

## OPTIMASI PERTUMBUHAN BAKTERI LAUT *Salinicola peritrichatus* LBF-1-0025 DALAM SENYAWA ALKANA

### *The Growth Optimization of Marine Bacteria Salinicola peritrichatus LBF-1-0025 in Alkanes*

Ratna Cempaka Lingga<sup>1</sup>, Ahmad Thontowi<sup>2\*</sup>, Elvi Yetti<sup>2</sup>, Anto Budiharjo<sup>1</sup>, Isworo Rukmi<sup>1</sup>, dan Yopi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

<sup>2</sup> Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong-Bogor, Indonesia

\* Korespondensi Penulis: ahmad.thontowi@lipi.go.id

Diterima: 30 Mei 2017; Direvisi: 20 Juli 2017; Disetujui: 28 Agustus 2017

#### ABSTRAK

Pentana, dekana, pentadekana, dan parafin merupakan jenis kelompok senyawa alkana yang tidak dapat larut dalam air dan sulit terdegradasi. Sifat ini yang menjadikan senyawa alkana dapat mencemari lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum senyawa alkana bagi pertumbuhan isolat LBF-1-0025 dan mengidentifikasinya secara molekuler berdasarkan gen 16S rDNA. Dari skrining awal diketahui bahwa isolat LBF-1-0025 memiliki potensi tinggi dalam mendegradasi senyawa pentana, dekana, pentadekana, dan parafin. Optimasi pertumbuhan isolat LBF-1-0025 pada beberapa senyawa alkana dilakukan dengan menumbuhkannya dalam medium *Artificial Sea Water* (ASW) yang mengandung beberapa konsentrasi senyawa pentana, dekana, pentadekana, dan parafin. Isolat LBF-1-0025 mampu tumbuh secara optimal pada pentana 150 ppm, dekana 200 ppm, pentadekana 150 ppm, dan parafin 200 ppm setelah 3 hari inkubasi. Hasil analisis sekuen gen 16S rDNA, bakteri LBF-1-0025 memiliki kemiripan sebesar 97% dengan *Salinicola peritrichatus* DY22.

**KATA KUNCI:** alkana, bakteri laut, 16S rDNA

#### ABSTRACT

*Pentane, decane, pentadecane, and paraffin are kind of groups of alkane compounds that are insoluble in water and difficult to degrade. This characteristic cause alkane compounds to pollute the environment. The aims of this research were to determine the optimum concentration of alkane compounds for the growth of isolate LBF-1-0025 and molecular identification based on 16S rDNA gene. From initial screening test, it was known that isolate LBF-1-0025 had high potential in degrading pentane, decane, pentadecane and paraffin compounds. Growth optimization of isolate LBF-1-0025 on several alkane compounds were carried out by culturing it in ASW medium containing various concentration of alkane (pentane, decane, pentadecane, and paraffin). Isolate LBF-1-0025 had optimum growth in pentane 150 ppm, decane 200 ppm, pentadecane 150 ppm and paraffin 200 ppm after 3 days incubation. Result analysis of 16S rDNA gene showed that isolate LBF-1-0025 had a similarity of 97% with *Salinicola peritrichatus* DY22.*

**KEYWORDS:** alkane, sea bacteria, 16S rDNA

#### PENDAHULUAN

Pemanfaatan sumber daya alam sebagai sumber energi sudah lama dilakukan. Ekplorasi dilakukan dengan proses pengeboran (*drilling*). Selama proses pengeboran tidak jarang terjadi kebocoran yang mengakibatkan minyak bumi yang sedang melewati tahapan pengeboran keluar dari pipa pengeboran atau bahkan dapat terjadi ledakan (*blow out*). Ledakan ini mengakibatkan semburan minyak bumi ke lokasi

sekitar laut, sehingga menimbulkan pencemaran (Rosidah, 2013).

Pencemaran akibat tumpahan minyak bumi di perairan laut dapat menimbulkan masalah yang serius, karena mengganggu ekosistem di laut baik dalam jangka waktu pendek dan jangka panjang. Akibat jangka pendek pencemaran minyak di laut ialah biota laut mengalami kekurangan oksigen dan keracunan langsung. Dampak jangka panjang dari tumpahan minyak ialah akumulasi bahan berbahaya di biota laut

yang secara tidak langsung akan dikonsumsi manusia. Selain itu dampak jangka panjang dari pencemaran di laut adalah kerusakan ekosistem laut (Kuncowati, 2010).

Pencemaran ekosistem laut oleh tumpahan minyak dapat diatasi dengan berbagai metode baik secara fisik, kimia, maupun biologis. Metode biologis dilakukan dengan memanfaatkan bakteri pendegradasi minyak pada daerah pencemaran minyak bumi. Pemanfaatan bakteri yang berpotensi tinggi mendegradasi hidrokarbon dilakukan dengan penambahan mikroba indigenous (*biodegradation*) atau dengan penambahan nutrisi untuk meningkatkan kemampuan mikroba indigenous (*biostimulation*) (Retno & Mulyana, 2013). Minyak mentah terdiri dari ribuan senyawa hidrokarbon yang dapat dikelompokkan ke dalam hidrokarbon alifatik (rantai jenuh), alisiklik, dan aromatik. Hidrokarbon terlarut 79,2 %, hidrokarbon aromatik 15,8 %, serta resin dan asfalten 5% (Queiroga, Nascimento, & Serra, 2003). n-Alkana, merupakan kelompok yang terbesar pada minyak mentah. Walaupun sifat toksisitasnya lebih rendah dibanding senyawa hidrokarbon aromatik, namun dengan jumlah yang relatif besar perlu upaya penanganannya.

