

## BAKTERI LAUT PANTAI SORONG PAPUA BARAT PENDEGRADASI KOMPONEN *crude oil*

Shinta Eri Andriana<sup>1</sup>, I Made Sudiana<sup>2</sup>, Langkah Sembiring<sup>3</sup>

Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada

### Abstrak

Penelitian ini dilakukan sebagai upaya untuk mengatasi pencemaran di laut akibat adanya tumpahan *crude oil* dengan cara mengisolasi bakteri yang dapat mendegradasi komponen *crude oil* khususnya senyawa *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (*Phenantrene* dan DBT) serta parafin. Penelitian ini juga bertujuan menemukan komposisi senyawa nitrogen yang sesuai yang dapat mengoptimalkan pertumbuhan bakteri laut potensial pendegradasi komponen *crude oil*. Bakteri potensial diisolasi dari pantai Sorong. Kemampuan bakteri tumbuh pada *crude oil* diuji pada medium ONR7a padat. Isolat terseleksi diuji kemampuannya mendegradasi *Polycyclic Aromatic Hidrokarbon* pada medium ONR7a padat yang disublimasi PAH. Sedangkan kemampuan degradasi parafin diuji pada media air laut buatan (ONR7a cair). Setelah itu dilakukan uji konfirmasi kemampuan mendegradasi komponen *crude oil* pada media air laut steril yang sudah diberi nitrogen dalam berbagai bentuk dan sumber karbon berupa parafin, DBT dan *phenantrene*. Tahap terakhir adalah karakterisasi dan identifikasi isolat potensial yang diperoleh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa strain E7a dan E7d tidak dapat mendegradasi semua komponen *crude oil* sekaligus. Strain E7a membutuhkan  $\text{KNO}_3$  untuk mendegradasi *phenantrene* dan DBT sedangkan E7d membutuhkan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebagai sumber nitrogen untuk mendegradasi parafin. Berdasarkan karakterisasi molekular menggunakan 16S rDNA, strain E7a paling dekat kekerabatannya dengan *Pseudomonas* sp. Sw1, sedangkan strain E7d paling dekat kekerabatannya dengan *Marinobacter santoriniensis* T5054<sup>T</sup>. Tidak ditemukan bakteri dari pantai Sorong yang dapat mendegradasi semua komponen *crude oil* (PAH dan parafin) sekaligus.

**Kata kunci** : Degradasi komponen *crude oil*, bakteri potensial dan Pantai Sorong.

### PENDAHULUAN

Indonesia adalah satu dari sekian banyak negara pemasok minyak bumi (*crude oil*) dunia yang diapit oleh dua benua dan dua samudera. Pembangunan pengeboran minyak lepas pantai juga menambah resiko tercemarnya perairan Indonesia oleh tumpahan minyak, apalagi banyaknya kecelakaan laut yang menyebabkan tumpahnya minyak ke laut meningkat dari tahun ke tahun (Sudrajat, 2006). Hal ini sangat berbahaya bagi keberlangsungan hidup organisme laut karena minyak bumi mengandung senyawa kimia tertentu yang sangat berbahaya bagi organisme karena bersifat karsinogenik (penyebab kanker) dan dapat merusak syaraf (Mangkoedihardjo, 2005). Menurut Mandri and Lin (2007), senyawa kimia tersebut antara lain *paraffin* dan senyawa *PAH* (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) yang meliputi *phenantrene* dan *DBT* (*dibenzothiophene*). Senyawa PAH ini diketahui dapat terbioakumulasi pada rantai makanan, dan sulit untuk terdegradasi di lingkungan alamiah.

Bioremediasi merupakan salah satu upaya untuk mengurangi bahan pencemar dengan bantuan organisme. Sejauh ini hanya bioremediasilah yang terbukti aman bagi lingkungan dan tidak menimbulkan efek yang merugikan organisme laut karena populasi bakteri akan kembali ke jumlah semula seiring habisnya senyawa yang dapat dijadikan sumber karbon mereka. Dengan kata lain, populasi bakteri akan kembali ke jumlah normal mereka di alam seiring dengan habisnya tumpahan minyak di laut (Fatimah, 2007). Salah satu faktor yang sering membatasi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon adalah sifat kelarutannya yang rendah sehingga sulit mencapai sel mikroorganisme (Francy *et al.*, 1991). Upaya yang umum dilakukan untuk meningkatkan kelarutan hidrokarbon adalah dengan pemberian surfaktan sintetis.

Penggunaan surfaktan ini menimbulkan masalah bagi organisme hidup karena bersifat toksik, *non-degradable* serta dapat menghambat proses degradasi oleh mikroorganisme (Laha and Luthy, 1992 dalam Willumsen dan Karlson, 1997).

Alternatif lain untuk meningkatkan biodegradasi hidrokarbon adalah penggunaan biosurfaktan. Biosurfaktan merupakan komponen mikroorganisme yang terdiri atas molekul hidrofobik dan hidrofilik, yang mampu mengikat molekul hidrokarbon tidak larut air dan mampu menurunkan tegangan permukaan. Selain itu biosurfaktan secara ekstraseluler menyebabkan emulsifikasi hidrokarbon sehingga mudah untuk didegradasi (Koch *et al.*, 1991). Keuntungan lainnya adalah sifatnya yang tidak toksik dan lebih mudah didegradasi oleh mikroorganisme (Richana *et al.*, 1998).

