

Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Sedimen Mangrove untuk Pembentukan Konsorsium Bakteri Perombak Dibenzofuran

Isolation and Selection of Bacteria from Mangrove Sediment to Development a Dibenzofuran Degrading Bacterial Consortium

Yanisworo W. Ratih^{1*}, Bostang Radjagukguk², Erni Martani², dan Irfan D. Prijambada²

¹Fakultas Pertanian UPN "Veteran" Yogyakarta

²Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

E-mail: woroyanis@yahoo.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Dibenzofuran is one among polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which contain oxygen. The discharge of dibenzofuran in the environment needs to be controlled promptly because it is the precursor of its chlorinated derivatives that more toxic than the dibenzofuran it self. Dibenzofuran can be used as a model compound because a number of dibenzofuran degrading bacteria can also degrade some related PAHs like dibenzodioxin, fluorene, fluoranthene, chlorinated dibenzofuran, phenanthrene and anthracene. The present study was conducted to formulate an artificial bacterial consortium with high capability to degrade dibenzofuran. The bacterial were isolated from mangrove sediment taken from Balongan, Indramayu, West Java, using liquid minerals medium enriched with dibenzofuran as its sole source of carbon and energy. A total of 12 isolates, GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4, GMYk-5, GMYs-1, GMYs-2, GMYs-3, GMYs-4, GMYs-5, GMYs-6 and GMYs-7 were isolated from the sediment. Based on the examination on the similarities of the isolates obtained, and the interaction among the isolates in degrading dibenzofuran, four isolates have been selected. They were GMYs-1, GMYs-6, GMYs-7 and GMYk-1. Based on the ability of all possible combination of the selected isolates to degrade dibenzofuran, a mixed culture of GMYs-1, GMYs-6, and GMYk-1 was chosen as an artificial consortium. This consortium has the highest ability to degrade dibenzofuran.

Key words: Islation, selection, consortium, degradation, dibenzofuran

Abstrak

Dibenzofuran merupakan salah satu senyawa hidrokarbon aromatis polisiklik (HAP) yang mengandung oksigen. Paparannya di alam harus segera ditanggulangi karena dibenzofuran berperan sebagai prekursor bagi senyawa berkhlor turunannya yang bersifat lebih toksik. Dibenzofuran dapat dijadikan senyawa model karena beberapa bakteri perombak dibenzofuran juga mampu merombak senyawa mirip lainnya seperti dibenzodioksin, fluorena, fluorantena, dibenzofuran terklorinasi, fenantrena dan antrasena. Penelitian ini dilakukan untuk membentuk konsorsium bentukan yang mempunyai kemampuan tinggi dalam merombak dibenzofuran. Isolat bakteri diperoleh dari sedimen mangrove asal Balongan, Indramayu, Jawa Barat menggunakan medium mineral cair yang diperkaya dengan dibenzofuran sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Total 12 isolat bakteri, GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4, GMYk-5, GMYs-1, GMYs-2, GMYs-3, GMYs-4, GMYs-5, GMYs-6 dan GMYs-7 berhasil diisolasi dari sedimen. Berdasarkan pengamatan terhadap keragaman isolat-isolat yang diperoleh serta interaksi di antara isolat dalam merombak dibenzofuran, empat isolat berhasil terseleksi untuk menyusun konsorsium bentukan. Isolat tersebut adalah GMYs-1, GMYs-6, GMYs-7 dan GMYk-1. Berdasarkan kemampuan merombak dibenzofuran dari kombinasi isolat-isolat yang disusun, biakan campuran GMYs-1-GMYs-6-GMYk-1 dipilih sebagai konsorsium bentukan. Konsorsium bentukan mempunyai kemampuan paling tinggi dalam merombak dibenzofuran.

Kata kunci: Isolasi, seleksi, konsorsium, perombakan, dibenzofuran

Diterima: 17 Januari 2011, disetujui: 27 April 2011

Pendahuluan

Dibenzofuran merupakan salah satu senyawa hidrokarbon aromatis polisiklik (HAP) yang mengandung oksigen. Paparan dibenzofuran di alam harus ditanggulangi karena dibenzofuran berperan sebagai prekursor bagi senyawa berklor turunannya seperti 2, 3, 7, 8 tetraklorodibenzofuran (Megharaj *et al.*, 1997). Dibenzo berklor dikenal sebagai senyawa yang sangat toksik (Poland dan Knutson, 1982; Safe, 1986). Dibenzofuran maupun dibenzofuran berklor semakin banyak dijumpai di alam. Dibenzofuran dapat dijumpai dalam minyak bumi, batubara dan limbah industri kertas. Dibenzofuran dapat dijadikan senyawa model karena beberapa bakteri perombak dibenzofuran juga mampu merombak senyawa mirip lainnya seperti dibenzodioxin, fluorena, fluorantena, dibenzofuran terkhlorinasi, fenantrena dan antrasena.

Akhir-akhir ini banyak digunakan istilah konsorsium sebagai biakan campuran untuk perombakan senyawa HAP. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa perombakan senyawa HAP oleh konsorsium bakteri berlangsung lebih cepat daripada perombakan oleh biakan tunggal (Fortnagel *et al.*, 1990; Ou dan Thomas, 1994; Bouchez *et al.*, 1995; Bouchez *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2000; Murygina *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Siciliano *et al.*, 2003). Menurut Sylvia *et al.*, (2005), konsorsium adalah biakan yang terdiri atas dua atau lebih bakteri yang mendapat untung dari lainnya. Berdasarkan cara pembentukannya, dikenal dua istilah yaitu konsorsium alami dan konsorsium bentukan. Konsorsium alami adalah konsorsium yang diperoleh melalui prosedur pengayaan menggunakan senyawa tertentu secara langsung dari sumbernya. Konsorsium bentukan adalah biakan campuran yang dibentuk dengan mengkombinasikan beberapa isolat yang diketahui kemampuan komplementer degradatifnya (Vinas *et al.*, 2002).

