



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN ANALISIS KEMAMPUAN  
DEGRADASI HIDROKARBON BAKTERI TANAH SAMPEL B,  
CILEGON, BANTEN**

**SKRIPSI**

**DACHNIAR HAJAR  
0706263731**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JANUARI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN ANALISIS KEMAMPUAN  
DEGRADASI HIDROKARBON BAKTERI TANAH SAMPEL B,  
CILEGON, BANTEN**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**DACHNIAR HAJAR  
0706263731**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JANUARI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Dachniar Hajar**  
**NPM : 0706263731**  
**Tanda tangan : .....**  
**Tanggal : 06 Januari 2012**



## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Dachniar Hajar  
NPM : 0706263731  
Program Studi : S1 Biologi  
Judul Skripsi : Isolasi, Identifikasi, dan Analisis Kemampuan  
Degradasi Hidrokarbon Bakteri Tanah Sampel B,  
Cilegon, Banten

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Sitaresmi, M.Sc. (.....)  
Pembimbing II : Dr. rer. Nat. Yasman, M.Sc. (.....)  
Penguji I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. (.....)  
Penguji II : Drs. Iman Santoso, M.Phil. (.....)

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 06 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala anugrah, rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir penulisan skripsi. Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra. Sitaresmi, M.Sc selaku pembimbing I dan Bapak Dr. rer. nat Yasman, M.Sc selaku pembimbing II atas bimbingan, motivasi, perhatian, dan kesabaran, serta sumbangan pikiran selama penelitian hingga tersusunnya skripsi.
2. Ibu Dra. Sitaresmi, M.Sc yang telah membiayai penelitian ini.
3. Ibu Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Bapak Drs. Iman Santoso, M.Phil. selaku penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Bapak Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi sekaligus Penasihat Akademik dan Ibu Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI atas perhatian dan dukungannya.
5. Bapak Reza Mulyawan yang telah membantu dalam analisis kromatografi gas, Ibu Ariyanti Oetari, Ph.D. dan Bapak Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. yang telah memberikan saran-saran dan bimbingan kepada penulis.
6. Seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang penulis terima dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas bantuan dalam melaksanakan teknis penelitian.
7. Kedua orang tua penulis, Bapak (Alm.) Abdur Rachman dan Ibu Rosidah atas do'a, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, serta dukungan moril dan materil yang selalu diberikan hingga skripsi ini dapat diselesaikan.
8. Saudariku tersayang, Fadilla Ajani atas do'a, dukungan, semangat, dan kebersamaan yang selalu menjadi motivasi bagi penulis.
9. Fahreza Saputra dan Diana Novia selaku teman seperjuangan penelitian atas kesabaran, pengertian, dan dukungan dalam suka maupun duka selama masa penelitian dan penulisan skripsi.
10. Estriningtyas Agus R., Bama Herdiana, Doni Alvian, Bapak Ahmad

Supriyadi, S.IP., dan Mbak Asri Martini, S.Si. yang senantiasa memberikan bantuan, pengertian, kesabaran, dan semangat selama penelitian dan penulisan skripsi.

11. Teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, Bregas A. L, Virgine E., Doni A. R., Galuh P., Kirana L., P. Imora, Kenardo, Rendy J., Eka Desi L., Adisty P., Kak Dafina, Kak Novia, Mbak Dalia, Mbak Reno, Kak Irvan, Fathia Nova, A. Rizky, Sentot, M. Rusli, Usman Arif, Edvan, Alvin, Michelle, Desi, Nur El F., Savit, Seyla, Hanum P., Chir, Rere, Odyt, Okta, dan Grand yang telah banyak membantu dan memberi masukan dalam menyelesaikan penelitian.
12. Sahabat-sahabat penulis, Mulki, Mega, Nafisah, Izza, Anin, Fitria, dan Teh Reni atas persahabatan indah, doa, serta dukungan yang telah diberikan.
13. Teman-teman Biologi khususnya A. Bayu, Febrial H., Fika R., M. T. Soekarno, Nabilah, Nabila Ch., N. Merry, Putri Sandy, R. Priambodo, Tiara, dan BLOSSOM '07 (*Biological Science Community '07*) yang tidak dapat ditulis satu per satu atas pertemanan yang tak akan terlupakan.
14. Teman-teman di KSHL COMATA, baik senior, seangkatan, maupun junior, atas petualangan yang menyenangkan.
15. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.

Akhir kata, penulis berharap agar skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2012

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dachniar Hajar  
NPM : 0706263731  
Program Studi : S1  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

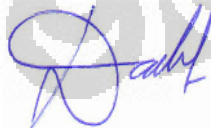
Isolasi, Identifikasi, dan Analisis Kemampuan Degradasi Hidrokarbon Bakteri Tanah Sampel B, Cilegon, Banten

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 06 Januari 2012

Yang menyatakan



(Dachniar Hajar)

## ABSTRAK

Nama : Dachniar Hajar  
Program Studi : Biologi  
Judul : Isolasi, Identifikasi, dan Analisis Kemampuan Degradasi Hidrokarbon Bakteri Tanah Sampel B, Cilegon, Banten

Bakteri yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon dapat diperoleh dari tanah yang tercemar hidrokarbon. Penelitian bertujuan mendapatkan isolat bakteri dari sampel tanah tercemar hidrokarbon dan mengetahui kemampuan isolat bakteri tersebut dalam mendegradasi hidrokarbon. Isolasi dilakukan menggunakan medium Ilyina *dkk.* (2003). Identifikasi dilakukan dengan mengamati sifat morfologi dan aktivitas biokimia, sedangkan analisis hasil degradasi hidrokarbon dilakukan dengan GC/MS. Sebanyak 3 dari 9 isolat yang diperoleh dipilih untuk melihat kemampuan degradasi hidrokarbon, yaitu DT2 (*Pseudomonas*), DT5 (*Citrobacter*) dan DT8 (*Enterobacter*). Isolat DT2 dipilih untuk analisis hidrokarbon karena memiliki pertumbuhan paling baik dalam medium BSM + 1% hidrokarbon. Hasil pengukuran berat ekstrak minyak solar setelah penambahan Isolat DT2 menunjukkan penurunan sebesar 32,5%. Hasil analisis sisa senyawa hidrokarbon memperlihatkan penurunan luas area yang mengindikasikan penurunan konsentrasi senyawa yang diduga merupakan *hexadecanoic acid*, *methyl ester* dan *n-heneicosane* masing-masing sebesar 97,66% dan 96,79%.

Kata kunci:  
analisis GC/MS, bakteri tanah, degradasi hidrokarbon, *Pseudomonas*.



## ABSTRACT

Name : Dachniar Hajar  
StudyProgram : Biology  
Title : Isolation, Identification, and Analysis of Hydrocarbon Degradation Capability of Soil Bacteria from Soil Sample B, Cilegon, Banten

Hydrocarbon degrading potential bacteria can be isolated from hydrocarbon contaminated soil. This research aims to obtain bacterial isolates from hydrocarbon contaminated soil and study the hydrocarbon degradation capabilities of selected isolates. Isolation was carried out using Ilyina *et al.* (2003) medium. Bacterial identification was performed based on morphological and biochemical characterizations, while GC/MS was used for analysis of hydrocarbon degradation capabilities. Nine isolates were obtained and three of them were selected to examine hydrocarbon degradation capability, namely DT2 (*Pseudomonas*), DT5 (*Citrobacter*) and DT8 (*Enterobacter*). The DT2 isolate was selected for analysis of hydrocarbon degradation because it has the highest growth in BSM medium + 1% hydrocarbon. The results from weight measurements of diesel oil extract after the addition of DT2 isolates showed a decrease of 32.5%. The results of hydrocarbon degradation analysis showed decrease in the area that indicate a decrease in concentration of compounds suspected to be *hexadecanoic acid*, *methyl ester* and *n-heneicosane* respectively 97.66% and 96.79%.

Key words:  
GC/MS analysis, hydrocarbon degradation, *Pseudomonas*, soil bacteria.

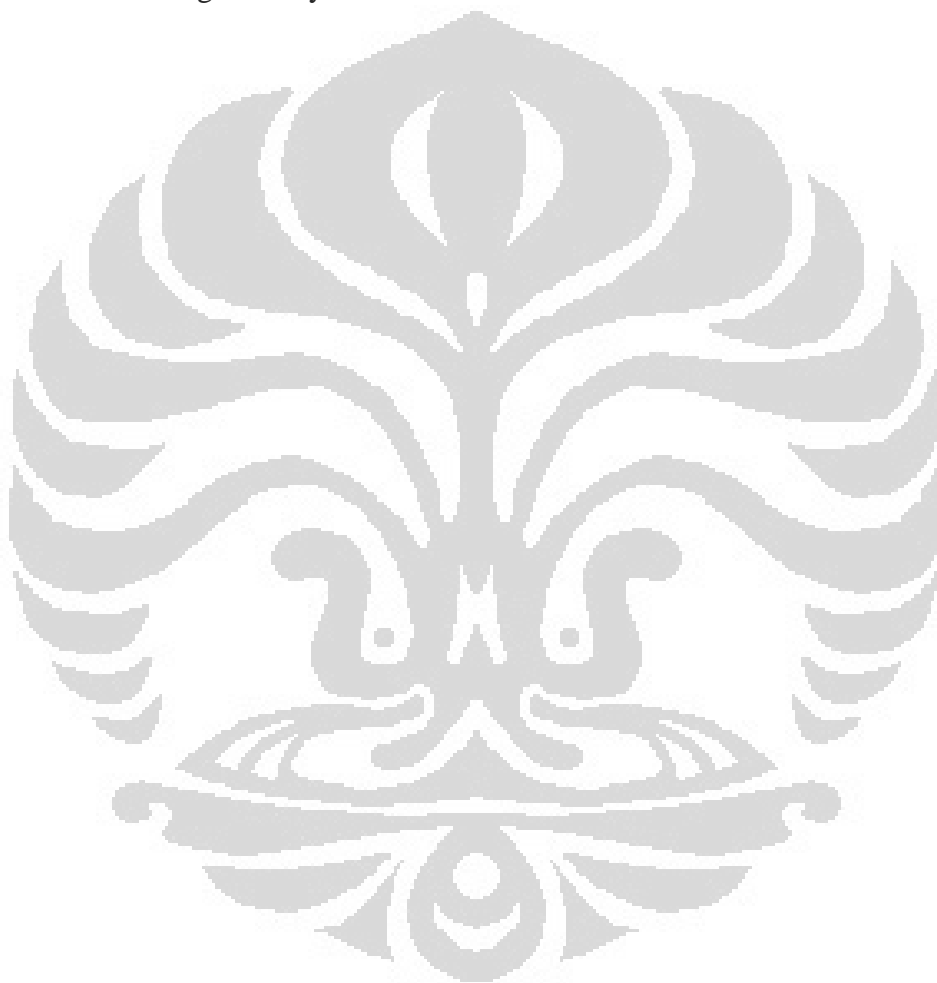
## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon.....	4
2.2 Senyawa Hidrokarbon .....	4
2.2.1 Degradasi Senyawa Hidrokarbon oleh Bakteri .....	5
2.2.2 Bioremediasi.....	8
2.3 Isolasi mikroorganisme.....	9
2.4 Identifikasi Bakteri .....	10
2.4.1 Karakterisasi Morfologi.....	10
2.4.1.1 Pengecatan Gram.....	11
2.4.2 Karakterisasi Biokimia Bakteri .....	12
2.5 Pengukuran Pertumbuhan Mikroorganisme .....	15
2.6 Kromatografi Gas .....	17
<b>3 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>20</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.2.1 Alat .....	20
3.2.2 Bahan.....	20
3.2.2.1 Sampel Tanah .....	20
3.2.2.2 Medium.....	21
3.2.2.3 Bahan Kimia .....	21
3.3 Cara Kerja.....	21
3.3.1 Penyimpanan Sampel Tanah .....	21
3.3.2 Pembuatan Medium.....	22
3.3.2.1 Medium Selektif Ilyina <i>dkk.</i> (2003).....	22
3.3.2.2 Medium <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	22
3.3.2.3 Medium <i>Basal Salt Mineral</i> (BSM) +1% Hidrokarbon.....	23

3.3.2.4	Medium <i>Nutrient Broth</i> (NB)	23
3.3.2.5	Medium Fermentasi Karbohidrat	23
3.3.2.6	Medium <i>Starch Agar</i> (SA)	24
3.3.2.7	Medium <i>Skim Milk Agar</i> (SMA)	24
3.3.2.8	Medium <i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	24
3.3.2.9	Medium Gelatin	24
3.3.2.10	Medium Tripton 1%	25
3.3.2.11	Medium <i>Methyl Red</i>	25
3.3.2.12	Medium Voges-Proskauer	25
3.3.2.13	Medium <i>Koser Citrate Agar</i> (KCA)	25
3.3.2.14	Medium Oksidasi-Fermentasi	26
3.3.3	Isolasi Bakteri Tanah	26
3.3.4	Pemurnian Isolat Bakteri	26
3.3.5	Pembuatan <i>stock</i> dan <i>working culture</i>	27
3.3.6	Seleksi Isolat	27
3.3.7	Identifikasi Bakteri	27
3.3.7.1	Pengamatan Makroskopik	27
3.3.7.2	Pengamatan Mikroskopik	27
3.3.7.3	Pengujian Aktivitas Biokimia Bakteri	28
3.3.8	Penghitungan Jumlah Bakteri dengan <i>Total Plate Count</i> (TPC)	32
3.3.9	Uji Kemampuan Isolat Bakteri dalam Mendegradasi Hidrokarbon	32
3.3.9.1	Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri pada Medium BSM + 1% Hidrokarbon	32
3.3.9.2	Seleksi Biakan Murni yang akan Digunakan untuk Analisis Senyawa Hidrokarbon	32
3.3.9.3	Ekstraksi Senyawa Hidrokarbon	33
3.3.9.4	Analisis Senyawa Hidrokarbon dengan GC/MS	34
3.3.10	Pengolah dan Analisis Data	34
<b>4</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>35</b>
4.1	Isolasi Bakteri dari Tanah Tercemar Hidrokarbon	35
4.2	Identifikasi Bakteri	36
4.3	Pengukuran Pertumbuhan Bakteri	41
4.4	Analisis Kemampuan Degradasi Hidrokarbon	46
<b>5</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>52</b>
5.2	Kesimpulan	52
5.2	Saran	52
	<b>DAFTAR REFERENSI</b>	<b>53</b>
	<b>LAMPIRAN</b>	<b>57</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Hasil Isolasi Bakteri Tanah pada Medium Ilyina <i>dkk.</i> (2003:88)..	35
Tabel 4.2(1)	Pengamatan Makroskopik Isolat DT2, DT5, dan DT8.....	37
Tabel 4.2(2)	Pengamatan Mikroskopik dan Biokimia Isolat DT2 .....	38
Tabel 4.2(3)	Pengamatan Mikroskopik dan Biokimia Isolat DT5 .....	40
Tabel 4.2(4)	Pengamatan Mikroskopik dan Biokimia Isolat DT8 .....	42
Tabel 4.3	Jumlah Rata-rata CFU/ml Isolat DT2, DT5, dan DT8 pada Medium BSM + 1% Hidrokarbon .....	45
Tabel 4.4	Dugaan senyawa hasil GC/MS .....	49

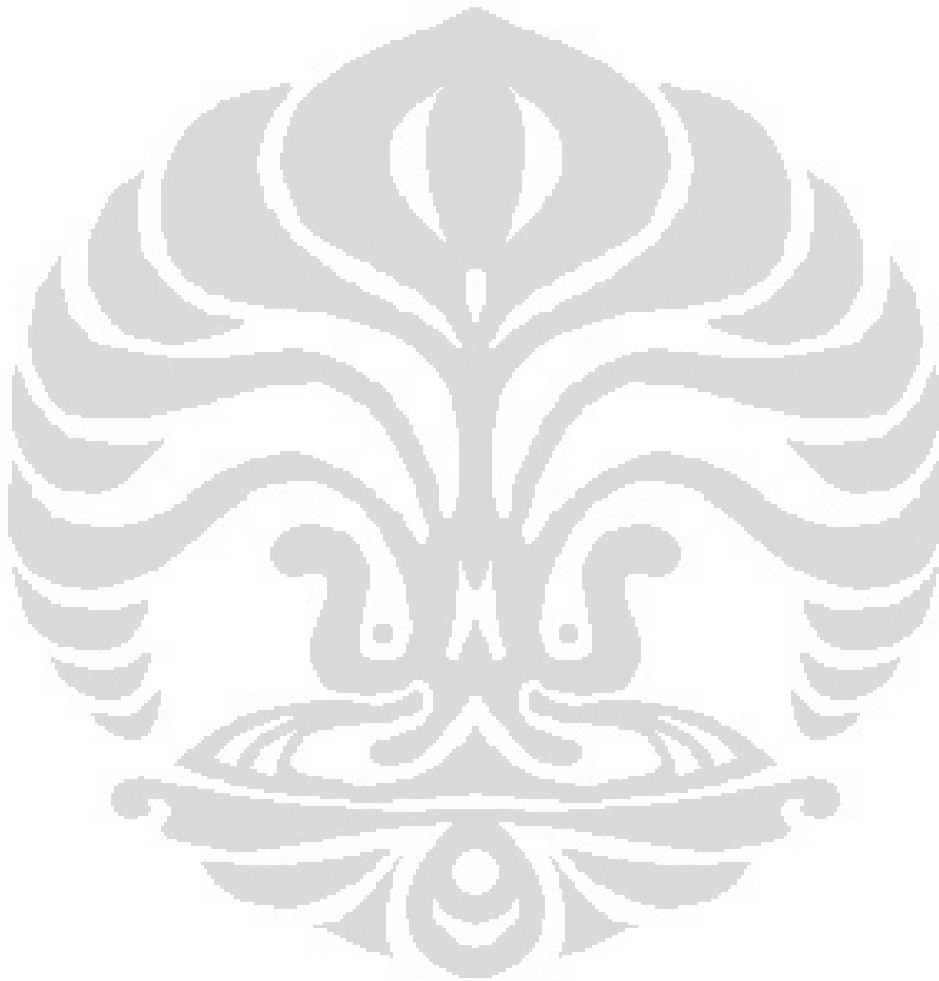


## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.1(1)	Degradasi senyawa hidrokarbon alifatik dengan enzim monooksigenase .....	7
Gambar 2.2.1(2)	Degradasi hidrokarbon aromatik melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim oksigenase .....	8
Gambar 2.4.1(1)	Pertumbuhan bakteri pada <i>Nurient Agar</i> (NA) miring .....	11
Gambar 2.4.1(2)	Pertumbuhan bakteri pada <i>Nutrient Agar</i> (NA) dalam cawan Petri .....	12
Gambar 2.4.2(1)	Reaksi uji indol .....	14
Gambar 2.4.2(2)	Reaksi uji <i>methyl red</i> .....	14
Gambar 2.4.2(3)	Reaksi uji Voges-Proskauer .....	14
Gambar 2.4.2(4)	Reaksi uji sitrat .....	15
Gambar 2.5	<i>Total Plate Count</i> (TPC) .....	16
Gambar 2.6	Skema ilustrasi kromatografi gas dengan <i>flame ionization detector</i> (FID) .....	18
Gambar 4.1	Isolat bakteri yang diperoleh dari isolasi pada medium Ilyina <i>dkk.</i> (2003:88) pada suhu 27--28°C .....	36
Gambar 4.2(1)	Pengamatan mikroskopik isolat DT5 pada medium <i>Nutrient Agar</i> dalam cawan Petri .....	43
Gambar 4.2(2)	Pengamatan makroskopik isolat DT8 pada medium <i>Nutrient Agar</i> dalam cawan Petri .....	43
Gambar 4.3	Grafik kurva pertumbuhan isolat DT2, DT5, dan DT8 pada medium BSM + 1% hidrokarbon .....	44
Gambar 4.4(1)	Kromatogram kontrol pada jam ke-96 (1) .....	48
Gambar 4.4(2)	Kromatogram kontrol pada jam ke-96 (3) .....	48
Gambar 4.4(3)	Kromatogram perlakuan penambahan isolat DT2 (1) pada jam ke-96 .....	49
Gambar 4.4(4)	Kromatogram perlakuan penambahan isolat DT2 (2) pada jam ke-96 .....	50
Gambar 4.4(5)	Kromatogram perlakuan penambahan isolat DT2 (3) pada jam ke-96 .....	50
Gambar 4.4(6)	Kromatogram kontrol jam ke-0 (1) .....	51
Gambar 4.4(7)	Kromatogram kontrol jam ke-0 (2) .....	51

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema kerja penelitian.....	57
Lampiran 2.	Isolasi bakteri dari tanah tercemar hidrokarbon .....	57
Lampiran 3.	Pemurnian isolat dengan <i>quadrant streak-plate</i> .....	58
Lampiran 4.	Pembuatan <i>stock</i> dan <i>working culture</i> .....	58
Lampiran 5.	Pembuatan kurva pertumbuhan isolat bakteri .....	59
Lampiran 6.	Skema penentuan senyawa hidrokarbon yang mengalami penurunan luas area .....	60



## **BAB 1 PENDAHULUAN**

Minyak bumi merupakan campuran kompleks senyawa kimia, termasuk hidrokarbon. Minyak bumi digunakan secara luas sebagai bahan bakar untuk kendaraan dan industri, minyak pelumas, pelarut, serta sebagai bahan mentah dalam pabrik petrokimia dan farmasi. Sebanyak 65% minyak bumi digunakan dalam bentuk gasolin pada kendaraan bermotor (Pichtel 2007: 65). Produk minyak bumi berpotensi sebagai sumber pencemaran tanah dan air karena penggunaannya yang tinggi. Pencemaran tersebut dapat terjadi melalui kebocoran pipa saluran, kecelakaan pengangkutan, kebocoran kapal pengangkut bahan bakar, dan tangki penyimpanan yang pecah (Kaczorek *dkk.* 2010: 1; Liu *dkk.* 2010:23). Pencemaran juga dapat terjadi karena adanya penumpukan limbah produk minyak bumi (Wongsa *dkk.* 2004: 415). Menurut Alvarez & Vogel tahun 1991 (*lihat Ilyina dkk.* 2003: 88), pencemaran tanah oleh hidrokarbon minyak bumi dapat menyebabkan kerusakan luas pada ekosistem lokal karena terjadi akumulasi senyawa tersebut di dalam jaringan hewan dan tumbuhan yang dapat menyebabkan kematian dan mutasi.