Dalam upaya mengoptimalkan bioremediasi lingkungan perairan di Indonesia, pencarian strain lokal yang mempunyai kapasitas tinggi dalam mendegradasi senyawa pencemar dan menghasilkan biosurfaktan sangat diharapkan. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan para peneliti khususnya dalam bidang bioremediasi di seluruh dunia, belum ditemukan bakteri yang dapat mendegradasi senyawa PAH dan paraffin sekaligus dalam waktu yang relatif cepat (dalam hitungan jam), walaupun telah ditemukan beberapa bakteri yang dapat mendegradasi parafin dan senyawa PAH secara terpisah yang sebagian besar berasal dari air laut yang belum tercemar *crude oil* dibandingkan dari air laut yang tercemar *crude oil* (Kaczorek *et al.*, 2007). Salah satu perairan yang masih murni dan belum tercemar khususnya oleh *crude oil* di Indonesia adalah perairan di Pantai Sorong, Papua Barat. Penelitian ini diarahkan untuk mencari (isolasi) bakteri laut potensial sebagai degrader senyawa PAH dan parafin dalam waktu yang relatif cepat khususnya yang berasal dari perairan laut Indonesia yang belum tercemar *crude oil*. Selain itu penelitian ini juga bertujuan untuk menemukan sumber nitrogen yang dapat mengoptimalkan pertumbuhan bakteri laut super tersebut sehingga biaya dapat diminimalisasi.

## METODE PENELITIAN

### 1. Sampling

Sampling dilakukan dengan cara mengambil air laut permukaan di Pantai Sorong, Papua Barat yang belum tercemar *crude oil* secara acak dari beberapa titik sampling. Air laut yang diambil diletakkan dalam satu tempat dan di enrichment menggunakan *crude oil*.

### 2. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan ada tiga yaitu medium minimal ONR7a, medium marine agar dan medium CH<sub>3</sub>COONa.

#### a. ONR7a (per liter akuades)

Terdiri dari tiga macam larutan (1,2 dan 3), dengan perbandingan 2:1:1. **Larutan 1** : 22,79 gr NaCl; 3,98 gr Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,72gr KCl; 83mg NaBr; 31mg NaHCO<sub>3</sub>; 27mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2,6mg NaF; 0,27gr NH<sub>4</sub>Cl; 89mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan 1,3gr TAPSO {3-[N-tris(hydroxymethyl)methylamino]-2-hydroxypropanesulfonic acid} ditimbang dengan timbangan analitik (Sartorius, TE 150 2S) dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500ml yang sudah diisi dengan aquades 100ml. Derajat keasaman (pH) disesuaikan hingga 7.6 dengan NaOH 10%. pH diukur menggunakan pH meter (Horiba pH/ion meter F-23). Larutan ini ditambah dengan aquades 400ml dan ditambah dengan agar (Difco) (15.0 gr/L) untuk memadatkan. Diaduk menggunakan magnetic stirrer (IKA<sup>®</sup> RH basic 2) hingga semua bahan bercampur. **Larutan 2** : 11,18 gr MgCl<sub>2</sub>; 1,46gr CaCl<sub>2</sub> dan 24mg SrCl<sub>2</sub> (*divalent cation salts*) ditimbang menggunakan timbangan analitik (Sartorius, TE 150 2S) dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250ml yang sudah diisi dengan aquades 20ml. Diaduk menggunakan magnetic stirrer (IKA<sup>®</sup> RH basic 2) hingga semua bahan bercampur. Setelah itu ditambah dengan 230ml aquades. **Larutan 3** : 2,0 mg FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O ditimbang menggunakan timbangan analitik (Sartorius, TE 150 2S) dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250ml yang sudah diisi dengan aquades 20ml. Diaduk menggunakan magnetic stirrer (IKA<sup>®</sup> RH basic 2) hingga semua bahan bercampur. Setelah itu ditambah dengan 230ml aquades. Ketiga larutan disterilisasi dengan autoclave (TOMY SX-500) high pressure steam sterilizer. Sebelum digunakan ketiga larutan dicampur di dalam LAF\* (laminar air flow) (Boiclean Bench SANYO) pada suhu 50°C. Larutan yang tidak dipergunakan disimpan sebagai stok di dalam kulkas (4°C, Sharp) (Rini & Sudiana, 2007).

- b. Medium Marine Agar 1/10 (per Liter)  
55,1g marine agar (Difco 2216) ditimbang dengan timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 1000ml yang sudah diisi dengan aquades dan ditambah dengan 10g agar (Difco). Diaduk dengan magnetic stirrer dan disterilkan dengan autoclave 121°C, 20 menit. Larutan yang tidak dipergunakan disimpan sebagai stok di dalam kulkas (4°C, Sharp) (Rini & Sudiana, 2007).
- c. Medium CH<sub>3</sub>COONa (per Liter)  
Larutan 1 medium ONR7a ditambah dengan 5g sodium asetat (CH<sub>3</sub>COONa). Setelah disterilisasi, larutan 1 ONR7a yang telah ditambah dengan sodium asetat dicampur dengan larutan 2 dan 3 setelah suhu turun menjadi 50°C. Larutan yang tidak dipergunakan disimpan sebagai stok di dalam kulkas (4°C, Sharp) (Rini & Sudiana, 2007).

