

Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA,
Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta, 16 Mei 2009

BAKTERI LAUT ISOLAT PULAU PARI PENDEGRADASI KOMPONEN *CRUDE OIL*

Dhama Susanthi¹; I Made Sudiana², Langkah Sembiring³

¹Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada; ²Puslit Biologi LIPI Cibinong;

³Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UGM.

Abstrak

Dalam upaya untuk melakukan bioremediasi tumpahan minyak bumi dilakukan penelitian bakteri laut yang mampu mendegradasi komponen *crude oil* yaitu *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin*. Sampel air laut Pulau Pari, DKI Jakarta diaklimasi dalam *column reactor* selama 2 bulan dengan 6 variasi *fertilizer* (*Super IB*, NH_4NO_3 , *Uric Acid*, *Hi-Control*, *Osmocoat*, dan *Chitosan*). Kemudian sampel bakteri diisolasi pada medium ONR7a padat yang ditambah dengan 100 μl *crude oil*. Bakteri potensial pendegradasi *crude oil* diisolasi dan dipurifikasi pada medium *marine agar* secara *streak plate* dan disubkultur. Enambelas isolat terpilih diuji kemampuannya mendegradasi *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin*. Isolat bakteri terpilih yaitu Dn yang terbukti dapat mendegradasi ketiga komponen *crude oil*. Selanjutnya isolat bakteri tersebut diuji pertumbuhannya pada 5 macam medium yaitu *marine broth*, *polypepton*, medium yang mengandung *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin*. Uji pertumbuhan dilakukan pada kadar NaCl 2% dan 5% pada suhu 30°C serta rasio C/N/P = 100:20:3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri tercepat pada medium yang mengandung DBT dengan kadar NaCl 2% ($g = 3,029$ jam), sedangkan pada medium yang mengandung *paraffin* kadar NaCl 2% memerlukan waktu pertumbuhan terlama ($g = 9,342$ jam). Pengukuran kemampuan sel bakteri melekat pada hidrokarbon (MATH) menunjukkan bahwa nilai adhesi tertinggi terhadap substrat *phenanthrene* yaitu 89,23%. Berdasarkan karakterisasi morfologi koloni, morfologi sel, pengecatan gram, karakterisasi fenotipik dengan kit API 20 NE, diketahui bahwa isolat Dn berbentuk diplococcus, bersifat gram negatif, dan bersifat *denitrifier*. Identifikasi molekular berdasarkan *sequencing* 16S rRNA dan konstruksi *phylogenetic tree* menunjukkan bahwa isolat Dn sangat mirip dengan *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 27132^T. Dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri laut di perairan Pulau Pari yang diaklimasi dalam *colum reactor* beranekaragam dan terdapat isolat bakteri Dn yang mampu mendegradasi ketiga komponen *crude oil* dengan penambahan sumber N dan P.

Kata Kunci : Bakteri Laut Pulau Pari, *Crude Oil*, *Phenanthrene*, DBT, *Paraffin*, Bioremediasi.

PENDAHULUAN

Minyak mentah (*crude oil*) merupakan bahan dasar untuk keperluan bahan bakar dan industri. Kegiatan eksplorasi, transportasi, dan distribusi minyak mentah terutama melalui lautan sering terjadi kebocoran (Sudrajad, 2006). Negara penghasil minyak bumi seperti Indonesia yang juga merupakan jalur transportasi kapal pengangkut minyak menambah resiko terjadinya *oil spill* tersebut. Oleh karena itu, tumpahan minyak di laut menjadi salah satu masalah yang serius karena mengakibatkan kerusakan lingkungan dan menimbulkan dampak negatif untuk organisme hidup termasuk manusia.

Minyak mentah terdiri dari banyak komponen penyusun. Menurut Cohen (2002) komponen penyusun minyak mentah dibagi dalam 4 kelompok yaitu hidrokarbon jenuh, aromatik, *resins*, dan *asphaltenes*. Salah satu komponen penyusun minyak mentah yaitu aromatik atau *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAHs) merupakan salah satu komponen yang sulit terdegradasi dan

berbahaya bagi makhluk hidup karena dapat terakumulasi dalam rantai makanan (Hughes *et al.*, 2003). Komponen PAHs yang terkenal sulit terdegradasi dan bersifat toksik, mutagenik, dan karsinogenik ini adalah *phenanthrene* dan *dibenzothiophene* (Kasai *et al.*, 2002).

Paraffin merupakan komponen minyak mentah dan termasuk dalam alkana rantai panjang. Degradasi *paraffin* sangat penting peranannya dalam bioremediasi khususnya bioremediasi *in situ* yang dikenal dengan MEOR (*Microbial Enhance Oil Recovery*). Hal ini berkaitan dengan sifat minyak yang memiliki *pour point* tertentu yaitu tingkat temperatur yang mengubah minyak menjadi memadat atau berhenti mengalir sehingga penting dalam prediksi kelakuan minyak di air dan penetapan strategi pembersihan minyak (Mangkoedihardjo, 2005). Penelitian membuktikan bahwa bakteri pendegradasi *paraffin* dapat menurunkan *pour point* minyak mentah Limbadora dari 37°C menjadi 31°C sehingga memudahkan dalam *recovery* dan remediasi (Anonim, 2008a).

Ada 3 cara untuk remediasi pencemar yaitu secara fisikawi, kimiawi, dan biologis. Remediasi secara fisikawi dan kimiawi bersifat sementara dan tidak tuntas dalam menghilangkan minyak dari lingkungan. Remediasi secara kimiawi juga kurang efektif karena menambah beban lingkungan dengan bahan kimia yang diintroduksi. Akan tetapi, remediasi secara biologis merupakan alternatif remediasi yang ramah lingkungan. Remediasi secara biologis atau yang lebih dikenal dengan bioremediasi ini merupakan teknologi yang menggunakan mikrobia untuk mengolah pencemar melalui mekanisme biodegradasi alamiah (*intrinsic biodegradation*) atau meningkatkan mekanisme biodegradasi dengan menambah mikrobia, nutrisi, donor elektron atau akseptor elektron (*enhanced bioremediation*) (Anonim, 2008b). Tujuan utama bioremediasi adalah untuk menghilangkan kontaminan dalam lingkungan sehingga dapat mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan (Bonner *et al.*, 1997).

