

PENGARUH PERBEDAAN SUHU DAN SUMBER KARBON PADA PERTUMBUHAN *Pseudomonas* sp. STRAIN LSU20 DALAM MENDESULFURISASI DIBENZOTIOFENA

Muhammad Iqbal¹, Ida Bagus Wayan Gunam², I Wayan Arnata²

¹ Mahasiswa Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Unud

² Dosen Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Unud

Email koresponden: ibwgunam@unud.ac.id

ABSTRACT

Desulfurization of crude oil to be low sulfur fuel content is a main concern by all researcher. *Pseudomonas* sp. strain LSU20 known as one of bacteria which could degrade dibenzothiophene (DBT) on n-tetradecane (TD) oil model. Temperature Growth condition of this bacteria was experimented at 37°C and 45°C. Some carbon sources were also tried in this experiment, such as glucose, sucrose, and citric acid. Using glucose as source of carbon and temperature growth condition at 37°C, the bacteria could degrade 67% (DBT) in TD after 96 hours of incubation. In this condition the bacteria growth could reach OD_{660nm} up to 0,978.

Key: *LSU20, dibenzothiophene, n-tetradecane, biodesulfurization.*

PENDAHULUAN

Minyak bumi adalah salah satu sumber energi yang digunakan untuk proses industri dan transportasi. Penggunaan minyak bumi telah berkembang pesat sejak era industri pada abad ke-19 hingga diawal abad ke-21. Minyak bumi memiliki kandungan senyawa karbon (84-87%), hidrogen (12-14%), serta oksigen dan nitrogen (1-2%), namun kandungan sulfur pada minyak mentah mencapai 3-5% (Anonim, 2015). Kandungan minyak bumi ini sangat berpengaruh besar dalam terjadinya berbagai polusi di bumi termasuk terjadinya hujan asam. Menurut Ying-zi *et al* (2012) hujan asam menyebabkan penurunan durasi elastisitas dan ketahanan pada benda berbahan bebatuan. Tidak hanya itu, hujan asam juga menimbulkan beberapa kerugian pada lingkungan, diantaranya penurunan pH tanah menjadi kurang dari 5,6, dimana penurunan pH tanah menyebabkan kerusakan yang signifikan pada ekosistem dan adaptasi dari beberapa tanaman dan pepohonan (Anonim, 2008).

Salah satu cara pencegahan yang dini dilakukan industri perminyakan adalah dengan menugurangi kandungan sulfur pada minyak bumi melalui teknik hidrodiesulfurisasi (HDS). Namun pada prosesnya HDS tidak selalu mampu mendegradasi senyawa sulfur aromatik heterosiklis yang ditemukan dalam fraksi yang besar. Biaya yang dikeluarkan pada proses HDS sendiri sangat mahal sebab teknik ini membutuhkan suhu dan tekanan yang sangat tinggi (Guerinik dan Muttawah, 2003). Prasetya (2015) telah mengisolasi bakteri yang mampu memanfaatkan sulfur aromatik dibenotiofena (DBT) sebagai sumber sulfur dari tanah tercemar di Langkat sumatera utara. *Pseudomonas* sp. strain LSU20 mampu mendegradasi DBT yang terkandung di dalam model minyak tetradekana (TD).

Berbagai peneliti telah menemukan beberapa bakteri yang mampu mendegradasi DBT pada minyak, diantaranya spesies *Gordona* strain CYKS1 (Rhee et al., 1998), *G. rubropertinctus* strain T08 (Matsui et al., 2001), spesies *Rhodococcus erythropolis* strain sp. IGTS8 (Watkins et al., 2003), dan spesies *Encherichia coli* (Reichmuth et al., 2000). Kondisi pertumbuhan yang berbeda pada setiap bakteri menjadi faktor penentu dalam kemampuan bakteri mendesulfurisasi DBT pada minyak bumi (Gunam et al., 2006). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat desulfurisasi oleh *Pseudomonas* sp strain LSU20 dalam berbagai kondisi jenis suhu pertumbuhan bakteri dan sumber karbon. Selain tingkat desulfurisasi, tingkat pertumbuhan bakteri juga diamati.

METODE PENELITIAN

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri dan Lingkungan Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Tekonologi Pertanian Unud, dan Laboratorium Forensik Polda Bali. Waktu pelaksanaan dari September-Desember 2015.

Bahan dan Alat

Bakteri *Pseudomonas* sp. strain LSU20 didapatkan dari kultur stok Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, yang sebelumnya telah diisolasi dari penelitian sebelumnya oleh Prasetya (2015). Media pertumbuhan selektif MSSF-CA cair memiliki komposisi sebagai berikut; K 2P 4, a2P 4, 4 l, a 1, Mg l2 2 , a l2, Fe l3, u l2 2 , dan Mn l2 2 yang diperoleh dari Merck. Bahan-bahan yang juga digunakan antara lain, glukosa (Merck), gliserol (Merck), sukrosa(Sigma), asam sitrat (Sigma), etanol (Merck), hexane (Wako), HCl (Merck), NaOH (Merck), senyawa sulfur aromatik yang telah terkonsentrasi (CA), dibenzotiofena (Aldrich), dan model minyak tetradekana (Merck).

