

Potensi Bakteri Asal Tanah Rizosfer, Sedimen Tanah, dan Pupuk Kandang Sapi untuk Biodegradasi Minyak Berat dan Oli Bekas

The Potential Of Bacteria from Rhizosphere, Soil Sediment and Cattle Manure for Biodegradation of Heavy Oil and Used Oil

Winda Ika Susanti^{1,*} dan Ricky Trinanda²

¹ Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, 16680, Indonesia, email: winda_ika_susanti@yahoo.com

² Indonesian Center of Biodiversity and Biotechnology Cilubang Street, Nagrak Number 62 Situgede Bogor Jawa Barat 16155

INFORMASI ARTIKEL

Riwayat artikel:

Diterima: 26 September 2016

Direview: 06 Oktober 2016

Disetujui: 10 Mei 2017

Katakunci:

Bakteri
Degradasi
Minyak berat
Oli bekas

Keywords:

Bacteria
Degradation
Heavy oil
Used oil

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri dari berbagai lokasi yang berpotensi dalam mendegradasi limbah minyak berat dan oli bekas. Percobaan dilakukan dengan tahapan: mengisolasi bakteri dari sepuluh lokasi pengambilan sampel, melakukan seleksi terhadap kemampuan bakteri dalam mendegradasi minyak berat dan oli bekas pada media minimal cair secara *in vitro*, mengkarakterisasi fisiologi dan biokimia bakteri, serta melakukan uji *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH). Diperoleh 5 isolat terpilih yaitu isolat OB3-10% yang diperoleh dari sedimen sungai di daerah Babakan Lebak, OB5-10% dan MB5-5% yang diperoleh dari kotoran sapi kering, OB9-10% yang diperoleh dari tanah rizosfer keladi, dan MB10-10% yang diperoleh dari tanah di sekitar perkebunan sawit. Isolat MB5-5% memiliki kemampuan paling baik dalam menurunkan TPH pada tanah tercemar minyak berat dan isolat OB9-10% memiliki kemampuan paling baik dalam menurunkan TPH pada tanah tercemar oli bekas.

Abstract. *The objective of this research was to obtain potential bacteria capable to degrade heavy oil and used oil. The research carried out in several steps: isolating bacteria from ten sampling location, selection of bacteria capability to degrade heavy oil and used oil in liquid minimal media, characterizing the physiology and biochemistry of bacteria, testing of Total Petroleum Hydrocarbon (TPH). Five selected isolates was obtained, they were: OB3-10% from Babakan Lebak river sediment, OB5-10% and MB5-5% from dried cow manure, OB9-10% from taro rhizosphere, and MB10-10% from oil palm plantation area. Isolate MB5-5% had the best capability in reducing TPH of heavy oil contaminated soil and isolate OB9-10% had the best capability in reducing TPH of used oil contaminated soil.*

Pendahuluan

Minyak bumi merupakan sumber energi utama untuk memenuhi kebutuhan masyarakat pada saat ini maupun pada masa yang akan datang. Permintaan terhadap minyak bumi semakin besar sejalan dengan kebutuhan manusia yang semakin meningkat (Muraza dan Galadima 2015). Semakin besar produksi minyak bumi, maka semakin berpotensi untuk mencemari lingkungan bila minyak bumi tumpah atau terbuang ke lingkungan. Minyak bumi tersebut akan menjadi limbah yang dapat menjadi pencemar yang berbahaya dan akan berpengaruh terhadap kehidupan tanaman, hewan maupun manusia (Charlena 2010). Minyak berat memiliki viskositas dan densitas tinggi serta mengandung banyak senyawa organik yang lebih berat, seperti resin dan aspalten, daripada yang terkandung pada minyak medium dan minyak ringan. Karakteristik tersebut menyebabkan minyak berat lebih sulit didegradasi (Huang *et al.* 2005; Meyer *et al.* 2007; Hao dan Lu 2009).

Salah satu metode alternatif yang lebih efektif, efisien, dan ramah lingkungan adalah bioremediasi, yaitu teknologi penggunaan makhluk hidup khususnya bakteri sebagai agen biologis yang mampu memanfaatkan hidrokarbon minyak bumi sebagai sumber karbon dan energi metabolisme yang kemudian diubah menjadi CO₂, H₂O dan biomassa (Andrews *et al.* 2004; Dhar *et al.* 2012). Dalam melaksanakan penanganan pencemaran yang disebabkan hidrokarbon minyak bumi secara biologi diperlukan mikroba yang secara aktif mampu mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Untuk itu, perlu dilakukan pencarian mikroba yang mampu mendegradasi minyak bumi dan mengkondisikan kehidupan mikroba tersebut di lingkungan tercemar minyak bumi.

