

Isolasi Bakteri Pendegradasi Phenanthrene dari Batanta-Salawati Raja Ampat Papua

Rini Riffiani

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI Jl. Jakarta – Bogor km 46, Cibinong,
Email: Rar4id@yahoo.com

ABSTRACT

Isolation of Bacteria Degrading Phenanthrene in Batanta- Salawati Districts Raja Ampat Papua. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are important environmental contaminants in soil and water. These compounds have a potential risk to human health, as many of them are carcinogenic and toxic to marine organisms such as diatome, gastrophode, mussel, and fish. Phenanthrene is one of the hazardous hydrocarbon compounds. The purpose of this research was to characterize microbial strains from Batanta-Salawati Raja Ampat Papua Island and their ability to remove phenanthrene. Two isolates were identified at their physiological characteristics based on salinity tolerance, pH tolerance and the composition of nitrogen base. Molecular identification based on 16S rRNA gene sequences indicated that bacteria had the highest similarity with *Rhodobacteraceae bacterium* F9 and *Roseobacter sp.* RW 37. *Rhodobacteraceae bacterium* F9 could grow optimum on ONR7a media with 5% salinity and at pH of 5-7,5 while *Roseobacter sp.* RW 37 could grow optimum on ONR7a media with 2% salinity and at pH of 6,2-7,5.

Key words: Phenanthrene, physiological characteristic, molecular identification, Raja Ampat

PENDAHULUAN

Berbagai kegiatan eksplorasi, eksploitasi, transportasi melalui media laut, sering menghasilkan kejadian kebocoran tumpahan minyak ke lingkungan. Tumpahan minyak di laut telah berdampak terhadap pencemaran multidimensi bagi makhluk hayati laut itu sendiri, usaha perikanan, usaha pariwisata, sampai kepada tingkat kerusakan laut (Edwards & White 1999). Kecelakaan tanker pengangkut minyak, tumpahan minyak mentah dari kegiatan eksplorasi minyak bumi sering terjadi di perairan Indonesia, yang memerlukan

perhatian dan tindakan bioremediasi yang lebih optimum dengan memanfaatkan teknologi biostimulasi dan bioaugmentasi.

Aplikasi teknologi bioremediasi memerlukan data dasar diversitas jenis dan fungsi fisiologis mikroba laut. Bakteri mampu mendegradasi bahan kimia berbahaya dalam lingkungan menjadi air dan gas yang tidak berbahaya (CO₂) (Vidali 2001). Menurut Yamikov *et al.* (2004), bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon dalam minyak bumi banyak ditemukan di laut. Beberapa bakteri yang diketahui dapat mendegradasi senyawa PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) dalam minyak bumi antara lain

Cycloclasticus, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, dan *Sphingomonas* (Kasai *et al.* 2002). Phenanthrene merupakan salah satu dari senyawa PAH yang berpotensi sebagai zat karsinogen dan bersifat racun terhadap biota laut seperti diatom, gastropoda, remis, serta ikan (Ouyang 2006; Sack *et al.* 1997).

Kepulauan Raja Ampat merupakan kawasan tropis dengan produktivitas ekosistem yang tinggi, yang mempunyai peran sentral dalam menjaga ekosistem dunia. Batanta dan Salawati merupakan pulau yang masuk dalam wilayah Kepulauan Raja Ampat. Kepulauan ini terletak antara pulau Halmahera dan Papua. Kawasan ini merupakan pulau-pulau yang berbatasan dengan kawasan Wallacea dan dikenal memiliki kekayaan hayati laut sangat tinggi. Ekosistem Raja Ampat telah mengalami perubahan dengan adanya kegiatan penambangan, penyelundupan kayu ilegal melalui kepulauan Raja Ampat oleh sejumlah kapal asing, dan eksploitasi sumber daya perairan. Hampir 99 % mata pencaharian warga kepulauan Raja Ampat di laut, dan umumnya warga setempat memiliki kendaraan laut yang menggunakan bahan bakar minyak yang dapat mencemari perairan laut (Kadarusman 2007). Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri yang dapat mendegradasi senyawa phenanthrene di pulau Batanta-Salawati kepulauan Papua Raja Ampat. Diharapkan dari penelitian ini dapat diperoleh bakteri unggulan yang dapat digunakan sebagai landasan untuk pengembangan teknologi bioremediasi hidrokarbon di lepas pantai.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampling

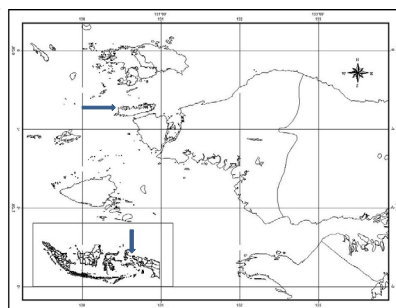
Sampel penelitian diambil dari Kepulauan Raja Ampat, Papua Barat pada tanggal 21 April-11 Mei 2008. Koordinat geografi astronomi dari lokasi pengambilan sampel adalah S: 00.18.865 E: 130.55.17 dan sampai S: 00.19.189 E: 130.066 (Gambar 1).

Sampel yang dikumpulkan berupa air laut. Untuk menghindari terjadinya degradasi jumlah bakteri dan kematian bakteri pada sampel, dilakukan metode pengayaan (*enrichment*). Media pengayaan yang digunakan adalah medium *artificial seawater mineral salt medium* (ONR7a) yang mengandung phenanthrene (1000 ppm). Komposisi media ONR7a per liter: 22,79 g NaCl, 3,99 g Na₂SO₄, 0,72 g KCl, 83 mg NaBr, 31 mg NaHCO₃, 27 mg H₃BO₃, 2,6 g NaF, 0,27 g NH₄Cl, 83 mg Na₂HPO₄, 1,3 g TAPSO, 11,18 g MgCl₂, 1,46 g CaCl₂, 24 mg SrCl₂, 2 mg FeCl₂ (Sheryl *et al.* 1995).

Pengayaan dilakukan dengan cara menambahkan 100 µL sampel air laut pada tabung (*PCR tube*) yang telah berisi 2 ml medium *enrichment* secara aseptik dan dilakukan langsung di lapangan setelah pengambilan sampel. Sampel kemudian disimpan pada suhu ruang 27-28°C.

Isolasi bakteri pendegradasi phenanthrene

Bakteri pendegradasi phenanthrene diisolasi pada medium minimum agar ONR7a dengan menggunakan metode sebar (*spread*). Medium yang telah



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel

diinokulasikan kemudian disublimasi dengan cara memanaskan senyawa phenanthrene pada suhu optimum yaitu 100°C selama 10 menit. Kondisi demikian menyebabkan senyawa tersebut menguap, lalu tertangkap pada medium yang diberi pendingin berupa batu es (Gambar 2). Pemberian batu es di atas medium yang telah diinokulasi untuk mencegah mencairnya medium agar karena terkena uap panas senyawa phenanthrene.

Medium yang telah disublimasi kemudian diinkubasi selama 7 hari pada temperatur 30°C . Bakteri yang dapat mendegradasi senyawa phenanthrene ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni.

Pemurnian Biakan Potensial Pendegradasi Phenanthrene

Isolat yang tumbuh dalam zona bening kemudian diisolasi secara aseptik dan diinokulasikan kembali ke medium ONR7a. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-72 jam. Kemurnian biakan diuji dengan diinokulasikan kembali pada medium kaya, yaitu *marine agar*. Media *marine agar* mengandung 5 gr pepton, 1 gr yeast ex-

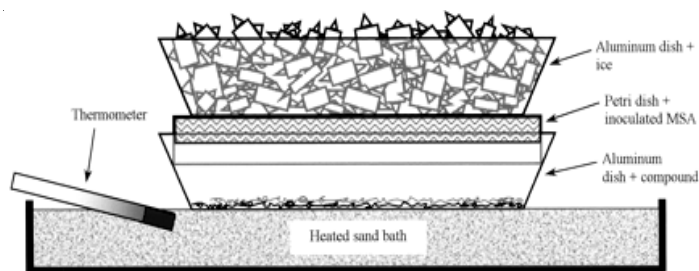
tract, 0,1 gr ferric citrate, 19,45 gr sodium chloride, 8,8 gr MgCl , 3,24 gr sodium sulfate, 1,88 gr calcium chloride, 0,55 potassium chloride, 0,16 gr sodium bicarbonate, 15 gr agar, 34 mg stronsium chloride, 22 mg boric acid, 4 mg sodium sillicate, 2,4 mg sodium flouride, 1,6 gr ammonium nitrat, dan 8 mg disodium phosphate.

