

## V. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. *Arthrobacter* sp AK<sub>1</sub>SC<sub>2</sub>, *Pseudomonas* sp BCI-1 dan *Pseudomonas* sp Dn-4CP mampu tumbuh dan menggunakan senyawa 4-klorofenol (4-CP) sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhannya, dengan waktu generasi masing-masing sebesar 50,6 jam; 51,6 jam dan 88,4 jam serta kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) berturut-turut sebesar 0,009 jam<sup>-1</sup>; 0,008 jam<sup>-1</sup> dan 0,005 jam<sup>-1</sup>;
2. Aktivitas dehalogenasi ke tiga isolat bakteri dengan melepas ion klorida ke dalam medium masing-masing sebesar : *Arthrobacter* sp AK<sub>1</sub>SC<sub>2</sub> 8,3 %, *Pseudomonas* sp BCI-1 5,3 % dan *Pseudomonas* sp Dn-4CP 9,7 %;
3. Ekstrak bebas sel (CFE) strain *Pseudomonas* sp Dn-4CP memiliki aktivitas dehalogenase tertinggi sebesar 0,1259  $\mu\text{mol mg}^{-1}\text{prot}^{-1}$ , kemudian diikuti strain *Arthrobacter* sp AK<sub>1</sub>SC<sub>2</sub> sebesar 0,0904  $\mu\text{mol mg}^{-1}\text{prot}^{-1}$  dan isolat *Pseudomonas* sp BCI-1 sebesar 0,0777  $\mu\text{mol mg}^{-1}\text{prot}^{-1}$ .

## RINGKASAN

Penggunaan secara luas senyawa aromatik terklorinasi, seperti 4-klorofenol sebagai biosida, pengawet kayu dan prekursor organik dalam sintesis herbisida klorofenoksiasetat menyebabkan terjadinya akumulasi di lingkungan. Kecenderungan senyawa aromatik terhalogenasi untuk terakumulasi di lingkungan dikarenakan sifatnya yang rekalsitran, sehingga kemungkinan akan mengalami biomagnifikasi atau biokonsentrasi dalam tubuh hewan tingkat tinggi melalui jalur rantai makanan.

Walaupun senyawa monoklorofenol (4-klorofenol) bersifat rekalsitran, strain bakteri tertentu telah menunjukkan kemampuan mendegradasinya. Proses degradasi dan deklorinasi senyawa terhalogenasi oleh mikrobia mempunyai peran yang sangat penting untuk detoksifikasi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari kemampuan tiga isolat "*indigenous*" strain AK<sub>1</sub>SC<sub>2</sub>, BCI-1 dan Dn-4CP dalam menggunakan senyawa 4-klorofenol sebagai sumber karbon tunggal dan sumber energi, serta besarnya aktivitas dehalogenasi selama proses degradasi 4-klorofenol.

Penelitian ini diawali dengan purifikasi bakteri pengguna senyawa terhalogenasi sederhana (1-kloropentana, 1-kloroheksana dan klorpirifos) dengan teknik koloni sel tunggal ("*single cell colony*"). Tahap skrining mikrobia dilakukan berdasarkan kemampuan tumbuh dalam medium SBA dengan indikator BTB ("*Bromo thymol blue*") yang ditambah 4-klorofenol (200 ppm). Koloni yang membentuk "zone jernih" kekuningan paling besar dipilih sebagai isolat terpilih. Kinetika pertumbuhan bakteri ditentukan dengan

percobaan kultivasi pada medium cair yang mengandung 4-klorofenol 200 ppm. Tahap inokulasi disiapkan dengan "resting cell incubation" dan kondisi kultur dilakukan pada temperatur  $37^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari inkubasi dalam sebuah "shaker incubator" 150 rpm. Aktivitas pertumbuhan bakteri dipantau dengan pengukuran absorbansi ( $\text{OD}_{600}$ ), jumlah ion klorida terlepas secara spektrofotometrik ( $\text{OD}_{460}$ ) dan perubahan nilai pH medium. Pengujian aktivitas dehalogenase dilakukan dengan berbagai sediaan (CFE, Debris, Supernatan kultur dan Kultur cair), berdasarkan ion klorida yang dilepaskan ke dalam substrat pertumbuhan dengan menggunakan metode Sallis *et al.*, (1990). Pengamatan terhadap hasil degradasi 4-klorofenol secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan kromatografi gas dengan detektor penangkap elektron ("ECD").

