



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN SURFAKTAN TWEEN 80
TERHADAP PROSES BIODEGRADASI PYRENA OLEH
BACILLUS SUBTILIS C19**

SKRIPSI

YONGKI SUHARYA DIPURA
0806460603

FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN SURFAKTAN TWEEN 80 TERHADAP
PROSES BIODEGRADASI PYRENA OLEH *BACILLUS SUBTILIS* C19**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik

**YONGKI SUHARYA DIPURA
0806460603**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
JULI 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 : Yongki Suharya Dipura

NPM : 0806460603

Tanda Tangan : 

Tanggal : 2 Juli 2012

LEMBAR PENGESAHAN

Makalah skripsi dengan judul:

**PENGARUH PENAMBAHAN SURFAKTAN TWEEN 80 TERHADAP
PROSES BIODEGRADASI PYRENA OLEH *BACILLUS SUBTILIS* C19**

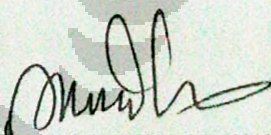
OLEH:

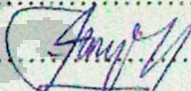
Yongki Suharya Dipura

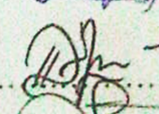
0806460603


Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

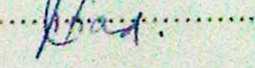
DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M. Eng. (.....) 

Pembimbing 2 : Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S. Si, M. Eng. (.....) 

Penguji 1 : Dianursanti, ST., MT (.....) 

Penguji 2 : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M. Tech (.....) 

Penguji 3 : Dr. Ir. Setiadi, M. Eng (.....) 

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan YME, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi dengan judul Pengaruh Penambahan Surfaktan Tween 80 Terhadap Proses Biodegradasi Pyrena Oleh *Bacillus Subtilis* C19 dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik Jurusan Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

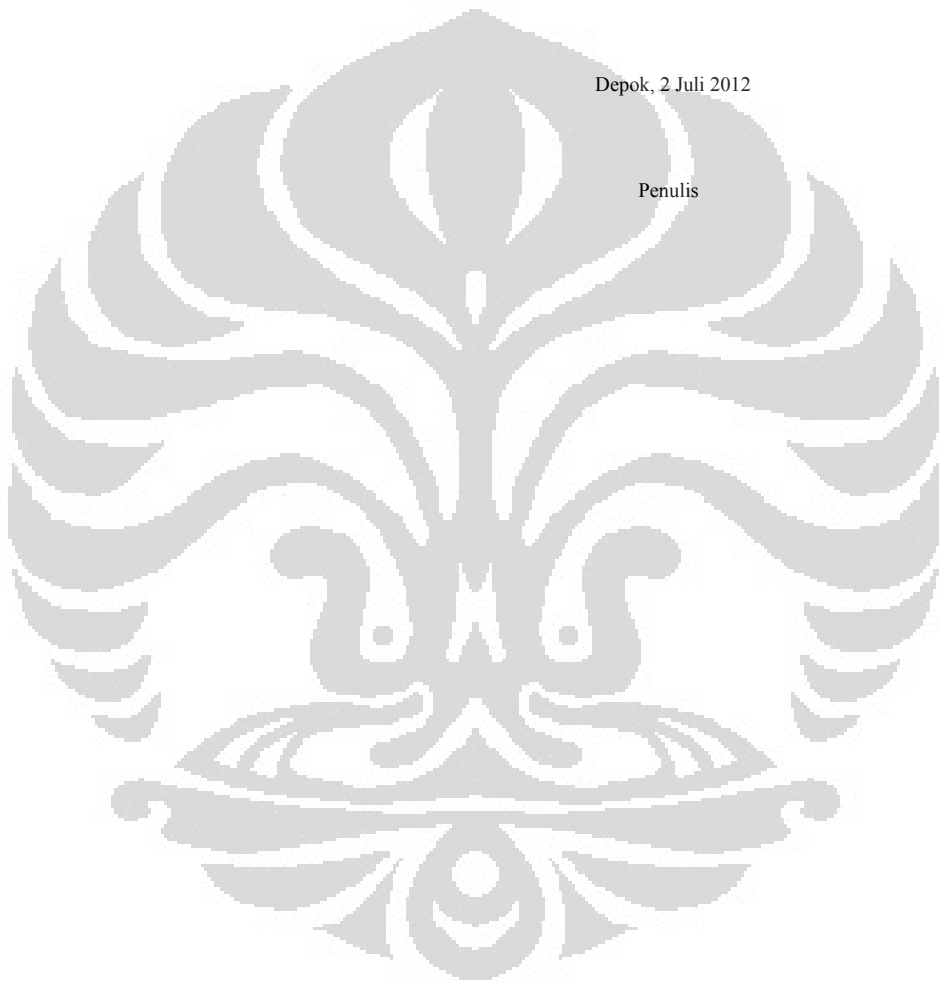
- (1) Bapak Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M. Eng. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Bapak Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S. Si., M. Eng. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (3) Bapak Prof. Dr. Ir. Widodo W. Purwanto, DEA., selaku kepala Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia.
- (4) Ibu Ir. Rita Arbianti, M. Si. selaku pembimbing akademis.
- (5) Ibu Hanif Yuliani, S. Si., M.T. selaku pembimbing dari BPPT yang telah membimbing saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (6) Orang tua dan keluarga Ratmanto yang telah memberikan dukungan tanpa henti.
- (7) Para laboran, Kak Ius, Mas Eko, Kang Jajat, Professor Ijal, Mas Taufik dan para karyawan DTK yang telah memberikan bantuan selama penulis menyelesaikan penelitian dan makalah skripsi.
- (8) Keluarga dan teman-teman Teknik Kimia 2008 atas semangatnya pada waktu mengambil data dan menyelesaikan skripsi ini.

Saya menyadari bahwa makalah skripsi ini masih jauh dari sempurna dengan segala keterbatasan yang ada. Oleh karena itu, semua saran dan kritik yang membangun sangat saya harapkan.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu dan semoga makalah skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 2 Juli 2012

Penulis



HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Yongki Suharya Dipura
NPM : 0806460603
Program Studi : Teknologi Bioproses
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis Karya : Skripsi

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

PENGARUH PENAMBAHAN SURFAKTAN TWEEN 80 TERHADAP PROSES BIODEGRADASI PYRENA OLEH *BACILLUS SUBTILIS* C19

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia /memformatkan, 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 : 2 Juli 2012

Yang menyatakan



(Yongki Suharya Dipura)

ABSTRAK

Nama : Yongki Suharya Dipura
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Pengaruh Penambahan Surfaktan Tween 80 Terhadap Proses Biodegradasi Pyrena Oleh *Bacillus Subtilis* C19

Biodegradasi pyrena sebagai salah satu senyawa *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAHs) dilakukan pada skala kecil dengan menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* C19 dan penambahan surfaktan Tween 80. Biodegradasi dilakukan pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 90 rpm selama 28 hari. Penelitian dilakukan dengan variasi substrat 40, 200, dan 1000 mg/L, dengan konsentrasi sel awal 1% (v/v) media kultur dan dengan variasi tanpa surfaktan, di bawah CMC, pada CMC, dan diatas CMC. Dari penurunan kadar konsentrasi pyrena pada konsentrasi awal 40 ppm, diketahui bahwa Tween 80 tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap proses biodegradasi pyrena oleh *Bacillus subtilis* C19. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari kinerja dari *Bacillus subtilis* C19 dalam mendegradasi senyawa pyrena dan penambahan Tween 80 untuk meningkatkan proses biodegradasi tersebut.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*, biodegradasi, pyrena, surfaktan sintetik, Tween 80.

ABSTRACT

Name : Yongki Suharya Dipura
Study Program : Bioprocess Technology
Judul : The Influence of Surfactant Tween 80 in Pyrene
Biodegradation by *Bacillus Subtilis* C19

Biodegradation of pyrene which is one of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) compound was performed on a small scale by using *Bacillus subtilis* C19 and the addition of surfactant Tween 80. The biodegradation process carried out at room temperature with agitation speed 90 rpm for 28 days. This research was conducted with a variety of substrates 40, 200, and 1000 mg/L, with initial cell concentration 1% (v/v) culture medium and without surfactant, below CMC, at the CMC, and above the CMC. From the decreasing of pyrene concentration on the 40 ppm initial concentration, shows that Tween 80 surfactant did not have a significant influence in pyrene biodegradation process by *Bacillus subtilis* C19. This research was investigated the performance of *Bacillus subtilis* C19 in degrading pyrene and Tween 80 addition to enhance biodegradation process.

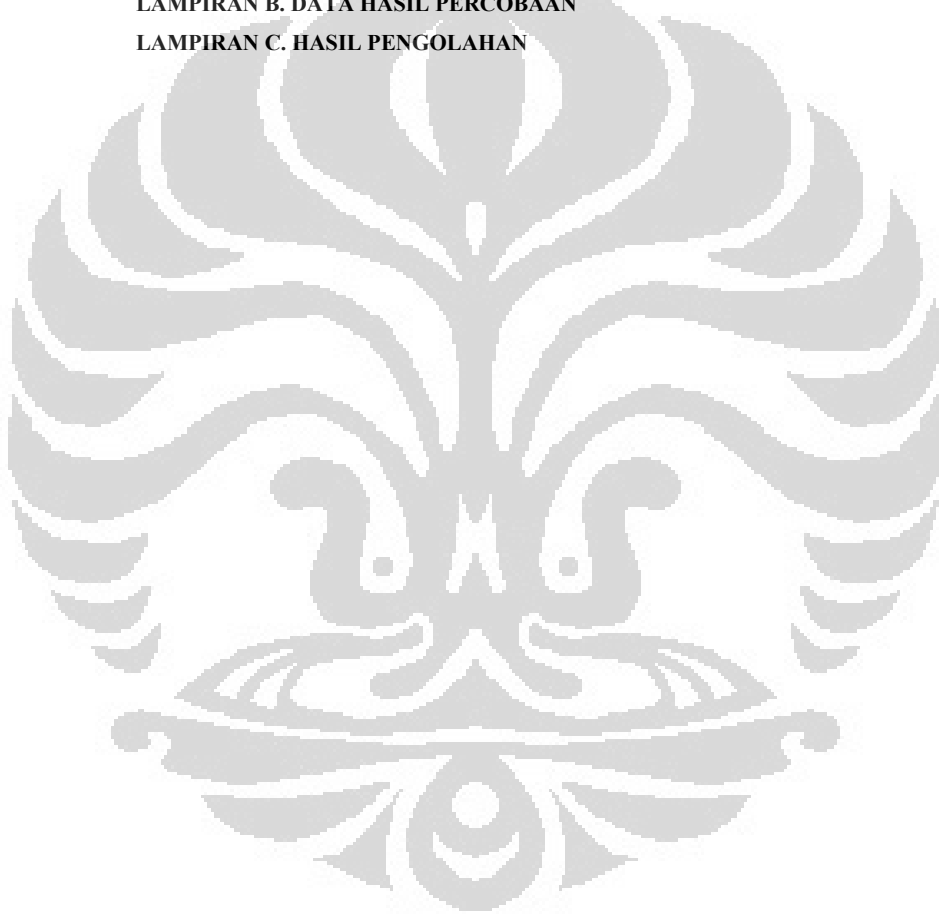
Keywords: *Bacillus subtilis*, biodegradation, pyrene, synthetic surfactant, Tween 80

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.5. Batasan Masalah.....	4
1.6. Sistematika Penulisan.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Limbah Lumpur Minyak Bumi (<i>Oil Sludge</i>).....	6
2.2. <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i> (PAHs).....	8
2.2.1. Pyrena	10
2.2.2. Fenantrena.....	10
2.2.3. Dampak Senyawa PAHs pada lingkungan.....	11
2.3. Biodegradasi	11
2.3.1. Biodegradasi Hidrokarbon Aromatik	13
2.3.2. Faktor-Faktor Pendukung Biodegradasi	14
2.3.3. Faktor-Faktor Pembatas Biodegradasi.....	15

2.4. Mikroorganisme Pendegradasi Pyrena (<i>Bacillus Subtilis</i>)	16
2.4.1. Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus Subtilis</i>	18
2.4.1.1. Fase Pertumbuhan Lambat (<i>Lag Phase</i>).....	20
2.4.1.2. Fase Pertumbuhan Logaritmik (<i>Exponential Phase</i>).....	20
2.4.1.3. Fase Pertumbuhan Stasioner (<i>Stationary Phase</i>).....	20
2.4.1.4. Fase Kematian (<i>Death Phase</i>).....	21
2.4.2. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan.....	21
2.4.3. Biosurfaktan <i>Bacillus Subtilis</i>	23
2.5. Surfaktan	25
2.5.1. Jenis-Jenis Surfaktan	25
2.5.2. <i>Critical Micelle Concentration</i> (CMC)	28
2.5.3. Mekanisme Kerja Surfaktan dalam Proses Biodegradasi	28
2.6. Penelitian yang Telah Dilakukan.....	29
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	33
3.1. Diagram Alir Penelitian.....	33
3.2. Alat dan Bahan Penelitian	34
3.3. Variabel Penelitian	34
3.3.1. Variabel Bebas.....	34
3.3.2. Variabel Terikat	34
3.3.3. Variabel Tetap	35
3.4. Prosedur Penelitian.....	35
3.4.1. Studi Literatur.....	35
3.4.2. Persiapan Penelitian.....	35
3.4.3. Peremajaan Bakteri.....	39
3.4.4. Pembuatan Prekultur Bakteri.....	39
3.4.5. Pembuatan Kultur Uji Biodegradasi.....	39
3.4.6. Pengambilan Data.....	40
3.4.7. Data Pengamatan dan Pengolahan Data	42
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1. Pengaruh Konsentrasi Pyrena pada Proses Biodegradasi.....	45
4.2. Perubahan Konsentrasi Tween 80 pada Proses Biodegradasi.....	47
4.3. Korelasi Pertumbuhan Bakteri terhadap Proses Biodegradasi Pyrena	49

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1. Kesimpulan.....	52
5.2. Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN A. KURVA STANDAR PYRENA	
LAMPIRAN B. DATA HASIL PERCOBAAN	
LAMPIRAN C. HASIL PENGOLAHAN	



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Karakteristik senyawa PAHs (Piskonen dan Itavaara, 2004)	2
Tabel 1.2 Batasan standar kandungan PAH (Malawska dan Wilkomirski, 2001).....	3
Tabel 2.1 Komposisi dan Sifat Fisika dari <i>Crude Oil Sludge</i> (Yuliani, 2004)	8
Tabel 2.2 Sifat fisika dan kimia PAHs (Juhasz dan Naidu, 2000).....	9
Tabel 2.3 Klasifikasi nutrisi bakteri (Baker, 1994).....	19
Tabel 2.4 Klasifikasi bakteri berdasarkan temperatur (Science in the Real World: Microbes in Action, 1999).....	22
Tabel 2.5 Klasifikasi biosurfaktan beberapa mikroorganisme (Pacwa-Plociniczak et al, 2011)	24
Tabel 2.6 <i>State of the art</i>	32
Tabel 3.1 Bahan-Bahan Pembuatan Medium <i>Yeast Extract</i>	36
Tabel 3.2 Komposisi pyrena pada proses pembuatan kurva standar	37
Tabel 4.1 Penentuan konsentrasi substrat pyrena dalam proses biodegradasi	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Limbah lumpur minyak bumi (Sumber: www.aalcar.com)	8
Gambar 2.2	Struktur pyrena (Sumber: http://atropos.as.arizona.edu)	10
Gambar 2.3	Struktur fenantrena (Sumber: http://atropos.as.arizona.edu)	10
Gambar 2.4	Reaksi degradasi hidrokarbon (Hadi, 2004)	14
Gambar 2.5	Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> (Sumber: http://faculty.mc3.edu)	17
Gambar 2.6	Pathway degradasi pyrena oleh <i>Bacillus subtilis</i> menjadi fenantrena (Sumber: http://umbbd.msi.umn.edu)	18
Gambar 2.7	Kurva Pertumbuhan Bakteri (Sumber: http://jovisaputra.wordpress.com)	20
Gambar 2.8	Struktur molekul dasar pada surfaktan (Drew, 1991)	25
Gambar 2.9	Tampilan fisik Tween 80 (Sumber: http://www.growth-medium.com)	27
Gambar 2.10	Struktur kimia Tween 80 (Sumber: http://www.growth-medium.com)	27
Gambar 2.11	<i>Critical Micelle Concentration</i> (Edy Supriyo, 2007)	28
Gambar 2.12	Cara kerja surfaktan dalam proses biodegradasi (Schippers et al, 2000)	30
Gambar 3.1	Diagram Alir Penelitian	33
Gambar 3.2	<i>Shaker</i>	40
Gambar 3.3	Vorteks	42
Gambar 3.4	Spektrofotometer UV-Vis	42
Gambar 4.1	Degradasi pyrena pada konsentrasi awal pyrena 40 ppm (tanpa surfaktan)	47
Gambar 4.2	Degradasi pyrena terhadap waktu pada berbagai variasi surfaktan (40 ppm)	48
Gambar 4.3	Persentase pyrena terdegradasi pada berbagai variasi surfaktan (40 ppm)	49
Gambar 4.4	Korelasi pertumbuhan bakteri dengan penurunan kadar konsentrasi pyrena (40 ppm)	51

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan minyak mentah sebagai sumber energi semakin meningkat seiring peningkatan standar hidup dan pertumbuhan ekonomi. Sehingga untuk memenuhi kebutuhan akan sumber energi yang semakin meningkat ini dilakukan peningkatan proses dalam industri pengilangan minyak bumi. Kegiatan operasi yang terdiri dari eksplorasi, produksi (pengolahan sampai pemurnian), dan penyimpanan sangat berpotensi menghasilkan limbah berupa lumpur minyak bumi (*oil sludge*). Produksi *sludge* minyak sebagai produk samping pengolahan minyak mencapai 200 ton/hari (Helmi et al, 2010).

