

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POTENTIAL BACTERIA DEGRADING USED
MACHINE OIL FROM SEVERAL WORKSHOP LOCATIONS IN MANADO CITY**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI POTENSIAL PENDEGRADASI OLI MESIN
BEKAS DARI BEBERAPA LOKASI BENGKEL DI KOTA MANADO**

Melitia L. Sendo^{1)*}, Fecky R. Mantiri¹⁾, Marhaenus J. Rumondor¹⁾

¹⁾Program Studi Biologi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

*melitiasendo@gmail.com

ABSTRACT

*Soil pollution due to indiscriminate disposal of used oil in workshops is currently getting more serious, this is due to the compound content in the oil which is difficult to decompose and can cause disease. This study aims to isolate, characterize and identify potential bacteria that degrade used engine oil from several workshop locations in Manado City. This research was conducted for 4 months, December 2020 to March 2021. Selection of bacteria using selective media (Busnhell-Haas) modified with the addition of used oil. The results showed that there were 3 isolates that were successfully isolated, namely bacteria 23, 29 and bacteria 33 with different characteristics and had been identified and it was found that bacteria 23 was a species of bacteria *Citrobacter freundii* which has the potential as bacteria to degrade used engine oil for the bioremediation process.*

Keywords : Isolation, characterization, degrading bacteria, used oil, 16S rRNA sequences.

ABSTRAK

Pencemaran tanah akibat dari pembuangan oli bekas secara sembarangan pada bengkel-bengkel saat ini semakin serius, hal ini dikarenakan kandungan senyawa yang ada dalam oli yang sulit untuk diurai dan dapat menyebabkan penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi serta mengidentifikasi bakteri potensial pendegradasi oli mesin bekas dari beberapa lokasi bengkel di Kota Manado. Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan, Desember 2020 sampai Maret 2021. Seleksi bakteri menggunakan media selektif (*Busnhell-Haas*) yang dimodifikasi dengan penambahan oli bekas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 3 isolat yang berhasil diisolasi, yaitu bakteri 23, 29 dan bakteri 33 dengan karakteristik yang berbeda-beda serta telah teridentifikasi dan ditemukan bahwa bakteri 23 merupakan spesies bakteri *Citrobacter freundii* yang berpotensi sebagai bakteri pendegradasi oli mesin bekas untuk proses bioremediasi.

Kata kunci: Isolasi, karakterisasi, bakteri pendegradasi, oli bekas, gen 16S rRNA

PENDAHULUAN

Jumlah transportasi baik kendaraan motor maupun mobil yang semakin meningkat dipicu oleh pertumbuhan populasi penduduk sehingga mendorong jumlah kegiatan usaha bengkel yang ada sebagai tempat yang menyediakan jasa perawatan dan perbaikan, terlebih khususnya di kota-kota besar yang ada di Indonesia. Sejalan dengan perkembangan jumlah kendaran tersebut, maka volume oli bekas akan terus meningkat (Azharuddin *et al.*, 2020).

Pencemaran akibat pembuangan oli mesin bekas secara sembarangan telah menimbulkan masalah lingkungan yang serius dengan mengingat dampaknya terhadap lingkungan maupun manusia, sehingga diperlukan adanya pengelolaan yang lebih baik pada lingkungan tersebut agar tidak terjadi kerusakan lingkungan yang berkelanjutan. Salah satu cara pengelolaan yang ramah lingkungan dan bersifat ekonomi yaitu dengan menggunakan mikroorganisme contohnya bakteri atau yang sering disebut dengan metode bioremediasi (Zam, 2011), metode ini lebih efektif, efisien, dan ramah lingkungan dibandingkan dengan metode lain untuk mengatasi pencemaran tanah (Pertiwi *et al.*, 2011). Bakteri yang sering digunakan dalam proses bioremediasi dari minyak bumi disebut dengan bakteri hidrokarbonoklastik (Zam, 2011). Bakteri yang akan diisolasi untuk proses bioremediasi akan lebih baik jika bakteri tersebut berasal dari lokasi pencemaran yang merupakan habitat aslinya.

