

KARAKTERISTIK KONSORSIUM BAKTERI PEROMBAK DIBENZOFURAN DARI SEDIMEN MANGROVE.

(Dibenzofuran-degrading Bacterial Consortium Characteristics from Mangrove Sediments)

Yanisworo Wijayaratih*, Bostang Radjagukguk**, Erni Martani**, Irfan D. Prijambada.**

*Jurusan Ilmu Tanah, Fak. Pertanian, UPN "Veteran" Yogyakarta.

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

**Fakultas Pertanian, UGM, Yogyakarta

Diterima: 11 Desember 2007

Disetujui: 8 Februari 2008

Abstrak

Dibenzofuran merupakan salah satu senyawa hidrokarbon aromatis polisiklik yang terdiri atas dua cincin benzene yang dihubungkan melalui satu atom oksigen dan satu atom karbon. Dibenzofuran yang mengalami klorinasi bersifat lebih meracun dari pada senyawa asalnya, dibenzofuran. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsorsium bakteri perombak dibenzofuran dari sediment mangrove serta menyelidiki sifat mikrobiologisnya. Konsorsium dikembangkan dari sediment mangrove menggunakan medium mineral cair yang diperkaya dengan 1000 mg l⁻¹ dibenzofuran sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsorsium yang diperoleh mempunyai kemampuan merombak dibenzofuran yang relatif tinggi. Kecepatan perombakan konsorsium terpilih adalah 211,5 mg l⁻¹ hari⁻¹. Dari konsorsium terpilih diperoleh lima isolat bakteri. Pertumbuhan konsorsium lebih tinggi dari pada masing-masing isolat atau kombinasinya. Jumlah bakteri dalam konsorsium terpilih mencapai 3,9x10¹² CFU ml⁻¹ sedangkan pada masing-masing isolat dan kombinasinya berkisar dari 1,0x10⁸ sampai 7,9x10¹⁰ CFU ml⁻¹.

Kata kunci: Perombak-dibenzofuran, konsorsium, mangrove.

Abstract

Dibenzofuran is a one of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds that consists of two benzene rings that are inter connected by one oxygen atom and one carbon. Chlorinated dibenzofuran can be more toxic chemical than the original compound, dibenzofuran. The present study was conducted to obtain the dibenzofuran-degrading bacterial consortium from mangrove sediments and to investigate their microbiological characteristics. The bacterial consortium were developed from mangrove sediments by enrichment liquid minerals medium with 1000 ppm dibenzofuran as the sole source of carbon and energy. The results showed that the consortium had relative high ability to degrade dibenzofuran. The degradation rates of dibenzofuran by the consortium was 211.5 mg l⁻¹ day⁻¹. There were five bacterial isolates in the consortium. The growth of the consortium was higher than that of the individual isolates or their combinations. The number of bacteria in the consortium was 3.9x10¹² CFU ml⁻¹ where as the number of the individual isolate or their combinations ranging from 1.0x10⁸ to 7.9x10¹⁰ CFU ml⁻¹.

Keywords: *Dibenzofuran-degradation, consortium, mangrove*

PENDAHULUAN

Dibenzofuran merupakan salah satu senyawa hidrokarbon aromatis polisiklik (HAP) yang mengandung oksigen. Dibenzofuran terdiri atas dua cincin benzen yang dihubungkan dengan satu atom oksigen dan satu karbon. Seperti senyawa HAP pada umumnya dibenzofuran bersifat hidrofobik. Hal ini mengakibatkan dibenzofuran semakin bersifat persisten. Senyawa dibenzofuran maupun dibenzofuran berkhlor semakin banyak dijumpai di alam sebagai hasil samping pembuatan pestisida, pembakaran senyawa yang mengandung khlor, limbah industri seperti pemutihan pulp, dan lain-lain. Senyawa dibenzo berkhlor dikenal sangat toksik, terutama pada kulit dan hati, dapat menimbulkan kerusakan pada sistem endokrin, mampu menginduksi kerja beberapa kelompok enzim, dan dapat memacu timbulnya tumor (Poland dan Knutson, 1982; Safe, 1986). Dibenzofuran dapat dijadikan senyawa model karena beberapa bakteri perombak dibenzofuran juga diketahui mempunyai kemampuan untuk merombak senyawa lain yang mirip seperti dibenzodioksin, fluorene, fluoranthene, dibenzofuran terkhlorinasi, serta phenanthrene dan anthrasene melalui kometabolisme (Habe *et al.*, 2004; Iida *et al.*, 2002; Yamazoe *et al.*, 2004)

Beberapa mikroorganisme perombak dibenzofuran telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber: lingkungan air (sungai), tanah, maupun lumpur aktif. *Sphingomonas wittichii* strain RW1, *Terrabacter* sp. Strain DBF63, *Rhodococcus* sp., *Janibacter* sp, dan *Pseudomonas* sp. Strain HH69 merupakan beberapa bakteri yang mempunyai kemampuan merombak dibenzofuran dengan baik (Megharaj *et al.*, 1997; Monna *et al.*, 1993; Noumura *et al.*, 2004). Perombakan dibenzofuran oleh biakan tunggal bakteri mengalami hambatan pada beberapa tahap metabolik sehingga terjadi akumulasi senyawa trihidroksibifenil (De'Enza, 2002) maupun asam salisilat dan gentisat (Fortnagel *et al.*, 1990).

