

Seleksi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole (TCMTB)

Selection, Characterization and Identification of 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole (TCMTB) Degrading Bacteria

Langkah Sembiring^{1*}, Lela Susilawati¹, Dwi Suhartanti²

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
E-mail: lsembiring@yahoo.com *penulis untuk korespondensi

²Fakultas MIPA, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

Abstract

The objective of this research was to investigate the capabilities of bacteria isolated from industrial tanning waste to degrade TCMTB. The bacteria was initially screened, based on their tolerance to various concentration of TCMTB using paper disk method. Then, those strains were further analyzed in terms of their ability to produce ammonia (NH_4^+) and sulphate (SO_4^{2-}). Degradation activity was measured based on remaining residue of TCMTB analyzed using HPLC. The superior strain that showed the highest activity in degradation of TCMTB then were characterized and identified based on phenotypic and 16S rDNA sequence analysis. The result of the experiments showed that four selected strains among seven were chosen based on their high tolerance to various concentration of TCMTB, namely PK1, PK2, PK4 and PK6. All four strains showed the ability to produce ammonia and sulphate but three of which, namely PK2, PK4 and PK6 showed the high capability to degrade TCMTB. One particular strain (PK2) was observed to degrade TCMTB 40.8% within 7 days, but the others were less than 30%. Based on the phenotypic characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the best strains (PK2) was identified to be member of genus *Pseudomonas*.

Key words: biodegradation, TCMTB, industrial tanning waste, PCR, Sequencing

Diterima: 06 Oktober 2007, disetujui: 02 Mei 2008

Pendahuluan

Senyawa 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole (TCMTB) merupakan bahan aktif fungisida yang digunakan pada proses penyamakan kulit, karena efektif dalam mengendalikan pertumbuhan jamur yang sering ditemukan tumbuh pada kulit samak seperti *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. (Yapici dan Karaboz, 1997) dan *Paecilomyces* sp. (Birbir *et al.*, 1994). Fungisida TCMTB termasuk golongan pestisida organosulfur yang merupakan salah satu derivat benzothiazole. Toksisitas TCMTB dapat membahayakan organisme air terutama ikan sehingga menurunkan kemampuannya berenang (Ewing,

1999). Selain itu TCMTB dapat berakibat fatal pada mamalia, antara lain menyebabkan radang kulit, terbakar, iritasi mata, hidung dan kerongkongan, sesak dada dan mimisan (Hanssen *et al.*, 1991).

Aktivitas bakteri di alam berperan penting dalam proses degradasi TCMTB sehingga menghasilkan senyawa yang lebih aman di lingkungan. Beberapa bakteri yang telah diketahui mampu menggunakan TCMTB sebagai satu-satunya sumber karbon, nitrogen dan energi antara lain kelompok genus *Rhodococcus* (Gaja dan Knapp, 1997; de Wever *et al.*, 1998; Haroune *et al.*, 2002; Kirouani, 2003) dan *Alcaligenes* (Junker *et al.*, 1994). Namun jalur degradasi TCMTB oleh

mikrobia belum diketahui secara terperinci. Pemecahan ini diduga melalui jalur pemecahan ikatan *ortho* yang membentuk *catechol* (de wever et al., 1998; Haroune et al., 2002; Kirouani, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan tujuh isolat bakteri yang diisolasi dari limbah penyamakan kulit dalam mendegradasi TCMTB. Isolat unggul yang diperoleh kemudian dikarakterisasi secara fenotipik dan molekular, dengan analisis sekuen 16SrDNA.

Metode Penelitian

Isolat bakteri

Tujuh isolat yang diuji antara lain PK1, PK2, PK3, PK4, PK5, PK6 dan PK7.

Seleksi isolat berdasarkan toleransinya terhadap TCMTB

Isolat diuji toleransinya terhadap TCMTB dengan berbagai konsentrasi (20, 30, 40, 50, 60ppm), menggunakan metoda *paper disk* pada medium NA. Diameter zona jernih yang terbentuk diukur dan tingkat toleransi isolat didasarkan pada pertumbuhan isolat pada konsentrasi paling tinggi dengan ukuran diameter zona paling rendah atau tidak membentuk zona sama sekali. Pada tahapan ini diperoleh isolat terpilih untuk diuji lebih lanjut.