Gen 16S rRNA adalah bagian dari gen prokariot yang sering dijumpai pada bakteri dan archaea, gen ini juga merupakan salah satu jenis gen yang sangat stabil karena walaupun dalam jangka waktu yang sangat panjang gen tersebut akan susah bermutasi sehingga jika digunakan dalam analisis filogenik dapat menguntungkan (Ardiani, 2011).

Penelitian ini belum pernah dilakukan di Kota Manado, Sulawesi Utara sebelumnya dan juga mengingat dampak yang ditimbulkan bagi manusia dan juga lingkungan sangat berbahaya. Maka dari itu berdasarkan uraian

permasalahan tersebut, diperlukan adanya penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi bakteri potensial pendegradasi oli mesin bekas dari beberapa lokasi bengkel di kota Manado untuk proses bioremediasi pada tanah tercemar oli bekas di Kota Manado.

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengidentifikasi jenis-jenis bakteri potensial pendegradasi oli mesin bekas yang diisolasi dari tanah tercemar oli mesin bekas pada beberapa bengkel di Kota Manado.
2. Mengidentifikasi karakteristik bakteri yang berpotensi sebagai pendegradasi oli mesin bekas yang diisolasi dari tanah tercemar oli mesin bekas pada beberapa bengkel di Kota Manado.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan dari bulan Desember 2020 – Maret 2021 di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi. Sekuensing dilakukan di tempat penyedia jasa sekuensing PT. *Genetika Science Indonesia*, Tangerang. Analisis data dilakukan di Jurusan Biologi, FMIPA Unsrat.

Alat dan Bahan

Alat dalam penelitian yaitu cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, timbangan analitik, autoklaf, inkubator, laminar air flow, spread glass, jarum ose, kulkas, lampu spiritus, mikropipet, sudip, spidol hitam, label, plastik wrap, aluminium foil, spatula steril, mikroskop, objek glass, tabung ependorf, tabung hach, tabung durham, masker dan sarung tangan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Nutrien Agar (NA) dan Nutrien Broth (NB) untuk pertumbuhan isolat, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NH_4NO_3 , MgSO_4 , FeCl_3 , Media selektif (*Bushnell Haas*), aquades, NaCl 0.9%, spiritus, alkohol 70%, alkohol 95%, kristal violet, safranin, lugols, Media MTM (*Motility Test Medium*), Media

SIM (*Sulfida Indol Motily*), Media TSIA (*Triple sugar iron agar*), Media Simmons Citrat, Larutan Hydrogen Peroksida (H_2O_2) 6%, alpha-naftol, kalium hidroksida, Media MIO, Reagen Kovac's, Gula laktosa, sukrosa dan glukosa), oli mesin bekas, dan sampel tanah yang terkontaminasi oli mesin bekas diperoleh dari tanah yang terkontaminasi oli bekas dari tiga bengkel di Kota Manado.

Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel diambil secara *purposive sampling* dari tanah yang tercemar oli mesin bekas pada tiga bengkel di Kota Manado. Tanah diambil dengan kedalaman 2-10 cm dari permukaan dengan spatula steril dengan dua titik yang berbeda dari tiap lokasi kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependorf lalu dibungkus dengan kertas aluminium foil, kemudian tanah selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk pembiakan bakteri.

2. Sterilisasi Alat

Untuk sterilisasi alat-alat dilakukan dengan menggunakan autoklaf yaitu dengan cara memilih alat-alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian kemudian dibungkus menggunakan aluminium foil dengan rapih lalu dimasukkan dalam autoklaf, pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15-30 menit dan untuk peralatan yang tidak tahan panas disterilisasi dengan menggunakan alkohol 90% dan bunsen (Zam, 2011).

3. Isolasi Bakteri Pendegradasi Oli Mesin Bekas

Setelah proses sterilisasi alat, dilakukan pengenceran beseri kemudian selanjutnya ditebar ke dalam media NA (*Nutrient agar*) untuk memperoleh koloni bakteri tunggal. Koloni yang diperoleh kemudian di seleksi kembali dengan menumbuhkan koloni tersebut didalam media *Bushnell-Haas* yang dimodifikasi dengan penambahan oli bekas. Isolat yang berhasil tumbuh digores ke media NA pada cawan petri dengan metode kuadran. Kemudian selanjutnya, bakteri diinokulasikan kembali ke media miring sebagai stok simpan isolat murni.