Penggunaan konsorsium, yang terdiri atas campuran beberapa strain bakteri, 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; Oudan 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). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perombakan senyawa HAP oleh konsorsium bakteri berlangsung lebih cepat dan sempurna dari pada oleh bakteri tunggal. Penggunaan konsorsium bakteri untuk merombak dibenzofuran belum pernah dilaporkan. Pada umumnya HAP dapat dirombak oleh konsorsium bakteri, dan dibenzofuran berpotensi mudah dirombak oleh konsorsium bakteri.

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan konsorsium bakteri yang mampu merombak dibenzofuran dengan cepat serta mengetahui karakter mikrobiologis perombakannya. Konsorsium berasal dari sedimen mangrove. Sebagai lahan basah sedimen mangrove mempunyai aktivitas dan keragaman mikroorganisme yang lebih tinggi daripada ekosistem yang lain. Perakaran tanaman mangrove membentuk rhizosfer yang teroksidasi dan mengandung bermacam-macam substrat sehingga merupakan zone kaya yang sangat baik bagi aktivitas mikroorganisme (Macek *et al.*, 2000). Dalam sedimen mangrove terdapat bakteri *indigenus* perombak HAP yang beragam (Daane *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2005; Ramsay *et al.*, 2000), sehingga dimungkinkan untuk mendapatkan konsorsium bakteri yang dapat merombak dibenzofuran dengan baik.

Dilakukan pula penelitian terhadap kemampuan perombakan dibenzofuran oleh *Sphingomonas Wittichii* strain RW1 sebagai pembanding. Strain ini dikenal sebagai bakteri perombak dibenzofuran yang handal dan sudah dikarakterisasi secara biokimia maupun molekular (Wittich *et al.*, 1992; Armengaud *et al.*, 1998; Yabuuci *et al.*, 2001).

METODOLOGI

Pengembangan konsorsium dan karakterisasi perombakan konsorsium

Sumber konsorsium adalah sedimen mangrove di daerah Indramayu yang dikulturkan menjadi empat biakan (biakan A1, biakan A2, biakan R1, dan biakan R2). Biakan A1 dan A2 dibuat untuk sedimen di sistem perakaran tanaman *Avicennia*, sedangkan biakan R1 dan R2 dari sedimen di sistem perakaran *Rhizophora*. Lima gram sedimen dimasukkan ke dalam 50 ml medium mineral cair (MMC) yang ditambah dengan 1000 mg l⁻¹ dibenzofuran sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi (MMC-1000mg l⁻¹-dibenzofuran). Komposisi MMC (mg l⁻¹) adalah: Na₂HPO₄·12H₂O-2200; NH₄NO₃-3000; KH₂PO₄-800; MgSO₄·7H₂O-100; FeCl₃·6H₂O-10; CaCl₂·2H₂O-50 dan NaCl-500. Dibenzofuran disiapkan dengan konsentrasi 50.000 mg l⁻¹ dalam etil asetat, diambil dengan volume tertentu sehingga memberikan konsentrasi yang diinginkan dan dimasukkan ke dalam bejana steril. MMC steril ditambahkan ke bejana tersebut setelah etil asetat habis menguap.

Biakan diinkubasikan selama satu minggu di atas meja penggojog (150 rpm), selanjutnya 5% dari biakan diambil, reinokulasikan pada MMC-1000mg l⁻¹-dibenzofuran segar (disebut subkultur 1), dan diinkubasikan kembali. Reinokulasi pada medium segar dilakukan tujuh kali. Pengamatan sisa dibenzofuran pada biakan dan jumlah sel dilakukan pada subkultur 1, 3, 5, dan 7 di akhir inkubasi. Biakan yang mempunyai kemampuan perombakan dibenzofuran yang paling cepat ditentukan sebagai konsorsium terpilih dan dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui karakter mikrobiologis dan perombakan-nya.

Pengujian karakter perombakan dilakukan melalui percobaan pertumbuhan menggunakan MMC-1000mg l⁻¹-dibenzofuran. Inokulum berupa konsorsium terpilih ditambahkan hingga jumlah sel awal mencapai 5.10⁷ sel ml⁻¹. Biakan diinkubasikan selama 3 hari dengan digojog

150 rpm. Pengamatan sisa dibenzofuran dilakukan setiap 24 jam dengan pengambilan sampel secara terbuang. Kemampuan perombakan dibenzofuran oleh *Sphingomonas Wittichii* strain RW1, sebagai pembanding, dilakukan dengan cara yang sama.

