ISBN 978-602-95965-2-6

KETAHANAN HIDUP KONSORSIUM BAKTERI PETROFILIK PADA MEDIA PEMBAWA TANAH GAMBUT SELAMA MASA PENYIMPANAN

Oleh:
Munawar[1)] dan Elfita[2)]
[1)]Dosen Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya, Jl. Raya Indralaya-Prabumulih KM 32, Indralaya, 30662
[2)]Dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya, Jl. Raya Indralaya-Prabumulih KM 32, Indralaya, 30662

E-mail: mu_na_war@yahoo.com

Abtract

Survival of The Petrophylic Bacteria Consortium in Peat Soil Carrier Media During Storage Period. This research used Factorial design with Completely Randomized Design (CRD). The treatment involves two factors: (1) the initial pH of peat soil (G) with level: g_1: peat soil plus $CaCO_3$ up to pH 6.0; g2: peat soil plus $CaCO_3$ up to pH 6.5, and g3: peat soil plus $CaCO_3$ up to pH 7.0. (2) Storage duration (W) consists of three level namely w1: storage of one month; w2: two months of storage; and w3: three months of storage. Nine treatment combinations, each repeated twice. Each experimental unit added the inoculum in the form of a consortium of about 2.5% (v / w) consisting of *Azotobacter* sp; *Bacillus* sp; *Micrococcus* sp; and *Flavobacterium* sp in exponential phase conditions. The results showed that the peat soil carrier medium with the addition of CaCO3 to pH 6.5 can be stored for three months and can degradation of TPH up to 11.36% for one week.

Keywords: Survival, consortium, petrophylic, peat soil, carrier media

PENDAHULUAN

Penggunaan medium pembawa (*carrier materials*) sudah banyak dilakukan di bidang pertanian untuk mengemas pupuk hayati atau *biofertilizer* yang umumnya berupa bakteri penambat nitrogen dan bakteri pelarut fosfat (Boraste A, *dkk.*, 2009). Disamping itu medium pembawa juga sudah digunakan untuk bakteri pembentuk biofilm (Andersson *dkk.*, 2008), dan untuk biofiltrasi (Smet, *dkk.*, 1996). Salah satu tujuan penggunaan medium pembawa untuk mengemas agen biologis adalah memudahkan penggunaan di lapangan dan memperpanjang masa simpan agen biologis tersebut.

Medium pembawa banyak jenisnya, Andersson *dkk.*, (2008) membagi medium pembawa berdasarkan bahan dasarnya menjadi tiga yaitu Bahan Alam (Natural Materials), Bahan Terproses (Processed Materials), dan Bahan Plastik (Plastic Materials), sedangkan Bashan (1998) membagi medium pembawa berdasarkan bentuk atau fasenya menjadi empat yaitu (1) bentuk bubuk (Powders) biasanya mempunyai ukuran partikel berkisar 0,075 – 0,25 mm. (2) bentuk bubur (Slurries) biasanya dibuat dari bentuk bubuk yang disuspensikan ke dalam air sehingga

ISBN 978-602-95965-2-6

berbentuk seperti bubur. (3) bentuk butiran (Granulars) biasanya mempunyai ukuran butiran berkisar 0,35 – 1,18 mm. (4) bentuk cair (Liquids) biasanya menggunakan media air yang diperkaya dengan mineral.

Secara umum bahan yang digunakan untuk pembuatan medium pembawa harus memenuhi persyaratan tetentu. Menurut Somasegaran dan Hoben, (1994) dalam Muraleedharan, *dkk.*, (2010) persyaratan bahan untuk pembuatan medium pembawa adalah (1) tidak bersifat toksik bagi agen biologis (strain mikroba yang digunakan), (2) mempunyai kapasitas penyerapan air yang baik untuk menjaga kelembaban, (3) mudah dalam proses penggunaannya dan tidak membentuk gumpalan, (4) mudah dalam proses sterilisasi, (5) mudah diperoleh karena ketersediannya cukup, (6) murah, (7) mempunyai kemampuan mengikat benih yang baik, khususnya untuk penerapan dalam bidang pertanian, (8) mempunyai kemampuan untuk menjaga kestabilan pH, dapat berfungsi sebagai penyangga pH (9) tidak bersifat toksik bagi tumbuhan, hewan dan makluk hidup lainnya.