Sebagai usaha untuk meningkatkan bioremediasi di perairan Indonesia, perlu adanya pencarian mikrobia lokal yang berpotensi tinggi untuk mendegradasi pencemar. Bioremediasi secara umum menggunakan mikrobia yang diisolasi dari lingkungan terkontaminasi dengan penambahan *growth factor*, nutrisi, donor elektron atau akseptor elektron dan hal ini telah dilakukan pada operasi skala besar untuk bioremediasi *oil spill* Exxon Valdez di Alaska (Cohen, 2002). Akan tetapi penggunaan bakteri *introduced* untuk bioremediasi jarang diterapkan. Beberapa ilmuwan menganggap bahwa penggunaan *indigenous* bakteri lebih unggul dari pada bakteri *introduced*. Oleh karena itu, diperlukan penelitian tentang potensi bakteri *introduced* dalam mendegradasi *crude oil* dan komponen penyusunnya yang sulit terdegradasi yaitu *phenanthrene*, *dibenzothiophene*, dan *paraffin*. Bakteri *introduced* yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri laut di perairan Pulau Pari. Pulau Pari merupakan bagian dari gugusan pulau-pulau di Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. Kepulauan Seribu telah terkontaminasi oleh *Heavy Crude oil* sepanjang 2 km² dengan tumpahan minyak setebal 5 cm pada tahun 2004 (Syakti *et al.*, 2004). Oleh karena itu ada kemungkinan terdapat bakteri yang mampu mendegradasi komponen *crude oil* di Pulau Pari.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel dan Aklimasi dalam *Column reactor*

Sampel penelitian diambil dari Pulau Pari, Kepulauan Seribu DKI Jakarta. Pulau Pari terletak di sebelah utara teluk Jakarta. Sampel air laut diambil dari sumur penampungan yang telah disiapkan. Setelah itu sampel air laut diaklimasi dalam *column reactor* selama 2 bulan (Gambar 1). Ada 6 macam kolom dengan 6 macam *fertilizer* yang berbeda yaitu *Super IB*, NH_4NO_3 , *Uric Acid*, *Hi-Control*, *Osmocoat*, dan *Chitosan*.



Gambar 1. *Column reactor*

Deteksi Kemampuan Mikrobia Mendegradasi *Crude Oil*

Deteksi kemampuan mikrobia mendegradasi *crude oil* berdasarkan Kasai *et al.* (2002) yang dimodifikasi. Medium yang digunakan untuk isolasi adalah medium ONR7a. Sebanyak 100 µl suspensi yang diambil dari 6 macam *fertilizer* dengan menggunakan mikropipet diletakkan pada medium ONR7a yang ditambah dengan 100 µl Arabian Light *crude oil* dan diratakan dengan *drigalski*. Setelah itu diinkubasikan selama 7 hari pada suhu 27°C untuk melihat aktivitasnya. Apabila terbentuk zona bening di sekitarnya menunjukkan bahwa bakteri yang terdapat dalam koloni dapat mendegradasi *crude oil*.

Deteksi Kemampuan Mikrobia Mendegradasi PAHs

Koloni bakteri yang potensial sebagai pendegradasi *crude oil* diisolasi dengan cara *streak plate* pada medium ONR7a yang ditambah dengan CH₃COONa 5g/L. Setelah itu, medium yang berisi koloni mikrobia *disublimasi* dengan PAHs (*Phenanthrene (Wako Lot WKF0060)* dan *DBT Lot JK01 TCL*). Teknik sublimasi dilakukan dengan cara memanaskan PAHs pada suhu (80-130°C) selama ±5 menit untuk menguapkan PAHs tersebut. Senyawa PAHs yang menguap akan *menyublim* dan terperangkap pada medium ONR7a yang diberi pendingin es batu. Setelah itu diinkubasikan selama 7 hari pada suhu 27°C. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni menunjukkan bahwa mikrobia dapat mendegradasi PAHs.

Uji Konfirmasi Kemampuan Isolat Bakteri Mendegradasi *Crude Oil*

Koloni yang tumbuh pada medium ONR7a+CH₃COONa diambil sebanyak 1 ose dan dimasukkan kedalam medium ONR7a cair yang ditambah dengan *yeast extract* (5g/L) dan *ferric sitrat* (4g/L). Lima mililiter medium diletakkan dalam tabung reaksi yang ditambah dengan 100 µl *crude oil*, kemudian diinkubasikan selama 3 hari pada 27°C. Hasil positif ditunjukkan dengan terdegradasinya *crude oil*. *Crude oil* yang semula kental dan berada di permukaan menjadi butiran yang lebih kecil dan tersebar di seluruh permukaan tabung.

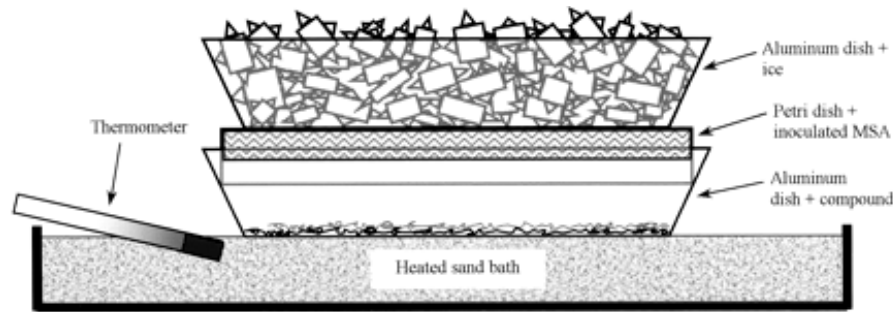
Isolasi dan Purifikasi Bakteri Pendegradasi *Crude Oil*

Sebanyak 100 µl suspensi bakteri dari medium ONR7a cair + *Crude oil* diambil dengan mikropipet dan diencerkan sampai pengenceran 10⁻⁸. Setelah itu sebanyak 50 µl dari masing-masing pengenceran tersebut diambil dan diinokulasikan pada medium Difco marine agar 2216 secara *pour plate*. Koloni yang tumbuh dipisahkan lagi ke dalam medium marine agar yang baru sampai murni. Kemudian dipilih 16 isolat secara acak untuk diberi perlakuan selanjutnya.

Uji Konfirmasi Kemampuan Isolat Bakteri Mendegradasi PAHs dan *Paraffin*

Uji konfirmasi digunakan untuk memastikan bahwa isolat bakteri dapat mendegradasi PAHs (Kasai *et al.*, 2002). Uji konfirmasi dilakukan terhadap 16 isolat bakteri terpilih dari hasil isolasi dan purifikasi. Uji konfirmasi I dilakukan dengan menginokulasikan 16 isolat bakteri pada medium ONR7a yang ditambah *phenantrene* dan DBT dengan cara menyublimkan senyawa tersebut serta diamati pembentukan zona bening atau perubahan warna medium (Gambar 2). Uji konfirmasi II dilakukan pada medium air laut steril sebanyak 50 ml ditambah dengan sumber C, N, dan P dengan rasio C/N/P=100:20:3. Sumber N terdiri dari *yeast ekstrak*, KNO₃, (NH₄)₂SO₄, dan Urea. Sedangkan sumber P adalah KH₂PO₄.

PAHs tidak larut di dalam air sehingga untuk melarutkannya digunakan pelarut organik DMSO (Dimethyl sulfoxide 99.5% GC Sigma). Sebanyak 0,01 gram PAHs dilarutkan dalam 600 µl DMSO dan diencerkan menjadi 10 ml dengan akuades. Lima mililiter campuran tersebut ditambahkan ke dalam medium air laut steril. Untuk uji konfirmasi II ini diamati perubahan warna medium atau tingkat kekeruhan medium. Selanjutnya uji konfirmasi degradasi *paraffin* dilakukan dengan *paraffin* padat. Sebanyak 100 µl suspensi bakteri dari 6 macam *fertilizer* ditambahkan ke dalam medium ONR7a cair yang ditambah 5 gram *paraffin*. Uji konfirmasi degradasi *paraffin* ini dilakukan dengan mengamati tingkat kekeruhan medium dan keteruraian padatan *paraffin*.