### 3. Persiapan dan Isolasi Mikroorganisme

Di dalam LAF, diambil 100µL air laut Sorong menggunakan mikropipet dan diletakkan dalam tube (ependrof) yang sudah diberi aquades steril 900 µL dan ditutup. Tube berisi mikrobial divortek (SIBATA TTM-1) selama 1menit. 100 µL biakan bakteri diambil dari tube dan diletakkan di tengah cawan medium ONR7a padat dan diratakan menggunakan dirglasky ke seluruh permukaan cawan hingga air mengering. Setelah itu *crude oil* ditambahkan sebanyak 100 µL dan diratakan ke seluruh permukaan cawan menggunakan dirglasky. Cawan disegel menggunakan plastik *wrep* dan diinkubasi dalam inkubator (SANYO) pada suhu 29,6°C hingga bakteri tumbuh. Dilakukan pengamatan tiap hari hingga terbentuk zona bening. Untuk perawatan, ditambahkan *crude oil* jika habis. Bakteri pendegradasi *crude oil* dimurnikan (Rini & Sudiana, 2007).

### 4. Uji Konfirmasi

- a. Uji Konfirmasi PAH (DBT dan Phenanthrene).

Uji konfirmasi yang pertama, dilakukan dengan menginokulasikan kembali biak terseleksi pada medium ONR7a tersublimasi phenanthrene dan DBT, dan diamati zona bening atau perubahan warna medium ONR7a. Uji konfirmasi yang kedua, dilakukan dengan menginokulasikan 100µL biak terseleksi pada medium air laut steril 50 ml mengandung PAH 1ml (phenanthrene dan DBT) yang sudah diberi 100µL sumber nitrogen (KNO<sub>3</sub> dan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dan 100µL sumber fosfat (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) serta ferric sitrat 100 µL, dengan perbandingan C:N:P = 100:20:3. Diinkubasi dalam bioshaker (SANYO) pada suhu 28°C. Diamati perubahan warna atau tingkat kekeruhan medium (Rini & Sudiana, 2007).

- b. Uji Konfirmasi Paraffin

Uji konfirmasi yang pertama dilakukan dengan menginokulasi kembali 100µL biak pendegradasi *crude oil* ke dalam 5ml medium ONR7a steril yang sudah diberi 50 mg paraffin sebagai sumber karbon, dan diamati buih yang dihasilkan dan penyusutan paraffin serta kekeruhan media. Uji konfirmasi yang kedua, dilakukan dengan menginokulasikan 100µL biak terseleksi pada medium air laut steril 50 ml mengandung paraffin 50mg yang sudah diberi 100µL sumber nitrogen (KNO<sub>3</sub> dan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dan 100µL sumber fosfat (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) serta ferric sitrat 100 µL, dengan perbandingan C:N:P = 100:20:3. Diinkubasi dalam bioshaker (SANYO) pada suhu 28°C. Diamati penyusutan paraffin atau tingkat kekeruhan medium (Rini & Sudiana, 2007).

### 5. Uji Pertumbuhan

Uji pertumbuhan biakan murni terseleksi pendegradasi komponen *crude oil* dilakukan dengan variasi dua parameter yaitu salinitas dan pertumbuhan dalam sodium asetat.

a. Salinitas

Uji pertumbuhan strain terseleksi menggunakan medium ONR7a cair dengan variasi salinitas: 2%, 5%, dan 10%. Pada uji pertumbuhan ini dilakukan pengamatan derajat kekeruhan optis (OD) per 3 jam selama 15 jam menggunakan alat *UV Pharmspectrofotometer 1700* (UV visible Shimadzu) pada panjang gelombang 600nm. Parameter pertumbuhan juga ditandai dengan penurunan jumlah fosfat, amonia dan nitrat yang terdapat pada medium (Rini & Sudiana, 2007).

b. Dalam Medium Sodium Asetat

Uji pertumbuhan strain terseleksi menggunakan medium sodium asetat. Bakteri uji distreak dan diinokulasi dalam inkubator (29°C). Pada uji pertumbuhan ini dilakukan pengamatan pertumbuhan koloni pada bekas setrikan (Rini & Sudiana, 2007).

## 6. Uji MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbon)

Setelah disentrifugasi, sel dicuci dua kali dengan PUM buffer dan disentrifugasi kembali. Suspensi sel bakteri dalam PUM buffer diukur ODnya (Ao) dengan panjang gelombang 600nm menggunakan UV-Visible Spectrophometer Shimadzu. Selanjutnya 500µl heksadekan ditambahkan dalam 5ml suspensi bakteri dan divortek selama 2 menit. Setelah 10 menit, OD fase cair diukur (A1). Derajat hidrofobisitas dihitung dengan rumus  $[1 - (Ao - A1)/Ao] \times 100\%$ . Dilakukan 5 ulangan dengan standar deviasi  $\pm 6.2\%$ . Hidrofobisitas pertumbuhan bakteri dalam glukosa dijadikan sebagai kontrol.

## 7. Identifikasi Biakan Murni Terseleksi Pendegradasi PAH dan Parafin

Identifikasi yang dilakukan adalah identifikasi secara morfologi, pewarnaan gram, KOH tes dan identifikasi secara molekular (biokimia dan enzimatik) meliputi: API 20 NE, dan 16S rDNA.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian terdapat enam kelompok bakteri (E7a, E7d, E27c, E61 dan E7c2) yang dapat tumbuh dengan menggunakan *crude oil* sebagai karbon. Adanya pertumbuhan ditandai dengan pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri. Adanya zona bening ini juga menunjukkan pembentukan biosurfaktan sebagai produk hasil metabolisme (Fatimah, 2007).