Beberapa penelitian terdahulu mengenai penggunaan medium pembawa telah banyak dilakukan. Andersson *dkk.*, (2008) menggunakan empat macam media pembawa yaitu LECA (*Light Expanded Clay Aggregates*), Batu Apung (*Pumice*), Kaldnes K1 (bahan plastik HDPE Ø 9,1 mm), dan SerpihanKayu (*wood chips*) untuk bakteri pembentuk biofilm. Smet, *dkk.*, (1996) menggunakan kulit kayu dan kompos sebagai media pembawa inokulum untuk proses biofiltrasi metil sulfida dan hasilnya mampu menurunkan metil sulfida dengan kemampuannya meregulasi pH. Kemampuan media pembawa dalam meregulasi pH sangat diperlukan untuk proses biofiltrasi jangka panjang. Arista (2010) menggunakan media pembawa campuran tanah gambut dan akar pakis haji untuk inokulum bakteri *Bacillus* sp dan *Azotobacter chroococcum*, hasilnya kedua bakteri tersebut dalam media pembawa masih bertahan hidup setelah disimpan selama 60 hari. Bahkan pada masa simpan 15 hari menunjukkan jumlah total bakteri yang meningkat dari jumlah awal. Bazilah dkk., (2011) menggunakan *vermicululite* (bahan semacam media tanam) dan debu yang terbuat dari serat sebagai medium pembawa strain bakteri *Burkholderia* sp (UPMB3) dan *Pseudomonas* sp (UPMP3). Hasilnya menunjukkan bahwa setelah disimpan pada suhu 10 dan 20 ^{o}C selama enam bulan populasinya masih stabil, jumlah sel yang masih hidup mencapai 86%. Hrenovic *dkk.*, (2005) menggunakan tiga media pembawa yaitu zeolit alam, zeolit alam yang ditambah magnesium, dan pasir kuarsa sebagai media pembawa bakteri pengumpul fosfat *Acinetobacter calcoaceticus*. Hasilnya bahwa medium pembawa zeolit alam yang ditambah magnesium dengan ukuran partikel < 0,125 mm menunjukkan kecepatan loading sel terimobilisasi tertinggi (68,61±1,1 x 10^8 cfu/gram).

Namun demikian penggunaan medium pembawa untuk agen biologis pada proses bioremediasi lingkungan yang tercemar hidrokarbon petroleum atau minyak bumi masih jarang. Oleh karena itu dalam tulisan ini dijelaskan hasil penelitian penggunaan medium pembawa tanah gambut untuk bakteri petrofilik (pendegradasi petroleum) selama masa simpan dan pengujian kenerjanya setelah dilakukan penyimpanan selama tiga bulan.

ISBN 978-602-95965-2-6

BAHAN DAN METODE

Penentuan kecepatan pertumbuhan

Setiap isolat bakteri anggota konsorsium ditumbuhkan dalam medium Zobell Cair yang ditambah minyak mentah, kultur diinkubasi pada suhu ruang dan diamati jumlah selnya setiap 24 jam dengan cara mengukur OD kultur tersebut menggunakan spektrofotometer spectronic 20D pada panjang gelombang 512 nm. Selanjutnya data OD dibuat grafik dengan data waktu pengamatan, sehingga terbentuk kurva pertumbuhan setiap isolat bakteri anggota konsorsium. Berdasarkan kurva pertumbuhan masing-masing ditentukan fase pertumbuhan logaritma dan kecepatan tertinggi (kecepatan pada fase eksponensial) sebagai dasar pembuatan konsorsium. Penentuan kecepatan pertumbuhan menggunakan persamaan 1.

$$\mu_{max} = \frac{2{,}3\,(\mathbf{Log\ Nt} - \mathbf{Log\ No})}{t - to} \quad \text{.....(1)}$$

