

JRL	Vol.6	No.1	Hal. 1 - 5	Jakarta, Maret 2010	ISSN : 2085-3866
-----	-------	------	------------	------------------------	------------------

KAJIAN KEMAMPUAN MUTAN BAKTERI *Pseudomonas sp* MENDEGRADASI BENZENA DALAM MIKROKOSMOS AIR TANAH

Fahrudin

Jurusan Biologi, F.Mipa, Universitas Hasanuddin, Makassar
email: f_udin@yahoo.com

Abstract

Mutation induction with UV can increase microbe capacity in do metabolite includes in mendegradasi polutan's material. mutagenesis UV's result from isolat wildtipe Pseudomonas sp (ICBB33p) gotten two mutants which is ICBB33 4 and ICBB33 18. To the effect this research is done to test isolat's ability that mutant bacteria is deep degradation benzene by compares with isolat parental or wildtipe. Mutant application is done on ground water microcosm that contains to concentrate benzene 125 ppm results benzene concentration decreases 17,82 ppm (86%) for ICBB33'S mutant 4 and 13,37 ppm (89%) for ICBB33'S mutant cell 18, meanwhile parental's cell stills to remain benzene concentration as big as 35,8 ppm (70%) of startup concentration 125 ppm. Decrease concentrates benzene, followed by population amount step-up bacteria cell and CO's amount step-up 2 one that resultant.

Key word: biodegradasi's capacity step-up, UV- mutation, benzene, mutant.

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Benzena senyawa aromatik merupakan senyawa berbau harum, dengan 6 atom karbon yang memiliki ikatan rangkap ganda, dengan elektron yang berpindah antar atom karbon sulit didegradasi di lingkungan. Efek benzena dapat meracuni tulang-tulang tubuh, dan menyebabkan anemia dan bersifat mutagenik (Chapelle, 1999; Mueller PF, 1996)

Pemanfaatan bakteri dalam biodegradasi zat pencemar adalah alternatif yang baik, efektif dan ramah lingkungan. Namun, keberhasilannya tidak hanya dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan, tetapi kemampuan bakteri itu untuk memanfaatkan substrat polutan sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhannya. Oleh karena itu, dalam proses biodegradasi perlu dipilih jenis isolat bakteri yang mempunyai kapasitas degradasi yang lebih tinggi (Stanbury, 1984)

Upaya proses biodegradasi yang cepat dapat dilakukan dengan melalui mutagenesis UV pada DNA bakteri (Fahrudin, 2006). Menurut Stanbury (1984); Bitton (1999), hasil mutasi dapat meningkatkan kapasitas bakteri dalam proses biodegradasi benzena oleh adanya perubahan arah metabolime dalam mengurai substansat.

Berdasarkan penjelasan tersebut terkait dengan peningkatan kapasitas bakteri dalam mendegradasi polutan benzena, maka dilakukan uji kemampuan degradasi benzena pada isolat bakteri mutan *Pseudomonas sp* yang dimutasi melalui induksi mutasi-UV. Dengan adanya mutan bakteri yang dihasilkan dari *Pseudomonas sp* (Fahrudin, 2006) dapat menjadi alternatif dalam menanggulangi pencemaran lingkungan oleh senyawa aromatik, menggunakan bakteri dalam menangani pencemaran senyawa benzena di lingkungan.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan utama penelitian adalah untuk meningkatkan kapasitas bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon monoaromatik melalui induksi mutasi UV. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk:

- Menentukan laju biodegradasi
- Menguji kemampuan degradasi isolat bakteri mutan dalam mikrokosmos air tanah yang tercemar senyawa hidrokarbon monoaromatik.
- Mengamati dinamika populasi mikroba selama proses biodegradasi

2. Metodologi

2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Media Pertumbuhan Isolat

Isolat bakteri yang digunakan adalah isolat mutan *Pseudomonas sp* (ICBB33₄ dan ICBB33₁₈) dan parental (ICBB33_p) belum teridentifikasi. Untuk pertumbuhan isolat digunakan Media Luria Bertani dengan komposisi: 10 Pepton, 5 yeast extract, 5 NaCl (g/l) pada pH 7,2 dan untuk seleksi isolat pendegradasi benzena digunakan media minimal dengan komposisi: 0,5 (NH₄)₂SO₄, 0,5 NaNO₃, 0,02 CaCl₂, 0,2 MgSO₂, 1,0 KH₂PO₄, 1,0 NaH₂PO₄. H₂O, 15,0 agar (g/l).