Analisis sisa dibenzofuran:

Sisa dibenzofuran dalam biakan cair dianalisis dengan cara menambahkan etil asetat pada biakan cair (1:1). Phenantrene, sebagai internal standart, ditambahkan sehingga kadarnya mencapai 200 ppm. Selanjutnya divortek selama satu menit. Fase bening etil asetat dilewatkan pada kolom yang berisi Na₂SO₄ untuk menghilangkan airnya. Selanjutnya sebanyak 1 µl disuntikkan ke dalam GC dengan kondisi operasional sebagai berikut: kolom yang digunakan adalah Kapiler HP1, suhu kolom dan detektor adalah 250°C dan 260°C, tekanan gas pembawa (N₂) sebesar 150 kPa.

Isolasi bakteri yang terdapat dalam konsorsium terpilih.

Bakteri yang terdapat dalam konsorsium terpilih diisolasi menggunakan medium Nutrien Agar (NA) dengan metode *surface plating*. Koloni tunggal yang menunjukkan morfologi yang berbeda diambil sebagai isolat. Isolat yang diperoleh dimurnikan dan disimpan dalam medium NA.

Pertumbuhan individu isolat dan biakan campuran pada MMC-1000mg l⁻¹-dibenzofuran.

Masing-masing isolat murni dan biakan campuran yang berupa kombinasi dari masing-masing isolat diuji dengan menggunakan MMC-1000mg l⁻¹-dibenzofuran. Masing-masing inokulum ditambahkan ke dalam medium hingga konsentrasi awal mencapai 5.10⁷ sel ml⁻¹, diinkubasikan selama tujuh hari di atas meja penggojog (150 rpm). Jumlah sel ditentukan setelah tujuh hari inkubasi menggunakan metode *surface plating* pada medium NA dalam petridish.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengembangan konsorsium dan karakterisasi perombakan dibenzofuran.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsorsium bakteri perombak dibenzofuran dapat dibentuk dari sedimen di bawah tegakan mangrove. Keempat biakan (biakan A1, biakan A2, biakan R1, dan biakan R2) yang dibuat menunjukkan aktivitas perombakan dibenzofuran yang beragam (Tabel 1). Setelah inkubasi selama tujuh hari, pada subkultur tiga dan seterusnya dari biakan A1, sisa dibenzofuran dalam medium tidak terdeteksi lagi, sedangkan dalam biakan A2, R1, dan R2 dibenzofuran masih dapat dijumpai. Kemampuan perombakan biakan A2 secara nyata sama dengan biakan R1. Sisa dibenzofuran pada subkultur 3 dari biakan A2 dan R1 tidak berbeda nyata, yaitu berturut-turut sebesar 44 dan 69 mg l⁻¹. Aktivitas perombakan biakan A2 maupun R1 menunjukkan kestabilan pada subkultur berikutnya. Sisa dibenzofuran masing-masing biakan A2 dan R1 pada subkultur 5 dan 7 tidak berbeda

nyata dengan subkultur 3. Sisa dibenzofuran biakan R2 pada subkultur 3, 5 dan 7 juga tidak berbeda nyata, berturut-turut sebesar 159, 162, dan 149 mg l⁻¹, secara nyata lebih tinggi dari pada biakan A1, R1, maupun R2. Berdasarkan analisis terhadap sisa dibenzofuran maka biakan A1 mempunyai kemampuan merombak dibenzofuran paling baik dibandingkan dengan ke tiga biakan lainnya, kemampuan perombakan biakan A2 dan R1 lebih rendah daripada A1, namun lebih tinggi dari pada biakan R2. Jumlah sel maksimum yang dicapai oleh biakan A1, A2, R1 dan R2 hampir sama yaitu sekitar 10¹² CFU ml⁻¹ (Tabel 2). Biakan A1 mempunyai kemampuan perombakan dibenzofuran yang paling baik dibandingkan dengan ketiga biakan lainnya, sehingga ditentukan sebagai konsorsium terpilih untuk dianalisis lebih lanjut.

Dalam penelitian ini dibenzofuran digunakan sebagai satu satunya sumber karbon dan energi untuk aktivitas sel sehingga pertumbuhan merupakan implikasi kemampuannya untuk merombak, memineralisasi dan mengasimilasi senyawa tersebut.

Tabel 1. Perombakan dibenzofuran oleh biakan A1, biakan A2, biakan R1, dan biakan R2.

Biakan	Sisa dibenzofuran (mg l ⁻¹) dalam medium pada subkultur			
	1	3	5	7
A1	83 <i>de</i>	0 <i>f</i>	0 <i>f</i>	0 <i>f</i>
A2	699 <i>a</i>	44 <i>e</i>	67 <i>de</i>	86 <i>de</i>
R1	704 <i>a</i>	69 <i>de</i>	97 <i>d</i>	105 <i>d</i>
R2	549 <i>b</i>	159 <i>c</i>	162 <i>c</i>	149 <i>c</i>

1. Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada taraf uji 5%.
2. Jumlah dibenzofuran awal adalah 1000 mg l⁻¹. Inkubasi dilakukan selama tujuh hari.

