Makara Journal of Science

Volume 13 | Issue 1 Article 14

4-25-2009

BIODEGRADASI FENANTREN OLEH BAKTERI LAUT Pseudomonas sp KalP3b22 ASAL KUMAI KALIMANTAN TENGAH

Tutik Murniasih
Pusat Penelitian Oseanografi, LIPI, Jakarta 14430, Indonesia, tutiic_2000@yahoo.com

Yopi Yopi
Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong – Bogor 16004 Indonesia

Budiawan Budiawan
Departemen Kimia, Program Magister, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

Follow this and additional works at: https://scholarhub.ui.ac.id/science

Recommended Citation
Murniasih, Tutik; Yopi, Yopi; and Budiawan, Budiawan (2009) "BIODEGRADASI FENANTREN OLEH BAKTERI LAUT Pseudomonas sp KalP3b22 ASAL KUMAI KALIMANTAN TENGAH," *Makara Journal of Science*: Vol. 13: Iss. 1, Article 14.
Available at: https://scholarhub.ui.ac.id/science/vol13/iss1/14

This Article is brought to you for free and open access by the Universitas Indonesia at UI Scholars Hub. It has been accepted for inclusion in Makara Journal of Science by an authorized editor of UI Scholars Hub.

BIODEGRADASI FENANTREN OLEH BAKTERI LAUT *Pseudomonas* sp KalP3b22 ASAL KUMAI KALIMANTAN TENGAH

Tutik Murniasih[1*)], Yopi[2], dan Budiawan[3]

1. Pusat Penelitian Oseanografi, LIPI, Jakarta 14430, Indonesia
2. Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong – Bogor 16004 Indonesia
3. Departemen Kimia, Program Magister, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

[*)]*E-mail: tutiic_2000@yahoo.com*

Abstrak

Studi tentang potensi bakteri laut pendegradasi poliaromatik hidrokarbon telah kami lakukan terhadap beberapa isolat yang diisolasi dari air laut tercemar daerah pelabuhan Kumai. Uji tingkat biodegradasi terhadap senyawa fenantren dari isolat terpilih *Pseudomonas* sp Kalp3b22 terbukti dapat mendegradasi Fenantren sebesar 59,5% selama 29 hari kultivasi. Penentuan struktur senyawa hasil degradasi menunjukkan adanya senyawa 1-naftalenol pada akhir fermentasi.

Abstract

The Biodegradation of Phenanthren by Marine Bacteria *Pseudomonas* sp KalP3b22 from Kumai Central Borneo. The study of the potential marine bacteria that degrade Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) was already done among several marine bacterium isolated from the contaminated sea water collected in Kumai Port area. The biodegradation rate of phenanthrene by selected bacteria *Pseudomonas* sp Kalp-3b22 was 59,5% after 29 days cultivation. The structural determination of degradation product was deduced as 1-naphtalenol.

Keywords: Phenanthrene, biodegradation, Pseudomonas sp.

1. Pendahuluan

Membuang sampah tidak pada tempatnya serta tidak tepatnya penanganan limbah toksik menyebabkan terkontaminasinya lingkungan darat maupun laut. Beberapa cara kimia, fisika dan biologi telah dikembangkan guna mengatasi cemaran bahan kimia rekalsitran. Bioremediasi saat ini diyakini merupakan cara terbaik dengan resiko paling kecil. Pada kondisi tertentu, beberapa mikroorganisme laut menggunakan poliaromatik hidrokarbon sebagai sumber karbon dan sumber energi. Dengan kemampuan fisiologinya tersebut maka mikrooganisme dapat dimanfaatkan untuk mengatasi cemaran senyawa kimia berbahaya [1].

Fenantren merupakan salah satu poliaromatik hidrokarbon (PAH) yang biasa ditemukan pada tanah yang tercemar, daerah estuaria dan perairan lainnya. Fenantren merupakan bentuk paling sederhana dari PAH yang mempunyai bentuk "*bay-region*" dan "*K-region*" sehingga sering digunakan sebagai model substrat untuk mempelajari metabolisme PAH yang karsinogenik.