Pencemaran akibat senyawa hidrokarbon dapat diatasi dengan beberapa metode, seperti perlakuan secara fisika, kimia, dan biologi (Dave *dkk.* 1994: 653). Pengabuan (*incineration*), klorinasi, ozonasi, pembakaran, dan penggunaan surfaktan termasuk ke dalam perlakuan secara fisika dan kimia (Sepic *dkk.* 1996: 1451; Liu *dkk.* 2010: 23). Pengabuan (*incineration*) merupakan cara yang paling sederhana dalam mengatasi pencemaran hidrokarbon, tetapi metode tersebut hanya efektif jika dilakukan segera setelah peristiwa tumpahan minyak terjadi. Penggunaan surfaktan bertujuan untuk mengemulsikan minyak sehingga minyak dapat dipindahkan dan diproses lebih lanjut. Akan tetapi, penggunaan surfaktan sangat bergantung pada karakter fisika-kimia hidrokarbon yang menjadi pencemar (Sepic *dkk.* 1996: 1451). Menurut Ting *dkk.* tahun 1999 (*lihat Liu dkk.* 2010: 23), penanggulangan pencemaran senyawa hidrokarbon secara fisika dan kimia umumnya memerlukan biaya yang sangat besar, tetapi tidak sepenuhnya menghilangkan pencemar.

Metode lain yang dapat digunakan untuk mengatasi pencemaran

hidrokarbon ialah bioremediasi. Bioremediasi merupakan penggunaan mikroorganisme untuk mendegradasi kontaminan di suatu lingkungan menjadi bentuk yang tidak mengandung racun (air dan karbon dioksida) (Dave *dkk.* 1994: 653; Vidali 2001: 1164). Bioremediasi dinilai sebagai metode yang efektif dan murah untuk mengatasi pencemaran hidrokarbon. Biodegradasi hidrokarbon minyak bumi dapat dilakukan dengan penambahan nutrisi (biostimulasi) atau dengan penambahan mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon secara langsung (bioaugmentasi) (Dave *dkk.* 1994: 653).

Bakteri merupakan mikroorganisme yang umum digunakan dalam bioremediasi hidrokarbon. Bakteri dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon dan menggunakan senyawa tersebut sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan. Contoh bakteri pendegradasi hidrokarbon antara lain *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas* (Chung & King 2001: 5585), *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Providencia* sp., *Citrobacter* sp. (Ilyina *dkk.* 2003: 90), dan *Micrococcus* sp. (Ghazali *dkk.* 2004: 63).

Menurut Ghazali *dkk.* (2004: 61), bakteri pendegradasi hidrokarbon dapat diisolasi dari tanah yang tercemar minyak bumi. Sepic *dkk.* (1996: 1454) melaporkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* dapat mendegradasi n-alkana dengan jumlah karbon C<sub>14</sub>--C<sub>18</sub>. Eriksson *dkk.* (2000: 622) melaporkan bahwa *Pseudomonas fluorescens* yang telah diisolasi dari tanah tercemar dapat menggunakan *naphthalene*, *fluorene*, dan *phenanthrene*, senyawa yang termasuk ke dalam kelompok PAH (*polyaromatic hydrocarbon*) sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan. Akan tetapi, bakteri tersebut tidak dapat menggunakan *pyrene*. Churchill *dkk.* (1999: 550) melaporkan bahwa *Mycobacterium* sp. strain CH1 dapat mendegradasi *pyrene*. *Mycobacterium* sp. strain CH1 juga dapat menggunakan alkana rantai lurus (*dodecane* dan *hexadecane*), alkana bercabang (*pristane*), dan alkana rantai panjang (*octadecane*, *docosane*, dan *octacosane*) sebagai sumber karbon utama yang dapat mendukung pertumbuhan, tetapi *cyclohexane* tidak dapat mendukung pertumbuhan bakteri tersebut. Wongsa *dkk.* (2004: 421) melaporkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* dan *Serratia marcescens* sangat baik dalam mendegradasi alkana dengan jumlah karbon C<sub>9</sub>--C<sub>23</sub>. Tsao *dkk.* (1998: 4929) melaporkan bahwa *Pseudomonas putida* PPO1



melakukan kometabolisme pada *p-xylene* dan *o-xylene* serta tumbuh pada *benzene* dan *toluene*.

Biodegradasi senyawa hidrokarbon seperti minyak bumi biasanya membutuhkan kerja sama lebih dari satu spesies bakteri. Hal tersebut karena minyak bumi terbentuk dari banyak senyawa hidrokarbon yang berbeda dan bakteri hanya dapat menggunakan hidrokarbon pada kisaran tertentu. Perbedaan kemampuan bakteri dalam menggunakan senyawa hidrokarbon dapat digunakan untuk memaksimalkan proses biodegradasi. Oleh karena itu, karakterisasi kemampuan suatu bakteri dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon menjadi penting untuk dilakukan (Ghazali *dkk.* 2004: 61).

Hasil penelitian Lestari (2010: 33) menunjukkan bahwa sampel tanah tercemar hidrokarbon yang berasal dari Cilegon, Banten, tanpa penambahan isolat bakteri dan *slow-release fertilizer* (SRF), mengalami penurunan senyawa hidrokarbon rata-rata 40,22% setelah 35 hari inkubasi. Hal tersebut menunjukkan adanya aktivitas degradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme indigenos. Akan tetapi, mikroorganisme indigenos, khususnya bakteri, belum pernah diisolasi dan diidentifikasi dari sampel tanah tersebut. Kemampuan mikroorganisme indigenos tersebut dalam mendegradasi hidrokarbon juga belum diketahui.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri dari sampel tanah tercemar hidrokarbon dan mengetahui kemampuan isolat bakteri tersebut dalam mendegradasi hidrokarbon. Hipotesis penelitian adalah isolat bakteri yang diperoleh memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon.

## **BAB 2** **TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon**

Bakteri adalah sel prokariotik yang bereproduksi dengan membelah diri. Sel bakteri berukuran kecil, umumnya memiliki diameter berkisar dari 0,5  $\mu\text{m}$  sampai 1  $\mu\text{m}$  dan panjang antara 1  $\mu\text{m}$  dan 2  $\mu\text{m}$ . Bakteri memiliki bermacam bentuk, seperti *coccus* (bulat), *rod* (batang), *helix* (spiral), dan *pleomorphic* (Meier *dkk.* 2000: 19--20).

Bakteri pendegradasi hidrokarbon merupakan bakteri yang dapat memutuskan ikatan karbon yang terdapat dalam senyawa hidrokarbon yang seringkali berbahaya menjadi struktur lain yang ramah lingkungan (Madsen 2008: 374). Pendegradasian senyawa hidrokarbon oleh bakteri dapat dilakukan dengan dua cara, cara pertama ialah dengan biodegradasi sempurna atau mineralisasi dan cara kedua dengan biodegradasi tidak sempurna (kometabolisme). Mineralisasi meliputi oksidasi dari senyawa hidrokarbon menjadi karbon dioksida dan air yang dapat digunakan untuk pertumbuhan dan reproduksi sel. Masing-masing tahapan dalam proses degradasi dikatalisis oleh enzim spesifik yang disintesis oleh sel (Meier *dkk.* 2000: 366).

Kometabolisme adalah peristiwa transformasi senyawa hidrokarbon oleh mikroorganisme. Kometabolisme merupakan reaksi degradasi tidak sempurna. Berbeda dengan mineralisasi, pada kometabolisme mikroorganisme tidak dapat menggunakan hasil transformasi sebagai sumber karbon atau sumber energi untuk mendukung pertumbuhan (Atlas & Bartha 1998: 532; Meier *dkk.* 2000: 366).

### **2.2 Senyawa Hidrokarbon**

Hidrokarbon adalah senyawa organik yang hanya terdiri dari karbon dan hidrogen. Hidrokarbon yang memiliki berat molekul rendah berbentuk gas, sedangkan hidrokarbon yang memiliki berat molekul lebih tinggi berupa cairan atau padatan pada suhu ruang. Minyak bumi terdiri dari ribuan senyawa hidrokarbon yang dapat dikelompokkan ke dalam hidrokarbon alifatik, alisiklik,

dan aromatik. Hidrokarbon alifatik terdiri dari alkana rantai lurus, alkana bercabang, dan alkena. Variasi hidrokarbon alifatik sangat besar dilihat dari panjang rantai, jumlah dan tingkatan cabang, serta jumlah ikatan rangkap (Meier *dkk.* 2000: 377 & 384; Madigan *dkk.* 2003: 597).

Secara umum, senyawa alifatik rantai lurus (n-alkana) dengan  $C_{10}$ -- $C_{18}$  lebih mudah didegradasi dibandingkan dengan senyawa alifatik dengan rantai yang lebih pendek atau lebih panjang. Rantai panjang n-alkana didegradasi lebih lambat karena memiliki *bioavailability* yang rendah. Hal tersebut disebabkan oleh rantai panjang n-alkana yang sangat sulit larut di dalam air. Berbeda dengan n-alkana rantai panjang, alkana rantai pendek sangat mudah larut dalam air. Akan tetapi, senyawa tersebut sangat toksik bagi sel (Maier *dkk.* 2000: 380).

Hidrokarbon aromatik merupakan senyawa yang terdiri dari minimal satu cincin tidak jenuh dengan struktur umum  $C_6R_6$  dengan R merupakan satu atau beberapa gugus fungsi. Benzena ( $C_6H_6$ ) merupakan induk dalam kelompok senyawa siklik tidak jenuh tersebut. Senyawa yang terdiri dari dua atau lebih cincin benzena yang bergabung disebut *polyaromatic hydrocarbon* (PAH) (Meier *dkk.* 2000: 384).

Hidrokarbon minyak bumi umumnya digunakan sebagai bahan bakar kendaraan, seperti bensin dan diesel. Bensin merupakan contoh fraksi minyak mentah dengan atom karbon berkisar antara  $C_4$ -- $C_{12}$  dan mengandung 30--70% senyawa alifatik, 20--70% senyawa alisiklik, dan 10--15% senyawa aromatik, baik yang berikatan dengan alkil, maupun tidak. Konsentrasi kandungan senyawa tersebut bergantung pada sumber minyak mentah (Pichtel 2007: 65,70; Maier *dkk.* 2000: 378). Diesel memiliki atom karbon berkisar antara  $C_9$ -- $C_{23}$  yang terdiri dari n-alkana, iso-alkana, siklo-alkana, dan hidrokarbon aromatik dengan atom karbon kurang dari 12 (Wongsa *dkk.* 2004: 417--418).

### 2.2.1 Degradasi Senyawa Hidrokarbon oleh Bakteri

Senyawa hidrokarbon termasuk metabolit yang tidak umum digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Bakteri yang dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon pada umumnya memiliki plasmid degradatif, yaitu plasmid yang

mengode gen untuk membentuk sistem enzim yang dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon. Banyak bakteri tanah, seperti *Pseudomonas* spp. memiliki plasmid degradatif. Salah satu contoh plasmid degradatif adalah plasmid TOL yang mengode sistem enzim untuk mendegradasi toluena (Krieg 1984: 152; Meier *dkk.* 2000: 26--27).

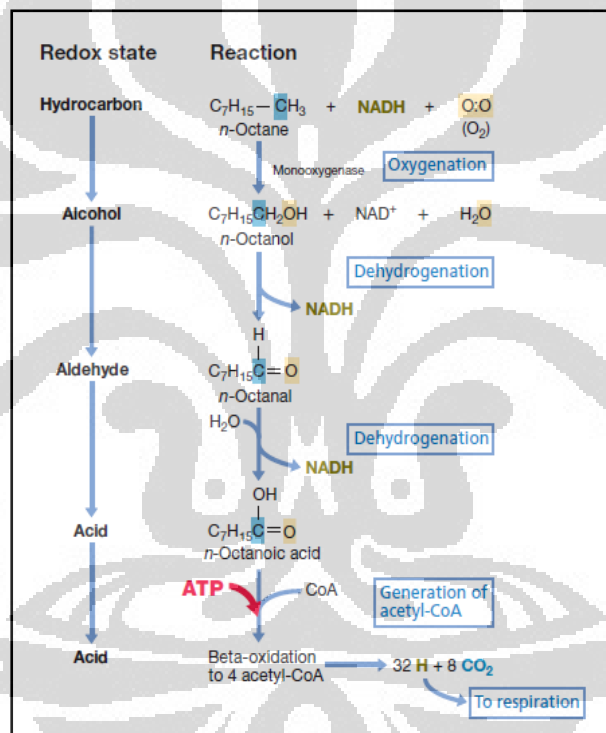
Bakteri tertentu dapat menggunakan hidrokarbon (alifatik atau aromatik) sebagai elektron donor pada kondisi aerob dengan cara oksidasi. Oksidasi hidrokarbon alifatik jenuh umumnya terjadi pada atom karbon terminal dan dikatalisis oleh enzim monooksigenase dengan oksigen sebagai reaktan. Salah satu molekul oksigen bergabung dengan hidrokarbon yang teroksidasi dan menghasilkan asetil-KoA pada akhir reaksi. Asetil-KoA tersebut selanjutnya akan masuk ke siklus asam sitrat (Madigan *dkk.* 2012: 401).

Alkana, salah satu anggota kelompok hidrokarbon alifatik, dianggap sebagai jenis hidrokarbon yang siap didegradasi. Hal tersebut disebabkan alkana memiliki struktur yang mirip dengan asam lemak dan parafin tumbuhan, yang tersebar luas di alam, sehingga banyak mikroorganisme di lingkungan yang dapat menggunakan n-alkana sebagai sumber karbon dan energi. Jalur yang umum digunakan dalam degradasi alkana ialah penggunaan enzim monooksigenase yang secara langsung menggabungkan satu atom oksigen ke satu karbon ujung alkana yang akan menghasilkan alkohol primer. Alternatif jalur lain ialah penggunaan enzim dioksigenase yang menggabungkan dua atom oksigen ke alkana untuk membentuk hidroperoksida. Hasil akhir kedua jalur tersebut adalah asam lemak primer. Asam lemak primer tersebut kemudian masuk ke jalur  $\beta$ -oksidasi, yang akan memecah dua fragmen atom karbon yang berurutan (Maier *dkk.* 2000: 377 & 380) (Gambar 2.2.1(1)).

Banyak senyawa hidrokarbon aromatik dapat digunakan sebagai elektron donor pada kondisi aerob oleh mikroorganisme, misalnya bakteri *Pseudomonas*. Metabolisme senyawa hidrokarbon aromatik diawali dengan pembentukan *protocatechuate* atau *catechol* atau senyawa lain yang memiliki struktur yang berhubungan. *Protocatechuate* atau *catechol* dianggap sebagai substrat awal karena oksidasi dilakukan setelah molekul aromatik yang besar diubah menjadi senyawa tersebut. *Protocatechuate* atau *catechol* kemudian didegradasi lebih jauh

menjadi senyawa yang dapat masuk ke dalam siklus asam sitrat (Madigan *dkk.* 2003: 598) (Gambar 2.2.1(2)).

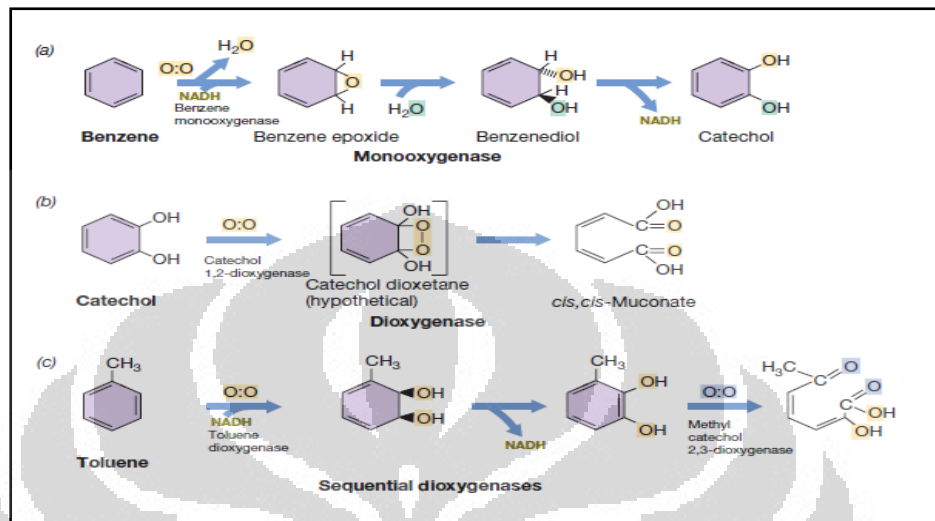
*Polyaromatic hydrocarbon* (PAH) merupakan hidrokarbon aromatik yang terdapat di lingkungan baik secara alami maupun sebagai hasil dari kegiatan manusia. *Polyaromatic hydrocarbon* (PAH) yang memiliki berat molekul tinggi sebagai akibat kegiatan manusia dapat mencapai konsentrasi beracun yang akan menurunkan kualitas lingkungan dan memengaruhi kesehatan manusia, karena bersifat sitotoksik, mutagenik, dan karsinogenik bagi jaringan tubuh (Churchill *dkk.* 1999: 549; Hilyard *dkk.* 2008: 1176).



Gambar 2.2.1(1) Degradasi senyawa hidrokarbon alifatik dengan enzim monooksigenase [Sumber: Madigan *dkk.* 2012: 400.]

