

KEANEKARAGAMAN KHAMIR PENDEGRADASI MINYAK HASIL ISOLASI DARI PELABUHAN TANJUNG PERAK SURABAYA

Tri Nurhariyati, Ni'matuzahroh, Tini Surtiningsih
FMIPA-Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRACT

The aims of this research was to obtain diversity of hydrocarbonoclastic yeast isolated from Tanjung perak harbor Surabaya. Exploration of yeast was conducted by isolation and identification of isolated yeast. Identification of yeast based on characteristics of colonies, cell shape, and biochemical tests. From this research, it was obtained 9 hydrocarbonoclastic yeasts. They were 8 generas: Rhodotorula, Candida, Geotrichum, Torulopsis, Trichosporon, Cryptococcus, Debaryomyces, and Saccharomyces.

Key words: hydrocarbonoclastic yeast, Tanjung Perak Harbor Surabaya

PENGANTAR

Pencemaran lingkungan oleh senyawa hidrokarbon minyak terus mengalami peningkatan dan telah menimbulkan dampak yang berarti bagi kesehatan organisme hidup (Atlas, 1991). Lapisan minyak di permukaan air akan mengganggu kehidupan organisme di dalam air. Selain itu air yang tercemar oleh minyak juga tidak dapat dikonsumsi oleh manusia karena sering kali dalam cairan berminyak terdapat zat-zat yang beracun seperti senyawa benzen, senyawa toluen, dan sebagainya (Wardhana, 1995).

Pencemaran minyak sering terjadi di lingkungan laut dan sumber pencemaran antara lain dari kecelakaan kapal, pencucian tanki-tanki kapal, limbah minyak hasil operasional kapal, aliran sungai yang membawa limbah industri, automobil, limbah domestik, dan sebagainya (Connel & Miller, 1995).

Penanggulangan pencemaran minyak di perairan secara kimia dapat dilaksanakan dengan mudah dan cepat, tetapi penanggulangan dengan cara tersebut menggunakan bahan-bahan pembersih yang mengandung pemantap bahan pelarut organik yang tinggi daya racunnya. Oleh karena itu, penanggulangan secara biologi yang ramah lingkungan perlu dikembangkan untuk mengatasi pencemaran hidrokarbon minyak. Lapisan minyak yang menutupi permukaan air dapat terdegradasi oleh mikroba tertentu. Keberadaan mikroba pendegradasi hidrokarbon tersebar luas di alam. Bakteri, kapang dan khamir tertentu dapat mendegradasi hidrokarbon minyak dalam ekosistem perairan (Brock *et al.*, 1994). Proses degradasi yang melibatkan mikroba dikenal dengan istilah biodegradasi.

Mikroba dapat menggunakan karbon dari minyak sebagai sumber energi untuk pertumbuhan (Jusfah, 1995).

Khamir adalah jamur yang tahap siklus kehidupannya berasal dari sel-sel tunggal dan sebagian besar berkembang biak melalui pertunasan (*budding*) (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Dasar-dasar utama identifikasi dan klasifikasi khamir terdiri atas pembentukan askospora, morfologi sel vegetatif, metode reproduksi aseksual, produksi miselium/pseudomiselium atau tidak, ciri pertumbuhan di media cair, warna koloni, dan ciri-ciri fisiologis (Frazier, 1986).

Di Indonesia perkembangan penelitian khamir pendegradasi minyak belum begitu pesat. Penelitian tentang peran khamir dalam mendegradasi minyak merupakan kajian yang masih perlu terus dikembangkan. Oleh sebab itu penelitian ini diarahkan untuk mengungkap keanekaragaman khamir pendegradasi minyak yang diperoleh dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas: minyak tanah, minyak solar dan minyak pelumas bekas kapal jenis MESRANIA SAE 40, media mineral cair (NaNO_3 , KCl , MgSO_4 , FeSO_4 , KH_2PO_4 , dan air laut), media mineral agar modifikasi Czapek agar (NaNO_3 , KCl , MgSO_4 , FeSO_4 , KH_2PO_4 , dan agar), media SDA (*Sabouraud Dextrosa Agar*), media *Sabouraud Broth*, media *christensen's urea Agar*, Zat warna untuk pewarnaan morfologi khamir, pewarnaan kapsul, askospora, Rose bengal, dan kloramfenikol.