Dalam merombak senyawa, penggunaan konsorsium bentukan lebih menguntungkan daripada konsorsium alami. Hal ini karena jumlah dan jenis komunitas bakteri dalam konsorsium alami sulit diketahui. Lingkungan alami mengandung beragam mikrob, hanya 0,1–1% yang dapat dibiakkan melalui teknik

mikrobiologi konvensional (Amann *et al.*, 1995). Stabilitas komposisi bakteri dalam lingkungan alami sulit untuk dipertahankan, karena rentan terhadap perubahan faktor lingkungan. Hal tersebut tidak terjadi dalam konsorsium bentukan karena populasi konsorsium bentukan terdiri atas beberapa isolat yang dapat dibiakkan secara konvensional.

Pembentukan konsorsium bentukan maka proses isolasi dan seleksi merupakan langkah yang menentukan. Isolasi dilakukan dari sumber yang bervariasi untuk mendapatkan spektrum isolat yang luas. Namun, dalam pembentukan konsorsium bentukan, apabila jumlah isolat yang diperoleh banyak, maka seleksi isolat merupakan langkah yang menentukan. Penelitian ini bertujuan membentuk konsorsium bentukan bakteri perombak dibenzofuran yang tersusun atas isolat bakteri yang diperoleh dari sedimen mangrove. Sumber isolat adalah sedimen mangrove di pantai Indramayu, Jawa Barat. Penelitian Ratih *et al.*, (2008), menunjukkan bahwa sedimen mangrove di pantai Indramayu mengandung komunitas bakteri alami perombak dibenzofuran dengan aktivitas perombakan yang sama dengan aktivitas *Sphingomonas wittichii* strain RW1, isolat yang dikenal sebagai perombak dibenzofuran yang handal dan sudah dikarakterisasi secara lengkap (Wittich *et al.*, 1992; Armengaud *et al.*, 1998; Yabuuchi *et al.*, 2001).

Metode Penelitian

Isolasi Bakteri dan Uji Kemampuan Isolat yang Diperoleh dalam Merombak Dibenzofuran

Isolasi dilakukan terhadap konsorsium alami dan sedimen sumber konsorsium alami dibentuk. Konsorsium alami, yang diberi nama konsorsium A1 diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya. Konsorsium A1 dikembangkan dari sedimen mangrove menggunakan medium mineral cair dengan komposisi (mg L^{-1}): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2200; NH_4NO_3 , 3000; KH_2PO_4 , 800; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 dan NaCl , 500 (Kasuga *et al.*, 1997) diperkaya dengan 1000 mg L^{-1} dibenzofuran (MMC-dibenzofuran 1000 mg L^{-1}) sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi.

Setelah diinkubasi selama satu minggu dilakukan pemindahan ke dalam medium segar yang sama (*subculturing*). Pemindahan dilakukan tujuh kali (Ratih *et al.*, 2008). Isolasi bakteri dari konsorsium A1 menggunakan metode *surface plating* pada permukaan medium NA dalam cawan petri. Sedimen sumber konsorsium A1 diperoleh diberi nama sedimen A1. Isolasi dari sedimen A1 dilakukan tanpa perlakuan *subculturing*, dengan cara: lima gram sedimen diinokulasikan ke dalam 50 ml MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹. Pemiakan dilakukan pada suhu kamar selama dua minggu di atas meja penggojog (125 rpm). Isolasi bakteri dilakukan pada inkubasi minggu pertama dan kedua. Masing-masing isolat diuji kemampuannya merombak dibenzofuran selama 7 hari inkubasi dalam MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹. Sisa dibenzofuran dianalisis pada akhir inkubasi menggunakan GC (Shimadzu 14B, Jepang) yang dihubungkan dengan *flame ionization detector* (GC-FID). Kolom berupa kapiler silika HP1 panjang 25 m dan diameter 0,2 mm. Suhu kolom 250°C dan suhu detektor 260°C, tekanan gas pembawa (N₂) sebesar 150 kPa, kecepatan alir gas pembawa 25 ml menit⁻¹ (Huy *et al.*, 1999).

Seleksi Isolat yang Diperoleh untuk Membentuk Konsorsium Bentukan

Seleksi isolat dilakukan berdasarkan tiga macam uji, yaitu keragaman, interaksi positif yang terjadi diantara isolat yang mempunyai kemampuan rendah dalam merombak dibenzofuran, serta uji respon pertumbuhan terhadap kosubstrat. Keragaman isolat bakteri yang diperoleh diuji berdasarkan *repetitive genomic sequences* yang diamplifikasi dengan PCR (REP-PCR). Primer yang digunakan adalah BOX AIR. Progam PCR yang digunakan adalah: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 4 menit, selanjutnya amplifikasi 30 siklus yang meliputi 92°C selama 1 menit, 50°C selama 1,5 menit dan 68°C selama 8 menit, kemudian 68°C selama 10 menit untuk perpanjangan produk akhir. Hasil PCR diamati dengan elektroforesis pada gel agarose 0,8%. Isolat yang menunjukkan keragaman pola pita DNA digunakan untuk menyusun konsorsium bentukan.

Isolat-isolat yang kemampuannya rendah merombak dibenzofuran disusun menjadi

biakan campuran dan diuji pertumbuhannya dalam MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹. Inkubasi dilakukan selama 7 hari di atas meja penggojog (150 rpm) pada suhu kamar. Setelah masa inkubasi jumlah sel ditentukan menggunakan metode *surface plating* pada permukaan NA dalam cawan petri. Isolat yang dikombinasikan dengan isolat lain menunjukkan peningkatan pertumbuhan digunakan untuk menyusun konsorsium bentukan.

