

**PEMENCILAN, PENYARINGAN DAN  
PENCIRIAN BAKTERIA PENGURAI  
HIDROKARBON DAN KESAN BIOREMEDIASI  
MINYAK DIESEL OLEH KONSORTIA  
BAKTERIA YANG DIFORMULASIKAN**



**NURULHUDA BINTI ZAIHAN**

**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH  
2011**

**PEMENCILAN, PENYARINGAN DAN  
PENCIRIAN BAKTERIA PENGURAI  
HIDROKARBON DAN KESAN BIOREMEDIASI  
MINYAK DIESEL OLEH KONSORTIA  
BAKTERIA YANG DIFORMULASIKAN**



**NURULHUDA BINTI ZAIHAN**

**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK  
MEMENUHI SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH  
SARJANA SAINS**

**SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH  
2011**

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN TESIS

JUDUL : \_\_\_\_\_

IJAZAH : \_\_\_\_\_

SAYA : \_\_\_\_\_ SESI PENGAJIAN : \_\_\_\_\_  
(HURUF BESAR)

Mengaku membenarkan tesis \*(LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

- 1. Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
- 2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
- 3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
- 4. Sila tandakan (/)

SULIT (Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD (Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh:

\_\_\_\_\_  
(TANDATANGAN PENULIS)

\_\_\_\_\_  
(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(NAMA PENYELIA)

TARIKH: \_\_\_\_\_

TARIKH: \_\_\_\_\_

Catatan:

\*Potong yang tidak berkenaan.

\*Jika tesis ini SULIT dan TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

\*Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana Secara Penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).

## **PENGAKUAN CALON**

Karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan, ringkasan dan rujukan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

20 Jun 2011

---

NURULHUDA BINTI ZAIHAN  
PS 2006-8564



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGESAHAN

NAMA : **NURULHUDA BINTI ZAIHAN**

NO. PELAJAR : **PS 2006-8564**

TAJUK : **PEMENCILAN, PENYARINGAN DAN PENCIRIAN  
BAKTERIA PENGURAI HIDROKARBON DAN KESAN  
BIOREMEDIASI MINYAK DIESEL OLEH KONSORTIA  
BAKTERIA YANG DIFORMULASIKAN**

IJAZAH : **SARJANA SAINS (SAINS SEKITARAN)**

TARIKH VIVA : **1 APRIL 2011**

**DISAHKAN OLEH**

**PENYELIA**

PROF. MADYA DR. PIAKONG BIN MOHD. TUAH



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGHARGAAN

Syukur kehadiran Ilahi kerana dengan berkat limpah kurnia-Nya, akhirnya saya berjaya menghabiskan kajian ini dengan impian serta harapan yang tinggi untuk menggenggam segulung ijazah sarjana.

Pertama sekali, saya amat berterima kasih kepada penyelia, Prof. Madya Dr. Piakong bin Mohd. Tuah, di atas segala tunjuk ajar, bantuan, nasihat serta kritikan berguna yang telah diberikan dari peringkat awal sehingga ke akhir penghasilan tesis ini. Begitu juga kepada pensyarah-pensyarah lain yang sudi berkongsi ilmu pengetahuan serta memberi galakan di sepanjang tempoh pengajian.

Teristimewa buat ayahanda, Hj. Zaihan bin Abd. Majid, dan bonda, Hjh. Latipah binti Jaiman, terima kasih di atas setiap doa serta dorongan dari kalian yang tidak pernah putus agar anakanda berjaya menghadapi segala dugaan dan rintangan dalam menghabiskan pengajian bagi mendapatkan ijazah ini. Tidak dilupakan kedua-dua adik yang dikasihi, Aizuddin dan Shahirah, terima kasih di atas doa dan sokongan yang diberi.

Seterusnya, terima kasih kepada rakan-rakan seperjuangan yang banyak memberi bantuan dan sokongan terutama sekali allahyarhamah Nur Hazwani Che Zulkepli, Saturi Baco, Arney Sapaat, Naida Haruliza, Nadiah, Nurfadzilah Basri dan Christine. Tidak dilupakan, terima kasih kepada Pn. Lam Nyee Fan, Glenda serta Lai yang telah banyak memberi tunjuk ajar serta pertolongan semasa analisis DNA dijalankan.

Ucapan terima kasih turut ditujukan kepada warga Sekolah Sains dan Teknologi, terutama sekali pensyarah dan staf Program Sains Sekitaran, pembantu makmal serta pegawai Sains yang banyak memberi bantuan berkaitan bahan kimia serta peralatan iaitu En. Soufi, En. Neldin, En. Jeffrey, Puan Doreen, Pn. Fatimah, Cik Nor Asiah, Puan Azimah dan Puan Radizah. Terima kasih juga buat pihak pengurusan di Pusat Pengajian Pascasiswazah.

Tidak dilupakan, terima kasih yang tidak terhingga diucapkan kepada pihak Universiti Malaysia Sabah di atas bantuan kewangan yang dihulur sebagai galakan kepada mahasiswa untuk meneruskan pengajian di peringkat lebih tinggi.

Selain itu, jutaan terima kasih buat Sabah Shell Petroleum Sdn. Bhd. di atas kerjasama yang diberikan dengan membenarkan saya menjalankan persampelan di Labuan Crude Oil Terminal serta memberikan penerangan lengkap berkenaan operasi yang dikendalikan di sana.

