

BIODEGRADASI FRAKSI ASFALTEN OLEH BAKTERI YANG DIISOLASI DARI TANAH TERKONTAMINASI MINYAK BUMI DI PROPINSI SUMATERA SELATAN

Munawar^{1,2}, Pingkan Aditiawati³, dan Dea Indriani Astuti³

¹ Mahasiswa Program Doktor, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10, Bandung

² Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, Jl. Raya Inderalaya Km.32, Inderalaya

³ Program Studi Mikrobiologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10, Bandung

¹Korespondensi Pembicara. Phone: +62 711 581790, Fax: +62 711 580306
Email: mu_na_war@yahoo.com

ABSTRACT

Biodegradation of Asphaltic Fraction by Bacteria Isolated From Oil-Contaminated Soil in The South Sumatra. Asphaltic Fraction is one of the components of petroleum hydrocarbons are the most difficult to degrade. Four strains of bacteria have been isolated from oil-contaminated soil in the area of South Sumatra, each of which is *Pseudomonas* sp-2, *Pseudomonas* sp-3, *Pseudomonas* sp-6, and *Mycobacterium* sp-1. Furthermore, the tested the ability of degrades asphaltic fraction in Mineral Medium supplemented asphaltic fraction and incubated for six days. Testing the ability of degrades performed as single cultures and as a consortium in a mixed culture consisting of four bacteria. The results of degradation as a single culture was *Pseudomonas* sp-2 and *Pseudomonas* sp-6 showed asphaltic concentration decreased, but the resulting fractions of saturated and aromatic fractions, whereas *Mycobacterium* sp-1 and *Pseudomonas* sp-3 respectively showed asphaltic concentration does not decline, and all bacteria as a single culture showed that CO₂ concentration has not changed. The test of a consortium showed that a decline in asphaltic concentrations of 9.36% and increased concentrations of CO₂ up to 191.25 ppm, CO₂ formation showed that in the form of a consortium capable of degrading the fraction asphaltic perfectly.

Keywords: asphaltic, saturated, aromatic, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, CO₂.

1. PENDAHULUAN

Asfaltik merupakan salah satu komponen yang menyusun hidrokarbon petroleum. Fraksi ini banyak terdapat pada minyak mentah jenis “heavy crude oil” dan juga minyak yang lama tumpah di lingkungan (Alboudwarej, dkk., 2006). Lebih lanjut Taki, dkk., (2003) menjelaskan bahwa fraksi asfaltik merupakan fraksi yang paling sulit didegradasi dibandingkan fraksi lainnya seperti fraksi jenuh, aromatik, dan resin. Menurut Auflem (2002) bahwa fraksi asfaltik merupakan fraksi yang sangat kompleks yang salah satu penyusunnya adalah fraksi alifatik (jenuh) dan aromatik.

Untuk mendegradasi fraksi asfaltik secara sempurna sangat kecil kemungkinannya hanya dilakukan oleh satu strain bakteri saja, tetapi diperlukan beberapa strain bakteri.

Beberapa bakteri seperti *Pseudomonas* sp hanya mampu mendegradasi fraksi asfaltik menjadi fraksi jenuh dan atau aromatik, yang masih perlu degradasi lebih lanjut (Takur, 2007). Bakteri lain seperti *Mycobacterium fortuinum*, *M. rotisbonense*, *Brevibacterium* sp, *Corynebacterium* sp, *Rhodococcus* sp mampu mendegradasi fraksi jenuh secara sempurna menghasilkan CO₂ dan H₂O (Pineda-Flores, dkk., 2001). Bakteri lain seperti *Arthrobacter* sp, *Nocardia* sp, dan *Pseudomonas* sp mampu mendegradasi fraksi aromatik secara sempurna menghasilkan CO₂ dan H₂O (Alquaty, dkk., 2005).