2.3 Aplikasi Isolat

Kajian aplikasi isolat mutan pada mikrokosmos air tanah dengan metode Burland dan Edwards, (1999) yang dimodifikasi. Menggunakan wadah terbuat dari felyx glass yang berisi air tanah 75 ml, ditambahkan nutrisi dari K₂HPO₄ dan NH₄NO₃ dan benzena 125 ppm, serta 100 µl kultur sel bakteri. Wadah ditutup rapat untuk menghindari keluarnya benzena. Inkubasi dilakukan pada shaker selama 120 jam. Selama proses biodegradasi dilakukan pengamatan konsentrasi benzena, konsentrasi CO₂ yang dihasilkan terlarut dalam air, dan populasi bakteri. Perlakuan dalam mikrokosmos yang telah dibuat dengan kondisi

steril, dengan tujuan untuk membandingkan kapasitas degradasi isolat mutan dengan isolat parental.

2.4 Ekstraksi Sampel

Benzena dari kultur cair disentrifus dengan kecepatan 12.000x g selama 10 menit pada suhu 2°C untuk memisahkan dari biomassa. Pelet dicuci tiga kali menggunakan 2 ml diklorometana dengan melakukan sentrifus, ekstrak lalu dicampur dengan supernatan. Lapisan pelarut diambil dan dikeringkan dengan anhidrous sodium sulfat.

2.5 Analisis Konsentrasi Benzena

Konsentrasi benzena diukur pada kromatografi gas. Benzena dalam 1 ml diklorometana dicampurkan dengan 100 µl standar internal dan dianalisis dalam kapiler gas kromatografi (GC-14A, Shimadzu, Japan) dihubungkan dengan *Data Integrator Chromatopac CR6A* yang dilengkapi dengan suatu injektor dan *flame ionization detector* (FID). GC juga dilengkapi kolom silika dengan panjang 30 m, diameter 0,32 mm. Untuk menentukan konsentrasi benzena, diatur pada temperatur 140°C, 2 menit; peningkatan temperatur 12°C dan temperatur akhir 250°C.

2.6 Analisis Konsentrasi CO₂

Analisis CO₂ menggunakan GC SRI (SRI *Instruments, Torrance, Calif*) yang dilengkapi dengan *Thermal Conductivity detector* (TCD) dan kolom Hayesep D (panjang 2m; 80/100 mesh). Helium digunakan sebagai *carrier gas* (laju alir 20 ml/menit), udara sintetik (250 ml/menit) dan H₂ (20 ml/menit) digunakan sebagai pembakaran gas dengan temperatur oven 80°C. (Yu, H., Rittmann, 2001)

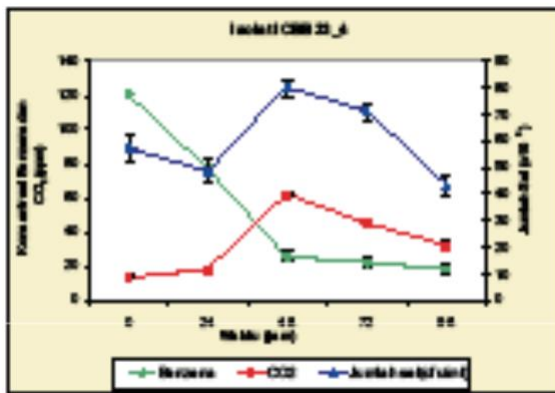
2.7 Menghitung Populasi Mikroba

Sampel diambil untuk dibuat seri pengenceran 1:10 atau (10⁻¹), kemudian hasil pengenceran diinokulasikan pada media minimal cair untuk metode MPN. Pertumbuhan diamati setelah inkubasi 48-72 jam, dihitung jumlah tabung ditumbuhi mikroba dan ditentukan jumlah tabung positif masing-masing

pengenceran. Ditentukan jumlah mikroba untuk tiap ml bahan berdasarkan jumlah tabung positif dari 3 seri pengenceran menurut tabel *Most Probable Number* (MPN).