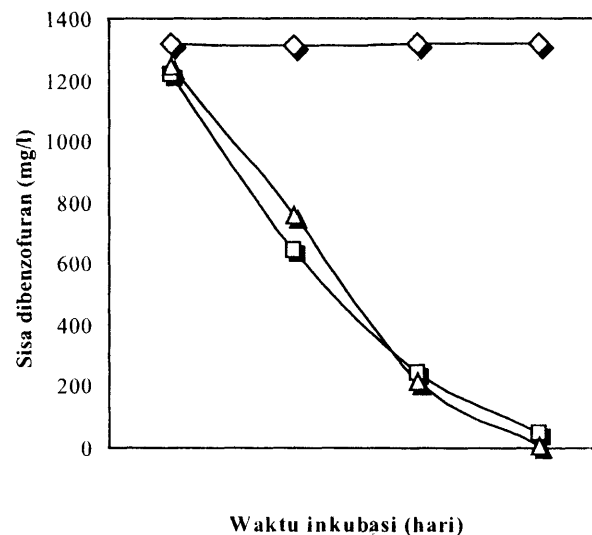
Tabel 2. Kepadatan sel dalam biakan A1, A2, R1, dan R2 setelah tujuh hari inkubasi.

Biakan	Jumlah sel (ml ⁻¹) dalam subkultur			
	1	3	5	7
A1	5,0.10 ⁷	10,0.10 ⁹	2,5.10 ¹²	4,0.10 ¹²
A2	2,3.10 ⁷	0,8.10 ⁹	0,2.10 ¹²	3,0.10 ¹²
R1	1,0.10 ⁷	8,3.10 ⁹	1,2.10 ¹²	4,0.10 ¹²
R2	1,7.10 ⁷	7,9.10 ⁹	0,3.10 ¹²	1,0.10 ¹²

Lahan basah seperti sedimen mangrove mengandung mikroorganisme yang mempunyai kemampuan untuk merombak senyawa hidrokarbon (Daane et al., 2001; Diaz et al., 2000; Guo et al., 2005; Ramsay et al., 2000). Beberapa konsorsium bakteri perombak hidrokarbon telah dikembangkan dari sedimen mangrove. Kemampuannya dalam merombak HAP beragam. Perbedaan kemampuan konsorsium yang dihasilkan tergantung dari jenis HAP yang ditambahkan ke dalam medium pengembang, sifat fisik dan kimiawi sedimen mangrove, serta struktur komunitas mikroorganisme *indigenious*. Guo et al., 2005 dan Tam et al., 2003, membuktikan bahwa kontaminasi, tipe polutan, sifat sedimen terutama kadar bahan organik dan tekstur tanah mempengaruhi struktur komunitas mikroorganisme dalam sedimen mangrove.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsorsium yang berhasil dikembangkan dari sedimen mangrove di Indramayu mempunyai aktivitas perombakan dibenzofuran

yang beragam. Berdasarkan analisis pada sisa dibenzofuran, maka biakan A1 secara nyata mempunyai kemampuan perombakan yang paling baik dibandingkan ke tiga biakan lainnya. Kemampuan perombakan dibenzofuran biakan A2 sama dengan R1, lebih rendah dari pada biakan A1, namun lebih tinggi daripada R2. Guo et al. (2005), melaporkan bahwa tujuh konsorsium yang dikembangkannya dari sedimen mangrove di Hongkong, dua diantaranya mempunyai kemampuan perombakan terhadap phenanthrene dan fluoranthene dengan cepat, sedangkan satu diantaranya lambat. Konsorsia yang dibentuk dari sedimen mangrove di Sai Keng dan Ho Chung mempunyai kemampuan merombak 90% phenanthrene dan fluoranthene (masing-masing 10 mg l⁻¹) selama 7 hari. Sebaliknya konsorsium dari Kei Ling Ha Lo Wai mampu merombak kurang dari 4e0% phenanthrene dan fluoranthene. Keragaman kemampuan perombakan konsorsium yang dikembangkan dari sedimen mangrove juga dilaporkan oleh Tam et al., (2003).



Gambar 1. Perombakan dibenzofuran oleh konsorsium-A1 (□), *Sphingomonas wittichii* RW1 (Δ), dan kontrol (◇) pada Medium Mineral Cair yang diperkaya dengan dibenzofuran.

Meskipun biakan A1 secara nyata mempunyai kemampuan perombakan yang paling baik dibandingkan ke tiga biakan lainnya namun jumlah sel maksimum yang dicapai setelah tujuh hari inkubasi pada ke empat biakan hampir sama, sekitar 1×10^{12} CFU ml⁻¹. Karena pengamatan jumlah sel dan sisa dibenzofuran hanya dilakukan pada akhir inkubasi, maka kecepatan perombakan dibenzofuran dan kecepatan pertumbuhan sel tidak dapat ditentukan. Hal ini mengakibatkan seolah-olah antara pertumbuhan sel dan aktivitas perombakan dibenzofuran tidak berkaitan. Data yang diperoleh akan lebih informatif apabila perubahan parameter diikuti dengan frekuensi pengamatan yang lebih tinggi, sehingga kecepatan pertumbuhan dan kecepatan perombakan dibenzofuran dapat ditentukan dan dibandingkan.