Isolat yang mempunyai kemampuan perombakan rendah diuji kembali pada medium MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ yang ditambah kosubstrat berupa 0,05% ekstrak khamir. Kemampuan pertumbuhan diamati secara kualitatif (visual) berdasarkan kekeruhan yang timbul. Isolat yang menunjukkan peningkatan pertumbuhan adanya kosubstrat digunakan untuk menyusun konsorsium bentukan.

Pembentukan Konsorsium Bentukan

Konsorsium bentukan disusun berdasarkan kemampuan merombak dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ dari biakan campuran, berupa kombinasi isolat-isolat yang dipilih. Campuran individu isolat pilihan dengan proporsi jumlah yang sama ditambahkan pada MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ sampai 1.10⁸ sel ml⁻¹. Inkubasi dilakukan selama 24 jam di atas meja penggojog (150 rpm) pada suhu kamar. Kombinasi isolat yang mempunyai kemampuan perombakan paling tinggi ditetapkan sebagai konsorsium bentukan.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri Serta Uji Kemampuan Isolat yang Diperoleh dalam Merombak Dibenzofuran

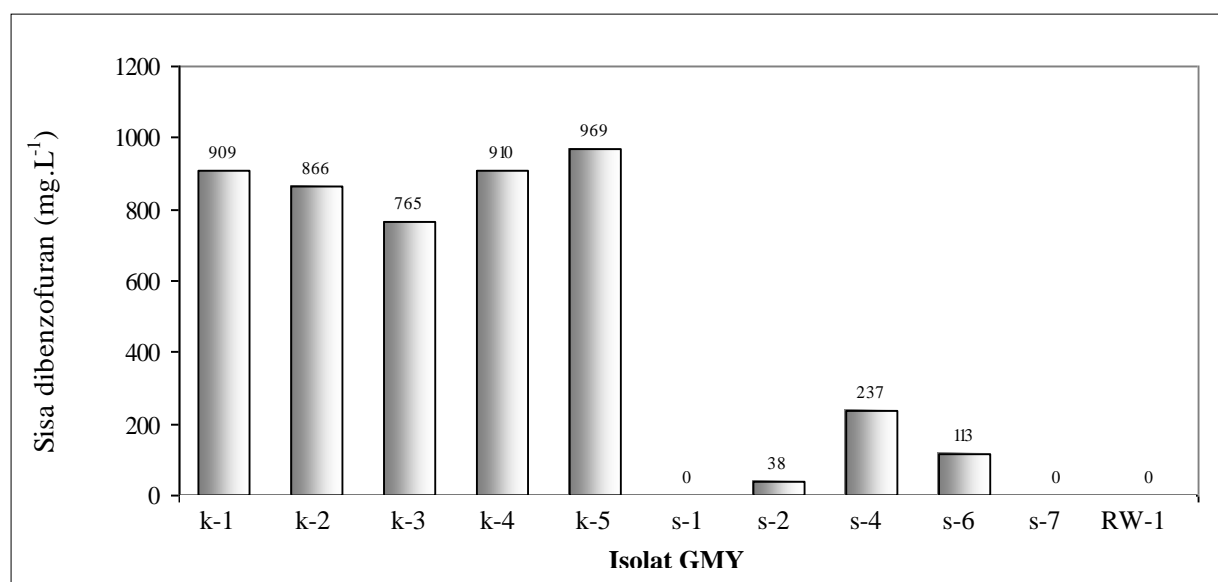
Dari konsorsium A1 dan sedimen A1 diperoleh 12 isolat yang diberi notasi berdasarkan sumber isolat yaitu k untuk konsorsium dan s untuk sedimen. Penelitian ini dilaksanakan di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Dari konsorsium A1 diperoleh lima isolat yang diberi notasi: GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4, dan GMYk-5. Kemampuan perombakan dibenzofuran dari individu isolat berkisar antara 3,1% (dari 1000 menjadi 969 mg L⁻¹) pada GMYk-5 sampai

dengan 23,5% (dari 1000 menjadi 765 mg L⁻¹) pada GMYk-3. Kemampuan perombakan kelima isolat yang diperoleh lebih rendah dibandingkan kemampuan *S. wittichii* RW1 yang mampu merombak 100% 1000 mg L⁻¹ dibenzofuran dalam waktu yang sama (Wittich *et al.*, 1992). Dari sedimen A1 diperoleh tujuh isolat, yang diberi notasi GMYs-1, GMYs-2, GMYs-3, GMYs-4, GMYs-5, GMYs-6 dan GMYs-7. Morfologi koloni isolat GMYs-3 mirip dengan GMYk-4 dan GMYs-5 mirip dengan GMYk-2, sehingga dari sedimen A1 dipilih 5 isolat, yaitu GMYs-1, GMYs-2, GMYs-4, GMYs-6 dan GMYs-7 untuk dianalisis lebih lanjut. Total isolat yang diperoleh dari konsorsium A1 dan sedimen A1 adalah GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4 dan GMYk-5 serta GMYs-1, GMYs-2, GMYs-4, GMYs-6 dan GMYs-7. Selama tujuh hari inkubasi, kemampuan merombak 1000 mg L⁻¹ dibenzofuran dari isolat yang diperoleh berkisar antara 76,3% pada GMYs-4 sampai dengan 100% pada GMYs-1 dan GMYs-7 (Gambar 1).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa komunitas bakteri pada sedimen A1 berbeda dengan komunitas bakteri pada konsorsium A1. Isolat yang diperoleh dari sedimen A1 mempunyai kemampuan merombak dibenzofuran lebih tinggi dibanding isolat dari konsorsium A1. Perbedaan komunitas terjadi

karena selama pembentukan konsorsium A1, dilakukan *subculturing* beberapa kali. Perlakuan *subculturing* mengakibatkan beberapa galur bakteri, terutama yang pertumbuhan dalam komunitasnya lambat, menjadi terseleksi. Pengalaman laboratoris selama penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri dengan kemampuan merombak dibenzofuran yang tinggi, mempunyai kemampuan pertumbuhan yang lambat. Penyiapan inokulum pada medium LB cair bagi isolat GMYs-1, GMYs-2, GMYs-4, GMYs-6 dan GMYs-7 biasanya membutuhkan waktu 48–72 jam sedangkan isolat GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4 dan GMYk-5 membutuhkan waktu 24 jam.

