



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH VARIASI JUMLAH INOKULUM KONSORSIUM  
BAKTERI TERHADAP DEGRADASI HIDROKARBON  
MINYAK BUMI**

**SKRIPSI**

**DWI ASTUTI  
0706263776**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH VARIASI JUMLAH INOKULUM KONSORSIUM  
BAKTERI TERHADAP DEGRADASI HIDROKARBON  
MINYAK BUMI**

**SKRIPSI**

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

**DWI ASTUTI  
0706263776**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 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** : Dwi Astuti

**NPM** : 0706263776

**Tanda Tangan** : 

**Tanggal** : 26 Juni 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Dwi Astuti  
NPM : 0706263776  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Judul Skripsi : Pengaruh Variasi Jumlah Inokulum Konsorsium  
Bakteri Terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak  
Bumi

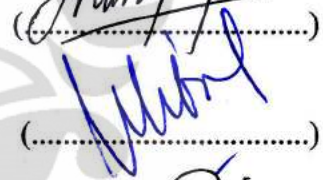
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

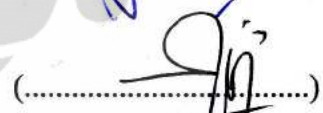
Pembimbing I : Ir. Yeti Darmayati, M.Sc.

()

Pembimbing II : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc.

()

Penguji I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.

()

Penguji II : Riani Widiarti, M.Si.

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 26 Juni 2012

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan hidayah-Nya akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “Pengaruh Variasi Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi” yang didanai oleh Riset Tematik LIPI Oseanografi Tahun Anggaran 2011 atas nama Ir. Yeti Darmayati, M.Sc.

Penulis banyak mengalami kesulitan dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini, tetapi berkat bimbingan dari berbagai pihak akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan walaupun masih jauh dari sempurna seperti pada peribahasa “Tiada Gading Yang Tak Retak”. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Ir. Yeti Darmayati M.Sc. dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc. selaku Pembimbing atas semua arahan/bimbingan, kesabaran, dukungan, doa, serta pengorbanan waktu dan pikiran selama penulis menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi.
2. Dra. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Riani Widiarti, M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan maupun penulisan skripsi ini serta seluruh dosen Departemen Biologi FMIPA UI yang telah memberikan bekal ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
3. Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Penasehat Akademik dan sebagai Ketua Departemen Biologi yang telah memberikan motivasi dan dorongan selama penulis menempuh pendidikan di Biologi FMIPA UI.
4. Dra. Nining Betawati Prihatini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI serta Dra. Titi Soedjiarti, S.U selaku Koordinator Pendidikan serta seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu pengetahuan yang diberikan selama menempuh pendidikan di di Biologi FMIPA UI .
5. Dr. Agung Dhamar Syakti, S.Pi., DEA., Yustian Rovi Alfiansyah, M.Sc., Ariani Hatmanti, M.Si., Lies Indah M.Si, Surahman, Noer Farida, dan seluruh

tim pelaksana penelitian ini yang telah banyak menyumbangkan tenaga, pikiran, dan materi kepada penulis.

6. Bapak Taryana, Bapak Taryono, Mbak Asri, Ibu Rus, dan seluruh staf karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas segala bantuan yang diberikan.
7. Bapak (Sono) dan Mama (Agustini) tersayang, terima kasih atas curahan cinta, kasih sayang, pengertian, nasehat, doa restu dan perhatian yang tidak akan sanggup aku balas setimpal sampai kapanpun. Semoga ini merupakan langkah awal penulis untuk terus berjuang demi kebanggaan kalian. Kakakku Kasih Anggoro Heru Pranoto, Wahyu Kurniawati, dan Adik-adik ku Trias, Dessy dan Nisfu yang telah memberikan semangat kepada penulis.
8. Sahabat-sahabat terbaik, Aulia Fauziah, Adisty Paramitha, Eka Desi Lestari, Inayatur Rohmah, Ratna Meyda Kania Tripati, Sela Agsriyanti, yang sudah mau bersedia menjadi teman, sekaligus keluarga yang banyak membantu selama penulis kuliah dan mengerjakan skripsi ini hingga selesai. Serta teman-teman laboratorium mikrobiologi LIPI: Bella, Wahyu, Oki, Tedjo, Tia, Reni, Nadya, dan Gabriel yang telah membantu dan memberikan semangat selama penelitian.

*Jazakumulloh khoiron katsiron.* Semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis dan pembaca untuk memberikan tambahan pengetahuan, khususnya dalam bidang biologi.

Depok, 26 Juni 2012



Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

---

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

Nama : Dwi Astuti  
NPM : 0706263776  
Program Studi : S1 Reguler  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengaruh Variasi Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi.

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 26 Juni 2012  
Yang menyatakan



(Dwi Astuti)

## ABSTRAK

Nama : Dwi Astuti  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Judul : Pengaruh Variasi Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah inokulum konsorsium bakteri yang optimum dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Sedimen dan air laut yang dicemari minyak jenis ALCO digunakan sebagai medium uji hidrokarbon minyak bumi yang diinokulasikan dengan berbagai jumlah inokulum bakteri sebesar  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , dan  $10^{10}$  sel/ml. Pengamatan proses biodegradasi hidrokarbon minyak bumi dilakukan selama 28 hari dengan interval waktu inkubasi hari ke-0, 2, 5, 9, 14, dan 28. Aktivitas konsorsium bakteri dapat diketahui dengan menghitung jumlah total sel bakteri menggunakan metode perhitungan *Acridine Orange Direct Count* (AODC) dan pengukuran konsentrasi minyak bumi dengan metode gravimetri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bioaugmentasi dengan inokulum konsorsium bakteri sebesar  $10^6$ – $10^{10}$  sel/ml dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi sebesar 42,54%–55,92%, sedangkan kontrol positif (K(+)) sebesar 32,90% dan kontrol negatif ((K(-)) sebesar 3,47%. Perlakuan K10 dengan inokulum konsorsium bakteri sebesar  $10^{10}$  sel/ml menghasilkan persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi terbesar yaitu 55,92% serta meningkatkan jumlah total sel bakteri sampai log 9,47.

