
ISOLASI BAKTERI PENDEGRADASI SENYAWA PIREN DARI PERAIRAN PELABUHAN PAOTERE

Hadija Enryani Ismail^a, Nursiah La Nafie^a, Seniwati Dali^a

^aFakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar
Koresponden penulis : enryanihadija@yahoo.co.id

Abstrak

Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (HAP) merupakan salah satu bahan polutan pada tanah, air dan udara. Senyawa ini memiliki potensi risiko terhadap kesehatan manusia, karena beberapa senyawanya bersifat karsinogenik dan beracun untuk organisme laut. Piren merupakan salah satu senyawa HAP yang berbahaya dan sulit didegradasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri yang berasal dari perairan pelabuhan Paotere yang mampu mendegradasi senyawa piren. Dari hasil isolasi dan karakterisasi biokimiawi sesuai *Bergey's manual of determinative bacteriology* diperoleh untuk ketiga isolat mempunyai ciri-ciri yang mengarah pada bakteri *Alcaligenes* untuk isolat A, *Sphingobacterium* untuk isolat B dan *Bacillus* untuk isolat C.

Kata kunci : Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (HAP), piren, isolasi bakteri, biodegradasi

Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HAP) is one of the pollutants in the soil, water and air. These compounds have the potential risk to human health, because some compounds are carcinogenic and toxic to marine organisms. Pyrene is one of HAP compounds are dangerous and difficult to degrade. The aim of this study was to obtain bacterial isolates originating from harbor waters Paotere capable of degrading pyrene compound. From the results of isolation and characterization of biochemical according Bergey's manual of determinative bacteriology obtained for all three isolates has characteristics that lead to bacterial isolates Alcaligenes for A, Sphingobacterium for B and Bacillus for isolate C.

Keywords: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HAP), pyrene, isolation of bacteria, biodegradation*

PENDAHULUAN

Minyak merupakan salah satu sumber energi utama untuk industri, transportasi dan rumah tangga [1]. Aktivitas industri, baik yang berada dekat pantai maupun di area lepas pantai belakangan ini semakin meningkat, hal ini dapat meningkatkan pencemaran di laut. Aktivitas tersebut meliputi pengeboran,

pengilangan, proses produksi dan transportasi yang dapat menghasilkan limbah minyak di tanah maupun perairan [2].

Paotere merupakan pusat pelelangan ikan terbesar di Makassar. Aktivitas bongkar muat kapal nelayan berpotensi meningkatkan buangan kapal, khususnya yang mengandung minyak

sehingga menimbulkan limbah minyak di sekitar pantai. Salah satu penyebab kerusakan ekosistem pantai adalah akibat tumpahan minyak karena mengandung senyawa pencemar yaitu Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (HAP). Sebagai polutan, HAP perlu selalu dipantau keberadaannya karena dapat menyebabkan mutasi material genetik dan menimbulkan kanker [3].

Kehadiran senyawa Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (HAP) di lingkungan menjadi ancaman serius terhadap kesehatan, karena bersifat toksik, karsinogenik dan mutagenik [4]. Salah satu senyawa HAP yang bersifat karsinogen yaitu piren. Piren merupakan salah satu kelompok HAP yang memiliki struktur dengan empat cincin aromatik, lebih sulit didegradasi (rekalsitran), persisten di lingkungan, hidrofobik, berasosiasi dengan tanah dan sedimen, lipofilik, berpotensi terakumulasi melalui rantai makanan sehingga membahayakan lingkungan dan komponen biotik [5]. Kepmen LH No.128 tahun 2003 memasukkan piren sebagai salah satu daftar bahan pencemar. Badan Perlindungan Lingkungan Amerika (EPA) menetapkan piren sebagai salah satu zat sangat berbahaya dan beracun [6].

Upaya pengelolaan piren di lingkungan dapat dilakukan secara biologis, yaitu bioremediasi dengan menggunakan mikroba potensial pendegradasi piren. Salah satu teknik bioremediasi adalah biodegradasi yaitu proses penguraian oleh aktivitas mikroba yang mengakibatkan transformasi struktur suatu senyawa sehingga terjadi perubahan integritas molekuler dan toksisitas senyawa tersebut berkurang atau menjadi tidak toksik sama sekali [2]. Dengan memanfaatkan sifat *indigenous* ataupun *extraneous* mikroba, bioremediasi mampu mengatasi pencemaran hidrokarbon, mempersingkat waktu degradasi sekaligus ramah lingkungan dan mampu mereduksi komponen pencemar yang berbahaya [7].