Karakteristik perombakan dibenzofuran oleh konsorsium A1 maupun *Sphingomonas wittichii* RW1 dapat dilihat pada gambar 1 dan tabel 3. Perombakan dibenzofuran dari kedua biakan terjadi secara eksponensial. Penurunan dibenzofuran terjadi karena aktivitas sel mengingat selama inkubasi tidak menunjukkan pengurangan kadar senyawa pada kontrol.

Dapat ditentukan bahwa kecepatan perombakan dibenzofuran oleh konsorsium A1 dan *Sphingomonas wittichii* RW1 berturut-turut sebesar 211,5 dan 232,4 mg l⁻¹ hari⁻¹. Dengan demikian 100% dibenzofuran-1000 mg l⁻¹ akan

terombak oleh konsorsium A1 atau *Sphingomonas wittichii* RW1 berturut-turut dalam waktu 4,3 atau 4,7 hari. Hasil uji homogenitas terhadap koefisien regresi menunjukkan bahwa kecepatan perombakan dibenzofuran oleh konsorsium A1 tidak berbeda nyata dengan *Sphingomonas wittichii* RW1.

Konsorsium A1 mempunyai kemampuan perombakan yang relatif tinggi. Guo *et al.* (2005), dalam penelitiannya mendapatkan bahwa konsorsium yang diperolehnya dari sedimen mangrove Sai Keng di Hongkong mempunyai kemampuan merombak 90% phenanthrene-10mg l⁻¹ dan fluoranthene-10mg l⁻¹, serta 100% pyrene-10mg l⁻¹ dalam waktu tujuh hari. Konsorsium yang dikembangkan dari sedimen mangrove oleh Diaz *et al.*, 2000, mempunyai kemampuan merombak 80% minyak mentah-1% dalam waktu 20 hari.

Kecepatan perombakan dibenzofuran oleh konsorsium A1 sama dengan kecepatan perombakan oleh *Sphingomonas wittichii* RW1, yang sudah dikenal sebagai bakteri yang mempunyai kemampuan merombak dibenzofuran yang handal. Namun demikian penggunaan biakan campuran atau konsorsium dalam merombak senyawa HAP biasanya mempunyai keunggulan dibandingkan dengan biakan tunggal. Pada biakan campuran terjadinya akumulasi metabolit dapat dihindari karena biakan campuran mempunyai kapasitas perombakan yang lebih komplit.

Tabel 3. Kecepatan perombakan (k) konsorsium A1 dan *Sphingomonas wittichii* RW1 dalam MMC-1000mg l⁻¹-dibenzofuran berdasarkan persamaan regresi antara waktu inkubasi dan sisa dibenzofuran.

Biakan	Persamaan regresi	r ²	k (mg l ⁻¹ hari ⁻¹)
Konsorsium A1	$\ln y = -1,6807x + 7,95$	0,8759	211,5
<i>S. wittichii</i> RW1	$\ln y = -1,8589x + 8,00$	0,9309	232,4

Keterangan:

Uji homogenitas terhadap koefisien persamaan regresi (taraf nyata 5%) menunjukkan bahwa

$t_{hitung} = 0,4857 < t_{tabel} = 2,776$ dengan demikian kedua persamaan bersifat tidak beda nyata atau homogen (Gomez dan Gomez, 1995).

Dalam suatu konsorsium, bakteri dari genera yang berbeda dapat saling bekerjasama dan bertahan hidup melalui interaksi metabolit. Mikroorganisme tertentu mungkin tidak mampu menggunakan suatu senyawa sebagai satu-satunya sumber karbon, namun dapat menggunakan metabolitnya, sehingga terjadi sinergisme selama perombakan berlangsung (Trzesicka-mlynarz dan Ward 1995; Bouchez *et al.*, 1999). Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai jenis metabolit yang dihasilkan oleh konsorsium A1 untuk mendukung pernyataan di atas.

Isolasi bakteri yang terdapat dalam biakan-A1 dan karakterisasi pertumbuhan.

