

Isolasi bertahap dan identifikasi isolat bakteri termofilik pendegradasi minyak bumi dari sumur bangko

Megga Ratnasari Pikoli, Pingkan Aditiawati, dan Dea Indriani Astuti

Jurusan Biologi, Institut Teknologi Bandung, Labtek XI ltn. IV, Jln. Ganesa No 10. Bandung 40132
e-mail: meggapikoli@hotmail.com; pingkan@bi.itb.ac.id; dea@bi.itb.ac.id

Masuk: Februari 2000; revisi masuk: Juni 2000; diterima: Desember 2000

Sari

Telah dilakukan isolasi bakteri termofilik pendegradasi minyak bumi dari Sumur Bangko dengan cara bertahap karena prosedur isolasi biasa belum tentu dapat mengisolasi bakteri pendegradasi secara lengkap. Isolasi tahap I dilakukan langsung dari *crude oil* di dalam medium basal *Stone Mineral Salt Solution* ditambah ekstrak ragi (SMSSe) pada 50°C. Isolasi tahap II dan III dilakukan dari sumber isolat yang sama, medium basal dan kondisi kultur yang sama, tetapi medium pengisolasi diperkaya dengan minyak sisa degradasi (MSD) isolat campuran tahap sebelumnya. Pada tahap I diperoleh 4 isolat, yaitu *Bacillus polymyxa*, *B. licheniformis*, *Bacillus* sp.1, dan *Pseudomonas aeruginosa*; pada tahap II diperoleh 3 isolat, yaitu *Bacillus* sp.2, *B. stearothermophilus*, dan *B. brevis*; sedangkan pada tahap III hanya diperoleh 1 isolat, yaitu *B. coagulans*. Semua isolat ini nantinya digunakan untuk mendegradasi *crude oil*.

Kata kunci : bakteri; degradasi; isolasi; isolasi bertahap; minyak bumi.

Abstract

A sequential isolation and isolate identification of thermophilic oil degrading bacteria from bangko reservoir

A study on the isolation of thermophilic oil-degrading bacteria from the crude oil (petroleum) of Bangko reservoir has been conducted on a sequential way. The conventional isolation procedure did not isolate the bacteria completely. The first isolation stage was performed directly on the crude oil sample by using Stone Mineral Salt Solution plus yeast extract (SMSSe), as basal medium, at 50°C. The second and third isolation stages used the same source, basal medium, and condition as the first stage, but were enriched with a depleted-oil obtained from the crude oil degraded from the previous stage's mixed culture bacteria. Four bacterial isolates were recovered from the first isolation stage, identified as *Bacillus polymyxa*, *B. licheniformis*, *Bacillus* sp.1, and *Pseudomonas aeruginosa*. The second stage gave another three different bacterial isolates, identified as *Bacillus* sp.2, *B. stearothermophilus*, and *B. brevis*; whereas the third stage gave only one isolate namely *Bacillus coagulans*. These isolates could be applied for the degradation of crude oil.

Keywords: bacteria; crude oil; degradation; isolation; sequential isolation.

1. Pendahuluan

Isolasi bakteri dari sumur minyak bumi menghasilkan isolat bakteri pendegradasi minyak bumi yang digunakan untuk meningkatkan perolehan minyak bumi dengan memanfaatkan kemampuan mikroba (MEOR = Microbial Enhanced Oil Recovery). Bakteri pendegradasi minyak bumi ini menghasilkan bioproduk seperti asam lemak, gas, surfaktan, dan biopolimer yang dapat meningkatkan porositas dan permeabilitas batuan reservoir formasi klastik dan karbonat [7]. Pada prinsipnya, MEOR dilakukan dengan meningkatkan jumlah dan kemampuan bakteri *in situ* dan *ex situ* dalam sumur minyak. Isolat hasil isolasi dari sumur minyak juga dikembangkan untuk bioremediasi lingkungan dan limbah minyak bumi, baik

di air maupun di darat, sehingga keberhasilan isolasi bakteri dari sumur minyak secara lengkap sangat dibutuhkan.