dimana: N_t : jumlah bakteri akhir (setelah waktu tertentu

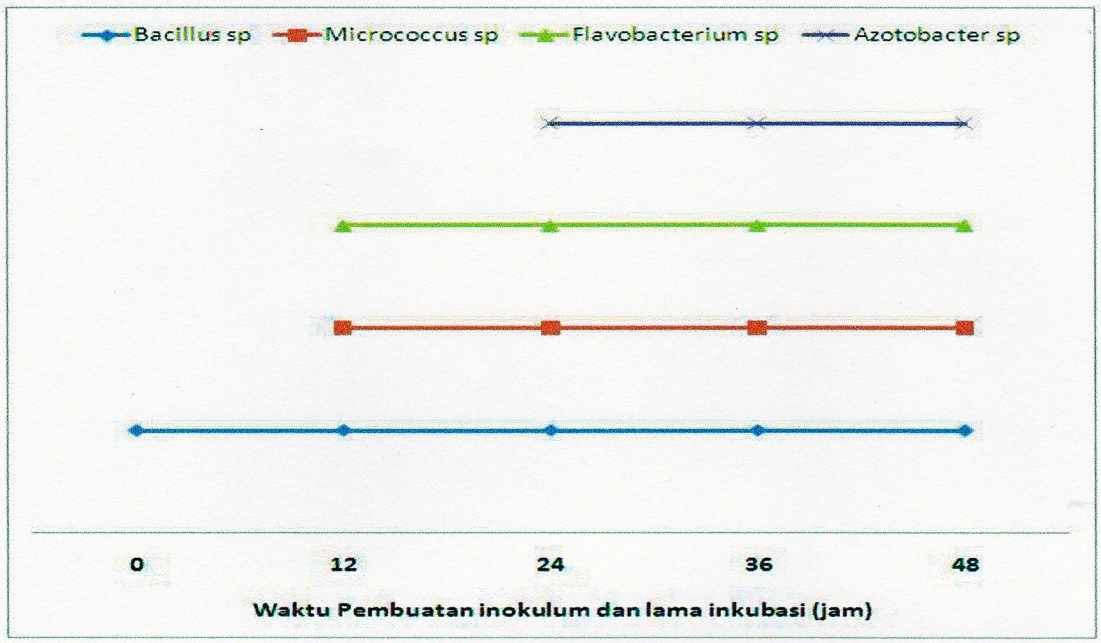
N_0 : jumlah bakteri awal

t : Waktu akhir (setelah waktu tertentu)

t_0 : Waktu awal

Pembuatan Konsorsium

ISBN 978-602-95965-2-6



Gambar 1. Grafik waktu mulai pembuatan inokulum dan lama inkubasi masing-masing bakteri yang akan dibuat konsorsium

Berdasarkan waktu yang diperlukan untuk mencapai μ_{max} pada masing-masing kurva pertumbuhan bakteri anggota konsorsium, maka pembuatan konsorsium dilakukan dengan membuat kultur tunggal *Bacillus* sp terlebih dahulu, setelah 12 jam kemudian dibuat dua kultur tunggal masing-masing *Micrococcus* sp dan *Flavobacterium* sp, setelah 12 jam umur kultur yang kedua, selanjutnya dibuat kultur tunggal bakteri *Azotobacter* sp dan diinkubasi selama 24 jam, setelah 24 jam maka semua kultur tunggal sudah mencapai fase eksponensial dan mencapai μ_{max} yang merupakan kondisi siap dibuat kultur campur menjadi konsorsium (Gambar 1). Sebelum konsorsium digunakan diinkubasi terlebih dahulu selama 2x24 jam supaya konsorsium menjadi stabil.

Formulasi media pembawa tanah gambut dan pengujian masa simpan

Tanah gambut dikeringkan, digiling, dan disaring menggunakan saringan dengan ukuran 50-100 mesh. Karakteristik tanah gambut yang digunakan seperti pada Tabel 1. Selanjutnya dilakukan percobaan dengan Rancangan Acak Lengkap berpola Faktorial, meliputi dua faktor yaitu Faktor pertama pH awal tanah gambut (G) dengan taraf: g_1: tanah gambut ditambah $CaCO_3$ hingga pH 6,0; g_2: tanah gambut ditambah $CaCO_3$ hingga pH 6,5; dan g_3: tanah gambut ditambah $CaCO_3$ hingga pH 7,0. Faktor kedua lama waktu penyimpanan (W) terdiri atas tiga taraf yaitu w_1: penyimpanan satu bulan; w_2: penyimpanan dua bulan; dan w_3: penyimpanan tiga bulan. Kombinasi perlakuan berjumlah sembilan (3x3) yang masing-masing diulang tiga kali. Masing-masing perlakuan ditambah inokulum berupa konsorsium sebanyak 2,5% (v/b) yang terdiri atas *Azotobacter* sp*; Bacillus* sp*; Micrococcus* sp*; dan Flavobacterium* sp. Variabel yang diukur meliputi viabilitas konsorsium yang dihitung menggunakan metode Total Plate Count (TPC).