Uji kemampuan degradasi PAH pertama-tama dilakukan dengan metode sublimasi. Strain terseleksi distreak pada medium ONR7a padat yang akan disublimasi dengan senyawa PAH *Phenanthrene* dan DBT. Kedua senyawa ini dipilih karena merupakan senyawa yang biasa digunakan sebagai model uji untuk bioremediasi PAH (Coral & Karagoz, 2005). Bioremediasi sendiri bertujuan untuk membuat fraksi-fraksi yang tidak mudah larut menjadi mudah larut sehingga mudah didegradasi. Susah tidaknya PAHs terdegradasi dipengaruhi oleh ukuran dan struktur, konfigurasi cincin-cincin benzene dan ikatan ganda aromatik. Semakin banyak cincin benzene dan semakin banyak ikatan rangkap yang terdapat di dalam PAHs maka semakin susah PAHs terdegradasi (Hughes *et al.*, 2002). Setelah satu minggu masa inkubasi, terbentuk zona bening dan perubahan warna pada medium. Tetapi setelah disubkultur pada medium yang sama, pembentukan zona bening dan warna pada media hanya membutuhkan waktu kurang dari 24 jam setelah pemberian senyawa PAH. Pada medium yang disublimasi dengan *phenanthrene* tidak terjadi perubahan warna pada medium tetapi terbentuk zona bening disekitar koloni. Sedangkan pada medium dengan sumber karbon berupa DBT terbentuk kompleks warna merah muda pada medium tetapi tidak terjadi zona bening dan terjadi pembentukan zona bening tetapi tidak terjadi perubahan warna. Adanya kompleks warna pada media membuktikan bahwa bakteri dapat menempel pada substrat parafin dan tumbuh meskipun pertumbuhannya lambat (Marino, 1998). Tidak semua strain mampu mendegradasi senyawa PAH *phenanthrene* dan DBT secara bersamaan. Berdasarkan hasil yang diperoleh hanya strain E7a yang mampu mendegradasi senyawa PAH *phenanthrene* maupun DBT.

Strain terseleksi pendegradasi *crude oil* selanjutnya akan diuji apakah mampu mendegradasi parafin dan menggunakannya sebagai sumber karbon. Ada dua perlakuan, yaitu satu diberi yeast ekstrak (medium berwarna kuning) sebagai sumber karbon lain dan satu tanpa yeast ekstrak. Pada *pre treatment* diketahui hanya bakteri strain E7d yang dapat mendegradasi parafin dengan memproduksi biosurfaktan dan emulsifikasi. Pada saat perlakuan, medium dengan yeast ekstrak, dalam waktu kurang dari satu minggu (3 hari) koloni yang terbentuk sudah banyak. Hal ini

ditandai dengan medium yang keruh. Sedangkan pada perlakuan tanpa yeast ekstrak koloni yang dibentuk masih sedikit. Tetapi setelah 5 hari koloni bakteri pada perlakuan tanpa yeast ekstrak lebih banyak bila dibandingkan dengan perlakuan dengan yeast ekstrak. Disamping itu jumlah parafin sisa pada perlakuan tanpa yeast ekstrak jauh lebih sedikit dan menjadi larut dalam medium bila dibandingkan dengan perlakuan dengan yeast ekstrak. Perbedaan lainnya adalah jumlah biosurfaktan yang dihasilkan. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri dengan yeast ekstrak lebih sedikit dan busa yang dihasilkan juga lebih sedikit. Sedangkan pada perlakuan tanpa yeast ekstrak jumlah biosurfaktan yang dihasilkan lebih banyak dengan busa yang lebih banyak pula. Hasil yang diperoleh mendukung teori yang menyatakan bahwa bakteri dapat mendegradasi parafin dengan cara membentuk sel yang berasosiasi dengan biosurfaktan (Marino, 1998).

Uji sumber nitrogen yang paling tepat untuk pertumbuhan bakteri terseleksi dalam medium dengan PAH (*phenanthrene* dan DBT) ataupun dengan parafin sebagai sumber karbon dilakukan pada saat uji pertumbuhan dalam berbagai salinitas. Sumber nitrogen yang dipilih adalah Urea, Yeast Ekstrak,  $KNO_3$  dan  $(NH_4)_2SO_4$ . Setelah satu minggu pengamatan, didapatkan hasil sumber nitrogen yang dapat mengoptimalkan pertumbuhan strain terseleksi. Uji pertumbuhan ini dilakukan pada medium air laut steril pada berbagai salinitas (2%, 5% dan 10%).

Dari semua strain yang dapat mendegradasi *Phenanthrene* yang ditumbuhkan dalam media air laut steril dengan berbagai sumber nitrogen, hanya strain E7a yang ditumbuhkan dalam air laut steril dengan  $KNO_3$ -lah yang paling optimum dapat mendegradasi *Phenanthrene*. Hal ini dibuktikan baik secara fisik, organoleptik maupun melalui reaksi kimia. Secara organoleptik tercipta bau seperti asam. Sedangkan secara kimiawi terdapat penurunan fosfat dan pH serta pembentukan nitrat. Secara fisik dapat diamati terjadi perubahan warna medium yang tadinya putih keruh menjadi bening kuning kecoklatan, terjadinya pertumbuhan koloni (diukur melalui OD yang terukur oleh biospektrofotometer) dan terbentuknya gelembung udara pada medium.

