



TESIS - RE 142541

BIOREMEDIASI TANAH TERKONTAMINASI SOLAR
MENGUNAKAN VARIASI KULTUR CAMPURAN
BAKTERI DAN RASIO NUTRIEN

RIMA NURMALASARI
3315201205

DOSEN PEMBIMBING:
Bieby Voijant Tangahu, ST, MT, PhD.

PROGRAM MAGISTER
DEPARTEMEN TEKNIK LINGKUNGAN
FAKULTAS TEKNIK SIPIL, LINGKUNGAN DAN KEBUMIHAN
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018



TESIS- RE142541

BIOREMEDIASI TANAH TERKONTAMINASI SOLAR
MENGUNAKAN VARIASI KULTUR CAMPURAN
BAKTERI DAN RASIO NUTRIEN

RIMA NURMALASARI
3315201205

DOSEN PEMBIMBING
Bieby Voijant Tangahu, ST, MT, PhD.

PROGRAM MAGISTER
DEPARTEMEN TEKNIK LINGKUNGAN
FAKULTAS TEKNIK SIPIL, LINGKUNGAN DAN KEBUMIHAN
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018



TESIS- RE142541

BIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED
DIESEL USING BACTERIA MIXED CULTURE
VARIATED AND NUTRIENT RATIO

RIMA NURMALASARI
3315201205

SUPERVISOR
Bieby Voijant Tangahu, ST, MT, PhD.

MASTER PROGRAM
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING
FACULTY OF CIVIL ENGINEERING AND GEO ENGINEERING
SEPULUH NOVEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2018

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Teknik (M.T.)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

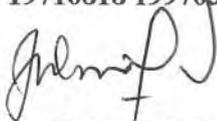
Oleh :
Rima Nurmalasari
NRP. 3315201205

Tanggal Ujian : 03 Januari 2018
Periode Wisuda : Maret 2018

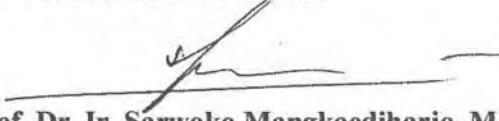
Disetujui oleh :



1. **Biaby Voijant Tangahu, S.T., M.T., Ph.D.** (Pembimbing)
NIP : 19710818 199705 2 001



2. **Prof. Dr. Yulinah Trihadiningrum, M.App.Sc.** (Penguji)
NIP : 19530706 198403 2 004



3. **Prof. Dr. Ir. Sarwoko Mangkoediharjo, M.Sc.ES.** (Penguji)
NIP : 19540824 198403 1 001



4. **Ipung Fitri Purwanti, S.T., MT., Ph.D.** (Penguji)
NIP : 19711114 200312 2 001



Fakultas Teknik Sipil, Lingkungan, dan Kebumihan
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Dehan



D AA Warmadewanthi, S.T., M.T., Ph.D.
NIP.19750212 199903 2 001

BIOREMEDIASI TANAH TERKONTAMINASI SOLAR MENGUNAKAN VARIASI KULTUR CAMPURAN BAKTERI DAN RASIO NUTRIEN

Nama Mahasiswa : Rima Nurmalasari
NRP : 3315 201 205
Departemen : Teknik Lingkungan
Dosen Pembimbing : Bieby Voijant Tangahu, ST, MT, PhD.

ABSTRAK

Pencemaran tanah oleh hidrokarbon dapat berasal dari kegiatan eksplorasi dan eksploitasi minyak bumi yaitu banyaknya tumpahan atau cecceran dari proses pengeboran dan kebocoran pipa. Produk turunan minyak bumi yang paling banyak digunakan adalah bahan bakar solar. Solar merupakan salah satu produk utama dari penyulingan minyak bumi yang menjadi sumber utama polusi di lingkungan karena merupakan hidrokarbon kompleks. Kelarutan hidrokarbon yang rendah dalam tanah menyebabkan rendahnya efektifitas biodegradasi. Salah satu cara menanggulangi permasalahan ini adalah dengan bioremediasi. Terdapat dua pendekatan yang dapat digunakan dalam bioremediasi tumpahan minyak, yaitu biostimulasi dan bioaugmentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh metode biostimulasi yang dikombinasikan dengan metode bioaugmentasi dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak solar dalam tanah.

Pada penelitian ini variabel yang digunakan adalah jenis kultur campuran bakteri (*Bacillus subtilis* - *Pseudomonas fluorescens*; *B. subtilis* - *Pseudomonas putida*; *P. putida* - *P. fluorescens*), variasi konsentrasi penambahan inokulum 5% (b/b) dan 10% (b/b), dan variasi konsentrasi penambahan nutrisi anorganik berupa pupuk urea dan superfosfat (100:10:10 dan 100:5:1). Penelitian ini dilakukan dalam skala laboratorium dengan konsentrasi penambahan minyak solar 10% (b/b). Uji utama adalah uji bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon dengan pengukuran parameter yang diuji meliputi kadar minyak yang terlarut (*Total Petroleum Hydrocarbon*), suhu, pH, total koloni mikroba serta pengukuran komponen hidrokarbon dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*.

Hasil penelitian menunjukkan penurunan nilai TPH terbaik pada campuran *P. fluorescens* - *P. putida* dengan konsentrasi inokulum 10% b/b yaitu 58.131 mg/kg (H-15) dengan tingkat degradasi sebesar 62,35%. Sedangkan berdasarkan variasi rasio pupuk anorganik, *P. fluorescens* - *P. putida* menunjukkan hasil penurunan nilai TPH tertinggi pada rasio penambahan C:N:P 100:5:1 penurunan TPH sebesar 54.968 mg/kg (H-15) dengan tingkat degradasi sebesar 64,04%.

Kata kunci: Bioaugmentasi, Biostimulasi, Campuran bakteri, Hidrokarbon, Pupuk Anorganik.

”HALAMAN INI SENGAJA DIKOSONGKAN”

BIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED DIESEL USING BACTERIA MIXED CULTURE VARIATED AND NUTRIENT RATIO

Student Name : Rima Nurmalasari
ID Number : 3315 201 205
Department : Environmental Engineering
Supervisor : Bieby Voijant Tangahu, ST, MT, PhD.

ABSTRACT

Pollution of soil by hydrocarbon can be caused by exploration and exploitation activities of petroleum that is the number of spills or spills from the drilling process and leakage of pipes. The most widely used petroleum derivative product is diesel fuel. Solar is one of the main products of petroleum refining which is the main source of pollution in the environment because it is a complex hydrocarbon. The low hydrocarbon solubility in the soil causes the low effectiveness of biodegradation. One way to overcome this problem is by bioremediation. There are two approaches that can be used in bioremediation of oil spills, namely biostimulation and bioaugmentation. This study aims to examine the effect of biostimulation method combined with bioaugmentation method in degrading hydrocarbon compounds in the soil.

*In this study the variables used were mixed culture bacteria (*Bacillus subtilis* - *Pseudomonas fluorescens*, *B. subtilis* - *Pseudomonas putida*, *P. putida* - *P. fluorescens*), variation of inoculum addition concentration were 5% and 10% (w/w), and variations in the concentration of inorganic fertilizers addition in the form of urea and superphosphate (100: 10: 10 and 100: 5: 1). This research was conducted on a laboratory scale with diesel concentration added 10% (w/w). The main test was hydrocarbon contaminated soil bioremediation test with measurement of tested parameters including Total Petroleum Hydrocarbon, temperature, pH, total microbial colonies and measurement of hydrocarbon components with Gas Chromatography-Mass Spectrometry.*

*The results showed that the best removal of TPH value on the mixture of *P. fluorescens* - *P. putida* in inoculum 10% (w/w) was 58.131 mg/kg (H-15) with the degradation rate of 62.35%. Meanwhile, based on variation of ratio of inorganic fertilizer, *P. fluorescens* - *P. putida* showed the highest decrease of TPH value on the addition ratio of C: N: P 100: 5: 1 decrease of TPH by 54.968 mg/kg (H-15) with degradation level equal to 64,04 %.*

Keywords: *Bioaugmentation, Biostimulation, Hydrocarbon, Mixed Bacteria, Anorganic Fertilizer.*

"HALAMAN INI SENGAJA DIKOSONGKAN"

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena hanya dengan rahmat dan pertolongan Nya, akhirnya Penulis dapat menyelesaikan Tesis tepat pada waktunya. Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang Strata Dua (S-2) Departemen Teknik Lingkungan Fakultas Teknik Sipil, Lingkungan dan Kebumihan Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Penulisan Tesis dapat terlaksana dengan baik atas bantuan dan bimbingan dari pihak-pihak yang terkait dalam pelaksanaannya. Oleh karena itu, perkenankan Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Bieby Voijant Tangahu, ST, MT, PhD selaku Dosen Pembimbing yang telah menyediakan banyak waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan arahan, bimbingan, dan saran.
2. Ibu Prof. Dr. Yulinah Trihadiningrum, M.AppSc dan Bapak Prof. Dr. Ir. Sarwoko Mangkoediharjo, MscES serta Ibu Ipung Fitri Purwanti, ST, MT, PhD selaku Dosen Penguji yang memberikan arahan, saran yang bermanfaat dan kritik yang membangun.
3. Bapak Dr.Ir. Mohammad Razif, MM selaku Dosen Wali yang selalu sabar dalam memberikan pengarahan selama masa perkuliahan S-2.
4. Ibu Dr. Ir. Ellina Sitepu Pandebesie, MT selaku Ketua Departemen Program Studi Pasca Sarjana Teknik Lingkungan.
5. Ibu Ipung Fitri Purwanti, ST, MT, Ph.D selaku Koordinator Tesis.
6. Keluarga di rumah khususnya mama dan papa tercinta yang selalu memberikan doa dan semangat, serta adik-adik Fahmi, Firman dan Silvia yang telah memberikan hiburan dan dukungan yang luar biasa pada saat mengerjakan Tesis.
7. Ibu Iin, Ibu Merry, Pak Edy, dan Pak Hadi selaku laboran di laboratorium Teknik Lingkungan yang membantu dan mengarahkan dalam melakukan penelitian.
8. Teman melakukan kegiatan penelitian di laboratorium Remediasi Lingkungan yaitu Setyo dan Fauzul, yang selalu memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian serta menjadi teman diskusi yang baik.

9. Sahabat-sahabat Penulis terutama Suhendra, Nasrullah, Made Satya, Dita dan Juwita yang selalu membantu ketika dibutuhkan, serta teman-teman S-2 Teknik Lingkungan-ITS angkatan 2015 yang selalu memberikan semangat dan motivasi dalam pengerjaan Tesis.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian Tesis. Penulis menyadari bahwa Tesis ini masih jauh dari sempurna. Namun, Penulis tetap berharap semoga Tesis ini dapat menjadi pengetahuan baru yang bermanfaat baik bagi Penulis maupun Pembaca.

Surabaya, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT.....	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Ruang Lingkup.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Pencemaran Hidrokarbon dalam Tanah.....	7
2.2 Tinjauan tentang Senyawa Hidrokarbon.....	8
2.3 Tinjauan tentang Minyak Solar.....	9
2.4 Teknologi Remediasi Tanah Tercemar Hidrokarbon	11
2.5 Pengertian Bioremediasi	12
2.6 Teknologi Bioremediasi.....	13
2.6.1 Bioaugmentasi	13
2.6.2 Biostimulasi	14
2.6.3 Faktor–faktor yang Berpengaruh dalam Meningkatkan Efisiensi Bioremediasi	16
2.7 Biodegradasi Hidrokarbon	20
2.7.1 Peran Mikroba Hidrokarbonoklastik dalam Biodegradasi.....	20
2.7.2 Biodegradasi Fraksi Alifatik.....	21
2.7.3 Biodegradasi Fraksi Aromatik	22
2.7.4 Bakteri Hidrokarbonoklastik.....	23
2.7.5 Tinjauan dan Karakteristik <i>Pseudomonas fluorescens</i>	24

2.7.6	Tinjauan dan Karakteristik <i>Pseudomonas putida</i>	26
2.7.7	Tinjauan dan Karakteristik <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.8	Degradasi Hidrokarbon oleh Konsorsium Mikroba	28
2.9	Penelitian Terdahulu.....	30
BAB 3	METODE PENELITIAN	33
3.1	Gambaran Umum	33
3.2	Kerangka Penelitian	33
3.3	Langkah Kerja Penelitian	35
3.3.1	Studi Literatur	35
3.3.2	Ide Penelitian.....	35
3.3.3	Rumusan Masalah	36
3.4	Penentuan Variabel Penelitian.....	36
3.5	Rancangan Penelitian	37
3.5.1	Persiapan Alat dan Bahan.....	38
3.6	Pelaksanaan Penelitian	39
3.6.1	Pembuatan Stok Bakteri Uji.....	39
3.6.2	Uji Pendahuluan untuk Menentukan Konsentrasi Pencemar Hidrokarbon Minyak Solar.....	40
3.6.3	Pembuatan Kultur dan Suspensi Bakteri	40
3.6.4	Persiapan Pupuk Anorganik untuk Perlakuan	42
3.6.5	Pembuatan Media Tercemar (<i>Spiked Soil</i>).....	42
3.6.6	Bioremediasi Tanah Tercemar Hidrokarbon.....	43
3.7	Analisis Data dan Pembahasan.....	47
3.8	Analisis Data dengan <i>Software</i> Statistik	48
3.9	Kesimpulan dan Saran.....	48
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN	49
4.1	Penelitian Pendahuluan Menentukan Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai <i>Optical Density</i> dan Jumlah Koloni Bakteri.....	49
4.2	Perubahan Suhu.....	52
4.3	Perubahan pH	54
4.4	Kadar Air.....	57

4.5	Jumlah Koloni Bakteri Selama Proses Bioremediasi Tanah Tercemar Hidrokarbon Minyak Solar	59
4.6	Hasil Penurunan <i>Total Petroleum Hydrokarbon</i> (TPH) Minyak Solar ..	62
4.7	Komponen Hidrokarbon Minyak Solar	66
4.8	Pengaruh Penambahan Variasi Jenis Campuran Bakteri terhadap Penyisihan Hidrokarbon.....	69
4.9	Pengaruh Penambahan Variasi Konsentrasi Inokulum Campuran Bakteri terhadap Penyisihan Hidrokarbon.....	72
4.10	Penentuan Rasio Pupuk Anorganik yang Optimum terhadap Penyisihan Hidrokarbon	75
4.11	Uji Statistik ANOVA <i>General Linier Model</i>	77
BAB 5	79
5.1	Kesimpulan	79
5.2	Saran	79
DAFTAR PUSTAKA	81
LAMPIRAN	91
BIOGRAFI PENULIS	111

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Hubungan antara Produk Turunan Minyak Bumi, Konstituen, dan Kemampuan Terbiodegradasi.....	10
Tabel 2.2 Komposisi Sel Mikroba.	15
Tabel 2.3 Jenis Sumber Nutrien.....	15
Tabel 2.4 Penelitian Terdahulu	30
Tabel 3.1 Matriks Perlakuan Antar Variasi.....	37
Tabel 3.2 Rancangan Variasi Perlakuan Pada Reaktor	44
Tabel 4.1 Persentase Penyisihan Hidrokarbon Minyak Solar	63
Tabel 4.2 Komponen Hidrokarbon Hasil GC-MS pada H-0 (Reaktor N0B0).....	67
Tabel 4.3 Komponen Hidrokarbon Hasil GC-MS pada H-15 (Reaktor NF210) ..	69

"HALAMAN INI SENGAJA DIKOSONGKAN"

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Reaksi Degradasi Hidrokarbon Alifatik	22
Gambar 2.2 Reaksi Degradasi Hidrokarbon Aromatik	23
Gambar 2.3 Sel Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i>	25
Gambar 2.4 Sel Bakteri <i>Pseudomonas putida</i>	27
Gambar 2.5 Sel Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> 3KP	28
Gambar 2.6 Contoh kometabolisme.....	29
Gambar 2.7 Skematis mekanisme degradasi sinergisme	30
Gambar 3.1 Kerangka penelitian.....	41
Gambar 3.2 Ilustrasi Pembuatan Suspensi Kultur Bakteri.....	41
Gambar 4.1 Uji Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai <i>Optical Density</i> pada Konsentrasi Inokulum 5%	50
Gambar 4.2 Uji Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai <i>Optical Density</i> pada Konsentrasi Inokulum 10%	50
Gambar 4.3 Uji Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai CFU pada Konsentrasi Inokulum 5% (v/v)	51
Gambar 4.4 Uji Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai CFU pada Konsentrasi Inokulum 10% (v/v).	51
Gambar 4.5 Suhu Reaktor pada Konsentrasi Inokulum 5% (b/b).....	53
Gambar 4.6 Suhu Reaktor pada Konsentrasi Inokulum 10% (b/b).....	53
Gambar 4.7 Nilai pH pada Konsentrasi Inokulum 5% (b/b).....	56
Gambar 4.8 Nilai pH pada Konsentrasi Inokulum 10% (b/b).....	56
Gambar 4.9 Persentase Kadar Air pada Konsentrasi Inokulum 5% Selama Proses Bioremediasi.....	58
Gambar 4.10 Persentase Kadar Air pada Konsentrasi Inokulum 10% Selama Proses Bioremediasi	58
Gambar 4.11 Total Koloni Bakteri pada Konsentrasi Inokulum 5% (b/b)	61
Gambar 4.12 Total Koloni Bakteri pada Konsentrasi Inokulum 10% (b/b)	61
Gambar 4.13 Persentase Penurunan TPH dari H-0 hingga H-15 Pada Konsentrasi Inokulum 5%	65

Gambar 4.14 Persentase Penurunan TPH dari H-0 hingga H-15 Pada Konsentrasi
Inokulum 10% 66

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kehadiran minyak bumi di perairan dan tanah dianggap sebagai zat yang tidak dikehendaki oleh alam karena jumlahnya yang tidak pada tempatnya (Fahrudin, 2014). Pencemaran tanah oleh minyak bumi dapat berasal dari kegiatan eksplorasi dan eksploitasi minyak bumi yaitu banyaknya tumpahan atau cecceran dari proses pengeboran, penyulingan, kecelakaan transportasi dalam pengangkutan, kebocoran pipa dan rusaknya tangki penyimpanan minyak (Herdiyantoro, 2005). Limbah yang dihasilkan dari hasil pengolahan minyak bumi adalah senyawa hidrokarbon. Senyawa hidrokarbon merupakan komponen terbesar dari minyak bumi sekitar 90%, sedangkan komponen sisanya adalah senyawa non-hidrokarbon (Lazar *et al.*, 2007).

Produk turunan minyak bumi yang paling banyak digunakan adalah bahan bakar solar dan bensin (Nashikin dan Shovitri, 2013). Solar merupakan salah satu produk utama dari penyulingan minyak bumi yang menjadi sumber utama polusi di lingkungan karena merupakan hidrokarbon kompleks. Kontaminan hidrokarbon pada tanah yang sulit diuraikan dapat mengubah sifat fisiko-kimia dan biologi tanah karena hidrokarbon bersifat toksik bagi organisme tanah dan mengganggu pertumbuhan tanaman (Widodo, 2010). Berdasarkan kandungannya, Kepmen LH No. 128 Tahun 2003 menyatakan bahwa tanah yang terkontaminasi minyak bumi termasuk dalam kategori limbah bahan berbahaya dan beracun (B3). Hal ini menyebabkan tanah yang tercemar senyawa hidrokarbon minyak bumi menjadi masalah lingkungan yang hingga saat ini selalu mendapat perhatian yang serius.

Untuk mengatasi masalah pencemaran hidrokarbon beberapa metode telah diterapkan, yaitu secara fisik dengan penyaringan lapisan minyak yang mengapung. Metode tersebut memerlukan beberapa peralatan apabila jumlah limbah minyak bumi meliputi jutaan ton sehingga kurang efisien. Secara kimia, tumpahan minyak diperlakukan dengan penggunaan senyawa dispersan atau surfaktan sintetik. Namun metode tersebut masih memberikan dampak negatif terhadap lingkungan serta masih memerlukan biaya oprasional yang mahal (Gudina, 2012). Teknologi

penanggulangan limbah minyak bumi yang saat ini mulai diterapkan adalah metode bioremediasi.

Bioremediasi adalah proses penurunan kontaminan di lingkungan menjadi bentuk yang kurang beracun menggunakan mikroorganisme, sehingga substansi kontaminan tersebut berkurang (Kumar *et al.*, 2011). Dalam proses bioremediasi, mikroorganisme tersebut mendegradasi senyawa polutan melalui reaksi yang berlangsung di dalam proses metabolisme (Vidali, 2001). Teknik bioremediasi dapat dilaksanakan di lingkungan tanpa menimbulkan kerusakan, tidak menimbulkan dampak lanjutan, serta dapat mengurangi limbah secara permanen (Retno *et al.*, 2013). Menurut Munawar *et al.* (2007), terdapat dua pendekatan yang dapat digunakan dalam bioremediasi tumpahan minyak, yaitu biostimulasi dan bioaugmentasi.

Biostimulasi merupakan penggunaan nutrisi untuk memicu mikroba *indigenous* yang terdapat secara alami melakukan biodegradasi. Nutrisi tambahan seperti fosfor dan nitrogen merupakan senyawa pendukung pertumbuhan, bahkan keberadaan sejumlah kecil bahan pencemar dapat berpengaruh untuk mengaktifkan enzim (Margesin dan Schinner, 2001). Nitrogen dan fosfor merupakan penyusun senyawa-senyawa penting dalam sel yang menentukan aktifitas pertumbuhan mikroorganisme. Kecepatan biodegradasi hidrokarbon sangat lambat bila tidak cukup terdapat nitrogen (N) dan fosfor (P) dalam tanah (Nugroho, 2006).

Pada penelitian ini, biostimulasi digunakan dalam bioremediasi tanah yang tercemar hidrokarbon dengan menekankan pada penambahan pupuk inorganik sebagai sumber nutrisi pada beberapa konsentrasi sehingga rasio C:N tanah berada pada kisaran rasio yang diharapkan mampu mendukung proses biodegradasi hidrokarbon. Chorom *et al.* (2010) meneliti kemampuan pupuk anorganik dalam meningkatkan degradasi hidrokarbon minyak bumi. Hasil gas kromatografi menunjukkan senyawa parafin dan isoperoid menurun di kisaran 40-60% dalam 10 minggu. Pada penelitian Agarry *et al.* (2012) menggunakan minyak tanah sebagai sumber karbon dan NPK (4,30 g) sebagai sumber nutrisi dengan hasil degradasi hidrokarbon pada solar sebesar 75,06% selama 42 hari.

Namun pada lingkungan tercemar hidrokarbon terdapat mikroorganisme yang terbatas dalam memanfaatkan substrat hidrokarbon untuk metabolismenya.

Sehingga dalam biodegradasi senyawa hidrokarbon membutuhkan campuran kelompok bakteri yang sejenis atau berbeda (konsorsium) yang dapat lebih cepat dalam mendegradasi hidrokarbon (Al-Saleh, 2009). Teknologi dengan penambahan mikroba yang sejenis atau berbeda dikenal sebagai bioaugmentasi. Bioaugmentasi merupakan cara peningkatan proses biodegradasi melalui penambahan mikroba atau enzim pada lingkungan tercemar (Fahrudin, 2014). Bioaugmentasi dapat digunakan untuk menangani bahan pencemar yang terdegradasi sangat lambat dan tingginya konsentrasi bahan pencemar yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba *indigenous* (Adams *et al.*, 2015).

Efektivitas bioremediasi bergantung pada peran koloni mikroba atau konsorsium dan bagaimana koloni mikroba tersebut diperkaya dan dipelihara dalam lingkungannya (Facundo, 2001). Kumpulan dari campuran dengan kapasitas enzimatis masing-masing diperlukan untuk memperluas dan mempercepat laju biodegradasi hidrokarbon (Arbabi *et al.*, 2009). Ketika mikroba *indigenous* pendegradasi jumlahnya sedikit atau tidak terdapat dalam area yang terkontaminasi ataupun jika tidak ada peningkatan jumlah bakteri secara alami, pemberian inokulum mikroorganisme dapat menjadi pilihan yang nyata. (Nugroho, 2006).

Penelitian Munawar *et al.* (2012) menunjukkan bahwa hasil isolasi bakteri dari lokasi di Indonesia yang tercemar minyak mentah yaitu, *Bacillus* sp. (LC.VI3); *Pseudomonas* sp. (LC.II7); *B. coagulan*; *B. slentimorbus*; *B. spasteuri*; *B. freudenreichii*; *P. freudenreichii*; *P. aeruginosa* dari lokasi penambangan minyak mentah di Propinsi Sumatera Selatan mampu memanfaatkan hidrokarbon minyak mentah sebagai sumber energinya dengan cara mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak mentah menjadi senyawa yang lebih sederhana. Selain itu, jumlah koloni bakteri tersebut menunjukkan rata-rata laju degradasi TPH dari tiga lokasi sebesar 1,29% per hari. Sehingga dapat diketahui bahwa konsentrasi *Total Petroleum Hydrocarbon* mencapai batas aman yaitu TPH < 1% (KepMen LH No. 128, 2003).

Pada penelitian yang dilakukan Al-Wasify dan Hameed (2014) menjelaskan strain bakteri sejenis dalam melakukan degradasi yaitu, *P. aeruginosa* (77,8%), *B. subtilis* (76,7%) dan *Acinetobacter iwoffii* (74,3%) memiliki kemampuan biodegradasi lebih rendah jika dibandingkan dengan kemampuan kombinasi atau konsorsium dari ketiga kultur bakteri tersebut yaitu 88,5%.

Pada penelitian Ghazali *et al.* (2004) menggunakan campuran konsorsium bakteri *B. subtilis* dengan *P.aeruginosa* dapat mendegradasi hidrokarbon rantai pendek dan rantai panjang senyawa alifatik n-alkana pada minyak solar dengan C₁₄ sebesar 74,5%. Selain itu, dengan genus yang sama yaitu *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. mampu mendegradasi minyak solar (C₁₂-C₂₃) dan menurunkan TPH 75% dengan menambahkan nutrisi unsur N dan P (Bento *et al.*, 2004). Sculz *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa campuran kedua bakteri *P.putida* dan *P.fluorescens* mampu menurunkan TPH minyak solar sebesar 88% karena keduanya mampu menghasilkan surfaktan alami (rhamnolipids) sehingga mampu menurunkan hidrofobitas dan meningkatkan proses biodegradasi.

Penambahan nutrisi diketahui dapat meningkatkan aktifitas dari mikroorganisme *indigenous*, termasuk organisme pendegradasi hidrokarbon. Penambahan nutrisi pada dua *treatment* (biostimulasi serta kombinasi bioaugmentasi-biostimulasi) telah berkontribusi terhadap peningkatan degradasi hidrokarbon yang akan terlihat dalam tiga minggu pertama proses inkubasi (Makadia *et al.*, 2011). Oleh karena itu, dengan adanya kombinasi antara teknik bioaugmentasi dengan biostimulasi diharapkan mampu mempercepat proses biodegradasi hidrokarbon dan menurunkan nilai TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*).

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dilakukan pendekatan untuk menganalisis efektivitas penambahan jenis campuran bakteri (*P. fluorescens*, *P. putida* dan *B. subtilis*) dengan variasi konsentrasi penambahan campuran bakteri dan penambahan nutrisi berupa pupuk anorganik, yaitu pupuk urea dan pupuk superfosfat yang divariasikan dalam proses bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon. Untuk menguji adanya penurunan konsentrasi kontaminan ditentukan jenis hidrokarbon yaitu minyak solar. Solar merupakan senyawa hidrokarbon dengan jumlah atom C berkisar antara 12 sampai dengan 20. Pemilihan hidrokarbon ini didasarkan pada tingkat kompleksitas senyawa dan banyaknya pencemaran lingkungan oleh hidrokarbon tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Bioremediasi memanfaatkan proses metabolisme mikroba dengan kondisi lingkungan yang optimum dan jumlah nutrisi yang mencukupi dalam memecah senyawa hidrokarbon. Menurut Munawar *et al.* (2007), terdapat dua pendekatan yang dapat digunakan dalam bioremediasi tumpahan minyak, yaitu bioaugmentasi dan biostimulasi. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian untuk mencari solusi dari permasalahan yang timbul di antaranya adalah bagaimana pengaruh penambahan variasi jenis campuran bakteri (*B.subtilis* – *P. fluorescens*; *B. subtilis* – *P. putida*; *P. putida* – *P.fluorescens*) dan variasi konsentrasi penambahan campuran bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar pada tanah, serta mendapatkan kadar nutrisi yang optimum digunakan oleh campuran bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar pada tanah tercemar.

1.3 Tujuan

Tujuan yang akan dicapai dari penelitian ini meliputi:

1. Mengkaji pengaruh penambahan variasi jenis kultur campuran bakteri (*B.subtilis* – *P.putida*; *B.subtilis* – *P.fluorescens*; *P.putida* - *P.fluorescens*) dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar di tanah.
2. Mengkaji pengaruh penambahan variasi konsentrasi kultur campuran bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar di tanah.
3. Menentukan konsentrasi kadar nutrisi yang optimum digunakan oleh kultur campuran bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar di tanah.

1.4 Ruang Lingkup

Ruang lingkup pada penelitian ini adalah:

1. Bioremediasi dilakukan dengan menggunakan penambahan mikroba, yaitu *P. fluorescens*, *P. putida* dan *B. subtilis*. Bakteri tersebut diperoleh dari Laboratorium Remediasi Lingkungan Jurusan Teknik Lingkungan FTSP ITS

2. Nutrien yang digunakan dalam bioremediasi adalah nutrien pupuk inorganik berupa urea dan superfosfat.
3. Limbah minyak yang digunakan adalah minyak solar dengan *specific gravity* 0,82-0,95 pada 15⁰C.
4. Tanah tercemar minyak berupa *spiked soil* dengan pencemar minyak solar.
5. Penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi hidrokarbon dan uji kemampuan biodegradasi jenis campuran bakteri.
6. Variabel yang digunakan adalah jenis campuran bakteri, konsentrasi penambahan campuran bakteri dan konsentrasi penambahan pupuk anorganik berupa urea dan superfosfat dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon. Penurunan konsentrasi hidrokarbon dianalisis menggunakan metode gravimetri dan untuk melihat komponen hidrokarbon yang terdegradasi dilakukan uji GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).
7. Penelitian dilakukan dengan menggunakan 21 reaktor.
8. Penelitian dianalisis dengan statistik menggunakan *software* minitab.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil setelah penelitian ini adalah:

1. Memberi informasi mengenai pengaruh dari penambahan jenis kultur campuran bakteri (*B.subtilis – P.putida*; *B.subtilis – P.fluorescens*; *P.putida - P.fluorescens*) dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar di tanah.
2. Memberikan informasi mengenai pengaruh dari penambahan variasi konsentrasi kultur campuran bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar di tanah.
3. Memberikan informasi mengenai kadar nutrien yang optimum digunakan oleh kultur campuran bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar di tanah.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Pencemaran Hidrokarbon dalam Tanah

Tanah merupakan sumber kehidupan manusia dan makhluk hidup lainnya sehingga fungsi tanah tidak dapat digantikan dengan fungsi lainnya. Pencemaran tanah adalah keadaan di mana bahan kimia buatan manusia masuk dan merubah lingkungan tanah alami sehingga konsentrasi suatu zat atau unsur hara tersebut menjadi racun bagi tanaman serta mengganggu ekosistem biota tanah dan tanah tidak dapat berfungsi sebagaimana peruntukannya (Notodarmojo, 2006).

Pencemaran hidrokarbon dalam tanah dapat disebabkan oleh terlepasnya berbagai bahan kimia yang diproduksi atau digunakan dalam aktifitas manusia ke permukaan atau ke dalam tanah. Salah satu penyebab utama pencemaran hidrokarbon dalam tanah berasal dari aktifitas penambangan minyak bumi. Pencemaran ini terjadi tidak hanya terbatas pada saat kegiatan penambangannya saja, tapi juga pada saat pengolahan dan pendistribusian hasil tambang seperti, tanker pembawa minyak mengalami kecelakaan, pengisian tangki berlebihan, dan adanya kebocoran pada jalur pipa transmisi di bawah permukaan tanah maupun pada tangki penyimpanan minyak (Widodo, 2010).

Pencemaran minyak bumi dapat mempengaruhi bau dan rasa air tanah meskipun dengan konsentrasi hidrokarbon yang sangat rendah (Zam, 2012). Pencemaran hidrokarbon pada tanah juga menyebabkan kerusakan luas pada ekosistem lokal karena akumulasi polutan pada hewan dan jaringan tumbuhan serta dapat menyebabkan kematian keturunan atau mutasi (Widodo, 2010). Berdasarkan PP No. 150 tahun 2000, disebutkan bahwa kerusakan tanah untuk produksi biomassa adalah berubahnya sifat dasar tanah yang melampaui kriteria baku kerusakan tanah.

Pencemaran tanah oleh hidrokarbon terjadi di beberapa daerah di Indonesia. Pencemaran tanah oleh hidrokarbon terjadi di sekitar tambang minyak Minas PT CPI, Riau akibat tumpahan *crude oil* saat proses pengeboran, produksi, dan transportasi (Karwati, 2009). Ali (2012) juga menyebutkan kasus pencemaran tanah

akibat hidrokarbon misalnya di PT. UNILEVER Jakarta seluas 2.2 Ha, di PT. CALTEX seluas 8 Ha, kebocoran pipa minyak bumi di PT. CONNOCO PHILLIPS sepanjang 300 meter.

1.2 Tinjauan tentang Senyawa Hidrokarbon

Senyawa hidrokarbon merupakan senyawa organik yang tersusun atas unsur karbon dan hidrogen. Senyawa hidrokarbon berasal dari sumber minyak bumi, termasuk bahan bakar umum seperti bensin, solar, minyak tanah, minyak pelumas, dan lemak. Kandungan senyawa hidrokarbon dalam minyak bumi lebih dari 90% (Fahrudin, 2014). Menurut Nugroho (2006) hidrokarbon dan senyawa turunannya, umumnya dapat dibagi dalam tiga kelompok besar, yaitu :

1. Hidrokarbon alifatik, yaitu senyawa hidrokarbon yang terdiri atas rantai atom karbon terbuka sehingga dapat disebut hidrokarbon rantai. Senyawa alifatik dibagi menjadi dua kelompok utama yaitu senyawa alifatik jenuh dan senyawa alifatik tak jenuh. Senyawa alifatik jenuh adalah senyawa alifatik yang rantai C-nya hanya bersifat ikatan-ikatan tunggal, dan yang termasuk di dalamnya adalah senyawa alkana. Sedangkan senyawa alifatik tak jenuh adalah senyawa alifatik yang rantai C-nya terdapat ikatan rangkap dua (alkena) atau rangkap tiga (alkuna).
2. Hidrokarbon alisiklik atau hidrokarbon siklik, yaitu senyawa hidrokarbon yang terdiri atas rantai atom karbon dalam satu lingkaran atau lebih yang berbentuk cincin, sehingga senyawa ini bersifat lebih stabil dan tahan terhadap oksidasi.
3. Hidrokarbon aromatik, yaitu golongan khusus senyawa hidrokarbon siklik yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi. Hidrokarbon aromatik yang paling sederhana adalah benzena yang terdiri atas sebuah cincin dasar yang mengandung 6 atom karbon, dengan ikatan rangkap di antara setiap atom karbon lainnya, sehingga terdapat tiga ikatan ganda dalam cincin dasar tersebut.