3. Hasil Dan Pembahasan

Dari hasil uji isolat mutan ICBB334 dalam kemampuan mereduksi benzena, menunjukkan isolat mutan ICBB334 (Gambar 1) dalam waktu 48 jam memiliki kemampuan degradasi yaitu 78% dalam waktu 48 jam dengan laju yaitu 3,93 ppm/jam dan biodegradasi benzena 4,22 ppm/sel bakteri. Sedangkan dari waktu 48 sampai 96 jam degradasi mulai menurun yaitu hanya 1,012 ppm/jam.



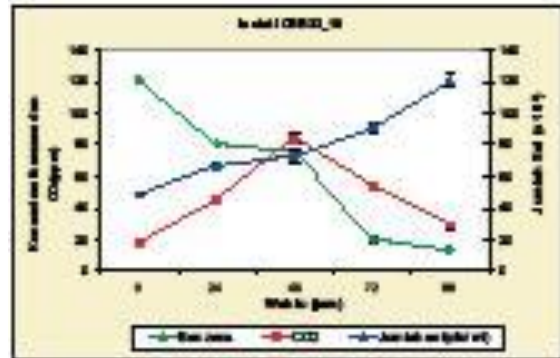
Gambar 1. Penurunan konsentrasi benzena dan CO₂ selama biodegradasi oleh isolat ICBB334

Secara keseluruhan biodegradasi benzena selama 96 jam yaitu mencapai 86% dengan laju 2,48 ppm/jam. Pengamatan CO₂ yang dideteksi memperlihatkan peningkatan produksi CO₂ meningkat sampai pada waktu 48 jam dan terus berkurang hingga akhir inkubasi yang sesuai dengan pola biodegradasi benzena.

Pertumbuhan populasi sel lambat dari awal dan akhir inkubasi, pada waktu 24 sampai 48 jam ada peningkatan populasi. Pertumbuhan mikroba sesuai dengan pola biodegradasi benzena dan jumlah CO₂ yang dihasilkan.

Pengujian kemampuan degradasi senyawa benzena pada isolat bakteri mutan ICBB3318 (Gambar 2) hanya mampu menurunkan konsentrasi benzena 38% dalam waktu 48 jam dengan laju 1,23 ppm/jam. Degradasi benzena meningkat tajam dari waktu

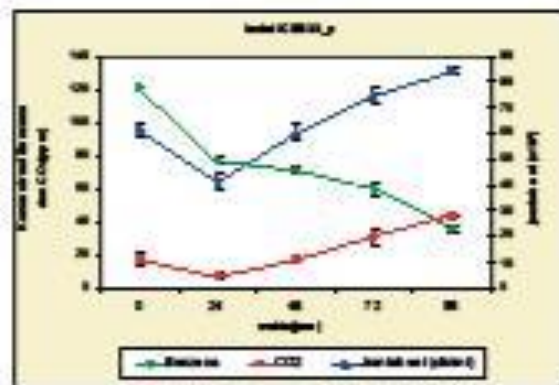
48 jam hingga akhir inkubasi 89% dengan laju 4,44 ppm/jam, biodegradasi benzena 1,30 ppm/sel bakteri dan secara keseluruhan laju degradasi benzena adalah 2,83 ppm/jam (Fahrudin 2006).



Gambar 2. Penurunan konsentrasi benzena dan penghasilan CO₂ selama biodegradasi oleh isolat ICBB3318

Peningkatan biodegradasi benzena ada peningkatan populasi sel yang disertai adanya peningkatan jumlah CO₂ yang dihasilkan.