Seleksi penghasil ammonia dan sulfat

Kemampuan degradasi isolat terpilih diuji secara tidak langsung dengan analisis produksi NH_4^+ dan SO_4^{2-} pada medium cair minimal (*free* SO_4^{2-} dan NH_4^+) dengan menambahkan TCMTB sebagai sumber karbon dan nitrogen baik secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan metode Weatherburn dan Mainprize (Besse et al., 2001). Medium uji yang telah diinokulasi, diinkubasikan dengan *shaker* (150 rpm) pada suhu 37°C. Selama masa inkubasi, secara periodik (24 jam), pertumbuhan bakteri ditentukan dengan berat kering sel. Residu TCMTB dianalisis menggunakan HPLC.

Analisis TCMTB

Analisis residu TCMTB dilakukan menggunakan HPLC Shimadzu dengan kolom C-18, temperatur kamar, eluen asetonitril: air (2/8, v/v) dengan kecepatan 1ml/menit. Detektor yang dipakai adalah Shimadzu UV-Vis 295 nm. Lima ml sampel diambil secara periodik, kemudian disentrifugasi 12000 xg selama 5 menit dan supernatan yang terbentuk dilarutkan dalam 1-2 ml diklorometan, kemudian dielusi dengan metanol dan selanjutnya diinjeksikan pada kolom HPLC.

Karakterisasi dan identifikasi isolat pendegradasi TCMTB

Isolat pendegradasi TCMTB dikarakterisasi secara fenotipik dan molekular. Karakteristik fenotipik meliputi pengamatan morfologi sel dan koloni, karakter fisiologis dan biokimiawi. Identifikasi isolat berdasarkan karakter fenotipik dilakukan dengan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). Karakteristik molekular dilakukan dengan konstruksi *phylogenetic tree* berdasarkan sekuen 16S rDNA.

Amplifikasi 16S rDNA

DNA isolat bakteri diisolasi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Amplifikasi 16S rDNA menggunakan metoda PCR dengan primer universal yaitu 24F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-3') dan 1542R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Kondisi PCR yang digunakan adalah: denaturasi (94°C;30 detik), *annealing* (52°C;1,5 menit) dan *extension* (72°C;1 menit) dengan volume perial sampel 25µl. Produk PCR dipurifikasi dengan fenol:kloroform (Wasko et al., 2003). Sekuensing 16S rDNA dilakukan menggunakan *sequencer* model Perkin-Elmer ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystem). Data sekuen *dialignment* dengan program CLUSTAL X (Thomson et al., 1994). *Phylogenetic tree* dikonstruksi dengan metoda *neighbour-joining* menggunakan program PHYLIP (Felsenstein, 1999). *Nucleotide difference* dan matriks similaritas dikonstruksi menggunakan program PHYDIT (Chun, 1999).

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil seleksi tingkat toleransi isolat terhadap TCMTB diketahui bahwa empat isolat (PK1, PK2, PK4 dan PK6) menunjukkan tingkat toleransi tinggi, karena masih mampu tumbuh pada kisaran konsentrasi 30-40 ppm dengan tidak membentuk zona jernih. Sedangkan tiga isolat lainnya (PK3, PK5 dan PK7) tampak membentuk zona jernih pada konsentrasi 30ppm, diameternya berkisar antara 2,5-6,3 mm (Tabel 1.).

