

Bioremediasi *In Vitro* Tanah Tercemar Toluena dengan Penambahan *Bacillus* Galur Lokal

In Vitro Bioremediation of Toluene Contaminated Soil With Addition of Local Strains *Bacillus*

AGUS IRIANTO* & M. SYAMSUL KOMAR

Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto 53123

Bioremediation is the use of microorganism to remove or detoxify toxic or unwanted chemicals in an environment. Among those chemicals are hydrocarbon such as toluene. Environment pollution by substances such as toluene will destroy the environment and resulting reduction of the biodiversity of organisms. Some species of microorganisms which capable to adapt and degrading toxic substance will exist. However, to optimise bioremediation nutrient addition such as N and introducing degrader microbes are necessary. This study tried to solved the problem by urea addition in 0.25% w/v concentration and introducing promising local bacilli isolates namely UK41 and UK44 respectively as well as their mixture. The parameters measured was toluene, COD, BOD, pH, microbial number, DO and CO₂. The best result was revealed from introduction of mixture of U41 and U44. It means that local isolates of bacilli U41 and U44 are prospective to be used as soil bioremediation agent for hydrocarbon contaminated soil.

Key words: *Bacillus*, bioremediation, soil, toluene

Senyawa aromatik merupakan senyawa yang relatif sulit mengalami biodegradasi sehingga dikenal sebagai senyawa rekalsitran (Atlas & Bartha 1987), salah satunya dijumpai pada minyak bumi.

Pada awalnya mikroorganisme pendegradasi minyak bumi dianggap hanya dijumpai pada daerah yang bersinggungan dengan minyak bumi, tetapi bukti menunjukkan bahwa mikroorganisme pendegradasi minyak tersebar luas di alam (Schlegel 1993). Hingga saat ini lebih dari 108 spesies bakteri mampu mendegradasi hidrokarbon, di antaranya yaitu: *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, dan *Vibrio* (Berry & Francis 1987).

Industri pengeboran minyak bumi serta industri hilirnya sangat potensial menyebabkan air, tanah, dan udara tercemar. Berbagai usaha untuk mengatasi pencemaran telah dilakukan antara lain dengan melakukan perbaikan pada sistem eksplorasi, eksploitasi, pengolahan dan penyaluran minyak bumi, serta pengelolaan limbah. Adapun penanganan pencemaran yang sejauh ini telah dilakukan meliputi penanganan fisik, biologi, dan kimiawi.

Kehadiran mikroorganisme pendegradasi cemaran hidrokarbon pada habitatnya akan mampu melakukan remediasi atau pemulihan, tetapi dengan jumlah populasinya yang rendah dan suplemen nutrisi tertentu menyebabkan kemampuan remediasinya rendah. Keefektifan bioremediasi sangat ditentukan oleh konsentrasi mikrob pendegradasi cemaran, konsentrasi cemaran, faktor fisik seperti suhu dan pH optimum, dan

faktor kimia seperti ketersediaan oksigen dan nutrisi (Bouwer, 1992).

Menurut Madigan *et al.* (1997) status nutrisi tanah merupakan faktor utama yang mempengaruhi aktivitas mikrob, dan daerah yang paling tinggi aktivitasnya terdapat di lapisan atas tanah terutama di rizosfer. Jumlah dan aktivitas mikrob bergantung pada jumlah kandungan dan keseimbangan nutrisi yang ada

Penelitian *in vitro* dalam mengatasi cemaran minyak mentah pada perairan laut dilakukan dengan suplementasi mineral dan sumber N berupa pepton, serta aerasi dan pengadukan permukaan. Dengan cara tersebut mikroorganisme dalam air laut tersebut mampu mendegradasi minyak mentah hanya dalam beberapa hari (Berwick 1984). Ia menunjukkan bahwa tiga isolat *Pseudomonas* secara bersama-sama mampu mendegradasi minyak hingga 87% dalam waktu 48 jam, sedangkan satu galur *Bacillus* dalam waktu yang sama mendegradasi 50-65%.