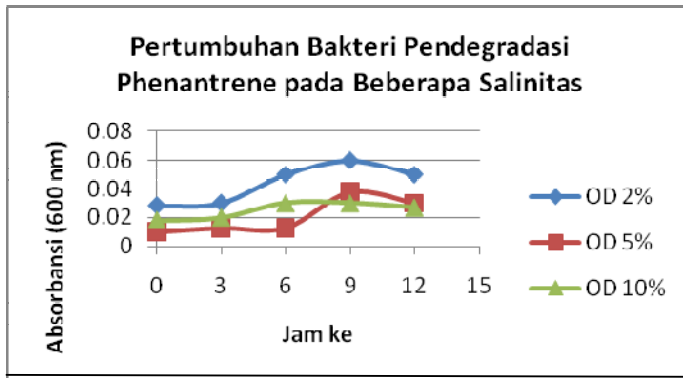
Berdasarkan kurva pertumbuhan pada berbagai salinitas (Gambar 1a), pertumbuhan bakteri paling optimum berada pada kondisi medium dengan kadar salinitas 5%. Sedangkan pertumbuhan paling rendah berada pada kondisi salinitas 10%. Berdasarkan hasil tersebut strain E7a bersifat mesofilik (tahan pada kadar garam sedang). Seperti halnya pada kondisi normal dengan sumber karbon yang mudah didegradasi (Tabel 2), berdasarkan Tabel 1, strain E7a paling cepat membelah pada salinitas 5% bila dibandingkan salinitas 2%. Hal ini menunjukkan bahwa strain E7a tidak terlalu terpengaruh dengan kondisi susah atau tidaknya sumber karbon itu dapat didegradasi, asalkan masih berada pada salinitas yang dapat ditoleransinya.

Tabel 1. Waktu Pembelahan Berbagai Bakteri dengan Berbagai Sumber Karbon dalam Berbagai Salinitas

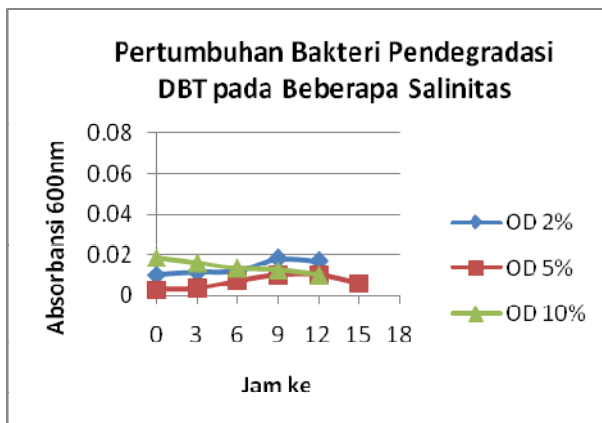
	Salinitas2% (menit)	Salinitas5% (menit)	Salinitas10% (menit)
Strain E7d	117,331	204,68	148,23
Strain E7a (Phe)	245,868	117,09	309,757
Strain E7a (DBT)	309,76	232,84	-

Tabel 2. Waktu Pembelahan Berbagai Bakteri dalam Medium MB pada Berbagai Salinitas

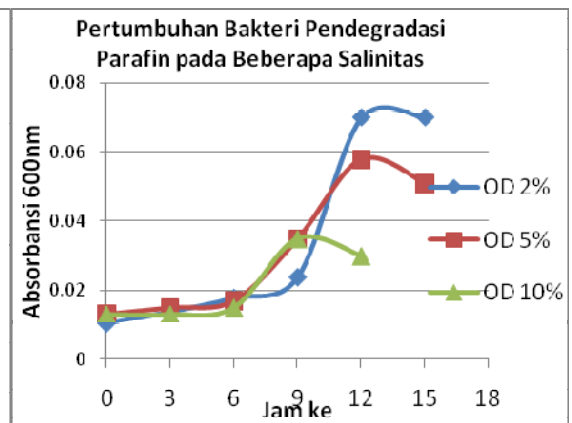
	Salinitas2% (jam)	Salinitas5% (jam)	Salinitas10% (jam)
Strain E7d	3,346	4,256	1,504
Strain E7a	4,898	4,631	6,956



(a)



(b)



(c)

Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Komponen *crude oil* pada Berbagai Salinitas dengan Sumber Karbon : (a) *Phenantrene* (strain *E7a*) OD = 1 -->  $5.835 \times 10^{10}$  koloni, (b) DBT (strain *E7a*) OD = 1 -->  $1.875 \times 10^{11}$  koloni, (c) Parafin (strain *E7d*) OD = 1 -->  $3.75625 \times 10^{12}$  koloni.

Dari semua strain yang dapat mendegradasi DBT yang ditumbuhkan dalam media air laut steril dengan berbagai sumber nitrogen, hanya strain E7a yang ditumbuhkan dalam air laut steril dengan  $\text{KNO}_3$ -lah yang paling optimum dapat mendegradasi DBT. Seperti halnya pada *phenantrene*, adanya pertumbuhan bakteri dengan sumber karbon DBT juga dibuktikan baik secara fisik, organoleptik maupun melalui reaksi kimia.

Pertumbuhan bakteri paling optimum berada pada kondisi medium dengan kadar salinitas 5%. Sedangkan pada kondisi salinitas 10% strain E7a tidak dapat tumbuh atau mengalami kematian. Seperti halnya pada kondisi normal dengan sumber karbon yang mudah didegradasi (Tabel 2), berdasarkan Tabel 1, strain E7a paling cepat membelah pada salinitas 5% bila dibandingkan salinitas 2%.