Menurut Kadarwati *et al.* (1994) mikroba yang banyak hidup dan berperan di lingkungan hidrokarbon minyak bumi sebagian besar adalah bakteri. Bakteri mempunyai kemampuan fisiologi dan metabolik untuk mendegradasi bahan pencemar (Udiharto 2000). Bakteri yang mampu mendegradasi senyawa yang terdapat di dalam petroleum

*Corresponding author: winda_ikasusanti@yahoo.com

hidrokarbon dikenal sebagai bakteri hidrokarbonoklastik. Bakteri ini memiliki karakteristik yang tidak dimiliki oleh mikroba lain yaitu kemampuannya mengekspresikan enzim hidroksilase, yaitu enzim pengoksidasi hidrokarbon, sehingga bakteri ini mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak bumi dengan cara memotong rantai hidrokarbon menjadi lebih pendek. Selain itu, penggunaan bakteri dalam mendegradasi minyak bumi juga sangat efektif karena populasinya di dalam tanah sangat tinggi (Charlena 2010).

Bakteri pendegradasi minyak bumi dapat diisolasi dari berbagai jenis lingkungan, tidak hanya di lingkungan yang tercemar minyak bumi. Lingkungan secara alamiah mengandung beranekaragam mikroba yang dapat dimanfaatkan dalam penanganan pencemaran lingkungan. Menurut Schlegel dan Schmidt (1994), bakteri pendegradasi minyak bumi tersebar luas, tidak hanya di lingkungan yang bersinggungan langsung dengan minyak bumi, sehingga bakteri ini dapat diisolasi juga dari tanah hutan, ladang, dan rerumputan. Sehubungan dengan permasalahan tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk memperoleh jenis bakteri yang secara aktif dan potensial mampu mendegradasi hidrokarbon minyak berat dan oli bekas dengan mengkondisikan kehidupan mikroba tersebut pada lingkungan yang mengandung minyak bumi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tanah, Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Institut Pertanian Bogor pada bulan Februari 2015 sampai dengan bulan Juni 2015.

Bahan yang digunakan adalah isolat dari berbagai lingkungan, minyak berat, oli bekas, contoh tanah segar, larutan fisiologis, alkohol 70%, *aquadest*, media minimal untuk seleksi isolat, media *Nutrient Agar* (NA) untuk pertumbuhan isolat. Komposisi media terdapat dalam Tabel 1. Alat yang digunakan untuk analisa mikrobiologi adalah autoklaf, bunsen, cawan Petri, *drigal sky*, labu Erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, *hot plate*, inkubator, jarum ose, kaca objek, kaca penutup, *magnetic stirrer*, mikroskop, penangas air, pipet serologis, pipet tetes, sekop kecil, *shaker*, spatula, tabung reaksi, timbangan dan *vortex*.

Pengambilan contoh

Contoh sumber isolat berasal dari beberapa sampel tanah, sedimen dan kotoran sapi dari berbagai lokasi, yakni: 1) tanah sedimen air hitam dari Kotabaru Jambi zona 4, 2) tanah rizosfer bambu, 3) sedimen sungai dari daerah Babakan Lebak, Dramaga (Kabupaten Bogor Jawa Barat),

4) kotoran sapi basah dari peternakan sapi IPB, 5) kotoran sapi kering dari peternakan sapi IPB, 6) tanah rizosfer jagung, 7) tanah sedimen air hitam Sukamaju Jambi, 8) tanah rizosfer kopi, 9) tanah rizosfer keladi, 10) tanah rizosfer kelapa sawit. Sampel tanah nomor 2, 6, 8, 9, 10 diambil di daerah kebun percobaan Cikabayan, IPB. Sumber isolat diambil dengan menggunakan sekop kecil yang disterilisasi menggunakan etanol. Secara aseptik setiap sampel tersebut masing-masing diambil sebanyak 100 g dan dimasukkan dalam plastik.

Tabel 1. Dosis dan komposisi media tumbuh

Table 1. Dosage and composition of the growth media

Nama Media	Komposisi	Dosis/liter
Nutrient Agar (NA)	-	28 g
Minimal	K ₂ HPO ₄	0,5 g
	NH ₄ Cl	1 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	20 mg
	Yeast Extract	0,2 g
	Casamino Acid	0,1 g
	Trace element	1 ml
	Heavy oil	1 %

Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Sebanyak 10 g sampel, diencerkan dengan larutan fisiologis 90 mL steril. Kemudian sebanyak 1 mL suspensi diinokulasikan pada medium minimal cair yang telah ditambahkan minyak berat (5% dan 10%) dan oli bekas (5% dan 10%) dan diinkubasi pada temperatur 30°C selama 7 hari. Isolat yang tumbuh pada konsentrasi tertinggi selanjutnya dimurnikan pada media NA dalam cawan Petri, selanjutnya dibuat *stock culture* pada agar miring media minimal dan disimpan pada suhu 4°C.

Isolat diberi kode yang terdiri atas 3 digit. Digit pertama berupa huruf yang menunjukkan media minimal dengan sumber karbon minyak berat atau oli bekas, digit kedua berupa angka yang menunjukkan lokasi asal sumber isolat, dan digit ketiga berupa konsentrasi (%) yang menunjukkan konsentrasi sumber karbon dimana bakteri paling banyak tumbuh. Contoh OB5-5% adalah bakteri dari media minimal dengan sumber karbon oli bekas yang diperoleh dari kotoran sapi yang tumbuh pada oli bekas dengan konsentrasi 5%.

