



## **Isolasi Bakteri Pendegradasi Minyak Mentah dan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon dari Sedimen Mangrove Bintan**

**Nur Fitriah Afianti<sup>1</sup>, Deva Febrian<sup>1</sup> dan Dede Falahudin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Oseanografi LIPI, Jl. Pasir Putih I, Ancol Timur, Jakarta 14430

Email: [nurfitriahafianti@gmail.com](mailto:nurfitriahafianti@gmail.com)

Submitted 11 April 2019. Reviewed 19 August 2019. Accepted 18 November 2019.

DOI: [10.14203/oldi.2019.v4i3.260](https://doi.org/10.14203/oldi.2019.v4i3.260)

### **Abstrak**

Bintan dikenal sebagai wilayah dengan kawasan hutan mangrove yang luas, namun berpotensi mengalami cemaran minyak karena letaknya yang berbatasan dengan jalur perairan internasional. Bakteri indigen pendegradasi minyak memainkan peranan penting dalam proses bioremediasi tumpahan minyak di lingkungan. Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi bakteri indigen dari sedimen mangrove Bintan yang memiliki kemampuan mendegradasi minyak mentah dan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH). Sampel sedimen mangrove diambil pada bulan Maret 2018, dari empat jenis tumbuhan mangrove yang berbeda, yaitu *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus granatum*, *Ceriops tagals* dan *Luminitzera littorea*. Isolasi bakteri pendegradasi minyak dilakukan menggunakan media pengayaan melalui penambahan *crude oil* ALCO. Sebanyak 45 isolat bakteri pendegradasi minyak berhasil diisolasi dari sedimen mangrove. Melalui tes degradasi dengan metode sublimasi, sebanyak 13 isolat bakteri diketahui juga menunjukkan kemampuan mendegradasi PAH dengan jenis yang berbeda, diantaranya *phenanthrene*, *acenaphthene*, *dibenzothiophene* dan *fluorene*. Berdasarkan analisis 16s rRNA, 13 isolat bakteri diidentifikasi berasal dari enam genus, yaitu *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Sphingopyxis*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, dan *Gordonia*.

**Kata kunci:** bakteri pendegradasi minyak, polisiklik aromatik hidrokarbon, sedimen mangrove, biodegradasi, Bintan

### **Abstract**

**Isolation of Crude Oil and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Mangrove Sediments in Bintan.** Bintan is known for its extensive mangrove areas, but it is prone to pollution from oil spills due to it is close to the international shipping lane. Indigenous bacteria plays important roles in bioremediation of oil spills in the natural environment. This research aims to explore indigenous bacteria from Bintan's mangrove sediments which may have ability to degrade crude oil and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). The mangrove sediment samples were taken in March 2018 from the sediments near four different mangrove plant species, i.e. *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus granatum*, *Ceriops tagal* and *Lumnitzera littorea*. Isolation of oil degrading bacteria was carried out using enrichment media supplemented with crude oil ALCO. A total of 45 strains of oil degrading bacteria were successfully isolated from the sediment samples. By using sublimation method, 13 bacterial isolates showed the ability to degrade various PAHs, including phenanthrene, acenaphthene, dibenzothiophene and fluorene. Sequencing analysis of 16s rRNA genes confirmed that the 13 isolated bacteria belong to the genera *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Sphingopyxis*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, and *Gordonia*.

**Keywords:** oil degrading bacteria, polycyclic aromatic hydrocarbon, mangrove sediments, biodegradation, Bintan

## Pendahuluan

Minyak bumi sebagai sumber utama senyawa hidrokarbon merupakan campuran dari berbagai senyawa diantaranya hidrokarbon jenuh, aromatik hidrokarbon, resin dan aspalten (Barnum, 2005; Head et al., 2006). PAH atau polisiklik aromatik hidrokarbon merupakan salah satu jenis senyawa hidrokarbon yang terdiri dari dua atau lebih cincin benzena. PAH bersifat toksik, mutagenik, dan beberapa senyawa antaranya juga bersifat karsinogen terhadap manusia. Selain itu, senyawa ini juga cenderung *recalcitrant* atau sulit didegradasi dalam waktu yang singkat (Kanaly & Harayama, 2000).

Ekosistem mangrove berada pada lahan basah di daerah intertidal dan memiliki peranan penting dalam sistem estuari dan pesisir. Ekosistem mangrove didukung oleh biodiversitas bakteri yang tinggi dan berperan dalam berbagai siklus nutrisi. Di samping itu, mangrove juga rentan terhadap pengaruh antropogenik yang tinggi, seperti tumpahan minyak. Kabupaten Bintan memiliki luasan dan kelimpahan mangrove yang cukup tinggi, diantaranya *Xylocarpus granatum* dan *Rhizophora apiculata* termasuk spesies mangrove dominan di wilayah tersebut (Dharmawan & Ulumudin, 2014). Ancaman terhadap ekosistem mangrove di wilayah Bintan berasal dari tekanan antropogenik dan pencemaran minyak di pesisir Bintan yang terjadi hampir setiap tahun pada musim-musim tertentu (Komisi VII DPR RI, 2018; Rizqan, 2019; Sulma et al., 2019). Pencemaran minyak di ekosistem pesisir merupakan masalah lingkungan yang sangat erat kaitannya dengan aktivitas transportasi kapal, distribusi minyak oleh kapal tanker, kebocoran minyak akibat penggunaan bahan bakar minyak dan juga proses kilang minyak.