Prosedur isolasi bakteri yang lazim dilakukan biasanya hanya dapat mengisolasi bakteri pendegradasi minyak bumi yang mendominasi kultur, yaitu bakteri yang mula-mula menggunakan komponen minyak yang mudah terdegradasi sehingga mampu mencapai konsentrasi sel tinggi dengan cepat. Isolat tersebut biasanya merupakan pengoksidasi alkana normal karena komponen ini mendominasi kebanyakan minyak bumi, lebih mudah larut dalam air, dan terdifusi ke dalam membran sel bakteri [4,6,8]. Bakteri pendegradasi komponen minyak yang lebih sulit didegradasi berjumlah lebih sedikit dan

tumbuh lebih lambat karena kalah bersaing dengan pendegradasi alkana yang memiliki substrat lebih banyak dan lebih mudah didegradasi, sehingga bakteri ini sulit terisolasi. Peran bakteri ini sebenarnya penting dalam melaksanakan degradasi komponen minyak lain yang sulit didegradasi [4].

Bakteri pendegradasi komponen minyak yang sulit didegradasi ini dapat diperoleh dengan memanfaatkan komponen minyak bumi yang masih ada setelah pertumbuhan yang lengkap bakteri pendegradasi awal [3]. Oleh karena itu, untuk memperoleh isolat bakteri yang lebih lengkap untuk menghasilkan degradasi total minyak bumi yang lebih besar, isolasi bakteri pendegradasi minyak bumi dilakukan secara bertahap [4].

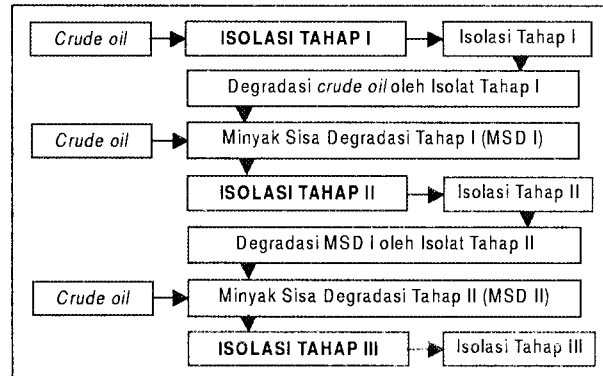
Isolasi bakteri secara bertahap ini telah dilakukan oleh Horowitz (1975) [4] dari minyak bumi dan menghasilkan sejumlah isolat yang bekerja secara bertahap, tergantung pada kemampuannya menggunakan komponen minyak bumi dari yang mudah sampai yang sulit terdegradasi. Isolasi bakteri secara konvensional telah dilakukan dari minyak bumi sumur Bangko pada tahun 1997 dan telah dipastikan bahwa contoh minyak bumi dari sumur Bangko mengandung bakteri yang mampu mendegradasi minyak bumi. Untuk meningkatkan kemampuan degradasinya, dilakukan isolasi bakteri secara bertahap agar diperoleh isolat lain yang berperan dalam rangkaian degradasi selain yang sudah diperoleh dan diketahui urutan kerja dari mikroba hasil isolasi.

