

Pertumbuhan Optimal Bakteri Laut *Pseudomonas aeruginosa* LBF-1-0132 dalam Senyawa Piren
(The Optimal Growth of Marine *Pseudomonas aeruginosa* LBF-1-0132 in Pyrene)

Safitriani², Ahmad Thontowi¹, Elvi Yetti¹, Suryani² & Yopi¹

¹Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor 16911.

²Jurusan Bioimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor Jl. Dramaga – Bogor 16680 Indonesia
Email: yopisunarya@gmail.com

Memasukkan: Agustus 2016, Diterima: Desember 2016

ABSTRACT

Pyrene is a high molecular weight chemical compound belongs to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) group that are difficult to degrade by environment. Biodegradation techniques using indigenous marine bacteria are used to be as an effort to reduce pollutants that are carcinogenic. The objectives of this research are to screen of 18 marine bacteria isolates qualitatively by sublimation method and quantitatively by growth test and to optimize degradation activity of marine bacteria isolates by pyrene concentration and cell concentration. Identification by 16S rDNA and phylogenetic tree analysis were conducted to determine the molecular basis of bacterial identity. The result of sublimation showed that 15 isolates were positive result for pyrene degradation and classified to 3 groups. The first group consisted of 5 isolates that can produce clear zone, while the second group are 5 isolates with isolate color changes. The third group have both of activities. Growth test showed that isolate LBF-1-0132 has high potency to degrade pyrene compound. Isolate LBF-1-0132 is capable of degrading pyrene compounds optimally at concentration of 600 ppm and optimum cell concentration of 20. Based on 16S rDNA gene analysis, isolate LBF-1-0132 is *Pseudomonas aeruginosa* with 98% identity.

Keywords : pyrene, marine bacteria, optimization, 16S rDNA identification

ABSTRAK

Piren merupakan salah satu jenis kelompok senyawa PAH yang memiliki bobot molekul tinggi sehingga sulit didegradasi di lingkungan. Teknik biodegradasi dengan menggunakan bakteri laut *indigenous* digunakan sebagai upaya mengurangi polutan piren yang bersifat karsinogenik. Tujuan penelitian ini adalah melakukan seleksi 18 isolat bakteri laut dengan sublimasi dan uji pertumbuhan, melakukan optimasi pertumbuhan bakteri laut yang memiliki potensi dalam mendegradasi senyawa piren melalui parameter optimasi konsentrasi piren dan optimasi konsentrasi sel. Identifikasi dengan 16S rDNA dan analisis pohon filogenetik dilakukan untuk mengetahui identitas bakteri secara molekuler. Sebanyak 15 isolat bakteri laut positif dapat mendegradasi piren melalui sublimasi yang terbagi menjadi tiga kelompok berdasarkan hasil sublimasi yaitu menghasilkan zona bening (5 isolat), mengalami perubahan warna (5 isolat), dan keduanya (5 isolat). Seleksi dengan uji pertumbuhan menyatakan bahwa isolat LBF-1-0132 memiliki potensi tinggi dalam mendegradasi senyawa piren. Isolat LBF-1-0132 mampu mendegradasi senyawa piren secara optimum pada konsentrasi piren 650 ppm dan konsentrasi sel optimum 20. Hasil identifikasi 16S rDNA bakteri laut menyatakan LBF-1-0132 merupakan *Pseudomonas aeruginosa* dengan tingkat kemiripan sebesar 98%.

Kata Kunci : piren, bakteri laut, optimasi, identifikasi 16S rDNA

PENDAHULUAN

Minyak yang digunakan sebagai sumber energi utama bagi kehidupan sering mengalami eksploitasi secara berlebihan. Pengeboran minyak lepas pantai yang dilakukan oleh industri sering mengalami kebocoran dan mengakibatkan pencemaran di wilayah laut Indonesia. Salah satu zat polutan yang terdapat

di dalam minyak bumi mentah adalah Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH). Menurut Febria (2012), senyawa PAH merupakan senyawa yang berbahaya bagi lingkungan karena bersifat toksik, karsinogenik, dan mutagenik. Piren merupakan salah satu kelompok PAH berbobot molekul tinggi yang memiliki struktur dengan empat cincin aromatik, lebih sulit didegradasi, persisten di lingkungan, hidrofobik, berasosiasi

dengan tanah dan membahayakan lingkungan dan komponen biotik (Krivobrook *et al.* 2003). Piren bersifat karsinogenik dan berbahaya bagi kesehatan. Menurut Lukitaningsih *et al.* (2004), PAH memberikan efek dengan membentuk ikatan kovalen dengan basa dari DNA sehingga menimbulkan kerusakan pada DNA yang berdampak kanker.

Bakteri laut telah banyak digunakan sebagai sarana dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon (Murniasih *et al.* 2009, Sulistinah & Rini 2011, Ahmad 2012, Ismail *et al.* 2015). Bakteri *indigenous* ini mampu memanfaatkan senyawa polutan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan sel. Karakter piren yang memiliki empat cincin benzena membuat piren sulit didegradasi di lingkungan sehingga dibutuhkan bakteri *indigenous* untuk mendegradasi senyawa tersebut. Masing-masing tahapan dalam proses degradasi dikatalisis oleh enzim spesifik yang disintesis oleh sel (Meier *et al.* 2000). Kim *et al.* (2007) melalui penelitian jalur metabolisme *Mycobacterium vanbalenii* PYR-1 menunjukkan peran enzim piren dioksigenase dalam memecah struktur piren menjadi lebih sederhana dan dijadikan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan melalui jalur siklus asam sitrat (TCA).