Penggunaan teknik bioremediasi untuk mengatasi pencemaran minyak dengan memanfaatkan mikroorganisme pendegradasi minyak dan turunannya, baik dengan metode biostimulasi maupun bioaugmentasi dinilai lebih efektif dan telah banyak dilaporkan (Darmayati & Afianti, 2018; Darmayati et al., 2015; Roy et al., 2014). Mikroorganisme memiliki peranan penting dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon secara sempurna, yaitu dengan memanfaatkan senyawa hidrokarbon dari minyak mentah secara keseluruhan ataupun sebagian untuk proses

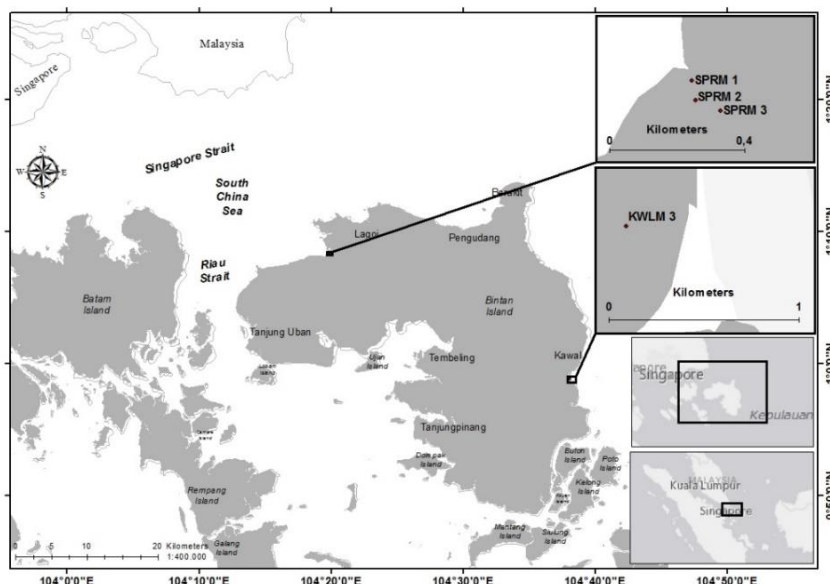
metabolismenya. Bakteri memiliki gen pengkode enzim oksigenase yang berperan dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon. Beberapa penelitian telah melaporkan mengenai komunitas bakteri pendegradasi hidrokarbon pada berbagai lingkungan, termasuk sedimen mangrove. Dominasi *Alteromonadales*, *Burkholderiales*, *Pseudomonadales*, *Rhodobacterales* and *Rhodocyclales* diperoleh dari sedimen mangrove di Guanabara Bay, Brazil (Marcial Gomes et al., 2008), kelompok Actinobacteria dan Bacteriodes dominan di hutan mangrove Florida (Ikenaga et al., 2010), sedangkan *Pseudomonas* dan *Burkholderia* dari sedimen mangrove di Okinawa, Jepang menunjukkan dominansinya sebagai bakteri pendegradasi minyak (Bacosa et al., 2013). Dominansi bakteri pendegradasi minyak yang berbeda-beda di setiap kawasan menunjukkan bahwa agen pendegradasi minyak yang langsung diisolasi dari habitat asalnya (bakteri *indigenous*) dapat mempercepat periode bioremediasi.

Pada penelitian ini, dilakukan isolasi bakteri pendegradasi minyak dari sedimen di ekosistem mangrove Bintan. Uji kemampuan isolat bakteri juga dilakukan untuk mengetahui potensinya mendegradasi senyawa toksik polisiklik aromatik hidrokarbon. Identifikasi isolat bakteri dilakukan berdasarkan karakterisasi morfologi dan analisis sekuens gen 16s rRNA.

## Metodologi

### Pengambilan Sampel Sedimen

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Maret 2018 di hutan mangrove Kabupaten Bintan, Provinsi Kepulauan Riau. Sampel sedimen mangrove diambil dari empat spesies mangrove berbeda, yaitu *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus granatum*, *Ceriops tagals* dan *Lumnitzera littorea* yang terletak di daerah Lagoi dan Kawal, berdasarkan spesies mangrove dominan pada zona tersebut. Peta lokasi pengambilan sampel sedimen ditunjukkan pada Gambar 1. Pada masing-masing zona, sampel sedimen diambil menggunakan pipa dari tiga titik kemudian dihomogenisasi dan dimasukkan secara aseptik ke dalam Falcon tube 15 ml. Sampel disimpan dalam *ice box* untuk selanjutnya dilakukan analisis di laboratorium.



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel.  
Figure 1. Map of sampling sites.

**Isolasi bakteri pendegradasi minyak**

Isolasi bakteri pendegradasi minyak dari sedimen mangrove dilakukan melalui metode pengayaan dengan menggunakan media mineral medium (4,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1 g CaCl<sub>2</sub>; 0,1 g NaCl; 0,002 g FeCl<sub>3</sub>; 0,1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1 L aquades) yang mengandung 1% crude oil ALCO (*Arabian Light Crude Oil*). Tiga gram sedimen mangrove dari masing-masing sampel komposit dimasukkan ke dalam 30 ml mineral medium dan 1% (v/v) ALCO dalam Erlenmeyer 100 ml. Sampel diinkubasi pada suhu ruang dengan agitasi 120 rpm dan suhu 27°C. Setiap 2 minggu, 3 ml kultur supernatan ditransfer ke 27 ml media mineral medium baru dengan tambahan 1% ALCO. Untuk memperoleh konsorsium bakteri pendegradasi minyak yang stabil, pengayaan dilakukan berulang selama 3 bulan.