2. Metodologi

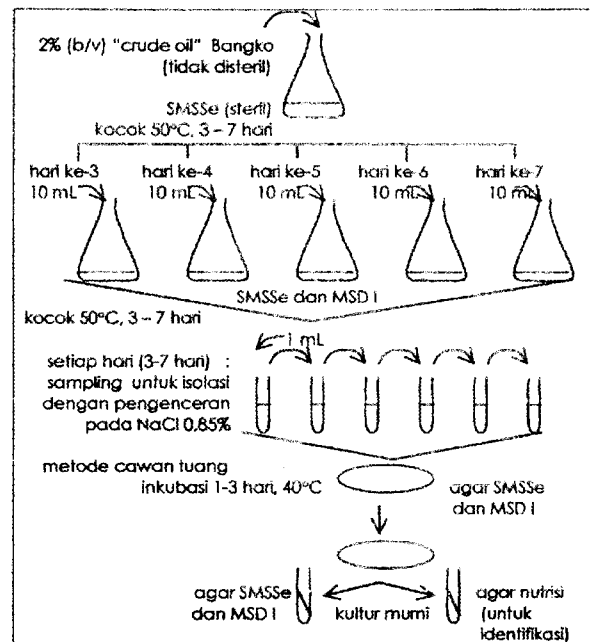
Isolasi dilakukan dalam 3 tahap, dengan menggunakan sampel minyak bumi (*crude oil*) dari sumur Bangko, Sumatera sebagai sumber isolat. Medium basal yang digunakan adalah *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) yang terdiri atas 5 g CaCO_3 ; 2,5 g NH_4NO_3 ; 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,2 g $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan di dalam 1 liter akuades [5]. Ekstrak ragi sebanyak 0,01% (b/v) ditambahkan ke dalam medium SMSS sebagai sumber N dalam bentuk asam amino dan *growth factor* tambahan. Medium SMSS yang mengandung ekstrak ragi ini selanjutnya disebut SMSSe untuk mempermudah penyebutannya. Ke dalam medium tersebut ditambahkan minyak bumi sebanyak 2% (b/v) sebagai sumber karbon. pH medium ini adalah 6,8-7.

Isolasi tahap I didahului dengan pengocokan 2% (b/v) *crude oil* di dalam medium SMSSe selama 7 hari dengan kecepatan 120 rpm. Untuk keperluan isolasi, pengambilan contoh diambil setiap hari, kemudian isolasi dilakukan dengan metode pengenceran. Contoh diambil sebanyak 1 ml untuk dibiakkan di atas lempeng agar SMSSe yang mengandung *crude oil* dengan metode cawan tuang. Setiap koloni yang berbeda dimurnikan kembali pada medium padat yang serupa. Isolasi tahap II

dan III dilakukan dengan prosedur dan kondisi yang sama, tetapi medium pengisolasiannya (SMSSe) diperkaya dengan minyak sisa degradasi (MSD) tahap sebelumnya. Isolasi tahap II menggunakan MSD I, sedangkan isolasi tahap III menggunakan MSD II. Prosedur isolasi bakteri secara bertahap dari minyak bumi secara garis besar diperlihatkan pada gambar 1 dan prosedur pemurnian bakteri tahap I, II, dan III dapat dilihat pada gambar 2. Isolat bakteri yang diperoleh kemudian diidentifikasi melalui pengamatan morfologi koloni, sel, dan sejumlah uji biokimia [2].