Strain yang dapat mendegradasi parafin adalah strain E7d dengan sumber nitrogen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Parameter pertumbuhan dapat dilihat dari parameter fisik, organoleptik maupun melalui reaksi kimia. Secara organoleptik tercipta bau seperti asam. Sedangkan secara kimiawi terdapat penurunan fosfat, amonium dan pH. Secara fisik dapat diamati terjadi perubahan pada parafin yang tadinya besar dan tidak larut dalam air menjadi mengecil dan larut dalam air serta terjadinya pertumbuhan koloni.

Berdasarkan kurva pertumbuhan pada berbagai salinitas (Gambar 1c), pertumbuhan bakteri paling optimum berada pada kondisi medium dengan kadar salinitas 2%. Tetapi berdasarkan waktu generasi (Tabel 1 dan 2), strain E7d paling cepat membelah pada salinitas 10%. Akan tetapi tidak bisa dikatakan strain E7d bersifat halofilik karena pada salinitas 10% strain tidak dapat bertahan hidup dalam waktu yang lama dan akan segera masuk ke dalam fase stationer (fase kematian).

Pada penelitian ini paraffin padat, paraffin, cair, phenanthrene, dan glukosa dijadikan model untuk *Microbial Surface Hydrophobicity*. Isolat uji yang digunakan adalah E7a dan E7d. Isolat E7d terbukti potensial untuk mendegradasi parafin padat dan parafin cair. Sedangkan isolat E7a potensial untuk mendegradasi *phenantrene* dan DBT.

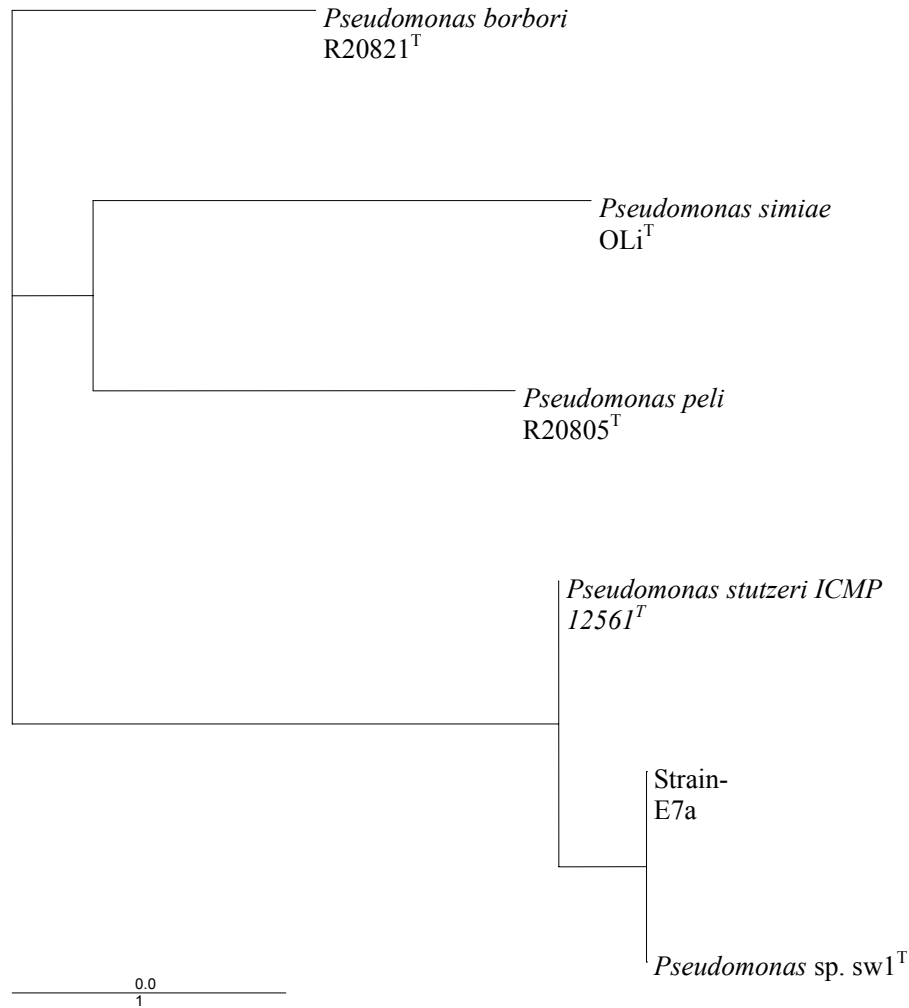
Tabel 3. Nilai MATH Bakteri Strain E7d dan Strain E7a

Macam Sumber Karbon	Strain	MATH (%)
Parafin Padat (5gr/50ml)	E7d	74.349
Parafin Cair (5gr/50ml)	E7d	74.349
Phenantrene (5gr/50ml)	E7a	32.692
Glukosa (5gr/50ml)	E7d	77.570
Glukosa (5gr/50ml)	E7a	74.632

Berdasarkan Tabel 3, strain E7d mempunyai nilai MATH yang besar terhadap parafin dan tidak berbeda jauh dengan glukosa yang dijadikan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa strain E7d merupakan bakteri potensial pendegradasi parafin karena nilai MATH yang tinggi menunjukkan daya lekat yang tinggi terhadap substrat makanan. Semakin besar daya lekatnya semakin banyak pula substrat yang dapat didegradasi. Sedangkan strain E7a walaupun dapat menggunakan *Phenantrene* sebagai sumber karbon tetapi daya lekat terhadap substrat berupa *Phenantrene* rendah yaitu hanya sekitar 32.692% bila dibandingkan dengan daya lekat terhadap glukosa yang digunakan sebagai kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa strain E7a kurang potensial dalam mendegradasi *Phenantrene* karena daya lekat terhadap substrat yang kecil. Nilai MATH untuk DBT tidak diukur karena adanya reaksi pembentukan warna pada degradasi DBT sehingga hasil yang diperoleh mempunyai bias yang tinggi jika diukur dengan spektrofotometer.

