

Seleksi dan Isolasi Bakteri Pengurai Senyawa Hidrokarbon Aromatik

Selection and Isolation of Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria

DWI SURYANTO^{1,3} & ANTONIUS SUWANTO^{2,3*}

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara,
Jalan Bioteknologi No. 1, Kampus USU Medan 20155

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor,
Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

³Pusat Penelitian Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Darmaga 16680

Thirty-four anoxygenic photosynthetic bacteria and 7 other environmental isolates were examined for their ability to grow anaerobically in light in monocyclic aromatic compound, including benzoate, salicylate (2-hydroxybenzoate), phenol, gentisate (2,5-dihydroxybenzoate), and catechol (1,2-benzenediol). Five aerobic bacteria were tested for aerobic utilization of the monocyclic aromatic compound. Twenty-seven out of 41 of isolated anoxygenic photosynthetic bacteria (65.8%) were able to grow in 5 mM benzoate. DS-1, DS-4, and Cas-13 of the anoxygenic photosynthetic bacteria and DS-8, MR1.2, and PG9.1 of the aerobic bacteria showed relatively short generation time. The ability of purple non-sulfur bacteria to grow in gentisate might be firstly reported. We also observed that MR1.2 was the only Gram positive isolate of the aerobic bacteria capable of growing in atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine).

Key words: anoxygenic photosynthetic bacteria, benzoate, atrazine

Banyak bakteri menunjukkan kemampuan menguraikan senyawa hidrokarbon aromatik secara aerob (Miethling & Karlson 1996), namun galur bakteri *Pseudomonas* dan *Bacillus* merupakan galur yang telah dipelajari secara intensif, baik kemampuan degradasi (Shen & Wang 1995) maupun genetiknya (Williams & Sayers 1994). Di samping itu, beberapa jenis ganggang (Semple & Cain 1996) dan cendawan (Spadaro *et al.* 1992) juga mempunyai kemampuan menguraikan senyawa hidrokarbon aromatik secara aerob.

Tidak seperti degradasi aerob, aspek degradasi anaerob senyawa aromatik monosiklik lebih sedikit mendapat perhatian. Meski demikian beberapa laporan menunjukkan kemampuan yang baik dari beberapa bakteri untuk melakukan degradasi secara anaerob. Kemampuan bakteri fotosintetik anoksigenik untuk tumbuh pada beberapa senyawa aromatik monosiklik, baik secara aerob maupun anaerob telah memungkinkan kelompok ini digunakan sebagai agens biodegradasi senyawa aromatik secara luas (Harwood & Gibson 1988).

Benzoat dan turunannya merupakan salah satu senyawa yang paling umum dilaporkan dapat diuraikan oleh bakteri fotosintetik anoksigenik (Harwood & Gibson 1988). Beberapa penelitian juga menunjukkan kemampuan bakteri fotosintetik anoksigenik dalam mengkatabolisme senyawa aromatik selain benzoat. Blasco & Castillo (1992) melihat bahwa *Rhodobacter*

capsulatus E1F1 dapat mendegradasi mononitrofenol dan dinitrofenol menggunakan asetat sebagai sumber karbon. *Rhodopseudomonas palustris* dapat memanfaatkan banyak jenis fenolat, asam aromatik terhidroksilasi dan termetoksilasi, aldehida aromatik, dan asam hidroaromatik (Harwood & Gibson 1988), dan juga mengkatabolisme senyawa piridin dan pirazin (Sasikala *et al.* 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi dan mengisolasi bakteri yang mampu menguraikan senyawa benzoat, fenol, salisilat, gentisat, katekol, dan atrazin. Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh isolat bakteri yang mampu menguraikan senyawa hidrokarbon aromatik monosiklik.

