

PERTUMBUHAN BAKTERI LAUT *Shewanella indica* LBF-1-0076 DALAM NAFTALENA DAN DETEKSI GEN NAFTALENA DIOKSIGENASE

*(The Growth of Marine Bacteria Shewanella indica LBF-1-0076 in Naphthalene
and Naphthalene Dioxygenase Gene Detection)*

Nuzul Farini¹⁾, Ahmad Thontowi²⁾, Elvi Yetti²⁾, Suryani¹⁾ dan Yopi²⁾

¹Departemen Biokimia, FMIPA, IPB, Jl. Raya Dramaga, 16680, Bogor, Indonesia

²Lab. Biokatalis dan Fermentasi, Puslit. Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor Km.46, 16911,
Bogor, Indonesia

e-mail: ahmad.thontowi@lipi.go.id

Naskah diterima 1 September 2016, revisi akhir 5 Februari 2017 dan disetujui untuk diterbitkan
6 Februari 2017

ABSTRAK. Eksploitasi minyak bumi yang sering terjadi di laut mengakibatkan adanya pencemaran minyak di laut. Naftalena merupakan salah satu senyawa dominan berbahaya yang terkandung dalam minyak bumi dan dapat mengakibatkan pencemaran perairan. Penelitian ini menggunakan bakteri laut LBF-1-0076 yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi naftalena. Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari pengaruh parameter konsentrasi naftalena dan konsentrasi sel terhadap bakteri laut pendegradasi naftalena LBF-1-0076. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengidentifikasi isolat LBF-1-0076 dan mendeteksi gen pengkode naftalena dioksigenase. Berdasarkan hasil uji pertumbuhan, degradasi naftalena yang optimal oleh isolat LBF-1-0076 terjadi pada konsentrasi naftalena 75 ppm dengan konsentrasi sel 15. Hasil analisis gen 16S rDNA menunjukkan isolat LBF-1-0076 teridentifikasi sebagai *Shewanella indica* strain 0102 dengan nilai keidentikan 99%. Hasil deteksi gen naftalena dioksigenase dengan menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) menunjukkan bahwa isolat tersebut mempunyai gen naftalena dioksigenase dengan ukuran ± 377 bp. Oleh karena itu, isolat LBF-1-0076 berpotensi sebagai agen bioremediasi untuk mengatasi masalah pencemaran minyak bumi di laut.

Kata kunci: bakteri laut, minyak bumi, naftalena, naftalena dioksigenase, *Shewanella indica*

ABSTRACT. Crude oil exploitation which often occurred offshore can cause water pollution in the sea since it contains naphthalene which is a hazardous compound. This research used marine bacteria LBF-1-0076 that have ability in naphthalene degradation. This research aimed to study the parameter effect of naphthalene and cell concentration toward marine bacteria LBF-1-0076. This research also identified isolate LBF-1-0076 and detected the encode gene of naphthalene dioxygenase. Based on growth test result, the optimum naphthalene degradation by isolate LBF-1-0076 occurred in 75 ppm naphthalene concentration with 15 cell concentration. The result of 16S rDNA gene analysis showed that LBF-1-0076 was identified as *Shewanella indica* strain 0102 with identical value 99%. The result of naphthalene dioxygenase gene detection using Polymerase Chain Reaction (PCR) showed that the isolate contained naphthalene dioxygenase gene with size ± 377 bp. Therefore, LBF-1-0076 potential as bioremediation agent to solve crude oil contamination in the sea.

Keywords: crude oil, marine bacteria, naphthalene, naphthalene dioxygenase, *Shewanella indica*

1. PENDAHULUAN

Adanya kegiatan eksploitasi minyak bumi berupa pengeboran, pengilangan, pengolahan, penyimpanan dan pendistribusian maka mengakibatkan pencemaran minyak baik di darat maupun di laut. Kegiatan eksploitasi minyak bumi sering terjadi di dekat pantai maupun area lepas pantai sehingga mengakibatkan peningkatan terjadinya pencemaran minyak bumi di laut (Nursyirwani & Amolle, 2007). Minyak bumi merupakan senyawa hidrokarbon yang mengandung sekitar 25% PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) dan sebagian besar alkana. Senyawa PAH merupakan kelompok senyawa organik yang terdiri atas dua atau lebih cincin aromatik (Seo, *et al.*, 2009). Walaupun kandungan senyawa PAH tersebut lebih kecil dibandingkan alkana namun senyawa tersebut memiliki toksisitas yang tinggi (Xue & Warshawsky, 2005). Indeks stabilitas, persistensi dan karsinogenik PAH akan semakin meningkat berdasarkan peningkatan jumlah cincin aromatik (berat molekul), struktur anguler dan hidrofobitasnya (Marston, *et al.*, 2001).

Naftalena (C₁₀H₈) termasuk salah satu kelompok senyawa PAH sederhana yang telah banyak digunakan sebagai model dalam studi bioremediasi PAH karena strukturnya yang sederhana dan bersifat mudah larut (Goyal, *et al.*, 1997). Naftalena merupakan salah satu kelompok senyawa PAH dengan berat molekul rendah yang terdiri atas gabungan dua cincin benzena (Rokade & Sayyed, 2009). Senyawa tersebut juga termasuk salah satu kelompok senyawa PAH dominan yang terkandung dalam minyak bumi (Kappell, *et al.*, 2014). Naftalena dapat menyebabkan keracunan akut di perairan akibat kelarutannya yang tinggi. Senyawa tersebut pada kadar tertentu dapat menghambat respirasi pada mitokondria sehingga mengakibatkan terhambatnya konsumsi oksigen pada beberapa organisme perairan (Heitkamp, *et al.*, 1987). Keracunan naftalena menyebabkan terjadinya anemia haemolitik dan

nefrotoksisitas pada manusia (Samanta, *et al.*, 2002).

