



**PERTUMBUHAN KULTUR KONSORTIUM DALAM MINYAK SELAMA BIODEGRADASI DI BAWAH KONDISI AEROB**

**GROWTH CONSORTIUM CULTURE IN OIL DURING BIODEGRADATION UNDER AEROBIC CONDITION**

<sup>1,2</sup>Marlinda Nilan Sari Rangkuti, <sup>3</sup>Palsan Sannasi, <sup>4</sup>Sahilah Abdul Mutalib

<sup>1</sup> School of Environmental Science and Natural Resources, Faculty of Science and Natural Resources, The National University of Malaysia, Bangi 43600, Selangor, Malaysia  
Email: marlinda@unimed.ac.id

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Medan, Medan 20221

<sup>3</sup> Faculty of Agro Based Industry, University Malaysia Kelantan, Kampus Jeli 17600, Kelantan, Malaysia

<sup>4</sup> School of Chemical Science and Food Technology Pusat Sains Kimia Dan Teknologi Makanan, The National University of Malaysia, Bangi 43600, Selangor, Malaysia

**ABSTRACT**

This study reported the ability of the Consortium Culture (5% v/v) was grown in minimum salts medium (MSM) with the addition of 1% (v / v) crude oil, at different incubation times (0, 2, 4, 6 and 8 weeks). The Consortium Culture (CC) can live and use crude oil as the sole source of carbon and energy. The analysis result shows that the highest percentage of biodegradation is at the second week with the percentage of hydrocarbon residue of 42% and it has been used up in the eighth week. These results indicate that the consortium culture can be utilized as a biodegradation agent and this phenomenon can used to enhance the bioremediation ability of the petroleum hydrocarbon polluted environment.

**Keywords :** *Consortium Culture, hydrocarbon, Biodegradation, Growth*

**Pendahuluan**

Salah satu masalah lingkungan saat ini adalah kontaminasi hidrokarbon minyak mentah yang dihasilkan dari kegiatan industri petrokimia. Serta produk minyak yang dilepaskan ke lingkungan apakah yang disengaja atau tidak disengaja menjadi perhatian khusus juga. Minyak mentah adalah campuran kompleks yang terutama terdiri dari berbagai hidrokarbon jenuh dan aromatik.

Komponen hidrokarbon telah dikenal sebagai polutan organik karsinogenik dan neurotoksik. Metode mekanik dan kimia umumnya digunakan untuk menghilangkan pencemaran minyak mentah dari lingkungan yang

terkontaminasi cukup efektif tetapi terbatas dalam hal penggunaan dan biaya yang dibutuhkan mahal.

Bioremediasi adalah pendekatan teknologi yang menjanjikan untuk pemulihan lingkungan yang terkontaminasi karena biaya efektif dan akan menghasilkan mineralisasi lengkap. Fungsi bioremediasi pada dasarnya adalah biodegradasi, yang menyelesaikan mineralisasi kontaminan organik menjadi karbon dioksida, air, senyawa anorganik, protein, dan sel atau transformasi kontaminan organik kompleks dengan senyawa organik sederhana lainnya oleh agen biologis seperti mikroorganisme. Hidrokarbon di lingkungan biasanya terdegradasi oleh bakteri, ragi, dan jamur.

Banyak mikroorganisme asli dalam air dan tanah mampu mengurangi kontaminasi hidrokarbon. Efisiensi biodegradasi yang telah dilaporkan antara 6% (Jones dkk., 1970), 82% (Pinholt dkk., 1979) untuk jamur tanah; 0,13% (Jones dkk., 1970), 50% (Pinholt dkk., 1979) untuk bakteri tanah; dan 0,003% (Hollaway dkk., 1980), 100% (Philip & Stuart, 1974) untuk bakteri laut. Beberapa ilmuwan melaporkan bahwa populasi campuran dengan kapasitas enzimatis yang luas diperlukan untuk mengurangi campuran kompleks hidrokarbon seperti minyak mentah di tanah (Bartha & Bossert, 1984), air tawar (Cooney, 1984), dan lingkungan laut (Atlas, 1985 dan Floodgate, 1984).