Metabolisme fenantren oleh *Streptomyces flavovirens* dan sianobakteri laut *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 menunjukkan sistem enzimatis yang lebih menyerupai mamalia dan kapang dibanding dengan bakteri sendiri. Keduanya mengoksidasi fenantren menjadi fenantren trans-9,10-dihidrodiol melalui katalis monooksigenase-epoksida hidrolase dan bukan dioksigenase. Formasi metabolik 1-metoksifenantren dari fenantren pertama kali dilaporkan dalam *Synechococcus sp.* PR-6. Organisme ini didetoksifikasi oleh 1-fenantrol. Metabolik dari 1-metoksifenantren dalam *Synechococcus sp*. PR-6 telah dipelajari [2].

Data toksisitas fenantren menunjukkan efek negatif terhadap karsinogenesitas pada tikus [3]. Eksperimen lain melaporkan bahwa fenantren menunjukkan efek papillomas terhadap 1 dari 12 hewan uji (18%) selama 100 minggu [4]**.** Dilingkungan laut, meskipun fenantren tidak bersifat mutagenik dan karsinogenik, namun fenantren ini dilaporkan toksik terhadap diatom laut, gastropoda, kerang, krustasea dan ikan [2]. Untuk melihat sejauh mana bakteri laut Indonesia mampu mendegradasi fenantren, maka dilakukan penelitian ini.

Jamur juga dapat memetabolisme fenantren dengan menggunakan monooksigenase dan epoksi hidrolase. Jalur metabolisme fenantren (9S,10S) pada jamur juga melibatkan serangan naftaloksidatif pada "K-region" fenantren [5]. Fenantren dapat didegradasi oleh bakteri tanah melalui salah satu jalur. Pada salah satu jalur, 1-hidroksi-2-asam naftoat dioksidasi menjadi 1,2-dihidronaftalen, selanjutnya didegradasi lanjut melalui jalur naftalen menjadi salisilat untuk dimetabolisme. Pada jalur yang lain, cincin 1-hidroksi-2-asam naftoat diputus, selanjutnya dimetabolisme melalui jalur ftalat. Di sini terlihat bahwa naftalen dan fenantren berhuhungan satu dengan yang lainnya dalam jalur metaboliknya[6].

2. MetodePenelitian

Bahan dan Peralatan. Sampel air laut tercemar diambil pada kedalaman sekitar 2 meter dari pelabuhan Kumai Kalimantan Tengah. Bahan kimia seperti fenantren dibeli dari Wako Pure Chem. Sebagai nutrien pengkayaan digunakan minyak mentah yang diambil dari Cepu Jateng. Adapun medium yang digunakan adalah swp broth yang mengandung (NH_4NO_3, K_2HPO_4, Fe(III) sitrat, ekstrak yeast). Selain itu digunakan medium agar-ONR7 yang mengandung NaCl, Na_2SO_4, TAPSO, KCl, NH_4Cl, $Na_2HPO_4.7\ H_2O$, NaBr, $NaHCO_3$, H_3BO_3, NaF, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$ dan $FeCl_24H_2O$. Purifikasi dilakukan dengan menggunakan medium marine-agar (2116 difco) yang mengandung yeast peptone, casamino acid, dekstrose, soluble starch, sodium pyruvate dan agar. Pelarut organik yang digunakan adalah diklorometan (Merck), heksan (Merck), etil asetat (Merck). Peralatan yang digunakan untuk identifikasi produk konversi adalah GC-Mass dengan kolom kapiler.

Isolasi Mikroba. Sampel air laut sebanyak 4 mL di tambahkan nutrien fenantren 1000 ppm dan 1mL medium swp. Selanjutnya diinkubasi selama 2-4 minggu menggunakan "shaker incubator" suhu 30^oC. Sesudah 2 minggu larutan fermentasi diinokulasi kedalam media agar-onr7 dengan konsentrasi 10^{-1} dan 10^{-2}. Sebelum diinkubasi dilakukan sublimasi dengan uap fenantren standar pada permukaan agar. Mikroba positif pendegradasi fenantren ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni. Selanjutnya dilakukan isolasi dan purifikasi.