Menurut Spain dan van Veld (1983) tingkat adaptasi suatu mikrobial terhadap senyawa *xenobiotic* berperan penting dalam menentukan kemampuannya mendegradasi senyawa tersebut di lingkungan. Hal ini berkaitan dengan kapasitas metabolik mikrobial dalam menggunakan *xenobiotic* sebagai substrat pertumbuhan yang sifatnya *novel* (van der Meer *et al.*, 1992). Gaja dan Knapp (1997) melaporkan bahwa proses degradasi TCMTB diikuti oleh adanya penghasilan senyawa NH_4^+ dan SO_4^{2-} yang disertai dengan meningkatnya biomassa sel. Berdasarkan hal itu tampak bahwa keempat isolat berpotensi untuk mendegradasi TCMTB karena menghasilkan kedua senyawa tersebut (Tabel 2) meskipun kadar yang diperoleh rendah.

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh

Besse *et al.*, (2001) dan De Wever *et al.*, (1998). Menurut mereka hal ini kemungkinan disebabkan karena nitrogen dan sulfat diasimilasi sel atau diubah ke dalam bentuk senyawa lain selain NH_4^+ dan SO_4^{2-} . Namun tiga diantaranya (PK2, PK4, PK6) terpilih berdasarkan kadar NH_4^+ yang dihasilkan dan waktu pelepasan yang lebih cepat, sedangkan kadar SO_4^{2-} yang dihasilkan oleh ke-empat isolat tampak fluktuatif.

Setelah dianalisis, residu TCMTB yang terdapat dalam medium yang diinokulasi PK2, yang awalnya 40 ppm, menurun hingga 23,69 ppm (40,8%). Penurunan ini lebih tinggi dibandingkan dengan dua isolat lainnya (PK4, PK6), yang hanya mampu menurunkan persentase TCMTB masing-masing 27,3% dan 27,4% dengan masing-masing penurunan konsentrasi 29,07 ppm dan 29,04 ppm.

Berdasarkan hasil identifikasi isolat tingkat genus dengan metoda *profile matching* diketahui bahwa isolat unggul PK2 diidentifikasi sebagai anggota genus *Pseudomonas* (Tabel 3). Hasil ini didukung oleh identifikasi filetik secara molekular yaitu dengan konstruksi *phylogenetic tree* berdasarkan *partial sequence* 16S rDNA dan diketahui bahwa isolat PK2 diidentifikasi sebagai anggota genus *Pseudomonas* (Gambar 1).

Tabel 1. Hasil uji toleransi isolat terhadap variasi konsentrasi TCMTB berdasarkan diameter zona yang terbentuk (mm).

Kode Isolat	konsentrasi TCMTB (ppm)				
	20	30	40	50	60
PK1	+	+	+	+	1.0
PK2	+	+	+	3.0	4.0
PK3	+	3.0	4.0	3.0	4.0
PK4	+	+	4.0	3.0	3.0
PK5	+	2.5	2.5	3.0	5.0
PK6	+	+	+	2.0	3.0
PK7	+	4.0	6.0	6.0	6.3

Ket: + : tidak membentuk zona jernih.

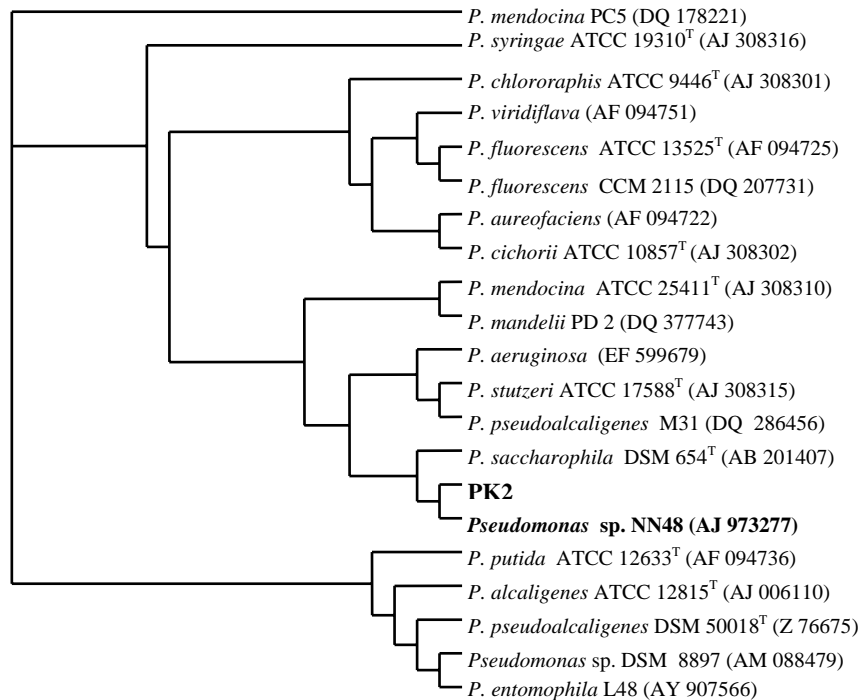
Tabel 2. Senyawa NH_4^+ dan SO_4^{2-} yang dihasilkan empat isolat terpilih setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 168 jam.