Sifat kimia *polyaromatic hydrocarbon* (PAH) tergantung pada jumlah dan pola sambungan cincin aromatik. Pertambahan ukuran PAH akan menyebabkan pertambahan sifat hidrofobik dan stabilitas elektrokimia, sehingga keberadaannya menetap dan terakumulasi di lingkungan (Kanaly & Harayama 2000: 2059). Tidak semua bakteri dapat memetabolisme *polyaromatic hydrocarbon* (PAH).

*Alcaligenes denitrificans*, beberapa jenis *Pseudomonas* dan *Mycobacterium* merupakan contoh bakteri yang dapat memetabolisme molekul *polyaromatic hydrocarbon* (PAH) (Churchill *dkk.* 1999: 549; Tsao *dkk.* 1998: 4924)



Gambar 2.2.1(2) Degradasi hidrokarbon aromatik melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim oksigenase  
[Sumber: Madigan *dkk.* 2012: 401.]

## 2.2.2 Bioremediasi

Bioremediasi adalah sebuah proses yang memanfaatkan kemampuan katalitik organisme hidup, khususnya mikroorganisme, untuk memperbesar laju atau tingkat penghancuran polutan, sehingga pencemaran lingkungan dapat diperbaiki atau dihilangkan (Ilyina *dkk.* 2003: 88; Alvarez & Illman 2006: 3; Madsen 2008: 374). Bioremediasi merupakan metode yang menjanjikan untuk menangani pencemar organik dengan kisaran yang luas, terutama hidrokarbon minyak bumi (Liu *dkk.* 2010: 23--24). Bioremediasi semakin diminati karena teknik tersebut memakai energi dalam jumlah yang lebih sedikit dan tidak banyak melibatkan sumber daya alam, sehingga lebih murah dan berkelanjutan dibandingkan dengan perlakuan fisika-kimia, seperti *land filling* atau pembakaran (Becker & Seagren 2010: 177). Levin dan Gealt tahun 1993 (*lihat* Crawford 1996: 1,2) memperkirakan bioremediasi memerlukan biaya antara \$40--\$100 per  $m^3$ , *inceneration* memerlukan \$250--\$800 per  $m^3$ , dan \$150--\$250 per  $m^3$  untuk *land*

*filling*.

Bioremediasi dapat dilakukan dengan dua pendekatan, yaitu *in-situ* dan *ex-situ*. Bioremediasi *in-situ* dari daerah tercemar melibatkan penambahan oksigen dan mineral nutrisi pada kumpulan polutan untuk jangka waktu yang lama.

Bioremediasi *in-situ* dapat dibagi menjadi:

1. Biostimulasi

Biostimulasi adalah penambahan nutrisi ke dalam tanah terkontaminasi yang bertujuan untuk meningkatkan aktivitas mikroorganisme indigen dalam mendegradasi senyawa kontaminan.

2. Bioaugmentasi

Bioaugmentasi adalah penambahan mikroorganisme ke dalam tanah yang terkontaminasi.

(Vidali 2001: 1168)

Bioremediasi *ex-situ* merupakan teknik bioremediasi yang meliputi pemindahan tanah yang terkontaminasi dari suatu lahan. Tanah tersebut kemudian diberikan perlakuan seperti pengadukan, pencampuran dengan limbah organik, atau penambahan mikroorganisme (Vidali 2001: 1168). Bioremediasi *ex-situ* sesuai terutama untuk area yang berukuran kecil dan tinggi sumber pencemaran (Becker & Seagren 2010: 205).

### 2.3 Isolasi Mikroorganisme

Isolasi adalah suatu cara untuk memisahkan mikroorganisme tertentu dari lingkungan, sehingga diperoleh biakan yang tidak tercampur dengan jenis yang lain atau biakan murni (Gandjar *dkk.* 1992: 20). Biakan murni diperlukan untuk mempelajari sifat-sifat biokimia dan morfologi biakan tersebut (Cappuccino & Sherman 2002: 13).

Bakteri yang berpotensi dalam mendegradasi hidrokarbon dapat diisolasi dari daerah yang telah lama terkontaminasi senyawa hidrokarbon, seperti lumpur berminyak di daerah sekitar tangki penyimpanan minyak bumi (Sadouk *dkk.* 2009: 66). Isolasi dapat dilakukan dengan cara sebar (*spread-plate*), tuang (*pour-plate*), atau gores (*streak-plate*) (Cappuccino & Sherman 2002: 13--14).

Isolasi bakteri dari tanah tercemar hidrokarbon dengan teknik *spread-plate* telah dilakukan oleh Ilyina *dkk.* (2003: 88). Sampel tanah tercemar terlebih dahulu diencerkan, kemudian disebar di atas permukaan medium. Medium yang digunakan merupakan medium agar padat yang mengandung sumber karbon berupa hidrokarbon (Ilyina *dkk.* 2003: 88).

## 2.4 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri meliputi karakterisasi morfologi dan biokimia. Monograf yang dapat digunakan dalam identifikasi bakteri antara lain *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1* (Krieg 1984: 1--836) dan *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (Barrow dan Feltham 1993: 1--262).

### 2.4.1 Karakterisasi Morfologi

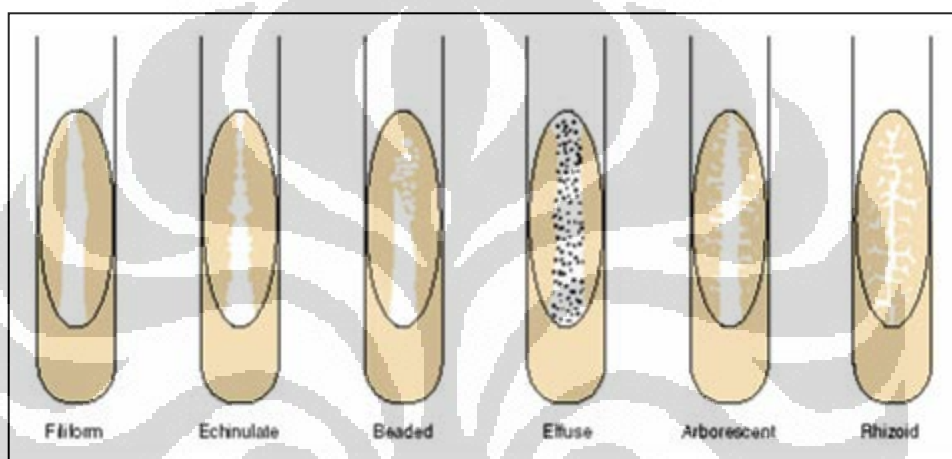
Karakterisasi morfologi bakteri dapat berupa pengamatan makroskopik dan pengamatan mikroskopik. Pengamatan makroskopik bakteri dapat dilakukan pada medium NA miring dan medium NA dalam cawan Petri. Penampakan makroskopik bakteri pada medium NA miring meliputi bentuk dan pigmentasi. (Cappuccino & Sherman 2002: 21). Pigmentasi dapat dilihat pada bakteri dan medium. Bakteri yang tidak memiliki *chromogene* memperlihatkan pertumbuhan berwarna putih, sedangkan bakteri yang memiliki *chromogene* memperlihatkan perbedaan warna. Beberapa bakteri menghasilkan pigmen yang dapat larut dan berdifusi ke medium sehingga medium berubah warna (Benson 2001: 158).

Bentuk pertumbuhan goresan garis tunggal di atas permukaan agar dikelompokkan menjadi *filiform* (bersambungan, seperti benang, dengan tepian halus), *echinulate* (bersambungan, seperti benang, dengan tepian tidak beraturan), *beaded* (pertumbuhan koloni terpisah), *effuse* (pertumbuhan tipis dan menyebar), *arborescent* (pertumbuhan seperti pohon), dan *rhizoid* (pertumbuhan seperti akar) (Gambar 2.4.1(1)) (Cappuccino & Sherman 2002: 21).

Penampakan makroskopik pada medium NA dalam cawan Petri meliputi



pigmentasi, bentuk, tepian koloni, dan elevasi. Pigmentasi merupakan warna koloni. Bentuk koloni dibagi menjadi *circular* (sekeliling tepi koloni rata), *irregular* (sekeliling tepian koloni berlekuk), dan *rhizoid* (pertumbuhan menyebar seperti akar). Tepian luar koloni meliputi *entire* (rata), *lobate* (berlekuk), *undulate* (bergelombang), *serrate* (bergerigi), dan *filamentous* (tepi melebar seperti benang). Elevasi merupakan derajat kenaikan pertumbuhan koloni di atas permukaan agar yang dikelompokkan menjadi *flat*, *raised*, *convex*, dan *umbonate* (Gambar 2.4.1(2)) (Cappuccino & Sherman 2002: 23).



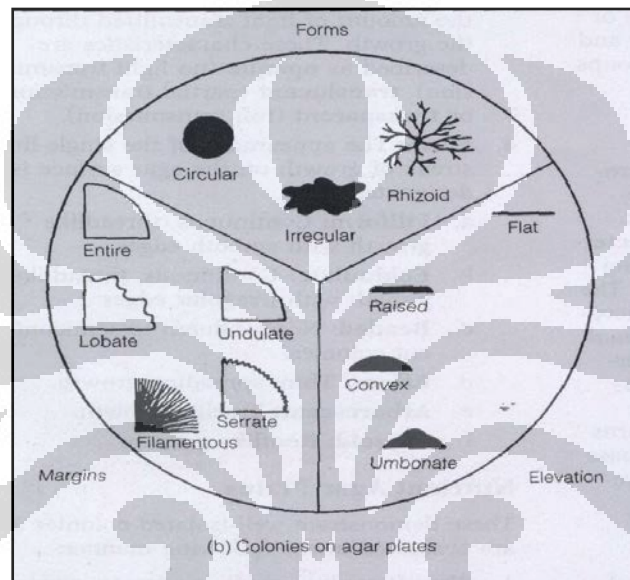
Gambar 2.4.1(1) Pertumbuhan bakteri pada *Nurient Agar* (NA) miring [Sumber: Benson 2001: 157.]

#### 2.4.1.1 Pengecatan Gram

Pengecatan Gram merupakan pengecatan diferensial yang digunakan secara luas dalam bakteriologi. Pengecatan Gram memisahkan bakteri ke dalam dua kelompok, yaitu Gram negatif dan Gram positif. Larutan yang digunakan dalam pengecatan Gram ialah Larutan Hucker's crystal violet, Larutan Lugol's iodine, Larutan alkohol aseton, dan Larutan Safranin. Keempat larutan tersebut memiliki fungsi masing-masing (Harley & Prescott 2002: 44).

Larutan Hucker's crystal violet berperan sebagai cat utama yang mewarnai sel bakteri menjadi ungu. Larutan Lugol's iodine berfungsi sebagai mordant yang meningkatkan interaksi antara sel bakteri dan cat utama. Larutan alkohol aseton bertindak sebagai *decolorizer* yang akan mencuci kompleks crystal violet-iodin.

Bakteri Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks crystal violet-iodin, sedangkan bakteri Gram negatif akan menjadi tak berwarna. Larutan Safranin berperan sebagai *counterstain* yang akan memberikan warna merah pada sel bakteri. Safranin akan memberi warna pada bakteri Gram negatif (Harley & Prescott 2002: 44). Hasil akhir dari pengecatan Gram ialah bakteri Gram positif berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah (Pepper & Gerba 2005: 40).



Gambar 2.4.1(2) Pertumbuhan bakteri pada *Nutrient Agar* (NA) dalam cawan Petri [Sumber: Cappuccino & Sherman 2002: 22.]

## 2.4.2 Karakterisasi Biokimia Bakteri

Bakteri memerlukan energi untuk kelangsungan hidupnya. Energi tersebut dapat diperoleh dari lingkungan sekitar dalam bentuk senyawa kimia tertentu yang dapat diurai (Gandjar *dkk.* 1992: 49). Bakteri menggunakan nutrisi yang ada di lingkungan dengan melakukan berbagai macam aktivitas biokimia. Aktivitas biokimia yang terjadi di dalam dan di luar sel bakteri dikatalisis oleh enzim (Harley & Prescott 2002: 125). Hasil reaksi aktivitas biokimia yang dilakukan hampir semuanya dapat diamati dan berbeda untuk setiap bakteri, sehingga hal

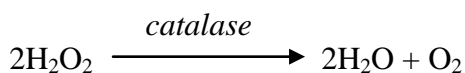
tersebut dapat digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi bakteri (Gandjar *dkk.* 1992: 49; Harley & Prescott 2002: 125).

Bakteri, dalam memperoleh energi dari makanan, dapat bersifat oksidatif atau fermentatif. Uji oksidasi-fermentasi dilakukan untuk mengetahui sifat bakteri dalam memecah karbohidrat dilihat dari pembentukan asam dan perubahan warna (Barrow & Feltham 1993: 27). Bakteri oksidatif merupakan bakteri yang memiliki sistem enzim sitokrom oksidase (Benson 2001: 161). Uji oksidase dilakukan untuk mengetahui penggunaan oksigen sebagai *electron acceptor* oleh bakteri (Harley & Prescott 2002: 180).

Kemampuan memfermentasi berbagai macam karbohidrat pada bakteri berbeda-beda. Spesies, genus, atau kelompok taksonomi bakteri tertentu mempunyai pola fermentasi yang khas. Oleh karena itu, uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengetahui pola fermentasi bakteri (Gandjar *dkk.* 1992: 50).

Keberadaan enzim hidrolase pada suatu bakteri penting untuk diamati. Salah satu contoh enzim hidrolase ialah gelatinase. Gelatinase akan menghidrolisis gelatin menjadi asam-asam amino yang dapat digunakan sebagai nutrisi oleh bakteri (Harley & Prescott 2002: 165). Walaupun gelatin tidak mengandung asam amino esensial triptofan, kemampuan bakteri dalam mencerna gelatin merupakan salah satu karakter yang penting untuk diamati. Hal tersebut karena pola pencairan gelatin oleh bakteri berbeda-beda (Cappuccino & Sherman 2002: 138).

Uji lain yang dilakukan sebagai langkah karakterisasi secara biokimia ialah dengan menguji pembentukan enzim katalase, produksi H<sub>2</sub>S, motilitas, dan IMViC (indol, *methyl red*, Voges Proskauer, dan *citrate*) (Gandjar *dkk.* 1992: 51--55). Pembentukan enzim katalase mengindikasikan bakteri mampu memecah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang bersifat toksik menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>.

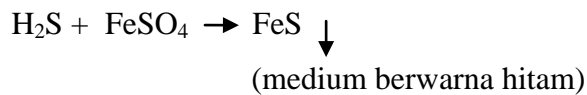


(Benson 2001: 168)

Produksi H<sub>2</sub>S dilakukan oleh bakteri yang mampu memecah asam amino yang mengandung unsur belerang, seperti metionin, sedangkan motilitas dilakukan oleh bakteri yang melakukan pergerakan (Gandjar *dkk.* 1992: 51--55).

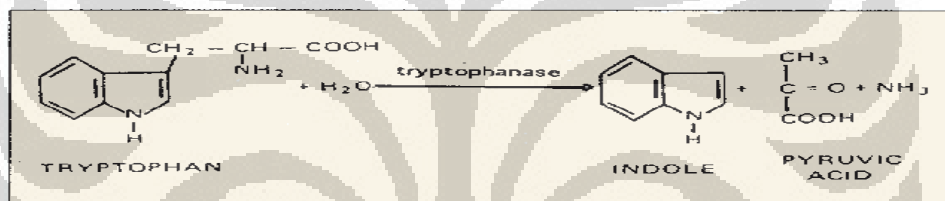
Contoh reaksi produksi H<sub>2</sub>S pada *Pseudomonas aeruginosa*:

Sistein → produksi H<sub>2</sub>S

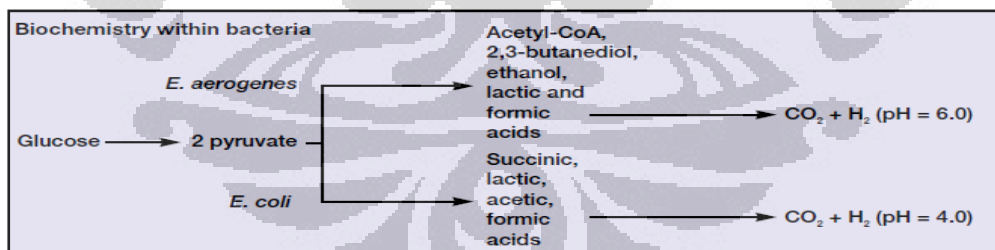


(telah dimodifikasi dari Harley & Prescott 2002: 136)

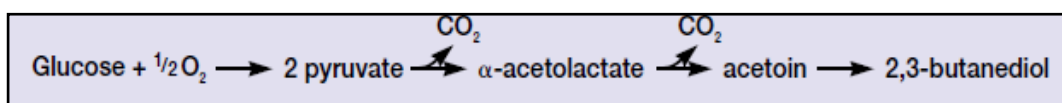
Uji indol memperlihatkan bahwa bakteri mampu menghidrolisis asam amino triptofan (Gambar 2.4.2(1)). Uji *methyl red* bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri membentuk asam dari hidrolisis glukosa (Gambar 2.4.2(2)), uji Voges-Proskauer bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan senyawa 2,3 butanediol (Gambar 2.4.2(3)), sedangkan sitrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan senyawa tersebut sebagai sumber karbon (Gambar 2.4.2(4)) (Gandjar *dkk.* 1992: 51--55).



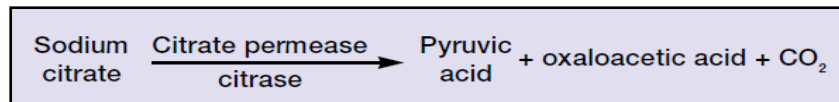
Gambar 2.4.2(1) Reaksi uji indol  
[Sumber: Benson 2001: 155.]



Gambar 2.4.2.(2) Reaksi *uji methyl red*  
[Sumber: Harley & Prescott 2002: 156.]



Gambar 2.4.2(3) Reaksi uji Voges-Proskauer  
[Sumber: Harley & Prescott 2002: 156.]



Gambar 2.4.2(4) Reaksi uji sitrat  
[Sumber: Harley & Prescott 2002: 157.]

## 2.5 Pengukuran Pertumbuhan Mikroorganisme

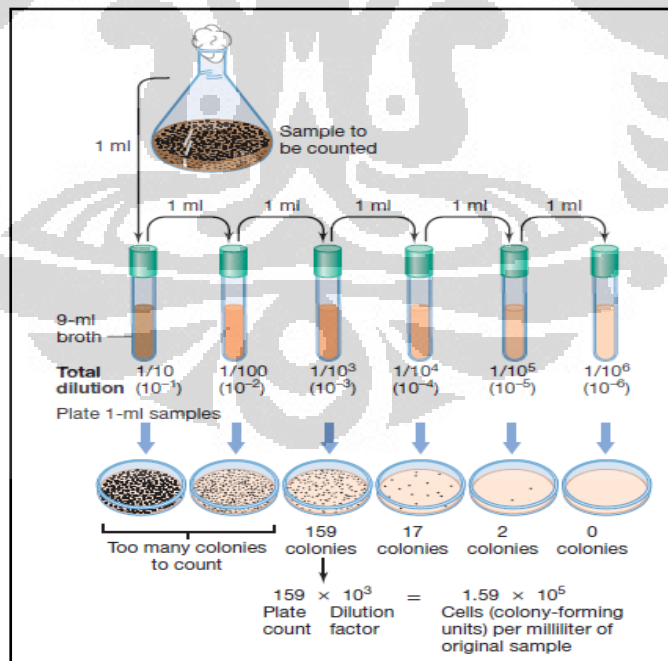
Pertumbuhan didefinisikan sebagai pertambahan jumlah sel mikroorganisme di dalam populasi. Pertambahan jumlah sel dapat diukur sebagai fungsi waktu untuk membuat kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan tersebut dapat dibagi ke dalam beberapa fase, seperti fase lag, fase eksponensial (log), fase stasioner, dan fase kematian (Maier *dkk.* 2000: 43--44; Madigan *dkk.* 2003: 142,144).