Remediasi yang dilakukan secara fisik dan kimia terhadap limbah minyak bumi ternyata dikhawatirkan semakin menambah efek toksiknya bagi organisme hidup. Bioremediasi menjadi suatu pilihan alternatif dalam menangani permasalahan pencemaran tersebut. Dengan memanfaatkan *indigenous* ataupun *extraneous* mikrobia seperti *Bacillus subtilis* (Helmi et al, 2010), bioremediasi mampu mengatasi pencemaran hidrokarbon sekaligus ramah lingkungan dan mampu mendestruksi komponen pencemar yang berbahaya (Liu et al, 2010). Di samping itu, bakteri merupakan kelompok dari mikroorganisme yang dominan dalam mendegradasi hidrokarbon di lingkungan. Komponen aromatik pada minyak sukar didegradasi daripada komponen alifatik sehingga membutuhkan bakteri pendegradasi minyak untuk meningkatkan biodegradasinya.

Hidrofobitas senyawa hidrokarbon minyak menjadikan limbah minyak sulit untuk larut dalam air sehingga membatasi kecepatan degradasinya oleh bakteri di perairan maupun di tanah (Angelova dan Schmauder, 1999; Ni'matuzahroh et al, 2003). Dengan adanya perlakuan pemberian surfaktan mampu meningkatkan kelarutan minyak dan meningkatkan ketersediaannya untuk didegradasi oleh bakteri pengurai minyak. Oleh karena itu, jenis dan konsentrasi surfaktan yang digunakan berpengaruh dalam memfasilitasi biodegradasi hidrokarbon oleh *Bacillus subtilis*. Tween 80 merupakan jenis surfaktan yang sering digunakan dalam uji biodegradasi hidrokarbon namun belum pernah

diaplikasikan dalam membantu proses biodegradasi pyrena oleh *Bacillus subtilis* C19. Uji efektivitas penggunaan surfaktan Tween 80 dalam meningkatkan biodegradasi minyak sangat dibutuhkan sebagai upaya untuk menentukan konsentrasi surfaktan yang tepat dalam membantu proses bioremediasi limbah minyak terutama komponen aromatik dalam minyak yang dikenal sangat karsiogenik.

Dalam penelitian ini, pyrena akan digunakan sebagai senyawa yang akan diuji karena pyrena dikenal sebagai salah satu senyawa aromatik pada *oil sludge* yang memberikan kontribusi yang besar pada tingkat toksisitas *oil sludge*.

Tabel 1.1 Karakteristik senyawa PAHs
(Piskonen dan Itavaara, 2004)

Parameter	Karakteristik
Type	<i>Sandy loam</i>
pH	7.7
Kandungan abu (%)	9
WHC (mL g ⁻¹)	0.85
Total PAHs (µg kg ⁻¹)	222,000
<i>Naphthalene</i>	2,410
<i>Acenaphthalene</i>	14,300
<i>Acenaphthene</i>	2,030
<i>Fluorene</i>	5,150
<i>Phenanthrene</i>	20,200
<i>Anthracene</i>	15,200
<i>Fluoranthene</i>	27,000
<i>Pyrene</i>	30,700
<i>Benz[a]anthracene</i>	18,700
<i>Chrysene</i>	17,600
<i>Benzo[b]fluoranthene</i>	10,200
<i>Benzo[k]fluoranthene</i>	16,000
<i>BaP</i>	21,200
<i>Indeno[1,2,3-c,d]pyrene</i>	10,800
<i>Dibenz[a,h]anthracene</i>	1,590
<i>Benzo[g,h,i]perylene</i>	9,100

Tabel 1.2 Batasan standar kandungan PAH
(Malawska dan Wilkomirski, 2001)

Total PAH ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pollution Class	Soil Assessment
< 200	0	Unpolluted (natural content)
200 – 600	I	Unpolluted (increased content)
600 – 1000	II	Slightly polluted
1000 – 5000	III	Polluted
5000 – 10000	IV	Heavily polluted
> 10000	V	Very heavily polluted

Pyrena pada hidrokarbon poliaromatik penyusun limbah lumpur minyak bumi dapat menyebabkan efek kronik pada mamalia seperti gangguan imunologis, reproduktif, serta timbulnya efek fetotoksik dan genotoksik (Mouwerik et al, 1997).

Penelitian ini merupakan kajian awal mengenai proses biodegradasi *oil sludge*, untuk mengetahui pengaruh pemakaian surfaktan Tween 80 dalam proses biodegradasi pyrena oleh *Bacillus subtilis* C19. Dengan adanya penambahan Tween 80 pada proses biodegradasi pyrena diharapkan mampu meningkatkan kinerja dari bakteri *Bacillus subtilis* C19 sehingga dapat mempercepat proses biodegradasi. Kondisi operasi seperti temperatur dan kecepatan *shaker* pada penelitian ini, diasumsikan tetap. Dengan demikian dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui persentase kontaminan pyrena yang terdegradasi dengan adanya penambahan Tween 80 maupun tanpa surfaktan tween 80.

1.2 Perumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Berapa besar efektivitas penggunaan *Bacillus subtilis* dalam mendegradasi pyrena.
2. Pengaruh penambahan Tween 80 dalam proses biodegradasi pyrena yang dilakukan oleh *Bacillus subtilis* C19.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemakaian surfaktan sintetis Tween 80 dalam proses biodegradasi senyawa pyrena yang dilakukan oleh *Bacillus subtilis*.
2. Mengetahui persentase senyawa pyrena yang berhasil terdegradasi pada berbagai variasi surfaktan.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk pengembangan penelitian berikutnya seperti proses biodegradasi fenantrena oleh bakteri-bakteri jenis lain.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioproses.
2. Penelitian ini hanya akan dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan surfaktan sintetis Tween 80 pada proses biodegradasi kontaminan pyrena yang dilakukan oleh *Bacillus subtilis*.
3. Bakteri pendegradasi yang digunakan adalah *Bacillus subtilis* C19.
4. Medium yang digunakan untuk perkembangbiakan bakteri ini adalah *yeast extract*.
5. Surfaktan sintetis yang digunakan adalah Tween 80/Polysorbate 80.
6. Analisis kandungan pyrena menggunakan alat analisa Spektrofotometer UV-Vis.

1.6 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan yang digunakan dalam makalah skripsi ini adalah sebagai berikut:

BAB 1 PENDAHULUAN

Bab ini berisi penjelasan mengenai latar belakang masalah, perumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan makalah.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menjelaskan mengenai teori umum tentang bakteri *Bacillus subtilis*, faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri, proses biodegradasi, dan mekanisme kerja surfaktan.

BAB 3 METODE PENELITIAN

Bab ini berisi penjelasan tentang diagram alir penelitian, alat dan bahan yang digunakan, variabel penelitian, dan prosedur penelitian.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini menyajikan data-data hasil pengamatan dan pengolahannya beserta pembahasannya.

BAB 5 KESIMPULAN

Bab terakhir ini menyajikan kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan berdasarkan hasil yang telah didapat pada bab sebelumnya.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Minyak bumi dalam kehidupan sehari-hari memegang peranan yang strategis, mulai kegiatan memasak, bahan bakar kendaraan bermotor, tenaga listrik, sampai pada bahan dasar industri petrokimia. Sumber limbah minyak bumi pada kegiatan usaha minyak dan gas bumi atau kegiatan lain diantaranya berasal dari limbah hasil pengeboran berupa limbah lumpur dan sumur bor (*cutting*) yang mengandung residu minyak bumi dan tumpahan minyak tersebut pada lahan akibat proses pengangkutan minyak melalui pipa, alat angkut, proses pemindahan minyak atau dari ceceran minyak pada tanah terkontaminasi (Kepmen LH No.128 tahun 2003).

2.1 Limbah Lumpur Minyak Bumi (*Oil Sludge*)

Limbah minyak yang berasal dari minyak mentah terdiri dari ribuan konstituen pembentuk yang secara struktur kimia dapat dibagi menjadi lima famili:

- Hidrokarbon jenuh (*Saturated Hydrocarbons*)

Merupakan kelompok minyak yang dicirikan dengan adanya rantai atom karbon (bercabang atau tidak bercabang atau membentuk siklik) berikatan dengan atom hidrogen, dan merupakan rantai atom jenuh (tidak memiliki ikatan ganda). Termasuk dalam kelompok ini adalah golongan alkana (parafin), yang mewakili 10-40% komposisi minyak mentah. Senyawa alkana bercabang (*branched alkanes*) biasanya terdiri dari alkana bercabang satu ataupun bercabang banyak (isoprenoid), contoh dari senyawa ini adalah pristana, phytana yang terbentuk dari sisa-sisa pigment klorofil dari tumbuhan. Kelompok terakhir dari famili ini adalah naphthana (*Napthenes*) atau disebut juga *cycloalkanes* atau *cycloparaffin*. Kelompok ini secara umum disusun oleh siklopentana dan sikloheksana yang massanya mewakili 30-50% dari massa total minyak mentah.

- Aromatik (*Aromatics*)

Famili minyak ini adalah kelas hidrokarbon dengan karakteristik cincin yang tersusun dari enam atom karbon. Kelompok ini terdiri dari benzene beserta

turunannya (monoaromatik dan polialkil), naphthalena (2 cincin), phenanthren (3 cincin), pyrena, benzantracen, chrysen (4 cincin) serta senyawa lain dengan 5-6 cincin aromatik. Aromatik ini merupakan komponen minyak mentah yang paling beracun, dan bisa memberi dampak kronik (menahun, berjangka lama) dan karsiogenik (menyebabkan kanker). Hampir kebanyakan aromatik bermassa rendah (*low-weight aromatics*), dapat larut dalam air sehingga meningkatkan bioavailabilitas yang dapat menyebabkan terpaparnya organisme didalam matrik tanah ataupun pada badan air. Jumlah relatif hidrokarbon aromatik didalam minyak mentah bervariasi dari 10-30%.

- **Asphalten dan Resin**

Minyak juga dikarakterisasikan oleh adanya komponen-komponen lain seperti aspal (*asphalt*) dan resin (5-20%) yang merupakan komponen berat dengan struktur kimia yang kompleks berupa siklik aromatik terkondensasi dengan lebih dari lima cincin aromatik dan naphthoaromatik dengan gugus-gugus fungsional sehingga senyawa-senyawa tersebut memiliki polaritas yang tinggi.

- **Komponen non-hidrokarbon**

Kelompok senyawa non-hidrokarbon terdapat dalam jumlah yang relatif kecil, kecuali untuk jenis petrol berat (*heavy crude*). Komponen non-hidrokarbon adalah nitrogen, sulfur, dan oksigen, yang biasanya disingkat sebagai NSO. Biasanya sulfur lebih dominan dibanding nitrogen dan oksigen.

- **Porphyrine**

Senyawa ini berasal dari degradasi klorofil yang berbentuk kompleks Vanadium (V) dan Nikel (Ni).

Crude oil sludge pada umumnya terdiri dari senyawa hidrokarbon, *asphaltenes*, *paraffins*, air, dan padatan anorganik seperti pasir, sulfida besi, dan oksida besi. Lebih dari 90% kandungan lumpur minyak bumi adalah material *paraffin*, *asphaltene*, dan hidrokarbon. *Sludge* terbentuk ketika sifat fisika dari *crude oil* berubah karena perubahan kondisi eksternal seperti pendinginan dibawah *cloud point*, evaporasi dari *light fraction* hidrokarbon, pencampuran material yang tidak saling larut (*un-compatible*), dan pembentukan emulsi karena *crude oil* bercampur dengan air. Sifat fisika dari *crude oil sludge* ditunjukkan oleh tabel berikut:

Tabel 2.1 Komposisi dan Sifat Fisika dari *Crude Oil Sludge*
(Yuliani, 2004)

<i>Wax</i>	10 – 40%
<i>Asphaltenes</i>	1 – 10%
Air	0 – 10%
Padatan Anorganik	0 – 5%
<i>Light Hydrocarbons</i>	40 – 80%
Viskositas	60 – 5000 cP
<i>Cloud Point</i>	35 – 45°C
<i>Pour Point</i>	30 – 80°C



Gambar 2.1 Limbah lumpur minyak bumi
(Sumber: www.aalcar.com)

2.2 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

Senyawa hidrokarbon aromatik adalah senyawa yang memiliki cincin benzen yang mempunyai enam atom karbon dengan salah satu atom hidrogen pada setiap karbon. Keadaan ini menyebabkan satu elektron tersisa untuk membentuk ikatan ganda. Senyawa ini sering disebut juga sebagai senyawa hidrokarbon aromatik karena senyawa ini memiliki aroma yang khas dan harum. Senyawa ini termasuk senyawa yang tidak jenuh. Ikatan ganda pada cincin benzen tidak hanya berada pada satu posisi saja, namun selalu berpindah-pindah. Peristiwa ini sering dikenal dengan istilah resonansi. Keadaan inilah yang menyebabkan senyawa aromatik sukar didegradasi dan lebih tahan terhadap beberapa reaksi kimia.

Senyawa aromatik mengandung berbagai senyawa aromatik lainnya seperti PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) yakni senyawa aromatik yang mengandung lebih dari dua cincin benzen. PAH bersifat toksik. PAH yang larut pada konsentrasi 0.1-0.5 ppm dapat menyebabkan keracunan pada makhluk hidup. Sedangkan PAH dalam kadar rendah dapat menurunkan laju pertumbuhan, perkembangan makhluk yang hidup di perairan seperti ikan, hewan berkulit keras, dan moluska. Selain itu hidrokarbon minyak bumi yang terserap ke dalam tubuh biota menimbulkan rasa yang menyengat dan memerlukan waktu tertentu untuk dapat hilang (Marsaoli, 2004).

Tabel 2.2 Sifat fisika dan kimia PAHs
(Juhasz dan Naidu, 2000)

PAH	Cincin	Titik leleh (°C)	Titik didih (°C)	Kelarutan dalam cair (mg/l)
<i>Phenanthrene</i>	3	101	340	1.29
<i>Anthracene</i>	3	216	340	0.07
<i>Fluoranthene</i>	4	111	250	0.26
<i>Benz[a]anthracene</i>	4	158	400	0.014
<i>Pyrene</i>	4	149	360	0.14
<i>Chrysene</i>	4	255	488	0.002
<i>Benz[a]pyrene</i>	5	179	496	0.0038
<i>Dibenz[a,h]anthracene</i>	5	262	524	0.0005

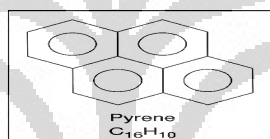
Berikut beberapa senyawa polisiklik aromatik yang sering ditemukan dan berbahaya bagi kesehatan maupun lingkungan:

1. *Naphthalene*
2. *Fluorene*
3. *Anthracene*
4. *Phenanthrene*
5. *Fluoranthene*
6. *Chrysene*
7. *Pyrene*
8. *Benzo [a] anthracene*
9. *Benzo [a] pyrene*

PAH merupakan polutan persisten yang ada dimana-mana di lingkungan (Tama dan Wong, 2008) dan berasal dari pembakaran tidak sempurna atau pirolisis dari bahan organik. Karakter dari senyawa toksik ini bersifat sangat hidrofobik sehingga PAH mudah untuk menempel pada bahan organik dari partikel padat, membentuk mikropolutan yang persisten di lingkungan.