Jam Ke-	Penghasilan NH_4^+ (ppm)				Penghasilan SO_4^{2-} (ppm)			
	PK1	PK2	PK4	PK6	PK1	PK2	PK4	PK6
0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0,03	0	0	0,22
72	0	0	0	0	0,56	0,14	0,26	0,1
96	0	0	0,26	0,24	0,29	0,06	1,6	0,19
120	0	0,55	0,54	0,51	0,5	0,26	0,17	1
144	0,32	0,32	0,32	0,33	0,64	0,9	1,14	0,2
168	0,23	0,227	0,229	0,23	0,61	0,61	0,35	0,61

Tabel 3. Profile matching identifikasi isolat unggul PK2 dengan genus acuan berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994).

Unit Karakter	Genus <i>Pseudomonas</i>	PK2
Gram	negatif	negatif
Motilitas	motil	motil
Bentuk sel	batang pendek	batang pendek
Katalase	+	+
Oksidase	+	+
Ukuran sel (μm)	0.5-1.0x 0.5-5.0	0.5 x 1.5
Reduksi nitrat	+	+
Kebutuhan O_2	aerob	aerob
Optimum temperatur	NA	NA
Pertumbuhan pH<4,5	-	-
Pertumbuhan 41°C	+	+
Pertumbuhan 4°C	+	+
Hidrolisis gelatin	-	-
Hidrolisis pati	-	-
Endospora	NA	NA
Sumber C : glukosa	+/-	-
<i>d-xylose</i>	-	-
sukrosa	+/-	-
Susunan sel	NA	NA
Pigmentasi koloni (NA)	NA	NA
Penghasilan asam: glukosa	NA	NA
<i>d-xylose</i>	NA	NA
Pigmen fluoresen	+/-	-
Pigmen piosianin	+/-	-

NA: Not Applicable



Gambar 1. Pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan algoritma *Neighbour-joining* dengan menggunakan data sekuen 16S rDNA, menunjukkan hubungan kekerabatan antara isolat dengan strain acuan anggota genus *Pseudomonas*.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari 7 isolat yang diuji terpilih 4 isolat yang menunjukkan toleransi tinggi terhadap TCMTB dengan kisaran 30ppm-40ppm yaitu PK1, PK2, PK4 dan PK6. Penghasilan NH_4^+ dan SO_4^{2-} selama proses degradasi TCMTB dapat digunakan sebagai salah satu seleksi untuk mengetahui kemampuan isolat dalam mendegradasi TCMTB dan berdasarkan hal ini terseleksi tiga isolat yaitu PK2, PK4 dan PK6. Isolat PK2 merupakan isolat unggul dalam mendegradasi TCMTB dan berdasarkan karakteristik fenotipik dan molekular (sekuen 16S rDNA) isolat PK2 diidentifikasi sebagai anggota genus *Pseudomonas*.

Saran

Guna mengetahui kondisi optimum pertumbuhan isolat yang mendukung proses degradasi TCMTB perlu dilakukan penelitian

lebih lanjut antara lain melakukan optimasi pH, suhu dan kecepatan agitasi. Disamping itu jalur degradasi yang terjadi perlu juga untuk ditelaah mendalam kaitannya dengan enzim yang berperan dalam proses degradasi TCMTB. Isolat yang diketahui berpotensi dalam mendegradasi TCMTB perlu untuk diidentifikasi lebih lanjut hingga ke aras spesies dan kemungkinan untuk memperoleh isolat baru (*novel species*).