BAHAN DAN METODE

Penapisan Bakteri Fotosintetik Anoksigenik pada Senyawa Hidrokarbon Aromatik. Penapisan bakteri fotosintetik anoksigenik dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri yang berasal dari koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, Pusat Penelitian Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor dan dari lingkungan pada media Sistrom yang dimodifikasi dalam tabung ulir 10 ml yang diisi penuh. Dalam 2000 ml media mengandung 5.44 g KH_2PO_4 , 0.39 g NH_4Cl , 1 g NaCl , 0.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0884 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.004 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 μl NH_4 -molibdat 1%, 0.2 ml unsur kelumit (0.1765 mg/l EDTA, 0.1540 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

* Penulis untuk korespondensi, Tel. 62-251-625965, Fax. 62-251-315107, E-mail: asuwanto@indo.net.id

0.0392 mg/l CuSO₄·5H₂O, 0.0248 mg/l Co(NO₃)₂·6H₂O, dan 0.011 mg/ml H₃BO₃, dan 0.2 ml vitamin (1 mg/ml asam nikotinat, 0.5 mg/ml tiamina, dan 0.01 mg/ml biotina), dengan 1 mM dan 5mM Na-benzoat, 0.1 mM fenol, 5 mM Na-salisilat (2-hidroksi-benzoat), dan 0.5 mM katekol sebagai sumber karbon. Pengujian beberapa isolat murni pada 5 mM gentisat (2,5-dihidroksi-benzoat) menggunakan media agar-agar Sistrom modifikasi dengan kondisi pertumbuhan sama dengan media cair.

Penapisan Bakteri Aerob pada Senyawa Hidrokarbon Aromatik. Penapisan bakteri aerob dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri yang berasal dari lingkungan pada media garam modifikasi yang dalam 1 000 ml media mengandung 0.5 g K₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 g NH₄Cl, 1 g MgSO₄·7H₂O, 20 µl NH₄-molibdat 1%, 0.2 ml unsur kelumit (0.1765 mg/l EDTA, 0.1540 mg/l MnSO₄·2H₂O, 0.5 mg/l ZnSO₄·7H₂O, 0.0392 mg/l CuSO₄·5H₂O, 0.0248 mg/l Co(NO₃)₂·6H₂O, dan 0.011 mg/ml H₃BO₃), dan 0.05 ml vitamin (1 µg/ml asam nikotinat, 0.5 µg/ml tiamina, dan 0.01 µg/ml biotina), dengan 5 mM Na-benzoat sebagai sumber karbon. Hasil penapisan digores pada media agar-agar garam modifikasi yang mengandung 5 mM benzoat untuk memperoleh isolat murni. Kemampuan tumbuh isolat pada 5 mM Na-gentisat, 1 mM fenol, 5 mM Na-salisilat, dan 1 mM atrazin (2-kloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazin) (kemurnian 90%) dilihat dengan cara menggores koloni tunggal pada media agar-agar garam modifikasi dengan sumber C senyawa hidrokarbon aromatik tersebut. Kecuali fenol semua senyawa aromatik disterilkan menggunakan filter.

Uji Kemampuan Tumbuh Isolat pada Benzoat. Uji kemampuan penggunaan benzoat dari isolat hasil penapisan aerob dilakukan dalam labu Erlenmeyer 250 ml berisi 50 ml media garam modifikasi yang mengandung 5 mM Na-benzoat dengan penggoyangan 200 putaran per menit pada suhu 30°C. Untuk isolat bakteri fotosintetik anoksigenik, uji serupa dilakukan dalam tabung 100 ml yang diisi penuh dengan media Sistrom modifikasi dengan 5 mM Na-benzoat. Kultur ditumbuhkan secara anaerob fototrof dengan pencahayaan lampu Tungsten 40 W yang diletakkan pada jarak 30 cm dari kultur. Kemasaman awal semua media diatur sekitar 7.2. Densitas sel diukur sebagai absorbansi pada panjang gelombang 660 nm (Harwood & Gibson 1988) menggunakan spektrofotometer *Novaspec II* (Pharmacia). Jumlah sel awal setiap pengujian dalam media sekitar 5 · 10⁶ sel/ml.

