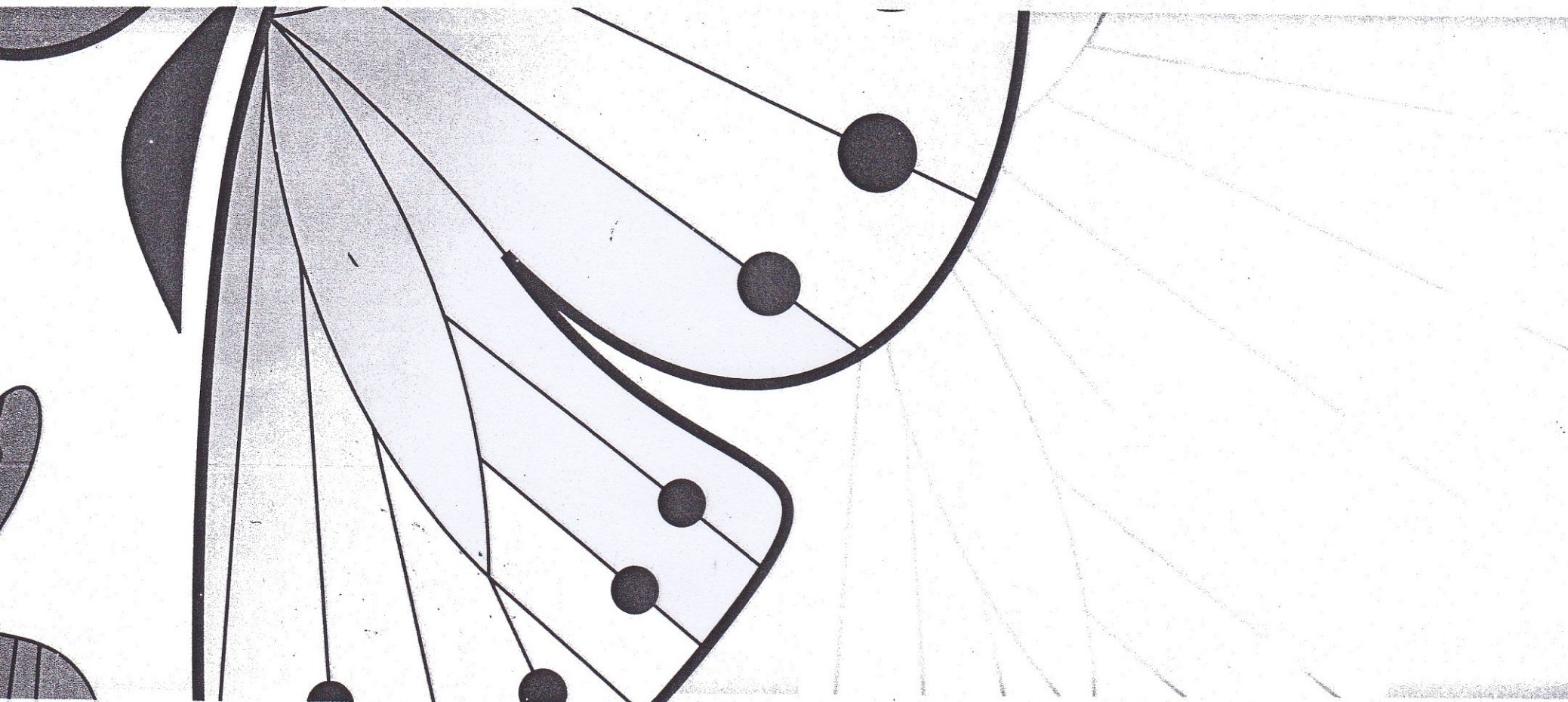




Peran **Biosistematika** dalam Pengelolaan Sumberdaya Hayati Indonesia

Editor :

Agus Nuryanto, Iman Budisantoso, Erwin R Ardli, Romanus E Prabowo



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL BIOLOGI



Fakultas Biologi
Universitas Jenderal Soedirman
Purwokerto 12 DESEMBER 2009

EKSPOLARI BIODIVERSITAS BAKTERI DARI LINGKUNGAN TERKONTAMINASI HIDROKARBON MINYAK BUMI

Munawar¹⁾ dan Elfita²⁾

¹⁾Dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya; ²⁾Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya
e-mail: mu_na_war@yahoo.com

