

ISOLASI BAKTERI POTENSIAL PENDEGRADASI DIBENZOTIOFENA DARI TANAH TERCEMAR MINYAK BUMI DI BULUH TELANG LANGKAT SUMATERA UTARA

I Putu Hendra Prasetya¹, Ida Bagus Wayan Gunam², Nyoman Semadi Antara²

¹Mahasiswa Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Unud

²Dosen Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Unud

E-mail: prasetyahendra12@gmail.com¹

E-mail koresponden: ibwgunam@unud.ac.id²

ABSTRACT

This research aimed to isolate some of potential bacteria which could degrade dibenzothiophene (DBT). The bacteria were isolated from the soil which has been contaminated by petroleum for many years in Buluh Telang Langkat North Sumatera. This experiment was also conducted to find out the isolate that had the highest degradation rate of DBT. The results showed that the isolated bacteria had a different ability to degrade dibenzothiophene with OD₆₆₀ ranged from 1.100 to 1.137 and the degradation rate ranged from 42.62% to 69.88%. The isolate of LSU20 had the highest ability to degrade DBT. The isolated bacteria which was incubated for 96 hours at 45°C in shaking condition at 150 rpm could degrade 69.88% of 200 ppm DBT in tetradecane.

Keywords: Isolation, biodesulfurization, dibenzothiophene

PENDAHULUAN

Pemanfaatan minyak bumi sebagai bahan bakar akan berbanding lurus dengan pencemaran udara. Pencemaran disebabkan oleh komponen gas, yaitu sulfur oksida (SO_x) serta nitrogen oksida (NO_x) (Yu *et al.*, 2006). Komponen gas tersebut dapat menyebabkan polusi udara dan hujan asam yang akan merusak lingkungan dan gangguan kesehatan (Cahyono, 2007). Menghilangkan kandungan sulfur pada minyak bumi sebaiknya dilakukan sebelum minyak bumi digunakan sebagai bahan bakar (Guerinik dan Mutawah, 2003). Hidrodesulfurisasi merupakan proses yang sering digunakan untuk mengurangi senyawa sulfur pada minyak bumi. Namun, proses ini masih menyisakan sejumlah senyawa sulfur aromatik salah satunya adalah dibenzotiofena (Li *et al.*, 2008). Untuk melengkapi proses hidrodesulfurisasi, telah diupayakan penanganan desulfurisasi secara biologis dengan memanfaatkan aktifitas bakteri sebagai biokatalis yang disebut biodesulfurisasi (Acero *et al.*, 2003).

Senyawa yang dapat digunakan untuk mempelajari biodesulfurisasi adalah dibenzotiofena (DBT). Dibenzotiofena dapat digunakan sebagai model senyawa sulfur aromatik yang terdapat di minyak bumi (Zhongxuan *et al.*, 2002). Dibenzotiofena merupakan komponen sulfur yang paling banyak terkandung dalam bahan bakar fosil yaitu sebesar 70% (Pikoli *et al.*, 2013). Bakteri yang berpotensi mendegradasi senyawa sulfur aromatik minyak bumi kebanyakan tumbuh pada kisaran

suhu 30^oC. Pada penelitian ini diharapkan isolat mampu tumbuh pada suhu 45^oC, bakteri yang mampu tumbuh pada suhu yang lebih tinggi lebih efisien dalam proses biodesulfurisasi.

Bakteri pendegradasi sulfur aromatik dapat ditemukan dengan melakukan isolasi tanah yang telah lama tercemar minyak bumi. Buluh Telang Langkat Sumatera Utara merupakan salah satu daerah penghasil minyak bumi di Indonesia (Anon, 2012). Penelitian Gunam *et al.* (2009) telah mengisolasi bakteri pendegradasi sulfur aromatik minyak bumi dengan mengambil sampel tanah yang telah tercemar minyak bumi di Bojonegoro Jawa Timur.