HASIL DAN PEMBAHASAN

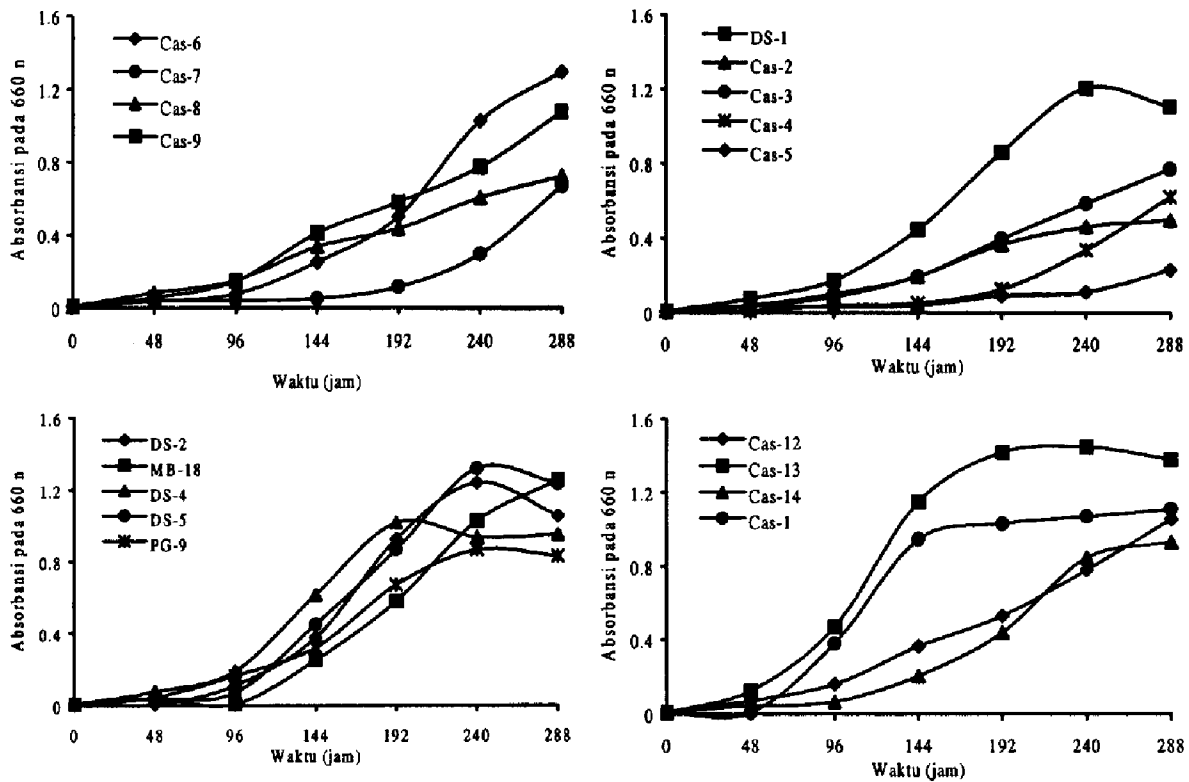
Hasil pengujian kemampuan tumbuh bakteri fotosintetik anoksigenik pada media Sistrom modifikasi dengan 5 mM benzoat sebagai sumber C menunjukkan 15 isolat (36.6%) mampu tumbuh dengan baik, 12 isolat (29.3%) tumbuh lambat, dan 14 isolat (34.1%) tidak dapat tumbuh. Meskipun beberapa isolat tumbuh lambat, persentase jumlah isolat uji termasuk isolat lingkungan yang mampu menggunakan benzoat cukup tinggi (65.8%) (Tabel 1.). Hal ini menunjukkan bahwa kelompok bakteri fotosintetik anoksigenik yang diuji merupakan

Tabel 1. Data kemampuan tumbuh bakteri pada senyawa aromatik pada kondisi anaerob dengan penyinaran lampu Tungsten 40 W berjarak 30 cm.