2.2.1 Pyrena

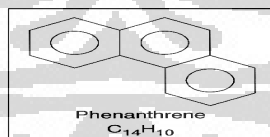
Salah satu contoh senyawa PAH adalah pyrena yang memiliki 4 cincin benzen dan tidak berwarna. Pyrena merupakan salah satu senyawa hidrokarbon aromatik polisiklik yang pemanfaatannya untuk membuat pewarna, plastik, dan pestisida.



Gambar 2.2 Struktur pyrena
(Sumber: <http://atropos.as.arizona.edu>)

2.2.2 Fenantrena

Fenantrena merupakan salah satu senyawa PAH yang biasa ditemukan pada tanah yang tercemar, daerah estuaria dan perairan lainnya. Fenantrena merupakan bentuk paling sederhana dari PAH yang mempunyai bentuk "*bay-region*" dan "*K-region*" sehingga sering digunakan sebagai model substrat untuk mempelajari metabolisme PAH yang karsinogenik.



Gambar 2.3 Struktur fenantrena
(Sumber: <http://atropos.as.arizona.edu>)

2.2.3 Dampak Senyawa PAHs pada lingkungan

PAHs adalah senyawa-senyawa kimia yang terbentuk dari proses pembakaran tidak sempurna pada bahan bakar fosil. Menurut United Nations Environment Programme (UNEP), senyawa PAH merupakan senyawa organik yang berbahaya dan karsinogenik, dimana senyawa tersebut tidak memberikan kontribusi secara langsung dalam pembentukan tumor maupun kanker. Tetapi, dalam sistem metabolisme tubuh senyawa PAH akan diubah menjadi senyawa alkylating dihydrodiol epoxides yang sangat reaktif dan berpotensi menyebabkan tumor dan resiko kanker.

Senyawa PAH juga bisa mengakibatkan kanker paru-paru, kanker kulit, dan kanker kandung kemih. Kontaminan tersebut dapat masuk ke dalam tubuh melalui saluran pernafasan akibat asap rokok maupun asap pabrik yang terhirup, dimana limbah gas tersebut banyak mengandung senyawa PAH di dalamnya. Di samping itu, kontaminan dapat masuk melalui saluran pencernaan melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi. Seperti, memakan ikan yang hidup dalam air yang terkontaminasi senyawa PAH, berinteraksi secara langsung dengan menyentuh tanah atau air yang tercemar PAH, dimana senyawa ini terserap melalui pori-pori kulit walaupun kadarnya rendah.

Senyawa PAH tidak larut dalam air, namun beberapa PAH dapat terlarut ringan tetapi teikat pada partikel kecil dapat mengalami fotodekomposisi. Efek kontaminan PAH pada kesehatan dapat diketahui beberapa tahun setelah terakumulasi dalam tubuh, antara lain dapat mengakibatkan kanker, permasalahan reproduksi, dan membahayakan organ tubuh. Oleh karena itu, dalam standar industri adanya paparan terhadap PAH harus diimbangi dengan berbagai macam pencegahan dampak.

2.3 Biodegradasi

Proses biodegradasi merupakan proses alami oleh mikroorganisme yang mengkonsumsi hidrokarbon dan menghasilkan karbondioksida, air, biomassa, dan oksidasi sebagian hasil ikutan secara biologi. Proses biodegradasi merupakan salah satu oksidasi dasar, dimana enzim bakteri mengkatalisis penempatan oksigen ke dalam hidrokarbon, sehingga molekul dapat digunakan dalam

metabolisme seluler. Beberapa molekul didegradasi secara lengkap menjadi CO₂ dan H₂O, sedangkan yang lain diubah dan digabungkan menjadi biomassa. Parafinik atau fraksi alifatik merupakan fraksi yang paling mudah didegradasi oleh mikroba, sedangkan fraksi naftenik dan aromatik dengan berat molekul lebih tinggi lebih sulit didegradasi.

Keberhasilan proses biodegradasi banyak ditentukan oleh aktivitas enzim. Untuk itu perlu dicari mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim pendegradasi hidrokarbon, kemudian aktivitasnya dioptimalkan dengan pengaturan kondisi dan penambahan suplemen yang sesuai. Disamping faktor lingkungan, pertumbuhan mikroorganisme banyak ditentukan oleh nutrisi yang tersedia. Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya. Dalam kaitan ini sumber C telah tersedia dari hidrokarbonnya sendiri. Senyawa lain yang menjadi faktor pembatas, yaitu N dan P. Kadar kedua unsur ini banyak menentukan aktivitas mikroorganisme, terutama dalam pertumbuhan dan biosintesis unsur pokok bakterial. Nitrogen merupakan unsur pokok protein dan asam nukleat, yaitu unsur makro yang berperan dalam pertumbuhan, perbanyakan sel, dan pembentukan dinding sel. Fosfor merupakan komponen utama asam nukleat dan lemak membran sel yang berperan dalam proses pemindahan energi secara biologis.

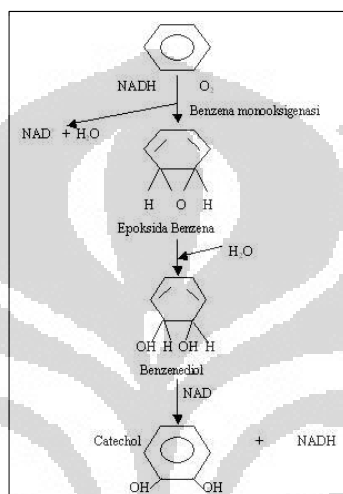
Fosfor berguna untuk pembentukan asam amino, transpor energi dan pembentukan senyawa antara dalam reaksi metabolisme (Leahy dan Colwell, 1990). Beberapa hal yang telah diketahui mengenai biodegradasi senyawa hidrokarbon menurut Cookson adalah sebagai berikut:

- a) Biodegradasi adalah proses aerobik, membutuhkan kelembapan di atas 50% dan pH di bawah 8,5.
- b) Senyawa hidrokarbon rantai pendek dan aromatik ringan akan menguap dan umumnya didegradasi oleh bakteri dalam kondisi terlarut.
- c) Alkana rantai panjang lebih mudah di degradasi daripada alkana rantai pendek. Untuk mendegradasi alkana rantai pendek dibutuhkan kometabolisme.

- d) Alifatik jenuh lebih mudah didegradasi daripada alifatik tidak jenuh. Alifatik rantai bercabang lebih sulit didegradasi daripada alifatik rantai lurus.
- e) Tingkat kesulitan biodegradasi senyawa hidrokarbon alisiklik dan aromatik sangat bergantung pada tipe substitusi, kompleksitas strukturnya, dan untuk senyawa aromatik juga ditentukan oleh jumlah cincin dan atom heterosiklik. Peningkatan kejenuhan pada senyawa aromatik mengurangi tingkat degradasi.
- f) Senyawa aromatik dengan 2 atau 3 cincin jauh lebih mudah didegradasi oleh bakteri dibandingkan dengan senyawa aromatik dengan cincin yang lebih banyak.
- g) Jika diurutkan dari senyawa yang mudah didegradasi sampai yang tersulit didegradasi secara individu senyawa maka urutan tersebut adalah:
 1. senyawa hidrokarbon alifatis rantai lurus
 2. senyawa hidrokarbon alifatis rantai bercabang
 3. senyawa hidrokarbon aromatik dengan berat molekul rendah
 4. senyawa hidrokarbon alisiklik
 5. senyawa hidrokarbon aromatik dengan berat molekul tinggi
 6. senyawa polar (aspal, resin)

2.3.1 Biodegradasi Hidrokarbon Aromatik

Banyak senyawa hidrokarbon aromatik digunakan sebagai donor elektron secara aerobik oleh mikroorganisme seperti bakteri dari genus *Bacillus*. Metabolisme senyawa ini oleh bakteri diawali dengan pembentukan *Protocatechuate* dan *catechol* atau senyawa yang secara struktur berhubungan dengan senyawa ini. Kedua senyawa ini selanjutnya didegradasi menjadi senyawa yang dapat masuk ke dalam siklus Krebs (siklus asam sitrat), yaitu suksinat, asetil KoA, dan piruvat. Gambar 2.4 menunjukkan reaksi perubahan senyawa benzena menjadi *catechol*.



Gambar 2.4 Reaksi degradasi hidrokarbon
(Hadi, 2004)

Pada degradasi komponen, terdapat hal-hal yang harus diperhatikan yang dapat diasumsikan sebagai “*rule of thumb*” pada tahap pertama evaluasi terhadap biodegradasi hidrokarbon (Baker, 1994), yaitu:

- Hidrokarbon jenuh lebih mudah terdegradasi dibandingkan hidrokarbon tak jenuh. Kehadiran ikatan karbon *double* atau *triple* menyulitkan tingkat degradasi.
- Hidrokarbon alifatik secara umum lebih mudah terdegradasi dibandingkan komponen aromatik.

2.3.2 Faktor-Faktor Pendukung Biodegradasi

Keberhasilan proses biodegradasi banyak ditentukan oleh aktivitas enzim. Untuk itu perlu dicari mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim pendegradasi hidrokarbon, kemudian aktivitasnya dioptimalkan dengan pengaturan kondisi dan penambahan suplemen yang sesuai.

Ditemukannya mikroorganisme yang bersifat *degradable* terhadap buangan minyak bumi, perlu ditingkatkan aktivitasnya agar dapat berperan aktif

dalam mendegradasi limbah minyak tersebut. Dalam hal ini perlu diperhatikan faktor-faktor pendukung kegiatan tersebut, yaitu antara lain kandungan air, pH dan suhu, nutrisi yang tersedia, penambahan surfaktan dan ada atau tidak adanya material toksik (Udiharto, 1996).

Kandungan air sangat penting untuk hidup, tumbuh, dan aktivitas metabolik dari mikroorganisme. Tanpa air, mikroorganisme tidak dapat hidup dalam limbah minyak. Mikroba akan hidup aktif pada interfasia antara minyak dengan air. Selain itu, meskipun biodegradasi hidrokarbon minyak bumi dapat berlangsung dalam kondisi anaerobik, bagaimanapun kondisi biodegradasi aerobik lebih efektif, sehingga suplai oksigen yang cukup merupakan faktor penting dalam kesuksesan terjadinya biodegradasi.

Disamping faktor lingkungan, pertumbuhan mikroorganisme banyak ditentukan oleh nutrisi yang tersedia. Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya. Dalam kaitan ini sumber C telah tersedia dari hidrokarbonnya sendiri. Senyawa lain yang menjadi faktor pembatas, yaitu N dan P. Kadar kedua unsur ini banyak menentukan aktivitas pertumbuhan mikroorganisme. Selain unsur-unsur di atas juga diperlukan adanya mineral dan unsur lain yang sesuai dan memadai (Udiharto, 1992).

2.3.3 Faktor-Faktor Pembatas Biodegradasi

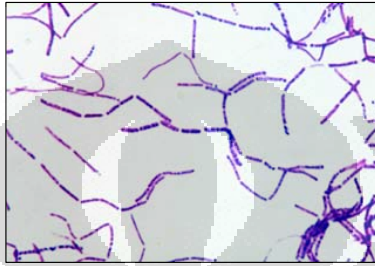
Kemampuan sel mikroorganisme untuk melanjutkan pertumbuhan sampai substrat didegradasi secara sempurna bergantung pada suplai oksigen dan nitrogen sebagai sumber nutrisi. Menurut ilmuwan Dr. D. R. Boone, menjelaskan bahwa nitrogen merupakan nutrisi yang paling penting untuk degradasi bahan bakar. Selain itu, keaktifan mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti temperatur dan pH. Oleh karena itu, kondisi lingkungan yang tidak sesuai dapat menyebabkan mikroba menjadi tidak aktif dalam mendegradasi hidrokarbon. Sebagai contoh, penambahan nutrisi anorganik seperti fosfor dan nitrogen untuk area tumpahan minyak meningkatkan kecepatan bioremediasi secara signifikan.

2.4 Mikroorganisme Pendegradasi Pyrena (*Bacillus subtilis*)

Mikroorganisme pendegradasi minyak bumi dapat ditemukan di tanah, air laut, air tawar, dan sebagainya. Mikroba pendegradasi minyak bumi ini ternyata cukup banyak dan dapat ditemukan di berbagai tempat yang sesuai, yaitu lingkungan yang mengandung cukup limbah minyak bumi. Bakteri yang menyukai hidrokarbon minyak bumi sebagai sumber energi dalam pertumbuhannya disebut bakteri petrofilik. Dari hasil penelitian yang dikemukakan oleh Bossert dan Bartha (1984) dalam Udiharto (1992), telah ditemukan 22 genera bakteri yang hidup di lingkungan minyak bumi. Isolat yang mendominasi di lingkungan tersebut terdiri atas beberapa genera, yaitu *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acentobacter*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, dan *Pseudomonas*.

Bacillus merupakan bakteri yang memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi pada lingkungan tempat tinggalnya sehingga dapat hidup di ekosistem tanah, rawa, maupun perairan. Bakteri ini mampu menggunakan komponen organik sebagai sumber makanannya. Berdasarkan kemampuan adaptasinya yang tinggi umumnya *Bacillus* digunakan untuk mendegradasi senyawa kontaminan organik seperti styrene, trinitrotoluena, hidrokarbon polisiklik aromatik, dan senyawa organik lainnya. *Bacillus* yang umum digunakan dalam degradasi hidrokarbon antara lain adalah *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus pumilus*.

Bacillus subtilis berbentuk basil (batang) dan merupakan bakteri gram positif. Bakteri jenis ini memiliki endospore yang letaknya di tengah. *Bacillus subtilis* mampu bertahan hidup pada suhu 25°C – 45°C.

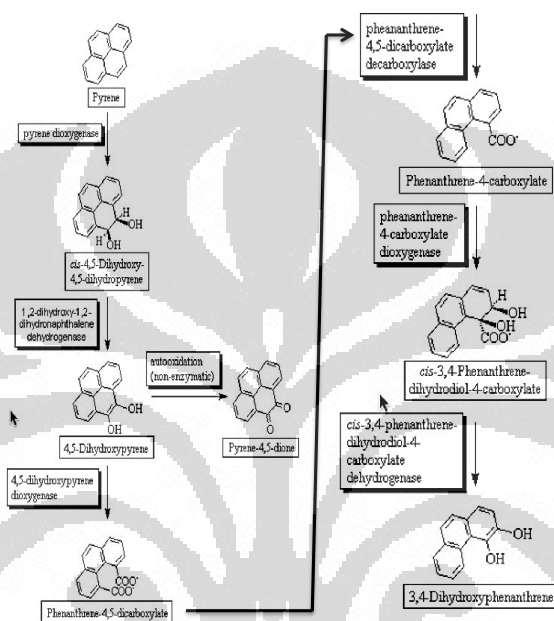


Gambar 2.5 Bakteri *Bacillus subtilis*
(Sumber: <http://faculty.mc3.edu>)

Banyak penelitian yang telah dilakukan berkaitan dengan aktivitas mikroorganisme di lingkungan situs hidrokarbon. Misalnya penelitian yang dikemukakan oleh Butar-butar (2003) menunjukkan bahwa *B. Stearothermophilus* memiliki kemampuan mendegradasi minyak bumi.

Secara umum spesies *Bacillus* memiliki karakteristik yang sama, namun memiliki perbedaan dalam karakteristik biokimianya. Secara umum *Bacillus* memiliki karakteristik sebagai berikut:

- Salah satu kelompok bakteri gram positif dan berukuran $0.5-2.5\mu\text{m} \times 1.0-1.2\mu\text{m}$
- *Bacillus* membentuk spora yang mudah disimpan, mempunyai daya tahan hidup lama, dan relatif mudah diinokulasi ke dalam tanah
- Bersifat aerob maupun anaerob



Gambar 2.6 Pathway degradasi pyrena oleh *Bacillus subtilis* menjadi fenantrena
(Sumber: <http://umbbd.msi.umh.edu>)

2.4.1 Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*

Bakteri bertambah jumlahnya melalui suatu proses yang dinamakan *binary fission*. Pada proses ini, sel bakteri terbagi menjadi dua sel, yang selanjutnya akan membelah lagi menjadi empat sel. Waktu yang dibutuhkan sel bakteri untuk membelah dinamakan waktu generasi. Bakteri memiliki waktu generasi yang berbeda-beda, biasanya dalam menit, jam, hari, maupun minggu. Kurva pertumbuhan ini dibagi menjadi menjadi empat fase pertumbuhan (Baker, 1994).