Gambar 2. Metode Sublimasi PAHs

Karakterisasi Pertumbuhan Isolat Bakteri Pendegradasi *Phenanthrene*, DBT, dan *Paraffin*

Uji pertumbuhan isolat murni terseleksi pendegradasi *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin* dilakukan dengan variasi salinitas 2% dan 5% serta suhu 30°C.

1. Pertumbuhan Pada *Marine Broth* dan *Polypepton*

Uji pertumbuhan pada *marine broth* dan *polypepton* digunakan sebagai pembanding terhadap pertumbuhan pada substrat *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin*. Sebelum diinokulasikan, dilakukan prekulturan pada medium *marine broth*. Satu ose bakteri dimasukkan kedalam 6 ml Difco *marine broth* 2216 dan diinkubasikan selama 18 jam pada suhu 30 °C. Setelah itu disentrifugasi dengan *centrifuge* 5411R dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 25°C, selanjutnya pelet dicuci dengan akuades dan disentrifugasi dengan kecepatan yang sama. Setelah itu inokulan dengan konsentrasi akhir 3% v/v dimasukkan pada medium 50 ml *marine broth* dan *polypepton* dengan variasi salinitas 2%, 5%, dan 10%. Kemudian ditentukan kekeruhannya (OD) secara spektrofotometris pada $\lambda = 600$ nm tiap 6 jam sekali selama 36 jam dengan Biospec 1601-Shimadzu.

2. Pertumbuhan pada *Phenanthrene*, DBT, dan *Paraffin Oil*

Medium yang digunakan untuk uji pertumbuhan adalah *sea water* steril yang ditambah dengan sumber C, N, dan P dengan rasio C/N/P=100:20:3. Medium sebanyak 50 ml ditambah dengan 5 ml *phenanthrene Wako Lot WKF0060*, *DBT lot JK01 TCL*, dan *paraffin oil JT Baker Lot T18H00*. Kemudian ditentukan kekeruhannya (OD) pada $\lambda = 600$ nm untuk tiap 3 jam selama 15 jam dengan Biospec 1601-Shimadzu. Selain itu dilakukan pula pengukuran pH setiap 3 jam sekali dengan pH meter Horiba. Konsumsi pospat dan ammonium juga dihitung serta diukur secara spektrofotometris dengan Biospec 1601-Shimadzu pada $\lambda = 630$ nm dan $\lambda = 880$ nm.

Uji pertumbuhan ini berguna untuk menentukan konstanta kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) dan waktu generasi (g). Nilai OD yang diperoleh dengan spektrofotometris digunakan untuk memperoleh nilai μ dan g tersebut. Nilai OD 1 mewakili 10^9 sel/ml. Nilai OD yang diperoleh ini diubah ke dalam nilai $\ln N$. Setelah kurva $\ln N$ diperoleh, dicari persamaan liniernya. Dari persamaan linier ini, dapat diketahui nilai μ . Sedangkan nilai g diperoleh dengan cara menghitung $\ln 2/\mu$.

Selain itu dilakukan pengukuran konsumsi fosfat dan amonium. Fosfat dan amonium diukur untuk melihat adanya aktivitas metabolisme. Untuk mengukur fosfat dan amonium dibutuhkan reagen yang spesifik. Reagen dibuat berdasarkan *Standard Method* edisi 18 (Greenberg *et al.*, 1992).

Uji *Microbial Adhesion to Hydrocarbon* (MATH)

Uji MATH ini dilakukan berdasarkan metode Bahrens *et al.* (1978) yang dimodifikasi. Sumber N dan alkalinitas medium MATH ini adalah 3 g/L NH_4Cl ; 0,70 g/L KH_2PO_4 ; 0,35 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,035 g/L ferric sitrat; 0,2 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,285 g/L H_3BO_3 yang dimasukkan dalam 1L air laut steril.

Suspensi bakteri sebanyak 3% v/v yang sebelumnya telah diprekultur dalam medium MB selama 48 jam, dimasukkan ke dalam 50 ml medium MATH. Lima mililiter *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin* padat dimasukkan ke dalam masing-masing botol yang berisi medium MATH. Glukosa sebanyak 5 gram juga dimasukkan ke dalam 50 ml medium sebagai kontrol. Medium diinkubasikan selama 2x24 jam pada suhu 30°C.

Satu mililiter suspensi bakteri dari masing-masing perlakuan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm lalu pelet dicuci dua kali dengan NaCl 2% dan disentrifugasi lagi pada kecepatan yang sama setelah pencucian. Pelet diresuspensi dengan NaCl 2% sampai volume menjadi 1 ml. Kemudian kekeruhannya (OD) diukur secara spektrofotometris dengan menggunakan Biospec 1601-Shimadzu pada $\lambda = 600$ nm. Nilai OD yang pertama ini menunjukkan adanya hidrokarbon dalam sel bakteri (A_0). Selain itu 5 ml suspensi bakteri dari masing-masing perlakuan juga diambil dan ditambah 500 μ l *paraffin oil* dan divortek selama 2 menit. Setelah didiamkan selama 10 menit, OD pada $\lambda = 600$ nm dari suspensi bakteri diukur kembali. Nilai OD yang kedua ini menunjukkan besarnya hidrokarbon yang terlepas dari sel bakteri (A_1). MATH diukur berdasarkan rumus dari Kaczorek *et al.*, 2007.

$$\frac{1-(A_0-A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan : A_0 = OD bakteri + hidrokarbon dalam sel bakteri

A_1 = OD hidrokarbon yang dilepaskan sel bakteri

Gambar 9. Rumus penghitungan MATH (Kaczorek *et al.*, 2007).

Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Pendegradasi *Crude Oil*, *Phenanthrene*, DBT, dan *Paraffin*

Karakterisasi isolat bakteri dilakukan untuk tujuan identifikasi. Karakterisasi dilakukan meliputi karakter morfologi koloni dan pengecatan gram. Disamping itu dilakukan pula karakterisasi fenotipik dengan kit API 20 NE dan metode identifikasi molekular (*sequencing* DNA).

Metode *sequencing* dengan 16S rRNA ini digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Preparasi DNA dilakukan dengan ekstraksi menggunakan metode Biosystem Prepman Ultra. Sebanyak 25 μ l prepman ditambah dengan 1 *loopfull* koloni bakteri dan divortek selama 10-30 detik. Setelah itu dipanaskan selama 10 menit (100°C) dengan Astec Program temperatur Control system. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 12000 rpm dan diambil supernatannya. Ada tidaknya DNA dicek dengan elektroforesis.