ISBN 978-602-95965-2-6

Tabel 1. Karakteristik fisika dan kimia tanah gambut yang digunakan sebagai media pembawa (*carrier materials*)

No	Karaktersitik Tanah	Satuan	Hasil analisis
1	**Sifat fisika tanah**		
	Tekstur tanah:		
	• Pasir	%	24
	• Debu	%	31
	• Liat	%	45
	Bobot isi	g/cm^3	1,14
2	**Sifat kimia tanah**		
	pH	unit	5,4
	Kelambaban	%	76
	$C_{organik}$	%	1,21
	N_{total}	%	0,14
	$P_{Bray\ I}$	ppm	3,56
	Ca	ppm	75,22
	Mg	ppm	2,20
	K	ppm	8,21
	Mn	ppm	0,56
	Fe	ppm	0,50
	Cl	ppm	15,50
	Kejenuhan Al	%	56,87

Penghitungan jumlah sel bakteri konsorsium dilakukan sebagai berikut: satu gram sampel tanah ditambah 9 ml 0,85% NaCl dan dihomogenkan secara mekanik selama dua menit, selanjutnya dilakukan seri pengenceran diambil 1 ml dimasukkan ke cawan petri steril dan di tambah medium agar dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2x24 jam. Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah koloni berdasarkan Standard Plate Count (modifikasi: Mariano et.al., 2007).

ISBN 978-602-95965-2-6

Pengujian kinerja konsorsium yang sudah dikemas dalam media pembawa tanah gambut setelah disimpan tiga bulan

Konsorsium yang digunakan adalah konsorsium bakteri petrofilik dalam media pembawa tanah gambut dengan pH 6,5 setelah disimpan selama tiga bulan. Pengujian ini dilakukan pada tanah terkontaminasi minyak bumi yang sudah dipreparasi yaitu dengan mengatur C:N:P ratio dibuat 100:5:1 dan ditambah sekam padi sebanyak 10% (v/v) sebagai *bulking agent*. Selanjutnya dibuat tiga mesokosmos menggunakan bak dari kaca dengan ukuran 60 (P) x 40 (L) x 50 (T) sebanyak tiga unit. Unit pertama diisi dengan tanah terkontaminasi yang sudah dipreparasi dalam kondisi tidak disteril, unit kedua diisi tanah terkontaminasi yang sudah dipreparasi dalam kondisi disteril dan ditambah konsorsium, unit ketiga diisi tanah yang sama dalam kondisi disteril saja. Masing-masing unit mesokosmos diinkubasi pada suhu ruang selama satu minggu, pada awal inkubasi T_0 dan setelah satu minggu T_1 dilakukan pengukuran jumlah total bakteri dan konsentrasi Total Petroleum Hidrokarbon (TPH) sebagai indikator kinerja konsorsium dalam proses bioremediasi tanah terkontaminasi minyak bumi.

Penghitungan Jumlah Bakteri menurut modifikasi: Mariano et.al., 2007 yang telah dijelaskan sebelumnya. Pengukuran TPH dilakukan sebagai berikut: sampel diekstraksi menggunakan pelarut n-heksan, dengan rasio sampel:n-heksan adalah 1:1. Selanjutnya dilakukan homogenisasi menggunakan *vortex mixer* dengan kecepatan 10 rpm. Selanjutnya dilakukan pemisahan TPH dengan cara mensentrifugasi pada 3.500 x g selama 10 menit. Supernatan pada bagian atas yang terdiri atas pelarut n-heksan dan THP diambil dan dimasukkan ke dalam botol yang sudah diketahui beratnya. Botol yang berisi supernatan tersebut diuapkan pelarutnya pada suhu 70 °C. Konsentrasi TPH ditentukan dengan persamaan 2 (Parnadi, 2007).

$$\text{Konsentrasi TPH} = \frac{\text{berat botol berisi TPH} - \text{berat botol}}{\text{berat sampel}} \times 100 \quad \text{.....(2)}$$

Selanjutnya dilakukan penghitungan penurunan konsentrasi TPH dengan persamaan 3 (modofikasi: Rene, et.al., 2007).