Fase lag diperkirakan sebagai fase adaptasi fisiologis sel pada kondisi pemeliharaan (Maier *dkk.* 2000: 44). Fase lag digunakan oleh mikroorganisme untuk melakukan perbesaran sel, sintesis DNA, enzim, dan ribosom (Talaro & Chess 2012: 210). Fase eksponensial (log) dicirikan sebagai suatu periode pembelahan sel ketika laju pertambahan sel sebanding dengan jumlah sel yang terdapat pada waktu tertentu (Maier *dkk.* 2000: 44). Mikroorganisme mencapai laju pembelahan sel maksimum selama fase tersebut. Fase eksponensial akan terus berlangsung selama sel mendapatkan nutrisi yang cukup dan kondisi lingkungan yang mendukung (Talaro & Chess 2012: 210).

Fase stasioner ditandai dengan tidak adanya kenaikan atau penurunan jumlah sel (Madigan *dkk.* 2003: 145). Hal tersebut disebabkan oleh jumlah sel yang membelah seimbang dengan jumlah sel yang mati (Maier *dkk.* 2000: 48). Kematian sel dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti jumlah nutrisi dan oksigen yang menipis. Selain hal tersebut, kepadatan sel yang meningkat seringkali menyebabkan akumulasi asam organik dan senyawa biokimia yang bersifat toksik bagi sel (Talaro & Chess 2012: 211). Fase berikut dari kurva pertumbuhan ialah fase kematian. Mikroorganisme mati dengan laju yang cepat karena jumlah nutrisi yang semakin menipis dan pembentukan sisa metabolisme yang semakin terakumulasi (Cappuccino & Sherman 2002: 125).

Penghitungan jumlah mikroorganisme dapat dilakukan baik secara langsung, maupun tidak langsung. Penggunaan ruang hitung (*counting chamber*) merupakan contoh penghitungan secara langsung (Gandjar *dkk.* 1992: 38--39). Kelemahan penghitungan dengan cara ruang hitung adalah tidak dapat membedakan antara sel yang mati dan sel yang hidup. Keterbatasan lain dalam penghitungan dengan cara tersebut ialah kesulitan dalam menghitung sel bakteri yang sangat kecil menggunakan mikroskop (Hogg 2005: 91).

Penghitungan jumlah mikroorganisme secara tidak langsung di antaranya dengan turbidometer, cara kimia, cara volume total, cara berat kering, kultur tabung putar, dan dengan *Total Plate Count* (TPC) (Gandjar *dkk.* 1992: 38--39). Penghitungan jumlah mikroorganisme secara tidak langsung dengan turbidometer dilakukan dengan mengukur persentase cahaya yang melewati larutan yang diperiksa pada panjang gelombang tertentu. Cara turbidometer memiliki kelemahan, yaitu tidak cocok untuk mikroorganisme yang tidak dapat hidup pada medium cair dan hasilnya kurang akurat bila mikroorganisme yang ditumbuhkan membuat biofilm (Madigan *dkk.* 2012: 131--132).



Gambar 2.5 *Total Plate Count* (TPC)

[Sumber: Madigan *dkk.* 2012: 130.]

*Total Plate Count* (TPC) merupakan salah satu teknik menghitung jumlah sel mikroorganisme secara tidak langsung. Sampel yang akan dihitung terlebih dahulu diencerkan secara bertingkat. Koloni yang tumbuh pada cawan Petri setelah inokulasi dan inkubasi suspensi sampel harus berkisar antara 30--300. Hal tersebut dikarenakan kisaran jumlah koloni tersebut secara statistik dapat dipercaya (Gambar 2.5) (Hogg 2005: 93).

Kelebihan dari metode *Total Plate Count* (TPC) ialah metode tersebut hanya menghitung jumlah sel yang hidup. Sel yang hidup dihitung dalam CFU (*colony forming unit*) dengan asumsi bahwa satu koloni yang terbentuk berasal dari satu organisme (Pepper & Gerba 2005: 3).

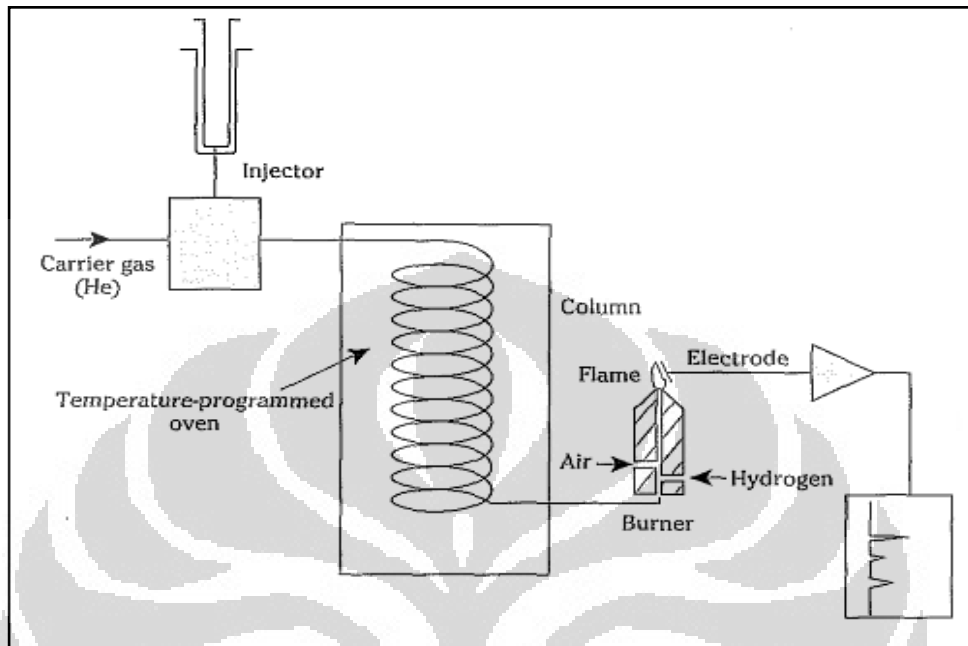
## 2.6 Kromatografi Gas

Kromatografi gas adalah metode pemisahan campuran senyawa kimia menggunakan dua fase, yaitu fase gerak yang berupa gas dan fase stasioner (Niessen 2001: 2). Senyawa yang akan dianalisis menggunakan kromatografi gas bersifat mudah menguap dan memiliki titik didih rendah. Hal tersebut bertujuan agar senyawa yang akan dianalisis dapat bergerak melewati kolom kromatografi gas bersama dengan fase gerak (Meier *dkk.* 2000: 237).

Kromatografi gas terdiri atas unit pengontrol gas, injektor, kolom, dan detektor. Unit pengontrol gas menunjukkan kontrol tekanan aliran gas yang melewati injektor, kolom, dan detektor (Niessen 2001: 2). Kromatografi gas memiliki dua macam detektor, yaitu *flame ionization detector* (FID) dan *electron capture detector* (ECD). FID sesuai untuk analisis hidrokarbon seperti BTEX (benzena, toluena, etilbenzena, dan *xylene*), poliaromatik hidrokarbon, atau alifatik hidrokarbon. ECD digunakan untuk analisis senyawa yang mengandung halogen, terutama senyawa yang mengandung khlor, seperti *trichloroetilene* (TCE) (Meier *dkk.* 2000: 237) (Gambar 2.6).

Kromatografi gas dapat digunakan bersama dengan *mass spectrometer* (MS) untuk identifikasi senyawa yang tidak diketahui. *Mass spectrometer* (MS) membombardir suatu senyawa dengan elektron, menyebabkan senyawa tersebut

terputus dan terfragmentasi menjadi bagian yang lebih kecil. Pola fragmentasi dapat diinterpretasikan oleh seorang ahli untuk menentukan molekul asli dari



Gambar 2.6 Skema ilustrasi kromatografi gas dengan *flame ionization detector (FID)*  
[Sumber: Wauquier 1995: 20.]

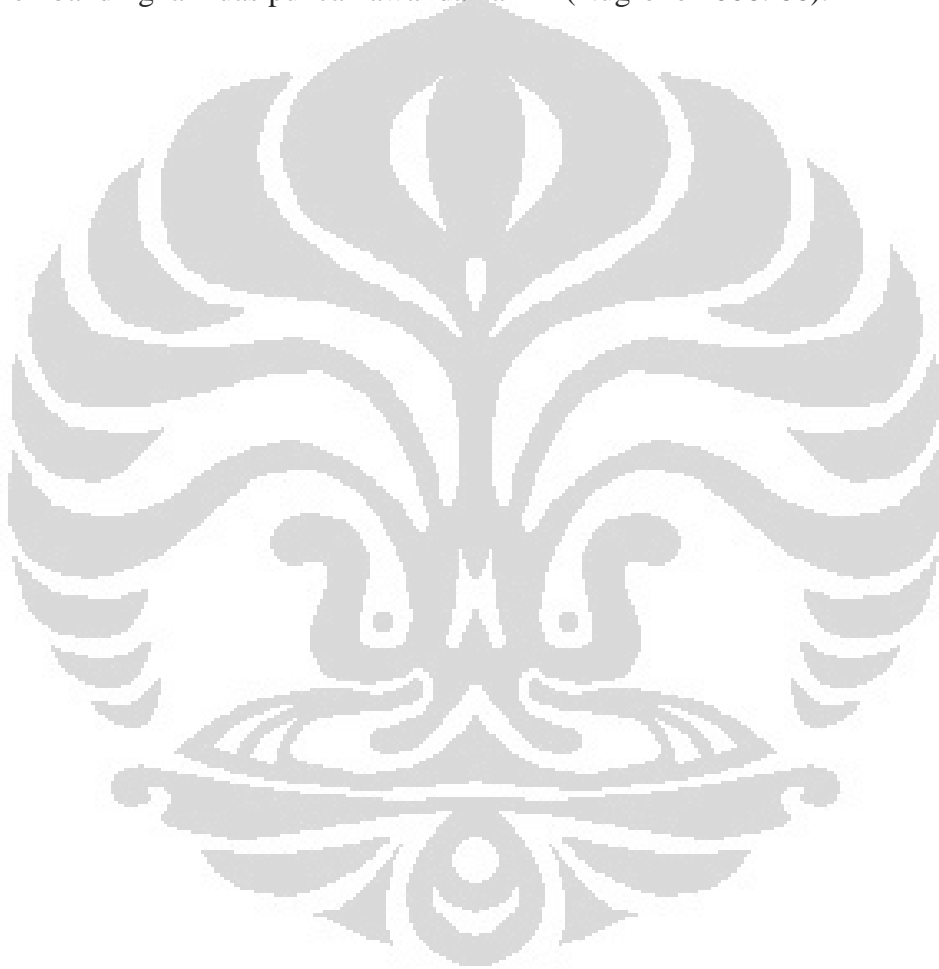
senyawa tersebut. MS untuk analisis rutin, umumnya memiliki daftar pola fragmentasi yang dapat digunakan untuk menentukan senyawa yang paling sesuai atau prediksi dari senyawa target yang sedang dianalisis (Meier *dkk.* 2000: 237).

Terdapat beberapa keuntungan dari pemakaian kromatografi gas, antara lain pemisahan materi akan efisien, selektif, dan dapat diaplikasikan dengan luas. Kromatografi gas mudah dikombinasikan dengan *mass spectrometer (MS)* yang berfungsi sebagai detektor. Pemisahan materi dengan kromatografi gas membutuhkan waktu yang relatif cepat dan pekerjaan yang dilakukan cukup sederhana. Kromatografi gas mudah dikuantifikasi dan dijadikan otomatis. Selain itu, kromatografi gas hanya memerlukan sampel dalam jumlah sedikit (miligram) dan menggunakan detektor yang tidak bersifat merusak. Selain beberapa kelebihan yang telah disebutkan, penggunaan kromatografi gas memiliki beberapa kelemahan, di antaranya ialah sampel yang digunakan harus bersifat mudah menguap dan tidak cocok untuk sampel yang mudah rusak pada suhu tinggi.



Kromatografi gas sulit digunakan untuk sampel berukuran besar dan hanya untuk analisis kualitatif (Miller 2005: 179).

Mikroorganisme mendegradasi hidrokarbon dengan memotong-motong hidrokarbon alifatik rantai panjang dan mentransformasi hidrokarbon aromatik sehingga menyebabkan perubahan komposisi hidrokarbon semula. Hasil pemotongan dan transformasi serta perubahan komposisi tersebut dapat dilihat dengan menggunakan GC/MS. Perubahan yang terjadi dapat dilakukan dengan membandingkan luas puncak awal dan akhir (Nugroho 2006: 86).



## **BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok. Analisis senyawa hidrokarbon dengan kromatografi gas-spektrometer massa dilakukan oleh Akademi Kimia Analisis, Bogor. Penelitian dilakukan selama 12 bulan (Juli 2010--Agustus 2010; Januari 2011--Oktober 2011).

### **3.2 Alat dan Bahan**

#### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan antara lain cawan Petri, corong gelas, pembakar spiritus, botol alkohol, jarum tanam bulat (ose), jarum tanam tajam, batang pengaduk, spatula, tabung Durham, tabung reaksi [Pyrex], labu Erlenmeyer [Pyrex dan Duran], gelas ukur [Pyrex], gelas Beaker [Pyrex], corong pemisah [Pyrex], pinset, mortar, spatel Drygalski, pipet volumetrik, mikropipet [Biohit dan Finpipete], tip, timbangan digital [AND EW-300 G], timbangan analitik [Oertling], autoklaf [Hiclave dan Hirayama HL 36 AE], oven [Heraeus], *shaker incubator* [OSK], *anaerobic jar*, GC [Agilent Technologies Type 7890A], MS [Agilent Technologies Type 5975C], dan kamera digital.

#### **3.2.2 Bahan**

##### **3.2.2.1 Sampel Tanah**

Sampel tanah yang digunakan berasal dari tempat pembuangan oli dan bahan bakar minyak selama lebih dari sepuluh tahun di daerah Cilegon, Banten.

### 3.2.2.2 Medium

Medium-medium yang digunakan dalam penelitian ialah medium selektif Ilyina *dkk.* (2003: 88), medium *Nutrient Agar* (NA) [Britania], medium *Basal Salt Mineral* (BSM) + 1% Hidrokarbon, medium *Nutrient Broth* (NB) [Britania], medium Fermentasi Karbohidrat, medium *Starch Agar* (SA), medium *Skim Milk Agar* (SMA), medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) [Britania], medium Tripton 1%, medium Gelatin, medium *Koser Citrate Agar* (KCA) [Difco], medium *Methyl Red*, medium Voges Proskauer, dan medium Oksidasi-Fermentasi.

### 3.2.2.3 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan ialah alkohol 70%, akuades, spiritus,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [Merck],  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [Merck], *Bacteriological Agar* [Britania],  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [Merck],  $\text{CaCl}_2$  [Merck],  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [Merck],  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  [Merck],  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [Merck],  $\text{FeCl}_3$ , *soluble starch* [BDH], *skim milk* [Difco], glukosa [Liofilchem Diagnostics], laktosa [Merck], sukrosa [BDH], tripton [Oxoid],  $\text{NaCl}$  [BDH], *phenol red* [Merck], reagen Kovac [Merck], gelatin [Merck],  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, pepton [Liofilchem Diagnostics], *Oxidase test stick* [Liofilchem Diagnostics], *Gas Generating Kit Anaerobic System* [Oxoid], *methyl red*, alfa-naftol 5%, larutan KOH 40%, bromtimol biru 0,2%, minyak immersi, Hucker's crystal violet, Lugol's iodine, alkohol aseton, dan safranin [Merck].

## 3.3 Cara Kerja

Skema cara kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

### 3.3.1 Penyimpanan Sampel Tanah

Sampel tanah yang diambil pada bulan Februari 2010 oleh peneliti Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong sebanyak 15 kg disimpan di dalam 8 kantong plastik transparan, tujuh plastik berisi masing-masing 2 kg sampel tanah dan satu plastik berisi 1 kg sampel tanah. Masing-masing plastik

diberi abjad dan disimpan pada suhu 27--28<sup>0</sup>C. Sampel tanah berkode B selanjutnya digunakan dalam penelitian.

### 3.3.2 Pembuatan Medium

#### 3.3.2.1 Medium selektif Ilyina *dkk.* (2003: 88)

Medium selektif Ilyina *dkk.* (2003: 88) sebanyak 1 liter dibuat dengan melarutkan 15 g *Bacteriological Agar* [Britania], 0,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [Merck], dan 0,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Merck] dalam 1000 ml akuades, kemudian diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Medium tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Medium tersebut kemudian ditambahkan dengan 10 ml minyak solar yang telah disterilisasi dengan penyaringan. Medium selektif Ilyina *dkk.* (2003: 88) selanjutnya dituang ke dalam cawan Petri steril masing-masing sebanyak 15--20 ml.

#### 3.3.2.2 Medium *Nutrient Agar* (NA)

Medium *Nutrient Agar* (NA) terdiri dari 3 g *beef extract*, 5 g pepton, 15 g agar, dan 1000 ml akuades (Gandjar *dkk.* 1992: 79). Medium NA sebanyak 1 liter dibuat dengan melarutkan 31 g NA [Britania] dalam 1000 ml akuades, kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk dan dipanaskan hingga semua bahan larut. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Medium NA yang sudah steril diturunkan suhunya hingga 38--40<sup>0</sup>C. Medium tersebut kemudian dituang ke dalam cawan Petri steril masing-masing sebanyak 15--20 ml.

Pembuatan medium NA miring melalui tahapan yang hampir sama dengan pembuatan medium NA dalam cawan Petri. Akan tetapi, pada pembuatan medium NA miring, medium terlebih dahulu dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 6 ml, kemudian disterilisasi. Medium yang telah steril dimiringkan di atas papan miring dan dibiarkan mengeras.

### 3.3.2.3 Medium *Basal Salt Mineral* (BSM) + 1% Hidrokarbon

Medium *Basal Salt Mineral* merupakan modifikasi dari medium *Bushnell-Haas Broth* (Atlas 2010: 286). Medium *Basal Salt Mineral* sebanyak 1 liter dibuat dengan melarutkan 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [Merck], 0,02 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [Merck], 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [Merck], 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  [Merck], 0,02 g  $\text{FeCl}_3$ , dan 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [Merck] dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga homogen. Derajat keasaman (pH) diatur menjadi 7. Medium dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer masing-masing sebanyak 100 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Medium tersebut kemudian ditambahkan minyak solar sebanyak 1% (v/v) yang telah disterilisasi dalam autoklaf dengan cara tindalisasi pada suhu  $110^\circ\text{C}$  selama 15 menit dengan jeda waktu 24 jam selama 3 hari.

### 3.3.2.4 Medium *Nutrient Broth* (NB)

Sebanyak 8 g medium *Nutrient Broth* (NB) [Britania] dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

### 3.3.2.5 Medium Fermentasi Karbohidrat

Sebanyak 0,5 g karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa), 10 g tripton, 5 g  $\text{NaCl}$ , dan 0,018 g *phenol red* dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung Durham masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit (telah dimodifikasi dari Gandjar *dkk.* 1992: 76)

### 3.3.2.6 Medium *Starch Agar* (SA)

Sebanyak 2 g *soluble starch* [BHD] dan 31 g *Nutrient Agar* (NA) [Britania] dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (telah dimodifikasi dari Gandjar *dkk.* 1992: 80). Medium SA yang sudah steril diturunkan suhunya hingga 38--40°C. Medium tersebut kemudian dituang ke dalam cawan Petri steril masing-masing sebanyak 15--20 ml.

### 3.3.2.7 Medium *Skim Milk Agar* (SMA)

Sebanyak 50 g skim milk [Difco] dan 15 g agar [Britania] dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaska hingga semua bahan larut. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Gandjar *dkk.* 1992: 80). Medium SMA yang sudah steril diturunkan suhunya hingga 38--40°C. Medium tersebut kemudian dituang ke dalam cawan Petri steril masing-masing sebanyak 15--20 ml.

### 3.3.2.8 Medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Sebanyak 62,5 g Medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) [Britania] dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah steril didiamkan memadat dalam posisi tegak.