Akhir kata, terima kasih semuanya, hanya Yang Maha Esa sahaja dapat membalas segala jasa baik anda semua. Insyaallah, segala jasa dan pengorbanan kalian tidak akan saya lupakan. Sekian, Amin Ya Rabbal Alamin.....

NURULHUDA BINTI ZAIHAN

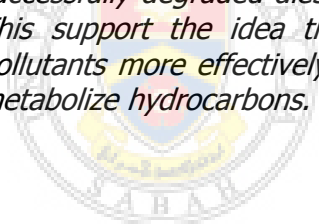
## ABSTRAK

### **PEMENCILAN, PENYARINGAN DAN PENCIRIAN BAKTERIA PENGURAI HIDROKARBON DAN KESAN BIOREMEDIASI MINYAK DIESEL OLEH KONSORTIA BAKTERIA YANG DIFORMULASIKAN**

Masalah pencemaran oleh petroleum semakin berleluasa berikutan peningkatan dalam permintaan terhadap produk petroleum. Bioremediasi merupakan alternatif utama dalam menangani masalah yang berlaku. Sebanyak sebelas strain bakteria pengurai hidrokarbon berjaya dipencilkan dari sampel minyak mentah, enapcemar tulen dan enapcemar terawat yang diperolehi dari Labuan Crude Oil Terminal. Tujuh daripada bakteria tersebut merupakan bakteria Gram positif berbentuk rod, manakala bakinya adalah bakteria Gram negatif berbentuk rod dan kokus. Kesemua bakteria berupaya menggunakan minyak mentah, diesel dan fenol sebagai sumber tenaga untuk pertumbuhan. Bioremediasi enapcemar diesel telah dijalankan secara skala makmal menerusi aplikasi olah tanah dalam masa enam bulan menggunakan konsortia Dd-6. Konsortia tersebut terdiri daripada *Pseudomonas* sp. ReCO-Cr2, *Bacillus* sp. RdPOS-Cr1, *Enterobacter cloacae* RePOS-W1, *Bacillus* sp. ReTOS-Cr2, *Pseudomonas* sp. ReTOS-Cr3 dan *Bacillus* sp. ReTOS-Cr4. Profil biodegradasi menunjukkan konsortia Dd-6 berjaya mendegradasi 95.9% diesel dengan penurunan TPH dari 11.7% ke 0.5%. Suhu di plot olah tanah berada di antara 26°C hingga 31°C dengan kelembapan di antara 14.5% hingga 21.5%. Keadaan tanah berubah dari berasid ke alkali iaitu dari pH 5.52 ke 8.71. Populasi bakteria juga meningkat iaitu dari  $1.71 \times 10^5$  CFU/mL hingga  $1.31 \times 10^6$  CFU/mL. Berdasarkan analisis GC-MS, didapati komponen hidrokarbon di semua plot semakin berkurang dengan bertambahnya masa rawatan. Konsortia Dd-6 telah menguraikan hampir kesemua komponen hidrokarbon alifatik ( $C_{17}$  hingga  $C_{24}$ ) di sepanjang tempoh kajian. Kesimpulannya, konsortia Dd-6 berjaya mendegradasikan enapcemar diesel menggunakan teknik olah tanah dalam masa enam bulan. Ternyata penggunaan bakteria secara konsortia berupaya mendegradasikan pencemar hidrokarbon dengan lebih efektif serta mesra alam kerana kebolehannya menggunakan komponen tersebut.

## **ABSTRACT**

*Environmental pollution by petroleum has become serious due to high demand on petroleum product. Bioremediation is an important alternative to solve the problem. Eleven new hydrocarbon-degrading bacteria have been isolated from environmental samples namely crude oil, pure oil sludge and treated oil sludge derived from Labuan Crude Oil Terminal. Seven of the bacterial strains are Gram-positive rod; meanwhile the rest were Gram-negative rod and coccus. These strains were capable to utilize crude oil, diesel and phenol as carbon source. Bioremediation of diesel-sludge by hydrocarbon degrading consortium Dd-6 were carried out by laboratory scale experiments via landfarming technique in six month. The consortium consists of *Pseudomonas* sp. ReCO-Cr2, *Bacillus* sp. RdPOS-Cr1, *Enterobacter cloacae* RePOS-W1, *Bacillus* sp. ReTOS-Cr2, *Pseudomonas* sp. ReTOS-Cr3 and *Bacillus* sp. ReTOS-Cr4. The Dd-6 consortium degraded up to 95.6% of applied diesel which equivalent to decreasing of TPH content from 11.7% to 0.5% after six month time. The condition of temperature monitored at the treatment plot between 26°C to 31°C with soil moisture in the range of 14.5% to 21.5%. The soil condition also changed from acidic to alkaline from pH 5.52 to 8.71. Microbial population in the soil increased from  $1.71 \times 10^5$  CFU/mL to  $1.31 \times 10^6$  CFU/mL during the treatment. Observation suggested that all hydrocarbon components were reduced during the treatment period based on GC-MS analysis. The Dd-6 consortium degraded almost all the aliphatic hydrocarbon ( $C_{17}$  until  $C_{24}$ ) during the period. From the results obtained, it can be concluded that Dd-6 consortium successfully degraded diesel-sludge via landfarming technique in six month period. This support the idea that microbial communities could degrade hydrocarbon pollutants more effectively and environmental friendly due to its specific ability to metabolize hydrocarbons.*



