

Keragaman Bakteri Laut Pendegradasi Alkana dan Poliaromatik Hidrokarbon di Pulau Pari Jakarta (Diversity of Alkane and Polyaromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria in Pari Island Jakarta)

Ahmad Thontowi & Yopi

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Cibinong Science Center, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong, Borgor 16911

Email: athontowi@yahoo.com, yopi001@lipi.go.id

Memasukkan: Februari 2013 **Diterima:** April 2013

ABSTRACT

Oil spills are one of the main causes of pollution in marine environments. Oil degrading bacteria play an important role for bioremediation. The sixty-six bacteria from Pari Island, Thousand Islands, Jakarta sea water were isolated, analyzed based on partial sequence 16S rDNA gene and oil degradation ability. Based on 16S rDNA gene analysis, we obtained five classes of oil degrading bacteria, namely α -proteobacteria (43.6 %), γ -proteobacteria (48.5 %), *Flavobacteria* (4.5 %), *Actinobacteria* (1.5 %), and *Bacillales* (1.5%). These bacteria have the ability to degrade oil components (alkane and several types of polyaromatic hydrocarbon compounds). γ -Proteobacteria and α -proteobacteria seem to play an important role in the oil-bioremediation at Pari Island marine environment. This result showed that oil degrading bacteria from Pari Island sea water very diverse.

Keywords: oil, marine, bacteria, bioremediation, alkane, polyaromatic hydrocarbon

ABSTRAK

Minyak mentah merupakan salah satu sumber pencemaran di lingkungan laut. Degradasi oleh bakteri memegang peranan penting dalam bioremediasinya. Sejumlah 66 bakteri laut dari Pulau Pari, Kepulauan Seribu Jakarta telah diisolasi, dianalisa berdasarkan gen 16S rDNA, dan diuji kemampuannya dalam mendegradasi minyak. Berdasarkan analisis gen 16S rDNA diperoleh lima kelompok bakteri pendegradasi minyak, yaitu α -proteobakteria (43.6 %), γ -proteobakteria (48.5 %), Flavobakteria (4.5 %), Aktinobakteria (1,5 %), dan Bacillales (1,5%). Bakteri-bakteri tersebut mampu mendegradasi komponen minyak (senyawa alkana dan poliaromatik hidrokarbon). γ -Proteobakteria dan α -proteobakteria mempunyai peran penting dalam bioremediasi minyak di kawasan lingkungan laut di Pulau Pari. Dari hasil tersebut membuktikan bahwa bakteri pendegradasi minyak dari Pulau Pari sangat beragam.

Kata kunci: minyak, laut, bakteri, bioremediasi, alkana, poliaromatik hidrokarbon

PENDAHULUAN

Minyak mentah terdiri atas senyawa hidrokarbon rantai jenuh (alkana), aromatik, resin, dan aspalan (Harayama *et al.* 1999). Hidrokarbon rantai jenuh tidak mempunyai rantai ganda. Hidrokarbon jenis ini dikelompokkan berdasarkan struktur kimianya menjadi n-alkana (parafin), isoalkana dan sikloalkana (naften). Dari beberapa senyawa tersebut n-alkana

alifatik merupakan kelompok hidrokarbon terbesar yang ada di minyak mentah maupun hasil penyulingan, yaitu berkisar antara 20-50% (Head *et al.* 2006). Senyawa poliaromatik hidrokarbon (PAH) tersusun atas dua atau lebih cincin aromatik. Walaupun kandungan PAH di minyak mentah (sekitar 25%) lebih kecil dibanding alkana, namun senyawa ini memiliki tingkat toksisitas yang tinggi (Van Hamme *et al.* 2003). Dengan demikian kedua senyawa ini

merupakan komponen penting dari minyak yang mempunyai efek negatif bagi lingkungan.

Hidrokarbon minyak adalah polutan utama pada lingkungan laut sebagai akibat dari limbah kilang minyak, produksi minyak lepas pantai, aktivitas pelayaran, dan tumpahan minyak akibat kecelakaan tanker. Mikroflora laut dan bakteri dilaporkan mampu melakukan degradasi atau pemanfaatan senyawa yang ada di dalam minyak (Head *et al.* 2006).