Peralatan yang digunakan adalah *ice box*, lemari pendingin, *deep freeze refrigerator* (New Brunswick Scientific). tabung reaksi (Pyrex), bunsen, magnetic stirrer, hot plate, labu takar (Pyrex), labu Erlenmeyer (Pyrex), vortex (Barnstead), timbangan analitik (Shimadzu), , laminar flow (Kojair), pipet mikro (Thermo scientific), inkubator (Memmert), autoclave (Hirayama), gas chromatography (Agilent Technologies 6890N) dengan detektor mass selective (Agilent Technologies 5973), kolom HP 5 MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 m; J&W Scientific), *waterbath shaker* (Memmert), sentrifuge (K3 series), UV-Vis spektrofotometer (Thermo scientific), dan pH meter (Schott instruments),

Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan Media selektif non sulfur (MSSF-CA dan MSSF-DBT)

Media pertumbuhan MSSF-CA cair diawali dengan melarutkan 11,4 g K 2P 4, 28,85 ga2P 4, 10 g 4 l, 0,375 ga l, 10,1650 g Mg l22, 3,6746 ga l2, 1,3510 g Fe l3, 0,0085 g u l22 , 0,0495 g Mn l22, pada 1 lieter aquades. Glukosa dengan takaran 1% dari total volume dan 0,005% senyawa sulfur aromatik yang telah terkonsentrasi (CA) dilarutkan bersamaan dengan media.

pH diset pada kisaran pH 7 (pH netral) dan sterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121°C menggunakan *autoclave*. Prosedur pembuatan media uji MSSF-DBT cair sama dengan pembuatan media MSSF-CA cair, CA diganti dengan 1 mL tetradekana yang mengandung 200 ppm dibenzothiopena (Gunam *et al*, 2006; Gunam *et al.*, 2013).

2. Persiapan kultur kerja

Pseudomonas sp. strain LSU20 yang diawetkan pada gliserol stok ditumbuhkan pada 150 mL MSSF-CA. Media diinkubasi pada suhu kamar selama 96 jam dan digojog dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya suspensi sel disentrifugasi (5.000 rpm selama 20 menit, sebanyak 2 kali ulangan pencucian) dan disamakan *Optical Density*-nya (OD) menjadi OD=5 menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660nm (D) (Gunam, 2006).

3. Kondisi pertumbuhan *Pseudomonas* sp. strain LSU20

Kondisi pertumbuhan dari *Pseudomonas* sp. strain LSU20 diperlakukan dengan variasi suhu 37°C dan 45°C, pada pH Media awal 7 dan variasi sumber karbon glukosa, sukrosa, dan asam sitrat. Waktu inokulasi selama 96 jam pada kecepatan rotasi 150rpm menggunakan waterbath shaker. Media MSSF-DBT (5 mL MSSF dan 1 mL TD dengan konsentrasi 200 ppm DBT) digunakan selama penentuan kondisi pertumbuhan bakteri.

4. Variabel yang diamati

Pertumbuhan bakteri dianalisis dengan tingkat kekeruhan (D) (Rastchi, 2004) menggunakan spektrofotometer serta derajat keasaman (pH) (Gunam *et al*, 2006) pada fase air (medium) sesudah dan sebelum proses biodesulfurisasi menggunakan pH meter, dan kadar DBT (Monticello, 2000) pada fase minyak sebelum dan sesudah proses biodesulfurisasi menggunakan GC detektor MS (Araujo, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengaruh Suhu Pertumbuhan Terhadap Degradasi DBT

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya adalah suhu dan sumber karbon. Kebanyakan dari mikroorganisme tumbuh pada suhu yang sama dengan suhu tubuh manusia. Bakteri dapat dibedakan diklasifikasikan sebagai: *psikrofil*, tumbuh pada 0 s.d 25°C; *mesofil*, yang tumbuh pada 25 s.d 40°C; dan *termofil*, yang tumbuh pada 50°C atau lebih (Pelczar, 1986).

Suhu juga mempengaruhi proses desulfurisasi oleh bakteri *Pseudomonas* sp. strain LSU20. Perbedaan suhu mempengaruhi juga tingkat desulfurisasi DBT pada fase minyak, serta aktivitas pertumbuhan dan merubah pH media setelah diinokulasi selama 96 jam menggunakan *waterbath shaker* dengan kecepatan rotasi 150 rpm. Data hasil percobaan dapat dilihat pada Tabel.1.