Seleksi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Seleksi bakteri dilakukan berdasarkan kemampuan bertahan hidup dan tumbuh pada medium yang

mengandung minyak bumi serta kemampuan untuk menggunakan minyak bumi tersebut sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Seleksi dilakukan dengan melihat langsung perubahan minyak bumi yang telah dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer bersama media minimal dan dipilih lima isolat terbaik.

Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Minyak Berat

Morfologi bakteri diamati dengan melihat ukuran koloni, margin, bentuk, elevasi dari koloni serta melihat pertumbuhan bakteri pada media agar tegak dan tipe Gram. Karakteristik biokimia diamati dengan melakukan pengujian fermentasi dan pengujian katalase.

a. Pengujian Fermentasi Gula (Glukosa dan Sukrosa)

Pengujian terhadap fermentasi gula dilakukan dengan mengambil biakan bakteri menggunakan ose steril dan diinokulasikan pada media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung glukosa dan sukrosa 1% dalam tabung reaksi berisi tabung Durham kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

b. Pengujian Motilitas

Pengujian motilitas dilakukan dengan metode tusuk. Koloni bakteri diambil secara aseptik menggunakan jarum ose, kemudian diinokulasikan secara vertikal pada media semi padat SIM (*Sulfide Indole Motility*) dan di inkubasi selama 24 jam. Bakteri motil ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan pada permukaan medium dan tidak ada bekas pada tusukan, sedangkan bakteri non motil tumbuh sepanjang tusukan.

c. Pengujian Kebutuhan Oksigen

Koloni bakteri diambil secara aseptik menggunakan jarum ose, kemudian diinokulasikan ke dalam *aquadest* steril di dalam tabung. Media *Nutrient Agar* (NA) semi padat disterilisasi di dalam tabung reaksi, kemudian suspensi bakteri diinokulasikan sebanyak 1 ml ke dalam tabung dan di inkubasi selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan adanya kekeruhan pada media di dalam tabung reaksi (baik di permukaan tabung, di tengah media, di dasar tabung maupun tersebar di dalam media).

d. Pengujian Katalase

Uji katalase dilakukan dengan meneteskan Hydrogen peroksida (H_2O_2) pada gelas objek. Selanjutnya pada tetesan H_2O_2 ditambahkan satu ose inokulum bakteri. Setelah itu dilakukan pengamatan terbentuknya gelembung atau tidak. Adanya gelembung-gelembung udara menunjukkan tes katalase tersebut positif.

e. Pengujian Oksidase

Senyawa p-amino dimethylaniline-oxalat 1% ditetaskan pada kertas saring. Secara aseptik, satu ose penuh koloni bakteri dioleskan di atas tetesan p-amino dimethylaniline-oksalat 1% tersebut. Jika koloni berubah warna menjadi merah maka menunjukkan tes positif dan jika bewarna ungu menunjukkan tes negatif.

f. Pengujian Bakteri pada Proses Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Uji kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon pada media padat dilakukan dengan menggunakan contoh tanah yang telah dicemari hidrokarbon minyak bumi masing-masing minyak berat dan oli bekas dengan konsentrasi 10%, kemudian diinokulasi lima bakteri terpilih dari hasil seleksi pada media cair, dan diamati selama 4 minggu.

Adapun perlakuan yang diujikan yaitu pemberian lima bakteri terpilih hasil isolasi dan seleksi yaitu sebagai berikut :

A = tanpa inokulasi bakteri (kontrol)

B = inokulasi bakteri OB3-10% (sumber isolat berasal dari sedimen sungai yang diisolasi pada media mengandung oli bekas 10%)

C = inokulasi bakteri OB5-10% (sumber isolat berasal dari kotoran sapi kering yang diisolasi pada media mengandung oli bekas 10%)

D = inokulasi bakteri OB9-10% (sumber isolat berasal dari rizosfer keladi yang diisolasi pada media mengandung oli bekas 10%)

E = inokulasi bakteri MB5-5% (sumber isolat berasal dari kotoran yang diisolasi pada media mengandung minyak berat 5%)

F = inokulasi bakteri MB10-10% (sumber isolat berasal dari rizosfer kelapa sawit pada media mengandung minyak berat 5%)

Semua perlakuan tersebut diujikan pada media percobaan dengan jenis kontaminan yang berbeda sebagai berikut

– Minyak berat dengan konsentrasi 10%

– Oli bekas dengan konsentrasi 10%

Kultur diinkubasi selama 4 minggu dengan setiap minggunya dilakukan pengukuran total petroleum hidrokarbon (TPH).