Nama Isolat	Asal	5mM Benzoat	5mM Salisilat	0.5mM Katekol	0.1mM Fenol	5mM Gentisat	GT pada Benzoat (jam)
Laboratorium							
MB-7	Kalteng	+	-	-	-	+	?
Cas-1	Maluku	+++	-	-	-	td	52
Cas-2	Maluku	+++	-	-	-	+	61
Cas-3	Maluku	+++	-	-	-	td	58
Cas-4	Maluku	++	-	-	-	+	106
Cas-5	Maluku	+	-	-	-	+	?
Cas-6	Maluku	+++	-	-	-	td	63
Cas-7	Maluku	+++	-	-	-	+	65
Cas-8	Maluku	+++	-	-	-	td	52
Cas-9	Maluku	+++	-	-	-	td	545
Cas-10	Maluku	+	-	-	-	td	?
Cas-11	Maluku	+	-	-	-	td	?
Cas-12	Maluku	+++	-	-	-	td	52
Cas-13	Maluku	+++	-	-	-	+	285
PG-9	Kalteng	+++	-	-	-	+	552
Waduk Permai	Kalbar	-	-	-	-	td	-
MT-2	Kalteng	+	-	-	-	td	?
BW17A	Kalteng	-	-	-	-	td	-
SKX121	Kalteng	-	-	-	-	td	-
BW12	Kalteng	-	-	-	-	td	-
Cikamai	Jawa Barat	-	-	-	-	td	-
MR-1	Kalteng	+	-	-	-	td	?
PG-5	Kalteng	+	-	-	-	td	?
PG-1	Kalteng	+	-	-	-	td	?
MB-1	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-2	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-3	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-12.1	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-15	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-18	Kalteng	+	-	-	-	td	?
MB-21.2	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-31	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-60	Kalteng	-	-	-	-	td	-
MB-61	Kalteng	-	-	-	-	td	-
Contoh Lingkungan (air atau tanah)							
DS-1	Jawa Barat	++++	-	-	-	+	38
DS-2	Jawa Barat	++	-	-	-	td	85
DS-3	DIY	+	-	-	-	td	?
DS-4	DIY	++++	-	-	-	+	47
DS-5	DIY	+++	-	-	-	td	64
DS-6	DIY	+	-	-	-	td	?
DS-7	DIY	+	-	-	-	td	?
A-1	DIY	-	-	-	-	-	-
A-2	DIY	-	-	-	-	-	-
A-3	DIY	-	-	-	-	-	-
A-4	DIY	-	-	-	-	-	-
A-5	DIY	-	-	-	-	-	-
A-6	DIY	-	-	-	-	-	-
A-7	DIY	-	-	-	-	-	-
A-8	DIY	-	-	-	-	-	-

Kalteng: Kalimantan Tengah; Kalbar: Kalimantan Barat; +++++: tumbuh sangat baik; +++: tumbuh baik; ++: tumbuh sedang; +: tumbuh kurang baik; -: tidak tumbuh; td: tidak diuji; ?: tumbuh sangat lambat, waktu generasi (GT) tidak dihitung. Contoh lingkungan dengan kode A tidak tumbuh pada penapisan 1 mM benzoat.

kelompok yang umumnya dapat menguraikan benzoat. Bakteri fotosintetik anoksigenik yang diuji diperkirakan memiliki gen yang bertanggung jawab terhadap degradasi benzoat melalui



Gambar 1. Grafik pertumbuhan beberapa isolat bakteri fotosintetik anoksigenik dalam media Sistrom modifikasi dengan 5 mM benzoat sebagai sumber C.

jalur anaerob (Pelletier & Harwood 1998). Tidak seperti pemecahan senyawa aromatik monosiklik pada bakteri aerob yang sering menghasilkan intermediet katekol atau turunannya yang dilanjutkan dengan penyigaran cincin aromatik (Williams & Sayers 1994), pemecahan senyawa aromatik monosiklik melalui jalur anaerob menghasilkan intermediet 2-ketosikloheksana-1-karboksil-KoA tepat sebelum penyigaran cincin (Pelletier & Harwood 1998). Dari kelompok bakteri fotosintetik anoksigenik, *R. palustris* merupakan bakteri yang paling banyak dilaporkan mampu menggunakan benzoat sebagai sumber C (Harwood & Gibson 1988).

Waktu generasi (GT) bakteri fotosintetik anoksigenik pada 5 mM benzoat tercepat ditunjukkan oleh isolat Cas-13, DS-1, dan DS-4 masing-masing 28.5 jam, 38 jam, dan 47 jam. Isolat dengan GT yang dapat dihitung ditampilkan pada Gambar 1. Tujuh dari 15 contoh lingkungan menunjukkan kemampuan tumbuh pada penapisan dengan 1 mM dan 5 mM benzoat (Tabel 1). Meskipun demikian, dalam contoh tersebut bukan berarti tidak ada bakteri fotosintetik anoksigenik. Tidak semua kelompok bakteri ini mampu menggunakan benzoat seperti yang diperlihatkan oleh beberapa isolat laboratorium. Bakteri ini merupakan bakteri yang distribusinya sangat luas di habitat tanah dan air (Kobayashi *et al.* 1967).