Pada pengamatan mutan, maka isolat parental tidak mengalami mutasi ICBB33_p (Gambar 3), memperlihatkan biodegradasi benzena menurun dari awal inkubasi sampai akhir inkubasi. Dalam waktu 48 jam konsentrasi benzena 41% dengan laju biodegradasi benzena 1,38 ppm/jam dan laju 1,49 ppm/sel bakteri. Proses ini menunjukkan bahwa awal hingga akhir inkubasi laju biodegradasi benzena adalah 1,51 ppm/jam dengan degradasi mencapai 70%.



Gambar 3. Penurunan konsentrasi benzena dan penghasilan CO₂ selama biodegradasi oleh isolat ICBB33_p

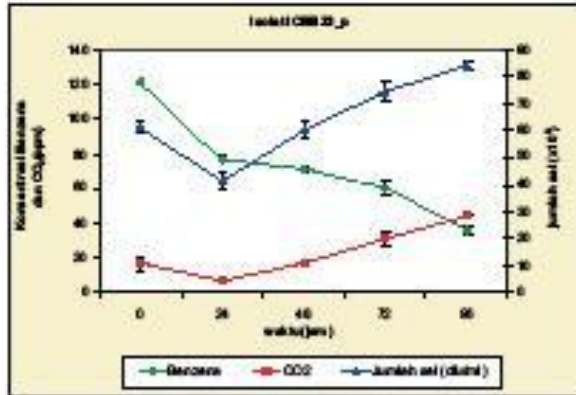
Pertumbuhan populasi sel juga relatif lambat, walaupun dari waktu 72 jam ada peningkatan populasi sel sampai akhir inkubasi, sesuai dengan CO₂ yang dihasilkan relatif tidak terjadi peningkatan.

Berdasarkan dari hasil pengamatan, jika dibandingkan antara kedua isolat mutan tersebut, ICBB33₄ memiliki laju degradasi lebih cepat terutama dalam waktu 48 jam, sedangkan laju degradasi pada isolat ICBB33₁₈ baru meningkat setelah 48 jam, walaupun pada akhirnya kedua isolat mutan ini memiliki kemampuan yang relatif sama dalam menurunkan konsentrasi benzena yaitu 89% atau tersisa 13,37 ppm dari jumlah awal 125 ppm. Selanjutnya, jika dibandingkan antara kedua isolat mutan dengan isolat parental, maka kedua isolat mutan ICBB33₄ dan ICBB33₁₈ terbukti mengalami peningkatan kapasitas dalam mendegradasi benzena. Kemampuan degradasi menonjol pada isolat mutan ICBB33₄ mampu menurunkan benzena lebih cepat yaitu 78% hanya dalam waktu 48 jam.

Pertumbuhan populasi sel yang menurun pada waktu 24 jam, karena bakteri membutuhkan waktu adaptasi secara enzimatik memerlukan pengenalan substrat aromatik yang sulit mengalami perombakan. Hal ini sesuai hasil penelitian yang dilaporkan oleh Sikkema et al. (1995) bahwa penambahan konsentrasi benzena dalam media kultur bakteri *Pseudomonas putida* menghambat konversi benzena menjadi cis-3.5-sikloheksadin-1-2-diol serta pembentukan suksinat dan katekol, yang berakibat pula terhambatnya pertumbuhan populasi bakteri tersebut. Dari penelitian Fahrudin (2006) mengemukakan benzena memberikan efek inhibitor pada pertumbuhan sel, dan efek pada ultrastruktur yang akan berpengaruh pada tingkat permeabilitas sel dan transduksi energi.