UMS  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH



## SENARAI KANDUNGAN

	Halaman
<b>TAJUK</b>	i
<b>PENGAKUAN</b>	ii
<b>PENGESAHAN</b>	iii
<b>PENGHARGAAN</b>	iv
<b>ABSTRAK</b>	v
<b><i>ABSTRACT</i></b>	vi
<b>SENARAI KANDUNGAN</b>	vii
<b>SENARAI JADUAL</b>	xi
<b>SENARAI RAJAH</b>	xii
<b>SENARAI FOTO</b>	xiv
<b>SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN</b>	xv
<b>SENARAI LAMPIRAN</b>	xvi
<b>BAB 1: PENDAHULUAN</b>	1
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Kajian	4
1.3 Kepentingan Kajian	4
<b>BAB 2: ULASAN PERPUSTAKAAN</b>	5
2.1 Petroleum Hidrokarbon	5
2.2 Sejarah serta Pengeluaran Minyak Petroleum di Malaysia	6
2.3 Sumber Hidrokarbon di Persekitaran	9
2.4 Pencemaran Persekitaran oleh Hidrokarbon	10
2.4.1 Pencemaran Udara	11
2.4.2 Pencemaran Air	12
2.4.3 Pencemaran Tanah	13

2.5	Kesan Pencemaran oleh Hidrokarbon	14
2.5.1	Pencemaran Udara	14
2.5.2	Pencemaran Air	15
2.5.3	Pencemaran Tanah	16
2.6	Mikroorganisma Pengurai Hidrokarbon	16
2.6.1	Ekologi serta Fisiologi Mikroorganisma	20
2.6.2	Keperluan bagi Pertumbuhan serta Metabolisma Mikroorganisma	21
2.7	Pengenalpastian Mikroorganisma	21
2.7.1	Kriteria Sel	21
2.7.2	Kriteria Pertumbuhan dan Nutrisi	22
2.7.3	Kriteria Biokimia	23
2.7.4	Kriteria Fisiologi dan Ekologi	23
2.7.5	Kriteria Genetik	23
2.8	Pengenalpastian Petroleum Hidrokarbon	26
2.9	Prinsip Biodegradasi	27
2.10	Bioremediasi Hidrokarbon	30
2.10.1	Definisi Bioremediasi	30
2.10.2	Jenis-jenis Bioremediasi	30
2.11	Teknologi Olah Tanah	33
2.11.1	Rekabentuk Teknologi Olah Tanah	34
2.11.2	Parameter-parameter yang Mempengaruhi Olah Tanah	34
	a) Ciri-ciri Tanah	34
	b) Ciri-ciri Jujuk Hidrokarbon	35
	c) Keadaan Cuaca	37
2.11.3	Kelebihan dan Kekurangan Olah Tanah	37
2.12	Penguatkuasaan Undang-undang	38
	<b>BAB 3: METODOLOGI</b>	39
3.1	Pengenalan	39
3.2	Penyediaan Media	40
3.2.1	Media Ramsay	40
3.2.2	Media Soya Triptikes	40
3.3	Persampelan dan Penyaringan	40
3.4	Pengendalian serta Penyimpanan Mikroorganisma	41
3.5	Penyaringan Populasi Bakteria Pengurai Hidrokarbon	41

3.6	Pencirian Bakteria Pengurai Hidrokarbon	42
3.6.1	Morfologi Koloni	42
3.6.2	Morfologi Sel	42
3.6.3	Ujian Biokimia	42
3.6.4	Pencirian Bakteria Pengurai Hidrokarbon Berdasarkan Sistem API	43
	a) API 20E	43
	b) API 20NE	43
	c) API 50 CHB	44
	d) API 50 CHL	44
3.6.5	Pencirian Bakteria Pengurai Hidrokarbon Berdasarkan Kaedah Molekular (16S rDNA)	45
	a) Pengekstrakan DNA serta Elektroforesis Gel	39
	b) Tindak balas Rantaian Polimerase (PCR) dan Penulenan Hasil PCR	46
	c) Penjujukan DNA	47
3.6.6	Keluk Pertumbuhan Bakteria Pengurai Hidrokarbon Terpilih	47
3.7	Kesan Pelbagai Sumber Karbon Terhadap Pertumbuhan Bakteria Pengurai Hidrokarbon	48
3.7.1	Kesan Minyak Mentah	48
3.7.2	Kesan Fenol	48
3.7.3	Kesan Minyak Diesel	49
3.8	Kajian Biodegradasi Bakteria Pengurai Hidrokarbon	49
3.8.1	Rekabentuk Plot Olah Tanah	49
3.8.2	Mikroorganisma Terpilih	50
3.8.3	Rawatan Plot Olah Tanah	51
3.8.4	Prosedur Operasi Olah Tanah	51
3.8.5	Persampelan Tanah	52
3.8.6	Fizikokimia Tanah	52
	a) Suhu	53
	b) pH	53
	c) Kandungan Kelembapan Tanah	53
	d) Pertumbuhan Koloni Bakteria Pengurai Hidrokarbon	53
3.8.7	Jumlah Petroleum Hidrokarbon (TPH)	54
3.8.8	Profil Kromatografi Hidrokarbon	54
<b>BAB 4: KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN</b>		<b>55</b>
4.1	Penyaringan Populasi Bakteria Pengurai Hidrokarbon	55
4.2	Pencirian Bakteria Pengurai Hidrokarbon	57
4.2.1	Pencirian Bakteria Pengurai Hidrokarbon Berdasarkan Morfologi Koloni dan Sel serta Ujian Biokimia	57
4.2.2	Pencirian Bakteria Pengurai Hidrokarbon Berdasarkan Sistem API	62
4.2.3	Pencirian Bakteria Pengurai Hidrokarbon Berdasarkan Kaedah Molekular (16S rDNA)	63

