



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PETROFILIK DARI KONSENTRASI RESIDU TOTAL PETROLEUM HIDROKARBON (TPH) DI BAWAH 1% (W/W) HASIL PROSES BIOREMEDIASI

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PETROFILIC BACTERIA FROM TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH) RESIDUES UNDER 1% (W/W) OF BIOREMEDIATION PROCESS RESULTS

Allen Kurniawan

*Departemen Teknik Sipil dan Lingkungan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680, Indonesia
allenkurniawan@ipb.ac.id; allen.kurniawan@gmail.com*

ABSTRAK

Dalam Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No.128/2003 tentang Tata Cara dan Persyaratan Teknis Pengolahan Limbah Minyak Bumi dan Tanah Terkontaminasi Oleh Minyak Bumi Secara Biologis, persyaratan akhir untuk memulihkan lahan tercemar Total Petroleum Hidrokarbon (TPH) melalui bioremediasi adalah kurang dari 1%. Residu TPH hasil bioremediasi sulit didegradasi secara alamiah dan membutuhkan jangka waktu yang panjang, sedangkan kuantitas hasil pengolahan terus mengalami peningkatan. Dengan demikian, efek ini akan membawa permasalahan baru bagi lingkungan. Isolasi dan identifikasi bakteri petrofilik merupakan awal dari rangkaian penelitian yang akan dilanjutkan dengan tahap penentuan parameter kinetika biodegradasi dan uji biodegradasi pada reaktor landfarming skala laboratorium. Tujuan penelitian ini menemukan isolat bakteri yang memiliki afinitas tinggi terhadap substrat yang diberikan. Isolasi bakteri menggunakan media Solution Base Salt (SBS) yang diperkaya ekstrak ragi dan crude oil. Tahap isolasi menghasilkan 6 isolat bakteri koloni tunggal yang berpotensi sebagai pendegradasi crude oil, dengan ciri dihasilkannya zona bening di sekitar koloni. Tahap identifikasi menghasilkan isolat indigenus bakteri *Pseudomonas putida* AK.A (4 isolat) dan *Pseudomonas diminuta* AK.B (2 isolat). Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif, bersifat aerobik, berbentuk batang dan dapat mendegradasi polutan terutama hidrokarbon aromatik. Kedua isolat ini akan digunakan untuk menentukan kinetika biodegradasi baik dalam koloni tunggal ataupun kultur tercampur.

Kata kunci: bakteri petrofilik, bioremediasi, isolasi, identifikasi, residu total petroleum hidrokarbon.

ABSTRACT

*In minister of decree (Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No.128/2003) mentioned that the final requirement of the recovery contaminated land by Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) through the bioremediation is less than 1%. The TPH residues resulted from bioremediation are difficult to degrade naturally and requires a treatment process in long term, while the treatment process output quantity is increasing. Thus, these effects will bring new problems for environment. The isolation and identification of petrofilic bacteria is the beginning phase of this research and will be continued by determination of biodegradation kinetic parameters and examine the biodegradation process at landfarming reactor on a laboratory scale. The purpose of this research is finding the bacteria isolates that have high affinity towards the given substrates. The bacteria isolation media was using Solution Base Salt (SBS) which enriched with yeast extract and crude oil. The isolation phase produced 6 single colonies of bacteria isolates that potentially degrading crude oil with clear zones characteristics around the colonies. The identification phase produced *Pseudomonas putida* AK.A (4 isolates) and *Pseudomonas diminuta* AK.B (2 isolates). These bacteria are gram-negative bacteria, aerobic, rod-shaped, and can degrade the pollutants especially aromatic hydrocarbons. Both of these isolates will be used to determine biodegradation kinetics of both in a single colony or a mixed culture.*



Keywords: bioremediation, identification, isolation, petrofilic bacteria, total petroleum hydrocarbon residues.