### 3.3.2.9 Medium Gelatin

Sebanyak 150 g gelatin [Merck] dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga homogen. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium

disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 3.3.2.10 Medium Tripton 1%

Sebanyak 10 g tripton [Oxoid] dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga homogen. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 3.3.2.11 Medium *Methyl Red*

Sebanyak 5 g pepton [Liofilchem Diagnostics], 5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Merck], 5 g glukosa [Liofilchem Diagnostics] ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Derajat keasaman (pH) diatur menjadi 7,5. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Atlas 2010: 1237).

#### 3.3.2.12 Medium Voges-Proskauer

Sebanyak 5 g pepton [Liofilchem Diagnostics], 5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Merck], 5 g glukosa [Liofilchem Diagnostics] ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1000 ml, kemudian dipanaskan hingga semua bahan larut. Derajat keasaman (pH) diatur menjadi 7,5. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Atlas 2010: 1237).

#### 3.3.2.13 Medium *Koser Citrate Agar* (KCA)

Sebanyak 5,7 g medium *Koser Citrate Agar* (KCA) [Difco] dan 20 g agar dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml, dipanaskan hingga semua bahan larut, kemudian ditambahkan indikator bromtimol biru 0,2%

sebanyak 15 ml. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah steril dimiringkan di atas papan miring dan dibiarkan memadat.

#### 3.3.2.14 Medium Oksidasi-Fermentasi

Sebanyak 2 g pepton [Liofilchem Diagnostics], 5 g NaCl [Merck], 0,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Merck], dan 3 g agar [Britania] dilarutkan dengan akuades hingga mencapai volume 900 ml. Semua bahan dipanaskan hingga larut, kemudian ditambahkan larutan glukosa [Liofilchem Diagnostics] sebanyak 100 ml (10 g/100 ml). Derajat keasaman (pH) medium diatur menjadi 7,1 dan ditambahkan indikator bromtimol biru 0,2% sebanyak 15 ml. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah steril dibiarkan memadat dalam posisi tegak (telah dimodifikasi dari Atlas 2010: 1335).

#### 3.3.3 Isolasi Bakteri Tanah

Teknik isolasi yang digunakan ialah teknik *spread-plate*. Sebanyak 1 g sampel tanah yang diencerkan hingga 10<sup>-8</sup> diinokulasikan ke dalam medium selektif Ilyina *dkk.* (2003: 88) masing-masing sebanyak 0,1 ml. Pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Inkubasi dilakukan selama 120 jam (Lampiran 2).

#### 3.3.4 Pemurnian Isolat Bakteri

Setelah diinkubasi, koloni bakteri yang representatif hasil isolasi digoreskan pada medium NA dalam cawan Petri dengan metode *quadrant streak-plate*. Koloni bakteri yang telah murni kemudian dipindahkan ke medium NA miring (Lampiran 3).



### 3.3.5 Pembuatan *Stock* dan *Working Culture*

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* dilakukan setelah biakan murni bakteri diperoleh. Masing-masing *stock* dan *working culture* dibuat duplo dengan suhu penyimpanan yang berbeda. *Stock culture* disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu sekitar 4°C, sedangkan *working culture* disimpan pada suhu sekitar 28°C. Peremajaan dilakukan dua minggu sekali (Lampiran 4).

### 3.3.6 Seleksi Isolat

Isolat yang akan digunakan untuk karakterisasi biokimia dan analisis hidrokarbon dipilih berdasarkan kesamaan karakter morfologi.

### 3.3.7 Identifikasi Bakteri

#### 3.3.7.1 Pengamatan Makroskopik

Koloni bakteri diinokulasi dengan cara menggoreskan garis lurus tunggal di atas permukaan Medium *Nutrien Agar* (NA) miring dan *quadrant streak plate* pada NA dalam cawan Petri, kemudian diinkubasi pada suhu sekitar 28°C selama 24--48 jam. Pengamatan makroskopik pada medium *Nutrient Agar* (NA) miring meliputi pigmentasi dan bentuk pertumbuhan gores tunggal. Pengamatan makroskopik pada medium NA dalam cawan Petri meliputi pigmentasi, bentuk koloni, tepi koloni, dan elevasi (Cappuccino & Sherman 2002: 21--23).

#### 3.3.7.2 Pengamatan Mikroskopik

##### 3.3.7.2.1 Pembuatan Preparat Olesan Bakteri

Beberapa ose akuades steril diletakkan di atas permukaan gelas objek yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%. Biakan bakteri dari medium NA miring diambil dalam jumlah sedikit dan diletakkan dalam tetesan akuades. Tetesan

tersebut kemudian diratakan hingga terbentuk lapisan tipis dengan luas sekitar 1 cm<sup>2</sup>. Tetesan tersebut dikering-anginkan dan difiksasi dengan cara melewatkan gelas objek di atas nyala api spiritus 3--4 kali (Gandjar *dkk.*1992: 31; Cappuccino & Sherman 2002: 51).

#### 3.3.7.2.2 Pengecatan Gram

Sebanyak 2--3 tetes larutan Gram A (Hucker's Crystal Violet) ditetaskan pada preparat olesan bakteri dan didiamkan selama 1 menit. Preparat kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas isap secara hati-hati. Larutan Gram B (Lugol's Iodine) ditetaskan pada preparat yang telah kering dan dibiarkan selama 1 menit. Preparat kembali dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat kemudian ditetesi larutan Gram C (alkohol aseton) selama 30 detik. Setelah dicuci dan dikeringkan, preparat ditetesi larutan Gram D (Safranin) selama 30 detik. Preparat kembali dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak immersi (Gandjar *dkk.* 1992: 32--33).

#### 3.3.7.3 Pengujian Aktivitas Biokimia Bakteri

Pengujian aktivitas biokimia bakteri dilakukan sesuai dengan metode Gandjar *dkk.* (1992 : 49--56)

##### 3.3.7.3.1 Fermentasi Karbohidrat

Sebanyak satu ose biakan bakteri diinokulasi ke dalam satu seri medium fermentasi dalam tabung reaksi yang berisi tabung Durham. Satu seri medium tidak diinokulasi dan digunakan sebagai kontrol. Tabung-tabung tersebut kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Reaksi dinyatakan positif jika terjadi perubahan warna indikator dari merah menjadi kuning dan terbentuk gelembung udara di dalam tabung Durham.

#### 3.3.7.3.2 Uji Hidrolisis Polisakarida

Biakan bakteri diinokulasikan ke medium *Starch Agar* (SA) dengan cara gores (*streak*), kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30--35°C. Reaksi dinyatakan positif jika terbentuk bagian yang tidak berwarna di sekitar biakan setelah ditetesi dengan larutan iodin.

#### 3.3.7.3.3 Uji Hidrolisis Protein

Biakan bakteri diinokulasikan ke medium *Skim Milk Agar* (SA) dengan cara gores (*streak*), kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30--35°C. Reaksi dinyatakan positif jika terbentuk zona bening di sekitar biakan.

#### 3.3.7.3.4 Produksi H<sub>2</sub>S

Biakan bakteri diinokulasikan ke medium TSIA dengan cara tusukan lurus (*stab*), kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30--35°C. Reaksi dinyatakan positif jika terbentuk warna hitam di sepanjang tusukan.

#### 3.3.7.3.5 Pencairan Gelatin

Sebanyak satu ose biakan bakteri diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi medium Gelatin dan diinkubasi selama 24--72 jam pada suhu 30°C. Sebagai kontrol digunakan tabung yang tidak diinokulasi. Setelah diinkubasi, semua tabung dimasukkan ke dalam lemari es (4°C) selama 10--15 menit. Reaksi dinyatakan positif jika medium gelatin tetap cair setelah dimasukkan ke dalam lemari es.

#### 3.3.7.3.6 Uji Katalase

Gelas objek yang telah dibersihkan ditetesi beberapa tetes larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Satu ose biakan bakteri yang berumur 24 jam diletakkan di dalam tetesan

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tersebut. Reaksi dinyatakan positif jika timbul gelembung-gelembung udara.

#### 3.3.7.3.7 Produksi Indol

Sebanyak satu ose biakan bakteri diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi medium Trypton 1% dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30--35°C. Tabung berisi medium yang tidak diinokulasi digunakan sebagai kontrol. Sebanyak satu ml larutan Kovac ditambahkan ke dalam setiap tabung. Tabung kemudian dikocok perlahan-lahan. Reaksi dinyatakan positif jika terbentuk warna merah tua pada lapisan atas permukaan medium.

#### 3.3.7.3.8 Uji *Methyl Red*

Sebanyak satu ose biakan bakteri diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi medium *Methyl Red* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Tabung berisi medium yang tidak diinokulasi digunakan sebagai kontrol. Sebanyak 2 tetes larutan *methyl red* ditambahkan ke dalam setiap tabung. Reaksi dinyatakan positif jika warna medium berubah menjadi merah.

#### 3.3.7.3.9 Uji Voges-Proskauer (VP)

Sebanyak satu ose biakan bakteri diinokulasi ke dalam tabung yang berisi medium Voges-Proskauer dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Tabung berisi medium yang tidak diinokulasi digunakan sebagai kontrol. Sebanyak 0,6 ml alfa-naftol 5% dan 0,5 ml KOH 4% ditambahkan ke dalam setiap tabung. Reaksi dinyatakan positif jika warna medium berubah menjadi merah.

#### 3.3.7.3.10 Uji Penggunaan Sitrat

Sebanyak satu ose biakan bakteri diinokulasi ke dalam tabung yang berisi medium *Koser Citrate Agar* dan diinkubasi selama 48--72 jam pada suhu 37°C. Tabung berisi medium yang tidak diinokulasi digunakan sebagai kontrol.

Reaksi dinyatakan positif jika warna medium berubah menjadi biru.

#### 3.3.7.3.11 Uji Oksidasi-Fermentasi

Biakan bakteri diinokulasi ke dalam satu seri medium OF dengan cara tusuk (*stab*) dan diinkubasi selama 3--7 hari pada suhu 30°C. Satu tabung kemudian diberi minyak parafin. Tabung berisi medium yang tidak diinokulasi digunakan sebagai kontrol. Reaksi dinyatakan positif jika warna medium berubah menjadi kuning.

#### 3.3.7.3.12 Uji Motilitas

Gelas objek cekung yang telah dibersihkan ditetesi akuades. Sebanyak satu ose biakan bakteri diletakkan pada tetesan akuades, kemudian ditutup dengan *cover glass*. Motilitas biakan bakteri dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak immersi.

#### 3.3.7.3.13 Uji Oksidase

Uji oksidase menggunakan *Oxidase Test Stick* [Liofilchem Diagnostics]. *Oxidase Test Stick* pertama-tama dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan beberapa menit hingga mencapai suhu ruang. *Oxidase Test Stick* diambil dengan pinset dari tempatnya. Koloni diambil sebanyak satu ose dan dioleskan pada ujung *Oxidase Test Stick*. Perubahan warna selama 30 detik diamati. Reaksi dinyatakan positif jika terbentuk warna ungu-biru dalam 30 detik. Reaksi dinyatakan negatif jika warna ungu-biru terbentuk setelah 30 detik.

#### 3.3.7.3.14 Uji Pengaruh Oksigen Bebas

Masing-masing satu ose biakan bakteri diinokulasikan dengan cara gores pada dua buah medium NA miring dalam tabung reaksi. Salah satu tabung dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* yang telah terlebih dahulu diberi *Gas*

*Genetrating Kit* [Oxoid]. Tabung yang lain diinkubasi pada suhu ruang. Pengamatan pertumbuhan dilakukan selama 24 jam.

### 3.3.8 Penghitungan Jumlah Bakteri dengan *Total Plate Count* (TPC)

Sebanyak 0,1 ml suspensi isolat bakteri yang telah diencerkan hingga  $10^8$  diinokulasikan ke dalam medium NA dalam cawan Petri. Pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Setelah diinkubasi selama 24 jam, koloni yang tumbuh dihitung dan jumlah CFU per ml sampel ditentukan.

Penghitungan CFU/ml mengikuti rumus:

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Jumlah rata-rata CFU terhitung}}{\text{Volume inokulasi} \times \text{faktor pengenceran}}$$

(Hogg 2005: 93)

### 3.3.9 Uji Kemampuan Isolat Bakteri dalam Mendegradasi Hidrokarbon

#### 3.3.9.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri pada Medium BSM + 1% Hidrokarbon

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 ml suspensi bakteri ke dalam 100 ml medium BSM + 1% hidrokarbon. Biakan diinkubasi di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 27--30°C. Pembuatan kurva pertumbuhan biakan murni bakteri pada medium BSM + 1% hidrokarbon dilakukan dengan metode TPC selama 7 hari dengan interval 8 jam (Lampiran 5).

#### 3.3.9.2 Seleksi Biakan Murni yang akan Digunakan untuk Analisis Senyawa Hidrokarbon

Biakan murni bakteri yang memiliki jumlah koloni tertinggi dalam medium BSM + 1% hidrokarbon akan digunakan untuk menganalisis

kemampuan bakteri tersebut dalam merombak senyawa hidrokarbon. Suspensi bakteri tersebut dimasukkan sebanyak 1% (v/v) ke dalam 100 ml medium BSM + 1% hidrokarbon. Medium BSM + 1% hidrokarbon tanpa suspensi bakteri digunakan sebagai kontrol. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Perlakuan diinkubasi selama 96 jam pada suhu 27--30°C di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan pengocokan 100 rpm.

### 3.3.9.3 Ekstraksi Senyawa Hidrokarbon

Ekstraksi senyawa hidrokarbon yang terdapat di dalam medium BSM cair dilakukan berdasarkan Adebusoye (2007:1151) yang telah dimodifikasi. Tujuan ekstraksi hidrokarbon ialah untuk memisahkan senyawa hidrokarbon dan medium. Ekstraksi dilakukan pada sembilan labu Erlenmeyer yang enam diantaranya berisi 100 ml medium BSM + 1% hidrokarbon, sebagai kontrol, dan tiga labu yang lain berisi 100 ml medium BSM + 1% hidrokarbon + 1% (v/v) suspensi isolat bakteri dengan kurva pertumbuhan terbaik. Sebanyak tiga kontrol diekstraksi pada jam ke-0 untuk mengetahui kandungan awal senyawa hidrokarbon. Tiga buah kontrol yang lain dan medium yang mengandung isolat diinkubasi selama 96 jam, kemudian diekstraksi pada jam ke-96. Ekstraksi senyawa hidrokarbon menggunakan metode kromatografi cair-cair dengan heksana sebagai fase gerak.

Sebanyak 100 ml medium BSM cair yang mengandung hidrokarbon dimasukkan ke dalam corong pemisah. Sebanyak 100 ml heksana kemudian dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer untuk membilas hidrokarbon yang masih menempel pada dinding labu, kemudian heksana tersebut dimasukkan ke dalam corong pemisah yang telah terisi medium BSM cair. Corong pemisah kemudian dikocok kuat beberapa kali, lalu didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Medium BSM cair (lapisan bawah) dikeluarkan dari corong pemisah dan ditampung dalam labu Erlenmeyer semula. Medium BSM cair tersebut kembali diekstrak dengan prosedur yang sama. Heksana dikeluarkan dari corong pemisah dan disaring menggunakan kertas saring yang telah ditaburkan 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Filtrat yang didapatkan dioven untuk menguapkan heksana yang tertinggal. Setelah seluruh

heksana menguap, filtrat yang telah diperoleh ditimbang. Filtrat kembali dilarutkan dengan heksana sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam botol vial, lalu disimpan untuk dianalisis. Ekstraksi senyawa hidrokarbon dari medium BSM + 1% hidrokarbon dengan penambahan isolat bakteri memiliki cara kerja yang sama seperti di atas, tetapi terlebih dahulu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit untuk memisahkan sel bakteri yang bertujuan untuk mengurangi emulsi saat dilakukan ekstraksi.

#### 3.3.9.4 Analisis Senyawa Hidrokarbon dengan GC/MS

Masing-masing ekstrak senyawa hidrokarbon yang telah diperoleh pada hari ke-0 dan hari ke-4 dilarutkan dengan 1 ml heksana. Analisis dilakukan oleh Akademi Kimia Analis, Bogor, menggunakan mesin GC/MS dengan program analisis berdasarkan Wongsa *dkk.* (2004: 416). Gas yang digunakan sebagai fase gerak ialah gas helium. Temperatur injektor dan detektor diatur pada suhu 250°C dan 300°C. Temperatur kolom untuk analisis hidrokarbon diatur pertama kali pada suhu 50°C yang akan meningkat hingga 270°C dengan kecepatan 5°C per menit. Persentase penurunan senyawa hidrokarbon dilakukan dengan cara membandingkan hasil kromatogram pada masing-masing kontrol dan perlakuan. Puncak yang memiliki waktu retensi yang hampir sama kemudian dicari nama senyawanya berdasarkan data *library* yang diberikan oleh Akademi Kimia Analis. Senyawa yang konsisten terdapat pada masing-masing kontrol dan perlakuan dipilih kemudian dihitung penurunan konsentrasi dengan membandingkan luas area puncak yang terdapat pada kromatogram perlakuan dan kontrol (Lampiran 6).

#### 3.3.10 Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel. Data berbentuk kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif meliputi data pengamatan makroskopik, mikroskopik, dan uji aktivitas biokimia. Data kuantitatif meliputi kurva pertumbuhan dan data perubahan konsentrasi senyawa hidrokarbon.



## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi Bakteri dari Tanah Tercemar Hidrokarbon

Sebanyak 9 isolat bakteri berhasil diisolasi dari tanah tercemar hidrokarbon sampel B Cilegon, Banten. Isolat bakteri yang diperoleh merupakan isolat yang berasal dari koloni representatif yang tumbuh pada permukaan medium Ilyina *dkk.* (2003:88). Hasil isolasi dapat dilihat pada tabel 4.1. Koloni yang tumbuh pada permukaan agar diperkirakan koloni bakteri pendegradasi hidrokarbon. Hal tersebut karena medium Ilyina *dkk.* (2003: 88) yang digunakan untuk isolasi merupakan medium selektif yang mengandung senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon.

Tabel 4.1 Hasil Isolasi Bakteri Tanah pada Medium Ilyina *dkk.* (2003:88)

Isolat	Pengenceran	Warna Koloni pada Medium Ilyina <i>dkk.</i> (2003: 88)	Warna Koloni pada Medium NA
Isolat DT1	10 <sup>-5</sup> (1)	Transparan	Putih
Isolat DT2	10 <sup>-5</sup> (2)	Transparan	Hijau-kebiruan
Isolat DT3	10 <sup>-5</sup> (3)	Transparan	Putih
Isolat DT4	10 <sup>-6</sup> (3)	Putih	Putih
Isolat DT5	10 <sup>-7</sup> (1)	Putih Pucat	Putih
Isolat DT6	10 <sup>-7</sup> (1)	Putih	Putih
Isolat DT7	10 <sup>-7</sup> (2)	Putih	Putih
Isolat DT8	10 <sup>-7</sup> (3)	Putih Pucat	Kuning
Isolat DT9	10 <sup>-7</sup> (3)	Putih	Putih

Konsentrasi minyak solar yang digunakan dalam penelitian sebesar 1% (v/v). Hal tersebut bertujuan agar bakteri dapat menggunakan minyak solar untuk pertumbuhan. Sadouk *dkk.* (2009: 68) melaporkan bahwa konsentrasi minyak solar lebih dari 3% (v/v) akan menghambat pertumbuhan bakteri.

Koloni yang tumbuh pada medium Ilyina *dkk.* (2003: 88) antara lain berwarna putih, putih pucat, dan transparan. Koloni-koloni tersebut diinokulasi ke

medium *Nutrient Agar* dalam cawan Petri untuk dilakukan pemurnian menggunakan metode *streak quadrant*. Koloni tunggal yang tumbuh kemudian dipindahkan ke medium miring *Nutrient Agar*. Isolat yang didapat diberi kode isolat DT1--DT9 (Gambar 4.1).