Senyawa hidrokarbon secara umum bersifat toksik. Toksisitas senyawa hidrokarbon bergantung pada jenisnya. Hidrokarbon alifatik mempunyai toksisitas yang lebih rendah daripada hidrokarbon aromatik dan hidrokarbon poliaromatik

(Kurniawan, 2014). Komposisi senyawa hidrokarbon pada minyak bumi tidak sama, bergantung pada sumber penghasil minyak bumi tersebut. Misalnya, minyak bumi di Amerika terutama mengandung hidrokarbon jenuh, sedangkan minyak bumi yang dieksplorasi di Rusia banyak mengandung hidrokarbon siklik.

Di Indonesia, minyak bumi yang berhasil dieksplorasi banyak mengandung senyawa aromatik dan kadar belerangnya sangat rendah. Persentase komposisi utama minyak bumi adalah 80 – 89% karbon, 12 – 14% hidrogen, 2 – 3% oksigen, 0 – 3% sulfur, dan 0,3 – 1% nitrogen. Selain itu, minyak bumi juga mengandung pengotor Cl, Ni, Mo, Fe, Na, dan unsur-unsur lain yang mempunyai sifat fisika dan kimia yang bervariasi, tergantung pada asal minyak bumi tersebut (Nugroho, 2006).

Berdasarkan pada peraturan tentang bioremediasi, ada beberapa persyaratan dalam limbah yang mengandung senyawa hidrokarbon. Persyaratan tersebut diantaranya kandungan TPH (*Total Petroleum Hydrokarbon*) tidak lebih dari 15% sebelum diolah. Kriteria hasil akhir pengolahan limbah minyak bumi secara biologis adalah kadar TPH tersebut tidak melebihi baku mutu yang berlaku berdasarkan Lampiran 2 Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No. 128 Tahun 2003 yaitu 1% (Kepmen LH, 2003).

1.3 Tinjauan tentang Minyak Solar

Produk turunan minyak bumi yang paling banyak digunakan adalah bahan bakar solar dan bensin (Nashikin dan Shovitri, 2013). Solar merupakan salah satu produk utama dari penyulingan minyak bumi yang menjadi sumber utama polusi di lingkungan karena merupakan hidrokarbon kompleks yang terdiri atas hidrokarbon alifatik (n-alkana), isoalkana, siklo-alkana, aromatik dan hidrokarbon aromatik polisiklik seperti naftalena, fluorena dan fenantrena (Nikhil *et al.*, 2013). Solar digunakan sebagai bahan bakar kendaraan diesel, dan pelarut minyak bakar yang tersusun atas ratusan rantai hidrokarbon yang berbeda, yaitu pada rentang C₁₂ sampai C₁₈.

Banyaknya jumlah rantai hidrokarbon menyebabkan tingginya tingkat titik didih solar yang mencapai $\pm 300^{\circ}\text{C}$. Solar memiliki densitas 15°C g/mL dengan *specific gravity* 0,87 (Pertamina UPPDN V, 2001). Minyak solar yang tidak berada pada tempatnya dapat dikategorikan sebagai limbah B3. Eksplorasi dan eksploitasi

produksi solar melibatkan aspek kegiatan yang beresiko menumpahkan solar tersebut antara lain, pengangkutan solar dengan menggunakan transportasi darat dan melalui perpipaan serta kilang-kilang penyulingan minyak yang menghasilkan minyak solar tersebut (Bento *et al.*, 2004).

Data Tabel 2.1 menunjukkan hubungan produk turunan minyak bumi yang salah satunya digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak solar (diesel) dengan kemampuannya untuk terdegradasi. Solar memiliki berbagai komponen kompleks senyawa hidrokarbon yaitu dari fraksi alifatik dan aromatik. Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri hidrokarbonoklastik yaitu memiliki kemampuan dalam mendegradasi komponen hidrokarbon. *P. putida* dan *P. fluorescens* mampu mendegradasi hidrokarbon alkana (C₅-C₁₆), alkil benzen, etilbenzen, sikloalkana, anthracene dan naftalin pada minyak solar. Hal tersebut dikarenakan *P. putida* dapat menghasilkan enzim alkana hidroksilase dan *P. fluorescens* mampu menghasilkan enzim naftalin dioksigenase/monooksigenase. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan digunakan minyak solar (diesel) sebagai senyawa pencemar hidrokarbon di tanah.

Tabel 0.1 Hubungan antara Produk Turunan Minyak Bumi, Konstituen, dan Kemampuan Terbiodegradasi

Kemampuan terbiodegradasi	Konstituen	Produk pada konstituen
Mudah terdegradasi	n-butana, I pentana, n-oktana, nonana	Bensin, solar
	Metil butana, dimetilpentana, metiloktana	Bensin
	Benzena, toluene, etil, benzene, xylene	Bensin
	Propil Benzena	Solar, kerosin
	Decana	Solar
	Dodecana	Kerosin
	Tridecana	Heating fuels
	Tetradecana	Minyak pelumas
	Napthalene	Solar
	Flourantenes	Kerosin
	Pyrenes	Heating oil
	Acnapthenes	Minyak pelumas
Sulit terdegradasi		

(Sumber : EPA, 1999)

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi pencemar hidrokarbon minyak solar optimum yang dapat dimanfaatkan bakteri sebagai sumber karbonnya. Dalam penelitian ini digunakan senyawa hidrokarbon minyak solar pada konsentrasi tertentu. Menurut Vidali (2001), kondisi optimum biodegradasi limbah minyak bumi terjadi pada total kontaminan (TPH) sebesar 5-10%. Selain itu, pada penelitian Pranowo dan Titah. (2016) menunjukkan pertumbuhan bakteri hingga yang diuji pada konsentrasi solar 2%, 4%, 6%, 8% dan 10% menunjukkan hampir semua isolat bakteri memiliki pertumbuhan lebih dari 50% untuk semua konsentrasi solar.

Pada penelitian Aldisi *et al.* (2016) pertumbuhan solar pada konsentrasi 15% hanya tumbuh 20% saja, sehingga dianggap sebagai konsentrasi hidrokarbon yang tinggi dan berpotensi toksik terhadap sebagian besar mikroorganisme. Oleh karena itu digunakan variasi konsentrasi solar 0% (kontrol), 6%, 8%, 10% dan 15% dalam menentukan seberapa besar kemampuan bakteri dalam mentolerir hidrokarbon pada konsentrasi tertentu. Konsentrasi minyak solar 0% (kontrol), 6%, 8%, 10% dan 15% diujikan pada dua konsentrasi inokulum yang berbeda yaitu 5% dan 10%.

1.4 Teknologi Remediasi Tanah Tercemar Hidrokarbon

Minyak bumi mengandung senyawa hidrokarbon yang sulit didegradasi secara alami dan bersifat toksik sehingga dibutuhkan penanganan dengan teknologi yang tepat. Salah satu teknologi yang digunakan adalah remediasi, yaitu membersihkan tanah yang terkontaminasi menjadi seperti semula. Gudina *et al.* (2012) menyebutkan remediasi tanah dapat dilakukan secara fisik-kimia, kimiawi, termal, dan biologis.

Untuk mengatasi masalah pencemaran hidrokarbon beberapa metode telah diterapkan, yaitu secara fisik-kimia dengan penggunaan senyawa dispersan atau surfaktan sintetik. Remediasi secara kimiawi dapat menggunakan oksidasi dengan hidrogen peroksida. Remediasi secara kimiawi bertujuan untuk melepaskan ikatan cincin aromatik yang sangat stabil. Sedangkan remediasi secara termal dapat menggunakan teknik iniserasi, yaitu bekerja dengan suhu yang tinggi untuk

melepaskan ikatan cincin aromatik. Untuk mendapatkan suhu yang tinggi, maka diperlukan energi yang besar pula (Gan *et al.*, 2009).

Remediasi secara biologis yang disebut juga dengan bioremediasi. Bioremediasi merupakan metode yang ramah lingkungan karena proses biodegradasi yang berlangsung terjadi secara alamiah. Teknologi bioremediasi saat ini mulai diterapkan dalam penanggulangan limbah minyak. Oleh karena itu pada penelitian ini akan digunakan teknologi bioremediasi dengan metode biostimulasi dan bioaugmentasi.

1.5 Pengertian Bioremediasi

Bioremediasi merupakan salah satu metode untuk mengaplikasikan prinsip-prinsip biologi dalam menghilangkan bahan-bahan kimia berbahaya dari air tanah, tanah dan lumpur (Cookson Jr, 1995). Bioremediasi tidak hanya diaplikasikan pada lingkungan yang tercemar hidrokarbon, tetapi juga dapat diterapkan untuk mengendalikan pencemaran oleh bahan-bahan berbahaya lainnya seperti pestisida dan senyawa xenobiotik lainnya (Nugroho, 2006). Proses bioremediasi dapat terjadi secara alamiah oleh mikroba yang terdapat pada lingkungan tercemar (*intrinsic bioremediation*). Selain itu, juga dapat dilakukan beberapa hal untuk mempercepat proses bioremediasi yaitu dengan penambahan mikroba (*exogenous microbe*), penambahan nutrisi, dan donor akseptor elektron (Fahrudin, 2014).

Proses bioremediasi bergantung pada kemampuan mikroorganisme yang digunakan dan sistem yang dioperasikan. Proses bioremediasi akan bekerja maksimal pada pH dan suhu optimum serta tersedianya oksigen yang cukup bagi mikroorganisme. Bioremediasi sendiri merupakan optimasi dari proses biodegradasi, dimana proses biodegradasi umumnya akan menghasilkan karbondioksida dan metana yang kurang berbahaya dibanding minyak pada besaran konsentrasi yang sama (Mangkoedihardjo, 2005).

Gordon (1994) menjelaskan untuk memahami lebih dalam mengenai bioremediasi hidrokarbon, terlebih dahulu memahami biodegradasi. Biodegradasi hidrokarbon merupakan proses alami, dengan melibatkan mikroba yang dapat mentransformasikan dan mendekomposisikan hidrokarbon menjadi komponen-komponen lain yang lebih sederhana. Bioremediasi merupakan optimasi dari proses

biodegradasi. Oleh karena itu, proses ini membutuhkan pengkondisian tertentu dan perlakuan-perlakuan khusus untuk mengatasi faktor-faktor lingkungan yang dapat membatasi proses biodegradasi. Menurut Hafiluddin (2011) beberapa kelebihan teknik bioremediasi adalah dapat menghilangkan toksisitas dari senyawa pencemar berbahaya, sederhana, dan bioremediasi secara *in situ* dapat dilakukan dengan aman.

1.6 Teknologi Bioremediasi

Berdasarkan tempat berlangsungnya, teknik bioremediasi dapat diaplikasikan langsung (*in situ*) pada lingkungan yang tercemar. Mikroba remediator yang digunakan adalah mikroba *indigenous*. Sifat remediasinya secara alamiah (*natural attenuation*). Teknik bioremediasi juga dapat dilakukan di luar lingkungan yang tercemar (*ex situ*), yaitu dengan membawa tanah yang terkontaminasi ke lokasi pengolahan yang telah ditetapkan (Hardiani *et al.*, 2011).

Menurut Sheehan (1995) jenis-jenis pengolahan bioremediasi *in-situ* adalah *bioventing*, *bioaugmentasi* dan *biosparging* yang akan diuraikan sebagai berikut:

- a. *Biostimulasi/Bioventing*: penggunaan nutrisi untuk memicu mikroba melakukan biodegradasi yang terdapat secara alami. Nutrisi tambahan seperti fosfor, nitrogen (N,P) dan aseptor elektron (O_2) pada lingkungan pertumbuhan mikroorganisme untuk menstimulasi pertumbuhannya.
- b. *Bioaugmentasi*: peningkatan biodegradasi melalui penambahan mikroba dari luar (*exogenous microorganism*) atau enzim pada lingkungan tercemar. Bakteri merupakan organisme yang umum digunakan dalam bioaugmentasi untuk merombak bahan pencemar.

1.6.1 Bioaugmentasi

Bioaugmentasi dapat digunakan untuk menangani bahan pencemar yang terdegradasi sangat lambat, bila lingkungan yang tercemar sulit dimodifikasi dalam rangka mencapai kondisi yang optimal bagi pertumbuhan mikroba, atau bila tingginya konsentrasi bahan pencemar menghambat pertumbuhan mikroba *indigenous*. Keberhasilan aplikasi bioaugmentasi diukur dari jumlah mikroba yang

berperan dalam proses degradasi serta daya tahan mikroba pada lingkungan yang tercemar.

Pada kenyataannya tidak semua mikroba yang ditambahkan mampu bertahan di lingkungan yang baru dan memberi peran yang signifikan dalam proses degradasi komponen pencemar. Oleh karena itu, untuk mendapatkan hasil yang signifikan dapat dilakukan penambahan nutrisi dan penambahan bakteri secara konsorsium untuk mengoptimalkan degradasi hidrokarbon. Proses ini dapat dikenal dengan *fertilizing*, yaitu teknik bioremediasi yang bertujuan untuk merangsang metabolisme mikroba dengan menambahkan mikroba *endogenous* dan nutrisi (N, P, K, dan unsur lainnya) (Fahrudin, 2014).

Untuk memperoleh *strain* mikroba ataupun konsorsium mikroba yang tepat bagi aplikasi bioaugmentasi, ada tiga pilihan metode yang bisa dilakukan, yaitu: pengkayaan selektif, penggunaan produk mikroba komersial, atau rekayasa genetik. Pengkayaan selektif pada dasarnya merupakan metode untuk meningkatkan jumlah koloni mikroba tertentu dari suatu inokulum.

1.6.2 Biostimulasi

Margesin dan Schinner (2001) menjelaskan biostimulasi adalah jenis remediasi alami yang dapat meningkatkan degradasi polutan dengan mengoptimalkan aerasi, penambahan nutrisi, pH dan mengontrol suhu. Pada dasarnya semua mikroorganisme membutuhkan karbon sebagai sumber energi untuk aktifitasnya dan keseimbangan metabolisme sel. Dalam kaitan ini sumber C telah tersedia dari hidrokarbonnya sendiri. Senyawa lain yang menjadi faktor pembatas yaitu N dan P. Dalam penanganan limbah penambahan nutrisi dilakukan untuk sumber nitrogen dan fosfor, sehingga proses degradasi oleh mikroba berlangsung lebih cepat dan pertumbuhannya meningkat (Hardiani *et al.*, 2011).

Unsur nitrogen dan fosfor sangat diperlukan untuk mengkonversi hidrokarbon menjadi bahan sel bagi mikroba. Nutrisi untuk pertumbuhan mikroba dapat dipenuhi dengan penambahan senyawa garam seperti amonium sulfat, amonium nitrat, dan kalsium sulfat. Mikroba harus mendapatkan seluruh kebutuhan nutrisi untuk tumbuh. Kebutuhan nutrisinya hampir sama dengan komposisi selnya yang dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 0.2 Komposisi Sel Mikroba.

Elemen	Berat Kering (%)
Karbon	50
Oksigen	20
Nitrogen	14
Hidrogen	8
Fosfor	3
Sulfur	1
Potasium	1
Natrium	1
Kalsium	0,5
Magnesium	0,5
Klorin	0,5
Besi	0,2
Lainnya	0,3

(Sumber: Atlas dan Bartha, 1985)

Struktur kimia mikroorganisme dapat digambarkan sebagai $C_5H_7O_2N$ dengan mineral-mineral lainnya dalam jumlah sedikit namun penting. Atlas dan Bartha (1985) menyebutkan kebutuhan karbon berbanding nitrogen adalah 10 : 1 sedangkan kebutuhan karbon berbanding dengan fosfor adalah 30 : 1. Nitrogen ditemukan pada protein, enzim, komponen dinding sel dan asam nukleat dari mikroba. Menurut Battelle (1996), nutrisi yang ditambahkan dilakukan dengan mencampur dengan tanah, yaitu menyemprotkan nutrisi dalam bentuk larutan konsentrasi atau dengan menambahkan nutrisi dalam bentuk kering pada setiap ember tanah per gramnya. Tabel 2.3. menunjukkan beberapa komposisi bahan kimia dari produk pertanian yang dapat digunakan pada proses bioremediasi.

Tabel 0.3 Jenis Sumber Nutrien

Nama Produk	Formula	Berat Molekul	Persentase C:N:P	Vendor
Urea	$CO(NH_2)_2$	60.03	46:0:0	Lesco
Super phosphate	$Ca(H_2PO_4)_2$	234	0:27:0	Lockbourne Farmers' Exchange Co.
Potassium sulfate	K_2SO_4	174	0:0:45	Lesco
Diammonium phosphate	$(NH_3)_2PO_4$	129	22:24:0	Lesco

Metabolisme mikroba tidak akan terjadi tanpa nitrogen. Bentuk molekul nitrogen hanya dapat digunakan oleh beberapa jenis mikroba, biasanya mikroba membutuhkan bentuk nitrogen yang tetap seperti asam amino nitrogen, ion-ion amonium atau ion-ion nitrat. Bentuk-bentuk dari nitrogen ini jarang ditemukan pada lingkungan, sehingga menyebabkan nitrogen menjadi faktor pembatas dalam pertumbuhan mikroba. Fosfor dibutuhkan dalam membran karena membentuk asam fosfat, ATP dan bergabung dengan asam nukleat (Atlas dan Bartha, 1985).

Rasio penambahan nutrisi, nutrisi yang akan ditambahkan ke dalam tanah berupa pupuk urea sebagai sumber N dan pupuk superfosfat sebagai sumber P. Penambahan pupuk anorganik ini bertujuan untuk memberikan nutrisi bagi bakteri sebagai sumber nitrogen dan fosfor (Hafiluddin, 2011). Pada penelitian Zam (2012), melakukan uji coba untuk mendapatkan rasio C:N:P optimum pada proses bioremediasi hidrokarbon. Hasil menunjukkan bahwa degradasi optimum bakteri hidrokarbonoklastik pada penambahan rasio 100:5:1 dengan penurunan TPH 66,55%. Menurut (Alexander, 1994), menyebutkan bahwa rasio C:N:P optimal adalah 100:10:1. Hal tersebut juga dijelaskan dalam US EPA (2016), bahwa nutrisi perlu ditambahkan ke dalam tanah untuk mempertahankan jumlah koloni bakteri. Sumber karbon, nitrogen dan fosfor yang diperlukan dalam proses biodegradasi jatuh pada kisaran 100:10:1 sesuai dengan mikroorganisme spesifik yang terlibat dalam proses biodegradasi. Oleh karena itu digunakan rasio C:N:P 100:5:1 dan 100:10:1 sebagai variabel dalam menentukan rasio nutrisi yang optimum digunakan campuran bakteri dalam bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon.

1.6.3 Faktor-faktor yang Berpengaruh dalam Meningkatkan Efisiensi Bioremediasi

Faktor-faktor yang mempengaruhi efektifitas proses bioremediasi adalah faktor fisik, faktor lingkungan dan faktor kimia. Faktor lingkungan meliputi suhu, pH, ketersediaan oksigen, ketersediaan nutrisi dan kelembapan. Faktor fisik terdiri atas ketersediaan air, kesesuaian jumlah mikroba dengan senyawa pencemar dan tersedianya akseptor yang sesuai. Sementara faktor kimia terdiri atas bentuk struktur kimia dari senyawa pencemar (Eweis *et al.*, 1998). Ketiga faktor tersebut diuraikan sebagai berikut:

1. Kadar Oksigen

Biodegradasi didominasi oleh proses oksidasi. Enzim-enzim bakteri akan mengkatalisis pemasukan oksigen ke dalam hidrokarbon dengan enzim oksidase sehingga molekul dapat dikonsumsi untuk metabolisme sel. Menurut Atlas dan Bartha (1985) oksigen sangat penting dalam degradasi hidrokarbon karena jalur utama untuk hidrokarbon jenuh maupun aromatik melibatkan molekul oksigen atau oksigenase. Secara perhitungan teori, 3,5 gram dari hidrokarbon dapat dioksidasi dengan setiap gram oksigen yang hadir. Sejumlah oksigen dibutuhkan untuk degradasi aerobik karena prinsip reaksi adalah oksidasi-reduksi dengan oksigen sebagai elektron penerima (Baker dan Herson, 2000).

2. Kelembaban

Kelembaban yang optimum untuk bioremediasi tanah adalah sekitar 80% atau 15% air dari berat kelembaban yang tidak mencukupi misalnya kurang dari 40%, dapat mengurangi laju bioremediasi. Sedangkan bioremediasi bahan bakar minyak dan sejenisnya, membutuhkan kelembaban sekitar 50%. Kelembaban tanah di atas 70% dapat mengganggu transfer gas untuk oksigen sehingga mengurangi aktifitas aerobik (Cookson, 1995).

3. Nilai pH

Tingkat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi laju pertumbuhan mikroba. Kebanyakan bakteri pendegradasi hidrokarbon dapat tumbuh dengan baik pada kisaran pH netral (6,5-7,5). Sebagai contoh *P. aeruginosa* mampu tumbuh optimum pada kisaran pH 6,6-7,0 dan mampu bertahan pada kisaran pH 5,6-8,0. Tingkat keasaman pH dapat berubah selama pertumbuhan mikroba. Peningkatan pH dapat terjadi oleh adanya proses reduksi nitrat membentuk amonia atau gas nitrogen, sedangkan penurunan pH terjadi apabila terbentuk asam-asam organik dari hasil proses fermentasi. Mikroorganisme pada umumnya tumbuh dengan baik pada pH antara 6,0-8,0. pH optimum untuk proses biodegradasi hidrokarbon di lingkungan tanah adalah pH 7,8 (Cookson, 1995).

4. Temperatur

Temperatur merupakan faktor lingkungan yang mempengaruhi biodegradasi senyawa hidrokarbon. Terutama terhadap proses metabolisme dan

laju pertumbuhan bakteri. Suhu yang optimal untuk degradasi adalah 30-40⁰C. Pada suhu rendah viskositas solar akan meningkat, mengakibatkan volatilitas alkana rantai pendek yang bersifat toksik menurun, dan kelarutannya dalam air meningkat sehingga proses biodegradasi akan terhambat. Efek penghambatan tersebut juga disebabkan aktifitas enzim mikroba. Berdasarkan suhu lingkungan mikroorganisme dikelompokkan menjadi tiga, yaitu psikofilik untuk golongan mikroorganisme yang memerlukan suhu optimum antara 5-15⁰C, mesofilik untuk golongan mikroorganisme yang memerlukan suhu optimum antara 25-50⁰C, dan termofilik untuk golongan mikroorganisme yang memerlukan suhu optimum antara 45-60⁰C (Fahrudin, 2014).

5. Nutrisi

Nutrisi merupakan faktor yang berpengaruh besar dalam sintesis dan pertumbuhan sel serta dalam aktifitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri untuk mendegradasi polutan. Beberapa nutrisi penting yang dibutuhkan mikroorganisme adalah karbon, nitrogen, dan fosfor. Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktifitasnya. Nitrogen dan fosfor merupakan penyusun senyawa-senyawa penting dalam sel yang menentukan aktifitas pertumbuhan mikroorganisme. Ketiga unsur tersebut merupakan tiga nutrisi utama (makronutrien) yang dibutuhkan oleh bakteri dalam melakukan metabolisme sel untuk menghasilkan senyawa-senyawa penting.

Nugroho (2006) menyebutkan bahwa metabolisme mikroba tidak akan terjadi tanpa nitrogen. Nitrogen ditemukan pada protein, enzim, dan asam nukleat dari mikroba. Unsur C merupakan unsur utama yang berperan dalam penyusunan sel-sel bakteri. Sedangkan unsur P berperan dalam pembentukan asam nukleat dan fosfolipid. Kebutuhan karbon berbanding nitrogen adalah 10:1 sedangkan kebutuhan karbon berbanding dengan fosfor adalah 30:1. Oleh karena itu, ketiga unsur tersebut harus dalam rasio yang tepat agar proses metabolisme mikroorganisme berjalan optimal (Fahrudin, 2014).

Mikroba sangat bergantung pada nutrisi untuk bertahan hidup. Mampu atau tidaknya mikroba bertahan hidup akan terlihat dari kecukupan nutriennya. Baker dan Herson (1994) menjelaskan bahwa nutrien-nutrien merupakan pendukung

untuk hidup, berkembang biak dan menghasilkan enzim-enzim untuk mendegradasi hidrokarbon. Nutrien yang dibutuhkan oleh mikroba bervariasi menurut jenis mikroba, namun seluruh mikroba memerlukan nitrogen, fosfor dan karbon. Selain itu, ada beberapa mineral-mineral lain yang dibutuhkan dalam jumlah kecil seperti, potasium, mangan, kalsium, besi, tembaga, kobalt dan seng. Senyawa-senyawa tersebut biasanya berbentuk garam-garam anorganik dan biasanya sudah terdapat dalam jumlah yang cukup di lingkungan baik tanah maupun air sehingga tidak memerlukan perhatian khusus pada perencanaan proses bioremediasi (Nugroho, 2006).

6. Tekstur Tanah

Tekstur tanah mempengaruhi permeabilitas, kelembapan dan kepadatan dari tanah. Untuk meyakinkan bahwa penambahan oksigen, distribusi nutrien, dan kelembapan tanah dapat berlangsung dalam rentang yang tepat, maka tekstur tanah harus diperhatikan. Misalnya, tanah lempung sangat sulit diaerasi dan mengakibatkan rendahnya oksigen. Selain itu, kesulitan juga terjadi untuk mendistribusikan nutrien secara seragam dan menahan air untuk masuk ke dalam tanah (presipitasi). Penambahan *bulking* seperti jerami perlu dicampurkan ke dalam tanah selama konstruksi bioremediasi untuk menambah pori-pori atau rongga (EPA, 1999).

7. Mikroba

Venosa (2002) menyatakan ada 2 pendekatan utama dalam pemanfaatan mikroba sebagai salah satu syarat berlangsungnya bioremediasi minyak bumi, yaitu bioaugmentasi (penambahan mikroba pendegradasi minyak bumi untuk membantu proses degradasi) dan biostimulasi (penambahan nutrien untuk menstimulasikan pertumbuhan mikroba indigenus). Biostimulasi berarti menyediakan seluruh kebutuhan mikroba sehingga mikroba dapat hidup dan melakukan proses biodegradasi. Biostimulasi dilakukan karena proses biodegradasi hidrokarbon hanya dapat terpenuhi bila seluruh kebutuhan dasar mikroba terpenuhi. Nugroho (2006) menyatakan bakteri yang dapat memanfaatkan hidrokarbon tersebar luas di lingkungan dan mulai membelah diri ketika berada pada kondisi yang sesuai. Proses pembelahan diri pada lingkungan alami memerlukan waktu. Untuk itu, penambahan jumlah bakteri pada tumpahan

minyak mempercepat proses degradasi dari minyak bumi dan tempat yang paling baik untuk menemukan mikroba pendegradasi minyak bumi adalah dari tumpahan minyak itu sendiri.

Konsentrasi penambahan campuran bakteri, penambahan bakteri bertujuan untuk meningkatkan proses biodegradasi hidrokarbon (Fahrudin, 2014). Berdasarkan penelitian Prathiba (2014), meneliti pengaruh bakteri *genus Pseudomonas sp.* pendegradasi hidrokarbon solar dengan konsentrasi inokulum 2%, 4%, 8% dan 10% (v/v). Hasil menunjukkan pemberian konsentrasi inokulum 10% (v/v) menyebabkan tingkat degradasi meningkat, yaitu 69,44%. Selain itu, Ghazali (2004) juga melakukan penelitian menggunakan konsorsium *Pseudomonas spp.* dan *Bacillus sp.* dengan konsentrasi inokulum 10% (v/w) mampu menurunkan TPH 74, 34% selama 30 hari. Pada penelitian Alkhatib *et al.* (2011) menggunakan inokulum sebesar 5% (v/w) dalam meningkatkan degradasi *crude oil* menggunakan bakteri *B. subtilis*. Hasil menunjukkan, dengan inokulum 5% (v/w) secara signifikan mampu menurunkan TPH 99,3 % selama 13 hari.

1.7 Biodegradasi Hidrokarbon

Biodegradasi secara garis besar didefinisikan sebagai pemecahan senyawa organik oleh mikroba membentuk biomassa dan senyawa yang lebih sederhana yang akhirnya menjadi air, karbondioksida atau metana. Karakteristik mikroba yang bisa dimanfaatkan dalam degradasi yaitu mampu menghasilkan enzim oksigenase yang dapat mengoptimalkan hubungan permukaan sel mikroba dengan bahan pencemar melalui interaksi hidrofobik (Fahrudin, 2014).

1.7.1 Peran Mikroba Hidrokarbonoklastik dalam Biodegradasi

Mekanisme bioremediasi pada prinsipnya berlandaskan pada proses penguraian bahan organik di biosfer yang dilakukan oleh kelompok mikroba perombak (heterotrofik). Mikroba heterotrofik memiliki kemampuan memanfaatkan senyawa organik, dalam hal ini hidrokarbon sebagai substrat. Penguraian hidrokarbon akan menghasilkan CO₂, CH₄, air, biomassa mikroba, serta hasil samping berupa senyawa yang lebih sederhana (Munawar, 2007). Secara

umum terjadinya proses biodegradasi suatu senyawa oleh mikroba disebabkan oleh produk-produk enzim tertentu yang dihasilkan oleh mikroba itu sendiri, sehingga proses degradasi bergantung pada jumlah mikroba yang cukup untuk mendegradasikan hidrokarbon melalui jalur metabolisme mikroba (Sheehan, 1997).

Bioremediasi hidrokarbon membutuhkan kehadiran mikroba hidrokarbonoklastik, karakteristik mikroba hidrokarbonoklastik yang tidak dimiliki oleh mikroba lain adalah kemampuan mengekspresikan enzim ω -hidroksilase, yaitu enzim pengoksidasi hidrokarbon, sehingga bakteri ini mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan cara memotong rantai hidrokarbon menjadi lebih pendek. Selain itu, mikroba hidrokarbonoklastik memiliki kemampuan untuk menempel pada hidrokarbon, kesanggupan memproduksi *emulsifier*, serta memiliki mekanisme untuk membebaskan diri (*desorption*) dari hidrokarbon (Nugroho, 2006). Pertumbuhan mikroorganisme dalam hidrokarbon sering diikuti dengan pengemulsian sumber karbon yang tidak larut dalam medium kultur karena adanya agen polimer ekstraseluler yang dibentuk selama fermentasi hidrokarbon (Sheehan, 1977).

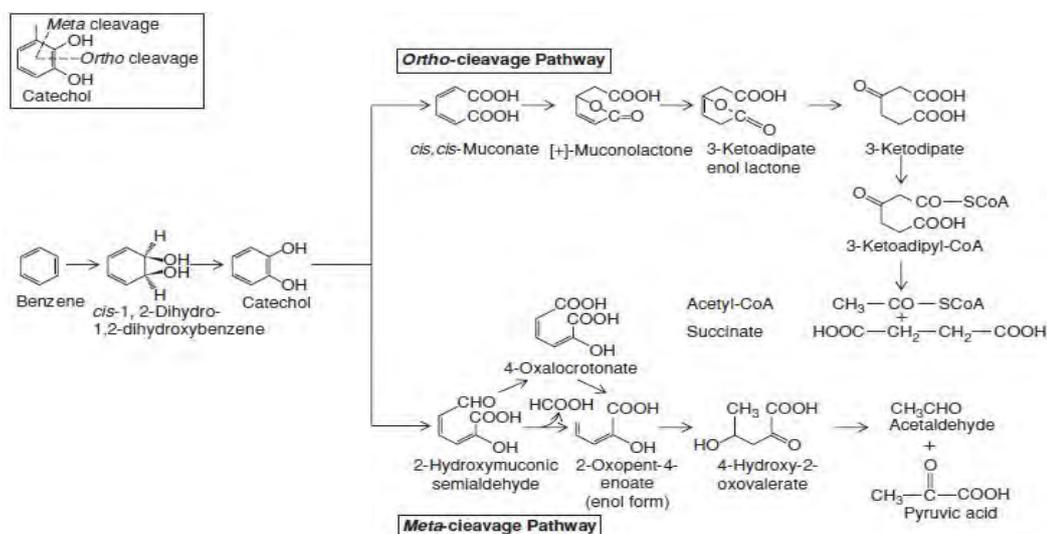
1.7.2 Biodegradasi Fraksi Alifatik

Minyak bumi dengan kandungan normal hidrokarbon alifatik tinggi mudah digunakan oleh mikroba. Nugroho (2006), menyatakan bahwa n-alkana dengan 10-16 atom karbon lebih mudah dipecah-pecah oleh mikroba bila dibandingkan dengan n-alkana dengan berat molekul rendah. Hidrokarbon rantai pendek ($<C_{10}$) lebih sulit didegradasi daripada rantai panjang, karena cenderung bersifat toksik sebagai akibat dari daya larutnya yang tinggi. Biodegradasi hidrokarbon alifatik pada umumnya dilakukan pada kondisi aerob.

Secara khusus, pemecahan molekul hidrokarbon n-alkana oleh mikroba diinisiasi oleh sistem enzim monooksigenase multi kompleks (ω -hidroksilase) yang dapat mengoksidasi alkana menjadi alkohol primer. Selanjutnya alkohol primer yang terbentuk dioksidasi menjadi senyawa aldehid dan akhirnya menjadi asam lemak dan asetil koenzim A. Senyawa antara asetil Ko-A akan masuk ke siklus krebs, rantai karbon akan berkurang dari C_n menjadi C_n-2 yang terus berlanjut sampai molekul hidrokarbon teroksidasi. Hasil biodegradasi hidrokarbon adalah

karboksilat. Secara primer terjadi adisi molekul-molekul oksigen yang dianalisis oleh adanya enzim katekol 2,3-dioksigenase (Nair *et al.*, 2008)

Pada gugus hidroksi dari atom karbon yang berdampingan membentuk peroksida siklik. Produk terakhir adalah asam organik yang dapat dirombak menjadi karbondioksida. Oleh transformasi intramolekul ikatan C-C lepas dan terjadi *cis-cis* mukonat, melalui rentetan perubahan kemudian dipecah menjadi suksinil-KoA dan asetil KoA, yang diubah pada jalur metabolisme intermediet. Pemotongan *meta* adalah pemecahan cincin antar karbon yang terhidroksilasi dan atom karbon yang tidak terhidroksilasi atau di dekat salah satu gugus hidroksil yang berdekatan yaitu ekstradiol juga dikatalisis oleh enzim dioksigenase. Sebagai produk pemecahan terjadi 2-hidroksimukonat semialdehid (Glazer dan Nikaido, 1994).