Abstract

Isolation and screening three of bacteria group that is petrophilic bacteria, fixing nitrogen bacteria and solubilizing phosphat bacteria from hydrocarbon petroleum contaminated soil has been done. Sample of hydrocarbon petroleum contaminated soil was collected from several different area oil industry at region Sumatera. Soil extract medium from same soil sample of sources bacteria was used isolation process. Bacteria isolates were selected base on capability of petrophilic, nitrogen fixed, and phosphat solubilized. Petrophilic characteristics were selected used medium added oil recovery as sole carbon sources, selected of capabilities nitrogen fixed was used *Nitrogen Deficient Semisolid Malat* medium, and than capabilities phosphat solubilized was used *Picovskaya's* medium. Isolation result showed 44 isolates and after selected resulted only 11 isolates consisted of nine isolates have the character of *Bacillus* Gram negative, and other two isolates *Coccus* Gram positive. The all eleven isolates selected showed petrophilic characteristics, six isolates showed nitrogen fixing, and nine isolates have capabilities of solubilizing phosphate. Between eleven bacteria isolates there is four isolates the bacterium has all characters that is petrophilic, nitrogen fixed, phosphat solubilized. Each sequentially isolate is A3 and A4 resulted from Abab area, other isolates that is T9 and L3 sequentially from Talangjimar dan Limau area.

Key words: Isolation, characterization, petrophilic, nitrogen fixing, phosphat solubilizing

Pendahuluan

Limbah *sludge* minyak merupakan salah satu jenis limbah dari kegiatan eksplorasi-produksi (industri minyak hulu) dan pengilangan minyak (industri minyak hilir) yang banyak mengandung hidrokarbon petroleum. Limbah ini dapat berasal dari berbagai sumber pada industri perminyakan seperti pembersihan tangki penampung minyak mentah, perangkat pemisah minyak-air, dan residu proses pengilangan. Limbah, tersebut dikategorikan sebagai limbah Bahan Beracun dan Berbahaya (B3) oleh Kementrian Lingkungan Hidup (KLH) dengan Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No. 128 Tahun 2003.

Sebagai B3, limbah hidrokarbon petroleum harus segera dilakukan pengelolaan, supaya tidak mencemari lingkungan sekitar industri perminyakan. Lingkungan yang telah tercemar oleh hidrokarbon petroleum juga harus dilakukan remediasi. Salah satu upaya remediasi lingkungan yang telah tercemar dengan melakukan bioremediasi. Bioremediasi yang sudah dilakukan masih mengkombinasikan bioaugmentasi (menambahkan inokulum mikroba) dan biostimulasi (menambahkan senyawa kimia sebagai sumber nutrisi (khususnya N dan P). Penerapan kombinasi ini cukup efektif untuk menurunkan konsentrasi *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) dalam lingkungan terkontaminasi hidrokarbon petroleum, tetapi biaya operasional masih cukup besar karena harus menambahkan senyawa kimia seperti pupuk N dan P. Menurut Wulandari (2001) penambahan pupuk P tidak efektif, karena P yang ditambahkan terikat oleh ion Al, Fe, dan Ca sehingga tidak dapat digunakan oleh bakteri petrofilik.

Sumber N dan P yang diperlukan oleh bakteri petrofilik, selain dapat dipenuhi dengan menambahkan senyawa kimia seperti pupuk N dan P, secara teoritik dapat juga dipenuhi oleh mikroba lain seperti bakteri penambat N yang dapat mensuplai kebutuhan N dan bakteri pelarut fosfat dapat mengefektifkan penggunaan P bagi bakteri petrofilik. Tetapi sampai saat ini belum pernah dibuat konsorsium yang merupakan interaksi sinergis dari tiga kelompok bakteri tersebut (bakteri petrofilik, penambat N, dan pelarut P).

Berdasarkan informasi tersebut perlu dilakukan pengkajian awal tentang bakteri penambat N dan bakteri pelarut P yang toleran atau bahkan yang bersifat petrofilik. Pengkajian awal dilakukan dengan melakukan eksplorasi biodiversitas bakteri dari lingkungan yang terkontaminasi hidrokarbon petroleum dengan cara melakukan isolasi dan karakterisasi bakteri penambat N dan bakteri pelarut P yang berasal dari area terkontaminasi hidrokarbon petroleum tersebut. Oleh karena itu perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri penambat N dan bakteri pelarut P yang berasal dari lingkungan (tanah) terkontaminasi hidrokarbon petroleum.