Tidak ada pertumbuhan bakteri fotosintetik anoksigenik ditunjukkan dalam 1 mM fenol, 5 mM salisilat, dan 0.5 mM katekol. Pengujian sembilan isolat terhadap 5 mM gentsiat memperlihatkan adanya pertumbuhan. Meskipun Harwood &

Tabel 2. Data kemampuan tumbuh bakteri pada senyawa aromatik pada kondisi aerob.

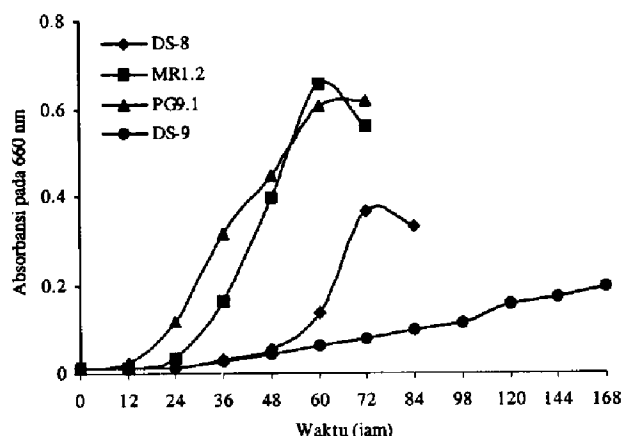
Nama Isolat	Asal	5 mM Benzoat	5 mM Salisilat	1 mM Fenol	1 mM Atrazin	5 mM Gentsiat	GT pada Benzoat (jam)
DS-8	Jawa Barat	++++	++	++++	-	+	11.4
MR1.2	Kalteng	++++	++	++++	++++	+	9.3
PG9.1	Kalteng	++++	+	-	-	+	12
MR1.1	Kalteng	++	+	+	-	-	?
DS-9	Jawa Barat	++	-	+	-	+	26.6

Kalteng: Kalimantan Tengah; +++++: tumbuh sangat baik; +++: tumbuh baik; ++: tumbuh sedang; +: tumbuh kurang baik; -: tidak tumbuh.

Gibson (1988) melaporkan kemampuan *R. palustris* mengkatabolisme beberapa asam aromatik terhidrosilasi, kemampuan tumbuh bakteri fotosintetik anoksigenik pada gentsiat (2,5-dihidroksibenzoat) mungkin pertama kali dilaporkan.

Kemampuan tumbuh bakteri aerob dalam berbagai senyawa aromatik monosiklik ditunjukkan dalam Tabel 2. Umumnya degradasi senyawa ini oleh bakteri aerob pada tahap awal menghasilkan intermediet katekol atau turunannya (Williams & Sayers 1994), namun Altenschmidt *et al.* (1993) melihat bakteri denitrifikasi *Pseudomonas* sp. KB740 pada tahap awal jalur oksidasi benzoat melewati benzoil-koenzim A dan 3-hidroksibenzoil-koenzim A. Tahap ini lebih mirip tahap awal degradasi anaerob oleh bakteri fotosintetik anoksigenik (Pelletier & Harwood 1998).

Seperti halnya bakteri fotosintetik anoksigenik (Gambar 1.), respons isolat aerob yang berbeda terhadap penggunaan



Gambar 2. Grafik pertumbuhan isolat bakteri aerob dalam media garam modifikasi dengan 5 mM benzoat sebagai sumber C.

benzoat sebagai sumber C ditunjukkan oleh fase lag dan GT yang berbeda untuk masing-masing isolat (Gambar 2). Waktu generasi PG9.1 dan DS-8 dalam 5 mM benzoat berturut-turut 12 jam dan 11.4 jam. Meskipun dapat menggunakan benzoat sebagai sumber C, isolat DS-9 merupakan isolat yang relatif lambat tumbuh dibandingkan isolat aerob lain (Gambar 2). Isolat Gram positif MR1.2 tumbuh dengan baik pada semua senyawa aromatik yang diujikan dengan GT pada benzoat 9.3 jam. Sangat disayangkan isolat ini tidak dapat dianalisis lebih lanjut karena mati. Isolat DS-8 hanya tidak dapat tumbuh pada 1 mM atrazin. Isolat PG9.1 tidak tumbuh pada 1 mM fenol dan 1 mM atrazin.