Proses degradasi alkana terjadi secara aerobik dengan melibatkan oksigen sebagai akseptor elektron eksternal (Abbasian, Lockington, Mallavarapu, & Naidu, 2015; Zampolli, Collina, Lasagni, & Gennaro, 2014). Salah satu proses degradasi senyawa hidrokarbon adalah biodegradasi dengan melibatkan mikroorganisme. Bakteri pendegradasi n-alkana di antaranya adalah *Cryptococcus neoformans* dan *Pseudomonas aeruginosa* dari tanah sekitar kilang minyak (Chan, Kuo, Lin, & Mou, 1990), *Pseudomonas aeruginosa* WatG dan *Serratia marcescens* HokM yang terdapat pada mata air panas yang terkontaminasi minyak bumi (Wongsa et al. 2004), *Mycobacterium* sp. CH1 yang diisolasi dari sedimen air tawar (Churchill, Harper, & Churchil, 1999), *Rhodococcus serytropolis* PR4 dari aspal di dekat Tanjung gutes Gorevol (Likhoshvay, Lomakina, & Grachev, 2014), *Marinobacter* sp. CAB dari stasiun pengeboran minyak di Vietnam Selatan (Huu, Denner, Ha, Wanner, & Lotter, 1999), dan *Alcanivorax dieselolei* B-5 dari air laut pesisir dan sedimen laut dalam (Liu et al. 2011). Akan tetapi, mikroba tersebut diisolasi dari daerah subtropis, dengan keadaan geografis dan suhu yang berbeda, sedangkan informasi mengenai mikroba pendegradasi minyak dari perairan daerah tropis masih terbatas.

Thontowi dan Yopi (2013) telah mengisolasi, menganalisis, dan menguji kemampuan isolat pendegradasi alkana dari Pulau Pari, Kepulauan

Seribu Jakarta. Dari laporan tersebut diperoleh informasi bahwa salah satu isolat potensial pendegradasi alkana ialah LBF-1-0025. Isolat ini mampu mendegradasi beberapa senyawa alkana rantai lurus dan rantai bercabang. Akan tetapi, informasi pertumbuhan optimal isolat ini pada beberapa senyawa tersebut belum diperoleh. Informasi pertumbuhan optimal pada senyawa alkana tersebut penting bagi upaya strategi pengembangan bioremediasi senyawa hidrokarbon sebagai polutan.

Berdasarkan jumlah atom C, maka senyawa alkana dapat dibagi menjadi tiga golongan, yaitu alkana rantai pendek (C5<), alkana rantai medium (C5-C17), dan alkana rantai panjang (C18>). Biodegradasi jenis alkana bergantung pada jenis enzim yang terdapat dalam sel. Beberapa enzim yang terlibat dalam biodegradasi senyawa alkana ialah metana monooksigenase, P450 sitokrom, dan monooksigenase rantai panjang (Cerniglia, 1992; Rojo, 2004; Throne-Holst et al. 2006; van Beilen & Funhoff, 2005). Pada penelitian ini digunakan beberapa senyawa alkana rantai medium dan rantai panjang. Informasi pertumbuhan dalam senyawa-senyawa tersebut merupakan informasi awal yang penting bagi aplikasi beberapa enzim yang terlibat dalam biodegradasi senyawa alkana, khususnya rantai medium dan panjang.

Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi optimal pertumbuhan isolat LBF-1-0025 dalam beberapa senyawa alkana dan mengidentifikasinya secara molekuler berdasarkan gen 16S rDNA. Kondisi optimal yang diperoleh diharapkan dapat meningkatkan efektivitas biodegradasi senyawa alkana sebagai salah satu agen bioremediasi untuk penyelamatan biota laut.

## BAHAN DAN METODE

### Isolat Bakteri Laut dan Produksi Sel

Bakteri laut yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri LBF-1-0025. Isolat ini merupakan koleksi Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong, Bogor. Isolat LBF-1-0025 diremajakan dalam media Marine Agar (MA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. Produksi sel dilakukan dengan sentrifugasi kultur bakteri pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Hasil dari sentrifugasi berupa pellet kemudian dilarutkan dengan larutan penyangga fosfat 0,2 M pH 7,0. Kepadatan sel isolat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Sel tersebut akan digunakan untuk optimasi pertumbuhan bakteri dalam beberapa konsentrasi senyawa alkana.

### **Optimasi Pertumbuhan Bakteri terhadap Konsentrasi Senyawa Alkana**

Pertumbuhan optimum isolat LBF-1-0025 diketahui dengan uji pertumbuhannya dalam media Artificial Sea Water (ASW) yang mengandung beberapa senyawa alkana dengan konsentrasi berbeda. Senyawa alkana yang digunakan ialah pentana, dekana, pentadekana, dan parafin dengan variasi konsentrasi (0, 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm). Sejumlah sel isolat LBF-1-0025 setara  $OD_{600nm} = 1$  ditumbuhkan ke dalam 3 ml media ASW yang mengandung beberapa konsentrasi senyawa alkana dalam tabung reaksi. Kontrol uji pertumbuhan dilakukan dengan dua cara yaitu kontrol isolat dengan campuran isolat bakteri dan media ASW cair tanpa penambahan alkana. Adapun kontrol alkana dengan campuran media ASW cair dan alkana tanpa isolat. Tabung reaksi diinkubasi dalam inkubator berpenggok pada suhu 30 °C dengan kecepatan 150 rpm selama 3 hari masa inkubasi. Pengambilan sampel kultur dilakukan pada hari inkubasi ke-3 setelah inkubasi. Sampel diukur kepadatan selnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600nm (Yetti, Thontowi, & Yopi, 2016).

### **Identifikasi secara Molekuler Gen 16S rDNA Isolat LBF-1-0025**

DNA isolat bakteri laut LBF-1-0025 diisolasi dengan PROMEGA Wizard® Genomic DNA Purification Kit sehingga diperoleh DNA genom. Visualisasi isolasi DNA genom dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8% dengan kondisi 35 Volt selama 110 menit. Marker yang digunakan adalah marker 1 kb Thermo Scientific.