**Kata Kunci:**

Bakteri hidrokarbonoklastik, bioaugmentasi, biodegradasi, jumlah total sel bakteri  
xiii + 81 halaman: 18 gambar; 5 tabel; 13 lampiran  
Daftar Acuan : 72 (1941--2012)



## ABSTRACT

Name : Dwi Astuti  
Program Study : Biology S1 Regular  
Title : Inoculum Variation Effect of Consortium Bacteria  
On Degradation of Petroleum Hydrocarbon

The study was conducted to determine the optimum amount of inoculums in the bacterial consortium degrading petroleum hydrocarbons. Sediments and sea water contaminated with ALCO type is used as the test medium ALCO petroleum hydrocarbons that were inoculated with various amounts of bacterial inoculum of  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , and  $10^{10}$  cells / ml . The biodegradation process was observed for 28 days with intervals 0, 2, 5, 9, 14, and 28 days. Bacterial consortium activities was determined by counting total number of bacterial cells using of Acridine Orange Direct Count (AODC) method and measuring the concentration of petroleum hydrocarbons are analyzed by gravimetric method. The results revealed that bioaugmentation which inoculums consortium bacteria of  $10^6$  -  $10^{10}$  cells / ml can degraded petroleum hydrocarbons at 42,54% to 55,92%, while positive control (K(+)) only 32,90% and negative control (K(-)) only 3,47%. Treatment K10 with a consortium of bacteria inoculums of  $10^{10}$  sel/ml increased capability of degrade petroleum hydrocarbons up to 55,92% and total number of bacterial cells up to log 9,47.

**Key words:**

Bacteria hydrocarbonoclastic, bioaugmentation, biodegradation, total number of bacterial cells

xiii + 81 pages : 18 pictures; 5 table; 13 appendixs

Bibliography : 72 (1941--2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Minyak Bumi .....	4
2.2. Pencemaran Laut oleh Minyak Bumi .....	6
2.3. Penanganan dalam Mengatasi Pencemaran Minyak Bumi .....	7
2.4. Bioremediasi .....	9
2.5. Bakteri Hidrokarbonoklastik.....	10
2.6. Mekanisme Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi oleh Bakteri .....	13
2.7. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Proses Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi.....	15
<b>3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>18</b>
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	18
3.2. Alat dan Bahan.....	18
3.2.1. Alat.....	18
3.2.2. Bahan.....	19
3.2.2.1. Mikroorganisme .....	19
3.2.2.2. Medium .....	19
3.2.2.3. Bahan Kimia.....	19
3.2.2.4. Bahan Habis Pakai .....	19
3.3 Cara Kerja .....	20
3.3.1. Rancangan Penelitian .....	20
3.3.2. Pembuatan Medium.....	21
3.3.2.1. <i>Marine agar</i> (MA) .....	21
3.3.2.2. Medium Air Laut Alami.....	21
3.3.2.3. Medium Tahap Adaptasi Bakteri .....	21
3.3.3. Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture Alcanivorax</i> <i>sp. TE-9, Bordetella sp. F2, dan Pseudomonas balearica</i> ST 101 .....	21
3.3.4. Karakterisasi Bakteri Hidrokarbonoklastik.....	22
3.3.4.1. Pengamatan Makroskopik.....	22

3.3.4.2. Pengamatan Mikroskopik.....	22
3.3.3.4.1. Pembuatan Preparat Olesan Bakteri.....	22
3.3.3.4.2. Pewarnaan Gram.....	22
3.3.5. Tahap Adaptasi Bakteri Hidrokarbonoklastik .....	23
3.3.6. Pembuatan Konsorsium Bakteri .....	24
3.3.7. Pembuatan Larutan untuk Penghitungan Total Sel Bakteri ...	25
3.3.7.1. Larutan <i>Acridine Orange</i> 0,05% .....	25
3.3.7.2. Larutan NaCl 2%.....	25
3.3.7.3. Larutan <i>Sudan Black</i> .....	26
3.3.7.4. Larutan NaCl (0,8 %) .....	26
3.3.8. Penyiapan Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi .....	26
3.3.8.1. Pembuatan <i>Mousse Oil</i> .....	26
3.3.8.2. Homogenisasi Sedimen.....	26
3.3.8.3. Pembuatan Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi	27
3.3.9. Pengukuran Variabel Utama Penelitian .....	27
3.3.9.1. Penghitungan Jumlah Total Sel Bakteri.....	27
3.3.9.2. Ekstraksi Hidrokarbon Minyak Bumi.....	28
3.3.10. Pengukuran Kondisi Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi	29
3.3.10.1. Pengukuran Oksigen Terlarut (DO) dan Suhu.....	29
3.3.10.2. Pengukuran pH.....	30
3.3.11. Pengolahan dan Analisis Data.....	30
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
4.1. Pengamatan Morfologi Bakteri.....	31
4.2. Tahap Adaptasi Bakteri Hidrokarbonoklastik.....	34
4.3. Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Bioaugmentasi) terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi (secara kualitatif)...	38
4.4. Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi.....	42
4.5. Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Bioaugmentasi) dan Waktu Inkubasi terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi	45
4.5.1. Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Bioaugmentasi) terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi.....	45
4.5.2. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi .....	48
4.6. Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Bioaugmentasi) dan Waktu Inkubasi terhadap Jumlah Total Sel Bakteri.....	50
4.6.1. Oksigen Terlarut (DO) .....	54
4.6.2. Suhu .....	55
4.6.3. Derajat Keasaman (pH).....	56
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>58</b>
5.1. Kesimpulan .....	58
5.2. Saran.....	58
<b>DAFTAR ACUAN.....</b>	<b>59</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.3.(1).	Perlakuan yang diujikan ke dalam medium tercemar minyak bumi.....	20
Tabel 4.1.(1).	Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik <i>Pseudomonas balearica</i> ST 101 pada medium MA .....	32
Tabel 4.1.(2).	Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik <i>Alcanivorax</i> sp. TE-9 pada medium MA.....	32
Tabel 4.1.(3).	Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik <i>Bordetella</i> sp. F2 pada medium MA .....	33
Tabel 4.4.	Perbandingan rerata jumlah minyak (%) terdegradasi pada medium pengujian inokulum konsorsium bakteri terhadap degradasi hidrokarbon minyak bumi menggunakan metode gravimetri .....	43