Setelah diperoleh produk DNA maka dilakukan amplifikasi 16S PCR dengan 2 primer yaitu primer F27 (5' AGAGTTGATCCTGGCTG 3') dan primer R1541 (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3') berdasarkan metode Bodour *et al.* (2003) yang dimodifikasi.. PCR dilakukan dengan 30 *cycle* yaitu 4 menit pada suhu 94°C (*denaturasi*), 1 menit pada suhu 55°C (*annealing*), dan 2 menit pada suhu 72°C (*extension*). Pada *cycle* terakhir dilakukan inkubasi selama 10 menit pada suhu 72°C. Kemudian untuk mendapatkan hasil yang maksimal dilakukan purifikasi produk PCR dengan *qiagen purification kit*. Apabila sudah murni maka dilanjutkan dengan *cycle sequencing* dan *sequencing*. Sekuen nukleotida ditentukan dengan *Big Dye terminatorv3.1. Sequencing* menggunakan DNA Sequencer model 377 (*Applied Biosystem*).

Sequence nukleotida yang diperoleh dikonstruksi ke dalam Clustal X, versi 1.83 (*Alignment*). Setelah itu dilakukan konstruksi *phylogenetic tree* dari data *evolutionary distance* menggunakan *neighbour joining method*. Konstruksi *phylogenetic tree* ini menggu *reference strain* yang terdapat pada pangkalan data NCBI. Visualisasi *phylogenetic tree* menggunakan TREEV32.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

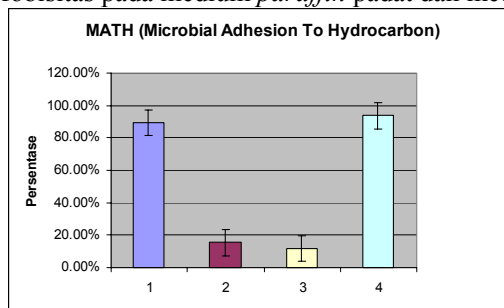
Penelitian tentang bakteri laut isolat Pulau Pari merupakan penelitian awal untuk mengetahui potensi isolat bakteri dalam mendegradasi komponen *crude oil* yaitu *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin*. Penelitian menggunakan sumber bakteri laut Pulau Pari yang diaklimasi dalam

column reactor dengan 6 macam fertilizer yaitu Super IB, Chitosan, Osmocoat, Hi-Control, NH_4NO_3 , dan Uric acid menunjukkan bahwa konsorsium bakteri dapat mendegradasi crude oil, akan tetapi tidak semua isolat yang diperoleh dapat mendegradasi komponen crude oil yaitu phenanthrene, DBT, dan paraffin. Terbukti bahwa isolat bakteri dari Uric acid yang merupakan isolat tunggal tidak dapat mendegradasi crude oil. Bakteri bekerja dalam mendegradasi crude oil secara bersama-sama. Menurut Palonen *et al.* (2008), bakteri memiliki sistem quorum sensing atau komunikasi antar populasi bakteri yang dapat mempengaruhi degradasi crude oil. Oleh karena itu diversitas bakteri dapat mempengaruhi laju degradasi crude oil.

Isolat terpilih yaitu isolat Dn dapat mendegradasi crude oil dan komponennya yaitu phenanthrene, DBT, dan paraffin. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi kemampuan bakteri dalam mendegradasi komponen tersebut. Beberapa faktor yang mempengaruhi adalah kemampuan bakteri dalam beradaptasi dengan lingkungan yang ekstrim yaitu pada salinitas dan kandungan PAHs. Sel harus menjaga cairan sitoplasma dan harus menjaga tekanan turgor untuk menjalankan fungsi dan pertumbuhan yang efektif. Menurut Webb *et al.* (2007) sel bakteri pada kadar NaCl tinggi harus menjaga keseimbangan tekanan osmotik disekitar medium dengan mengakumulasi ion potassium pada sel sehingga menjaga tekanan turgor. Selain itu adaptasi sel bakteri dalam kadar NaCl yang tinggi juga dilakukan dengan merubah komposisi membran lipid dan merubah ekspresi gen. Oleh karena itu hanya bakteri tertentu yang dapat hidup dalam medium dengan salinitas tinggi.

PAHs merupakan komponen yang toksik bagi bakteri. Perubahan integritas membran sebagai akibat interaksi dari PAHs dengan komponen membran menyebabkan perubahan fungsi membran. Francy *et al.* (1991) mengatakan bahwa senyawa hidrokarbon juga mempengaruhi komponen permukaan sel yang hidrofob kehilangan integritas struktural sel dan akan melepaskan biosurfaktan ke dalam medium. Biosurfaktan inilah yang akan membantu bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon. Oleh karena itu, kemampuan bakteri menghasilkan biosurfaktan sangat penting untuk membantu mendegradasi PAHs.

Kemampuan isolat bakteri dalam mengikat PAHs juga dipengaruhi oleh kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap adanya PAHs. Apabila sel bakteri cepat beradaptasi maka akan cepat mendegradasi hidrokarbon. Ukuran molekul hidrokarbon juga mempengaruhi permeabilitas dari sel. Phenanthrene dan DBT yang telah dilarutkan dalam DMSO menjadi partikel yang lebih kecil dibanding paraffin padat dan paraffin cair (Uji Microbial Adhesion to Hydrocarbons / MATH). Kemampuan sel bakteri melekat pada hidrokarbon menunjukkan bahwa nilai adhesi tertinggi pada substrat phenanthrene 89,23% dan yang terendah pada substrat paraffin cair 11,85% (Gambar 3). Nilai adhesi pada substrat paraffin padat 15,36%. Sedangkan pada substrat glukosa sebagai kontrol sebesar 93,59%. Secara umum hidrofobisitas permukaan sel isolat Dn pada substrat phenanthrene lebih besar dari nilai hidrofobisitas pada medium paraffin padat dan medium paraffin cair

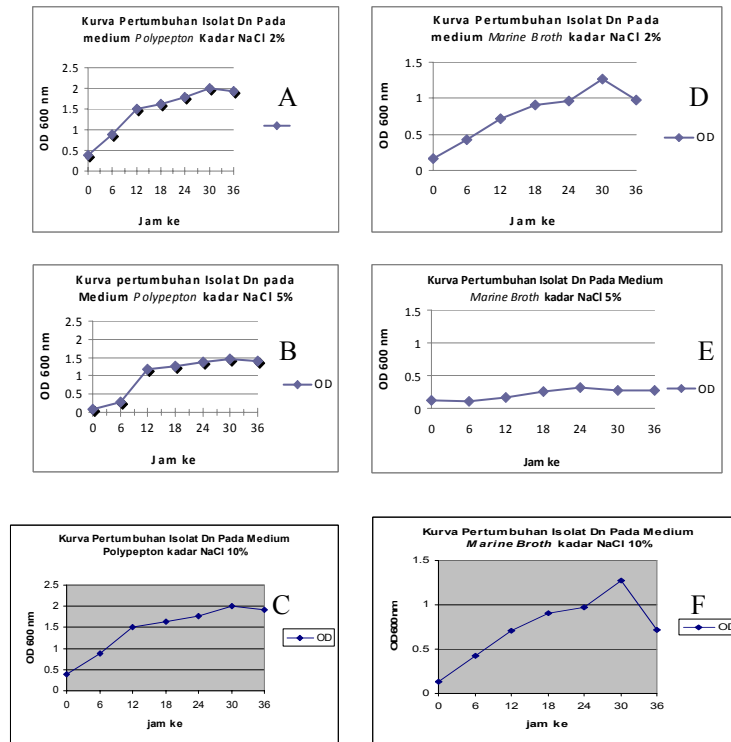


Gambar 3. Nilai MATH isolat Dn pada phenanthrene(1), paraffin padat(2), paraffin cair (3), dan glukosa(4).