Isolat bakteri laut LBF-1-0025 diamplifikasi berdasarkan sekuen gen penyandi 16S rRNA menggunakan primer universal berupa primer 9F (5' AAGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') dan primer 1541R (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') (Dastgheib, Amoozegar, Khajeh, & Ventosa, 2011). Kondisi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan pada 10 siklus pertama yaitu pradenaturasi 1 siklus (95 °C selama 2 menit), denaturasi (95 °C selama 30 detik), penempelan primer (65 °C selama 1 menit), dan elongasi (72 °C selama 2 menit). Amplifikasi dilakukan kembali sebanyak 30 siklus, yaitu denaturasi (95 °C selama 30 detik), penempelan (55 °C selama 1 menit), dan elongasi (72 °C selama 2 menit). Selanjutnya, dilakukan penyesuaian atas dan bawah (extension) pada suhu 72 °C selama 2 menit (Thontowi & Yopi, 2011).

### **Analisis Keragaman dan Pohon Kekerbatan**

Sekuen gen 16S rDNA dilakukan dengan DNA sekuen Pharmacia tipe ABI 310. Analisis penjajaran urutan nukleotida parsial gen pengkode 16S rDNA

menggunakan program BLAST (Altschul et al. 1997). Proses penyejajaran sekuen dengan menggunakan program ClustalX (Higgins & Sharp, 1988), sedangkan analisis filogenetik menggunakan program NJ Plot serta Mega 5.2 *ABI sequencer software* (Tamura et al. 2011).