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.(1).	Senyawa hidrokarbon jenuh .....	4
Gambar 2.1.(2).	Hidrokarbon aromatik .....	5
Gambar 2.1.(3).	Senyawa Resin .....	5
Gambar 2.1.(4).	Senyawa Aspal .....	6
Gambar 2.5.(1).	Morfologi bakteri .....	11
Gambar 2.6.(1).	Mekanisme degradasi hidrokarbon minyak bumi secara aerob oleh bakteri .....	14
Gambar 4.1.(1).	Hasil pengamatan makroskopik bakteri pada medium MA, a. <i>Pseudomonas balearica</i> ST 101, b. <i>Alcanivorax</i> sp. TE-9, c. <i>Bordetella</i> sp. F2.....	33
Gambar 4.1.(2).	Hasil pengamatan mikroskopik bakteri dengan pengecatan gram, a. <i>Pseudomonas balearica</i> ST 101, b. <i>Alcanivorax</i> sp. TE-9, c. <i>Bordetella</i> sp. F2.....	33
Gambar 4.2.(1).	Perubahan kondisi medium adaptasi setelah diinkubasi selama masa 48 jam, a. kultur bakteri pada konsentrasi 10.000 ppm, b. Kultur bakteri pada konsentrasi 100.000 ppm, 1. <i>Pseudomonas balearica</i> ST 101, 2. <i>Alcanivorax</i> sp. TE-9, 3. <i>Bordetella</i> sp. F2, 4. kontrol .....	35
Gambar 4.2.(2).	Mekanisme penggunaan hidrokarbon minyak bumi oleh bakteri melalui biosurfaktan.....	36

Gambar 4.3.(1).	Perubahan kondisi medium uji hidrokarbon minyak bumi a. Medium uji hidrokarbon minyak bumi dengan inkubasi hari ke-0, b. Medium uji hidrokarbon minyak bumi dengan inkubasi hari ke-28, c. Sedimen dicemari minyak d. Perubahan kejernihan medium.....	39
Gambar 4.3.(2).	Jalur degradasi perifer alkan, 1. n-alkana oleh $\omega$ -hidroksilase (oksigenase), 2. Alkohol dehidrogenase, 3. Aldehid dehidrogenase.....	41
Gambar 4.5.(1).	Persentase degradasi oleh hidrokarbon minyak bumi pada inkubasi hari ke-28.....	48
Gambar 4.5.(2).	Perubahan konsentrasi persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari .....	49
Gambar 4.6.(1).	Jumlah total sel bakteri pada berbagai perlakuan selama masa inkubasi 28 hari .....	51
Gambar 4.6.1.(1).	Perubahan oksigen terlarut (DO) pada medium uji hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari.	55
Gambar 4.6.2.(1).	Perubahan suhu pada medium uji hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari .....	55
Gambar 4.6.3.(1).	Perubahan pH pada medium uji hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari.....	56

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja Penelitian .....	66
Lampiran 2.	Skema Tahap Adaptasi Bakteri Hidrokarbonoklastik .....	67
Lampiran 3.	Skema Pembuatan Konsorsium Bakteri .....	68
Lampiran 4.	Skema Perhitungan Total Sel Bakteri (sel/ml) .....	69
Lampiran 5.	Skema Ekstraksi Hidrokarbon Minyak Bumi .....	70
Lampiran 6.	Data Persentase Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi....	71
Lampiran 7.	Data Total Sel Bakteri (sel/ml).....	72
Lampiran 8.	Data Pengukuran Kondisi Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi.....	73
Lampiran 9.	Data Persentase Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi (%) {Transf. Arc. Sin $\sqrt{x/100}$ } .....	74
Lampiran 10.	Korelasi Sederhana Total Sel Bakteri Terhadap Persentase Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi .....	79

Lampiran 11.	Perhitungan Volume Larutan NaCl (0,8%) yang digunakan dalam Pengenceran Suspensi Bakteri untuk Memperoleh Total Sel Bakteri $2,32 \cdot 10^{11}$ sel/ml.....	80
Lampiran 12.	Perhitungan Volume Suspensi Bakteri.....	81
Lampiran 13.	Perhitungan Konsentrasi Minyak Bumi 100.000 ppm (10%).....	81



## **BAB 1 PENDAHULUAN**

Minyak bumi merupakan sumber energi utama bagi industri yang banyak ditemui dalam bentuk bahan bakar maupun bahan baku untuk berbagai produk kimia seperti plastik, cat, dan kosmetik (Harayama *dkk.* 1999: 63; Alvarez & Illman 2006: 4). Selain berbagai kegunaan tersebut, minyak bumi juga dapat mengakibatkan pencemaran pada lingkungan. Pencemaran lingkungan oleh minyak dapat terjadi secara alamiah seperti rembesan minyak (NRC 2003: 2), maupun akibat berbagai aktivitas seperti eksploitasi, penyimpanan pada tangki, pengolahan, serta transportasi minyak yang memungkinkan terjadinya tumpahan atau kebocoran (Alvarez & Illman 2006: 4). Salah satu contoh kebocoran minyak yang terjadi adalah bocornya kapal tanker MT King Fisher pada tahun 1999--2000 di wilayah perairan Cilacap, yang menyebabkan 4000 barel minyak tersebar di perairan hingga pesisir pantai Cilacap (Rusdi 2008 *dalam* IMC 2008: 1). Pencemaran minyak dapat berdampak pada kerusakan ekosistem dan terganggunya kesehatan manusia (Lau Ning Ling 2003: 2).