Mikroba yang mempunyai kemampuan mendegradasi minyak telah berhasil diisolasi (Okazaki *et al.* 2006), serta mekanisme degradasinya telah dipelajari secara intensif (Harayama *et al.* 2004). Beberapa bakteri yang dapat mendegradasi hidrokarbon adalah dari jenis *Alcanivorax* (Yakimov *et al.* 1998), *Cycloclasticus* (Dyksterhouse *et al.* 1995), *Marinobacter* (Gauthier *et al.* 1992), *Neptumonas* (Hedlund *et al.* 1999), *Oleiphilus* (Golyshin *et al.* 2002) dan *Oleispira* (Yakimov *et al.* 2004) yang termasuk ke dalam γ -proteobacteria, serta dari genus *Planococcus*, yang merupakan bakteri gram positif (Engelhardt *et al.* 2001). Akan tetapi, mikroba tersebut diisolasi dari daerah subtropis, dengan keadaan geografis dan suhu yang berbeda, sedangkan informasi mengenai mikroba pendegradasi minyak dari perairan daerah tropis masih terbatas. Selain itu, dengan wilayah laut Indonesia yang mencapai 2/3 luas negara, kegiatan pengungkapan biodiversitas mikroba laut pendegradasi minyak menjadi sangat penting.

Biostimulasi merupakan cara remediasi dengan pemberian nutrisi tertentu untuk merangsang aktivitas mikroba asli daerah tercemar dalam mendegradasi polutan. Teknik ini memiliki efisiensi tinggi dan ramah lingkungan. Penerapan teknik biostimulasi membutuhkan informasi jenis serta aktivitas mikroba asli daerah tercemar untuk mendegradasi cemaran (Harayama *et al.* 2004). Perairan Pulau

Pari, Kepulauan Seribu, Jakarta dijadikan sebagai model penerapan bioremediasi minyak dengan teknik biostimulasi. Isolasi mikroba dilakukan dari contoh air laut Pulau Pari yang ditambahkan minyak serta beberapa mineral. Penambahan minyak serta mineral diharapkan mendorong pertumbuhan mikroba asli yang ada di perairan laut dengan hanya memanfaatkannya sebagai sumber C dan N.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman bakteri laut pendegradasi minyak dari Pulau Pari, Kepulauan Seribu, Jakarta. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat disusun bank data bakteri laut yang berkemampuan mendegradasi minyak serta bakteri unggulan yang dapat digunakan sebagai landasan untuk pengembangan teknologi bioremediasi hidrokarbon minyak di lepas pantai.

BAHAN DAN CARA KERJA

Contoh air laut dari perairan Pulau Pari, Kepulauan Seribu, Jakarta (Gambar 1) langsung diinokulasikan ke dalam media ONR7 (Dyksterhouse *et al.* 1995) padat yang mengandung minyak mentah dalam kondisi aseptis. Dalam 1 L ONR7 terkandung 22.79 g NaCl, 11.18 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 3.98 g Na_2SO_4 , 1.46 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.3 g 3-[*N*-tris(hidroksimetil)metilamino]-2-hidroksiopropanesulfonic acid (TAPSO), 0.72 g KCl, 0.27 g NH_4Cl , 89 mg $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 83 mg NaBr, 31 mg $NaHCO_3$, 27 mg H_3BO_3 , 24 mg $SrCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.6 mg NaF, dan 2.0 mg $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, serta ditambahkan 15 gram agar. Sebanyak 1 ml minyak mentah disebar merata di permukaan media ONR7 padat. Setelah diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang, koloni yang tumbuh dan menghasilkan zona bening di sekitarnya diduga merupakan bakteri pendegradasi minyak.

Ekstraksi DNA bakteri dengan

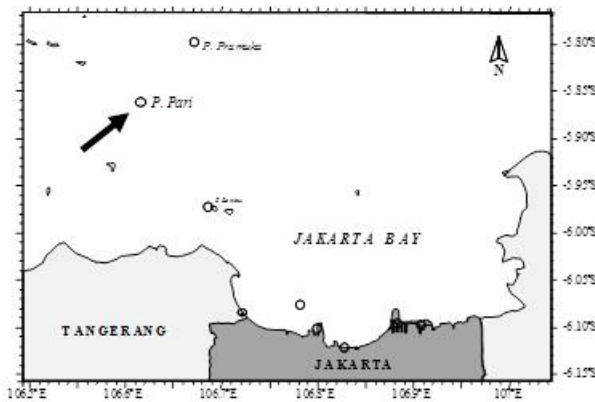
menggunakan InstaGen (BioRad). Identifikasi bakteri dilakukan secara molekuler, dengan menganalisis sebagian gen 16S rDNAnya. Gen 16S rDNA diamplifikasi dengan menggunakan primer 9F (5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTAYGACTT-3') (Burggraf *et al.* 1992). Adapun kondisi reaksi PCR ialah 95 °C, 2 menit (1 siklus); 95 °C, 30 detik, 65 °C, 1 menit, 72 °C, 2 menit (10 siklus); 95 °C, 30 detik, 55 °C, 1 menit, 72 °C, 2 menit (30 siklus); serta 72 °C, 2 menit (1 siklus).