Beberapa bakteri telah berhasil diisolasi dari tanah terkontaminasi minyak bumi di Sumatra Selatan. Bakteri tersebut antara lain *Mycobacterium* sp-1, *Pseudomonas* sp-3, *Pseudomonas* sp-2, *Pseudomonas* sp-6. Masing-masing strain bakteri tersebut telah diseleksi bersifat petrofilik, tetapi belum diketahui kemampuannya dalam mendegradasi fraksi yang lebih spesifik seperti asfaltik yang merupakan komponen minyak bumi paling sulit didegradasi. Untuk mengetahui kemampuan biodegradasi keempat bakteri tersebut, dilakukan pengujian dalam bentuk kultur tunggal dan kultur campur, sehingga diharapkan diperoleh kinerja degradasi terbaik.

2. BAHAN DAN ALAT

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan adalah strain bakteri *Mycobacterium* sp-1, *Pseudomonas* sp-3, *Pseudomonas* sp-2, *Pseudomonas* sp-6, Mineral medium, indikator Phenol Phtalein (PP), dan pelarut n-pentana dan toluena untuk mengekstraksi fraksi hidrokarbon, sedangkan peralatan yang digunakan adalah Erlenmeyer dan botol respirometrik untuk melakukan percobaan biodegradasi, dan peralatan lain yang umum digunakan di laboratorium Mikrobiologi.

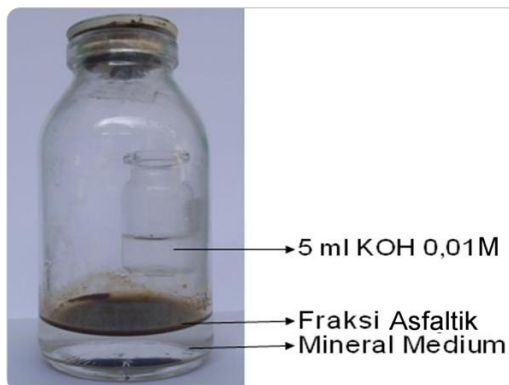
Percobaan Biodegradasi Fraksi Asfaltik oleh Bakteri

Pengujian dilakukan terhadap empat strain bakteri sebagai kultur tunggal yaitu (1) *Mycobacterium* sp-1, (2) *Pseudomonas* sp-3, (3) *Pseudomonas* sp-2, (4) *Pseudomonas* sp-6 dan sebagai konsorsium merupakan kultur campur meliputi (5) *Pseudomonas* sp-2 + *Pseudomonas* sp-6 + *Mycobacterium* sp-1, (6) *Pseudomonas* sp-2 + *Pseudomonas* sp-6 + *Pseudomonas* sp-3, (7) *Pseudomonas* sp-2 + *Pseudomonas* sp-6 + *Mycobacterium* sp-1 + *Pseudomonas* sp-3, (8) Kontrol (tanpa bakteri). Semua kultur diinokulasikan ke dalam botol 100 ml yang berisi 12,5 ml *Mineral Medium* (MM) dengan komposisi menurut Atlas (2010) gram per liter: K₂HPO₄ 0,45; (NH₄)₂SO₄ 0,1; MgSO₄·7H₂O 0,02; NaCl 0,01; CaCl₂ 0,01; FeCl₃ 0,002 dan 0,25 gram fraksi asfaltik sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Botol kultur dilengkapi dengan botol kecil yang berada didalamnya yang berisi larutan KOH 0,01 M sebagai penangkap CO₂ sebagaimana terdapat pada Gambar 1. Kultur diinkubasi pada *orbital shaker* dengan putaran 100 rpm pada suhu kamar (26 – 31 °C) selama satu minggu. Selanjutnya dilakukan penghitungan populasi bakteri menggunakan bilik hitung, dan analisis fraksi jenuh, aromatik dan asfaltik menggunakan metode *SARA Analysis*, serta analisis CO₂ menggunakan metode titrasi asidik-alkalimetri setiap 24 jam.