PENDAHULUAN

Sektor pertambangan khususnya minyak bumi dan gas (migas) cenderung dipersepsikan sebagai salah satu sumber pencemaran yang mengganggu kelestarian lingkungan. Hal ini diakibatkan adanya produk sampingan berupa limbah minyak bumi (*oil sludge*) yang dihasilkan dari proses eksplorasi hingga proses pengilangan. Limbah minyak bumi ini menimbulkan bau, serta secara fisik mempunyai tekstur liat dan saling melekat. Proses bioremediasi merupakan teknologi alternatif untuk meminimalisir dan memulihkan lahan terkontaminasi komponen yang berbahaya dengan adanya aktivitas mikroorganisme. Kontaminan tersebut diolah dan direduksi hingga konsentrasi kandungan *Total Petroleum Hidrocarbon* (TPH) mempunyai persyaratan nilai akhir kurang dari 1% sesuai dengan *Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No. 128/2003*. Nilai 1% TPH adalah setara dengan 10.000 mg/L. Limbah padat hasil proses bioremediasi biasanya ditempatkan pada satu unit penampungan hingga kontaminan terdegradasi secara alamiah. Hampir sebagian besar industri minyak bumi di Indonesia membuat persepsi bahwa konsentrasi maksimum TPH 1% menyatakan keberhasilan pengolahan. Bila dikaji lebih mendalam, konsentrasi TPH sebesar 1% masih menunjukkan adanya kontaminan yang masih berbahaya di dalam lingkungan. Patut dicermati bahwa residu TPH hasil proses bioremediasi sangat sulit didegradasi secara alamiah dan membutuhkan proses dalam jangka waktu yang tidak singkat, sedangkan kuantitas hasil pengolahan terus mengalami peningkatan. Oleh karena itu secara tidak disadari efek ini akan membawa permasalahan baru bagi lingkungan sebagai media penerima.

Atas dasar permasalahan di atas, maka penelitian ini dilakukan dalam rangka upaya pemulihan lanjutan hasil proses bioremediasi, dengan tujuan mengisolasi dan mengidentifikasi sekumpulan mikroorganisme (*indigenous*) dari tanah hasil proses akhir bioremediasi. Hasil isolat bakteri dari tahap ini akan digunakan untuk analisis tahap lanjutan berupa pengayaan melalui uji skala laboratorium, sehingga didapatkan nilai parameter kinetika konsorsium bakteri dalam menurunkan konsentrasi TPH 1%, serta aplikasi isolat tersebut pada reaktor bioremediasi.

BAHAN DAN METODA

Penelitian ini menggunakan sampel berupa media tanah hasil pengolahan bioremediasi dengan kisaran maksimum TPH sebesar 1% dari perusahaan *Kaltim Prima Coal* (KPC) di Sangatta, Kalimantan Timur, Indonesia. Proses bioremediasi ini dilakukan akibat dari tumpahan minyak ataupun pelumas pada gudang-gudang atau *workshop* perusahaan. Media tanah tersebut digunakan sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan bakteri.

Media yang digunakan dalam proses isolasi mikroorganisme adalah *Nutrient Agar* (NA) dan *Solution Base Salt* (SBS). SBS terdiri atas 0,135 gram KH_2PO_4 ; 0,45 gram K_2HPO_4 ; 0,135 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,06 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; yang dilarutkan di dalam 500 mililiter akuades. Media SBS kemudian diperkaya dengan ekstrak ragi sebanyak 0,135 gram sebagai sumber B dalam bentuk asam amino dan faktor pertumbuhan tambahan. pH medium ini harus diusahakan berkisar antara 6,8–7. Sedangkan Nutrien Agar (NA) yang berfungsi sebagai media dalam memperhitungkan jumlah populasi bakteri, mempunyai komposisi setiap liter nya atas 2,5 gram buffer K_2HPO_4 ; 2,5 gram glukosa; 3 gram *beef extract*; 5 gram pepton; 15 gram agar.