Bakteri pendegradasi minyak didapatkan melalui teknik *spread plate* dengan menginokulasi 0,1 ml aliquot pada media ONR7 padat mengandung 75 µl ALCO steril. Selanjutnya, cawan diinkubasi pada suhu 27°C hingga terbentuk zona bening. Koloni bakteri yang membentuk zona bening diisolasi, dimurnikan dan disubkultur pada media MA miring sebagai kultur stok. Identifikasi dasar dilakukan berdasarkan karakterisasi morfologi koloni, sel dan pewarnaan Gram.

**Penapisan bakteri pendegradasi PAH**

Penapisan kemampuan bakteri pendegradasi PAH untuk mendapatkan bakteri potensial dilakukan dengan metode sublimasi (Alley & Brown, 2000) menggunakan media

ONR7 agar. Lima jenis PAH yang diuji yaitu dibenzotiofen, fenantrena, fluorene, acenaphthene dan naftalena. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi PAH pada tes sublimasi akan menunjukkan salah satu indikator yaitu perubahan warna media dan/atau zona bening di sekitar isolat.

Tabel 1. Kondisi uji degradasi PAH dengan metode sublimasi.  
Table 1. Condition for PAH degradation by sublimation methods.

PAH	Temperature (°C)	Time (minutes)
Dibenzothiophene	100	5
Phenanthrene	100	5
Fluorene	100	5
Acenaphthene	60	10
Naphtalene	75	1

Media yang telah diinokulasikan bakteri diletakkan di atas cawan yang berisi serbuk polisiklik aromatik hidrokarbon yang disublimasi untuk menangkap gas dari proses penguapan polisiklik aromatik hidrokarbon, sesuai dengan kondisi pada Tabel 1. Sampel diinkubasi pada suhu 27°C sekitar dua minggu hingga muncul zona bening atau terjadi perubahan warna pada media. Perlakuan diulang sebanyak dua kali.

**Identifikasi bakteri**

Isolat bakteri diidentifikasi dengan menggunakan analisis sekuensing gen 16s rRNA. Ekstraksi total DNA bakteri dari kultur cair dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi

DNA yang dimodifikasi. Sebanyak 2 ml sampel dipresipitasi selnya dan dibilas menggunakan 50 mM EDTA. Pelet sel ditambahkan dengan 200 µl bufer lisis (20% sukrosa, 10 mg/ml lisozim) dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Pada suspensi ditambahkan 200 µl SDS 20% kemudian diinkubasi pada 56°C selama 1 jam. Kloroform sebanyak 250 µl ditambahkan ke dalam suspensi, kemudian divortex dan disentrifugasi pada 13.000g selama 1 menit. Supernatan diambil dan ditambah 1 kali volume isopropanol, divortex kemudian disentrifugasi pada 12.000g selama 5 menit pada 4°C. Supernatan dibuang dan dilakukan pencucian pelet dengan menggunakan 200 µl etanol 70%. Selanjutnya sampel disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang dan tube dibiarkan hingga kering. Pada pelet DNA ditambahkan 50 µl TE buffer. Ekstrak DNA disimpan pada suhu -20°C.

DNA yang telah diekstraksi dari sampel digunakan sebagai cetakan (*template*) dalam proses amplifikasi gen 16s rRNA yang berukuran sekitar 1400 pb menggunakan pasangan primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1429R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). Proses PCR dilakukan dengan volume reaksi 25 µL terdiri atas 12,5 µL DreamTaq Green PCR Master Mix, 1 µM primer *reverse* dan *forward*, 2 µL template DNA dan 9,5 µL ddH<sub>2</sub>O. Kondisi PCR diatur dengan kondisi suhu denaturasi awal 96°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus suhu denaturasi 96°C selama 1 menit, suhu annealing 55°C selama 30 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik. Setelah itu, dilanjutkan dengan tahap elongasi akhir pada suhu 72°C selama 1,5 menit dan penyimpanan pada suhu 4°C. Produk amplifikasi fragmen 16s rRNA dikirim ke penyedia jasa Macrogen Singapura untuk dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan BLAST untuk menguji kemiripan sekuens isolat dengan sekuens pada database genbank NCBI. Sekuens bakteri hasil BLAST dilakukan proses *Multiple Sequence Alignment* (MSA) menggunakan aplikasi ClustalX. Konstruksi pohon filogenetik dibuat dengan software Mega-X menggunakan *neighbour joining* (Saitou & Nei, 1987) dan 1000x *bootstrap*.

## Hasil

### Isolasi bakteri pendegradasi minyak dan PAH

Bakteri pendegradasi minyak diisolasi dari sampel sedimen mangrove dengan jenis yang berbeda, yaitu *Rhizopora apiculata*, *Xylocarpus granatum*, *Ceriops tagals* dan *Lumilitzera littorea*. Pemilihan jenis mangrove didasarkan pada spesies dominan di lokasi penelitian. Sedimen mangrove diisolasi bakteri pendegradasi minyaknya dengan menggunakan metode pengayaan medium melalui penambahan minyak mentah ALCO. Empat puluh lima strain bakteri berhasil diisolasi dari empat jenis sedimen mangrove yang berbeda sesuai dengan Tabel 2. Seluruh isolat bakteri memiliki kemampuan mendegradasi minyak yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni pada media padat mengandung minyak mentah. Isolat bakteri pendegradasi minyak terbanyak ditemukan pada sedimen mangrove *Lumilitzera littorea*, yaitu 15 isolat bakteri.