Bakteri adalah agen yang paling aktif untuk mendegradasi polusi minyak, dan mereka bekerja sebagai pengurai utama tumpahan minyak pada lingkungan (Rahman dkk., 2003 & Brooijmans dkk., 2009). Yakimov dkk., 2007, melaporkan bahwa beberapa bakteri bahkan dikenal secara khusus "memakan" hidrokarbon. Tahta-Holst, 2007 menemukan bahwa *Acinetobacter* sp dapat menggunakan rantai panjang *n*-alkana C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis (1) kemampuan Konsortium Kultur untuk hidup dan berkembang biak dalam medium garam minimum (MSM) yang ditambahkan dengan minyak mentah dan (2) kemampuan Konsortium Kultur untuk mendegradasi hidrokarbon minyak mentah dalam kondisi aerobik.

## Bahan Dan Metode

### Sumber Mikroorganisme

Konsorsium Kultur terdiri dari enam kultur bakteri Gram-negatif (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Flavobacterium* sp., *Chryseomonas* sp., *Xanthomonas* sp., dan *Agrobacterium* sp.) Dan tiga bakteri Gram-positif (*Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp. dan *Micrococcus* sp.).

### Sumber Minyak Mentah

Minyak mentah diperoleh dari ExxonMobil Oil Refinery, Port Dickson, Negeri Sembilan, Malaysia.

### Media Dan Persiapan Inokulum

Inokulum KK disiapkan dalam nutrient broth (NB), sebagai media pertumbuhan kultur. Waktu inkubasi yang diperlukan untuk mencapai OD<sub>600</sub>, 0.5 (2.5×10<sup>8</sup> cfu/mL) adalah antara 8-12 jam,

itu adalah waktu optimal untuk mentransfer KK (5% v/v) ke medium garam minimum (MSM).

### Pertumbuhan KK Dalam Minyak Mentah

Sejumlah 5% (v/v) KK dari kultur semalaman dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer (250 ml) yang mengandung 100 ml medium MSM steril (Abu-Ruwaida dkk, 1991; Rahman dkk, 2002) ditambahkan dengan 1% (v/v) minyak mentah, sebagai sumber karbon tunggal untuk uji biodegradasi. Selanjutnya set labu Erlenmeyer ditempatkan dalam shaker dengan putaran (200 rpm) pada 29 ± 2°C (untuk meniru suhu ruangan) selama delapan minggu. Pada setiap interval waktu 2 minggu, 2.0 ml kultur diambil dari masing-masing set labu Erlenmeyer.

Pertumbuhan KK diamati dengan menggunakan teknik spread plate dan dilaporkan sebagai jumlah unit koloni yang terbentuk per mililiter (cfu/mL).

### Analisis struktur populasi KK dengan mikroskop elektron pemindai (SEM)

Sebanyak 1 mL kultur semalaman dipindahkan ke dalam tabung ependorf sebelum disentrifuse (Hettich Mikro-12-24 Zentrifugen) pada pusingan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dikeluarkan dan pelet dimasak dengan air suling terionisasi dan disentrifuse kembali. Langkah ini diulangi lagi 2-3 kali untuk membersihkan pelet sel daripada semua sisa medium. Biomassa kemudian diendapkan di dalam 0.5-1 mL air suling terionisasi. Alikuot sampel (100 µL) diletakkan ke atas membran filter Whatman (diameter 25 mm dan ukuran lubang 0.22 µm) yang dilekatkan pada potongan Aluminium (Al) dan dikeringkan pada suhu 35 °C semalaman. Potongan ini kemudian dilakukan percikan salutan (sputter coater, SC500) dengan pancaran gas Ar pada tekanan 0.1-0.5 torr selama 1 menit dan disalut dengan emas (Au) setebal 2 µm selama 1.5 menit pada suhu 26 °C. Sampel kemudian diamati dengan alat SEM (Philips XL30 Series) yang beroperasi pada arus 20 kV.