Pengujian Konfirmasi

Pengujian konfirmasi bertujuan untuk memastikan kemampuan biak terseleksi dalam mendegradasi phenanthrene. Isolat terseleksi diinokulasikan kembali pada medium ONR7a, dan disublimasi kembali dengan senyawa phenanthrene. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-72 jam. Pembentukan zona bening pada medium ONR7a kemudian diamati. Zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni menandakan bahwa isolat tersebut mampu mendegradasi senyawa phenanthrene.

Pengujian Pengaruh Salinitas dan pH Terhadap Isolat Terpilih

Pengaruh salinitas dan pH terhadap pertumbuhan isolat SL49 dan B29 dilakukan dengan cara menumbuhkan kedua isolat dalam medium ONR7a



Gambar 2. Teknik sublimasi untuk isolasi mikroba pendegradasi PAHs

dengan variasi salinitas (NaCl) 0%, 2%, 5%, dan 10% serta variasi pH 5, 6, 2, 7, dan 10. Kultur diinkubasi pada shaker inkubator dengan suhu 30°C dan kecepatan 100 rpm selama 4 hari. Pengukuran pertumbuhan mikroba (OD) dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Pengukuran dilakukan setiap 4 jam dan 16 jam.

Penelitian yang dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap, dengan tiga kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf nyata 5% dan dilanjutkan dengan uji Duncan dengan program SPSS versi 12.

Identifikasi dan Analisis Filogenetik.

Identifikasi dilakukan secara molekular dengan 16S rDNA. Analisis molekular yang dilakukan berupa ekstraksi DNA dan PCR amplifikasi, purifikasi PCR produk dan sekuensing. Ekstraksi DNA menggunakan *intragene matrix kit* (Biorad) dilanjutkan dengan amplifikasi. Hasil optimasi PCR diperoleh komposisi per reaksi sebesar 25 µL dengan menggunakan Primer 9F (5'GAGTTTGATCCTGGCTCG) dan

1510R (5' GGCTACCTTGTTACGACTT).

Analisis DNA menggunakan program *BioEdit* dan dilakukan *blast* pada Bank Gen *NCBI dataLibrary*. Analisis Filogenetik menggunakan program *multiple alignment* Clustal X versi 1.83. Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *Neighbor joining*. Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ plot.

HASIL

Penapisan mikroba pendegradasi senyawa penanthrene

Hasil isolasi bakteri pendegradasi penanthrene menggunakan metode sublimasi terlihat dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni. Setelah dipurifikasi ditemukan 2 isolat, yaitu SL49 dan B29.

Pengaruh Salinitas Terhadap Pertumbuhan Isolat Terseleksi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan optimum bakteri SL49 terjadi pada medium dengan salinitas (NaCl) 2% (Gambar 3A), sedangkan

pertumbuhan isolat B29 berada pada kisaran salinitas lebih luas dibandingkan SL49, yaitu pada kisaran salinitas 2-10%, dengan pertumbuhan optimum terjadi pada salinitas (NaCl) 5% dengan setelah diinkubasi selama 28 jam (Gambar 3B). Berdasarkan uji statistik terjadi perbedaan yang nyata pada pertumbuhan bakteri SL 49 dan B29 dengan perlakuan dengan variasi salinitas pada taraf uji 0,05.

Pengaruh pH Terhadap Pertumbuhan Isolat Terpilih

Hasil pengujian pH terhadap pertumbuhan menunjukkan bahwa pertumbuhan optimum bakteri SL49 terjadi pada pH normal, yaitu pada kisaran 6,2-7,5 (Gambar 4A). Pada pH asam (pH 5) dan pH basa (pH 10) pertumbuhan bakteri terlihat kurang optimal.

Pertumbuhan bakteri B29 memiliki kisaran pH yang lebih luas dibandingkan dengan SL49, yaitu pada kisaran 5-7,5. Hasil tersebut menunjukkan bakteri B29 memiliki toleransi terhadap pH dan salinitas yang lebih luas dibandingkan bakteri SL49 (Gambar 4B). Berdasarkan