Bakteri yang berhasil dipilih sebagai "dehalogenator" *Arthrobacter* sp AK<sub>1</sub>SC<sub>2</sub>, *Pseudomonas* sp BCl-1 dan *Pseudomonas* sp Dn-4CP mampu tumbuh dan menggunakan senyawa 4-klorofenol (4-CP) sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhannya, dengan waktu generasi masing-masing sebesar 50,6 jam; 51,6 jam dan 88,4 jam serta kecepatan pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) berturut-turut sebesar  $0,009 \text{ jam}^{-1}$ ;  $0,008 \text{ jam}^{-1}$  dan  $0,005 \text{ jam}^{-1}$ . Aktivitas dehalogenasi ke tiga isolat bakteri dengan melepas ion klorida ke dalam medium masing-masing sebesar : *Arthrobacter* sp AK<sub>1</sub>SC<sub>2</sub> 8,3 %, *Pseudomonas* sp BCl-1 5,3 % dan *Pseudomonas* sp Dn-4CP 9,7 %. Ekstrak bebas sel (CFE) strain *Pseudomonas* sp Dn-4CP memiliki aktivitas dehalogenase tertinggi sebesar  $0,1259 \mu\text{mol mg}^{-1}\text{prot}^{-1}$ , kemudian diikuti strain *Arthrobacter* sp AK<sub>1</sub>SC<sub>2</sub> sebesar  $0,0904 \mu\text{mol mg}^{-1}\text{prot}^{-1}$  dan isolat *Pseudomonas* sp BCl-1 sebesar  $0,0777 \mu\text{mol mg}^{-1}\text{prot}^{-1}$ .

Aktivitas spesifik dehalogenase yang lebih tinggi pada sediaan supernatan kultur dan kultur cair dibandingkan dengan debris sel, menunjukkan bahwa enzim 4-klorofenol dehalogenase bekerja di luar sel (enzim ekstraseluler).

## DAFTAR PUSTAKA

- Apajalahti, JHA. and Salonen, S. 1987. Dechlorination and parahydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*. J. Bacteriol 169 : 675 - 681.
- Alexander, M.1999. Biodegradation and Bioremediation, Second Edition, Academic Press, USA. p.22-38.
- Atlas, RM. and Bartha, R.1993. Microbial Ecology : Fundamentals and Applications. Third Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., USA. p 386-397.
- Balfanz, J and Rehm, HJ.1991. Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp A7-2 in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 662-668.
- Bartels, I, Knackmuss, HJ. and Reineke, W. 1984. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. Appl. Environ. Microbiol. 47: 500-505.
- Bedard, DL., Unterman, R., Bopp, LH., Brennan, MJ. and Johnson, C.1986. Rapid assay for screening and characterising microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyl. Appl. Environ. Microbiol, 51: 761-768.
- Bollag, JM. 1974. Microbial transformation of pesticides. Adv. Appl. Microbiol 18: 37-75.
- Cappucino, JG. and Sherman, N. 1983. Microbiology : a laboratory manual. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.
- Dorn, E. and Knackmuss, HJ.1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds; substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. Biochem. J. 174: 85-94.
- Farrel, A. and Quilty, B. 1999. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a *meta*-cleavage pathway. Biodegradation 10: 353-362.
- Fava, F., Armenante, PM., Kafkewitz, D. and Marchetti, L. 1995. Influence of organic and inorganic growth supplement on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acids. Appl. Microbiol Biotechnol. 43: 171-177.
- Fetzner, S., Muller, R. & Lingens, F. 1992. Purification and some properties of 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase, a two component of enzyme system from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. J. Bacteriol 174: 279-290.

- Fetzner, S. and Lings, F. 1994. Bacterial dehalogenases : Biochemistry, genetics and biotechnological applications. *Microbiol Rev* 58: 641-685.
- Forster, CF. and Wase, DAJ. 1987. *Environmental Biotechnology*. Ellis Horwood Limited, Publ, Chicester.
- Frobisher, M., Hinsdill, Crabtree and Goodheart. 1974. *Fundamentals of microbiology*. ninth edition, WB Saunders Company, Philadelphia. p. 139-141.
- Goldman, P., Milne, GWA. and Pignataro, MT. 1967. Fluorine containing metabolites formed from 2-fluorobenzoic acid by *Pseudomonas* species. *Archs Biochem. Biophys.* 118: 178-184.
- Gosset, RW., Brown, DA. and Young, DR. 1983. Predicting the bioaccumulation of organic compounds in marine organism using octanol/water partition coefficients. *Marine Pollution Bulletin.* 14: 387-392.
- Hagblom, MM. 1990. Mechanism of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compound. *J. Basic Microbiol.* 30: 115-141.
- Hagblom, MM. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compound, *FEMS Microbiology Review* 103 : 29-72.
- Hagblom, MM. and Valo, RJ. 1995. *Microbial transformation and degradation of toxic chemicals*, Wiley & Sons, New York, p. 389.
- Hardman, DJ. 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Critical Review on Biotechnology*, CRC Press Inc. Great Britain. p. 1-39.
- Hardman, DJ. and Slater, JH. 1981. Microbial ecology in the laboratory : Experimental system. In : *Experimental microbial ecology* (Burns RG and Slater JH eds), p. 255-274.
- Hardman, DJ. 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Crit. Rev in Biotechnol* 11: 11-40.
- Hollender, J., Hopp, J. and Dott, W. 1997. Biodegradation of 4-chlorophenol via the *meta*-cleavage pathway by *Comamonas testoteroni* JH5. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4567-4572.
- Holt, JG. 1977. *The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology*. Eight edition. Williams & Wilkins Baltimore.