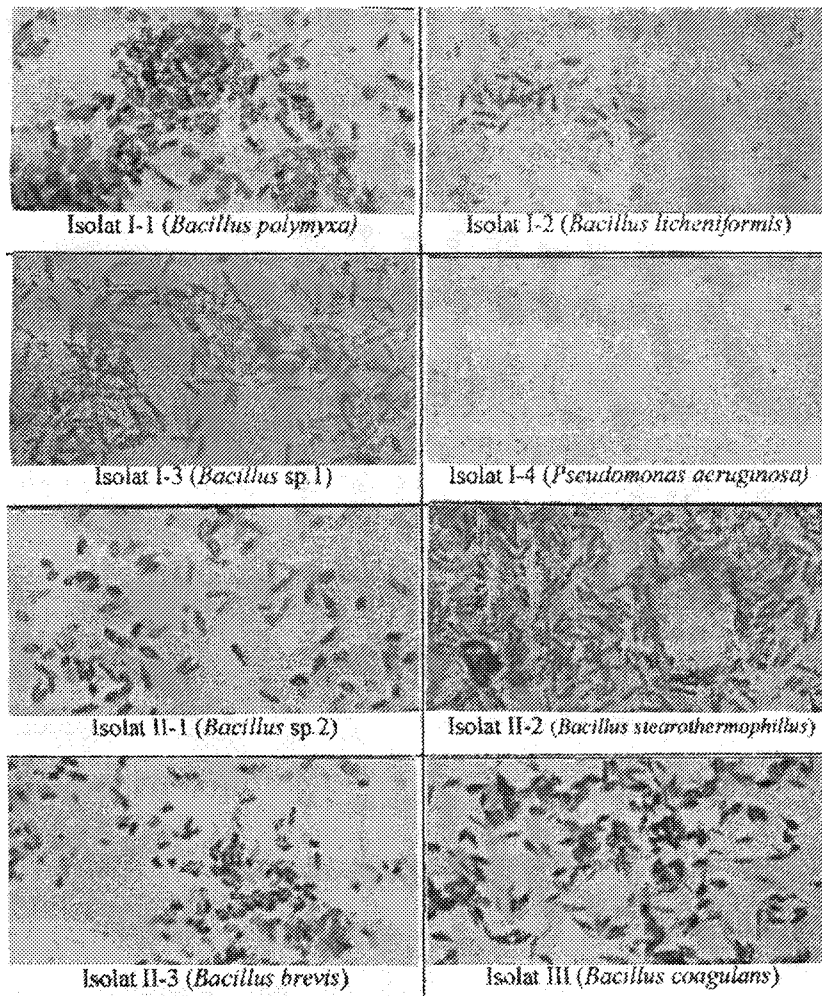
Gambar 1 Bagan prosedur isolasi bakteri secara bertahap dari minyak bumi



Gambar 2 Prosedur isolasi dan pemurnian bakteri tahap I, II, dan III

3. Hasil dan Pembahasan

Isolat bakteri yang diperoleh secara bertahap dari minyak bumi Bangko di dalam medium SMSSe dengan kecepatan pengocokan 120 rpm berjumlah 8 isolat, yaitu 4 isolat dari tahap I, 3 isolat dari tahap II, dan 1 isolat

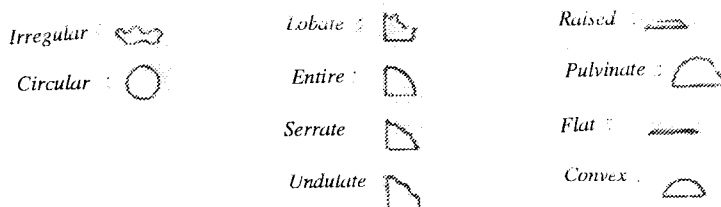


Gambar 3 Foto isolat bakteri pendegradasi minyak bumi (perbesaran 1000x)

Tabel 1 Karakteristik koloni isolat bakteri

Isolat	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna	Permukaan
I-1	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Raised</i>	Kuning	Kasar
I-2	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Raised</i>	Kuning	Kasar
I-3	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Pulvinate</i>	Bening	Mengkilap
I-4	<i>Circular</i>	<i>Serrate</i>	<i>Flat</i>	Hijau	Kasar
II-1	<i>Circular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Raised</i>	Putih	Mengkilap
II-2	<i>Circular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Convex</i>	Putih	Mengkilap
II-3	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Raised</i>	Krem	Kasar
III	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Coklat muda	Mengkilap

Keterangan : Koloni yang diamati adalah koloni yang ditumbuhkan pada agar nutrisi pada suhu 40° C selama 24 jam.



dari tahap III. Isolat yang diperoleh pada tahap I adalah *Bacillus polymyxa* (isolat I-1), *Bacillus licheniformis* (isolat I-2), *Bacillus* sp.1 (isolat I-3), dan *Pseudomonas aeruginosa* (isolat I-4); pada tahap II *Bacillus* sp.2 (isolat II-1), *Bacillus stearothermophilus* (isolat II-2), dan *Bacillus brevis* (isolat II-3); sedangkan pada tahap III hanya diperoleh 1 isolat, yaitu *Bacillus coagulans* (isolat III). Gambar 3 menunjukkan kedelapan isolat tersebut.