Bioremediasi merupakan salah satu teknologi yang digunakan dalam mengatasi pencemaran minyak dengan memanfaatkan mikroba untuk mengurangi konsentrasi minyak. Bioremediasi memiliki beberapa keuntungan diantaranya membutuhkan biaya yang relatif rendah serta efektif dalam mereduksi cemaran sampai pada tingkat tertentu dengan hasil akhir seperti CO<sub>2</sub> dan air (Unterman 1996: 226; Alvarez & Ilman 2006: 19). Bakteri merupakan mikroba yang sering digunakan dalam bioremediasi, karena diketahui memiliki kemampuan yang tinggi dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon (Harayama *dkk.* 1999: 67).

Metode bioremediasi berdasarkan pemanfaatan mikroba terdiri atas bioaugmentasi dan biostimulasi. Bioaugmentasi merupakan metode yang dilakukan dengan menginokulasikan mikroba pendegradasi minyak ke daerah tercemar minyak untuk melengkapi populasi mikroba yang telah ada, sedangkan biostimulasi merupakan metode yang dilakukan dengan memodifikasi lingkungan seperti mengubah habitat atau penambahan nutrisi untuk menstimulasi mikroba indigenos agar dapat mendegradasi minyak (Zhu *dkk.* 2001: 25). Ouyang *dkk.* (2005: 3767--3768) melaporkan bahwa bioaugmentasi dapat menurunkan

senyawa hidrokarbon sebesar 45--53%, sedangkan biostimulasi hanya sebesar 31%. Adanya inokulum bakteri (bioaugmentasi) dapat mendegradasi senyawa yang rekalsitran (sulit mengalami degradasi secara alami) dan meningkatkan laju degradasi hidrokarbon minyak bumi serta mempersingkat proses biodegradasi pada awal bioremediasi (Zhu *dkk.* 2001: 25). Menurut Leahy & Colwell (1990: 311), adanya inokulum konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (bioaugmentasi) dapat mendegradasi hidrokarbon secara spesifik dan lebih luas.

Bioaugmentasi dilakukan dengan menggunakan bakteri hidrokarbonoklastik baik dalam bentuk spesies tunggal bakteri maupun konsorsium. Nasser *dkk.* (2010: 206) melaporkan bahwa bioaugmentasi dalam bentuk konsorsium bakteri memberikan hasil terbaik dalam mendegradasi *phenantrene* yaitu sebesar 92,75%, sedangkan dalam bentuk spesies tunggal bakteri hanya sebesar 85,52%--87,75%. Menurut Leahy & Colwell (1990: 308), spesies tunggal bakteri hanya mampu mendegradasi sejumlah senyawa tertentu pada komponen minyak, sedangkan dengan konsorsium bakteri dapat mendegradasi senyawa yang tidak bisa didegradasi oleh bakteri lain karena kapasitas enzim untuk mendegradasi hidrokarbon minyak bumi yang tersedia menjadi lebih banyak.

Sebanyak 125 isolat bakteri telah diisolasi dari perairan pelabuhan di Teluk Jakarta (Tanjung Priuk, Muara Baru dan Sunda Kelapa) oleh Darmayati 2009. Menurut Hatmanti & Darmayati (2010: 8), uji MPN dari ke-125 isolat tersebut berhasil didapatkan isolat bakteri unggul yang memiliki kemampuan dalam mengurai minyak dengan jenis *Arabian Light Crude Oil* (ALCO) dan beberapa jenis *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH). Bakteri hidrokarbonoklastik lokal unggulan yang berhasil diidentifikasi dari wilayah tersebut adalah *Alcanivorax dieselolei* strain NO1A Liu & Shao 2005, *Alcanivorax* sp. B-1084 Yakimov *dkk.* 1998, *Pseudomonas balearica* ST 101 Bennasar *dkk.* 1996, *Alcanivorax* sp. TE-9 Yakimov *dkk.* 1998, *Bacillus* sp. L41 Cohn 1872, *Alcanivorax dieselolei* strain B-5 Liu & Shao 2005, dan *Bordetella* sp. F2 Moreno-López 1952. Keseluruhan bakteri hidrokarbonoklastik lokal unggulan yang berhasil diidentifikasi telah dibuat lima konsorsium bakteri yang terdiri dari KA (*Pseudomonas balearica* ST 101, *Alcanivorax* sp. TE-9, dan



*Bordetella* sp. F2.), KB (*Pseudomonas balearica* ST 101, *Alcanivorax* sp. TE-9, dan *Alcanivorax dieselolei* strain B-5), KC (*Alcanivorax dieselolei* strain NO1A, *Bacillus* sp. L41, dan *Alcanivorax dieselolei* strain B-5), KD (*Alcanivorax* sp. B-1084, *Pseudomonas balearica* ST 101, dan *Alcanivorax dieselolei* strain B-5) dan KE (*Alcanivorax* sp. B-1084, *Alcanivorax* sp. TE-9, dan *Bordetella* sp. F2) (Darmayati *dkk.* 2008: 13). Potensi yang dimiliki oleh ke lima konsorsium bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi diteliti oleh Arifah (2010: 36).

Arifah (2010: 36) melaporkan bahwa bioaugmentasi dengan jumlah inokulum konsorsium bakteri (*Pseudomonas balearica* ST 101, *Alcanivorax* sp. TE-9, dan *Bordetella* sp. F2.) sebesar  $10^8$  sel/ml dan bergabung dengan bakteri indigenos memberikan persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi tertinggi yaitu sebesar 70,46 % dengan konsentrasi awal minyak sebesar 1000 ppm. Namun demikian, potensi konsorsium bakteri *Pseudomonas balearica* ST 101, *Alcanivorax* sp. TE-9, dan *Bordetella* sp. F2 dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan konsentrasi minyak bumi jenis ALCO sebesar 100.000 ppm belum diketahui dan jumlah inokulum konsorsium bakteri yang tinggi mungkin akan lebih besar dalam mendegradasi hidrokarbon. Adanya inokulum bakteri mempengaruhi proses laju biodegradasi hidrokarbon minyak bumi. Konsentrasi 10% limbah minyak bumi merupakan batas konsentrasi maksimum terdekat yang masih dapat dilakukan dengan metode bioremediasi (KLH 2004: 13).