Nutrien juga diperlukan untuk membantu mempercepat degradasi PAHs. Sumber N dan P berfungsi untuk membantu dalam mendispersi komponen PAHs (Reisfeld *et al.*, 1972). Sehingga diharapkan dengan penambahan sumber N dan P, degradasi dapat berjalan lebih cepat. Medium cair yang dipakai adalah sea water dengan C/N/P rasio 100:20:3. Menurut Mangkoediharjo (2005) saat terjadi tumpahan minyak di laut, suplai karbon kedalam air laut meningkat sehingga C/N/P rasio meningkat melebihi komposisi normal untuk pertumbuhan mikrobia. Oleh karena itu untuk mengoptimalkan pertumbuhan mikrobia diperlukan penambahan nutrisi N dan P pada tingkat

C/N/P rasio sebelum terjadi tumpahan minyak.

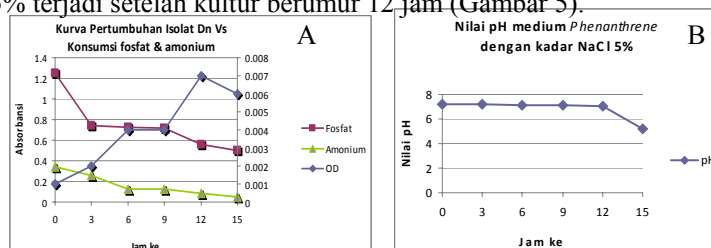
Isolat terpilih (Isolat Dn) pendegradasi *crude oil*, *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin* ditumbuhkan pada medium *Polypepton* (PP) dan *Marine Broth* (MB) untuk mengetahui pola pertumbuhannya. Pada percobaan pertumbuhan pada medium *polypepton* dan *marine broth* dengan kadar NaCl 10%, bakteri dapat bertahan hidup, akan tetapi bakteri harus melakukan mekanisme penyesuaian diri yang panjang dibandingkan dengan tumbuh pada medium dengan kadar NaCl 2% dan 5% (Gambar 4).

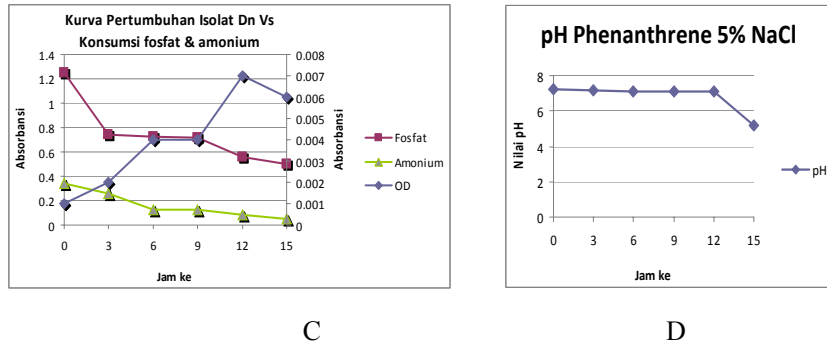


Gambar 4. Kurva Pertumbuhan Pada Medium *Polypepton* dan *Marine Broth* dengan kadar NaCl 2%, 5%, & 10% pada Suhu 30 °C. (A) Kurva pertumbuhan pada medium *polypepton* dengan kadar NaCl 2%, (B) Kurva pertumbuhan pada medium *polypepton* dengan kadar NaCl 5%, (C) Kurva pertumbuhan pada medium *polypepton* dengan kadar NaCl 10%, (D) Kurva pertumbuhan pada medium *marine broth* dengan kadar NaCl 2%, (E) Kurva pertumbuhan pada medium *marine broth* dengan kadar NaCl 5%, (F) Kurva pertumbuhan pada medium *marine broth* dengan kadar NaCl 10%.

Menurut Mangkoedihardjo (2005) kenaikan salinitas akan menurunkan laju degradasi hidrokarbon sebesar 3,3-28,4%. Akan tetapi untuk mengimbangi salinitas yang tinggi, bakteri melakukan proteksi dirinya dengan cepat membelah diri menggunakan sumber nutrisi yang tersedia. Menurut Pelczar & Chan (1986) nutrisi dan kondisi fisik medium berpengaruh pada kecepatan generasi dari bakteri.

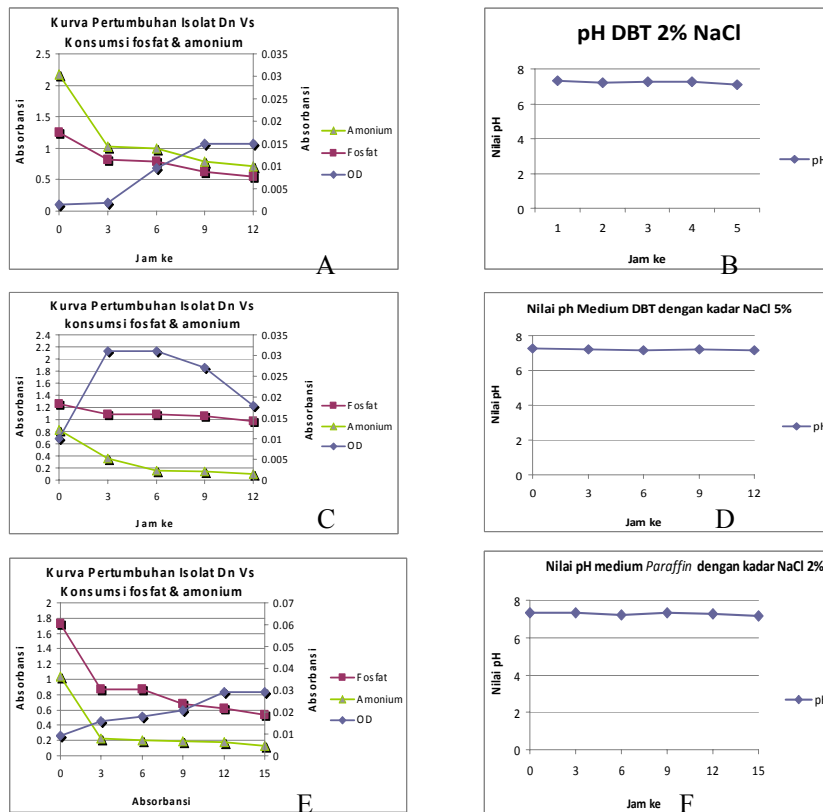
Isolat bakteri Dn juga ditumbuhkan pada medium yang mengandung *phenanthrene*, DBT, dan *paraffin*. Fase stasioner pada medium yang mengandung *phenanthrene* dengan kadar NaCl 2% & 5% terjadi setelah kultur berumur 12 jam (Gambar 5).