Gambar 0.2 Reaksi Degradasi Hidrokarbon Aromatik (Glazer dan Nikaido, 1994)

1.7.4 Bakteri Hidrokarbonoklastik

Atlas dan Bartha (1985) menyebutkan bahwa bakteri hidrokarbonoklastik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon untuk keperluan metabolime dan perkembangbiakannya. Bakteri memiliki jumlah paling banyak dan merupakan kumpulan aktif secara biokimia. Bakteri yang mampu menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon adalah bakteri heterotrof, bakteri autotrof dan bakteri belerang (Nugroho,2006).

Di seluruh dunia, diketahui banyak mikroba yang hidup di lingkungan yang tercemar hidrokarbon. Bakteri pendegradasi hidrokarbon tersebar di tanah, laut, dan air tawar. Mikroba tersebut sebagian besar adalah bakteri, fungi (jamur) berfilamen termasuk di dalamnya ragi diketahui mampu tumbuh pada substrat hidrokarbon. Mikroba tersebut biasanya berjumlah kurang dari 1% dari jumlah alami mikroba, tapi dapat berjumlah lebih dari 10% pada ekosistem tercemar hidrokarbon (Nugroho 2006).

Genus bakteri pengguna hidrokarbon yang paling penting berdasarkan frekuensi isolasinya adalah *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Athrobacter*, *Bacillus*, *Benecdea*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Methylobacter*, *Methylobacterium*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, *Methylomonas*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Vibrio* (Ebuehi *et al.*, 2005). Beberapa jenis bakteri yang merupakan pendegradasi hidrokarbon yang efektif di lingkungan alami telah diisolasi antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. laterospor* (Cybulski *et al.*, 2003).

Ni'matuzahroh *et al.* (2009) juga melaporkan telah berhasil mengisolasi sejumlah mikroba pendegradasi hidrokarbon dari sampel tanah tempat penambangan minyak mentah tradisional Ds. Wonocolo Kec. Kedewan, Bojonegoro. Hasil isolasi terdapat beberapa spesies bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon dalam minyak mentah, yaitu *Acinetobacter faecalis* tipe II, *Actinobacillus* sp., *Aeromonas hydrophyla*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. cepacea*, *P. fluorescens-25*, dan *P. Pseudomallei*. Ada beberapa keuntungan yang didapat dari mikroorganisme pendegradasi minyak, antara lain populasi alami sudah beradaptasi dan berkembang dengan baik di lingkungannya dan kemampuan untuk menggunakan hidrokarbon telah disebarkan dalam populasi mikroba degradasi (Ghazali *et al.*, 2004).

1.7.5 Tinjauan dan Karakteristik *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens merupakan bakteri gram negatif. Bakteri ini berbentuk batang lonjong dengan ukuran 0,5 – 1,0 μm , bersifat fluorosent, aerobik obligat, tidak membentuk spora, dan oksidasi positif. Mempunyai satu atau lebih

flagel yang digunakan sebagai motilitas. Sekresi dari *P. fluorescens* menghasilkan pigmen yang disebut pyoverdinin yaitu salah satu jenis siderophore. Bakteri ini dapat tumbuh optimal pada suhu ruang. Bakteri ini dapat ditemukan pada lingkungan yang lembab dan kondisi yang ekstrim seperti pada polutan berbahaya dan hidrokarbon aromatik (toluen, benzena dan etilbenzena) (Munawar, 2013). Hal tersebut didukung juga pada penelitian Kuran *et al.* (2014) yang telah berhasil mengisolasi bakteri hidrokarbonoklastik *P. fluorescens* dari tanah yang tercemar hidrokarbon solar akibat kecelakaan tangki penyimpanan.

P. fluorescens merupakan salah satu bakteri yang mampu mendegradasi senyawa Poli Aromatic Hidrokarbon (PAH) mampu memanfaatkan naftalen, phenantren dan BTEX sebagai substrat (Thapa, 2012). Selain itu, *P. fluorescens* mampu mendegradasi hidrokarbon alkana (C₅-C₁₆), alkil benzen dan sikloalkana pada minyak solar. Hal tersebut dikarenakan *P. fluorescens* mampu menghasilkan enzim alkana hidroksilase. *P. fluorescens* juga memiliki kemampuan dalam memproduksi biosurfaktan yang berkaitan dengan keberadaan enzim regulatori. Surfaktan yang dihasilkan oleh *P. fluorescens* merupakan kelompok lipopeptida viscosin (Junaidi *et al.*, 2013). Klasifikasi bakteri *P. fluorescens* menurut *Bergey's Manual Systematic Bacteriology, second edition* (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Zymobacter
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Spesies	: <i>Pseudomonas fluorescens</i>



Gambar 0.3 Sel Bakteri *Pseudomonas fluorescens* (Junaidi *et al.*, 2013).

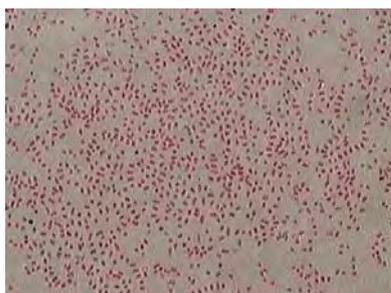
1.7.6 Tinjauan dan Karakteristik *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida merupakan bakteri gram negatif. Bakteri ini berbentuk batang lonjong dengan ukuran 0,5 – 1,0 µm, bersifat fluorescent, aerobik, tidak membentuk spora, dan oksidasi positif. Mempunyai satu atau lebih flagel yang digunakan sebagai motilitas. Bakteri ini dapat tumbuh optimal pada suhu ruang. Bakteri ini dapat ditemukan pada lingkungan yang lembab dan kondisi yang ekstrim seperti pada polutan berbahaya dan hidrokarbon aromatik (toluen, benzena, etilbenzena) (Munawar, 2013). Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Sopiah *et al.* (2011) yang telah berhasil mengisolasi *P.putida* sebagai bakteri hidrokarbonoklastik dari sampel tanah tercemar minyak bumi di Riau dan Bojonegoro.

P. putida merupakan salah satu bakteri yang mampu mendegradasi senyawa Poli Aromatic Hidrokarbon (PAH) mampu memanfaatkan naftalen, phenantren dan BTEX sebagai substrat (Thapa, 2012). Selain itu, *P.putida* mampu mendegradasi hidrokarbon alkana (C₅-C₁₆), alkil benzen dan sikloalkana pada minyak solar dan mendegradasi naftalin. Hal tersebut dikarenakan *P. putida* dapat menghasilkan enzim alkana hidroksilase dan naftalin dioksigenase/monooksigenase. *P. putida* juga mampu menghasilkan surfaktan jenis glikolipida (rhamnosa lipid) yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Penurunan tegangan permukaan menyebabkan minyak terdispersi dan memperbesar kontak permukaan antara bakteri dan minyak sehingga akan terjadi peningkatan biodegradasi hidrokarbon (Widodo, 2010)

Klasifikasi bakteri *P. putida* menurut *Bergey's Manual Systematic Bacteriology, second edition* (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Zymobacter
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Spesies	: <i>Pseudomonas putida</i>



Gambar 0.4 Sel Bakteri *Pseudomonas putida* (Ni'matuzahroh *et al.*, 2009).

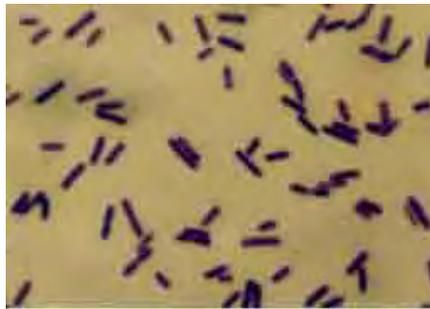
1.7.7 Tinjauan dan Karakteristik *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri gram positif dengan panjang sel tidak lebih dari 3 μm , berbentuk batang dengan ukuran diameter 0,7–0,8 μm dan membentuk sel yang berantai, memiliki endospora terminal atau subterminal dengan ukuran diameter 0,6–0,9 μm dan panjangnya 1,0–1,5 μm endospora tersebut di bentuk dalam waktu 48 jam, serta bersifat aerob dan anaerob fakultatif. Bakteri *B. subtilis* ini mampu hidup pada suhu 50⁰C atau pada kondisi NaCl 10%. *B. subtilis* merupakan jenis bakteri petrofilik yang menggunakan substrat hidrokarbon sebagai sumber karbon dalam metabolismenya (Fahrudin, 2014). Pada penelitian Ramirez *et al.* (2013) telah berhasil mengisolasi bakteri hidrokarbonoklastik salah satunya adalah *B.subtilis* dari lahan parkir truk yang tercemar minyak solar dari aktifitas manusia.

B. subtilis mampu mendegradasi hidrokarbon rantai pendek dan rantai panjang senyawa alifatik n-alkana pada minyak solar dan mendegaradi toluene karena memiliki enzim alkana hidrosilase. Selain itu, *B. subtilis* dapat menghasilkan komponen surfaktan yang tergolong dalam kelompok lipopeptida siklik surfaktin yang dapat menurunkan tegangan antar muka media. Penurunan tegangan antar muka media menyebabkan minyak terdispersi dan memperbesar kontak permukaan antara bakteri dan minyak sehingga akan terjadi peningkatan biodegradasi hidrokarbon. Proses selanjutnya, *B. subtilis* juga memproduksi enzim ekstraseluler yang dapat mendegradasi hidrokarbon (Nwaogu, 2008). Klasifikasi bakteri *B. subtilis* menurut *Bergey's Manual Systematic Bacteriology, second edition* (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes

Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>



Gambar 0.5 Sel Bakteri *Bacillus subtilis* 3KP (Ni'matuzahroh *et al.*, 2003).

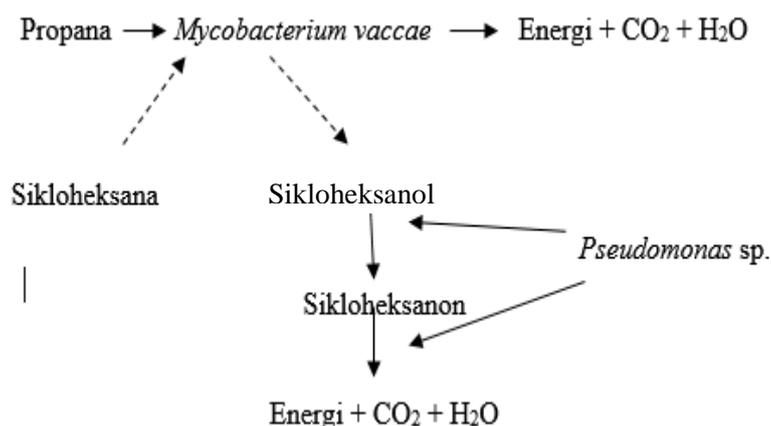
1.8 Degradasi Hidrokarbon oleh Konsorsium Mikroba

Suatu konsorsium merupakan campuran populasi mikroba dalam bentuk komunitas yang mempunyai hubungan kooperatif, komensal dan mutualistik. Anggota komunitas yang mempunyai hubungan akan berasosiasi, yaitu salah satu anggota komunitas memperoleh keuntungan dengan adanya populasi kedua, sedangkan populasi kedua itu tidak memperoleh keuntungan atau kerugian dari populasi pertama, sehingga lebih berhasil mendegradasi hidrokarbon dibandingkan bila dikerjakan masing-masing.

Biodegradasi senyawa hidrokarbon dapat dilakukan dengan beberapa jenis bakteri atau oleh suatu kumpulan mikroba yang saling berinteraksi secara sinergistik dalam bentuk konsorsium untuk dapat mengoptimalkan proses biodegradasi. Banyak mikroba yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon alifatik maupun aromatik, namun tidak dapat menggunakan hasil degradasinya sebagai sumber karbon atau nutrisi. Akibatnya banyak hasil degradasi senyawa hidrokarbon yang tidak bisa didegradasi lebih lanjut akan terakumulasi pada media pertumbuhannya (Nugroho, 2006).

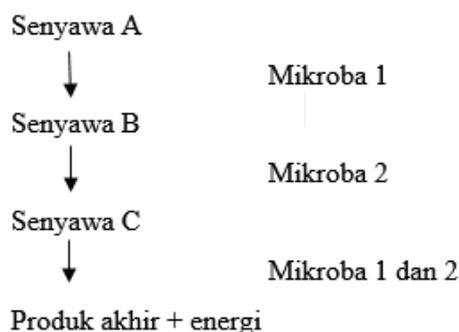
Fenomena kometabolisme tersebut merupakan peristiwa yang sering terjadi pada suatu jenis mikroba dalam mendegradasi bahan pencemar hidrokarbon alifatik dan aromatik. Kometabolisme didefinisikan sebagai penguraian suatu senyawa oleh

mikroba yang membutuhkan keberadaan senyawa lain (ko-substrat) karena tanpa ko-substrat mikroba tersebut tidak dapat melakukan metabolisme. Interaksi mikroba karbonoklastik memberi peran penting dalam biodegradasi minyak bumi. Interaksi itu bisa berupa mutualisme, yaitu semua anggota di dalam kultur campuran memperoleh keuntungan dari anggota lain, atau berupa komensalisme, yaitu salah satu anggota komunitas memperoleh keuntungan dengan adanya populasi kedua, sedangkan populasi kedua tidak memperoleh keuntungan atau kerugian dari populasi pertama. (Nugroho, 2006). Sebagai contoh adalah, *Mycobacterium vaccae* mampu mengkometabolisme sikloheksana ketika menggunakan propana, sikloheksana dioksidasi menjadi sikloheksanol yang dapat digunakan mikroba lain seperti *Pseudomonas* sp. Sementara metabolisme sikloheksana tidak mempengaruhi aktifitas *Mycobacterium vaccae* (Gambar 2.6)



Gambar 0.6 Contoh kometabolisme (Atlas dan Bartha, 1987)

Proses lain yang terjadi adalah sinergisme, perombakan suatu substrat hidrokarbon yang juga dilakukan oleh dari suatu mikroba dan terjadi dalam beberapa tahap, setiap tahap tersebut menghasilkan energi untuk tahap berikutnya. Sehingga mikroba dapat memperoleh energi lebih banyak (Gambar 2.7).



Gambar 0.7 Skematis mekanisme degradasi sinergisme

1.9 Penelitian Terdahulu

Beberapa penelitian terdahulu telah dilakukan untuk membuktikan bahwa metode biostimulasi menggunakan pupuk anorganik dengan bioaugmentasi menggunakan campuran bakteri pada tanah tercemar hidrokarbon mampu menurunkan kadar hidrokarbon yang terkandung di dalamnya. Berikut beberapa penelitian terdahulu yang ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Tabel 0.4 Penelitian Terdahulu

Penelitian	Sampel	Penambahan Bakteri/Nutrien	Konsentrasi Pencemar	Lama Inkubasi	Hasil Efisiensi yang Diperoleh
Nakamura <i>et al.</i> (1996)	Sumber <i>Crude Oil</i> .	kombinasi antara <i>Acinetobacter sp.</i> dan <i>Pseudomonas putida</i> . Inokulum: 1/100 volume	Tidak tercampurkan	25 hari	<i>Acinetobacter sp.</i> dan <i>Pseudomonas putida</i> yang mampu mendegradasi 40% senyawa hidrokarbon jenuh dan 21% senyawa aromatik.
Bento <i>et al.</i> (2004)	Tanah tercemar <i>diesel</i>	Konsorsium bakteri (<i>B. cereus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. fusiformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Acinetobacter junii</i> dan <i>Pseudomonas sp.</i>) Inokulum: 40 mL of 2.6 10 ⁸ cells mL ⁻¹ dan penambahan nutrisi (anorganik N dan P)	Tanah tercemar diesel 450 gram.	12 minggu	Hasil menunjukkan selama 12 minggu dengan metode bioaugmentasi dapat menurunkan TPH 63% dan dengan kombinasi kedua metode dapat menurunkan TPH 72%.
Ghazali <i>et al.</i> (2004)	Tanah tercemar <i>crude oil</i>	Konsorsium yang terdiri atas tiga jenis strain <i>Bacillus sp.</i> dua	10% (v/v)	30 hari	Kemampuan bakteri konsorsium yang terdiri atas tiga jenis strain <i>Bacillus sp.</i> dua strain <i>P.</i>

Penelitian	Sampel	Penambahan Bakteri/Nutrien	Konsentrasi Pencemar	Lama Inkubasi	Hasil Efisiensi yang Diperoleh
		strain <i>P. aeruginosa</i> dan satu strain <i>Micrococcus sp.</i> Inokulum konsorsium 10% (v/w).			<i>aeruginosa</i> dan satu strain <i>Micrococcus sp.</i> dapat menurunkan kadar hidrokarbon.
Mukred <i>et al.</i> , (2008)	Tanah tercemar hidrokarbon petroleum oil	Menggunakan campuran bakteri <i>Acinetobacter sp. T4</i> dan <i>P.putida PB4</i> dengan inokulum 10% (v/w)	10% (v/v)	15 hari	Hasil menunjukkan campuran bakteri mampu memotong rantai n-alkana dan sebagian komponen aromatik sebesar 53-73%.
Alkhatib <i>et al.</i> (2011)	Tanah tercemar <i>crude oil</i>	Penambahan konsorsium bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> dan <i>Enterobacteriaceae</i> dengan inokulum 5% (v/w)	5% (v/w)	13 hari	Hasil menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menurunkan TPH sebesar 98,8%.
Agarry dan Ogunleye (2012)	Tanah tercemar <i>crude oil</i>	NPK <i>fertilizer</i> (4,22 g) dan surfaktan Tween 80 (10,69 mg/l) digunakan sebagai variabel biostimulasi.	10% (w/w)	42 hari	Bioremediasi tanah artifisial yang terkontaminasi <i>crude oil</i> dan NPK <i>fertilizer</i> (4,22 g) dan surfaktan Tween 80 (10,69 mg/l). Setelah 42 hari terjadi penurunan TPH sebesar 67,20%.
Agarry <i>et al.</i> (2013)	Tanah tercemar <i>Bonny light crude oil</i>	Penambahan NPK <i>fertilizer</i> 1.75 gram (C:N;46:1) sebagai sumber nutrisi.	10% (w/w) dalam sampel tanah 1000 gram.	42 hari	Penambahan NPK <i>fertilizer</i> dapat menurunkan nilai TPH hingga 85%
Silva-Castro <i>et al.</i> (2013)	Tanah tercemar <i>diesel</i>	Penambahan NPK.	1 m ³ tanah yang tercemar 20.000 mg/kg diesel	21 hari	Penambahan NPK dengan oksidasi fenton pada tanah tercemar diesel dapat menurunkan TPH sebesar 58% (lapisan permukaan tanah), 57% (lapisan tanah tidak jenuh), dan 32% (lapisan tanah jenuh).
Hamzah <i>et al.</i> (2014)	Tanah tercemar <i>crude oil</i> .	Menggunakan NPK inorganic <i>fertilizer</i> dengan konsorsium bakteri dan fungi.	10% (v/w) dalam sampel tanah 200 gram.	30 hari	Hasil menunjukkan penambahan pupuk NPK secara signifikan meningkatkan pertumbuhan konsorsium mikroba

Penelitian	Sampel	Penambahan Bakteri/Nutrien	Konsentrasi Pencemar	Lama Inkubasi	Hasil Efisiensi yang Diperoleh
					dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi dengan total tertinggi 100%
Omoni <i>et al.</i> (2015)	Tanah tercemar <i>diesel</i>	Menggunakan biostimulasi bahan organik 100 gram dan <i>Pseudomonas</i> sp dan <i>Bacillus</i> sp	10% (w/w) 100 mL dalam 1kg pasir	14 hari	Hasil menunjukkan persentase tertinggi penyisihan hidrokarbon pada hari ke-14 yaitu 54,43%.
Jabeen <i>et al.</i> (2015)	Tanah tercemar <i>crude oil</i> .	<i>B.subtilis</i> dengan substansi organik (kompos dari kulit pisang).	10% (w/v) dalam sampel tanah 500 gram.	15 hari	<i>Bacillus subtilis</i> memiliki kemampuan lebih tinggi dalam degradasi <i>crude oil</i> yaitu sebesar 44,86%, sedangkan dengan kulit pisang hanya 37,25%.
Sukumar dan Nirmala (2016)	Tanah tercemar <i>diesel</i>	Menggunakan bakteri <i>P.putida</i> dan <i>Bacillus</i> sp. 1 mL inokulum.	1% (v/v) 10gram	14 hari	Hasil menunjukkan <i>Pseudomonas</i> sp. dan <i>Bacillus</i> sp memiliki kemampuan maksimum dalam mendegradasi hidrokarbon solar dengan total populasi 64×10^5 CFU dan 54×10^5 CFU.
Rima Nurmalasari	Tanah tercemar minyak solar	Konsorsium bakteri (<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , dan <i>Bacillus subtilis</i>) dengan variasi nutrisi	10% b/b	15 hari	Hasil menunjukkan <i>P. fluorescens</i> - <i>P. putida</i> memiliki penurunan nilai TPH tertinggi pada rasio penambahan C:N:P 100:5:1 menunjukkan hasil penurunan TPH sebesar 54.968 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 64,04%.

BAB 3

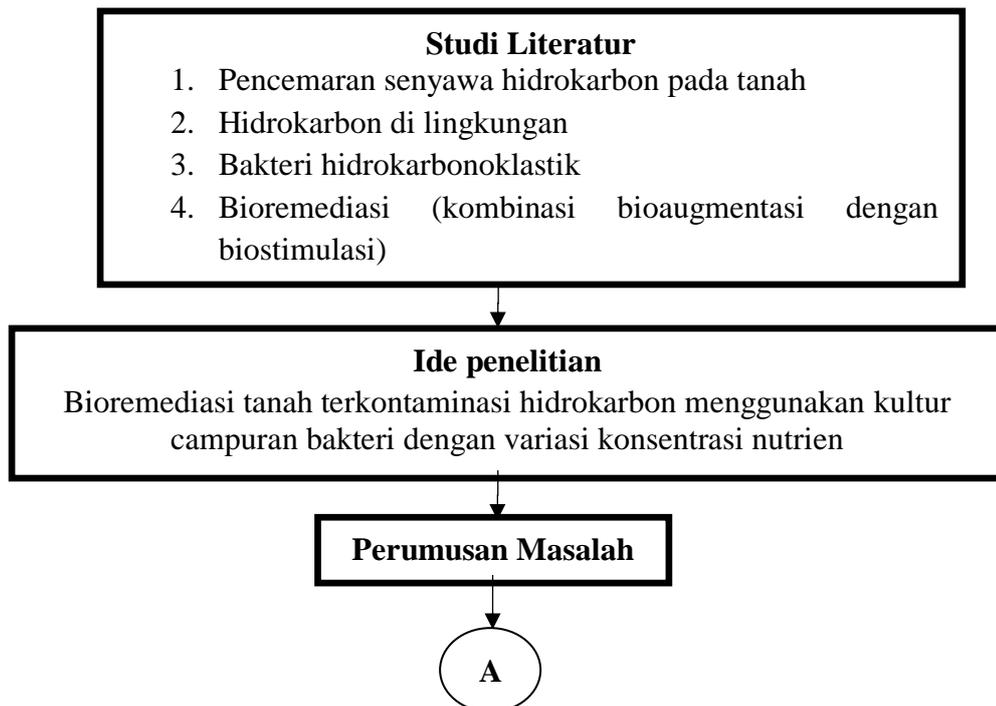
METODE PENELITIAN

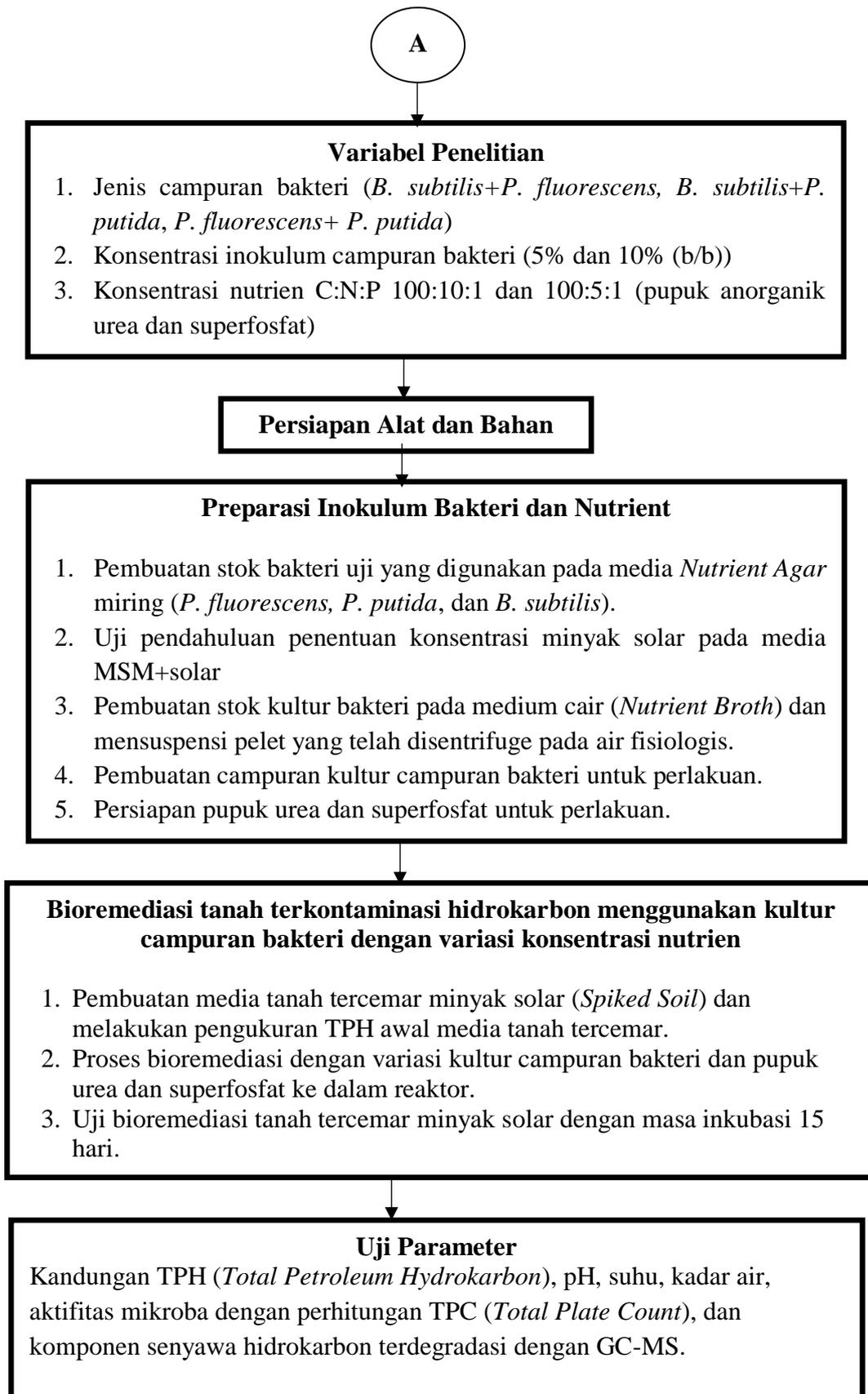
1.1 Gambaran Umum

Penelitian ini akan dilakukan upaya pemulihan tanah yang telah tercemar hidrokarbon dengan bioremediasi menggunakan metode kombinasi biostimulasi dengan bioaugmentasi. Penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian eksperimental skala laboratorium. Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Remediasi Lingkungan, Jurusan Teknik Lingkungan, FTSLK-ITS. Kontaminan pencemar hidrokarbon yang digunakan adalah minyak solar dengan media uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *spiked soil*.

1.2 Kerangka Penelitian

Kerangka penelitian merupakan gambaran awal tahap-tahap penelitian. Kerangka penelitian bertujuan untuk memudahkan penelitian dan penyusunan laporan serta mengetahui hal-hal yang berkaitan dengan penelitian agar tujuan penelitian dapat tercapai. Kerangka penelitian yang berupa diagram alir dapat dilihat pada Gambar 3.1.





Gambar 3.1 Kerangka penelitian

1.3 Langkah Kerja Penelitian

Langkah penelitian meliputi tahapan yang dilakukan dalam melaksanakan penelitian dengan tujuan memudahkan pemahaman. Adapun tahapan yang dilakukan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

1.3.1 Studi Literatur

Studi literatur ini dilakukan untuk mendapatkan ide studi dan pemahaman yang baik mengenai permasalahan yang terjadi. Studi literatur juga meningkatkan pemahaman mengenai metode pengolahan yang akan digunakan. Selain itu, dilakukan pengkajian mengenai penelitian serupa yang telah dilakukan. Sumber literatur yang digunakan adalah jurnal, *text book*, tugas akhir dan tesis yang berhubungan dengan penelitian ini. Studi literatur dilakukan dari awal sampai akhir penelitian untuk memperoleh dasar teori yang jelas dan kuat sehingga ketika melakukan analisis dan pembahasan data penelitian dapat diperoleh suatu kesimpulan dari hasil penelitian ini.

1.3.2 Ide Penelitian

Kehadiran hidrokarbon di perairan dan tanah dianggap sebagai zat yang tidak dikehendaki oleh alam, baik karena jumlahnya yang tidak pada tempatnya. Limbah hidrokarbon dapat berasal dari hasil kegiatan pengeboran minyak dan hasil aktifitas industri yang terkait dengan pengolahan minyak. Bertumpuknya limbah hidrokarbon tersebut di tanah sangat berdampak bagi lingkungan maupun kesehatan jika terbawa ke badan air.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk bioremediasi tanah tercemar dengan penambahan nutrisi yang dilakukan agar memicu pertumbuhan mikroorganisme *indigenous* (biostimulasi) dan juga penambahan mikroba atau enzim pada tanah tercemar (bioaugmentasi). Namun, hasil dari masing-masing metode tersebut tidak cukup baik dalam bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon. Oleh karena itu, hal ini menjadi dasar ide penelitian untuk menggabungkan metode biostimulasi dengan bioaugmentasi menggunakan campuran bakteri simbitotik, yang diharapkan dapat menjadi salah satu pilihan untuk mengoptimalkan proses pemulihan tanah tercemar hidrokarbon.

1.3.3 Rumusan Masalah

Bioremediasi memanfaatkan proses metabolisme mikroba dengan kondisi lingkungan yang optimum dan jumlah nutrisi yang mencukupi dalam memecah senyawa hidrokarbon. Menurut Munawar *et al.* (2007), terdapat dua pendekatan yang dapat digunakan dalam bioremediasi tumpahan minyak, yaitu bioaugmentasi dan biostimulasi. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian untuk mencari solusi dari permasalahan yang timbul di antaranya adalah bagaimana efektivitas penambahan variasi jenis campuran bakteri dan variasi konsentrasi campuran bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar pada tanah, serta mendapatkan kadar nutrisi yang optimum digunakan oleh bakteri dalam menurunkan konsentrasi hidrokarbon minyak solar pada tanah.

1.4 Penentuan Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 3 macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kendali. Variabel-variabel tersebut akan dijelaskan sebagai berikut:

1. Variabel Bebas

- a. Variasi jenis campuran dari ketiga bakteri yang digunakan yaitu *P. fluorescens*, *P. putida*, dan *B. subtilis*. Variasi jenis campuran terdiri atas kombinasi *B. subtilis* dengan *P. fluorescens*, *B. subtilis* dengan *P. putida* dan *P. fluorescens* dengan *P. putida*.
- b. Konsentrasi penambahan campuran bakteri, penambahan bakteri bertujuan untuk meningkatkan proses biodegradasi hidrokarbon (Fahrudin, 2014). Pada penelitian ini digunakan variasi konsentrasi 5% dan 10% (b/b) untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum yang optimum sebagai variabel dalam proses bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon.
- c. Rasio penambahan nutrisi, nutrisi yang akan ditambahkan ke dalam tanah berupa pupuk urea sebagai sumber N dan pupuk superfosfat sebagai sumber P. Penambahan pupuk anorganik ini bertujuan untuk memberikan nutrisi bagi bakteri sebagai sumber nitrogen dan fosfor (Hafiluddin, 2011). Pada penelitian ini digunakan rasio C:N:P 100:5:1 dan 100:10:1 sebagai variabel

dalam menentukan rasio nutrisi yang optimum digunakan campuran bakteri dalam bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pH tanah yang diukur dengan pH meter, suhu tanah yang diukur dengan termometer, perhitungan persentase kadar air dan total koloni mikroba dengan metode *Total Plate Count* (TPC), persentase penurunan kadar minyak yang terlarut (TPH) dengan metode gravimetri dan analisis komponen hidrokarbon yang terdegradasi dengan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).

3. Variabel Kendali

Waktu inkubasi yang diperlukan dalam proses bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon yaitu selama 15 hari, kadar minyak perlakuan (mL) dan ukuran partikel pasir (mm).

1.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga variabel dalam pelaksanaan penelitian. Penelitian dilakukan dengan total perlakuan 21 variasi. Berikut ini matriks penelitian yang direncanakan:

Tabel 0.1 Matriks Perlakuan Antar Variasi

	B0	S		P		F	
		5%	10%	5%	10%	5%	10%
N1	N1B0	N1S5	N1S10	N1P5	N1P10	N1F5	N1F10
N2	N2B0	N2S5	N2S10	N2P5	N2P10	N2F5	N2F10
N0	N0B0	N0S5	N0S10	N0P5	N0P10	N0F5	N0F10

Keterangan:

N1 : Rasio CNP 100:10:1

N2 : Rasio CNP 100:5:1

N0 : Tanpa nutrisi

B0 : Tanpa bakteri

S : *B. subtilis* + *P. putida*

P : *B. subtilis* + *P. fluorescens*

F : *P. putida* + *P. fluorescens*

1.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Penelitian ini membutuhkan alat dan bahan untuk keberlangsungannya. Alat-alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian adalah:

1. Reaktor, berupa bahan yang terbuat dari kaca berdimensi 149 x 269 mm dengan volume 3,5 L sebagai wadah tempat berlangsungnya penelitian.
2. Aerator sebagai alat pembantu penambahan kadar oksigen pada tanah
3. Ayakan 10 *mesh*, untuk menghaluskan dan memisahkan media tanah hingga ukuran partikel $\leq 2\text{mm}$.
4. Sekop Kecil, untuk mengambil tanah yang akan digunakan.
5. Soil Tester T-350 untuk analisa pH.
6. Termometer, untuk mengukur suhu tanah.
7. *Colony Counter* untuk analisa jumlah bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC).
8. Neraca Analitik, untuk menimbang tanah, kompos, dan serbuk NA secara akurat.
9. Timbangan, untuk menimbang tanah dan pupuk.
10. Tabung Reaksi, digunakan untuk menumbuhkan bakteri pada media agar miring.
11. Cawan Petri, digunakan sebagai media tumbuh bakteri setelah dilakukan pengenceran.
12. Labu Erlenmeyer, digunakan untuk wadah produksi kultur bakteri pada media cair.
13. *Beaker Glass*, digunakan sebagai wadah media / wadah pembuatan media.
14. *Autoclave* untuk mensterilkan peralatan laboratorium.
15. Spatula, digunakan mengambil serbuk Natrium Agar (NA) / pengaduk larutan
16. Inkubator (Ogawa Seiki, Japan) untuk menginkubasi bakteri dalam media agar.
17. UV Spektrofotometer (Genesys 20, Germany) digunakan untuk mengukur nilai absorbansi bakteri (*Optical Density*).
18. *Shaker incubator* (Innova 2000) digunakan untuk masa inkubasi produksi kultur bakteri.
19. Mikropipet dan tip mikropipet, digunakan untuk melakukan pengenceran *Total Plate Count*.