Selama pertumbuhan dan reproduksi, bakteri membutuhkan molekul-molekul yang tepat untuk mensintesis sel baru. Kurang lebih 95% komponen dalam bakteri terdiri dari karbon, oksigen, nitrogen, hydrogen, dan fosfor. Elemen penting yang dibutuhkan untuk mensintesis sel adalah karbon. Secara umum,

bakteri dapat menggunakan karbondioksida atau karbon organik (benzene, pyrena, dll) sebagai sumber karbon. Bakteri yang menggunakan karbondioksida sebagai sumber karbon disebut sebagai autotroph (*autotrophs*) dan yang menggunakan karbon organik sebagai sumber karbon disebut sebagai heterotrof (*heterothrops*). Selain itu, bakteri juga membutuhkan sumber energi untuk mensintesis komponen sel baru (Baker, 1994).

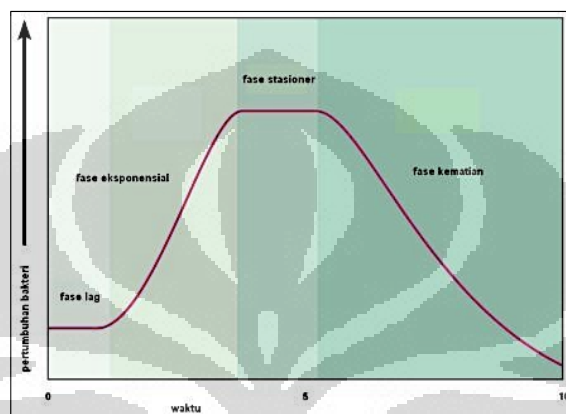
Organisme yang memperoleh energi dari reaksi fotosintesis dengan cahaya sebagai sumber energi disebut fototrof (*phototrophs*). Sedangkan yang memperoleh energi dari oksidasi baik kimia organik maupun inorganik disebut kemotrof (*chemotrophs*). Dengan mengkombinasikan dua kebutuhan (sumber karbon dan sumber energi), maka dapat dibuat pengklasifikasian bakteri menjadi kelompok nutrisi, yang ditunjukkan pada tabel 2.2.

Tabel 2.3 Klasifikasi nutrisi bakteri
(Baker, 1994)

Kelompok	Sumber Karbon	Sumber Energi
Fotoautotrof	Karbon dioksida	Cahaya
Fotoheterotrof	Karbon organik	Cahaya
Kemoautotrof	Karbon dioksida	Kimia organik (seperti pyrena)
Kemoheterotrof	Karbon organik	Kimia organik (seperti pyrena)

Pada kemoheterotrof, bakteri bertanggung jawab untuk mendegradasi kontaminan organik di lingkungan, tetapi tidak semua organisme mampu memetabolisme semua sumber karbon, contohnya adalah bakteri asam laktat yang terbatas pada komponen organik tertentu.

Tipe pertumbuhan bakteri tidak berlangsung dalam periode waktu yang kontinu, namun dipengaruhi oleh lingkungan dan nutrisi yang dikandung didalamnya. Nutrisi ini sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Kurang nutrisi dapat menyebabkan berhentinya pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri dapat digambarkan dalam kurva pertumbuhan seperti pada gambar 2.6.



Gambar 2.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri
(Sumber: <http://jovisaputra.wordpress.com>)

2.4.1.1 Fase Pertumbuhan Lambat (*Lag Phase*)

Pada awalnya, populasi bakteri menunjukkan kondisi dimana tidak terjadi penambahan. Selama fase lag, bakteri melakukan sintesis molekul-molekul yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan replikasi, mensintesis enzim metabolisme, dan beradaptasi dengan lingkungan pertumbuhannya yang baru (*aklimatisasi*).

2.4.1.2 Fase Pertumbuhan Logaritmik (*Exponential Phase*)

Pada fase logaritmik, populasi bakteri meningkat hingga mencapai laju pertumbuhan maksimal. Di fase ini juga ukuran populasi akan berlipat ganda sebagai fungsi dari waktu generasi. Seiring dengan peningkatan jumlah bakteri, maka nutrisi-nutrisi yang tersedia akan semakin berkurang, sehingga mengakibatkan menurunnya laju pertumbuhan bakteri.

2.4.1.3 Fase Pertumbuhan Stasioner (*Stationary Phase*)

Untuk fase stasioner, jumlah bakteri hasil reproduksi sama dengan jumlah bakteri yang mati, sehingga tidak ada penambahan jumlah sel bakteri tersebut. Hal ini dikarenakan, bakteri telah mengolah semua makanan (substrat dan nutrisi)

yang diperlukan bagi perkembangan dan pertumbuhan sel-sel baru diiringi dengan kematian sel-sel bakteri yang telah tua.

2.4.1.4 Fase Kematian (*Death Phase*)

Fase kematian merupakan fase dimana kematian sel-sel tua lebih besar daripada pembentukan sel-sel baru. Kecepatan kematian biasanya merupakan fungsi dari banyaknya bakteri serta mempunyai sifat khas sesuai dengan lingkungannya (kebalikan fase lag). Di fase ini, bakteri terpaksa melakukan metabolisme terhadap protoplasmanya sendiri tanpa penggantian protoplasma yang baru karena makanannya sudah habis. Selama fase ini, terjadi proses *lisis* yaitu proses difusi nutrisi yang keluar dari sel-sel yang masih hidup (*cryptic growth*) dan tingkat reproduksi semakin menurun dan jumlah kematian sel bakteri makin meningkat (Sanseverino et al, 1994).

2.4.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan

Faktor-faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah:

a) Substrat

Semua bakteri membutuhkan substrat sebagai sumber karbon dan energi. Karbon diperlukan untuk pertumbuhan sel dan reproduksi. Sumber karbon dari bakteri adalah senyawa organik. Senyawa organik sebagian terasimilasi ke dalam substansi sel dan sebagian dioksidasi untuk memperoleh energi. Senyawa-senyawa organik alamiah yang banyak terdapat di bumi adalah polisakarida, selulosa, dan pati. Komponen monomer dari senyawa ini yang paling banyak dimanfaatkan adalah glukosa.

Bakteri juga memerlukan mineral-mineral dan zat pelengkap lainnya yang disebut suplemen. Mineral-mineral yang dibutuhkan antara lain mangan, molibden, seng, tembaga dan masih banyak lagi. Sedangkan zat-zat pelengkap yang dibutuhkan terdiri dari 3 kelompok zat, yaitu asam-asam amino, senyawa purin, senyawa pirimidin.

Pada dasarnya kebutuhan nutrisi bakteri hampir sama dengan komposisi dari sel-sel bakteri tersebut. Struktur kimia bakteri diperkirakan mendekati $C_5H_7O_2N$. Karbon diperoleh dari senyawa organik seperti glukosa, tetapi ada juga beberapa yang menggunakan senyawa anorganik, seperti karbonat dan bikarbonat

sebagai sumber karbon. Hidrogen dan oksigen diperoleh dari air. Nitrogen, fosfor, dan sulfur diperoleh dari senyawa organik dan anorganik.

b) Temperatur

Salah satu parameter fisik yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah temperature. Setiap mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada temperatur dengan rentang tertentu. Berdasarkan temperatur, bakteri dapat dibedakan menjadi tiga golongan seperti tampak pada tabel 2.3.

Tabel 2.4 Klasifikasi bakteri berdasarkan temperatur
(Science in the Real World: Microbes in Action, 1999)

Bakteri	Rentang Temperatur (°C)
Termofilik	40 - 80
Mesofilik	10 - 45
Psikrofilik	0 - 35

Banyak reaksi kimia di dalam metabolisme bakteri yang dipengaruhi oleh panas, semakin tinggi temperatur maka semakin baik reaksi kimia yang terjadi. namun akan terjadi saat dimana temperatur dapat merubah struktur enzim sehingga menyebabkan turunnya aktivitas bakteri. Temperatur ini disebut temperatur maksimum dimana bakteri dapat hidup dan beraktivitas.

c) pH

PH mempengaruhi kemampuan mikroorganisme untuk mengadakan transport membran sel dan kesetimbangan dari reaksi katalisis. Kebanyakan bakteri tumbuh dengan subur pada pH netral. Pada pH 5 atau kurang dari itu, pertumbuhan bakteri sangat lambat. Pada umumnya pH harus mendekati 7 dengan rentang 4-10 agar bakteri dapat tumbuh. Untuk oksidasi nitrogen dan fermentasi metana, rentang pH terbatas dari 6-8. Degradasi hidrokarbon menjadi lebih cepat pada pH diatas 7.

Mempertahankan nilai pH tertentu sepanjang pertumbuhan, mempunyai arti penting bagi mikroorganisme. Ada bakteri yang tidak tahan terhadap asam tetapi menghasilkan asam dalam metabolismenya, seperti *Lactobacillus*, *Enterobacteriace*, dan banyak *Pseudomonas*. Hal ini dapat menyebabkan terhentinya pertumbuhan dan menyebabkan kematian. Untuk menghindari kematian bakteri akibat asam dapat digunakan substrat yang tidak dapat diragikan atau dengan mendapatkan media baik. Fosfat anorganik dapat mengembangkan

efek dari dapar tertentu diatas pH 7.2. Kalsium karbonat atau natrium bikarbonat juga dapat ditambahkan untuk menaikkan pH.

PH yang terdapat di lingkungan tidak sepenuhnya disebabkan oleh aktivitas bakteri tetapi juga adanya garam anorganik di dalam tanah dan air mineral. Kemampuan bakteri untuk mengubah pH adalah akibat adanya interaksi antara spesies. Penggunaan karbon dan energi, efisiensi penggunaan substrat, sintesis protein, sintesis berbagai material dan pelepasan produk metabolisme dari sel, sangat dipengaruhi oleh perubahan pH.

d) Oksigen

Bakteri aerob memerlukan oksigen untuk dua tujuan, tujuan yang paling utama adalah sebagai sumber akseptor elektron untuk sistem transport elektron. Sedangkan tujuan yang lain adalah untuk reaksi enzim tertentu. Oksidasi dari hidrokarbon membutuhkan oksigen. Bakteri yang hidup tanpa oksigen tidak dapat mendegradasi hidrokarbon (Kuswardini, 2004).

2.4.3 Biosurfaktan *Bacillus subtilis*

Biosurfaktan merupakan agen aktif permukaan biologis yang diproduksi oleh beberapa mikroorganisme. Sifat-sifat seperti toksisitas dan kemampuan biodegradasi dapat diterima secara lingkungan. Biosurfaktan berfungsi sebagai katalis dan *emulsifier* untuk meningkatkan efisiensi bioremediasi *sludge* minyak. Efisiensi bioremediasi *sludge* dipengaruhi oleh konsentrasi katalis (biosurfaktan) dan karakteristik fisik dari biosurfaktan yang ditambahkan, serta jenis mikroba (tunggal atau konsorsium) dan kondisi lingkungan bioremediasi (Yuliani, 2010).

Ada beberapa kelas biosurfaktan, yaitu:

- a) Glikolipida
- b) Lipopeptida atau lipoprotein
- c) Lipida netral
- d) Fosfolipida
- e) Asam lemak tersubstitusi
- f) Lipopolisakarida

Produksi biosurfaktan jenis lipopeptida secara efektif, surfaktin, pertama dilaporkan untuk strain *Bacillus subtilis*.

Penelitian tentang pengaruh penambahan biosurfaktan terhadap bioremediasi hidrokarbon yang dihasilkan bakteri telah dilakukan oleh Kumar *et al* (2006). Dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa produksi biosurfaktan secara insitu tidak hanya meningkatkan emulsifikasi dari minyak, tetapi juga mengubah adhesi dari hidrokarbon ke permukaan sel bakteri. Penambahan biosurfaktan meningkatkan interaksi sel-sel dan mengubah sifat permukaan sehingga meningkatkan *bioavailability* dan meningkatkan kecepatan degradasi minyak.

Tabel 2.5 Klasifikasi biosurfaktan beberapa mikroorganisme
(Pacwa-Plociniczak et al. 2011)

Biosurfaktan		Mikroorganisme	Referensi
Kelompok	Kelas		
Glikolipid	Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sifour et al (2007), Whang et al (2008), Maier dan Chavez (2000)
		<i>Pseudomonas sp.</i>	
	Trehalopids	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Franzetti et al (2010)
		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
		<i>Arthrobacter sp.</i>	
		<i>Nocardia sp.</i>	
	Sophorolipids	<i>Corynebacterium sp.</i>	
		<i>Torulopsis bombicola</i>	Whang et al (2008)
		<i>Torulopsis petrophilum</i>	Pesce, L. A (2002)
			<i>Torulopsis apicola</i>
Asam lemak, fosfolipid	Corynomylic acid	<i>Corynebacterium lepus</i>	Gerzon dan Zajic (1978)
	Spiculisporic acid	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Ishigami et al (2000), Hong et al (1998)
	Phosphat-dylethanolamin	<i>Acinetobacter sp.</i>	Apanna et al (1995)
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		
Lipopeptida	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	Jennema et al (1983), Awasthi et al (1999)
	Lichenysin	<i>Bacillus licheniformis</i>	Thomas et al (1993)

Polimer	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Zozim et al (1982)
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53	Toren et al (2001)
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	Rosenberg et al (1988)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	Cirigliano et al (1984)
	Mannoprotein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cameron et al (1988)

2.5 Surfaktan

Surfaktan (*surface active agent*) yang dinamakan pula zat aktif permukaan, adalah suatu senyawa yang mempunyai kecenderungan untuk berpusat pada antarmuka (Abou, 1992). Pada membran cair emulsi surfaktan berfungsi sebagai zat penstabil emulsi dengan jalan membentuk lapisan pelindung dan berorientasi pada antarmuka serta menurunkan tegangan antar tetesan terdispersi dan fasa sinambung. Surfaktan mempunyai dua gugus terpisah yaitu gugus hidrofilik yang suka akan polar dan gugus hidrofobik yang suka akan non polar. Bentuk umum molekul surfaktan tampak pada gambar berikut



Gambar 2.8 Struktur molekul dasar pada surfaktan (Drew, 1991)

Bagian hidrofilik bisa bersifat *non ionic*, *ionic*, atau *zwitterionik*, yang terkadang juga memiliki *counter ion*. Rantai hidrokarbon memiliki gaya tarik yang lemah dengan molekul air pada lingkungan *aqueous*, sementara bagian gugus kepala polar atau *ionic* berikatan kuat dengan molekul air.

2.5.1 Jenis-Jenis Surfaktan

a) Anionik Surfaktan

Surfaktan jenis ini merupakan surfaktan yang paling banyak digunakan pada dunia industry, karena biaya pembuatannya yang rendah dan aplikasinya yang luas sebagai detergent. Agar mendapatkan *detergency* yang optimal, rantai

hidrofobik diutamakan yang berbentuk rantai alkil lurus dengan panjang 12-16 atom C. Rantai lurus dipilih karena lebih efektif dan lebih gampang terurai daripada rantai bercabang. Gugus hidrofilik yang sering digunakan ialah karboksilat, sulfat, sulfonat, dan fosfat. Secara umum, formula molekul surfaktan anionik ialah sebagai berikut.