Di Indonesia penelitian tentang pencarian isolat bakteri pendegradasi piren masih terbatas. Berdasarkan latar belakang di atas, maka akan dilakukan penelitian mengenai “Isolasi Bakteri Pendegradasi Senyawa Piren dari Perairan Pelabuhan Paotere”.

METODE

Pengambilan Sampel

Sampel penelitian berupa limbah air laut yang diambil di tempat pelelangan ikan perairan pelabuhan Paotere Makassar. Sampel air laut diambil di tiga titik pengambilan masing-masing sebanyak 500 mL dari bagian permukaan, dimasukkan ke dalam botol kaca dan diberi label. Sampel dimasukkan ke dalam kotak pendingin. Sebelum sampel air diambil, terlebih dahulu dilakukan pengukuran yaitu pH, suhu dan salinitas.

Pengayaan Bakteri Pendegradasi

Pengayaan bakteri pendegradasi dilakukan menggunakan media selektif secara aseptis. Media selektif dibuat dari pepton 0.4 g, *yeast extract* 0.2 g, dilarutkan dalam 1000 mL air laut steril. Media selektif kemudian dihomogenkan, disterilisasi dan ditambah dengan 50 mg/L piren. Media kemudian dituang ke dalam erlenmeyer masing-masing volumenya 25 mL. Media ini digunakan untuk pengayaan bakteri pendegradasi tahap pertama, kedua dan ketiga.

Pengayaan tahap pertama dilakukan dengan cara menambahkan 25 mL sampel air laut yang diambil dari perairan tercemar di tempat pelelangan ikan perairan pelabuhan Paotere, dimasukan ke dalam erlenmeyer berisi media selektif dan *dishaker* pada suhu ruang selama 7 x 24 jam dengan kecepatan 150 rpm. Sebelum dan sesudah masa inkubasi, dilakukan pengamatan OD (*optical density*) pada panjang gelombang 600 nm. Kontrol pada pengayaan tahap

pertama ini adalah media minimal tanpa penambahan sampel air laut.

Tahap selanjutnya adalah pengayaan tahap kedua. Sumber inokulum adalah pengayaan tahap pertama yang berusia tujuh hari. Biakan bakteri diambil 25 mL dan dibiakan ke dalam erlenmeyer berisi 25 mL media minimal baru. Pertumbuhan bakteri pada tahap ini juga dideteksi sebagaimana tahap pertama. Tahap terakhir adalah pengayaan tahap ketiga. Metode yang digunakan sama dengan pengayaan kedua dan sumber inokulum yang digunakan adalah pengayaan tahap kedua yang berusia 7 hari [2].

Isolasi Bakteri dan Karakterisasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode tuang (*pour plate*) secara aseptis. Sumber isolat berasal dari pengayaan tahap ketiga. Media yang digunakan adalah media PCA (5.0 g pepton, 2.5 g *yeast extract*, 1.0 g glukosa dan 14.0 g agar dalam 1000 ml aquades steril) yang sudah disterilisasi. Cawan Petri berisi isolat bakteri kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam [2].

Isolat tunggal yang tumbuh di permukaan media dimurnikan ke media baru dengan metode gores dan diinkubasi 1 x 24 jam. Pemurnian dilakukan secara bertahap sampai diperoleh isolat biakan murni melalui pengamatan mikroskopis.

Bakteri diidentifikasi berdasarkan karakter biokimiawinya secara bertahap (*step ways*) sesuai dengan kunci dikotomi *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Isolat yang digunakan untuk uji biokimia merupakan biakan murni dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Piren

Isolat murni yang sudah dikarakterisasi dibiakan kembali dalam media. Sebelumnya dibuat terlebih dahulu starter berusia 1 x 24 jam. Diambil 10 mL starter dimasukkan dalam 100 mL media dan dishaker pada suhu ruang selama 7 x 24 jam. Selama masa inkubasi, pertumbuhan isolat diukur berdasarkan kerapatan optik pada panjang gelombang 600 nm setiap 24 jam. Ada dua kontrol pada tahap ini yaitu kontrol (+) dan kontrol (-). Kontrol (+) merupakan isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media selektif tanpa piren. Sedangkan kontrol (-) merupakan media minimal dengan piren, namun tanpa isolat bakteri. Hasil pengukuran pertumbuhan dibandingkan dengan kontrol (+) dan (-) selanjutnya digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan [2].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengayaan Bakteri Pendegradasi

Pertumbuhan bakteri pada minggu ke- 1, 2 dan 3 ditunjukkan pada Tabel 1 dimana terjadi penurunan OD (*Optical Density*) dari minggu 1 ke minggu 3. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri di dalam media sudah terseleksi dan diduga merupakan bakteri yang mampu menggunakan piren sebagai sumber nutrisinya.