Pemurnian DNA sebagai persiapan sekuensing dilakukan dengan menggunakan kit dari *AGENCOURT CLEANSEQ Dye-Terminator Removal* (Beckman Coulter-USA). Sekuen gen 16SrDNA dilakukan dengan DNA sekuen Pharmacia tipe ABI 310. Analisis penjajaran urutan nukleotida parsial gen

pengkode 16S rDNA menggunakan program BLAST (Altschul *et al.* 1997). Proses penyejajaran sekuen dengan menggunakan program ClustalX (Higgins dan Sharp *et al.* 1988), sedangkan analisis filogenetik menggunakan program NJ Plot serta Mega 3.1 *ABI sequencer software* (Kumar *et al.* 2004).

Isolat bakteri pendegradasi minyak yang telah murni ditumbuhkan dalam media ONR7 cair yang mengandung alkana. Inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C selama 9 hari. Senyawa alkana yang digunakan ialah parafin (C_nH_{2n+2})-merupakan senyawa alkana rantai lurus, dan pristan (2,6,10,14-Tetrametilpentadekan)-merupakan senyawa alkana berantai cabang, masing-masing dengan konsentrasi 2000 ppm. Sebagai kontrol ialah media ONR7 ditambahkan senyawa alkana yang tidak ditambahkan bakteri, serta media ONR7 tanpa senyawa alkana dan ditambahkan bakteri. Pertumbuhan diamati berdasarkan kekeruhannya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Isolat bakteri diinkubasi selama 2-4 minggu dengan menggunakan metode sublimasi (Alley & Brown, 2000) pada media ONR7 padat ditambah senyawa poliaromatik hidrokarbon (PAH), yaitu fenantren, dibenzotiofen, fluoren, fluoranten, dan fenotiazin. Suhu dan waktu sublimasi ditampilkan pada Tabel 1. Sebagai kontrol ialah media ONR7 yang telah diinokulasi bakteri, tetapi tidak dilakukan sublimasi. Bakteri yang tumbuh dan menghasilkan zona bening diduga merupakan bakteri pendegradasi PAH.



Gambar 1. Lokasi Pengambilan Sampel di Pulau Pari, Jakarta

Tabel 1. Kondisi Sublimasi Senyawa PAH

Senyawa PAH	Titik Leleh (°C)	Waktu (menit)
Fenantren	100	5
Dibenzotiofen	100	3
Fluoren	115	3
Fenotiazin	130	30
Fluoranten	130	30
Piren	130	30

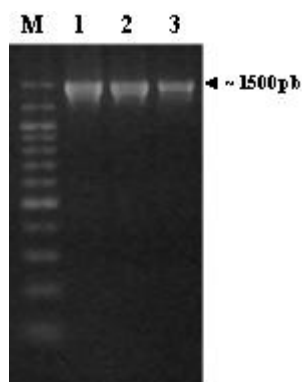
HASIL

Isolasi Bakteri Pendegradasi Minyak

Hasil isolasi bakteri laut yang mempunyai kemampuan mendegradasi minyak mentah telah

diperoleh 66 isolat murni dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Isolat-isolat ini diduga mampu mendegradasi minyak. Selanjutnya, sebanyak 66 isolat bakteri dianalisis sebagian gen 16S rDNA dan karakternya dalam mendegradasi komponen minyak (alkana dan PAH).

Hasil amplifikasi PCR sebagian gen 16S rDNA dari seluruh isolat bakteri menghasilkan pita berukuran sekitar 1500 pb (Gambar 2). Pita inilah yang selanjutnya dimurnikan sebelum sekuensing. Analisa DNA gen 16S rDNA menggunakan program Bioedit. Data hasil sekuen sebagian gen 16S rDNA bakteri dari Pulau Pari dibandingkan dengan seluruh data yang ada di bank data menggunakan program BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Hasil analisis homologi sebagian gen 16S rDNA dari seluruh isolat, diperoleh lima kelas bakteri pendegradasi minyak dari Pulau Pari, yaitu α -proteobakteri (43.6%), γ -proteobakteria (48.5%), flavobakteria (4.5%), aktinobakteria (1.5%), serta bacillales (1.5%) (Tabel 2). Berdasarkan genus, dari Pulau Pari telah teridentifikasi 17 jenis bakteri. Genus *Alcanivorax* mendominasi bakteri di lingkungan Pulau Pari. Beberapa isolat bakteri dari Pulau Pari mempunyai perbedaan lebih dari 3% atau nilai keidentikan kurang dari 97% dengan isolat yang ada di bank gen, yaitu isolat 6 dan 17 masing-