Bioremediasi merupakan teknologi efektif dan ramah lingkungan yang melibatkan biokonversi polutan secara sebagian atau sempurna menjadi biomassa sel, karbon dioksida dan air. Proses biokonversi polutan tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor yang dapat mengurangi keefisienan dan keefektifannya. Faktor-faktor tersebut yaitu struktur polutan, kelarutan polutan dalam air, konsentrasi substrat, kadar toksisitas polutan, oksigen, nutrien, pH, suhu, salinitas dan aktivitas mikroba (Ward, 2004). Oleh karena itu, faktor-faktor yang mempengaruhi proses bioremediasi perlu diperhatikan.

Bioremediasi melibatkan adanya proses pemberian mikroorganisme pada daerah yang terkontaminasi. Mikroorganisme pendegradasi naftalena yang biasa digunakan dalam proses bioremediasi adalah bakteri. Sistem metabolisme bakteri pendegradasi naftalena melibatkan gen-gen pengkode enzim pendegradasi naftalena yang diatur oleh *operon nah1* dan *nah2* (Puntus, *et al.*, 2015). Naftalena dioksigenase (EC 1.14.12.12) merupakan enzim yang diketahui terlibat pada reaksi pertama dalam jalur degradasi naftalena (Kauppi, *et al.*, 1998).

Beberapa penelitian di Indonesia telah melaporkan tentang potensi dan identifikasi molekuler beberapa bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi beberapa senyawa PAH (Harwati, *et al.*, 2009; Murniasih, *et al.*, 2009; Riffani, 2010; Teramoto, *et al.*, 2010; Thontowi, *et al.*, 2013, Thontowi & Yopi, 2011; Yetti, *et al.*, 2015). Namun, penelitian tentang variabel yang mempengaruhi bakteri laut pendegradasi naftalena dan deteksi gen fungsionalnya masih belum banyak dilakukan. Beberapa penelitian telah mempelajari pengaruh variabel pH, salinitas, konsentrasi bakteri dan konsentrasi PAH terhadap bakteri laut (John, *et al.*, 2012; Katsner, *et al.*, 1998; Lakshmi & Velan, 2011). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh parameter konsentrasi naftalena

dan konsentrasi sel terhadap bakteri laut pendeградasi naftalena. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri laut LBF-1-0076 dan mendeteksi gen pengkode naftalena dioksigenase.

2. METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan meliputi bubuk agarosa, buffer TAE 1x (Tris-asetat-EDTA), 0,2 M buffer fosfat pH 7, bubuk naftalena, bubuk agar, bubuk MB (*Marine Broth*), bubuk MA (*Marine Agar*), bubuk ASW (*Artificial Sea Water*), kit Wizard® *Genomic DNA Purification*, larutan DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), Go Taq, DNA cetakan, ddH₂O, EtBr, SYBR Green, etanol 70%, marker 100 bp, marker 1 kb, loading dye 6x, aplikasi NJ Plot, aplikasi Clustal X dan aplikasi MEGA 6. Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat sublimasi, mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seperangkat alat elektroforesis, spektrofotometer nanodrop, spektrofotometer UV-VIS, *deep well*, autoklaf, *freezer*, penggojok (*shaker*), inkubator, sentrifus, microwave, *water bath* 37°C, UV transilluminator, penangas air, tabung eppendorf 1,5 mL, termometer, neraca analitik, pipet mikro dan seperangkat alat gelas lainnya. Prosedur penelitian meliputi peremajaan dan kultivasi isolat LBF-1-0076, uji sublimasi naftalena, uji pertumbuhan, analisis gen 16S rDNA, optimasi konsentrasi naftalena, optimasi konsentrasi sel dan deteksi gen naftalena dioksigenase.

Peremajaan dan Kultivasi Isolat LBF-1-0076

Isolat bakteri laut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu LBF-1-0076 yang berasal dari koleksi Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Peremajaan isolat LBF-1-0076 dilakukan dengan memindahkan isolat dari gliserol *stock* ke dalam media MA. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 30°C. Isolat LBF-1-0076 hasil peremajaan tersebut digunakan untuk kultivasi isolat kemudian isolat LBF-1-0076 tersebut ditumbuhkan dalam tabung reaksi yang berisi 3 mL MB (*Marine*

Broth) steril. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 30°C dan kecepatan 150 rpm. Indikator dari hasil kultivasi isolat yaitu warna larutan MB tampak lebih keruh yang menunjukkan bahwa isolat tersebut telah tumbuh dalam media MB (Yetti, *et al.*, 2016).

Uji Sublimasi Naftalena

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yetti, *et al.* (2016), hasil uji sublimasi dan uji pertumbuhan menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0076 memiliki kemampuan untuk mendegradasi naftalena. Pengecekan kemampuan degradasi naftalena oleh isolat LBF-1-0076 melalui uji sublimasi (uji kualitatif) dan uji pertumbuhan (uji kuantitatif) dilakukan kembali dalam penelitian ini. Metode uji sublimasi naftalena dilakukan sesuai penelitian Alley dan Brown (2000). Isolat LBF-1-0076 diinokulasi ke dalam media ASW (*Artificial Sea Water*) padat. Proses sublimasi dilakukan pada suhu 80°C selama 1 menit. Inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu 30°C. Adanya pembentukan zona bening di sekeliling isolat LBF-1-0076 merupakan indikator bahwa isolat tersebut memiliki kemampuan mendegradasi naftalena.

Uji Pertumbuhan Isolat LBF-1-0076 pada Senyawa Naftalena

Pengujian kemampuan degradasi naftalena secara kuantitatif dilakukan melalui uji pertumbuhan (Thontowi, *et al.*, 2011). Isolat LBF-1-0076 ditumbuhkan dalam tabung reaksi yang berisi media ASW cair dan naftalena dengan 3 kali pengulangan. Total larutan yang terdapat dalam tabung reaksi tersebut yaitu 3000 µL dengan OD (*Optical Density*) sel 1 dan konsentrasi naftalena 50 ppm. Inkubasi dilakukan di dalam penggojok selama 7 hari pada suhu 30°C dengan kecepatan 150 rpm. Pengukuran OD sel awal (pada hari ke-0) dan OD sel akhir (pada hari ke-7) dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Adanya peningkatan OD sel menunjukkan isolat LBF-1-0076 dapat

tumbuh dalam media ASW cair yang berisi naftalena.