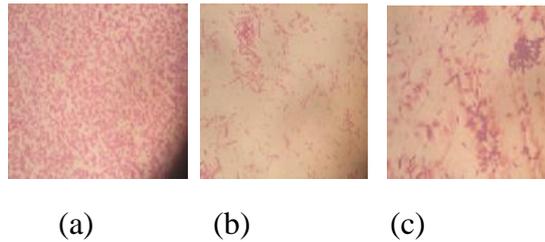
Tabel 1. Hasil Pengukuran OD pengayaan Bakteri

Sa mpel	Minggu ke 1		Minggu ke 2		Minggu ke 3	
	OD hari 0	OD hari 7	OD hari 0	OD hari 7	OD hari 0	OD hari 7
A	0.043	0.601	0.372	0.469	0.286	0.303
B	0.107	0.776	0.445	0.542	0.369	0.392
C	0.142	0.378	0.214	0.367	0.155	0.210
Kon trol	0.015	0.095	0.039	0.051	0.021	0.029

Isolasi Bakteri dan Karakterisasi Bakteri

Pewarnaan gram

Dari proses isolasi di tiga titik sampel, didapatkan 3 isolat bakteri yang berbeda. Kemurnian isolat dideteksi menggunakan mikroskop perbesaran 1000X dengan mengamati bentuk dan warna selnya. Hasil mikroskopis pewarnaan gram ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil analisis mikroskopis dengan pewarnaan gram a= isolat A, b= isolat B c= isolat C.

Hasil analisis mikroskopis pada Gambar 1 dapat dilihat isolat A dan B merupakan gram negatif sedangkan isolat C merupakan gram positif. Berdasarkan data hasil pewarnaan gram, dimana setelah pengamatan dengan mikroskop tampak warna merah pada isolat A dan B, sedangkan isolat C berwarna biru-ungu.

Uji Biokimia

Hasil karakterisasi ketiga isolat bakteri melalui uji biokimia yang ditunjukkan pada Tabel 2, berikut :

Parameter Uji	Isolat A	Isolat B	Isolat C
Slant	Asam	Asam	Asam
TSIA	Butt Basa	Butt Basa	Asam
H ₂ S	-	-	-
MRVP	MR -	MR -	MR +
VP	-	-	-
Indol	-	-	-

Sitrat	-	+	-
Urea	-	-	-
Glukosa	+	-	+
Laktosa	-	-	-
Sukrosa	-	-	-
Mannitol	-	-	-

Hasil uji biokimia pada Tabel 2 berdasarkan uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) terhadap isolat A, B, dan C pada daerah *slant* warna media menjadi merah artinya isolat tersebut bersifat asam. Hal ini menandakan bahwa isolat ini mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa. Pada daerah *butt* isolat A dan B bersifat basa menandakan isolat tersebut tidak dapat memfermentasi glukosa sedangkan pada isolat C media berubah menjadi kuning artinya bersifat asam yang menandakan bahwa isolat tersebut mampu memfermentasi glukosa. Pembentukan gas hasil dari fermentasi H₂ dan CO₂ dapat dilihat dari pecahnya agar. Pembentukan gas H₂S ditandai dengan adanya endapan warna hitam. Pada isolat A, B, dan C tidak terbentuk gas H₂S hal ini menandakan bahwa isolat tersebut tidak mampu memfermentasi asam amino metionin dan sestein. Jika isolat mampu memfermentasi kedua asam amino ini maka gugus S akan keluar dan bereaksi dengan H₂O membentuk H₂S, dimana H₂S akan bereaksi dengan Fe²⁺ yang terdapat pada media membentuk FeS berwarna hitam dan mengendap.

Pada uji MRVP untuk analisa MR isolat C menunjukkan hasil positif karena media berubah menjadi merah setelah ditambahkan metil red artinya isolat ini

menghasilkan asam campuran (metilen glikon) dari proses fermentasi glukosa yang terkandung dalam media MR. Sedangkan isolat A dan B menunjukkan hasil negatif karena warna media mendekati merah. Untuk analisa VP ketiga isolat menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuk warna merah setelah ditambahkan naphthol dan KOH artinya hasil akhir fermentasi isolat ini bukan asetil metil karbinol (asetoin).

