

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Asal Indonesia

Rosario Trijuliamos Manalu^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Institut Sains dan Teknologi Nasional, Jalan Moh Kahfi II Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640

*Email korespondensi: rio@istn.ac.id

ABSTRAK

Pengelolaan secara mikrobiologi merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi kontaminasi tanah akibat limbah *oil sludge*. Sehingga perlu upaya untuk meningkatkan kecepatan biodegradasi senyawa hidrokarbon melalui rekayasa proses metabolisme mikroba yang optimal, yang diawali dengan isolasi dan karakterisasi. Tujuan penelitian ini adalah menyeleksi dan karakterisasi isolat unggul yang mampu mendegradasi hidrokarbon. Metode yang digunakan adalah penelitian deskriptif eksploratif, dan data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif yang dilaporkan dalam bentuk tabel dan grafik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 3 isolat bakteri unggul yang diperoleh dan dapat mendegradasi hidrokarbon yaitu *Bacillus* sp. ICBB 7859, ICBB 9461 dan ICBB 5071.

Kata kunci: isolasi, bakteri, hidrokarbon

Isolation and Characterization of Degrading Hydrocarbons Bacteria From Indonesia

ABSTRACT

Microbiological management is one alternative to overcome soil contamination due to oil sludge waste. So that efforts need to be made to increase the speed of biodegradation of hydrocarbon compounds through the engineering of optimal microbial metabolic processes, beginning with isolation and characterization. The purpose of this study was to select and characterize superior isolates capable of degrading hydrocarbons. The method used is descriptive exploratory research, and the data obtained are analyzed descriptively reported in the form of tables and graphs. The results showed that 3 superior bacterial isolates were obtained and could degrade hydrocarbons namely *Bacillus* sp. ICBB 7859, ICBB 9461 and ICBB 5071.

Keywords: isolation, bacteria, hydrocarbon

PENDAHULUAN

Aktivitas industri minyak dan gas (migas) sangat berpotensi mengontaminasi lingkungan tanah. Salah satu jenis limbah kegiatan industri migas adalah *oil sludge*. Sampai saat ini, pengelolaan limbah *oil sludge* masih merupakan salah satu masalah utama industri migas. Hal ini terutama disebabkan oleh jumlahnya yang relatif besar (Okoro, 2010).

Matthew (2006) menyatakan bahwa *oil sludge* mengandung senyawa hidrokarbon dan logam berat yang dapat menurunkan kualitas kimia-fisik lingkungan, meracuni biota dan mengganggu rantai makanan. Oleh karena itu, *oil sludge* dikategorikan sebagai bahan berbahaya dan beracun sesuai dengan PP No. 18 Tahun 1999 tentang pengelolaan limbah bahan berbahaya dan beracun. Menurut Simons & Saginor (2010), pengelolaannya harus mampu mengurangi sifat

berbahaya dan beracun tersebut agar tidak membahayakan kesehatan manusia dan lingkungan.

Pengendalian secara mikrobiologi merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi kontaminasi tanah akibat limbah *oil sludge*. Menurut Stroud *et al.* (2007) salah satu upaya untuk meningkatkan kecepatan biodegradasi senyawa hidrokarbon *oil sludge* adalah melalui rekayasa proses untuk mencapai kondisi media dan tingkat metabolisme mikroba yang optimal.

Dengan biodiversitas sangat besar, alam Indonesia menyediakan sumber melimpah isolat mikroba yang dapat dimanfaatkan dalam proses bioremediasi tanah terkontaminasi limbah *oil sludge*. Diperlukan Sebuah taktik yang harus dilakukan agar kinerja bakteri tetap terjaga dan mampu hidup pada proses awal hingga akhir pada proses remediasi tanah tercemar minyak bumi. Karakteristik bakteri ini adalah memiliki kemampuan dalam memanfaatkan senyawa hidrokarbon

sebagai sumber karbon dan energi yang diperlukan bagi pertumbuhannya (Mujab, 2011).