Isolat bakteri pendegradasi minyak ini diuji pula kemampuannya dalam mendegradasi senyawa toksik PAH, sebanyak 13 isolat bakteri mampu mendegradasi beberapa jenis PAH berdasarkan hasil positif uji degradasi PAH dengan metode sublimasi (Tabel 3). Dari ketigabelas isolat tersebut, enam isolat bakteri mampu mendegradasi acenaphthene, enam isolat mampu mendegradasi fenantrena, delapan mampu mendegradasi dibenzotiofen dan enam mampu mendegradasi fluorena. Sementara itu, tidak ada satupun isolat bakteri yang mampu mendegradasi naftalena. Kemampuan mendegradasi PAH tidak ditemukan pada isolat bakteri yang diisolasi dari sedimen mangrove *Xylocarpus granatum*.

Isolat bakteri pendegradasi fenantrena lebih banyak diperoleh dari sedimen mangrove *Rhizopora apiculata* (Tabel 3). Isolat bakteri RCO\_NS110 dari sedimen mangrove tersebut menunjukkan diameter zona degradasi fenantrena paling besar yaitu 12 mm. Bakteri pendegradasi acenaphthene lebih banyak ditemukan pada sedimen mangrove *Ceriops tagal*, salah satunya adalah isolat bakteri RCO\_NS35 yang mampu menghasilkan zona degradasi paling besar yaitu 6 mm. Bakteri pendegradasi dibenzotiofen dan fluorena didapatkan merata sekitar 1-3 isolat bakteri pada ketiga jenis sedimen mangrove. Seluruh isolat bakteri pendegradasi dibenzotiofen menunjukkan perubahan warna media di sekitar koloni bakteri pada tes sublimasi.

Tabel 2. Perolehan isolat bakteri dari sampel sedimen mangrove.

Table 2. Number of bacterial isolates from mangrove sediments.

Mangrove sediment	Sites	Station	Amount of oil degrading bacteria	Amount of PAH-degrading bacteria
<i>Rhizopora apiculata</i>	Lagoi	SPRM1	11	4
<i>Xylocarpus granatum</i>	Lagoi	SPRM2	7	-
<i>Ceriops tagal</i>	Lagoi	SPRM3	12	6
<i>Lumlitzera littorea</i>	Kawal	KWLM3	15	3
Total			45 isolates	13 isolates

Tabel 3. Kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi PAH berdasarkan tes sublimasi.

Table 3. Capability of PAHs degradation by bacterial isolates based on sublimation test.

Sediments source	Isolate code	Biodegradation capability (mm)			
		Acenaphthene	Phenanthrene	Dibenzothiophene	Fluorene
<i>Rhizopora apiculata</i>	RCO_NS14	-	3	3	-
	RCO_NS18	-	6	-	2
	RCO_NS110	-	12	4	-
	RCO_NS111	-	3	3	-
<i>Ceriops tagal</i>	RCO_NS31	-	4	3	-
	RCO_NS34	-	-	-	2
	RCO_NS35	6	-	4	3
	RCO_NS37	4	-	-	-
	RCO_NS39	3	-	4	2
	RCO_NS312	4	-	-	-
<i>Lumlitzera littorea</i>	RCO_NK33	4	-	-	-
	RCO_NK314	-	3	3	4
	RCO_NK317	2	-	4	2

Note : Biodegradation capability based on diameter of clear zone (CZ) or colour change (CC)

### Identifikasi isolat bakteri

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa pada sedimen mangrove ditemukan lebih banyak bakteri Gram positif dibandingkan Gram negatif (Tabel 4). Hasil analisis molekuler dan konstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa ketigabelas isolat bakteri pendegradasi minyak dan PAH yang didapatkan teridentifikasi dalam kelompok filum Alphaproteobacteria, Actinobacteria, dan Firmicute. Berdasarkan peninjauan dengan database GenBank pada Tabel 5, diperoleh homologi berkisar antara 95-100%