Pada uji indol terhadap isolat A, B dan C menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuk cincin berwarna merah muda, berarti ketiga isolat tersebut tidak memiliki indol dari tryptopan sebagai sumber carbon. Asam amino tryptopan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganismenya akibat penguraian protein.

Berdasarkan uji sitrat terhadap isolat A dan C hasil reaksinya negatif karena tidak terjadi perubahan warna pada media menunjukkan isolat tersebut tidak mempunyai enzim sitrat permease yaitu enzim spesifik yang membawa sitrat ke dalam sel. Sehingga isolat tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Sedangkan isolat B hasil positif karena terjadi perubahan warna dari hijau ke biru, berarti isolat ini mampu menggunakan karbon pada media sitrat sebagai sumber karbon.

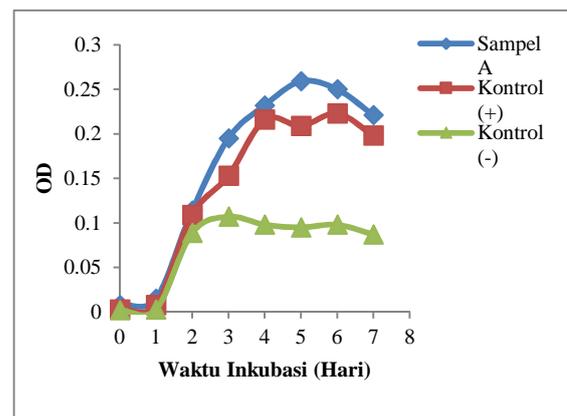
Hasil reaksi pada uji urease terhadap isolat A, B dan C menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna pada media berarti isolat ini tidak mampu menghidrolisis urea, artinya ketiga isolat tersebut tidak memiliki enzim urease

yang dapat menguraikan urea membentuk amoniak.

Hasil uji fermentasi menggunakan pereaksi laktosa, sukrosa dan mannitol terhadap ketiga isolat memberikan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna dari merah ke kuning hal ini menunjukkan bahwa media tidak dapat memfermentasi gula, sedangkan untuk pereaksi glukosa isolat A dan C menunjukkan hasil positif karena terjadi perubahan warna dari merah ke kuning menunjukkan bahwa isolat tersebut memfermentasi gula membentuk asam.

Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Piren

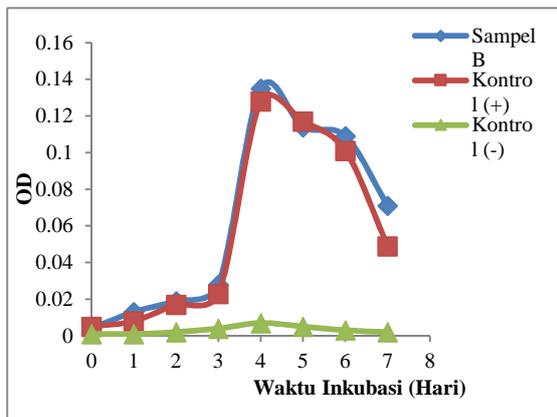
Media yang digunakan pada pertumbuhan bakteri pendegradasi piren adalah media yang sama dengan media seleksi. Ada dua kontrol pada tahap ini yaitu kontrol (+) dan kontrol (-). Kontrol (+) merupakan isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media selektif tanpa piren Sedangkan kontrol (-) merupakan media selektif dengan piren tanpa isolat bakteri. Berikut adalah kurva pertumbuhan bakteri



pendegradasi piren.

Gambar 3. Kurva pertumbuhan Bakteri pendegradasi piren pada isolat A

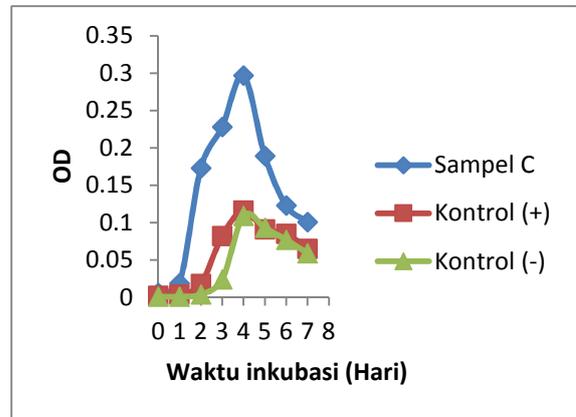
Berdasarkan Gambar 3 isolat A mampu mendegradasi piren. Hal ini dapat dilihat dari perbandingan nilai *Optical Density* (OD) antara media pertumbuhan dengan kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-). Media pertumbuhan bakteri tumbuh lebih baik dibandingkan dengan kontrol (+) dan kontrol (-). Hal ini berarti isolat tersebut kemungkinan besar mampu memanfaatkan piren sebagai sumber karbon. Waktu optimum pertumbuhan bakteri yaitu pada hari ke 5 inkubasi dan menurun pada hari ke 6, namun pada hari ke 7 masih terlihat banyaknya bakteri yang hidup. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki waktu pertumbuhan yang panjang.