Berdasarkan uraian tersebut, perlu dilakukan penelitian dengan membuat variasi jumlah inokulum konsorsium bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon untuk mendapatkan inokulum konsorsium bakteri yang optimum. Jumlah inokulum konsorsium bakteri yang optimum diharapkan dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak bumi secara efektif dengan mengetahui persentase minyak bumi yang terdegradasi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai model penanganan tumpahan minyak di wilayah perairan Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah inokulum konsorsium bakteri yang optimum dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi pada konsentrasi sebesar 100.000 ppm (10%). Hipotesis dalam penelitian ini adalah bioaugmentasi dengan jumlah sel bakteri yang semakin banyak menghasilkan persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi yang semakin besar.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

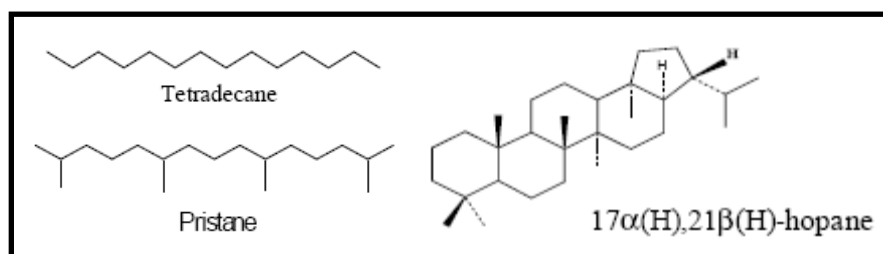
### 2.1. Minyak Bumi

Minyak bumi adalah campuran cairan kental bersifat hidrofobik yang tersusun atas ribuan senyawa kompleks, dan sebagian besar terdiri atas karbon dan hidrogen (Harayama *dkk.* 1999: 64). Beberapa produk minyak bumi antara lain gasolin, kerosin, bahan bakar, minyak pelumas, minyak diesel, parafin, dan aspal serta bahan baku untuk berbagai produk kimia seperti plastik, cat, dan kosmetik (Harayama *dkk.* 1999: 63; Zhu *dkk.* 2001: 12).

Komponen minyak bumi terbagi atas 4 bagian, yaitu:

#### 1. Hidrokarbon jenuh

Hidrokarbon jenuh memiliki ikatan rantai tunggal setiap atom karbon seperti alkana ( $C_nH_{2n+2}$ ) dan sikloalkana ( $C_nH_{2n}$ ). Alkana memiliki rantai atom karbon bercabang atau tidak bercabang, sedangkan sikloalkana ( $C_nH_{2n}$ ) hanya memiliki satu atau lebih cincin atom karbon. Senyawa hidrokarbon jenuh merupakan komponen utama pada minyak mentah karena  $\pm 58,2\%$  terdiri atas senyawa tersebut (Zhu *dkk.* 2001: 9; Prince *dkk.* 2003: 464). Beberapa contoh senyawa hidrokarbon jenuh adalah *tetradecane*, *pristane*, dan  $17\alpha(H),21\beta(H)$ -*hopane* (Harayama *dkk.* 1999: 64).

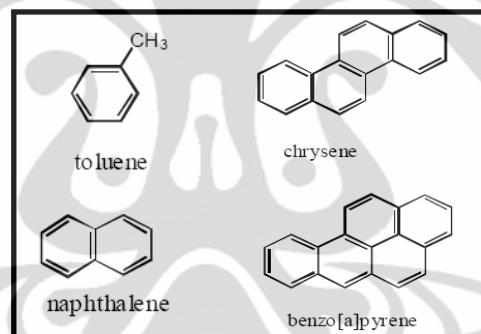


Gambar 2.1.(1) Senyawa hidrokarbon jenuh

[Sumber: Harayama *dkk.* 1999: 63.]

## 2. Hidrokarbon aromatik

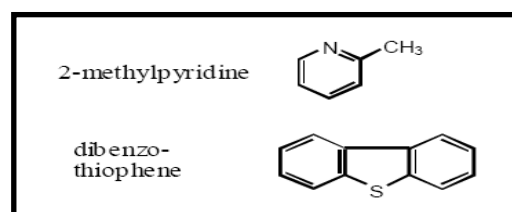
Hidrokarbon aromatik memiliki satu atau lebih cincin aromatik dengan atau tanpa alkil (Harayama *dkk.* 1999: 64). Senyawa aromatik hidrokarbon terdiri atas dua bagian, yaitu aromatik monosiklik [seperti benzena ( $C_6H_6$ ), toluena ( $C_7H_8$ ), xylene ( $C_8H_{10}$ )] serta *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) [seperti naftalena ( $C_{10}H_8$ ), anthracena, *benzo[a]pyrene*, *chrysene*, dan Phenanthrena]. PAH merupakan senyawa yang bersifat karsinogenik atau menjadi karsinogenik akibat ditransformasi oleh mikroba (Zhu *dkk.* 2001: 9 ; Nugroho 2006: 13). Minyak mentah mengandung 28,6 % senyawa hidrokarbon aromatik dalam total kandungan minyak tersebut (Prince *dkk.* 2003: 464).



Gambar 2.1.(2) Hidrokarbon Aromatik

[Sumber: Zhu *dkk.* 2001: 11.]

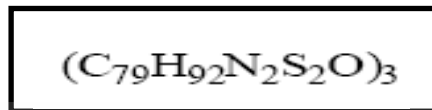
3. Resin tersusun atas senyawa polar yang mengandung nitrogen, sulfur, oksigen (NSO) misalnya seperti *2-methylpyridine* dan *dibenzothiophenes* (Zhu *dkk.* 2001: 10).



Gambar 2.1.(3) Senyawa Resin

[Sumber: Zhu *dkk.* 2001: 11.]

4. Aspal tersusun atas senyawa dengan susunan kimia yang kompleks berupa siklik aromatik, dan sebagian kecil hidrokarbon seperti NSO serta logam berat seperti nikel, vanadium, dan besi (Zhu *dkk.* 2001: 10).