Tampaknya untuk mendapatkan isolat yang lebih baik perlu dipelajari lebih dalam tentang metode pengayaan dan isolasi agar sesuai. Keragaman bakteri dapat dipelajari secara konvensional dengan metode pengayaan biasa. Pengayaan secara konvensional dilakukan dengan menambahkan senyawa tertentu ke dalam medium sebagai sumber karbon dan energi sehingga terjadi seleksi. Jasad yang tumbuh dan berkembang adalah yang mampu menggunakan senyawa tersebut, sedangkan jasad lain akan tersingkirkan. Keragaman yang terungkap tergantung dari metode pengayaan yang digunakan dan modifikasi yang dilakukan.



Gambar 1. Kemampuan isolat-isolat bakteri dari konsorsium A1 dan sedimen A1 dalam merombak 1000 mg L⁻¹ dibenzofuran selama tujuh hari inkubasi.

Dua prosedur yang berbeda telah dibandingkan untuk mengisolasi bakteri perombak HAP dari tanah dan lumpur yang tercemar senyawa tersebut (Bastiaens *et al.*, 2000). Prosedur pertama dilakukan dengan metode pengayaan menggunakan HAP dalam bentuk kristal disertai dengan penggojokan. Cara yang kedua, senyawa HAP ditambahkan dalam bentuk terjerap pada teflon. Kedua teknik berhasil mengisolasi bakteri, namun isolat yang diperoleh berbeda. Dari cara pertama bakteri utama yang terseleksi adalah *Sphingomonas* spp, sedangkan cara kedua berupa *Mycobacterium* spp. Hasil yang mirip ditunjukkan pada saat Vacca *et al.*, (2005) mengisolasi bakteri perombak fenantrena bentuk terjerap asam humat. Tiga isolat yang diperoleh, *Burkholderia* spp., *Delffia* sp. dan *Sphingomonas* sp. mampu merombak HAP bentuk terjerap pada asam humat, sedangkan 25 isolat lain yang diperoleh dengan cara konvensional tidak dapat menggunakannya.

Seleksi Isolat yang Diperoleh untuk Menyusun Konsorsium Bentukan

Keragaman isolat diuji berdasarkan analisis REP-PCR. Elektroforesis hasil REP-PCR dari 10 isolat yang diuji (Gambar 2) menunjukkan bahwa pola pita isolat GMYs-1 (sumuran 3) mirip dengan GMYs-2 (sumuran 5) dan GMYs-4 (sumuran 4) mirip dengan GMYs-6 (sumuran 6), sedangkan pola pita isolat lainnya beragam. Kemiripan pola pita menunjukkan kekerabatan yang dekat. Kekerabatan GMYs-1 dekat dengan GMYs-2 dan GMYs-4 dekat dengan GMYs-6. Kemampuan perombakan dibenzofuran dari GMYs-1 lebih tinggi daripada GMYs-2, dan GMYs-6 lebih tinggi daripada GMYs-4 (Gambar 1), maka di samping GMYs-7, GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4 dan GMYk-5, isolat GMYs-1 dan GMYs-6 dipilih untuk tahapan penelitian berikutnya.

Metode *Repetitive genomic sequences-PCR* (REP-PCR) menggunakan primer tunggal yang menggandakan urutan nukleotida pendek dan berulang dalam genom mikroba. Setiap mikroba mempunyai urutan nukleotida berulang dengan jumlah dan jarak yang bervariasi dan bersifat unik. Oleh karena itu, metode ini dapat digunakan untuk membedakan keragaman bakteri (Kirk *et al.*, 2004). REP-PCR adalah

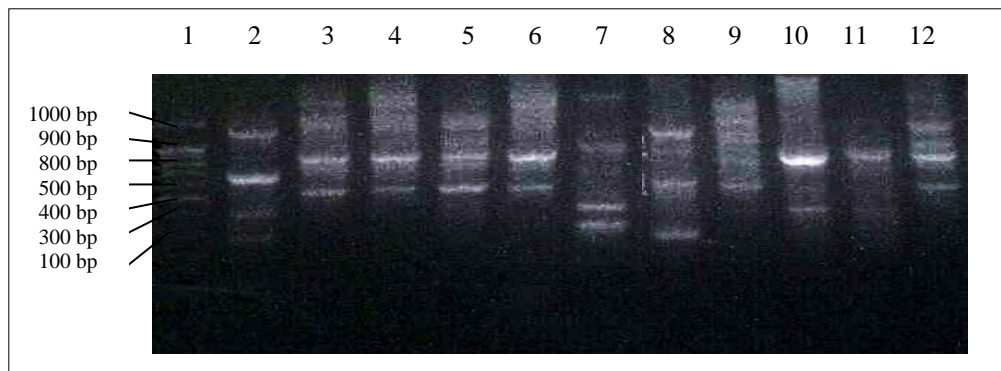
metode penentuan sidik jari mikroba secara genomik yang dapat dipercaya, cepat dan diskriminatif (Rademaker dan De Bruijn, 2000), sehingga digunakan sebagai metode penapisan/seleksi dalam memilih isolat bakteri (De Clerck *et al.*, 2004).