Uji Pertumbuhan dengan Parameter Konsentrasi Naftalena

Isolat LBF-1-0076 diinokulasi dalam tabung reaksi yang berisi media ASW cair dengan konsentrasi naftalena yang bervariasi yaitu 0, 25, 50, 75, 100 dan 200 ppm. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan kemudian inkubasi dilakukan di dalam penggojok selama 7 hari pada suhu 30°C dengan kecepatan 150 rpm. Nilai OD sel awal dan OD sel akhir diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Peningkatan OD sel tertinggi pada konsentrasi naftalena tertentu merupakan indikator bahwa isolat LBF-1-0076 memiliki kemampuan degradasi naftalena yang optimal pada konsentrasi naftalena tersebut (Thontowi, *et al.*, 2011).

Uji Pertumbuhan dengan Parameter Konsentrasi Sel

Isolat bakteri laut diinokulasi dalam tabung reaksi yang berisi media ASW cair dengan konsentrasi naftalena yang optimal berdasarkan hasil uji optimasi konsentrasi naftalena sebelumnya. Isolat bakteri laut yang diinokulasi memiliki nilai OD sel yang bervariasi yaitu 0, 5, 10, 15 dan 20. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan kemudian inkubasi dilakukan di dalam penggojok selama 7 hari pada suhu 30°C dengan kecepatan 150 rpm. Pengukuran OD sel awal dan OD sel akhir dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Peningkatan OD sel tertinggi pada konsentrasi sel tertentu merupakan indikator bahwa isolat LBF-1-0076 memiliki kemampuan degradasi naftalena yang optimal pada konsentrasi sel tersebut (Thontowi, *et al.*, 2011).

Analisis Gen 16S rDNA Bakteri Laut

Isolat LBF-1-0076 diidentifikasi dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Identifikasi tersebut dilakukan dengan menganalisis

gen 16S rDNA bakteri. Isolasi DNA genom dari isolat LBF-1-0076 dilakukan terlebih dahulu dengan menggunakan kit *Wizard® Genomic DNA Purification*. Amplifikasi gen 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan primer 9F (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTAYGACTT-3') (Cavalca, *et al.*, 1999). Kondisi PCR dilakukan pada 10 siklus pertama yaitu denaturasi (95°C selama 30 detik), penempelan primer (55°C selama 1 menit) dan perpanjangan (72°C selama 2 menit). Amplifikasi dilakukan kembali selama 30 siklus pada suhu dan waktu yang sama. Amplifikasi terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 2 menit dengan 1 siklus. Hasil amplifikasi gen 16S rDNA diverifikasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% kemudian dilakukan sekuensing dan hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan NCBI (Yetti, *et al.*, 2015). Selanjutnya, pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan aplikasi Clustal X, NJ Plot dan MEGA 6 (Thompson, *et al.*, 1997; Choi, *et al.*, 2000).

Deteksi Gen Naftalena Dioksigenase

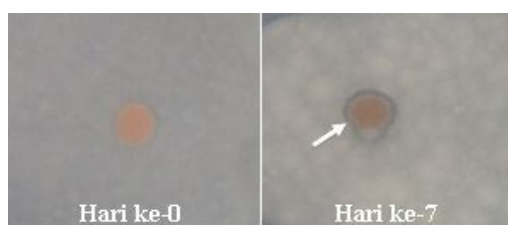
Deteksi gen naftalena dioksigenase dilakukan dengan amplifikasi gen naftalena dioksigenase menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer yang digunakan yaitu primer NAH-F (CAAA A(A/G)CACCTGATT(C/T)ATGG) dan NAH-R ((C/T)(A/G)CG(A/G)G(C/G)GACTTCTTTCAA) (Jones, *et al.*, 1999). Kondisi PCR yang dilakukan yaitu denaturasi (95°C selama 3 menit dan 95°C selama 1 menit), penempelan primer (47°C selama 1 menit) dan pemanjangan (72°C selama 7 menit). Hasil PCR diverifikasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji kemampuan degradasi naftalena oleh isolat bakteri laut LBF-1-0076 dilakukan secara kualitatif menggunakan uji sublimasi. Metode kualitatif lainnya untuk menentukan kemampuan degradasi naftalena secara kualitatif yaitu metode

spray-plate. Metode *spray-plate* melibatkan penggunaan pelarut organik seperti aseton dan eter untuk dapat melarutkan senyawa PAHs. Metode *spread-plating* juga melibatkan kontak langsung pelarut organik ke dalam agar. Adanya penggunaan pelarut organik pada metode *spray-plate* dan *spread-plating* dapat menimbulkan efek toksik bagi bakteri (Alley & Brown, 2000).

Metode uji sublimasi tidak melibatkan adanya penggunaan pelarut organik sehingga penentuan kemampuan degradasi naftalena oleh bakteri laut pada penelitian ini menggunakan metode uji sublimasi. Metode uji sublimasi bertujuan mengetahui potensi kemampuan degradasi naftalena oleh suatu isolat (Alley & Brown, 2000). Sublimasi dilakukan pada suhu yang sesuai dengan titik leleh naftalena yaitu 80°C. Indikator keberhasilan uji sublimasi ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada medium atau pembentukan zona bening di sekeliling isolat (Alley & Brown, 2000). Hasil uji sublimasi naftalena oleh isolat bakteri laut LBF-1-0076 ditunjukkan pada Gambar 1.

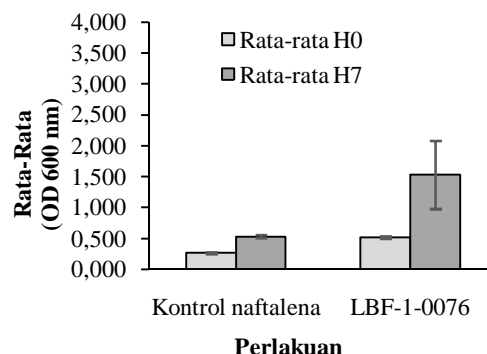


Gambar 1. Hasil sublimasi naftalena oleh isolat LBF-1-0076 pada hari ke-0 dan hari ke-7. Tanda panah menunjukkan zona bening di sekitar koloni bakteri LBF-1-0076

Pembentukan zona bening tidak terjadi pada hari ke-0 dan tampak jelas pada hari ke-7. Terbentuknya zona bening di sekeliling isolat menunjukkan bahwa isolat tersebut dapat menggunakan senyawa karbon aromatik yaitu naftalena sebagai sumber karbon dan energi bagi pertumbuhannya karena sumber karbon dari media ASW telah habis (Dykstershouse, *et al.*, 1995).