Gambar 2.1.(4) Senyawa Aspal

[Sumber: Zhu *dkk.* 2001: 11.]

## 2.2 Pencemaran Laut oleh Minyak Bumi

Menurut Peraturan Pemerintah RI Nomor 19 Tahun 1999, pencemaran laut adalah masuknya atau dimasukkannya makhluk hidup, zat, energi, dan atau komponen lain ke dalam lingkungan laut oleh kegiatan manusia sehingga kualitas air laut menjadi turun sampai ke tingkat tertentu yang menyebabkan lingkungan laut tidak sesuai lagi dengan baku mutu dan/atau fungsinya. Salah satu sumber pencemaran laut adalah minyak bumi. Sumber pencemaran terbesar berasal dari rembesan alami, salah satunya akibat kecelakaan/kebocoran kapal minyak yang terjadi selama proses transportasi minyak. Pencemaran lingkungan oleh tumpahan minyak dari kapal atau kecelakaan kapal minyak bukan merupakan hal baru di Indonesia (NRC 2003: 28; IMC 2008: 1).

Beberapa contoh kasus kecelakaan kapal minyak di Indonesia sejak tahun 1975--2000 antara lain Tanker Showa Maru di Selat Malaka; Choya Maru di Bulebag, Bali; Golden Win di Lhokseumawe, NAD; Nagasaki Spirit di Selat Malaka; Maersk Navigator di Selat Malaka; Bandar Ayu di Pelabuhan Cilacap; Mission Viking di Selat Makassar; MT King Fisher di Cilacap dan MT Natuna Sea di Pulau Sambu (Rusdi 2008 *dalam* IMC 2008: 1). Pencemaran lingkungan oleh minyak bumi akan berdampak negatif seperti mengalami gangguan kesehatan pada makhluk hidup khususnya masyarakat, produksi tangkapan ikan, organisme akuatik, wisata, maupun kualitas air (Rosenberg & Ron 1996: 101; IMC 2008: 1). Hal tersebut disebabkan oleh kandungan senyawa hidrokarbon pada minyak bumi yang dapat bersifat akut maupun kronis yang tergantung dari tingkat toksisitas.

Toksisitas akut terjadi dalam jangka waktu yang relatif singkat karena konsentrasi minyak tinggi, sedangkan kronis terjadi dalam waktu yang relatif panjang karena konsentrasi minyak yang mencemari relatif rendah (NRC 2003: 23). Toksisitas akut umumnya menyerang sistem syaraf dan beberapa senyawa hasil metabolit *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) seperti 7,8-diol-9,10-epoxide of benzo pyrene dapat menyebabkan kanker, sedangkan dalam jangka panjang dengan konsentrasi minyak yang lebih rendah dapat menyebabkan kelainan darah seperti anemia, dan kerusakan tulang belakang (Manahan 2001: 836--837).

### 2.3. Penanganan dalam Mengatasi Pencemaran Minyak Bumi

Berbagai upaya penanganan telah banyak dilakukan untuk mengatasi pencemaran minyak bumi di perairan, baik secara fisika, kimia maupun biologis.

#### A. Metode fisika

Metode fisika yang dapat dilakukan antara lain:

##### 1. *Booming* dan *skimming*,

*Booms* digunakan untuk melokalisasi dan mengendalikan pergerakan minyak sedangkan *skimmer* digunakan untuk mengambil minyak.

##### 2. *Wiping* dengan absorben,

*Wiping* dengan absorben adalah bahan hidrofobik yang digunakan untuk menyeka minyak dari permukaan air.

##### 3. Mekanis,

Peralatan mekanis digunakan untuk mengumpulkan dan membuang sedimen yang tercemar minyak dalam jumlah besar. Hal tersebut terutama dilakukan di daerah pantai.

##### 4. Pencucian,

Pencucian dilakukan dengan menggunakan air dingin bertekanan rendah sampai air panas bertekanan tinggi.

##### 5. Relokasi sedimen dan *tilling*,

Relokasi sedimen dan *tilling* merupakan pemindahan sedimen tercemar minyak ke tempat lain atau pencampuran dengan sedimen lain.

## 6. Pembakaran setempat.

Pembakaran setempat yang tercemar minyak biasa dilakukan bersamaan dengan substrat yang mudah terbakar (tumbuhan kering, sampah kering) terutama dilakukan di kawasan pesisir.

## B. Metode kimia

Metode kimia yang dapat dilakukan antara lain:

### 1. *Dispersant*

Kandungan surfaktan digunakan untuk mendispersi minyak menjadi butiran dalam air.

### 2. *Demulsifiers*

Bahan ini digunakan untuk memutus emulsi minyak-air guna mempercepat dispersi alamiah.

### 3. *Solidifiers*

Bahan ini digunakan untuk meningkatkan polimerisasi minyak sehingga minyak menjadi stabil, meminimalkan penyebaran, dan meningkatkan efektivitas remediasi fisik.

### 4. *Surface film chemicals*

Bahan pembentuk film (*film-forming agents*) digunakan untuk mencegah minyak tertarik ke substrat laut lepas, dan untuk meningkatkan pembuangan minyak terikat pada permukaan alat pencuci bertekanan.

(Zhu *dkk.* 2001: 4--5).

Penanganan secara fisika dan kimia bersifat jangka pendek dan tidak tuntas (perpindahan massa antar media lingkungan) karena hanya dapat memindahkan sekitar 10--15 % pencemar dari media laut (OTA 1990 *dalam* Zhu *dkk.*: 2001: 5). Selain itu, penanganan secara fisika maupun kimia membutuhkan dana yang lebih besar dan dapat menimbulkan dampak yang baru dibandingkan penanganan secara biologis seperti bioremediasi (Nugroho 2006: 83). Bioremediasi juga dapat dipadukan dengan metode fisika maupun kimia untuk mempercepat proses penanggulangan pencemaran (Boopathy 2000: 64).