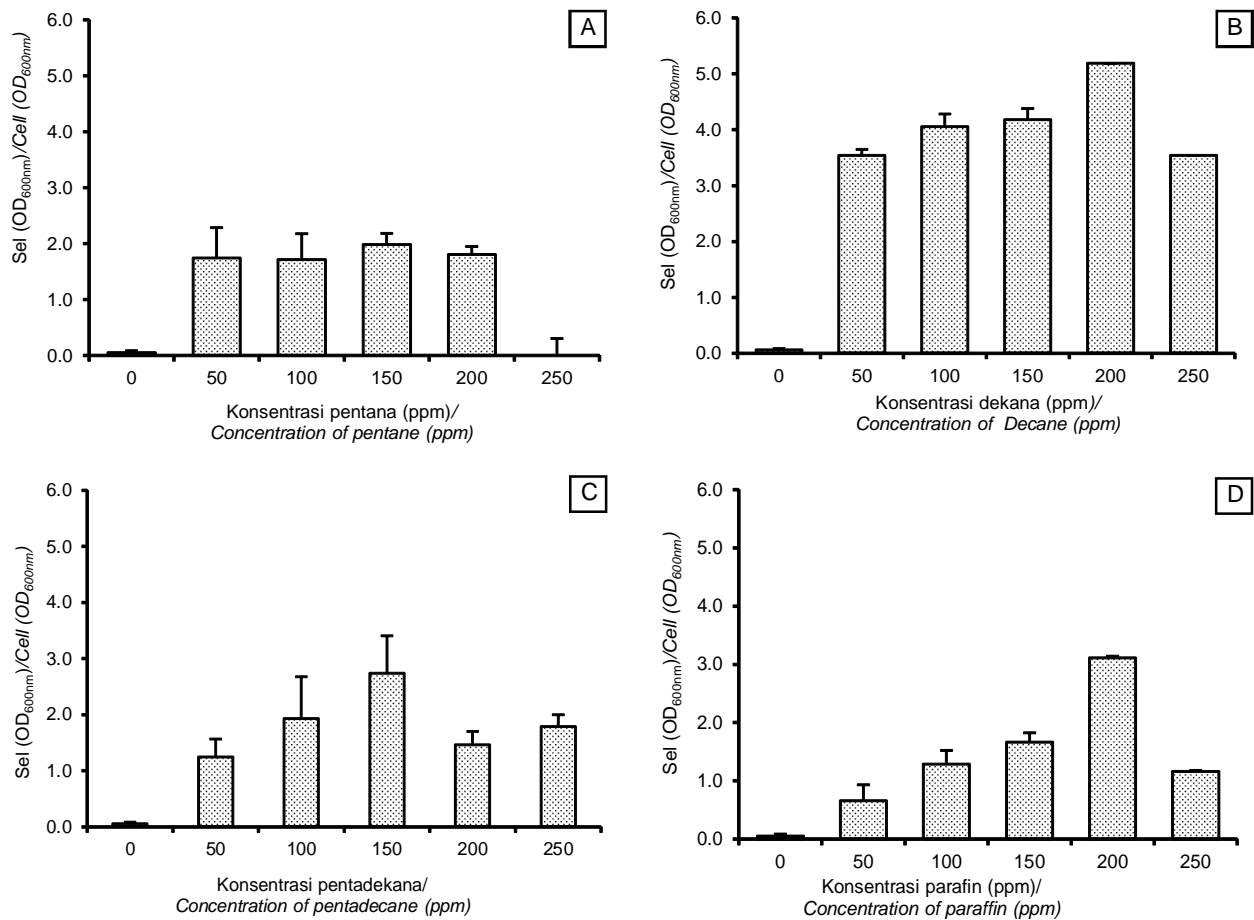
## **HASIL DAN BAHASAN**

### **Optimasi Konsentrasi Pentana Bagi Pertumbuhan Bakteri**

Optimasi konsentrasi pentana bertujuan mendapatkan kondisi pertumbuhan optimum pada beberapa variasi konsentrasi pentana. Gambar 1A menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0025 memiliki kemampuan optimal mendegradasi senyawa pentana pada konsentrasi 150 ppm dengan nilai  $OD_{600nm}$  sebesar 1,99. Konsentrasi optimal dalam pertumbuhan bakteri menunjukkan batas kemampuan bakteri yang dapat menggunakan senyawa pentana sebagai sumber karbon dan energi untuk kegiatan metabolisme (degradasi substrat) (Ionata, Blasio, & Cara, 2005). Nilai  $OD_{600nm}$  sel isolat LBF-1-0025 meningkat dari 1,77 pada konsentrasi pentana 100 ppm menjadi 1,99 pada konsentrasi pentana 150 ppm. Menurut Astiranditha (2016) peningkatan jumlah sel berkaitan erat dengan pertumbuhan bakteri dan kemampuan dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon. Nilai  $OD_{600nm}$  sel isolat LBF-1-0025 menurun pada konsentrasi 200 ppm dan bahkan tidak dapat mendegradasi pentana pada konsentrasi 250 ppm. Konsentrasi hidrokarbon yang tinggi memiliki sifat toksik yang tinggi pula, sehingga dapat menurunkan laju biodegradasi (Leahy & Colwell, 1990). Penelitian Cameorta dan Singh (1990) melaporkan bahwa konsentrasi pentana lebih dari 1,98 g/l (0,3%) pada *Pseudomonas* PG-1 dapat menghambat pertumbuhan dan yang ditandai dengan menurunnya biomasa sel. Menurut Pandey, Mailray, dan Chakrabart (2002) sifat senyawa pentana mudah menguap, kelarutan dalam air rendah dan menghambat pembentukan biofilm, sehingga senyawa sulit didegradasi.

### **Optimasi Konsentrasi Dekana Bagi Pertumbuhan Bakteri**

Optimasi konsentrasi dekana bertujuan mendapatkan kondisi pertumbuhan optimum pada beberapa variasi konsentrasi dekana. Isolat LBF-1-0025 memiliki kemampuan optimal dalam mendegradasi senyawa dekana pada konsentrasi 200 ppm dengan nilai  $OD_{600nm}$  sel sebesar 5,19 (Gambar 1B). Nilai  $OD_{600nm}$  sel isolat LBF-1-0025 meningkat dari 3,53 pada konsentrasi dekana 50 ppm menjadi



Gambar 1. Optimasi konsentrasi (A) pentana, (B) dekana, (C) pentadekana, dan (D) parafin bagi pertumbuhan bakteri laut LBF-1-0025

Figure 1. Optimization of (A) pentane, (B) decane, (C) pentadecane, and (D) paraffin concentrations for cell growth of LBF-1-0025 marine bacteria

5,19 pada konsentrasi dekana 200 ppm. Hasil optimasi konsentrasi dekana juga menunjukkan bahwa OD<sub>600nm</sub> sel menurun dari 5,19 pada konsentrasi dekana 200 ppm menjadi 3,54 pada konsentrasi 250 ppm. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemampuan degradasi dekana oleh isolat bakteri semakin menurun apabila telah melebihi konsentrasi optimum. Penelitian yang dilakukan Hassanuzzaman et al. (2007) dan Liu et al. (2014) menunjukkan bahwa konsentrasi dekana yang melebihi batas konsentrasi dapat merusak struktur lipid pada membran sel bakteri, terakumulasinya dekana, dan menurunkan viabilitas sel.

#### Optimasi Konsentrasi Pentadekana Bagi Pertumbuhan Bakteri

Optimasi konsentrasi pentadekana bertujuan mendapatkan kondisi pertumbuhan optimum pada beberapa variasi konsentrasi pentadekana. Berdasarkan Gambar 1C dapat diketahui bahwa isolat

LBF-1-0025 memiliki kemampuan mendegradasi senyawa pentadekana yang optimal pada konsentrasi 150 ppm dengan nilai OD<sub>600nm</sub> sel 2,73. OD<sub>600nm</sub> sel isolat LBF-1-0025 meningkat dari 1,24 pada konsentrasi pentadekana 50 ppm menjadi 2,73 pada konsentrasi pentadekana 150 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan degradasi pentadekana oleh isolat LBF-1-0025 meningkat seiring peningkatan konsentrasi pentadekana. Peningkatan laju biodegradasi alkana rantai panjang (pentadekana) sampai batas maksimum menunjukkan bakteri masih dapat memanfaatkan pentadekana sebagai sumber karbon karena bakteri masih mampu melakukan katabolisme dan transformasi senyawa tersebut (Acer, Güven, Bekler & Güven, 2016; Hassanshaian, Ahmadinejad, Tebyanian, & Kariminik, 2013).

Hasil optimasi konsentrasi pentadekana juga menunjukkan bahwa OD<sub>600nm</sub> sel menurun pada konsentrasi 200 dan 250 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan degradasi pentadekana oleh isolat

LBF-1-0025 menurun apabila melebihi konsentrasi pentadekana optimum. Konsentrasi senyawa pentadekana yang semakin tinggi atau melebihi batas toleransi dapat mengganggu aktivitas sel dalam mengemulsi, mentransfor, dan mendegradasi pentadekana (Kato, Haruki, Imanaka, Morikawa, & Kanaya, 2001; Zam, 2010).

### **Optimasi Konsentrasi Parafin Bagi Pertumbuhan Bakteri**

Optimasi konsentrasi parafin bertujuan mendapatkan kondisi pertumbuhan optimum pada beberapa variasi konsentrasi parafin. Isolat LBF-1-0025 memiliki kemampuan optimal dalam mendegradasi senyawa parafin pada konsentrasi 200 ppm dengan nilai OD<sub>600nm</sub> sel 3,11 (Gambar 1D). Nilai OD<sub>600nm</sub> sel isolat LBF-1-0025 meningkat dari 0,66 pada konsentrasi parafin 50 ppm menjadi 3,11 pada konsentrasi parafin 200 ppm. Konsentrasi parafin yang tinggi menyediakan sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan bakteri, sehingga laju pertumbuhan bakteri semakin cepat (Liu, Jia, & Xu, 2013; Wentzel, Ellingsen, Kotlar, Zotchev, & Holst, 2007).