Dari hasil isolasi dan identifikasi bakteri di kawasan Sumatera Selatan dan sekitarnya bakteri-bakteri indigenus yang diisolasi dari lahan terkontaminasi minyak bumi adalah *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus beta hemolisa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Acinetobacter calcoaceticus*. Bakteri tersebut diduga berpotensi dalam mendegradasi berbagai komponen hidrokarbon sehingga dapat dikembangkan dan dimanfaatkan untuk bioremediasi lingkungan (Manalu *et al.*, 2016).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyeleksi isolat bakteri yang diperoleh dari lingkungan ekstrem dan mengkarakterisasi tiga isolat bakteri unggul yang mempunyai kemampuan dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan. Bahan yang digunakan 15 isolat bakteri koleksi ICBB yang telah teruji berpotensi mendegradasi hidrokarbon. Bahan lain yang digunakan meliputi larutan fisiologis steril, HCl, phenolphtaleine, metil oranye, aquadest dan alkohol 70%, media NA (*Nutrient Agar*) dan media LB (*Luria-Bertani*) untuk pertumbuhan mikroba, serta Media Minimal Cair yang mengandung bahan-bahan pemasok kebutuhan hidup bakteri dalam jumlah minimal (10 g NaCl, 1 g NH₄NO₃, 0,5 g MgSO₄, 0,7 g K₂HPO₄, 0,3 g KH₂PO₄, 0,1 ml FeCl₃, 5-10% minyak berat dan 20 g agar) untuk seleksi isolat.

Peremajaan Isolat dan Seleksi. Peremajaan bakteri dilakukan dengan tujuan agar bakteri awal yang merupakan biakan induk yang masih dalam keadaan dorman menjadi biakan segar sehingga ketika digunakan, bakteri dalam keadaan yang segar. Terdapat sebanyak 15 biakan bakteri ICBB yang telah teruji mampu mendegradasi hidrokarbon. Media tumbuh untuk peremajaan isolat yaitu media LB (*Luria-Bertani*). Biakan murni dari 15 isolat kemudian diseleksi kemampuannya dalam mendegradasi minyak berat.

Masing-masing isolat yang ada di biakan induk dibiarkan dahulu beberapa menit, setelah itu satu per satu biakan dipindahkan ke dalam 20 ml media LB dalam tabung erlenmeyer dengan menggunakan jarum ose (Gambar 1). Biakan diinkubasi di atas *shaker* selama 24 jam pada suhu ruang.



Gambar 1. Peremajaan Bakteri

Bakteri yang telah diremajakan kemudian diseleksi yang bertujuan untuk memperoleh tiga bakteri terbaik dari ke-15 bakteri yang mampu mendegradasi hidrokarbon. Media yang digunakan pada proses seleksi ini adalah Media Minimal Cair yang mengandung minyak mentah (*crude oil*). Penambahan minyak mentah bertujuan supaya diperoleh bakteri yang benar-benar mampu beradaptasi dengan lingkungan yang bercampur dengan minyak bumi.

Karakterisasi Bakteri. Isolat terbaik yang telah mampu mengurai komposisi minyak bumi dimurnikan kemudian dilakukan pengamatan dan pengujian untuk mengetahui karakter bakteri tersebut untuk mendegradasi hidrokarbon. Pengujian yang dilakukan:

a. Pengamatan morfologi bakteri

Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang meliputi warna, bentuk koloni, elevasi (kenampakan dari samping), bentuk pinggiran dan tekstur permukaan (Hadioetomo, 1993).

b. Pengujian *Hipersensitive Response*

Pengujian menurut Schaad *et al.* (2001) yang dimodifikasi dilakukan untuk menguji patogenitas bakteri pada tanaman. Bakteri dengan kerapatan 10⁹ CFU/ml dalam media cair disuntikkan ke daun tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) berumur 2 bulan menggunakan *syringe* 1 ml (tanpa jarum) dan diamati selama 1 minggu. Pengujian menggunakan kontrol negatif berupa air steril dan kontrol positif bakteri patogen tanaman.

Tujuan pengujian ini adalah untuk menguji bakteri yang berpotensi sebagai patogen pada tanaman, dalam hal ini pengujian menggunakan tembakau (Schaad *et al.*, 2001). Pada Gambar 2 adalah tahapan dari pengujian *hipersensitive response*, bakteri yang sudah terseleksi diremajakan kembali hingga kerapatan 10⁹ CFU/ml, lalu disuntikkan ke daun tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) berumur 2 bulan menggunakan *syringe* 1 ml (tanpa jarum) dan diamati selama 1 minggu.