Gambar 4. Kurva pertumbuhan Bakteri pendegradasi piren pada isolat B

Berdasarkan Gambar 4 isolat B kurang mampu mendegradasi piren. Hal ini dapat dilihat dari perbandingan nilai *Optical Density* (OD) antara media pertumbuhan dengan kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-). Pertumbuhan bakteri pada media pertumbuhan tumbuh kurang baik. Kurva pertumbuhan bakteri yang tumbuh pada kontrol (+) hampir sama dengan kurva pertumbuhan hal ini menunjukkan bakteri tersebut dapat tumbuh dengan memanfaatkan *yeast extract* sebagai sumber karbonnya. Kontaminasi yang terjadi pada tahap ini kecil, bisa di lihat dari Gambar 4 nilai OD

pada kontrol (-) rendah. Waktu optimum pertumbuhan yaitu pada hari ke 4 dan menurun pada hari ke 5 inkubasi.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan Bakteri pendegradasi piren pada isolat C

Berdasarkan Gambar 5 isolat C mampu mendegradasi piren. Hal ini dapat dilihat dari perbandingan nilai *Optical Density* (OD) antara media pertumbuhan dengan kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-). Media pertumbuhan bakteri tumbuh lebih baik dibandingkan dengan kontrol (+) dan kontrol (-). Hal ini berarti isolat tersebut kemungkinan besar mampu memanfaatkan piren sebagai sumber karbon. Kontaminasi yang terjadi pada tahap ini tinggi, hal ini bisa di lihat dari Gambar 5 nilai OD pada kontrol negatif tinggi. Waktu optimum pertumbuhan bakteri yaitu pada hari ke 4 inkubasi dan menurun pada hari ke 5 sedangkan Penurunan jumlah bakteri disebabkan oleh terjadinya akumulasi bahan toksik, nutrisi yang sangat terbatas sehingga banyak sel yang mati.

KESIMPULAN

Dari hasil uji biokimia ketiga isolat bakteri pendegradasi senyawa piren dari Perairan Pelabuhan Paotere mempunyai ciri-ciri mengarah adalah *Alcaligenes* untuk isolat A, *Sphingobacterium* untuk isolat B, dan *Bacillus* untuk isolat C.

DAFTAR PUSTAKA

- Herdiyantoro, D., 2005. *Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi oleh Bacillus sp. Galur ICBB 7859 dan ICBB 7865 dari Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah dengan Penambahan Surfaktan*. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Nasikhin., dan Shovitri, M., 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin dari Perairan Pelabuhan Gresik. ITS. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2(2): 2337-3520.
- Lukitaningsih, E dan Ari, S., 2010. Bioakumulasi Senyawa Poliaromatik Hidrokarbon dalam Plankton, Ganggang dan Ikan di Perairan Laut Selatan Jogjakarta. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(1) :18 – 26.
- Seo, J. S., Keum, Y. S., dan Li, Q. X., 2009. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int.J. Environ. Res. Public Health*, 6(1):278-309.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C., dan Jouanneau, Y., 2003. Identification of Pyrene-induced Proteins in Mycobacterium sp. strain 6PY1: Evidence for Two Ring-Hydroxylating Dioxygenases. *J. Bacteriol.* 185(13): 3828–3841
- Febria, F. A., 2012. *Penapisan Bakteri Pendegradasi Piren dari Tanah Kawasan Tambang Minyak Bumi Serta Identifikasi Berdasarkan Gen Penyandi 16s rRNA dan Piren Dioksigenase*. Universitas Andalas Padang.
- Liu, P.-W. G., Chang, T. C., Whang, L.-M., Kao, C.-H., Pan, P.-T., Cheng, S.-S., 2011. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil: Effects of Strategied and microbial Community Shift. *International Biodeterioration and Biodegradation* ,65(8):1119-1127.