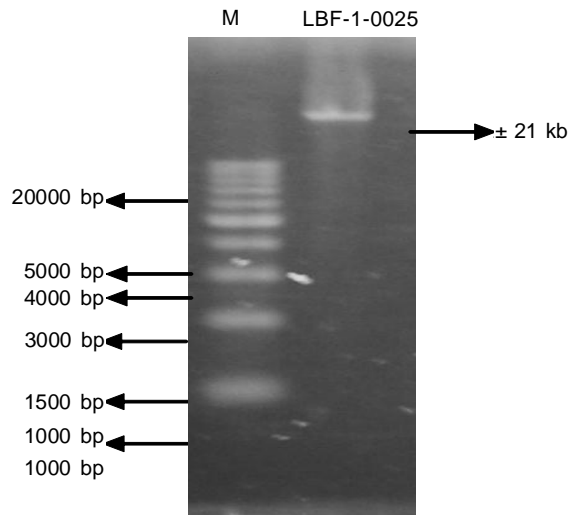
Hasil optimasi konsentrasi parafin juga menunjukkan bahwa isolat LBF-1-0025 memiliki kemampuan degradasi parafin yang optimal pada konsentrasi 200 ppm. Isolat ini selanjutnya menunjukkan penurunan OD<sub>600nm</sub> sel pada konsentrasi 250 ppm sebesar 1,16. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemampuan degradasi menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi parafin. Hassanshaian et al. (2013) menyatakan bahwa laju degradasi dipengaruhi oleh konsentrasi. Konsentrasi senyawa yang melebihi batas optimum atau batas maksimal toleransi sel menyebabkan keseimbangan metabolisme sel terganggu, dan bahkan menghambat bioavailabilitas sel (Leahy & Colwell, 1990; Queiroga et al., 2003; Susanthi, Sudiana, & Sembiring, 2009).

Berdasarkan hasil uji optimasi konsentrasi pada 4 senyawa alkana, isolat LBF-1-0025 mempunyai kondisi optimum pertumbuhan saat ditumbuhkan dalam senyawa dekana dan parafin 200 ppm. Adapun konsentrasi optimum bagi pertumbuhan isolat LBF-1-0025 dalam senyawa pentadekana dan pentana ialah 150 ppm. Jika dibandingkan pertumbuhan selnya dalam keempat senyawa alkana yang diuji, isolat ini menunjukkan kecenderungan lebih mampu memanfaatkan senyawa alkana rantai lurus (pentana, dekana, pentadekana dan parafin). Adapun pertumbuhannya dalam media yang mengandung senyawa alkana rantai bercabang lebih rendah dibanding dalam rantai lurus. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri LBF-1-0025 lebih mudah memanfaatkan alkana rantai lurus, baik dengan jumlah

atom C-medium hingga rantai panjang dibanding alkana rantai bercabang. Alkana rantai lurus dengan jumlah C-medium merupakan senyawa yang mudah didegradasi (Sun, Ning, Yang, & Li, 2015). Alkana rantai pendek (<C5) pada konsentrasi yang tinggi lebih sulit didegradasi karena dapat merusak membran sel, menurunkan viabilitas sel, dan toksisitas sel (Acer et al., 2016; Kloss, Munch, & Schloter, 2006). Hal yang menarik adalah kemampuan isolat ini tumbuh dalam senyawa alkana rantai panjang dan alkana bercabang. Dari hasil ini diduga bahwa isolat LBF-1-0025 memiliki kemampuan untuk mendegradasi alkana rantai medium (dekana dan pentadekana), alkana rantai lurus (parafin), dan alkana rantai panjang (pentadekana). Kemampuan ini mengindikasikan isolat ini memiliki beberapa enzim pendegradasi alkana yaitu metana monooksigenase, enzim P450 sitokrom, dan long chain alkane monooksigenase. Beberapa laporan menyebutkan bahwa enzim metana-propana monoksigenase merupakan enzim yang mendegradasi alkana rantai pendek (C1-C4), enzim P450 sitokrom merupakan enzim yang mendegradasi alkana rantai medium (C6-C11), dan long chain alkane monooksigenase (LadA) merupakan enzim yang mendegradasi alkana rantai panjang (C15-C36) (Ji, Mao, Wang, & Bartlam, 2013, Liu & Shao, 2005; van Beilen, Li, Duetz, Smits, & Witholt, 2003). Namun dugaan ini haruslah diuji secara mendetail dalam tahap berikutnya dengan fokus identifikasi dan uji aktivitas enzim-enzim tersebut dalam senyawa alkana.

### **Identifikasi isolat bakteri laut LBF-1-0025**

Untuk menganalisa gen 16S rRNA, maka telah dilakukan isolasi dan deteksi DNA genom dari isolat LBF-1-0025. DNA genom isolat LBF-1-0025 berukuran sekitar 21 kb (Gambar 2). Langkah selanjutnya adalah mengidentifikasi isolat LBF-1-0025 dengan melakukan analisa terhadap gen 16S rRNA. Salah satu metode identifikasi mikroba ialah secara molekuler dengan menganalisis sebagian gen 16S rDNA bakteri. Identifikasi isolat bakteri laut potensial LBF-1-0025 pendegradasi senyawa parafin, pentadekana, pentana, dan dekana dilakukan dengan analisis sebagian gen 16S rRNA. Menurut Patel (2001) gen 16S rRNA dimiliki hampir semua bakteri dan digunakan untuk mengetahui filogeni dan taksonomi karena sifatnya yang stabil, konservatif, dan tidak berubah selama evolusi. Amplifikasi gen 16S rRNA dapat dilakukan dengan menggunakan koloni bakteri sebagai DNA cetakan untuk reaksi PCR (Pace, 1997). Primer yang digunakan untuk memperoleh wilayah 16S rRNA adalah primer universal 9F dan 1541R. Amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus, dengan perkiraan hasil yang diperoleh sebanyak ~2 triliun salinan fragmen target (Clarridge, 2004).