Gambar 2. Proses tahapan pengujian *Hipersensitive Response* Ket: a: Meremajakan isolat selama 24 jam; b: mempersiapkan bahan dan alat: isolat, tembakau, *syringe* 1 ml dan masker); c: isolat dimasukan ke dalam *syringe* 1ml; d: memasukkan isolat



ke dalam jaringan daun tembakau

c. Pengujian *Haemolysis*

Pengujian ini untuk menguji patogenitas bakteri pada manusia dan hewan. Bakteri ditumbuhkan pada media *Blood Agar* (Difco) yang telah dicampur darah domba 5%. Pengujian menggunakan kontrol positif bakteri patogen pada manusia atau hewan, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu ruang. Adanya zona bening di sekeliling koloni menunjukkan bakteri yang diuji termasuk patogen (Difco, 2009).

d. Pengujian Antagonis

Bakteri-bakteri yang digunakan untuk uji antagonis adalah bakteri yang mampu mendegradasi hidrokarbon. Satu koloni bakteri yang tumbuh terpisah di cawan petri, diambil menggunakan jarum ose dan digoreskan pada media NA yang telah disiapkan. Pengujian antagonis empat isolat bakteri tersebut dilakukan pada media agar (Gambar 3 dan 4). Pengamatan dilakukan setiap hari terhadap koloni bakteri dengan cara melihat pertumbuhan empat bakteri bersama-sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi dan Karakterisasi

Berdasarkan penyeleksian terhadap ke-15 bakteri (Gambar 3) diperoleh tiga bakteri yang paling baik dalam mendegradasi hidrokarbon, yaitu ICBB 7859, ICBB 9461 dan ICBB 5071. Hasil Seleksi bakteri disajikan pada Tabel 1.



Gambar 3. Hasil seleksi bakteri pendegradasi hidrokarbon selama dua minggu

Tabel 1. Hasil Seleksi Bakteri

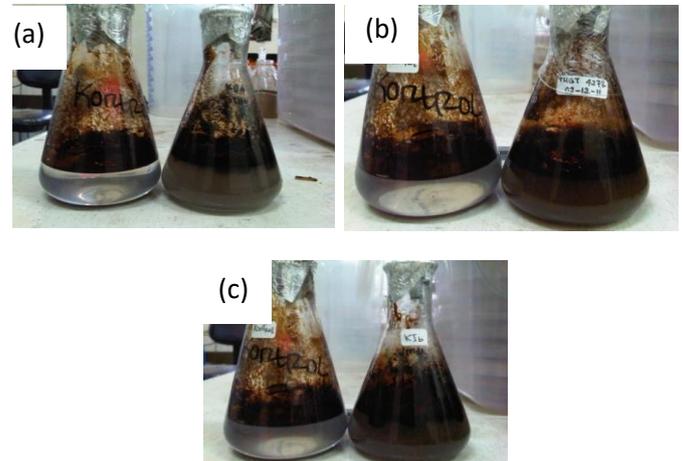
| No | Kode Isolat | Seleksi | No | Kode Isolat | Seleksi |
|----|-------------|---------|-----|-------------|---------|
| 1. | ICBB 9461 | (+) | 9. | ICBB 7802 | (-) |
| 2. | ICBB 9464 | (-) | 10. | ICBB 7859 | (+) |
| 3. | ICBB 9465 | (-) | 11. | ICBB 02 | (-) |
| 4. | ICBB 9466 | (-) | 12. | ICBB 29 | (-) |
| 5. | ICBB 5071 | (+) | 13. | ICBB 30 | (-) |
| 6. | ICBB 9467 | (-) | 14. | ICBB 7856 | (-) |
| 7. | ICBB 7830 | (-) | 15. | ICBB 7866 | (-) |
| 8. | ICBB 7865 | (-) | | | |

Keterangan:

(+): Mampu mendegradasi hidrokarbon

(-): Tidak mampu mendegradasi hidrokarbon

Indikator bakteri yang paling baik dilihat dari kekeruhan media seleksi bakteri dibanding dengan kontrol. Semakin keruh media seleksi bakteri tersebut, hal itu mengindikasikan bahwa bakteri mampu dengan baik mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Ketiga bakteri tersebut disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Bakteri hasil seleksi selama dua minggu, (a) ICBB 7859, (b) ICBB 9461, dan (c) ICBB 5071.