4.2.4	Identiti Bakteria Pengurai Hidrokarbon yang Telah Dikenalpasti	67
	a) <i>Bacillus</i> sp. dan <i>Lactobacillus</i> sp.	68
	b) <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp. dan <i>Sphingomonas</i> sp.	70
4.2.5	Pertumbuhan Bakteria pada Suhu 30°C, 37°C dan 40°C	72
4.3	Kesan Pelbagai Sumber Karbon Terhadap Pertumbuhan Bakteria Pengurai Hidrokarbon	75
4.3.1	Kesan Minyak Mentah	75
4.3.2	Kesan Fenol	78
4.3.3	Kesan Minyak Diesel	81
4.4	Bioremediasi Enapcemar Minyak	83
4.4.1	Bioremediasi Enapcemar Minyak oleh Bakteria dalam Dua Bulan	83
	a) Profil Biodegradasi	85
	b) Biodegradasi Enapcemar Minyak dan Parameter yang Mempengaruhinya	87
4.4.2	Bioremediasi Enapcemar Minyak oleh Bakteria Pengurai Hidrokarbon dalam Enam Bulan	91
	a) Profil Biodegradasi	91
	b) Biodegradasi Enapcemar Minyak dan Parameter yang Mempengaruhinya	93
	c) Profil Kromatografi Hidrokarbon Alifatik	97
<b>BAB 5: KESIMPULAN</b>		104
5.1	Kesimpulan	104
5.2	Cadangan	105
<b>RUJUKAN</b>		106
<b>LAMPIRAN</b>		121

## SENARAI JADUAL

	Halaman
Jadual 2.1	Komponen-komponen hidrokarbon biasa 5
Jadual 2.2	Mikrob pengurai hidrokarbon yang ditemui di persekitaran 18
Jadual 2.3	Kriteria yang diguna dalam pengenalpastian mikroorganisma 22
Jadual 2.4	Mikrob yang berjaya dikenalpasti menerusi tindakbalas PCR dengan menggunakan primer universal 25
Jadual 2.5	Bakteria pengurai hidrokarbon anaerobik 28
Jadual 2.6	Keupayaan degradasi pencemar biasa dalam tanah 29
Jadual 2.7	Evolusi teknologi rawatan enapcemar petroleum 31
Jadual 2.8	Struktur kimia hidrokarbon serta tahap biodegradasinya 36
Jadual 3.1	Primer universal yang diguna dalam amplifikasi gen 16S rDNA 47
Jadual 3.2	Jenis rawatan serta inokula yang digunakan 50
Jadual 4.1	Ciri-ciri morfologi koloni, morfologi sel serta ujian biokimia bakteria pengurai hidrokarbon 58
Jadual 4.2	Taksonomi bakteria pengurai hidrokarbon berdasarkan API 63
Jadual 4.3	Identiti bakteria pengurai hidrokarbon berdasarkan kaedah molekul (16S rDNA) 65
Jadual 4.4	Kod baru bagi setiap spesies bakteria pengurai hidrokarbon 67
Jadual 4.5	Suhu optimum semua strain berdasarkan pertumbuhan bakteria pada suhu 30°C, 37°C dan 40°C dalam tempoh 24 jam 72
Jadual 4.6	Bakteria pengurai hidrokarbon yang digunakan dalam rawatan bioremediasi enapcemar diesel 84
Jadual 4.7	Penurunan komposisi hidrokarbon alifatik selepas enam bulan 102

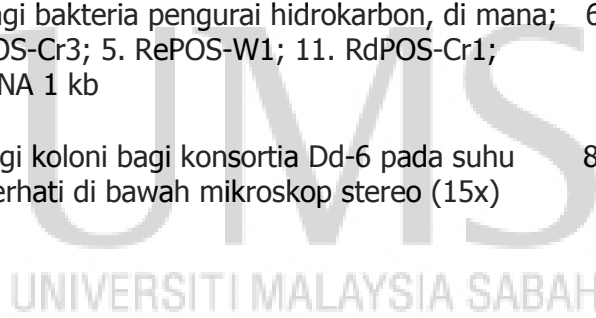
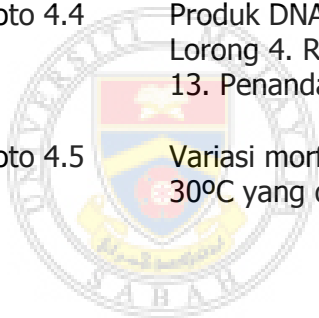
## SENARAI RAJAH