20. Pipet Ukur dan propipet, digunakan untuk mengambil larutan dengan volume tertentu.
21. Cawan porselen, oven, desikator untuk analisa *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) dengan metode gravimetri.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

1. Tanah pasir.
2. Pencemar hidrokarbon menggunakan minyak solar.
3. Pupuk urea sebagai sumber N dan pupuk superfosfat sebagai sumber P bagi mikroba.
4. Larutan n-heksan untuk analisis gravimetri.
5. *Diatomaceous-silica filter aid suspension* untuk analisis gravimetri.
6. Kertas saring Whatman no.1 untuk analisis gravimetri.
7. *Nutrien Agar* (NA) (Merck, USA) untuk menumbuhkan isolat bakteri yang digunakan dan pengamatan jumlah bakteri dalam tanah.
8. *Nutrien Broth* (NB) (Merck, USA) untuk pengamatan laju pertumbuhan bakteri dan pembuatan starter bakteri.
9. *Mineral salt medium* (MSM) sebagai media suspensi pelet bakteri yang telah disentrifugasi.

1.6 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis variabel penelitian sehingga dapat diketahui apakah variasi komposisi penambahan kultur campuran bakteri yang dikombinasikan dengan penambahan nutrien dapat mempengaruhi tingkat biodegradasi hidrokarbon minyak bumi (TPH) pada media tanah yang tercemar hidrokarbon, serta dapat mengamati pengaruh pH, suhu, dan jumlah mikroba. Tahapan penelitian ini akan dilaksanakan selama 15 hari dimana penelitian dan proses analisis parameter yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

1.6.1 Pembuatan Stok Bakteri Uji

Menyiapkan biakan murni 3 isolat bakteri masing-masing diperbanyak dengan cara ditumbuhkan pada agar miring berisi media NA (*Nutrient Agar*) (Merck, USA). dengan metode gores dan diinkubasi ke dalam inkubator (Ogawa

Seiki, Japan) dengan suhu 30°C selama 24 hingga 48 jam. Stok bakteri dimasukkan ke dalam plastik dan disimpan di dalam lemari es pada suhu 4°C.

1.6.2 Uji Pendahuluan untuk Menentukan Konsentrasi Pencemar Hidrokarbon Minyak Solar

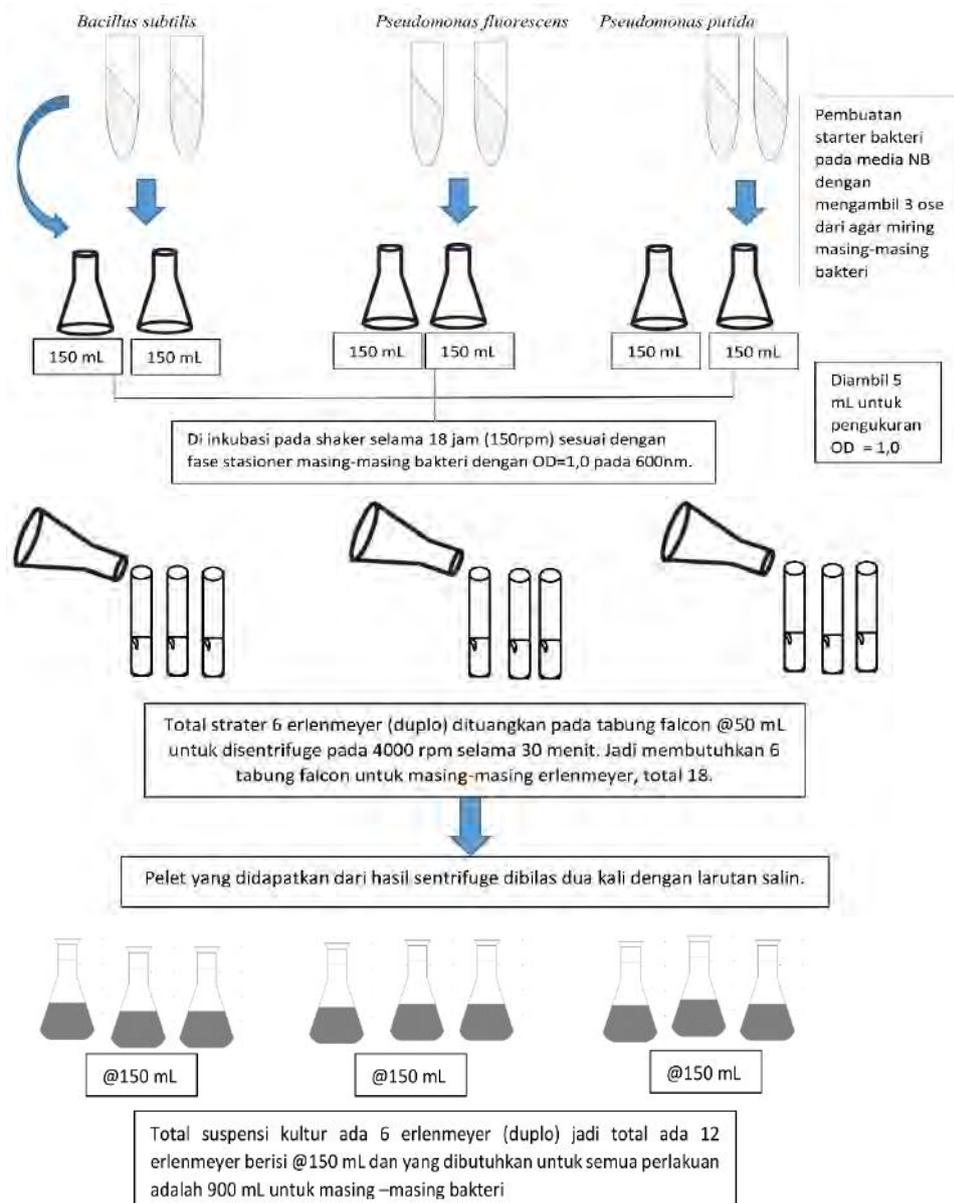
Bakteri yang akan digunakan ditumbuhkan dalam media *Nutrient Broth* (Merck, USA) secara aseptik kemudian menginkubasi dalam *shaker incubator* (150 rpm) pada suhu ruang selama 18 jam (Ghazali *et al.*, 2004). Memindahkan 5% dan 10% masing-masing bakteri (*B. subtilis*, *P. putida* dan *P. fluorescens*) dengan OD 1,0 pada $\lambda = 600$ nm pada reaktor uji. Reaktor yang digunakan pada uji pendahuluan adalah *erlenmeyer* berisi 100 mL *Mineral Salt Medium* steril dengan komposisi (NH₄)₂SO₄ (3g/L); KH₂PO₄ (4g/L); Na₂HPO₄ (7 g/L); MgSO₄·7H₂O (0.2 g/L); CaCl₂·2H₂O (0.001 g/L); FeSO₄·7H₂O (0.001 g/L); dalam 1000 mL akuades steril dengan pH 7 (pH larutan MSM dinetralkan dengan penambahan NaOH 10% atau HCl 5%) yang dicampur dengan konsentrasi solar 0% (kontrol), 6%, 8%, 10% dan 15% (v/v), kemudian diletakkan di atas *shaker* (Innova 2000) pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm selama 5 hari (Basheer *et al.*, 2014).

Pada masing-masing konsentrasi akan diamati parameter pertumbuhan jumlah koloni bakteri tiap CFU/mL pada hari ke-5 untuk menentukan konsentrasi solar dan konsentrasi inokulum optimum yang dapat dimanfaatkan bakteri sebagai sumber karbon dalam tahap uji bioremediasi (Chang *et al.*, 2011).

1.6.3 Pembuatan Kultur dan Suspensi Bakteri

Menyiapkan labu erlenmeyer 250 mL yang masing-masing berisi 100 mL *Nutrient Broth* (Merck, USA) kemudian memindahkan tiga ose masing-masing bakteri ke dalam masing-masing media *Nutrient Broth* (Merck, USA) secara aseptik kemudian menginkubasi dalam *shaker incubator* (150 rpm) pada suhu ruang selama 18 jam (Ghazali *et al.*, 2004). Kultur sel disediakan dari pemanenan kultur sel pada masa pertengahan fase *log* yang mempunyai OD 1,0 pada $\lambda = 600$ nm. Pemisahan sel bakteri dengan media dilakukan dengan menggunakan *centrifuge* pada 4000 rpm selama 30 menit.

Pelet yang terbentuk dibilas dua kali menggunakan air fisiologis (0,85% NaCl steril), setelah itu pelet bakteri ditambah dengan air fisiologis steril dalam erlenmeyer hingga 150 mL. Pelet atau biomassa bakteri yang terbentuk diukur berat keringnya untuk mengetahui jumlah per gram bakteri yang masuk ke dalam reaktor. Pengukuran berat kering pelet dilakukan dengan mengeringkan pelet dalam oven bersuhu 80°C selama 24 jam, agar kandungan air hilang dan yang terukur hanya per gram pelet yang terbentuk. Berikut ilustrasi pembuatan suspensi kultur bakteri yang ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 0.1 Ilustrasi Pembuatan Suspensi Kultur Bakteri

1.6.4 Persiapan Pupuk Anorganik untuk Perlakuan

Variasi penambahan nutrisi pada tanah yaitu pada rasio C:N:P 100:5:1 yang mengacu pada penelitian Zam (2012), menunjukkan bahwa degradasi optimum bakteri hidrokarbonoklastik pada penambahan rasio 100:5:1. Sedangkan variasi rasio C:N:P 100:10:1 mengacu pada (Alexander, 1994), yang menyebutkan bahwa rasio C:N:P optimal adalah 100:10:1. Hal tersebut juga dijelaskan dalam US EPA (2016), bahwa sumber karbon, nitrogen dan fosfor yang diperlukan dalam proses biodegradasi jatuh pada kisaran 100:10:1. Unsur N diambil dari pupuk dasar urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ dengan berat molekul 60,03 dan unsur P diambil dari pupuk dasar *superphosphate* $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ dengan berat molekul 234. Persiapan pupuk urea dan superfosfat untuk perlakuan yaitu menghaluskan terlebih dahulu menggunakan mortar, kemudian menganyaknya dengan ayakan 40 mesh.

Konsentrasi minyak solar yang ditambahkan sebanyak 10 % (b/b), artinya dalam 1000 g tanah terdapat 100 g minyak solar / kg substrat tanah. ($0,1 \times 1000 \text{ g} = 100 \text{ g}$). Dalam perhitungan selanjutnya, kadar minyak solar di dalam tanah digunakan sebagai kadar C dalam tanah. Kemudian menghitung banyaknya pupuk yang ditambahkan agar perbandingan C:N:P sebesar 100:10:1 dan 100:5:1 yang diperlukan tiap variasi perlakuan (perhitungan pupuk terlampir pada Lampiran 3).

1.6.5 Pembuatan Media Tercemar (*Spiked Soil*)

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah pasir (massa jenis $1,27 \text{ g/cm}^3$). Tanah pasir memiliki porositas yang tinggi, sehingga meningkatkan mobilitas minyak solar pada pasir (Jabeen *et.al.*, 2015). Kontaminan pencemar yang digunakan adalah minyak solar dengan berat jenis 840 kg/m^3 dan *specific gravity* 0,82 (Jabeen *et al.*, 2015) yang diharapkan dapat mewakili pencemaran minyak bumi pada tanah dalam kondisi sebenarnya. Pencemaran hidrokarbon pada sampel tanah akan dibuat dengan sengaja dengan konsentrasi minyak solar 10% (b/b) yang setara dengan 100 g beratnya. Dalam hal ini diperoleh 100 g minyak solar setara dengan 123 mL volumenya. Tanah pasir terlebih dahulu dijemur dibawah sinar matahari selama ± 1 hari. Proses penjemuran bertujuan untuk menghilangkan kandungan air berlebih pada media. Setelah melewati proses penjemuran, tanah diayak dengan saringan 10 mesh. Hal ini mengacu pada penelitian yang telah

dilakukan Zhang *et al.* (2011) sampel tanah dihaluskan dan diayak hingga mendapatkan ukuran partikel ≤ 2 mm untuk memisahkan tanah dengan batu dan kerikil kecil lainnya, serta memperluas permukaan tanah sehingga proses biodegradasi berjalan lebih cepat. Tanah pasir hasil ayakan tersebut kemudian ditimbang sesuai dengan konsentrasi tanah tercemar (b/b).

Konsentrasi pencemar 10% (b/b) dalam 1000 g tanah, dibutuhkan 900 g pasir dan 100 g solar (setara dengan volume). Pasir yang telah diayak disterilisasi terlebih dahulu bersama dengan minyak solar yang akan digunakan. Hal ini dilakukan agar mikroba *exogenous* yang berada dalam pasir maupun minyak solar tidak berpengaruh terhadap proses bioremediasi. Keduanya ditimbang menggunakan timbangan analitik (kapasitas 3kg), kemudian tanah pasir dan minyak solar dicampurkan ke dalam *beaker glass*. Setelah minyak solar dan tanah pasir dicampur, didiamkan selama 2-3 hari sampai minyak solar tercampur merata ke dalam tanah pasir. Hal ini ditunjukkan dengan warna pasir yg menjadi kehitaman dan berminyak.

1.6.6 Bioremediasi Tanah Tercemar Hidrokarbon

Uji bioremediasi dilakukan selama 15 hari setelah masa aklimatisasi untuk menentukan persentase degradasi hidrokarbon oleh penambahan jenis campuran bakteri, konsentrasi penambahan campuran bakteri (*inoculum size*) dan konsentrasi penambahan pupuk. Pelaksanaan bioremediasi dilakukan pada reaktor kaca berdimensi 149 x 269 mm (volume 3,5 L) (Gambar 3.4) dengan aerasi menggunakan aerator (kecepatan 3,5 L/menit diukur dengan *flow meter*) untuk membantu menambah kadar oksigen dalam tanah. Berikut rancangan untuk uji perlakuan bioremediasi yang ditunjukkan pada Tabel 3.2 dan ilustrasi proses pencampuran kultur dengan pupuk ke dalam reaktor uji yang ditunjukkan pada Gambar 3.3. Banyak isolat bakteri untuk tiap campuran bakteri adalah dua jenis bakteri. Volume tiap stok suspensi bakteri uji untuk masing-masing perlakuan variasi campuran bakteri (OD 1,0 pada $\lambda = 600$ nm) ke dalam reaktor berisi 1000 g *spiked soil* adalah 1:1. Volume campuran bakteri yang ditambahkan sesuai hasil penentuan persentase penambahan terbaik pada uji pendahuluan. Untuk konsentrasi campuran bakteri 10%, maka masing-masing suspensi bakteri yang diambil 50 mL

(100 mL/2 = 50) total 100 mL, sedangkan untuk campuran bakteri dengan konsentrasi 5%, maka 25 mL (50 mL/2 = 25) total 50 mL. Oleh karena itu dilakukan pengukuran volume campuran bakteri ke dalam gram agar satuan menjadi (b/b) dengan total pasir dan minyak solar, yaitu dengan menghitung berat kering bakteri. Hasil perhitungan jumlah koloni dan berat kering bakteri yang masuk ke dalam reaktor tertera pada Lampiran 5.

Tabel 0.2 Rancangan Variasi Perlakuan Pada Reaktor

Konsentrasi	Jenis Kombinasi	Konsentrasi Bakteri	Kode Reaktor
Tanpa Nutrien	Tanpa Bakteri	0%	N0B0
C:N:P 100:10:1	Tanpa Bakteri	0%	N1B0
C:N:P 100:5:1	Tanpa Bakteri	0%	N2B0
C:N:P 100:10:1	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>P. putida</i>	5%	N1S5
		10%	N1S10
C:N:P 100:5:1	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>P. putida</i>	5%	N2S5
		10%	N2S10
Tanpa Nutrien	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>P. putida</i>	5%	N0S5
		10%	N0S10
C:N:P 100:10:1	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>P. fluorescens</i>	5%	N1P5
		10%	N1P10
C:N:P100:5:1	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>P. fluorescens</i>	5%	N2P5
		10%	N2P10
Tanpa Nutrien	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>P. fluorescens</i>	5%	N0P5
		10%	N0P10
C:N:P 100:10:1	<i>P. putida</i> + <i>P. fluorescens</i>	5%	N1F5
		10%	N1F10
C:N:P100:5:1	<i>P. putida</i> + <i>P. fluorescens</i>	5%	N2F5
		10%	N2F10
Tanpa Nutrien	<i>P. putida</i> + <i>P. fluorescens</i>	5%	N0F5
		10%	N0F10

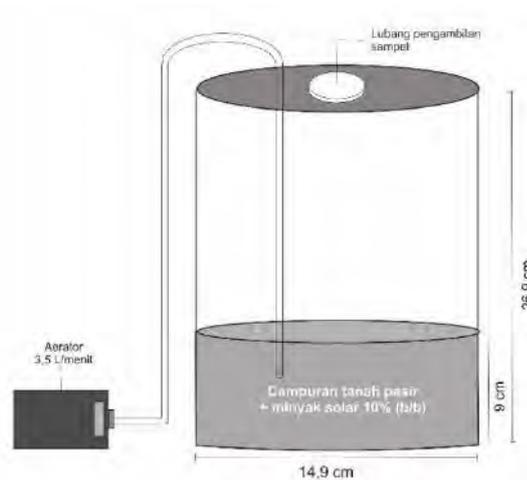


Suspensi kultur yang dicampurkan memiliki perbandingan 1:1 dengan OD= 1.0 yang dilarutkan dalam air fisiologis (@150 mL)



Pupuk urea dan superfosfat yang dimasukkan ke dalam reaktor dengan rasio 100:10:1 dan 100:5:1

Gambar 3.3 Ilustrasi Kultur Campuran Bakteri dengan pupuk inorganik yang akan dimasukkan ke dalam Reaktor



Reaktor berisi 1000 g pasir yang telah dicampur dengan minyak solar 10 % (b/b)

Gambar 0.4 Ilustrasi Skema Reaktor untuk Uji Bioremediasi

Adapun pengamatan dan analisis terhadap proses biodegradasi mengacu pada Prabhakaran *et al.*, (2014) yang telah disesuaikan. Analisis parameter yang dilakukan pada tahap uji bioremediasi adalah:

a. Perhitungan jumlah mikroorganisme

Perhitungan jumlah mikroorganisme merupakan indikator terjadinya proses biodegradasi hidrokarbon. Jumlah mikroorganisme akan meningkat bila ia mampu hidup dengan memanfaatkan substrat yang ada dalam senyawa hidrokarbon tersebut. Dasar perhitungannya dengan mengencerkan suspensi dengan rentang pengenceran tertentu secara bertingkat sesuai metode *Colony Forming Unit* (CFU). Metode CFU menggunakan metode *Pour Plate* (Harley-Prescott, 2002). Analisis dilakukan pada awal (H-0), pertengahan (H-3), (H-5) dan (H-10), dan akhir (H-15) dengan mengambil 10 g sampel tanah dari reaktor (cara perhitungan *Total Plate Count* lebih lengkap ada pada Lampiran 2). Berikut ilustrasi proses pengenceran untuk perhitungan jumlah bakteri yang ditunjukkan pada Gambar 3.4.



Gambar 0.5 Ilustrasi Analisis *Total Plate Count*

a. Pengukuran pH

Parameter pH akan setiap hari pada H0 – H15 dengan mengambil 20 g sampel tanah. Pengukuran pH akan dilakukan dengan moister tester dan pH ukur tanah (APHA AWWA dan WEF, 2005).

b. Pengukuran Suhu

Parameter suhu akan diukur setiap hari pada H0 - H15 dengan mengambil 20 g sampel tanah. Pengukuran suhu akan dilakukan dengan menggunakan termometer EC 10 PHonLab, USA (APHA AWWA dan WEF, 2005).

c. Pengukuran Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan pada (H-0), (H-5), (H-10) dan (H-15) dengan mengambil sampel tanah sebanyak 10 g ditempatkan dalam cawan porselen. Kadar air dihitung dengan metode gravimetri (ASTM D 2216, 1979) menggunakan rumus yang terdapat pada Lampiran 3. Pengukuran kelembapan dilakukan untuk mengetahui kadar air pada reaktor, sehingga dapat dilakukan pengkondisian kadar air optimum sebesar 70-90%. Penambahan aquades dilakukan jika kadar air kurang dari 50% (Vidali, 2001).

d. Pengukuran Kadar Hidrokarbon

Analisis penurunan *Total Petroleum Hydrocarbon* menggunakan metode ekstraksi *soxhlet* dan dilanjutkan dengan analisis gravimetri. Ekstraksi *soxhlet* dilakukan dengan cara pemanasan dan dilakukan secara berulang atau kontinyu. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah n-heksan. Diawali dengan menimbang 5 g sampel tanah dari reaktor kemudian

dilarutkan dengan pelarut n-heksan. Pengukuran nilai TPH menggunakan metode gravimetri disesuaikan dengan US EPA-821-R-98-002 Metode 1664 tahun 1999. Konsentrasi penurunan hidrokarbon akan dianalisis awal (H-0), pertengahan (H-5) dan (H-10), dan akhir (H-15). Prosedur pengukuran TPH dapat dilihat pada Lampiran 3.

e. Penurunan Komponen Hidrokarbon

Analisis komponen hidrokarbon menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography/ Mass Spectrometry*) (Chang *et al.*, 2011). Konsentrasi hidrokarbon yang diujikan yaitu, pada hari ke-0 dan hari ke-15. Kadar hidrokarbon residu (alifatik, aromatik dan poliaromatik) dideteksi menggunakan GCMS-QP2010S SHIMADZU pada kolom AB 5MS, panjang, gas 30 meter, ID 0,25 mm, film 0,25 mm, gas pembawa adalah helium (aliran 0,55 mL/menit), suhu injektor 310°C. Volume sampel yang diinjeksikan 1 µL dengan suhu awal kolom 50°C selama 5 menit dan akan terus bertambah dengan rata-rata 5°C/menit sampai temperatur mencapai 300°C selama 15 menit Injeksi sampel di lakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA – UGM.

1.7 Analisis Data dan Pembahasan

Analisa data dan pembahasan dilakukan terhadap data yang diperoleh dari hasil analisis parameter meliputi data dari penurunan kandungan minyak (TPH), pH, suhu, jumlah bakteri (*Total Plate Count*), dan komponen hidrokarbon dengan GC-MS (*Gas Chromatography- Mass Spectrometry*). Hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk grafik dan tabel. Analisis hasil dan pembahasan yang dituliskan meliputi beberapa hal berikut:

1. Pengaruh jenis campuran terhadap efisiensi penurunan TPH dan penurunan konsentrasi hidrokarbon dalam tanah.
2. Pengaruh variasi konsentrasi penambahan terhadap efisiensi penurunan TPH dan penurunan konsentrasi hidrokarbon dalam tanah
3. Pengaruh variasi penamabahan nutrien pupuk anorganik terhadap efisiensi penurunan TPH dan penurunan konsentrasi hidrokarbon dalam tanah.

4. Hubungan antara parameter (pH, suhu, dan total koloni mikroba) dengan efisiensi penurunan TPH pada tanah tercemar hidrokarbon.
5. Uji statistik *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk melihat interaksi dan korelasi antar variabel penelitian (interaksi antara variasi jenis kultur campuran dan variasi konsentrasi inokulum bakteri, interaksi antara variasi konsentrasi inokulum dan variasi rasio nutrisi serta interaksi antara variasi rasio nutrisi dan variasi jenis kultur campuran bakteri).

1.8 Analisis Data dengan Software Statistik

Pengaruh masing-masing variabel dianalisis secara statistik untuk membandingkan perbedaan yang signifikan terhadap semua perlakuan dengan menggunakan aplikasi *minitab* 16. Data kuantitatif yang telah diperoleh diuji menggunakan *analysis of variance*. Penggunaan ANOVA juga bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya interaksi antar faktor yang digunakan serta pengaruh perlakuan masing-masing unit eksperimen terhadap respon. Analisis ANOVA yang digunakan pada penelitian ini adalah *General Linier Method* ANOVA dan dilakukan dengan uji taraf $p < 0,05$.

1.9 Kesimpulan dan Saran

Setelah dilakukan analisis data dan pembahasan terhadap semua data yang telah dikumpulkan, maka dapat ditarik kesimpulan dari penelitian ini. Kesimpulan diambil berdasarkan hasil akhir yang diperoleh dari hasil penelitian serta dapat menjawab tujuan penelitian yang telah dibuat sebelumnya. Sedangkan saran ditujukan untuk penelitian selanjutnya agar tidak melakukan kesalahan yang terjadi pada penelitian ini sehingga penyempurnaan pada penelitian berikutnya dapat tercapai

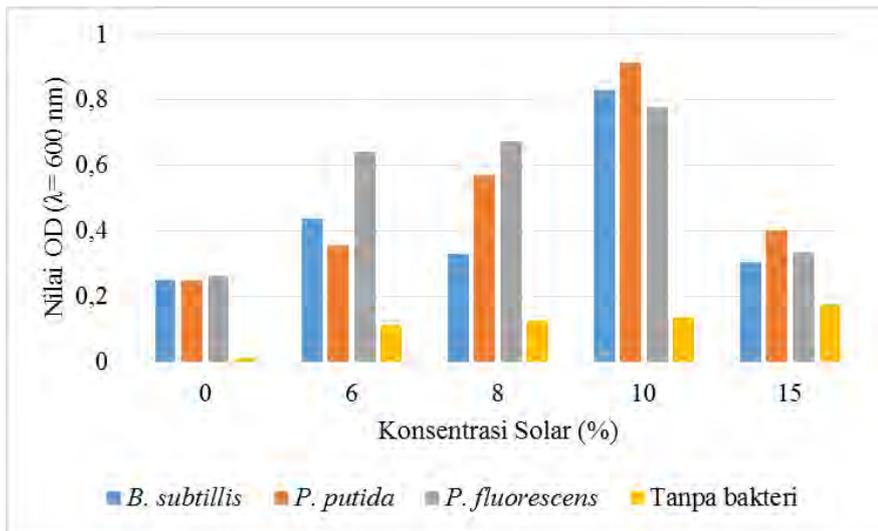
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

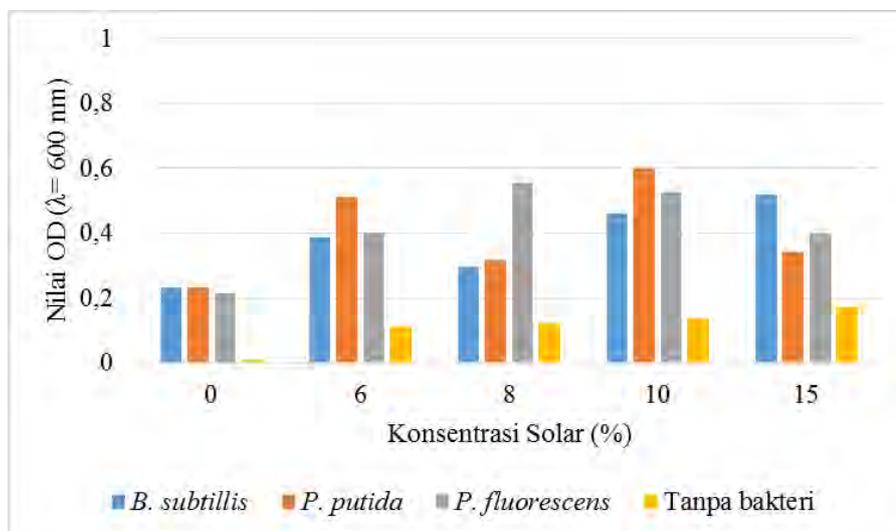
1.1 Penelitian Pendahuluan Menentukan Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai *Optical Density* dan Jumlah Koloni Bakteri

Hasil pengukuran berdasarkan nilai *Optical Density* pada masing - masing konsentrasi inkokulum bakteri (Gambar 4.1 dan Gambar 4.2) menunjukkan bahwa nilai OD tertinggi yaitu pada penambahan minyak solar 10% (v/v). Pada konsentrasi inkokulum 5% (v/v), isolat bakteri *B. subtilis*, *P. putida* dan *P. fluorescens* memiliki nilai OD 0,83; 0,915; dan 0,776 ($\lambda= 600$ nm), sedangkan pada konsentrasi inkokulum 10% (v/v) isolat bakteri *B. subtilis*, *P. putida* dan *P. fluorescens* memiliki nilai OD 0,459; 0,6; dan 0,525 ($\lambda= 600$ nm). *Optical Density* pada kontrol tanpa bakteri terbaca pada OD 0,031 dikarenakan pada media *Mineral Salt Medium* ditambahkan konsentrasi solar yang menyebabkan terbacanya kekeruhan solar tersebut.

Jika dibandingkan berdasarkan konsentrasi inkokulum bakteri 5% (v/v) dan 10% (v/v), pada penambahan inkokulum 5% (v/v) nilai OD tertinggi pada bakteri *B.subtillilis*. Hal tersebut disebabkan *B.subtillilis* mampu memanfaatkan seluruh sumber karbon dari solar dengan waktu generasi yang lebih cepat daripada *P. putida* dan *P. fluorescens*. Sedangkan pada konsentrasi inkokulum 10% (v/v), nilai OD tertinggi pada bakteri *P.putida*. Hal tersebut disebabkan pada *P.putida* tidak terjadi kompetisi yang tinggi, sehingga dengan konsentrasi inkokulum yang lebih banyak, *P.putida* mampu beradaptasi dengan baik. Sedangkan pada *B.subtillilis* terjadi penurunan pada inkokulum 10% (v/v) karena terjadi kompetisi yang tinggi dalam memanfaatkan sumber karbon yang lebih banyak sehingga nilai OD lebih rendah jika dibandingkan dengan konsentrasi inkokulum 5% (v/v) (Retno dan Mulyana, 2013).



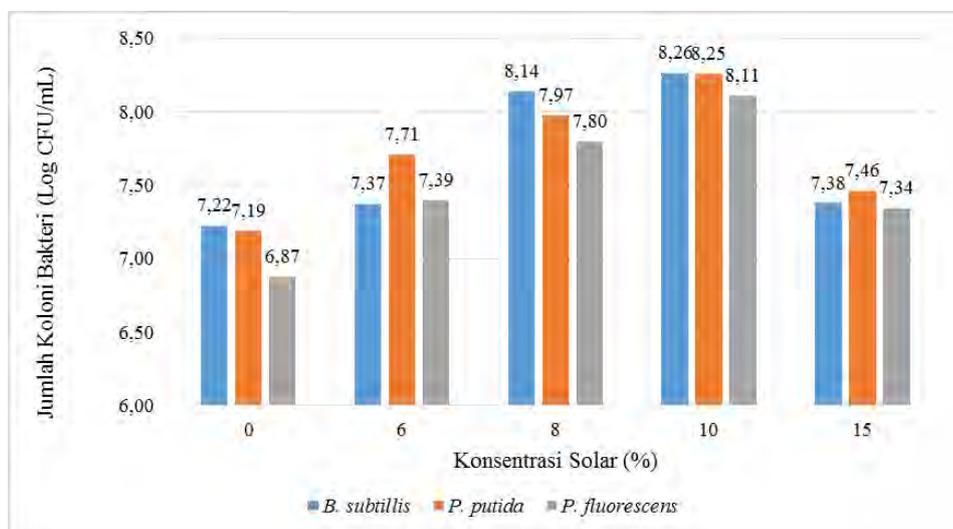
Gambar 0.1 Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai *Optical Density* pada Konsentrasi Inokulum 5%



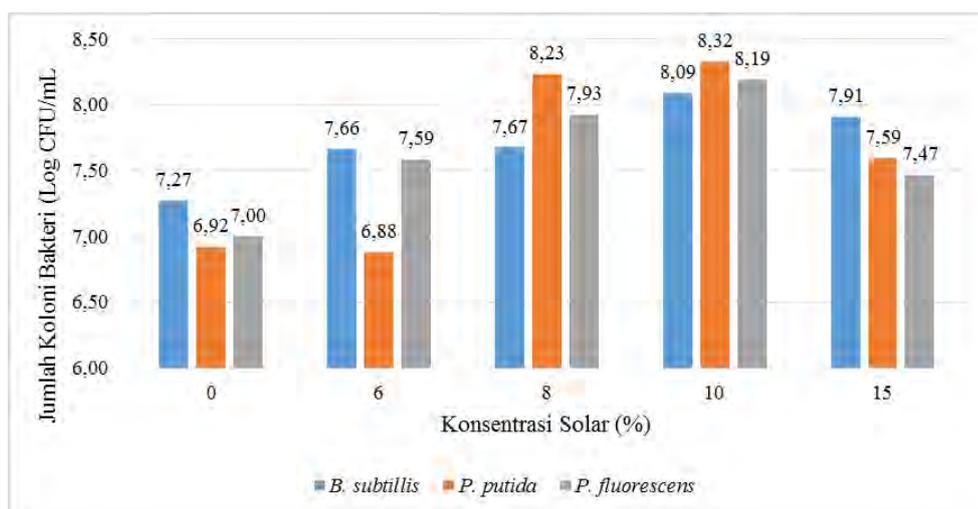
Gambar 0.2 Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai *Optical Density* pada Konsentrasi Inokulum 10%

Peningkatan nilai OD kultur sesuai dengan Hogg (2005) yang menyatakan bahwa jumlah koloni bakteri di dalam media MSM dapat meningkat secara konstan apabila mikroba telah mencapai kondisi yang optimal. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk bertahan terhadap hidrokarbon dengan memanfaatkan hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi (Basheer *et al.*, 2014). Pengukuran *Optical Density* merupakan metode secara kualitatif untuk menghitung jumlah bakteri dalam suatu larutan. Ketika bakteri bertambah jumlahnya atau semakin besar ukurannya dalam biakan cair, terjadi

peningkatan kekeruhan dalam biakan. Namun perhitungan nilai *Optical Density* dihasilkan dari serapan biomassa yang hidup dan mati, sehingga perlu dilakukan uji pertumbuhan total koloni bakteri pada media agar. Pada Gambar 4.3 dan Gambar 4.4 merupakan hasil perhitungan total jumlah koloni ketiga bakteri dengan konsentrasi inokulum 5% (v/v) dan 10% (v/v).



Gambar 0.3 Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai CFU pada Konsentrasi Inokulum 5% (v/v)



Gambar 0.4 Konsentrasi Minyak Solar Berdasarkan Nilai CFU pada Konsentrasi Inokulum 10% (v/v).