Hasil uji sublimasi naftalena juga menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan warna pada media agar. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yetti, *et al.* (2015) dan Yetti, *et al.* (2016) dimana hasil uji sublimasi naftalena hanya menunjukkan adanya pembentukan zona bening tanpa adanya perubahan warna. Namun, hasil uji sublimasi akan menunjukkan perubahan warna dan pembentukan zona bening di sekeliling isolat apabila uji tersebut dilakukan untuk senyawa PAH lainnya seperti dibenzotiofen dan fluorena karena degradasi senyawa tersebut akan menghasilkan metabolit yang berwarna sebagai hasil dari aktivitas enzim pada metabolisme bakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Yetti, *et al.* (2015) menggunakan uji sublimasi sebagai uji utama untuk penapisan bakteri laut yang mampu mendegradasi berbagai senyawa *Polyaromatic Hydrocarbons* (PAH) sedangkan uji sublimasi pada penelitian ini berupa uji pendahuluan sebelum melakukan uji selanjutnya.

Kemampuan degradasi naftalena oleh isolat bakteri laut LBF-1-0076 juga dilakukan secara kuantitatif melalui uji pertumbuhan (*growth test*). Uji pertumbuhan merupakan uji yang dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat dalam tabung reaksi yang berisi senyawa naftalena dan media yang mengandung sumber karbon minimal (Thontowi, *et al.*, 2011). Hasil uji pertumbuhan ditunjukkan pada Gambar 2.



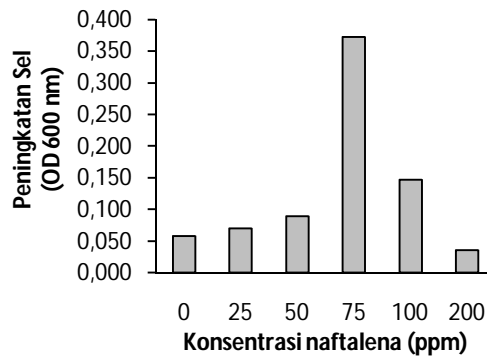
Gambar 2. Hasil uji pertumbuhan dalam media ASW cair berisi naftalena oleh isolat LBF-1-0076

Berdasarkan hasil uji pertumbuhan, isolat LBF-1-0076 dapat tumbuh dalam media ASW cair yang berisi naftalena. Nilai OD sel isolat LBF-1-0076 mengalami peningkatan dari 0,249 pada hari ke-0 menjadi 1,000 pada hari ke-7 sehingga nilai OD sel isolat tersebut mengalami peningkatan sebesar 75%. Nilai OD sel isolat didapatkan dari hasil selisih antara rata-rata hasil uji pertumbuhan dengan kontrol naftalena. Hasil uji pertumbuhan menunjukkan bahwa isolat bakteri laut dapat mendegradasi senyawa naftalena sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan selnya. Adanya kemampuan isolat dalam mendegradasi naftalena merupakan hasil adaptasi isolat dari habitat aslinya yang tercemar polutan (Meer, 2006).

Isolat bakteri laut LBF-1-0076 dapat memanfaatkan naftalena sebagai sumber karbon karena sistem metabolisme dari isolat tersebut. Iwabuchi dan Harayama (1997) menyatakan bahwa degradasi naftalena atau senyawa PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) oleh bakteri laut diawali dengan reaksi atom oksigen dalam inti aromatik yang dikatalisis oleh multikomponen dioksigenase. Produk antara (*intermediate*) dari degradasi tersebut adalah salisilat. Oksidasi salisilat lebih lanjut dapat dilakukan melalui jalur asam gentisat atau katekol (*ortho* atau *meta*) untuk menghasilkan prekursor yang terintegrasi dengan siklus asam sitrat.

Isolat LBF-1-0076 memiliki kemampuan degradasi naftalena berdasarkan hasil uji sublimasi dan uji pertumbuhan. Tahap selanjutnya berupa uji pertumbuhan dengan parameter konsentrasi naftalena dan konsentrasi sel oleh isolat LBF-1-0076. Hasil uji pertumbuhan dengan parameter konsentrasi naftalena oleh isolat LBF-1-0076 ditunjukkan pada Gambar 3.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0076 memiliki kemampuan degradasi naftalena yang optimal pada konsentrasi naftalena 75 ppm dengan peningkatan OD sel sebesar 37,30% (nilai OD sel 0,373). Peningkatan nilai OD sel isolat LBF-1-0076 mengalami kenaikan dari 0,070 (7%) pada konsentrasi naftalena



Gambar 3. Degradasi naftalena oleh isolat bakteri laut LBF-1-0076 pada berbagai konsentrasi naftalena

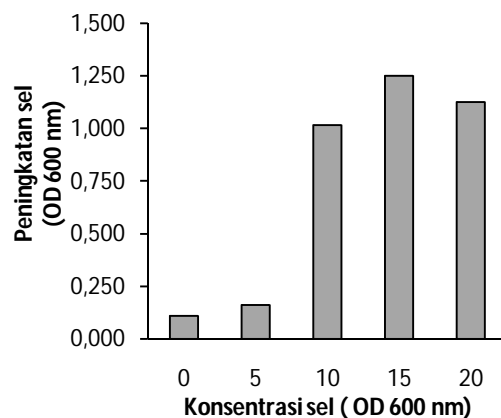
25 ppm menjadi 0,373 (37,30%) pada konsentrasi naftalena 75 ppm. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemampuan degradasi naftalena isolat LBF-1-0076 semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi naftalena. Konsentrasi naftalena yang semakin tinggi menyediakan sumber karbon yang lebih bagi bakteri sehingga sel bakteri dapat tumbuh semakin cepat (Kamil & Talih, 2015).