Cara Kerja

Cara kerja terdiri atas tahapan sebagai berikut:

1. **Tahap isolasi**, sampel diambil dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Sampel berupa air laut diambil pada lokasi penelitian yang tercemar minyak. Penentuan titik-titik pengambilan sampel dilakukan secara purposif. Isolasi khamir (modifikasi Buck, 1975 dalam Greenbers *et al.*, 1992), dilakukan dengan cara memasukkan sampel air laut yang terkontaminasi minyak (10 ml) ke dalam Erlenmeyer yang berisi media mineral cair (90 ml) yang telah ditambah dengan substrat minyak yang berbeda (minyak tanah, solar, dan pelumas), sebanyak 10 ml. Kultur diinkubasi di dalam *shaker incubator* selama 4 hari pada suhu kamar, kemudian suspensi diinokulasikan ke dalam cawan petri steril yang telah ditambah 1 ml larutan campuran rose bengal 0,35% dan larutan kloramfenikol 1%. Setelah itu dituang media modifikasi Czapek agar yang telah ditambah minyak sebagai sumber karbonnya dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 4 hari. Untuk memperoleh biakan murni, koloni yang tumbuh diambil dan ditanam kembali pada media SDA. Biakan murni yang diperoleh kemudian diperbanyak dalam media agar miring SDA dan dipergunakan untuk uji identifikasi.
2. **Tahap identifikasi**, yang terdiri atas berbagai uji, yaitu: uji pertumbuhan khamir dalam media cair, uji mikroskopis khamir dalam media Sabouraud Broth dan media Cornmeal-tween 80 Agar (*slide culture*), uji morfologi koloni, uji kapsul, uji urease, dan uji askospora. Uji pertumbuhan khamir dalam media cair dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat khamir ke dalam media Sabouraud Broth pada suhu kamar dan diamati pertumbuhannya setiap hari sampai hari ke-7. Uji mikroskopis dilakukan dengan mengamati khamir di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan dengan diberi zat warna lactofenol. Pengamatan pada uji mikroskopik meliputi bentuk, ukuran, dan model reproduksi vegetatifnya (*budding*). Pengukuran sel

khamir dilakukan dengan cara menyisipkan suatu mikrometer okular pada lensa okular. Sebelum digunakan mikrometer okular ditera terhadap mikrometer pentas (Hadioetomo, 1993). Uji morfologi koloni dilakukan dengan cara menumbuhkan biakan murni hasil isolasi ke dalam media SDA dengan metode cawan tuang (*pour plate*), Koloni yang tumbuh diamati di bawah mikroskop Nikon Transformer model XN. Uji kapsul dilakukan dengan menggunakan zat warna kristal violet dan larutan tembaga sulfat. Uji urease dilakukan dengan menggunakan media *Agar Base Urea* (Christensen), jika khamir menghasilkan urease (uji positif), maka media akan berubah warna dari kuning menjadi merah keunguan, sedang uji askospora dilakukan dengan metode modifikasi Schaeffer-Fulton's dengan menggunakan zat warna hijau malakit dan safranin (Kreger-van Rij, 1987).

HASIL

Temuan-temuan isolat khamir yang memiliki kemampuan mendegradasi minyak dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya, setelah diuji dengan bermacam-macam uji identifikasi (Tabel 1- 4), diperoleh 9 isolat khamir.

Tabel 1. Hasil uji morfologi koloni dalam media SDA

Khamir	Morfologi Koloni	Warna Koloni
Khamir-1	Bentuk bundar, elevasi cembung, tepi licin	Merah muda mengkilat
Khamir-2	Bentuk keriput, elevasi berbukit-bukit, tepian menyebar (bercabang)	Krem keruh
Khamir-3	Bentuk seperti kapas (berbenang-benang)	Putih
Khamir-4	Bentuk bundar, tepian menyebar bercabang, elevasi timbul	Krem keruh
Khamir-5	Bentuk bundar, elevasi seperti tombol, tepi licin	Krem bening
Khamir-6	Bentuk seperti kapas	Krem
Khamir-7	Bentuk bundar, elevasi cembung, tepi licin	Krem kecoklatan (coral)
Khamir-8	Bentuk bundar, Tepian kerang, elevasi cembung,	Putih keruh
Khamir-9	Bentuk bundar, elevasi cembung	Putih bening

Tabel 2. Hasil uji mikroskopis khamir dalam media Sabouraud Broth

Khamir	Bentuk sel dan budding	Ukuran (μm)	Hifa	Spora
Khamir-1	Oval, multilateral budding	(2-3) \times (3-5)	-	Blastospora
Khamir-2	Oval pendek, sel ada yang tunggal, ada yang berantai, multilateral budding	(3-5) \times (4-7)	Pseudohifa	Blastospora
Khamir-3	Bulat, empat persegi panjang	4 \times 9	Hifa (fragmentasi)	Artrokonidia
Khamir-4	Oval, multilateral budding	(2-3,5) \times (3-7,5)	-	Blastospora
Khamir-5	Bulat dan oval, single terminal budding	(2,5-4) \times (3-5)	-	Blastospora
Khamir-6	Oval memanjang	(4-5) \times (5-14)	-	Endospora (1-6)
Khamir-7	Bulat, oval pendek, multilateral budding	(4-5) \times (5-7)	-	Blastospora
Khamir-8	Bulat, oval pendek, multilateral budding	(3-5,5) \times (3-7)	-	Blastospora
Khamir-9	Bulat, oval pendek, multilateral budding	(3-6) \times (5-7,5)	-	Askospora (1-4)