Pengamatan Morfologi bakteri

Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang meliputi warna, bentuk koloni, elevasi (kenampakan dari samping), bentuk pinggir, dan tekstur permukaan seperti ditunjukkan pada Tabel 2.

Isolat ini mempunyai warna koloni putih berpigmen kekuningan, bentuk yang *irregular*, dengan bentuk tepi yang tinggi (*lobate*), elevasi tinggi (*raised*), dan struktur dalam yang kasar dan beraturan. Secara khusus isolat ini berbentuk sel batang dan berujung tumpul yang terkait seperti rantai dengan panjang 3–10 mikron, lebar 1 – 3 mikron, berspora sentral dan tidak bergerak, berkapsul, bersifat Gram positif, berbentuk batang. Isolat ini dapat tumbuh pada kondisi pH 7,0 – 7,4, suhu pertumbuhan 37°C, dan sifatnya aerob sehingga pertumbuhan jarang terjadi jika tidak ada oksigen.

Tabel 2. Morfologi Isolat Bakteri

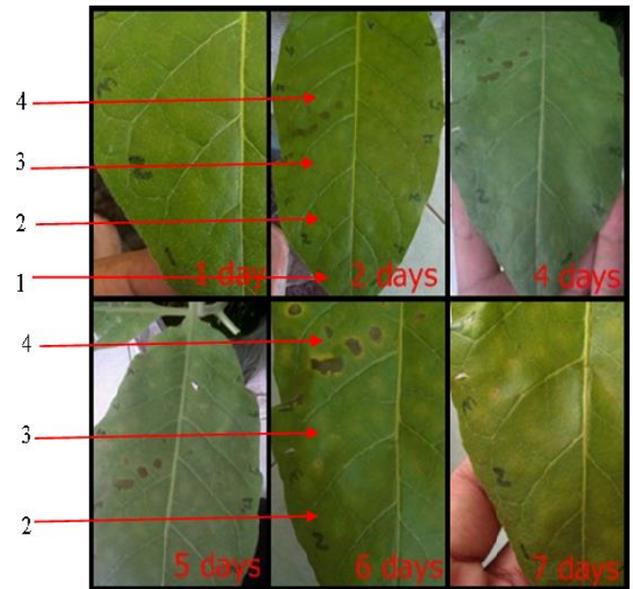
| Isolat | Bentuk | Warna | Tepi | Elevasi | Struktur Dalam |
|-----------|------------------|------------------|---------------|---------------|--------------------------|
| ICBB 7859 | <i>Irregular</i> | Putih Kekuningan | <i>Lobate</i> | <i>Raised</i> | <i>Coarsely Granular</i> |
| ICBB 9461 | <i>Irregular</i> | Putih Kekuningan | <i>Lobate</i> | <i>Raised</i> | <i>Coarsely Granular</i> |
| ICBB 5071 | <i>Irregular</i> | Putih Kekuningan | <i>Lobate</i> | <i>Raised</i> | <i>Coarsely Granular</i> |

Hasil uji *Hipersensitive Response* (HR)

Ketiga bakteri yang sudah terseleksi dilakukan uji *Hipersensitive Response* yang tersaji pada Gambar 5. Ketiga bakteri disuntikkan pada setiap tulang daun dan disimbolkan dengan angka 1, 2 dan 3 dan kontrol bakteri patogen disimbolkan dengan angka 4. Pada hari pertama setelah inokulasi bakteri ke dalam jaringan daun tembakau, belum ada perubahan yang signifikan pada daun yang diinokulasi ketiga bakteri dan pada daun yang diinokulasi bakteri patogen. Pada hari kedua setelah inokulasi sudah ada perubahan pada tulang daun angka 4 yang diinokulasi bakteri patogen sebagai kontrol, dan pada tulang daun 1, 2 dan 3 belum ada perubahan yang signifikan. Perubahan yang terlihat pada tulang daun dengan angka 4 adalah adanya bercak berwarna coklat yang diduga bagian daun sudah terserang patogen yang telah disuntikkan. Pada hari keempat dan kelima perubahan semakin signifikan pada kontrol, bercak tulang daun lebih berwarna coklat kehitaman dan pada tulang daun 1, 2 dan 3 perubahan yang terlihat hanya sedikit.