Hasil uji pertumbuhan dengan parameter konsentrasi naftalena juga menunjukkan OD sel isolat LBF-1-0076 mengalami penurunan dari 0,373 (37,30%) pada konsentrasi naftalena 75 ppm menjadi 0,036 (3,60%) pada konsentrasi naftalena 200 ppm. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemampuan degradasi naftalena oleh isolat bakteri laut semakin menurun apabila telah melebihi konsentrasi naftalena optimum. Konsentrasi naftalena yang semakin tinggi atau melebihi batas toleransi bakteri akan mengganggu keseimbangan metabolisme dan dapat memicu mekanisme toksisitas (Pumphrey & Madsen, 2007). Mekanisme toksisitas tersebut dapat berupa kerusakan membran sel bakteri (Ramos, *et al.*, 2002). Selain itu, konsumsi naftalena yang berlebih oleh bakteri juga mengakibatkan kelebihan produksi metabolit sehingga mengganggu pertumbuhan sel bakteri (Park, *et al.*, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Pumphrey dan Madsen (2007) menunjukkan adanya akumulasi metabolit berwarna merah bercampur kuning (*orange*) pada medium kultur

Polaromonas naphthalenivorans CJ2 yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bakteri. Berdasarkan penelitian Pumphrey dan Madsen (2007), analisis metabolit menggunakan HPLC diduga akumulasi metabolit tersebut berupa 1,2-naftoquinon dan senyawa tersebut termasuk produk dari hasil autooksidasi naftalena.

Konsentrasi naftalena yang berlebih juga dapat mengakibatkan enzim pendegradasi naftalena yang dihasilkan oleh bakteri laut mencapai kapasitas maksimal (Black, 2002). Hal tersebut disebabkan substrat naftalena telah berikatan dengan seluruh sisi aktif dari enzim pendegradasi naftalena sehingga substrat naftalena yang berlebih tidak dapat menempati sisi aktif enzim. Oleh karena itu, ketersediaan jumlah sisi aktif enzim yang berkurang mengakibatkan degradasi naftalena semakin menurun.

Konsentrasi naftalena 75 ppm pada isolat LBF-1-0076 digunakan untuk uji pertumbuhan dengan parameter konsentrasi sel. Konsentrasi sel berpengaruh terhadap kemampuan degradasi naftalena oleh bakteri laut. Hasil uji pertumbuhan dengan parameter konsentrasi sel ditunjukkan pada Gambar 4.



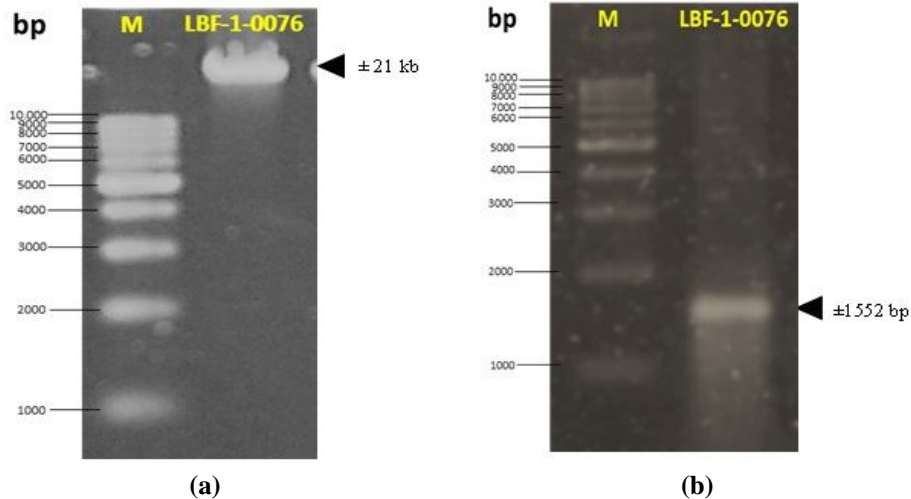
Gambar 4. Degradasi naftalena oleh isolat bakteri laut LBF-1-0076 pada berbagai konsentrasi sel

Berdasarkan hasil penelitian, isolat LBF-1-0076 memiliki kemampuan degradasi naftalena yang optimal pada konsentrasi sel 15 dengan peningkatan OD sel sebesar 1,249 (8,33%). Peningkatan

OD sel isolat LBF-1-0076 juga terus mengalami kenaikan dari 0,162 (3,24%) pada konsentrasi sel 5 menjadi 1,249 (8,33%) pada konsentrasi sel 15. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemampuan degradasi naftalena oleh bakteri laut semakin tinggi seiring dengan meningkatnya konsentrasi sel. Adanya peningkatan konsentrasi sel bakteri laut mengakibatkan peningkatan produksi enzim pendegradasi naftalena sehingga degradasi naftalena oleh isolate bakteri laut semakin cepat (Black, 2002). Hal tersebut disebabkan enzim yang dihasilkan memiliki sisi aktif yang akan berikatan dengan substrat naftalena. Oleh karena itu, jumlah sisi aktif enzim semakin meningkat seiring dengan meningkatnya produksi enzim yang menyebabkan degradasi naftalena yang semakin cepat sehingga bakteri dapat tumbuh dengan cepat.

Hasil uji optimasi konsentrasi sel juga menunjukkan bahwa peningkatan sel isolat LBF-1-0076 mengalami penurunan dari 1,249 (8,33%) pada konsentrasi sel 15 menjadi 1,126 (5,63%) pada konsentrasi sel 20. Hal tersebut dapat diakibatkan adanya persaingan bakteri laut untuk memenuhi kebutuhan sumber karbon dan energinya (Auger, *et al.*, 1995). Ketersediaan naftalena pada konsentrasi tertentu tidak seimbang dengan jumlah sel bakteri yang membutuhkan naftalena untuk pertumbuhan selnya sehingga bakteri laut yang tidak mendapatkan naftalena sebagai sumber nutrisinya akan terhambat pertumbuhan selnya.