Sudah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa piren (Kim *et al.* 2007, Walter *et al.* 1991, Rehmann *et al.* 1998, Klankeo *et al.* 2009). Penelitian Walter *et al.* (1991) menunjukkan adanya korelasi antara kenaikan nilai pertumbuhan OD sel dengan penurunan jumlah piren selama masa inkubasi 12 hari. Isolat bakteri laut *indigenous* yang digunakan dalam penelitian ini belum dioptimasi aktivitasnya terkait biodegradasi senyawa piren sebagai kelompok PAH berbobot molekul tinggi. Identifikasi molekuler melalui analisis 16S rDNA juga dilakukan untuk memperkaya biodiversitas bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa piren sebagai senyawa polutan berbobot molekul tinggi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan seleksi isolat bakteri laut yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa piren dan mengoptimasi pertumbuhan isolat bakteri laut yang unggul dalam mendegradasi senyawa piren dengan parameter konsentrasi piren dan konsentrasi sel. Identifikasi melalui 16S rDNA dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri dalam rangka meningkatkan biodiversitas bakteri laut yang unggul dalam mendegradasi senyawa piren. Kondisi optimum yang diperoleh diharapkan

dapat meningkatkan nilai efektivitas biodegradasi senyawa piren oleh bakteri laut sebagai salah satu agen bioremediasi untuk penyelamatan lingkungan biota laut.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sebanyak 18 isolat bakteri laut yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari koleksi Laboratorium Biokatalisis dan Fermentasi, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Isolat bakteri laut diremajakan dalam media *marine agar* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Kultivasi dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri laut pada media *marine broth* dan diinkubasi pada inkubator pengaduk pada kecepatan 200 rpm, 30 °C selama 24 jam. *Artificial Sea Water* (ASW) cair merupakan media minimum pada pengujian uji pertumbuhan dan optimasi.

Uji biodegradasi senyawa piren secara kualitatif dilakukan dengan metode sublimasi dengan media agar ASW (Alley dan Brown 2000). Sublimasi dilakukan kepada 18 isolat bakteri laut pada suhu 137 °C selama 7 menit. Kontrol sublimasi adalah isolat bakteri laut pada media agar ASW tanpa perlakuan sublimasi dan media agar ASW yang disublimasi dengan piren tanpa adanya isolat bakteri laut. Media agar ASW memiliki komposisi natrium klorida (NaCl), natrium sulfat (Na₂SO₄), kalium klorida (KCl), natrium bikarbonat (NaHCO₃), kalium bromida (KBr), natrium florida (NaF), dan agar 1%. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 7 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan pembentukan zona bening atau perubahan warna pada isolat setelah perlakuan.

Uji pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa piren secara kuantitatif. Uji pertumbuhan dilakukan dalam media ASW cair yang berisi larutan piren 50 ppm dan sel isolat bakteri laut OD_{600nm} sel 1. Inkubasi dilakukan pada inkubator pengaduk pada kecepatan 200 rpm, 30 °C selama 7 hari. Kontrol uji pertumbuhan dilakukan dengan dua cara yaitu kontrol piren dengan campuran piren dan media ASW cair tanpa isolat dan kontrol isolat dengan campuran isolat bakteri laut dan media ASW cair tanpa penambahan piren. Pengukuran OD sel dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm dan dilakukan

pengukuran pertumbuhan bakteri pada hari H0 dan H7. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Hasil isolat bakteri laut dengan nilai OD_{600nm} sel tertinggi digunakan untuk diidentifikasi secara molekuler dan dilakukan optimasi konsentrasi piren dan konsentrasi sel.

Isolat bakteri laut unggul yang telah teridentifikasi selanjutnya dilakukan optimasi kemampuan degradasi piren dengan parameter konsentrasi piren dan konsentrasi sel. Optimasi konsentrasi senyawa piren dilakukan pada variasi konsentrasi 0 ppm, 50 ppm, 250 ppm, 450 ppm, 500 ppm, 650 ppm dan 750 ppm. Konsentrasi sel pada rentang konsentrasi 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, dan 30 ppm. Larutan stok piren dibuat dengan mencairkan bubuk piren dengan senyawa dimetil sulfoksida (DMSO) pada konsentrasi 3000 ppm. Kontrol optimasi pertumbuhan dilakukan dengan dua cara yaitu kontrol piren dengan campuran piren dan media ASW cair tanpa isolat dan kontrol isolat dengan campuran isolat bakteri laut dan media ASW cair tanpa penambahan piren. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Pengukuran OD sel dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm dan dilakukan pengukuran pertumbuhan bakteri pada hari H0, H3, dan H7.

Isolat bakteri yang unggul dalam mendegradasi senyawa piren kemudian diidentifikasi berdasarkan analisis 16S rDNA. DNA genom dihasilkan dari ekstraksi DNA dengan menggunakan DNA *Extraction Kit* PROMEGA. DNA genom digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi gen 16S rDNA. Primer yang digunakan dalam amplifikasi gen 16S rDNA adalah primer 9F (5P-GAGTTTGGAT CCTGGCTCAG-3P) dan 1541(5PAAGGAGGTGAT CCAGCCGCA3P). Target gen 16S rDNA sekitar 1500 pasang basa.