Karboksilat (<i>Carboxylates</i>)	: $C_nH_{2n+1}COO^-X$
Sulfat (<i>Sulfates</i>)	: $C_nH_{2n+1}OSO_3^-X$
Sulfonat (<i>Sulfonates</i>)	: $C_nH_{2n+1}SO_3^-X$
Fosfat (<i>Phosphate</i>)	: $C_nH_{2n+1}OPO(OH)O^-X$

n biasanya berkisar 8-18 atom, dan counterion biasanya Na^+ .

b) Kationik Surfaktan

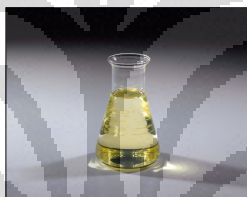
Jenis surfaktan kationik yang paling umum ialah senyawa ammonium kuaterner dengan rumus molekul $R'R''R'''R''''NX^+$, yang mana X biasanya ion klorida dan R merupakan gugus alkil. Surfaktan kationik secara umum ialah kelas *alkyl trimethyl ammonium chloride*, dengan R terdiri dari 8-18 atom C, contohnya ialah *dodecyl trimethyl ammonium chloride*, $C_{12}H_{25}(CH_3)_3NCl$. Surfaktan kationik jenis lain, yang secara umum sering digunakan ialah yang memiliki 2 rantai panjang gugus alkil, dengan panjang rantai 8-18 atom C. Surfaktan dialkil ini kurang larut dalam air, dan menghasilkan struktur multilamellar. Surfaktan jenis tersebut sering digunakan sebagai *fabric softeners*.

c) Amfoterik Surfaktan

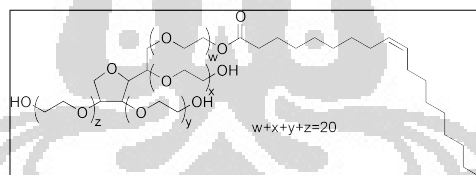
Surfaktan amfoterik memiliki kedua gugus yaitu gugus kationik dan gugus anionik. Jenis paling umum dari surfaktan amfoterik ialah N-alkyl betaines, yang memiliki turunan senyawa berupa trimethyl-glycine, $(CH_3)_3NCH_2COOH$. Salah satu contoh jenis surfaktan betaine adalah laurylamidopropyl dimethylbetaine, $C_{12}H_{25}CON(CH_3)_2CH_2COOH$. Sifat utama surfaktan amfoterik ialah ketergantungan terhadap pH larutan tempat surfaktan tersebut terlarut. Pada larutan asam, molekul surfaktan amfoterik memiliki muatan positif dan bersifat seperti surfaktan kationik, sementara pada larutan alkali surfaktan amfoterik berubah menjadi bermuatan negative dan bersifat seperti surfaktan anionik.

d) Surfaktan Nonionik

Surfaktan nonionik, paling banyak berasal dari *ethylene oxide*, yang bisa juga disebut *ethoxylated surfactants*. Beberapa kelas surfaktan nonionik bisa dibedakan yaitu: *alcohol ethoxylates*, *alkyl phenol ethoxylates*, *fatty acid ethoxylates* dan *ethylene oxide-propylene oxide copolymers*. Kelas surfaktan nonionik yang lain ialah produk senyawa *multihydroxy* seperti *glycol*, *esters*, *glycerol (polyglycerol) esters*, *glucoside* dan *sucrose esters*. *Amine oxide* dan *sulfinyl surfactants* merupakan surfaktan non ionik dengan ukuran gugus kepala yang kecil. Tween 80 merupakan salah satu jenis surfaktan nonionik dimana surfaktan tersebut mudah larut dalam air dingin maupun panas, methanol, toluena, alkohol, minyak biji kapas, dan lain-lain.



Gambar 2.9 Tampilan fisik Tween 80
(Sumber: <http://www.growth-medium.com>)



Gambar 2.10 Struktur kimia Tween 80
(Sumber: <http://www.growth-medium.com>)

Nilai *critical micelle concentration* (CMC) surfaktan nonionik besarnya 2 kali lebih rendah daripada surfaktan anionik yang memiliki panjang gugus alkyl yang sama. Molekul dengan panjang rantai alkyl rata-rata 12 atom C dan memiliki lebih dari 5 unit *ethylene oxide* (EO), bersifat larut dalam air pada suhu ruangan. Bagaimanapun, pada saat suhu larutan ditingkatkan secara perlahan-lahan, larutan

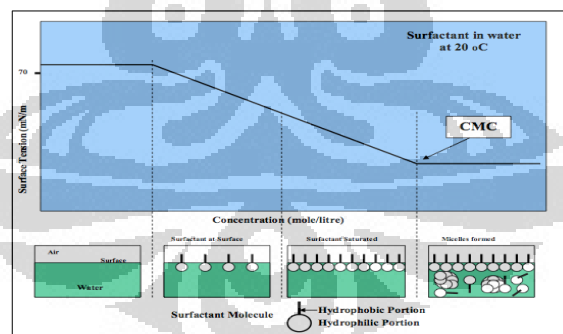
akan menjadi keruh (karena proses dehidrasi rantai EO) dan titik suhu dimana larutan mulai keruh disebut *cloud point* (CP). Pada panjang rantai alkyl tertentu, nilai CP meningkat seiring peningkatan jumlah unit EO pada molekul surfaktan. Secara umum, nilai CP akan menurun jika terjadi peningkatan konsentrasi elektrolit.

2.5.2 Critical Micelle Concentration (CMC)

Critical Micelle Concentration merupakan salah satu sifat penting surfaktan yang menunjukkan batas konsentrasi kritis surfaktan dalam suatu larutan. Diatas konsentrasi tersebut akan terjadi pembentukan *micelle* atau agregat. Pada prakteknya dosis optimum surfaktan ditetapkan disekitar harga CMC.

Penggunaan dosis surfaktan yang jauh diatas harga CMC-nya dapat mengakibatkan terjadinya emulsi balik (*reemulsification*), disamping itu juga secara ekonomis tidak menguntungkan. Cara yang umum untuk menetapkan CMC adalah dengan mengukur tegangan permukaan atau tegangan antar muka larutan surfaktan sebagai fungsi dari konsentrasi.

Makin tinggi konsentrasi surfaktan menyebabkan tegangan muka makin rendah sampai mencapai suatu konsentrasi dimana tegangan antar mukanya konstan. Batas awal konsentrasi mulai konstan disebut CMC. Gambar 2.11 menunjukkan ilustrasi penetapan CMC dari suatu surfaktan dalam air.



Gambar 2.11 *Critical Micelle Concentration* (CMC)
(Edy Supriyo, 2007)

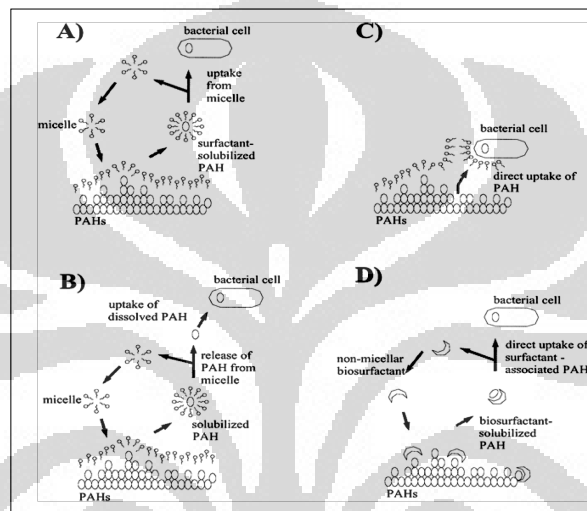
Adsorpsi surfaktan pada permukaan tergantung dari konsentrasinya (Porter, 1994). Pada konsentrasi yang sangat rendah, molekul-molekul bergerak bebas dan dapat berjajar datar di atas permukaan. Dengan meningkatnya konsentrasi, maka jumlah molekul surfaktan di atas permukaan juga meningkat, sehingga tidak ada ruang lagi bagi surfaktan tersebut untuk berjajar datar sehingga mulai bergerak ke satu arah, dimana arahnya tergantung dari sifat grup hidrofilik dan permukaannya. Pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi, jumlah molekul surfaktan yang tersedia sekarang cukup untuk membuat lapisan molekul gabungan (*unimolekular layer*). Konsentrasi ini sangat penting dan dikenal sebagai *critical micelle concentration* (CMC). Pada konsentrasi di atas CMC, tidak nampak adanya perubahan adsorpsi pada permukaan *hydrophobic*, tetapi pada permukaan *hydrophilic* lebih dari satu lapis molekul surfaktan terbentuk menjadi struktur yang teratur yang dikenal sebagai *micelle*. Harga CMC dari surfaktan campuran non-ionik dan anionic dalam minyak yang ada fase air dapat dihitung dari penurunan tegangan antar muka versus log konsentrasi (Opawale dan Burges, 1998)

2.5.3 Mekanisme Kerja Surfaktan dalam Proses Biodegradasi

Kebutuhan akan surfaktan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya proses-proses yang membutuhkan senyawa aktif permukaan. Surfaktan banyak dibutuhkan antara lain dalam proses bioremediasi, industri petrokimia, dan dalam meningkatkan perolehan minyak bumi *Enhanced Oil Recovery* (EOR). Surfaktan dapat dipergunakan untuk mempercepat remediasi lingkungan yang tercemar oleh tumpahan limbah minyak bumi, yaitu dengan meningkatkan daya kelarutan minyak bumi. Selanjutnya pencemar didegradasi oleh sel-sel mikroorganisme, melalui pembentukan butiran-butiran minyak bumi yang terdispersi dalam air.

Peningkatan solubilitas PAHs dengan aplikasi surfaktan sebagai *mobilizing agents*. Efek surfaktan pada *availability* dari senyawa organik digambarkan pada mekanisme utama yaitu: dispersi dari senyawa organik yang tidak larut air (*nonaqueous-phase liquid* (NAPL)), meningkatkan luas area kontak dengan mengurangi tegangan antar permukaan fase air dan fase hidrokarbon (tidak larut air), meningkatkan kelarutan dari polutan, dan menjadi *facilitated*

transport dari polutan organik pada fase padat, dengan mengurangi tegangan permukaan air pada partikel padat.

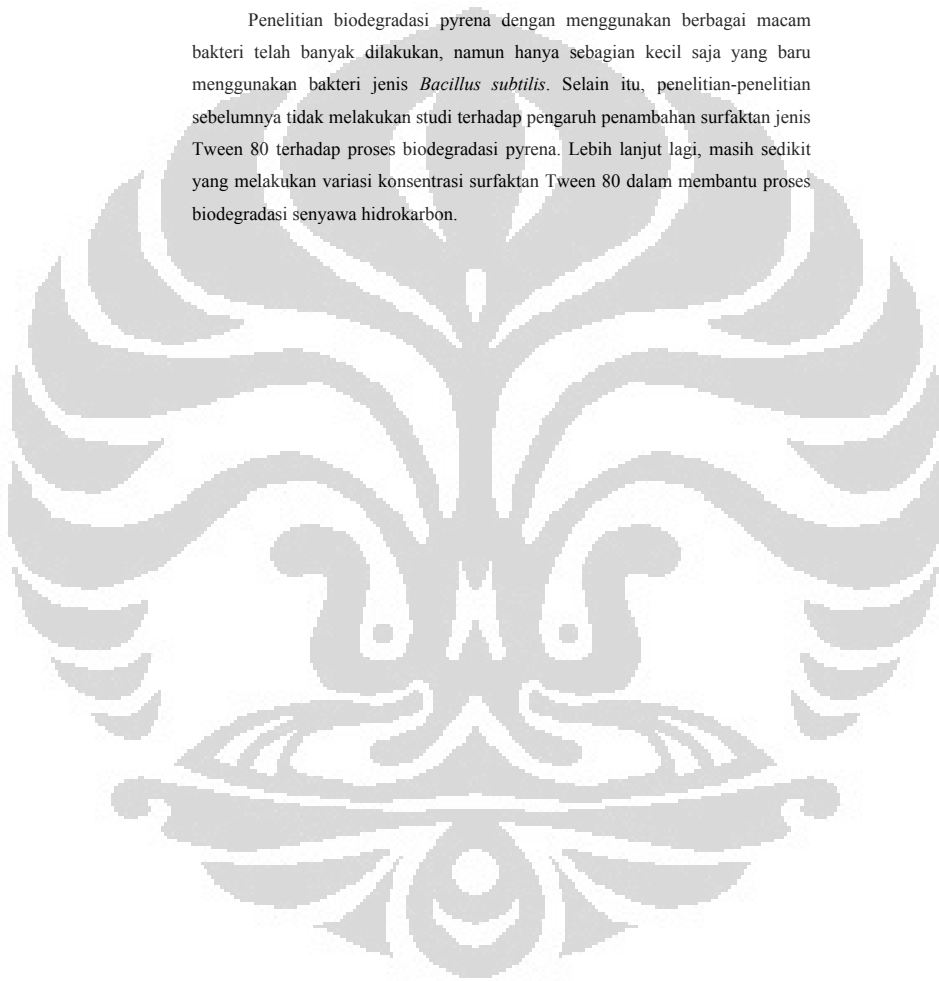


Gambar 2.12 Cara kerja surfaktan dalam proses biodegradasi (Schippers et al, 2000)

Gambar diatas menunjukkan pendekatan mekanisme biodegradasi dengan mediasi surfaktan. Pada pendekatan pertama, sel mikroba dapat mengikat polutan organik dari *micellar core* surfaktan. Pendekatan kedua, surfaktan meningkatkan transfer masa dari polutan kedalam fase air untuk selanjutnya digunakan oleh mikroba. Pendekatan ketiga, penambahan dari surfaktan mengubah *hydrophobicity* dari sel, memfasilitasi kontak langsung sel dengan NAPLs. Dan mekanisme pendekatan keempat adalah surfaktan membantu adsorpsi mikroba pada permukaan partikel padat yang tercemar polutan organik dengan meningkatkan *site of adsorption* dan *site of bio-uptake* dari mikroba.

2.6 Penelitian yang Telah Dilakukan

Penelitian biodegradasi pyrena dengan menggunakan berbagai macam bakteri telah banyak dilakukan, namun hanya sebagian kecil saja yang baru menggunakan bakteri jenis *Bacillus subtilis*. Selain itu, penelitian-penelitian sebelumnya tidak melakukan studi terhadap pengaruh penambahan surfaktan jenis Tween 80 terhadap proses biodegradasi pyrena. Lebih lanjut lagi, masih sedikit yang melakukan variasi konsentrasi surfaktan Tween 80 dalam membantu proses biodegradasi senyawa hidrokarbon.



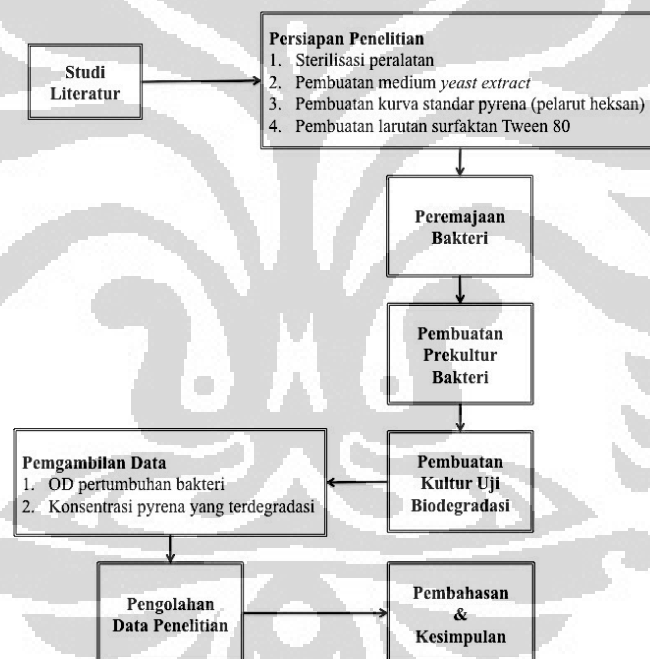
Tabel 2.6 *State of the art*

		Tanpa Surfaktan	Surfaktan Sintetik		
			Brij 35	Triton X-100	Tween 80
Mikroorganisme	Spingomonas	Kazunga <i>et al.</i> , 2000			Park <i>et al.</i> , 2002
	Mycobacterium	Mahanty <i>et al.</i> , 2007 Ramirez <i>et al.</i> , 2000 Liang, 2009 Cottin dan Merlin, 2007	Tiehm, 1993	Tiehm, 1993	Sarma dan Pakshirajan, 2010
	Stenorophomonas maltophilia	Johasz <i>et al.</i> , 2000 Boonchan <i>et al.</i> , 2000	Boonchan <i>et al.</i> , 1998	Boonchan <i>et al.</i> , 1998	
	Agropyron elongatum				Cheng <i>et al.</i> , 2008
	Fungi	Ting <i>et al.</i> , 2010 Eibes <i>et al.</i> , 2005			Pinto dan Moore, 2000
	Bacillus sp.	Kazunga <i>et al.</i> , 2000 Dan <i>et al.</i> , 2006			Penelitian yang dilakukan

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

Pada bab ini, akan dijelaskan mengenai diagram alir penelitian, alat dan bahan penelitian, variabel penelitian, prosedur serta metode pengolahan data hasil observasi yang akan digunakan dalam penelitian ini.

3.1 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Pada bagian berikut akan dijelaskan mengenai beberapa alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini.

Pada penelitian ini akan digunakan peralatan-peralatan sebagai berikut:

1. Seperangkat alat *shaker* yang dibuat dan dirancang oleh Departemen Teknik Kimia.
2. Bejana masak bertekanan sebagai substitusi autoklaf
3. Spektrofotometer UV-Vis (untuk menghitung OD pada 600 nm)
4. Spektrofotometer UV-Vis (untuk menghitung absorbansi pada 348 nm)
5. Alat sentrifuge
6. Mikropipet

Sedangkan untuk bahan penelitian yang digunakan adalah:

1. *Bacillus subtilis* C19 (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia)
2. Pyrena (Sigma-Aldrich)
3. *Yeast extract* (Difco)
4. Heksan (Brataco)
5. Aquadest (Brataco)
6. Alkohol 70% (Brataco)

3.3 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel ini merupakan variabel yang diset pada suatu angka tertentu. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi pyrena dan surfaktan Tween 80.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel ini merupakan variabel yang diukur dengan menggunakan alat. Variabel terikat pada penelitian ini adalah OD pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan konsentrasi pyrena yang terdegradasi.