Pengujian mikrobiologis terhadap konsorsium menunjukkan bahwa melalui metode pengayaan biakan dan isolasi dapat diperoleh lima strain bakteri dari konsorsium A1. Kelima isolat diberi notasi: GMY1, GMY2, GMY3, GMY4, dan GMY5. Semua isolat bersifat Gram negatif, berbentuk batang. Masing-masing isolat dan kombinasinya menunjukkan pertumbuhan pada MMC-1000 mg/l-1-dibenzofuran sehingga secara nyata mengalami peningkatan jumlah sel, kecuali isolat GMY5 (Gambar 2, balok 5) yang tidak berbeda nyata dengan jumlah sel awal (balok 27). Namun demikian kemampuan pertumbuhan masing-masing isolat dan kombinasinya lebih rendah dibandingkan dengan konsorsium A1 (balok 26)

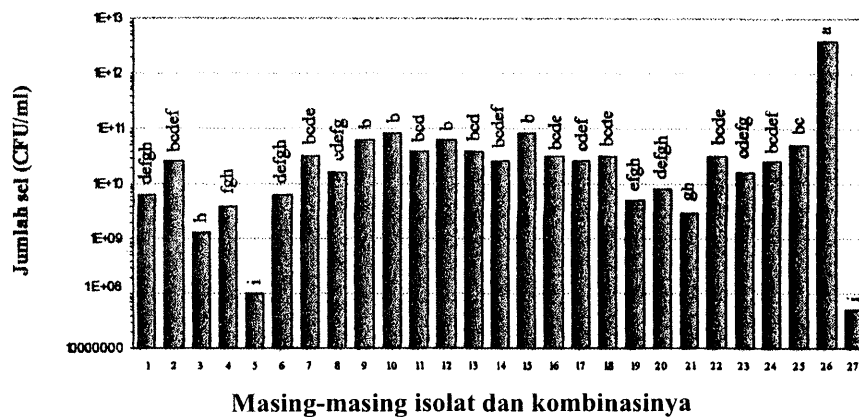
Selama tujuh hari inkubasi kepadatan biakan GMY1, GMY2, GMY3, GMY4, dan GMY5 berturut-turut sebesar $6,3 \times 10^9$; 25×10^9 ; $1,3 \times 10^9$; $4,0 \times 10^9$ dan $1,0 \times 10^8$ CFU ml⁻¹ (Gambar 2, balok 1, 2, 3, 4, dan 5), sedangkan jumlah sel pada konsorsium A1 mencapai $3,9 \times 10^{12}$ CFU ml⁻¹. Pertumbuhan sel merupakan representasi dari pemanfaatan dibenzofuran sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi, dengan demikian perombakan dibenzofuran oleh masing-masing isolat kurang efisien dibandingkan dengan komunitasnya dalam bentuk konsorsium.

Guo *et al.* (2005), meneliti tiga strain isolat yang masing-masing diisolasi dari konsorsium

yang diperoleh dari 3 sedimen mangrove yang berbeda di Hongkong. Isolat *Sphingomonas* sp. yang diperoleh dari Ma Wan mempunyai kemampuan merombak HAP yang lebih rendah daripada kemampuan konsorsiumnya. Dua isolat lain yaitu *Paracoccus* sp. dan *Rhodococcus* sp., masing-masing diperoleh dari Sheung Ma Wan dan Ho Chung, mempunyai kemampuan merombak HAP yang lebih cepat dari pada konsorsiumnya. Diduga bahwa ke dua isolat tersebut merupakan bakteri kunci pada perombakan HAP.

Jumlah sel biakan campuran yang dicapai berkisar antara 3×10^9 CFU ml⁻¹ pada GMY3-GMY4-GMY5 (balok 21) sampai dengan 79×10^9 CFU ml⁻¹ pada GMY4-GMY5 (balok 15). Jumlah sel biakan yang terdiri atas lima isolat, GMY1, GMY2, GMY3, GMY4, dan GMY5 mencapai 50×10^9 CFU ml⁻¹ (balok 25), lebih rendah dibandingkan dengan kepadatan sel pada konsorsium A1 yang mencapai $3,9 \times 10^{12}$ CFU ml⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam konsorsium A1 terdapat bakteri lain yang tidak terisolasi yang berperan penting dalam perombakan dibenzofuran. Peran bakteri tersebut memungkinkan terjadinya proses sinergisme sehingga perombakan dibenzofuran dan pertumbuhan sel dalam konsorsium A1 lebih cepat.

Tampaknya untuk mendapatkan isolat yang lebih baik perlu dipelajari lebih dalam tentang metode pengayaan dan isolasi yang sesuai. Teknik mikrobiologi secara konvensional hanya mampu membiakkan 0,1% sampai dengan 1% dari keseluruhan populasi yang ada (Amann *et al.*, 1995). Pada dasarnya keragaman bakteri dapat dipelajari secara konvensional dengan metode pengayaan biasa. Pengayaan secara konvensional dilakukan dengan menambahkan senyawa tertentu ke dalam medium sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi sehingga akan terjadi seleksi. Jasad yang tumbuh adalah yang mampu menggunakan senyawa tersebut, sedangkan jasad lain akan tersingkirkan. Keragaman yang terungkap sangat tergantung dari metode pengayaan yang digunakan dan modifikasi yang dilakukan.



Gambar 2. kepadatan sel masing-masing isolat dan kombinasinya pada MMC-1000mg/l-1-dibenzofuran setelah tujuh hari inkubasi. Balok dengan huruf yang tidak sama adalah berbeda nyata.