Berdasarkan hal di atas, diperlukan penelitian untuk mendapatkan bakteri yang berpotensi mendegradasi dibenzotiofena yang diisolasi dari tanah yang tercemar minyak bumi di Buluh Telang Langkat Sumatera Utara. Penelitian juga dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri yang memiliki tingkat degradasi dibenzotiofena tertinggi.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana dan Laboratorium Forensik POLDA Bali dari April hingga September 2015.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah berasal dari sumur minyak bumi di Buluh Telang Langkat Sumatera Utara. Komposisi dari media adalah: KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NH₄Cl, NaCl, MgCl₂.6H₂O, CaCl₂, FeCl₃, CuCl₂.2H₂O, MnCl₂.4H₂O, glukosa (Merck), agarose (Vivantis), aquades, senyawa sulfur aromatik yang telah terkonsentrasi (CA), dibenzotiofena (Aldrich), tetradekana (Merck).

Alat

Peralatan yang digunakan adalah labu takar (Pyrex), labu Erlenmeyer (Pyrex), batang gelas bengkok, jarum ose, cawan petri (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), bunsen, *magnetic stirrer*, *hot plate*, vortex (Barnstead), timbangan analitik (Shimadzu), pipet mikro (Thermo scientific), inkubator (Memmert), *autoclave* (Hirayama), *laminar flow* (Kojair), *waterbath shaker* (Wina), *sentrifuge* (K3 series), pH meter (Schott instruments), UV-Vis spektrofotometer (Thermo scientific), *gas chromatography* (Agilent Technologies), *mass selective detector* (Agilent Technologies), kolom HP 5 MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m; J&W Scientific).

Prosedur Percobaan

Pembuatan Media

Pembuatan media MSSF-CA padat dilakukan dengan melarutkan 11,2 g KH_2PO_4 , 28,85 g Na_2HPO_4 , 10 g NH_4Cl , 0,375 g NaCl , 10,165 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,6746 g CaCl_2 , 1,351 g FeCl_3 , 0,0085 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0495 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1% glukosa, 1% agarose, 0,1% senyawa sulfur aromatik yang telah terkonsentrasi (CA) dalam 1 l aquades. pH media diatur pada kisaran pH $7 \pm 0,02$ dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Media MSSF-CA cair dibuat dengan cara yang sama seperti pembuatan media MSSF-CA padat namun tidak ditambahkan agarose. Media uji MSSF-TD dibuat dengan cara yang sama seperti pembuatan MSSF-CA cair namun tidak ditambahkan CA melainkan ditambah dengan 200 ppm dibenzotiofena yang dilarutkan dalam tetradekana (Gunam *et al.*, 2006; 2013).

Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil di 5 sumur minyak bumi Buluh Telang Langkat Sumatera Utara yang telah tercemar minyak bumi selama bertahun-tahun dan masih aktif.

Isolasi Bakteri

Sampel tanah ditimbang sebanyak 10 g dan dimasukkan ke 90 ml NaCl (0,85%) sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} . Suspensi sampel pada pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke 9 ml NaCl (0,85%) sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} , pengenceran dilakukan sampai pengenceran 10^{-5} . Pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} diambil sebanyak 0,1 ml dipindahkan ke media MSSF-CA padat dan disebar dengan menggunakan batang gelas bengkok dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 96 jam di inkubator (Gunam *et al.*, 2006).

Pemurnian Isolat

Koloni bakteri yang tumbuh secara terpisah dan berbeda secara fisik (bentuk, warna, tepian, ukuran, elevasi) pada tahap isolasi kemudian digores dengan metode gores kuadran. Koloni bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose dan dipindahkan pada media MSSF-CA padat yang baru dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 96 jam di inkubator. Koloni bakteri yang tumbuh terpisah setelah inkubasi dipindahkan ke 5 ml media MSSF-CA cair dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 96 jam di inkubator. Setelah inkubasi, sebanyak 1 ml isolat dipindahkan ke tabung yang telah berisi 1 ml larutan gliserol 40% dan disimpan pada suhu -70°C (sebagai stok kultur) (Gunam *et al.*, 2006).