		Halaman
Rajah 2.1	Sejarah pengeluaran minyak mentah Malaysia	6
Rajah 2.2	Jumlah pengeluaran dan penggunaan minyak di Malaysia dari tahun 1988 hingga 2008	7
Rajah 2.3	Proses penyulingan berperingkat yang dialami oleh petroleum serta produk yang dihasilkan	8
Rajah 2.4	Aplikasi proses bioremediasi	33
Rajah 3.1	Rekabentuk kajian pemencilan, penyaringan dan pencirian bakteria pengurai hidrokarbon dan kesan bioremediasi minyak diesel oleh konsortia bakteria yang diformulasikan	39
Rajah 3.2	Gambar rajah skematik plot olah tanah yang digunakan	49
Rajah 3.3	Prosedur lengkap rawatan enapcemar diesel menggunakan operasi olah tanah	52
Rajah 4.1	Bilangan koloni bakteria pengurai hidrokarbon yang dipencilkan menerusi pemencilan terus dan pengayaan di atas agar Ramsay pada suhu 30°C	55
Rajah 4.2	Bilangan strain bakteria pengurai hidrokarbon yang terpilih	56
Rajah 4.3	Keluk pertumbuhan bakteria pengurai hidrokarbon pada suhu optimumnya iaitu; (a) 30°C, (b) 37°C dan (c) 40°C	60
Rajah 4.5	Pertumbuhan bakteria di atas agar Ramsay (mengandungi glukosa) selepas penambahan 5, 10, 15 dan 20% (v/v) minyak mentah pada suhu 30°C	75
Rajah 4.6	Pertumbuhan bakteria di atas agar Ramsay (tanpa glukosa) selepas penambahan 5, 10, 15 dan 20% (v/v) minyak mentah pada suhu 30°C	77
Rajah 4.7	Pertumbuhan bakteria di atas agar Ramsay selepas penambahan 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mM fenol pada suhu 30°C	79
Rajah 4.8	Pertumbuhan bakteria di atas media Ramsay selepas penambahan 5, 10, 15 dan 20% (v/v) minyak diesel pada suhu 30°C	81

Rajah 4.9	Profil penurunan kandungan TPH oleh bakteria pengurai hidrokarbon dalam tempoh dua bulan	85
Rajah 4.10	Profil keupayaan biodegradasi oleh bakteria pengurai hidrokarbon dalam tempoh dua bulan	85
Rajah 4.11	Suhu tanah di dalam plot olah tanah di sepanjang tempoh rawatan selama dua bulan	88
Rajah 4.12	Keadaan pH di dalam plot olah tanah di sepanjang tempoh rawatan selama dua bulan	89
Rajah 4.13	Kandungan kelembapan tanah di dalam plot olah tanah di sepanjang tempoh rawatan selama dua bulan	90
Rajah 4.14	Populasi bakteria di dalam plot olah tanah pada minggu awal dan akhir rawatan	91
Rajah 4.15	Profil penurunan jumlah petroleum hidrokarbon (TPH) oleh konsortia Dd-6 dalam tempoh enam bulan	92
Rajah 4.16	Profil keupayaan biodegradasi enapcemar minyak oleh konsortia Dd-6 dalam tempoh enam bulan	92
Rajah 4.17	Suhu tanah di dalam plot olah tanah di sepanjang tempoh rawatan selama enam bulan	94
Rajah 4.18	Keadaan pH di dalam plot olah tanah di sepanjang tempoh rawatan selama enam bulan	95
Rajah 4.19	Kandungan kelembapan tanah di sepanjang tempoh rawatan selama enam bulan	95
Rajah 4.20	Populasi bakteria di sepanjang tempoh rawatan selama enam bulan	96
Rajah 4.21	Profil awal kromatografi gas enapcemar diesel	98
Rajah 4.22	Profil kromatografi gas enapcemar diesel pada bulan keenam	99
Rajah 4.23	Komposisi hidrokarbon alifatik terpilih pada setiap bulan	101

## SENARAI FOTO

		Halaman
Foto 3.1	(a) LCOT (b) Tapak rawatan enapcemar minyak di LCOT	40
Foto 3.2	(a) Plot olah tanah yang diguna dalam kajian (b) Keadaan tanah setelah dimasukkan 10% diesel (v/v), serampang tiga mata untuk pembajakan serta batang paip untuk persampelan	50
Foto 4.1	Morfologi koloni bakteria yang diambil menggunakan mikroskop stereo (x15)	59
Foto 4.2	Bentuk sel yang dilihat menggunakan mikroskop cahaya (x1000)	60
Foto 4.3	Produk DNA bagi bakteria pengurai hidrokarbon, di mana; Lorong 7. ReTOS-Cr2; 9. ReTOS-Cr4; 10. ReCO-Cr2; 12. Penanda DNA 1 kb	64
Foto 4.4	Produk DNA bagi bakteria pengurai hidrokarbon, di mana; Lorong 4. ReTOS-Cr3; 5. RePOS-W1; 11. RdPOS-Cr1; 13. Penanda DNA 1 kb	64
Foto 4.5	Variasi morfologi koloni bagi konsortia Dd-6 pada suhu 30°C yang diperhati di bawah mikroskop stereo (15x)	84



