

## ISOLASI, SELEKSI BAHAN PEMBAWA DAN FORMULASI INOKULUM *Thiobacillus* spp.

### *Isolation, Carriers Selection and Inoculum Formulation of Thiobacillus spp.*

**Fahrizal Hazra<sup>1)</sup> dan Enny Widyati<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup> Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Fakultas Pertanian IPB, Kampus IPB Darmaga-Bogor

<sup>2)</sup> Peneliti pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan dan Konservasi Alam, Jl. Raya Gunung Batu - Bogor.

#### ABSTRACT

*One of problems in international trading of coal is high content of sulfur. Biodesulfuration of coal using Thiobacillus spp is recognized as the most environmentally friendly to reduce the content. This research was aimed to collect and to isolate Thiobacillus spp from coal, acid mine drainage, ex-coal mining soil and agriculture soil, on selected media. Colonies growing on the media were re-isolated for further characterization to find the most similar to Thiobacillus spp. In this experiment, the selected isolate (5, 10, 20, 50, and 100 ml) was cultured in 100 g of coal dust, rice husk charcoal, wood charcoal, and activated charcoal, to find an appropriate inoculum for coal desulfuration. To observe their survival rate, they were re-isolated onto 10 ml Thiobacillus broth medium. The re-isolations were observed at the 7, 14, 21 and 28 days of incubation. The results showed that Thiobacillus spp was found only in acid mine drainage. After characterization, the isolates were strongly similar to Thiobacillus ferrooxidans. The most proper inoculum was 100 ml culture of Thiobacillus in 100 g rice husk charcoal. It had 100% survival rate after 20 days cultured in that carrier.*

**Key word :** *Thiobacillus* spp., acid mine drainage, inoculum formulation.

#### PENDAHULUAN

Batubara yang ditambang di beberapa lokasi di Indonesia mempunyai kandungan sulfur yang tergolong tinggi. Hal ini akan memberikan dampak negatif terhadap lingkungan, antara lain ketika dibakar akan melepaskan sulfur ke udara. Apabila sulfur tersebut berreaksi dengan oksigen di udara akan menjadi sulfur dioksida yang merupakan salah satu gas penyebab hujan asam. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk menurunkan kandungan sulfur dalam batubara tersebut. Salah satu cara untuk mengatasi masalah ini adalah dengan memanfaatkan kerja dari *Thiobacillus* spp yang mampu menurunkan kandungan sulfur dalam batubara melalui proses oksidasi menjadi bentuk sulfat (Brock and Medigan, 1991).

*Thiobacillus* spp merupakan bakteri yang hidup secara aerob, suka kondisi asam (*acidophilic*) dan menggunakan sumber energi dari oksidasi sulfur dan sumber karbon dari CO<sub>2</sub> (kemolitotrof) (Soepandi, 1991). Disamping oksidasi sulfur beberapa kelompok *Thiobacillus* juga mampu menggunakan sumber energi dari proses oksidasi ferro menjadi ferri. Karena sumber energi dan karbon yang diperlukan seperti tersebut di atas, *thiobacillus* dapat ditemukan pada tanah bekas tambang batubara, pada batubara, pada air asam tambang, pada tanah pertanian

yang mempunyai kandungan besi tinggi, pada tanah gambut dan pada tanah sulfat masam (Widyati, 2003). Hasil eksplorasi mikrob yang bermanfaat (Hazra, 2005) dapat dikoleksi dan digunakan sesuai dengan kegunaannya serta dapat dikembangkan untuk proses-proses bioremediasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat *Thiobacillus* spp. dan formulasi inokulum untuk biodesulfurisasi batubara.

#### BAHAN DAN METODE

##### *Isolasi Thiobacillus spp.*

Sampel batubara, air asam tambang (Galian Pit Barat dan Timur/GBB dan GPT) dan tanah bekas tambang batubara diambil dari lokasi penambangan batubara PT Bukit Asam (Sumatera Selatan), sedangkan tanah sawah diambil dari Subang dan Cianjur (Jawa Barat). Dari sampel-sampel tersebut selanjutnya diisolasi pada media selektif untuk bakteri *Thiobacillus* spp. dengan komposisi yang disajikan pada Tabel 1, di mana terdapat perbedaan kandungan garam ferro (Nurseha, 2000). Setelah semua bahan dicampur selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

Tabel 1. Komposisi Medium Cair dengan Garam Ferro (g/l)

Bahan	Medium 1 pH 3.5	Medium 2 pH 3.5	Medium 3 pH 2.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	0.50	0.50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.15	3.00	3.00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.01	0.01	0.01
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.50	0.50	0.50
KCl	0.05	0.10	0.10
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1.00	10.00	3000