Suplementasi nutrisi seperti sumber N, N organik seperti pepton dan N anorganik berupa urea atau amonia, dapat meningkatkan kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi hidrokarbon. Sabarni (1995) menunjukkan bahwa penambahan urea hingga 0.25% (bobot per volume) mampu meningkatkan degradasi hidrokarbon aromatik berupa toluena oleh *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070 hingga 10 kali lipat dalam tempo enam hari.

Bakteri dan cendawan diketahui mampu mendegradasi hidrokarbon (Swannell & Head 1994). Di antara bakteri yang dikenal mampu mendegradasi hidrokarbon yaitu *Bacillus*. *Bacillus* merupakan bakteri pembentuk spora yang bersifat kosmopolit dan memerlukan syarat hidup yang sederhana,

* Penulis untuk korespondensi,
E-mail: Agus_iriato@purwokerto.wasantara.net.id

aerob dan fakultatif anaerob, selnya berbentuk batang, memproduksi katalase, dan bersifat gram positif (Claus & Barkley 1980).

Irianto & Anggorowati (1997) serta Irianto & Andriani (1998) berhasil mendapatkan beberapa isolat *Bacillus* yang mampu mendegradasi hidrokarbon alifatik, siklik, dan aromatik. Pendegradasi senyawa aromatik antara lain *Bacillus thermoleovorans*, *B. gordonae*, *B. benzoovorans* (Pichinoty *et al.* 1986, Zarilla & Perry 1987). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *Bacillus* dan urea terhadap bioremediasi tanah yang tercemar oleh minyak bumi secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Bahan. *Bacillus* UK41 dan *Bacillus* UK44 diisolasi dari Taman Nasional Ujungkulon. Tanah yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari lokasi pengeboran minyak Lemigas di Cepu. Tanah sebanyak 500 g ditambah akuades steril sehingga menjadi bubur dan ditempatkan dalam ember plastik tanpa aerasi. Dalam penelitian ini disiapkan sebanyak 48 ember. Masing-masing lumpur ditambah 0.25% urea.

Karakteristik unggul antara lain tumbuh pada media kaldu nutrisi pada pH 5.0-9.5 dan suhu 15^o-50^oC, mampu menggunakan sumber karbon berbagai jenis KH (antara lain glukosa, laktosa, galaktosa, xilosa, arabinosa, sukrosa) serta turunan hidrokarbon (toluena, heksana, benzena, dan naftalena).

Isolat Uji. Isolat *Bacillus* UK41 dan UK44 diremajakan pada agar-agar nutrisi (NA Oxoid). Biakan berumur 2 X 24 jam diuji ulang kemampuan tumbuhnya pada media Bushnell Hass + 1% toluena. Jika kemampuannya masih tetap baik maka biakan diinokulasikan ke media kaldu nutrisi (NB Oxoid) dan diinkubasi pada suhu kamar 37^oC selama 2 X 24 jam. Jika pertumbuhan biakan kurang baik maka bakteri diaktivasi dengan menginokulasikannya ke dalam tanah steril dan diinkubasi selama 10 hari.

Metode. Suspensi bakteri selanjutnya ditambahkan ke dalam lumpur yang telah disiapkan di dalam ember, perlakuan yang dicoba yaitu *Bacillus* UK4 sebanyak 50 ml, isolat *Bacillus* UK44 sebanyak 50 ml, dan campuran 25 ml suspensi *Bacillus* UK41 dan 25 ml suspensi *Bacillus* UK44, dan sebagai kontrol hanya ditambahkan 50 ml akuades steril.