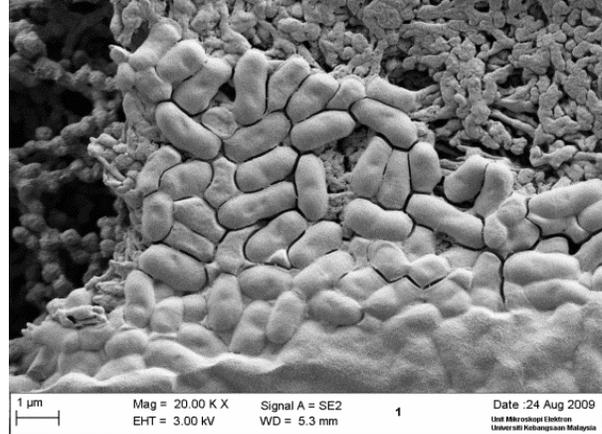
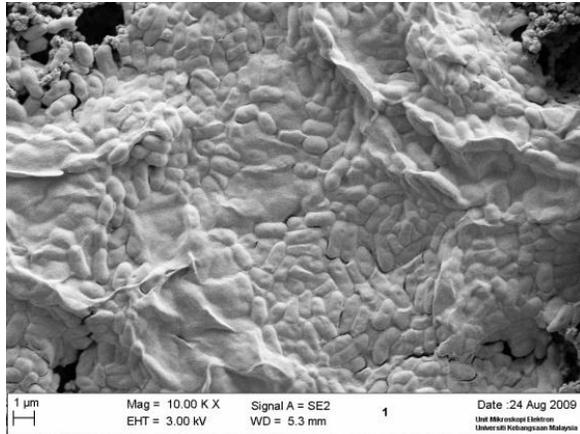
### Ekstraksi Minyak Mentah Untuk analisis GC-FID

Pada setiap interval waktu dua minggu, 50 ml sampel diambil dari setiap set labu Erlenmeyer untuk mengekstraksi sisa minyak mentah. Selanjutnya, sampel dituangkan ke dalam corong pisah, 30 mL *n*-heksana ditambahkan (EPA, 1999) dan minyak mentah sisa dalam sampel diekstraksi dengan menggoncang corong pemisah dengan penuh kuat selama 2 menit. Kemudian sampel

dibiarkan selama 15 menit untuk memungkinkan pemisahan fasa organik dari fasa cair. Lapisan cairan dipindahkan dari corong pisah dan lapisan organik dipindahkan ke tempat lain. Proses ekstraksi diulang dua kali, setiap proses ditambahkan dengan 30 mL *n*-heksana untuk memastikan ekstraksi lengkap dari sisa minyak mentah.

Ekstrak yang diperoleh kemudian dikumpulkan dalam labu alas bulat dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* (EYERLAN-1000, Jepang) dalam penangas air dengan suhu 60°C. Residu minyak mentah kemudian dilarutkan dengan menambahkan 1.0 mL *n*-heksana untuk analisis GC-FID. Satu mikroliter dari ekstrak minyak mentah dianalisis pada 30 m kolom kapiler poli dimetil siloxane (HP1) dalam kromatografi gas kapiler (Agilent-Auto System) yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala (FID) menggunakan perangkat lunak HP Chemstation. Suhu oven awal ditetapkan pada 30°C dan meningkat 4°C pada tingkat min<sup>-1</sup> hingga 300°C sebagai suhu akhir (Hamzah dkk., 2010). Degradasi diperkirakan sebagai perbedaan antara konsentrasi hidrokarbon awal dan akhir dalam sampel.

### Analisis Data Statistik



Gambar 1 Hasil mikroskop elektron pemindai (SEM) menunjukkan KK dalam minyak mentah (a. Pembesaran 10.000 x) (b. Pembesaran 20.000 x).

Pada grafik 1 menunjukkan kemampuan KK 5% (v/v) untuk tumbuh dalam medium garam mineral dengan tambahan minyak mentah 1% (v/v) sebagai sumber karbon tunggal. Populasi KK meningkat secara bertahap selama minggu kedua hingga minggu keempat, tetapi setelah minggu

Data dianalisis dengan menggunakan analisis varian satu arah (ANOVA) dengan uji perbandingan ganda Tukey-HSD. Semua tes dilakukan rangkap tiga dan nilai min dilaporkan.