Balok no.

- | | | |
|--------------|--------------------|------------------------------|
| 1. GMY1 | 10. GMY2-GMY3 | 19. GMY2-GMY3-GMY4 |
| 2. GMY2 | 11. GMY2-GMY4 | 20. GMY2-GMY3-GMY5 |
| 3. GMY3 | 12. GMY2-GMY5 | 21. GMY3-GMY4-GMY5 |
| 4. GMY4 | 13. GMY3-GMY4 | 22. GMY1-GMY2-GMY3-GMY4 |
| 5. GMY5 | 14. GMY3-GMY5 | 23. GMY1-GMY2-GMY3-GMY5 |
| 6. GMY1-GMY2 | 15. GMY4-GMY5 | 24. GMY2-GMY3-GMY4-GMY5 |
| 7. GMY1-GMY3 | 16. GMY1-GMY2-GMY3 | 25. GMY1-GMY2-GMY3-GMY4-GMY5 |
| 8. GMY1-GMY4 | 17. GMY1-GMY2-GMY4 | 26. Konsorsium A1 |
| 9. GMY1-GMY5 | 18. GMY1-GMY2-GMY5 | 27. Jumlah sel awal |

Suryawan (2005), dari sumber isolat yang sama dengan yang digunakan dalam penelitian ini, dengan cara pengayaan yang sama namun waktu inkubasi diperpanjang dari 7 menjadi 15 hari, berhasil mendapatkan beberapa isolat bakteri yang mempunyai kemampuan perombakan dibenzofuran yang lebih tinggi. Nampaknya terjadi suksesi mikroorganisme selama perombakan dibenzofuran oleh komunitas mikroorganisme dalam sedimen mangrove. Greene *et al.* (2000), juga menunjukkan terjadinya suksesi antara *Pseudomonas* dan *Rhodococcus* ke *Alcaligenes* selama perombakan HAP di dalam tanah.

Dua prosedur yang berbeda dibandingkan untuk mengisolasi bakteri perombak HAP

dari tanah dan lumpur yang tercemar senyawa tersebut. 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 dihasilkan berbeda. Dari cara pertama bakteri utama yang terseleksi adalah *Sphingomonas* spp, sedangkan dari cara kedua berupa *Mycobacterium* spp. (Bastiaens *et al.*, 2000). Hasil yang mirip ditunjukkan pada saat Vacca *et al.* (2005), mengisolasi bakteri perombak Phenanthrene terjerap pada asam humat. Tiga strain yang diperoleh: *Burkholderia* spp., *Delffia* sp, dan *Sphingomonas* sp.

mampu merombak HAP yang terjerap pada asam humat, sedangkan 25 strain lain yang diisolasi dengan cara konvensional tidak dapat menggunakan phenanthrene bentuk terjerap. Stach dan Burns (2002), dengan membuat biakan biofilm, berdasarkan analisis terhadap 16s dan 18s rDNA-single strain polimorfism conformation (SSCP) mendapatkan 36 strain bakteri dari tanah pasiran yang dikontaminasi dengan creosote, sedangkan dengan metode pengayaan konvensional hanya diperoleh 12 strain bakteri.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsorsium bakteri perombak dibenzofuran dapat diperoleh dari sedimen mangrove. Kemampuan perombakan konsorsium terpilih tidak berbeda nyata dengan kemampuan *Sphingomonas Wittichii* strain RW1. Diperoleh lima isolat bakteri dari konsorsium terpilih. Aktivitas pertumbuhan masing-masing isolat maupun kombinasinya lebih rendah dibandingkan dengan pertumbuhannya dalam bentuk konsorsium.

Ucapan terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Timmis Kennet, Divisi Mycrobiology GBF, National Research Centre for Biotechnology, Germany, yang telah memberi *Sphingomonas Wittichii* strain RW1.

Penelitian ini dibiayai Ditjen Dikti Depdiknas berdasarkan surat perjanjian Nomor 159/5P2H/PP/DP2M/III/2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1995. Phyllogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59:143-169.
- Armengaud, J., Happe, B. and Timmis, K. N. 1998. Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. Strain RW1: Catabolic genes dispersed on the genom. *J. Bacteriology*. 3954-3906.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., de Wachter, R., Veractert, H. and Diels, L. 2000. Isolation af adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carries. *Appl. Environmental Microbiology*. 66:1834-1841.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele, J.P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by pure culture and by defined strain association: Inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:156-164.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haeseler, F., and Vandecasteele, J.P. 1999. Efficiency of defined strains of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixture. *Biodegradation*. 10:429-435.
- Carvalho, M. F., Alves, C.T.T., Ferreira, M.I.M, De Marco, P., and Castro, P.M.L. 2001. Isolation and characterization of a bacterial consortium able to mineralize fluorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:102-105.
- Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J. and Haggblom, M. M. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with rhizosphere of salt march plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2683-2691.
- D'Enza, von Marina. 2002. Genetic and biochemical characterization of two new extradiol dioxygenases of *Sphingomonas* sp. Strain RW1 and construction of two gene cassettes for biodegradation of dibenzofuran and dioxin. Dissertation Von der Gemein samen Naturwissenschaftlichen Fakultat der Technischen Universitat Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