Semua isolat uji dapat tumbuh pada salisilat dan gentisat. Hal ini mungkin mengindikasikan bahwa gentisat merupakan intermediet dalam katabolisme salisilat seperti yang dilaporkan Grund *et al.* 1990 dan Fuenmayor *et al.* 1998. Beberapa kajian biokimia degradasi salisilat dan gentisat memang telah dilakukan (Altenschmidt *et al.* 1993, Fuenmayor *et al.* 1998, Werwath *et al.* 1998), namun tetap dirasa belum memadai (Werwath *et al.* 1998).

Isolat Gram negatif MR1.1 meskipun pada penapisan dalam media agar-agar garam modifikasi dengan 5 mM benzoat dapat tumbuh, namun ketika diuji dalam media cair pertumbuhannya terhambat. Warna coklat kehitaman yang ditimbulkan karena konversi benzoat mengindikasikan isolat ini hanya mampu mengkonversi benzoat sampai ke katekol atau derivatnya saja, mengesampingkan kemungkinan isolat ini mengkonversi benzoat menjadi senyawa berbahaya seperti protoanemonin seperti yang dilaporkan oleh Blasco *et al.* (1997) terhadap degradasi senyawa 4-klorobifenil. Isolat MR1.1 mungkin tidak memiliki enzim untuk tahap pemecahan cincin aromatik yang mampu meneruskan degradasi setelah katekol intermediet (Williams & Sayers 1994).

DAFTAR PUSTAKA

- Altenschmidt, U., B. Oswald, E. Steiner, H. Herrmann & G. Fuchs. 1993. New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *J. Bacteriol.* **175**:4851-4858.
- Blasco, R. & F. Castillo. 1992. Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* EIF1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:690-695.
- Blasco, R., M. Mallavarapu, R. Wittich, K.N. Timmis & D.H. Pieper. 1997. Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:427-434.
- Fuenmayor, S.L., M. Wild, A.L. Boyes & P.A. Williams. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J. Bacteriol.* **180**:2522-2530.
- Grund, E., C. Knorr & R. Eichenlaub. 1990. Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1459-1464.
- Harwood, C.S. & J. Gibson. 1988. Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:712-717.
- Kobayashi, M., E. Takahashi & K. Kawaguchi. 1967. Distribution of nitrogen-fixing microorganisms in paddy soils of Southeast Asia. *Soil Science* **104**:113-118.
- Miethling, R. & U. Karlson. 1996. Accelerated mineralization of pentachlorophenol in soil upon inoculation with *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP1 and *Sphingomonas chlorophenolica* RA2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4361-4366.
- Pelletier, D.A. & C.S. Harwood. 1998. 2-Ketocyclohexanecarboxyl coenzyme A hydrolase, the ring cleavage enzyme required for anaerobic benzoate degradation by *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **180**:2330-2336.
- Sasikala, C., C.V. Ramana & P.R. Rao. 1994. Photometabolism of heterocyclic aromatic compounds by *Rhodospseudomonas palustris* OU 11. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2187-2190.
- Semple, K.T. & R.B. Cain. 1996. Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1264-1273.
- Shen, H. & Y. Wang. 1995. Simultaneous chromium reduction and phenol degradation in a coculture of *Escherichia coli* ATCC 33456 and *Pseudomonas putida* DMP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2754-2758.
- Spadaro, J.T., M.H. Gold & V. Renganathan. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2397-2401.
- Werwath, J., H.A. Arfmann, D.H. Pieper, K.N. Timmis & R. Wittich. 1998. Biochemical and genetic characterization of a gentisate 1,2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW5. *J. Bacteriol.* **180**:4171-4176.
- Williams, P.A. & J.R. Sayers. 1994. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegrad.* **5**:195-217.