Uji Tingkat Biodegradasi. Sebelumnya dibuat prakultur isolat dalam 4mL medium "marine broth", kemudian diinkubasi selama 2 hari, sebanyak 3mL larutan prakultur ditambahkan kedalam 300mL medium "marine broth" yang mengandung minyak mentah (1mL) dan diinkubasi pada "rotary shaker" suhu 30^oC. Sesudah 6 hari, kultur dipanen dan disentrifuse untuk mendapatkan sel bakteri. Sel dipisahkan dari "supernatant" dan ditimbang berat basahnya. Selanjutnya pellet bakteri dilarutkan dalam 4 mL buffer fosfat pH 7,5 mL. Sebanyak 1 mL larutan inokulum (1,08mg/mL) ditambahkan kedalam 150 mL medium ONR-7 yang masing-masing mengandung PAH fenantren 1000 ppm. Sebagai kontrol abiotik digunakan medium ONR-7 yang mengandung PAH tanpa diinokulasi dengan bakteri. Masing-masing eksperimen dilakukan secara duplo. Kultur diinkubasi pada "rotary shaker" suhu 30^oC, dan dilakukan pengukuran pertumbuhan dengan spektrometer UV/visible panjang gelombang 660 nm. Pemanenan dua kali dalam seminggu dilakukan untuk mendeteksi konsentrasi fenantren yang tersisa. Kultivasi dihentikan ketika grafik pertumbuhan sudah mengalami penurunan.

Preparasi sampel yang digunakan untuk analisis GC/GC-Mass dilakukan sebagai berikut, sebanyak 5 mL larutan kultur diekstrak dengan diklorometan, kemudian diambil fasa organiknya, selanjutnya untuk menghilangkan kandungan air ditambahkan natrium sulfat. Fase organik dipekatkan hingga volume akhir 1 mL. Contoh siap dianalisis menggunakan GC dan GC-Mass.

Analisis "Gas Chromatography" dilakukan untuk mengetahui konsentrasi fenantren sisa biodegradasi. Metode yang digunakan adalah metode Anonimous 1989. Detektor yang digunakan adalah FID, dengan kolom kapiler (HP1) silika panjang 12 m, diameter 0,2 mm, tebal film 0,33 µm. Suhu oven 60^oC kemudian dinaikkan hingga 280^oC. Kecepatan alir 6mL/menit, didiamkan selama 15 menit. Suhu detektor 300^oC dan suhu injektor 240^oC. Sebagai gas pembawa digunakan hidrogen.

Pemisahan Senyawa Hasil Biodegradasi. Untuk menentukan struktur senyawa hasil konversi, dilakukan pemanenan terhadap kultur Pseudomonas sp KalP3b22 pada hari ke-29. Larutan kultur selanjutnya diekstrak dengan pelarut diklorometan, kemudian dievaporasi dan ekstrak difraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom silika gel dengan elusi gradien heksan-etil asetat digunakan untuk memisahkan fraksi-fraksi produk konversi. Selanjutnya fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis untuk menentukan fraksi produk konversi. Sebagai penampak noda digunakan sinar UV.

Analisis Produk Biodegradasi. Untuk mengetahui produk konversi hasil degradasi maka dilakukan analisis spektrofotometer infra merah dan analisis GC-Mass. Fraksi–fraksi hasil pemisahan dengan kromatografi kolom silika gel sesudah dikeringkan diambil sedikit dan dicampur dengan serbuk KBr dan dihaluskan kemudian langsung dimasukkan "sample plate" dan dilakukan pengukuran.

Analisis "Gas Chromatography - Spectroscopy Massa" terhadap ekstrak hasil fermentasi dilakukan berdasarkan metode Petrosca menggunakan kolom kapiler, detektor FID, suhu awal 80^{o}C dan suhu maksimum 325^{o}C. Gas pembawa adalah gas helium dengan tekanan 19,56 psi dengan kecepatan aliran 53,2 mL/min.

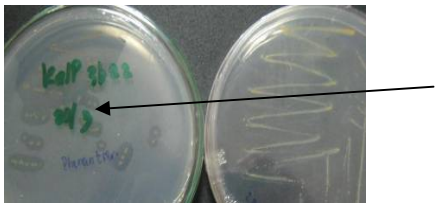
3. Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri Pendegradasi. Dari hasil skrining bakteri pendegradasi fenantren, diperoleh isolat dengan warna krem yang memberikan zona pada uji sublimasi dengan fenantren. Gambar 1 berikut di bawah ini adalah profil dari isolat pendegradasi terpilih KalP3b22.