Isolasi bakteri petrofilik dilakukan dengan menggunakan sampel tanah hasil bioremediasi sebagai sumber isolat. Tanah sebesar 1 gram dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} secara aseptis dan selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-8} . Setiap tabung pengenceran dikocok dengan vortex agar partikel tanah dapat tercampur secara homogen dengan larutan aquidest steril. Tiga pengenceran terakhir



kemudian diambil 1 ml untuk dicampur dengan pada dua perlakuan medium SBS yang berbeda. Medium SBS pertama adalah medium yang telah diperkaya dengan ekstrak ragi, crude oil ($\pm 100 \mu\text{l}$), dan agar (takaran agar sebesar 15 mg/liter). Sedangkan medium SBS yang kedua adalah medium yang hanya diperkaya dengan ekstrak ragi, dan agar. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan bakteri spesifik yang kemungkinan dapat saja berbeda. Teknik pencampuran melalui metode agar tuang (Pour Plate).

Setelah itu bakteri yang diperkirakan koloni tunggal dipindahkan ke dalam medium Nutrient Agar (NA) yang telah memadat di dalam cawan petri. Fungsi dari medium NA untuk mengetahui tingkat homogenitas pertumbuhan bakteri hasil isolasi melalui metode pour plate. Proses inokulasi menggunakan metode *four quadrant streak* dan di inkubasi selama 1-3 hari pada suhu ruang.

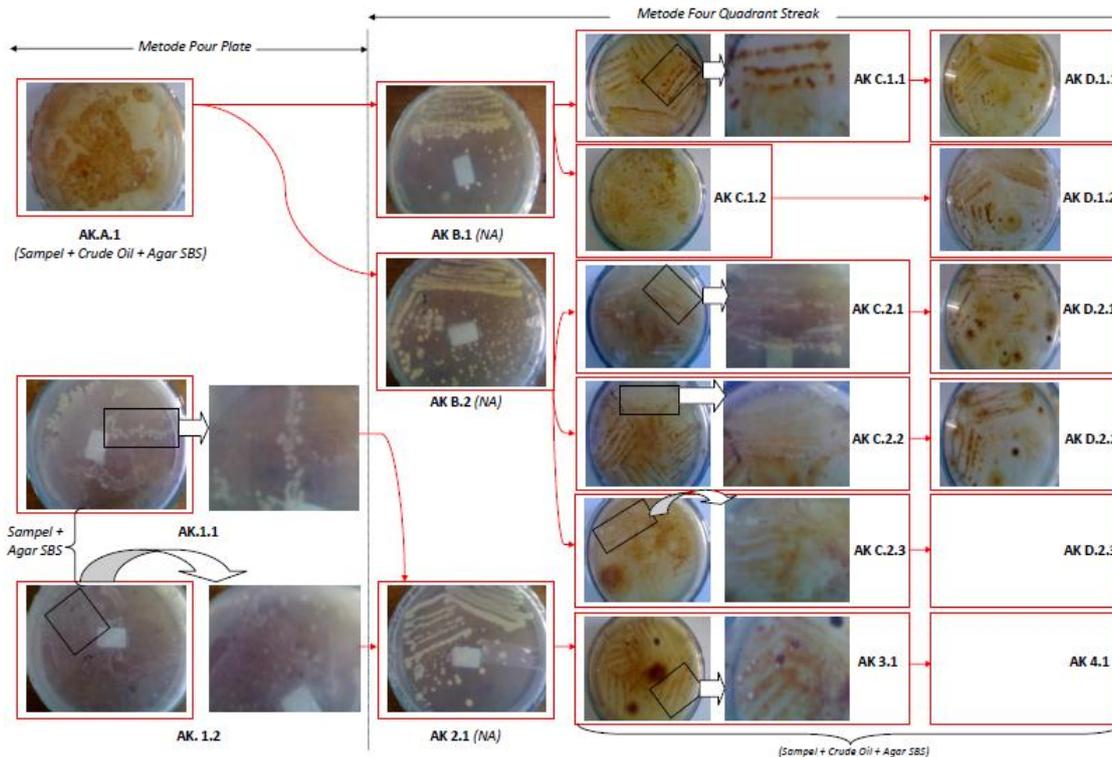
Untuk uji biokimia dalam proses identifikasi mikroorganisme digunakan beranekaragam media. Jenis uji media yang dianalisis adalah uji hidrolisa pati, hidrolisa kasein, fermentasi laktosa, fermentasi sukrosa, fermentasi glukosa, fermentasi mannitol, reduksi nitrat, katalase, indol, hidrogen sulfida, metil merah, Vogus-Proskauer, sitrat, urease dan hidrolisa gelatin. Komposisi yang digunakan sesuai dengan standar *Microbiology Laboratory Manual*, Cappucino & Sherman (2001).