Identifikasi isolat LBF-1-0076 dilakukan melalui amplifikasi gen 16S rDNA. Isolasi DNA terlebih dahulu dilakukan dengan menggunakan kit *Wizard® Genomic DNA Purification*. Hasil isolasi DNA dari isolat LBF-1-0076 ditunjukkan pada Gambar 5. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ukuran DNA genom isolat LBF-1-0076 memiliki ukuran pita diatas 1 kb. Menurut Demerdash (2012), molekul DNA kromosom bakteri memiliki ukuran lebih dari 1 kb yaitu 21-23 kb. DNA kromosom bakteri memiliki konformasi linier yang berukuran besar sehingga menyebabkan molekul DNA sulit melewati pori-pori gel agarosa.



Gambar 5. (a) Hasil isolasi DNA genom, M: Marker 1 kb, (b) Hasil amplifikasi gen 16S rDNA

DNA genom hasil isolasi digunakan sebagai bahan amplifikasi gen 16S rDNA. Gen 16S rDNA merupakan bagian dari DNA yang sering digunakan untuk tujuan taksonomi (Bottger, 1989). Gen tersebut bersifat stabil, terdistribusi secara luas di sel dan tersimpan dengan baik pada jarak filogenik yang luas. Oleh karena itu, identifikasi bakteri dilakukan melalui analisis gen 16S rDNA karena ketersediaan datanya di bank data cukup bagus dan mudah diamplifikasi menggunakan PCR (Pace, 1997). Hasil amplifikasi gen 16S rDNA ditunjukkan pada Gambar 5.

Hasil tersebut menunjukkan adanya pita gen 16S rDNA dengan ukuran ± 1522 bp sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Patel (2001) yaitu gen 16S rDNA bakteri memiliki ukuran ± 1522 . Gen 16S rDNA tersebut digunakan sebagai bahan untuk identifikasi bakteri. Gen 16S rDNA disekuensing dan dibandingkan dengan database yang terdapat pada NCBI dengan menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hal tersebut dilakukan untuk mengidentifikasi jenis dari bakteri LBF-1-0076.

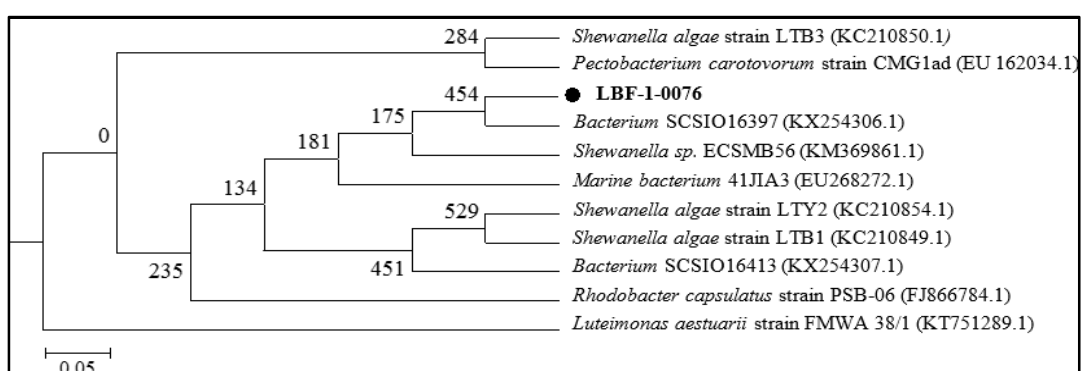
Penelitian sebelumnya terkait identifikasi bakteri pendegradasi naftalena yang diisolasi dari daerah tercemar PAH telah banyak dilakukan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hedlund, *et al.* (1999), *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Acinobacter* spp., *Marinobacter* spp. dan

Sphingomonas spp. termasuk jenis bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi naftalena. Jenis bakteri lainnya yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi naftalena yaitu *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* dan *Halomonas cupida* yang diisolasi dari teluk Persia dan laut Kaspia (Ghasemi & Rahbari, 2015). Menurut Pawar, *et al.* (2013), jenis bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi naftalena berasal dari genus *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. dan *Pseudomonas* spp.

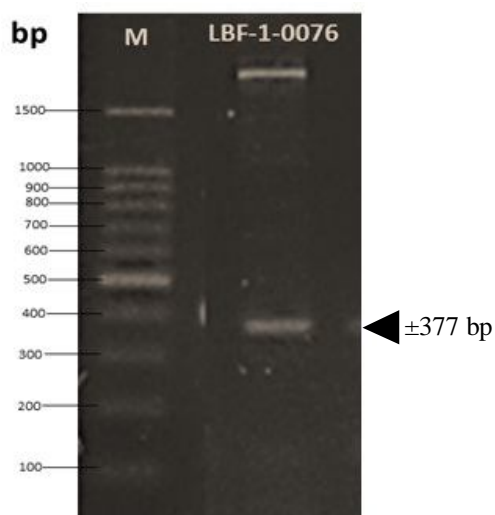
Hasil BLAST sekuen gen 16S rDNA dari isolat LBF-1-0076 ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil analisis gen 16S rDNA menunjukkan bahwa isolat dengan kode LBF-1-0076 memiliki kemiripan dengan spesies *Shewanella indicastrain* 0102 dengan keidentikan 99%. Penelitian yang dilakukan oleh Tahriz, *et al.* (2014) menunjukkan bahwa bakteri genus *Shewanella* memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa naftalena. Genus *Shewanella* merupakan anggota dari kelas *Gammaproteobacteria* (Anzai, *et al.*, 2000). Bakteri tersebut termasuk dalam kelompok bakteri gram negatif, fakultatif anaerobik, motil (memiliki flagella) dan berbentuk batang. *Shewanella indica* dapat tumbuh pada daerah yang memiliki suhu 10-45°C dan pH 6,5-10 (Verma, *et al.*, 2011). Pohon filogenik dari isolat LBF-1-0076 ditunjukkan pada Gambar 6.