4. Sekuensing

Salah satu isolat terpilih yang sudah dalam bentuk stok simpan pada media miring, dikirim untuk identifikasi bakteri secara molekuler dengan metode sekuensing yang dilakukan di tempat penyedia jasa sekuensing PT. Genetika Science Indonesia, Tangerang. Hasil yang diperoleh berupa kromatogram, sekuens bakteri, dan hasil BLAST yang menyandi bakteri hasil isolasi, dikirim melalui email.

5. Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi isolat bakteri pendegradasi oli mesin bekas yang telah diperoleh, dilakukan melalui pengamatan secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia.

6. Analisis Data dan Penyajian Data

Data Penelitian yang dilakukan ini bersifat observatif dan deskriptif. Data yang diperoleh ditabulasi dan dideskripsikan dengan menampilkan tabel dan foto hasil pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis serta hasil sekuensing.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Potensial Pendegradasi Oli Mesin Bekas

Sampel yang digunakan sebagai sumber isolat bakteri pendegradasi berasal dari tanah tercemar oli mesin bekas dari tiga lokasi bengkel yang berbeda-beda. Sampel tanah yang diambil berada disekitar lokasi dengan kriteria, diantaranya berminyak, hitam dan berbau oli yang menyengat (Hezi *et al.*, 2015). Dari tiga lokasi bengkel yang berbeda-beda diperoleh masing-masing satu isolat yang mewakili masing-masing lokasi pengambilan sampel, dapat dilihat pada Tabel 1.

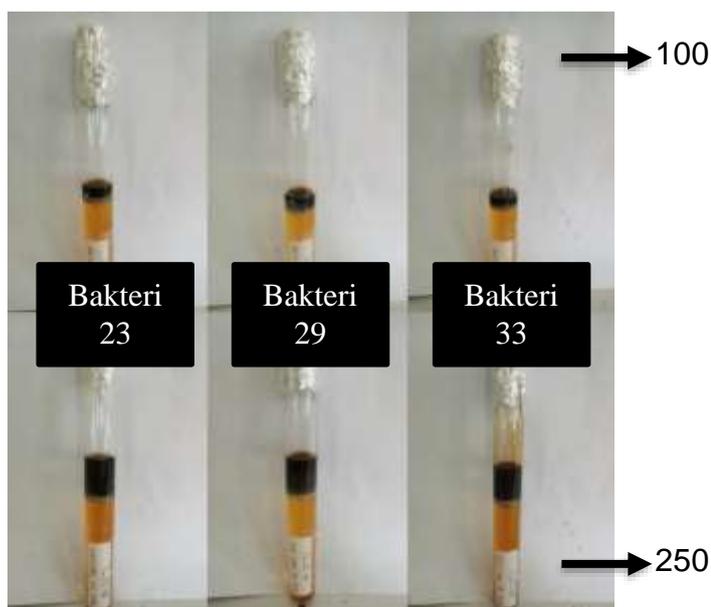
Tabel 1. Deskripsi Lokasi Isolat

Kode Isolat	Lokasi
Bakteri 23 ($3B, 10^{-4}$)	Bengkel 3 (Malalayang)
Bakteri 29 ($2A, 10^{-4}$)	Bengkel 2 (Malalayang)
Bakteri 33 ($1B, 10^{-3}$)	Bengkel 1 (Kleak)

3 isolat tersebut memiliki kemampuan pendegradasi hidrokarbon dan berhasil tumbuh pada media selektif yang digunakan.

Indikasi yang menandakan bahwa terdapat bakteri potensial pendegradasi oli bekas yang mampu tumbuh pada media selektif *Bushnell-Haas* cair dapat dilihat dari

perubahan media yang menjadi keruh setelah 7 hari inkubasi (Gambar 1) karena bakteri menggunakan oli bekas dalam media sebagai sumber karbonnya maka dapat memungkinkan bakteri tersebut untuk melakukan pertumbuhan/pembelahan sel (Ahmad *et al.*, 2012).