- Diaz, M.P., Grigson, S.J.W., Peppatt, C.J., and 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., Harm, H., Wittich, R. M., Krohn, S., Meyer, H., Sinnwell, V., Wilkes, H. and Francke, W. 1990. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the mixed culture HH27. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1148-1156.
- Gomez, K. A. dan Gomez, A. A. 1995. Prosedur statistik untuk penelitian pertanian. 2nd. Ed. Diterjemahkan oleh: Syamsudin, E. dan Baharsyah, J. S. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Greens, E. A., Kay, J. G., Jaker, K., Stehmeier, L. G., and Voordouw, G. 2000. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5282-5289.
- Guo, C. L., Zhou, H. W., Wong, Y. S. and Tam, N. F. Y. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Marine Pollution Bulletin.* 51:1054-1061.
- Habe, H., Ching, J. S., Kato, H., Ayabe, Y., Kasuga, K., Yoshida, T., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2004. Characterization of the upper pathway genes for fluorene metabolism in *Terrabacter* sp. Strain DBF 63. *Journal of Bacteriology.* 186:5938-5944.
- Iida, T., Mukouzaka, Y., Nakamura, K., Yamaguchi, I. and Kudo, T. 2002. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading actinomycetes: Analysis of multiple extradiol dioxygenase genes in dibenzofuran-degrading *Rhodococcus* species. *Bioscience Biotechnology and Biotechnology.* 66:1462-1472.
- Macek, T., Mackova, M., and Kas, J. 2000. Exploitation of plants for the removal of organic in environmental remediation. *Biotechnology Advances.* 18:23-34.
- Megharaj, M., Wittich, R. M., Blasco, R., Pieper, D. H. and Timmis, K. N. 1997. Superior survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran in soil by soil-adapted *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:109-114.
- Monna, L., Omori, T. and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. *Appl. Environ. Microbiology.* 59:285-289.
- Murygina, V., Arinbasarov, M., and Kalyuzhnyi, S. 2000. Bioremediation of oil polluted aquatic system and soil with novel preparaton "Rhoder". *Biodegradation.* 11:385-389.
- Noumura, T., Habe, H., Widada, J., Chung, J., Yoshida, T., Nojiri, H., and Omori, T. 2004. Genetic characterization of the dibenzofuran-degrading actinobacteria carrying the *dbfA1A2* gene homologues isolated from activated sludge. *FEMS Microbiology Letters.* 239:147-155.
- Ou, L.T and 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. and 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.
- Ramsay, M.A., Swannel, R.P.J., Shipton, W.A., Duke, N.C., and Hill, R.T. 2000. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin.* 41:413-419.
- 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. and Greer, C.W. 2003. Changes in microbial community composition and function

- during a polyaromatic hydrocarbon phyto-remediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:483-489.
- Stach, J. M., and Burns, R. G. 2002. Enrichment versus biofilm culture: a fundamental and phylogenetic, comparison of polyaromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environmental Microbiology*. 4: 169-182.
- Suryawan, D. 2005. Keanekaragaman genetik bakteri pendegradasi dibenzofuran yang diisolasi dari tanah hutan bakau dengan dan tanpa melalui proses pengayaan. Tesis Sarjana-S2. Program Studi Bioteknologi, UGM.
- Tam, N.F.Y., Guo, C.L., Yau, W.Y., Ke, L., and Wong, Y.S. 2003. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia enriched from mangrove sediments. *Water Sci. & Technol.* 48:177-183.
- Trzesicka-mlynarz, D. and Ward, O. P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures obtain from PAH-contaminated soil. *Canadian Journal of Microb.* 41:470-476.
- Vacca, D.J., Bleam, W.F., and Hickey, W.J. 2005. Isolation of bacteria adapted to humic acid-sorp phenanthrene. *Appl Environmental Microbiology*. 71:3797-3855.
- Wittich, R. M., Wilkes, H., Sinnwell, V., Francke, W. and Fortnagel, P. 1992. Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *Appl. Environ. Microbiology* 1005-1010.
- Yabuuchi, E., Terakubo, S., Okamura, N., Naka, T., Kobayashi, K., Kosaka, Y., and Hiraishi, A. 2001. Proposal of *Sphingomonas wittichii* sp. Nov. for strain RW1 (T), known as a dibenzo-p-dioxin metabolizer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:281-292.
- Yamazoe, A., Yogi, O., and Oyaizu, H. 2004. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly isolated dibenzofuran-utilizing *Janibacter* sp strain YY-1. *Applied Microbiology and Biotechnol.* 65:211-218.