Daftar Pustaka

- Birbir, M., Ozyaral, O., Johansson, C. and Ilgaz, A. 1994. Mold Strains Isolated From Unfinished and Finished Leather Goods and Shoes. *J. of The American Leather Chemist Assosiation* 89: 14-19.
- Besse, P., Combourieu, B., Boyse, G., Sancelme, M., De Wever, H. and Delor, A.M. 2001. Long-Range ^1H - ^{15}N Heteronuclear Shift Correlation at Natural Abundance: a Tool Study Benzothiazole Biodegradation by Two *Rhodococcus* Strains. *Appl. and Enviro. Microbio.* 67 (4): 1412-1417.

- Chun, J. 1999. *PHYDIT (The Phylogenetic Molecular Sequence Editor) Version 3.0. User' Manual*.
- de Wever, H., Vereecken, K., Stolz, A. and Verachtert, H. 1998. Initial transformations in the Biodegradation of Benzothiazoles by *Rhodococcus* Isolates. *Appl. and Enviro. Microbio.* 64 (9): 3270-3274.
- Ewing, D.R. 1999. *Diminishing Return: Salmon Decline and Pesticides*. Oregon Pesticide Education Network (OPEN). USA.
- Felsenstein, J. 1999. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. User' Manual*.
- Gaja, M.A. and Knapp, J.S. 1997. The Microbial Degradation of Benzothiazole. *J. of Appl. Microbio.* 83: 327-334.
- Hanssen, H.W., Henderson, N.D. and Ward, J.E.H. 1991. *A Review of The Environmental Impact and Toxic Effect of TCMTB*. B.C. Environment Columbia.
- Haroune, N., Combourieu, B., Besse, P., Sancelme, M., Reemtsa, T., Kloepfer, A., Diab, A., Knapp, J.S., Baumberg, S. and Delort, A.M. 2002. Benzothiazole Degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* strain PA: Evidence of Catechol 1,2-Dioxygenase Activity. *Appl. and Enviro. Microbio.* 68: 6114-6120.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed.* Williams and Wilkins. Baltimore.
- Junker, F., Leisinger, T. and Cook, A.M. 1994. 3-Sulfocatechol 2,3-dioxygenase and Dioxygenases in the Degradative Pathways of 2-aminobenzenesulphonic, benzenesulphonic and 4-toluenesulphonic acids in *Alcaligenes* sp. Strain O-1. *Microbiology* 140: 1713-1722.
- Kirouani, H.H. 2003. Microbial and Photolytic Degradation of Benzothiazoles in Water and Wastewater. *Thesis*. Technical University of Berlin. http://edocs.tu-berlin.de/diss/2003/kirouani_hafida.pdf. 09/07/2005.
- Spain, J.C. and Van Veld, P.A. 1983. Adaptation of Natural Microbial Communities to Degradation of Xenobiotic Compound: Effects of Concentration, Exposure Time, Inoculum, and Chemical sStructure. *Appl. and Enviro. Microbio.* 45 (2): 428-435.
- Thomson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. *CLUSTAL X Version 1.6. User' Manual*.
- van der Meer, J.R., De Vos, W.M., Harayama, S. and Zehnder, A.J.B. 1992. Molecular Mechanism of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compound. *Microbiological Reviews* 56 (4): 677-694.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C. and Foresti, F. 2003. Non-destructive Genetic Sampling in Fish. An improved Method for DNA Extraction from Fish Fins and Scales. *Hereditas*. 138: 161-165.
- Yapici, M.B. and Karaboz, I. 1997. The Effect of Two anti-Fungal Compounds on the Growth of Molds that Frequently Appear on Tanned Leather. *J. of The American Leather Chemist Assosiation*. 92: 38-45.