Seleksi Isolat

Kultur stok isolat diinokulasikan pada 5 ml media MSSF-CA kemudian diinkubasi selama 96 jam dengan digojog pada kecepatan 150 rpm untuk perbanyak sel pertama. Isolat yang tumbuh pada perbanyak sel pertama diinokulasikan pada 150 ml media MSSF-CA cair untuk perbanyak sel kedua dan diinkubasi dengan metode yang sama. Isolat yang tumbuh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit. Sel isolat dicuci dengan menambahkan larutan NaCl 0,85% dan disentrifugasi kembali dengan metode yang sama. Tingkat kekeruhan sel

isolat disamakan sampai absorbansi 5 dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm, selanjutnya sel isolat diinokulasikan sebanyak 0,1 ml pada media uji MSSF-TD. Media uji MSSF-TD tanpa sel isolat dibuat sebagai kontrol. Isolat diinkubasi pada *waterbath shaker* pada suhu 45^oC selama 96 jam dengan digojog pada kecepatan 150 rpm.

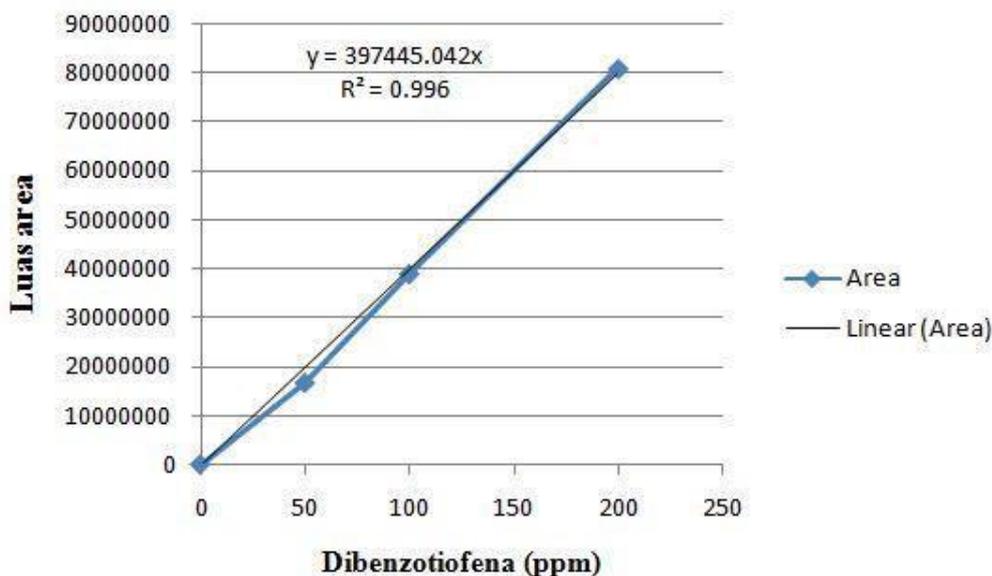
Fase minyak dan fase air setelah inkubasi dipisahkan, fase minyak dianalisis dengan menggunakan kromatografi gas untuk mengetahui tingkat degradasi dibenzotiofena. Fase air dianalisis untuk mengetahui tingkat pertumbuhan dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer (OD₆₆₀) dan pH dianalisis dengan pH meter. Isolat bakteri yang mempunyai tingkat degradasi dibenzotiofena dan tingkat pertumbuhan tertinggi dipilih sebagai isolat potensial (Gunam *et al.*, 2006).

Pengukuran Kadar Dibenzotiofena

Kadar dibenzotiofena setelah inkubasi dianalisis dengan menggunakan kromatografi gas, dengan gas pembawa helium dan dengan pengaturan kondisi antara lain: Suhu injektor diatur pada 250^oC, suhu awal kolom diatur pada 160^oC, laju kenaikan 10^oC/menit dan suhu akhir oven 270^oC dan suhu detektor 230^oC (Gunam *et al.*, 2006 yang dimodifikasi). Konsentrasi standar dibenzotiofena dianalisis terlebih dahulu, sehingga diperoleh kurva standar lalu dibuat persamaan liniernya. Data luas area standar dibenzotiofena disajikan pada Tabel 1 dan kurva linearnya disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Luas area standar dibenzotiofena

| Standar dibenzotiofena (ppm) | Luas Area |
|------------------------------|-----------|
| 200 | 80745935 |
| 100 | 38848655 |
| 50 | 16636244 |