3.3.3 Variabel Tetap

Variabel tetap dalam penelitian ini adalah suhu dan pH kultivasi, konsentrasi mikroba, dan kecepatan agitasi.

3.4 Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian secara umum dapat dilihat pada gambar 3.1. Masing-masing tahapan tersebut dapat dijabarkan lagi menjadi prosedur-prosedur seperti terlihat pada penjelasan berikut.

3.4.1 Studi Literatur

Studi literatur dilakukan sebelum menjalankan persiapan, semua literatur yang berkaitan dengan penelitian dikumpulkan dan dipelajari.

3.4.2 Persiapan Penelitian

Peralatan seperti tabung reaksi, labu Erlenmeyer, mikrotip, dan medium *yeast extract* yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam bejana bertekanan dalam selang waktu 15 menit atau dengan alkohol 70% sebelum dilakukan perangkaian peralatan riset ini.

a) Sterilisasi Peralatan

Sebelum digunakan, seluruh peralatan untuk riset yang akan bersentuhan langsung dengan *Bacillus subtilis* C19 disterilisasi terlebih dahulu.

Langkah-langkah sterilisasi alat:

1. Pencucian Alat

Peralatan yang digunakan dicuci terlebih dahulu dengan air dan sabun cuci sampai bersih lalu dibilas dengan air sampai tidak terdapat lagi sisa sabun pada peralatan yang digunakan.

2. Pengeringan

Peralatan yang telah dicuci kemudian dibilas sampai bersih, selanjutnya dikeringkan menggunakan tisu kering atau dengan kompresor udara. Kemudian semua peralatan kaca yang memiliki rongga ditutup dengan *aluminium foil* untuk mencegah masuknya kontaminan setelah disterilisasi.

3. Sterilisasi

Peralatan dari kaca/logam disterilisasi menggunakan bejana bertekanan selama kurun waktu 15 menit, sedangkan peralatan dari plastik cukup dibersihkan dengan alkohol 70%.

4. Penyimpanan

Peralatan kaca/logam yang telah disterilisasi selanjutnya disimpan dalam kotak penyimpanan yang kedap udara dan telah disterilisasi sebelumnya.

Hal-hal yang perlu diperhatikan yaitu lingkungan pada lemari kerja dan *transfer box* juga harus bersih dan steril, caranya dengan dilap terlebih dahulu, lalu disemprot dengan alkohol 70% dan diratakan dengan lap/tisu kering dan bersih. Lemari penyimpanan alat dan *transfer box* harus menggunakan lampu UV untuk mencegah pertumbuhan kuman dan dimatikan saat akan digunakan untuk kerja. Dan yang tidak kalah penting yaitu tangan praktikan juga harus selalu bersih, dicuci terlebih dahulu dan dilumuri spray alkohol 70% sebelum memulai kerja atau mengambil data.

Proses sterilisasi dilakukan untuk mencegah kontaminasi pada alat-alat penelitian dari berbagai mikroorganisme yang tidak diharapkan, sehingga alat tersebut berada dalam kondisi steril dan hanya mengandung *Bacillus subtilis*, bakteri yang akan dianalisa. Sterilisasi yang dilakukan memakai bejana bertekanan selama kurun waktu 15 menit. Perhitungan waktu sterilisasi dimulai ketika bejana bertekanan melepas uap. Jika objek yang disterilisasi memiliki ketebalan yang tinggi dan banyak, transfer panas di dalam bejana akan melambat, sehingga dibutuhkan perpanjangan waktu selama 10-15 menit. Perpanjangan waktu juga dibutuhkan ketika larutan dalam volume yang besar akan disterilisasi.

b) Pembuatan Medium *Yeast Extract*

Medium yang digunakan sebagai media kultur pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dalam riset ini adalah medium *yeast extract*. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat larutan medium *yeast extract* yaitu:

Tabel 3.1 Bahan-Bahan Pembuatan Medium *Yeast Extract*

Bahan	Jumlah
<i>Yeast extract powder</i>	1 g
Aquadest	100 mL

Cara membuat satu liter medium:

1. Melarutkan 1 g bubuk *yeast extract* dalam 100 mL aquadest, diaduk sampai seluruh bahan larut.
2. Medium disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit, lalu didinginkan. Cara membuka *autoclave* harus menunggu suhu dan tekanan *autoclave* turun agar tidak berbahaya.
3. Medium yang telah steril dan dingin dapat disimpan dalam lemari pendingin bila tidak langsung digunakan. Apabila terdapat endapan pada dasar medium, harus dipisahkan terlebih dahulu sebelum disimpan.

Pembuatan medium *yeast extract* akan digunakan untuk proses peremajaan bakteri, prekultur bakteri, dan kultur bakteri. Pemilihan *yeast extract* sebagai medium bakteri dikarenakan ketersediaan bahan baku dan nutrisi pada *yeast extract* dianggap mencukupi nutrisi yang diperlukan oleh bakteri *Bacillus subtilis*.

c) Pembuatan Kurva Standar Pyrena (Pelarut Heksan)

Pembuatan kurva standar pyrena menggunakan pelarut n-heksan dan berbagai variasi konsentrasi pyrena. Cara membuat kurva standar pyrena adalah:

1. Melarutkan pyrena dengan berbagai variasi konsentrasi pada 100 mL pelarut n-heksan dengan perbandingan sebagai berikut

Tabel 3.2 Komposisi pyrena pada proses pembuatan kurva standar

No.	Larutan	Pyrena
1.	100 ppm	0.01 g
2.	200 ppm	0.02 g
3.	300 ppm	0.03 g
4.	400 ppm	0.04 g
5.	500 ppm	0.05 g
6.	600 ppm	0.06 g
7.	700 ppm	0.07 g
8.	800 ppm	0.08 g
9.	900 ppm	0.09 g
10.	1000 ppm	0.1 g

2. Melakukan *screening* dengan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm, sehingga didapatkan data absorbansi.

3. Data absorbansi pada setiap panjang gelombang kemudian diolah untuk didapatkan persamaan garis yang memiliki nilai koefisien korelasi yang mendekati 1

Pembuatan kurva standar pyrena bertujuan untuk keperluan pembacaan data spektrofotometer UV-Vis dalam hal mengukur tingkat konsentrasi pyrena yang terdegradasi. Dalam pembuatan kurva standar pyrena, pelarut yang digunakan berupa n-heksan. Pemilihan n-heksan sebagai pelarut, dikarenakan pada tahapan pengambilan sampel akan digunakan n-heksan (pelarut organik) untuk melarutkan kandungan PAHs pada sampel yang diambil. Dengan koefisien korelasi paling baik ($R^2=0.9998$), absorbansi konsentrasi pyrena terdeteksi pada panjang gelombang 348 nm.

d) Pembuatan Larutan Surfaktan Tween 80

Pembuatan larutan surfaktan Tween 80 merupakan proses pengenceran dari surfaktan Tween 80 yang dibeli. Tween 80 memiliki tingkat viskositas yang tinggi dan dibutuhkan dalam jumlah yang sangat sedikit. Oleh karena itu, diperlukan pelarutan pada larutan *yeast extract* terlebih dahulu sehingga mempermudah pada saat pengukuran Tween 80 yang akan dimasukkan. Cara membuat larutan surfaktan Tween 80 sebagai berikut:

1. Larutan *yeast extract* dibuat dengan cara melarutkan 1 g bubuk *yeast* ke dalam 100 mL aquadest.
2. Melarutkan 1.572 mg Tween 80 ke dalam 100 mL larutan *yeast extract* yang telah dibuat (15.72 ppm).
3. Pada saat melakukan variasi penambahan Tween 80, untuk variasi dibawah CMC diperlukan 0.5 mL larutan Tween 80 (10 ppm), pada CMC sebesar 1 mL, (15.72 ppm) dan diatas CMC sebesar 2 mL (20 ppm).

Perhitungan CMC Tween 80 sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{CMC Tween 80} &= 0.012 \text{ mM} & \text{BM Tween 80} &= 1310 \\ \text{mM} &= \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \approx 0.012 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \\ \text{Massa} &= \text{mol} \times \text{Mr} \\ 0.012 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} &\times 1310 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \\ 15.72 \frac{\text{mg}}{\text{l}} &\approx 15.72 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \end{aligned}$$

3.4.3 Peremajaan Bakteri

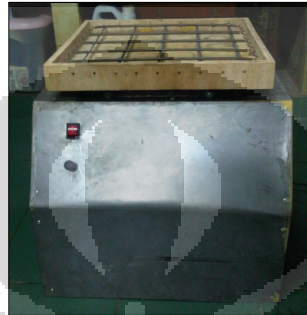
Sebelum tahap eksperimen, bakteri *Bacillus subtilis* C19 diremajakan dalam 100 mL larutan medium *yeast extract*. Perlakuan peremajaan bakteri dikhususkan untuk memperbanyak jumlah bakteri dan optimasi kemampuan bakteri dalam mendegradasi pada proses kultur. Hal ini dikarenakan sebelumnya bakteri tersebut disimpan pada keadaan inaktif dalam media NA di lemari pendingin. Proses peremajaan bakteri dilakukan selama 24 jam dan kecepatan agitasi 90 rpm.

3.4.4 Pembuatan Prekultur Bakteri

Setelah peremajaan bakteri, kemudian dilakukan prekultur bakteri dalam 100 mL larutan medium *yeast extract* yang telah ditambahkan senyawa kontaminan sebesar 10 mg (100 ppm). Hal ini bertujuan untuk mengadaptasikan bakteri terhadap kontaminan dan untuk mendapatkan sumber karbon dari pyrena. Tahapan prekultur bakteri berlangsung selama 48 jam dan bakteri yang diambil berasal dari 2 mL larutan peremajaan. Pemiakan ini dilakukan dalam satu wadah yang bertujuan untuk menyamakan kondisi awal bakteri, salah satunya umur bakteri.

3.4.5 Pembuatan Kultur Uji Biodegradasi

Proses biodegradasi pyrena dilakukan selama 28 hari, menggunakan alat agitasi seperti yang ditunjukkan pada gambar 3.2 pada kecepatan agitasi sebesar 90 rpm dengan memvariasikan konsentrasi pyrena pada 40 ppm, 200 ppm, dan 1000 ppm. Di samping itu, juga divariasikan konsentrasi surfaktan pada masing-masing variasi konsentrasi pyrena yaitu tanpa surfaktan maupun dengan surfaktan dibawah CMC, pada CMC, dan diatas CMC. Proses degradasi ini menggunakan labu Erlenmeyer berukuran 250 mL dan dikondisikan pada suhu ruang. Volume larutan yang dibuat pada kultur uji biodegradasi adalah sebanyak 100 mL pada masing-masing variasi.

Gambar 3.2 *Shaker*

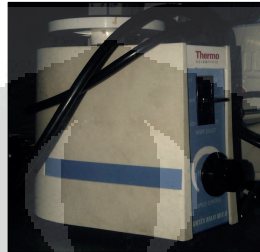
Tahapan-tahapan pembuatan larutan kultur adalah sebagai berikut:

1. Membuat larutan *yeast extract* dengan 1 g bubuk *yeast* dan 100 mL aquadest
2. Menambahkan kontaminan pyrena pada berbagai variasi konsentrasi (0,004 g, 0,02 g, dan 0,1 g)
3. Menambahkan berbagai variasi konsentrasi surfaktan Tween 80 pada larutan *yeast extract* (tanpa surfaktan, 0,5 mL Tween 80, 1 mL Tween 80, dan 2 mL Tween 80)
4. Setelah penambahan berbagai senyawa, kemudian erlenmeyer ditutup dengan kapas, kassa, *aluminium foil*, dan kertas *wrap*. Selanjutnya, erlenmeyer di sterilisasi dengan bejana bertekanan selama 15 menit (*autoclave*)
5. Setelah proses sterilisasi selesai, dilanjutkan dengan proses pendinginan selama 20 menit dan dimasukkan dengan larutan prekultur sebesar 1 mL. Pada tahapan ini, pengerjaan dilakukan di dalam *transfer box* untuk menjaga sterilisasi.
6. Meletakkan erlenmeyer pada alat shaker dengan kecepatan agitasi 90 rpm dan suhu ruang.

3.4.6 Pengambilan Data

Proses pengambilan sampel dilakukan sebanyak 1 x 48 jam selama 28 hari. Pengambilan sampel sebesar 6 mL dalam setiap pengambilan dengan

pembagian 1 mL untuk cek OD pertumbuhan bakteri dan 5 mL untuk cek absorbansi. Proses pengambilan sampel dilakukan di dalam *transfer box* untuk meminimalisir kontaminasi pada larutan kultur dan menggunakan mikropipet 1mL. Setelah pengambilan sampel, langkah selanjutnya adalah melakukan pengecekan OD pertumbuhan bakteri dengan spektrofotometer UV-Vis. Sebelum dilakukan pengujian, larutan sampel diencerkan (1:4) dikarenakan larutan sampel berwarna kuning pucat. Tujuan dari pengenceran tersebut adalah sensitivitas spektrofotometer UV-Vis adalah pada rentang absorbansi 0.2-0.8. Blanko yang digunakan pada pengujian OD adalah larutan *yeast extract*. Setelah melakukan pengujian OD, sampel (5 mL) selanjutnya dilakukan proses pemisahan pyrena dengan menggunakan metode *liquid-liquid extraction* dengan menggunakan pelarut n-heksan (Mukherjee dan Das, 2006). Di samping itu, penggunaan alat vorteks dalam membantu proses pelarutan pyrena pada heksan juga dijelaskan pada literatur tersebut. Selanjutnya, didapatkan tiga fase pada proses ekstraksi tersebut (fase n-heksan, fase emulsi, dan fase larutan kultur). Emulsi yang terbentuk pada proses ekstraksi dikarenakan adanya aktivitas surfaktan maupun biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri, sehingga menurunkan tegangan antar permukaan air dan pelarut organik sehingga terjadi emulsi yang stabil. Terbentuknya emulsi selama proses ekstraksi, maka dilakukan proses pemisahan emulsi secara fisika yaitu dengan sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan untuk memaksimalkan larutan n-heksan yang didapat karena pada larutan n-heksan sudah terlarut senyawa PAHs yang akan diuji absorbansinya. Pada proses sentrifugasi, kecepatan yang digunakan adalah 10.000 rpm selama 10 menit (Mukherjee dan Das, 2006). Supernatan digunakan untuk melakukan cek absorbansi pyrena yang terlarut pada panjang gelombang 348 nm.



Gambar 3.3 Vorteks

3.4.7 Data Pengamatan dan Pengolahan Data

Beberapa variabel yang diukur pada eksperimen ini adalah *Optical Density* (OD 600), konsentrasi pyrena, dan pH. Pertumbuhan bakteri pendegradasi ditentukan berdasarkan tingkat kekeruhan pada sampel sehingga dilakukan pengukuran OD. OD dan konsentrasi pyrena diukur dengan menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm dan 348 nm sedangkan untuk pH diukur dengan menggunakan indikator universal.



Gambar 3.4 Spektrofotometer UV-Vis

Data absorbansi ($\lambda=600$ nm) dari spektrofotometer dimasukkan ke dalam grafik OD pertumbuhan bakteri terhadap waktu. Nilai absorbansi memberikan besarnya OD (*optical density*) yang menunjukkan besarnya konsentrasi sel (biomassa) yang tumbuh dalam medium. Satuan absorbansi ($\lambda_{600\text{nm}}$) ini sebanding dengan besarnya konsentrasi sel (X) dalam g/L basis kering (Juang *et al.*, 2006). Sedangkan untuk data absorbansi ($\lambda=348$ nm), dimasukkan ke dalam persamaan

garis yang telah didapatkan dari kurva standar pyrena, sehingga didapatkan konsentrasi pyrena persatuan waktu dan kemudian diolah agar diperoleh persentase pyrena terdegradasi. Data pH yang diperoleh dari pengukuran digunakan untuk membahas kecenderungan perubahan pH yang terjadi akibat adanya aktivitas metabolisme bakteri dalam mengkonsumsi substrat di masing-masing konsentrasi.



BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, pertumbuhan *Bacillus subtilis* berlangsung secara aerobik, dimana bakteri memerlukan asupan oksigen untuk metabolismenya. Oksigen mampu diperoleh bakteri dalam bentuk oksigen bebas yang terdapat di udara, tanah, serta oksigen yang terlarut dalam air. Dalam skala laboratorium, penambahan oksigen dapat dilakukan dengan agitasi. Sehingga, agitasi menyebabkan terjadinya kontak yang lebih intensif antara bakteri dengan senyawa pyrena sehingga degradasi oleh *Bacillus subtilis* C19 dapat berlangsung lebih cepat. Pertumbuhan ini diamati dalam 12 erlenmeyer, masing-masing berisi 100 mL larutan medium, surfaktan Tween 80, dan bakteri dengan menggunakan alat pengocok (*shaker*) untuk proses homogenisasi larutan dan memudahkan terjadinya proses difusi pyrena ke dalam larutan medium yang berisi bakteri dan surfaktan. Kecepatan guncangan yang digunakan adalah 90 rpm dengan variasi konsentrasi kontaminan pyrena masing-masing sebesar 40 ppm, 200 ppm, dan 1000 ppm. Pemilihan variasi konsentrasi substrat tersebut didasarkan pada kajian pada literatur-literatur yang ada sebelumnya. Hasil-hasil literatur yang telah dikaji pada tabel 4.1 menjadi dasar pemilihan kecepatan agitasi 90 rpm, variasi konsentrasi pyrena, dan waktu kultur pada penelitian ini

Tabel 4.1 Penentuan konsentrasi substrat pyrena dalam proses biodegradasi

Mikroba	Konsentrasi Awal Substrat	% Degradasi (Hari)	Referensi
<i>Proteus vulgaris</i>	0.5 mg/mL pyrene	71.5 % , (7 hari)	Ceyhan, 2011
<i>Bacillus subtilis</i> <i>P. aeruginosa</i>	250 mg/100 mL pyrene	ST 30 mN/m ST 45 mN/m	Das and Mukherjee, 2006
<i>Paracoccus</i> <i>Aminovorans</i>	40 mg/l chrysene	85.2 % , (8 hari)	Yu-bin et al, 2011
<i>Candida viswanathii</i>	100 mg/200 mL PAHs	89.7% <i>naphthalene</i> 77.21% <i>phenanthrene</i> 60.77% <i>pyrene</i>	El-Latief Hesham, 2009
<i>Spingomonas sp.</i>	100 mg/l	100-85 mg/l, (7 hari)	Supaka et al, 2000

<i>Mycobacterium</i> <i>Spingomonas</i> <i>Terrabacter</i> <i>Sphingopyxis</i> <i>Spinngobium</i> <i>Rhodococcus</i>	100 mg/l	Identifikasi gen	Zhou et al, 2006
<i>Ochrobactrum sp</i>	50 mg/l	20 %BaP, (80 hari)	Yirui et al, 2008
<i>Pseudomonas putida</i>	200 mg/l	68±2 % pyrena, (5 hari)	Kumar et al, 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	50 mg/l	84.66 %, (28 hari)	Lily et al, 2009

Di samping itu, juga dilakukan 4 variasi penambahan surfaktan pada masing-masing variasi kontaminan dengan susunan tanpa surfaktan, dibawah CMC, pada CMC, dan diatas CMC. Pemilihan konsentrasi surfaktan Tween 80 pada penelitian ini berdasarkan pada perhitungan angka CMC yang ada.

4.1 Pengaruh Konsentrasi Pyrena pada Proses Biodegradasi

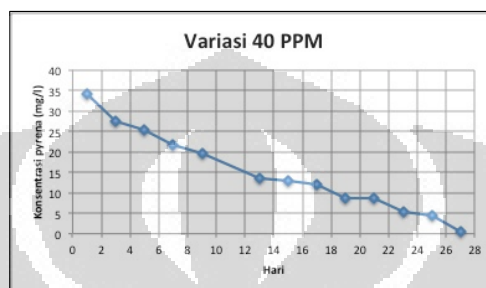
Penelitian ini merupakan proses degradasi pyrena oleh *Bacillus subtilis* C19 pada konsentrasi 40 ppm, 200 ppm, dan 1000 ppm. Pyrena memiliki sifat yang tidak mudah larut dalam air (kelarutan dalam air = 0.135 mg/l) dan mudah larut pada pelarut organik. Namun, penelitian ini tidak digunakan pelarut organik dalam melarutkan senyawa kontaminan tersebut dikarenakan penyesuaian pada kondisi lapangan yang tidak menggunakan pelarut organik dalam mengatasi pencemaran limbah minyak baik di laut maupun di darat. Di samping itu, pemakaian pelarut organik umumnya memberikan dampak negatif pada pertumbuhan bakteri yang digunakan untuk mendegradasi. Untuk itu, diberikan perlakuan penambahan surfaktan pada penelitian ini untuk meningkatkan tingkat kelarutan senyawa pyrena sehingga dapat dikonsumsi oleh bakteri sebagai sumber karbon. Dengan menggunakan alat pengocok pada kecepatan agitasi 90 rpm, diharapkan pyrena mampu terdifusi ke seluruh medium yang berisi *Bacillus subtilis* dan Tween 80.

Gambar 4.3 menunjukkan grafik degradasi pyrena terhadap waktu, dengan variasi konsentrasi pyrena 40 ppm (suhu ruang dan tekanan 1 atm). Dari grafik

tersebut terlihat bahwa pada variasi konsentrasi pyrena 40 ppm memiliki kecenderungan untuk terdegradasi oleh bakteri pendegradasi. Penurunan konsentrasi pyrena dikarenakan karbon pada kontaminan digunakan sebagai sumber karbon pada proses metabolisme *Bacillus subtilis*, dimana bakteri tersebut merupakan jenis bakteri kemoheterotrof (Baker, 1994). Namun, pada konsentrasi 200 dan 1000 ppm tidak terjadi penurunan kadar konsentrasi pyrena. Hal ini disebabkan karena adanya beban substrat yang lebih banyak untuk dikonsumsi oleh bakteri. Maka semakin besar konsentrasi pyrena, waktu yang diperlukan melarutkan/mendegradasi pyrena menjadi lebih lama. Teori tersebut sejalan dengan pengamatan yang ada, untuk konsentrasi pyrena 40 ppm, endapan pyrena sudah terlarut sempurna pada hari ke-1. Untuk konsentrasi pyrena di 200 ppm, endapan baru terlarut sempurna di hari ke-5. Sedangkan untuk konsentrasi 1000 ppm, masih terdapat banyak endapan di hari ke-27 pada saat pengambilan data terakhir.

Konsentrasi pyrena yang tinggi menyebabkan efek jenuh pada larutan sehingga mengakibatkan banyaknya endapan pyrena pada konsentrasi-konsentrasi kontaminan yang tinggi. Dengan konsentrasi pyrena yang besar maka diperlukan juga waktu yang lebih lama dan jumlah pelarut yang lebih besar untuk melarutkan senyawa pyrena tersebut. Selain itu, kecepatan agitasi juga berpengaruh pada kecepatan pelarut dalam melarutkan. Tetapi di penelitian ini tidak dilakukan peningkatan agitasi dikarenakan kecepatan agitasi yang besar membutuhkan energi yang besar pada saat diaplikasikan pada proses bioremediasi limbah minyak.

Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi. Unsur senyawa karbon harus berada dalam komposisi yang tepat agar tercapai proses biodegradasi yang optimal. Tersedianya komposisi karbon yang terlalu rendah akan menghalangi perkembangbiakan bakteri sedangkan komposisi yang terlalu tinggi akan menyebabkan proses degradasi berlangsung lebih lambat sehingga diperlukan waktu yang lebih lama untuk mendegradasi sempurna senyawa pyrena tersebut (Alexander, 1994).



Gambar 4.1 Degradasi pyrena pada konsentrasi awal pyrena 40 ppm (tanpa surfaktan)

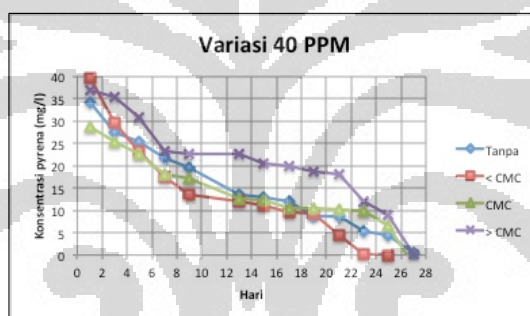
Konsentrasi akhir dan persen pyrena yang terdegradasi untuk masing-masing variasi dapat dilihat pada tabel di lampiran. Persen terdegradasi pyrena adalah perbandingan antara jumlah pyrena yang terdegradasi oleh bakteri terhadap konsentrasi awal pyrena. Dilihat dari persen terdegradasi, bahwa semakin besar konsentrasi pyrena maka persen pyrena yang terdegradasi semakin kecil. Hal ini karena bakteri pada konsentrasi kontaminan yang besar, membutuhkan waktu yang relatif lama untuk mensintesis sumber karbon yang ada untuk digunakan sebagai penunjang proses metabolisme.

4.2 Perubahan Konsentrasi Tween 80 pada Proses Biodegradasi

Variasi konsentrasi surfaktan Tween 80 adalah dibawah CMC, pada CMC, dan diatas CMC. Dasar pemilihan variasi konsentrasi ini dikarenakan CMC Tween 80 sebesar 0.01572 g/l, sehingga dipilih konsentrasi di bawah dan di atas kelarutan, untuk mengetahui optimasi konsentrasi Tween 80 baik di bawah maupun diatas kelarutannya mampu membantu kinerja bakteri *Bacillus* dalam mendegradasi kontaminan.

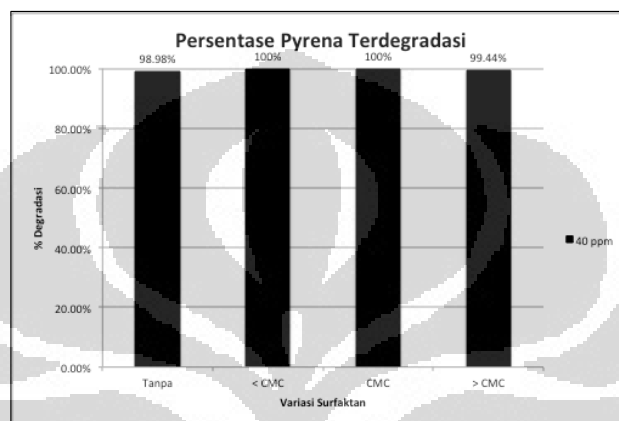
Pada gambar 4.4, dijelaskan tentang grafik degradasi pyrena terhadap waktu, dengan melakukan variasi pada konsentrasi Tween 80. Pada grafik, dapat dilihat bahwa konsentrasi kontaminan 40 ppm pada berbagai variasi penambahan surfaktan menunjukkan kecenderungan untuk didegradasi oleh *Bacillus subtilis*. Grafik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara penambahan

Tween 80 di berbagai variasi maupun tanpa surfaktan. Pada variasi tanpa surfaktan, bakteri *Bacillus* mampu memproduksi biosurfaktan sendiri untuk membantu bakteri dalam memenuhi kebutuhan karbon yang diperlukan untuk metabolisme. Pada dasarnya, bakteri memiliki sifat untuk memproduksi biosurfaktan sendiri apabila berada dalam keadaan tertekan yang diakibatkan minimnya ketersediaan nutrisi. Biosurfaktan yang memiliki komposisi kimia sama (memiliki kecocokan) dengan materi terselubung sel bakteri, serta memiliki nilai HLB (*Hydrophile Lipophile Balance*) rendah berpotensi sebagai transporter substrat yang lebih efisien ke dalam sel bakteri.



Gambar 4.2 Degradasi pyrena terhadap waktu pada berbagai variasi surfaktan (40 ppm)

Data yang didapat berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Dong Zhang dan Lizhong Zhu (2012) dimana konsentrasi surfaktan yang tepat sangat berpengaruh dalam memfasilitasi biodegradasi pyrena. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan adanya penambahan surfaktan sintetik Tween 80 tidak akan selalu memfasilitasi proses biodegradasi yang ada pada berbagai jenis bakteri yang digunakan. Kondisi tersebut terbukti pada penambahan Tween 80 tidak mempengaruhi proses pertumbuhan bakteri atau memberikan peningkatan yang signifikan pada proses degradasi yang dilakukan oleh *Bacillus subtilis*.



Gambar 4.3 Persentase pyrena terdegradasi pada berbagai variasi surfaktan (40 ppm)

Di samping itu, apabila ditinjau dari persentase pyrena yang berhasil terdegradasi pada gambar 4.5, didapatkan persentase yang hampir tidak ada perbedaan yang cukup jauh (40 ppm) untuk berbagai variasi surfaktan. Variasi tanpa surfaktan menunjukkan respon yang sama dengan variasi dengan surfaktan. Penyebabnya adalah tidak tercukupinya sumber karbon bagi metabolisme bakteri dikarenakan kelarutan pyrena yang kecil. Oleh sebab itu, bakteri menghasilkan surfaktin (biosurfaktan) sebagai transporter substrat yang lebih efisien ke dalam sel bakteri (Jacobucci et al, 2001).

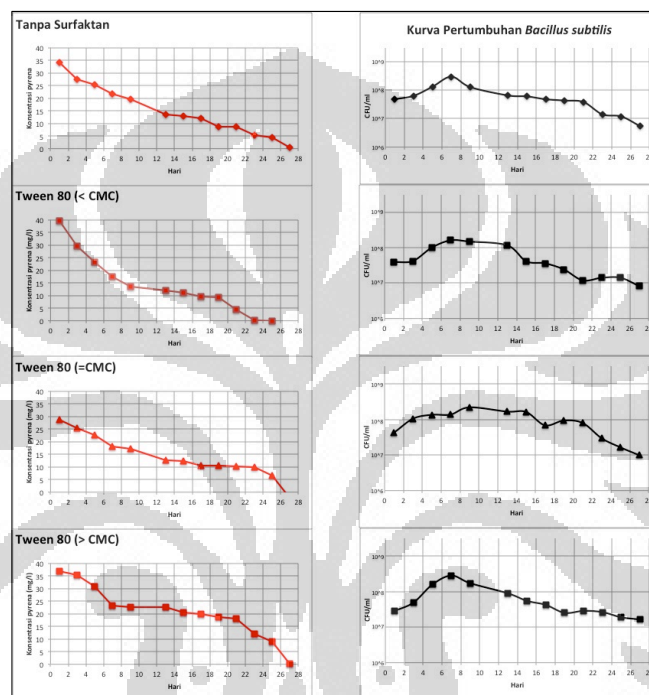
4.3 Korelasi Pertumbuhan Bakteri terhadap Proses Biodegradasi Pyrena

Penelitian ini dilakukan pada suhu kamar 28°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), dengan mengasumsikan temperatur pada variabel tetap. Berdasarkan analisa fragmen gen 16S r DNA diketahui bahwa strain C19 yang digunakan pada penelitian memiliki kemiripan dengan *Bacillus subtilis* (JN58751) dengan homologi 100% (Yuliani, 2011). Hal tersebut menunjukkan keberadaan *Bacillus subtilis* dalam medium kultur tersebut, sehingga pada proses degradasi tersebut terbukti bahwa adanya pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*.

Tujuan dari dibuatnya erlenmeyer sebanyak 12 buah yang diletakkan pada alat pengocok adalah untuk menghindari terjadinya kontaminasi bakteri dengan lingkungan sekelilingnya, sehingga didapatkan data yang akurat. Sumber bakteri untuk semua erlenmeyer berasal dari satu sumber (prekultur bakteri), sehingga didapatkan kondisi dan perlakuan yang sama. Data diambil pada hari ke-1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, dan 27.

Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* 40 ppm dapat dilihat pada gambar 4.6 dengan berbagai variasi penambahan surfaktan. Pada awal fase merupakan fase lag, dimana *Bacillus subtilis* melakukan sintesis molekul-molekul yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel dan replikasi (penggandaan), dan juga mensintesis enzim metabolisme. Fase lag umumnya berada pada hari ke-0 sampai hari ke-3. Pada fase lag untuk masing-masing konsentrasi pyrena memiliki perbedaan aktivitas yang dilakukan. Semakin besar konsentrasi pyrena maka kemampuan bakteri untuk mensintesis substrat yang ada untuk metabolisme semakin kecil, diakibatkan beban substrat yang lebih besar. Oleh karena itu, fase pertumbuhan lambat untuk konsentrasi yang lebih besar akan diperoleh produk akhir metabolisme yang lebih sedikit.