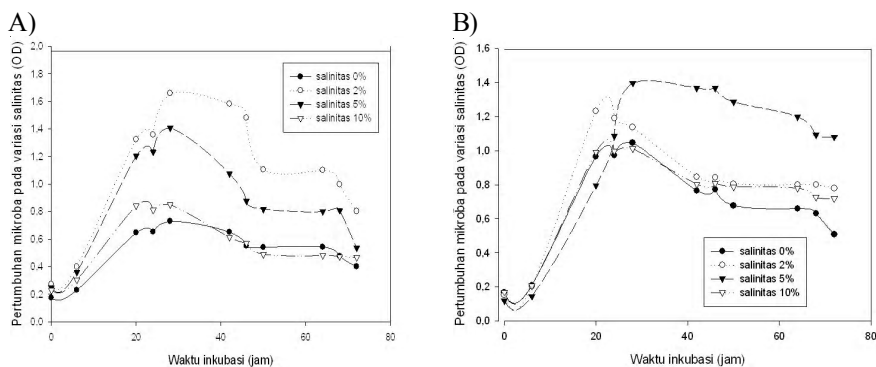
uji statistik terjadi perbedaan yang nyata pada pertumbuhan bakteri SL49 dan B29 dengan perlakuan dengan variasi pH pada taraf uji 0,05.

Identifikasi dan Analisis Filogenetik Isolat Terpilih

Berdasarkan analisis penjajaran urutan nukleotida parsial gen pengkode 16S rDNA menggunakan program *BLAST*, bakteri dengan kode isolat B29 mempunyai tingkat kesamaan tertinggi dengan *Rhodobacteraceae bacterium* F9 dengan persentase tingkat kesamaan 100% dan urutan nukleotida yang dapat dideteksi mencapai hingga 1026 bp. Sedangkan bakteri dengan kode isolat SL 49 mempunyai tingkat kesamaan dengan *Roseobacter* sp. RW 37 dengan tingkat kesamaan 99% dan nukleotida yang dapat dideteksi mencapai 910 bp.

PEMBAHASAN

Terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri menunjukkan bahwa koloni bakteri tersebut dapat menggunakan senyawa phenanthrene



Gambar 3. (A) Kurva pertumbuhan bakteri SL 49; (B) B 29 dalam medium ONR7 dengan variasi salinitas

sebagai sumber karbon dan energi bagi pertumbuhannya. Oleh karena media ONR7a merupakan media minimum mineral, setelah sumber karbon dari medium digunakan untuk pertumbuhan habis, maka bakteri akan menggunakan senyawa karbon aromatik yaitu phenanthrene sebagai sumber karbon dan energi bagi bakteri (Sheryl *et al.* 1995).

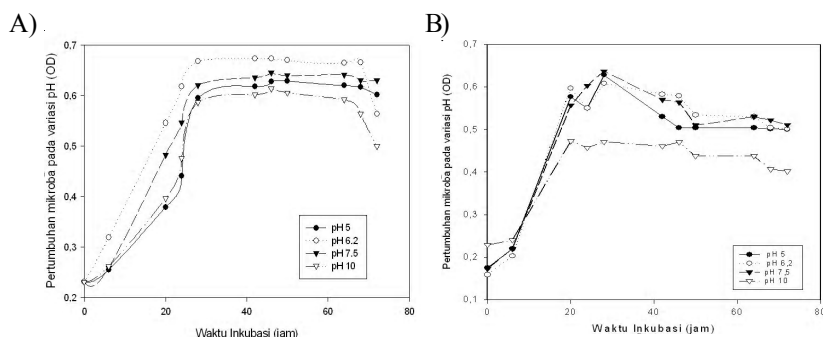
Menurut Iwabuchi & Harayama. (1997), biodegradasi senyawa PAH diawali dengan masuknya atom oksigen (reaksi oksidasi) ke dalam inti aromatik. Reaksi ini dikatalisis oleh multikomponen dioksigenase. Senyawa PAH yang teroksidasi akan membentuk prekursor intermediet dari siklus asam sitrat. Sebagai produk dari siklus tersebut pada akhirnya akan terbentuk air dan karbon dioksida.

Senyawa phenanthrene dapat didegradasi secara sempurna oleh bakteri menjadi air dan karbon dioksida melalui salah satu dari dua jalur yang ada, yakni jalur *o*-phthalat dan salisilat (Iwabuchi & Harayama 1997). Kedua jalur tersebut melalui senyawa intermediet yang sama, yaitu *1-hydroxy-2-napthoic acid*.

Bakteri *Aeromonas* dan *Nocardioides* sp. strain KP7 mendegradasi senyawa phenanthrene melalui jalur *o*-phthalat, sedangkan bakteri *Burkholderia cepacia* F297 melalui jalur salisilat (Iwabuchi & Harayama 1997; Mrozik *et al.* 2002). Serangkaian reaksi yang terjadi dalam proses biodegradasi senyawa phenanthrene baik melalui jalur *o*-phthalat maupun salisilat dapat dilihat pada.