Pada Tabel 1 diungkapkan bahwa isolat I-1 dan I-2 tampak serupa, yaitu memiliki bentuk koloni yang tidak beraturan (*irregular*), tepi *lobate*, berwarna kuning, dan permukaan yang kasar, tidak mengkilap. Apabila kedua isolat tersebut diamati secara lebih saksama, terutama bila pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop berlensa obyektif 4 kali, kedua isolat tampak memiliki perbedaan bentuk koloni pada elevasi. Kedua isolat sama-sama memiliki elevasi yang naik (*raised*) mulai dari tepi koloni, tetapi kemudian menurun pada bagian tengah koloni sehingga koloni tampak memiliki lingkaran di tengahnya. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop berlensa obyektif 10 kali menunjukkan lingkaran tengah tersebut merupakan kumpulan titik yang padat berwarna abu-abu dengan latar belakang berwarna kuning seperti warna tepinya. Perbedaannya adalah isolat I-1 memiliki lingkaran tengah yang lebih besar daripada isolat I-2. Pada kultur yang berumur tua (48 jam atau lebih) isolat I-1 memiliki tepi koloni dengan juluran yang lebih panjang daripada isolat I-2 pada umur yang sama. Hal-hal tersebut cukup untuk membuktikan bahwa kedua koloni yang hampir mirip tersebut merupakan dua isolat yang berbeda.

Isolat I-3 dan I-4 memiliki karakteristik koloni yang khas, yang mudah dibedakan dari isolat tahap I lainnya. Koloni dari isolat I-3 tampak bening, mengkilap, dengan tepi yang rata menyerupai tetesan air. Isolat I-4 memiliki karakteristik koloni yang paling mudah dibedakan dari yang lain, yaitu memiliki warna hijau. Sebenarnya koloni isolat I-4 berwarna kuning muda kehijauan pada pengamatan dengan menggunakan mikroskop, namun bila ditumbuhkan pada agar nutrisi, kumpulan koloni dan agar nutrisinya berwarna hijau agak tua. Demikian pula bila isolat I-4 ditumbuhkan di dalam medium SMSSe yang mengandung *crude oil*, kultur tunggal yang berumur 2x24 jam akan menyebabkan warna medium cair itu berwarna hijau kecoklatan.

Crude oil yang digunakan sebagai sumber karbon dalam isolasi tahap I secara langsung telah menyeleksi jenis bakteri pengguna hidrokarbon. Alkana normal dengan panjang rantai C₁₄-C₃₀ merupakan kisaran senyawa yang paling disukai untuk didegradasi oleh bakteri [6]. Oleh karena itu, semua isolat yang diperoleh pada tahap I diduga merupakan bakteri yang memiliki spesifisitas dalam degradasi kelompok senyawa tersebut. Bakteri yang mendegradasi komponen yang sukar didegradasi dalam *crude oil* sulit untuk diisolasi melalui prosedur pada tahap I ini. Hal ini dapat disebabkan oleh pendegradasi komponen minor dalam *crude oil* kalah

bersaing dengan pendegradasi alkana yang lebih mudah didegradasi [4].

Isolasi tahap II dan III ditujukan untuk memperoleh bakteri pendegradasi komponen lain yang tidak dominan di dalam *crude oil* karena peran bakteri ini dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon di alam tetap penting, meskipun jumlahnya sedikit. Pada isolasi tahap II dan III, sumber isolat yang dipakai tetap berasal dari *crude oil*. Di dalam *crude oil* memang terdapat berbagai bakteri pengguna senyawa hidrokarbon yang berbeda, meskipun tidak semuanya dalam keadaan aktif [5].

Pada isolasi tahap II, medium agar SMSSe yang diperkaya dengan minyak sisa degradasi tahap I (MSD I) ditumbuhkan beberapa macam koloni. Koloni yang telah dimurnikan kemudian ditumbuhkan kembali pada lempeng agar nutrisi dan diamati dengan menggunakan mikroskop berlensa obyektif 4 dan 10 kali. Setelah morfologi koloninya dibandingkan dengan morfologi koloni isolat tahap I, baru dapat diyakini bahwa isolat yang berbeda dari isolat tahap I merupakan isolat tahap II.