Pengukuran Total Petroleum Hidrokarbon (TPH)

Botol kaca berukuran 50 ml dipanaskan pada suhu 70°C dalam oven selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang (A). Sebanyak 5 g sampel tanah dari tiap perlakuan dimasukkan ke dalam botol

sentifuse dan ditambahkan 35 mL n-heksana kemudian disentifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 20 menit. Kemudian supernatan diambil menggunakan pipet dan dimasukkan ke botol (A). Botol yang berisi supernatan dibiarkan menguap agar n-heksana habis. Botol yang berisi residu ekstrak senyawa hidrokarbon hasil penguapan ditimbang (B). Total Petroleum Hidrokarbon (TPH) dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Trinanda 2015) :

$$TPH = \frac{B-A}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

Efisiensi degradasi dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$ED = \frac{X-Y}{X} \times 100\%$$

Keterangan :

TPH = Total Petroleum Hidrokarbon (%)

A = Berat botol kosong (g)

B = Berat botol yang berisi ekstrak senyawa hidrokarbon (g)

ED = Efisiensi degradasi (%)

X = TPH pada t=0 (t = waktu)

Y = TPH pada akhir proses bioremediasi (t=n).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan Seleksi Bakteri Pendegradasi Minyak Berat dan Oli Bekas

Medium yang digunakan dalam isolasi bakteri pendegradasi minyak berat dan oli bekas adalah medium minimal (Matalova 2005) dengan minyak berat dan oli bekas sebagai sumber karbon. Penggunaan media minimal ini bertujuan sebagai media selektif agar bakteri pendegradasi minyak berat dan oli bekas dapat tumbuh dalam medium setelah 7 hari inkubasi. Selanjutnya pada tahap pemurnian media minimal ditambahkan *yeast extract* sebagai sumber karbon utama. Sumber karbon utama pada media minimal digantikan dengan *yeast extract* karena minyak berat dan oli bekas sukar digunakan pada medium padat. Minyak berat dan oli bekas memiliki kelarutan yang rendah sehingga tidak bisa bercampur dengan substansi kimia yang lain dalam medium agar.

Berdasarkan lokasi pengambilan sampel dan isolasi, maka didapatkan lima perlakuan terbaik. Dari lima perlakuan tersebut, didapatkan isolat bakteri pendegradasi minyak berat dan oli bekas yang memiliki tingkat degradasi tertinggi pada media minimal cair.



Gambar 1. Setting penelitian di laboratorium untuk seleksi bakteri pendegradasi hidrokarbon minyak berat dan oli bekas

Figure 1. Laboratory experimental setting for selection of bacteria which are potential to degrade heavy oil and used oil

Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Kelima isolat terpilih dimurnikan kembali, lalu dilakukan pengamatan dan pengujian untuk mengetahui karakter bakteri tersebut. Pengujian yang dilakukan antara lain:

a. Pengamatan morfologi bakteri

Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang meliputi warna, bentuk koloni, elevasi (kenampakan dari samping), bentuk pinggiran, dan pertumbuhan pada media miring dan tegak (Tabel 2).

Empat isolat berwarna putih susu dan 1 isolat berwarna merah, 3 isolat memiliki bentuk *Irregular* dan 2 isolat berbentuk *Circular*. Berdasarkan ukuran koloni isolat OB9-10% dan OB5-10% memiliki ukuran koloni kecil, sedangkan isolat OB3-10% dan MB10-10% memiliki ukuran koloni yang sedang dan sisanya yaitu isolate MB5-5% memiliki ukuran koloni yang besar. Pengamatan margin pada kelima isolate juga bervariasi yaitu 2 isolat memiliki margin *Lobate*, 2 isolat memiliki margin *Entire* dan 1 isolat memiliki margin *Undulate*. Elevasi dan

Tabel 2. Morfologi koloni bakteri pendegradasi minyak berat dan oli bekas terpilih yang memiliki tingkat degradasi tertinggi

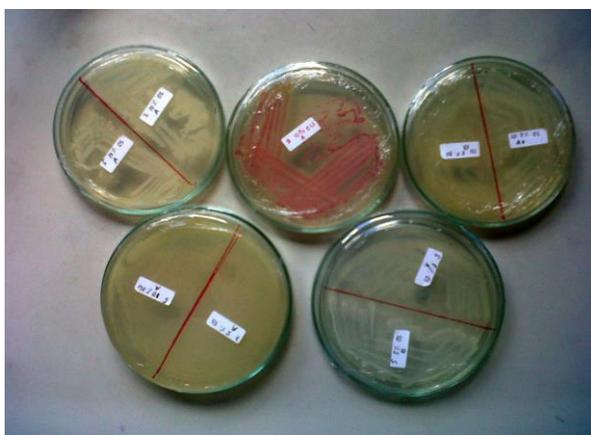
Table 2. Morphology of selected bacteria colonies that has the highest degradation capacity