Penghitungan Populasi Bakteri

Populasi bakteri dihitung menggunakan bilik hitung dalam satuan sel per ml. Sampel diambil sebanyak 1 ml dari botol kultur setelah dihomogenkan, dimasukkan

ke dalam bilik hitung bawah mikroskop. menggunakan bilik sebanyak 5 bilik bakteri dalam satuan dengan persamaan Populasi bakteri



dan diamati di Penghitungan hitung diambil besar. Populasi sel per ml dicari berikut:

$$(\text{sel/ml}) = A \times \frac{1000}{0,02}$$

(1)
dimana: A = jumlah sel bakteri pada lima bilik besar
1000 = konversi **ml** menjadi **mm³**
0,02 = volume lima bilik besar dalam satuan **mm³**

Analisis Fraksi Hidrokarbon

Dilakukan pemisahan medium dengan fraksi asfaltik yang tersisa menggunakan corong pemisah. Sisa minyak yang masih terdapat pada dinding botol kultur dibilas dengan n-pentan, digabungkan dengan fraksi asfaltik yang telah dipisahkan. Selanjutnya ditambahkan n-pentan hingga 20 ml kedalam botol baru yang berisi fraksi asfaltik. Botol dikocok selama dua menit sehingga homogen, selanjutnya disaring menggunakan kertas saring yang sudah diketahui beratnya, fraksi yang tertahan di atas kertas saring sebagai fraksi asfaltik. Selanjutnya sisa filtrat dikolom menggunakan *silica gel* (60-100 mesh), untuk ekstraksi fraksi jenuh, sisa filtrat ditambah n-pentan hingga volume 20 ml dikolom dengan kecepatan 5 ml/menit selama 4 menit, ekstraksi fraksi aromatik ditambahkan 20 ml toluen pada kolom dan dialirkan dengan kecepatan 5 ml/menit selama 4 menit. Selanjutnya masing-masing fraksi diuapkan pelarutnya dengan menyimpan pada lemari asam hingga beratnya konstan. Penentuan konsentrasi semua fraksi dilakukan secara gravimetri. (Auflem (2002); Vazquez dan Mansoori (2000)).

Analisis Karbon Dioksida (CO₂)

Analisis CO₂ dilakukan terhadap 5 ml larutan KOH 0,01 M dalam botol respirometrik. Dipindahkan 5 ml KOH 0,01 M ke dalam erlenmeyer 100 ml, ditambahkan indikator phenol phtalein (pp) sebanyak 1,5 tetes, dikocok. Dititrasi dengan HCl 0,01 M. sampai warna merah hilang, dan dihitung volume HCl yang digunakan dalam satuan liter. Perhitungan konsentrasi CO₂ dilakukan sesuai dengan persamaan 2, sebagai berikut:

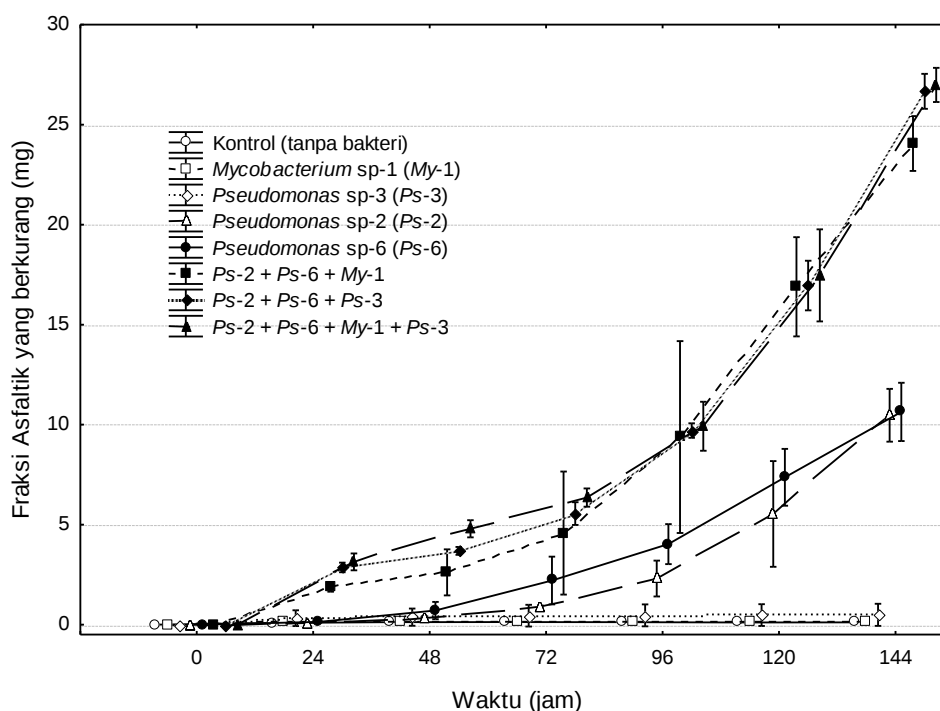
$$\text{Konsentrasi CO}_2 (\text{ppm}) = V \times 0,01 \times 44,0098 \times 1000 \times 200$$