Strain E7d dan E7a mempunyai karakteristik yang bertolak belakang. Strain E7d dapat menggunakan amonium sebagai sumber nitrogen sedangkan strain E7a menggunakan KNO<sub>3</sub> sebagai sumber nitrogen dan menghasilkan nitrat atau bersifat nitrifikasi (dibuktikan dengan tes API 20). Strain E7a mempunyai sifat yang melekat erat pada substrat dan kering, sedangkan strain E7d berlendir. Kedua strain tersebut sama- sama bakteri gram negatif, dapat bergerak ke sumber karbon, dapat mendegradasi *crude oil*, sel berbentuk batang, bersifat aerob fakultatif, mempunyai tipe pertumbuhan rhizoid pada agar tegak dan filiform pada agar miring dan mempunyai bentuk koloni yang ireguler. Dari hasil identifikasi dengan API 20 NE dapat diketahui bahwa isolat E7a dapat tumbuh pada medium yang mengandung potassium nitrit, glukosa, mannitol, maltosa, glukonat, malat, sitrat, dan phenyl acetate. Sedangkan isolat E7d dapat tumbuh pada medium yang mengandung glukosa, mannitol, maltosa, glukonat, malat, sitrat, dan phenyl acetate.

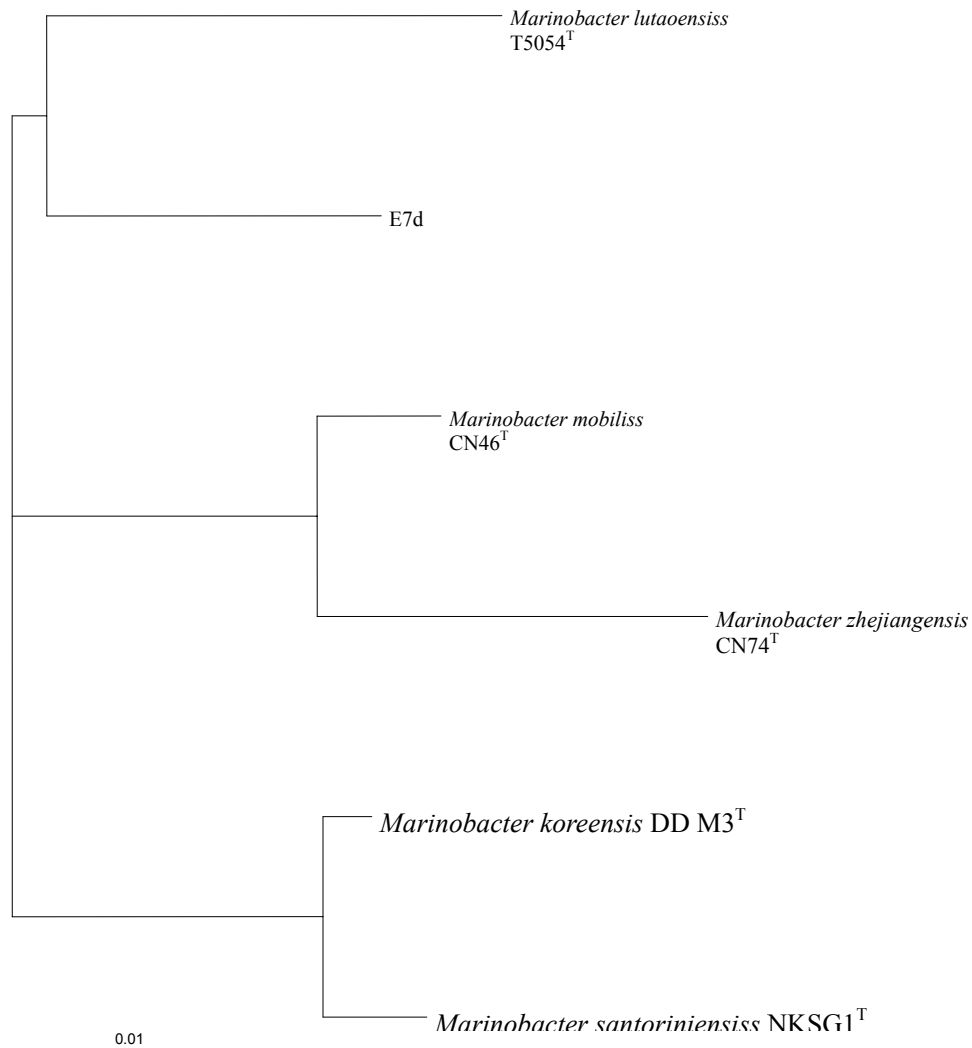
Berdasarkan hasil API 20 NE dan hasil sekuensing, dapat diketahui bahwa setelah dibandingkan dengan data sekuensing 16 S rRNA dari berbagai macam genus bakteri yang ada di bank DNA DDBJ di Jepang, isolat E7a secara genomik masuk ke dalam genus *Pseudomonas*. Spesies anggota *Pseudomonas* yang digunakan sebagai acuan adalah anggota *Pseudomonas* yang merupakan Type Strain atau strain pertama yang diberi nama. Hasilnya secara molekular isolat E7a paling dekat hubungan kekerabatannya dengan *Pseudomonas* sp. sw1 (nilai similaritas 100% dan tidak ada nukleotida yang berbeda) serta dengan *Pseudomonas stutzeri* ICMP 12561<sup>T</sup> (nilai similaritas 99,93% dan 1 nukleotida yang berbeda). Hubungan kekerabatan strain E7a dengan beberapa spesies anggota genus *Pseudomonas* disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pohon Filogeni yang Dibuat Berdasarkan Algoritme Neighbour-Joining yang Menunjukkan Hubungan antara Strain Acuan dengan Strain E7a atas dasar sekuen 16S rRNA