Uji pertumbuhan kombinasi isolat yang mempunyai kemampuan rendah merombak 1000 mg L⁻¹ dibenzofuran dilakukan untuk mengetahui sinergisme di antara mereka, yaitu isolat GMYk-1 GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4 dan GMYk-5. Kelima isolat tersebut diperoleh dari konsorsium A1. Kemampuan pertumbuhan individu isolat dan campurannya dalam MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ dapat dilihat dalam Tabel 1. Setiap isolat secara sendiri-sendiri menunjukkan kemampuan tumbuh pada MMC-dibenzofuran mg L⁻¹, kecuali GMYk-5, selama satu minggu inkubasi masing-masing isolat mengalami pertumbuhan dari 5.10⁷ sel ml⁻¹ di awal inkubasi menjadi berturut-turut 6,3.10⁹; 25.10⁹; 1,3.10⁹ dan 4.10⁹ sel ml⁻¹ untuk GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3 dan GMYk-4 pada akhir inkubasi. Namun, aktivitas pertumbuhan lebih rendah dibanding konsorsium A1. Dalam waktu inkubasi yang sama konsentrasi sel yang dicapai oleh konsorsium A1 adalah 4,0.10¹² sel ml⁻¹. Pertumbuhan yang lebih rendah dibanding konsorsium A1 juga terjadi pada biakan campuran yang terdiri atas kombinasi individu isolat yang diuji. Jumlah sel yang diperoleh biakan campuran berkisar antara 3.10⁹ sel ml⁻¹ pada campuran GMYk-3-GMYk-4-GMYk-5 sampai dengan 79.10⁹ sel ml⁻¹ pada GMYk-2-GMYk-3. Kemampuan tumbuh yang rendah dari biakan campuran pada MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ menunjukkan bahwa selama perombakan dibenzofuran berlangsung tidak terjadi interaksi yang menguntungkan di antara mereka. Penelitian ini dibenzofuran digunakan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi sehingga pertumbuhan sel merupakan implikasi kemampuan sel dalam merombak dibenzofuran dan mengasimilasi hasil perombakannya. Pertumbuhan sel yang lambat menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh tidak efisien dalam memanfaatkan dibenzofuran.

Seleksi dengan perlakuan penambahan kosubstrat berupa 0,05% ekstrak khamir dilakukan pada isolat mempunyai kemampuan perombakan dibenzofuran yang rendah, yaitu

isolat GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4 dan GMYk-5. Kosubstrat adalah senyawa yang memacu pertumbuhan sel sehingga mikroba mampu merombak senyawa utama atau senyawa target (Alexander, 1999). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa perombakan senyawa HAP dapat ditingkatkan dengan penambahan kosubstrat. Berbeda dengan GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4 dan GMYk-5, hasil pengamatan secara

kualitatif terhadap kekeruhan medium menunjukkan bahwa isolat GMYk-1 mengalami pertumbuhan dengan penambahan 0,05% ekstrak kamir pada MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹. Peningkatan pertumbuhan menunjukkan bahwa kemampuan GMYk-1 merombak dibenzofuran meningkat, mengingat sebagian besar sumber karbon dalam MMC yang digunakan berasal dari dibenzofuran.



Gambar 2. Hasil analisis *rep*-PCR dari isolat-isolat bakteri yang diperoleh menggunakan primer BOX-AIR. 1: primer, 2: galur RW1, 3: GMYs-1, 4: GMYs-4, 5: GMYs-2, 6: GMYs-6, 7: GMYk-4, 8: GMYk-5, 9: GMYk-2, 10: GMYk-1, 11: GMYk-3, 12: GMYs-7.

Tabel 1. Jumlah sel masing-masing isolat yang mempunyai kemampuan yang rendah dalam merombak dibenzofuran dan kombinasinya dalam MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ setelah tujuh hari inkubasi.

No	Isolat dan Kombinasinya	Jumlah Sel (ml ⁻¹)
1	GMYk-1	6,3.10 ⁹
2	GMYk-2	2,5.10 ¹⁰
3	GMYk-3	1,3.10 ⁹
4	GMYk-4	4,0.10 ⁹
5	GMYk-5	1,0.10 ⁸
6	GMYk-1-GMYk-2	6,3.10 ⁹
7	GMYk-1-GMYk-3	3,2.10 ⁹
8	GMYk-1-GMYk-4	1,6.10 ¹⁰
9	GMYk-1-GMYk-5	6,3.10 ¹⁰
10	GMYk-2-GMYk-3	7,9.10 ¹⁰
11	GMYk-2-GMYk-4	4,0.10 ¹⁰
12	GMYk-2-GMYk-5	6,3.10 ¹⁰
13	GMYk-3-GMYk-4	4,0.10 ¹⁰
14	GMYk-3-GMYk-5	2,5.10 ¹⁰
15	GMYk-4-GMYk-5	7,9.10 ¹⁰
16	GMYk-1-GMYk-2-GMYk-3	3,1.10 ¹⁰
17	GMYk-1-GMYk-2-GMYk-4	2,5.10 ¹⁰
18	GMYk-1-GMYk-2-GMYk-5	3,2.10 ¹⁰
19	GMYk-2-GMYk-3-GMYk-4	5,0.10 ⁹
20	GMYk-2-GMYk-3-GMYk-5	8,0.10 ⁹
21	GMYk-3-GMYk-4-GMYk-5	3,0.10 ⁹
22	GMYk-1-GMYk-2-GMYk-3-GMYk-4	3,2.10 ¹⁰
23	GMYk-1-GMYk-2-GMYk-3-GMYk-5	1,6.10 ¹⁰
24	GMYk-2-GMYk-3-GMYk-4-GMYk-5	2,5.10 ¹⁰
25	GMYk-1-GMYk-2-GMYk-3-GMYk-4- GMYk-5	5,0.10 ¹⁰
26	Konsorsium A1	4,0.10 ¹²

Akhir-akhir ini istilah kosubstrat digunakan secara lebih luas sehingga berlaku bagi senyawa organik maupun anorganik. Kosubstrat berfungsi untuk meningkatkan kelarutan kontaminan hidrofobik, memacu pembentukan surfaktan, menyediakan sumber karbon yang lebih tersedia sehingga memacu pertumbuhan, meningkatkan kemampuan sel untuk menempel pada permukaan padatan (Lynch *et al.*, 1997; Ramsay *et al.*, 1988) dan mengaktifkan aktivitas enzim tertentu (Kanaly dan Harayama, 2000). Kosubstrat berupa senyawa organik disamping berperan sebagai sumber karbon tersedia juga berperan sebagai suplemen yang mendukung terjadinya kometabolisme (Ou dan Thomas, 1994).