dimana:
V = volume titran (HCl) dalam Liter
0,01 = Molaritas HCl
44,0098 = Berat molekul CO₂
1000 = faktor konversi dari **g** ke **mg**
200 = faktor konversi dari **5 ml** ke satu **liter**

Gambar 1. Unit percobaan untuk menguji kemampuan bakteri dalam mendegradasi fraksi asfaltik.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

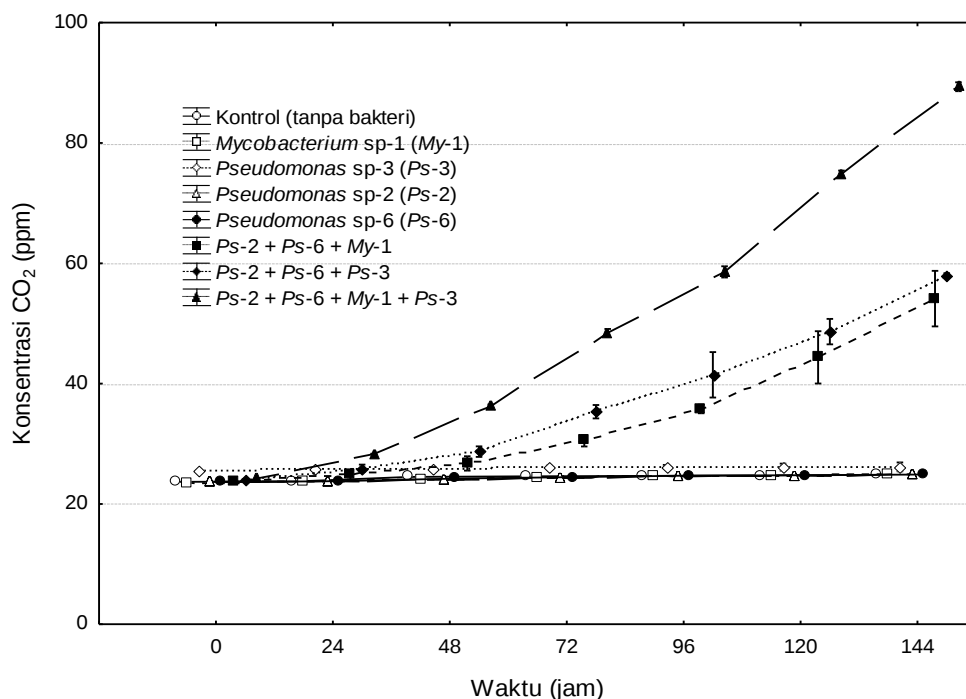
Strain bakteri *Mycobacterium* sp-1 dan *Pseudomonas* sp-3 dalam bentuk kultur tunggal tidak mampu mendegradasi fraksi asfaltik, karena kedua strain tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi asfaltik yang berkurang (Gambar 2.) dan CO₂ (Gambar 3.) yang dihasilkan tidak berbeda dengan kontrol.