Pengamatan. Pengamatan dilakukan pada awal percobaan, akhir minggu ke-1, akhir minggu ke-2 dan akhir minggu ke-3. Beberapa peubah yang diamati yaitu kadar toluena sisa dengan GC (Noegrohati 1983), CO₂ bebas (APHA 1985), sel mikroba, nilai pH (dengan pH meter Horiba F8-L), nilai oksigen terlarut (Alaerts & Santika 1987), kadar COD (Alaerts & Santika 1987), dan BOD₅ (APHA 1985).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil menunjukkan bahwa populasi mikroba terus meningkat dari awal percobaan hingga akhir minggu ke-3. Peningkatan

populasi yang berarti umumnya terjadi pada minggu ke-1 hingga akhir minggu ke-2. Peningkatan paling besar terjadi pada perlakuan inokulasi campuran *Bacillus* UK41 dan U42, hal ini menunjukkan bahwa kerja kedua isolat tersebut sinergis, baik di antara keduanya maupun dengan mikroba endogen substrat tersebut. Sedangkan mikroba endogen pada kontrol baru menunjukkan peningkatan yang berarti setelah minggu ke-2, hal ini menunjukkan bahwa penambahan nutrisi berupa urea 0.25% terbukti mampu meningkatkan kinerja mikroba endogen dalam bioremediasi tanah yang tercemar hidrokarbon. Indikasi tersebut juga ditunjukkan secara kualitatif pada perlakuan lainnya. Koloni *Bacillus* akan menunjukkan warna putih keruh, kusam dengan tepi tidak teratur, sedangkan mikroba endogen muncul dalam beberapa karakter koloni yang menunjukkan bahwa mikroba endogen terdiri atas beberapa jenis mikroba. Tanpa penambahan urea kemungkinan populasi maupun aktivitas biodegradasi oleh mikroba endogen tidak ada peningkatan. Peningkatan kinerja ini ditunjukkan dengan peningkatan populasi mikroba (Gambar 1) serta peubah lain seperti COD, pH, dan kadar toluena.

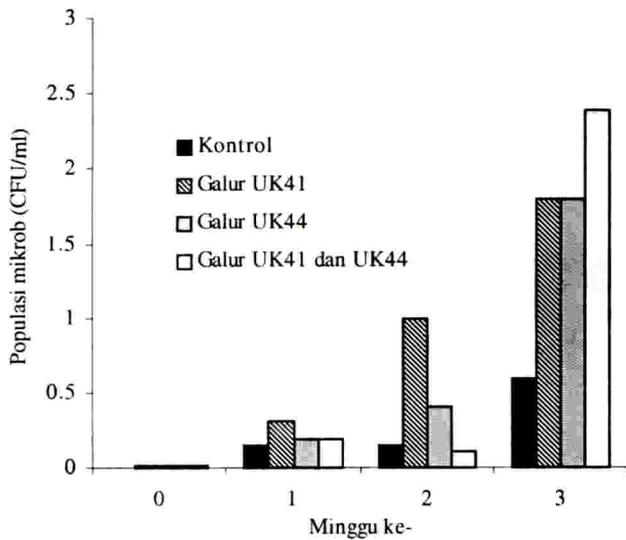
Nilai pH substrat terus menurun sejalan dengan berlangsungnya proses bioremediasi. Selama proses remediasi berlangsung biodegradasi, senyawa hidrokarbon baik alifatik, siklik maupun aromatik akan dipecah menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga terbentuk asetil-KoA dan selanjutnya masuk ke siklus asam trikarboksilat. Dari rangkaian reaksi tersebut dihasilkan berbagai senyawa seperti asam-asam organik, metana, H₂O dan CO₂ (Madigan *et al.* 1997). Senyawa hasil degradasi hidrokarbon yang bersifat asam berperan pada penurunan nilai pH substrat. Pada pH tinggi urea akan berupa gas sehingga akan segera dibebaskan ke udara dan hal ini berperan pula pada penurunan pH. Hasil pada akhir percobaan masih menunjukkan kecenderungan penurunan pH, hal ini diduga karena biodegradasi hidrokarbon masih terus berlangsung dan belum semua proses telah mencapai fase akhir biodegradasi.