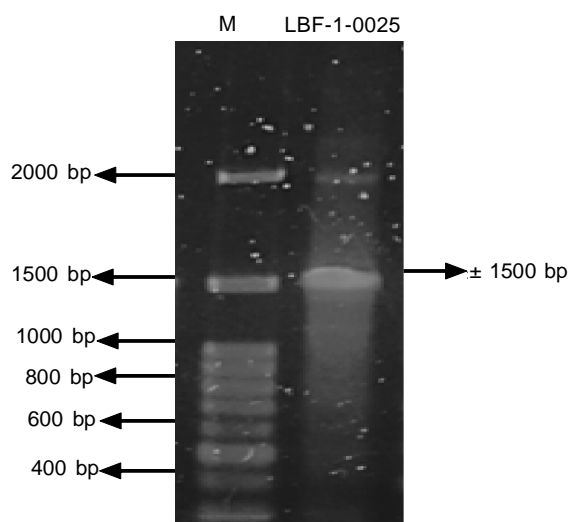
Gambar 2. Visualisasi elektroforesis hasil isolasi DNA genom bakteri laut LBF-1-0025 dalam agarosa 0,8% dengan kode; M = marker 1 kb

Figure 2. Electrophoresis visualization of the isolation of LBF-1-0025 marine bacterial DNA genomes in 0.8% agarose with code; M = 1 kb marker

Visualisasi produk amplifikasi gen 16S rDNA isolat LBF-1-0025 dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil visualisasi menunjukkan adanya pita DNA dengan kisaran panjang 1.500 bp (Gambar 3). Menurut Clarridge (2004) panjang 16S rRNA sekitar 1.550 dengan daerah lestari berada sekitar 540 sampai 1.550 bp. Hasil urutan basa nukleotida isolat LBF-1-0025 dibandingkan dengan database di *genbank* melalui program BLSTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) pada 17 Juli 2016 untuk mendapatkan kekerabatan terdekat dengan organisme

lainnya. Berdasarkan *genbank*, isolat LBF-1-0025 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Salinicola petrichatus* strain DY22 (NR\_109731.1) dengan tingkat kemiripan 97% (Tabel 1 dan Gambar 4).

Berdasarkan data dari *genbank*, isolat LBF-1-0025 memiliki kemiripan 97% dengan *Salinicola petrichatus* DY22 dengan *max score* 1295 dan nilai *bootstrap* 100 yang menunjukkan bahwa data relatif stabil. Hal ini sesuai dengan Lemey, Marco, dan Anne-Mieke, (2009) yang menyatakan bahwa nilai *bootstrap*



Gambar 3. Visualisasi elektroforesis produk hasil PCR dalam agarosa 1% dengan kode; M = marker 100 bp  
Figure 3. Visualization of PCR product electrophoresis results in a 1% agarose with code; M = 100 bp marker

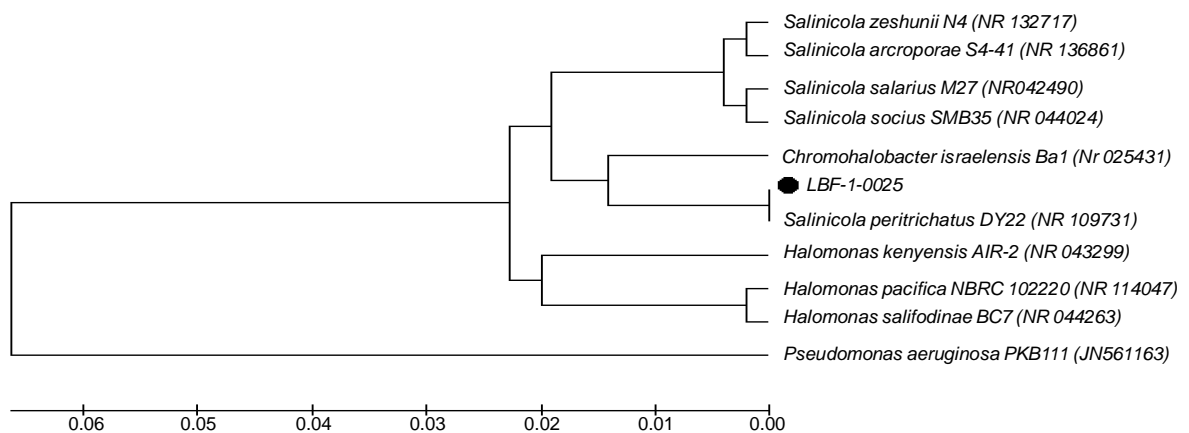
Tabel 1. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolat LBF-1-0025  
 Table 1. BLAST analysis result of 16S rRNA gene of isolate LBF-1-0025

Analisis BLAST/ BLAST Analysis	Skor maksimal/ Maximal Score	Skor total/ Total Score	Query Cover (%)	E-Value	Kemiripan/ Similarity
<i>Salinicola peritrichatus</i> DY22 (NR_109731.1)	1295	1295	100	0.0	97%
<i>Salinicola zeshunii</i> N4 (NR_132717.1)	1279	1279	100	0.0	97%
<i>Salinicola acroporae</i> S4-41 (NR_136861.1)	1267	1267	100	0.0	96%
<i>Salinicola salarius</i> M27 (NR_042490.1)	1251	1251	100	0.0	96%
<i>Salinicola socius</i> SMB 35 (NR_044024.1)	1245	1245	100	0.0	96%
<i>Salinicola halophilus</i> CG4.1 (NR_042125.1)	1245	1245	100	0.0	96%
<i>Halomonas pacifica</i> NBRC 102220 (NR_114047.1)	1240	1240	100	0.0	96%
<i>Halomonas salifodinae</i> BC7 (NR_044263.1)	1240	1240	100	0.0	96%
<i>Halomonas kenyensis</i> AIR-2 (NR_043299.1)	1240	1240	100	0.0	96%
<i>Chromohalobacter israelensis</i> Ba1 (NR_025431.1)	1229	1229	100	0.0	96%

yang lebih besar dari 70 menunjukkan bahwa data relatif stabil.