Adapun tujuan dalam penelitian ini adalah mengkaji biodiversitas bakteri terutama bakteri yang bersifat petrofilik, bakteri penambat nitrogen, dan bakteri pelarut fosfat.

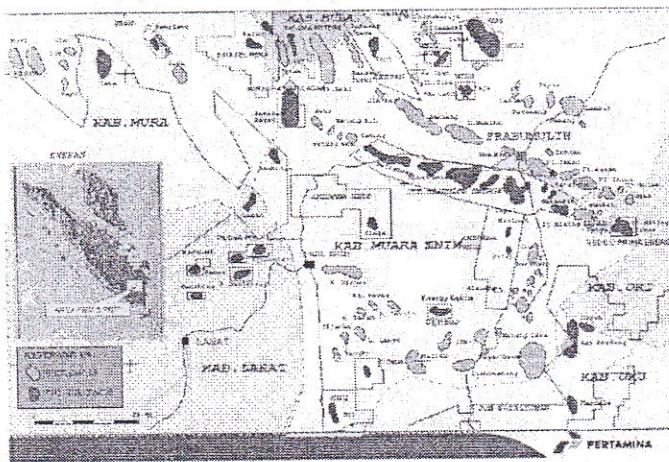
Cara Kerja

Bahan penelitian berupa sampel tanah terkontaminasi hidrokarbon petroleum yang berada di area industri minyak bumi di Sumatera Selatan. Bahan kimia yang digunakan untuk isolasi, seleksi bakteri petrofilik, bakteri penambat N dan bakteri pelarut fosfat berbagai media dan reagen adalah medium *Soil Extract*, medium *Pikovskaya's* cair dan padat, medium *Nitrogen Deficient Semisolid* (NDS), medium *Plate Count Agar* (PCA), medium *Zobell* cair dan padat, reagen pewarna Gram, pewarna spora.

Alat yang digunakan adalah peralatan gelas dan instrumen pendukungnya yang biasa digunakan di Laboratorium Mikrobiologi, alat berat seperti *Colony counter*, oven, inkubator, *orbital shaker*, *UV sterilizer*, mikroskop, pH meter, *water bath*, *hot plate stirrer magnetic*, alat sentrifugasi, dan autoklaf.

Sampel yang akan diambil berupa tanah terkontaminasi minyak yang sudah dilakukan *recovery* sehingga kandungan minyak atau TPH $\leq 15\%$, di area industri perminyakan di Sumatera Selatan. Lokasi pengambilan sampel terdiri atas lima lokasi yaitu Benakat, Abab, Raja, Talang Jimar, dan Limau, semua lokasi tersebut berada di area industri minyak bumi yang ada di Sumatera Selatan. Denah lokasi pengambilan sampel tertera pada gambar 1.

Pengambilan sampel dilakukan menggunakan metode *multiple sampling*, dengan menentukan lima stasiun pengambilan sampel dengan metode *cluster random sampling*. Selanjutnya masing-masing stasiun yang terpilih ditentukan tiga sub stasiun sebagai titik sampling dengan metode *cluster random sampling*. Masing-masing titik sampling diambil tanah terkontaminasi sebanyak 0,5 kg sampai kedalaman 30 cm menggunakan alat sampling *Auger* dan dikomposit menjadi sampel yang mewakili stasiun (Modifikasi Steel dan Torrie, 1981; Modifikasi: Greene dkk., 2000; Chokshi, 2003).