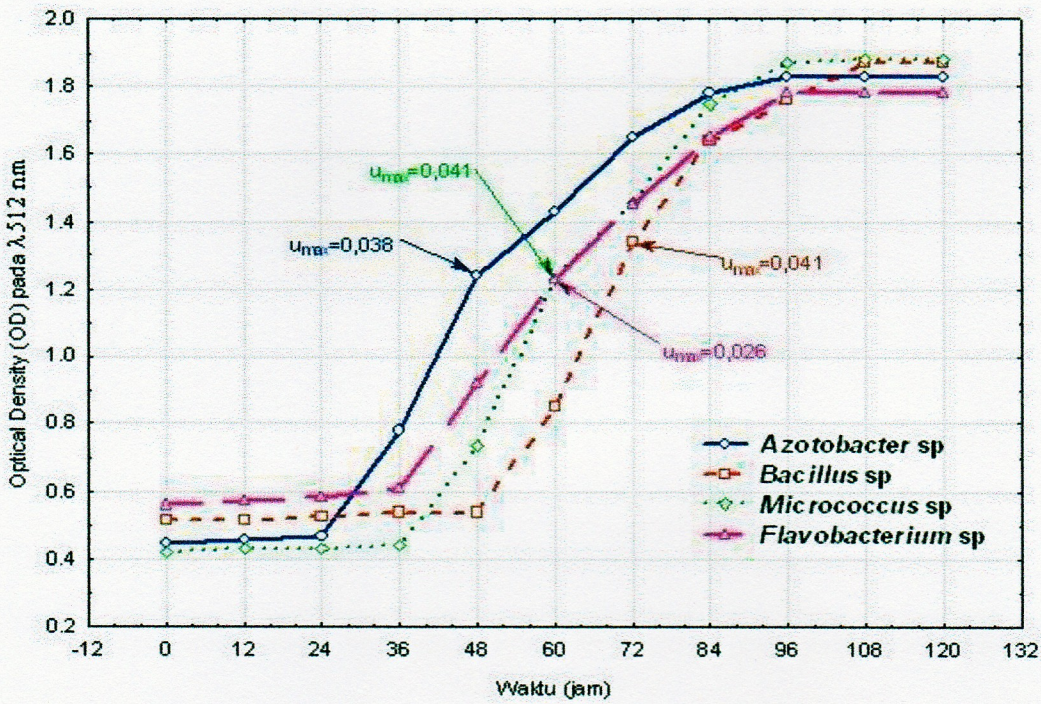
$$\text{Penurunan TPH (\%)} = \frac{(\text{Konsentrasi TPH awal}) - (\text{Konsentrasi TPH akhir})}{(\text{Konsentrasi TPH awal})} \times 100 \quad \text{.....(3)}$$

ISBN 978-602-95965-2-6

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan kinetika pertumbuhan

Berdasarkan kurva pertumbuhan (Gambar 2.) masing-masing isolat bakteri yang akan dibuat konsorsium dapat diketahui bahwa bakteri *Azotobacter* sp paling cepat memasuki fase eksponensial yaitu pada jam ke-24, disusul bakteri *Micrococcus* sp dan *Flavobacterium* sp keduanya mulai fase eksponensial pada jam ke-36, sedangkan bakteri *Bacillus* sp memulai fase eksponensial pada jam ke-48. Disamping itu rata-rata kecepatan maksimum (μ_{max}) masing-masing isolat yang akan dibuat konsorsium diketahui yaitu μ_{max} bakteri *Azotobacter* sp sebesar 0,038 dicapai pada jam ke 48, bakteri *Micrococcus* sp mempunyai μ_{max} sebesar 0,041 dan *Flavobacterium* sp menunjukkan μ_{max} sebesar 0,026 keduanya dicapai pada jam ke 60, sedangkan bakteri *Bacillus* sp menunjukkan μ_{max} sebesar 0,041 yang dicapai pada jam ke 72. Setelah diketahui waktu yang diperlukan oleh masing-masing bakteri untuk mencapai kecepatan tertinggi (μ_{max}) selanjutnya dilakukan pembuatan konsorsium.