Seleksi dilakukan terhadap sembilan isolat bakteri yang diperoleh untuk memilih isolat-isolat yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon. Seleksi isolat-isolat tersebut dilakukan berdasarkan karakter morfologi isolat bakteri, yaitu berdasarkan warna. Sebanyak tiga dari sembilan isolat yang diperoleh masing-masing berwarna hijau-kebiruan (DT2), putih (DT5), dan kuning (DT8). Isolat-isolat bakteri tersebut kemudian diidentifikasi dan dilihat kemampuannya dalam mendegradasi hidrokarbon.



Gambar 4.1 Isolat DT1--DT9 yang diperoleh dari isolasi pada medium Ilyina *dkk.* (2003:88) pada suhu 27--28°C

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## 4.2 Identifikasi Bakteri

Pengecatan Gram yang dilakukan menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek. Berdasarkan karakter morfologi dan biokimia, ketiga isolat bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar hidrokarbon memiliki perbedaan karakteristik dan diidentifikasi dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1* (Krieg 1984: 1--836)

sebagai bakteri yang berasal dari genus *Pseudomonas* Migula (isolat DT2), *Citrobacter* Werkman dan Gillen (isolat DT5), dan *Enterobacter* Hormaeche dan Edwards (isolat DT8). Hasil identifikasi isolat bakteri berdasarkan karakter morfologi dan biokimia adalah sebagai berikut.

Pengamatan morfologi dilakukan pada isolat DT2 berumur 24 jam, pada medium *Nutrient Agar*, di suhu ruang. Berdasarkan pengamatan makroskopik, isolat DT2 memiliki bentuk pertumbuhan koloni goresan tunggal berbentuk filiform, pigmentasi hijau-kebiruan, bentuk koloni *circular* dengan tepi koloni *entire* dan elevasi *convex*. Hasil pengamatan makroskopik isolat DT2 dapat dilihat pada tabel 4.2(1). Berdasarkan pengamatan mikroskopik, isolat DT2 termasuk Gram negatif, bentuk sel batang pendek dengan diameter dan panjang sel masing-masing berukuran  $<1\mu\text{m}$  dan  $1\mu\text{m}$ .

Tabel 4.2(1) Pengamatan Makroskopik Isolat DT2, DT5, dan DT8

Identifikasi Bakteri	Isolat DT2	Isolat DT5	Isolat DT8
Karakterisasi Morfologi Makroskopik			
Pigmentasi	Hijau-kebiruan	Putih	Kuning
Bentuk pertumbuhan goresan tunggal	Filiform	Filiform	Filiform
Bentuk koloni	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>
Tepi koloni	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>
Elevasi	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>

Hasil pengamatan karakteristik biokimia isolat DT2 memperlihatkan bahwa isolat DT2 tumbuh pada kondisi aerob, motil, uji katalase dan oksidase positif, dan menggunakan gula dengan cara oksidatif. Isolat DT2 menghasilkan gas pada glukosa dan sukrosa, tetapi tidak pada laktosa, serta tidak menghidrolisis polisakarida. Hasil positif terlihat pada uji hidrolisis protein, pencairan gelatin, produksi  $\text{H}_2\text{S}$ , dan uji penggunaan sitrat. Hasil negatif terlihat pada uji produksi indol, uji *methyl red* dan uji Voges-Proskauer. Hasil pengamatan mikroskopik dan biokimia isolat DT2 dapat dilihat pada tabel 4.2(2).

Tabel 4.2(2) Pengamatan Mikroskopik dan Biokimia Isolat DT2

No.	Identifikasi Bakteri	Isolat DT2 ( <i>Pseudomonas</i> )	<i>Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria</i> (1993)	<i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1.</i> (1984)
Karakterisasi Morfologi Mikroskopik				
1	Bentuk sel	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
2	Gram	-	-	-
3	Panjang sel	1 $\mu\text{m}$		1,5--5 $\mu\text{m}$
4	Diameter sel	< 1 $\mu\text{m}$		0,5--1 $\mu\text{m}$
Karakterisasi Biokimia				
5	Uji Motilitas	+	+	+
6	Pertumbuhan Aerob	+	+	+
7	Pertumbuhan Anaerob	-	-	-
8	Uji Katalase	+	+	+
9	Uji Oksidase	+	+	D
10	Uji OF	O	O	
11	Pembentukan asam dari:			
	a. Glukosa	+	D	
	b. Laktosa	-	D	
	c. Sukrosa	-	D	
12	Hidrolisis Polisakarida	-	D	-
13	Hidrolisis Protein	+	D	
14	Pencairan Gelatin	+	D	D
15	Produksi H <sub>2</sub> S	+	D	
16	Produksi Indol	-		
17	Uji Methyl Red	-		
18	Uji Voges Proskauer	-		
19	Uji Penggunaan Sitrat	+	D	

Keterangan: O/F = menggunakan gula dengan cara oksidasi/fermentasi

D = hasil berbeda pada spesies yang berbeda

+/- = reaksi positif/negatif

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat DT2 termasuk ke dalam genus *Pseudomonas* sesuai dengan tabel identifikasi bakteri oleh Barrow & Feltham (1993: 95, 110--111) dalam *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Menurut Barrow & Feltham (1993: 116), *Pseudomonas* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, motil, bersifat aerob, katalase dan oksidase positif, dan menggunakan gula dengan cara oksidatif.

Pengamatan morfologi dilakukan pada isolat DT5 berumur 24 jam, pada medium *Nutrient Agar*, di suhu ruang. Berdasarkan pengamatan makroskopik, isolat DT5 memiliki bentuk pertumbuhan koloni goresan tunggal berbentuk filiform, pigmentasi putih, bentuk koloni *circular* dengan tepi koloni *entire* dan elevasi *convex*. Hasil pengamatan makroskopik isolat DT5 dapat dilihat pada tabel 4.2(1) dan gambar 4.2(1). Berdasarkan pengamatan mikroskopik, isolat DT5 termasuk Gram negatif, bentuk sel batang pendek dengan diameter dan panjang sel masing-masing berukuran  $<1\mu\text{m}$  dan  $1\mu\text{m}$ .

Hasil pengamatan karakteristik biokimia isolat DT5 memperlihatkan bahwa isolat DT5 tumbuh pada kondisi aerob, motil, uji katalase positif, oksidase negatif, dan menggunakan gula dengan cara fermentatif. Isolat DT5 menghasilkan gas dan asam pada glukosa dan sukrosa, serta hanya menghasilkan gas pada laktosa. Isolat DT5 mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan memproduksi  $\text{H}_2\text{S}$ , tetapi tidak dapat mencairkan gelatin. Hasil negatif terlihat pada hidrolisis polisakarida, hidrolisis protein, uji produksi indol, dan uji Voges-Proskauer. Hasil positif terlihat pada uji *methyl red*. Hasil pengamatan mikroskopik dan biokimia isolat DT5 dapat dilihat pada tabel 4.2(3). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat DT5 termasuk ke dalam genus *Citrobacter* sesuai dengan tabel identifikasi bakteri oleh Barrow & Feltham (1993: 95, 132) dalam *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Menurut Barrow & Feltham (1993: 132), *Citrobacter* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, motil, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, katalase positif, oksidase negatif, menggunakan gula dengan cara fermentatif, menghasilkan gas, dan uji sitrat positif.

Pengamatan morfologi dilakukan pada isolat DT8 berumur 24 jam, pada medium *Nutrient Agar*, di suhu ruang. Berdasarkan pengamatan makroskopik,

Tabel 4.2(3) Pengamatan Mikroskopik dan Biokimia Isolat DT5

No.	Identifikasi Bakteri	Isolat DT5 ( <i>Citrobacter</i> )	<i>Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria</i> (1993)	<i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1. (1984)</i>
Karakterisasi Morfologi Mikroskopik				
1	Bentuk sel	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
2	Gram	-	-	-
3	Panjang sel	1 $\mu\text{m}$		2,0--6,0 $\mu\text{m}$
4	Diameter sel	< 1 $\mu\text{m}$		~ 1 $\mu\text{m}$
Karakterisasi Biokimia				
5	Uji Motilitas	+	+	+
6	Pertumbuhan Aerob	+	+	
7	Pertumbuhan Anaerob	-	+	
8	Uji Katalase	+	+	
9	Uji Oksidase	-	-	-
10	Uji OF	F	F	
11	Pembentukan gas dari:			
	Glukosa	+	+	+
12	Pembentukan asam dari:			
	a. Laktosa	+	+	D
	b. Sukrosa	+	D	D
13	Hidrolisis Polisakarida	-		
14	Hidrolisis Protein	-	-	
15	Pencairan Gelatin	-	-	-
16	Produksi H <sub>2</sub> S	+	D	D
17	Produksi Indol	-	D	D
18	Uji Methyl Red	+	+	+
19	Uji Voges Proskauer	-	-	-
20	Uji Penggunaan Sitrat	+	+	+

Keterangan: O/F = menggunakan gula dengan cara oksidasi/fermentasi

D = hasil berbeda pada spesies yang berbeda

+/- = reaksi positif/negatif

isolat DT8 memiliki bentuk pertumbuhan koloni goresan tunggal berbentuk filiform, pigmentasi kuning, bentuk koloni *circular* dengan tepi koloni *entire* dan elevasi *convex*. Hasil pengamatan makroskopik isolat DT8 dapat dilihat pada tabel 4.2(1) dan gambar 4.2(2). Berdasarkan pengamatan mikroskopik, isolat DT8 termasuk Gram negatif, bentuk sel batang pendek dengan diameter dan panjang sel masing-masing berukuran  $<1\mu\text{m}$  dan  $1\mu\text{m}$ .

Hasil pengamatan karakteristik biokimia isolat DT8 memperlihatkan bahwa isolat DT8 tumbuh pada kondisi aerob, motil, uji katalase positif, oksidase negatif, dan menggunakan gula dengan cara fermentatif. Isolat DT8 menghasilkan gas dan asam pada glukosa dan sukrosa, serta hanya menghasilkan gas pada laktosa. Isolat DT8 mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan mampu mencairkan gelatin, tetapi gelatin yang dicairkan lebih sedikit jika dibandingkan dengan isolat DT2. Hasil negatif terlihat pada hidrolisis polisakarida, hidrolisis protein, produksi  $\text{H}_2\text{S}$ , uji produksi indol, uji *methyl red*, dan uji Voges-Proskauer. Hasil pengamatan mikroskopik dan biokimia isolat DT8 dapat dilihat pada tabel 4.2(4).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat DT8 termasuk ke dalam genus *Enterobacter* sesuai dengan tabel identifikasi bakteri oleh Barrow & Feltham (1993: 95, 130) dalam *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Menurut Barrow & Feltham (1993: 132), *Enterobacter* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk rod, motil, bersifat aerob, katalase positif, oksidase negatif, menggunakan gula dengan cara fermentatif menghasilkan gas, dan pencairan gelatin berlangsung lambat.

### **4.3 Pengukuran Pertumbuhan Bakteri**

Pengukuran pertumbuhan isolat-isolat bakteri hasil isolasi dari sampel tanah B Cilegon, Banten dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri tersebut ke dalam medium *Basal Salt Mineral* (BSM) + 1% hidrokarbon. Medium *Basal Salt Mineral* digunakan karena medium tersebut mengandung makronutrien seperti N, H, O, P, S, K, Mg, Ca, S, dan Fe yang dapat menunjang kehidupan bakteri. Menurut Talaro & Chess (2012: 187), makronutrien dibutuhkan dalam

Tabel 4.2(4) Pengamatan Mikroskopik dan Biokimia Isolat DT8

No.	Identifikasi Bakteri	Isolat DT8 ( <i>Enterobacter</i> )	<i>Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria</i> (1993)	<i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1.</i> (1984)
Karakterisasi Morfologi Mikroskopik				
1	Bentuk sel	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
2	Gram	-	-	-
3	Panjang sel	1µm		1,2--3 µm
4	Diameter sel	< 1µm		0,6--1 µm
Karakterisasi Biokimia				
5	Uji Motilitas	+	D	+
6	Pertumbuhan Aerob	+	+	
7	Pertumbuhan Anaerob	-	+	
8	Uji Katalase	+	+	
9	Uji Oksidase	-	-	-
10	Uji OF	F	F	
11	Pembentukan gas dari:			
	Glukosa	+	D	D
12	Pembentukan asam dari:			
	a. Laktosa	+	D	D
	b. Sukrosa	+	+	D
13	Hidrolisis Polisakarida	-		
14	Hidrolisis Protein	-	-	
15	Pencairan Gelatin	+	D	D
16	Produksi H <sub>2</sub> S	-	-	-
17	Produksi Indol	-	-	D
18	Uji Methyl Red	-	D	D
19	Uji Voges Proskauer	-	D	D
20	Uji Penggunaan Sitrat	+	+	+

Keterangan: O/F = menggunakan gula dengan cara oksidasi/fermentasi

D = hasil berbeda pada spesies yang berbeda

+/- = reaksi positif/negatif





Gambar 4.2(1) Pengamatan makroskopik isolat DT5 pada medium *Nutrient Agar* dalam cawan Petri  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2(2) Pengamatan makroskopik isolat DT8 pada medium *Nutrient Agar* dalam cawan Petri  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

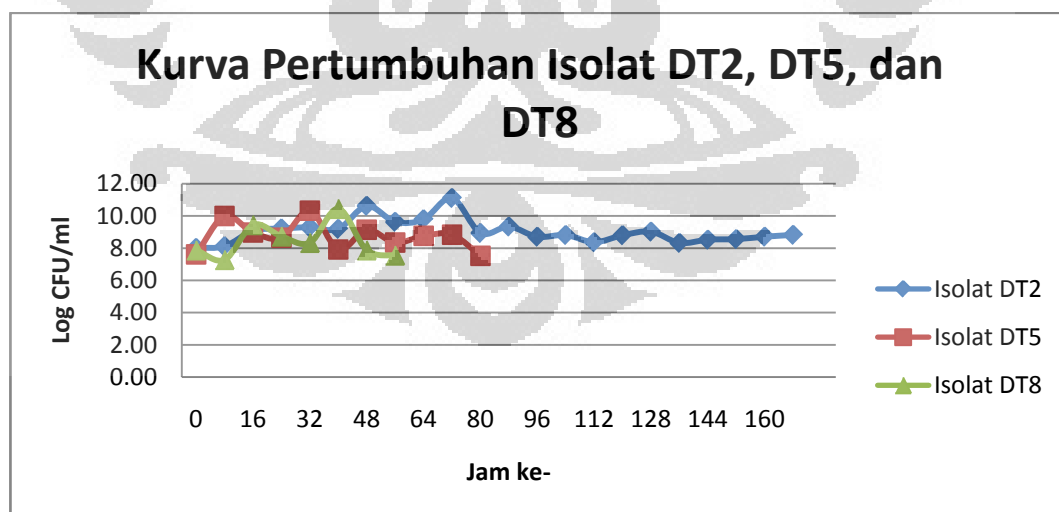
jumlah yang relatif banyak dan berperan dalam pembentukan dan metabolisme sel. Penambahan 1% hidrokarbon berupa minyak solar ke dalam medium *Basal Salt Mineral* bertujuan agar hanya bakteri yang mampu menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon yang dapat tumbuh dan memperbanyak diri.

Pengukuran pertumbuhan dilakukan selama tujuh hari dengan interval 8 jam bertujuan agar dapat menentukan peralihan dari fase lag ke log. Metode yang digunakan adalah metode *Total Plate Count* (TPC). Metode tersebut digunakan

karena hanya menghitung sel yang hidup. Penghitungan sel berdasarkan *Colony Forming Unit* (CFU) yang terbentuk karena diasumsikan satu koloni yang terbentuk berasal dari satu sel (Madigan *dkk.* 2012: 129). Pertumbuhan ketiga isolat bakteri yang diperoleh dapat dilihat dalam bentuk kurva pertumbuhan (Gambar 4.3). Jumlah koloni isolat DT2, DT5, dan DT8 dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Berdasarkan hasil perhitungan *Total Plate Count* jam ke-0, ketiga isolat memiliki jumlah awal yang berbeda, yaitu  $1,02 \times 10^8$  CFU/ml untuk isolat DT2,  $4,11 \times 10^7$  CFU/ml untuk isolat DT5, dan  $7,44 \times 10^7$  CFU/ml untuk isolat DT8. Perbedaan jumlah awal tersebut dikarenakan perbedaan *doubling time* masing-masing isolat bakteri saat ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* miring sebelum diinokulasikan ke medium *Basal Salt Mineral* + 1% hidrokarbon. Bakteri memiliki *doubling time* yang berbeda. Bakteri dengan pertumbuhan cepat memiliki *doubling time* dalam hitungan menit, sedangkan bakteri dengan pertumbuhan lambat memiliki *doubling time* dalam hitungan hari bahkan minggu (Madigan *dkk.* 2012: 123).

Kurva pertumbuhan isolat DT2 terlihat datar dari jam ke-0 sampai jam ke-8. Hal tersebut kemungkinan karena isolat DT2 sedang mensintesis enzim untuk



Gambar 4.3 Grafik kurva pertumbuhan isolat DT2, DT5, dan DT8 pada medium BSM + 1% hidrokarbon

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.3 Jumlah rata-rata CFU/ml isolat DT2, DT5, dan DT8

Jam ke-	Rata-rata CFU/ml Isolat DT2	Rata-rata CFU/ml Isolat DT5	Rata-rata CFU/ml Isolat DT8
0	$1,02 \times 10^8$	$4,11 \times 10^7$	$7,44 \times 10^7$
8	$1,30 \times 10^8$	$9,79 \times 10^9$	$1,89 \times 10^7$
16	$1,18 \times 10^9$	$9,27 \times 10^8$	$2,74 \times 10^9$
24	$1,64 \times 10^9$	$4,44 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$
32	$1,95 \times 10^9$	$2,10 \times 10^{10}$	$2,17 \times 10^8$
40	$1,54 \times 10^9$	$8,22 \times 10^7$	$2,76 \times 10^{10}$
48	$4,15 \times 10^{10}$	$1,37 \times 10^9$	$7,44 \times 10^7$
56	$4,24 \times 10^9$	$2,21 \times 10^8$	$3,56 \times 10^7$
64	$6,11 \times 10^9$	$5,81 \times 10^8$	0
72	$1,27 \times 10^{11}$	$6,83 \times 10^8$	$5,56 \times 10^8$
80	$8,60 \times 10^8$	$3,33 \times 10^7$	0
88	$2,15 \times 10^9$	0	$0,22 \times 10^7$
96	$5,06 \times 10^8$	0	0
104	$6,47 \times 10^8$	0	0
112	$2,32 \times 10^8$	0	0
120	$6,28 \times 10^8$	0	0
128	$1,05 \times 10^9$	0	$1,84 \times 10^8$
136	$2,10 \times 10^8$	0	0
144	$3,32 \times 10^8$	$1,11 \times 10^7$	0
152	$3,61 \times 10^8$	0	0
160	$5,10 \times 10^8$	0	0
168	$6,61 \times 10^8$	0	0

dapat mendegradasi hidrokarbon. Fase tersebut dikatakan sebagai fase lag. Madigan *dkk.* (2012: 126) menyatakan bahwa fase lag merupakan waktu yang diperlukan bagi sel untuk mensintesis enzim yang diperlukan oleh sel tersebut untuk proses metabolisme. Selama fase lag, isolat DT2 tidak memperlihatkan adanya penambahan jumlah CFU/ml. Talaro & Chess (2012: 210) menyatakan bahwa pada fase lag, sel tidak melakukan pembelahan diri.