Berdasarkan hasil perhitungan total koloni bakteri pada hari ke-5 masa inkubasi menunjukkan bahwa hasil tertinggi pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi inokulum 5% (v/v) dan 10% (v/v) terdapat pada konsentrasi penambahan minyak solar sebesar 10% (v/v). Jumlah koloni bakteri dihitung pada

$\pm 10^8$ CFU/mL, masing-masing jenis bakteri *B. subtilis*, *P. putida* dan *P. fluorescens* dengan konsentrasi inokulum 5% (v/v) adalah 8,26; 8,25; dan 8,11 (log CFU/mL) sedangkan pada konsentrasi inokulum 10% (v/v) adalah 8,09; 8,32; dan 8,19 (log CFU/mL). Berdasarkan nilai CFU ketiga bakteri *B. subtilis*, *P. putida* dan *P. fluorescens* mampu hidup pada semua konsentrasi minyak solar. Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat tersebut memiliki kemampuan untuk mendegradasi solar.

Namun, pertumbuhan optimum ketiga bakteri terdapat pada penambahan konsentrasi minyak solar 10% (v/v). Hal tersebut disebabkan seluruh sumber karbon dapat dimanfaatkan dan berasimilasi dengan bakteri untuk metabolisme sel (Dadrasnia dan Agamuthu, 2013). Selain itu, menurut Vidali (2001) kondisi optimum biodegradasi limbah minyak bumi terjadi pada total kontaminan sebesar 5-10%, konsentrasi hidrokarbon yang terlalu tinggi akan menciptakan lingkungan dimana mikroba sulit untuk memecahkan molekul minyak (Vidali, 2001).

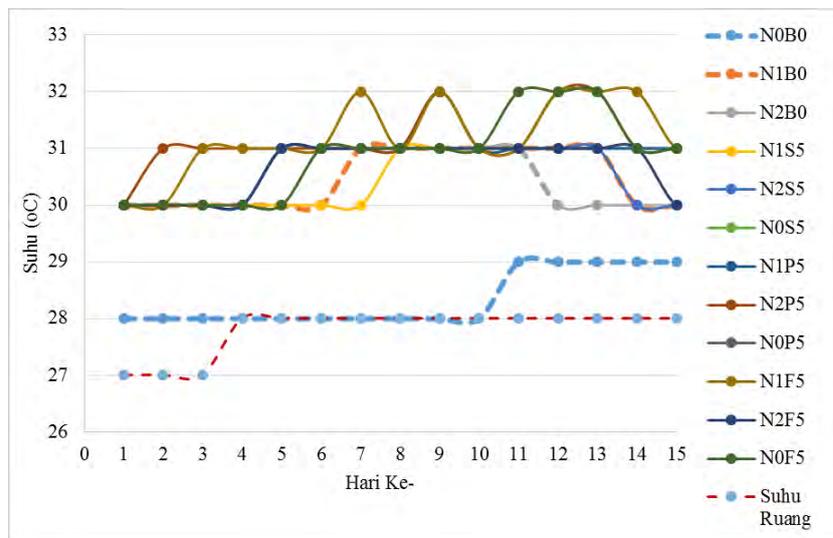
Peningkatan dan penurunan jumlah koloni bakteri berhubungan dengan jenis komponen senyawa hidrokarbon dan jenis bakteri. Penurunan jumlah koloni bakteri dapat disebabkan komposisi dan konsentrasi senyawa hidrokarbon tertentu dapat menjadi racun bagi mikroba karena efek pelarut dari solar yang dapat menghancurkan membran sel bakteri (Shafiee *et al.*, 2006). Oleh karena itu, untuk uji bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon minyak solar, digunakan konsentrasi pencemar minyak solar sebesar 10%. Hasil perhitungan dan foto koloni bakteri pada penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Lampiran 5 dan Lampiran 6.

1.2 Perubahan Suhu

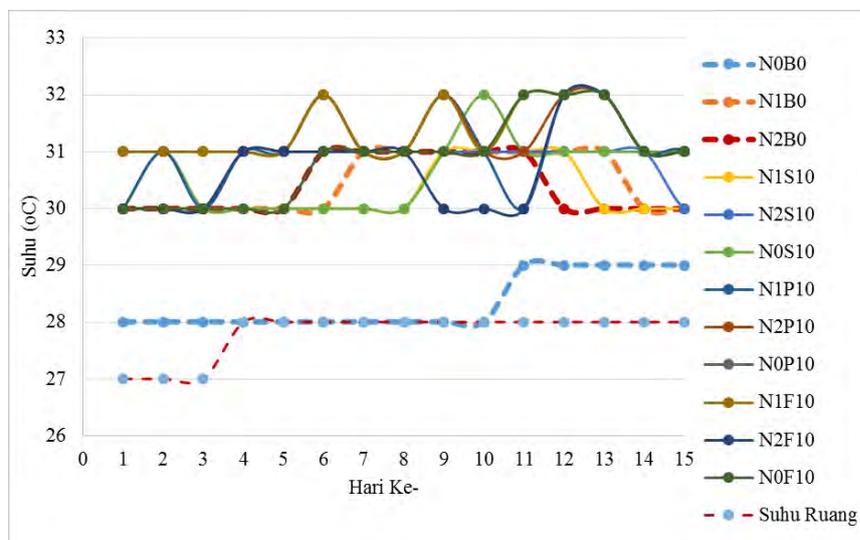
Suhu yang terukur selama 15 hari menunjukkan nilai pada kisaran 28 – 33 °C, yang merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri. Pada Gambar 4.5 dan Gambar 4.6 merupakan pengukuran suhu pada penambahan konsentrasi inokulum 5% (b/b) dan 10% (b/b) yang dibandingkan dengan reaktor kontrol N0B0 (tanpa bakteri - tanpa nutrien) dan reaktor N1B0 (rasio pupuk 100:10:1 - tanpa bakteri) dan N2B0 (rasio pupuk 100:5:1 - tanpa bakteri). Reaktor kontrol dan tanpa pupuk anorganik (N0B0) menunjukkan suhu yang cukup stabil pada kisaran 28 – 29°C. Kenaikan suhu pada reaktor kontrol N0B0 disebabkan adanya pengaruh

aerasi yang menyebabkan terjadinya proses penguapan senyawa hidrokarbon sehingga. Sedangkan pada reaktor tanpa penambahan bakteri yang ditambahkan pupuk anorganik dengan rasio C:N:P (100:10:1 dan 100:5:1) memiliki suhu awal hingga akhir yang lebih tinggi dan stabil pada kisaran 30-31°C. Hal tersebut dikarenakan pengaruh penambahan pupuk urea dan superfosfat yang menyebabkan suhu tanah pada reaktor meningkat (Zam, 2012).

Reaktor dengan campuran bakteri *P. putida* - *P. fluorescens* pada kedua rasio nutrisi (100:10:1 dan 100:5:1), memiliki kisaran suhu yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan campuran *B. subtilis* - *P. putida* dan *B. subtilis* - *P. fluorescens* pada kedua rasio nutrisi (100:10:1 dan 100:5:1).



Gambar 0.5 Suhu Reaktor pada Konsentrasi Inokulum 5% (b/b)



Gambar 0.6 Suhu Reaktor pada Konsentrasi Inokulum 10% (b/b).

Keterangan:

N1 : Rasio 100:10:1

N2 : Rasio 100:5:1

N0 : Tanpa nutrien

B0 : Tanpa bakteri

S : *B. subtilis* - *P. putida*

P : *B. subtilis* - *P. fluorescens*

F : *P. putida* - *P. fluorescens*

Namun jika dibandingkan dengan konsentrasi inokulum bakteri, campuran *P.putida* -*P. fluorescens* pada konsentrasi 5% (b/b) (N1F5, N2F5, N0F5) memiliki pola perubahan suhu yang relatif lebih rendah daripada campuran *P.putida* -*P. fluorescens* pada konsentrasi inokulum 10% (b/b) (N1F10, N2F10, N0F10). Peningkatan suhu disebabkan oleh adanya aktifitas bakteri yang memanfaatkan sumber karbon dari minyak solar. Oleh karena itu, semakin tinggi aktifitas mikroorganisme maka akan menghasilkan suhu lingkungan yang lebih tinggi (Retno dan Mulyana, 2013).

Rentang suhu yang terukur pada semua reaktor dengan penambahan bakteri uji masih relatif stabil dikisaran suhu mesofilik yang dibutuhkan bakteri untuk tumbuh, yaitu antara 20°C - 40°C. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Vidali (2001), bahwa pada proses biodegradasi minyak yang dilakukan secara biologis berada di dalam kondisi mesofilik. Kecenderungan yang terjadi pada masing-masing reaktor adalah menurunnya suhu pada H-14 sampai H-15 dikarenakan aktifitas bakteri menurun. Menurunnya aktifitas bakteri disebabkan sumber nutrien pupuk urea dan superfosfat yang semakin menipis pada hari terakhir proses bioremediasi.

1.3 Perubahan pH

Pada Gambar 4.7 dan Gambar 4.8 merupakan pengukuran pH pada penambahan konsentrasi inokulum 5% (b/b) dan 10% (b/b) yang dibandingkan dengan reaktor kontrol N0B0 (tanpa bakteri - tanpa nutrien) dan reaktor dengan penambahan nutrien rasio 100:10:1 dan 100:5:1. Reaktor kontrol tanpa bakteri dan tanpa pupuk anorganik reaktor tanpa bakteri – rasio pupuk 100:10:1 (NIB0) dan reaktor NIB0 (rasio pupuk 100:10:1 - tanpa bakteri) dan N2B0 (rasio pupuk 100:5:1 - tanpa bakteri) menunjukkan nilai pH yang cukup stabil pada kisaran 6,9 – 7,0.

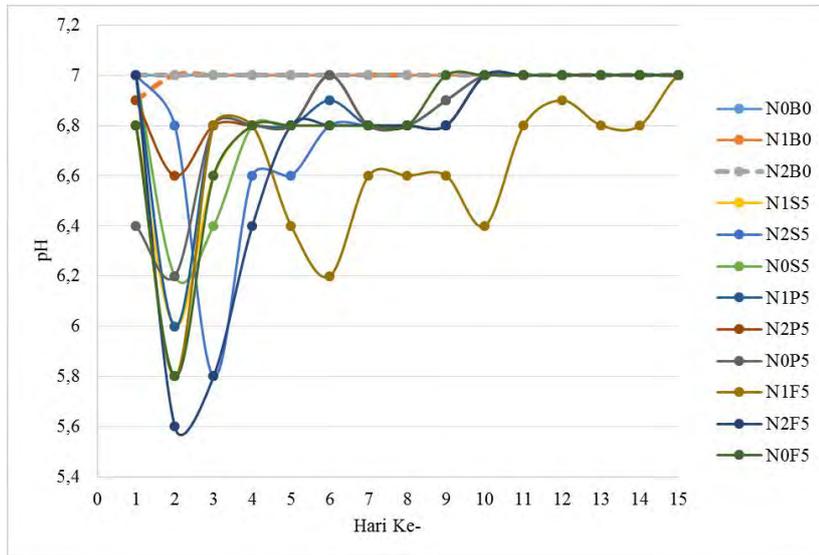
Reaktor dengan penambahan konsentrasi inokulum 5% (b/b) pada ketiga jenis campuran bakteri (*B. subtilis* - *P. fluorescens*, *B. subtilis* - *P. putida* dan *P. fluorescens* - *P. putida*) mengalami penurunan di H-3 hingga H-12 dengan kisaran pH 5,6 – 6,8.

Pemberian pupuk anorganik pada rasio 100:5:1 pada ketiga jenis campuran bakteri (N2S5, N2P5 dan N2F5) memberikan nilai kisaran penurunan pH yang lebih rendah jika dibandingkan dengan pemberian rasio pupuk anorganik 100:10:1 (N1S5, N1P5 dan N1F5), sedangkan berdasarkan jenis kultur campuran bakteri, kisaran penurunan pH yang lebih rendah terdapat pada campuran *P. putida* - *P. fluorescens* (N2F5). Reaktor dengan penambahan konsentrasi inokulum sebesar 10% (b/b) (Gambar 4.8) memiliki kisaran nilai pH yang lebih rendah jika dibandingkan dengan konsentrasi inokulum 5% (b/b) (Gambar 4.8). Namun secara keseluruhan, pada reaktor dengan pemberian inokulum 5% (b/b) dan 10% (b/b) tidak memiliki perbedaan nilai pH yang terlalu jauh dan masih berada pada kisaran pH optimum bakteri hidrokarbonoklastik untuk melakukan proses degradasi yaitu 5,5-8,8 (Vidali, 2001).

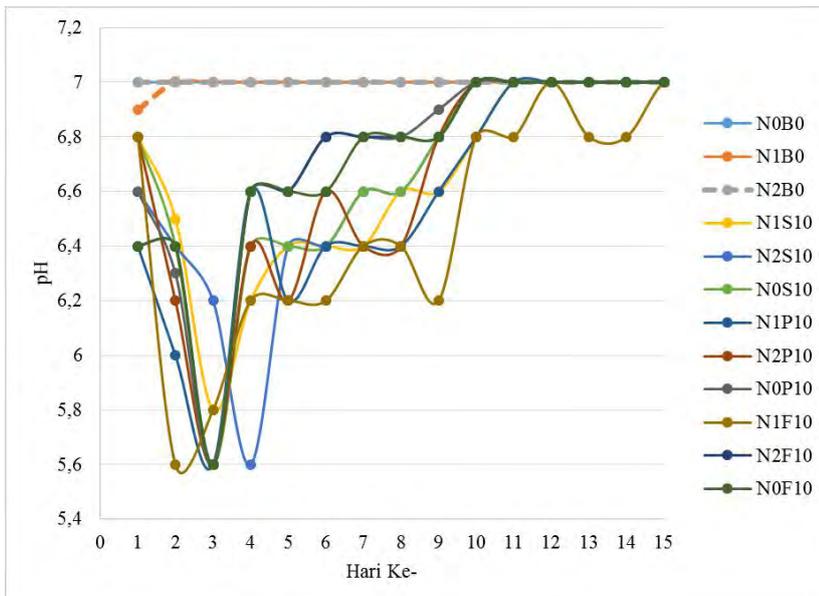
Pada pemberian pupuk dengan rasio 100:10:1 (N1S10, N1P10 dan N1F10) memberikan nilai kisaran penurunan pH yang lebih rendah yaitu 5,6 - 6,8 jika dibandingkan dengan pemberian rasio pupuk anorganik 100:5:1 (N2S10, N2P10 dan N2F10), sedangkan berdasarkan jenis kultur campuran bakteri, kisaran penurunan pH yang lebih rendah terdapat pada campuran *P. putida* - *P. fluorescens* (N1F10). Penurunan pH menunjukkan bahwa media semakin bersifat asam dikarenakan adanya aktifitas pertumbuhan dalam degradasi minyak solar. Aktifitas tersebut disebabkan hasil metabolit asam-asam organik dan karbondioksida dari aktivitas metabolisme sel selama proses degradasi hidrokarbon. Pada proses degradasi, minyak solar didegradasi menjadi senyawa alkohol, kemudian menjadi aldehid dan dibiodegradasi menjadi senyawa asam karboksilat yang kesemuanya bersifat asam (Hogg, 2005).

Peningkatan pH mendekati netral dan stabil terjadi di H-13 hingga H-15 pada semua reaktor yaitu dengan kisaran 6,8-7,0. Peningkatan pH yang terjadi merupakan pengaruh proses dekomposisi bahan organik (Padmono, 2007). Selain itu, dapat disebabkan oleh adanya kemampuan bakteri dalam melakukan respon

toleransi asam dengan mekanisme pompa hidrogen. Beberapa bakteri memiliki kemampuan untuk melakukan upaya homeostatis terhadap keasaman lingkungan sebatas masih dalam toleransi adaptasinya. Bakteri melakukan pertukaran kation K^+ dari dalam sel dan menukarnya dengan H^+ yang banyak terdapat di lingkungannya, sehingga keasaman lingkungan dapat dikurangi (Rosenberg et al., 1992).



Gambar 0.7 Nilai pH pada Konsentrasi Inokulum 5% (b/b)



Gambar 0.8 Nilai pH pada Konsentrasi Inokulum 10% (b/b)

Keterangan:

N1 : Rasio 100:10:1

N2 : Rasio 100:5:1

N0 : Tanpa nutrien

B0 : Tanpa bakteri

S : *B. subtilis* - *P. putida*

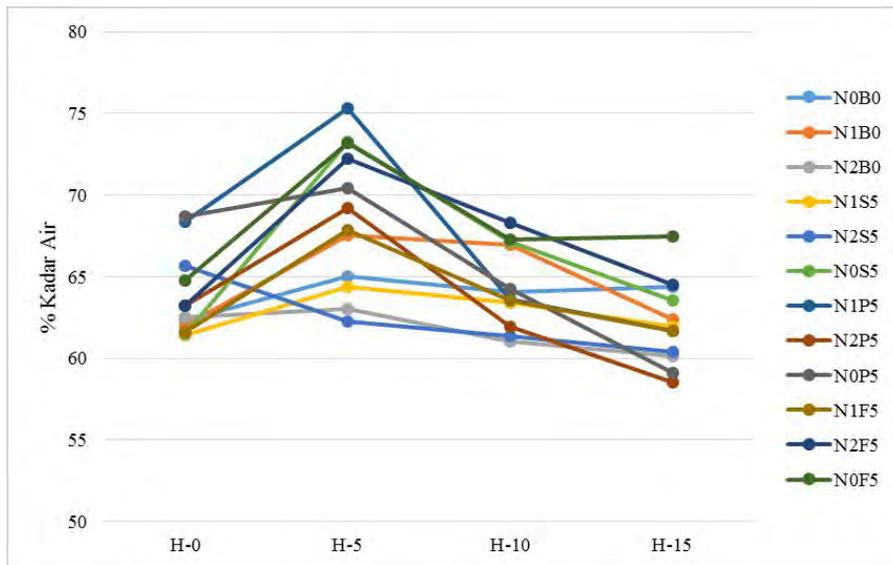
P : *B. subtilis* - *P. fluorescens*

F : *P. putida* - *P. fluorescens*

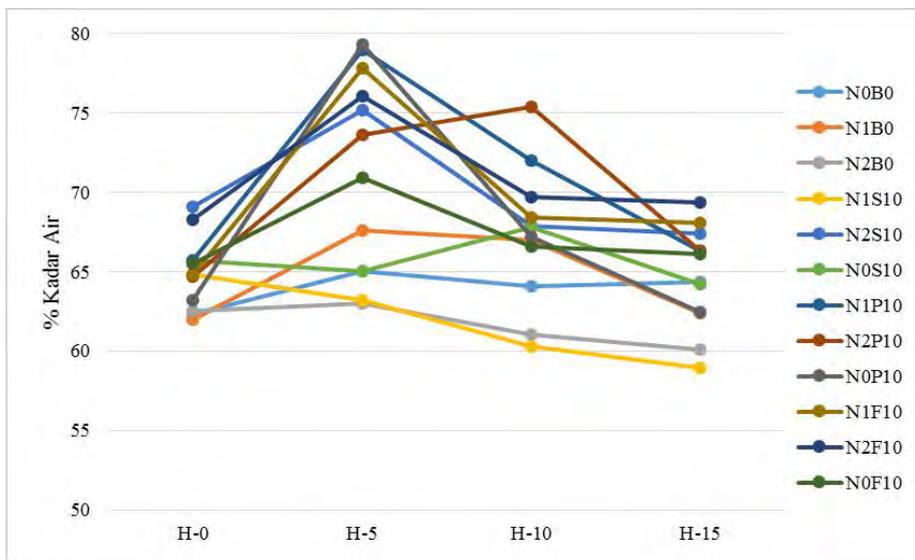
1.4 Kadar Air

Kelembaban yang optimum untuk bioremediasi tanah adalah sekitar 80% kapasitas lapang atau 15% air dari berat kelembaban yang tidak mencukupi misalnya kurang dari 40%, dapat mengurangi laju bioremediasi (Cookson, 1995). Kadar air pada reaktor dijaga kelembabannya dengan menyemprotkan akuades tiap 5 hari sekali menggunakan *sprayer*, sehingga dapat dilakukan pengkondisian kadar air optimum sebesar 70-90%. Hasil analisis kadar air pada masa inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4.9. Kadar air semua reaktor pada H-0 hingga H-15 memiliki kisaran 58% – 79%. Kadar air tertinggi terjadi pada H-5 dan sedikit menurun dari H-10 ke H-15. Tingginya kadar air pada H-5 berpengaruh terhadap nilai pH, karena penambahan air untuk mengatur kelembaban juga dapat meningkatkan nilai pH (Aminah, 2010).

Hal tersebut berkaitan dengan meningkatnya nilai pH pada konsentrasi inokulum 5% (b/b) dan 10% (b/b) (Gambar 4.7 dan Gambar 4.8) mendekati netral dari H-5 hingga H-15. Adanya perbedaan kadar air disebabkan karena terlalu sedikit dalam penambahan akuades pada H-10 dan H-15. Namun, pada reaktor dengan penambahan inokulum 5% (b/b) dan 10% (b/b) memiliki kisaran yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol tanpa penambahan bakteri dan tanpa nutrien (NOB0) yang relatif stabil dari H-0 ke H-15. Kadar air pada reaktor dengan penambahan bakteri 5% (b/b) dan 10% (b/b) berkurang disebabkan adanya peningkatan suhu oleh adanya proses metabolisme mikroorganisme (Aminah, 2010). Meskipun terjadi penurunan, kadar air yang terukur masih berada pada kondisi optimum yaitu 40%-80% sehingga pertumbuhan bakteri hidrokarbonoklastik dapat berjalan dengan baik (Nugroho, 2006).



Gambar 0.9 Persentase Kadar Air pada Konsentrasi Inokulum 5% Selama Proses Bioremediasi



Gambar 0.10 Persentase Kadar Air pada Konsentrasi Inokulum 10% Selama Proses Bioremediasi

Keterangan:

N1 : Rasio 100:10:1

N2 : Rasio 100:5:1

N0 : Tanpa nutrisi

B0 : Tanpa bakteri

S : *B. subtilis* - *P. putida*

P : *B. subtilis* - *P. fluorescens*

F : *P. putida* - *P. fluorescens*

1.5 Jumlah Koloni Bakteri Selama Proses Bioremediasi Tanah Tercemar Hidrokarbon Minyak Solar

Pengukuran total koloni bakteri digunakan untuk mengetahui jumlah kisaran bakteri pendegradasi minyak yang hidup di dalam setiap reaktor selama proses bioremediasi berlangsung. Perhitungan total koloni bakteri digunakan metode hitungan cawan (*plate count*) yang diencerkan hingga 10^7 , dan 10^8 . Menurut Cappuccino dan Sherman (2013), dalam metode hitungan cawan (*plate count*) jumlah terbaik koloni yang dapat dihitung berkisar antara 30-300 mikroba per mL atau per gram sampel. Pengukuran total koloni bakteri dilakukan pada awal proses inkubasi yaitu H-0, pertengahan H-3, H-5 dan H-10, serta akhir proses inkubasi pada H-15. Hasil analisa perhitungan jumlah koloni bakteri dapat dilihat pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11.

Jumlah koloni bakteri dihitung pada 10^8 CFU/g-tanah. Pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11 menunjukkan secara keseluruhan pada masa inkubasi H-0 hingga H-15, total koloni bakteri bakteri ketiga jenis campuran bakteri (*B. subtilis* - *P. putida*, *B. subtilis* - *P. fluorescens* dan *P. fluorescens* - *P. putida*) pada penambahan inokulum 5% (b/b) dan 10% (b/b) yang dikombinasikan dengan pupuk anorganik (100:10:1 dan 100:5:1) memiliki jumlah koloni bakteri yang lebih tinggi daripada reaktor kontrol N0B0 (tanpa bakteri - tanpa pupuk), reaktor N1B0 (tanpa bakteri – rasio pupuk 100:10:1) dan reaktor N2B0 (tanpa bakteri – rasio pupuk 100:5:1). Pada H-0 jumlah koloni bakteri tertinggi pada reaktor N1F5 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) yaitu sebesar 10,12 log CFU/g-tanah, sedangkan pada penambahan inokulum 10% (b/b) jumlah tertinggi pada reaktor N1F10 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) yaitu sebesar 10,08 log CFU/g-tanah.

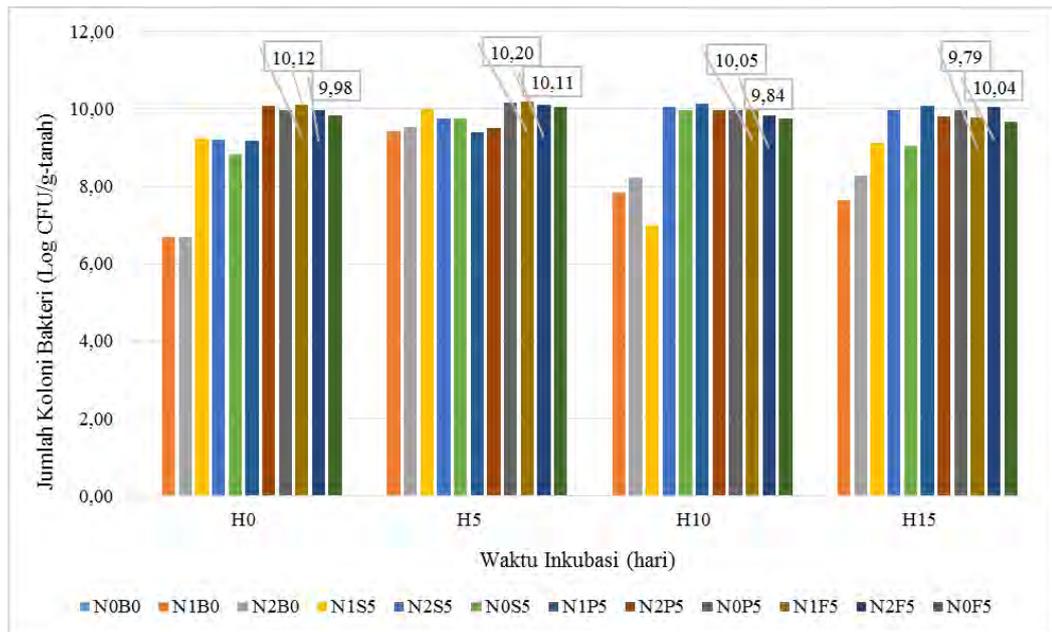
Jumlah koloni bakteri meningkat rata-rata di semua reaktor H-5 hingga H-15 . Pada reaktor penambahan inokulum 5% (b/b), N1F5 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) dan reaktor N2F5 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) memiliki jumlah koloni yang relatif tinggi jika dibandingkan jenis campuran yang lain, yaitu sebesar 10,2 log CFU/g-tanah (H-5); 10,05 log CFU/g-tanah (H-10); 9,79 log CFU/g-tanah (H-15); dan 10,11 log CFU/g-tanah (H-5); 9,84 log CFU/g-tanah (H-10); 10,04 log CFU/g-

tanah (H-15). Sedangkan penambahan inokulum 10% (b/b), N1F10 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) memiliki jumlah koloni yang meningkat dari H-5 menuju H-15, yaitu dari 10,1 log CFU/g-tanah menjadi 10,16 log CFU/g-tanah (H-15). Pada reaktor N2F10 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) mengalami penurunan di H-10 menjadi 9,84 log CFU/g-tanah dan meningkat kembali di H-15 menjadi 9,99 log CFU/g-tanah.

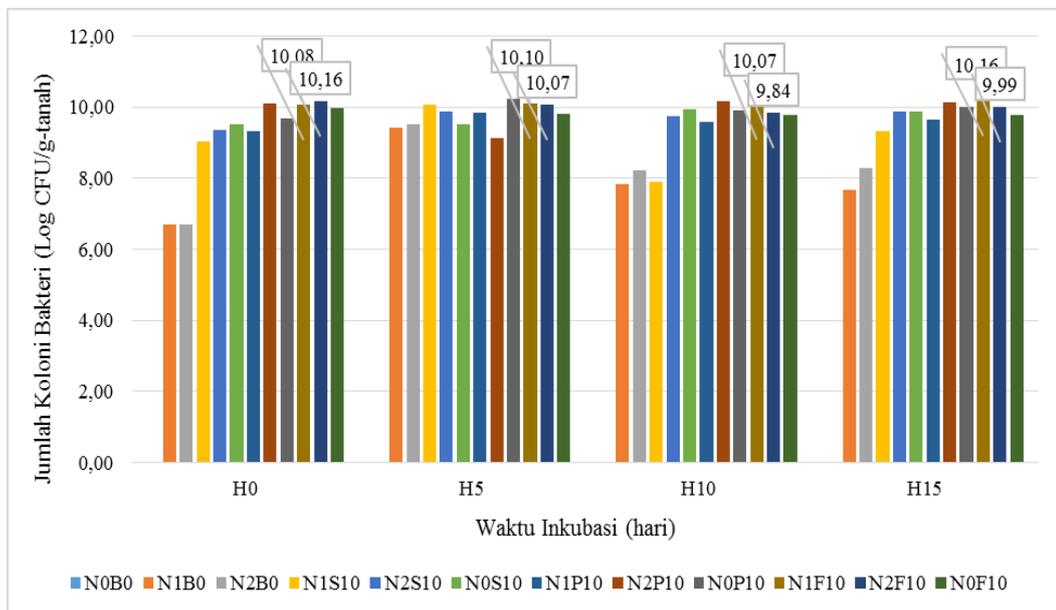
Meningkatnya jumlah koloni bakteri, mengindikasikan adanya aktifitas metabolisme. Peningkatan jumlah koloni bakteri yang terjadi merupakan fase logaritma karena bakteri telah teradaptasi dengan minyak sehingga dapat menggunakan sumber karbon utama yaitu minyak solar untuk pertumbuhannya. Oleh karena itu, bakteri dapat melakukan reproduksi sel sehingga jumlah total sel bakteri meningkat (Madigan *et al.*, 2012). Semakin besar laju kenaikan jumlah koloni bakteri, maka semakin cepat proses biodegradasi hidrokarbon pada minyak solar (Aminah, 2010).

Berdasarkan Gambar 4.10 dan Gambar 4.11, pada H-15 terdapat penurunan jumlah koloni bakteri pada setiap perlakuan cenderung menurun. Pada konsentrasi inokulum 5% (b/b) penurunan jumlah koloni bakteri terendah terdapat pada reaktor NOS5 (tanpa pupuk – campuran *B. subtilis* - *P. putida*) yaitu sebesar 9,05 log CFU/g-tanah, sedangkan pada konsentrasi inokulum 10% penurunan jumlah koloni bakteri terendah terdapat pada reaktor N1S10 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran *B. subtilis* - *P. putida*) yaitu sebesar 9,31 log CFU/g-tanah.

Penurunan jumlah koloni bakteri juga terjadi pada reaktor N1F5 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) yang pada H-0 hingga H-10 memiliki jumlah koloni bakteri tertinggi, mengalami penurunan pada H15 menjadi 9,79 log CFU/g-tanah. Jika dibandingkan secara keseluruhan, penambahan konsentrasi inokulum 5% (b/b) memiliki kisaran tingkat pertumbuhan jumlah koloni bakteri yang lebih rendah jika dibandingkan dengan penambahan inokulum 10% (b/b), yang menunjukkan tingkat pertumbuhan koloni bakteri yang lebih tinggi dan stabil dari H-0 hingga H-15. Jika berdasarkan pemberian rasio pupuk yang berbeda, pupuk dengan rasio 100:5:1 menunjukkan tingkat koloni bakteri lebih tinggi daripada penambahan pupuk dengan rasio 100:5:1.



Gambar 0.11 Total Koloni Bakteri pada Konsentrasi Inokulum 5% (b/b)



Gambar 0.12 Total Koloni Bakteri pada Konsentrasi Inokulum 10% (b/b)

Keterangan:

N1 : Rasio 100:10:1

N2 : Rasio 100:5:1

N0 : Tanpa nutrisi

B0 : Tanpa bakteri

S : *B. subtilis* - *P. putida*

P : *B. subtilis* - *P. fluorescens*

F : *P. putida* - *P. fluorescens*

Penurunan jumlah koloni bakteri disebabkan ketersediaan substrat (nutrien) seperti N, P dan C untuk pertumbuhan bakteri berkurang serta bakteri membutuhkan waktu adaptasi untuk senyawa kompleks. Ketersediaan nutrien yang semakin berkurang tetapi jumlah total sel bakteri tinggi akan menyebabkan terjadinya kompetisi. Kompetisi yang semakin besar dalam memanfaatkan nutrien menyebabkan penyerapan nutrien oleh bakteri menjadi terbatas dan tidak optimal. Menurunnya tingkat pertumbuhan bakteri akan menyebabkan proses degradasi menjadi terhambat (Ghazali *et al.*, 2004). Jika sebelumnya jumlah koloni bakteri mengalami penurunan dan mengalami peningkatan kembali, disebabkan terdapat bakteri yang memanfaatkan bakteri yang telah lisis, karena isi sel yang keluar dapat menjadi nutrisi bagi sebagian sel yang masih hidup sehingga tetap terjadi peningkatan jumlah total sel bakteri (Madigan *et al.*, 2012).

Perbedaan jumlah bakteri pada masing-masing perlakuan disebabkan adanya perbedaan kemampuan masing-masing jenis campuran bakteri dalam menggunakan nutrisi yang ada dalam media perlakuan (Siregar, 2009). Turunnya jumlah bakteri pada minggu terakhir disebabkan adanya akumulasi metabolisme toksik pada substrat perlakuan. Hee *et al.* (1997) menyatakan senyawa yang tidak terdegradasi lebih lanjut akan terakumulasi dan menjadi lebih toksik untuk bakteri.

1.6 Hasil Penurunan *Total Petroleum Hydrokarbon* (TPH) Minyak Solar

Bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon minyak solar menggunakan kultur campuran bakteri dengan variasi rasio nutrien selama 15 hari ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi jenis kultur campuran bakteri, konsentrasi penambahan inokulum dan rasio optimum nutrien dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak solar. Analisis kadar hidrokarbon dilakukan setiap lima hari sekali yaitu pada H-0, H-5, H-10 dan H-15. Metode yang digunakan dalam analisis nilai TPH adalah metode gravimetri dengan ekstraksi *soxhlet*. Hasil analisis kadar hidrokarbon selama proses bioremediasi dapat dilihat pada Gambar 4.12 dan Gambar 4.13. Penyisihan senyawa hidrokarbon minyak solar dari masing-masing perlakuan dapat diketahui dari perhitungan persentase degradasi (Lampiran 3). Hasil perhitungan disajikan pada Tabel 4.1 berikut.