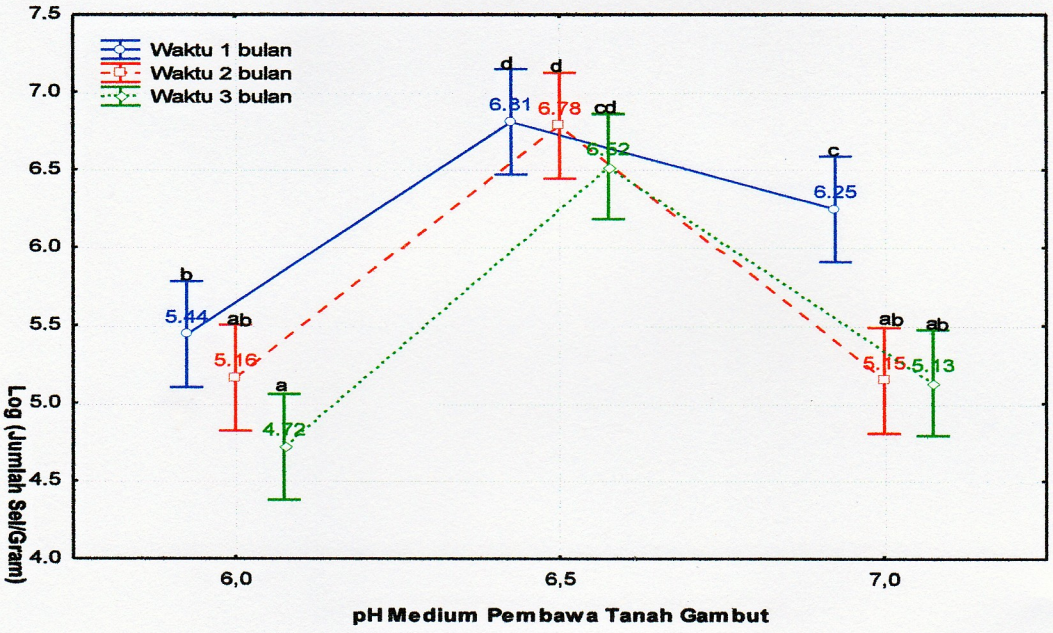
Gamba
r 2. Grafik kurva pertumbuhan masing-masing bakteri yang akan dibuat konsorsium

ISBN 978-602-95965-2-6

Formulasi media pembawa tanah gambut dan pengujian masa simpan

Hasil anaisis ragam (ansira) menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara pH media pembawa tanah gambut (G) dan lama waktu penyimpanan (W), selanjutnya hasil uji lanjut Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) pada interaksi tersebut menunjukkan bahwa populasi bakteri pada medium Pembawa Tanah Gambut pH 6,5 setelah disimpan tiga bulan masing cukup stabil, hal ini ditunjukkan oleh Gambar 3., yaitu pada pH medium pembawa tanah gambut 6,5 setelah disimpan satu bulan (g_2w_1) menunjukkan populasi bakteri 6,4 x 10^6 sel/gram, pH medium pembawa tanah gambut 6,5 setelah disimpan dua bulan (g_2w_2) menunjukkan populasi bakteri 6,1 x 10^6 sel/gram, pH medium pembawa tanah gambut 6,5 setelah disimpan tiga bulan (g_2w_3) menunjukkan populasi bakteri 3,3 x 10^6 sel/gram, secara umum pada media pembawa tanah gambut pH 6,5 yang disimpan baik satu, dua, dan tiga bulan menunjukkan populasi bakteri yang tidak signifikan dan populasi bakterinya masih pada kisaran 10^6 sel/gram. Hasil ini menunjukkan bahwa konsorsium bakteri petrofilik dalam medium pembawa tanah gambut dengan pH 6,5 minimal masih dapat disimpan selama enam bulan dengan populasi sel bakteri masih berasda pada 10^6 sel/gram.

Berdasarkan hasil tersebut, maka medium pembawa tanah gambut dengan pH 6,5 masih bertahan setelah disimpan selama tiga bulan. Konsorsium dalam medium pembawa tersebut dilakukan pengujian kinerja pada proses bioremediasi tanah terkontaminasi minyak bumi skala mesokosmos.