Jumlah CFU/ml tertinggi yang dicapai oleh isolat DT2 yaitu pada jam ke-72 sebesar  $1,22 \times 10^{11}$  CFU/ml, Isolat DT5 yaitu pada jam ke-32 sebesar  $2,01 \times 10^{10}$  CFU/ml, dan Isolat DT8 pada jam ke-40 sebesar  $2,76 \times 10^{10}$  CFU/ml. Pada masing-masing kurva pertumbuhan isolat bakteri terlihat adanya fluktuasi jumlah CFU/ml. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan terjadi penggabungan sel bakteri

yang lebih banyak, sehingga jumlah koloni yang terbentuk lebih sedikit. Penggabungan sel bakteri dapat dilihat dari ukuran *colony forming unit* yang berbeda-beda pada cawan Petri yang sama. Metode *Total Plate Count* merupakan metode menghitung jumlah sel yang hidup dalam bentuk *Colony Forming Unit*. Ketika sel-sel bergabung, sel-sel tersebut akan tetap membentuk satu koloni. Semakin banyak sel yang bergabung, akan semakin sedikit jumlah koloni yang terbentuk (Madigan *dkk.* 2012: 130). Hal tersebut akan mengakibatkan data yang didapatkan mengalami fluktuasi.

Pertumbuhan tidak terlihat signifikan hingga jam ke-168 terjadi setelah jam ke-32 untuk isolat DT5, setelah jam ke-40 untuk isolat DT8, dan setelah jam ke-72 untuk isolat DT2. Asumsi yang dapat diberikan adalah substrat hidrokarbon yang dapat digunakan ketiga isolat bakteri telah berkurang atau isolat bakteri mengalami penurunan jumlah CFU/ml karena akumulasi metabolisme hidrokarbon yang bersifat toksik.

#### **4.4 Analisis Kemampuan Degradasi Hidrokarbon**

Analisis kemampuan degradasi hidrokarbon dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon. Kemampuan tersebut dapat dilihat dari perubahan konsentrasi senyawa hidrokarbon awal dan akhir. Perubahan konsentrasi dapat dianalisis menggunakan kromatografi gas dengan spektrometer massa dalam bentuk perubahan luas area. Kromatografi gas digunakan karena senyawa hidrokarbon merupakan senyawa yang mudah menguap dan memiliki titik didih yang tinggi. Menurut Miller (2005: 179), sampel yang digunakan pada kromatografi gas harus bersifat mudah menguap dan tidak cocok untuk sampel yang mudah rusak pada suhu tinggi. Penggunaan kromatografi gas dengan spektrometer massa bertujuan untuk identifikasi senyawa yang tidak diketahui (Meier *dkk.* 2000: 237).

Isolat yang digunakan untuk analisis kemampuan degradasi hidrokarbon adalah isolat DT2. Isolat DT2 memiliki pertumbuhan yang lebih baik pada medium BSM + 1% hidrokarbon dibandingkan dengan isolat DT5 dan DT8. Analisis kemampuan degradasi hidrokarbon dilakukan pada medium BSM + 1%

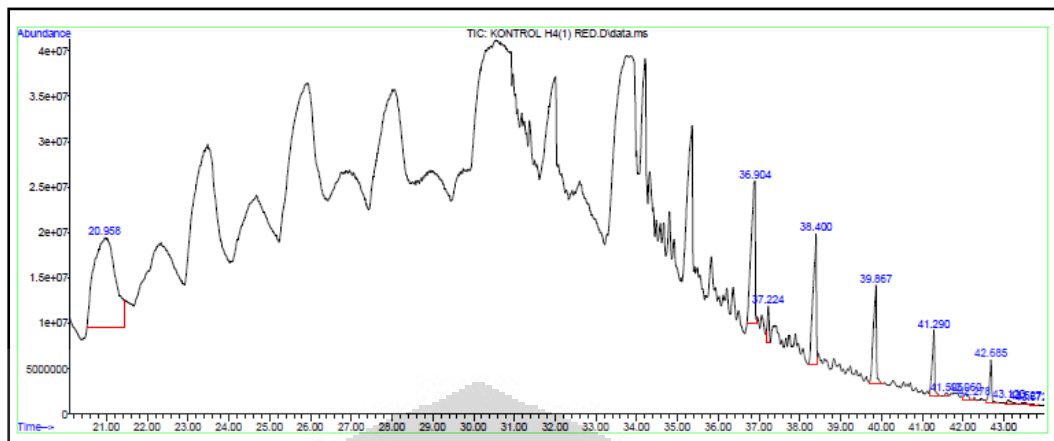
hidrokarbon yang telah diinokulasikan isolat DT2. Waktu inkubasi selama 96 jam yang dipakai berdasarkan hasil kurva pertumbuhan isolat DT2 yang mencapai jumlah CFU/ml tertinggi. Ekstraksi senyawa hidrokarbon dilakukan pada jam ke-0 untuk kontrol jam ke-0 dan jam ke-96 untuk kontrol jam ke-96 dan perlakuan penambahan isolat DT2.

Ekstraksi senyawa hidrokarbon yang dilakukan menghasilkan ekstrak berupa minyak dengan berat rata-rata pada kontrol jam ke-0, kontrol jam ke-96, dan perlakuan penambahan isolat DT2 masing-masing sebesar 0,4 g; 0,3 g; dan 0,27 g. Berdasarkan hasil tersebut, terdapat penurunan total senyawa hidrokarbon pada kontrol jam ke-96 dan perlakuan penambahan isolat DT2 jika dibandingkan dengan kontrol jam ke-0, yaitu masing-masing sebesar 25% dan 32,5%. Ekstrak kemudian dianalisis menggunakan GC/MS untuk mengetahui jenis senyawa yang mengalami penurunan konsentrasi.

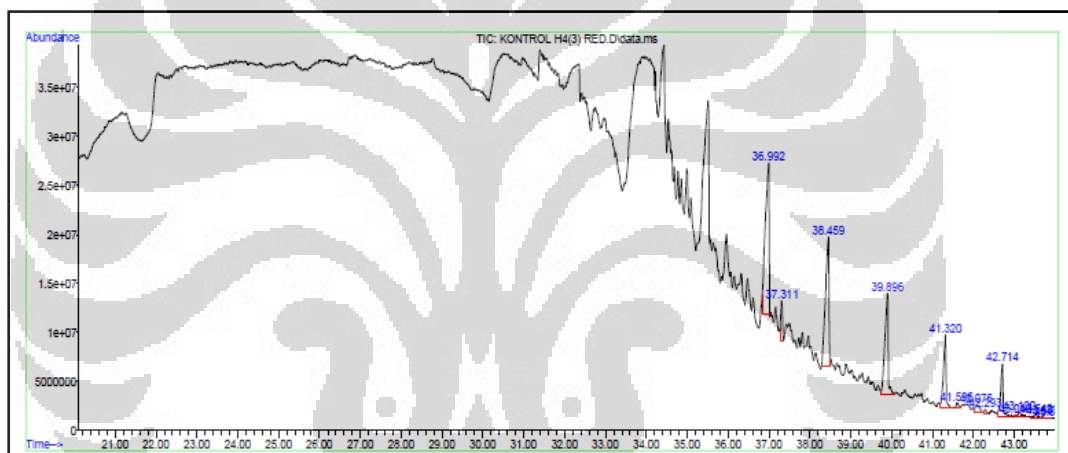
Hasil yang diperoleh berupa kromatogram dan data *library*. Kromatogram yang didapat terdiri dari 2 kontrol pada jam ke-0, 2 kontrol pada jam ke-96 dengan inkubasi, dan 3 pengulangan perlakuan pemberian isolat DT2 yang diinkubasi selama 96 jam. Berdasarkan hasil kromatogram yang didapat, kromatogram kontrol pada jam ke-96 tidak dimasukkan untuk perbandingan luas area. Hal tersebut karena kromatogram yang diperoleh memiliki puncak yang melebar, sehingga senyawa-senyawa yang dimiliki oleh kontrol tidak terpisah dengan baik (Gambar 4.4(1) dan Gambar 4.4(2)).

Penghitungan besar penurunan senyawa hidrokarbon dilakukan dengan membandingkan luas area kontrol dengan luas area perlakuan pada waktu retensi yang hampir sama. Berdasarkan hasil analisis kromatografi gas dan data *library*, pada kontrol jam ke-0 dan perlakuan, senyawa-senyawa yang diperoleh diduga merupakan *hexadecanoic acid*, *methyl ester* dan *n-heneicosane*. Data senyawa-senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Masing-masing dari kedua senyawa, yaitu *hexadecanoic acid*, *methyl ester* dan *n-heneicosane* memperlihatkan adanya penurunan luas area jika dilakukan perbandingan antara kontrol jam ke-0 dengan perlakuan pemberian isolat DT2. *Hexadecanoic acid*, *methyl ester* mengalami penurunan sebesar 97,66%, sedangkan *n-heneicosane* mengalami penurunan luas area sebesar 96,79%



Gambar 4.4(1) Kromatogram kontrol pada jam ke-96 (1) dengan inkubasi  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



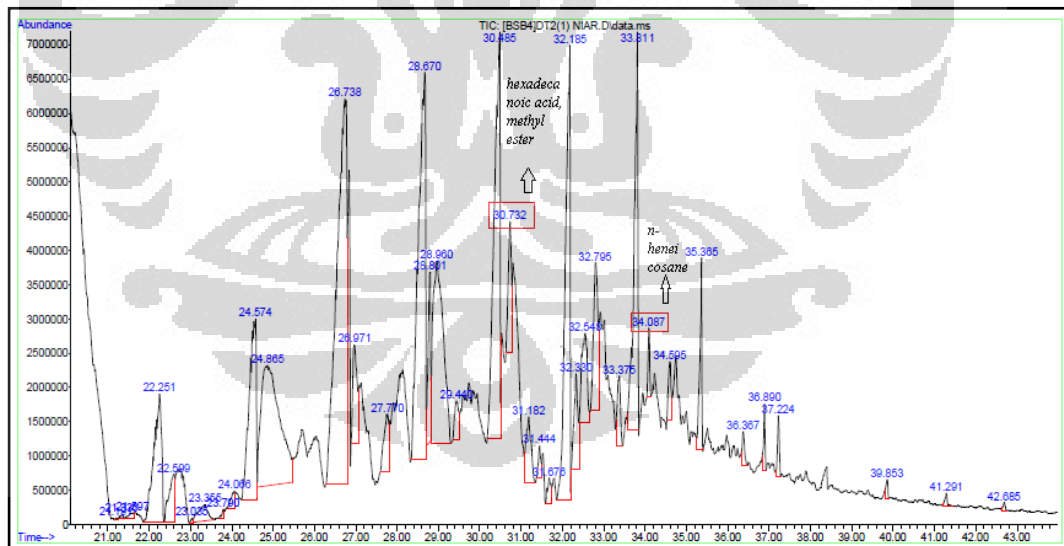
Gambar 4.4(2) Kromatogram kontrol pada jam ke-96 (3) dengan inkubasi  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

(Tabel 4.4). Kromatogram hasil kromatografi gas dapat dilihat pada Gambar 4.4(3), Gambar 4.4(4), Gambar 4.4(5), Gambar 4.4(6), dan Gambar 4.4(7).

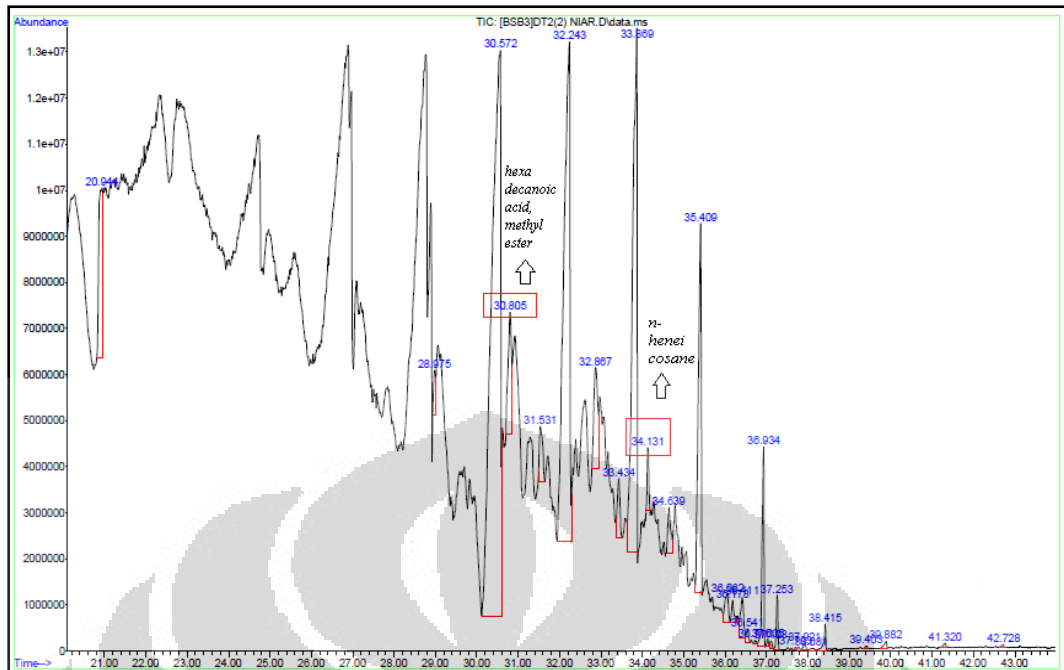
*Hexadecanoic acid, methyl ester* merupakan senyawa yang memiliki rumus molekul  $C_{17}H_{34}O_2$ . Penurunan senyawa tersebut hingga mencapai 97,66% diduga karena bakteri dapat langsung menggunakan dan mendegradasi senyawa tersebut untuk metabolisme. Berdasarkan Madigan *dkk.* (2012: 400), senyawa hidrokarbon akan didegradasi oleh bakteri menjadi alkohol oleh enzim monooksigenase yang akan mengubah hidrokarbon menjadi alkohol. Selanjutnya alkohol akan diubah menjadi aldehid yang akan diubah menjadi asam. Asam tersebut akan masuk ke dalam jalur  $\beta$ -oksidasi.

Tabel 4.4 Dugaan Senyawa hasil GC/MS

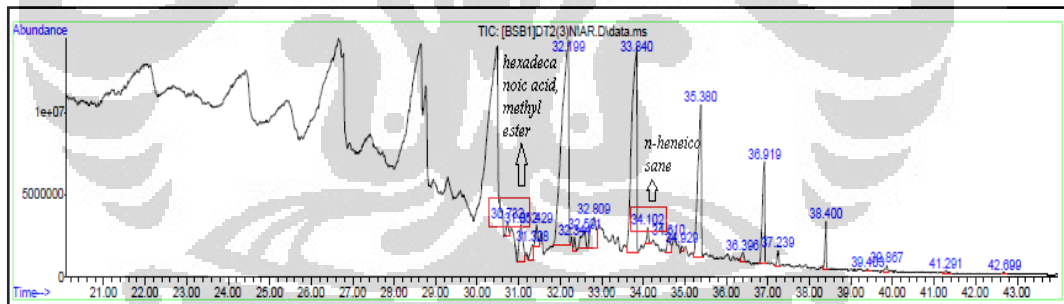
No.	Senyawa	K0	DT2	Penurunan Luas Area (%)
		<i>Retention Time</i>	<i>Retention Time</i>	
		Rata-rata Luas Area	Rata-rata Luas Area	
1	<i>Hexadecanoic acid, methyl ester</i> (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )		30,732 <sub>(DT2(1))</sub>	97,66
		31,415 <sub>(K0(1))</sub>	30,805 <sub>(DT2(2))</sub>	
		31,386 <sub>(K0(2))</sub>	30,732 <sub>(DT2(3))</sub>	
2	<i>n-heneicosane</i> (C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> )		34,087 <sub>(DT2(1))</sub>	96,79
		34,537 <sub>(K0(1))</sub>	34,131 <sub>(DT2(2))</sub>	
			34,102 <sub>(DT2(3))</sub>	



Gambar 4.4(3) Kromatogram perlakuan penambahan isolat DT2 (1) pada jam ke-96  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

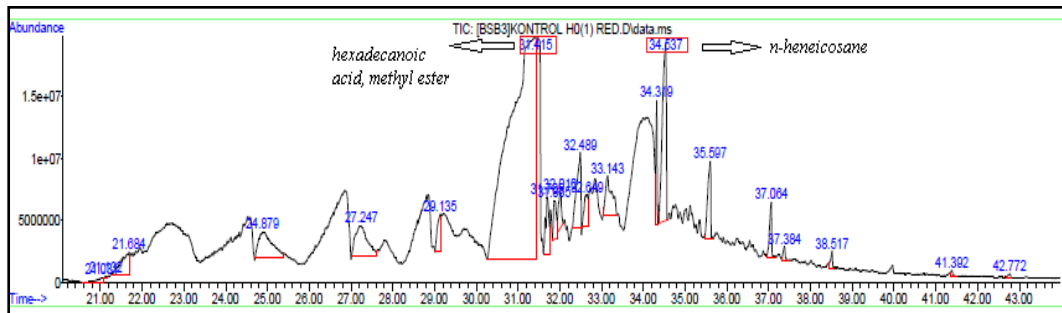


Gambar 4.4(4) Kromatogram perlakuan penambahan isolat DT2 (2)  
pada jam ke-96  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

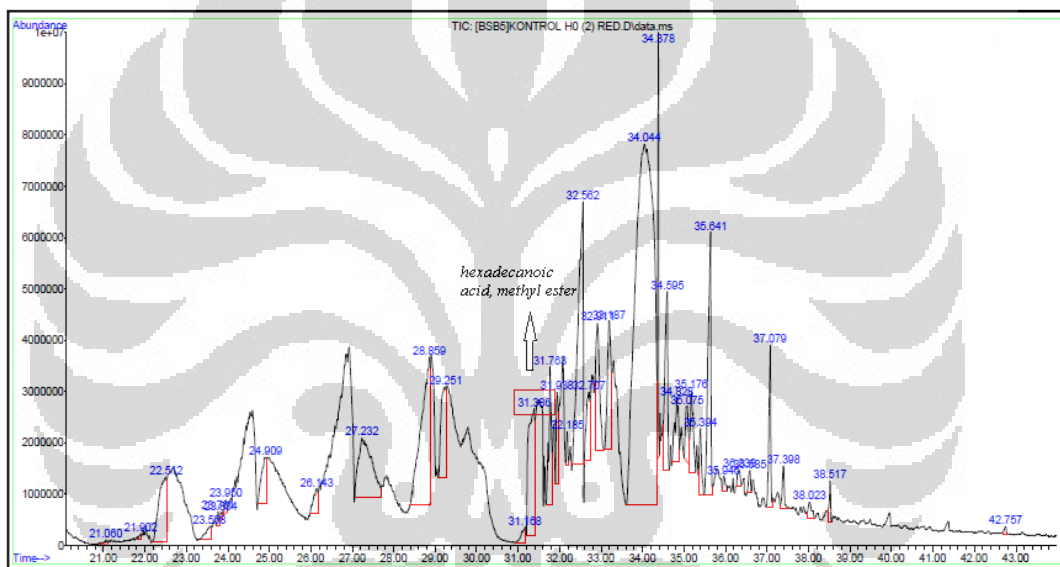


Gambar 4.4(5) Kromatogram perlakuan penambahan isolat DT2 (3)  
pada jam ke-96  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]





Gambar 4.4(6) Kromatogram kontrol jam ke-0 (1)  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.4(7) Kromatogram kontrol jam ke-0 (2)  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

*Hexadecanoic acid, methyl ester* merupakan senyawa yang termasuk ke dalam asam sehingga dapat langsung masuk ke dalam jalur  $\beta$ -oksidasi. Oleh karena itu, pengurangan luas area yang terjadi karena senyawa tersebut diduga dapat langsung masuk ke dalam jalur  $\beta$ -oksidasi. *N-heneicosane* merupakan senyawa hidrokarbon yang memiliki rumus  $C_{21}H_{44}$  yang termasuk alkana rantai lurus. Penurunan luas area hingga 96,79% diduga karena isolat DT2 mampu mendegradasi alkana. Berdasarkan Meier *dkk.* (2000: 380), secara umum alkana merupakan senyawa yang lebih mudah didegradasi.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 KESIMPULAN**

1. Sebanyak sembilan isolat bakteri diperoleh dari isolasi sampel tanah B, Cilegon, Banten. Tiga isolat yang diidentifikasi termasuk ke dalam genus *Pseudomonas* (DT2), *Citrobacter* (DT5), dan *Enterobacter* (DT8).
2. Isolat DT2 (*Pseudomonas*) memiliki kemampuan degradasi hidrokarbon yang dapat dilihat dari penurunan berat ekstrak minyak solar sebesar 32,5% dan penurunan luas area kromatogram senyawa yang diduga sebagai *hexadecanoic acid*, *methyl ester* dan *n-heneicosane* masing-masing sebesar 97,66% dan 96,79%.