Gambar 2. Konsentrasi asfaltik yang berkurang pada proses biodegradasi asfaltik oleh berbagai perlakuan kultur bakteri selama satu minggu

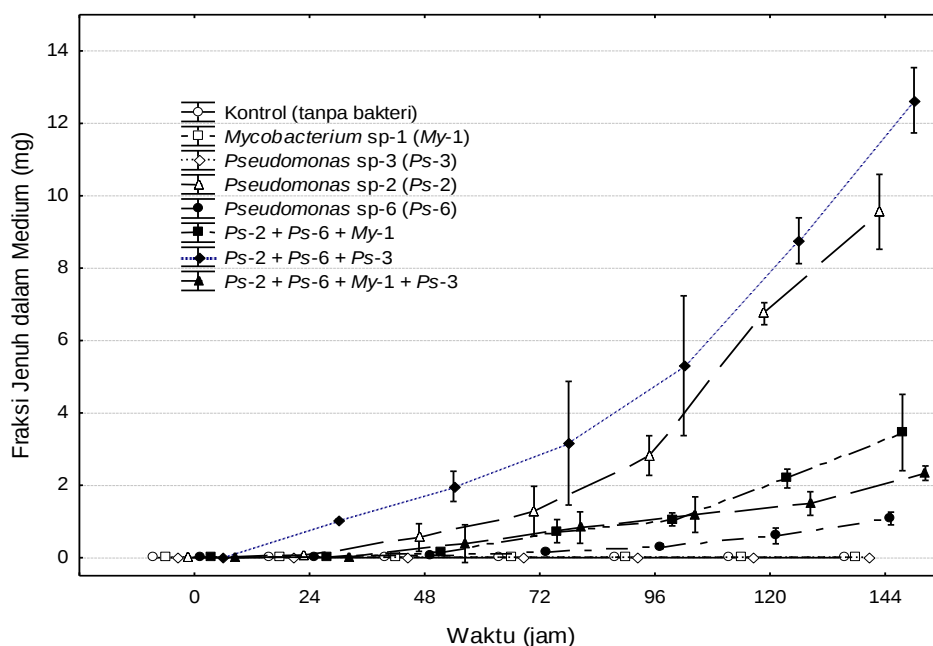
Sedangkan kultur tunggal strain *Pseudomonas* sp-2 mampu mendegradasi asfaltik menjadi fraksi jenuh dan *Pseudomonas* sp-6 mampu mendegradasi asfaltik menjadi fraksi aromatik. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 2., pada kultur tunggal *Pseudomonas* sp-2 terjadi pengurangan fraksi asfaltik dan dihasilkan fraksi jenuh (Gambar 4) yang cukup tinggi serta pada kultur tunggal *Pseudomonas* sp-6 terjadi pengurangan fraksi asfaltik (Gambar 2.) dan dihasilkan fraksi aromatik (Gambar 5) yang cukup tinggi. Tetapi pada kedua strain bakteri tersebut konsentrasi CO₂ (Gambar 3.) yang dihasilkan masih tidak berbeda dengan kontrol (tanpa bakteri).

Fenomena ini menunjukkan bahwa kedua strain bakteri tersebut dalam mendegradasi asfaltik berlangsung tidak sempurna. Hal ini didukung oleh pendapat Uribe-Alvarez dkk., (2011) bahwa biodegradasi sempurna atau proses mineralisasi senyawa petroleum hidrokarbon ditandai dengan dihasilkannya CO₂.