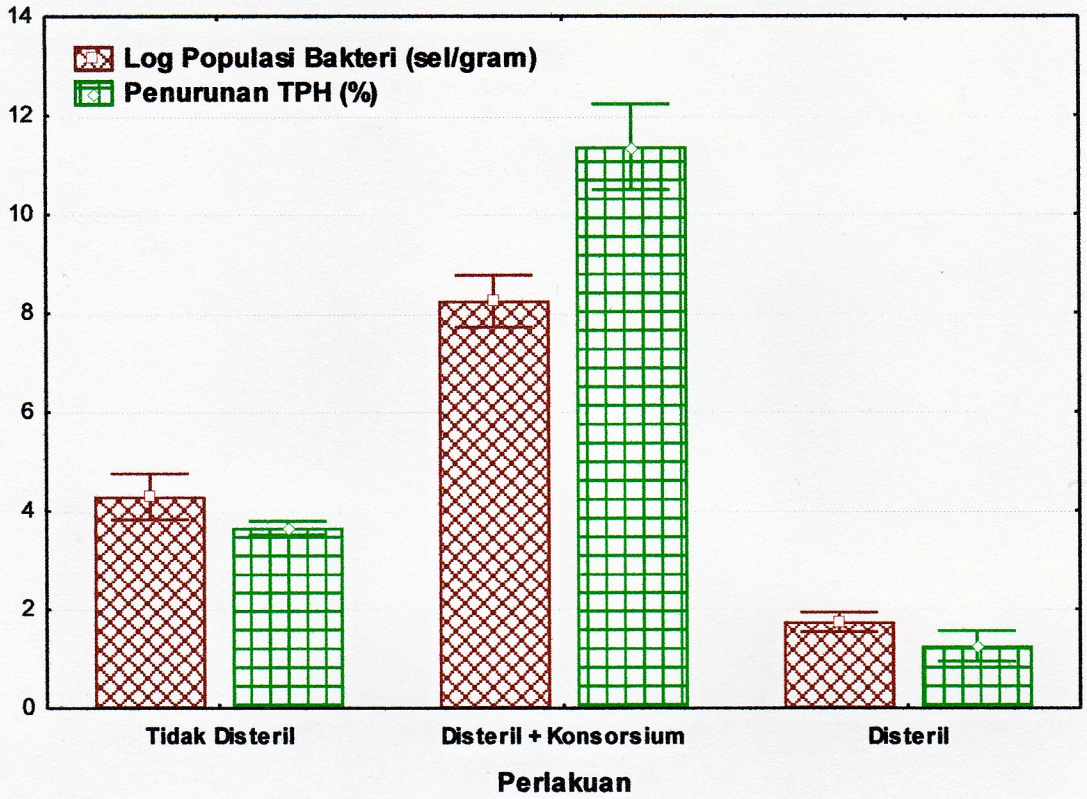
Gambar 3. Grafik interaksi pH medium pembawa tanah gambut dan Log Jumlah bakteri pada masing-masing kombinasi perlakuan, nilai rataan pada grafik yang diikuti huruf kecil sama menunjukkan tidak signifikan pada $\alpha < 0,05$.

ISBN 978-602-95965-2-6

Pengujian kinerja konsorsium

Konsorsium yang diuji kinerjanya lebih lanjut adalah konsorsium dalam media tanah gambut dengan pH 6,5 setelah disimpan selama tiga bulan. Hasil pengujian kinerja menunjukkan bahwa pada mesokosmos yang berisi tanah terkontaminasi disteril dan ditambah konsorsium dan diinkubasi selama satu minggu mempunyai nilai penurunan TPH dan populasi bakteri paling tinggi dibandingkan dengan mesokosmos yang berisi tanah terkontaminasi yang disteril maupun yang tidak disteril yang keduanya tidak ditambah konsorsium (Gambar 4.). Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsorsium yang digunakan mampu melakukan biodegradasi hidrokarbon petrolum dengan baik, dibandingkan dengan proses biodegradasi yang berlangsung secara alamiah (pada mesokosmos yang diisi tanah terkontaminasi tidak disteril). Mesokosmos yang berisi tanah terkontaminasi disteril sebagai kontrol untuk menggambarkan proses biodegradasi hidrokarbon petroleum tanpa adanya mikroba dari tanah.