### Hasil Dan Pembahasan

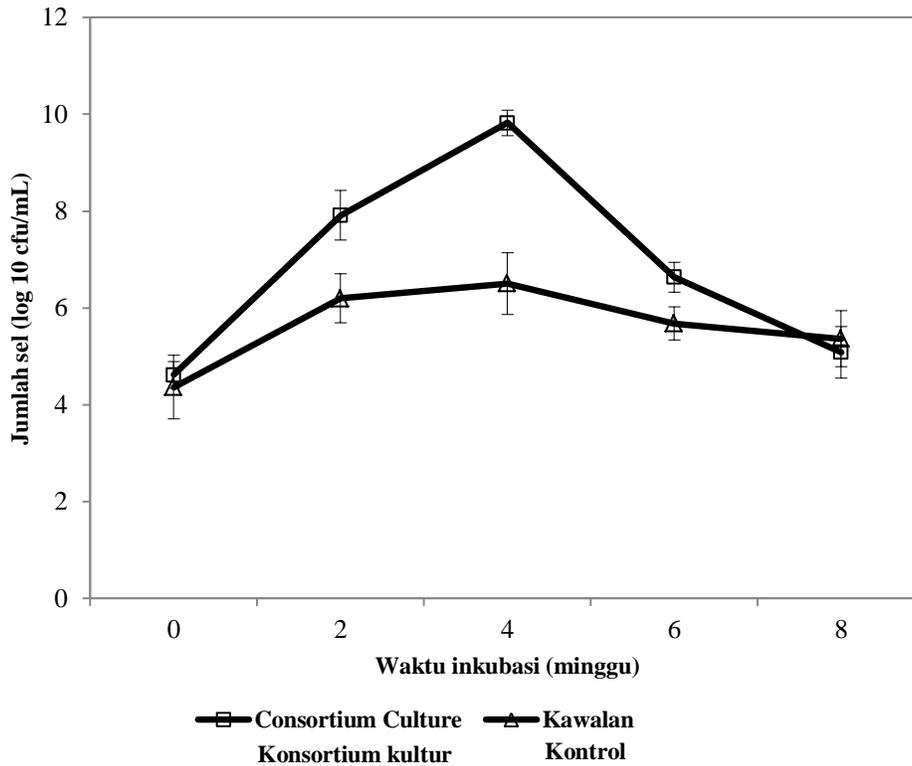
Degradasi cepat dan sempurna dari mayoritas polutan organik umumnya terjadi dalam kondisi aerobik. Serangan intraseluler awal terhadap pencemar organik adalah proses oksidasi dan aktivasi, dan penambahan oksigen sebagai kunci dari reaksi enzimatik dikatalisis oleh oksigenase dan peroksidase. Degradasi hidrokarbon minyak bumi dapat dimediasi oleh sistem enzim tertentu. Mekanisme lain yang terlibat adalah (1) adhesi sel mikroba ke substrat dan (2) biosurfaktan (Hommel, 1990).

Melalui pengamatan dengan menggunakan mikroskop elektron scanning (SEM) menunjukkan bahwa KK dapat hidup dan berkembang dalam medium MSM yang ditambahkan dengan minyak mentah (Gambar 1). Ini juga menunjukkan bahwa KK membentuk interaksi ikatan ion dengan minyak untuk menggunakannya sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi.

keenam hingga minggu kedelapan populasi KK menurun. Hasil ini menunjukkan kemampuan KK untuk memanfaatkan minyak mentah sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi untuk perkembangbiakan.

Tidak ada fase lag yang diamati, itu menunjukkan kemampuan KK untuk tumbuh, beradaptasi dalam minyak mentah dan memanfaatkan hidrokarbon sebagai sumber karbon tunggal sangat cepat. Pada grafik 1 juga menunjukkan peningkatan yang signifikan ( $p < 0,05$ )