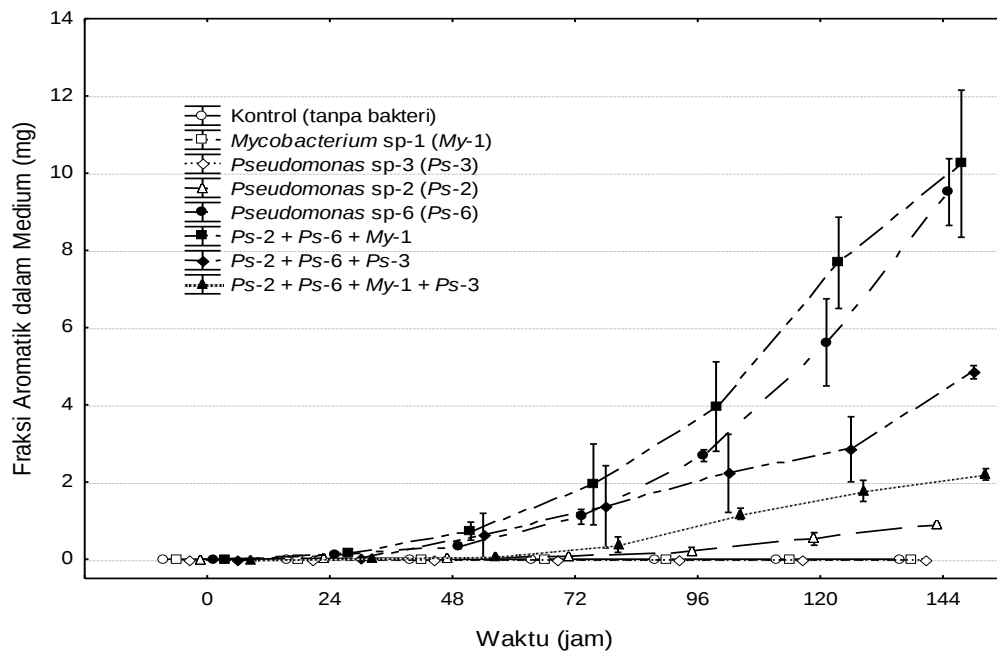
Gambar 3. Konsentrasi CO₂ yang dihasilkan pada proses biodegradasi asfaltik oleh berbagai perlakuan kultur bakteri selama satu minggu

Proses biodegradasi asfaltik oleh semua kultur campur lebih baik dibandingkan dengan kultur tunggal, hal ini ditunjukkan pada semua kultur campur menunjukkan konsentrasi CO₂ (Gambar 3.) yang lebih tinggi baik dibandingkan dengan kontrol ataupun dengan semua kultur tunggal. Pada kultur campur (*Pseudomonas* sp-2 + *Pseudomonas* sp-6 + *Mycobacterium* sp-1) menunjukkan konsentrasi fraksi jenuh (Gambar 4.) yang terdapat dalam medium lebih sedikit dibandingkan konsentrasi fraksi aromatik (Gambar 5.) yang terdapat dalam medium. Hal ini terjadi kemungkinan fraksi jenuh hasil degradasi strain *Pseudomonas* sp-2 didegradasi lebih lanjut oleh *Mycobacterium* sp-1, sehingga konsentrasi fraksi jenuh yang tersisa dalam medium lebih sedikit dibandingkan dengan fraksi aromatik. Sedangkan pada kultur campur (*Pseudomonas* sp-2 + *Pseudomonas* sp-6 + *Pseudomonas* sp-3) menunjukkan kondisi yang sebaliknya, yaitu konsentrasi fraksi aromatik lebih sedikit dibanding dengan fraksi jenuh. Hal ini dimungkinkan karena fraksi aromatik hasil degradasi dari fraksi asfaltik oleh strain *Pseudomonas* sp-6 didegradasi lebih lanjut oleh strain *Pseudomonas* sp-3. Fenomena ini didukung oleh Auflem (2002) yang menyatakan bahwa fraksi asfaltik terdiri atas fraksi alifatik (jenuh) dan aromatik. Takur (2007) menjelaskan bahwa *Pseudomonas* sp mampu mendegradasi asfaltik menghasilkan aromatik.