Pada Gambar 4., ditunjukkan bahwa perlakuan mesokosmos yang berisi tanah terkontaminasi minyak bumi disteril ditambah konsorsium, populasi bakterinya mencapai 1,7 x 10^8 sel/gram dan penurunan TPH hingga 11,36 % selama satu minggu, merupakan populasi bakteri dan penurunan TPH tertinggi dibandingkan dengan dua perlakuan yang lain yaitu mesokosmos yang berisi tanah terkontaminasi tidak disteril saja dan mesokosmos yang berisi tanah terkontaminasi disteril saja. Gambar 4., juga menunjukkan bahwa pada setiap perlakuan populasi bakteri dan penurunan TPH berkorelasi positif, artinya semakin tinggi populasi bakteri maka penurunan TPH juga semakin tinggi. Fenomena ini menunjukkan bahwa penurunan TPH yang terjadi karena terjadi biodegradasi hidrokarbon petroleum oleh bakteri.



Gambar 4. Grafik hubungan antara perlakuan dengan populasi bakteri dan penurunan TPH setelah proses bioremediasi tanah terkontaminasi minyak bumi skala mesokosmos masa inkubasi satu minggu.

KESIMPULAN

Medium pembawa tanah gambut dengan penambahan $CaCO_3$ hingga pH 6,5 dapat disimpan selama tiga bulan dan mampu menurunkan TPH sebesar 11,36% selama satu minggu pada proses bioremediasi tanah terkontaminasi minyak bumi skala mesokosmos.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M DIKTI yang telah membiayai penelitian ini melalui Lembaga Panelitian Universitas Sriwijaya dalam penelitian Hibah Bersaing 2011.

DAFTAR PUSTAKA

Andersson, S., M. Nilsson, G. Dalhammar, and G. K. Rajarao. 2008. Assessment of Carrier Materials for Biofilm Formation and Denitrification. *Vatten* 64: 201-207.

Arista, J. 2010. Viabilitas *Bacillus* sp DUCC-BR-K1.3 dan *Azotobacter chroococcum* pada Bahan Pembawa Campuran Gambut dan Akar Pakis Haji (*Cycas rumphii* Miq.) Selama Penyimpanan 60 Hari. Skripsi. Universitas Diponegoro. Semarang

Bashan, Y., 1998. Inoculants of Plant Growth-Promoting Bacteria for use in Agriculture. *Biotechnol. Advandces* 16(4): 729-770.

Bazilah, A.B.I., M. Sariah, M.A.Z. Abidin, and S. Yasmeen. 2011. Effect of Carrier and Temperature on the Viability of Burkholdera sp (UPMB3) and Pseudomonas sp (UPMP3) during Storage. *Int. J. of Agric. and Biol* 13(2): 198-202.

Boraste A., Vamsi K.K., Jhadav A., Khairnar Y., Gupta N., Trivedi S., Patil P., Gupta G., Gupta M., Mujapara A.K., Joshi B. 2009. Biofertilizers: A novel tool for agriculture. *Int. J. Microbiol. Research.* 1(2): 23-31

Hrenovic, J., D. Tibijas, Y.Orhan, and H. Buyukgungor. 2005. Immobilisation of Acinetobacter calcoaceticus using natural carriers. Water S A 13(2):261-266.

Mariano, A.P. A.P.A.G. Kataoka, D.F. Angelis, and D.M. Bonotto. 2007. Laboratory Study on The Bioremediation of Diesel Oil Contaminated Soil from a Petrol Station. *Brazilian J. Microbiology.* 38: 346-353.

Muraleedharan, H., Seshadri, and K. Perumal. 2010. Biofertilizer Phosphobacteria. Shri AMM MurugappaChettiar Research Centre. Chennai.

Parnadi, P.S., E. Kardena, E. Ratnaningsih, dan Wisnuprapto. 2007. Improving the Effectiveness of Crude-Oil Hydrocarbon Biodegradation Employing. *Microiol. Indonesia.* 1(1): 5-10.

Rene, E.R., M.S. Jo, S.H. Kim, and H.S. Park. 2007. Statistical Analysis of Main and Interaction effects during the removal of BTEX Mixtures in Batch Condition, Using Wastewater Treatment Plant Sludge Microbes. Int. *J. Environ. Sci. Tech.* 4(2): 177-182

Smet, E., G. Chasaya, H. V. Langenhove, and W. Verstraete. 1996. The Effect of Inoculation and type carrier material used on the biofiltration of methyl sulphides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45(1-2):293-298.