Penurunan pH yang terbesar terjadi pada kontrol yaitu dari pH 9.35 menjadi 7.54-7.83 (Tabel 1). Penurunan pH ini diduga terjadi karena akumulasi produk antara atau pembebasan ion H. Berdasarkan jumlah mikroba (Gambar 1), degradasi toluena (Gambar 2), serta kadar BOD (Gambar 3) diketahui bahwa laju biodegradasi pada kontrol relatif lebih lambat dibandingkan perlakuan lainnya.

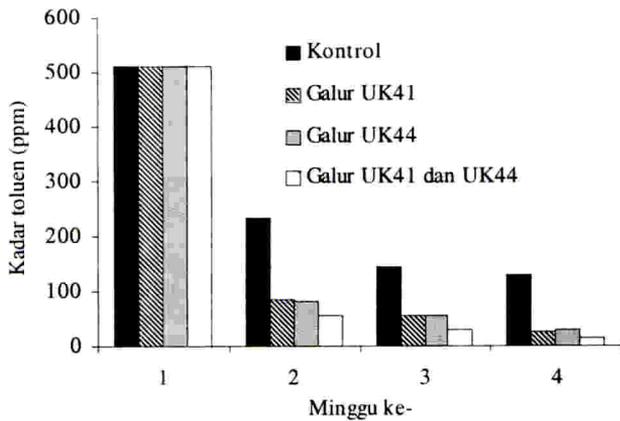
Nilai BOD menunjukkan kecenderungan terus menurun sejalan dengan berlangsungnya proses bioremediasi. Selama proses bioremediasi bahan organik yang dapat didegradasi

Tabel 1. Nilai pH pada perlakuan bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon menggunakan *Bacillus* galur lokal.

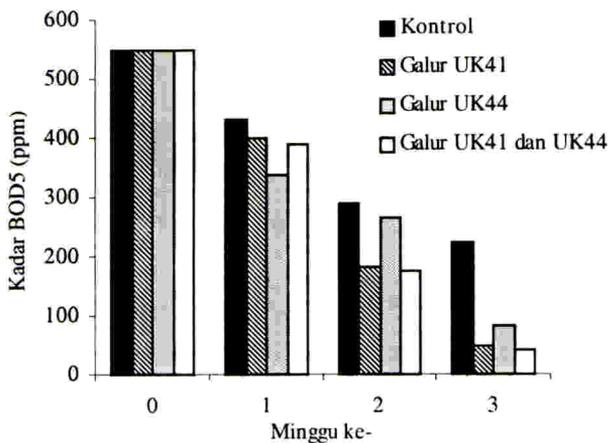
Perlakuan	Nilai kisaran pH			
	Awal (T0)	Akhir Minggu I (T1)	Akhir Minggu II (T2)	Akhir Minggu III (T3)
kontrol	9.35	7.95-8.11	7.79-8.01	7.54-7.83
<i>Bacillus</i> UK41	9.35	8.13-8.20	7.97-8.02	7.81-7.99
<i>Bacillus</i> UK44	9.35	7.99-8.20	7.90-8.15	7.85-8.02
<i>Bacillus</i> UK41 dan UK44	9.35	7.85-8.02	7.85-8.01	7.79-7.82



Gambar 1. Populasi mikroba (cfu/ml) pada perlakuan bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon menggunakan *Bacillus* galur lokal.



Gambar 2. Kadar toluena (ppm) pada perilaku bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon menggunakan *Bacillus* galur lokal.

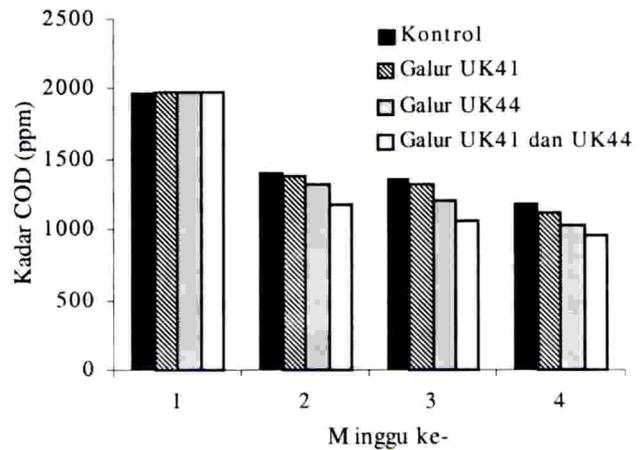


Gambar 3. Kadar BOD₅ (ppm) pada perlakuan bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon menggunakan *Bacillus* galur lokal.