Gambar 2. Visualisasi hasil elektroforesis gen 16S rDNA hasil amplifikasi PCR. M: marker DNA; 1, 2 dan 3 adalah pita gen 16S rDNA beberapa isolat

masing identik dengan *Nocardioides alkalitolerans* KSL-12 dan *Novosphongobium indicum* H25 (Tabel 2).

Karakter Bakteri Pendegradasi Minyak dari Pulau Pari

Dari hasil uji pertumbuhan bakteri pada senyawa alkana dan PAH menunjukkan bahwa bakteri dari Pulau Pari terbagi menjadi dua golongan berdasarkan kemampuannya mendegradasi komponen minyak. Pertama, bakteri yang hanya mampu tumbuh di senyawa PAH, seperti genus *Muricauda*, *Erythrobacter*, *Chromohalobacter*, *Idiomarina*, *Haererehalobacter*, *Marinobacter*, *Halomonas*, *Bacillus*, dan *Rhodospirillaceae*. Kedua, bakteri yang mampu tumbuh pada senyawa alkana dan PAH, seperti *Alcanivorax*, *Stappia*, *Novosphingobium*, *Pseudoalteromonas*, *Thalassospira*, *Nocardioides*, *Sphingopyxis* dan *Acinobacter*. Karakter 66 bakteri Pulau Pari dalam mendegradasi komponen minyak ditampilkan pada Tabel 3.

PEMBAHASAN

Keragaman Bakteri Pendegradasi Minyak dari Pulau Pari

Salah satu metode identifikasi mikroba ialah secara molekuler dengan menganalisis sebagian gen 16S rDNA bakteri. Saat ini, bagian dari DNA yang sering digunakan untuk tujuan taksonomi pada bakteri ialah gen 16S rDNA (Bottger 1989). Gen ini memiliki sifat unik pada sistem sintesa protein, berfungsi secara stabil, terdistribusi secara luas di sel, serta tersimpan secara baik pada jarak filogeni yang luas, ketersediaan data lengkap di bank gen dan mudah dilakukan amplifikasi dengan PCR (Pace 1997).

Dari hasil analisis sekuen sebagian gen 16S rDNA menunjukkan bahwa kelas γ -proteobakteria dan α -proteobakteria mendominasi bakteri yang ada di Pulau Pari. Komposisi ini

Tabel 2. Pengelompokan bakteri pendegradasi minyak di Pulau Pari hasil identifikasi gen 16S rDNA

Kode Isolat	Keidentikan Sebagian Gen 16S rDNA Berdasarkan BLAST	Kisaran Keidentikan Sekuen (%)	Jumlah	Frekuensi Relatif (%)
4,14,15 9,18,19,20,21,22,25,29,31,32, 38,43,45,46,48,49,51,52,56 10 30 37,63 47,5 34,60,61 12	Kelas -proteobakteria <i>Pseudoalteromonas</i> sp. <i>Alcanivoraxdieselolei</i> <i>Chromohalobacter</i> sp. <i>Idiomarinafontislapidosi</i> <i>Haererehalobacterostenderis</i> <i>Marinobacteraquaeolei</i> <i>Halomonasp.</i> <i>Acinetobactervenetianus</i>	99-100 98-100 100 99 98 97-99 99 98	3 19 1 1 2 2 3 1	4.5 28.8 1.5 1.5 3.0 3.0 4.5 1.5
			32	48.5
1,23,24 2,3,16,17,27,28,33,35,36,39,4 0,41,42 5,11,53,57,58,59 8,54,55 64,65,66 44	Kelas -proteobakteria <i>Stappiaaggregata</i> <i>Novosphingobium</i> sp. <i>Thalassospira</i> sp. <i>Erythrobacter vulgaris</i> <i>Rhodospirillaceae bacterium</i> <i>Sphingopyxis</i> sp.	100 95 99 97-100 99 99	3 13 6 3 3 1	4.5 19.7 9.1 4.5 4.5 1.5
			29	43.9
6 7,13 26 62	KelasAktinobakteria <i>Nocardioidesalkalitolerans</i> KelasFlavobakteria <i>Muricaudaaquimarina</i> <i>Muricaudaflavescens</i> KelasBacillales <i>Bacillus pumilus</i>	96 99 99 99	1 2 1 1	1.5 3.0 1.5 1.5
Jumlah			66	100