Gambar 1. Isolat bakteri dalam medium *Bushnell-Haas* cair setelah inkubasi.

Karakterisasi Makroskopis

Hasil pengamatan makroskopis (Tabel 2) menunjukkan bahwa ketiga isolat yang diperoleh memiliki morfologi warna yang sama yaitu putih. Bentuk dari isolat-isolat bervariasi mulai dari bentuk bulat (*circular*), tak beraturan (*irregular*) dan poros (*spindle*). Isolat-isolat tersebut juga memiliki variasi terhadap tepinya yaitu ada yang rata (*entire*) dan ada yang bergelombang (*undulate*). Permukaan atau elevasi dari isolat-isolat yang

didapatkan juga berbeda-beda yakni cembung dibagian tengah lebih menonjol (*umbonate*) dan timbul (*raised*). Penampakan morfologi koloni yang berbeda-beda ini mengindikasikan bahwa koloni bakteri tersebut berasal dari spesies yang berbeda. Hasil isolasi pada penelitian ini didominasi oleh isolat 23 dengan bentuk bulat, dengan tepi rata, elevasi timbul tengah serta memiliki warna putih.

Tabel 2. Deskripsi makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri pendegradasi

Kode Isolat	Makroskopis				Mikroskopis	
	Bentuk	Tepi	Permukaan	Warna	Bentuk sel	Kelompok gram
Bakteri 23	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Umbonate</i>	Putih	Basil	
Bakteri 29	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Raised</i>	Putih	Basil	
Bakteri 33	<i>Spindle</i>	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>	Putih	Basil	

Karakterisasi Mikroskopis

Hasil pengamatan yang dilakukan secara mikroskopis menunjukkan hasil bahwa semua isolat merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel bakteri yaitu batang (*basil*) (Tabel 2). bakteri Gram negatif berwarna merah sebab kompleks tersebut larut pada saat

pemberian larutan alkohol sehingga mengambil warna merah safranin. Hal yang menyebabkan perbedaan warna Gram antara bakteri Gram negatif dan juga bakteri positif yaitu karena berbedanya struktur dinding dari kedua jenis bakteri tersebut.

Uji Biokimia

Karakterisasi dilakukan pula melalui uji biokimia dengan melihat proses metabolisme dari bakteri tersebut baik secara ekstraseluler maupun intraseluler (Cappuccino dan Sherman, 2005). Pengamatan untuk melihat proses biokimia dari bakteri potensial pendegradasi oli mesin bekas dilakukan dengan beberapa uji yakni motilitas, TSIA,

sitrat, katalase, VP, lysin, indol dan fermentasi karbohidrat Tabel 3. Dan dari hasil uji biokimia menunjukkan bahwa ketiga isolat memberikan reaksi yang positif terhadap uji motilitas, TSIA, sitrat, katalase dan fermentasi karbohidrat, sedangkan untuk uji VP, lysin, indol menunjukkan hasil yang negatif.

Tabel 3. Karakterisasi berdasarkan uji biokimia isolat bakteri pendegradasi

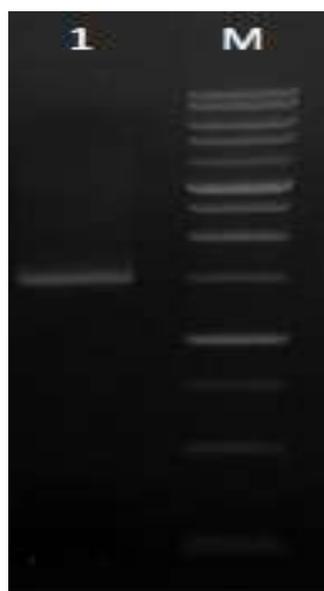
Uji Biokimia	Kode isolat		
	Bakteri 23	Bakteri 29	Bakteri 33
Motilitas	+	+	+
TSIA	+	+	+
Sitrat	+	+	+
Katalase	+	+	+
VP	-	-	-
Lysin	-	-	-
Indol	-	-	-
Fermentasi karbohidrat	+	+	+

Keterangan: tanda (-) menunjukkan hasil negatif dan tanda (+) menunjukkan hasil positif.