Kode Bakteri	Bentuk	Ukuran	Margin	Elevasi	Koloni pada Media Miring	Pertumbuhan Media Agar Tegak
OB3-10%	<i>Irregular</i>	Sedang	<i>Lobate</i>	<i>Raised</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Papilliate</i>
OB5-10%	<i>Circular</i>	Kecil	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Echinulate</i>
OB9-10%	<i>Irregular</i>	Kecil	<i>Undulate</i>	<i>Raised</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Echinulate</i>
MB5-5%	<i>Circular</i>	Besar	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	<i>Spreading</i>	<i>Echinulate</i>
MB10-10%	<i>Irregular</i>	Sedang	<i>Lobate</i>	<i>Raised</i>	<i>Spreading</i>	<i>Echinulate</i>

Keterangan:

Irregular = bentuk tidak beraturan; *Circular* = bentuk membulat; *Lobate* = lekukan terlihat jelas; *Undulate* = lekukan seperti gelombang; *Entire* = margin sangat rata; *Raised* = elevasi sedikit menonjol; *Convex* = elevasi berbentuk kubah; *Echinulate* = pertumbuhan seperti benang dengan tepian tidak rata; *Spreading* = pertumbuhan koloni menyebar

pertumbuhan isolat pada media agar tegak dari 5 isolat yang diperoleh tidak terlalu bervariasi, 4 isolat memiliki elevasi *Raised* yaitu isolat OB5-10%, OB9-10% dan MB10-10% dengan pertumbuhan isolat pada media agar tegak *Echinulate*, isolat OB3-10% dengan pertumbuhan isolat pada media agar tegak *Papillate*, sedangkan 1 isolat lainnya memiliki elevasi *Convex* dengan pertumbuhan isolat pada media agar tegak *Echinulate*. Bentuk koloni pada media miring juga tidak terlalu bervariasi yaitu 3 isolat yang dengan sumber karbon oli bekas berbentuk *Echinulate*, dan 2 isolat yang menggunakan sumber karbon minyak berat bentuk koloni pada media miring berbentuk *Spreading*. Kelima isolat yang telah dimurnikan dalam cawan Petri (Gambar 2) kemudian dibuat stock culture pada agar miring dalam tabung reaksi.

Gambar 2. Lima isolat murni bakteri terseleksi
Figure 2. Five pure isolates of selected bacteria

b. Pengujian biokimia

Pengujian biokimia yang dilakukan meliputi pengujian fermentasi pada sukrosa dan glukosa, pengujian katalase dan uji pewarnaan Gram (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil pengujian biokimia isolat bakteri terpilih pendegradasi minyak berat dan oli bekas

Table 3. Biochemistry test result of selected bacteria that have capacity to degrade heavy oil and used oil

Kode Bakteri	Pengujian			Gram
	Fermentasi		Katalase	
	Sukrosa	Glukosa		
OB3-10%	-	-	+	+
OB5-10%	-	-	+	-
OB9-10%	-	-	+	+
MB5-5%	-	-	+	+
MB10-10%	+	+	+	-

Keterangan : (-) = negatif (+) = positif

Pada hasil fermentasi glukosa, 4 isolat menunjukkan uji negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung, sedangkan pada MB10-10% menunjukkan hasil positif. Begitu pun untuk uji sukrosa, hanya isolat MB10-10% saja yang menunjukkan hasil positif dengan ditandai terbentuknya gelembung. Menurut Cappuccino dan Sherman (1992), mikroba dapat menggunakan berbagai karbohidrat tergantung sistem enzim yang dimiliki. Beberapa mikroba dapat memfermentasi gula seperti glukosa secara anaerob atau aerob, sedangkan yang bersifat anaerob fakultatif dapat menggunakan lintasan aerob dan anaerob. Pada saat fermentasi, substrat seperti karbohidrat dan alkohol akan mengalami disimilasi anaerob dengan menghasilkan asam organik (seperti asam laktat, asam formiat, atau asam asetat) yang diikuti gas H_2 atau CO_2 . Mikrob anaerob fakultatif biasanya pelaku fermentasi karbohidrat. Fermentasi dikaitkan dengan degradasi glukosa melalui lintasan glikolisis. Degradasi fermentasi dalam lingkungan anaerob berlangsung dalam tabung reaksi berisi nutrient dan tabung Durham dengan posisi terbalik untuk menyimpan gas. Media untuk

fermentasi karbohidrat mengandung kaldu nutrient, yang dapat digunakan oleh mikroba. Tidak berlangsungnya fermentasi karbohidrat tidak berarti mikroba tidak tumbuh karena mikroba dapat menggunakan karbon lain dalam media sebagai sumber energi (Trinanda 2015).

Hasil uji katalase menunjukkan semua isolat bereaksi positif yang ditandai dengan terbentuknya gelembung. Bakteri yang menghasilkan enzim katalase atau peroksidase mampu menguraikan H_2O_2 menjadi $2H_2O$ dan O_2 . Kehadiran enzim ini ditandai dengan terbentuknya gelembung yang artinya uji positif. Hadioetomo (1992) menjelaskan bahwa kebanyakan bakteri aerob dan anaerob fakultatif yang menggunakan O_2 juga menghasilkan H_2O_2 yang bersifat racun bagi sistem enzimnya sendiri. Namun bakteri tersebut dapat tetap hidup karena dihasilkannya enzim katalase. Bakteri-bakteri anaerob obligat mati bila tidak ada oksigen karena tidak terbentuk enzim katalase sehingga H_2O_2 meracuni bakteri itu sendiri.