Tabel 0.1 Persentase Penyisihan Hidrokarbon Minyak Solar

Variasi Perlakuan	TPH (mg/kg)		Penyisihan Hidrokarbon (%)
	H0	H15	
N0B0	140.528	127.170	9,51
N1B0	159.469	79.455	50,18
N2B0	139.167	79.074	43,18
N1S5	156.794	82.230	47,56
N1S10	161.139	72.835	54,80
N2S5	151.304	75.759	49,93
N2S10	140.249	53.249	62,03
N0S5	163.502	75.467	53,84
N0S10	147.533	69.186	53,10
N1P5	156.612	67.829	56,69
N1P10	163.238	68.896	57,79
N2P5	159.351	63.995	59,84
N2P10	155.926	68.295	56,20
N0P5	168.136	67.118	60,08
N0P10	159.001	65.522	58,79
N1F5	143.684	54.853	61,82
N1F10	155.290	57.108	63,22
N2F5	178.103	64.134	63,99
N2F10	152.874	54.969	64,04
N0F5	175.249	67.318	61,59
N0F10	154.428	58.131	62,36

Hasil pengamatan yang telah dilakukan terhadap nilai TPH dalam tanah memperlihatkan bahwa secara umum nilai TPH pada setiap variasi perlakuan mengalami penurunan. Penambahan jenis campuran bakteri dengan konsentrasi inokulum yang berbeda, serta adanya variasi penambahan nutrisi berupa pupuk anorganik, sangat berpengaruh pada tingkat degradasi nilai TPH pada sampel tanah tercemar minyak solar. Pada awal proses inkubasi (H-0), secara keseluruhan menunjukkan konsentrasi nilai TPH (mg/kg) yang tidak jauh berbeda di setiap reaktor yaitu berada pada kisaran 139.167 mg/kg – 175.249 mg/kg. Hal ini disebabkan pada awal proses bioremediasi, bakteri masih membutuhkan waktu beradaptasi untuk mensintesis enzim-enzim yang diperlukan dalam proses degradasi hidrokarbon minyak solar (Prayitno *et al.*, 2010).

Memasuki masa inkubasi H-5, variasi perlakuan mengalami penurunan nilai TPH yang beragam pada setiap perlakuan, kecuali pada reaktor kontrol N0B0 (tanpa pupuk - tanpa bakteri) menunjukkan tingkat penurunan TPH tidak berbeda

jauh dari H-0 hingga H-15, yaitu sebesar 140.528 mg/kg hingga 127.170 mg/kg. Pada Gambar 4.13 menunjukkan hasil penurunan TPH oleh ketiga jenis kultur campuran bakteri (*B. subtilis* - *P. putida*, *B. subtilis* - *P. fluorescens* dan *P. fluorescens* - *P. putida*) dengan penambahan konsentrasi inokulum 5% b/b dan variasi perlakuan (tanpa pupuk, 100:10:1, 100:5:1).

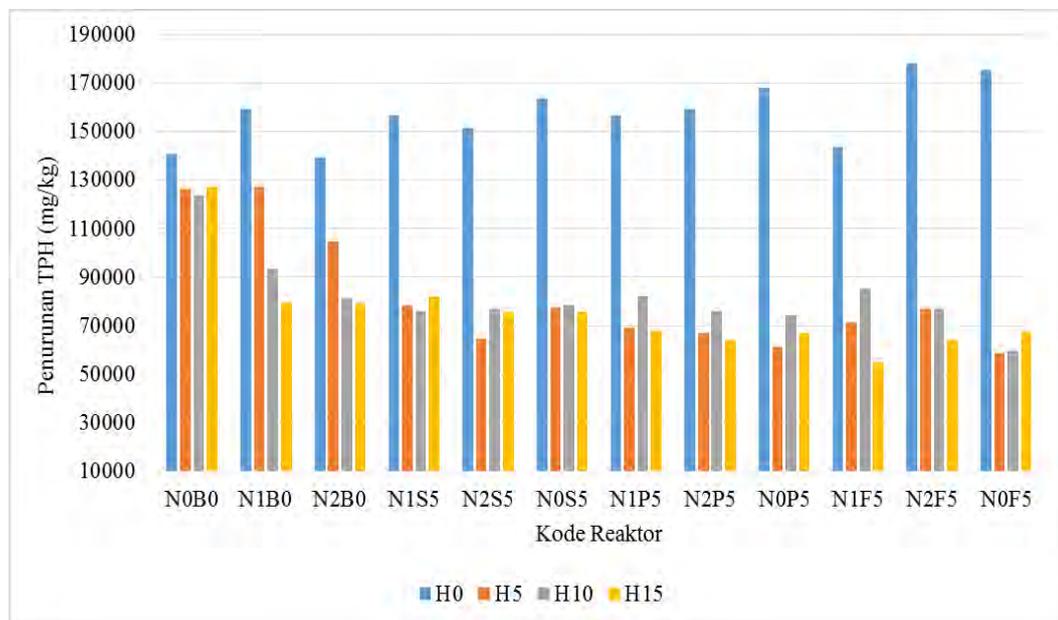
Hasil menunjukkan penurunan nilai TPH terbaik terdapat pada reaktor N1F5 (pupuk anorganik rasio 100:10:1 - jenis campuran *P. fluorescens* - *P. putida*), yaitu dari 143.684 mg/kg (H0) hingga 54.853 mg/kg (H15) dengan total penyisihan hidrokarbon sebesar 61,82%. Sedangkan pada reaktor penambahan campuran bakteri (*B. subtilis* - *P. putida*, *B. subtilis* - *P. fluorescens* dan *P. fluorescens* - *P. putida*) konsentrasi inokulum 5% (b/b) yang dikombinasikan dengan pupuk anorganik rasio 100:5:1 (Gambar 4.12), menunjukkan hasil penurunan nilai TPH terbaik pada reaktor N2F5 dengan jenis campuran bakteri yang sama (*P. fluorescens* - *P. putida*), yaitu dari 178.103 mg/kg (H0) hingga 64.134 mg/kg (H15) dengan tingkat penyisihan hidrokarbon sebesar 63,99%.

Pada Gambar 4.14 menunjukkan hasil penurunan TPH oleh ketiga jenis kultur campuran bakteri (*B. subtilis* - *P. putida*, *B. subtilis* - *P. fluorescens* dan *P. fluorescens* - *P. putida*) dengan penambahan konsentrasi inokulum 10% b/b dan variasi perlakuan (tanpa pupuk, 100:10:1, 100:5:1). Pada konsentrasi inokulum 10% (b/b), menunjukkan hasil penurunan nilai TPH terbaik terdapat pada reaktor N1F10 (pupuk rasio 100:10:1 - *P. fluorescens* - *P. putida* – inokulum 10% b/b) yaitu dari 155.289 mg/kg (H0) hingga 57.107 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 63,22%. Sedangkan pada reaktor penambahan campuran bakteri (*B. subtilis* - *P. putida*, *B. subtilis* - *P. fluorescens* dan *P. fluorescens* - *P. putida*) konsentrasi inokulum 10% (b/b) yang dikombinasikan dengan pupuk anorganik rasio 100:5:1, menunjukkan hasil penurunan nilai TPH terbaik pada reaktor N2F10 (pupuk rasio 100:5:1 - *P. fluorescens* - *P. putida* – inokulum 10% b/b) yaitu dari 152.874 mg/kg (H0) hingga 54.968 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 64,04%.

Hal tersebut menunjukkan bioaugmentasi (kultur campuran bakteri) mampu meningkatkan efektivitas degradasi minyak bumi dibandingkan dengan perlakuan tanpa inokulasi bakteri dan tanpa adanya bakteri. Hasil yang diperoleh sesuai Singh

& Lin (2010), yang menyatakan bahwa inokulasi bakteri (bioaugmentasi) dapat mempercepat proses degradasi hidrokarbon minyak bumi dibandingkan tanpa inokulasi bakteri.

Jika dibandingkan berdasarkan penambahan pupuk anorganik, penurunan nilai TPH dengan variasi perlakuan campuran bakteri yang dikombinasikan dengan penambahan pupuk anorganik memberikan penurunan yang lebih baik. Hal ini dapat dikaitkan bahwa, mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya, sedangkan nitrogen dan fosfor merupakan penyusun senyawa-senyawa penting dalam sel yang menentukan aktivitas pertumbuhan mikroorganisme. Ketiga unsur ini harus ada dalam rasio yang tepat agar tercapai pertumbuhan bakteri yang optimal, serta dapat mempercepat laju degradasi senyawa hidrokarbon pada minyak solar.



Gambar 0.13 Persentase Penurunan TPH dari H-0 hingga H-15 Pada Konsentrasi Inokulum 5%

Keterangan:

N1 : Rasio 100:10:1

N2 : Rasio 100:5:1

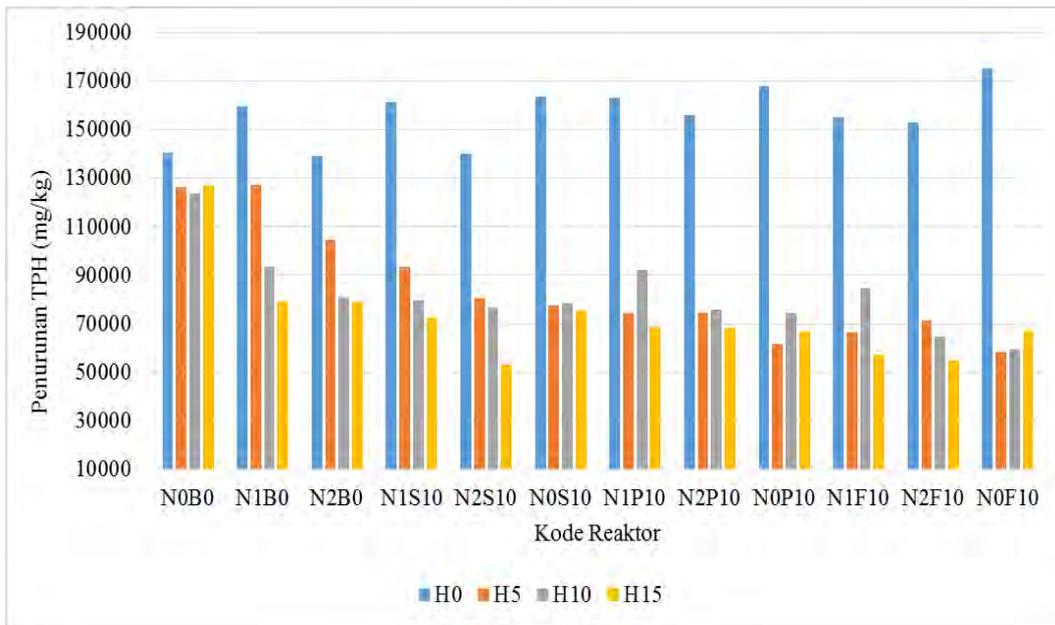
N0 : Tanpa nutrisi

B0 : Tanpa bakteri

S : *B. subtilis* - *P. putida*

P : *B. subtilis* - *P. fluorescens*

F : *P. putida* - *P. fluorescens*



Gambar 0.14 Persentase Penurunan TPH dari H-0 hingga H-15 Pada Konsentrasi Inokulum 10%

1.7 Komponen Hidrokarbon Minyak Solar

Hasil uji *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) digunakan untuk menganalisis senyawa yang berhasil didegradasi pada perlakuan terbaik, dalam hal ini adalah N2F10 (pupuk dengan rasio 100:5:1 – campuran *P. fluorescens* - *P. putida* - konsentrasi inokulum 10% b/b pada hari ke-15). N2F10 merupakan perlakuan terbaik berdasarkan penurunan TPH dari 152.874 mg/kg (H0) hingga 54.968 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 64,04%. Sebelum menganalisis hasil di akhir, hasil GC-MS perlakuan kontrol tanpa penambahan apapun (N0B0) pada H-0 terlebih dahulu dianalisis. Hasil GC-MS pada perlakuan kontrol dan perlakuan terbaik disajikan pada Tabel 4.2 dan Tabel 4.3.

Biodegradasi senyawa hidrokarbon dihitung dari nilai penurunan persentase pada peak-peak senyawa hidrokarbon yang dikalikan dengan nilai konsentrasi TPH (mg/kg). Konsentrasi hidrokarbon (mg/kg) pada Tabel 4.2 dan Tabel 4.3 merupakan hasil perkalian luas area (%) tiap senyawa dengan konsentrasi TPH pada hari ke-0 (reaktor N0B0) yaitu 140.528 mg/kg dan konsentrasi TPH pada hari ke-15 (reaktor N2F10) yaitu 54.969 mg/kg. Untuk mengetahui peak-peak senyawa hidrokarbon hasil ekstraksi gravimetri nampak pada kromatogram dilihat dari waktu retensi (retention time) senyawa tersebut. Hasil analisis GC-MS, penambahan isolat

menghasilkan respon berupa peningkatan aktivitas degradasi minyak bumi. Profil komponen hidrokarbon pada perlakuan reaktor N2F10 hari ke-15 menunjukkan hasil yang berbeda dibandingkan dengan kontrol N0B0 pada hari ke-0.

Tabel 0.2 Komponen Hidrokarbon Hasil GC-MS pada H-0 (Reaktor N0B0)

NO	Luas area (%)	Nama Senyawa	Formula	Hidrokarbon (mg/kg)
Fraksi Hidrokarbon Alifatik				
1	1,45	<i>Acetone</i>	C ₃ H ₆ O	203.765
2	0,79	<i>Pentane 3-methyl</i>	C ₆ H ₁₄	507.910
3	4,32	<i>Cyclopentane-methyl</i>	C ₆ H ₁₂	607.081
4	0,55	<i>Dodecane</i>	C ₁₂ H ₂₆	430.015
5	0,39	<i>Tridecane, 6-methyl</i>	C ₁₄ H ₃₀	54.806
6	0,53	<i>1-Iodoundecane</i>	C ₁₁ H ₂₃	74.480
7	0,39	<i>Tetradecane, 4-methyl</i>	C ₁₅ H ₃₂	54.806
8	0,84	<i>2-methyloctadecane</i>	C ₁₉ H ₄₀	118.043
9	0,4	<i>Pentadecane, 3-methyl</i>	C ₁₆ H ₃₄	1.354.689
10	5,9	<i>Heptadecane</i>	C ₁₇ H ₃₆	2.502.802
11	0,45	<i>Undecane,4-8-dimethyl</i>	C ₁₃ H ₂₈	390.668
12	0,42	<i>Hexadecane</i>	C ₁₆ H ₃₄	1.287.236
13	0,58	<i>Octadecane</i>	C ₁₈ H ₃₈	147.554
14	0,71	<i>3-Cyclohexyl-4-ethyl</i>	C ₁₂ H ₂₄ O	99.775
15	1,07	<i>Cyclohexane</i>	C ₆ H ₁₂	150.365
16	0,65	<i>1 Octanol, 2 buthyl</i>	C ₁₂ H ₂₆ O	91.343
17	0,71	<i>Eicosane</i>	C ₂₀ H ₄₂	3.742.258
18	3,45	<i>Tetracosane</i>	C ₂₄ H ₅₀	1.256.319
19	0,42	<i>Octacosane</i>	C ₂₈ H ₅₈	267.003
20	1,08	<i>Tetratetracontane</i>	C ₄₄ H ₉₀	226.250
Fraksi Hidrokarbon Aromatik				
1	0,68	<i>Trans-2-3-Epoxyoctane</i>	C ₈ H ₁₆ O	95.559
2	0,4	<i>p-Methane-3-one semicarbazone</i>	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O	56.211
3	0,55	<i>Naphthalene 1,5-dimethyl</i>	C ₁₂ H ₁₂	77.290
4	0,79	<i>Germacrane</i>	C ₁₅ H ₃₀	111.017
5	2,05	<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid</i>	C ₆ H ₄	541.032

Berdasarkan hasil uji GC-MS menunjukkan terjadinya pengurangan senyawa yang semula berada di kontrol, pada hasil GC-MS perlakuan N2F10 sudah tidak terdeteksi lagi yakni senyawa dari golongan alifatik adalah *Tridecane, 6-methyl, Tetradecane, 4-methyl, 1-Iodoundecane, 2-methyloctadecane, Octadecane, 1 Octanol, 2 buthyl, 3-Cyclohexyl-4-ethyl, Cyclohexane, Octacosane, Tetratetracontane* dan senyawa dari golongan aromatik adalah *p-Menthane-3-one semicarbazone, Naphthalene 1,5-dimethyl, Germacrane* dan *1,2-Benzenedicarboxylic acid*. Pada perlakuan kontrol terdeteksi senyawa lebih banyak (25 senyawa) sedangkan pada perlakuan N2F10 hanya terdapat 15 senyawa yang terdeteksi dan mengalami penurunan (Tabel 4.2).

Hal ini membuktikan bahwa pada reaktor perlakuan N2F10 (pupuk rasio 100:5:1 – campuran *P. fluorescens* - *P. putida* - konsentrasi inokulum 10%) selama masa inkubasi terjadi proses penguraian bahan organik dari kompleks menjadi sederhana dan jenis campuran bakteri yang digunakan sesuai untuk degradasi hidrokarbon minyak solar. Senyawa yang tidak terdeteksi dan senyawa yang mengalami penurunan menandakan adanya proses degradasi senyawa-senyawa TPH kompleks menjadi sederhana. Proses degradasi dibuktikan oleh adanya alkohol yaitu dari senyawa *Pentadecanol*, dan *2-hexyl-Octanol* serta terbentuknya asam organik yaitu dari senyawa *Hexadecanoic acid*.

Asam organik yang terbentuk merupakan hasil metabolisme dari senyawa hidrokarbon *Hexadecane* yang merupakan fraksi alifatik (alkana). Oksidasi senyawa alkana dikatalisis oleh *alkana monooxygenase* menghasilkan alkohol (*Hexadecanol*) yang selanjutnya teroksidasi menjadi *Hexadecanal* oleh enzim *alcDH* (alkohol dehidrogenase). Setelah terbentuk *Hexadecanal*, dioksidasi lagi oleh enzim *alcDH* menjadi asam organik *Hexadecanoic acid* yang sudah dapat masuk ke jalur β -oxidation, sehingga dapat diubah menjadi asetil ko-A dan masuk ke dalam siklus TCA (Ahmed *et al.*, 2010).

Berdasarkan hasil GC-MS, tidak semua asam organik yang terbentuk dapat terdeteksi. Hal tersebut dikarenakan penggunaan kolom kromatografi yang sama antara sampel kontrol dengan sampel perlakuan. Penggunaan kolom seharusnya dibedakan antara komponen nonpolar dan komponen polar, agar senyawa polar yang terbentuk dari hasil degradasi dapat terdeteksi di hasil akhir GC-MS.

Sistem *Gas Chromatography* secara efektif mampu memisahkan suatu senyawa menjadi komponen-komponen penyusunnya, sedangkan detektor *mass spectrometry* memberikan data hasil fragmentasi yang spesifik. Gabungan dari kedua sistem tersebut akan mendapatkan data waktu retensi dan spektrum massa dari masing-masing komponen. Namun, hasil GC-MS tidak dapat melihat *pathway* dari reaksi degradasi suatu senyawa. Oleh karena itu, selain berdasarkan hasil GC-MS, proses terjadinya biodegradasi oleh bakteri dapat dikaitkan dengan hasil pengukuran pH selama masa inkubasi (Gambar 4.7 dan 4.8). Nilai pH mengalami penurunan di H-3 hingga H-12 dengan kisaran pH 5,6 – 6,8. Keasaman nilai pH dapat disebabkan senyawa metabolit organik yang merupakan hasil produksi

polimer ekstraseluler oleh bakteri selama proses degradasi. Pada proses degradasi, minyak solar didegradasi menjadi senyawa alkohol, kemudian menjadi aldehid dan dibiodegradasi menjadi senyawa asam karboksilat yang kesemuanya bersifat asam (Hogg, 2005).

Tabel 0.3 Komponen Hidrokarbon Hasil GC-MS pada H-15 (Reaktor NF210)

No	Luas area (%)	Nama Senyawa	Formula	Hidrokarbon (mg/kg)	Penyisihan (mg/kg)
Fraksi Hidrokarbon Alifatik					
1	9,24	<i>Pentane, 3-methyl</i>	C ₆ H ₁₄	111017	396.893
2	3,45	<i>Cyclopentane-methyl</i>	C ₆ H ₁₂	189642	417.439
3	0,68	<i>Cyclopentane (2-hexyloctyl)</i>	C ₁₉ H ₃₈	37379	tt
4	0,75	<i>Dodecane</i>	C ₁₂ H ₂₆	170953	259.063
5	0,93	<i>Pentadecanol</i>	C ₁₅ H ₃₂ O	51121	tt
6	5,78	<i>Pentadecane</i>	C ₁₅ H ₃₂	1138401	216.288
9	1,75	<i>Hexadecane</i>	C ₁₆ H ₃₄	472181	815.055
11	0,88	<i>Hexadecanoic acid, methyl ester</i>	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	48372	tt
12	0,76	<i>2-hexyl-1octanol</i>	C ₁₃ H ₄₀ O	41776	tt
13	6,22	<i>Heptadecane</i>	C ₁₇ H ₃₆	380383	2.122.419
14	0,69	<i>Nonadecane, 2-methyl</i>	C ₂₀ H ₄₂	86301	tt
15	0,7	<i>Docosane</i>	C ₂₂ H ₄₆	38478	tt
16	0,74	<i>Undecane,2,10-dimethyl</i>	C ₁₃ H ₂₈	40677	349.991
17	0,98	<i>Eicosane</i>	C ₂₀ H ₄₂	1315400	2.426.858
18	0,66	<i>Heptacosane</i>	C ₂₇ H ₅₆	36279	tt
19	3,88	<i>Tetracosane</i>	C ₂₄ H ₅₀	849266	407.054

Keterangan: tt (Tidak terdeteksi)

1.8 Pengaruh Penambahan Variasi Jenis Campuran Bakteri terhadap Penyisihan Hidrokarbon

Mekanisme bioremediasi pada prinsipnya berlandaskan pada proses penguraian bahan organik di biosfer yang dilakukan oleh kelompok mikroba perombak (heterotrofik). Mikroba heterotrofik memiliki kemampuan memanfaatkan senyawa organik, dalam hal ini hidrokarbon sebagai substrat. Ketiga jenis campuran bakteri *B. subtilis* - *P. putida*, *B. subtilis* - *P. fluorescens* dan *P. fluorescens* - *P. putida* dalam penelitian ini merupakan bakteri hidrokarbonoklastik yang memiliki kemampuan dalam memanfaatkan senyawa organik dari senyawa hidrokarbon dan dapat dibuktikan dari jumlah koloni bakteri selama masa inkubasi (Gambar 4.11 dan 4.12).

Jika dibandingkan berdasarkan jenis variasi campuran bakteri, dapat dilihat bahwa jenis kultur campuran bakteri dengan campuran inokulum 5% b/b, yaitu *B. subtilis* - *P. putida* (N0S5) memiliki nilai penurunan TPH yaitu sebesar 69.186

mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi 53,10%, jenis campuran *B. subtilis* - *P. fluorescens* (NOP5), memiliki nilai penurunan TPH yaitu sebesar 65.521 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 58,79%, dan jenis *P. fluorescens* - *P. putida* (NOF5) memiliki nilai penurunan TPH yaitu sebesar 67.318 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 61,58%. Pada jenis kultur campuran bakteri dengan campuran inokulum 10% b/b, *B. subtilis* - *P. putida* (NOS10) memiliki nilai penurunan TPH yaitu sebesar 75.467 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi 53,84%, jenis campuran *B. subtilis* - *P. fluorescens* (NOP10), memiliki nilai penurunan TPH yaitu sebesar 67.118 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 60,08%, dan jenis *P. fluorescens* - *P. putida* (NOF10) memiliki nilai penurunan TPH yaitu sebesar 58.131 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 62,35%

Berdasarkan perhitungan tersebut dapat dilihat jenis kultur campuran bakteri yang memberikan tingkat degradasi hidrokarbon tertinggi dimiliki oleh campuran *P. fluorescens* - *P. putida* pada konsentrasi penambahan inokulum 5% dan 10%. Hal ini dapat dikaitkan bahwa hidrokarbon minyak solar dapat diuraikan oleh bakteri genus *P. fluorescens* - *P. putida*. Namun, *P. fluorescens* - *P. putida* merupakan jenis bakteri yang mampu bekerja secara sendiri-sendiri tanpa ketergantungan satu sama lain dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon. Hal tersebut dikarenakan, strain *Pseudomonas spp.* pada masing-masing jenis *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*. *P. putida* mampu menghasilkan surfaktan jenis glikolipida (rhamnosa lipid) dan *P. fluorescens* mampu menghasilkan biosurfaktan kelompok *lipopeptida viscosin* (Junaidi *et al.*, 2013) yang dapat menurunkan tegangan permukaan.

Penurunan tegangan permukaan menyebabkan minyak terdispersi dan memperbesar kontak permukaan antara bakteri dan minyak sehingga akan terjadi peningkatan biodegradasi hidrokarbon (Widodo, 2010). Selain itu, *P. putida* dan *P. fluorescens* mampu mendegradasi hidrokarbon alkana (C₅-C₁₆), alkil benzen, etilbenzen, sikloalkana, anthracene dan naftalin pada minyak solar. Hal tersebut dikarenakan *P. putida* dapat menghasilkan enzim alkana hidroksilase dan *P. fluorescens* mampu menghasilkan enzim naftalin dioksigenase/monooksigenase.

Hasil dari analisis GC-MS menunjukkan bahwa *P. fluorescens* dan *P. putida* dapat memanfaatkan rantai panjang n-alkana. *P. fluorescens* dan *P. putida* memanfaatkan hidrokarbon melalui emulsifikasi substrat. Pada penelitian Barathi dan Vasudevan (2001), mengungkapkan bahwa *P. fluorescens* mampu menghasilkan enam jenis biosurfaktan golongan rhamnolipid, yang memiliki struktur kimia yang serupa. Biosurfaktan yang dihasilkan mampu menjadi bioemulsifier dalam mendegradasi senyawa *Heptadecane*, *Hexadecane*, *Octadecane* yang merupakan hidrokarbon fraksi alifatik serta mampu mengemulsi komponen hidrokarbon aromatik yaitu *Naphtalene* (Barathi dan Vasudevan, 2001).

Oleh karena itu *P. fluorescens* dan *P. putida* berperan penting dalam remediasi tanah terkontaminasi hidrokarbon. Selain itu, substrat yang telah di emulsi akan lebih mudah didegradasi, karena *P. putida* yang mampu menghasilkan enzim *Alkane Hydroxylases*, sehingga dapat memanfaatkan substrat *alkanes*, *fatty acids*, *alkyl benzenes*, dan *cycloalkanes* (Das dan Chandran, 2011). Sebagian besar penelitian menunjukkan bahwa kemampuan efektif spesies *P. putida* dan *P. fluorescens* dalam biodegradasi minyak mentah disebabkan oleh sistem enzim aktif untuk metabolisme hidrokarbon. Selain itu, *P. putida* menghasilkan spora yang dapat membantu bakteri lain bertahan dalam kondisi ekstrim, sehingga kondisinya menjadi menguntungkan (Vinothini *et al.*, 2015).

Higgins *et al.* (1995), menjelaskan adanya interaksi antara spesies yang saling menguntungkan pada genus *Pseudomonas sp.*, antara lain dikarenakan *Pseudomonas putida* mampu memberikan faktor biotin yang dibutuhkan mikroorganisme lain yang hanya mampu mengoksidasi sikloheksan namun tidak dapat tumbuh di dalamnya. Dua genus *P. putida* dan *P. fluorescens* mampu saling meningkatkan metabolit kooperatif antar anggota dengan menghasilkan berbagai enzim oleh berbagai anggota, contohnya adalah aktifitas lesitinase, serta transfer plasmid antara spesies dalam kultur campuran *Pseudomonas sp.* akan menghasilkan strain baru yang mampu berhadapan dengan polutan baru.

Das dan Chandran (2011) menyatakan bahwa biodegradasi senyawa hidrokarbon telah terbukti memerlukan keberadaan suatu komunitas mikroba yang terdiri atas beberapa jenis mikroba. Interaksi mikroba karbonoklastik memberi peran penting dalam biodegradasi minyak bumi. Interaksi itu bisa berupa

mutualisme, yaitu semua anggota di dalam kultur campuran memperoleh keuntungan dari anggota lain, atau berupa komensalisme, yaitu salah satu anggota komunitas memperoleh keuntungan dengan adanya populasi kedua, sedangkan populasi kedua tidak memperoleh keuntungan atau kerugian dari populasi pertama.

Pada penelitian Meliani *et al.* (2014), menggunakan campuran konsorsium jenis *Pseudomonas spp.* (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*) membuktikan bahwa penggunaan konsorsium tersebut dapat secara efisien dan lebih efektif menurunkan komponen hidrokarbon minyak mentah yang kompleks sebesar 77%, daripada menggunakan satu jenis strain. Hasil ini menunjukkan bahwa kultur bakteri campuran yang ditambahkan ditambahkan mampu meningkatkan laju biodegradasi hidrokarbon di dalam tanah.

Malik dan Ahmed (2012), menekankan bahwa tidak ada satu strain bakteri dengan kapasitas metabolisme untuk menurunkan semua komponen yang ditemukan dalam minyak bumi. Selain itu, biodegradasi minyak bumi di alam melibatkan serangkaian spesies mikroba yang ada. Hal tersebut diakibatkan adanya kometabolisme. Kometabolisme menyebabkan proses penguraian suatu senyawa oleh mikroba yang membutuhkan keberadaan senyawa lain, karena tanpa senyawa tersebut maka mikroba tidak dapat melakukan metabolisme dan memperbanyak sel dengan baik (Nugroho, 2006).

1.9 Pengaruh Penambahan Variasi Konsentrasi Inokulum Campuran Bakteri terhadap Penyisihan Hidrokarbon

Berdasarkan konsentrasi inokulum pada masing-masing jenis campuran bakteri, penurunan nilai TPH yang lebih tinggi pada konsentrasi pemberian inokulum 10% b/b. Hal ini dapat ditunjukkan berdasarkan Gambar 4.14, *B. subtilis* - *P. putida* (NOS10) memberikan nilai penurunan TPH sebesar 75.467 mg/kg (H-15) penyisihan hidrokarbon sebesar 53,84%, campuran *B. subtilis* - *P. fluorescens* (NOP10) memberikan nilai penurunan TPH sebesar 67.118 mg/kg (H-15) penyisihan hidrokarbon sebesar 60,08%, dan campuran *P. fluorescens* - *P. putida* (NOF10), memberikan nilai penurunan TPH sebesar 67.318 mg/kg (H-15) penyisihan hidrokarbon sebesar 61,58%. Jika berdasarkan dari jenis campuran terbaik, yaitu *P. fluorescens* - *P. putida* juga menunjukkan bahwa penurunan nilai

TPH yang lebih tinggi pada konsentrasi pemberian inokulum 10% b/b, yaitu pada variasi perlakuan N1F10 (pupuk rasio 100:10:1 - *P. fluorescens* - *P. putida*) sebesar 57.107 mg/kg (H15) penyisihan hidrokarbon sebesar 63,22%. %, dan variasi perlakuan N2F10 (pupuk rasio 100:5:1 - *P. fluorescens* - *P. putida*) yaitu 54.968 mg/kg (H15) penyisihan hidrokarbon sebesar 64,04%.

Sedangkan, inokulum 5% (b/b) menunjukkan hasil penurunan nilai TPH lebih rendah pada variasi jenis campuran *B. subtilis* - *P. putida* (N0S5) memberikan nilai penurunan TPH sebesar 69.186 mg/kg (H-15) dengan tingkat degradasi 53,10%, campuran *B. subtilis* - *P. fluorescens* (N0P10) memberikan nilai penurunan TPH sebesar 65.521 mg/kg (H-15) dengan penyisihan hidrokarbon sebesar 58,79%, dan campuran *P. fluorescens* - *P. putida* (N0F10), memberikan nilai penurunan TPH sebesar 58.131 mg/kg (H-15) dengan penyisihan hidrokarbon sebesar 62,35%. Jika berdasarkan dari jenis campuran terbaik, yaitu *P. fluorescens* - *P. putida* juga menunjukkan bahwa penurunan nilai TPH yang lebih rendah pada konsentrasi pemberian inokulum 5% b/b yaitu pada variasi perlakuan N1F5 (pupuk anorganik rasio 100:10:1 sebesar 54.853 mg/kg (H15) dengan penyisihan hidrokarbon sebesar 61,82%, dan variasi perlakuan reaktor N2F5 (pupuk anorganik rasio 100:5:1, yaitu sebesar 64.134 mg/kg (H15) penyisihan hidrokarbon sebesar 63,99%.

Hal ini berbanding terbalik dengan hasil jumlah koloni bakteri pada dua campuran bakteri *P. fluorescens* dengan *P. putida*. Pada reaktor penambahan inokulum 5% (b/b), N1F5 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) memiliki jumlah koloni bakteri lebih tinggi yaitu sebesar 10,20 log CFU/g-tanah (H-5) dan 9,84 log CFU/g-tanah (H-10), sedangkan penambahan inokulum 10% (b/b), N1F10 (rasio pupuk 100:10:1 – campuran bakteri *P. fluorescens* - *P. putida*) memiliki jumlah koloni tertinggi yaitu sebesar 10,12 log CFU/g-tanah (H-5) dan 10,07 log CFU/g-tanah (H-10). Hal ini dapat dikaitkan pada penelitian Prathiba (2015) yang menyatakan bahwa jumlah total sel bakteri yang tinggi akan mendegradasi hidrokarbon minyak bumi lebih cepat, tetapi meningkatnya jumlah total sel bakteri tidak selalu menghasilkan laju degradasi yang semakin besar.

Menurut Chaineau *et al.* (2005), jumlah koloni bakteri juga bergantung pada ketersediaan nutrisi. Namun demikian, dapat disimpulkan bahwa inokulum bakteri dan jumlah total sel bakteri merupakan salah satu faktor keberhasilan dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Al-Whasify *et al.* (2014) menyatakan bahwa proses degradasi dengan inokulum bakteri dapat bekerja optimal apabila jumlah inokulum konsorsium bakteri sama atau lebih banyak daripada jumlah koloni bakteri indigenus, karena jumlah inokulum konsorsium bakteri yang tepat merupakan salah satu tahapan penting dalam menentukan tingkat keberhasilan untuk mendegradasi hidrokarbon minyak bumi (Sing dan Lin, 2003).

Degradasi hidrokarbon minyak bumi yang terjadi oleh penambahan inokulum bakteri menunjukkan adanya penggunaan minyak sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhannya maupun digunakan untuk metabolisme selnya. Fenomena tersebut diperkuat dengan adanya peningkatan jumlah total sel bakteri. Menurut Nair *et al.* (2008) hasil degradasi hidrokarbon seperti alkana menghasilkan alkohol, aldehid, dan asam lemak yang akan membentuk asetil CoA melalui proses β -oksidasi. Selanjutnya masuk ke dalam siklus asam trikarboksilat (siklus Krebs) yang akhirnya menghasilkan energi untuk pertumbuhan sehingga dapat meningkatkan jumlah total sel bakteri.