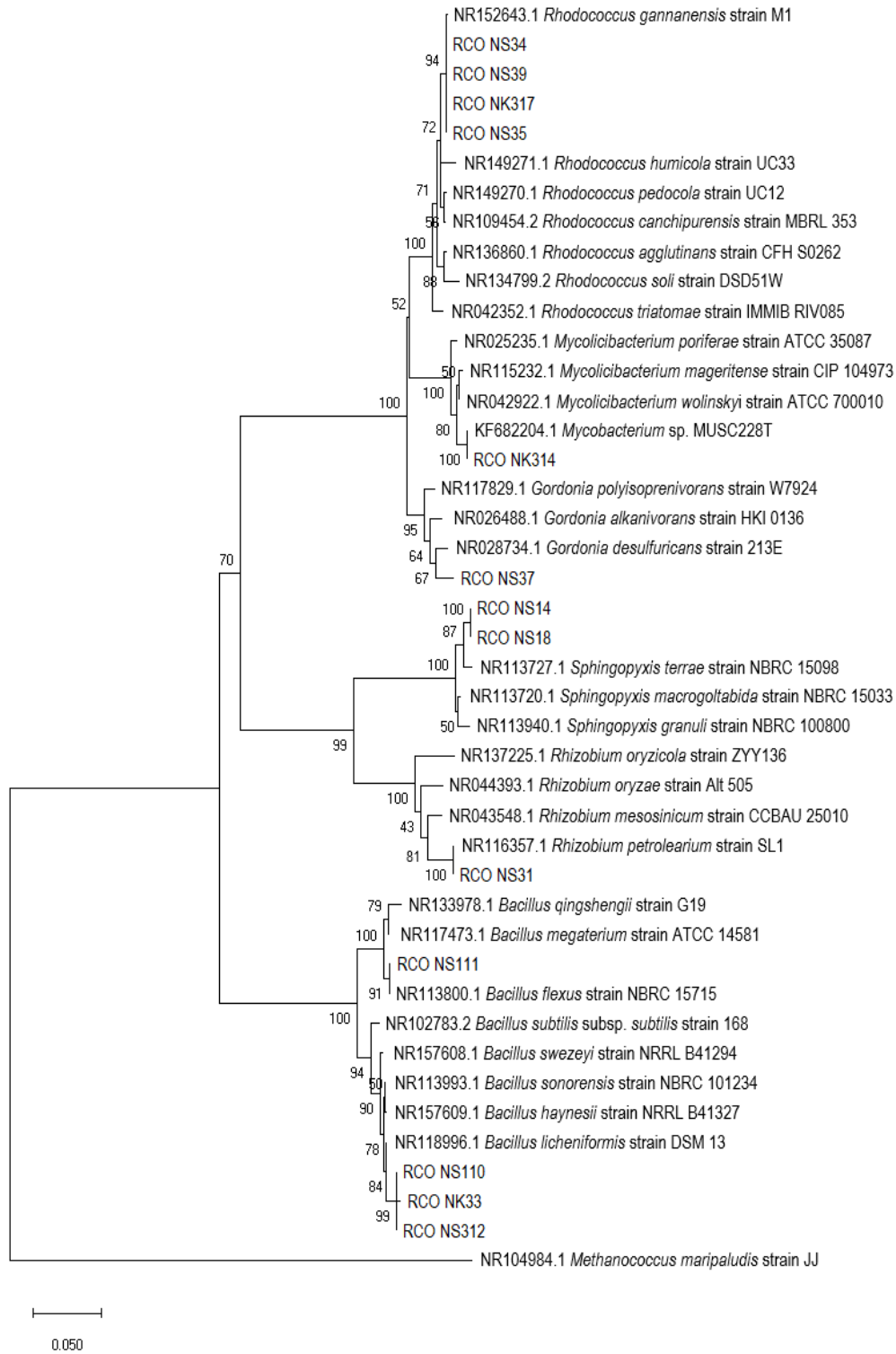
dengan enam genus dan 8 spesies bakteri. Genus bakteri pendegradasi minyak dan PAH yang paling banyak didapatkan dari sedimen mangrove berturut-turut adalah *Rhodococcus* (empat isolat), *Bacillus* (empat isolat), *Sphingopyxis* (dua isolat), *Rhizobium* (satu isolat), *Mycobacterium* (satu isolat), dan *Gordonia* (satu isolat). Konstruksi pohon filogenetik menunjukkan kekerabatan antar jenis bakteri (Gambar 2). Angka-angka pada node menunjukkan persentase sampel *bootstrap* (1000x).

Table 4. Morfologi sel dan koloni isolat bakteri pendegradasi minyak dan PAH.  
Tabel 4. Colony and cell morphology of oil and PAH degrading bacteria isolates.

Isolate code	Colony Morphology					Cell Morphology	
	Elevation	Margin	Colour	Size	Shape	Gram Staining	Cell shape
RCO_NS14	convex	entire	yellowish	pin point	circular	-	rod
RCO_NS18	convex	entire	White	small	circular	-	rod
RCO_NS110	convex	entire	Browish	small	circular	+	bacilli
RCO_NS111	convex	entire	deep yellow	medium	circular	+	bacilli
RCO_NS31	convex	entire	White	medium	circular	-	rod
RCO_NS34	convex	entire	White	medium	circular	+	coccus
RCO_NS35	convex	irregular	White	small	circular	+	coccus
RCO_NS37	convex	entire	Orange	medium	circular	+	diplobacilli
RCO_NS39	convex	entire	White	medium	circular	+	coccus
RCO_NS312	convex	entire	White	small	circular	+	bacilli
RCO_NK33	convex	entire	Cream	small	circular	+	bacilli
RCO_NK314	umbonate	entire	White	small	circular	+	bacilli
RCO_NK317	convex	entire	Cream	medium	circular	+	coccus

Tabel 5 Identifikasi molekuler isolat bakteri berdasarkan sekuensing 16s rDNA.  
Table 5. Molecular identification of bacterial isolates by 16S rDNA sequencing.

Isolate code	Accession no.	Related species	Phylogenetic affiliation	Sequence fragment (bp)	Query cover (%)	Identity (%)
RCO_NS14	NR113727.1	<i>Sphingopyxis terrae</i> strain NBRC 15098	Alphaproteobacteria	1356	100	98,89
RCO_NS18	MF618306.1	<i>Sphingopyxis terrae</i> strain JCM 10195	Alphaproteobacteria	1357	100	98,90
RCO_NS110	JN366785.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain 30C1-1	Firmicutes	1403	100	99,72
RCO_NS111	KY962908.1	<i>Bacillus flexus</i> strain FS-3	Firmicutes	1394	100	99,78
RCO_NS31	NR116357.1	<i>Rhizobium petrolearium</i> strain SL-1	Alphaproteobacteria	1354	100	99,63
RCO_NS34	NR152643.1	<i>Rhodococcus gannanensis</i> strain M1	Actinobacteria	1368	100	98,69
RCO_NS35	EU741198.1	<i>Rhodococcus</i> sp. 13663M	Actinobacteria	1378	100	99,20
RCO_NS37	NR028734.1	<i>Gordonia desulfuricans</i> strain 213E	Actinobacteria	932	100	96,57
RCO_NS39	EU741198.1	<i>Rhodococcus</i> sp. 13663M	Actinobacteria	1362	100	99,19
RCO_NS312	NR118996.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13	Firmicutes	1403	100	99,64
RCO_NK33	JN366743.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain 30N2-2	Firmicutes	1405	100	99,57
RCO_NK314	KF682204.1	<i>Mycobacterium</i> sp. MUSC228T	Actinobacteria	1329	100	99,85
RCO_NK317	NR152643.1	<i>Rhodococcus gannanensis</i> strain M1	Actinobacteria	1341	100	98,88



Gambar 2. Pohon filogeni isolat bakteri berdasarkan analisis daerah 16s rRNA menggunakan metode *Neighbour-Joining* (NJ).