oleh mikroba akan diubah menjadi molekul yang lebih sederhana. Proses degradasi hidrokarbon sebagian besar berlangsung secara aerob karena untuk pemecahan tersebut diperlukan enzim oksigenase. Dengan demikian meskipun terjadi penurunan nilai BOD yang berarti kebutuhan oksigen untuk biodegradasi menurun, ketersediaan oksigen terlarut juga terus menurun karena selalu dipakai oleh mikrobiota pada lumpur tersebut untuk memecah hidrokarbon. Perlakuan *Bacillus* UK44 menghasilkan nilai BOD yang lebih rendah dibandingkan kontrol. Penambahan inokulan dalam bentuk campuran *Bacillus* UK41 dan UK42 menghasilkan nilai BOD yang terendah. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua spesies isolat *Bacillus* sinergis. Asosiasi sinergis antara dua spesies akan menghasilkan produk yang lebih besar dibandingkan penggabungan hasil akumulasi kerja masing-masing spesies (Atlas & Bartha 1987).

Nilai COD menggambarkan jumlah senyawa organik yang *non-biodegradable* pada suatu substrat. Pada beberapa hal senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa rekalsitran yang antara lain adalah hidrokarbon aromatik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa inokulasi *Bacillus* UK41 dan UK44 ataupun campurannya berhasil menurunkan nilai COD, berarti bahwa meskipun sebagian hidrokarbon yang ada pada substrat digolongkan sebagai rekalsitran, tetapi terbukti bahwa mikroba yang ditambahkan mampu melakukan biodegradasi terhadap senyawa rekalsitran tersebut.

Penurunan COD terbesar terjadi pada perlakuan penambahan isolat campuran *Bacillus* UK41 dan UK44 (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa dua isolat tersebut bersama-sama dengan mikroba endogen mampu bekerja sinergis dalam meningkatkan laju biodegradasi senyawa-senyawa rekalsitran seperti toluena dan fenol. Tidak semua senyawa rekalsitran yang ada dalam tanah yang tercemar tersebut dapat didegradasi, hal ini dibuktikan dengan penurunan nilai COD yang relatif rendah yaitu antara 39.93% pada kontrol hingga 51.67% pada perlakuan campuran *Bacillus* UK41 dan UK44.



Gambar 4. Kadar COD (ppm) pada perlakuan bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon menggunakan *Bacillus* Galur lokal.

Toluena sendiri terbukti mampu didegradasi dalam jumlah relatif cukup tinggi.

Penurunan kadar toluena yang sangat besar selama proses bioremediasi *in vitro* ditunjukkan oleh penurunan kadar toluena pada semua perlakuan (Gambar 4). Penurunan terbesar terjadi pada penggunaan inokulum campuran *Bacillus* UK41 dan UK44 yakni dari 510.07 ppm pada awal perlakuan menjadi 15.03 ppm. Hal ini berarti terjadi penurunan sebesar 97.05%. Pada perlakuan kontrol terjadi penurunan sebesar 74.4%, perlakuan dengan penambahan isolat UK41 menunjukkan penurunan sebesar 94.99%, dan pada penambahan isolat UK44 mencapai 94.34%.