Hasil uji pewarnaan Gram menunjukkan dari 5 isolat yang diperoleh, terdapat 3 isolat bersifat Gram positif dan 2 isolat bersifat Gram negatif. Menurut Cappuccino and Sherman (1992) reaksi pewarnaan didasarkan atas perbedaan komposisi kimiawi dinding sel. Sel Gram positif mempunyai dinding dengan lapisan peptidoglikan yang tebal sedangkan Gram negatif lebih tipis dan diliputi lapisan membran luar yang tersusun dari lipid.

Pengujian Bakteri pada Bioremediasi Tanah Terkontaminasi Hidrokarbon

Lima bakteri terpilih hasil isolasi dan seleksi diuji pada media percobaan dengan jenis kontaminan yang berbeda yaitu minyak berat (10%) dan oli bekas (10%). Media percobaan yang digunakan yaitu seperti pada Gambar 3:

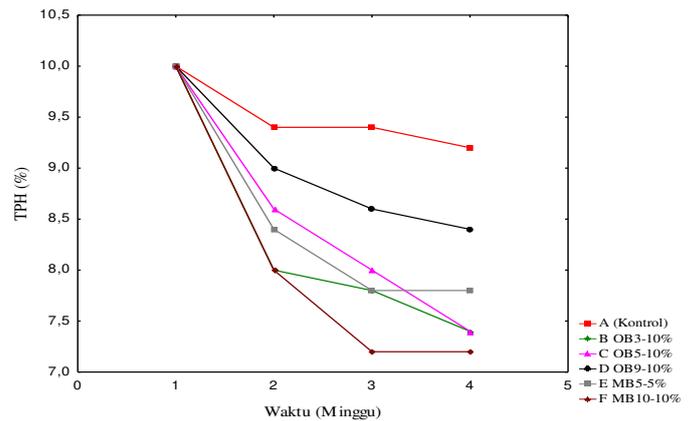


Gambar 3. Media untuk pengujian Total Petroleum Hidrokarbon

Figure 3. Media for Total Petroleum Hydrocarbon testing

Pengujian bakteri pada bioremediasi tanah terkontaminasi minyak berat

Pengaruh bakteri terhadap penurunan TPH pada tanah tercemar minyak berat disajikan pada Gambar 4. Perlakuan E inokulasi bakteri dengan kode MB5-5% mampu menurunkan kadar TPH pada tanah tercemar minyak berat mencapai 7,2% dari konsentrasi awal 10% pada minggu keempat. Kemampuan bakteri MB5-5% pada perlakuan E lebih baik jika dibandingkan dengan isolat lain dan kontrol dalam mendegradasi minyak berat karena menunjukkan penurunan kadar TPH yang lebih besar, walaupun belum mampu mendegradasi minyak berat pada tanah sampai kadar TPH < 1% dan masih jauh di atas ambang batas yang telah ditetapkan sesuai KepMenLH No.128 Tahun 2003.



Gambar 4. Pengaruh inokulasi bakteri terhadap penurunan Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) pada tanah tercemar minyak berat

Figure 4. Influence of bacteria inoculation on decreasing Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) in heavy oil contaminated soil

Pada pengujian ini bakteri terpilih hasil isolasi dan seleksi sulit mendegradasi minyak berat dalam waktu yang singkat sampai kadar TPH yang diperbolehkan karena karakteristik dari minyak berat yang sulit didegradasi. Minyak berat (*heavy oil*) merupakan salah satu jenis minyak mentah yang sangat tidak mudah mengalir karena mempunyai viskositas yang tinggi. Karakteristik umum limbah minyak berat (*heavy oil waste/HOW*) adalah densitas (*specific gravity*) yang tinggi, rendah rasio hidrogen dan karbon, residu karbon yang tinggi dan kandungan *asphaltenes*, *heavy metal*, sulfur dan nitrogen yang tinggi sehingga sangat sulit didegradasi (Meyer *et al.* 2007; Trinanda 2015).