tidak berbeda dengan komposisi bakteri laut di Laut Utara dan Road Bay, Antartica (Harayama *et al.* 1999; Yakimov *et al.* 2004). Selain dua kelas tersebut, juga terdapat famili Aktinobakteria, Bacillales, dan Flavobakteria. Kelas g-proteobakteria juga mendominasi bakteri pendegradasi minyak di Muara Kamal, Jakarta (Yopi *et al.* 2006). Hasil yang berbeda dilaporkan dari keragaman bakteri pendegradasi minyak di perairan laut Semarang, Jawa Tengah. Harwati *et al.* (2007) melaporkan bahwa kelas α -proteobakteria justru lebih banyak terisolasi dari daerah ini. Hasil ini menunjukkan beragamnya bakteri pendegradasi minyak di daerah perairan Indonesia, sehingga menarik untuk

dilakukan eksplorasi lebih jauh. Sementara itu, kelas Aktinomisetes mendominasi serta memegang kunci bioremediasi senyawa alkana di Laut Mediterania (Quatrini *et al.* 2007). Keragaman bakteri pendegradasi minyak di beberapa lokasi yang berbeda ini diduga terjadi karena perbedaan lokasi serta kondisi lingkungan (O_2 , elektron penerima, suhu, potensial redok, salinitas, dan pH) (Harayama *et al.* 1999). Dari Tabel 2 terlihat bahwa masing-masing isolat contoh memiliki prosentase keidentikan dengan bakteri lain yang ada di bank gen. Hal yang menarik dari isolat Pulau Pari ialah terisolasinya bakteri dari genus *Novosphingobium* dan *Nocardiodies* yang masing-

Tabel3. Pertumbuhan bakteri hasil isolasi dari Pulau Pari pada media ONR7 yang diberi senyawa alkana dan PAH

Nomor isolat	Pertumbuhan di senyawa Alkana			Aktivitasdegradasi di senyawa PAH				
	Parafin	Pristan	Fenantren	Dibenzotiofen	Fluoren	Fenotiazin	Piren	Fluoraenten
1	+	-	-	-	+	-	-	-
2	+	-	+	+	+	-	-	-
3	+	-	+	+	+	-	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-	-
5	+	-	-	-	-	+	+	-
6	+	-	-	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	+	-
9	+	+	++	++	++	+	+	+
10	-	-	-	-	+	-	-	-
11	+	-	-	-	-	+	+	-
12	+	-	+	-	-	-	-	-
13	-	-	+	-	-	+	-	-
14	+	-	+	-	-	+	-	-
15	+	-	+	+	+	-	-	-
16	+	-	+	+	+	-	-	-
17	+	-	+	+	+	-	-	-
18	+	-	+	-	-	-	-	-
19	+	-	+	-	-	-	-	-
20	+	-	+	-	-	-	-	-
21	+	-	+	-	-	-	-	-
22	+	-	+	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	+	-	-	-
24	+	-	-	-	+	-	-	-
25	+	-	+	-	-	-	-	-
26	-	-	-	+	-	-	-	-
27	+	-	+	+	+	+	-	-
28	+	-	+	+	+	+	-	-
29	+	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	+	-	-	-	-
31	++	+	+	+	+	+	+	++
32	+	-	+	-	-	-	-	-
33	+	-	+	+	+	+	-	+
34	-	-	+	-	-	-	-	-
35	+	-	+	+	+	+	-	+
36	+	-	+	+	+	+	-	+
37	-	-	+	+	-	-	-	-
38	+	-	+	-	-	-	-	-
39	+	-	+	+	-	+	-	+
40	+	-	+	+	-	+	-	+
41	+	-	+	+	-	+	-	+
42	+	-	+	+	+	+	-	+
43	+	-	-	-	-	-	-	-
44	+	-	+	+	-	-	-	-
45	+	+	+	+++	+	++	+	+++
46	+	-	+	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	+	+	-	-
48	+	-	+	-	-	-	-	-
49	+	-	+	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	+	+	-	-
51	+	-	+	-	-	-	-	-
52	+	-	+	-	-	-	-	-
53	+	-	-	-	-	-	+	-
54	-	-	-	-	-	+	-	-
55	-	-	-	-	-	+	+	-
56	+	-	-	-	-	-	-	-
57	+	-	-	-	-	-	+	-
58	+	-	-	-	-	+	+	-
59	-	-	-	-	-	-	+	-
60	-	-	+	-	-	-	-	-
61	-	-	+	-	-	-	-	-
62	-	-	+	-	-	+	-	-
63	-	-	+	+	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	+	-	-
65	-	-	-	-	-	+	-	-
66	-	-	-	-	-	+	-	-