Gambar 1. Kurva linear standar dibenzotiofena

Residu DBT dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standar DBT:

$$y = 397445,042x$$

Keterangan:

y : Luas area sampel

x : Residu DBT (ppm)

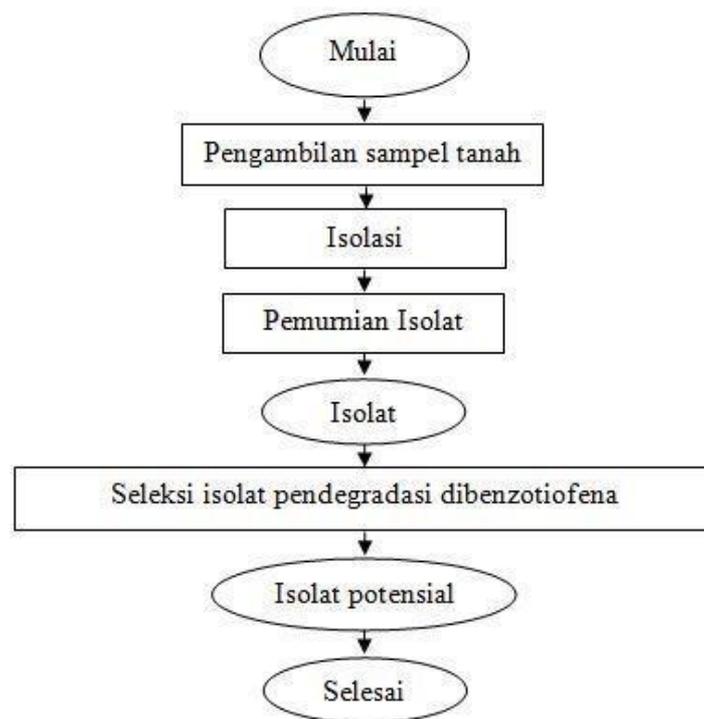
Persentase tingkat degradasi DBT dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Tingkat degradasi DBT (\%)} = \frac{(200 - \text{residu DBT})}{200} \times 100$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dari serangkaian pengujian dianalisis dan dipaparkan secara deskriptif dan data ditampilkan dalam bentuk tabel, gambar maupun foto.

Diagram alir penelitian isolasi bakteri potensial pendegradasi dibenzotiofena dari tanah tercemar minyak bumi di Buluh Telang Langkat Sumatera Utara dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram alir isolasi bakteri potensial pendegradasi dibenzotiofena dari tanah tercemar minyak bumi di Buluh Telang Langkat Sumatera Utara

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri pada media *mineral salt sulfur free* diperkaya dengan senyawa sulfur aromatik yang telah terkonsentrasi (MSSF-CA) didapatkan 25 koloni yang berbeda secara fisik (bentuk, ukuran, warna, tepian dan elevasi) dari 5 sampel tanah yang berasal dari sumur minyak

bumi Buluh Telang Langkat Sumatera Utara. Dari 25 isolat bakteri yang diisolasi, terdapat 3 isolat yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena. Isolat yang dipilih adalah isolat yang memiliki tingkat pertumbuhan $\geq 1,000$ yang dianalisis dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer (OD_{660}). Isolat bakteri yang tumbuh dengan baik pada media uji MSSF-TD mengindikasikan bahwa isolat bakteri dapat menggunakan sulfur yang terdapat pada dibenzotiofena sebagai sumber sulfur untuk pertumbuhannya (Gunam *et al.*, 2009). Gambar koloni bakteri yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena yang tumbuh pada media MSSF-CA disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Koloni bakteri yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena yang tumbuh pada media MSSF-CA padat

Penambahan sulfur aromatik minyak bumi yang terdapat pada sumber isolat dapat mengurangi pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan, sehingga dapat mengindikasikan hanya mikroba yang diinginkan yang dapat tumbuh (Davis *et al.*, 2005).