Amplifikasi DNA dilakukan sebagai berikut, terjadi 10 siklus yang terdiri atas pemisahan utas DNA (denaturasi) pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada DNA (*annealing*) pada suhu 55°C selama 1 menit dan sintesis DNA (*elongation*) pada suhu 72°C selama 2 menit. Kedua, proses 30 siklus kembali terjadi pada suhu dan waktu yang sama, yaitu atas pemisahan utas DNA (denaturasi) pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada DNA (*annealing*) pada suhu 65°C selama 1 menit dan sintesis DNA (*elongation*) pada suhu 72°C selama 2

menit. Selanjutnya, penyesuaian utas atas dan bawah (*extension*) pada suhu 72°C selama 2 menit dengan satu siklus ulangan. Hasil amplifikasi kemudian divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis agarosa 1% pada kondisi 35V selama 110 menit dan dilakukan dekolorisasi dengan menggunakan *Sybergreen* selama 20 menit. Hasil visualisasi dilihat dibawah UV-Transiluminator.

Hasil amplifikasi positif terlihat pita gen 16S rDNA kemudian dilakukan sekuensing untuk menerima data urutan nukleotida. Analisis urutan nukleotida dilakukan untuk mengetahui kekerabatan organisme terdekat melalui bank data metode BLAST. Pembentukan pohon filogenetik dilakukan dengan program MEGA6.0 dengan *Test Neighbor-joining tree* dan diuji dengan *Bootstrap method* pada ukuran 1000 nukleotida.

HASIL

Seleksi isolat bakteri laut dalam mendegradasi piren dengan sublimasi (kualitatif)

Uji sublimasi dilakukan untuk mendapatkan informasi kemampuan isolat bakteri laut dalam mendegradasi senyawa piren secara kualitatif. Sebanyak 18 isolat bakteri laut didegradasi dengan cara memaparkan uap piren pada permukaan ASW agar yang diinokulasikan isolat bakteri laut. Kontrol sublimasi merupakan isolat bakteri laut yang diinokulasikan ke dalam media agar ASW tanpa perlakuan sublimasi dan media agar ASW tanpa isolat yang diberikan perlakuan sublimasi. Hasil menunjukkan bahwa terdapat 15 bakteri laut yang dapat mendegradasi senyawa piren. Hasil positif pada uji sublimasi memperlihatkan bahwa terdapat 3 kelompok isolat yang menghasilkan perubahan yang berbeda setelah inkubasi 7 hari (Tabel 1). Perubahan tersebut meliputi kelompok isolat yang mengalami perubahan warna dan menghasilkan zona bening sebanyak 5 isolat, kelompok isolat yang hanya menghasilkan zona bening sebanyak 5 isolat, dan kelompok isolat yang hanya mengalami perubahan warna sebanyak 5 isolat (Gambar 1). Uji sublimasi merupakan uji seleksi awal yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri laut dalam mendegradasi senyawa piren. Uji pertumbuhan perlu dilakukan sebagai uji konfirmasi kemampuan bakteri dalam memanfaatkan piren sebagai sumber makanan dengan parameter nilai OD sel

Tabel 1. Uji degradasi senyawa piren oleh 18 isolat bakteri laut dengan metode sublimasi.

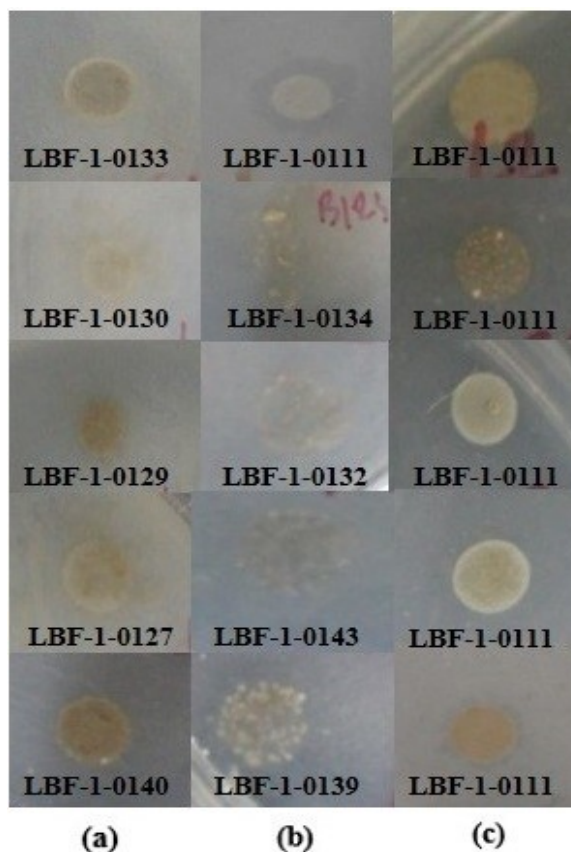
Kode Isolat	Hasil	Keterangan ^a
LBF-1-0133	+	Zona bening, Perubahan warna coklat
LBF-1-0130	+	Zona bening, Perubahan warna coklat
LBF-1-0129	+	Zona bening, Perubahan warna coklat
LBF-1-0127	+	Zona bening, Perubahan warna coklat
LBF-1-0140	+	Zona bening, Perubahan warna coklat
LBF-1-0111	+	Zona bening
LBF-1-0134	+	Zona bening
LBF-1-0132	+	Zona bening
LBF-1-0143	+	Zona bening
LBF-1-0139	+	Zona bening
LBF-1-0128	+	Perubahan warna coklat
LBF-1-0135	+	Perubahan warna coklat
LBF-1-0136	+	Perubahan warna coklat
LBF-1-0137	+	Perubahan warna coklat
LBF-1-0141	+	Perubahan warna coklat
LBF-1-0138	-	Tidak terjadi perubahan
LBF-1-0131	-	Tidak terjadi perubahan
LBF-1-0142	-	Tidak terjadi perubahan

^aPerubahan warna terjadi dari warna putih menjadi warna coklat setelah masa inkubasi 7 hari.

pertumbuhan bakteri. Sebanyak 15 Isolat positif yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa piren tersebut kemudian digunakan dalam pengujian seleksi isolat bakteri laut secara kuantitatif dengan uji pertumbuhan.