- Horowitz, A., Sulfito, JM. and Tiedje, JM. 1982. Reductive dehalogenation of halobenzoates by anaerobic lake sediment microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1459-1461.
- King, GM. 1986. Inhibition of microbial activity in marine sediments by a bromophenol from a hemichordate. *Nature* 323: 257-259.
- Klecka, GM. and Gibson, DT. 1981. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1159-1165.
- Leisinger, T. and Bader, R. 1993. Microbial dehalogenation of synthetic organohalogen compounds : Hydrolytic dehalogenases. *Chimia* 47: 116-121.
- Leung, KT., Errampalli, D., Cassidy, M., Lee, H and Trevors, JT. 1997. *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., USA. p.585.
- Loh, KC. and Wang, SJ. 1998. Enhancement biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon source. *Biodegradation* 8: 329-338.
- Mars AE., Kasberg, T., van Agteren, MH., Janssen, DB. and Reineke, W. 1997. Microbial degradation of chloroaromatics : Use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.* 179: 4530-4537.
- Martani, E. 1991. *Bioteknologi Lingkungan*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- McCullar, MV., Brenner, V., Adam, RH. and Focht, DD. 1994. Construction of a novel polychlorinated biphenyl-degrading bacterium: utilization of 3,4-dichlorobiphenyl by *Pseudomonas acidovorans* M3GY. *Appl. Env. Micro.* 60: 3833-3839.
- Neidleman, SL. and Geigert, J. 1986. *Biohalogenation : principles, basic roles and applications*. Ellis Horwood Limited, England. p. 13-34, 46-121, 156-175.
- Saber, DL. and Crawford, RL. 1985. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1512-1518.
- Saez, PB. & Rittmann, BE. 1991. Biodegradation kinetics of 4-chlorophenol, an inhibitory co-metabolite. *Res. J. Water. Pollut. Control. Fed.* 63: 838-847.

- Sallis, P.J., Armfield, S.J., Bull, A.T. and Hardman, D.J. 1990. Isolation and characterization of a haloalkane halohydrolyase from *Rhodococcus erythropolis* Y2. *J. Gen Microbiol*, 136: 115-120.
- Schmidt, E., Helwig, M. and Knackmuss, H.J. 1983. Degradation of chlorophenol by a defined mixed microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1038-1044.
- Slater, J.H. 1994. Microbial dehalogenation of haloaliphatic compounds. In : *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands. p. 379-421.
- Soetarto, E.S. 1995. Dehalogenating bacteria from Indonesian volcanic source. Thesis Report, October 1995.
- Soetarto, E.S. and Djohan, T.S. 1999. Biotransformasi residu pestisida organoklorin oleh bakteri tanah, Laporan penelitian HB VII, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.
- Spokes, J.R. and Walker, N. 1974. Chlorophenol and chlorobenzoic acid co-metabolism by different genera of soil bacteria. *Arch. Microbiol* 96: 125-134.
- Strotmann, U. and Rosenthaler, R. 1987. A method for screening bacteria : aerobically degrading chlorinated short-chain hydrocarbons. *Current Microbiology* 15: 159-163.
- Sung ~~bae~~, H., Lee, J.M., Bae ~~Kim~~, Y. and Lee, S.T. 1996. Biodegradation of the mixture of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testoteroni* CPW 301. *Biodegradation* 7: 463-469.
- Sumarno and Wilcock, T. 1992. Uji aktivitas dehalogenase mikrobial *Pseudomonas* sp isolat dari sampel tanah asal Ujung Kulon. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol 3. No. 3.
- Topp, E., Crawford, R.L. and Hanson, R.S. 1988. Influence of a readily metabolizable carbon on pentachlorophenol metabolism by a pentachlorophenol-degrading *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2452-2459.
- van der Meer, J.R. 1994. Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 239-249.
- van Pee, K.H. 1996. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* 50: 375-399.

- Weiser, M., Eberspacher, J., Volgler, B. and Lingens, F.1994. Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp GP1: Structure of the *meta*-cleavage product of 4-chlorocatechol. FEMS Microbil.Lett. 116: 73-78.
- Weistmeier, F. and Rehm, HJ. 1987. Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptiv immobilized *Alcaligenes* sp. A7-2. Appl.Microbiol.Biotechnol. 26: 78-83.
- Wijgaard, AJ., Janssen, DB. and Witholt, B.1989. Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial culture isolated from freshwater sediment. Journal of general microbiology, Great Britain p. 241-255.