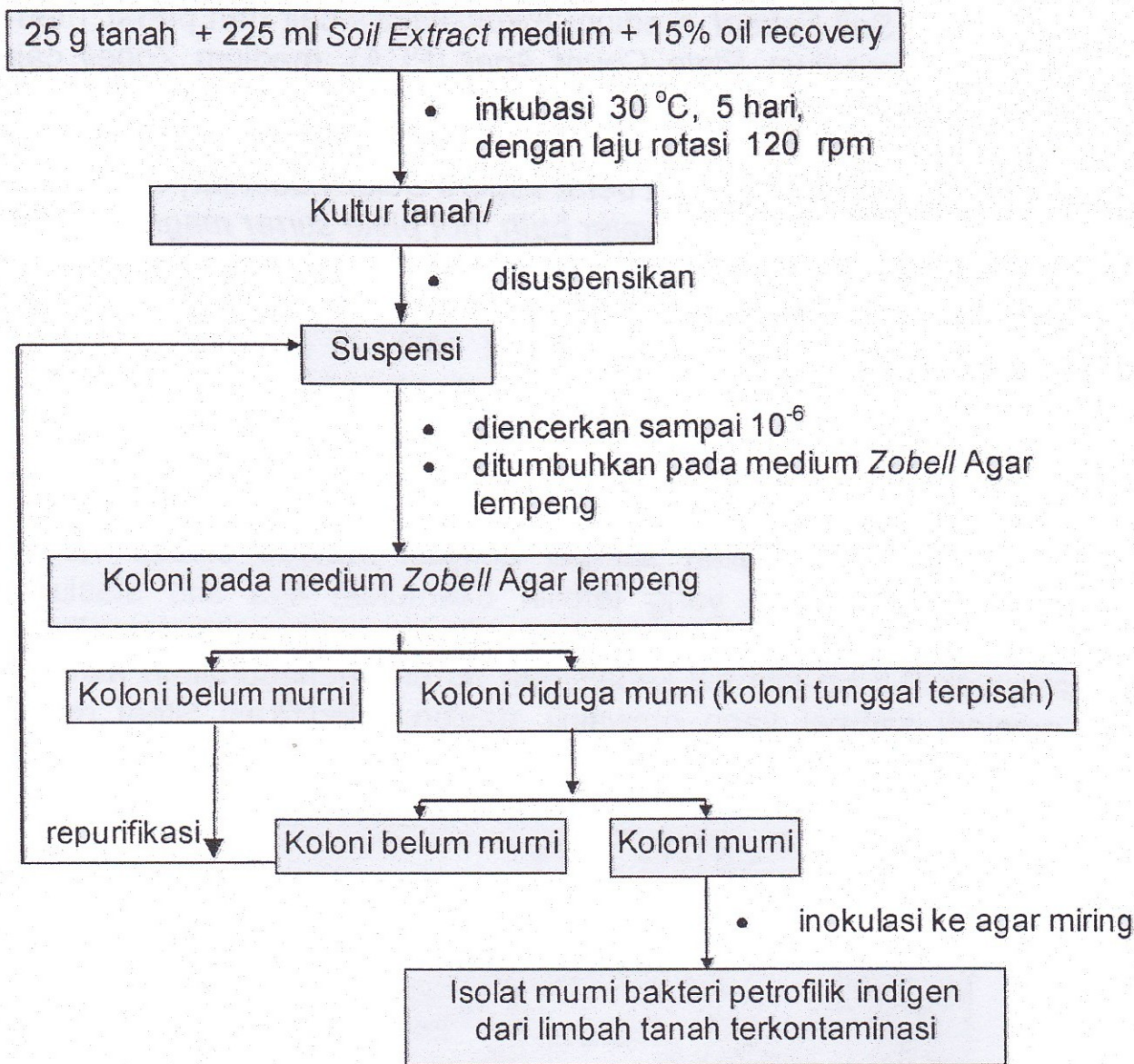
Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel

Dua puluh lima gram tanah terkontaminasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml yang berisi 225 ml medium *Soil Extract* (SE) dan ditambah *recovered oil* dengan konsentrasi 15% (v/v) sebagai satu-satunya sumber karbon. Kultur diinkubasi pada *orbital shaker* dengan putaran 100 rpm pada suhu kamar, setiap hari selama satu minggu diambil sampel 1 ml dan dilakukan pengenceran menggunakan larutan garam fisiologis (0,85% NaCl) hingga 10^{-8} .

Masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml dan diinokulasikan ke permukaan medium *Zobell Agar* dan diratakan. Masing-masing kultur diinkubasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam selanjutnya dilakukan pengamatan tiap koloni yang mempunyai ciri morfologi berbeda. Selanjutnya dilakukan proses pemurnian hingga mendapatkan koloni isolat bakteri petrofilik murni dan kelimpahannya (Modifikasi: Aagot dkk., 2001; Vialin dkk., 2006; Munawar, 1999). Koloni isolat bakteri yang sudah murni, diinokulasikan pada medium agar miring yang sama ditambah gliserin sebagai kultur stok dan disimpan pada suhu 4°C. Isolat yang diperoleh merupakan isolat bakteri petrofilik yaitu mampu memanfaatkan hidrokarbon petroleum sebagai sumber karbon dan energinya. Bagan alir isolasi dan pemurnian bakteri petrofilik terdapat pada Gambar 2.

Untuk mendapatkan bakteri penambat N, dilakukan dengan cara menyeleksi isolat bakteri petrofilik yang sudah diperoleh. Setiap isolat bakteri petrofilik yang diperoleh dibuat suspensi menggunakan larutan garam fisiologis, selanjutnya diambil suspensi sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml *Liquid N-Deficient Medium* (LNDM). Kultur diinkubasi pada suhu kamar selama satu minggu, selanjutnya kultur pada medium LNDM

cair, isolat yang mampu tumbuh pada medium bebas N merupakan isolat bakteri yang mampu menambat N. (Modifikasi: Guerinot dan Colwell, 1985; Eckford dkk., 2002).



Gambar 2. Bagan alir isolasi dan seleksi bakteri petrofilik (modifikasi Aagot dkk., 2001; Vialin dkk., 2006; Munawar, 1999)

Untuk mendapatkan bakteri pelarut P, dilakukan dengan cara menyeleksi isolat bakteri petrofilik yang sudah diperoleh. Setiap isolat bakteri petrofilik yang diperoleh dibuat suspensi menggunakan larutan garam fisiologis, selanjutnya kultur dinokulasikan sebanyak 0,1 ml ke permukaan medium *Picovskayas (PKV)* agar, pada cawan petri dan diinkubasi pada suhu ruang selama 4 hari. Koloni yang dikelilingi zona jernih menunjukkan isolat bakteri pelarut P (Modifikasi: Rajankar dkk., 2007).

Hasil dan Pembahasan

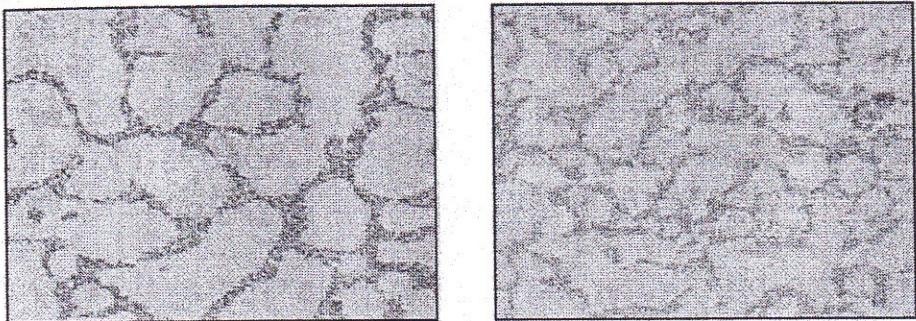
Total jumlah isolat yang diperoleh 44 isolat, dan setelah dilakukan seleksi terhadap sifat petrofilik, kemampuan menambat N, dan kemampuan melarutkan P hanya 11 isooot yang terseleksi. Hasil seleksi selengkapnya disajikan pada tabel 1. Berdasarkan tabel 1 setelah dilakukan seleksi lebih lanjut terhadap kemampuan mendegradasi hidrokarbon petroleum (Petrofilik), kemampuan menambat nitrogen (Pemfiksasi N), dan kemampuan melarutkan fosfat (Pelarut P), hanya 11 (sebelas) isolat yang terseleksi. Kesebalas isolat tersebut semuanya bersifat petrofilik yaitu mampu memanfaatkan sumber karbon dari hidrokarbon petroleum, dan sebelas isolat tersebut terdapat enam isolat yang mampu menambat N, dan sembilan isolat mampu melarutkan fosfat.

Dari sebelas isolat bakteri yang diperoleh terdapat empat isolat yang mempunyai kemampuan ketiganya yaitu petrofilik, penambat N, dan pelarut P, empat isolat tersebut masing-masing mempunyai kode A3 dan A4 keduanya berasal dari lokasi Abab, yang lain adalah T9 dan L3 masing-masing secara berurutan berasal dari lokasi Talangjimar dan Limau. Karakteristik morfologi sel masing-masing isolat yang terseleksi berdasarkan asal lokasi disajikan pada gambar 3 sampai 7.

