

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

Absract

*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 adalah senyawa kimia banyak digunakan dalam berbagai industri kimia yang dapat menjadi sumber pencemaran lingkungan. Benzena berbahaya karena selain sulit terdegradasi di alam, juga bersifat toksik dan karsinogenik, sehingga diberikan ambang batas pada air minum adalah 0,005 mg/l (Chapelle, 1999; Mueller PF, 1996)

Untuk mengatasi pencemaran benzena di lingkungan dilakukan dengan cara biologis melalui proses biodegradasi oleh bakteri. Namun, keberhasilan biodegradasi tidak hanya dipengaruhi oleh faktor lingkungan, tetapi kemampuan bakteri itu untuk memanfaatkan substrat bahan pencemar sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan. Oleh karena itu, dalam proses biodegradasi perlu dipilih isolat bakteri yang mempunyai kapasitas degradasi yang lebih tinggi (Stanbury, 1984)

Upaya meningkatkan kapasitas bakteri dalam proses biodegradasi bisa dilakukan melalui mutasi genom. Menurut Stanbury dan Whitaker; Bitton, kemampuan metabolisme organisme dikendalikan oleh genom, sehingga peningkatan kapasitas bakteri dapat dilakukan melalui induksi mutasi genom dengan menggunakan sinar ultra violet (UV). Adanya mutasi, diharapkan terjadi perubahan genetik ke arah yang lebih baik dalam melakukan metabolisme substrat.

Berdasarkan dari uraian di atas, maka perlu dilakukan uji kemampuan degradasi benzena pada isolat bakteri mutan *Pseudomonas sp* yang dimutasi melalui induksi mutasi-UV dan dibandingkan dengan isolat parental atau isolat aslinya. Diharapkan hasil induksi mutasi mendapatkan isolat bakteri yang memiliki kapasitas degradasi yang tinggi terhadap senyawa aromatik, sehingga dapat dijadikan sebagai sumber inokulum dalam menangani pencemaran senyawa hidrokarbon aromatik 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 pendegradasi benzena yang digunakan adalah isolat mutan *Pseudomonas sp* (ICBB33₄ dan ICBB33₁₈) dan parental *Pseudomonas sp* (ICBB33_p). 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 MgSO₄, 1,0 KH₂PO₄, 1,0 NaH₂PO₄, H₂O, 15,0 agar (g/l).

2.3 Aplikasi Isolat

Kajian biodegradasi benzena pada isolat mutan dan parental dilakukan dalam mikrokosmos air tanah dengan metode Burland dan Edwards, (1999) yang dimodifikasi. Mikrokosmos dibuat menggunakan botol serum 100 ml yang berisi air tanah 30 ml, ditambahkan nutrien dari K₂HPO₄ sebagai sumber fosfor dan NH₄NO₃ sebagai sumber nitrogen dan ditambah benzena 125 ppm, kemudian diinokulasikan 100 µl kultur sel bakteri. Botol serum ditutup rapat untuk menghindari keluarnya benzena yang volatil. Inkubasi dilakukan pada shaker selama 120 jam. Selama proses biodegradasi dilakukan pengamatan penurunan konsentrasi benzena, CO₂ yang dihasilkan, dan populasi bakteri. Perlakuan 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)

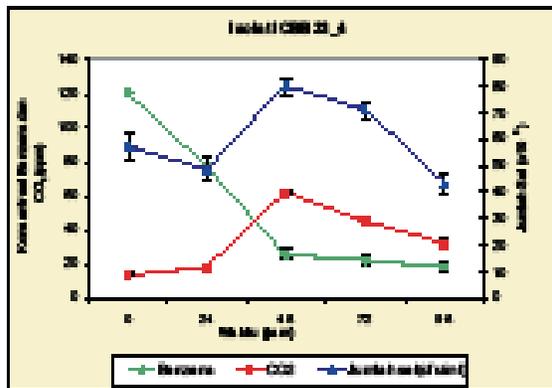
2.7 Menghitung Populasi Mikroba

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 yang ditumbuhi mikroba dan ditentukan jumlah tabung positif dari 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 kemampuan degradasi benzena, menunjukkan isolat mutan ICBB33₄ (Gambar 1) lebih cepat menurunkan konsentrasi benzena sampai 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 lambat yaitu hanya 1,012 ppm/jam.



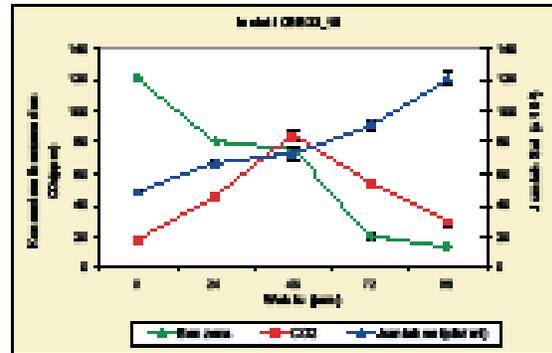
Gambar 1. Penurunan konsentrasi benzena dan CO₂ selama biodegradasi oleh isolat ICBB33₄

Secara keseluruhan biodegradasi benzena selama 96 jam yaitu mencapai 86% dengan laju 2,48 ppm/jam. Pengamatan CO₂ yang dideteksi pada headspace botol 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 cenderung lambat dari awal hingga akhir inkubasi, kecuali dari waktu 24 sampai 48 jam sedikit mengalami peningkatan populasi. Pertumbuhan mikroba sesuai dengan pola biodegradasi benzena dan jumlah CO₂ yang dihasilkan.