Dalam penelitian ini identifikasi bakteri hanya dilakukan secara molekuler melalui analisa sebagian gen 16S rRNA. Berdasarkan laporan Huo, Meng, Xu, Wang, dan Xu (2013) *Salinicola peritrichatus* DY22 termasuk bakteri Gram negatif, sel berbentuk batang,

memiliki flagel, dan berukuran 0,6-1,5 µm. Koloni berdiameter 2 mm, sirkular, berwarna *creamy-yellow* dengan tepi yang teratur setelah inkubasi 3 hari pada suhu 35 °C. Pertumbuhan optimal *Salinicola peritrichatus* DY22 terjadi pada pH 5,0-7,0 dan suhu 35-37 °C. Hasil uji negatif terjadi pada oksidase dan reduksi nitrat. Bakteri ini tidak mampu menghidrolisis



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat LBF-1-0025 berdasarkan perbandingan gen 16S rRNA  
 Figure 4. Phylogenetic tree of LBF-1-0025 isolate based on the comparison of 16S rRNA gene

nitrat, asetat, sitrat, glukonat, dan kasein. Penelitian tentang kemampuan *Salinicola petrichatus* dalam mendegradasi senyawa alkana belum dilaporkan. Hasil ini menunjukkan beragamnya bakteri pendegradasi minyak, khususnya alkana di daerah perairan Indonesia, sehingga menarik untuk dilakukan eksplorasi lebih jauh (Harwati, Kasai, Kodama, Susilaningsih, & Watanabe, 2007; Thontowi & Yopi, 2013). Penelitian lanjutan dari hasil ini juga menarik, terutama terkait dengan karakteristik isolat LBF-1-0025 dalam mendegradasi senyawa alkana, enzim-enzim yang terlibat dalam biodegradasi alkana, serta aplikasi dalam bioremediasi.

## KESIMPULAN

Isolat bakteri laut LBF-1-0025 merupakan bakteri yang dapat tumbuh dalam senyawa alkana. Konsentrasi optimum senyawa alkana bagi pertumbuhan isolat LBF-1-0025 ialah pentana 150 ppm, dekana 200 ppm, pentadekana 150 ppm, dan parafin 200 ppm. Berdasarkan analisis sekuen gen 16S rRNA, bakteri LBF-1-0025 memiliki kemiripan sebesar 97% dengan *Salinicola petrichatus* DY22.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada *Project of SATREPS development of Internationally Standardized Microbial Resources Center as a Core of Biological Resources Center to Promote Life Science and Research and Biotechnology* (2011-2016) dan DIPA Tematik Puslit Bioteknologi LIPI 2016 atas dukungan dana dalam pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(3), 670-699.
- Acer, O., Güven, K., Bekler, F. M., & Güven, R. G. (2016). Isolation and Characterization of long-chain alkane-degrading *Acinetobacter* sp. BT1A from oil-contaminated soil in Diyarbakir, in the Southeast of Turkey. *Bioremediation Journal*, 1(20), 80-87. doi:10.1080/10889868.2015.1096898.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST; a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research*, 17(25), 3389-3402.
- Astiranditha, K. M., (2016). Potensi Isolat Bakteri dari Lingkungan Pelabuhan Pantai Nusantara (PPN) Karangantu, Serang, Sebagai starter Pendegradasi Rantai Hidrokarbon. Prosiding Seminar nasional ke-III: Peran Geologi dalam Pengembangan Pengelolaan sumber Daya Alam dan Kebencanaan, Fakultas Teknik Geologi Universitas Padjadjaran, 3(2). ISSN: 2407-4314.
- Cameorta, S., & Singh, H. D. (1990). Uptake of volatile n-alkane by *Pseudomonas* PG-1. *Journal Bioscience*, 4(15), 313-322.
- Cerniglia, C. E., (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368.
- Chan, E. C, Kuo, J., Lin, H. P., & Mou, D. G. (1990). Stimulation of n-alkane conversion to dicarboxylic acid by organic-solvent-and detergent-treated microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 772-777.
- Churchill, S. A, Harper, J. P., & Churchill, P. F. (1999). Isolation and Characterization of a *Mycobacterium* species Capable of Degrading Three- and Four-Ring Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2(65), 549-552.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Disease. *Clinical Microbiology*, 4(17), 840-862. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
- Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Khajeh, K., & Ventosa, A. (2011). A Halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 305-312. doi: 10.1007/s00253-010-3049-6.
- Harwati, U. T., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningsih, D., & Watanabe, K. (2007). Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesia Seawater. *Microbes and Environments*, 22, 1-4.
- Hassanshaian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., & Kariminik, A. (2013). Isolation and Characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Marine Pollution Bulletin*, 73, 300-305. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.05.002.
- Hassanuzzaman, M., Ueno, A., Ito, H., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2007). Degradation of long-chain n-alkane (C<sub>36</sub> and C<sub>40</sub>) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *International Biodeterioration & Biodegeneration*, 59, 40-43. doi:10.1016/j.ibiod.2006.07.010.
- Higgins, D. G., & Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73, 237-244.
- Huo, Y.Y., Meng, F.X., Xu, L., Wang, C.S., & Xu, X.W. (2013). *Salinicola petrichatus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104(1), 55-62. doi: 10.1007/s10482-013-9925-1.
- Huu, N. B, Denner, E. B. M., Ha, D. T. C., Wanner, G., & Lotter, H. S. (1999). *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *International Journal of Systematics Bacteriology*, 49, 367-375.
- Ionata, E., Blasio, P. D., & Cara, F. L. (2005). Microbiological degradation of pentane by