Dalam proses pewarnaan gram dan endospora digunakan *reagent* kristal violet, safranin, lugol dan malakit hijau. Komposisi setiap *reagent* dalam 10 ml, untuk kristal violet terdiri atas 0,2 gr kristal violet; 2 ml ethyl alcohol 95%; dan 0,08 gr ammonium oksalat; untuk lugol terdiri atas 0,03 gr iodine; dan 0,07 gr potassium iodide; untuk safranin terdiri atas 0,025 safranin O; dan 1 ml etil alkohol 95%; sedangkan malakit hijau terdiri atas 0,5 gr malakit hijau dalam 10 ml akuades.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi pada medium padat dilakukan pertama kali melalui metode *pour plate* melalui proses pencampuran media cair *Solution Base Salt (SBS)*, *supernatant* tanah, dan akuades steril. Terdapat dua perlakuan (*lihat gambar 1*), perlakuan pertama dilakukan dengan mencampur *supernatant* tanah, crude oil hasil proses pencucian (*leaching*) tanah, dan media SBS, setelah diperkaya agar untuk proses pemadatan (*kode: AK A.1*). Sedangkan perlakuan kedua dilakukan dengan mencampur *supernatant* tanah, dan media SBS yang diperkaya dengan agar, tanpa pemberian crude oil (*AK 1.1 dan AK 1.2*). Hal ini dilakukan sebagai faktor perbandingan variasi pertumbuhan setiap jenis mikroorganisme yang dapat berkembang dengan *crude oil* sebagai substrat ataupun tanpa substrat. Hasil secara visual yang diperoleh setelah inkubasi selama 3 hari menunjukkan bahwa bakteri petrofilik dapat tumbuh berkembang melalui dua perlakuan tersebut. Melalui proses inokulasi ke dalam media *Nutrien Agar (NA)*, maka hampir sebagian besar bakteri menunjukkan bentuk bulat (*circular*) yang homogen (*AK B.1, AK B.2, dan AK 2.1*), walaupun belum diketahui keseragaman spesies melalui teknik pewarnaan gram.

Untuk menguji bakteri tersebut sehingga dapat mendegradasi TPH, maka melalui metode *four quadrant streak*, bakteri diinokulasi dari media NA ke dalam media SBS padat yang permukaannya telah diratakan oleh *crude oil* (*AK C.1-2, AK C.2.1-3, dan AK 3.1*). Hasil bakteri yang diperoleh pada saat pewarnaan gram, belum menunjukkan adanya bentuk koloni tunggal, sehingga diperlukan pemurnian kembali dengan menginokulasikan bakteri pada medium yang serupa.



Gambar 1. Proses Isolasi Bakteri Indigenus

Koloni tunggal adalah koloni yang timbul atau tumbuh dari satu sel atau beberapa kumpulan sel, bukan dari beberapa ratus sel. Kondisi ini didapatkan pada media dengan kode *AK D.1.1-2*, *AK D.2.1-3*, dan *AK 4.1*. Hal ini dibuktikan dengan adanya keseragaman bentuk dalam setiap media melalui pewarnaan gram. Bakteri yang dihasilkan secara keseluruhan merupakan bakteri gram negatif yang ditandai dengan morfologi bakteri berwarna merah. Umumnya bakteri berbentuk kecil dan bulat (*circular*), dengan jenis tipe permukaan adalah *convex*, permukaan halus mengkilap, dan tipe pinggiran sel adalah *undulate* dan *entire*. Untuk informasi lebih lengkap mengenai hasil pengamatan morfologi koloni melalui teknik pewarnaan, dan analisis visual pada berbagai macam media penumbuh, dapat dilihat pada *Tabel 1*. Dari hasil isolasi di atas diperkirakan terdapat dua isolat murni yang diperkirakan berbeda jenis spesiesnya, sehingga diberikan nama sementara yaitu *isolat A*, dan *isolat B*.