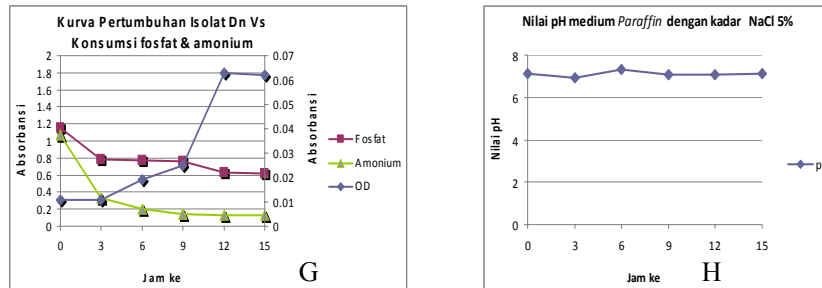




Gambar 5. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Dn pada medium yang mengandung *Phenanthrene* dengan kadar NaCl 2% & 5% dan Suhu 30 °C. (A) Kurva pertumbuhan Isolat Dn, kandungan fosfat dan Amonium pada medium dengan kadar NaCl 2%, (B) Nilai pH medium yang mengandung *phenanthrene* dengan kadar NaCl 2%, (C) Kurva pertumbuhan Isolat Dn, kandungan fosfat dan amonium pada medium dengan kadar NaCl 5%, (D) Nilai pH medium yang mengandung *phenanthrene* dengan kadar NaCl 5%.

Pertumbuhan isolat bakteri Dn pada medium yang mengandung DBT dengan kadar NaCl 2% & 5% mencapai fase stasioner pada jam yang berbeda. Kultur bakteri pada medium yang mengandung DBT dengan kadar NaCl 5% cepat sekali mengalami fase stasioner (Gambar 6). Sedangkan kurva pertumbuhan bakteri pada medium yang mengandung *paraffin* dengan kadar NaCl 2% dan 5%, fase stasioner terjadi pada saat umur kultur 15 jam (Gambar 6).





Gambar 6. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Dn pada medium yang mengandung DBT(A,B,C,D) dan yang mengandung *paraffin* (E,F,G,H) dengan kadar NaCl 2% & 5% dan Suhu 30 °C. (A)Kurva pertumbuhan Isolat Dn, kandungan fosfat dan Amonium pada medium dengan kadar NaCl 2%, (B)Nilai pH medium yang mengandung DBT dengan kadar NaCl 2%, (C)Kurva pertumbuhan Isolat Dn, kandungan fosfat dan amonium pada medium dengan kadar NaCl 5%, (D)Nilai pH medium yang mengandung DBT dengan kadar NaCl 5%. (E)Kurva pertumbuhan Isolat Dn, kandungan fosfat dan Amonium pada medium dengan kadar NaCl 2%, (F)Nilai pH medium yang mengandung *Paraffin* dengan kadar NaCl 2%, (G)Kurva pertumbuhan Isolat Dn, kandungan fosfat dan amonium pada medium dengan kadar NaCl 5%, (H)Nilai pH medium yang mengandung *Paraffin* dengan kadar NaCl 5%.

Ada kemungkinan bahwa bakteri akan mendegradasi hidrokarbon pada saat fase stasionernya. Bakteri dengan cepat membentuk biomassa untuk mencapai fase stasionernya. Pada keadaan osmotik yang tinggi, sel bakteri yang tidak dapat bertahan akan mengalami lisis. Menurut penelitian pada saat fase stasoiner, bakteri akan membentuk biosurfaktan yang dapat membantu dalam mendegradasi hidrokarbon (Fatimah, 2007).

Isolat Dn yang ditumbuhkan pada 3 substrat yang berbeda yaitu medium yang mengandung *phenantrene*, DBT, dan *paraffin* dengan variasi kadar NaCl 2% dan 5% juga dihitung μ (kecepatan pertumbuhan spesifik) dan g (waktu generasi). Hal ini diperlukan untuk mengetahui waktu yang digunakan untuk membelah menjadi 2 sel sehingga diketahui efektivitasnya dalam mendegradasi substrat.

Tabel 1. Nilai μ dan g isolat Dn pada substrat yang berbeda dengan kadar NaCl 2% dan 5%.

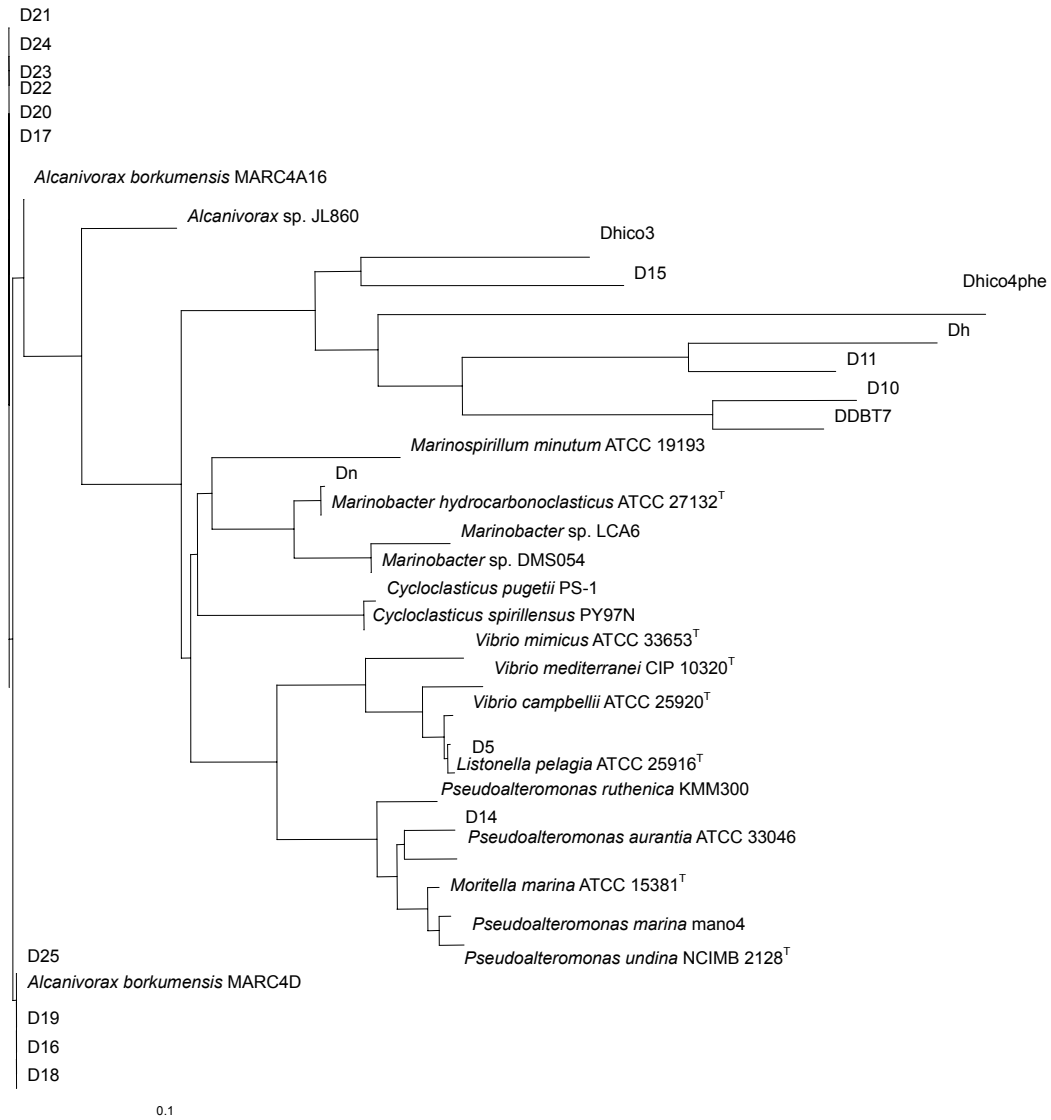
Substrat	μ (Jam ⁻¹)	g (Jam) (Ln 2/ μ)
MB dengan kadar NaCl 2%	0,0262	26,456
MB dengan kadar NaCl 5%	0,0473	14,654
MB dengan kadar NaCl 10%	0,0456	15,200
PP dengan kadar NaCl 2%	0,0392	17,682
PP dengan kadar NaCl 5%	0,0709	9,776
PP dengan kadar NaCl 10%	0,0392	17,682
Phenanthrene dengan kadar NaCl 2%	0,0869	7,976
Phenanthrene dengan kadar NaCl 5%	0,1211	5,723
DBT dengan kadar NaCl 2%	0,2288	3,029
DBT dengan kadar NaCl 5%	0,1881	3,685
Paraffin dengan kadar NaCl 2%	0,0742	9,342
Paraffin dengan kadar NaCl 5%	0,1358	5,142

Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa g (waktu generasi) dari isolat Dn tercepat pada substrat yang mengandung DBT dengan kadar NaCl 2% (3,029 jam). Sedangkan pada substrat *paraffin* dengan kadar NaCl 2% memerlukan waktu generasi paling lama yaitu 9,342 jam.

Isolat terpilih yaitu isolat Dn ini memiliki karakteristik morfologi yaitu warna koloni kuning pucat, bentuk koloni iregular, tekstur koloni halus, permukaan berlendir, bersifat motil, fakultatif aerob, positif terhadap uji H₂O₂. Sedangkan dari pewarnaan gram diketahui bahwa isolat Dn bersifat gram negatif dan berbentuk diplococcus.

Dari hasil identifikasi fenotipik dengan kit API 20 NE dapat diketahui bahwa isolat dapat tumbuh pada medium yang mengandung *potassium nitrat*, *mannitol*, *maltosa*, *glukonat*, *caprate*,

sitrat, dan *phenyl acetate*. Isolat mampu mereduksi nitrat (NO₃) menjadi NO₂, akan tetapi tidak dapat mereduksi sampai menjadi N₂. Isolat bakteri bersifat *denitrifier* dan dapat menggunakan nitrat sebagai akseptor elektron pada saat kondisi anaerob (Khartikeyan & Bhandari, 2001).



Gambar 7. *Phylogenetic Tree* berdasarkan Neighbour-Joining yang menunjukkan hubungan antara *reference strain* dari kelas γ Proteobacteria dengan isolat bakteri laut di Perairan Pulau Pari pendegradasi komponen *crude oil* atas dasar *sequence* 16S rRNA.

Tabel 7. Nilai similaritas 16S rRNA (%) dan jumlah nukleotida yang berbeda antara *reference strain* dari klas γ Proteobacteria dengan isolat bakteri laut Pulau Pari (Isolat Dn) pendegradasi komponen *crude oil*.

	Dn	<i>Marinobacter</i> sp. LCA6	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 27132 ^T	<i>Marinobacter</i> sp. DMS054	<i>Marinospirillum minutum</i> ATCC 19193	<i>Cycloclasticus pugetii</i> PS-1	<i>Cycloclasticus spirillensus</i> PY97N
Dn	---	45/853	2/1503	35/599	150/1456	164/1481	61/726
<i>Marinobacter</i> sp. LCA6	94,72	---	45/851	14/533	103/847	121/850	57/512
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 27132 ^T	99,87	94,71	---	35/597	150/1454	163/1486	61/724
<i>Marinobacter</i> sp. DMS054	94,16	97,37	94,14	---	73/599	77/598	67/578
<i>Marinospirillum minutum</i> ATCC 19193	89,7	87,84	89,68	87,81	---	181/1450	77/726
<i>Cycloclasticus pugetii</i> PS-1	88,93	85,76	89,03	87,12	87,52	---	1/726
<i>Cycloclasticus spirillensus</i> PY97N	91,6	88,87	91,57	88,41	89,39	99,86	---

Dari Tabel 7 dan *phylogenetic tree* (Gambar 7) diketahui bahwa isolat bakteri Dn yang dapat mendegradasi ketiga komponen *crude oil* sangat mirip dengan *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 27132^T sebesar 99,87%. Sekuen nukleotida yang berbeda sebesar 2 dari total nukleotida 1503.

Tabel 8. Nilai similaritas 16S rRNA (%) dan jumlah nukleotida yang berbeda antara *reference strain* dari klas γ Proteobacteria dengan isolat bakteri laut Pulau Pari (Isolat D5) pendegradasi komponen *crude oil*.

	D5	<i>Listonella pelagia</i> ATCC 25916 ^T	<i>Vibrio ambellii</i> ATCC 25920 ^T	<i>Vibrio mediterranei</i> CIP 10320 ^T	<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653 ^T
D5	---	5/1424	7/1429	43/1429	96/1420
<i>Listonella pelagia</i> ATCC 25916 ^T	99,65	---	10/1450	43/1454	98/1446
<i>Vibrio ambellii</i> ATCC 25920 ^T	99,51	99,31	---	46/1461	97/1450
<i>Vibrio mediterranei</i> CIP 10320 ^T	96,99	97,04	96,85	---	93/1454
<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653 ^T	93,24	93,22	93,31	93,6	---

Dari tabel 8 diketahui bahwa isolat Dn sangat mirip dengan *Listonella pelagia* ATCC 25916^T (99,65%) dan nukleotida yang berbeda sebesar 5 nukleotida dari total nukleotida 1424.

Tabel 9. Nilai similaritas 16S rRNA (%) dan jumlah nukleotida yang berbeda antara *reference strain* dari klas γ Proteobacteria dengan isolat bakteri laut Pulau Pari (Isolat D14) pendegradasi komponen *crude oil* .