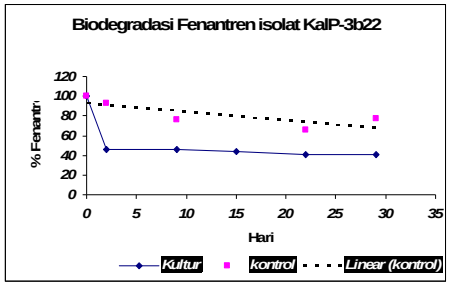
Identifikasi dengan analisis 16SrDNA dari isolat tersebut menunjukkan jenis *Pseudomonas* sp KalP3b22 [7].

Uji Biodegradasi. Analisis konsentrasi sisa fenantren hasil biodegradasi *Pseudomonas* sp KalP3b22, dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Gas. Gambar 2 berikut adalah profil biodegradasi fenantren oleh bakteri tersebut.

Degradasi fenantren berlangsung cepat pada 2 hari pertama kultivasi, dimana terjadi penurunan konsentrasi hingga 44,4%. Selanjutnya hingga hari ke-29 penurunan konsentrasi fenantren mencapai 59,5%. Hasil tersebut membuktikan bahwa metabolisme fenantren pada bakteri *Pseudomonas* sp KalP3b22 maksimal pada 2 hari kultivasi, pada hari selanjutnya metabolisme fenantren sangat lambat. Hingga hari ke-29, bakteri ini tidak mampu mendegradasi fenantren secara total. Untuk mendegradasi hidrokarbon secara sempurna, diperlukan optimasi baik dari segi lingkungan (pH, nutrien, oksigen, suhu) maupun dari mikrobanya sendiri dilakukan rekayasa genetika dan penggunaan konsorsium [8].



Gambar 1. Isolat KalP 3b22 dalam Media onr-7 (A) dan Marine Agar (B)

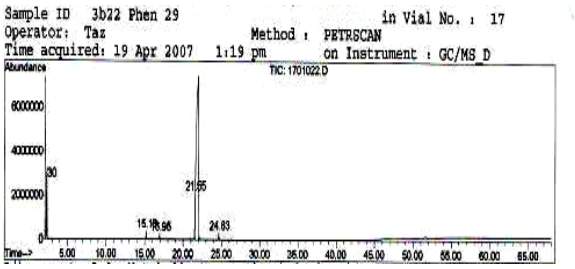


Gambar 2. Grafik Biodegradasi Fenantren oleh Bakteri *Pseudomonas* sp KalP-3b22

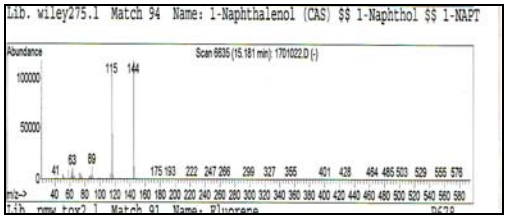
Analisis Produk Konversi. Pemisahan senyawa hasil fermentasi menggunakan kromatografi kolom menghasilkan 4 fraksi. Fraksi 1 menggunakan eluen heksan 100%, fraksi 2 heksan:etil asetat (5:1), fraksi 3 heksan:etil asetat (4:1) dan fraksi 4 heksan:etil asetat (1:1). Analisis TLC fraksi 1 dan 2 mempunyai waktu retensi sama dengan fenantren (0,6), sedangkan fraksi 3 dan 4 mempunyai waktu retensi (0,3). Terhadap fraksi tersebut dilakukan analisis GC-Mass. Di bawah ini adalah profil GC senyawa hasil biodegradasi fenantren oleh bakteri *Pseudomonas* sp kalp3b22 .