Identifikasi Bakteri Pendegradasi menggunakan Gen 16S rRNA

Hasil ekstraksi DNA total dielektroforesis untuk menunjukkan DNA kromosomal yang telah dimurnikan. Hasil elektroforesis DNA dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa isolat memiliki pita tebal dan terang. Tebalnya pita menandakan isolat tersebut memiliki DNA

yang cukup untuk analisis sekuens DNA. Besarnya ukuran pita yang dihasilkan adalah sekitar 1500 bp, besarnya ukuran ini sesuai dengan yang diharapkan dari gen-gen 16S rRNA.



Gambar 2. Hasil elektroforesis gel agarosa 0,8% dari produk PCR gen 16S rRNA bakteri

Bagian dari sekuens yang telah diediting untuk kualitas pembacaan yang baik kemudian dipilih untuk dilakukan BLAST yang akan diakses diwebsite NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Penggunaan BLAST dalam sekeunsi memiliki tujuan untuk mengetahui identitas dari sekuens yang diperoleh (Ramadhani, 2017).

Tabel 4. Hasil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Gen 16S rRNA Sampel Bakteri

No	Nama Spesimen Bakteri	Lokasi Pengambilan	Query Coverage	Per. Identity	E. Value	Nama Pembanding (nomor akses)	Referensi
1.			100%	100%	0	<i>Citrobacter freundii</i> (CP048382.1)	Nuesch <i>et al.</i> (2020)
2.			100%	100%	0	<i>Citrobacter freundii</i> (LS992183.1)	Gonzaga (2018)
3.	Bakteri 23	Bengkel 3 (Malalayang)	100%	100%	0	<i>Citrobacter freundii</i> (MG209573.1)	Singh <i>et al.</i> (2017)
4.			100%	100%	0	<i>Citrobacter freundii</i> (CP016952.1)	Leski <i>et al.</i> (2016)
5.			100%	100%	0	<i>Citrobacter freundii</i> (MT793132.1)	Dong (2020)

Tabel 4 menunjukkan bahwa salah satu bakteri yang berhasil diisolasi dari tanah tercemar oli mesin bekas yaitu bakteri 23 berdasarkan hasil BLAST merupakan bakteri *Citrobacter freundii* dengan presentase kemiripan yang melebihi 95%. Suatu sekuens dapat dikatakan homolog apabila tingkat similaritasnya melebihi 70% (Claverie dan

Notredame, 2007). Untuk sampel mikroorganisme jika menggunakan marka 16S rRNA maka dikatakan identikal (*similar*) pada level spesies jika nilai “percentage identity” nya diatas 97.5%, dan pada level genus jika nilai “percentage identity” nya diatas 95% (Stackebrandt dan Goebel, 1994).

Analisis Sekuens Gen 16S rRNA Bakteri

Citrobacter freundii

Menurut buku identifikasi bakteri Bergey’s (Holt *et al.*, 1994) dan NCBI (2014) bakteri *Citrobacter freundii*, termasuk kedalam Filum Proteobacteria, Kelas Gammaprobia, Ordo Enterobacteriales, Famili Enterobacteriaceae dan Genus *Citrobacter*. Bakteri *C. freundii* terbukti dapat mendegradasi hidrokarbon berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Singh dan Lin (2008), yang berhasil mengisolasi bakteri *C. freundii* (MRC3) dari sampel tanah yang terkontaminasi diesel pada perusahaan

transportasi di Kwazulu-Natal, Afrika Selatan dan terbukti mampu menurunkan 86,94% minyak diesel dalam dua minggu. Erdogan *et al.*, (2011), dalam penelitiannya berhasil mengisolasi empat jenis bakteri yang mampu mendegradasi hidrokarbon dari tanah tercemar minyak bumi di Adana, Batman, dan Adiyaman, Turki diantaranya *Pseudomonas aeruginosa*, *Klesibella pneumonia*, *Citrobacter koseri* dan *Citrobacter amalonaticus*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh tiga isolat yang diisolasi dari tanah tercemar oli mesin bekas yang berasal dari tiga bengkel memiliki potensi sebagai bakteri pendegradasi oli mesin bekas dengan karakteristik yang berbeda-beda, salah satu isolat yaitu bakteri 23 teridentifikasi sebagai spesies *Citrobacter freundii*.