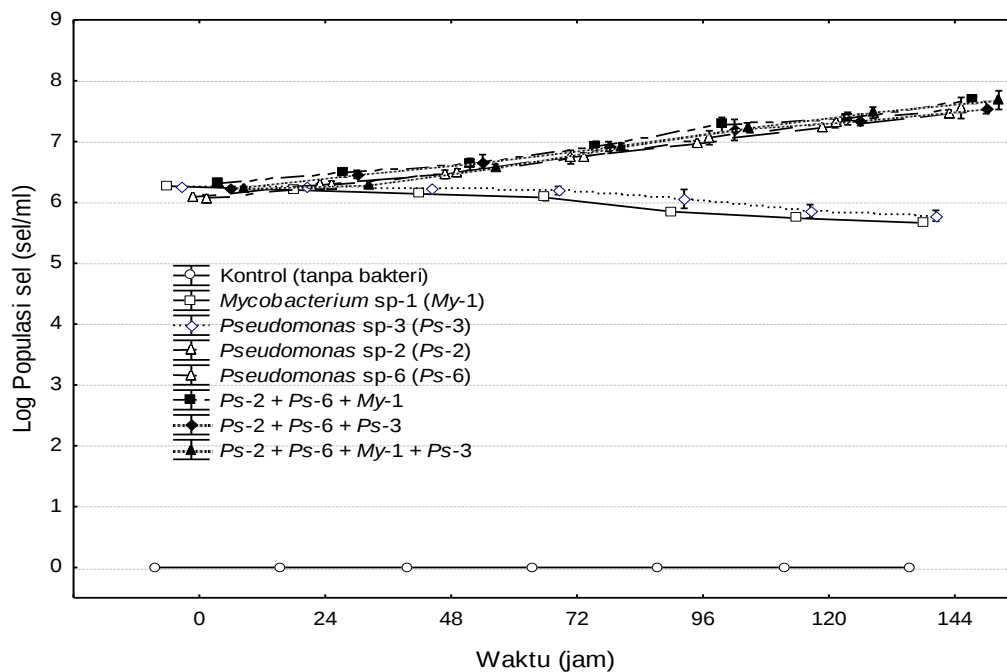


Gambar 4. Konsentrasi fraksi jenuh yang dihasilkan pada proses biodegradasi asfaltik oleh berbagai perlakuan kultur bakteri selama satu minggu

Pada kultur campur yang terdiri atas empat strain bakteri (*Pseudomonas* sp-2 + *Pseudomonas* sp-6 + *Mycobacterium* sp-1 + *Pseudomonas* sp-3) menunjukkan konsentrasi CO₂ (Gambar 3.), fraksi asfaltik yang didegradasi (Gambar 2.) yang paling tinggi dibanding dengan semua kultur tunggal dan kultur campur yang lain, dan konsentrasi fraksi jenuh (Gambar 4.) serta konsentrasi fraksi aromatik (Gambar 5.) dalam medium paling sedikit. Hal ini dapat dijelaskan bahwa fraksi jenuh hasil degradasi asfaltik oleh strain *Pseudomonas* sp-2 didegradasi lebih lanjut oleh strain *Mycobacterium* sp-1, dan fraksi aromatik hasil degradasi asfaltik oleh strain *Pseudomonas* sp-6 didegradasi lebih lanjut oleh strain *Pseudomonas* sp-3, sehingga fraksi jenuh dan fraksi aromatik dalam medium jumlahnya menjadi sedikit. Populasi sel (Gambar 6.) kultur tunggal *Mycobacterium* sp-1 dan *Pseudomonas* sp-3 menunjukkan penurunan selama inkubasi satu minggu, hal ini dapat dijelaskan bahwa kedua strain tersebut tidak mampu mendegradasi fraksi asfaltik secara langsung. Tetapi kultur tunggal strain *Pseudomonas* sp-2 dan *Pseudomonas* sp-6 menunjukkan populasi sel yang meningkat selama inkubasi satu minggu, hal ini didukung oleh berkurangnya fraksi asfaltik dalam medium, yang menunjukkan terjadi degradasi fraksi asfaltik walaupun tidak sempurna, karena konsentrasi CO₂ yang dihasilkan masih setara dengan CO₂ yang dihasilkan pada kontrol. Secara umum populasi sel pada kultur campur menunjukkan kenaikan selama proses biodegradasi, dan menunjukkan jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultur tunggal.