Pada pengamatan secara sepintas, koloni isolat II-3 menyerupai isolat I-1 dan I-2, yaitu dalam hal bentuk, tepi, elevasi, dan permukaannya. Apabila diamati secara saksama, isolat II-3 berwarna krem, lebih terang daripada isolat I-1 dan I-2 yang berwarna kuning. Isolat II-1 dan II-2 sama-sama memiliki warna koloni putih, tetapi warna putih koloni isolat II-2 cenderung bening. Elevasi pada kedua koloni juga cukup untuk membedakan kedua isolat itu, yaitu koloni isolat II-2 naik membulat atau cembung (*convex*), sedangkan koloni isolat II-1 naik mendatar (*raised*). Koloni isolat II-2 juga menyerupai isolat I-3, tetapi pada pengamatan dengan menggunakan mikroskop berlensa obyektif 4 kali elevasi kecembungan koloni isolat I-3 lebih membulat (*pulvinate*) daripada isolat II-2.

Pada isolasi tahap III hanya 1 jenis isolat yang terisolasi. Medium yang diperkaya dengan MSD II benar-benar selektif mengisolasi isolat tahap III. Isolat ini memiliki karakteristik koloni yang khas, yaitu memiliki warna coklat muda agak transparan, sehingga sangat berbeda dari semua isolat tahap sebelumnya.

Tabel 2 Karakteristik sel isolat bakteri

Isolat	Bentuk	Panjang (µm)	Gram	Letak endospora	Bentuk endospora
I-1	Batang	2 – 2,5	Positif	Terminal	Elips
I-2	Batang	1,5 – 2,3	Positif	Sentral	Elips
I-3	Batang	3	Negatif	Terminal	Elips
I-4	Batang pendek	0,5 – 1	Negatif	Tidak ada	
II-1	Batang	2 – 2,5	Positif	Sentral	Elips-bulat
II-2	Batang	3	Positif	Terminal	Elips
II-3	Batang	1,5 – 2,3	Positif	Subterminal	Elips-bulat
III	Batang	2 – 2,5	Positif	Terminal	Elips

Keterangan : Sel yang diwarnai berumur 24 jam; terminal = di ujung sel; subterminal = di antara ujung dan tengah sel; sentral = di tengah sel; elips = bulat telur.

Tabel 3 Hasil uji biokimia pada isolat bakteri

Uji biokimia	Isolat bakteri hasil isolasi pada suhu 50°C							
	I-1	I-2	I-3	I-4	II-1	II-2	II-3	III
Glukosa	+	+	+	-	-	+	-	+
Laktosa	+	+	+	-	-	+	-	+
Dekstrosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Pati	+	+	+	-	+	+	-	+
Lemak	+	+	-	+	-	-	+	-
Kasein	+	+	-	+	-	-	+	-
Gelatin	-	+	-	+	+	-	-	+
TSIA	Asam	Asam	Asam	Alkali	Alkali	Asam	Alkali	Asam
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	+	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	+	-
S. Sitrat	-	-	-	+	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilitas	+	-	-	+	-	+	+	-
Nitrat	+	+	-	+	-	-	+	-
Reaksi Litmus	Asam	Reduksi litmus	Asam, gas, reduksi dan curd	Proteolisis	Asam	Tidak berubah	Reduksi litmus	Asam, gas, reduksi dan curd

Keterangan : Suhu pengujian 40°C selama 24-48 jam; + = hasil reaksi positif; - = hasil reaksi negatif sesuai dengan prosedur uji biokimia secara mikrobiologis (2). Curd = dadih yang terbentuk karena presipitasi kasein di dalam susu.

Pengamatan selanjutnya dilakukan pada karakteristik sel setiap isolat, yaitu melalui preparat yang terlebih dahulu diwarnai. Pengamatan pada semua preparat (Tabel 2) menunjukkan bahwa semua isolat merupakan bakteri batang. Hampir semua isolat merupakan bakteri Gram positif. Isolat I-4 tampak sangat berbeda dari isolat lainnya karena merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek, tidak memiliki endospora, dan berukuran sangat kecil, bahkan hampir menyerupai kokus.