Beberapa senyawa, misalnya fruktosa (Lynch *et al.*, 1997) dan glukosa (Jain *et al.*, 2005) telah digunakan sebagai kosubstrat dalam perombakan senyawa HAP. Menurut Ou dan Thomas (1994), perombakan fenamiphos mengalami peningkatan dengan penambahan ekstrak khamir 0,05%. Dalam penelitian tahap ini digunakan ekstrak khamir 0,05% sebagai kosubstrat. Ekstrak khamir adalah bagian terlarut dari khamir *Saccharomyces* spp. yang mengalami autolisis dan banyak mengandung nitrogen, karbon, vitamin serta asam amino yang memacu pertumbuhan bakteri. Ekstrak khamir juga mengandung beberapa senyawa aromatis (Ou dan Thomas, 1994).

Pada saat ditumbuhkan pada MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ kombinasi isolat GMYk-1, GMYk-2, GMYk-3, GMYk-4 dan GMYk-5 tidak menunjukkan sinergisme. Diantara kelima isolat yang diuji hanya GMYk-1 yang menunjukkan respon positif terhadap penambahan ekstrak khamir, sehingga dari lima isolat yang diuji, isolat GMYk-1 dipilih untuk penyusunan konsorsium bentukan. Isolat yang digunakan untuk menyusun konsorsium bentukan adalah: GMYs-1, GMYs-6, GMYs-7 dan GMYk-1.

Penyusunan Konsorsium Bentukan

Konsorsium bentukan disusun dengan menguji kemampuan perombakan dibenzofuran dari biakan campuran, berupa kombinasi antara isolat GMYs-1, GMYs-6, GMYs-7 dan GMYk-1 dalam MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹. Hasil pengamatan tahap ini disajikan pada

Gambar 3. Kemampuan perombakan biakan campuran (balok no. 4–15) sangat beragam.

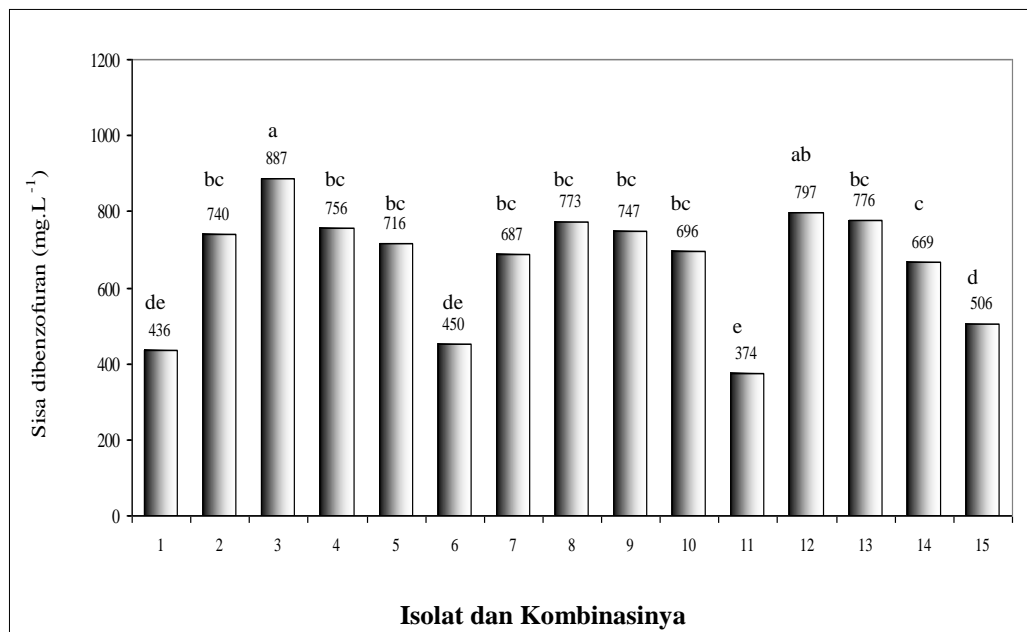
Biakan campuran GMYs-1-GMYs-6-GMYk-1 (balok no. 11) mempunyai kemampuan perombakan paling tinggi, sedangkan GMYs-1-GMYs-6-GMYs-7 (Balok no. 12) paling rendah. Setelah satu hari inkubasi, sisa dibenzofuran dalam biakan GMYs-1-GMYs-6-GMYk-1 dan GMYs-1-GMYs-6-GMYs-7 berturut-turut sebesar 374 dan 797 mg L⁻¹. Sisa dibenzofuran pada biakan campuran GMYs-1-GMYs-6-GMYk-1 tidak berbeda nyata dengan biakan GMYs-1 (Balok no. 1) maupun campuran GMYs-1-GMYk-1 (Balok no 6), namun demikian biakan campuran GMYs-1-GMYs-6-GMYk-1 dipilih sebagai konsorsium bentukan untuk digunakan dalam penelitian lebih lanjut. Biakan GMYs-1 dan GMYs-1-GMYk-1 tidak dipilih karena GMYs-1 berupa biakan tunggal sedangkan biakan GMYs-1-GMYk-1 hanya terdiri atas dua individu isolat dan salah satu anggotanya yaitu GMYk-1 mempunyai kemampuan perombakan dibenzofuran yang rendah. Keterbatasan ini dapat mengurangi keberhasilan pada saat biakan diaplikasikan di lapangan dengan kondisi lingkungan yang lebih beragam. Menurut Worm dan Duffy, 2003, diversitas dapat meningkatkan stabilitas komunitas karena keberadaan spesies yang lebih beragam mengakibatkan komunitas mampu beradaptasi terhadap kondisi lingkungan yang bervariasi.