Seleksi isolat bakteri laut dalam mendegradasi piren dengan uji pertumbuhan

Uji pertumbuhan dilakukan untuk menyeleksi bakteri yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa piren dengan pengukuran OD sel. Uji pertumbuhan dilakukan sebagai uji konfirmasi kemampuan isolat bakteri dalam memanfaatkan piren sebagai sumber makanan. Gambar 2 merupakan pertumbuhan isolat bakteri laut pada masa inkubasi hari ke-7. Menurut Bintang (2010), besarnya konsentrasi suatu larutan akan sebanding dengan absorbansi yang terukur pada panjang gelombang tertentu. Hasil menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0132 memiliki nilai OD sel tertinggi pada panjang gelombang 600 nm sebesar 2.918 (OD_{600nm}). Tingginya konsentrasi sampel menunjukkan bahwa isolat bakteri laut mampu tumbuh dalam media yang dicampur dengan piren. Isolat LBF-

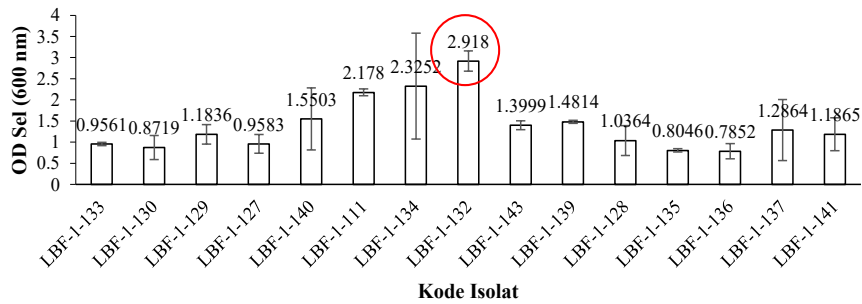


Gambar 1 Hasil uji degradasi senyawa piren hari ke-7 oleh isolat bakteri laut dengan sublimasi. (a) Kelompok isolat pembentuk zona bening dan mengalami perubahan warna; (b) Kelompok isolat pembentuk zona bening; (c) Kelompok isolat mengalami perubahan warna.

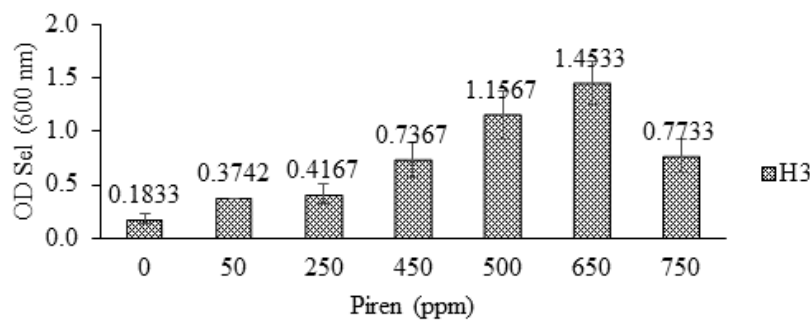
1-0132 diduga memiliki potensi unggul dalam mendegradasi senyawa piren sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan selnya.

Optimasi Pertumbuhan Isolat LBF-1-0132 dalam Variasi Konsentrasi Piren

Optimasi konsentrasi piren bertujuan mendapatkan kondisi pertumbuhan optimum pada beberapa variasi konsentrasi piren. Gambar 3 menunjukkan nilai pertumbuhan isolat LBF-1-0132 sampai pada hari ke-3 yang telah dikurangi dengan nilai kontrol piren. Inkubasi hari ke-7 menunjukkan penurunan nilai OD sel isolat bakteri laut. Hal ini menunjukkan bahwa isolat sudah tidak mampu mendegradasi piren dengan baik. Isolat LBF-1-0132 mampu tumbuh pada konsentrasi piren sebesar 50-650 ppm dan menurun pada konsentrasi 750 ppm. Isolat LBF-1-0132 terus meningkat sampai konsentrasi 500 ppm dan mengalami titik kritis atau optimum



Gambar 2 Pertumbuhan bakteri laut dalam mendegradasi senyawa piren setelah 7 hari inkubasi pada suhu 30 °C



Gambar 3. Kemampuan degradasi isolat bakteri laut dalam berbagai variasi konsentrasi senyawa piren.

pada konsentrasi 650 ppm dengan nilai OD_{600nm} sel sebesar 1.4533 dan menurun pada konsentrasi 750 ppm dengan nilai OD_{600nm} sel sebesar 0.7733 sampai pada hari ke-3. Hal ini menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0132 memiliki kondisi optimum dalam mendegradasi senyawa piren sampai pada konsentrasi piren sebesar 650 ppm. Konsentrasi piren optimum yang telah ditemukan kemudian digunakan sebagai standar konsentrasi piren untuk pengujian optimasi konsentrasi sel isolat bakteri laut LBF-1-0132