Sumber: Nurseha (2000)

Setelah media siap selanjutnya diambil sampel tanah sebanyak 10 gram sedangkan sampel air diambil 10 ml kemudian dimasukkan ke dalam 90 ml larutan fisiologis steril (0,85% NaCl) dan dikocok selama 15 menit. Kemudian campuran tersebut didiamkan untuk memisahkan endapannya. Tahapan selanjutnya diambil 1 ml dari masing-masing larutan dan dimasukkan ke dalam masing-masing media di atas. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 250 rpm pada suhu kamar. Pertumbuhan *thiobacillus* ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi kuning karat.

#### Karakterisasi dan seleksi isolat

Karakterisasi isolat yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram. Pewarnaan ini digunakan untuk menentukan sifat dinding sel bakteri dan bentuk sel bakteri. Karakter lain yang dipelajari pada penelitian ini adalah pH tempat bakteri tersebut ditemukan, kebutuhan akan mineral ferro dan nitrogen. Data yang didapat selanjutnya dibandingkan dengan sifat-sifat bakteri *Thiobacillus* pada literatur.

Seleksi isolat dilakukan melalui pertumbuhan bakteri pada media yaitu dilakukan pengukuran kerapatan sel bakteri dengan menghitung kerapatan optik (*optical density*) dengan spektrofotometer. *Optical density* diukur dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang yang menunjukkan nilai absorbansi maksimum. Pengukuran dilakukan tiap hari selama 12 hari inkubasi.

#### Formulasi inokulum

Untuk memudahkan aplikasi di lapangan maka perlu dilakukan pembuatan inokulum. Inokulum merupakan

isolat bakteri yang dikultivasi pada media pembawa (karier), sehingga perlu dilakukan seleksi karier yang paling tepat bagi bakteri tersebut. Pada penelitian ini dicoba beberapa karier yaitu arang sekam, arang aktif, arang kayu, serta serbuk batubara. Kemudian setiap bahan pembawa tersebut ditambahkan dengan isolat dengan dosis (v/w) 5%, 10%, 20%, 50%, dan 100%. Untuk mengetahui kemampuan hidup bakteri pada bahan pembawa maka setiap 5 hari dilakukan isolasi ulang (re-isolasi) sampai hari ke 20 dan ditumbuhkan pada medium cair. Untuk satu perlakuan dilakukan re-isolasi pada 9 tabung reaksi. Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan menghitung jumlah tabung yang berubah warna menjadi kuning karat (+) pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah reisolasi, sehingga diperoleh persentase kemampuan hidupnya (*survival rate*) dengan rumus (Widyati, 2006) sebagai berikut:

$$\text{Survival rate} = \frac{\text{Jumlah tabung positif}}{\text{total tabung}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Thiobacillus spp* hanya dapat diisolasi dari air asam tambang GPB (galian pit barat) dan GPT (galian pit timur) PT. Bukit Asam yang ditumbuhkan pada medium 3 (Tabel 2). Medium 3 ini memiliki kandungan garam ferro paling tinggi bila dibandingkan dengan medium lainnya (Tabel 1). Diduga Medium 3 mempunyai kondisi yang paling mendekati kondisi air asam tambang GPT dan GPB. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Widyati dan Kresno (2007), lokasi GPB dan GPT memiliki kandungan sulfat, Fe dan Mn yang tinggi.

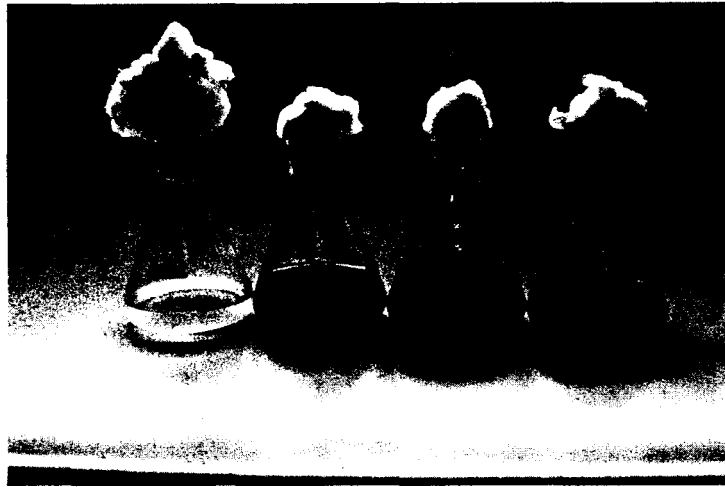
Tabel 2. Sampel yang Digunakan dalam Isolasi Beserta Media yang Digunakan