Figure 2. Phylogenetic tree of bacterial isolates by analysis of 16s rRNA region using Neighbour-Joining method.

## Pembahasan

Metode pengayaan dengan penambahan *crude oil* pada media mineral medium dipilih sebagai metode yang digunakan untuk mengisolasi bakteri pendegradasi minyak dari sampel. Alfiansah et al. (2015) menyebutkan bahwa media diperkaya minyak mentah lebih efektif untuk mengisolasi bakteri pendegradasi minyak dibandingkan metode isolasi secara langsung dari sampel sedimen. Sedimen mangrove kaya akan bahan organik juga mengandung biodiversitas bakteri yang tinggi. Metode isolasi bakteri dengan media pengayaan akan menyeleksi jenis bakteri yang tumbuh dan memperkaya jenis bakteri tertentu yang mampu menggunakan media diperkaya sebagai sumber karbonnya, dalam hal ini minyak mentah ALCO. Oleh karenanya, bakteri dominan yang tumbuh adalah bakteri pendegradasi minyak atau biasa disebut juga dengan bakteri hidrokarbonoklastik. Selain itu, pertumbuhan bakteri hidrokarbonoklastik juga membutuhkan senyawa makronutrien anorganik seperti nitrogen dan fosfat untuk mendukung pertumbuhannya (Abioye et al., 2010; Leys et al., 2005; Ron & Rosenberg, 2014). Sampel sedimen mangrove mengandung senyawa organik dan anorganik yang tinggi, sehingga isolasi langsung pada media sintetik yang tidak menyediakan unsur esensial yang cukup bagi pertumbuhan dapat menjadi faktor pembatas pertumbuhan bakteri pendegradasi minyak. Sedangkan, pada media pengayaan yang digunakan terkandung unsur nitrogen dan fosfat dalam bentuk  $K_2HPO_4$  dan  $(NH_4)_2SO_4$  sebagai pendukung pertumbuhan dalam kultur cair.

Dari penelitian ini, diperoleh 45 strain isolat bakteri pendegradasi minyak yang berbeda karakteristik morfologi koloni dan selnya. Selain mampu mendegradasi minyak mentah, sebanyak 28,8% isolat bakteri diantaranya juga memiliki kemampuan mendegradasi senyawa toksik PAH yang berbeda. Kelimpahan bakteri pada sedimen mangrove didominasi berturut-turut oleh Proteobacteria (47,1–56,3%), Firmicutes (10,5–13,8%), Actinobacteria (5,4–12,2%), Bacteroidetes (3,8–11,8%), Chloroflexi (1,3–5,4%), Cyanobacteria (1,2–3,5%), Planctomycetes (1,2–3,8%), Acidobacteria (0,0–2,7%), dan Archaea (0–3,4%) (Andreote et al., 2012). Isolat bakteri *indigenous* potensial untuk bioremediasi yang berhasil diperoleh pada penelitian ini termasuk dalam 3 filum dominan tersebut, yaitu Alphaproteobacteria, Firmicutes dan Actinobacteria. Penelitian Ramsay et al. (2000) melaporkan bahwa bakteri indigen pada sedimen mangrove memiliki potensi besar untuk

mendegradasi senyawa hidrokarbon, dimana tercatat bakteri pendegradasi alkana dan PAH meningkat masing-masing mencapai  $10^8$  sel/g dan  $10^6$  sel/g selama proses bioremediasi di hutan mangrove.

Bakteri dengan kemampuan mendegradasi minyak dan PAH paling banyak diisolasi termasuk dalam filum Actinobacteria. Isolat RCO\_NS35, RCO\_NS39 dan RCO\_NS317 yang diidentifikasi berasal dari genus *Rhodococcus* memiliki kemampuan mendegradasi jenis PAH paling banyak yaitu, acenaphthene, dibenzotiofen dan fluorena. Guo et al. (2005) juga berhasil mengisolasi bakteri pendegradasi PAH dari Genus *Sphingomonas*, *Rhodococcus* dan *Paracoccus* dari sedimen mangrove yang diperkaya PAH. Filum Actinobacteria lainnya yang berasal dari genus *Mycobacterium* juga menunjukkan kemampuan mendegradasi tiga jenis PAH. Isolat RCO\_NK314 yang memiliki kemiripan 99,85% dengan *Mycobacterium* sp. MUSC228T juga menunjukkan hasil positif mendegradasi fenantrena, dibenzotiofen dan fluorena. Gen pengkode enzim dioksigenasi telah dideteksi pada *Sphingomonas*, *Rhodococcus* dan *Mycobacterium* yang juga diisolasi dari sedimen mangrove (Zhou et al., 2006). Selain itu, *Gordonia desulfuricans* (RCO\_NS37) yang pada penelitian ini mampu menggunakan acenaphthene, juga dilaporkan dapat menggunakan dibenzotiofen. Anggota Genus *Gordonia* seperti *G. alkanivorans* telah dimanfaatkan sebagai bakteri eksogen dalam proses bioremediasi tanah dengan metode biopile. Pada penelitian tersebut, jumlah bakteri indigen *G. desulfuricans* juga meningkat selama perlakuan (Lin et al., 2010).