## 2.4. Bioremediasi

Bioremediasi adalah proses biodegradasi yang memanfaatkan mikroba sebagai agen hayati dan hidrokarbon sebagai sumber energi serta mampu menghilangkan atau mendetoksifikasi bahan pencemar baik yang mengontaminasi tanah, air, dan sedimen (Atlas & Cerniglia 1995: 332; Crawford 1996: 1). Menurut Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No. 128 tahun 2003 (KLH 2004: 13) bahwa konsentrasi maksimum total hidrokarbon minyak bumi (TPH) awal sebelum proses pengolahan bioremediasi tidak lebih dari 15 %. Kelompok mikroba yang umum digunakan dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi adalah bakteri, karena lebih dari 80 % degradasi hidrokarbon dilakukan oleh bakteri. Bakteri dapat menggunakan hidrokarbon minyak bumi sebagai sumber karbon dan energi serta menghasilkan surfaktan dan emulsifier sehingga bakteri dapat tumbuh (Harayama *dkk.* 1999: 67).

Metode bioremediasi tumpahan minyak bumi terbagi menjadi dua pendekatan utama, yaitu:

1. Bioaugmentasi, yaitu metode dengan menginokulasikan mikroba pendegradasi minyak ke daerah tercemar minyak untuk melengkapi populasi mikroba yang telah ada. Bioaugmentasi dapat mempercepat proses biodegradasi ketika populasi indigenus hidrokarbon rendah.
2. Biostimulasi, yaitu metode yang dilakukan dengan memodifikasi lingkungan seperti mengubah habitat atau penambahan nutrisi untuk menstimulasi mikroba indigenos agar dapat mendegradasi minyak.

(Zhu *dkk.* 2001: 25).

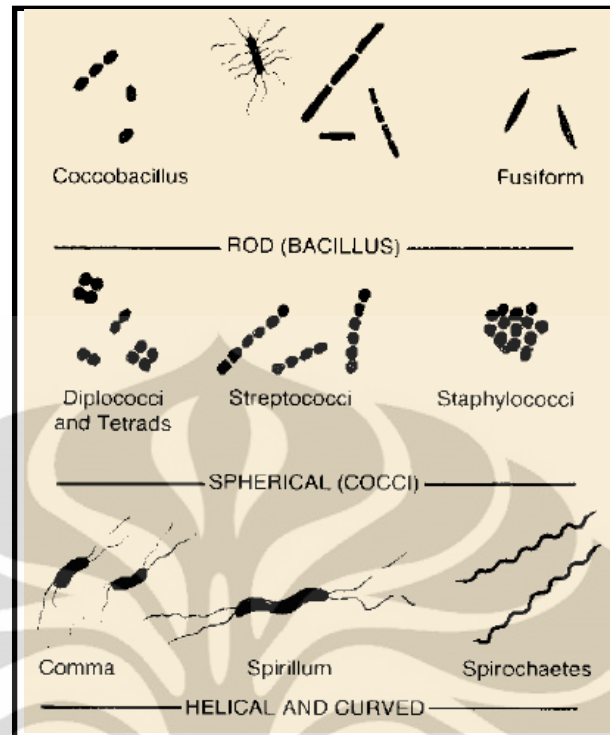
Menurut Atlas 1977, syarat mikroba yang ditambahkan ke dalam tumpahan minyak bumi adalah memiliki kemampuan dalam mendegradasi komponen minyak bumi, memiliki gen yang stabil, viabilitas yang tinggi, pertumbuhan yang cepat, aktivitas enzimatis yang tinggi, mampu berkompetisi dengan mikroorganisme indigenos, bersifat non patogen dan tidak menghasilkan senyawa metabolit yang bersifat toksik (*lihat* Lau Ning Ling 2003: 21).

## 2.5. Bakteri Hidrokarbonoklastik

Mikroorganisme seperti bakteri dan fungi berperan besar dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Bakteri pendegradasi hidrokarbon umumnya mendominasi wilayah perairan seperti halnya laut (Atlas & Cerniglia 1995: 333). Menurut Harayama *dkk.* (1999: 67), kelompok mikroba yang umum digunakan dalam mendegradasi minyak bumi adalah bakteri, karena dapat menggunakan hidrokarbon minyak sebagai sumber karbon dan energi sehingga bakteri dapat tumbuh serta dapat menghasilkan biosurfaktan dan emulsifier. Bakteri yang dapat menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon dikenal sebagai bakteri hidrokarbonoklastik (Nugroho 2006: 90). Bakteri merupakan organisme prokariotik yang tidak memiliki membran inti, memiliki dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan, dan memiliki plasmid (DNA ekstrakromosomal) (Madigan *dkk.* 2012: 32). Bakteri dikelompokkan menjadi tiga bagian berdasarkan morfologinya, yaitu batang (*rod*), kokus (*coccus*), dan *helical* serta *curved* (Gambar 2.5.(1)) (Benson 2001: 46).

Bakteri juga dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan struktur dinding sel bakteri yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan yang tebal (90 %) dan asam teikoat, sedangkan bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis (15--20 %) dan memiliki lapisan lipopolisakarida yang tebal. Asam teikoat pada bakteri gram positif berfungsi untuk menstabilkan dinding sel (Singh & Kapoor 2010: 31--32).





Gambar 2.5.(1). Morfologi bakteri

[Sumber: Benson 2001: 46.]

Berdasarkan Atlas 1984; Focht & Westlake 1987; Jordan & Payne 1980; Leahy & Colwell 1990, genus bakteri yang umumnya dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi antara lain *Alcanivorax* Yakimov dkk.. 1998, *Achromobacter* Yabuuchi & Yano 1981, *Acinetobacter* Brisou & Prévot 1954, *Alcaligenes* Davis 1969, *Arthrobacter* Conn & Dimmick 1947, *Bacillus* Cohn 1872, *Brevibacterium* Breed 1953, *Corynebacterium* Lehmann & Neumann 1896, *Flavobacterium* Bergey dkk. 1923, *Nocardia* Trevisan 1889, *Pseudomonas* Migula 1894, dan *Vibrio* Pacini 1854 (lihat Zhu dkk. 2001: 19). *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium* sp., *Alcanivorax dieselolei* strain NO1A, *Alcanivorax* sp. B-1084, *Pseudomonas balearica* st 101, *Alcanivorax* sp. TE-9, *Bacillus* sp. L41, *Alcanivorax dieselolei* strain B-5, dan *Bordetella* sp. F2 merupakan spesies-spesies yang berhasil di isolasi dari perairan Indonesia, tepatnya di Teluk Jakarta (Hatmanti & Darmayati 2010: 8; Darmayati 2011: 106).