Analisis kromatogram GC-Mass senyawa hasil biodegradasi fenantren menunjukkan 2 puncak penting, puncak 1 pada waktu retensi 15,16 menit dan puncak 2 pada waktu retensi 21,55 menit. Analisis spektra massa menggunakan internal standar menunjukkan bahwa senyawa dengan waktu retensi 15,16 menit adalah naftalenol sedangkan senyawa dengan waktu retensi 21,55 menit adalah fenantren. Gambar 4 di bawah ini merupakan spektra massa senyawa naftalenol.

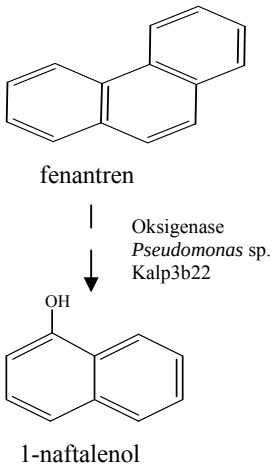
Dari profil fragmentasi senyawa hasil biokonversi didapatkan "base peak"m/z 144 yang menunjukkan berat molekul 1-naftalenol. Puncak ion dengan m/z 115



Gambar 3. Pemisahan Senyawa Hasil Biodegradasi Fenantren Hari Ke-29 Menggunakan GC-Mass



Gambar 4. Fragmentasi Senyawa Naftalenol Hasil Biodegradasi



Gambar 5. Biodegradasi Fenantren Menjadi 1-naftalenol oleh Bakteri *Pseudomonas* sp Kalp3b22

menunjukkan hilangnya ion =C-OH pada gugus naftalenol, selanjutnya diikuti dengan hilangnya 2 atom C menghasilkan puncak ion pada m/z 89. Pecahnya seluruh cincin aromatik ditandai dengan hilangnya molekul =HC-CH= ,sehingga muncul ion molekul dengan m/z 63.

Dari hasil analisis tersebut memberikan bukti bahwa bakteri *Pseudomonas* sp Kalp3b22 mampu mendegradasi fenantren menjadi senyawa naftalenol. Gambar 5 berikut adalah struktur fenantren dan 1-naftalenol.

Jalur metabolik biodegradasi fenantren dengan naftalen pada bakteri tertentu sangat berhubungan satu sama lain, sehingga pembentukan senyawa turunan naftalen dalam hal ini naftalenol pada metabolisme fenantren dapat terjadi [6]. Selain itu Kiyohara juga melaporkan bahwa jalur metabolisme fenantren pada jamur juga melibatkan serangan naftaloksidatif pada posisi "K-region" fenantren, yang selanjutnya dapat terbentuk senyawa turunan naftalen.

4. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri laut asal Kumai *Pseudomonas* sp KalP 3b22 merupakan jenis yang potensial untuk dikembangkan menjadi bakteri biodegradator PAH. Dengan model molekul fenantren terbukti bakteri ini mampu mendegradasi hingga tahap pembukaan cincin aromatik. Penelitian genetika, "functional gene" dan enzimologi sangat diperlukan untuk mengetahui kemampuan pendegradasiannya secara menyeluruh.

Daftar Acuan

[1] A. Nugroho, Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi, Penerbit Graha Ilmu Yogyakarta, 2006, p. 39-42.
[2] B. Boldrin, A. Tiehm, C. Fritzsche, Applied and Environmental Microbiology 59 (6) (1993) 1927-1930.
[3] E. I. Kenneway, J. Ind. Hyg. 5 (1924) 462-590.
[4] H. Kiyohara, S. Torigoe, N. Kaida, T. Asaki, T. Lida, H. Hayashi, N. Takizawa, J. Bacterio. 176 (8) (1994) 2439-43.
[5] J. Ouyang, University of Minnesota, http://umbbd.umn.edu/pha/pha_map.html, 2006.
[6] J. Ouyang, M. Fitzgerald, University of Minnesota, http://umbbd.umn.edu/pha2/ pha2_map.html, 2006
[7] T.S. Brodkorb, R.L. Legge, Applied and Environmental Microbiology 58 (9) (1992) 3117-3121.
[8] D. Warshawsky, W. Barkley, E. Bingham, Fundam Appl. Toxicol. 20 (1993) 376-382.
[9] Murniasih, Tesis Magister, Jurusan Kimia, Universitas Indonesia, Depok, 2007.