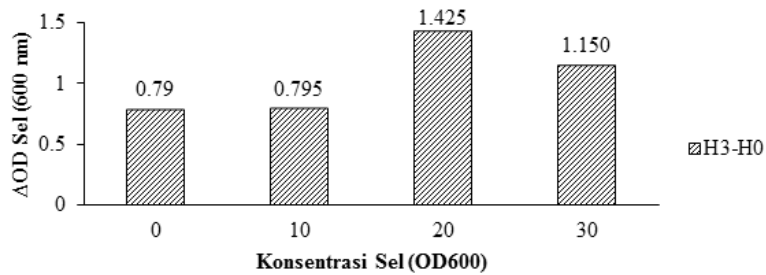
Optimasi Pertumbuhan Isolat LBF-1-0132 dalam Variasi Konsentrasi Sel

Optimasi konsentrasi sel isolat bakteri laut bertujuan mendapatkan kondisi optimum pertumbuhan bakteri pada beberapa variasi konsentrasi sel berdasarkan OD_{600nm} sel bakteri. Optimasi konsentrasi sel isolat LBF-1-0132 dilakukan dengan melakukan uji pertumbuhan pada variasi konsentrasi sel dari 0-30 (OD_{600nm}) pada media yang mengandung kondisi optimum dari konsentrasi piren sebesar 650 ppm selama masa inkubasi 7 hari. Konsentrasi sel diukur mengacu kepada

pengukuran OD_{600 nm} yang dikonversikan sesuai dengan jumlah pengencerannya. Isolat LBF-1-0132 terus meningkat sampai konsentrasi sel 10 (OD_{600nm}). Hasil pada Gambar 4 menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0132 menghasilkan nilai OD sel tertinggi pada konsentrasi sel sebesar 20 (OD_{600nm}) dengan nilai pertumbuhan sebesar 1.425 sampai pada masa inkubasi hari ke-3. Yang dimaksud dengan nilai pertumbuhan adalah selisih antara nilai OD sel pertumbuhan isolat bakteri laut pada hari ke-3 yang dikurangi dengan nilai OD sel pada hari ke-0. Terjadi penurunan nilai OD sel isolat bakteri laut pada hari ke-7. Hal inilah yang menjadi dasar pengambilan data pada hari ke-3 yang dikurangi dengan nilai nilai OD sel pada hari ke-0.

Identifikasi molekuler bakteri unggul pendegradasi senyawa piren

Identifikasi molekuler isolat bakteri laut dapat dilakukan dengan menggunakan analisis gen 16S rDNA. DNA genom diperlukan untuk melakukan amplifikasi gen 16S rDNA. Elektroforegram hasil isolasi DNA genom dapat dilihat



Gambar 4. Peningkatan kemampuan degradasi isolat bakteri laut dalam berbagai variasi konsentrasi sel (OD_{600nm}) setelah 7 hari inkubasi pada suhu 30 °C

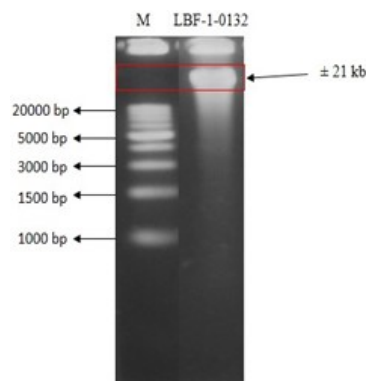
pada Gambar 5. DNA genom isolat bakteri laut diekstraksi menggunakan kit *Wizard® Genomic DNA Purification*. Hasil menunjukkan bahwa DNA genom isolat bakteri laut LBF-1-0132 menghasilkan pita DNA genom dengan ukuran sekitar 21 kb.

Identifikasi molekuler isolat LBF-1-0132 dilakukan dengan menggunakan analisis gen 16S rDNA. Gen 16S rDNA memiliki sifat yang stabil, konservatif dan tidak berubah selama evolusi sehingga sering digunakan dalam proses identifikasi bakteri. Amplifikasi gen 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan DNA genom sebagai DNA cetakan untuk melakukan amplifikasi. Hasil amplifikasi gen 16S rDNA memperlihatkan panjang pita DNA sekitar 1500 bp. Hasil elektroforegram gen 16S rDNA dapat dilihat pada Gambar 6.

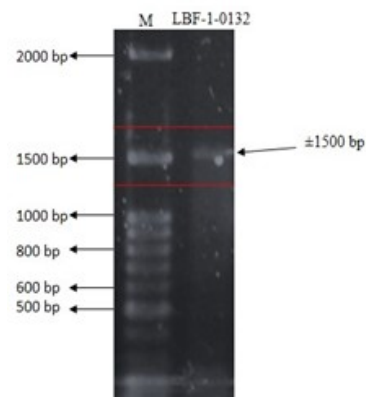
Identifikasi isolat LBF-1-0132 dilakukan dengan melakukan analisis gen 16S rDNA sebagian. Hasil urutan basa nukleotida isolat LBF-1-0132 dibandingkan dengan bank data melalui program BLAST untuk mendapatkan informasi kekerabatan terdekat dengan organisme lainnya. Isolat LBF-1-0132 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Pseudomonas aeruginosa* HS9 (GU323371.1) dengan tingkat kemiripan sebesar 98% (Tabel 2). Pembentukan pohon filogenetik berfungsi memperlihatkan kekerabatan antara isolat LBF-1-0132 dengan bakteri *P. aeruginosa* (Gambar 7).