masing memiliki keidentikan kurang dari 97% dibandingkan sekuen pembandingnya. Isolat nomor 17 mempunyai keidentikan 95% dengan *Novosphingobium indicum* H25 (Yuan *et al.* 2009). Adapun isolat 6 nilai keidentikannya 96% dengan *Nocardioides alkalitolerans* KSL-12m (Yoon *et al.* 2005). Isolat-isolat ini diduga merupakan spesies baru. Namun, dugaan ini haruslah diuji kebenarannya dengan menggunakan beberapa metode identifikasi bakteri lainnya, seperti secara morfologi dan biokimia. Dalam penelitian ini tidak dilakukan uji-uji tersebut. Identifikasi bakteri hanya dilakukan secara molekuler dengan menganalisis sebagian gen 16SrDNA.

Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa pada kelas γ -proteobacteria terdapat beberapa genus bakteri. Dari 32 isolat kelas γ -proteobacteria didominasi oleh ordo Oceanospirillales dan Pseudomonales, masing-masing 28.8 dan 4.5%. Adapun pada kelas α -proteobacteria didominasi oleh genus *Novosphingobium* sebesar 19.7%. Kedua ordo tersebut diketahui mempunyai kemampuan dalam proses degradasi minyak di lingkungan (Yakimov *et al.* 2004). Dari pustaka yang ada, sejak tahun 1998 laporan tentang terisolasinya *Alcanivorax* sp. dari berbagai lingkungan laut di dunia terus meningkat (Yakimov *et al.* 2004). Bakteri ini merupakan mikroba kosmopolitan. Selain itu, *Alcanivorax* sp. merupakan bakteri laut yang mampu memanfaatkan minyak sebagai sumber karbon dan energi. Genus *Alcanivorax* ini telah diketahui berpotensi untuk memproduksi biosurfaktan serta biokatalis yang ramah lingkungan dalam proses industri (Golyshin *et al.* 2002). Produksi biosurfaktan oleh bakteri pendegradasi minyak ini berfungsi untuk meningkatkan kecepatan biodegradasi minyak. 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; Ron & Rosenberg 2002). Selain genus-genus tersebut, genus *Pseudomonas* telah dikenal sejak lama mampu mendegradasi alkana rantai pendek (C_6 - C_{12}), yaitu *Ps. oleovorans* (van Beilen *et al.* 1994) dan *Ps. maltophilia* (Lee *et al.* 1996).

Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa pada kondisi serta waktu yang berbeda, bakteri-bakteri gram negatif dari kelas proteobacteria (diantaranya *Pseudomonas* dan *Alcanivorax*) cenderung dominan di daerah yang tercemar minyak (MacNaughton *et al.* 1999) dan di lingkungan terkontaminasi minyak setelah perlakuan biostimulasi. Adapun golongan bakteri gram positif dapat dideteksi keberadaannya, namun tidak pernah dominan (Kaplan & Kitts 2004).

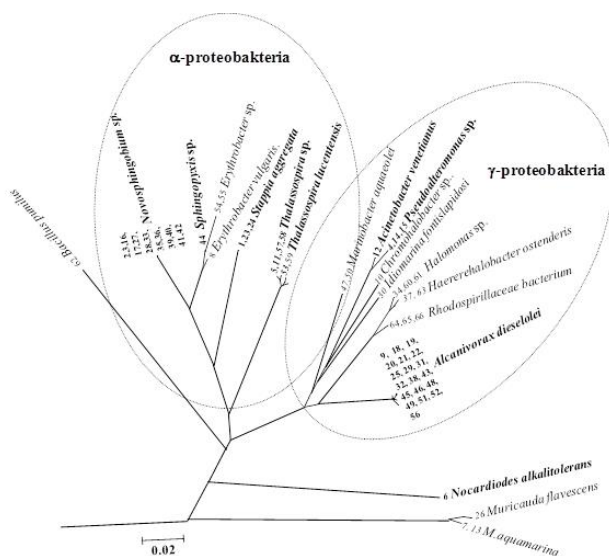
Dengan teridentifikasinya jenis-jenis bakteri di Pulau Pari yang mempunyai kemampuan mendegradasi minyak menunjukkan bahwa di lingkungan Pulau Pari diduga telah terjadi proses biodegradasi minyak secara alami. Namun, pencegahan pencemaran terbaik ialah dengan pembatasan buangan limbah secara langsung ke lingkungan, serta dilakukan proses bioremediasi dengan menggunakan isolat unggulan untuk mengatasi daerah tercemar minyak bumi.