Menurut Anthoni (2006), NaCl sangat mempengaruhi salinitas air laut, karena konsentrasinya paling dominan dibandingkan dengan senyawa lainnya. Air laut dengan salinitas 3,5% mengandung sekitar 85,62% NaCl, artinya konsentrasi senyawa NaCl di dalam air laut sebesar 3%. Oleh karena itu, bakteri SL49 dapat tumbuh optimum pada medium dengan salinitas (NaCl) 2%, karena konsentrasi NaCl yang terkandung di dalamnya hampir menyerupai habitat aslinya (air laut) yaitu sebesar 3%.

Pertumbuhan isolat B29 berada pada kisaran salinitas lebih luas dibandingkan SL49, yaitu pada kisaran salinitas 2-10%, dengan pertumbuhan



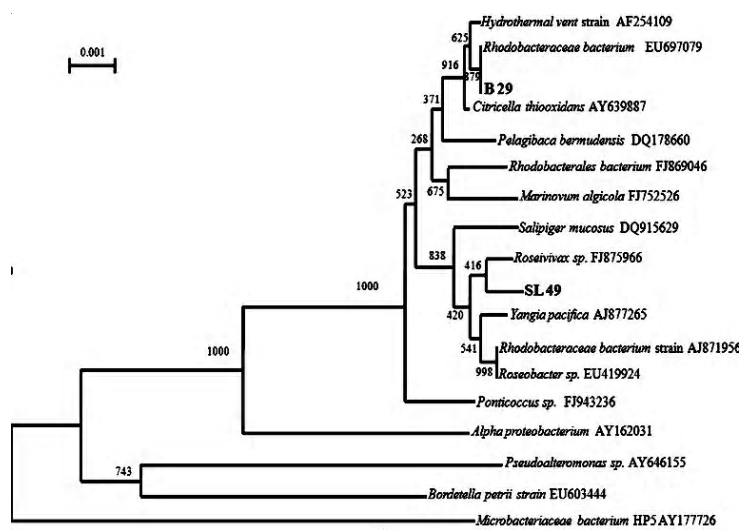
Gambar 4 (A) Kurva pertumbuhan bakteri SL49; (B) B29 dalam medium ONR7a dengan variasi pH

optimum terjadi pada salinitas (NaCl) 5% dengan OD 1,396 setelah diinkubasi selama 28 jam (Gambar 3B). Hal ini diduga stabilitas membran, aktivitas enzim, maupun mekanisme transpor aktif bakteri ini tidak terganggu oleh kenaikan konsentrasi Na^+ . Menurut Kogure *et al.* (1991), sebagian bakteri laut memiliki ketergantungan terhadap ion Na^+ untuk menjaga stabilitas membran, aktivitas enzim, dan mekanisme transpor aktif.

Pertumbuhan bakteri B29 memiliki kisaran pH yang lebih luas dibandingkan dengan SL49, yaitu pada kisaran 5-7,5. Hasil tersebut menunjukkan bakteri B29 memiliki toleransi terhadap pH dan salinitas yang lebih luas dibandingkan bakteri SL49 (Gambar 4A dan 4B). Hal

ini menunjukkan bahwa bakteri SL49 memiliki pH optimum untuk pertumbuhan sesuai dengan pH habitat asli dari bakteri laut, yaitu sekitar 7-8,5 (Peter 2003).

Hasil analisis menampilkan pohon filogeni kedua isolat bakteri tersebut dapat dilihat pada Gambar 5. Pohon filogeni tersebut menunjukkan bahwa B29 adalah *Rhodobacteraceae bacterium* F9 dan bakteri SL49 adalah *Roseobacter* sp. RW 37 memiliki kekerabatan yang dekat. Kedua kelompok tersebut termasuk ke dalam kelompok α -*Proteobacteria*. Mikroba laut dari kelompok Sub klas *Proteobacteria* merupakan mikroba laut terkultur yang mempunyai peran dalam proses bioremediasi senyawa toksik seperti senyawa PAH (*Polycyclic*



Gambar 5. Pohon kekerabatan 2 bakteri potensial pendegradasi phenanthrene yaitu B29 (*Rhodobacteraceae bacterium* F9) dan bakteri SL49 (*Roseobacter* sp. RW 37) dengan kelompok luar sebagai pembandingan *Microbacteriaceae bacterium* yang dianalisis dengan program *BioEdit*. Tingkat ketelitian dendrogram ditentukan melalui nilai *bootstrap* dengan pengulangan 1000 kali.