Ada beberapa ciri-ciri umum bakteri gram negatif menurut Black (2008), diantaranya dinding sel bakteri gram negatif lebih tipis namun strukturnya lebih kompleks dibandingkan bakteri gram positif. Dinding sel bakteri ini berlapis tiga (10-15 nm), yang terdiri dari komposisi kimiawi yang mengandung lipid tinggi, protein, berbagai macam polisakarida, peptidoglikan sebesar 10-20% dari berat kering, dan tidak terdapat asam tekoat. Ciri-ciri lain dari bakteri gram negatif adalah kurang rentan terhadap penisilin, pertumbuhan tidak dihambat oleh zat warna dasar, persyaratan nutrisi relatif sederhana, serta kurang resisten terhadap gangguan fisik.

Pengamatan aktivitas biokimia atau metabolisme dapat diketahui dari kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan dan menguraikan molekul yang kompleks seperti karbohidrat, lemak, protein dan asam nukleat. Sehingga hasil dari berbagai uji ini digunakan untuk perincian dan identifikasi mikroorganisme.

Ada 15 macam jenis uji biokimia yang dilakukan untuk mengidentifikasi kedua isolat hasil dari proses isolasi. Hasil dari proses ini dapat dilihat pada tabel 2, sehingga dapat dilakukan pengecekan melalui referensi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dalam Cowan (1975), untuk mengetahui jenis spesies terpilih. Dari hasil pengecekan pada referensi tersebut, didapat bahwa isolat A adalah *Pseudomonas putida* strain AK.A, sedangkan isolat B adalah *Pseudomonas diminuta* strain AK.

Tabel 1. Hasil Pewarnaan dan Pengamatan Morfologi

| Uji yang Dilakukan | Hasil Pengamatan | Gambar |
|---|--|--------|
| Isolat A (Kode: AK D.1.1; AK D.1.2; AK D.2.1; dan AK D.2.2) | | |
| A) Pewarnaan 1) Gram 2) Endospora | Gram negatif, berbentuk batang pendek. Tidak ada spora. | |
| B) Pengamatan Morfologi 1) Pertumbuhan pada media cair 2) Pertumbuhan pada agar miring 3) Koloni pada cawan petri <ul style="list-style-type: none"> • Ukuran • Bentuk • Elevasi • Permukaan • Pinggiran | Pertumbuhan menebal pada bagian atas tabung (aerob). <i>Effuse</i> : tipis, <i>yellowwish</i> . Kecil Bulat (<i>circular</i>) <i>Convex</i> Halus mengkilap <i>Entire</i> | |
| Konsorsium B (Kode: AK D.2.3; dan AK 4.1) | | |
| A) Pewarnaan 1) Gram 2) Endospora | Gram negatif, berbentuk batang pendek (<i>lebih pendek dari isolat A</i>). Tidak ada spora. | |
| B) Pengamatan Morfologi 1) Pertumbuhan pada media cair 2) Pertumbuhan pada agar miring 3) Koloni pada cawan petri <ul style="list-style-type: none"> • Ukuran • Bentuk • Elevasi • Permukaan • Pinggiran | Pertumbuhan menebal pada bagian atas tabung (<i>aerob</i>). <i>Effuse</i> : tipis, <i>yellowwish</i> . Titik Bulat (<i>circular</i>) <i>Convex</i> Halus mengkilap <i>Undulate</i> | |