Biodegradasi Alkana dan Poliaromatik Hidrokarbon (PAH)

Karakter kemampuan masing-masing isolat bakteri diketahui dengan menguji pertumbuhannya pada media ONR7 yang mengandung senyawa alkana dan PAH. Senyawa alkana yang digunakan untuk menyeleksi bakteri ialah parafin dan pristan. Parafin mewakili senyawa alkana yang mempunyai rantai lurus. Senyawa ini mempunyai kisaran panjang rantai C_{10} - C_{40} . Dengan

demikian diharapkan akan lebih mudah menapis berbagai bakteri dengan kemampuan degradasi alkana (Holst *et al.* 2006). Adapun senyawa pristan yang digunakan mewakili senyawa alkana yang mempunyai rantai cabang.

Beberapa genus menunjukkan kemampuannya dalam mendegradasi senyawa alkana dan PAH, yaitu *Alcanivorax*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*, *Stappia*, *Thalassospira*, *Pseudoalteromonas*, dan *Nocardioides* (Gambar 2). Selain itu, diketahui bahwa isolat nomor 9, 31, dan 45 (teridentifikasi sebagai genus *Alcanivorax*) mampu mendegradasi senyawa alkana dan PAH. Ketiga isolat ini mempunyai pertumbuhan sel lebih tinggi pada senyawa parafin dan pristan bila dibandingkan isolat lainnya. Bahkan saat ditumbuhkan di PAH, sublimasi ketiganya memberikan respon positif dengan terbentuknya zona bening. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga isolat juga merupakan pendegradasi PAH. Dengan kemampuannya tersebut, diduga isolat-isolat terse-



Gambar 2. Pohon filogenetik bakteri pendegradasi minyak dari Pulau Pari, Jakarta berdasarkan analisis sebagian gen 16S rDNA. Huruf bercetak tebal menunjukkan bakteri pendegradasi alkana dan PAH, sedangkan huruf bercetak normal sebagai bakteri pendegradasi PAH. Angka di depan nama bakteri merupakan nomor isolat.

but mempunyai enzim alkana monooksigenase yang berperan dalam degradasi alkana, serta dioksigenase untuk degradasi PAH.

Berbagai jenis bakteri pendegradasi minyak berada di lingkungan laut. Mereka seringkali terisolasi sebagai bakteri pendegradasi alkana ataupun beberapa senyawa hidrokarbon aromatik, seperti toluene, naftalen, dan fenantren (Riffiani 2010). Beberapa bakteri ini tergolong jenis baru, seperti genus *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptumonas*, *Oleiphilus* dan *Oleispira*. Bakteri-bakteri tersebut, kecuali *Marinobacter* dan *Neptumonas* mampu menggunakan sumber karbon minimum (*professional hydrocarbonoclastic bacteria*) (Harayama *et al.* 2004). Sebagai contoh, strain *Alcanivorax* tumbuh pada senyawa n-alkana dan alkana rantai bercabang, tetapi tidak mampu menggunakan gula atau asam amino sebagai sumber karbon. Serupa dengan *Alcanivorax*, strain *Cycloclasticus* mampu tumbuh pada senyawa hidrokarbon aromatik, seperti naftalen, fenantren dan antrasen, sedangkan *Oleiphilus* dan *Oleispira* tumbuh dalam senyawa hidrokarbon alifatik alkanol dan alkanoat.