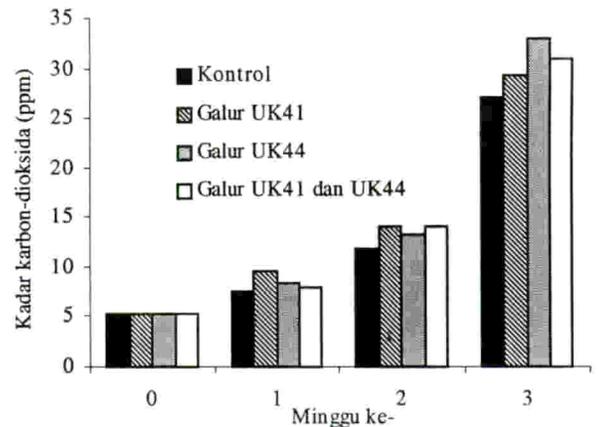
Hasil di atas menunjukkan bahwa penambahan *Bacillus* UK41 dan UK44 terbukti mampu meningkatkan laju degradasi toluena lebih dari 20%. Gambar 4 menjelaskan pula bahwa kerja sinergis *Bacillus* UK41 dan UK44 secara bersama-sama mampu menunjukkan hasil terbaik. *Bacillus* UK41 dan UK44 terbukti pula mampu bertahan dalam jumlah relatif tinggi hingga akhir penelitian.

Aktivitas pemecahan hidrokarbon, termasuk toluena, pada akhirnya akan menghasilkan produk akhir berupa karbon dioksida dan air. Berdasarkan hal tersebut, meningkatnya kadar karbon dioksida menunjukkan peningkatan aktivitas biodegradasi. Karbon dioksida merupakan gas sehingga sangat mudah dilepaskan ke udara. Peningkatan suhu lingkungan juga akan mempercepat lepasnya karbon dioksida ke udara.

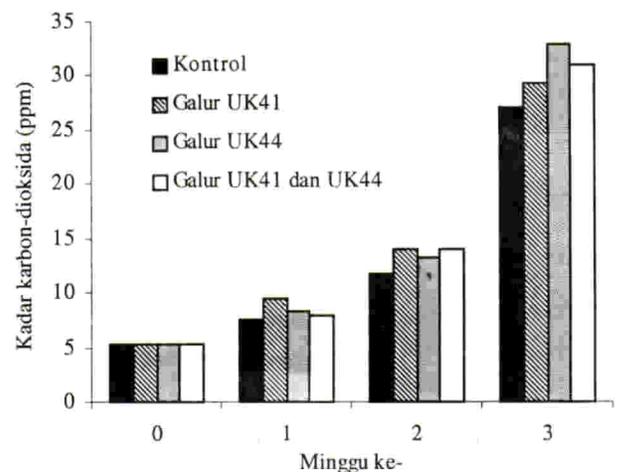
Gambar 5 menunjukkan terjadinya peningkatan karbondioksida sejak awal percobaan hingga akhir minggu ke-3, berarti laju biodegradasi dari awal percobaan hingga akhir minggu ke-3 terus meningkat. Data tersebut juga didukung oleh penurunan nilai BOD yang sangat besar, peningkatan populasi mikroba, respirasi, dan penurunan kadar toluena.

Indikasi laju degradasi yang cepat selama proses bioremediasi terlihat pula dari kadar oksigen terlarut (Gambar 6) yang terus mengalami penurunan sebagai akibat aktivitas mikroba pada perlakuan. Aktivitas mikroba dalam penguraian memerlukan pasokan oksigen dalam jumlah besar dan hal ini akan berakibat penurunan kadar oksigen terlarut. Sebaliknya, aktivitas tersebut akan berakibat pada penurunan BOD, penurunan kadar toluen serta peningkatan karbon dioksida sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2 hingga 6. Madigan *et al.* (1997) menyatakan bahwa pemecahan hidrokarbon yang cepat memerlukan oksigenase sehingga umumnya berlangsung pada kondisi aerob. Dengan demikian, jika proses bioremediasi diberi aerasi tentu proses pemecahan toluen akan berlangsung lebih cepat. Penurunan oksigen terlarut terbesar terjadi pada penambahan campuran *Bacillus* UK41 dan UK44 yang ditunjukkan oleh penurunan sebesar 83.93% yaitu dari 5.6 ppm pada awal perlakuan menjadi 0.9 ppm pada akhir minggu ke-3.