Tabel 3. Hasil uji mikroskopis khamir dalam media Cornmeal-Tween 80 (*slide culture*)

Khamir	Bentuk sel dan budding	Ukuran (μm)	Hifa	Spora
Khamir-1	Bulat dan oval pendek	(2,5-4) \times (2,5-5)	Hifa	Blastospora
Khamir-2	Oval	(2-3) \times (2,5-7)	Hifa	Blastospora tunggal dan kelompok
Khamir-3	Bulat dan empat persegi panjang	(4 \times 5) \times (6-10)	Hifa	Artrokonidia
Khamir-4	Oval memanjang	(2-3) \times (3-10)	Pseudohifa	Blastokonidia di sepanjang pseudohifa
Khamir-5	Bulat, dan oval	2,5-4) \times (3-5)	-	Blastospora
Khamir-6	Oval	2,5-5	-	Blastospora
Khamir-7	Bulat dan oval	(3-5) \times (3,5--7)	Hifa	Blastospora dan arthrokonidia
Khamir-8	Bulat dan oval	(3-6) \times (4-8,5)	-	Blastospora
Khamir-9	Bulat dan oval, multilateral budding	(2,5-5) \times (3-5,5)	--	Askospora (1-3) Blastospora

Tabel 4. Hasil uji urease, uji kapsul dan uji pertumbuhan khamir pada media cair

Khamir	Uji urease	Uji kapsul	Uji pertumbuhan pada media cair
Khamir-1	+	+	Tumbuh di permukaan dengan membentuk lapisan berwarna merah muda dan terdapat endapan berwarna merah muda
Khamir-2	-	-	Ada endapan berwarna krem keputihan
Khamir-3	-	-	Tumbuh di permukaan dengan membentuk pelikel dan terdapat endapan berwarna putih
Khamir-4	-	-	Tumbuh di permukaan (lapisan) dan ada endapan berwarna putih
Khamir-5	-	-	Tumbuh di dasar, ada endapan berwarna krem keputihan
Khamir-6	+	-	Tumbuh di permukaan (pelikel tebal) dan ada endapan berwarna putih
Khamir-7	+	+	Tumbuh di dasar ada endapan berwarna putih kecoklatan (coral)
Khamir-8	-	-	Tumbuh di permukaan dan terdapat endapan berwarna putih
Khamir-9	-	-	Tumbuh di dasar dan terdapat endapan berwarna putih

Hasil identifikasi menurut *The Yeast a Taxonomic Study* dan *Medically Important Fungi: a Guide to Identification*, isolat khamir tersebut di atas berturut-turut dari khamir-1 sampai khamir-9 digolongkan dalam genus: *Rhodotorula*, *Candida*, *Geotrichum*, *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, dan *Saccharomyces*.

PEMBAHASAN

Khamir yang berhasil diisolasi digolongkan dalam khamir pendegradasi minyak, karena pada waktu isolasi menggunakan media yang mengandung minyak sebagai satu-satunya sumber karbon. Jika khamir tersebut tumbuh berarti khamir tersebut dapat menggunakan karbon dari minyak sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya.

Dalam kultur cair pertumbuhan khamir menunjukkan beberapa perbedaan. Khamir oksidatif tumbuh membentuk lapisan (film) atau pelikel pada kultur cair, sedangkan khamir fermentatif biasanya tumbuh di seluruh cairan (Frazier, 1986).

Pada kultur media SDA koloni khamir tampak bervariasi dalam bentuk, tepian, dan elevasi. Pada khamir yang membentuk hifa atau pseudohifa, pada tepi sekitar koloni tampak bentukan seperti rambut. Koloni khamir ada yang berwarna putih, krem, dan merah. Pigmentasi juga nampak pada pengamatan koloni. Dalam Schlegel, 1993, dinyatakan bahwa koloni yang menarik perhatian karena warnanya yang mencolok, disebabkan karena terjadi sekresi zat warna ke dalam medium atau pigmentasi sel. Koloni yang berwarna merah berasal dari karotenoid. Dari hasil uji morfologi koloni, hanya koloni khamir-1 (*Rhodotorula*) yang berwarna merah. Hal ini didukung dalam Frazier (1986) yang menunjukkan bahwa *Rhodotorula* merupakan salah satu khamir yang menghasilkan pigmen karotenoid.