Sampel	Medium 1	Medium 2	Medium 3
Galian Pit Barat (GPB)	-	-	+
Galian Pit Timur (GPT)	-	-	+
Tanah bekas tambang	-	-	-
Tanah Cianjur	-	-	-
Tanah Subang	-	-	-
Batubara	-	-	-

Keterangan: + ; terjadi perubahan warna menjadi kuning kecoklatan, - ; warna tidak berubah

Pertumbuhan bakteri *Thiobacillus spp* ditandai dengan perubahan warna media dari kuning pucat menjadi kuning karat (Gambar 1). Perubahan warna media tersebut

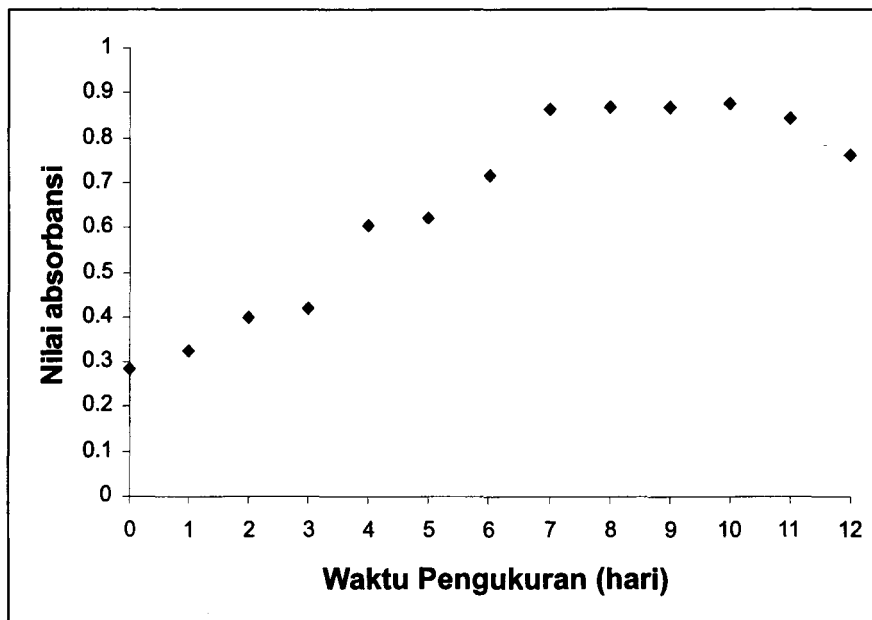
disebabkan karena terbentuknya besi ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) karena dioksidasinya besi ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oleh bakteri (Nurseha, 2000).



Gambar 1. Isolat yang Berhasil Diisolasi pada Medium M-3 (Kontrol : paling kiri).

Untuk mengetahui pertumbuhan sel bakteri *Thiobacillus* spp. ini dapat diukur dengan berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang yang menunjukkan nilai absorbansi maksimum (Gambar 2). Pengukuran dilakukan tiap hari selama 12 hari inkubasi. Dari Gambar 2 terlihat bahwa pertumbuhan bakteri *Thiobacillus* spp. Terdiri

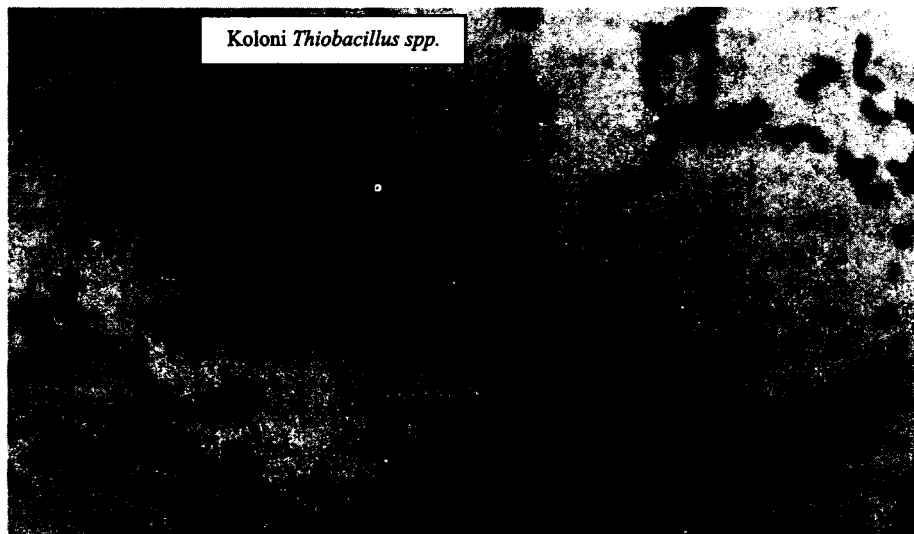
dari 4 fase yaitu; fase anjang-ancang (*lag-phase*) yang terjadi pada hari ke-0 sampai hari ke-3, fase eksponensial (*log-phase*) pada hari ke-4 sampai hari ke-7, fase konstan (*fase stasioner*) hari ke-7 sampai hari ke-10, dan fase kematian (hari ke-11 dan seterusnya).