Pada hari keenam, perubahan warna pada tulang daun yang disuntikkan bakteri 1, 2 dan 3 tidak berbeda nyata dengan warna pada tulang daun 4 yang disuntikkan bakteri patogen. Tulang daun 4 kini sudah mulai berwarna kuning di sekitar warna bercak coklat. Dan pada hari ketujuh, bakteri 1, 2 dan 3 terlihat tidak adanya gejala-gejala yang ditimbulkan oleh adanya patogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Kerr dan Gibb (1977) bahwa apabila bakteri yang diuji berupa bakteri patogen maka akan terjadi nekrosis pada daun tembakau, dimana terjadi hubungan yang compatible antara patogen dan tembakau.

Isolat bakteri 1, 2 dan 3 tidak menunjukkan gejala nekrosis pada daerah suntikan sampai satu minggu setelah perlakuan. Daun hanya menunjukkan kebasah-basahan segera setelah diinfiltrasi inokulum bakteri dan setelah 24 jam, bagian daun tersebut menjadi segar kembali dengan warna hijau seperti semula. Bakteri tidak dapat berkembang di dalam daun tembakau karena sel bakteri incompatible dengan sel daun tembakau. Ini berarti bakteri tersebut bukan merupakan bakteri patogen tumbuhan pada tembakau.

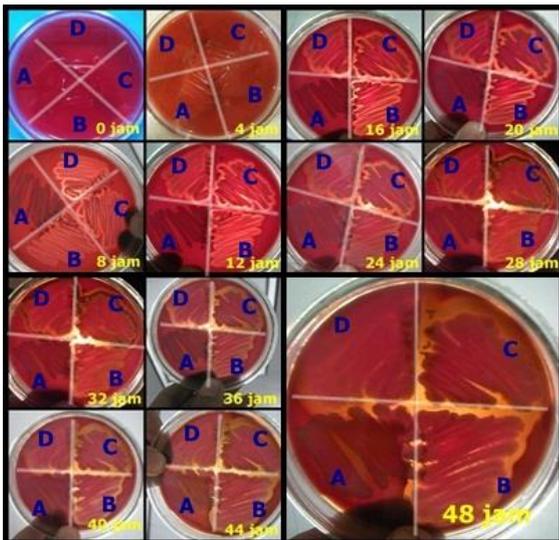


Gambar 5. Hasil uji Hipersensitive Response (HR)

Hasil Uji Hemolisis

Hasil uji hemolisis pada penelitian ini disajikan pada Gambar 6, bila terdapat zona bening di sekeliling koloni, maka bakteri tersebut termasuk patogen karena mampu melisis darah. Menurut Difco (2009), proses lisis sempurna terlihat dari zona yang benar-benar jernih (β -hemolysis), proses hemolisis tidak sempurna memperlihatkan media berwarna kehijauan (α -hemolysis). Proses lisis yang tidak nyata menyebabkan tidak terjadi perubahan warna media (γ -hemolysis). Berdasarkan pada Gambar 6, yang digoreskan pada cawan petri sebanyak 4 isolat bakteri yang terdiri (A) ICBB 7859, (B) ICBB 9461, (C) ICBB 5071 dan (D) *Escherichia coli*.

Hasil inkubasi hingga 4 jam, keempat isolat belum memberikan perbedaan signifikan pada media darah. Pada 8 jam inkubasi, *Escherichia coli* mulai menghemolisis media agar darah sehingga di sekeliling koloni terdapat zona bening. Saat 12-24 jam inkubasi dua isolat bakteri yaitu ICBB 9461 dan ICBB 5071 mulai terlihat zona bening sekeliling koloni seperti isolat *Escherichia coli*.