Penurunan kadar oksigen terlarut jika terus berlanjut akan berakibat pada kekurangan oksigen dan lingkungan akan



Gambar 5. Kadar CO₂ (ppm) selama perlakuan bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon menggunakan *Bacillus* galur lokal.



Gambar 6. Perubahan kadar oksigen terlarut (ppm) pada bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon menggunakan *Bacillus* galur lokal selama tiga minggu.

menjadi anaerob. Keadaan anaerob menyebabkan penurunan laju biodegradasi, tetapi proses biodegradasi tidak akan terhenti. *Bacillus* UK41 maupun UK44 serta beberapa mikroba endogen substrat memiliki sifat fakultatif anaerob (Irianto & Komar 1998), hal ini berarti pada kondisi anaerob proses biodegradasi akan tetap berlangsung meskipun hanya terhadap senyawa-senyawa antara dan dengan laju yang lebih lambat.

Inokulasi campuran isolat lokal *Bacillus* UK41 dan UK44 terbukti mampu meningkatkan biodegradasi hidrokarbon dengan penurunan oksigen terlarut sebesar 83.93%.

DAFTAR PUSTAKA

- Alaerts, G. & S.S. Santika. 1987. *Metoda Penelitian Air*. Surabaya: PT Usaha Nasional.
- APHA. 1985. *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Ed. ke-16. New York: American Public Health Association.
- Atlas, R.M. & R. Bartha. 1987. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Ed. ke-2. Menlo Park: Benjamin/Cummings.
- Berry, D.F. & A.J. Francis. 1987. Microbial metabolism of homoecyclic and heterocyclic aromatic compound under anaerobic condition. *Microb. Review* 51:43-59.

- Berwick, P.G.** 1984. Physical and chemical conditions for microbial oil degradation. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:1294-1305.
- Bouwer, E.J.** 1992. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. hlm. 287-318. *Di dalam*: R. Mitchell (Ed.). *Environmental Microbiology*. New York: Wiley & Sons.
- Claus, D. & R.C.W. Barkley.** 1980. Genus *Bacillus* Cohn 1872. hlm. 174. *Di dalam*: T.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. London: Williams and Wilkins.
- Irianto, A. & R. Andriani.** 1998. Isolasi dan identifikasi *Bacillus* pendegradasi hidrokarbon dari perairan Nusakambangan, Cilacap. Laporan Penelitian. Purwokerto: Fakultas Biologi Unsoed.
- Irianto, A. & D.E. Anggorowati.** 1997. Isolasi dan identifikasi *Bacillus* pendegradasi toluen dari Sungai Donan, Cilacap. Laporan Penelitian. Purwokerto: Fakultas Biologi Unsoed.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker.** 1997. *Brock's Biology of Microorganisms*. Ed. ke-8. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- Noegrohati, S.** 1983. Teknik dan Uji Cemaran Pangan. *Chromatografi Gas*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Pichinoty, F., J.B. Waterbury, M. Mandel & J. Asselineau.** 1986. *Bacillus gordonae* sp. nov. Une nouvelle espèce appartenant au second groupe morphologique dégradant divers composé aromatiques. *Ann. Inst. Pasteur* **137A**:65-78.
- Sabarni, N.** 1995. Kemampuan *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070 dalam biodegradasi toluena dengan penambahan urea sebagai sumber nitrogen. Skripsi. Purwokerto: Fakultas Biologi Unsoed.
- Schlegel, H.G.** 1993. *General Microbiology*. Cambridge University Press.
- Swannell, R.P.J. & I.M. Head.** 1994. Oil spills, bioremediation comes of age. *Nature* **368**:396-397.
- Zarilla, K.A. & J.J. Perry.** 1987. *Bacillus thermoleovorans*, sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endosporeforming bacteria. *System. App. Microbiol.* **9**:247-255.