Mukred *et al.* (2008) meneliti tanah tercemar hidrokarbon petroleum oil menggunakan campuran bakteri *Acinetobacter. sp.* T4 dan *P.putida* PB4 dengan inokulum 10% (v/w) selama 15 hari mampu memotong rantai n-alkana dan sebagian komponen aromatik sebesar 53-73%. Sedangkan pada penelitian Barathi dan Vasudevan (2003), meneliti kemampuan *P. fluorescens* NS1 dengan penambahan *bulking agent* dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi dalam konsentrasi inokulum 10% (v/w) mampu mendegradasi senyawa alkan 13% dan senyawa aromatik 21% selama 35 hari.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Astuti (2003), diketahui bahwa konsentrasi inokulum terbaik digunakan dalam degradasi minyak bumi adalah 10%. Pemberian konsentrasi dibawah ataupun lebih dari 10% akan memberikan hasil pertumbuhan dan degradasi yang kurang baik. Hal ini dikarenakan konsentrasi inokulum 10% merupakan konsentrasi inokulum yang memberikan jumlah koloni bakteri yang mencukupi, serta tidak mengakibatkan

terjadinya kompetisi antar bakteri, sehingga pertumbuhan dan proses degradasi lebih tinggi.

1.10 Penentuan Rasio Pupuk Anorganik yang Optimum terhadap Penyisihan Hidrokarbon

Nutrisi merupakan faktor yang berpengaruh besar dalam sintesis dan pertumbuhan sel serta dalam aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri untuk mendegradasi polutan. Beberapa nutrisi penting yang dibutuhkan mikroorganisme adalah karbon, nitrogen, dan fosfor. Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya. Nitrogen dan fosfor merupakan penyusun senyawa-senyawa penting dalam sel yang menentukan aktivitas pertumbuhan mikroorganisme. Ketiga unsur ini harus ada dalam rasio yang tepat agar tercapai pertumbuhan bakteri yang optimal.

Rasio C:N yang rendah (kandungan unsur N yang tinggi) akan meningkatkan emisi dari nitrogen sebagai amonium yang dapat menghalangi perkembangbiakan bakteri. Sedangkan rasio C:N yang tinggi (kandungan unsur N yang relatif rendah) akan menyebabkan proses degradasi berlangsung lebih lambat karena nitrogen akan menjadi faktor penghambat (*growth-rate limiting factor*) (Alexander, 1994). Rasio C:N tergantung dari kontaminan yang ingin didegradasi, bakteri serta jenis nitrogen yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan pupuk anorganik berupa pupuk dasar urea dan superfosfat.

Pada reaktor tanpa penambahan nutrisi (N0S10, N0P10 dan N0F10) memberikan nilai penurunan TPH yang tidak berbeda jauh dengan reaktor yang ditambahkan nutrisi, yaitu masing-masing sebesar 69,186 mg/kg; 65,522 mg/kg; dan 58,131 mg/kg. Hal tersebut disebabkan, terdapat bakteri yang memanfaatkan bakteri yang telah lisis, karena isi sel yang keluar dapat menjadi nutrisi bagi sebagian sel yang masih hidup sehingga tetap terjadi peningkatan jumlah total sel bakteri dan proses biodegradasi tetap berjalan meskipun penurunan TPH tidak terlalu optimal jika dibandingkan dengan reaktor yang ditambahkan nutrisi (Madigan *et al.*, 2012).

Pada reaktor dengan jenis campuran terbaik yaitu *P. fluorescens* - *P. putida* dengan konsentrasi inokulum 5% (b/b), memberikan hasil penurunan TPH pada

rasio pupuk anorganik 100:10:1 yaitu 54.853 mg/kg (H15), sedangkan pada reaktor dengan pupuk anorganik rasio 100:5:1, menunjukkan hasil penurunan nilai TPH yang lebih tinggi, yaitu 64.134 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 63,99%. Hal ini juga ditunjukkan pada penambahan konsentrasi inokulum 10% b/b, memberikan hasil penurunan TPH lebih rendah dengan rasio pupuk anorganik 100:10:1, yaitu 57.107 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 63,22% daripada penambahan pupuk anorganik rasio 100:5:1 yang menunjukkan hasil penurunan nilai TPH lebih tinggi, yaitu 54.968 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 64,04%.

Berdasarkan hasil penurunan nilai TPH minyak solar, penambahan pupuk urea dan superfosfat memberikan penurunan nilai TPH tertinggi pada rasio penambahan C:N:P 100:5:1. Hal ini menunjukkan bahwa rasio tersebut menyediakan sumber nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan bakteri hidrokarbonoklastik. Kesesuaian antara rasio C:N:P sangat berpengaruh terhadap metabolisme bakteri.

Zam (2010) menyatakan ketersediaan nutrisi terutama nitrogen (N) dan fosfat (P) dalam perbandingan yang sesuai merupakan salah satu faktor yang dapat meningkatkan degradasi minyak bumi. Menurut Zam (2010), pemberian N dan P dapat meningkatkan respirasi sel bakteri, artinya terjadi peningkatan jumlah energi yang dihasilkan sehingga meningkatkan degradasi hidrokarbon dan meningkatkan biodegradasi TPH. Afifi (2004) menambahkan perbandingan C:N:P merupakan salah satu faktor pembatas dalam proses bioremediasi. Perbandingan rasio tersebut sangat tergantung dari karakteristik limbah yang akan diremediasi, sehingga perbandingan yang sesuai akan memberikan hasil bioremediasi yang optimum.

Hasil penelitian menunjukkan perbandingan antara C:N:P=100:5:1 memberikan pertumbuhan dan hasil biodegradasi yang lebih baik jika dibandingkan dengan perbandingan C:N:P =100:10:1. Hal ini dapat diakibatkan oleh konsentrasi N yang tinggi menyebabkan terbentuknya nitrit yang merupakan senyawa toksik sehingga pertumbuhan komunitas mikroorganisme terganggu dan akibatnya proses biodegradasi menjadi rendah. Menurut Astuti (2003), pertumbuhan dan degradasi hidrokarbon akan terjadi lebih baik dengan penambahan nitrogen tetapi apabila terdapat dalam jumlah banyak, metabolisme nitrogen, terutama amonia akan

menghasilkan asam yang dapat menurunkan pH sampai pada tingkatan yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme serta biodegradasi hidrokarbon. Menurut Mulvey (2002), menyatakan senyawa nitrogen dalam jumlah banyak dapat menekan pertumbuhan mikroorganisme, sehingga sumber nutrisi yang mengandung nitrogen tidak dapat diberikan dalam jumlah banyak pada awal proses fermentasi karena dapat terakumulasi dalam bentuk nitrit yang bersifat toksik. Keberadaan senyawa toksik ini akan mengganggu proses bioremediasi, karena kehadiran senyawa ini akan mengganggu metabolisme sel mikroorganisme.

1.11 Uji Statistik ANOVA *General Linier Model*

Analisis data dilakukan dengan uji statistik yaitu uji Anova *General Linier Model* karena variabel prediktor (x) lebih dari dua. Uji *Anova General Linier Model* dilakukan untuk mengetahui pengaruh masing-masing variabel bebas (jenis kultur campuran bakteri, konsentrasi inokulum dan rasio penambahan pupuk inorganik) terhadap variabel terikat (penurunan nilai TPH). Sebelum dilakukan uji signifikansi dilakukan uji asumsi terlebih dahulu uji nilai *Variance Influence Factor* dan uji normalitas.

Berdasarkan nilai VIF dari ketiga variabel memiliki angka lebih besar dari 10, yaitu variabel jenis campuran bakteri sebesar 1,33; konsentrasi inokulum sebesar 1,00; dan untuk variabel rasio nutrisi sebesar 1,33. Hal tersebut menandakan bahwa ketiga jenis variabel berpengaruh terhadap respon penurunan nilai TPH serta tidak terdapat korelasi antar variabel independen dalam model yang didapatkan dengan hipotesis. Berdasarkan hasil pengujian normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan *P-Value* > 0,150 yang mana nilai ini lebih besar dari α ($\alpha = 0,05$) sehingga dapat disimpulkan gagal tolak H_0 yang berarti residual memenuhi asumsi berdistribusi normal. Ada tiga hipotesis awal pada analisis Anova *General Linier Model*, yaitu:

- H_0 (a): tidak ada pengaruh yang signifikan dari interaksi antara variasi jenis kultur campuran dan variasi konsentrasi inokulum bakteri terhadap tingkat penurunan TPH
- H_0 (b): tidak ada pengaruh yang signifikan dari interaksi antara variasi konsentrasi inokulum dan variasi rasio nutrisi terhadap tingkat penurunan TPH

- H0 (c): tidak ada pengaruh yang signifikan dari interaksi antara variasi rasio nutrisi dan variasi jenis kultur campuran terhadap tingkat penurunan TPH

Selanjutnya dilakukan uji statistik Anova *General Linier Model* signifikansi dengan melihat nilai P untuk mengetahui seberapa besar pengaruh jenis kultur campuran bakteri, konsentrasi inokulum dan rasio penambahan pupuk inorganik terhadap efisiensi penurunan nilai TPH minyak solar. Dari hasil analisis didapatkan:

- Untuk H0 (a) nilai $P > 0,05$ ($P = 0,314$) maka gagal tolak H0 (a) sehingga tidak ada pengaruh signifikan dari interaksi antara variasi jenis kultur campuran dan variasi konsentrasi inokulum bakteri terhadap tingkat penurunan TPH
- Untuk H0 (b) nilai $P > 0,05$ ($P = 0,161$) maka gagal tolak H0 (b) sehingga tidak ada pengaruh signifikan dari interaksi antara variasi konsentrasi inokulum dan variasi rasio nutrisi terhadap tingkat penurunan TPH
- Untuk H0 (c) nilai $P > 0,05$ ($P = 0,279$) maka gagal tolak H0 (c) sehingga tidak ada pengaruh signifikan dari interaksi antara variasi rasio nutrisi dan variasi jenis kultur campuran terhadap tingkat penurunan TPH

Berdasarkan hasil analisa uji statistik Anova *General Linier Model* dari nilai P didapatkan hasil bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan jenis kultur campuran bakteri, konsentrasi inokulum dan rasio penambahan pupuk inorganik terhadap efisiensi penurunan nilai TPH minyak solar. Hal ini disebabkan ketiga jenis bakteri yang digunakan merupakan bakteri hidrokarbonoklastik yang ketiganya memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan hasil penyisihan hidrokarbon yang tidak terlalu jauh pada masing-masing jenis kultur campuran bakteri, yaitu 53,10% (*B. subtilis* - *P. putida*), 58,79% (*B. subtilis* - *P. fluorescens*), dan 62,35% (*P. fluorescens* - *P. putida*) pada hari ke-15. Selain itu, pada variasi konsentrasi inokulum (5% dan 10%) dan variasi rasio nutrisi (100:10:1 dan 100:5:1), tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan disebabkan rentang variasi yang tidak terlalu berbeda, sehingga juga menghasilkan tingkat degradasi yang tidak terlalu jauh perbedaannya.

BAB 5

PENUTUP

1.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis maka dapat ditentukan kesimpulan dari penelitian sebagai berikut:

1. Berdasarkan jenis variasi campuran bakteri, kultur campuran bakteri *B. subtilis* - *P. putida*; *B. subtilis* - *P. fluorescens* dan *P. fluorescens* - *P. putida* memberikan pengaruh terhadap tingkat degradasi hidrokarbon minyak solar selama masa inkubasi 15 hari, dengan hasil penurunan nilai TPH terbaik pada campuran *P. fluorescens* - *P. putida* yaitu 58.131mg/kg selama 15 hari dengan tingkat degradasi sebesar 62,35%.
2. Berdasarkan konsentrasi inokulum, penurunan nilai TPH yang lebih tinggi pada konsentrasi pemberian inokulum 10% b/b. Pada campuran *B. subtilis* - *P. putida* memberikan nilai penurunan TPH sebesar 75.467 mg/kg (H-15) dengan tingkat degradasi 53,84%, campuran *B. subtilis* - *P. fluorescens* memberikan nilai penurunan TPH sebesar 67.118 mg/kg (H-15) dengan tingkat degradasi 60,08%, dan campuran *P. fluorescens* - *P. putida*, memberikan nilai penurunan TPH sebesar 58.131 mg/kg (H-15) dengan tingkat degradasi 62,35%.
3. Berdasarkan variasi rasio pupuk anorganik, *P. fluorescens* - *P. putida* menunjukkan hasil penurunan nilai TPH tertinggi pada rasio penambahan C:N:P 100:5:1. Pada konsentrasi inokulum 5% (b/b), menunjukkan hasil penurunan nilai TPH sebesar 64.134 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi 63,99% dan pada konsentrasi inokulum 10% (b/b), menunjukkan hasil penurunan TPH sebesar 54.968 mg/kg (H15) dengan tingkat degradasi sebesar 64,04%.

1.2 Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Meningkatkan kinerja reaktor sehingga perlu dilakukan kajian kembali mengenai desain reaktor yang digunakan, baik meliputi pemantauan terhadap kondisi aerobik, porositas, sistem pengaturan kadar air, maupun sistem

pengambilan sampel. Agar setiap reaktor uji memiliki kondisi yang stabil dari awal hingga akhir proses bioremediasi.

2. Menyediakan rentang waktu penelitian yang lebih lama untuk dapat melihat pengaruh penambahan jenis kultur campuran bakteri dan pupuk inorganik sampai terdegradasi secara sempurna, serta pendeteksian hasil akhir senyawa yang terdegradasi dapat dilakukan pada semua reaktor perlakuan diakhir masa inkubasi agar dapat diketahui senyawa yang berhasil didegradasi oleh semua jenis perlakuan atau senyawa yang belum berhasil didegradasi oleh masing-masing perlakuan
3. Penggunaan kolom kromatografi yang berbeda antara perlakuan kontrol dengan perlakuan setelah masa inkubasi, yaitu kolom nonpolar untuk mendeteksi komponen yang seluruhnya hidrokarbon dan kolom polar untuk mendeteksi komponen senyawa asam-asam organik yang terbentuk dari proses degradasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, A.M., Naif, A., dan Salem. A. (2010), "Hexadecane Degradation by Bacterial Strains Isolated from Contaminated Soils", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9, No.44, hal. 7487-7494.
- Adams, O.G., Fufeyin.P.T., Ehinomen, Igelenyah. (2015), "Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review", *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, Vol. 3, No.1, hal. 28-39.
- Afifi, S. M. (2004), "Treatment of OBM Dril Cutting Soil by Elimination of Biodegradation Limiting Factors Using Bio-augmented Lanfarming", *The Annual International Conference on Contaminated Soils, Sediments, and Water*, Massachusetts.
- Agarry, S.E., Mujidat, O.A., Oluwafunmilayo, A. (2013), "Kinetic Modelling and Half-life Study on Enhanced Soil Bioremediation of Bonny Light Crude Oil Amended with Crop and Animal Derived Organic Waste", *Journal Environmental Biotechnology*, Vol.4, No.2, hal. 2-11.
- Agarry, S.E dan Ogunleye, O.O. (2012), "Box-Behnken Design Application to Study Enhanced Bioremediation of Soil Artificially Contaminated with Spent Engine Oil Using Biostimulation Strategy", *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, Vol.3 No.31, hal.1-14.
- Aldisi Z, Jaoua S, Al-Thani D, Al-Meer S, Zouari N. (2016), "Isolation, screening and activity of hydrocarbon-degrading bacteria from Harsh soils", *Proceedings of the World Congress on Civil, Structural, and Environmental Engineering (CSEE' 16)*, AWSPT 104.
- Alexander, M. (1994), "*Biodegradation and Bioremediation*: Academic Press, Inc.", United States of America.
- Ali, M. (2012), "*Tinjauan Proses Bioremediasi melalui Pengujian Tanah Tercemar Minyak*", UPN Press. Surabaya.
- Alkhatib, F., Alam, M.D, Muyibi, S., dan Fusain, I. (2011), "An Isolated Bacterial Consortium for Crude oil Biodegradation", *African Journal of Biotechnology*, Vol.10, No.81. hal.18763-18767.
- Al-Saleh, H. Drobiova, dan C. Obuekwe, (2009), "Predominant Culturable Crude Oil-degrading Bacteria in the Coast of Kuwait," *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 63, no. 4, hal. 400-406.
- Al-Wasify, Raed., Hamed, Shima R. (2014), "Bacterial Biodegradation of Crude Oil Using Local Isolates", *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Bacteriology*, Vol. 8, No.3, hal. 142-153.

- Aminah, Siti. (2010), “*Uji Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Mentah pada Bioreaktor dengan Variasi Formula Konsorsium*”, Skripsi. S.Si. Universitas Airlangga. Surabaya.
- APHA, AWWA, dan WEF. (2005), “*Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater 21th Edition*”, Washington D.C.: American Public Health Association.
- Arbabi, M., Sadeghi, M., dan Anyakora, C. (2009), “Phenanthrene Contaminated Soil Biotreatment Using Slurry Phase Bioreactor”, *American Journal of Environmental Sciences*, Vol. 5, No.3, hal. 223-229.
- Astuti, D, I. (2003), “*Pemanfaatan Kultur Campuran Isolat Mikroba Lokal Untuk Degradasi Minyak Bumi dan Produksi Biosurfaktan*”, Disertasi Doktor Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Atlas, R. dan Bartha, R. (1985), “*Microbial Ecology*”, The Benjamin Cummings Publishing, London.
- ASTM. (1979), Standard method of laboratory determination of moisture content of soil: Procedure D2216-71. pp. 290–291. In Annual book of ASTM standards. Am. Soc. Test. Mater., Philadelphia, PA.
- Baker, C dan Herson, D. (1994), “*Bioremediation*”, McGraw-Hill, Inc, USA.
- Barathi, S. dan Vasudevan, N. (2006), “Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil by Bioaugmentation of *Pseudomonas fluorescens* NS1”, *Journal of environmental Science and Health*, Vol. A38, No. 9, hal. 1857-1866
- Battelle dan Nfesc. (1996), “*Technical Memorandum TM-2189-ENV: Biopile Design and Construction Manual*”, Port Hueneme, California 93043-4301.
- Bento, F.M., Camargo, A.O.F., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T. (2004), “Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation”, *Bioresource Technology*, Vol.96, hal.1049-1055.
- Bergey, (2000), *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*, William and Wilkins Co Baltrimore, Maryland, United States.
- Calvo, C., Silva-Castro, GA., Manzanera, M., Perucha. C., and Laguna. J. (2013), “Biostimulation combined treatments for remediation of diesel contaminated soil. In: Popov V”, *Environmental toxicology III*, hal. 347-355.
- Cappuccino, J.G.,N. Sherman, (2013), “*Microbiology: a laboratory manual*”, Addison- Wesley Publishing Company. 466 halaman.

- Chaineau, C. H., G. Rougeux., C. Yepremian & J. Oudot, (2005), "Effects of Nutrient Concentration on the Biodegradation of Crude Oil and Associated Microbial Populations in the Soil", *Soil Biology & Biochemistry*, Vol.37, hal 1490-1497.
- Chang, L.K., Ibrahim, D., Omar, I.C. (2011), "A Laboratory Scale Bioremediation of Tapis Crude Oil Contaminated Soil by Bioaugmentation of *Acinetobacter baumannii* T30C", *African Journal of Microbiology Research*, Vol.5, No.18, hal.2609-2615.
- Chithra, S dan Hema, S.N. (2014), "Biodegradation of Crude Oil by Gravimetric Analysis", *International Journal of Advanced Technology in Engineering and Science*, Vol.02, No.11, hal.372-376.
- Connel, D dan Miller, G. (1995), "*Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*", Australia, A Wiley-Interscience Publication.
- Cookson, J.T. (1995), "*Bioremediation Engineering: Design and Application*", Mc. Graw Hill, Inc.
- Das, Kishore dan Ashis K. Mukherjee. (2006), "Crude Petroleum-oil Biodegradation Efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from a Petroleum-oil Contaminated Soil from North-East India", *Bioresource Technology*. Vol.98, No.7, hal.1339-1345.
- Das, Nilanjana dan Chandran, Preethy. (2011), "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview", *Biotechnology Research International*, Vol 11, hal. 1-13.
- Dadrasnia, A.R., dan Agamuthu, P., (2013), "Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic waste", *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10:769-778.
- Ebuehi, O.A.T., Abibo, I.B., Shekwolo, P.D., Sigismund, K.I., Adoki, A., dan Okoro, I.C. (2005), "Remediation of Crude Oil Contaminated Soil by Enhanced Natural Attenuation Technique", *J. Appl. Sci. Environ. Mgt*, Vol.9, hal.103-106.
- Eweis JB, Ergas SJ, Chang EDDPY, Schoroeder. (1998), "*Bioremediation Principles*", McGraw-Hill., New York.
- Facundo, J.M., Vanessa, H., dan M.A. Teresa L. (2001), "Biodegradation of Diesel Oil In Soil By A Microbial Consortium", *Journal Water, Air, and Soil Pollution*, Vol.128, hal. 313-320.
- Fahrudin. (2014), "*Bioteknologi Lingkungan*", Edisi Revisi, Penerbit Alfabeta., Bandung.

- Gan, S., Lau, E. V., Ng, H. K. (2009), "Remediation of Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 172, hal. 532-549.
- Ghazali, M.F., Zaliha, N.R., Abdul, R.N., Salleh. A.B, dan Basri M. (2004), "Biodegradation of Hdrocarbons in Soil by Microbial Consortium", *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol.54, hal. 61-67.
- Glazer, A.N. dan Nikaido H. (1994), "*Microbial Biotechnology: Fundamental of Applied Microbiology*", Freeman and Company, New York. p. 501-6-1.
- Gudiña, E. J., L. R. Rodrigues, J. A., Teixeira, J. F. dan Pereira, J.A. (2012), "Biosurfactant producing microorganisms and its application to Enhance Oil Recovery", *Society of Petroleum Engineers*, SPE 154598, hal. 3-4.
- Hafiluddin. (2011), "Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak dengan Teknik Bioaugmentasi dan Biostimulasi", *Embryo*, Vol. 8, No. 1, hal. 0216-0188.
- Hamzah, A., Nursyazana, S., Sarmasi, S. (2014), "Enhancing Biodegradation of Crude Oil in Soil Using Fertilizer and Empty Fruit Bunch of Oil Palm", *Sains Malaysiana*, Vol.43, No.9, hal.1327-1332.
- Hardiani, H., Kardiansyah, T, dan S. Sugesty. (2011), "Bioremediasi Logam Timbal (Pb) Dalam Tanah Terkontaminasi Limbah Sludge Industri Kertas Proses Deinking", *Jurnal Selulosa*, Vol. 1, No.1, hal. 31 – 41.
- Harley-Prescott. (2002), "*Laboratory Exercises in Microbiology*", The Mac-Graw Hill Companies, Fifth Edition.
- Higgins, I.J. and Burns, R.G. (1995), "*The chemistry and microbiology of pollution*", Academic Press.
- Hogg S. (2005), *Essential Microbiology*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Jabeen, S., Khan, M.A.S., Hassan, Q.M., Ahmed, M.S., Nishat, N dan Zain, H. (2015), "Comparative Study of Bioremediation of Crude Oilby Bacillus Subtilis and Organic Substances", *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*", Vol. 5, No. 3, hal. 2621-2633.
- Junaidi, Muyassir, dan Syafruddin. (2013), "Penggunaan Bakteri Pseudomonas fluorescens dan Pupuk Kandang dalam Bioremediasi Inceptisol Tercemar Hidrokarbon", *Jurnal Konservasi Sumber Daya Lahan*, Vol.1, No.1, hal.1-9.
- Karwati. (2009), "*Degradasi Hidrokarbon pada Tanah Tercemari Minyak Bumi dengan Isolat A10 dan D8*", Skripsi S.Si, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup (2003), *Tentang Tata Cara dan Persyaratan Teknis Pengolahan Limbah Minyak Bumi dan Tanah Terkontaminasi oleh Minyak Bumi Secara Biologis*, No.128.
- Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., Dhewa, T. (2011), "Review on Bioremediation of Polluted Environment: a Management Tool", *International Journal of Environmental Sciences*. Vol. 1 No.6, hal. 1079-1093.
- Kuran, P., Trogl, J., Novawoka, J., Pilarova, V. (2014), "Biodegradation of Spilled Diesel Fuel in Agricultural Soil: Effect of Humates, Zeolite, and Bioaugmentation", *The Scientific World Journal*, Vol. 2014.
- Kurniawan, A., Effendi, A.J. (2014), "Biodegradasi Residu Total Petroleum Hidrokarbon di bawah Konsentrasi 1% (W/W) Hasil Proses Bioremediasi", *Jurnal Manusia dan Lingkungan*, Vol. 21, No.3, hal. 286-294.
- Lazar, I., Petrisor, I.G., and Yen, T.F. (2007), "Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR)", *Petroleum Science and Technology*, Vol 25, hal. 1353-1366.
- Makadia, Tanvi H., Adetutu, Eric M., Simons, Keryn L., Jardine, Daniel., Sheppard, Petra J., Ball, Andrew S. (2011), "Re-used of Remediated Soils for Bioremediation of Waste Oil Sludge", *Journal of Environmental Management*, Vol. 92, hal. 866-871.
- Malik, Z.A., dan Ahmed, S. (2012), "Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacteria consortium," *Afr. J. Biotechnol*, Vol.1, hal.650-658.
- Mangkoedihardjo, S. (2005), "Seleksi Teknologi Pemulihan untuk Ekosistem Laut Tercemar Minyak", *Seminar Nasional Teori & Aplikasi Teknologi Kelautan ITS Surabaya*, hal.1-9.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001), "Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel Oil Contaminated Soil In An Alpine Glacier Skiing Area", *Appl. Environ. Microbiol*, Vol.67, hal. 3127-313.
- Mukred, A.M., Hamid, A., Hamzah, A., dan Yusoff, W.(2008), "Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum oil in Contaminated Water", *Journal of Biological Sciences*, Vol.8, No.4, hal.73-79
- Mulvey, P. (2002), "Treatment, Recovery and Disposal Technology: Bioremediation Techniques for Petroleum Facilities", *Environmental and Earth Sciences Pty Ltd.*, North Sydney.
- Munawar, Aditiawati, P., Astuti D.I. (2011), "Fungsi dan Komposisi Konsorsium Bakteri Pendegradasi Fraksi Resin dari Minyak Bumi", *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi IV*, Palembang. hal.573-583.

- Munawar, Aditiawati, P., Astuti D.I. (2012), "Sequential Isolation of Saturated, Aromatic, Resinic and Asphaltic Fractions Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soil in South Sumatera", *Makara Journal of Science*, Vol. 16, No.1, hal. 58-64.
- Munawar, Mukhtasor, Surtiningsih, T. (2007), "Bioremediasi Tumpahan Minyak Mentah dengan Metode Biostimulasi Nutrien Organik di Lingkungan Pantai Surabaya Timur", *Jurnal Berk. Penel. Hayati*, Vol. 13, hal. 91-96.
- Munawar dan Zaidan. (2013), "Bioremediasi limbah minyak bumi dengan teknik biopile di lapangan klamono papua", *Sains dan matematika*, Vol. 1, No.2, hal. 41-46.
- Nair CI, Jayachandran K, Shashidar S. (2008), "Biodegradation of phenol", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7, hal. 4951- 4958.
- Nakamura Syoko-Komukai, K.S., Inomata Yukie-Yamauchi, H.T., Venkateswaran, K. (1996), "Construction of Bacterial Consortia That Degrade Arabian Light Crude Oil", *Journal of Fermentatioan Bioenineering*, Vol.82, No.6, hal.570-574.
- Nashikin, R., dan Shovitri, M. (2013), "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin dari Perairan Pelabuhan Gresik.", *Jurnal Sains dan Seni POMITS*, Vol.2, No.2, hal.84-88.
- Nikhil, T., Deepa,V., Rohan, G., and Satish, B. (2013), "Isolation, Characterization and Identification of Diesel Engine Oil Degrading Bacteria from Garage Soil and Comparison of Their Bioremediation Potential", *International Research Journal of Environment Sciences*, Vol.2, No.2, hal.48-52.
- Ni'matuzahroh, Supriyanto, A., Affandi, M. dan Fatimah. (2009), "*Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Menggunakan Konsorsium Mikroba*", Laporan Hibah Penelitian Strategis Nasional Tahun Anggaran 2009. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Notodarmojo, Suprihanto. (2006), "*Pencemaran Tanah dan Air Tanah*", Institut Teknologi Bandung., Bandung.
- NRCS. (2004), "Soil Survey Laboratory Methods Manual", USDA-NRCS Soil Surv. Invest. Rep. no. 42, v. 4., U. S. Govt. Print. Office, Washington, D. C.
- Nugroho, A. (2006), "*Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi*", Graha Ilmu., Yogyakarta.
- Nwaogu, L.A., Onyeze, G.O.C dan Nwabueze, R.N. (2008), "Degradation of Diesel Oil in a Polluted Soil Using *Bacillus subtilis*", *African Journal of Biotechnology*, Vol.7, No.12, hal. 1939-1943.

- Omoni, V.T., Aguru, C.U., Edoh, E.O. (2015), "Biostimulation of Hydrocarbon Utilizing Bacteria in Soil contaminated with Spent Engine Oil Using Banana and Plantain Agro-wastes", *Journal of Soil Science and Environmental Management*, Vol.6, No.8, hal.225-233.
- Padmono, D. (2007), "Kemampuan Alkalinitas Kapasitas Penyanggaan (Buffer Capacity) dalam Sistem Anaerobik Fixed Bed. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, Vol. 8, No. 2: 119-127.
- Pemerintah Republik Indonesia. (2000), "*Peraturan Pemerintah No. 150 Tahun 2000 Tentang Pengendalian Kerusakan Tanah untuk Produksi Biomassa*".
- Pemerintah Republik Indonesia. (1999), "*Peraturan Pemerintah No 85 Tahun 1999 tentang Pengelolaan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun*".
- Pertamina UPPDN V. (2001), "*Standar Kandungan Minyak Solar*", Surabaya., Indonesia.
- Prabhakaran, P., Sureshabu, A., Rajakumar, S., Ayyasamy, P.M. (2014), "Bioremediation of Crude Oil in Synthetic Mineral Salts Medium Enriched With Aerobic Bacterial Consortium", *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, Vol.3, No.2, hal.9236-9242.
- Prathiba, J.G., Keerthi, K., Deshpande, A., Bhattacharya, S., dan Indira R. (2014), "Molecular Identification of the Isolated Diesel Degrading Bacteria and Optimization Studies", *J Biochem Tech*, Vol.5, No.3, hal.727-730.
- Prawono, P., dan Titah, H.S. (2016), "Isolation and Screening of Diesel-Degrading Bacteria from the Diesel Contaminated Seawater at Kenjeran Beach, Surabaya", *Environment Asia*, Vol.9, No.2, hal.165-169.
- Retno, T.D.L., dan Nana M. (2013), "Bioremediasi Lahan Tercemar Limbah Lumpur Minyak Menggunakan Campuran *Bulking Agent* yang Diperkaya Konsorsia Mikroba Berbasis Kompos Iradiasi", *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, Vol. 9, hal. 139-150.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., and Ron, E. Z.(1992), "Petroleum Bioremediation a Multiphase Problem", *Biodegradation*, Vol.3, hal.213 –226.
- Santhini, K., Myla J., Sajani S dan Usharani G. (2009), "Screening of *Micrococcus* sp. from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation", *Botany Research International*, Vol.2, No.4, hal.248-252.

- Sculz, A., Ambrozewicz, S., Sydow, M., Lawniczak, L., Cyplik, P.A., Marecik, R. (2014), "The Influence of Bioaugmentation and Biosurfactant Addition on Bioremediation Efficiency of Diesel-oil Contaminated Soil: Feasibility", *Journal of Environmental Management*", Vol. 132, hal. 121-128.
- Sheehan, D. (1997), "*Bioremediation Protocols*", Humana Press, New Jersey.
- Silvia-Castro, G.A., Rodelas, B., Perucha, C., Laguna, J. (2013), "Bioremediation of Diesel-Polluted Soil Using Biostimulation as Post-Treatment After Oxidation with Fenton-like Reagents: Assays in a Pilot Plant", *Science of the Total Environment*, Vol.445-446, hal.347-355.
- Sinaga, A. P. (2013), "*Perombakan Hidrokarbon dalam Tanah Terkontaminasi Minyak Berat, Minyak Ringan dan Oli Bekas oleh Bacillus sp*", Skripsi., Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sing, C & J. Lin. 2010. Bioaugmentation efficiency of diesel degradation by *Bacillus pumilus* JLB and *Acinetobacter calcoaceticus* LT1 in contaminated soils. *African Journal of Biotechnology* 9 (41): 6881--6888.
- Sopiah, N., Oktaviani, A., Suciati, F., dan Aviantara D.B. (2011), "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendeградasi Hidrokarbon yang Berasal dari Tanah Tercemar Minyak Bumi", *J. Tek. Ling*", Vol.12, No.3, hal.291-298.
- Sukumar, S dan Nirmala, P. (2016), "Screening of Diesel Oil Degrading Bacteria from Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil", *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, Vol.3 No.8, hal.18-22.
- Sumarsono, T. (2009), "*Efektivitas Jenis dan Konsentrasi Nutrien dalam Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Mentah yang Diaugmentasi dengan Konsorsium Bakteri*", Skripsi S.Si., Universitas Airlangga, Surabaya.
- Thapa, B., Kumar, A., Ghimire, A. (2012), "A Review on Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants in Soil", *Kathmandu University Journal of Science Engineering and Technology*, Vol. 8, No.1, hal. 164-170.
- US EPA (2016), "*How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewers*", United States Environment Protection Agency, Washington DC.
- US EPA. (1999), "*Method 1664, Revision A : N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated N-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry*", United States Environment Protection Agency, Washington DC.

- Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, Jean., dan Coosemans, Jozef. (2003), "Bioremediation of Diesel oil-contaminated Soil by Composting with Biowaste", *Environmental Pollution*, Vol.125, hal.361-368.
- Venosa, A.D., Haines, J.R., Nisamanepong, W., Govind, R., Pradhan, S., dan Siddique, B. (2002), "Efficiency of Commercial Products in Enhancing Oil Biodegradation in Closed Laboratory Reactors", *Journal of Industrial Microbiology*, Vol.10, hal.13-23.
- Vidali, M. (2001), "Bioremediation : An Overview", *Journal of Applied Chemistry*. Vol.73, No.7, hal.1163-1172.
- Vinothini, O., Sudhakar, S., dan Ravikumar, R. (2015), "Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*", *Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci*, Vol.4, No.1, hal.318-329.
- Widodo. (2010), "*Uji efektivitas Biosurfaktan dari Acinetobacter sp. p2(1) dan Pseudomonas putida T1(8) dalam Memobilisasi Minyak Mentah Menggunakan Sand Pack Column*", Skripsi S.Si. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Zam, S.I. (2010), "Optimasi Konsentrasi Inokulum, Rasio C:N:P dan pH pada Proses Bioremediasi Limbah Pengilangan Minyak Bumi Menggunakan Kultur Campuran", *El-hayah*, Vol.1, No.2, hal.23-34.
- Zam, S and Mustafa, I. (2012), "Degradation of Petroleum Refinery Waste by A Consortium of Hydrocarbonoclastic Bacteria Cultured on Combinations Of Medium C:N:P Ratio", *J.Trop.Life.Science*", Vol. 2, No.1, hal.11-14.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

Tahapan Peremajaan Isolat Bakteri (Cappuccino dan Sherman, 1983)

Dilakukan peremajaan terlebih dahulu pada masing-masing jenis bakteri (*B. subtilis*, *P. putida* dan *P. fluorescens*) yang digunakan dalam penelitian ini, dengan tahapan sebagai berikut:

1. Bakteri induk, media NA agar miring dan semua peralatan inokulasi disiapkan sebelum dilakukan proses peremajaan.
2. Jarum ose yang akan digunakan dipanaskan hingga membara kemudian didinginkan dengan cara diangin-anginkan.
3. Penutup tabung dibuka kemudian dilewatkan pada api sebanyak 2 kali.
4. Diambil satu ose bakteri induk dengan cara menggores ose pada bakteri induk.
5. Setelah selesai, mulut tabung dilewatkan pada api 2 kali dan ditutup kembali dengan kapas lemak.
6. Penutup tabung NA agar miring dibuka, kemudian mulut tabung dilewatkan api sebanyak 2 kali.
7. Jarum ose yang sudah mengandung bakteri dioleskan secara zig-zag pada media NA agar miring dimulai dari dasar tabung.
8. Setelah selesai, mulut tabung dilewatkan pada api 2 kali dan ditutup kembali dengan kapas lemak.
9. Semua perlakuan 1-8 harus dilakukan pada kondisi aseptik agar tidak terjadi kontaminasi yaitu dekat dengan api (maksimum 20 cm dari api).
10. Jarum ose dipanaskan hingga membara untuk membunuh semua bakteri yang menempel.
11. Tabung NA agar miring yang telah diinokulasikan bakteri disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
12. Setelah 24 jam, bakteri siap digunakan untuk penelitian

LAMPIRAN 2

Tahapan Pembuatan Media Kultur Bakteri yang Masuk ke dalam Reaktor Uji

(Ghazali *et al.*, 2004)

Persiapan suspensi kultur bakteri untuk uji bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon minyak solar, dengan tahapan sebagai berikut:

1. Bakteri berumur 24 jam pada media agar miring NA diambil sebanyak 2 ose.



2. Bakteri dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer volume 250 mL yang berisi media NB sebanyak 100 mL.



3. Labu Erlenmeyer yang berisi bakteri dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm.



4. Setelah dishaker 24 jam, media NB berisi bakteri diambil sebanyak 100 mL dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi.
5. Dilakukan proses pemisahan pelet dengan supernatan selama 15 menit dengan *centrifuge* putaran sebanyak 4000 rpm.



6. Supernatan yang tidak mengandung bakteri dibuang dari tabung sentrifugasi.
7. Pelet bakteri yang ada didasar tabung sentrifugasi dicuci menggunakan air salin (0,85% NaCl steril) sebanyak 2 kali. Setelah itu pelet bakteri dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer berisi @150 mL air fisiologis, yang nantinya akan dimasukkan ke dalam reaktor uji.



8. Dilakukan perhitungan berat kering pelet yang terbentuk pada masing-masing bakteri untuk mengetahui berat per gram bakteri yang masuk ke dalam reaktor uji.
9. Pengukuran nilai OD dilakukan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai OD = 1,0 atau lebih maka bakteri siap ditambahkan pada reaktor uji.
10. Dilakukan perhitungan total jumlah koloni bakteri yang terdapat pada suspensi pelet (OD = 1,0) untuk mengetahui jumlah bakteri cfu/g pelet.

LAMPIRAN 3

ANALISA TOTAL PETROLEUM HIDROKARBON (TPH) DENGAN EKSTRAKSI SOXHLET (US EPA-821-R-98-002 Metode 1664 ,1999)

Bahan

1. Sampel tanah
2. Larutan n-heksan
3. Kertas saring, diameter 11 cm
4. *Diatomaceous-silica filter aid suspension*

Alat

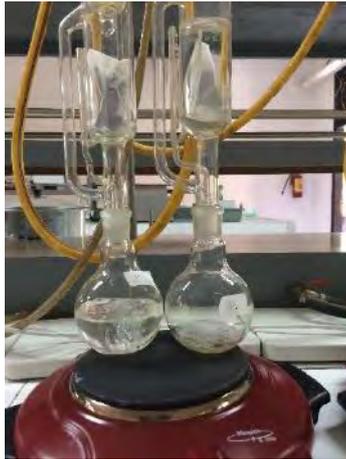
1. Neraca Analitik
2. Oven
3. Desikator
4. Peralatan ekstraksi soxhlet, dengan labu ekstraksi 125 ml
5. Buchner funnel
6. Tabung ekstraksi
7. Pemanas elektrik
8. Kertas saring
9. Gelas ukur
10. Vacuum pump

Prosedur Percobaan

1. Labu ekstraksi kosong diambil dari dalam oven kemudian dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit lalu ditimbang dengan neraca analitik
2. Berat awal sampel ditimbang sebesar 5 g dengan neraca analitik, kemudian dicatat hasil penimbangannya



3. Sampel dimasukkan ke dalam kertas saring yang sudah ditutup rapat.
 1. Kertas saring berisi sampel dimasukkan ke dalam extraction thimble. *Extraction thimble* berisi kertas saring dirangkai dengan labu ekstraksi kosong
 2. *Extraction thimble* kosong diisi dengan 200 mL pelarut ekstraksi (n-heksan) sampai pelarut turun ke dalam labu ekstraksi
 3. Peralatan ekstraksi *soxhlet* dirangkai



4. Minyak diekstraksi pada peralatan *soxhlet* pada rate 20 putaran/jam selama 4 jam. Waktu diukur dari putaran pertama. Ekstraksi dilakukan hingga pelarut dalam thimble bening
5. Ekstraksi dihentikan, dilanjutkan dengan distilasi pada water bath dengan suhu 85°C untuk memisahkan pelarut
6. Labu ekstraksi didinginkan dalam desikator hingga diperoleh berat konstan



7. Labu ekstraksi ditimbang menggunakan neraca analitik
Dihitung kandungan minyak (%) dengan rumus:

$$\text{Minyak \%} = \frac{(\text{Berat beaker+ekstrak}) - (\text{Berat beaker kosong})}{\text{Berat Sampel (gram)}} \times 100 \%$$

8. Sampel hasil pengeringan dilarutkan kembali dengan 50 mL pelarut n-heksan ke dalam beaker berisi minyak dan lemak lalu diaduk dan dicampur. Campuran minyak dan pelarut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL.



9. Ditimbang sebanyak 3 g silika gel menggunakan neraca analitik. Silika gel dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi campuran minyak dan pelarut. Penambahan silika gel untuk menghilangkan air.
10. Campuran minyak dan pelarut berisi silika di magnetic stirer selama 5 menit
11. Silika gel dibiarkan mengendap di bagian bawah erlenmeyer
12. Erlenmeyer kosong ditimbang menggunakan neraca analitik
13. Supernatan disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* kosong yang telah ditimbang.



Dihitung kandungan hidrokarbon (%) dengan rumus:

$$\% \text{ TPH} = \frac{\text{Berat Residu Hidrokarbon (gram)}}{\text{Berat Sampel (gram)}} \times 100 \%$$

14. TPH yang terukur dirubah menjadi konsentrasi dalam mg/kg.
15. Bobot yang terukur merupakan TPH, dari perolehan TPH pada hari ke-0 hingga hari ke-15 dapat dihitung persentase penyisihan hidrokarbon atau persentase degradasi dengan rumus:

$$\% \text{ Degradasi} = \frac{\text{TPH}_0 - \text{TPH}_n}{\text{TPH}_0}$$

TPH₀ = TPH minggu ke-0 (mg)

TPH_n = TPH minggu ke-n (mg)

LAMPIRAN 4
PERHITUNGAN TOTAL KOLONI MIKROBA DENGAN METODE
PLATE COUNT (Harley-Prescott, 2002)

Bahan

1. Media *Nutrient Agar* (NA)
2. Aquades
3. NaCl
4. Kertas Coklat
5. Kapas Lemak

Alat

1. Cawan Petri (*Petridish*)
2. Sendok Spatula
3. Pipet Ukur 10mL
4. Tabung Reaksi
5. Beaker Glass 100mL dan 500mL
6. Kompor Listrik
7. Autoclave

Prosedur Percobaan

1. Menimbang 4,25 g NaCl kemudian dilarutkan ke dalam 500 mL aquades (dipindahkan ke dalam tabung reaksi @9 mL kemudian disumbat dengan kapas lemak).



2. Menimbang media *Nutrient Agar* sebanyak 1,61 g kemudian ditambahkan 70 mL aquades dan memanaskan media NA di atas kompor listrik sambil diaduk sampai larutan mendidih.



3. Menuang larutan *Nutrient Agar* ke dalam tabung reaksi masing masing sebanyak @10 mL kemudian disumbat dengan kapas lemak dan dimasukkan ke dalam autoclave 121°C selama 1 jam.
4. Mengambil sampel tanah sebanyak 10 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 150mL aquades yang telah disterilkan kemudian *dishaker* selama 1 jam (100-150rpm).
5. Jika dilakukan pengenceran, ambil sampel sebanyak 1 mL dengan pipet ukur steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL larutan NaCl. Sampel tersebut menjadi pengenceran 10⁻¹. Kemudian ambil kembali 1 mL sampel dari tabung reaksi pertama dan masukkan ke dalam tabung reaksi kedua berisi 9 mL larutan NaCl. Sampel tersebut merupakan pengenceran 10⁻². Langkah yang sama dilakukan untuk pengenceran selanjutnya.



6. Ambil setiap sampel sebanyak 0,1 mL dengan pipet ukur steril kemudian ditaruh ke dalam cawan petri. Pengambilan sampel dilakukan secara aseptik.
7. Tambahkan media NA steril yang telah didinginkan setelah dipanaskan (suhu sekitar 47-50°C) ke dalam masing masing cawan petri kemudian digoyang-goyangkan supaya media menyebar dan merata. Penambahan media NA juga dilakukan secara aseptik.
8. Setelah 24 jam, diamati mikroba yang tumbuh pada media di cawan petri dan dihitung total koloni menggunakan *colony counter*.

Perhitungan dan Analisa Data

Perhitungan total koloni mikroba per mL sampel menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Total Koloni} = \frac{\text{Jumlah Koloni}}{\text{mL sampel}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

LAMPIRAN 5

PENGUKURAN BULK DENSITY DAN KADAR AIR (ASTM D 2216, 1979)

A. *Bulk Density* (Kerapatan Tanah)

Prosedur kerja dari pengamatan *bulk density* adalah :

1. Memasukkan pipa paralon yang berisi sampel tanah utuh ke dalam oven suhu 105°C selama 2x24 jam.
2. Mengeluarkan ring sampel dari dalam oven setelah dipanaskan selama 2x24 jam lalu menimbang ring sampel berisi tanah utuh menggunakan timbangan analitik kemudian mencatat hasil timbangan tersebut.



3. Mengeluarkan sampel tanah utuh dari ring sampel lalu mengukur tinggi dan jari-jari dari ring sampel.



4. Menghitung nilai bulk density dari sampel tanah utuh yang telah ditimbang dengan menggunakan rumus :

$$\text{Bulk density (g.cm}^{-3}\text{)} = \frac{\text{massa tanah kering oven (g)}}{\pi r^2 t}$$

Dimana :

$\Pi = 3,14$

r = jari-jari ring sampel (cm)

t = tinggi ring sampel (cm)

Perlakuan	Massa tanah (g)	Volume tanah (g)	Bulk density (g/cm ³)	Rata-rata (g/cm ³)
Sampel 1	80,451	68,4421875	1,175	1,2
Sampel 2	77,536	63,25382813	1,225	

B. Kadar Air

Pengukuran kadar air berdasarkan metode gravimetri yakni selisih berat cawan awal dan akhir (setelah dimasukkan ke dalam oven 105°C) dengan rumus empiris yakni:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a-b}{a}$$

Keterangan:

a = massa sampel awal

b = massa sampel setelah dikeringkan

LAMPIRAN 6

PERHITUNGAN PUPUK NPK YANG DIBUTUHKAN (BATTELLE & NFESC, 1996)

Menghitung banyaknya nutrien anorganik yang diperlukan untuk tiap-tiap perlakuan. Perbandingan C:N:P media tanah yang diinginkan yaitu 100:10:1 dan 100:10:1, maka banyaknya nutrisi yang ditambahkan dihitung dengan cara berikut:

1. Sumber nutrien
 - a. Sumber N berasal dari pupuk urea ($\text{Co}(\text{NH}_2)_2$) dengan berat fraksi 0.46.
 - b. Sumber P berasal dari pupuk super phosphate 36 ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) dengan berat fraksi 0.26.
2. Konsentrasi minyak mentah yang ditambahkan sebanyak 10 %, artinya dalam 1000 g terdapat 100 g minyak solar ($0,1 \times 1000 \text{ g} = 100 \text{ g}$).
3. Kadar minyak solar di dalam tanah digunakan sebagai kadar C dalam tanah yaitu 100 gr/kg
4. Banyaknya nutrien yang ditambahkan agar perbandingan C:N sebesar 100:10:1 dan 100:5:1 dihitung dengan
 - a. N yang ditambahkan / kg media tanah = $(100 \text{ g / kg}) \times (10/100) = 10 \text{ g / kg}$.
 - b. N yang ditambahkan / kg media tanah = $(100 \text{ g / kg}) \times (5/100) = 5 \text{ g / kg}$.
 - c. P yang ditambahkan / kg media tanah = $(100 \text{ g / kg}) \times (1/100) = 0,1 \text{ g / kg}$.
5. Jumlah nutrien yang dibutuhkan dalam setiap kilogram tanah: Berat tanah x bulk density (g/cm^3) = $1000 \text{ (g)} \times 1,2 \text{ (g/cm}^3) = 1200 \text{ g}$
 - a. Sumber N yang dibutuhkan = $1200 \text{ g} \times 10 \text{ g/kg} \times 1 \text{ kg/1000 g} = 12 \text{ g}$.
Gram N yang dibutuhkan / berat fraksi = $12 \text{ g} / 0,46 = \text{g}$.
 - b. Sumber N yang dibutuhkan = $1200 \text{ g} \times 5 \text{ g/kg} \times 1 \text{ kg/1000 g} = 6 \text{ g}$.
Gram N yang dibutuhkan / berat fraksi = $6 \text{ g} / 0,46 = 13,04 \text{ g}$.
 - c. Sumber P yang dibutuhkan = $1200 \text{ g} \times 0,1 \text{ g/kg} \times 1 \text{ kg/1000 g} = 0,12 \text{ gr}$.
Gram P yang dibutuhkan / berat fraksi = $0,12 \text{ gr} / 0,26 = 0,46 \text{ g}$.
6. Sehingga banyaknya nutrien yang ditambahkan:
 - a. Rasio 100:10:1 yang ditambahkan = N yang ditambahkan: % N dalam pupuk urea = 26,08 g/kg-media tanah.
 - b. Rasio 100:10:1 yang ditambahkan = P yang ditambahkan: % P dalam pupuk urea = 0,46 g/kg-media tanah.
 - c. Rasio 100:5:1 yang ditambahkan = N yang ditambahkan: % N dalam pupuk urea = 13,04 g/kg-media tanah.
 - d. Rasio 100:5:1 yang ditambahkan = P yang ditambahkan: % P dalam pupuk urea = 0,46 g/kg-media tanah.

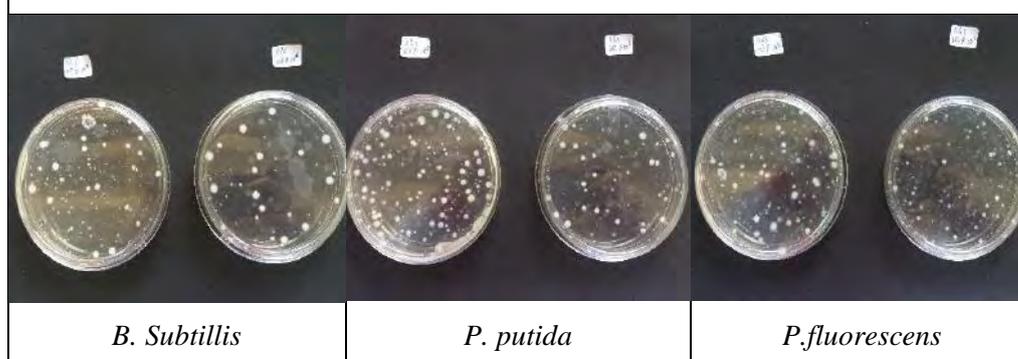
LAMPIRAN 7

Hasil Perhitungan Karakteristik Jenis Bakteri yang Masuk ke dalam Reaktor

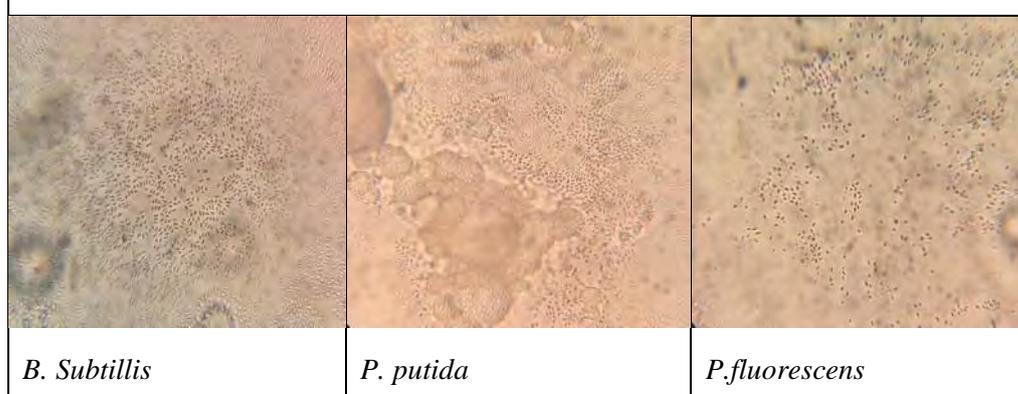
Karakteristik Tiap Jenis Bakteri yang Masuk ke dalam Reaktor Uji

Kode Erlenmeyer @ 150 mL	Bakteri	Berat Kering (g/mL)	OD ($\lambda=600$ nm)	Jumlah Koloni (Log CFU)
B1	<i>B. subtilis</i>	0,8438	1,028	9,744
B2	<i>B. subtilis</i>	1,148	1,002	9,684
B3	<i>B. subtilis</i>	1,247	1,021	9,678
P1	<i>P. putida</i>	1,378	1,023	9,745
P2	<i>P. putida</i>	1,256	1,022	9,856
P3	<i>P. putida</i>	1,236	1,008	9,773
F1	<i>P. fluorescens</i>	1,283	1,015	9,261
F2	<i>P. fluorescens</i>	1,228	1,018	9,348
F3	<i>P. fluorescens</i>	1,342	1,009	9,285

Hasil TPC Konsentrasi Solar 10%



Hasil Pengamatan Mikroskopis Penambahan Solar 10%



LAMPIRAN 8
Hasil Analisis Uji Pendahuluan dalam Menentukan Konsentrasi Senyawa
Pencemar (Minyak Solar)

A. Hasil Pengukuran *Optical Density* pada Konsentrasi Inokulum 5%

Konsentrasi solar (%)	Inokulum 5%			
	Nilai OD			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	Tanpa bakteri
0	0,252	0,247	0,263	0,011
6	0,437	0,355	0,643	0,111
8	0,331	0,569	0,672	0,124
10	0,83	0,915	0,776	0,137
15	0,305	0,402	0,335	0,175

B. Hasil Pengukuran *Optical Density* pada Konsentrasi Inokulum 10%

Konsentrasi solar (%)	Inokulum 10%			
	Nilai OD			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	Tanpa bakteri
0	0,234	0,232	0,216	0,011
6	0,388	0,513	0,401	0,111
8	0,297	0,317	0,525	0,124
10	0,459	0,6	0,557	0,137
15	0,52	0,345	0,399	0,175

C. Hasil Pengukuran TPC pada Konsentrasi Inokulum 5%

Konsentrasi solar (%)	Inokulum 5%		
	Jumlah Koloni (log cfu/mL)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>
0	7,22	7,19	6,87
6	7,37	7,71	7,39
8	8,14	7,97	7,80
10	8,26	8,25	8,11
15	7,38	7,46	7,34

D. Hasil Pengukuran TPC pada Konsentrasi Inokulum 10%

Konsentrasi solar (%)	Inokulum 10%		
	Jumlah Koloni (log cfu/mL)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>
0	7,27	6,92	7,00
6	7,66	6,88	7,59
8	7,67	8,23	7,93
10	8,09	8,32	8,19
15	7,91	7,59	7,47

LAMPIRAN 9

Hasil Analisa Parameter

A. Hasil Analisis Parameter Suhu

Kode Reaktor	Suhu															
	H-0	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15
Suhu Ruang	27	27	27	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
N0B0	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	29	29	29	29	29	29
N1B0	30	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31	31	31	30	30	30
N2B0	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31	31	30	30	30	30	30
N1S5	30	30	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31	31	31	30	30
N1S10	31	31	30	31	31	30	30	30	30	30	30	31	31	31	30	30
N2S5	30	30	30	31	31	30	30	30	30	30	30	31	31	31	30	30
N2S10	31	30	30	31	31	30	30	30	30	31	31	31	31	31	31	31
N0S5	31	31	30	30	31	30	30	30	31	31	31	31	31	31	31	31
N0S10	30	31	30	30	30	30	30	30	31	32	31	31	31	31	31	31
N1P5	31	30	30	31	31	30	31	31	32	31	31	31	31	31	32	32
N1P10	30	31	30	31	31	32	31	31	32	31	30	32	32	31	32	32
N2P5	31	31	30	31	31	31	31	31	32	31	31	32	32	30	32	32
N2P10	31	31	31	31	31	32	31	31	32	31	31	32	32	31	32	32
N0P5	31	31	31	31	31	31	32	31	32	31	31	32	32	31	32	32
N0P10	31	31	31	31	31	32	31	31	32	31	31	32	32	31	32	32
N1F5	31	31	30	30	30	31	31	31	31	31	32	32	32	31	30	30
N1F10	31	31	30	30	30	31	31	31	30	30	31	31	31	31	30	30
N2F5	30	31	31	31	31	31	31	31	30	30	31	31	31	31	30	30
N2F10	30	30	30	31	31	31	31	31	30	30	31	32	32	31	31	31
N0F5	31	31	30	30	30	31	31	31	31	31	32	32	32	31	31	31
N0F10	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31	32	32	32	31	31	31

B. Hasil Analisis Parameter pH

Kode Reaktor	pH															
	H-0	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15
N0B0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
N1B0	6,9	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
N2B0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
N1S5	6,8	6	6,6	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N1S10	6,8	6,5	5,8	6,2	6,4	6,4	6,4	6,6	6,6	6,8	7	7	7	7	7	7
N2S5	7	6,8	5,8	6,6	6,6	6,8	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N2S10	6,6	6,4	6,2	5,6	6,4	6,4	6,6	6,6	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N0S5	7	6,2	6,4	6,8	6,8	7	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N0S10	6,8	6,4	5,6	6,4	6,4	6,4	6,6	6,6	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N1P5	7	6	6,8	6,8	6,8	6,9	6,8	6,8	6,9	7	7	7	7	7	7	7
N1P10	6,4	6	5,6	6,6	6,2	6,4	6,4	6,4	6,6	6,8	7	7	7	7	7	7
N2P5	6,9	6,6	6,8	6,8	6,8	7	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N2P10	6,8	6,2	5,6	6,4	6,2	6,6	6,4	6,4	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N0P5	6,4	6,2	6,8	6,8	6,8	7	6,8	6,8	6,9	7	7	7	7	7	7	7
N0P10	6,6	6,3	5,6	6,6	6,6	6,8	6,8	6,8	6,9	7	7	7	7	7	7	7
N1F5	6,8	5,8	6,8	6,8	6,4	6,2	6,6	6,6	6,6	6,4	6,8	6,9	6,8	6,8	7	7
N1F10	6,8	5,6	5,8	6,2	6,2	6,2	6,4	6,4	6,2	6,8	6,8	7	6,8	6,8	7	7
N2F5	7	5,6	5,8	6,4	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N2F10	6,4	6,4	5,6	6,6	6,6	6,8	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7
N0F5	6,8	5,8	6,6	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7	7
N0F10	6,4	6,4	5,6	6,6	6,6	6,6	6,8	6,8	6,8	7	7	7	7	7	7	7

C. Total Koloni Bakteri pada Konsentrasi Inokulum 5%

Perlakuan	Jumlah Koloni Bakteri (Log CFU/g-tanah)			
	H0	H5	H10	H15
N0B0	0,00	0,00	0,00	0,00
N1B0	6,70	9,41	7,85	7,65
N2B0	6,70	9,52	8,22	8,27
N1S5	9,24	9,99	7,00	9,13
N2S5	9,21	9,75	10,04	9,98
N0S5	8,83	9,75	9,97	9,05
N1P5	9,18	9,39	10,15	10,08
N2P5	10,07	9,52	9,97	9,80
N0P5	9,96	10,17	9,98	9,98
N1F5	10,12	10,20	10,05	9,79
N2F5	9,98	10,11	9,84	10,04
N0F5	9,83	10,06	9,75	9,68

D. Total Koloni Bakteri pada Konsentrasi Inokulum 10%

Perlakuan	Jumlah Koloni Bakteri (Log CFU/g-tanah)			
	H0	H5	H10	H15
N0B0	0,00	0,00	0,00	0,00
N1B0	6,70	9,41	7,85	7,65
N2B0	6,70	9,52	8,22	8,27
N1S10	9,03	10,05	7,90	9,31
N2S10	9,35	9,87	9,74	9,87
N0S10	9,53	9,52	9,93	9,89
N1P10	9,31	9,85	9,58	9,66
N2P10	10,10	9,14	10,17	10,12
N0P10	9,69	10,22	9,92	10,00
N1F10	10,08	10,10	10,07	10,16
N2F10	10,16	10,07	9,84	9,99
N0F10	9,97	9,79	9,78	9,78

Hasil TPC Pengenceran 10^7 dan 10^8 pada Hari Ke-0					
<i>B.subtillis-P.putida</i>		<i>B.subtillis- P.fluorescens</i>		<i>P.fluorescens -P.putida</i>	
					
Hasil TPC Pengenceran 10^7 dan 10^8 pada Hari Ke-5					
					
Hasil TPC Pengenceran 10^7 dan 10^8 pada Hari Ke-10					
					
Hasil TPC Pengenceran 10^7 dan 10^8 pada Hari Ke-15					
					

E. Tabel Penurunan Nilai Total Petroleum Hydrocarbon

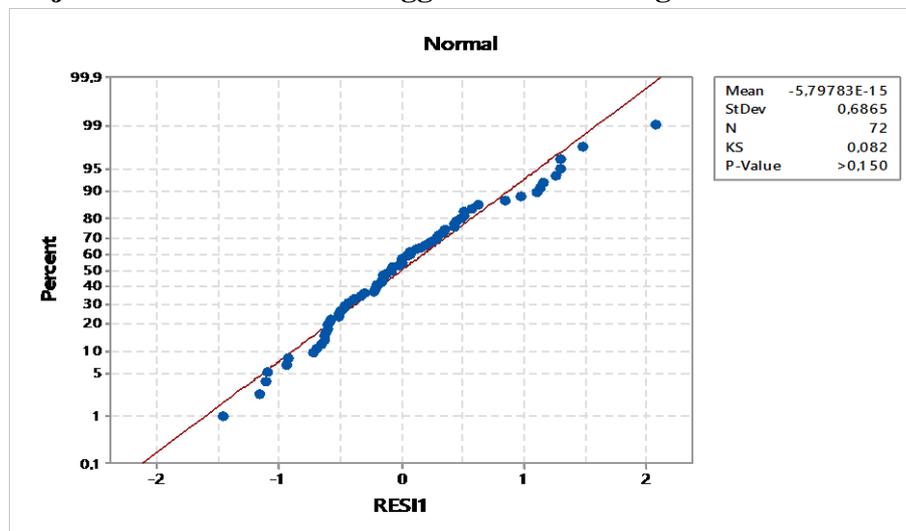
Variasi Perlakua n	H0		H5		H10		H15	
	TPH (%)	TPH (mg/kg)						
N0B0	14,05	140.528	12,62	126.228	12,38	123.808	12,72	127.170
N1B0	15,95	159.469	12,71	127.065	9,35	93.482	7,95	79.455
N2B0	13,92	139.167	10,45	104.506	8,13	81.305	7,91	79.074
N1S5	15,68	156.794	7,79	78.397	7,63	76.252	8,22	82.230
N1S10	16,11	161.139	9,45	93.508	7,97	79.656	7,28	72.835
N2S5	15,13	151.304	6,48	64.647	7,68	76.811	7,58	75.759
N2S10	14,02	140.249	8,00	80.899	7,65	76.513	5,32	53.249
N0S5	16,35	163.502	7,75	77.494	7,87	78.670	7,55	75.467
N0S10	14,75	147.533	7,84	78.101	7,53	75.304	6,92	69.186
N1P5	15,66	156.612	6,88	69.251	8,23	82.290	6,78	67.829
N1P10	16,32	163.238	7,46	74.556	9,20	92.046	6,89	68.896
N2P5	15,94	159.351	6,68	66.809	7,61	76.129	6,40	63.995
N2P10	15,59	155.926	7,44	74.450	7,59	75.948	6,83	68.295
N0P5	16,81	168.136	6,14	61.449	7,45	74.498	6,71	67.118
N0P10	15,90	159.001	7,84	78.446	7,92	79.191	6,55	65.522
N1F5	14,37	143.684	7,11	71.138	8,52	85.186	5,49	54.853
N1F10	15,53	155.290	6,66	66.636	8,45	84.537	5,71	57.108
N2F5	17,81	178.103	7,69	76.858	7,68	76.835	6,41	64.134
N2F10	15,29	152.874	7,13	71.261	6,49	64.941	5,50	54.969
N0F5	17,52	175.249	5,87	58.730	5,96	59.599	6,73	67.318
N0F10	15,44	154.428	7,47	74.721	8,12	81.177	5,81	58.131

F. Hasil Analisis ANOVA *General Linier Model* Terhadap Penurunan Nilai Total Petroleum Hidrokarbon dengan Software Minitab 16

Analysis of Variance for TPH, using Adjusted SS for Tests						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasi	1	0,065	0,065	0,065	0,10	0,754
Nutrien	2	1,860	1,860	0,930	1,42	0,252
Bakteri	2	2,279	2,279	1,139	1,74	0,186
Konsentrasi*Nutrien	2	2,481	2,481	1,240	1,89	0,161
Konsentrasi*Bakteri	2	1,554	1,554	0,777	1,18	0,314
Nutrien*Bakteri	4	3,434	3,434	0,859	1,31	0,279
Konsentrasi*Nutrien*Bakteri	4	1,825	1,825	0,456	0,70	0,599
Hari	3	1003,803	1003,803	334,601	510,04	0,000
Error	51	33,458	33,458	0,656		
Total	71	1050,757				

S = 0,809957 R-Sq = 96,82% R-Sq(adj) = 95,57%

G. Uji Distribusi Normal Menggunakan Kolmogrov-Smirnov



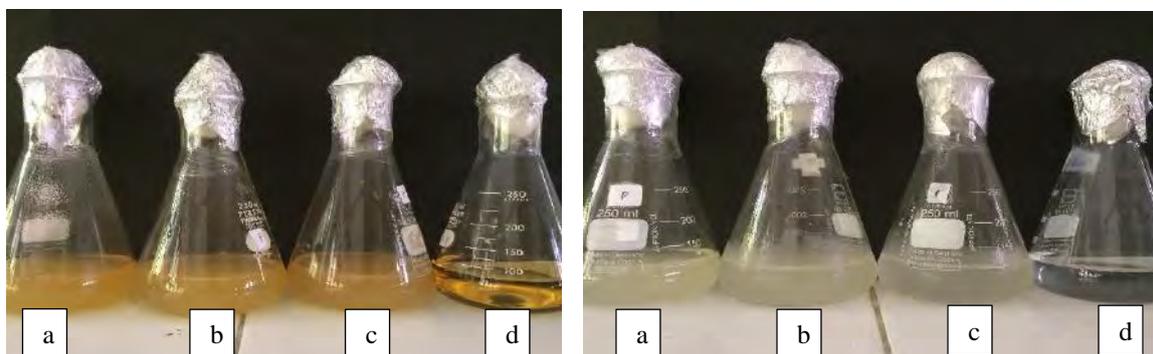
H. Uji Korelasi Antar Variabel Independen (Jenis Kultur Campuran Bakteri, Konsentrasi Inokulum, Rasio Nutrien)

Variabel	VIF	Kesimpulan
Nutrien	1,33	Tidak terdapat multikolinieritas
Bakteri	1,33	Tidak terdapat multikolinieritas
Konsentrasi	1,00	Tidak terdapat multikolinieritas
Hari	1,5	Tidak terdapat multikolinieritas
Nutrien*Bakteri	1,78	Tidak terdapat multikolinieritas
Nutrien*Konsentrasi	1,33	Tidak terdapat multikolinieritas
Bakteri*Konsentrasi	1,33	Tidak terdapat multikolinieritas
Nutrien*Bakteri*Konsentrasi	1,78	Tidak terdapat multikolinieritas

LAMPIRAN 10
DOKUMENTASI PENELITIAN



Kultur Campuran Bakteri



Keterangan Gambar:

- a. *B. subtilis*
- b. *P. putida*
- c. *P. fluorescens*
- d. Kontrol NaCl 0,85%

BIOGRAFI PENULIS

RIMA NURMALASARI, lahir di Palembang, 11 November 1991. Penulis



merupakan anak pertama dari 3 bersaudara. Anak dari pasangan Ibu Maharani dan Bapak Hariadi Eko Purnomo, S.H. ini menempuh pendidikan formal di TK. Aisyah Bustanul Atfal, Semarang tahun 1996. Kemudian, Penulis melanjutkan pendidikan di SDN Dr. Soetomo VI/328 Kota Surabaya (1998-2004), SMPN 21 Kota Surabaya (2004-2007), dan SMAN 22 Kota Surabaya (2007-2010). Selepas lulus pada tahun 2010, penulis memasuki jenjang S-1 di Jurusan

Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya melalui jalur PMDK Umum Tahun 2010 dan lulus tahun 2014 dengan skripsi yang berjudul, *”Efektivitas Formulasi Kombinasi Biosurfaktan dengan Enzim Lipase dalam Mobilisasi Crude Oil Menggunakan Metode Sand Pack Column”*. Setelah itu, melanjutkan studi S-2 di Jurusan Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil, Lingkungan dan Kebumihan Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Selama masa perkuliahan, penulis memiliki kegiatan memberikan les privat kepada murid SMP dan SMA untuk mata pelajaran IPA. Motto penulis adalah **“Jika kita berfikir positif, kita akan bertindak positif, maka berfikirlah selalu secara positif ”**. Penulis memiliki hobi memasak dan berolahraga. Penulis dapat dihubungi di email nurmalasari.rima@gmail.com, facebook: Rima Nurmalasari, nomor: 081233133386, alamat: Hayam Wuruk Selatan No.51, Kecamatan Wonokromo, Kelurahan Sawunggaling, Surabaya, Provinsi Jawa Timur, 60242.