Gambar 6. Hasil uji hemolisis. (A) ICBB 7859, (B) ICBB 9461, (C) ICBB 5071 dan (D) *Escherichia coli*. Pada saat inkubasi 8 jam, *Escherichia coli* mulai menghemolisis media agar darah sehingga di sekeliling koloni terdapat zona bening. Saat 12-24 jam inkubasi dua isolat bakteri yaitu ICBB 9461 dan ICBB 5071 mulai terlihat zona bening sekeliling koloni seperti isolat *Escherichia coli*. ICBB 7859 hingga akhir inkubasi tidak memperlihatkan tanda-tanda menghemolisis media darah.

Hemolisin merupakan enzim yang bersifat toksik, dapat melisis sel darah merah, berperan dalam meningkatkan permeabilitas sel, sehingga sel lebih rentan terhadap agen infeksi. Menurut Park *et al.* (2004) hemolisin pada *Escherichia coli* berperan sebagai faktor patogenisitas dan merupakan salah satu toksin penting yang dibentuk oleh *Escherichia coli*. Reaksi toksin ini dalam kondisi dingin (pada suhu 4°C) akan meningkat dan dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan meningkatkan hemolisis (Joklik *et al.*, 1992). Hingga masa inkubasi 48 jam, hanya 1 isolat bakteri saja yang tidak dapat melisis darah yaitu bakteri *Bacillus* sp. ICBB 7859. Maka bakteri ini tidak patogen, sedangkan bakteri lainnya adalah patogen.

Uji Antagonis Isolat Bakteri

Pengujian antagonis ketiga isolat bakteri yaitu ICBB 7859, ICBB 9461 dan ICBB 5071 dilakukan dengan metode silang pada cawan petri. Hasil pengujian antagonis tersebut disajikan pada Gambar 7 yang menunjukkan bahwa tidak terjadi aktivitas penghambatan dari pertumbuhan masing-masing bakteri. Hal ini berarti bahwa jika isolat bakteri ditumbuhkan bersamaan dalam satu media maka masing-masing isolat bakteri akan tetap tumbuh dan tidak saling menghambat. Hasil pertumbuhan dari setiap isolat bakteri yang ditumbuhkan bersamaan dalam satu media menunjukkan bahwa interaksi antara isolat bakteri berbeda menunjukkan hasil pertumbuhan yang sama dengan pertumbuhan setiap bakteri secara tunggal dalam media.



Gambar 7. Hasil uji antagonis isolat bakteri

KESIMPULAN

Isolat bakteri ICBB 7859, ICBB 9461 dan ICBB 5071 merupakan isolat-isolat terseleksi yang paling efektif dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon limbah minyak berat baik secara tunggal dan kombinasinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Okoro, C. C. (2010). Microbiological Impacts of Produce Water discharges In Nearshore shallow Marine waters near Chevron's Escravos Tank Farm, Nigeria. *Journal of American Science*, **6**(3), 93-101.
- Matthew, O. (2006). Hydrocarbon degrading potentials of bacteria isolated from a Nigerian bitumen (Tarsand) deposit. *Nat. Sci.*, **4**, 51-57. DOI: 10.1007/s10669-009-9239
- Simons R.A., Saginor. J. (2010). Determining Off-Site Damages to Non-Residential Property from Leaking Underground Storage Tanks Using Contingent Valuation Analysis. *International Real Estate Review*, **13**, 134.
- Manalu, R. T., Napoleon, A., & Hermawan, A. (2016). Eksplorasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Pada tanah Terkontaminasi Minyak Bumi. *Sainstech Farma*, **9**(2).
- Manalu, R. T. (2013). Aplikasi Bakteri Lokal Indonesia dalam Bioremediasi Tanah Terkontaminasi Minyak Berat, Minyak Ringan, dan Limbah Oli Bekas. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Stroud, J., Paton, G., Semple, K., (2007). Microbe aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 1239-1253.
- Difco. (2009). *Manual of Microbiological Culture Media*. Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA (Eds). Ed ke-2. Becton, Dickinson and Company. Maryland.

Park, P.W., T.J. Foster, E. Nishi, S.J. Duncan, M. Klagsbrun, & Y.Chen. (2004). Activation of Syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* α -toxin and β -toxin. *J. Biol. Chem.* **279**(1), 251-2.