Pengamatan mikroskopik dilakukan dalam 2 media, karena bentuk, ukuran dan reproduksi aseksual (*budding* dan *arthrospora*) lebih jelas diamati dalam media Sabouraud Broth, sedangkan media Cornmeal Agar-Tween 80 digunakan untuk pembentukan hifa dan pseudohifa dan menstimulasi pembentukan spora. Pemberian Tween 80 berguna untuk mempercepat pertumbuhan chlamydospora (Hazen *et al.*, 1973; Rogers & Beneke, 1970). Dari hasil pengamatan dengan menggunakan *Slide Culture*, tidak satu pun isolat yang menampakkan adanya chlamydospora, yang pada umumnya dimiliki oleh *Candida* patogen yaitu *Candida albicans*.

Uji kapsul dilakukan karena beberapa khamir memiliki kapsul, sehingga sangat perlu untuk identifikasi. Jika khamir memiliki kapsul maka dengan pewarnaan kristal violet dan tembaga sulfat, kapsul akan tampak sebagai lingkaran berwarna biru pucat mengelilingi sel-sel berwarna biru tua sampai ungu. Dari hasil pewarnaan tersebut, uji positif hanya terdapat pada khamir 1 (*Rhodotorula*) dan khamir 7 (*Cryptococcus*). Salah satu karakteristik dari *Cryptococcus* adalah memiliki kapsul, sedangkan *Rhodotorula* ada juga yang memilikinya (Larone, 1993).

Khamir berbeda kemampuannya dalam menghidrolisis urea konsentrasi tinggi menjadi amoniak dalam media lengkap yang mengandung pepton sebagai sumber nitrogen (Kreger-van Rij, 1987). Pada uji urease dengan menggunakan media Christensen's Urea Agar (mengandung pepton, urea, dan phenol red), hanya khamir 1 (*Rhodotorula*), khamir 6 (*Trichosporon*) dan khamir 7 (*Cryptococcus*) yang memberikan uji positif. Hal ini

menunjukkan bahwa khamir tersebut memiliki kemampuan menghasilkan urease. Jika ada aktivitas urease, amoniak akan dihasilkan, pH medium naik dan akan terjadi perubahan warna phenol red dari kuning (pH 6,8) menjadi merah keunguan (pH > 8,1).

Uji askospora dilakukan dengan metode modifikasi Scaeffler-Fulton's. Jika khamir memiliki askospora, maka dengan pewarnaan tersebut askospora akan berwarna hijau dan sel vegetatif berwarna merah. Hasil uji askospora hanya khamir 8 (*Debaryomyces*) dan khamir 9 (*Saccharomyces*) yang memberikan hasil positif. Pada khamir 8 (*Debaryomyces*) memiliki askospora berbentuk bulat dengan jumlah 1-3 (umumnya 1), sedangkan khamir 9 (*Saccharomyces*) mengandung 1-4 askospora dengan bentuk bulat. Spora tersebut tidak nampak dibebaskan dari askus.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas RM, 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oil Spill. *J.Chem. Tech. Biotechnol* 52: 149-156.
- Brock TD, MT Madigan JM, Martinko and Parker J, 1994. Biology of Microorganism, Prentice-Hall International, Inc., Baltimore
- Connell DW and Miller GJ, 1995. Chemistry and Ecotoxicology of pollution. Penerjemah Yanti K. Penerbit Universitas Indonesia.
- Frazier WC, 1986. Food Microbiology. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Greenbers AE, Clesceri LS, and Andrew DE, 1992. Standart Methods for the Examination of Water and Waste. American Water Works Association Water Environment Federation
- Hazen EL, Gordon MA, and Reed FC, 1973. Laboratory Identification of Pathogenic Fungi Simplified. Third edition. Charles C Thomas Publisher USA.
- Hadioetomo RS, 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Jusfah J, 1995. Peranan Mikroorganism dalam Pengelolaan Limbah untuk Mengatasi Pencemaran Lingkungan. Pidato Pengukuhan sebagai Guru Besar FMIPA Universitas Andalas.
- Kohlmeyer J and Kohlmeyer E, 1979. Marine Mycology. Academic Press, New York.
- Kreger-van Rij NJW, 1987. The Khamir a Taxonomic Study. Elsevier Science Publisher BV., Amsterdam.
- Larone DH, 1993. Medically Important Fungi: A Guide to Identification, 2nd ed. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Rogers AL and Beneke ES, 1970. Medical Mycology Manual, 3rd ed. Burgers Publishing Company.

Schlegel HG, 1993. General Microbiology, 7th ed. Cambridge University Press.

Wardhana WA, 1995. Dampak Pencemaran Lingkungan. Penerbit Andi offset, Yogyakarta.

Reviewer: **Ir. Triwibowo Yuwono, Ph.D.**