Isolat E7d setelah dibandingkan dengan hasil API 20 NE dan data sekuensing 16 S rRNA dari berbagai macam genus bakteri yang ada di bank DNA DDBJ di Jepang paling dekat hubungan kekerabatannya dengan dengan spesies anggota genus *Marinobacter*. Secara molekular isolat E7d paling dekat hubungan kekerabatannya dengan *Marinobacter lutaoensis* strain T5054<sup>T</sup> dengan nilai similaritas 96,73% tetapi berdasarkan perbedaan nukleotida isolat E7d paling dekat dengan *Marinobacter santoriniensis* NKSG1<sup>T</sup>. Hubungan kekerabatan strain E7d dengan beberapa spesies anggota genus *Marinobacter* disajikan pada Gambar 3.





Gambar 3. Pohon Filogeni yang Dibuak Berdasarkan Algoritme Neighbour-Joinning yang Menunjukkan Hubungan antara Strain Acuan dengan Strain E7d atas dasar sekuen 16S rRNA

### KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan disimpulkan bahwa tidak ditemukan bakteri dari pantai laut Sorong yang dapat mendegradasi phenantrene, DBT dan parafin sekaligus. Dalam skala laboratorium strain E7a dapat mendegradasi senyawa PAH dengan  $KNO_3$  sebagai sumber nitrogen sedangkan strain E7d dapat mendegradasi parafin dengan sumber nitrogen ammonium sulfat. Bakteri yang dapat mendegradasi *crude oil*, PAH serta parafin berasal dari kelas gamaproteobacteria. Secara molekular menggunakan 16S rDNA Strain E7a paling dekat kekerabatannya dengan *Pseudomonas* sp. Sw1 sedangkan strain E7d dekat dengan *Marinobacter santoriniensis* NKSG1<sup>T</sup>.

Penelitian ini merupakan penelitian awal oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kemampuan bakteri dalam mendegradasi komponen *crude oil* pada skala lapangan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Coral, G. and Karagoz, S. 2005. *Isolation and Characterization of Phenanthrene-Degrading Bacteria from a Petroleum Refinery Soil*. *Annals of Microbiology* 55(4) : 255-259
- Fatimah. 2007. *Uji Produksi Biosurfaktan oleh Pseudomonas sp. pada Substrat yang Berbeda*. *Berkala Penelitian*. Hayati: 12 (181–185).
- Francy DS, Thomas JM, Raymond RL and Ward CH. 1991. Emulsification of Hydrocarbons by Surface Bacteria. *J ind Microbiol* 8: 234–246
- Hughes, J. B. V. Jee, and C. H. Ward. 2002. *Bioremediation of Contaminated Sediments*. Department of Environmental Science and Engineering. Rice University. Houston.
- Kaczorek, L., Chrzanowski, A. Pijanowska, A. Olszanowski. 2007. *Yeast and Bacteria Cell Hydrophobicity and Hydrocarbon Biodegradation in the Presence of Natural Surfactants: Rhamnolipides and Saponins*. Institute of Chemical Technology and Engineering, Poznan University of Technology, Pl. M. Skłodowskiej-Curie 2, 60-965 Poznan. Poland
- Koch AK, Kappeli O, Fiechter A and Reiser J, 1991. *Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in Pseudomonas aeruginosa Mutans*. *J bacterial* 173(13), United State of America.
- Mandri, T. and Lin, J. 2007. *Isolation and Characterization of Engine Oil Degrading Indigenous Microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6(1), pp. 023-027.4 Januari.
- Mangkoedihardjo, A. 2005. *Seleksi Teknologi Pemulihan untuk Ekosistem Laut Tercemar Minyak*. Seminar Nasional Teori dan Aplikasi Teknologi Kelautan ITS Surabaya, 24 November.
- Marino, F. 1998. *Biodegradation of Paraffin Wax*. Department of Chemical Engineering. McGill University, Montréal
- Richana N, Helena YM, Ani S, Tun Tedja I. 1998. *Produksi Biosurfaktan Lipopeptida oleh Isolat Bakteri Indigenous*. *Prosiding Seminar Pertemuan Ilmiah Tahunan: Peranan Mikrobiologi Dalam Agroindustri Untuk Menunjang Ketahanan Pangan Nasional*: 191–198.
- Rini and Sudiana, I. 2007. *Bakteri Pendegradasi Crude Oil dari Perairan Raja Ampat*. Jakarta.
- Sudrajad, A. 2006. *Tumpahan Minyak di Laut dan Beberapa Catatan Terhadap Kasus di Indonesia*. *Inovasi* Vol.6/XVIII/Maret.
- Willumsen PA, and Karlson U. 1997. Screening of Bacteria, Isolated from PAH Contaminated Soils, for Production of Biosurfactans dan Bioemulsifiers. *Biodegradation* 77: 4155–423