Aromatic Hydrocarbon) yang banyak terdapat pada bahan bakar fosil terutama minyak bumi (Kasai *et al.* 2002)

KESIMPULAN

Dua bakteri pendegradasi senyawa phenanthrene dari kepulauan Raja Ampat telah diisolasi, masing-masing adalah *Roseobacter* sp. RW 37 dan *Rhodobacteraceae bacterium* F9. Keduanya merupakan kelompok α -*Proteobacteria*. Pertumbuhan optimum *Roseobacter* sp. RW 37 berlangsung pada salinitas 2% dan pada kisaran pH 6,2-7,5 sedangkan *Rhodobacteraceae bacterium* F9 pada salinitas 5% dan pada kisaran pH 5-7,5.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Dr. Bambang Sunarko, Dr. I Made Sudiana, Dra. Nunik Sulistinah, Arif Nurkanto S. Si, yang telah memberikan kontribusi yang besar selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Anthoni, FJ. 2006. *The Chemical Composition of Seawater*. <http://www.seafriends.orgnz/oceano/seawater.htm>

Edward, R.& I.White. 1999. *The Sea Empress Oil Spill.Environmental Impact and Recovery*. Proceeding of International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute Washington DC.

Iwabuchi, T.& S. Harayama. 1997. Biochemical and Genetic Characterization of 2-Carboxybenzaldehyde Dehydrogenase, an Enzyme Involved in Phenanthrene Degradation by *Nocardioides* sp. Strain KP7. *J. Bacteriology*. 179: 6488-6494.

Kadarusman, 2007. Studi Awal Pengeboman Ikan di Raja Ampat, Suatu Ancaman Megadiversitas Jantung Segitiga Karang Dunia. Factsheet Apsor: www.apsordkp.com. Akademi Perikanan Sorong-DKP. Sorong, Papua Barat.

Kasai, Y, H. Kishira, & S. Harayama. 2002. Bacteria Belonging to the Genus *Cycloclasticus* Play a Primary Role in the Degradation of Aromatic Hydrocarbons Released in a Marine Environment. *Appl. & Envi. Microbiology*. 5625-5633.

Kogure, K, O. Suwan, K. Ohwada, & U. Simidu. 1991. Correlation between Possession of a Respiration-Dependent Na⁺ Pump and Na⁺ Requirement for Growth of Marine Bacteria". *Appl. & Envi. Microbiology*. 57. 1844-1846.

MacLeod, RA. 1965. The Question of the Existence Specific Marine Bacteria. *Bacteriological Review*, 29 (1).

Mrozik, A., Z. Piotrowska-Seget & S. Labuzek. 2002. Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish Journal of Envir. Studies* 12: 15-25.

- Ouyang, Jun. 2006. *Phenanthrene Pathway Map*. <http://umbbd.msi.umn.edu/pha/phamap.html>
- Peter L., JA.Musick & Jeanette Wyneken. 2003. *The Biology of Sea Turtles*. II: 420.CRC Press LLC.
- Sack, U, MH.Thomas, D. Joanna, EC. Carl, M. Rainer, Z. Frantisek & F. Wolfgang 1997. Comparison of Phenanthrene and Pyrene Degradation by Different Wood-Decaying Fungi". *Appl. & Envi. Microbiolog.* 63: 3919-3925.
- Yamikov, MM., Laura G., Renata D., Ermanno C., Tatiana N. C., Wolf-Rainer A., Heinrich L., Kenneth N. Timmis & Peter N. Golyshin. 2004. "*Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a Novel Marine Bacterium That Obligately Utilizes Hydrocarbons". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 141–148
- Sheryl, E Dykstershouse, JP. Gray, RP. Herwig, Canolara & JT. Staley. 1995. *Cycloclasticus pugetii* gen. Nov, sp. Nov, on Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sedi-ments. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 116-123.
- Vidali, M. 2001. "Bioremediation and Overview". *Pure and Applied. Chemistry.IUPAC*, Vol. 73, 7: 1163–1172.

Memasukkan: Mei 2009

Diterima: Desember 2009