Pengujian kemampuan degradasi benzena pada isolat mutan ICB33₁₈ (Gambar 2) hanya mampu menurunkan konsentrasi benzena 38% dalam waktu 48 jam dengan laju 1,23 ppm/jam. Degradasi benzena meningkat tajam dari waktu

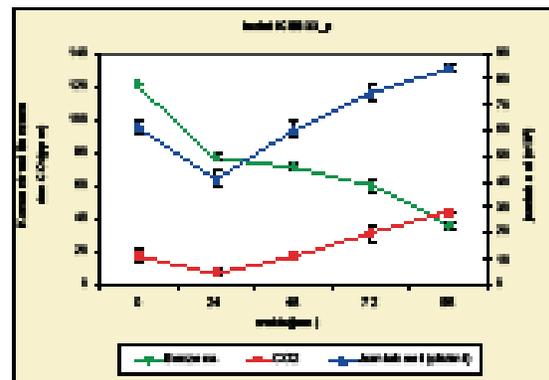
48 jam hingga akhir inkubasi yaitu mencapai 89% dengan laju 4,44 ppm/jam, biodegradasi benzena 1,30 ppm/sel bakteri dan secara keseluruhan laju degradasi benzena adalah 2,83 ppm/jam.



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

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

Dibandingkan pada kedua isolat mutan tersebut, maka isolat parental atau isolat asli tidak mengalami mutasi ICBB33_p (Gambar 3) selaku kontrol, memperlihatkan biodegradasi benzena terjadi sangat lambat dari awal inkubasi sampai waktu 72 jam. Dalam waktu 48 jam hanya mampu menurunkan konsentrasi benzena 41% dengan laju biodegradasi benzena 1,38 ppm/jam dan laju 1,49 ppm/sel bakteri. Secara keseluruhan dari 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

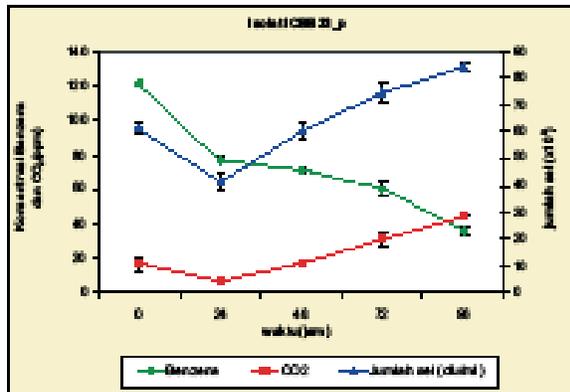
Pertumbuhan populasi sel juga relatif lambat, walaupun dari waktu 72 jam ada peningkatan populasi sel sampai akhir inkubasi, sesuai dengan CO₂ yang dihasilkan relatif tidak terjadi peningkatan.

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 awal inkubasi, merupakan bukti bahwa mikroba membutuhkan waktu yang panjang dalam tahap adaptasi untuk memanfaatkan substrat benzena sebagai sumber karbon dan energi yang dikenal dengan fase lag. Hal ini terlihat terutama pada isolat parental ICBB33_p, sedangkan pada kedua isolat mutan fase lag relatif lebih cepat. Hal ini sesuai hasil penelitian yang dilaporkan oleh Sikkema et al., 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 Sikkema et al., mengemukakan bahwa senyawa benzena memberikan efek inhibitor pada pertumbuhan sel, juga mempunyai efek pada ultrastruktur dan sifat fisiologi sel yang akan berpengaruh pada tingkat permeabilitas sel yang dapat menghambat transduksi energi.

Penurunan konsentrasi benzena yang tidak disertai dengan peningkatan pertumbuhan sel dan penghasilan CO₂, karena perombakan benzena tidak sempurna, akan menghasilkan senyawa intermediet yang bersifat menghambat pertumbuhan sel mikroba (Alexander, JT; Bartha, 1979). Namun pada sisi lain, terjadi peningkatan pertumbuhan sel, tetapi tidak disertai penurunan konsentrasi benzena, karena proses metabolisme sel akan menghasilkan asam – asam organik yang dapat dimanfaatkan pula mikroba sebagai

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



Berdasarkan uraian tersebut, menunjukkan bahwa induksi mutasi UV dapat mengubah kapasitas metabolisme bakteri. Hal ini sesuai dinyatakan oleh Jones, bahwa induksi mutasi, dapat meningkatkan kapasitas bakteri dalam menghasilkan suatu produk metabolisme. Mutasi dapat menciptakan variasi genetik mikroba dalam meningkatkan biodegradasi 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 terbukti mampu meningkatkan kapasitas bakteri dalam mendegradasi senyawa benzena. Dari aplikasi isolat mutan pada mikrokosmos 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. Bitton, G. 1999. *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss. New York. pp. 365- 402
6. Burland, S.M., and E.A. Edwards. 1999. *Anaerobic Benzene Biodegradation Linked To Nitrate Reduction*. Appl. Environ. Microbiol. 65 (2) : 529-533.
7. 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 Gardèn And Forest Soils*. Appl. Environ. Microbiol. 65(8) : 3599-3604.
8. Sikkema, J., J.A.M. Bont, and B. Poolman. 1995. *Mechanisms Of Membrane Toxicity Of Hydrocarbons*. Microbiological Reviews. 201-222.
9. 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.
10. Dibble, J. T. and R. Bartha. 1979. *Effect Of Environment Parameter On The Biodegradation Of Oil Sludge*. Appl. Environ. Microbiol. 37 : 729-739.
11. Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press. New York.
12. Jones, D.G., 1987. *Exploitation of Microorganisms*. Chapman and Hall. London.