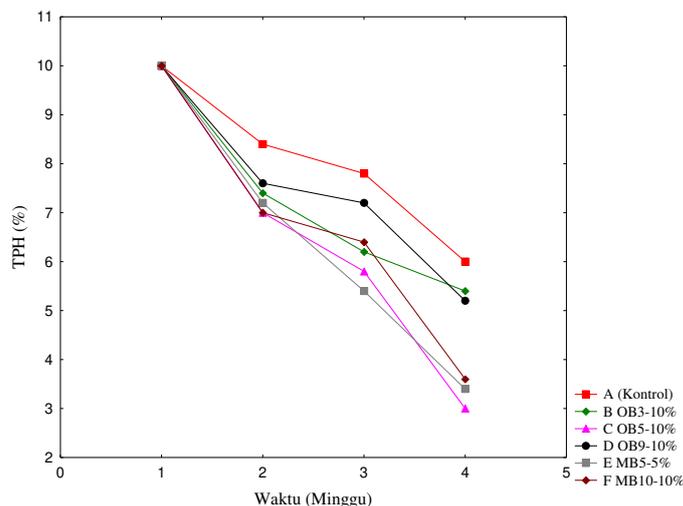
Penurunan kadar TPH yang kurang baik pada proses bioremediasi tanah terkontaminasi minyak berat selain karena sulitnya minyak berat didegradasi dugaan lain yang mungkin terjadi adalah kurangnya nutrisi dalam media

percobaan. Salah satu faktor penting yang diperlukan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon adalah nutrisi. Faktor nutrisi yang diperlukan antara lain karbon, dimana sumber karbon ini didapatkan dari hidrokarbon minyak bumi (Udiharto 2000; Nugroho 2006). Oleh karena itu, bakteri yang hidup di lingkungan hidrokarbon minyak bumi tetapi tidak mampu memecah hidrokarbon minyak bumi maka tidak akan memperoleh karbon sebagai sumber energinya dan tidak mampu bertahan hidup sehingga proses degradasi minyak bumi akan berjalan sangat lambat. Selain karbon, untuk pertumbuhannya bakteri juga memerlukan unsur lain yaitu, nitrogen, fosfor, belerang, kalium, magnesium dan besi. Dari deretan unsur tersebut, nitrogen dan fosfor merupakan unsur esensial untuk mendukung biodegradasi hidrokarbon minyak bumi (Munawar dan Surtiningsih *et al.* 2007).

Pengujian bakteri pada bioremediasi tanah terkontaminasi oli bekas

Pengaruh bakteri terhadap penurunan TPH pada tanah tercemar oli bekas disajikan pada Gambar 5. Pada pengujian bioremediasi tanah tercemar oli bekas perlakuan C yaitu inokulasi bakteri dengan kode OB9-10% menunjukkan kemampuannya menurunkan kadar TPH pada tanah tercemar oli bekas hingga mencapai konsentrasi 3% dari konsentrasi 10%. Kemampuan bakteri OB9-10% pada perlakuan C lebih baik jika dibandingkan dengan isolat lain dan kontrol dalam mendegradasi oli bekas karena menunjukkan penurunan kadar TPH yang lebih besar. Walaupun belum mampu mendegradasi oli bekas pada tanah sampai kadar TPH < 1% dan masih di atas ambang batas yang telah ditetapkan sesuai KepMenLH No.128 Tahun 2003, isolat-isolat terpilih hasil isolasi dan seleksi yang diujikan lebih mudah dalam mendegradasi oli bekas dibandingkan mendegradasi minyak berat. Hal ini diduga disebabkan karena hidrokarbon struktur alifatik dari oli bekas lebih sedikit daripada minyak berat. Menurut Mukred *et al.* (2008), senyawa-senyawa yang terkandung di minyak bumi ada yang mudah didegradasi dan beberapa resisten terhadap degradasi sehingga biodegradasi pada senyawa-senyawa minyak bumi yang berbeda terjadi secara bersamaan tetapi pada tingkat yang berbeda karena bakteri dengan spesies yang berbeda akan mendegradasi senyawa yang berbeda pula.

Secara umum dari masing-masing pengujian baik pengujian dengan bahan pencemar minyak berat ataupun oli bekas, terdapat penurunan TPH yang disebabkan aktivitas bakteri dalam memecah rantai hidrokarbon menjadi senyawa karbon yang digunakan sebagai sumber energi bagi bakteri tersebut.



Gambar 5. Pengaruh bakteri terhadap penurunan konsentrasi Total Petroleum Hydrocarbon TPH pada tanah tercemar oli bekas

Figure 5. Influence of bacteria inoculation on reducing Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) concentration in used oil contaminated soil

Menurut Manalu (2013), penurunan konsentrasi TPH ini juga disebabkan karena pertumbuhan bakteri berada pada fase pertumbuhan puncak dimana bakteri membutuhkan energi yang cukup besar, dan energi ini didapatkan oleh bakteri dari senyawa hidrokarbon. Berkurangnya hidrokarbon yang dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber karbon disebabkan karena adanya reaksi enzimatik, hal ini sesuai dengan Hadioetomo (1992), menjelaskan bahwa berkurangnya hidrokarbon oleh proses pemecahan rantai hidrokarbon oleh bakteri terjadi melalui reaksi enzimatik. Kebanyakan bakteri memproduksi enzim oksigenase sehingga dapat mendegradasi hidrokarbon dan menjadikan hidrokarbon sebagai donor elektronnya serta mengubah hidrokarbon menjadi H_2O dan CO_2 . Menurut Miller (1995) bakteri mampu beradaptasi pada lingkungan hidrokarbon melalui beberapa cara, yaitu: (i) pembentukan bagian hidrofobik pada dinding sel sehingga meningkatkan afinitas sel terhadap hidrokarbon, (ii) dihasilkannya surfaktan ekstraselular yang dapat meningkatkan kelarutan hidrokarbon dan (iii) modifikasi intraselular membran sitoplasmik yang dapat mengurangi toksisitas hidrokarbon terhadap bakteri.