SARAN

Jenis-jenis bakteri yang didapat memiliki potensi sebagai pendegradasi oli mesin bekas yang perlu dikaji lebih lagi melalui studi lebih lanjut, disarankan adanya penelitian lanjutan, baik menyangkut kemampuan berbagai isolat bakteri dalam mendegradasi berbagai komponen hidrokarbon, maupun pengembangan potensi bakteri tersebut dalam upaya bioremediasi lingkungan di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Azharuddin., A.A. Sani & M.A. Ariasya. 2020. Proses Pengolahan Limbah B3 (Oli Bekas) Menjadi Bahan Bakar Cair Dengan Perlakuan Panas Yang Konstan. *Journal Austenit*. **12**: 48-53.
- Ardiani, U. 2011. Analisis Keragaman Genetik Gen 16S-rRNA Dan Karakterisasi Fisiologis Bakteri Asal Usus Udang *Vaname Litopenaeus Vannamei* Dari Berbagai Umur. [skripsi]. FPIK Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ahmad, N. 2012. Isolation and Identification of Secondary Metabolites Producing Organisms from Marine Sponge. *Discovery*. **1**: 14-17.
- Cappuccino, J.G., & N. Sherman. 2005. *Microbiology A Laboratory Manual seventh edition*. Rockland Community College, New York: State University.
- Claverie, J.M. & C. Notredame. 2007. *Bioinformatics for Dummies. 2nd ed.* Wiley Publishing, Inc, New York.
- Dong, N. 2020. *Citrobacter freundii* strain CF1 16S ribosomal RNA gene, partialsequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT793132.1> [11 Juni 2021].
- Erdoğan, E.E., F. Sahin & A. Karaca. 2011. Determination of petroleum degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey. *Journal of Biotechnology*. **11**: 4853-4859.
- Gonzaga, M.A. 2018. *Citrobacter freundii* isolate *Citrobacter freundii* str. U2785 genome assembly, chromosome: 1. [de/LS992183.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/de/LS992183.1) [10 Juni 2021].
- Hezi, Y.P., Periadnadi & Nurmiati. 2015. Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon di Tanah Tercemar Lokasi Perbengkelan Otomotif. *Journal Biologi Universitas Andalas*. **4**: 153-157.
- Holt, J.G., N.R Krieg., P.H.A. Sneath. J.T Staley & S.T Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinate Bacteriology*. Wiliam and Wilkins Co Baltimore, Unites States Maryland.
- Leski, T.A., C.R Taitt. U. Bangura. R. Ansumana. D.A. Stenger. Z. Wang & G.J. Vora. 2016. *Citrobacter freundii* strain SL151 chromosome, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP016952.1> [11 Juni 2021].
- Nuesch-Inderbinen, M., M.J.A. Stevens and R. Stephan. 2020. *Citrobacter freundii* strain 62 chromosome, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP048382.1> [10 Juni 2021].

- Pertiwi, S., W. Hary. Y. Bambang dan W. Hary. 2011. Pemanfaatan Rumput *Fimbrisylis* sp. dalam Proses Bioremediasi Tanah pada Berbagai Konsentrasi Limbah Minyak Bumi. *Jurnal Penelitian Sains*. **14**: 57-61.
- Singh, A., H.K Tiwari. S. Singh. R. Kaur. And S. Das. 2017. *Citrobacter freundii* strain B06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG209573.1> [10 Juni 2021].
- Singh, C. & J. Lin. 2008. Isolation and characterization of diesel oil-degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*. **7**: 1927- 1932.
- Stackebrandt, E., & B. M. Goebel. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International journal of systematic bacteriology*. **44**: 846-849.
- Zam, S.I. 2011. Bioremediasi Tanah yang Tercemar Limbah Pengilangan Minyak Bumi Secara In Vitro pada Konsentrasi pH Berbeda. *Jurnal Agroteknologi*. **1**: 1-8.