Terdapat empat isolat bakteri Filum Firmicutes yang termasuk Genus *Bacillus* pada penelitian ini, yaitu satu strain *Bacillus flexus* dan tiga strain *Bacillus licheniformis*. Salah satu strain *B. licheniformis* menghasilkan zona degradasi fenantrena paling besar diantara seluruh isolat bakteri. Selain *B. licheniformis*, anggota genus *Bacillus* lain seperti *B. flexus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. Vietnamensis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus* dan *B. subtilis* juga mampu tumbuh, menggunakan serta mendegradasi fenantrena (Sukhdhane et al., 2017; Toledo et al., 2006). *Bacillus* juga diketahui sebagai bakteri dominan pendegradasi PAH yang diisolasi dari beberapa daerah di Indonesia, yaitu Pulau Pari, Pelabuhan Muara Kamal dan Teluk Cilacap (Yetti et al., 2016).

Proteobacteria merupakan bakteri dominan pada sedimen mangrove (HuiJie et al., 2011; Marcial Gomes et al., 2008). Pada penelitian ini berhasil diisolasi dua spesies bakteri pendegradasi



minyak dan PAH dari Subfilum Alphaproteobacteria yang diidentifikasi sebagai dua *strain Sphingopyxis terrae* dan satu *strain Rhizobium petrolearium*. Alphaproteobacteria dilaporkan lebih berperan mendegradasi PAH seperti fenantrena dan naftalena dibanding minyak mentah (Crisafi et al., 2016). Genus *Sphingopyxis* sendiri juga diketahui memiliki kemampuan mendegradasi jenis hidrokarbon lainnya seperti diesel dan kerosin. Keberadaan *Sphingopyxis* sangat menyebar pada berbagai lingkungan diantaranya berhasil diisolasi dari air laut, sedimen, air limbah dan tanah terkontaminasi heksaklorosikloheksana (Kertesz & Kawasaki, 2010; Kim et al., 2014; Takeuchi et al., 2001). Hal ini memungkinkan penggunaan bakteri tersebut pada proses bioremediasi dengan kondisi lingkungan yang sangat beragam. Bakteri *Rhizobium* sp. yang berasosiasi dengan akar tanaman dan berperan penting dalam ketersediaan sumber nitrogen, juga berpotensi dalam bioremediasi polisiklik aromatik hidrokarbon. *Rhizobium petrolearium* dari sedimen lumpur terkontaminasi minyak diketahui sebagai bakteri pendegradasi fenantrena (Huang et al., 2016; Zhang et al., 2012). Selain fenantrena, *Rhizobium petrolearium* dapat menggunakan sumber karbon lain seperti naftalena, fluorena, antrasena, piren, 1-naphthol dan asam gentisat. Isolat RCO\_NS31, kemiripan 99,63% dengan *Rhizobium petrolearium* strain SL-1, menunjukkan hasil positif dalam mendegradasi fenantrena dan dibenzotiofen. Terkait dengan sifatnya sebagai bakteri endofit tanaman, keberadaan isolat bakteri ini juga berpotensi membantu degradasi PAH dalam tumbuhan pada proses fitoremediasi oleh mangrove.

### Kesimpulan

Pada penelitian ini berhasil diisolasi 45 isolat bakteri pendegradasi minyak dari empat jenis sedimen mangrove. Tiga belas isolat diantaranya merupakan kandidat potensial untuk bioremediasi karena kemampuannya dalam mendegradasi polisiklik aromatik hidrokarbon, yaitu sebanyak enam isolat bakteri mampu mendegradasi acenaphthene, enam isolat mampu mendegradasi fenantrena, delapan isolat mampu mendegradasi dibenzotiofen dan enam isolat mampu mendegradasi fluorena. Berdasarkan analisis 16s rRNA, ketigabelas isolat bakteri tersebut berasal dari enam genus, yaitu *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Sphingopyxis*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, dan *Gordonia*.

### Persantunan

Penelitian ini didanai dari dana penelitian Prioritas LIPI melalui program Coral Reef Management and Rehabilitation Program-Coral Triangle Initiative (COREMAP-CTI) tahun anggaran 2018.

### Daftar Pustaka

- Abioye, P. O., Aziz, A., & Agamuthu, P. (2010). Enhanced Biodegradation of Used Engine Oil in Soil Amended with Organic Wastes. *Water, Air, & Soil Pollution*, 209(1–4), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0189-3>
- Alfiansah, Y. R., Adindasari, M., Argarini, M., Darmayati, Y., & Ruyitno, R. (2015). Isolation and distribution of crude oil and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from polluted harbours in north jakarta. *Marine Research in Indonesia*, 39(2), 79–85. <https://doi.org/10.14203/mri.v39i2.49>
- 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.
- Andreote, F. D., Jiménez, D. J., Chaves, D., Dias, A. C. F., Luvizotto, D. M., Dini-Andreote, F., ... de Melo, I. S. (2012). The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *PLoS ONE*, 7(6), e38600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038600>
- Bacosa, H. P., Suto, K., & Inoue, C. (2013). Degradation potential and microbial community structure of heavy oil-enriched microbial consortia from mangrove sediments in Okinawa, Japan. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(8), 835–846. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.761476>
- Barnum, S. R. (2005). *Biotechnology: an introduction*. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole.
- Crisafi, F., Giuliano, L., Yakimov, M. M., Azzaro, M., & Denaro, R. (2016). Isolation and degradation potential of a cold-adapted oil/PAH-degrading marine bacterial consortium from Kongsfjorden (Arctic region). *Rendiconti Lincei*, 27(S1), 261–270. <https://doi.org/10.1007/s12210-016-0550-6>
- Darmayati, Y., & Afianti, N. F. (2018). Impact of slow release fertilizers on enhancing biodegradation in oil contaminated tropical