Tabel.1 Pengaruh perbedaan suhu pada pertumbuhan dan desulfurisasi

Kode	SUHU	Residu	Degradasi (%)	OD _{H0}	OD _{H4}	pH _{H0}	pH _{H4}
LSU20	37°C	86,0	57,0	0,222	0,963	7,04	5,43
	45°C	106,5	46,7	0,211	0,848	7,01	5,51

Keterangan: Ditumbuhkan pada MSSF-DBT (5 mL MSSF dan konsentrasi 200 ppm DBT pada 1 mL TD). Inokulasi selama 96 jam dengan kecepatan rotasi 150 rpm menggunakan *waterbath shaker*. Fase air dianalisis menggunakan spektrofotometer dan pH meter untuk mengukur tingkat pertumbuhan, fase minyak diuji tingkat desulfurisasi DBT menggunakan GC detektor MS.

Terlihat pada Tabel.1 pertumbuhan tertinggi terjadi pada suhu 37°C dengan 0,963 (OD_{660nm}) dan tingkat desulfurisasi DBT sebesar 56%. Pada suhu 45°C pertumbuhan *Pseudomonas* sp. strain LSU20 berada pada 0,848 (OD_{660nm}) mengikuti tingkat desulfurisasi sebesar 46%. Berbagai peneliti telah menemukan bakteri yang mampu mendegradasi DBT pada minyak bumi diantaranya spesies *Gordona* strain CYKS1 (Rhee et al., 1998), *G. rubropertinctus* strain T08 (Matsui et al., 2001), spesies *Rhodococcus erythropolis* strain sp. IGTS8 (Watkins et al., 2003), dan spesies *Encherichia coli* (Reichmuth et al, 2000), yang memiliki suhu optimal pada suhu 30°C.

Pengaruh suhu lingkungan tumbuhnya mikroorganisme jika berada pada tingkat rendah atau <4°C maka suatu mikroorganisme akan berada pada posisi tidak aktif, dan akan aktif kembali seiring meningkatnya suhu lingkungan tumbuhnya (Madigan *et al*, 2012). Berbagai enzim yang aktif pada proses desulfurisasi juga mempengaruhi tingkat degradasi sulfur yang terkandung pada minyak bumi, salah satunya enzim *Bdsb* yang aktif pada suhu 37°C (Ohasiro *et al.*, 2005).

2. Pengaruh Sumber Karbon Terhadap Degradasi DBT

Jenis sumber karbon media yang digunakan oleh *Pseudomonas* sp. strain LSU20 pada percobaan kali ini adalah glukosa, sukrosa, dan asam sitrat. Sumber karbon yang ditambahkan adalah sebesar 1% dari volume total media yang digunakan. Waktu inokulasi yang ditetapkan adalah selama 96 jam dan digojog dengan kecepatan 150 rpm pada *waterbath shaker* pada suhu 37°C. Data hasil perlakuan dapat dilihat pada Tabel.2 dibawah ini.

Tabel.2 Pengaruh perbedaan sumber karbon pada pertumbuhan dan desulfurisasi *Pseudomonas* sp. Strain LSU20

Kode	KARBON	Residu	Degradasi (%)	OD _{H0}	OD _{H4}	pH _{H0}	pH _{H4}
LSU20	Glukosa	65,10525	67,44737477	0,188	0,978	7,06	5,27
	Sukrosa	142,61285	28,69357394	0,120	0,336	7,04	6,5
	As. Sitrat	165,31675	17,3416233	0,119	0,272	7,07	6,85

Keterangan: Ditumbuhkan pada MSSF-DBT (5 mL MSSF dan konsentrasi 200 ppm DBT pada 1 mL TD). Inokulasi selama 96 jam dengan kecepatan rotasi 150 rpm menggunakan *waterbath shaker*. Fase air dianalisis menggunakan spektrofotometer dan pH meter untuk mengukur tingkat pertumbuhan, fase minyak diuji tingkat desulfurisasi DBT menggunakan GC detektor MS.

Terlihat pada Tabel.2 tingkat pertumbuhan tertinggi terjadi pada sumber karbon yaitu sebesar 0,678 (OD_{660nm}) serta tingkat desulfurisasi 67%. Terjadi pertumbuhan pada sumber karbon

sukrosa dan asam sitrat, namun tingkat desulfurisasi pada sumber karbon ini tidak setinggi pada sumber karbon glukosa yaitu hanya mendesulfurisasi sebesar 28% dan 17%. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) terbentuk setelah karbohidrat terkonversi dari glukosa oleh bakteri dan juga berfungsi sebagai sumber energy bagi mikroba (Funke, 2013). Bakteri-bakteri seperti *Sphingomonas* sp (White *et al.*, 1996) dan *R. erythropolis* strain IAWQ (Xu *et al.*, 2009) diketahui mampu mendesulfurisasi DBT pada minyak bumi dengan tingkat pertumbuhan yang cukup baik.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kondisi pertumbuhan terbaik dari *Pseudomonas* sp. strain LSU20 dalam mendesulfurisasi DBT pada minyak bumi adalah pada suhu 37°C dengan sumber karbon glukosa. Pada kondisi ini bakteri *Pseudomonas* sp. strain LSU20 dapat mendegradasi DBT dalam model minyak tetradekana sebesar 67% dan dapat tumbuh sampai tingkat OD_{660m} sebesar 0,978.

Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah dilakukannya perlakuan dengan varian pH, selanjutnya diujikan menggunakan metode *resting cell* dan *immobilized cell*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2008. Energy Futures and Urban Air Pollution: Challenges for China and the US. National Academies Press. Washington, DC. USA.
- Anonim. 2015a. Global Petroleum and Other Liquid. https://www.eia.gov/forecasts/steo/report/global_oil.cfm. Diakses pada 20-4-2016.
- Araujo, H.W. Casullo, M.C.F. Siva, dan C.I.M. Lins. 2012. Oxidation of DBT by *Serratia marcescens* UCP 1549 formed biphenyl as final product. *Biotechnol. for Biofuels* 2012: 31-33.
- Funke, BR, Tortora GJ, dan Case CL. 2013. *Microbiology : An Introduction*. Pearson Publish.
- Guerinik, K, dan Muttawah QA. 2003. Isolation and Characterization of Oil -Desulphurizing Bacteria. *World J. of Microbiol & Biotechnol.* 19: 941-945.
- Gunam, IBW, Yaku Y, Hirano M, Yamamura K, Tomita K, Sone T, and Asano K. 2006. Biodesulfurization of alkylated forms of dibenzothiopena and benzothiophene by *Sphingomonas subarctica* T7b. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 322-327.

- Gunam, IBW, Yamamura K, Sujaya IN, Antara NS, Ayanta NR, Michiko T, Fusao T, Sone T, and Kozo A. 2013. Biodesulfurization of Dibenzothiophene and Its Derivatives Using Resting and Immobilized Cells of "Sphingomonas Subarctica" T7b. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(4): 473–482
- Matsui, T, Onaka T, dan Maharuhasi K. 2001. Benzo[b]thiophene Desulfurization by *G. rubropertinctus* strain T08. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 212-215.
- Madigan, MT, Martinko JM, Stahl DA, dan Clark DP. 2012. *Biology of Microorganism*. Benjamin Cummings, Pearson Ltd. USA.
- Ohshiro, T, Ishii Y, dan Matsubara T. 2005. Dibenzothiophene Desulfurizing Enzymes From Moderately Thermophilic Bacterium *Bacillus Subtilis* WU-S2B: Purification, Characterization and Overexpression. *J. of Biosci. and Bioeng.*, 100(3): 266–273.
- Pelczar Jr, MJ, dan Chan ECS. 1986. *Element of Microbiology*. McGraw-Hill Company/UI-Press. Jakarta, Indonesia.
- Prasetya, IPH. 2015. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Potensial Pendegradasi Dibenzotiofena dari Tanah tercemar Minyak Bumi di Langkat, Sumatera Utara*. Skripsi. Program Studi Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana. Bukit Jimbaran, Badung, Bali. Indonesia.
- Rastchi, M., G.H. Mohebali, dan M.M. Akbarnejad. Analysis of biodesulfurization of model oil system by the bacterium, strain RIPI-22. *Biochem. Eng. J.* 29 (2006): 169–173.
- Reichmuth, DS, Hittle JL, dan Blanch HW. 2000. Biodesulfurization of Dibenzothiophene in *E. Coli* is enhanced by expression of a *Vibrio harveyi* Oxidoreductase Gene. *Biotechnol. And Bioeng.* : 72-79.
- Rhee, SK, Chang JH, dan Chang KY. 1998. Deep Desulfurization of Dibenzothiophene and Diesel Oil by a Newly Isolated *R. erythropolis* Strain XP. *Applied and Environmental Microbiology*: 2327-2331.
- Watkins, LM, Rodriguez R, dan Schneider D. 2003. Purification and characterization of aromatic desulfurase, 2-(20 hydroxyphenyl) benzenesulfinate desulfurase. *Archives of biochemys. and Biophys.* 415: 14-23.
- White, DC dan Sutton S. 1996. *The genus Sphingomonas: physiology and ecology*. Current Biology. Oakland, USA.
- Ying-zi, Zhang, Ying-Fang F, dan Hong-nan L. 2012. Influence of simulated acid rain Corrosion on the Uniaxial Tensile Mechanical Properties of Concrete. *International J. Of Corros.*, h:7-15.