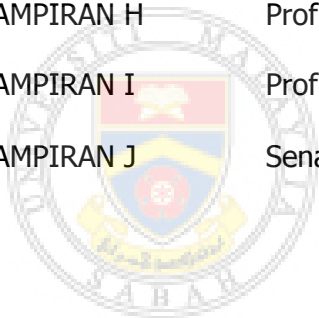


## SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN

%	peratus
>	lebih daripada
±	tambah tolak
≤	kurang atau sama daripada
μL	mikroliter
μm	mikrometer
API	<i>Analytical Profile Index</i>
BLAST	<i>Basic local alignment research tool</i>
bp	<i>base pair</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
cm	sentimeter
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
g	gram
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometer</i>
gL <sup>-1</sup>	gram per liter
kb	<i>kilo base pair</i>
km <sup>2</sup>	kilometer persegi
L	liter
m	meter
mL	mililiter
mm	milimeter
mM	milimolar
nm	nanometer
O.D	<i>optical density</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ppm	<i>part per million</i>
RBC	<i>Rose Bengal Chloramphenicol</i>
RBF	<i>Round bottom flask</i>
rDNA	<i>Ribosomal DNA</i>
RNA	<i>Ribose nucleic acid</i>
rpm	<i>revolution per minute</i>
sp.	spesies
TAE	tris-asetat
TPH	<i>Total petroleum hydrocarbon</i>
TSA	<i>Tryptic Soy agar</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>

## SENARAI LAMPIRAN

		Halaman
LAMPIRAN A	Kiraan Plat Heterotropik (Kaedah APHA 9215)	121
LAMPIRAN B	Prosedur Asas Morfologi Sel dan Ujian Biokimia	122
LAMPIRAN C	Parameter Analitikal Dalam Penentuan Profil Kromatografi Hidrokarbon	125
LAMPIRAN D	Bentuk Sel Bakteria Pengurai Hidrokarbon Berdasarkan Pewarnaan Gram	126
LAMPIRAN E	Keputusan Analisis API	127
LAMPIRAN F	Pengenalpastian Spesies Bakteria Berdasarkan Jujukan Gen 16S rDNA	128
LAMPIRAN G	Keluk Pertumbuhan Bakteria Pengurai Hidrokarbon	134
LAMPIRAN H	Profil Piawai Hidrokarbon (C <sub>12</sub> hingga C <sub>28</sub> )	138
LAMPIRAN I	Profil Kromatografi Gas Emapcemar Diesel	139
LAMPIRAN J	Senarai Penerbitan	144



UMS  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Pengenalan

Perkembangan industri mikrobiologi serta bioteknologi banyak menyumbang dalam aktiviti harian masyarakat umum seperti dalam bidang perubatan, sektor pertanian, industri berasaskan makanan dan minuman fermentasi, industri kimia, industri perlombongan serta industri petroleum (Ibrahim, 1994). Namun, dengan setiap kemajuan yang dikecapi negara, masalah masih lagi timbul. Masalah utama yang dihadapi pada masa kini adalah pencemaran serta kontaminasi pada tanah, air bawah tanah, sedimen, air larian permukaan dan udara oleh bahan kimia toksik yang berbahaya.

Produk petroleum merupakan antara bahan kimia yang digunakan secara meluas di kebanyakan negara dan permintaan terhadap minyak semakin meningkat berikutan perkembangan sektor perindustrian dan automobil. Ini menyebabkan berlakunya peningkatan dalam jumlah minyak yang perlu diproses, disimpan dan dieksport, di mana masalah kemalangan dan kebocoran juga tidak dapat dielakkan. Industri berasaskan petroleum biasanya menghasilkan kuantiti air sisa bercampur minyak berserta enapcemar berkepekatan tinggi semasa operasi penyimpanan, penapisan dan pemprosesan minyak.

Pencemaran alam oleh produk petroleum merupakan kelaziman kerana sisa industri dibuang ke persekitaran dalam kuantiti yang banyak. Punca utama kontaminasi petroleum adalah dari kebocoran tangki simpanan atau dari saluran paip bawah tanah, tumpahan semasa proses penghantaran produk, tapak stesen minyak terbiar, pelepasan sisa perindustrian serta pembuangan sisa enapcemar secara haram (Sarkar *et al.*, 2005).

Petroleum merupakan campuran antara hidrokarbon alifatik, aromatik, resin dan asphalt yang kompleks (Atlas, 1981; Leahy dan Colwell, 1990). Ia mengandungi

bahan kimia merbahaya seperti benzena, toluena, etilbenzena, xylene dan naftalena. Pencemaran petroleum adalah merbahaya kerana mampu mengancam kesihatan manusia, haiwan dan tumbuhan serta mengganggu ekosistem darat dan marin (Atlas, 1981; Van Hamme *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2005)

Jabatan Alam Sekitar Malaysia bersama agensi lain turut memantau pencemaran yang berlaku di sekitar perairan negara. Berdasarkan laporan, pencemaran yang berlaku berpunca dari tumpahan minyak dari kapal dagangan di laut, pelabuhan dan terminal serta dari aktiviti penerokaan dan carigali dijalankan. Selain itu, peningkatan permintaan terhadap produk berasaskan petroleum juga mengakibatkan berlakunya masalah seperti pembuangan air sisa ke dalam sungai dan laut serta kejadian tumpahan minyak. Penyelidikan secara intensif banyak dijalankan bagi mencari penyelesaian untuk mengatasi masalah ini.

Menurut Sarkar *et al.* (2005) tanah yang dicemari minyak dapat dirawat melalui tiga proses iaitu secara fizikal, kimia dan biologi. Proses fizikal termasuklah pembuangan di tapak pelupusan sanitari atau pembakaran insinerator, namun cara ini memerlukan kos perbelanjaan yang tinggi. Rawatan secara kimia melibatkan suntikan terus bahan pengoksida ke dalam tanah atau kawasan tadahan air bawah tanah yang tercemar. Rawatan secara biologi pula merangkumi proses penguraian atau biodegradasi bahan tercemar kepada keadaan tidak bertoksik berdasarkan aktiviti mikrobiologi.