Tabel 2. Hasil Uji Biokimia

| No. | Uji yang Dilakukan | Media | Indikator Perubahan Warna pada Media | Reaksi | |
|-----|-------------------------|----------------|---|----------|----------|
| | | | | Isolat A | Isolat B |
| 1. | <i>Hidrolisa Pati</i> | Agar Pati | (+) media tampak jernih/bening (-) media berwarna biru | - | - |
| 2. | <i>Hidrolisa Kasein</i> | Agar Susu | (+) zona berwarna bening di sekitar pertumbuhan bakteri (-) tidak terbentuk zona bening | - | + |
| No. | Uji yang Dilakukan | Media | Indikator Perubahan Warna pada Media | Reaksi | |
| | | | | Isolat A | Isolat B |
| 3. | <i>Indol</i> | Kaldu Tryptone | (+) ada cincin berwarna merah pada bagian atas suspensi bakteri (-) tidak ada cincin merah | - | - |
| 4. | <i>Reduksi Nitrat</i> | Kaldu Nitrat | (+) tidak ada perubahan warna (-) kaldu berwarna merah | + | - |



| | | | | | |
|---------------------|----------------------------|--|---|---|---|
| 5. | <i>Fermentasi Glukosa</i> | Kaldu Glukosa | (+) fenol merah pada media berubah menjadi kuning, dan terbentuk gas pada Tabung Durham (-) warna tetap merah, dan tidak terbentuk gas | + | - |
| 6. | <i>Fermentasi Laktosa</i> | Kaldu Laktosa | | - | - |
| 7. | <i>Fermentasi Sukrosa</i> | Kaldu Sukrosa | | - | - |
| 8. | <i>Fermentasi Mannitol</i> | Kaldu Mannitol | | + | - |
| 9. | <i>Sitrat</i> | Agar <i>Simmons Citrate</i> | (+) media berwarna biru keunguan (-) media tetap berwarna hijau | + | + |
| 10. | <i>Katalase</i> | NA Miring | (+) gelembung udara pada koloni (-) tidak ada gelembung udara | + | - |
| 11. | <i>Urease</i> | Kaldu Urea | (+) media berwarna merah muda gelap (-) media tetap berwarna merah | + | - |
| 12. | <i>H₂S</i> | Agar H ₂ S | (+) daerah tusukan inokulasi berwarna hitam (-) tidak ada perubahan warna | - | - |
| 13. | <i>Metil Merah</i> | Kaldu MR-VP | (+) ada cincin berwarna merah pada bagian atas suspensi bakteri (-) ada cincin berwarna kuning | - | - |
| 14. | <i>Vogus Proskauer</i> | | (+) ada cincin berwarna merah muda pada bagian atas suspensi bakteri (-) tidak ada cincin merah muda | - | - |
| 15. | <i>Hidrolisa Gelatin</i> | Nutrien Gelatin | (+) media berubah menjadi fasa semi-cair (gelatin) (-) media tetap dalam fasa cair | - | + |
| Nama Spesies | | Isolat A adalah <i>Pseudomonas putida</i> AK.A Isolat B adalah <i>Pseudomonas diminuta</i> AK.B | | | |

I

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat ditarik kesimpulan bahwa isolasi dan identifikasi bakteri indigenous dari tanah hasil proses pengolahan bioremediasi di bawah konsentrasi TPH 1% menghasilkan 2 jenis isolat yaitu *Pseudomonas putida* AK.A dan *Pseudomonas diminuta* AK.B. Saran dari hasil penelitian ini yaitu diperlukan adanya tahap penelitian lanjutan berupa uji parameter kinetika biodegradasi antara kedua isolat tersebut, serta aplikasi langsung pada reaktor bioremediasi baik dalam bentuk isolat tunggal atau kultur tercampur.

DAFTAR PUSTAKA

- Black J. G. (2008). *Microbiology*, John Wiley & Sons, New York.
 Cappucino J. G., Sherman N. (2001). *Microbiology Laboratory Manual*, Pearson Education Inc., San Francisco.
 Cowan, S. T. (1975). *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, Cambridge.