Biakan campuran GMYs-1-GMYs-6-GMYs-7-GMYk-1 mempunyai kemampuan merombak dibenzofuran yang tidak berbeda nyata dengan GMYs-1 dan GMYs-1-GMYk-1. Namun demikian GMYs-1-GMYs-6-GMYs-7-GMYk-1 tidak dipilih sebagai konsorsium bentukan karena mempunyai kemampuan yang secara nyata lebih rendah daripada biakan GMYs-1-GMYs-6-GMYk-1. Sinergisme antara GMYs-1-GMYs-6-GMYk-1 dapat diketahui dengan membandingkan antara pertumbuhan sel dari masing-masing isolat saat ditumbuhkan secara individu dengan saat ditumbuhkan secara bersama sebagai biakan campuran (Tabel 2). Pada saat ditumbuhkan secara individu jumlah sel meningkat dari 1.10⁸ sel ml⁻¹ pada awal inkubasi menjadi berturut-turut sebesar 2,51.10¹⁰, 2,00. 10⁹, dan 5,01. 10⁸ sel

ml⁻¹ pada GMYs-1, GMYs-6 dan GMYk-1. Setiap isolat tumbuh lebih cepat dalam biakan campuran. Jumlah sel masing-masing GMYs-1, GMYs-6 dan GMYk-1 meningkat dari 0,33. 10⁸ sel ml⁻¹ pada awal inkubasi menjadi berturut-turut sebesar 2,40.10¹⁰, 3,10. 10¹⁰ dan 4,50. 10¹⁰ sel ml⁻¹.

Sedimen mangrove mengandung beragam bakteri yang mempunyai kemampuan perombakan terhadap senyawa hidrokarbon yang beragam pula. Jumlah bakteri perombak senyawa aromatik di sedimen mangrove mencapai 10⁴ sampai 10⁶ sel g⁻¹ sedimen (Ramsay *et al.*, 2000). Akhir-akhir ini penggunaan konsorsium bakteri untuk merombak senyawa hidrokarbon telah dikembangkan. Bakteri dari genera yang berbeda dapat saling bekerja sama dalam suatu lingkungan dan bertahan hidup melalui interaksi metabolit (de Souza *et al.*, 1998).

Penggunaan konsorsium untuk merombak HAP telah dilakukan (Bouches *et al.*, 1995; Bouches *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2000; Fortnagel *et al.*, 1990; Siciliano *et al.*, 2003; Murygina *et al.*, 2000; Ou dan Thomas, 1994). Biakan campuran mempunyai kemampuan perombakan yang lebih sempurna serta mempunyai toleransi yang lebih tinggi terhadap metabolit yang bersifat toksik (Trzesicka Mlynarz dan Ward 1995; Bouchez *et al.*, 1999). Beberapa konsorsium bentukan perombak HAP telah berhasil dikembangkan dari sedimen mangrove. Yu *et al.*, (2005) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa konsorsium bentukan yang terdiri atas tiga isolat bakteri, yakni *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp. dan *Pseudomonas* sp. mampu merombak fluorena dan pirena dengan baik. Seluruh fluorena dan pirena dalam medium cair terombak selama 4 minggu inkubasi.



Gambar 3. Perombakan dibenzofuran oleh individu isolat dan kombinasinya pada MMC-dibenzofuran mg L⁻¹. Waktu inkubasi 24 jam, jumlah sel awal 1.10⁸ sel.ml⁻¹. Balok dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%:

- | | | |
|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| 1. GMYs-1 | 6. GMYs-1- GMYk-1 | 11. GMYs-1- GMYs-6- GMYk-1 |
| 2. GMYs-6 | 7. GMYs-1- GMYs-7 | 12. GMYs-1- GMYs-6- GMYs-7 |
| 3. GMYk-1 | 8. GMYs-6- GMYs-7 | 13. GMYs-6- GMYs-7- GMYk-1 |
| 4. GMYs-7 | 9. GMYk-1- GMYs-7 | 14. GMYs-1- GMYs-7-GMD1 |
| 5. GMYs-1- GMYs-6 | 10. GMYs-6- GMYk-1 | 15. GMYs-1-GMYs-6-GMYs-7-GMYk-1 |

Tabel 2. Konsentrasi sel total dalam MMC-dibenzofuran 1000 mg L⁻¹ yang diinokulasi dengan individu GMYs-1, GMYs-6, GMYs-7 dan GMYk-1 serta kombinasinya.

Isolat dan Kombinasinya	Jumlah Sel (ml ⁻¹)
GMYs-1	2,51.10 ¹⁰ ab
GMYs-6	2,00.10 ⁹ abc
GMYk-1	5,01.10 ⁸ bc
GMYs-7	6,31.10 ⁷ c
GMYs-1 - GMYs-6- GMYk-1	1,00.10 ¹¹ a
Jumlah individu isolat: GMYs-1	2,40.10 ¹⁰
GMYs-6	3,10.10 ¹⁰
GMYk-1	4,50.10 ¹⁰

Keterangan: Waktu inkubasi: 24 jam. Jumlah inokulum biakan tunggal: 1.10⁸ sel ml⁻¹.
Jumlah inokulum masing-masing isolat dalam biakan campuran: 0,33. 10⁸

Simpulan dan Saran

Simpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sedimen mangrove di Indramayu Jawa Barat mengandung bakteri yang berperan dalam perombakan dibenzofuran. Konsorsium isolat bentukan mempunyai kemampuan merombak dibenzofuran lebih baik daripada isolat penyusunnya.