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Thiobacillus* spp.

Salah satu cara karakterisasi bakteri *Thiobacillus* spp adalah dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan yang digunakan pada penelitian ini adalah pewarnaan *diferensial* yaitu pewarnaan Gram yang dapat membedakan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Hasil pewarnaan

bakteri *Thiobacillus* spp. Menunjukkan bakteri gram negatif, berbentuk batang. Bakteri *Thiobacillus* spp. merupakan bakteri Gram negatif yang dicirikan dengan warna merah muda dengan pewarnaan Gram.



Gambar 3. Pewarnaan Gram Bakteri *Thiobacillus spp.* (Sel Bakteri Bewarna Merah, Berbentuk Batang dan Berantai Pendek)

Tabel 3. Karakterisasi Bakteri

Kondisi	Karakterisasi Isolat	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (Robertson and Kuenen)
pH	3.37	1.3 - 4.5
Suhu lingkungan pertumbuhan	26 - 32 °C	24-33 °C
Pewarnaan Gram	Gram negatif	Gram negatif
Bentuk sel	Batang pendek	Tongkat pendek, rantai pendek (bentuk tunggal atau berpasangan), ujung membulat
Sumber energi	FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	Oksidasi dari Fe <sup>2+</sup> dan reduksi sulfur
Kebutuhan oksigen	Shaker 250 rpm	Aerob obligat
Sumber Nitrogen	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Amonium, nitrat

Berdasarkan hasil karakterisasi bila dibandingkan dengan hasil karakterisasi *thiobacillus* oleh Robertson and Kuenen (*tanpa tahun*) (Tabel 3) bahwa bakteri yang terisolasi mempunyai karakter sangat dekat dengan *Thiobacillus ferrooxidans* yaitu memiliki ciri-ciri hidup pada kisaran pH 1,3 - 4,5, bersifat Gram negatif, mempunyai sel berbentuk batang atau tongkat. Selain itu bakteri ini menggunakan hasil oksidasi dari Fe<sup>2+</sup> dan reduksi sulfur sebagai sumber energinya, serta amonium, dan nitrat sebagai sumber nitrogennya, selain itu sangat membutuhkan oksigen untuk kehidupannya.

Untuk mengetahui kemampuan hidup bakteri pada karirnya dapat dihitung melalui persentase kemampuan hidup (*survival rate*) setelah ditanam pada karier kemudian dire-isolasi pada medium yang sama (Tabel 4). Tabel 4 menunjukkan bahwa *thiobacillus* tidak dapat hidup pada medium dengan bahan pembawa arang kayu (AK) dan arang aktif (AA). Sebaliknya bakteri dapat tumbuh dengan baik pada media dengan bahan pembawa arang sekam. Pada bahan pembawa ini bakteri masih dapat hidup ketika

direisolasi hari ke-20 dan masih bertahan sampai hari ke-28 setelah inkubasi (48 hari setelah dibuat inokulum). Dengan demikian arang sekam merupakan media pembawa yang paling sesuai untuk formulasi inokulum desulfurasi batubara.

Pada penelitian ini didapatkan data bahwa meskipun *Thiobacillus spp* yang terisolasi merupakan mikroba yang bersifat litotrof yang tidak dapat hidup ketika pada lingkungan tempat hidupnya terdapat bahan organik ternyata dapat ditumbuhkan pada media arang sekam. Arang sekam merupakan bahan organik karena sekam merupakan limbah kulit padi. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Bacelar-Nicolou dan Johnson (1999) mengatakan bahwa *Thiobacillus ferrooxidans* mampu menggunakan karbon organik secara terbatas. Dengan demikian hal ini makin menguatkan bahwa isolat *thiobacillus* yang berhasil diisolasi sangat dekat sifat-sifatnya dengan *T. Ferrooxidans*. Hal ini diduga karena karbon organik pada arang bersifat inert setelah diarsirkan sehingga menjadi tidak tersedia bagi bakteri.