- immobilized cells of *Arthrobacter* sp. *Biodegradation*, 16, 1-9.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., & Bartlam, M. (2013). Structural insight into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, 4(58), 1-13. doi:10.3389/fmicb.2013.00058.
- Kato, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., & Kanaya, S. (2001). Isolation and Characterization of Long-Chain-Alkane Degrading *Bacillus thermoleovorans* from Deep Subterranean Petroleum Reservoirs. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1(91), 64-70.
- Kloss, K., Munch, J. C., & Schlöter, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soil based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiology Methods*, 66, 486-496. doi:10.1016/j.mimet.2006.01.014.
- Kuncowati. (2010). Pengaruh Pencemaran Minyak di Laut Terhadap Ekosistem Laut. *Jurnal Aplikasi Pelayaran dan Kepelabuhan* 1(1): 18-20.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial Degeneration of Hydrocarbons in the environment. *Microbiological*, 54, 305-315.
- Lemey, P., Marco, S., & Anne-Mieke, V. (2009). *The Phylogenetic Handbook*. Second edition. Cambridge University Press. New York.
- Likhoshvay, A., Lomakina, A., & Grachev, M. (2014). The Complete *alk* sequences of *Rhodococcus erythropolis* From Lake Baikal. *Springerplus*, 3(621), 1-5. doi: 10.1186/2193-1801-3-621.
- Liu, C., & Shao, Z. (2005). *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1181-1186. doi: 10.1099/ijs.0.63443-0.
- Liu, C., Wang, W., Wu, Y., Zhou, Z., Lai, Q., & Shao, Z. (2011). Multiple alkane hydroxylase system in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environmental Microbiology* 5(13), 1168-1178. doi: 10.1111/j.11462-2920.2010.02416.x.
- Liu, H., Yao, J., Yuan, Z., Shang, Y., Chen, H., Wang, F., Masakorala, K., Yu, C., Cai, M., Blake, R. E., & Choi, M. M. F. (2014). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oil-field, China. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 87, 52-59.
- Liu, J., Jia, Y., & Xu, R. (2013). Biodegradation of Paraffin in Crude oil. *Asian Journal of Chemistry*, 10 (25), 5473-5475. doi:10.14233/ajchem.2013.14287.
- Pace, N. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734- 740.
- Pandey, K. K., Mailray, S., & Chakrabarti, T. (2002). *Pseudomonas indica* sp. nov., a Novel Butane Utilizing Species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1559-1567.
- Patel, J. (2001). 16S rRNA Gene sequencing For Bacterial Pathogen Identification In The Clinical Laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6, 313-321.
- Queiroga, C. L., Nascimento, L. R., & Serra, G. E. (2003). Evaluation of Paraffins Biodegradation and Biosurfactant Product *Bacillus Subtilis* in The Presence of Crude Oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 34, 321-324. ISSN 1517-8382.
- Retno, T. D. L., & Mulyana, N. (2013). Bioremediasi Lahan Tercemar Limbah Lumpur Minyak Menggunakan Campuran Bulking Agents yang Diperkaya Konsorsia Mikroba Berbasis Kompos Iradiasi. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi* 2(9), 139-150. ISSN 1907-0322.
- Rojo, F. (2004). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11, 2477-2490.
- Rosidah. (2013). Pencemaran Limbah Minyak Industri. *Jurnal Pencemaran*. 3, 1-11.
- Sun, Y., Ning, Z., Yang, F., & Li, X. (2015). Characterization of Newly Isolated *Geobacillus* sp. ZY-10 Degrading Hydrocarbons in Crude Oil. *Polish Journal of Microbiology* 3(64), 253-263.
- Susanthi, D., Sudiana, I. M., & Sembiring, L. (2009). Bakteri Laut Isolat Pulau Pari Pendegradasi Komponen Crude Oil. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA, Fakultas MIPA Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta, 16 Mei 2009. ISBN: 978-979-96880-5-7.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Thontowi, A., & Yopi. (2011). Alkane Degradation and Detection of Monoxygenase Gene from *Alcanivorax* sp. from Jakarta Bay. *Annales Bogorienses*, 2(15), 25-30.
- Thontowi, A., & Yopi. (2013). Keragaman Bakteri Laut Pendegradasi Alkana dan Poliaromatik Hidrokarbon di Pulau Pari Jakarta. *Jurnal Biologi Indonesia*, 9(1), 137-146.
- Throne-Holst, M., Markussen, S., Winnberg, A, Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B. (2006). Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB- type alkane hydroxylases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 53-360.
- van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2005). Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), 308-314.
- van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., & Witholt, B. (2003). Diversity of Alkanes Hydroxylase System In the environment. *Oil & Gas Science and Technology*, 4(58), 427-440.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., & Holst, M. T. (2007). Bacterial Metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(76), 1209-1221. doi:10.1007/s00253-007-1119-1.
- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2004). Isolation and

- Characterization of Novel Strain of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possesing High Efficiency to degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. *Current microbiology*, 49, 415-422. doi: 10.1007/s00284-004-4347-y.
- Yetti, E., A. Thontowi., & Yopi. (2016). Penapisan dan Optimasi Pertumbuhan Bakteri Laut yang Berpotensi sebagai Hidrokarbonoklasitik PAH Fenotiazin. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 2(11), 127-138. doi:10.15578/jpbkp.v11i2.297.
- Zam, S. I. (2010). Optimasi konsentrasi inokulum Bakteri Hidrokarbonoklastik pada Bioremediasi Limbah Pengilangan Minyak Bumi di Sungai Pakning. *Journal of Enviromental Science*, 2(4).
- Zampolli, J., Collina, E., Lasagni, M., & Gennaro, P. D. (2014). Biodegradation of variable-chain-length *n*-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism. *Applied and industrial Microbiology and Biotechnology Express*, 4(73), 1-9. doi:10.1186/s13568-014-0073-4.