PEMBAHASAN

Penapisan isolat bakteri laut dengan sublimasi dilakukan untuk melihat kemampuan biodegradasi senyawa piren oleh isolat bakteri laut. Sublimasi dilakukan sebagai salah satu langkah awal studi kemampuan isolat bakteri laut dalam mendegradasi senyawa yang sukar



Gambar 5 Elektroforegram DNA genom bakteri laut isolat LBF-1-0132 dengan kode; M=marker 1 kb. Visualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% dengan marker 1 kb

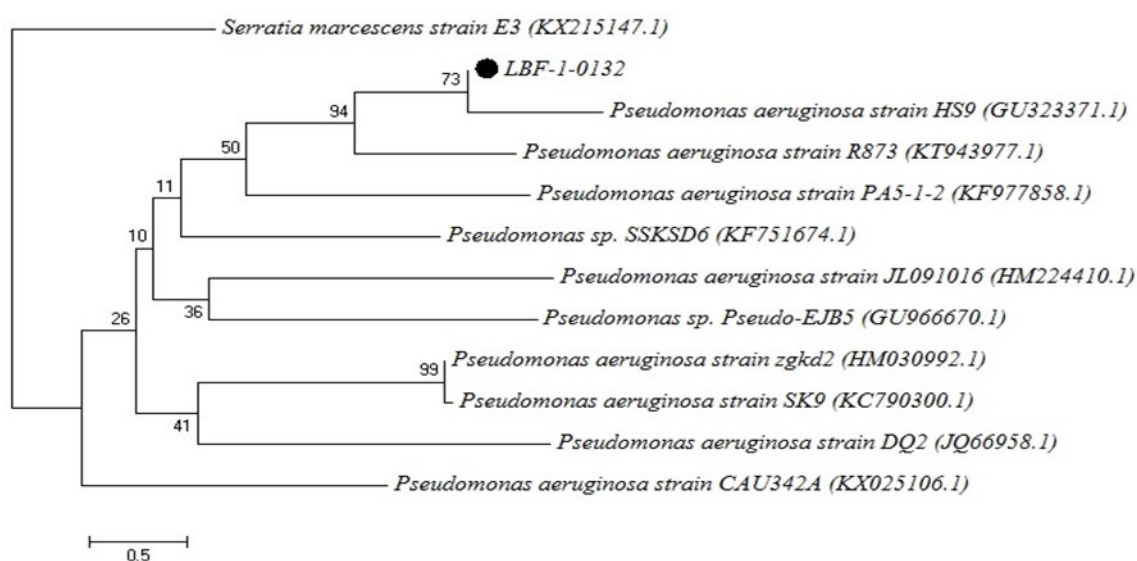


Gambar 6 Elektroforegram DNA genom bakteri laut isolat LBF-1-0132 dengan kode; M = marker 100 bp. Visualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% dengan marker 100 bp.

larut dalam air sebagai substrat bagi mikroorganisme (Alley dan Brown 2000). Sebanyak 15 isolat bakteri laut positif menghasilkan zona bening dan mengalami perubahan warna (Tabel 1, Gambar 1). Perbedaan perubahan yang terjadi setelah dilakukan sublimasi pada isolat bakteri laut karena adanya perbedaan kemampuan degradasi senyawa piren oleh bakteri laut. Perbedaan luas zona bening yang dihasilkan oleh isolat bakteri laut

Tabel 2. Hasil analisis BLAST gen 16S rDNA isolat LBF-1-0132

No	Hasil BLAST	Query Cover (%)	E Value	Homologi (%)	Identities
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DQ2 (JQ669958.1)	99	0.0	98%	2261/2261
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> zqkdf2 (HM030992.1)	99	0.0	98%	2259/2259
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA5-1-2 (KF977858.1)	99	0.0	98%	2257/2257
4	<i>Pseudomonas</i> sp. SSKSD6 (KF751674.1)	99	0.0	98%	2257/2257
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JL091016 (HM224410.1)	99	0.0	98%	2255/2255
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SK9 (KC790300.1)	99	0.0	98%	2255/2255
7	<i>Pseudomonas</i> sp. Pseudo-EJB5 (GU966670.1)	99	0.0	98%	2255/2255
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HS9 (GU323371.1)	99	0.0	98%	2255/2255
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CAU342A (KX025106.1)	99	0.0	98%	2254/2254
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R873 (KT943977.1)	99	0.0	98%	2254/2254



Gambar 7. Pohon filogenetik isolat LBF-1-0132.

belum tentu menunjukkan adanya aktivitas kemampuan degradasi isolat bakteri laut yang besar. Menurut penelitian, adanya kompleks warna dan zona bening pada media membuktikan bahwa isolat bakteri dapat memanfaatkan senyawa PAH sebagai sumber karbon untuk memenuhi kebutuhan nutrisi bagi pertumbuhan bakteri (Marino 1998; Hidayati 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukannya uji konfirmasi dengan menggunakan uji pertumbuhan isolat bakteri laut dengan parameter OD sel pertumbuhan bakteri.

Uji pertumbuhan merupakan metode yang digunakan untuk melakukan seleksi isolat menggunakan parameter OD_{600nm} sel bakteri secara spektrofotometri. Larutan uji merupakan senyawa piren yang dilarutkan ke dalam dimetil sulfoksida (DSMO). Nilai pertumbuhan diperlihatkan dengan tingginya nilai OD sel bakteri dibandingkan dengan kontrol piren. Nilai OD sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol piren menunjukkan bahwa konsentrasi/jumlah sel isolat bakteri laut meningkat. Peningkatan yang terjadi menunjukkan