#### **5.2 SARAN**

1. Perlu dilakukan pemeliharaan isolat bakteri pada medium yang mengandung senyawa hidrokarbon agar kemampuan isolat bakteri tersebut dalam mendegradasi hidrokarbon tetap terjaga.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan kondisi optimum pertumbuhan isolat DT2 pada medium yang mengandung hidrokarbon.
3. Perlu dilakukan pengukuran pertumbuhan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan penambahan biosurfaktan pada medium yang mengandung hidrokarbon untuk mengoptimalkan perhitungan *colony forming unit* per ml.

## DAFTAR REFERENSI

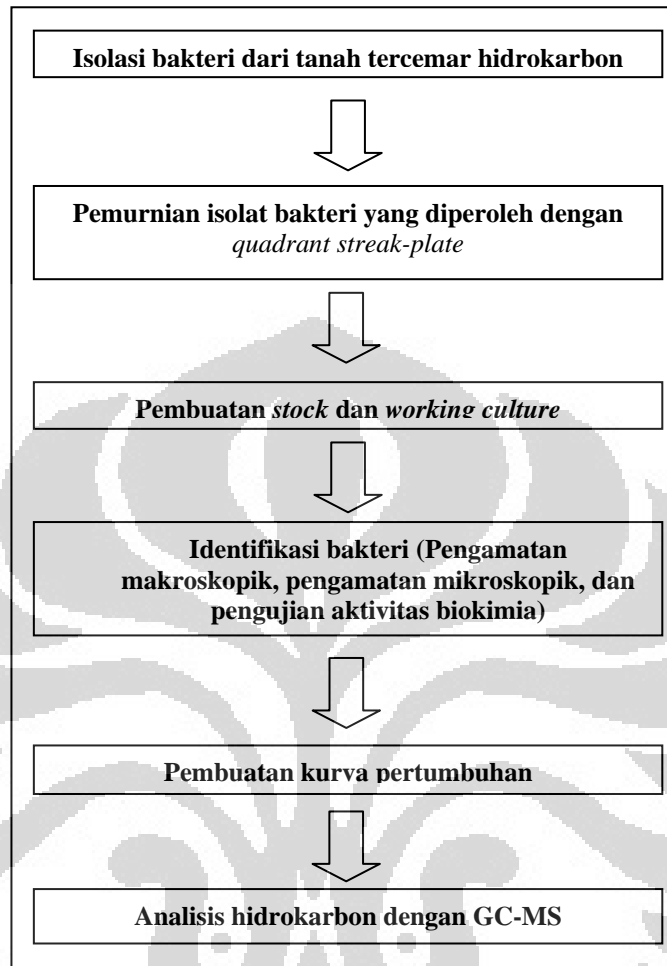
- Adebusoye, S. A., M. O. Ilori, O. O. Amund, O. D. Teniola & S. O. Olatope. 2007. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **23**: 1149--1159 hlm.
- Alvarez, P. J. J. & W. A. Illman. 2006. *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: x + 612 hlm.
- Atlas, R. M. 2010. *Handbook of microbiological media*. 4<sup>th</sup> ed. CRC Press, Boca Raton: 2036 hlm.
- Atlas, R. M. & R. Bartha. 1998. *Microbial ecology fundamentals and applications*. 4th ed. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park: x + 694 hlm.
- Barrow, G. I. & R. K. A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, Great Britain: xix + 331 hlm.
- Becker, J.G. & E.A. Seagren. 2010. Bioremediation of hazardous organics. *Dalam*: Mitchell, R.S. & J.D. Gu (ed). 2010. *Environmental microbiology*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, New Jersey: 177--212.
- Benson. 2001. *Microbiological applications laboratory manual in general microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, New York: xi + 478 hlm.
- Cappuccino, J. G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology a laboratory manual*. 6<sup>th</sup> ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park: xvi + 491 hlm.
- Chung, W. K. & G. M. King. 2001. Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediment and description of *Lutibacterium anuloederans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*: 5585--5592 hlm.
- Churchill, S. A., J. P. Harper & P. F. Churchill. 1999. Isolation and characterization of *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Applied and Environmental*

- Microbiology*: 549--552 hlm.
- Crawford, R. L. & D. L. Crawford. 1996. *Bioremediation: principles and applications*. Cambridge University Press, Cambridge: xii + 400 hlm.
- Dave, H., C. Ramakrishna, B. D. Bhatt & J. D. Desai. 1994. Biodegradation of slop oil from a petrochemical industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **10**: 653--656 hlm.
- Eriksson, M., G. Dalhammar & A. -K. Borg-Karlson. 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology & Biotechnology* **53**: 619--626 hlm.
- Gandjar, I., I. R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. UI-Press, Depok: viii+87 hlm.
- Ghazali, F. M., R. N. Z. A. Rahman, A. B. Salleh & M. Basri. 2004. Biodegradation of hydrocarbon in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54** (2004): 61—67.
- Harley, J. P. & L. M. Prescott. 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. 5<sup>th</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, New York: xiv + 466 hlm.
- Hilyard, E. J., J. M. Jones-Meehan, B. J. Spargo & R. T. Hill. 2008. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from elizabeth river sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(4): 1176--1182.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester: x + 468 hlm.
- Ilyina, A., Castillo S. M. I., Villarreal S. J. A., Ramirez E. G., Candelas R. J. 2003. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. *Vestnik Moskovskovo Universiteta (Bulletin of Moscow University). Seria (series) 2*. **44**(1): 88--91.
- Kaczorek, E., S. Moszyńska & A. Olszanowski. 2010. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. *Biodegradation*: 1--8.

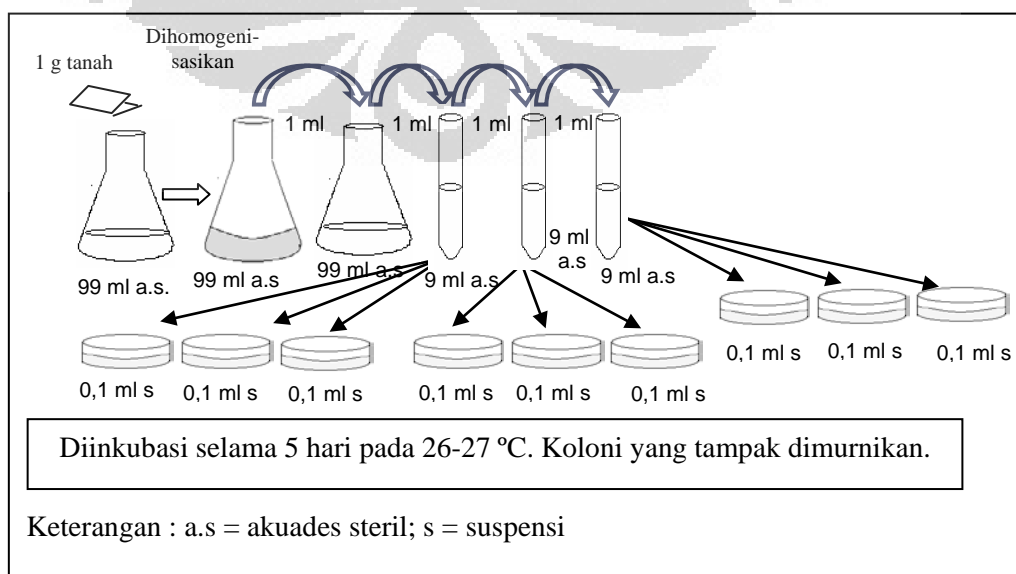
- Kanally, R. A. & S. Harayama. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of bacteriology* **182**(8): 2059--2067.
- Komukai-Nakamura, S., K. Sugiura, Y. Y. Inomata, H. Toki, K. Venkateswaran, S. Yamamoto, H. Tanaka & S. Harayama. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **82**(6): 570--574.
- Krieg, N. R. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology volume 1*. Williams & Wilkins, Baltimore: xxvii + 1964 hlm.
- Lestari, S. 2010. Penambahan slow-release fertilizer (SRF) dan bakteri pendegradasi hidrokarbon untuk bioremediasi tanah tercemar hidrokarbon. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok: xiii + 52 hlm.
- Liu, W., Y. Luo, Y. Teng, Z. Li & L. Q. Ma. 2010. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environmental Geochemical Health* **32**: 23—29.
- Madigan, M. T., J. Martinko & J. Parker. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10<sup>th</sup> ed. Prentice Hall International, Inc., New Jersey: xix + 1097 hlm.
- Madigan, M. T., J. Martinko & J. Parker. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13<sup>th</sup> ed. Benjamin Cummings, San Francisco: xxviii + 1044 hlm.
- Madsen, E. L. 2008. *Environmental microbiology from genomes to biogeochemistry*. Blackwell Publishing, Malden: ix + 479 hlm.
- Meier, R. M., I. L. Pepper & C. P. Gerba. 2000. *Environmental microbiology*. Academic Press, San Diago: xix + 585 hlm.
- Miller, J. M. 2005. *Chromatography concepts and contrast*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey: xxvi +490 hlm.
- Niessen, W. M. A. 2001. *Current practice of gas chromatography-mass spectrometry*. Marcel Dekker, Inc., New York: xi + 507 hlm.
- Nugroho, A. 2006. Biodegradasi sludge minyak bumi dalam skala mikrokosmos: simulasi sederhana sebagai kajian awal bioremediasi land treatment. *Makara, teknologi* **10**(2): 82--89.

- Olah, G. A. & A. Molnar. 2003. *Hydrocarbon chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Interscience, Hoboken: xxiv + 871 hlm.
- Pepper, I. L. & C. P. Gerba. 2005. *Environmental microbiology a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed: 2004. Elsevier Inc., London: xvii + 209 hlm.
- Pichtel, J. 2007. *Fundamental of site remediation for metal and hydrocarbon-contaminated soil*. 2<sup>nd</sup> ed. Government Institutes, Plymouth: xxii + 437 hlm.
- Sadouk, Z., A. Tazerouti & H. Hacene. 2009. Biodegradation of diesel oil and production of fatty acid esters by a newly isolated *Pseudomonas citronellolis* KHA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 65--70.
- Sepic, E., C. Trier & H. Leskovsek. 1996. Biodegradation studies of selected hydrocarbons from diesel oil. *Analyst* 121: 1451—1456.
- Talaro, K. P., B. Chess. 2012. *Foundation in microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. McGraw Hill, New York: xxxii + 828 hlm.
- Tsao, C. -W., H. -G. Song & R. Bartha. 1998. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbon in soil. *Applied and environmental microbiology* 64(12): 4924--4929.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation an overview. *Pure Applied Chemistry* 73(7): 1163--1172.
- Wauquier, J. -P. 1995. *Pertroleum refining 1: crude oil, petroleum product, process flowsheets*. Editions technip, Rue Ginoux: xxx + 470 hlm.
- Wongsa, P., M. Tanaka, A. Ueno, M. Hasanuzzaman, I. Yumoto & H. Okuyama. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current Microbiology* 49(2004):415--422.

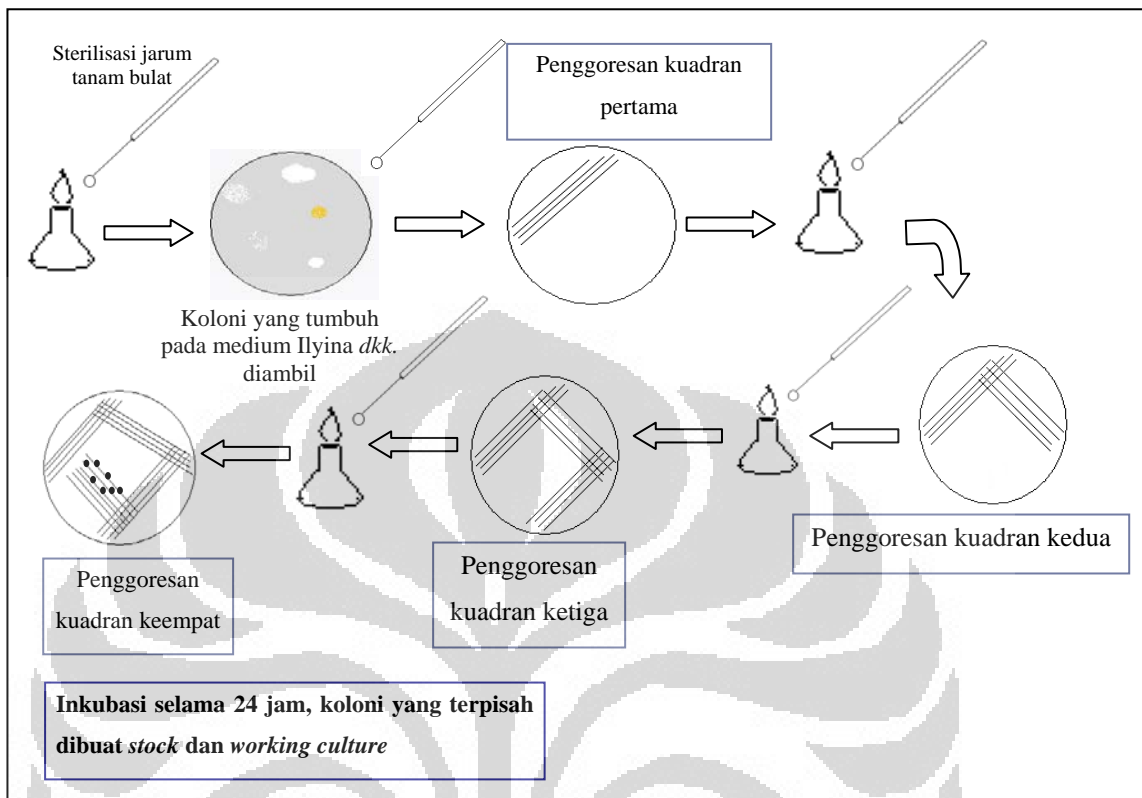
Lampiran 1  
Skema kerja penelitian



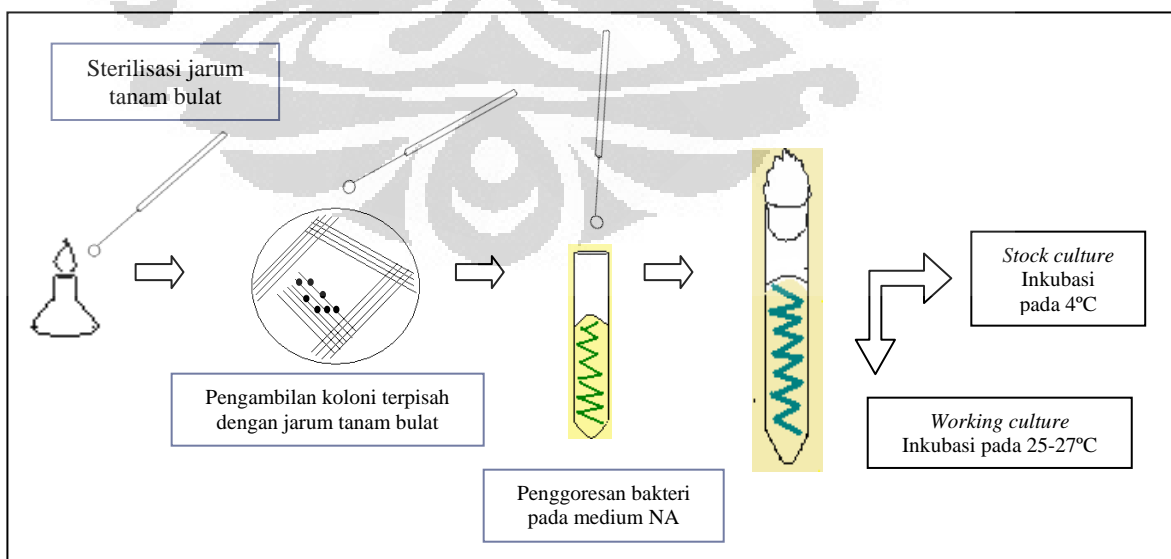
Lampiran 2  
Isolasi bakteri dari tanah tercemar hidrokarbon



Lampiran 3  
Pemurnian isolat dengan *quadrant streak-plate*

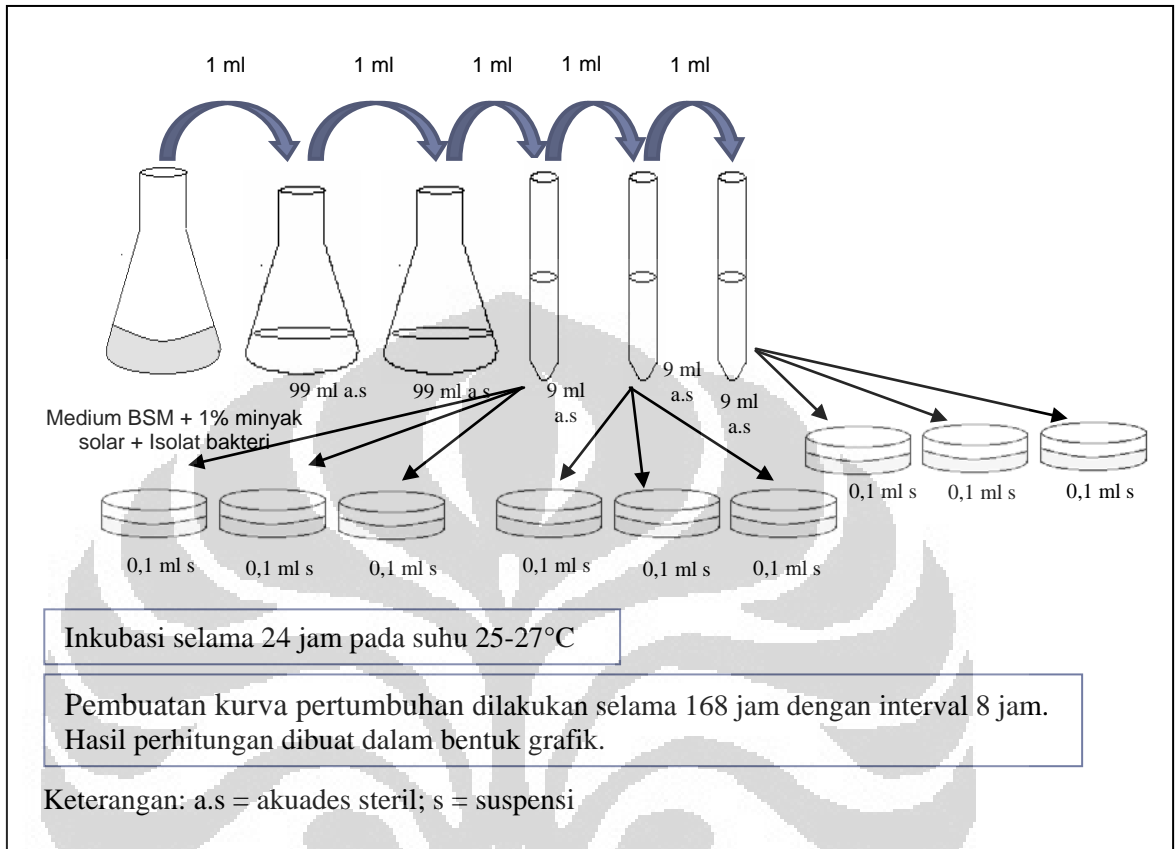


Lampiran 4  
Pembuatan *stock* dan *working culture*





Lampiran 5  
Pembuatan kurva pertumbuhan isolat bakteri



Lampiran 6.

Skema penentuan senyawa hidrokarbon yang mengalami penurunan luas area