Gambar 5. Konsentrasi fraksi aromatik yang dihasilkan pada proses biodegradasi asfaltik oleh berbagai perlakuan kultur bakteri selama satu minggu



Gambar 6. Populasi sel selama proses biodegradasi asfaltik oleh berbagai perlakuan kultur bakteri selama satu minggu

Berdasarkan kemampuan biodegradasi kultur tunggal dan kultur campur, maka peran masing-masing strain dapat dijelaskan strain *Pseudomonas* sp-2 mendegradasi fraksi asfaltik menjadi fraksi jenuh yang akan didegradasi lebih lanjut oleh strain *Mycobacterium* sp-1, sedangkan strain *Pseudomonas* sp-6 mendegradasi asfaltik menghasilkan fraksi aromatik yang akan didegradasi lebih lanjut oleh strain *Pseudomonas* sp-3, sehingga pada kultur campur yang terdiri atas (*Pseudomonas* sp-2

+ *Pseudomonas* sp-6 + *Mycobacterium* sp-1 + *Pseudomonas* sp-3) menunjukkan fraksi asfaltik yang didegradasi dan konsentrasi CO₂ yang dihasilkan paling tinggi.

4. KESIMPULAN

Isolat bakteri dari tanah terkontaminasi minyak bumi asal Sumatra Selatan dalam bentuk kultur tunggal tidak mampu mendegradasi fraksi asfal dengan sempurna, tetapi dalam bentuk konsorsium yang merupakan kultur campur yang terdiri atas empat bakteri (*Pseudomonas* sp-2, *Pseudomonas* sp-6, *Mycobacterium* sp-1 dan *Pseudomonas* sp-3) mampu mendegradasi fraksi asfaltik dengan sempurna, yang ditunjukkan terjadi peningkatan konsentrasi CO₂.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Djoko T. Iskandar yang telah banyak memberikan masukan selama penelitian sehingga artikel ini dapat ditulis.

5. REFERENCES

- Alboudwarej, H., J. Felix, S. Taylor, R. Badry, C. Bremner, B. Brough, C. Skeates, A. Baker, D. Palmer, K. Pattison, M. Beshry, P. Krawchuk. G. Brown, R. Calvo, J.A.C. Triana, R. Hathcock, K. Koerner, T. Hughes, D. Kundu, J.L. de-Cardenas, dan C. West. (2006). Highlighting Heavy Oil. *Oilfield Review Summer*. 34-53.
- Alquaty, C., M. Papacchini, C. Riccard, S. Spicaglia, G. Bestiti. (2005). Diversity of naphtalene-degrading bacteria from a petroleum contaminated soil. *Annals of Microbiology*. 55(4): 237-242
- Atlas, R.M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. 4th Ed. CRC Press Taylor & Francis Group: New York.
- Auflem, I.H. (2002). Influence of Asphaltene Aggregation and Pressure on Crude Oil Emulsion Stability. Ph.D. Thesis. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. Norwegian.
- Pineda-Flores, G., G. Boll-Argüello, C. Lira-Galeana, dan A. M. Mesta-Howard. (2004). A Microbial Consortium Isolated from a Crude Oil Sample that uses Asphaltenes as a Carbon and Energy Source. *Biodegradation* 15: 145–151
- Takur, I.S. (2007). *Environmental Microbiology*. School of Environmental Science. Jawaharal Nehru University. New Delhi.
- Uribe-Alvarez, C., Ayala, Perezgasga, L., Naranjo,L., Urbina, H., & Vazquez-Duhalt, R (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology*, 4(5): 663–672.
- Vazquez, D. & Mansoori, G.A. (2000). Identification and Measurement of Petroleum Precipitates. *J. Petrol. Sci. & Engineering*. 26: 49-56.