Tabel 1. Hasil BLAST dari sekuen gen 16S rDNA isolat bakteri laut LBF-1-0076

No.	Hasil BLAST	Keidentikan sekuen (%)	Identities
1.	<i>Shewanella indica</i> strain 0102 (KP236237.1)	99	1635/1635
2.	<i>Shewanella alga</i> strain LTY2 (KC210854.1)	99	1635/1635
3.	<i>Shewanella alga</i> strain LTB3 (KC210850.1)	99	1635/1635
4.	<i>Shewanella alga</i> strain LTB1 (KC210849.1)	99	1635/1635
5.	<i>Pectobacterium carotovorum</i> strain CMG1ad (EU162034.1)	99	1635/1635
6.	<i>Bacterium</i> SCSIO16413 (KX254307.1)	99	1629/1629
7.	<i>Bacterium</i> SCSIO16397 (KX254306.1)	99	1629/1629
8.	<i>Shewanella</i> sp. ECSMB 56 (KM369861.1)	99	1629/1629
9.	<i>Rhodobacter capsulatus</i> strain PSB-06 (FJ866784.1)	99	1618/1618
10.	<i>Marine bacterium</i> 41JIA3 (EU268272.1)	99	1618/1618



Gambar 6. Pohon filogenik dari isolat LBF-1-0076



Gambar 7. Hasil amplifikasi gen naftalena dioksigenase dari isolat LBF-1-0076. M: Marker 100 bp

Isolat LBF-1-0076 diduga memiliki kemampuan untuk mendegradasi naftalena karena memiliki enzim pendegradasi naftalena berupa naftalena dioksigenase. Oleh karena itu, deteksi gen naftalena dioksigenase juga dilakukan dalam penelitian ini. Hasil amplifikasi gen

naftalena dioksigenase dari isolat LBF-1-0076 dapat ditunjukkan pada Gambar 7. Hasil tersebut menunjukkan adanya pitagen naftalena dioksigenase dengan ukuran sekitar 377 bp.

Menurut Minovaska, *et al.* (2013), gen naftalena dioksigenase memiliki

ukuran sekitar 377 bp. Pengaturan gen-gen pendegradasi naftalena pada bakteri telah dilaporkan dan studi awal berasal dari karakterisasi bakteri *Pseudomonas* sp. NCBI 9816-4 (Kauppi, *et al.*, 1998). Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa gen-gen yang mengekspresikan enzim naftalena dioksigenase yaitu *nahAa*, *nahAb*, *nahAcAd*. Naftalena dioksigenase (EC 1.14.12.12) merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi naftalena menjadi (+)-cis-(1R,2S)-dihidroksi-1,2-dihidronaftalena (Kauppi, *et al.*, 1998). Senyawa cis-naftalena dihidrodiol tersebut akan terdehidrogenasi menjadi 1,2-dihidroksinaftalena oleh enzim cis-dihidrodiol dehidrogenase. Senyawa 1,2-dihidroksinaftalena tersebut dimetabolisme menjadi senyawa antara (*intermediate*) yaitu salisilat. Salisilat mengalami proses dekarboksilasi menjadi katekol dan mengalami proses metabolisme lebih lanjut oleh pembelahan cincin melalui jalur gentisat dan orto atau meta untuk menghasilkan prekursor yang terintegrasi dengan siklus asam sitrat.

4. KESIMPULAN

Konsentrasi naftalena dan konsentrasi sel berpengaruh terhadap bakteri laut pendegradasi naftalena LBF-1-0076. Isolat bakteri laut LBF-1-0076 memiliki kemampuan yang optimal untuk mendegradasi naftalena dengan peningkatan sel 37,3% pada konsentrasi naftalena 75 ppm dan peningkatan sel sebesar 8,33% pada konsentrasi sel 15. Isolat bakteri laut LBF-1-0076 teridentifikasi sebagai *Shewanella indica*. Bakteri laut tersebut memiliki enzim pendegradasi naftalena berupa naftalena dioksigenase. Oleh karena itu, isolat LBF-1-0076 dapat digunakan sebagai agen bioremediasi untuk mengatasi masalah pencemaran minyak bumi dalam perairan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh *Project of SATREPS Development of Internationally Standardized Microbial Resources Center as a Core of Biological Resources Center to Promote*

Lifa Science and Research and Biotechnology 2011-2016 dan DIPA Tematik Puslit Bioteknologi LIPI 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Alley, J.F. & Brown, L.R. (2000). Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 439-442.
- Anzai, Y., Kodo, Y. & Oyaizu, H. (2000). The phylogeny of the genera *Chrysonomas*, *Flavimonas* and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 249-251.
- Auger, R.L., Jacobson, A.M. & Domach, M.M. (1995). Effect of nonionic surfactant addition on bacterial metabolism of naphthalene: assessment of toxicity and overflow metabolism potential. *Journal of Hazardous Materials*, 43, 263-272.
- Black, J.G. (2002). *Microbial Principles and Exploration*. Amerika: John Wiley & Sons Inc.
- Bottger, E.C. (1989). Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Federation of European Microbiological Societies Letters*, 65, 171-176.
- Choi, J.H., Jung, H.Y., Kim, H.S. & Cho, H.G. (2000). PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics Application Note*, 16(11), 1056-1058.
- Demerdash, H.A.M.E. (2012). A simple and expensive procedure for chromosomal DNA extraction from *Streptococcus thermophilus* strains. *Middle-East Journal Scientific Research*, 11(1), 13-18.
- Dykstershouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Canolara & Staley, J.T. (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen nov sp nov on aromatic hydrocarbon degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 116-123.
- Ghasemi, S.M. & Rahbari, M. (2015). Characterization of naphthalene-degrading bacteria isolated from the Persian Gulf and the Caspian Sea as