Tabel 4. Survival Rate Bakteri Pada Bahan Pembawa

Bahan Pembawa / Konsentrasi Isolat % (v/w)	Hari Isolasi															
	5				10				15				20			
	Survival rate(%) hari Ke-				Survival rate(%) hari Ke-				Survival rate(%) hari Ke-				Survival rate(%) hari Ke-			
	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
<b>Arang Sekam (AS)</b>																
5	0	66.6	66.6	66.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	11.1	55.5	55.5	77.7	0	0	0	11.1	0	0	11.1	11.1	0	0	0	0
20	0	55.5	55.5	77.7	0	0	11.1	11.1	0	0	11.1	11.1	0	0	0	0
50	55.5	99.9	100	100	0	0	55.5	55.5	0	0	55.5	55.5	0	0	0	0
100	55.5	88.8	100	100	0	77.7	100	100	0	77.7	100	100	0	0	11.1	33.3
<b>Arang Aktif (AA)</b>																
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	11.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	55.5	88.8	0	0	0	0	0	0	11.1	11.1	0	0	0	0
<b>Arang Kayu (AK)</b>																
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Serbuk Batubara (SB)</b>																
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	22.2	22.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	66.6	88.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	33.3	77.7	88.8	88.8	0	11.1	22.2	88.8	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	77.7	88.8	0	0	22.2	77.7	0	0	77.7	0	0	0	0	0

Tabel 4 menunjukkan bahwa formula inokulum yang paling baik adalah konsentrasi 100 ml isolat dalam 100 gram arang sekam. Hasil penghitungan survival rate menunjukkan bahwa thiobacillus tidak dapat bertahan ketika dipelihara pada arang sekam lebih dari 20 hari. Tabel 4 menunjukkan bahwa setelah dibiakkan 20 hari pada arang sekam hanya 11 – 33% isolat yang masih hidup. Hal ini menunjukkan bahwa inokulum paling baik diaplikasikan sebelum 15 hari setelah pembuatan.

**KESIMPULAN**

1. *Thiobacillus* spp. dapat diisolasi dari air asam tambang yang memiliki kandungan besi ferro yang tinggi, kandungan C-organik yang rendah, pH rendah.
2. Isolat bakteri yang didapat mempunyai ciri-ciri yang sangat dekat dengan *Thiobacillus ferrooxidans* yaitu hidup pada kisaran pH 1,3 - 4,5, menggunakan sumber C dari CO<sub>2</sub> udara (inorganik), sumber energi dari oksidasi sulfur dan besi.

3. Formulasi inokulum terbaik adalah 100 ml isolat pada bahan pembawa (karir) 100 gram arang sekam.
4. Inokulum dapat diaplikasikan paling baik maksimum 15 hari setelah pembuatan yang disimpan pada suhu kamar.

**DAFTAR PUSTAKA**

Bachelor-Nicolau, P., and D. B. Johnson. 1999. Lanching of piryte by acidophillie iron oxidating-bacteria. J Apple/ Env. Microbial. 65(2) 585-590.

Brock, T. D. and M. T. Madigan. 1991. Biology of Microorganism, 6<sup>th</sup> Edition. Prentice-Hall International Inc., USA.

Hazra, F. 2005. Eksplorasi mikrob pengguna metanol dari tanah dan kotoran ternak sebagai protein sel tunggal. J. Tanah dan Lingkungan 7(2):71-75.

Nurseha. 2000. Isolasi dan Uji Aktivitas Bakteri Asidofilik Pengoksidasi Besi dan Sulfur dari Ekosistem Air Hitam. Tesis. Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor.

Robertson and Kuenen. Characteristic of *Thiobacillus*. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/thiobacillus#classification>. [diakses 10 Agustus 2007].

Soepandi, G. 1991. Studi Kinetika Desulfurisasi Batubara dengan Larutan Kaporit. Lembaga Penelitian ITB. Bandung.

Widyati, E. 2003. Isolasi dan Seleksi Bakteri Pengasimilasi Sulfur Untuk Remediasi Lahan Terpolusi. Laporan Tahunan Pusat Litbang Hutan dan Konservasi Alam. Bogor. (Tidak dipublikasikan).

\_\_\_\_\_. 2006. Bioremediasi Tanah Bekas Tambang Batubara dengan *Sludge* Industri Kertas Untuk Memacu Revegetasi Lahan. Disertasi. Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor.

---