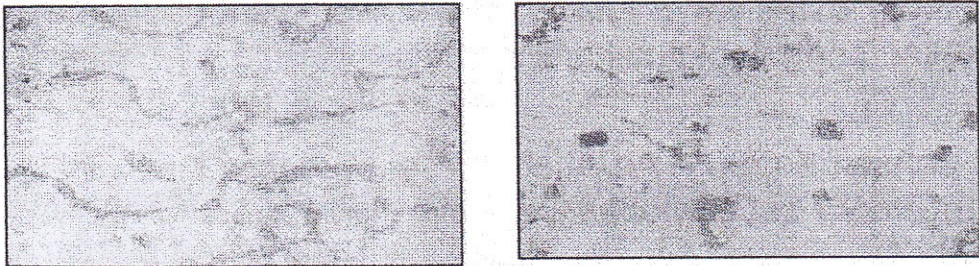
Tabel 1. Isolat hasil seleksi kemampuan petrofilik, penambat N, dan pelarut P

No	Kode isolat	Asal sampel	Sifat Gram	Bentuk sel	Kemampuan		
					Petrofilik	Penambat N	Pelarut P
1	B1	Benakat	Positif	Batang	√	-	√
2	B2	Benakat	Negatif	Batang	√	-	√
3	A3	Abab	Negatif	Batang	√	√	√
4	A4	Abab	Positif	Batang	√	√	√
5	R5	Raja	Negatif	Batang	√	-	√
6	R6	Raja	Negatif	Batang	√	-	√
7	T7	Talangjimar	Negatif	Batang	√	-	√
8	T9	Talangjimar	Negatif	Coccus	√	√	√
9	T10	Talangjimar	Negatif	Batang	√	√	-
10	L3	Limau	Negatif	Batang	√	√	√
11	L5	Limau	Negatif	Coccus	√	√	-
Jumlah isolat					11	6	9

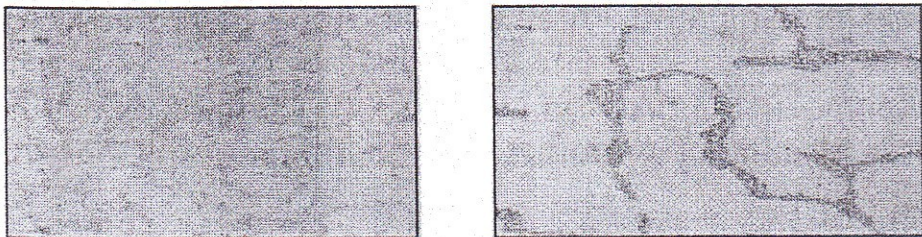
Keterangan: √ = mampu; - = tidak mampu



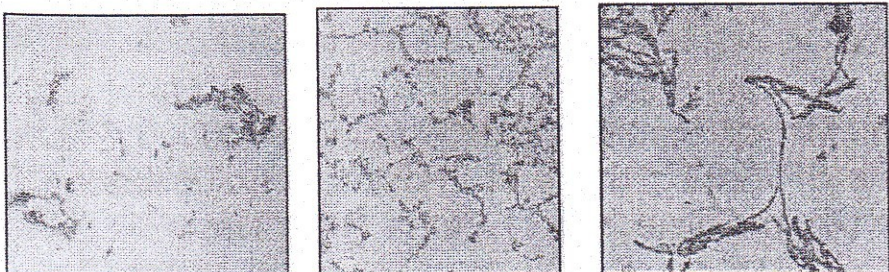
Gambar 3. Morfologi sel isolat B1 dan B2 dari Benakat (100X)