Fase selanjutnya adalah fase pertumbuhan logaritmik (fase eksponensial), dimana bakteri memiliki pertumbuhan yang cukup signifikan, karena pada fase berikut merupakan laju pertumbuhan optimum didapatkan. Selama fase eksponensial jumlah bakteri terus meningkat pada berbagai variasi konsentrasi surfaktan. Fase tersebut merupakan proses penggunaan hasil dari metabolisme berupa ATP untuk pembentukan sel baru dalam jumlah yang cukup besar. Selama fase logaritmik, pertumbuhan bakteri terus meningkat dari hari ke-3 hingga hari ke-7 untuk tanpa surfaktan, dibawah CMC, dan diatas CMC sedangkan untuk pada CMC sampai hari ke-9. Hal tersebut menunjukkan bahwa masih terjadinya proses metabolisme dan pertumbuhan sel pada semua variasi surfaktan. Pada fase stasioner, jumlah bakteri yang bereproduksi sama dengan jumlah yang mati. Sedangkan untuk fase kematian, rata-rata berlangsung setelah hari ke-9. Fase kematian tersebut bisa diakibatkan habisnya sumber karbon maupun sumber nutrisi yang dibutuhkan oleh *Bacillus subtilis* untuk tetap bereproduksi dan tumbuh.



Gambar 4.4 Korelasi pertumbuhan bakteri dengan penurunan kadar konsentrasi pyrena (40 ppm)

Dari analisis yang ada, dapat disimpulkan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* C19 pada komposisi 1%(v/v) belum mampu untuk mendegradasi habis senyawa pyrena pada konsentrasi 200 ppm dan 1000 ppm dan berbagai variasi surfaktan Tween 80. Kondisi tersebut pada suhu ruang dan kecepatan agitasi 90 rpm selama 28 hari. Menurut HU Yuting (2003), diperlukan kecepatan agitasi yang lebih besar sekitar 200 rpm untuk mempercepat proses difusi pyrena.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Beberapa kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil penelitian dan analisa terhadap hasil tersebut, antara lain:

1. Penambahan Tween 80 tidak menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* C19, namun penambahan Tween 80 tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap proses biodegradasi pyrena oleh *B.subtilis* C19.
2. Biodegradasi pyrena dibantu oleh keberadaan/produk biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* C19.
3. Konsentrasi kontaminan pyrena dapat didegradasi sempurna pada agitasi 90 rpm adalah 40 ppm.

5.2 Saran

1. Perlu adanya peningkatan pada kecepatan agitasi sekitar 120-200 rpm untuk mempercepat proses pelarutan pyrena pada larutan medium.
2. Untuk konsentrasi pyrena yang lebih besar (> 40 ppm) diperlukan agitasi yang lebih besar, sehingga disarankan untuk dilakukan analisa pengaruh agitasi terhadap kecepatan biodegradasi pyrena dan diperoleh kecepatan agitasi yang optimum untuk biodegradasi pyrena pada konsentrasi yang lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Angelova, B. dan Schmauder, H.P. 1999. *Lipophilic Compounds in Biotechnology-Interaction With Cells and Technological Problems*. Journal Biotechnology. 67 : 13-32.
- Baker, H. Katherine dan Diane S. Herson. 1994. *Bioremediation*. McGraw-Hill.
- Bossert, I., dan R. Bartha. 1986. *Structure-Biodegradability Relationship of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil*. Bull. Environ. Contam. Toxicol.
- Cookson, Jr dan J.T. 1995. *Bioremediation Engineering : Design and Application*. New York : McGraw-Hill, Inc.
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2006. *Crude Petroleum-Oil Biodegradation Efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India*. Bioresour. Technol.
- Hadi, Sapto Nugroho. 2004. *Kategori Kimia Karbon*. Departemen Biokimia IPB.
- Helmy, Q., E. Kardena, Z. Nurachman, Wisjnuaprpto. 2010. *Application of Biosurfactant Produced by Azotobacter vinelandii AV01 for Enhanced Oil Recovery and Biodegradation of Oil Sludge*. International Journal of Civil & Environmental Engineering IJCEE. Vol : 10 No : 01.
- Jacobucci, D.F., Vasconcelos, C.K., Matsuura, A.B., Falconi, F., dan Durrant, L. 2001. *Degradation of Diesel Oil by Biosurfactant Producing Bacterial Strains*. AEHS Magazine.
- Juang, R.-S. and S.-Y. Tsai. 2006. *Growth Kinetics of Pseudomonas putida in the Biodegradation of Single and Mixed Phenol and Sodium Salicylate*. Biochemical Engineering Journal 31 ((2006)): 133-140.
- Leahy, J. G. dan R. R. Colwell. 2000. *Microbial Degradation of Hydrocarbon in the Environments*. Microbiological Reviews. 54(3) : 305-315.
- Liu, W., Y. Luo, Y. Teng. 2010. *Bioremediation of Oily Sludge-contaminated Soil by Stimulating Indigenous Microbes*. Environ Geochem Health. 32: 23-29.
- Malawska, M., dan B. Wilkomrski. 2001. *An Analysis of Soil and Plant (Taraxacum officinale) Contamination with Heavy Metals and Polycyclic*

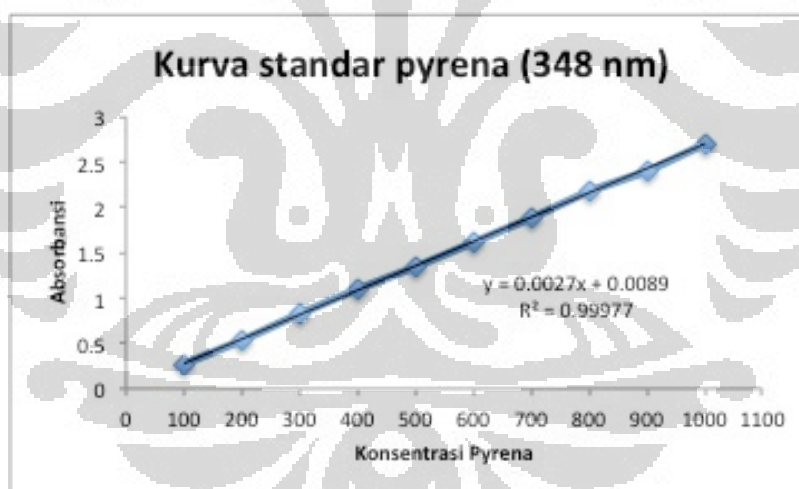
- Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Area of the Railway Junction Ilawa Glowna, Poland. Water, Air, and Soil Pollution.* 127 : 339.
- Marsaoli, M. 2004. *Kandungan Bahan Organik, N-Alkana, Aromatik dan Total Hidrokarbon dalam Sedimen di Perairan Raha Kabupaten Muna Sulawesi Tenggara.* Makara, Sains. 8(3) :116-122,
- Mouwerik, M.V., Stevens, L., Seese, M.D., dan Basham, W. 1997. *Environmental Contaminant Encyclopedia Diesel Oil.* National Park Service, Colorado.
- Ni'matuzahroh, Surtiningsih, T., Isnaeni. 2003. *Kemampuan Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Lingkungan Tercemar Minyak dalam Memproduksi Biosurfaktan: Upaya Bioremediasi Lingkungan.* Laporan Penelitian RUT VIII. 3. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Opawale, Foyeke.O dan Burgess, Diane J. 1998. *Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactant on Water-in-Oil Emulsion Stability.* Jurnal Colloid and interface science 197 : 142-150.p
- Piskonen, R., dan M. Itavaara. 2004. *Evaluation of Chemical Pretreatment of Contaminated Soil for Improved PAH Bioremediation.* Appl. Microbial. Biotechnol.. 65 : 627.
- Porter, M.R. 1994. *Handbook of Surfactant.* 2nd Ed. Blackie Academic & Profesional. Madras. 324 p.
- Sanseverino, J. Graves, Levitt, M.E. dan Gupta, S.K. 1994. *Surfactant-Enhance Bioremediation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Coke Waste.* Dalam L.W. Donald dan D.J. Trantolo (eds). *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils.* Marcel Dekker. Inc., New York.
- Udiharto, M. 1992. *Pengaruh Aktivitas Bacillus stearothermophilus Terhadap Tegangan Permukaan Crude Oil.* Jakarta : Lembaran Publikasi LEMIGAS.
- Udiharto, M. 1996. *Prosiding Pelatihan dan Lokakarya: Peranan Bioremediasi dalam Lingkungan.* LIPI, BPPT, dan HSF.
- Zhang, D., dan Zhu, Lizhong. 2012. *Effect of Tween 80 on the Removal, Sorption, and Biodegradation of Pyrene by Klebsiella oxytoca PYR-1.* Environmental Pollution 164, 169-174.



LAMPIRAN A :
KURVA STANDAR PYRENA

Kurva Standar Pyrena

Konsentrasi pyrena (ppm)	Hasil absorbansi (348 nm)
100	0.273
200	0.542
300	0.816
400	1.097
500	1.349
600	1.616
700	1.892
800	2.177
900	2.4
1000	2.702





LAMPIRAN B :
DATA HASIL PERCOBAAN

Tabel data absorbansi pyrena tiap waktu

Hari Ke-	40 PPM			200 PPM			1000 PPM					
	Tanpa	< CMC	= CMC	> CMC	Tanpa	< CMC	= CMC	> CMC	Tanpa	< CMC	= CMC	> CMC
1.	0.101	0.116	0.086	0.108	0.044	0.1	0.056	0.026	0.294	0.29	0.288	0.566
3.	0.083	0.088	0.078	0.104	0.112	0.172	0.138	0.121	0.056	0.041	0.039	0.268
5.	0.077	0.072	0.07	0.092	0.155	0.198	0.222	0.249	0.046	0.186	0.391	0.728
7.	0.068	0.056	0.058	0.072	0.126	0.18	0.196	0.158	0.058	0.254	0.158	0.428
9.	0.062	0.046	0.055	0.07	0.014	0.17	0.12	0.128	0.085	0.407	0.98	0.985
11.	-	-	-	-	0.026	0.136	0.058	0.162	-	-	-	-
13.	0.046	0.041	0.043	0.07	0.058	0.131	0.047	0.2	0.282	0.859	0.424	0.975
15.	0.044	0.038	0.042	0.064	0.112	0.06	0.014	0.161	0.587	1.138	0.848	0.75
17.	0.041	0.035	0.038	0.062	0.064	0.148	0.021	0.176	0.948	0.798	1.079	0.604
19.	0.032	0.034	0.037	0.059	0.092	0.05	0.039	0.132	0.212	0.613	1.538	1.173
21.	0.032	0.021	0.036	0.058	0.056	0.042	0.052	0.13	0.614	1.848	1.778	1.412
23.	0.024	0.009	0.036	0.042	0.074	0.017	0.065	0.098	1.951	2.014	1.63	0.773
25.	0.021	0.009	0.027	0.034	0.03	0.027	0.055	0.093	1.951	1.866	1.927	1.951
27.	0.01	0.003	0.002	0.009	0.055	0.085	0.054	0.07	1	1.951	1.951	1.951

Tabel data konsentrasi pyrena tiap waktu

Hari Ke-	40 PPM			200 PPM			1000 PPM					
	Tanpa	< CMC	= CMC	> CMC	Tanpa	< CMC	= CMC	> CMC	Tanpa	< CMC	= CMC	> CMC
1.	34.111	39.481	28.740	36.704	13.185	33.926	17.352	6.518	105.778	104.111	103.185	206.333
3.	27.444	29.481	25.407	35.407	38.37	60.407	48	41.611	17.629	11.889	11.333	95.778
5.	25.222	23.37	22.629	30.778	54.111	70.222	78.926	88.926	13.926	65.778	141.518	266.148
7.	21.704	17.444	18.185	23.185	43.37	63.37	69.296	55.037	18.185	90.592	55.407	155.037
9.	19.481	13.556	17.074	22.629	1.704	59.851	41.148	43.926	28.185	147.444	359.852	361.518
11.	-	-	-	-	6.333	46.889	18.37	56.704	-	-	-	-
13.	13.556	11.889	12.629	22.629	18.37	45.222	14.111	70.778	101.333	314.852	153.741	357.815
15.	12.815	10.963	12.259	20.592	38.185	19.111	1.889	56.333	214.111	418.185	310.593	274.482
17.	11.889	9.667	10.592	19.852	20.407	51.518	4.481	61.889	347.815	292.259	396.518	220.222
19.	8.556	9.296	10.407	18.741	30.592	15.407	11.148	45.592	75.222	223.741	566.148	431.148
21.	8.556	4.481	10.222	18.185	17.629	12.444	15.778	45.037	223.926	681.333	655.407	519.482
23.	5.407	0.222	10.037	12.074	24.296	2.907	20.778	33	719.296	742.444	600.593	283
25.	4.481	0.037	6.704	9.111	7.814	6.611	17.167	31.241	719.296	688	710.407	719.296
27.	0.407	-2.185	-2.37	0.222	17.074	28.185	16.704	22.815	367.074	719.296	719.296	719.296

Tabel data pertumbuhan bakteri tiap waktu (OD 600)

Hari Ke-	40 PPM			200 PPM			1000 PPM					
	Tanpa	<CMC	= CMC	> CMC	Tanpa	<CMC	= CMC	> CMC	Tanpa	< CMC	= CMC	> CMC
1.	1.725	1.66	1.675	1.552	2.302	1.648	2.02	1.838	3.087	3.25	3.43	3.713
3.	1.825	1.68	2.015	1.735	0.525	0.197	0.363	2.015	2.355	2.428	3.035	2.265
5.	2.115	2	2.12	2.19	0.682	0.267	0.74	4.025	2.445	2.29	2.66	2.31
7.	2.485	2.2	2.128	2.455	0.99	0.39	0.878	4.21	2.42	3.005	2.29	2.37
9.	2.1	2.165	2.335	2.225	1.873	0.882	0.965	4.205	2.653	2.687	2.665	2.63
11.	-	-	-	-	2.33	1.447	1.465	2.778	-	-	-	-
13.	1.835	2.06	2.21	1.95	2.032	2.033	1.75	2.95	1.99	1.89	1.865	1.66
15.	1.806	1.675	2.2	1.77	2.247	2.557	2.503	2.302	1.605	1.9	2.275	2.215
17.	1.725	1.63	1.85	1.68	2.215	2.995	3.002	3.21	1.225	1.777	1.808	1.965
19.	1.69	1.505	1.97	1.515	1.985	1.925	1.968	2.64	1.06	1.72	1.575	1.91
21.	1.648	1.305	1.905	1.555	1.68	1.775	1.575	2.425	0.79	1.755	1.317	1.67
23.	1.35	1.35	1.565	1.53	1.562	1.31	1.395	2.402	0.87	1.34	1.06	1.505
25.	1.305	1.35	1.39	1.43	1.26	0.865	1.305	1.975	1.052	1.36	1.385	1.425
27.	1.115	1.21	1.255	1.39	0.805	0.75	1.15	1.58	1.205	1.5	1.39	1.625



LAMPIRAN C :
HASIL PENGOLAHAN

Perhitungan %Degradasi

$$\% \text{ Degradasi} = \frac{\text{Konsentrasi awal} - \text{Konsentrasi akhir}}{\text{Konsentrasi awal}} \times 100\%$$

Pada konsentrasi pyrena 200 PPM dan Tween 80 pada CMC,

$$\% \text{ Degradasi} = \frac{200 - 16.704}{200} \times 100\%$$

$$\% \text{ Degradasi} = 91.65\%$$

Hasil perhitungan % degradasi pada variasi konsentrasi lainnya dapat dilihat pada tabel berikut

Tabel konsentrasi akhir pyrena pada masing-masing konsentrasi

Variasi pyrena	Variasi surfaktan	Konsentrasi awal (ppm)	Konsentrasi akhir (ppm)	Terdegradasi (ppm)	% degradasi
40 ppm	Tanpa	40 ppm	0.407	39.593	98.98%
	< CMC	40 ppm	-2.185	42.185	100%
	= CMC	40 ppm	-2.37	42.37	100%
	> CMC	40 ppm	0.222	39.778	99.44%
200 ppm	Tanpa	200 ppm	17.074	182.926	91.46%
	< CMC	200 ppm	28.185	171.815	85.91%
	= CMC	200 ppm	16.704	183.296	91.65 %
	> CMC	200 ppm	22.815	177.185	88.59%
1000 ppm	Tanpa	1000 ppm	367.074	632.926	63.29%
	< CMC	1000 ppm	719.296	280.704	28.07%
	= CMC	1000 ppm	719.296	280.704	28.07%
	> CMC	1000 ppm	719.296	280.704	28.07%