Pemurnian Isolat Bakteri yang Berpotensi Mendegradasi Dibenzotiofena

Koloni bakteri yang dimurnikan diberikan kode berupa huruf dan angka yaitu LSU01, LSU02, LSU03, LSU04, LSU05, LSU06, LSU07, LSU08, LSU09, LSU10, LSU11, LSU12, LSU13, LSU14, LSU15, LSU16, LSU17, LSU18, LSU19, LSU20, LSU21, LSU22, LSU23, LSU24, LSU25 dan 3 diantaranya merupakan isolat bakteri yang berpotensi mendegradasi dibenzotiofena. Karakteristik koloni bakteri yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena disajikan pada Tabel 2 dan gambar koloninya setelah digores kuadran disajikan pada Gambar 4.

Tabel 2. Karakteristik koloni bakteri yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena yang tumbuh pada media MSSF-CA padat

| Kode Isolat | Karakteristik koloni | | | | |
|----------------|----------------------|--------|-------|--------|---------|
| | Bentuk | Ukuran | Warna | Tepian | Elevasi |
| LSU09 | Bulat | Kecil | Krem | Rata | Cembung |
| LSU15 | Bulat | Besar | Krem | Rata | Cembung |
| LSU20 | Tidak beraturan | Sedang | Putih | Rata | Cembung |

Keterangan: Percobaan dilakukan dengan menginokulasikan isolat pada media MSSF-CA padat dan diinkubasi pada suhu 45^oC selama 96 jam



Gambar 4. Koloni bakteri yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena setelah digores kuadran pada media MSSF-CA padat

Hasil Seleksi Isolat yang Berpotensi Mendegradasi Dibenzotiofena

Data hasil seleksi isolat yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data hasil seleksi isolat yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena

| Kode isolat | Analisis setelah inkubasi | | | |
|-------------|---------------------------|-------------|------------------|---------------------------|
| | OD ₆₆₀ | pH | Residu DBT (ppm) | Tingkat degradasi DBT (%) |
| LSU09 | 1,100 ± 0,001 | 5,14 ± 0,06 | 116,74 ± 4,28 | 42,62 ± 7,71 |
| LSU15 | 1,120 ± 0,037 | 4,88 ± 0,11 | 111,54 ± 6,44 | 44,23 ± 3,22 |
| LSU20 | 1,137 ± 0,019 | 5,15 ± 0,03 | 60,24 ± 2,67 | 69,88 ± 1,33 |
| Kontrol | 0,183 ± 0,001 | 6,70 ± 0,00 | 197,09 ± 0,40 | 1,45 ± 0,20 |

Keterangan: Percobaan dilakukan dengan menginokulasikan isolat pada media MSSF-TD yang mengandung 200 ppm dibenzotiofena yang dilarutkan dalam tetradekana dan diinkubasi pada suhu 45^oC selama 96 jam pada *waterbath shaker* dengan digojog 150 rpm

Tabel 3 menunjukkan bahwa semua isolat mempunyai tingkat degradasi dibenzotiofena yang berbeda. Isolat LSU20 memiliki tingkat degradasi dibenzotiofena tertinggi yaitu sebesar 69,88%, tingkat pertumbuhan sebesar 1,137 dan pH 5,15 pada akhir inkubasi. Bakteri yang diisolasi dari tanah yang tercemar minyak bumi mempunyai daya adaptasi dan dapat menggunakan sulfur yang terdapat pada dibenzotiofena sebagai salah satu sumber nutrisinya untuk kebutuhan tumbuh (Labana *et al.*, 2005; Bahuguna *et al.*, 2011). Bakteri yang dapat mendegradasi dibenzotiofena menghasilkan enzim dszC monooksigenase, dszA monooksigenase serta dszB desulfonase (Calzada *et al.*, 2009).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak bumi di Buluh Telang Langkat Sumatera Utara mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mendegradasi dibenzotiofena. Terdapat 3 isolat

yang berpotensi dapat mendegradasi dibenzotiofena dengan OD₆₆₀ berkisar dari 1,100-1,137 dan tingkat degradasi berkisar dari 42,62-69,88%. Isolat LSU20 mempunyai kemampuan tertinggi dalam mendegradasi 200 ppm dibenzotiofena dalam tetradekana yaitu sebesar 69,88%.

Saran

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui kondisi optimum pertumbuhan bakteri dan pola pertumbuhannya serta kemampuan mendegradasi sulfur pada bahan bakar minyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Acero, J., C. Berdugo and L. Mogollon. 2003. Biodesulfurization process evaluation with a *Gordona rubropertincus* strain. *Ciencia Tecnologia Futuro*. 2: 43-54.
- Aguila, R.A.D., K. Boltes, P. Leton, A. Rodriguez, R. Rosal, J.A. Perdigon and E.G. Calvo. 2007. Biodesulfurization of DBT in model oil by resting cell of *Pseudomonas putida* CECT5279: Process enhancement. *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)*.
- Anonimous. 2012. Sejarah dan perkembangan pertambangan dan industri migas di Langkat. Distamben.langkatkab.go.id. Diakses pada 17 Januari 2015.
- Bahuguna, A., M.K. Lily, A. Munjal, R.N. Singh and K. Dangwal. 2011. Desulfurization of dibenzothiophene (DBT) by a novel strain *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7 isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*. 23(6): 975-982.
- Calzada J., M.T. Zamarro, A. Alcon, V.E. Santos, E. Diaz, J.L. Garcia and F. Garcia-Ochoa. 2009. Analysis of dibenzothiophene desulphurization in a recombinant *Pseudomonas putida* strain. *Applied Environmental Microbiology*. 75: 875-877.
- Cahyono, W.E. 2007. Pengaruh hujan asam pada biotik dan abiotik. *Jurnal Lapan*. 8(3): 48-51.
- Davis, K.E.R., S.J. Joseph and P.H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculums size and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 71: 826-834.
- Guerinik, K. and Muttawah, Q.A. 2003. Isolation and characterization of oil desulphurizing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 19:941-945.
- Gunam, I.B.W., Y. Yaku, Hirano, K. Yamamura, F. Tomita, T. Sone and K. Asano. 2006. Biodesulfurization of alkylated forms of dibenzothiophene and benzothiophene by *Sphingomonas subarctica* T7b. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(4): 322-327.
- Gunam, I.B.W., A.S. Duniaji dan I.G.A.L. Triani. 2009. Biodesulfurisasi Minyak Bumi dengan Menggunakan Bakteri Pendegradasi Sulfur dengan Teknik Sel Terimobilisasi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahap II. Universitas Udayana.
- Gunam, I.B.W., K. Yamamura, I N.S. Sujaya, N.S. Antara, I W.R. Aryanta, F. Tomita, T. Sone and K. Asano. 2013. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives using resting and immobilized cells of *Sphingomonas subarctica* T7b. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(4): 473-482.

- Labana, D., G. Pandey and R.K. Jain. 2005. Desulphurization of dibenzothiophene and diesel oils by bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 40: 159-163.
- Li, G., S. Li, M. Zhang, J. Wang, L. Zhu, F. Liang, R. Liu and T. Ma. 2008. Genetic rearrangement strategy of optimizing the dibenzothiophene biodesulfurization pathway in *Rhodococcus erythropolis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(4): 971-976.
- Pikoli, M.R., P. Astuti, F. Ahmad dan N.A. Solihat. 2013. Pengayaan Bertingkat Dibenzothiophene pada Sampel Tanah Pertambangan Batubara untuk Mengisolasi Bakteri Desulfurisasi. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*.
- Yu, B., C. Ma, W. Zhou, Y. Wang, X. Cai, Q. Zhang., M. Tong, J. Qu and P. Xu. 2006. Microbial desulfurization of gasoline by free whole cells of *Rhodococcus erythropolis* XP. *FEMS Microbiol Lett*. 258: 284-289.
- Zhongxuan, G., L. Huizhou, L. Mingfang, L. Shan, X. Jianmin and C. Jiayong. 2002. Isolation and identification of nondestructive desulfurization bacterium. *Science in China (Series B)*. 45 (5): 521-531.