Biodegradasi adalah proses penguraian bahan organik oleh organisma hidup yang sering dikaitkan dengan ekologi, pengurusan sisa pepejal atau bioremediasi. Sebatian petroleum hidrokarbon menjalani proses degradasi melalui dua cara iaitu degradasi oleh bakteria atau tindakbalas kimia, dan menghasilkan metana, karbon dioksida dan air (Atlas, 1981; Wong *et al.*, 1997). Menurut Atlas (1981), banyak kajian dibuat berkenaan aktiviti mikroorganisma ke atas hidrokarbon dan mendapati terdapat banyak bakteria berupaya menggunakan hidrokarbon sebagai sumber utama tenaga untuk pertumbuhan. Penggunaan hidrokarbon oleh mikrob bergantung kepada faktor persekitaran dan sifat kimia semulajadi sebatian itu.

Bakteria mampu menjalankan proses biodegradasi dalam keadaan aerobik atau anaerobik. Antara bakteria yang biasa digunakan termasuklah *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* dan *Nocardia* (Wong *et al.*, 1997). Bartha dan Atlas (1977) telah menyenaraikan beberapa spesies pengurai hidrokarbon yang diperoleh dari persekitaran marin iaitu *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Candida*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula* dan *Sporobolomyces*. Leahy dan Colwell (1990) turut melaporkan beberapa bakteria yang berupaya mendegradasikan minyak petroleum iaitu *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* dan *Rhodococcus*.

Bioremediasi didefinisikan sebagai penggunaan mikroorganisma hidup untuk mengurai bahan pencemar kepada keadaan tidak bertoksik di dalam tanah, air mahupun gas (Anderson, 1995). Secara amnya, bioremediasi diklasifikasikan kepada dua kategori iaitu *in situ* dan *ex situ*. Kaedah *in situ* melibatkan rawatan bahan tercemar di tapak manakala kaedah *ex situ* melibatkan perawatan bahan tercemar di tempat lain. Antara contoh teknologi bioremediasi adalah bioreaktor, bioaugmentasi, fitoremediasi, biokompos dan olah tanah.

Namun, teknik yang mudah serta lebih mesra alam dalam merawat enapcemar minyak serta pencemaran tanah oleh petroleum hidrokarbon adalah dengan menggunakan aplikasi olah tanah. Olah tanah merupakan alternatif terbaik dalam rawatan serta perlupusan sisa-sisa petroleum kerana lebih berjaya dari teknik insinerator serta mesra alam. Kriteria penting yang perlu diambil kira dalam aplikasi ini termasuklah persediaan plot rawatan yang dilapisi lapisan istimewa, semburan bakteria pengurai hidrokarbon, penambahan nutrien bagi keperluan mikrob, pembajakan di tapak rawatan serta siraman air yang dibuat secara berkala bagi mengoptimumkan proses biodegradasi.

Lazimnya, selepas enapcemar minyak menjalani rawatan bioremediasi, komponen hidrokarbon di dalamnya akan diuraikan menjadi bahan yang tidak merbahaya dan keadaan tanah akan kembali pulih ke keadaan asal. Malah, tanah tersebut selamat untuk digunakan semula bagi kegiatan pertanian.

## **1.2 Objektif Kajian**

Tujuan utama kajian adalah untuk menentukan keupayaan bakteria tempatan yang telah dipilih dari proses penyaringan, pemencilan dan pencirian bakteria pengurai hidrokarbon untuk merawat enapcemar minyak melalui aplikasi olah tanah. Objektif spesifik kajian adalah seperti berikut:

- i. Untuk memencil, menyaring dan mencirikan bakteria pengurai hidrokarbon dari minyak mentah, enapcemar minyak tulen dan enapcemar minyak terawat.
- ii. Untuk mengkaji tahap biodegradasi bakteria pengurai hidrokarbon ke atas enapcemar minyak diesel.
- iii. Untuk mengawalselia parameter yang mempengaruhi bioremediasi enapcemar diesel selama enam bulan.

## **1.3 Kepentingan Kajian**

Kepelbagaian aktiviti mikroorganisma dalam alam membawa banyak faedah serta kebaikan kepada manusia, khususnya dalam bidang mikrobiologi industri. Bidang ini merupakan cabang mikrobiologi gunaan yang menggunakan mikrob terpilih pada peringkat industri untuk menghasilkan produk serta teknologi baru. Ia turut melibatkan kajian tindakbalas mikrob dalam pengawalan keadaan semulajadi.

Di Malaysia, masalah pencemaran dari kawasan perindustrian termasuklah dari industri petroleum semakin berleluasa. Kini, banyak penyelidikan dijalankan dalam usaha menangani masalah tersebut. Berdasarkan pembacaan, didapati kajian biodegradasi hidrokarbon serta pengenalpastian spesies pengurai hidrokarbon yang berpotensi di Malaysia masih sedikit. Oleh itu, hasil kajian ini penting untuk tujuan rujukan pada masa kini dan masa hadapan. Kajian ini juga membawa banyak kebaikan kepada masyarakat dan alam sekitar. Mikrob yang diperoleh boleh dikomersialkan untuk merawat masalah berkenaan pencemaran oleh petroleum hidrokarbon. Kini, enapcemar minyak dari industri petroleum dan petrokimia boleh dirawat menggunakan kaedah yang lebih selamat, mesra alam serta kos efektif apabila menggunakan kaedah olah tanah sebagai rawatan pemulihan.