- sandy beach. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2049, p. 020076). AIP Publishing LLC  
<https://doi.org/10.1063/1.5082481>
- Darmayati, Y., S. Sanusi, H., Prariono, T., Santosa, D. A., & Nuchsin, R. (2015). The Effect of Biostimulation and Biostimulation-Bioaugmentation on Biodegradation of Oil-Pollution on Sandy Beaches Using Mesocosms. *International Journal of Marine Science*, 5(27), 1–11.  
<https://doi.org/10.5376/ijms.2015.05.0027>
- Dharmawan, I. W. E., & Ulumudin, Y. I. (2014). Estimasi Stok Karbon Ekosistem Mangrove di Pesisir Timur Kabupaten Bintan, Kepulauan Riau. *Oseanologi Dan Limnologi Di Indonesia*, 40(3), 267–281.
- Guo, C. L., Zhou, H. W., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2005). Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8–12), 1054–1061.  
<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2005.02.012>
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173–182.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1348>
- Huang, X., Shi, J., Cui, C., Yin, H., Zhang, R., Ma, X., & Zhang, X. (2016). Biodegradation of phenanthrene by *Rhizobium petrolearium* SL-1. *Journal of Applied Microbiology*, 121(6), 1616–1626.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13292>
- HuiJie, L., CaiYun, Y., Yun, T., GuangHui, L., & TianLing, Z. (2011). Using population dynamics analysis by DGGE to design the bacterial consortium isolated from mangrove sediments for biodegradation of PAHs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(2), 269–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.010>
- Ikenaga, M., Guevara, R., Dean, A. L., Pisani, C., & Boyer, J. N. (2010). Changes in Community Structure of Sediment Bacteria Along the Florida Coastal Everglades Marsh–Mangrove–Seagrass Salinity Gradient. *Microbial Ecology*, 59(2), 284–295.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-009-9572-2>
- Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059–2067.
- Kertesz, M. A., & Kawasaki, A. (2010). Hydrocarbon-Degrading Sphingomonads: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, and *Sphingopyxis*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1693–1705). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_119](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_119)
- Kim, J., Kim, S. J., Kim, S. H., Kim, S. I., Moon, Y. J., Park, S. J., ... Chung, Y. H. (2014). Draft Genome Sequence of *Sphingopyxis* sp. Strain MWB1, a Crude-Oil-Degrading Marine Bacterium. *Genome Announc*, 2(6), e01256-14.  
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01256-14>
- Komisi VII DPR RI. (2018). Laporan kegiatan kunjungan kerja komisi VII DPR RI ke provinsi Kepulauan Riau. Retrieved June 12, 2019, from <http://www.dpr.go.id/dokakd/dokumen/K7-12-aff454cdd896df85ddaa79c17dba51ce.pdf>
- Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W., & Springael, D. (2005). Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 726–736.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1766-4>
- Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 27–34.  
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.10.080>
- Marcial Gomes, N. C., Borges, L. R., Paranhos, R., Pinto, F. N., Mendonça-Hagler, L. C. S., & Smalla, K. (2008). Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 96–109.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00519.x>
- Ramsay, M. A., Swannell, R. P., Shipton, W. A., Duke, N. C., & Hill, R. T. (2000). Effect of Bioremediation on the Microbial Community in Oiled Mangrove Sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 41(7–12), 413–419.  
[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00137-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00137-5)
- Rizqan, I. M. (2019). Tumpahan Minyak Hitam di Pesisir Utara Pulau Bintan. Retrieved June 12, 2019, from <https://kkp.go.id/bpsplpadang/artikel/9476-tumpahan-minyak-hitam-di-pesisir-utara-pulau-bintan>
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea.

- Current Opinion in Biotechnology*, 27, 191–194. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.02.004>
- Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Deka Boruah, H. P., Saikia, N., ... Chandra Bora, T. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 79–89. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2014.03.024>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sukhdhane, K. S., Pandey, P. K., Ajima, M. N. O., Jayakumar, T., Vennila, A., & Raut, S. M. (2017). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from PAHs contaminated mangrove sediment of Thane Creek in Mumbai, India. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/10406638.2016.1261911>
- Sulma, S., Rahmi, K. I. N., Febrianti, N., & Sitorus, J. (2019). Deteksi tumpahan minyak menggunakan metode adaptive threshold dan analisis tekstur pada data SAR. *Majalah Ilmiah Globe*, 21(1), 45–52. <https://doi.org/10.24895/mig.2019.21-1.925>
- Takeuchi, M., Hamana, K., & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1405–1417. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1405>
- Toledo, F. L., Calvo, C., Rodelas, B., & González-López, J. (2006). Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(3), 244–252. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2005.09.003>
- Yetti, E., Thontowi, A., & Yopi. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from the Indonesian marine environment. *Biodiversitas*, 17(2), 857–864. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d170263>
- Zhang, X., Li, B., Wang, H., Sui, X., Ma, X., Hong, Q., & Jiang, R. (2012). *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1871–1876. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.026880-0>
- Zhou, H. W., Guo, C. L., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2006). Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 262(2), 148–157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00379.x>