- potential agents for naphthalene removal from polluted environments. *Iranian Journal of Environmental Technology*, 1(1), 1-8.
- Goyal, A.K. & Sylstra, G.J. (1997). Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Indonesian Microbiology Biotechnology*, 19, 401-407.
- Harwati, T.U., Kasai, Y., Kodarma, Y., Susilaningih, D. & Watanabe, K. (2009). *Tropicibacter naphthalenivorans* gen nov sp nov a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 59, 392-396.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Bair, T.J. & Staley, J.T. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Applied Environmental Microbiology*, 65(1), 251-259.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J.P. & Cerniglia, C.E. (1987). Naphthalene Biodegradation in Environmental Microcosms Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites. *Applied Environmental Microbiology*, 53, 129-139.
- Iwabuchi, T. & Harayama, S. (1997). Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp strain KP7. *Journal Bacteriology*, 179, 6488-6494.
- John, R.C., Essien, J.P., Akpan, S.B. & Okpokwasili, G.C. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 1014-1019.
- Jones, L.G., Laurie, A.D., Hunter, D.W.F. & Fraser, R. (1999). Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 29, 69-79.
- Kamil, N.A.F.M. & Talih, S.A. (2015). Biodegradation of PAHs in soil: influence of initial PAHs concentration. *Soft Soil Engineering International Conference*, 136, 1-6.
- Kappell, A.D., Wie, Y., Newton, R.J., Nostrand, J.D.V., Zhou, J., McLellan, S.L. & Hristova, K.R. (2014). The polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential of gulf of Mexico native coastal microbial communities after deepwater horizon oil spill. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-14.
- Kauppi, B., Lee, K., Ccarredano, E., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H. & Ramaswamy, S. (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure*, 6(5), 571-586.
- Lakshmi, M.B. & Velan, M. (2011). Biodegradation of the toxic polycyclic aromatic hydrocarbon, phenanthrene by an indigenously isolated *Alcaligenes faecalis* MVMB1 strain. *International Conference on Environmental Science and Technology*, 6, 440-444.
- Marston, C.P., Pereira, J., Ferguson, J., Fischer, L., Hedstrom, O., Dashwood, W.M. & Baird, W.M. (2001). Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 22, 1077-1086.
- Meer, V.D. (2006). Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(1), 35-42.
- Minovaska, G., Narancic, T., Mandic, M., Senerovic, L., Vvasikevic, B. & Nikodinovic, R. (2013). Limited aromatic pathway genes diversity amongst aromatic compound degrading soil bacterial isolates. *Genetika*, 45(3), 703-716.
- Murniasih, T., Yopi & Budiawan, (2009). Biodegradasi fenantren oleh bakteri laut *Pseudomonas* sp. Kalp3b22 asal Kumai Kalimantan Tengah. *Makara Sains*, 13(1), 77-80.

- Nursyirwani, & Amolle, K.C. (2007). Isolasi dan karakterisasi bakteri hidrokarbonoklastik dari perairan Dumai dengan sekuen 16S rDNA. *Ilmu Kelautan*, 12(1), 12-17.
- Pace, N. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734-740.
- Park, W., Jeon, C.O., Cadillo, H., DeRito, C. & Madsen, E.L. (2004). Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(3), 429-435.
- Patel, J. (2001). 16S rRNA Gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnostics*, 6, 313-321.
- Pawar, A.N., Ugale, S.S., More, M.G., Kokani, N.F. & Khandelwal, S.R. (2013). Biological degradation of naphthalene: a new era. *Journal Bioremediation & Biodegradation*, 4(7), 1-5.
- Pumphrey, G.M. & Madsen, E.L. (2007). Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. *Microbiology*, 153, 3730-3738.
- Puntus, I.F., Ryazanova, L.P., Zvonarev, A.N., Funtikova, T.V. & Kulakovskaya, T.V. (2015). The Role of Mineral Phosphorus Compounds in Naphthalene Biodegradation by *Pseudomonas Putida*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 202-208.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Gonzales, M.I., Rojas, A., Teran, W. & Segura, A., (2002). Mechanism of solvent tolerance in g negative bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 743-768.
- Riffani, R. (2010). Isolasi bakteri pendegradasi phenanthrene dari Batanta-Salawati Raja Ampat Papua. *Jurnal Biologi Indonesia*, 6(2), 153-161.
- Rokade, Y.B. & Sayyed, R.Z. (2009). Naphthalene derivatives: a new range of antimicrobials with high therapeutic value. *Journal of Chemistry*, 2(4), 972-980.
- Samanta, S.K., Singh, O.V. & Jain, R.K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6), 243-248.
- Seo, J.S., Keum, Y.S. & Li, Q.X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 278-309.
- Tahriz, V., Hamidi, A., Rahimi, E., Eramabadi, M., Eramabadi, P., Yahaghi, E., Darian, E.K. & Hejazi, M.S. (2014). Isolation and characterization of naphthalene-degradation bacteria from Qurugol lake located at Azerbaijan. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(2), 715-722.
- Teramoto, M., Suzuki, M., Okazaki, F., Hatmanti, A. & Harayama, S. (2010). Oceanobacter-related bacteria are important for the degradation of petroleum aliphatic hydrocarbons in the tropical marine environment. *Microbiology*, 155, 3362-3370.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Research*, 25(24), 4876-4882.
- Thontowi, A. & Yopi. (2011). Alkane degradation and detection of monooxygenase gene from *Alcanivorax* sp. from Jakarta Bay. *Annales Bogorienses*, 15(2), 25-30.
- Thontowi, A., Rahmani, N. & Yopi. (2013). Polyaromatic hydrocarbon degradation and dioxygenase gene detection from *Alteromonas alvinellae* Bt05. *Annales Bogorienses*, 17(1), 33-42.
- Verma, P., Pandey, P.K., Gupta, K., Kim, H.J., Baik, K.S., Seong, C.N., Patole, M.S. & Shouche, Y.S. (2011). *Shwenella indica* sp. nov., isolated from sediment of the Arabian Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2058-2064.

- Ward, O.P. (2004). The industrial sustainability of bioremediation processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 1-4.
- Xue, W. & Warshawsky, D., (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206, 73-93.
- Yetti, E., Thontowi, A., Yopi & Lisdiyanti, P. (2015). Screening of marine bacteria capable of degrading various polyaromatic hydrocarbons. *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, 10(3), 121-127.
- Yetti, E., Thontowi, A. & Yopi. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from the Indonesian marine environment. *Biodiversitas*, 17(2), 857-864.