KESIMPULAN

Bakteri dari kelas a-proteobacteria, g-proteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria dan Bacillales berhasil diisolasi dari perairan Pulau Pari, Jakarta. Dari kelima kelas tersebut, kelas g-proteobacteria dan a-proteobacteria mendominasi dan berperan penting dalam bioremediasi minyak, terutama dalam degradasi senyawa PAH dan alkana di perairan Pulau Pari, Jakarta.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Puslit Bioteknologi LIPI dan *National Institute Technology and Evaluation* (NITE) Jepang atas

kesempatan dan fasilitas untuk dapat melakukan penelitian ini. Ucapan terimakasih juga kami tujukan pada tehnisi di Pulit Bioteknologi-LIPI yang membantu penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Alley, JF., & LR. Brown. 2000. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:439-442.
- Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, & DJ. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25: 3389-3402.
- Bottger, EC. 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* 65:171-176.
- Burggraf, S., GJ. Olsen, KO. Stetter, & CR. Woese. 1992. A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. *Syst Appl Microbiol.* 15:352-356.
- Dyksterhouse, SE., JP. Gray, RP. Herwig, JC. Lara, & JT. Staley. 1995. *Cycloclasticus putigen*. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:116-123.
- Engelhardt, MA., K. Daly, RP. Swannell, & IM. Head. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, gram positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *J. Appl. Microbiol.* 90:237-247.
- Gauthier, MJ., BR. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin, & JC. Bertrand. 1992. *Marinobacter hydrocarbon clasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:568-576.
- Golyshin, PN. Chernikova, TN., Abraham, WR., Lünsdorf, H., Timmis, KN., & Yakimov, MM. 2002. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligatorily utilizes hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:901-911.
- Harayama, S., Y. Kasai, & A. Hara. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:205-214.
- Harayama, S., H. Kishira, Y. Kasai, & Shutsubo, K. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:63-70.
- Harwati, UT., Y. Kasai, Y. Kodama, D. Susilaningih, & K. Watanabe. 2007. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesia Seawater. *Microbes. Environ.* 22:1-4.
- Head, IM., DM. Jones, & WF. Roling. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:173-182.
- Hedlund, BP., AD. Geiselsbrecht, TJ. Bair, & JT. Staley. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:251-259.
- Higgins, DG., & PM. Sharp. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* 73:237-244.
- Holst, MT., S. Markussen, A. Winnberg, TE. Ellingsen, HK. Kotlar, & SB. Zotchev. 2006. Utilization of n- alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:353-360.
- Kaplan, CW., & CL. Kitts. 2004. Bacterial succession in petroleum land treatment unit.

- Appl. Environ. Microbiol.* 70:1777-1786.
- Koch, AK., O. Kappeli, A. Fiechter, & J. Reiser. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173:4212-4219.
- Kumar, S., K. Tamura, & M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163.
- Lee, NR., MO. Hwang, GH. Jung, YS. Kim, & KH. Min. 1996. Physical structure and expression of *alkB* encoding alkane hydroxylase and rubredoxin reductase from *Pseudomonas maltophilia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:17-21.
- MacNaughton, SJ., JR. Stephen, AD. Venosa, GA. Davis, YJ. Chang, & DC. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3566-3574.
- Okazaki S., N. Kishimoto, & T. Fujita. 2006. Isolation and phylogenetic characterization of microbial consortia able to degrade aromatic hydrocarbons at high rates. *Microbes. Environ.* 21:44-52.
- Pace, N. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276:734-740.
- Quatrini, P., G. Scaglione, C. De Pasquale, S. Riela, & AM. Puglia. 2007. Isolation of gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean. *J. Appl. Microbiol.* 104:251-259.
- Riffiani R. 2010. Isolasi Bakteri Pendegradasi Phenanthrene dari Batanta-Salawati Raja Ampat Papua. *J. Biol. Indon.* 6(2): 153-161.
- Ron, EZ., & E. Rosenberg. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:249-252.
- van Beilen, JB., MG. Wubbolts, & B. Witholt. 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation.* 5:161-174.
- Van Hamme JD., A. Singh, & OP. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:503-549.
- Yakimov, MM., G. Gentile, V. Bruni, S. Cappello, G. D'Auria, PN. Golyshin, & L. Giuliano. 2004. Crude oil induced structural shift of coastal bacterial communities of Rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 49:419-432.
- Yoon, JH., IG. Kim, MH. Lee, CH. Lee, & TK. Oh. 2005. *Nocardioideus alkalitolerans* sp. nov., isolated from an alkaline serpentinite soil in Korea. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(2):809-814.
- Yopi, Theresia, UH., A. Thontowi, & D. Susilansih. 2006. Karakterisasi bakteri pendegradasi minyak bumi dari perairan Muara Kamal, Teluk Jakarta. Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi. Cibinong, 15-16 Nopember 2006. 423-427.
- Yuan, J., Q. Lai, T. Zheng, & Z. Shao. 2009. *Novosphingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(8): 2084-2088.