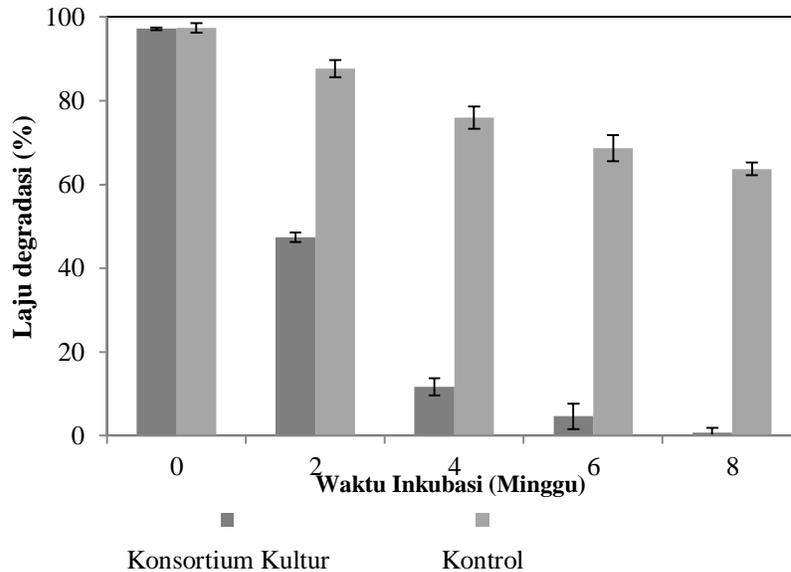
total koloni yang layak, dari  $3 \times 10^5$  (cfu/mL) pada hari pertama hingga  $4 \times 10^7$  (cfu/mL) pada minggu kedua dan mencapai maksimum  $7 \times 10^9$  (cfu/mL) pada minggu keempat. Total populasi menurun pada  $5 \times 10^6$  (cfu/mL) setelah minggu keenam dan menurun lebih lanjut dalam minggu kedelapan.



Grafik 1 Perbandingan pertumbuhan KK (5% (v/v) dalam medium garam minimum (MSM) dengan penambahan 1% (v/v) minyak bumi dan kontrol (cfu/mL) selama proses biodegradasi hidrokarbon minyak mentah dalam kondisi aerobik. Titik data mewakili rata-rata tiga tabung replikasi, sedangkan bar kesalahan mewakili standar deviasi.

Aktifitas biodegradasi (Grafik 2) dibaca pada 52% pada minggu 2 dan meningkat menjadi 100% dalam minggu 8. Hasil ini mirip dengan hasil penelitian sebelumnya, misalnya, Zhang dkk., (2005) melaporkan minyak mentah lebih dari 58% terdegradasi oleh *Pseudomonas aeruginosa*. Degradasi oleh mikroba dipengaruhi oleh komposisi

minyak, beberapa minyak terdegradasi lebih lengkap daripada yang lain (Hamzah et al. 2010). Terjadi penurunan pertumbuhan KK setelah minggu ke 6 hingga minggu ke 8 hal ini terjadi karena menipisnya persediaan minyak mentah sebagai sumber karbon tunggal di dalam medium garam minimum.



Grafik 2 Perbandingan hidrokarbon minyak mentah sisa dalam medium MSM dengan penambahan KK dan kontrol. Data mewakili rata-rata tiga replikasi labu Erlenmeyer, sedangkan bar kesalahan mewakili standar deviasi.

Kemampuan KK untuk hidup dan sepenuhnya mengurangi minyak mentah dalam waktu delapan minggu menunjukkan bahwa KK dapat bertahan hidup dalam minyak mentah setelah inokulasi. pH 7 digunakan dalam penelitian ini sebagai pH optimal, yang selain pH optimal dapat merusak kemampuan populasi mikroorganisma untuk mendegradasi hidrokarbon (Rahman dkk, 1999; Meredith dkk., 2000). Kelangsungan hidup mikroorganisme setelah diinokulasi dalam media yang mengandung minyak mentah telah terbukti menjadi faktor utama dalam memastikan tingkat biodegradasi hidrokarbon di tanah atau di air (Ramos dkk, 1997).

Komposisi konsorsium mikroba merupakan faktor penting untuk memastikan peningkatan sinergisme dalam aktivitas katabolik. Haramaya dkk., (1997) melaporkan bahwa konsorsium kultur mikroba menunjukkan laju aktivitas biodegradasi lebih tinggi bila dibandingkan dengan kultur murni *Acinetobacter* saat digunakan untuk mendegradasi minyak mentah ringan dan berat. Salleh dkk., (2003) melaporkan bahwa konsorsium bakteri yang terdiri dari *Pseudomonas aeruginosa* (1 strain) dan *Bacillus* sp (dua strain yang berbeda), telah terbukti secara efektif mendegradasi hidrokarbon dalam air, tanah dan pasir yang terkontaminasi dengan minyak mentah. Rahman dkk., (2002) dan Kalme dkk., (2008) juga melaporkan efisiensi yang lebih baik dari biodegradasi minyak mentah oleh campuran

kultur bakteri jika dibandingkan dengan kultur tunggal. Kehadiran berbagai bakteri dalam kultur bakteri campuran meningkatkan persaingan dalam memanfaatkan sumber karbon tunggal baru, “memaksa” campuran bakteri untuk beradaptasi dengan cepat terhadap lingkungan.

### Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa KK dapat hidup dan berkembang biak dengan memanfaatkan minyak mentah sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Selain itu, KK juga dapat mendegradasi hidrokarbon minyak mentah sepenuhnya. Dengan kemampuan ini, KK memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen bioremediasi lingkungan tercemar minyak mentah.

### Daftar Pustaka

- Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S. & Khamis, A. 1991. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* bacterium. *J. Microbiol. Biotechnol.* 7:53-61.
- Ainon Hamzah, Amir Rabu, Raja Farzarul Hanim Raja Azmy & Noor Aini Yusoff. 2010. Isolation and characterization of bacteria degrading sumandak and south angsi oils. *Sains Malaysiana* 39 (2): 161-168
- Atlas, R. M. 1985. Effects of hydrocarbons on microorganisms and biodegradation in Arctic

- ecosystems, in *Petroleum Effects in the Arctic Environment*, F. R. Engelhardt, Ed., pp. 63–99, Elsevier, London, UK.
- Bartha, R. and Bossert, I. 1984. The treatment and disposal of petroleum wastes in *Petroleum Microbiology*. Atlas, R.M. Ed., pp. 553-578. Macmillan. New York. NY. USA.
- Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I. and Siezen, R.J. 2009. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microbial Biotechnology*. vol. 2, no. 6, pp. 587–594,
- Cooney, J.J. 1984. The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems. in *Petroleum Microbiology*. Atlas, R.M. Ed., pp. 399-434. Macmillan. New York. NY. USA.
- EPA. 1999. Analytical Method Guidance for EPA Method 1664 Implementation and Use. United States Environmental Protection, USA.
- Floodgate, G. 1984. The fate of petroleum in marine ecosystems. in *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., pp. 355–398, Mac million, New York, NY, USA.
- Haramaya, S., Sugiura, K., Ishihara, M. & Shimauci, T. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science and Technolnology* 31:45-51.
- Hollaway, S.L., Faw, G.M. and Sizemore, R.K. 1980. The bacterial community composition of an active oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. vol. 11. no. 6. pp. 153-156.
- Jones, J., Knight, M. and Byron, J.A. 1970. Effect of gross population by kerosene hydrocarbons on the microflora of a moorland soil. *Nature*. vol. 227. p. 1166.
- Kalme, S., Parshetti, G. & Gomare, S. 2008. Diesel and kerosene degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. *Current Microbiology* 58:581-586.
- M. Throne-Holst, A. Wentzel, T. E. Ellingsen, H.-K. Kotlar, and S. B. Zotchev,. 2007. Identification of novel genes involved in long-chain *n*-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 10, pp. 3327–3332,
- Meredith, W., Kelland, S.J. & Jones, D.M. 2000. Influence of biodegradation on crude oil acidity and carboxylic acid composition. *Organic Geochemistry* 31:1059-1073.
- Phillips, G.J.M. and Stewart, J.E. 1974. Distribution of hydrocarbon utilizing bacteria in Northwestern Atlantic waters and coastal sediments. *Canadian Journal of Microbiology*. vol. 20, no. 7. pp. 955-962.
- Pinholt, Y., Struwe, S. and Kjoller, A. 1979. Microbial changes during oil decomposition in soil. *Holarctic Ecology*. vol. 2. pp. 195-200.
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R. and Banat, I.M. 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*. vol. 90, no. 2, pp. 159–168
- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakhsmanaperumalsamy, P. & Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 85:257-261.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haidour, A., Reyest, F. & Fernandez-Barrero, A. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 272:3887-3890.
- Saleh, A.B, Mohamad, G.F., Abdul Rahman, R.N.Z. & Basri, M. 2003. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Bototechnology* 2:411-425.
- Sannasi, P., Kader, J., Ismail, B.S. & Salmijah, S. 2006. Sorption of Cr (VI), Cu (II) and Pb (II) by growing and no growing cell of bacterial consortium. *Bioresource Technology* 97:740-747.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. vol. 18, no. 3, pp. 257–266,