- Kastner, M., and B. Mahro. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil affected by organic matrix of compost. *Applied Microbiology dan Biotechnology* 44: 668-675.
- Krieg N.R., and J.G. Holt. 1982. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1*. Williams dan Wilkins. Baltimore.
- McGill, W.B., M.J. Rowell, and D.W.S. Westlake. 1988. Biochemistry, ecology, and microbiology of petroleum component. In: Paul, E.A., and J.N. Ladd. (eds). *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 299-281.
- Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.P. Klein. 1999. *Microbiology 4th*. WCB McGraw-Hill. Boston.
- Prijambada, I., D. Widiyanto, dan Fahrudin. 2002. *Proceedings Environmental Technology dan Management. Bandung January 9-10, 2002*. pp. OEM 7-1 – OEM 7-6.
- Rosenberg, E., and E.Z. Ron. 1996. Bioremediation of petroleum contamination. In: Crawford, R.L., and D.L. Crawford. (eds).. *Bioremediation Principles and Application*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 100-124.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sembiring, L. 2002. *Petunjuk Praktikum Sistematika Molekular untuk Mahasiswa S-2. Program Pascasarjana Biologi*. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UGM.

Saitou, N., and M. Nei. 1987. The Neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Towner, K.J. 1992. The genus *Acinetobacter*. In: Balows, A., H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer. (eds.). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications Volume 4*. Springer Verlag. New York. p.3137-3143.

Triyanto, H.N. Kamiso, A. Isnansetyo, dan Murwantoko, 1997. Pembuatan Antigen murni untuk memproduksi polivalen Antibodi dan vaksin *Aeromonas hydrophyla*. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing V/I Perguruan Tinggi tahun Anggaran 1996 – 1997*. Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta,