

## PENGUJIAN BAKTERI POTENSIAL PENDEGRADASI *Dibenzothiophene* (DBT) YANG DIISOLASI DARI TANAH YANG TERKONTAMINASI MINYAK BUMI DI SAMBOJA

Bimby Issassam<sup>1</sup>, Ida Bagus Wayan Gunam<sup>2</sup>, dan Ni Made Wartini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Unud

<sup>2</sup>Dosen Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Unud

Email: bimbyissassam1992@gmail.com<sup>1</sup>

Email koresponden: ibwgunam@unud.ac.id<sup>2</sup>

### ABSTRACT

This study aims to determine the dibenzothiophene (DBT) degradation level of four potential sulfur aromatic degrading bacteria. Biodesulfurization activity test was done by using two-phase system. First was water phase which used mineral salt sulfur free (MSSF) medium and the second phase was oil phase which use 200 ppm DBT in n-tetradecane. Isolates were incubated for 96 hours at 37°C and the DBT residu oil phase was analyzed using Gas Chromatography. The experiment was repeated twice. This isolate wa able to degrade DBT in level of 80,82% after 96 hours incubation. The growth of the bacteria in water phase reached OD<sub>660</sub> 1,169.

Keywords: *Dibenzothiophene*, *Biodesulfurization*, *Bacteria Potential*, *SBJ 8*

### PENDAHULUAN

Minyak bumi telah digunakan oleh manusia sejak 5000 tahun SM, produksi dan konsumsi energi primer dunia menunjukkan peningkatan yang tinggi. Penggunaan energi fosil terutama minyak bumi diakui mempunyai manfaat yang luas yaitu sebagai bahan bakar utama pada kehidupan manusia namun juga mempunyai dampak yang negatif yaitu hasil pembakaran dari minyak bumi menghasilkan emisi NO<sub>x</sub> yang dapat menyebabkan iritasi pada mata yang menyebabkan rasa pedih dan berair dan gas belerang oksida atau sering ditulis dengan SO<sub>x</sub> mempunyai sifat reaktif dengan uap udara yang ada di udara untuk membentuk asam sulfat atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Apabila asam sulfat dan asam sulfit turun ke bumi bersama-sama dengan jatuhnya hujan, terjadilah apa yang dikenal dengan *acid rain* atau hujan asam. Hujan asam sangat merugikan kehidupan manusia, hewan, tumbuhan karena dapat merusak tanaman maupun kesuburan tanah dan gangguan kesehatan (Pohan, 2002).

Tingkatan senyawa sulfur organik dalam minyak bumi harus dikurangi, bahan bakar fosil seperti minyak bumi mengandung berbagai senyawa organosulfur heterosiklik, termasuk teralkilisasi bentuk *dibenzothiophene*. Senyawa tersebut adalah senyawa utama sulfur di dalam beberapa jenis minyak mentah yang tidak bisa sepenuhnya didesulfurisasi menggunakan proses katalis kimia Hidrodesulfurisasi. Proses hidrodesulfurisasi sulit dilakukan untuk memisahkan senyawa sulfur aromatik dalam minyak bumi sehingga dilakukan tahapan lanjutan dengan proses

biologi yaitu biodesulfurisasi menggunakan mikroba untuk menghilangkan sulfur aromatik *dibenzothiophene* (Gunam *et al.*, 2013).

Proses Biodesulfurisasi memiliki banyak keuntungan dibandingkan dengan proses fisika dan kimia konvensional, yaitu proses dilakukan dalam kondisi suhu dan tekanan lebih rendah dibandingkan proses HDS dengan tidak ada reaksi produk berbahaya dapat mereduksi sulfur organik (Monticello, 1998).

Hasil penelitian dari (Gunam *et al.*, 2014), menunjukkan bahwa dari puluhan isolat yang diperoleh dari sampel tanah yang terkontaminasi minyak bumi di Samboja Kalimantan Timur berpotensi mendegradasi senyawa sulfur aromatik dari minyak bumi, sepuluh diantaranya memiliki tingkat absorbansi tertinggi pada media uji desulfurisasi. Empat diantaranya berpotensi untuk mendegradasi sulfur aromatik dari minyak bumi yaitu SBJ 4, SBJ 5C, SBJ 8, dan SBJ 10A, dengan suhu 37°C.

Menentukan isolat mana yang paling potensial dalam mendegradasi senyawa sulfur aromatik (*dibenzothiophene*) yang ada pada minyak bumi maka perlu dilakukan sebuah penelitian untuk menguji kemampuan beberapa isolat dalam mendegradasi senyawa sulfur aromatik tersebut.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Laboratorium Forensik, POLDA Bali. Waktu pelaksanaan penelitian mulai Mei sampai Agustus 2015.

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa isolat mikroba pendegradasi sulfur aromatik minyak bumi yang diperoleh dari penelitian sebelumnya yang dikoleksi di laboratorium Mikrobiologi, FTP Unud (diisolasi dari sampel tanah di Desa Samboja, Kabupaten Kutai Kertanegara, Kalimantan). Komposisi dari media adalah  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , glukosa (Merck), agarose (Vivantis), aquades, senyawa sulfur aromatik yang telah terkonsentrasi, *dibenzothiophene* (Aldrich), tetradecane (Merck).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya timbangan analitik (SHIMADZU), pipet mikro (Thermo scientific), inkubator (Mettler), *autoclave* (Hirayama), *laminar flow* (Kojair), *waterbath shaker* (Mettler), *sentrifuge* (K3 series), pH meter (Schott instruments), UV-Vis spektrofotometer (Thermo scientific), *gas chromatography* (Agilent Technologies 6890N), *mass selective detector* (Agilent Technologies 5973), kolom HP 5 MS (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

## Prosedur Percobaan

### Pembuatan Media Pertumbuhan dan Media Uji Degradasi Dibenzothiophene

Media spesifik yaitu *mineral salt sulfur free* diperkaya dengan senyawa sulfur aromatik yang diperoleh dari minyak bumi (MSSF-CA). Pembuatan media selektif MSSF-CA padat untuk pertumbuhan mikroba yang berpotensi mendegradasi dibenzothiophene yaitu dengan melarutkan 11,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 28,85 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,375 g  $\text{NaCl}$ , 10,1650 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3,6746 g  $\text{CaCl}_2$ , 1,3510 g  $\text{FeCl}_3$ , 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, 0,005% senyawa sulfur aromatik yang telah terkonsentrasi (CA). Kemudian diaduk, dan sterilisasi dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Media dinginkan sampai suhu  $\pm 50^\circ\text{C}$  selanjutnya media dituang ke dalam cawan petri.

Pembuatan media MSSF-CA cair sama dengan pembuatan media padat perbedaannya tidak ada penambahan agarose dan menggunakan tabung reaksi, sedangkan pembuatan media uji degradasi dibenzothiophene MSSF-DBT cair sama dengan pembuatan media MSSF-CA cair, perbedaannya CA diganti dengan dibenzothiophene yang dilarutkan dalam tetradecane dengan perbandingan 5 ml MSSF + 1 ml DBT konsentrasi 200 ppm yang dilarutkan dalam tetradecane dan disterilisasi dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit menggunakan *Autoclave*.

### Peremajaan Isolat

Isolat mikroba yang disimpan pada larutan glycerol 40% steril (sebagai kultur stok) diremajakan dengan cara isolat setelah cair dipipet sebanyak 0,1 ml dipindahkan ke cawan petri yang sudah berisi media MSSF-CA steril, dan disebar dengan gelas bengkok, ditutup dan diinkubasikan pada suhu yang sesuai dalam posisi terbalik. Setelah tumbuh koloni yang terpisah dipindahkan dengan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media MSSF-CA cair steril, kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^\circ\text{C}$ .

### Perbanyak Sel dan preparasi sel

Setelah mikroba yang ditumbuhkan pada media cair dalam tabung reaksi tumbuh dengan baik yang ditandai dengan timbulnya kekeruhan, maka selanjutnya dilakukan perbanyak sel secara bertingkat yaitu dengan menumbuhkan kembali pada Erlenmeyer 500 ml yang berisi media MSSF-CA cair dan diinkubasikan pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 96 jam di *waterbath shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Setelah inkubasi sel mikroba dipanen dan disentrifuse pada suhu rendah dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet (sel) dicuci dengan menambahkan larutan  $\text{NaCl}$  0,85% sampai volume tertentu dan disentrifuge kembali dengan metode yang sama. Pelet (sel) di *adjust* OD-nya atau menyamakan tingkat kekeruhannya menjadi OD 5 dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm ( $\text{OD}_{660}$ ) (Ohshiro *et al.*, 1996).

## Seleksi Isolat

Isolat terpilih ditentukan sebagai isolat bakteri potensial pendegradasi dibenzothipohene sampai tingkat tertentu dengan menyamakan tingkat kekeruhan atau jumlah sel isolat dan diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi 5 ml media MSSF cair dan 1 ml DBT dalam *n-tetradecane* (konsentrasi DBT 200 ppm).

Sebelum diinkubasi, tingkat pertumbuhan yang dilihat dari tingkat kekeruhan dengan dianalisis ( $OD_{660}$ ) sebagai pembanding untuk tingkat pertumbuhan isolat setelah inkubasi. Isolat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 96 jam di *waterbath shaker* dengan kecepatan 150 rpm.

Variabel yang diamati yaitu *Optical Density* (OD)/tingkat kekeruhan, derajat keasaman (pH), dan kadar DBT sebelum dan sesudah proses desulfurisasi.

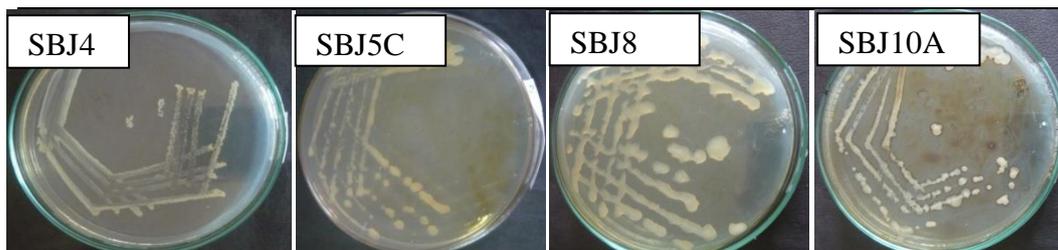
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Seleksi Isolat Potensial

Setiap koloni bakteri hasil isolasi yang mampu tumbuh pada media MSSF-CA selanjutnya di seleksi berdasarkan tingkat absorbansi tertinggi pada panjang gelombang 660nm ( $OD_{660}$ ). Dari 10 isolat yaitu SBJ4, SBJ5A, SBJ5B, SBJ5C, SBJ6B, SBJ7C, SBJ8, SBJ10A, SBJ10B, dan SBJ10C didapatkan 4 isolat yang memiliki kemampuan mendegradasi dibenzothiophene paling potensial yaitu SBJ4, SBJ5C, SBJ8, dan SBJ10A, dan dikarakterisasi. Karakteristik koloni bakteri disajikan pada Tabel 1 dan gambar koloni empat terbaik setelah digores kuadran disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Karakteristik koloni yang tumbuh pada media MSSF-CA

Kode Isolat	Karakteristik koloni				
	Bentuk	Ukuran	Warna	Tepian	Elevasi
SBJ4	Bulat	Kecil	Kuning muda	Rata	Cembung
SBJ5C	Bulat	Besar	Kuning muda	Rata	Cembung
SBJ8	Bulat	Besar	Putih	Rata	Cembung
SBJ10A	Bulat	Sedang	Putih	Rata	Cembung



Gambar 1. Foto isolat 10 terbaik setelah digores kuadran (*quadrant streak*) pada media selektif MSSF-CA.

Tabel 2. Data hasil seleksi isolat pada media MSSF-DBT dengan konsentrasi 200 ppm dibenzothiophene

KODE ISOLAT	OD		pH		Residu dibenzothiophene (ppm)	Tingkat degradasi dibenzothiophene (%)
	RATA-RATA	SD	RATA-RATA	SD		
SBJ4	0,912	0,001	6,45	0,010	104,03	47,98
SBJ5C	0,982	0,033	4,33	0,145	57,53	71,23
SBJ8	1,169	0,007	6,06	0,140	38,34	80,82
SBJ10A	1.119	0.023	5.67	0,065	142,56	28,71

Dari 4 isolat potensial di seleksi tingkat degradasi DBT tertinggi pada media MSSF-DBT dengan konsentrasi 200 ppm yang diinkubasi pada suhu 37°C dengan waterbath shaker berkecepatan 150 rpm selama 96 jam dan fase minyak dianalisis dengan GC disajikan pada Tabel 2. Keempat isolate memperlihatkan tingkat degradasi DBT yang berbeda-beda isolat SBJ8, SBJ5C, SBJ4, dan SBJ10 A mempunyai kemampuan mendegradasi DBT berturut-turut adalah 80,82%, 71,23%, 47,985 dan 28,71%. Isolat SBJ8 merupakan isolat yang mempunyai kemampuan mendegradasi DBT paling tinggi isolate ini juga memperlihatkan pertumbuhan yang paling tinggi diantara isolat lainnya, yaitu mencapai OD<sub>660</sub> sebesar 1,169.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak bumi dari tanah tercemar minyak bumi di Samboja Kalimantan Timur mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mendegradasi dibenzothiophene. Isolat SBJ8 mempunyai tingkat degradasi dibenzothiophene tertinggi yaitu 80,82% dan tingkat pertumbuhan paling tinggi OD<sub>660</sub> sebesar 1,169.

### Saran

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui spesies bakteri SBJ8 dan kondisi optimum pertumbuhan bakteri (suhu dan pH) dan kemampuan mendegradasi sulfur pada bahan bakar diesel.

## DAFTAR PUSTAKA

- Gunam, I.B.W., K. Yamamura, I N. Sujaya, N.S. Antara, W.R. Aryanta, M. Tanaka, 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*. Vol. 23(4): 473–482.
- Gunam, I.B.W., N.S Antara, I W Arnata,. 2014. Pemanfaatan Bakteri Lokal Untuk Biodesulfurisasi Minyak Diesel Sebagai Upaya Memperoleh Energi Fosil Berkadar Sulfur Rendah. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi, Universitas Udayana, Bali
- Monticelo, D J. 1998. Riding the fossil biodesulfurization wave. *Chemtech*. 28(7): 38-45

Ohshiro, T., Aoi, Y., Torii, K. and Izumi, Y. 2002. Flavin Reductase Coupling With Two Monooxygenases Involved In Dibenzothiophene Desulfurization: Purification and Characterization From A Non-Desulfurizing Bacterium, *Paenibacillus polymyxa* A-1. *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 59:649–657.

Pohan N. 2002. Pencemaran udara dan hujan asam. Program Studi Teknik Kimia. Universitas Sumatera Utara. Medan