Penurunan konsentrasi benzena yang tidak disertai peningkatan pertumbuhan sel dan penghasilan CO₂, karena perombakan benzena akan menghasilkan senyawa toksik menghambat mikroba (Alexander, JT; Bartha, 1979). Terjadi peningkatan sel bakteri, tetapi tidak disertai penurunan konsentrasi benzena, karena proses metabolisme sel dipengaruhi oleh lingkungan dari senyawa metabolik yang dihasilkan oleh bakteri yang bersifat inhibitor jika senyawa itu dimanfaatkan mikroba sebagai

sumber karbon dan energi selain benzena bagi pertumbuhannya, sehingga metabolisme tidak selalu berhubungan dengan pertumbuhan mikroba (Jones, DG., 1987).



Berdasarkan hasil induksi mutasi UV menunjukkan peningkatan kapasitas bakteri dalam degradasi benzena. Sesuai dinyatakan Jones (1987), induksi mutasi, dapat meningkatkan kapasitas bakteri dikendalikan oleh gen yang bermutasi. Mutasi dapat mengubah genom bakteri untuk lebih adaptif pada senyawa pencemar di lingkungan.

4. Kesimpulan Dan

Saran 4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dalam uji kemampuan isolat bakteri mutan dalam mendegradasi senyawa benzena, maka dapat disimpulkan bahwa induksi mutasi UV mampu meningkatkan kapasitas bakteri dalam mendegradasi senyawa benzena. Dari aplikasi isolat mutan pada air tanah diperoleh mutan ICBB33₄ mampu mendegradasi benzena 86% dan ICBB33₁₈ 89%, sedangkan isolat parental hanya mampu mendegradasi 70% dari konsentrasi awal benzena 125 ppm.

4.2 Saran

Perlu kajian molekular lebih lanjut terhadap isolat mutan untuk mengetahui gen – gen yang mengalami mutasi dan perlu kajian aplikasi isolat mutan dilapangan, termasuk interaksinya dengan mikroba tempatan.

Daftar Pustaka

1. Zhou, E., and R. L. Crawford. 1995. *Effect Of Oxygen, Nitrogen, And Temperature On Gasoline Biodegradation In Soil*. Biodegradation 6: 127-140
2. Chapelle, F., 1999. *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*. John Wiley and Sons. New York.
3. Mueller, J.G., C. E. Cerniglia and P. H. Pritchard. 1996. *Bioremediation of Enviroments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocabons*. In Crawford, R.L. and D.L. Crawford. [Editor]. *Bioremediations Principles and Applications*. Cambridge University Press. Idaho. pp. 125-128
4. Stanbury, P. F. and A. Whitaker. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press. New York. pp. 31-34.
5. Fahrudin. 2006. Peningkatan kapasitas bakteri dalam biodegradasi benzene melalui mutagenesis UV. *Disertasi*, Program Studi Doktor Pengelolaan Sumber Daya Alam dan Lingkungan (PSL), Institut Pertanian Bogor, Bogor.
6. Bitton, G. 1999. *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss. New York. pp. 365- 402
7. Burland, S.M., and E.A. Edwards. 1999. *Anaerobic Benzene Biodegradation Linked To Nitrate Reduction*. Appl. Environ. Microbiol. 65 (2): 529-533.
8. Matthies, C., A. Griebhammer, and M. Schittroth. 1999. *Evidence for Involment Of Gut-Associated Denitrifying Bacteria In Emission Of Nitrous Oxide (N₂O) By Earthworms Obatined From Garden And Forest Soils*. Appl. Environ. Microbiol. 65(8): 3599-3604.
9. Sikkema, J., J.A.M. Bont, and B. Poolman. 1995. *Mechanisms of Membrane Toxicity Of Hydrocarbons*. Microbiological Reviews. 201-222.
10. Yu, H., B.J. Kim and B.E. Rittmann. 2001. *Atwo-Step Model for The Kinetics Of Btx Degradation And Intermediate Formation By Pseudomonas Putida F1*. Biodegradation 12: 465-475.
11. Dibble, J. T. and R. Bartha. 1979. *Effect of Environment Parameter On The Biodegradation Of Oil Sludge*. Appl. Environ. Microbiol. 37: 729-739.
12. Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press. New York.
13. Jones, D.G., 1987. *Exploitation of Microorganisms*. Chapman and Hall. London.