	D14	<i>Pseudoalteromonas undina</i> NCIMB 2128 ^T	<i>Moritella marina</i> ATCC 15381 ^T	<i>Pseudoalteromonas aurantia</i> ATCC 33046	<i>Pseudoalteromonas marina</i> mano4	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300
D14	---	50/1433	49/1435	44/1411	53/1370	69/1486
<i>Pseudoalteromonas undina</i> NCIMB 2128 ^T	96,51	---	53/1412	44/1399	50/1359	72/1425
<i>Moritella marina</i> ATCC 15381 ^T	96,59	96,25	---	8/1387	22/1347	60/1418
<i>Pseudoalteromonas aurantia</i> ATCC 33046	96,88	96,85	99,42	---	17/1355	60/1409
<i>Pseudoalteromonas marina</i> mano4	96,13	96,32	98,37	98,75	---	50/1368
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> KMM300	95,36	94,95	95,77	95,74	96,35	---

Dari Tabel 9 diketahui bahwa isolat D14 sangat mirip dengan *Pseudoalteromonas aurantia* ATCC 33046 sebesar 96,88%. Nukleotida yang berbeda sebesar 44 nukleotida dari total 1411 nukleotida.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Bakteri Laut pendegradasi komponen *crude oil* di perairan Pulau Pari yang diaklimasi dalam *coloum reactor* dengan 6 variasi *fertilizer* (*Super IB*, NH_4NO_3 , *Uric Acid*, *Hi-Control*, *Osmocoat*, dan *Chitosan*) beranekaragam. Konsorsium bakteri dapat mendegradasi *crude oil*. Akan tetapi tidak semua bakteri dapat mendegradasi komponen *crude oil* yaitu *phenanthrene*, *dibenzothiophene*, dan *paraffin*. Isolat bakteri Dn mampu mendegradasi ketiga komponen *crude oil* tersebut dengan penambahan sumber N dan P. Berdasarkan metode *sequencing* 16S rRNA dan konstruksi *phylogenetic tree* diketahui bahwa isolat Dn sangat mirip dengan *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 27132^T.

Saran

Penelitian tentang bakteri laut di perairan Pulau Pari pendegradasi komponen *crude oil* yaitu *phenanthrene*, *dibenzothiophene*, dan *paraffin* untuk bioremediasi tumpahan minyak bumi merupakan penelitian tahap awal. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk :

1. Menguji kemampuan isolat bakteri maupun konsorsium bakteri yang berasal dari laut Pulau Pari untuk mendegradasi komponen *crude oil* lainnya seperti *asphaltene*s.
2. Mencari komposisi *fertilizer* yang lebih optimal untuk bioaugmentasi.
3. Menguji degradasi pada variasi salinitas yang lebih tinggi/ *halosaline* yang dapat diterapkan pada laut yang salinitasnya tinggi.
4. Menguji degradasi *paraffin* oleh bakteri pada suhu yang lebih tinggi dan tekanan tinggi untuk kepentingan *Microbial Enhance oil Recovery* (MEOR).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2008a. *Development Of Biocatalyst to Enhance The Growth Rate Of Paraffin Degrading Bacterial Consortium* (Sponsor : Oil And Natural Gas Corporation Ltd.). The Energy And Resources Institute.
- Anonim. 2008b. *Global Marine Oil Pollution Information Gateway*. <http://oils.gpa.unup.org>. diakses tanggal 20 Juni 2008.
- Bonner, J.J, D. LaRiviere, & L. Autenrieth. 2008. *Biodegradation Of Oil Contaminated Sediment : Effect Of Dispersant And Natural Organic Matter*. USA. pp.765-778.
- Cohen, Y. 2002. Bioremediation Of Oil by Marine Microbial Mats. *Instant. Microbiol* 5:189-193.
- Fatimah. 2007. Uji Produksi Biosurfaktan Oleh Pseudomonas sp. Pada Substrat Yang Berbeda. *Berkala Penelitian Hayati* 12 : 181-185.
- Francy, D.S, Thomas J.M., RL Raymond, dan CH Ward. 1991. *Emulsification of Hydrocarbons by Surface Bacteria*. *J. Ind. Microbiol* 8:234-246.
- Greenberg, A.E., L.S. Clescen, & A.D. Eaton. 1992. *Standard Methods 18th edition For the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington DC.
- Hughes, J.B., V. Jee, & C.H. Ward. 2003. *Bioremediation of Contaminated Sediments*. *Rice University*. Houston. pp. 236-242.
- Hunt, J. M. 1996. *Petroleum Geochemistry and Geology*. 2nd edition. New York.
- Kaczorek, E., L. Chrzanowski, A. Pijanowska, & A. Olszanowski. 2008. Yeast And Bacterial Cell Hydrophobicity And Hydrocarbon Biodegradatin in the Presence of Natural Surfactants :Rhamnolipides and Saponins. *Bioresource Technology* 99 : 4285-4291.
- Karthikeyan, R dan A. Bhandari. 2001. Anaerobic Biotransformation of Aromatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oil Micricosms : A Review. *Journal of Hazardous substance Research*. Volume three. Kansas State university. pp. 1-13.
- Kasai, Y, H. Kishira, & S. Harayama. 2002. Bacteria Belonging to The genus Cyclocasticus Play Role in The Degradation of Aromatic Hydrocarbons Released in a Marine Environment. *Applied And Environmental Microbiology* 68(11): 5625-5633.
- Mangkoedihardjo, S. 2005. *Seleksi Teknologi pemulihan Untuk Ekosistem Laut tercemar Minyak*. Seminar Nasional Teori dan Aplikasi Teknologi Kelautan ITS. Surabaya. pp.1-9.
- Palonen, E.K., A.M. Brandt & J.T. Soini. 2008. *In Search For Novel Quorum Sensing molecules In Fermenting Fungi Using Oligonucleotide-Based Microarrays*. Turku Center For Biotechnology. University Of Turku & Abo Academi University.
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan. *Dasar-dasar Mikrobiologi* (Terj.). 1986. Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). Jakarta. Pp. 131-156.
- Reisfeld, A., E. Rosenberg, dan D. Gutnick. 1972. Microbial Degradation of Crude Oil: Factors Affecting The Dispersion In Sea Water by Mixed and Pure Cultures. *Applied Microbiology* 24(3) : 363-368.

- Sudrajad, A. 2006. *Tumpahan Minyak di laut dan Beberapa Catatan Terhadap Kasus di Indonesia*. INOVASI vol.6/XVIII/Maret 2006.
- Syakti, A.D. *Bioremediasi Lingkungan*. Staf Divisi Bioteknologi (Bioremediasi Lingkungan) Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan Institut Pertanian Bogor. <http://www.freelist.org>.
- Webb, M.D, C.Pin, M.W. Peck, & S.C Stringer. 2007. Historical and Contemporary NaCl Concentrations Affect The Duration and Distribution of Times From Individual spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied&Environmental Microbiology* 73(7) : 2218-2127.