## BAB 2

### ULASAN PERPUSTAKAAN

#### 2.1 Petroleum Hidrokarbon

Hidrokarbon terdiri dari komponen asas kumpulan sebatian organik iaitu elemen hidrogen dan karbon. Ia terbahagi kepada dua kelas utama iaitu hidrokarbon alifatik dan hidrokarbon aromatik serta unsur lain seperti sulfur, nitrogen dan oksigen (Jadual 2.1). Hidrokarbon alifatik terdiri dari rantai lurus karbon dan dikelaskan kepada tiga kumpulan iaitu alkana, alkena dan alkuna. Hidrokarbon aromatik atau hidrokarbon alkil pula terdiri dari gelang benzena yang mengandungi enam karbon dan disambung oleh ikatan tunggal atau ikatan ganda dua.

**Jadual 2.1: Komponen-komponen hidrokarbon biasa**

Jenis hidrokarbon	Contoh komponen
Hidrokarbon (Alifatik)	Alkana (metana, 2-metilbutana, siklobutana) Alkena (etilena, 1-pentena, cis-1,2-dikloroetena) Alkuna (asetilena)
Hidrokarbon (Aromatik)	Monoaromatik (benzena) Diaromatik (naftalena) Poliaromatik (benzo(a)pyrena)
Bukan-hidrokarbon (Kumpulan terbitan)	Sebatian sulfur (dibenzotiofena) Sebatian nitrogen ( <i>acridine</i> ) Sebatian oksigen (asid karboksilik siklopentana) Asfalt [(C <sub>79</sub> H <sub>92</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ]

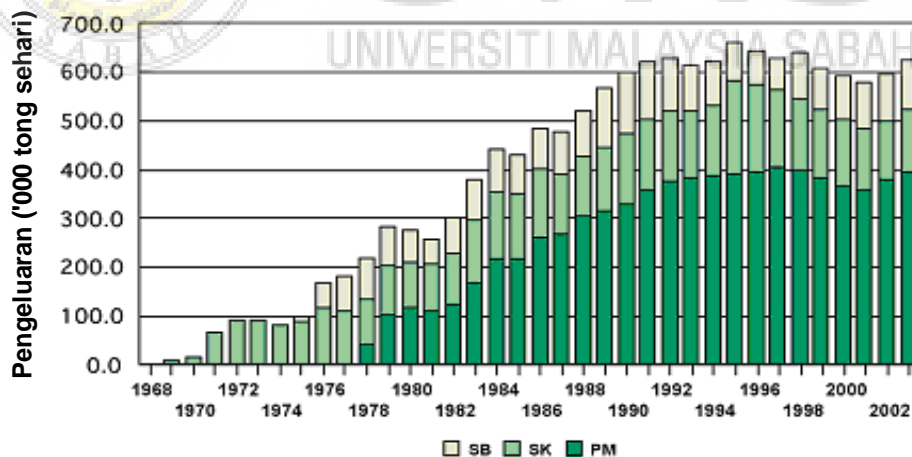
Sumber: Wong *et al.* (1997)

Petroleum merupakan campuran antara hidrokarbon alifatik, aromatik, resin dan asfalt yang kompleks (Atlas, 1981; Leahy dan Colwell, 1990). Ia terdiri dari hidrokarbon tepu, hidrokarbon tak tepu, hidrokarbon aromatik dan terbitannya iaitu sebatian nitrogen dan sulfur. Petroleum memiliki beberapa ciri unik seperti sifatnya yang cair, nilai kalori yang tinggi, menjadi pelbagai jenis bahan api, minyak pelincir

serta merupakan bahan petrokimia (Koesoemadinata, 1987). Kebanyakan produk petroleum mempunyai nilai komersial tersendiri terutamanya dalam sektor perindustrian.

## 2.2 Sejarah serta Pengeluaran Minyak Petroleum di Malaysia

Eksplorasi petroleum di Malaysia bermula pada abad ke-20 di Sarawak, di mana minyak pertama telah ditemui pada tahun 1909 dan pertama kali dikeluarkan pada tahun 1910 (Razmahwata, 2005). Pada tahun 1975, kerajaan telah mengizinkan konsesi petroleum di mana syarikat minyak diberi hak eksklusif untuk mencarigali serta mengeluarkan sumber petroleum. Malaysia mempunyai simpanan minyak ke-25 terbesar di dunia dan simpanan gas ke-14 terbesar di dunia. Jumlah keseluruhan simpanan mencecah 18.82 bilion tong minyak dengan kadar penghasilan minyak mentah sebanyak 600 ribu tong sehari (Razmahwata, 2005; US EIA, 2009). Rajah 2.1 merujuk kepada pengeluaran minyak mentah Malaysia dari tahun 1968 sehingga 2002 (Razmahwata, 2005). Pengeluaran minyak mentah di Malaysia didapati meningkat dengan peredaran masa berikutan perkembangan dalam industri petroleum dan petrokimia serta peningkatan kenderaan bermotor.



**Rajah 2.1: Sejarah pengeluaran minyak mentah Malaysia, di mana; SB = Sabah, SK = Sarawak, PM = Semenanjung Malaysia.**

Sumber: Razmahwata (2005)