Isolat pada semua tahap memiliki endospora, kecuali isolat I-4. Sel Gram positif berspora tersebut diisolasi secara aerob; jadi, genus bakteri berspora ini adalah *Bacillus*. Isolat I-3, meskipun terwarnai Gram negatif, tetap merupakan *Bacillus* karena cukup memenuhi ciri-ciri penting *Bacillus*. *Bacillus* merupakan bakteri berbentuk batang, memiliki endospora, dan merupakan satu-satunya bakteri batang yang aerob, sedangkan golongan Bacillaceae batang berspora lainnya bersifat mikroaerofilik (*Sporolactobacillus*) atau anaerob (*Clostridium*) [1].

Hasil uji biokimia yang diperlihatkan pada Tabel 3 memperkuat dugaan bahwa kedelapan isolat merupakan spesies yang berbeda-beda. Setiap mikroba memiliki karakteristik biokimia tersendiri yang disebut *biochemical fingerprints*. Perangkat ini dikendalikan oleh aktivitas enzimatis sel dan bertanggung jawab dalam biosintesis dan biodegradasi [2].

Dua isolat bakteri dari genus *Bacillus*, yaitu I-3 dan II-1, belum berhasil diidentifikasi sampai spesies. Enam dari kedelapan isolat telah berhasil diidentifikasi sampai spesies berdasarkan perbedaan karakteristiknya, terutama dari hasil uji biokimia, yang berpanduan pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [1].

4. Kesimpulan

Isolat bakteri yang diperoleh dari minyak bumi Sumur Bangko yang diisolasi secara bertahap dengan menggunakan medium SMSSe (*Stone Mineral Salt Solution* yang mengandung ekstrak ragi) adalah *Bacillus polymyxa*, *B. licheniformis*, *Bacillus* sp.1, dan *Pseudomonas aeruginosa*, dari Tahap I; *Bacillus* sp.2, *B. stearothermophilus* dan *B. brevis* dari Tahap II; dan *B. coagulans* dari Tahap III. Terisolasinya jenis bakteri yang berbeda pada setiap tahap isolasi menunjukkan bahwa semua isolat bakteri yang diperoleh memiliki kemampuan menggunakan komponen yang berbeda di dalam *crude oil*.

5. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada URGE dan Center Grant Jurusan Biologi ITB 1997/1998 atas bantuan biaya penelitian.

6. Daftar Pustaka

1. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The William and Wilkins Co., Baltimore, 529-550 (1974).
2. Capuccino, J.G. & Sherman, N., *Microbiology: A Laboratory Manual*, The Benjamin/ Cummings Publishing Co., Inc., California, 19-179 (1987).
3. Harayama, S., Sigiura, K., Asaumi, M., Shimauchi, T., Goto, M., Sasaki, S. & Ishihara, M., Biodegradation of Crude Oil, dalam *Program and Abstracts in the First Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference*, Shimizu, Shizuoka, Japan, 19-24 (1995).
4. Horowitz, A., Gutnick, D. & Rosenberg, E., Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil, *Appl. Microbiol.* **30**(1), 10-19 (1975).
5. Sharpley, J.M., *Elementary Petroleum Microbiology*, Gulf Publishing Company, Texas, 65-95, 115-117 (1966).
6. Sigiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T. & Harayama, S., Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil, *Environ. Sci. Technol.* **31** (1997), 45-51.
7. Turner, R.S., Microbial Enhanced Oil Recovery from Carbonates Reservoirs, *Geomicrobiol. J.*, **9**, 169-195 (1991).
8. Walker, J.D. & R.R. Colwell, Microbial Petroleum Degradation: Use of Mixed Hydrocarbon Substrates, *Appl. Microbiol.* **27**(6), 1053-1060 (1974)