pertumbuhan sel. Pertumbuhan sel ini dikarenakan isolat bakteri laut mampu memanfaatkan senyawa piren sebagai sumber karbon utama untuk pertumbuhan selnya. Seleksi dilakukan terhadap 15 isolat bakteri laut positif pada uji sublimasi. Hasil uji pertumbuhan menunjukkan nilai pertumbuhan isolat bakteri laut yang berbeda-beda (Gambar 2). Isolat LBF-1-0132 menghasilkan nilai OD sel tertinggi dibandingkan dengan isolat lainnya. Menurut Latha dan Kalaivani (2012), terdapat korelasi antara penambahan jumlah sel dengan peningkatan kemampuan degradasi kandungan minyak. Kemampuan adaptasi yang diberikan oleh bakteri terhadap laju biodegradasi bergantung pada pemanfaatan substrat yang diberikan, pengenalan enzim spesifik yang bekerja, peningkatan kemampuan metabolisme melalui perubahan genetik yang terjadi, ataupun dengan memperkaya selektivitas bakteri dengan kemampuan metabolisme yang dimiliki (Van der Meer *et al.* 1992, Macleod *et al.* 2002). Isolat LBF-1-0132 mampu memanfaatkan substrat secara maksimal untuk pertumbuhan sel yang ditandai dengan tingginya nilai OD sel bakteri dibandingkan dengan isolat lainnya. Hal ini tentu dipengaruhi kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa piren secara enzimatik. Kim *et al.* (2007) menyatakan bahwa metabolisme degradasi piren dilakukan secara enzimatik dengan mengkatalisis masuknya dua buah atom oksigen kedalam substrat dengan menggunakan enzim piren dioksigenase. Proses ini akan memecah struktur piren membentuk fenantrena-4,5-dikarboksilat. Hasil oksidasi selanjutnya akan membentuk ftalat yang kemudian membentuk senyawa protokatekuat. Senyawa protokatekuat kemudian didegradasi lebih jauh menjadi senyawa asam sitrat yang dapat masuk ke dalam siklus asam sitrat sehingga membentuk energi untuk pertumbuhan bakteri (Madigan *et al.* 2003).

Zulkifli & Satriamanda (2006), menyatakan bahwa kondisi optimum perlu diciptakan untuk mendapatkan keefektifan dalam proses bioremediasi. Optimasi kemampuan biodegradasi piren oleh isolat LBF-1-0132 dilakukan melalui dua parameter yaitu konsentrasi piren dan konsentrasi sel. Isolat LBF-1-0132 memiliki kemampuan optimum dalam mendegradasi senyawa piren pada konsentrasi 650 ppm dan menurun pada konsentrasi 750 ppm (Gambar 3). Johnsen *et al.* (2005) menyatakan bahwa kenaikan pertumbuhan sampai batas konsentrasi

maksimal menunjukkan bakteri masih dapat memanfaatkan piren sebagai sumber karbon karena kapasitas populasi mikroorganisme yang masih memadai untuk melakukan transformasi senyawa tersebut. Saat laju masa meningkat, maka laju biodegradasi dikontrol oleh aktivitas metabolisme bakteri dengan pengaruh aktivitas sel bakteri dan populasi sel. Pengaruh aktivitas sel dapat dipengaruhi oleh permeabilitas membran sel, bioavailabilitas sel, dan aktivitas transfer elektron (Rosenberg *et al.* 1980, Johnsen & Karlson 2004, Orjuela *et al.* 2010). Isolat LBF-1-0132 menghasilkan kondisi optimum konsentrasi sel sebesar 20 (OD_{600nm}) dan menurun pada konsentrasi sel 30 (OD_{600nm}). Penurunan nilai pertumbuhan ini dapat diakibatkan tingginya kompetisi sel sehingga proses biodegradasi menjadi rendah (Zam 2010). Konsentrasi sel yang semakin tinggi akan menyebabkan persaingan dalam penggunaan substrat sehingga mengakibatkan pertumbuhan kultur menjadi tidak baik karena penambahan jumlah sel atau biomassa menjadi rendah (Astuti 2003).

Hasil optimasi dalam beberapa variasi konsentrasi piren dan peningkatan konsentrasi sel memperlihatkan nilai pertumbuhan isolat bakteri laut LBF-1-0132 pada hari ketiga. Pertumbuhan pada hari ketujuh mengalami penurunan nilai OD sel dibandingkan dengan hari ketiga. Penurunan nilai OD sel ini dapat terjadi karena sel yang lisis karena sumber makanan yang sudah habis pada hari ketujuh. Sel akan mengalami lisis jika tidak dapat mempertahankan kondisi osmotik sel yang tinggi dalam memanfaatkan substrat (Susanthi *et al.* 2009). Penelitian Mnif *et al.* (2008) tentang isolasi dan Karakterisasi *Halomonas* sp. pendegradasi PAH menyatakan bahwa adanya hubungan antara pertumbuhan bakteri laut dengan menggunakan OD sel dan penurunan jumlah senyawa PAH dengan analisis GC-MS. Kemampuan biodegradasi senyawa piren oleh isolat bakteri laut dapat dilakukan dengan menggunakan analisis kromatografi gas (GC). Namun, dalam penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan kondisi pertumbuhan optimum bakteri dalam mendegradasi senyawa piren dengan parameter konsentrasi piren dan konsentrasi sel. Hasil kondisi pertumbuhan yang optimal ini diharapkan akan meningkatkan efektivitas bioremediasi laut yang

tercemar dengan menggunakan bakteri laut.