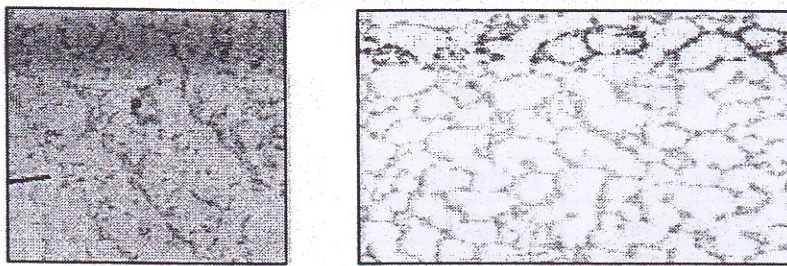
Gambar 4. Morfologi sel isolat A3 dan A4 dari Abab (100X)



Gambar 5. Morfologi sel isolat R5 dan R6 dari Raja (100X)



Gambar 6. Morfologi sel isolat T7, T9 dan T10 dari Talangjimar (100X)



Gambar 7. Morfologi sel isolat L3 dan L5 dari Limau (100X)

Isolat bakteri yang dihasilkan merupakan biodiversitas bakteri yang berpotensi sebagai agent biologis untuk upaya pemulihan lingkungan yang terkontaminasi hidrokarbon yang efektif dan efisien. Hal ini memungkinkan jika antar isolat yang diperoleh dapat berinteraksi secara sinergis dalam bentuk konsorsium yang memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon petroleum, memfiksasi nitrogen dan melarutkan fosfat.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Total isolat bakteri yang diperoleh adalah 44, setelah diseleksi hanya 11 isolat yang terseleksi berdasarkan kemampuan petrofilik, menambat N, dan melarutkan P. Sebalas isolat tersebut semuanya bersifat petrofilik, enam isolat penambat nitrogen, dan sembilan isolat pelarut fosfat. Dari sebelas isolat bakteri yang diperoleh terdapat empat isolat yang mempunyai kemampuan ketiganya yaitu petrofilik, penambat N, dan pelarut P, empat isolat tersebut masing-masing mempunyai kode A3 dan A4 keduanya berasal dari lokasi Abab, yang lain adalah isolat T9 dan L3 masing-masing secara berurutan berasal dari lokasi Talangjimar dan Limau.

Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan mengenai pengkajian pola interaksi antar isolat bakteri yang diperoleh sehingga dapat membentuk komunitas bakteri dalam bentuk konsorsium yang mempunyai tiga kemampuan sekaligus yaitu mendegradasi hidrokarbon petroleum, memenuhi kebutuhan N dengan cara menambat nitrogen dari udara, dan mengefisienkan penggunaan pupuk P dengan cara melarutkan fosfat yang terikat oleh kation yang terdapat pada tanah terkontaminasi yang akan dilakukan pengolahan secara biologis.

Daftar Pustaka

- Aagot N, Nybroe O, Nielsen P, Johsen K (2001) An Altered *Pseudomonas* Diversity is Recovered from Soil by using Nutrient-Poor *Pseudomonas*-Selective Soil Extract Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(11): 5233-5239.
- Chokshi BG (2003) Microbial degradation of hydrocarbons in petroleum sludge waste. *A Master Thesis*. Faculty of California polytechnic. State University. San Luis Obispo.
- Eckford R, Cook FD, Saul D, Aislabie J, Foght J (2002) Free-Living Heterotrophic Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Fuel-Contaminated Antarctic Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 5181-5185.
- Greene EA, Kay JG, Jaber K, Stehmeier LG, Voordouw G (2000) Composition of Soil Microbial Communities Enriched on a Mixture of Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5282-5289.
- Guerinot ML, Colwell RR (1985) Enumeration, Isolation, and Characterization of N₂-Fixing Bacteria from Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(2): 350-355.
- Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup (2003) Tentang Tata Cara dan Persyaratan Teknis Pengolahan Limbah Minyak Bumi dan Tanah Terkontaminasi oleh Minyak Bumi Secara Biologis. Nomor 128, Jakarta.
- Munawar (1999) Isolasi Dan Uji Kemampuan Isolat Bakteri Rizosfir dari Hutan Bakau di Cilacap dalam Mendegradasi Residu Minyak Bumi. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Rajankar PN, Tambekar DH, Wate SR (2007) Study of Phosphate Solubilization Efficiencies of Fungi and Bacteria Isolated from Saline belt of Purna River Basin. *R.J. Agriculture and Biological Science* 3(6): 701-703.
- Steel RGD, Torrie JH (1981) Principles and Procedures of Statistics A Biometrical Approach 2nd ed. Mc-Graw Hill International Book Company, London.