Saran

Penelitian ini perlu dikembangkan untuk mengetahui jenis metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing isolat dan biakan campurannya untuk mengungkap mekanisme interaksi yang terjadi diantara isolat penyusun konsorsium.

Ucapan Terima Kasih

Kami ucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta atas ijinnya untuk menggunakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.

Daftar Pustaka

- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press. San Diego.
- Amann, R.I., Ludwig, W. dan Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59: 143–169.

- Armengaud, J., Happe, B. dan Timmis, K.N. 1998. Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. Strain RW1: Catabolic genes dispersed on the genom. *J. Bacteriol.*, 180: 3954–3906.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., de Wachter, R., Verachtert, H. dan Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1834–1841.
- Bouchez, M., Blanchet, D. dan Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations-inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 156–164.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haeseler, F. dan Vandecasteele, J.P. 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation*, 10: 429–435.
- Carvalho, M.F., Alves, C.T.T., Ferreira, M.I.M., De Marco, P. dan Castro, P.M.L. 2001. Isolation and characterization of a bacterial consortium able to mineralize fluorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 102–105.
- De Clerck, E., Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J. dan De Vos, P. 2004. Isolation, characterization and identification of bacterial contaminant in semifinal gelatin extract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3664–3672.
- de Souza, M.L., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D.E., Hay, A., Sadowsky, M.J. dan Wackett, L.P. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 178–184.

Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Sedimen Mangrove

- Diaz, M.P., Grigson, S.J.W., Peppiatt, C.J. dan Burgess, J.G. 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar. Biotechnol.*, 2: 522–532.
- Fortnagel, P., Harms, H., Wittich, R.M., Khron, S., Meyer, H., Sinnwell, V., Wilkes, H. dan Franke, W. 1990. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the mixed culture HH27. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1148–1156.
- Huy, N.Q., Jin, S., Amada, K., Haruki, M., Huu, N.B., Hang, D.T., Ha, D.T., Imanaka, T., Morikawa, M. dan Kanaya, S. 1999. Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *J. Biosci. Bioeng.*, 88: 100–102.
- Jain, R.K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P. M., Bhattacharya, D. dan Thakur, I. S. 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Curr. Sci.* 89: 101-112.
- Kanaly, R.A. dan Harayama, S. 2000. Biodegradation of High-molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *J. Bacteriol.*, 182: 2059.
- Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H. dan Omori, T. 1997. Genes of enzymes involved in the biodegradation of carbazole, dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by bacteria. *Wat. Sci. Technol.*, 36: 9–16.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. dan Trevors, J.T. 2004. Review: Method of studying soil microbial diversity. *J. Microb. Meth.*, 58: 169–188.
- Lynch, R.M., Woodley, G.M. dan Lily, M.D. 1997. Process design for the oxidation of fluorobenzene to fluorocatechol by *Pseudomonas putida*. *J. Biotechnol.*, 58: 167–175.
- Megharaj, M., Wittich, R.M., Blasco, R. dan Pieper, D.H. 1997. Superior survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *Appl. Environ. Biotechnol.*, 48: 109–114.
- Murygina, V., Arinbasarov, M. dan Kalyuzhnyi, S. 2000. Bioremediation of oil polluted aquatic system and soil with novel preparation “Rhoder”. *Biodegradation*, 11: 385–389.
- Ou, L.T. dan Thomas, J.E. 1994. Influence of soil organic matter and soil surfaces on bacterial consortium that mineralize fenamiphos. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 58: 1148–1153.
- Poland, A. dan Knutson, J.C. 1982. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbon: Examination of the mechanisms of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22: 517–554.
- Rademaker, J.L. dan De Bruijn, F.J. 2000. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic finger printing and computer-assisted pattern analysis. Michigan State University, USA.
- Ramsay, M.A., Swannell, R.P.J., Shipton, W.A., Duke, N.C. dan Hill, R.T. 2000. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, 41: 413–419.
- Ramsay, B., McCarthy, J., Guerra-Santos, L., Kappeli, O. dan Fiechter, A. 1988. Biosurfactant production and diauxic growth of *Rhodococcus aurantiacus* when using n-alkanes as the carbon source. *Can. J. Microb.*, 34: 1209–1212.
- Safe, S. 1986. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26: 371–399.
- Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, K. dan Greer, C.W. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 483–489.
- Sylvia, D.M., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J. dan Zuberer, D.A. 2005. Glossary/Index. *Dalam: Principles and Applications of Soil Microbiology*. Pearson Education Inc. New Jersey. Pp.607–640.
- Trzesicka-Mlynarz, D. dan Ward, O.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can. J. Microb.*, 41: 470–476.
- Vacca, D.J., Bleam, W.F. dan Hickey, W.J. 2005. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 3797–3805.
- Vinas, M., Grifoll, M., Sabate, J. dan Solanas, A.M. 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J. Industrial Microb and Biotechnol.*, 28: 252–260.
- Ratih, Y.W., Radjagukguk, B., Martani, E. dan Prijambada, I.D. 2008. Karakteristik konsorsium bakteri perombak dibenzofuran dari sediment mangrove. *J. Manusia dan Lingkungan*, 15: 59–69.

- Wittich, R.M., Wilkes, H., Sinnwell, V., Franke, W. dan Fortnagel, P. 1992. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1005–1010.
- Worm, B. dan Duffy, J. E. 2003. Biodiversity, productivity and stability in real food webs. *TRENDS in Ecology and Evolution.*, 18: 628–632.
- Yabuuchi, E., Yamamoto, H., Terakubo, S., Okamura, N., Naka, T., Fujiwara, N., Kobayashi, K., Kasoka, Y. dan Hiraishi, K. 2001. Proposal of *Sphingomonas Witticchi* sp. Nov. for Strain RW1(T), known as a dibenzo-*p*-diokxin metabolizer. *Int. J. Syst. Environ.*, 55: 281–292.
- Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y.S. dan Tam, N.F.Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ. International.*, 31: 149–154.