Identifikasi bakteri bakteri laut secara molekuler dilakukan dengan menggunakan analisis gen 16S rDNA dan pembentukan pohon filogenetik. Hasil identifikasi isolat LBF-1-0132 menunjukkan kemiripan dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain HS9 (GU323373.1) dengan tingkat kemiripan sebesar 98%. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif dengan sifat aerobik. *Pseudomonas aeruginosa* memiliki morfologi dengan bentuk batang dan memiliki flagella untuk pergerakannya. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 30 °C sampai 50 °C dan optimal pada suhu 45 °C (Perfumo *et al.* 2006). *Pseudomonas aeruginosa* sudah banyak diteliti sebagai bakteri yang efektif dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon dan memproduksi biosurfaktan sebagai cara untuk mengkonsumsi hidrokarbon sebagai sumber energi (Noordman & Janssen 2002; Rahman *et al.* 2002). Ramnolipid merupakan biosurfaktan yang diproduksi oleh *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian Perfumo *et al.* (2006) melaporkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mampu mendegradasi secara sempurna komponen minyak kurang dari 1 minggu masa inkubasi. Isolat LBF-1-0132 yang teridentifikasi sebagai *Pseudomonas aeruginosa* diharapkan dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi dalam proses bioremediasi dalam mendegradasi senyawa piren.

KESIMPULAN

Isolat LBF-1-0132 merupakan isolat bakteri laut yang diduga unggul dalam mendegradasi senyawa piren. Isolat LBF-1-0132 menghasilkan pertumbuhan optimal dalam mendegradasi senyawa piren pada konsentrasi 650 ppm dan konsentrasi sel optimum sebesar 20 (OD_{600nm}). Hasil identifikasi gen 16S rDNA menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0132 memiliki tingkat kemiripan 98% dengan *Pseudomonas aeruginosa* strain HS9. Isolat bakteri laut *indigenous* ini memiliki potensi sebagai agen bioremediasi berdasarkan kemampuan pemanfaatan senyawa piren sebagai sumber pertumbuhan sel.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada SATREPS 1: *Indonesian Culture Collection* dan DIPA Tematik Puslit Bioteknologi LIPI tahun 2016 atas dukungan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alley, JF., & LR. Brown. 2000. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (1): 439-442.
- Astuti, DI. 2003. Pemanfaatan kultur campuran isolat mikroba lokal untuk degradasi minyak bumi dan produksi biosurfaktan. [disertasi] Doktor Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia: Teknik Penelitian*. Jakarta (ID): Erlangga.
- Hidayati, NV. & DS. Agung. 2011. Efektivitas biosurfaktan dalam proses biodegradasi fluorine oleh bakteri hidrokarbonoklastik. Di dalam: Suyono, Nur Isdarmawan, Noor Z, editor. *Prosiding Seminar Nasional Strategi Pembagunan Perikanan dan Kelautan Berwawasan Lingkungan*. 2011 Des 9, Tegal, Indonesia. Tegal (ID): Universitas Pancasakti Tegal. 28–36.
- Johnsen, AR., & U. Karlson. 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology Biotechnology*. 63:452–459.
- Kim, SJ., & EC. Carl. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on system biology. *Journal of Bacteriology*. 189 (2): 464–472.
- Klankeo, P., N. Wannarak, & P. Onruthai. 2009. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108 (6): 488–495.
- Latha, R., & R. Kalaivani. 2012. Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Advances in Applied Science Research*. 3: 2789-2795.
- Madigan, MTJ., Martinko, & J. Parker. 2003. *Brock Biology Of Microorganism 10th Ed.* New Jersey (USA): Prentice Hall International, Inc.
- Macleod, CJA., & TS. Kirk. 2002. The adaptation of

- two similar soil to pyrene catabolism. *Environmental Pollution*. 199 (1): 357–364.
- Marino, F. 1998. *Biodegradation of Paraffin Wax*. Montréal (UK): Department of Chemical Engineering, Mc Gill University.
- Meer, VD., WM. Devos, S. Harayama, AJB. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology Review*. 56: 677–694.
- Meier, RM., IL. Pepper, CP. Gerba. 2000. *Environmental Microbiology*. San Diego (US): Academic Press.
- Mnif, Chamkha, & Sayadi. 2008. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 785-794.
- Noordman, WH., & DB. Janssen. 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environment Microbiology*. 68: 4502–4508.
- Orjuela, GL, G. Eleni, DS. Roberto, S. Christopher, & RP. Jhon. 2010. Metabolic pathway for degradation of aromatic hydrocarbon by bacteria. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*. 237:105-120.
- Perfumo, A., M. Ibrahim, F. Canganella, & M. Roger. 2006. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied Microbiology Biotechnology*. 72: 132–138.
- Rahman, KSM, TJ. Rahman, S. McClean, R. Marchant, IM. Banat. 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol Programe*. 18:1277–1281.
- Rehmann, K, PN. Harald, EW. Christian, A. Steinberg, & A. Kettrup. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. *Chemosphere*. 36 (14): 2297-2992.
- Rosenberg M, & E. Rosenberg. 1981. Role of adherence in growth of *Acinobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Journal Bacteriology*. 148: 51–57.
- Susanthi, D., I. Made, & S. Langkah. 2009. Bakteri laut isolat pulau pari pendegradasi komponen *crude oil*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan, MIPA. Yogyakarta, 16 Mei 2009. 148–157.
- Walter, U., M. Beyer, J. Klein & HJ. Rehm. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology Biotechnology*. 34:671–676.
- Zam, SI. 2010. Optimasi konsentrasi inokulum, rasio C:N:P dan pH pada proses bioremediasi limbah pengilangan minyak bumi menggunakan kultur campuran. *El-Hayah*. 1 (2): 23–34.
- Zulkifli & Satriamanda. 2006. Bioremediasi. *Jurnal Reaksi (Journal of Science and Technology) Review*. 4(8): 15–20.