Kesimpulan dan Saran

Isolat bakteri yang berpotensi mendegradasi minyak bumi dari jenis minyak berat dan oli bekas adalah isolat OB3-10% asal sedimen sungai di daerah Babakan Lebak, OB5-10% dan MB5-5% asal kotoran sapi kering, OB9-

10% yang diperoleh asal tanah rizosfer keladi, dan MB10-10% yang diperoleh dari tanah di sekitar perkebunan sawit. Isolat bakteri MB5-5% memiliki kemampuan paling baik dalam menurunkan *total petroleum hydrocarbon* (TPH) pada tanah tercemar minyak berat dan isolat bakteri OB9-10% memiliki kemampuan paling baik dalam menurunkan TPH pada tanah tercemar oli bekas, sehingga berpotensi dikembangkan untuk biodegradasi minyak berat dan oli bekas.

Daftar Pustaka

- Andrews, J.E., P. Brimblecombe, L.D. Jickells, P.S. Liss, dan B. Reid. 2004. *An Introduction to Environmental Chemistry*. 2nd edition, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Cappucino, J.G. dan N. Sherman. 1992. *Microbiology a Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing, New York, USA.
- Charlena. 2010. *Bioremediasi Tanah Tercemar Limbah Minyak Berta Menggunakan Konsorsium Bakteri*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor, Indonesia.
- Dhar, K.S., M.N. Dutta, dan Anwar. 2012. Biodegradation of petroleum hydrocarbon by two *Aspergillus* spp. and two *Penicillium* spp. isolated from the contaminated soil and water of ship breaking yard. *Asian J Microbiol Biotech Env Sci*. 14(1):143-48.
- Hadioetomo, R.S. 1992. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek, Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Penerbit Gramedia, Jakarta, Indonesia.
- Hao, R., dan A. Lu. 2009. Biodegradation of heavy oils by halophilic bacterium. *Prog Nat Sci*. 19:997-1001.
- Huang, X.D., Y. El-Alawi, J. Gurska, B.R. Glick, dan B.M. Greenberg. 2005. A multi-process phyto-remediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from Soils. *Microchem J*. 81(1): 139-47.
- Kadarwati, S., M. Udiharto, E.H. Legowo, E. Bagio, M. Rahman, dan E. Jasjfi. 1994. Aktivitas Mikroba dalam Transformasi Substitusi di Lingkungan Hidrokarbon. *Lembaran Publikasi Lemigas* 2:28-38.
- Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No. 128 Tahun 2003
- Manalu, R.T. 2013. *Aplikasi Bakteri Lokal Indonesia dalam Bioremediasi Tanah Terkontaminasi Minyak Berat, Minyak Ringan, dan Limbah Oli Bekas*. Tesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia.
- Matalova, K. 2005. "Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Environmental Habitats in Western New York State," Thesis of Departement of Chemistry. Rechester Institute of Technology : Rochester.
- Meyer, R.F., E.D. Attanasi, dan F.A. Freeman. 2007. Heavy oil and natural bitumen resources in geological basins of the world. Geological Survey Open-File Report 2007- 1084. Reston, Virginia, USA.
- Miller, R.M. 1995. Surfactant enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. Di dalam: Skipper HD, Turco RF, editors. *Bioremediation: Science and Applications*. SSSA Special Publication 43. hlm 33-54.
- Mukred, A.M., A.A. Hamid, A. Hamzah, dan M.W.M. Yusoff. 2008. Development of the three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. *Biologic Sci*. 8(4):1608-4217.
- Munawar, M., and T. Surtiningsieh. 2007. Bioremediasi tumpahan minyak mentah dengan metode biostimulasi nutrient organik di lingkungan pantai Surabaya Timur. *Berk. Panel. Hayati*. 13: 91-96.
- Muraza, O., dan A. Galadima. 2015. Aquathermolysis of heavy oil: A review an perspective on catalyst development. *Fuel*. 157:219-231.
- Nugroho, A. 2006. *Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi*. Graha Ilmu, Jakarta.
- Schlegel H.G. dan K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Terjemahan. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Trinanda R. 2015. *Efektivitas Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Minyak Berat yang Diisolasi dari Ekosistem Air Hitam di Kabupaten Tanjung Jabung Timur, Jambi*. Tesis. Insitut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia.
- Udiharto, M. 2000. *Bioremediasi minyak bumi*. Prosiding Pelatihan dan Lokakarya Peranan Bioremediasi dalam Pengelolaan Lingkungan Cibinong, 24-28 Juni 1996. hlm 24-39.