Beberapa contoh karakteristik dari bakteri hidrokarbonoklastik dapat diuraikan sebagai berikut:

1. Genus *Alcanivorax* Yakimov, M.M., Peter, N.G., Siegmund, L., Edward, R. B.M., Wolf-Rainer A., Heinrich. L, & Kenneth N. T 1998

*Alcanivorax* merupakan bakteri laut dan kelompok bakteri gram negatif yang dapat menghasilkan biosurfaktan serta mampu mendegradasi n-alkana namun tidak dapat menggunakan karbohidrat dan asam amino sebagai substrat untuk pertumbuhannya (Harayama *dkk.* 1999 :69). Cappelo *dkk.* (2007: 189) melaporkan bahwa genus *Alcanivorax* mendominasi populasi bakteri untuk wilayah perairan laut yang terkontaminasi minyak dan populasi tersebut diketahui melalui analisis taksonomi 16S rDNA. Salah satu contoh spesies dari genus *Alcanivorax* adalah *Alcanivorax* sp. TE-9 yang diisolasi dari Perairan Teluk Jakarta. *Alcanivorax* sp. TE-9 dapat tumbuh optimal dengan kisaran salinitas 10--34 ppt dan pH 6--8. Bakteri tersebut mampu menggunakan berbagai jenis karbon tunggal maupun PAH serta *Arabian Light Crude Oil* (ALCO) kecuali *fluorene* (Darmayati *dkk.* 2008: 16).

2. Genus *Pseudomonas* Migula 1894

Genus *Pseudomonas* merupakan bakteri gram negatif yang dapat mendegradasi senyawa aromatik hidrokarbon, alifatik, terpenik, dan PAH. *Pseudomonas* dapat menggunakan asetat sebagai sumber karbon dan mereduksi  $\text{NO}_3$  menjadi  $\text{NO}_2$  atau  $\text{N}_2$  serta TNT (2,4,6 trinitrotoluena) sebagai sumber nitrogen dan menghasilkan toluene, aminotoluena, dan nitrotoluena sebagai hasil produknya tetapi tidak dapat menggunakan toluena sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya (Zhu *dkk.* 2001: 26; Aberoumand 2010: 292 & 293). Salah satu contoh spesies dari genus *Pseudomonas* adalah *Pseudomonas balearica* ST 101 yang diisolasi dari Perairan Teluk Jakarta. *Pseudomonas balearica* ST 101 dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada kisaran salinitas 10--34 ppt dan pH 6--8 (Darmayati *dkk.* 2008: 17).

### 3. Genus *Bordetella* Moreno-López 1952

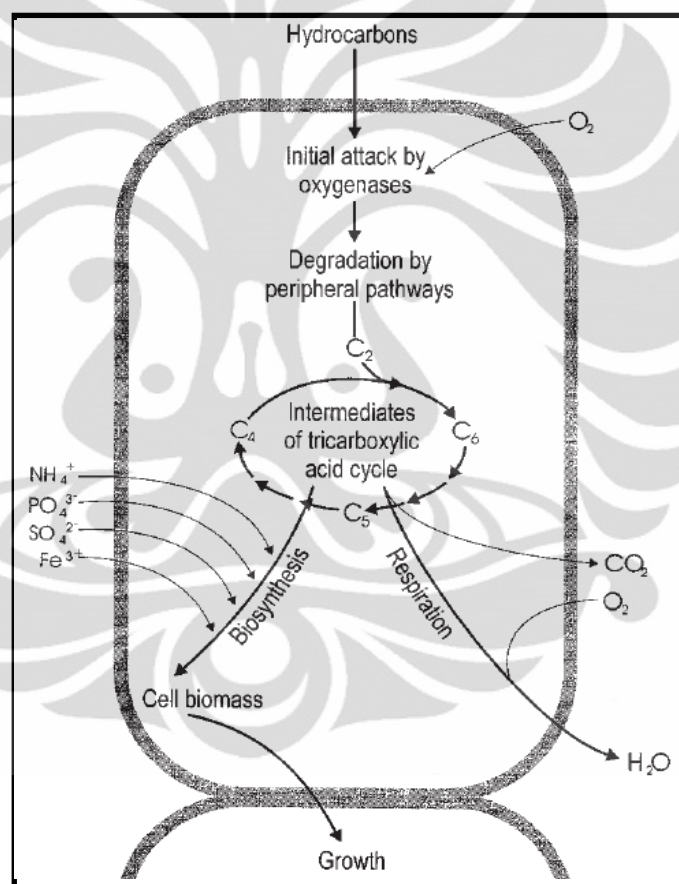
*Bordetella* sp. F2 yang diisolasi dari Perairan Teluk Jakarta merupakan salah satu contoh bakteri dari genus *Bordetella* yang mampu menggunakan senyawa *pyrene*, *phenanthrene*, *dibenzothiophene* (DBT) dan *fluorene* sebagai sumber karbon (karbon tunggal) dan memiliki pertumbuhan sangat baik di *Arabian Light Crude Oil* (ALCO) serta dapat memineralsasi 1,2,4 *Tri Chloro Benzene* (TCB) (Wang *dkk.* 2007: 901; Hatmanti & Darmayati 2010: 5--6).

Zhu *dkk.* (2001: 19) menyatakan bahwa biodegradasi minyak di alam secara alamiah tidak hanya didegradasi oleh satu spesies saja tetapi juga melibatkan lebih dari satu mikroba atau dikenal sebagai konsorsium. Konsorsium bakteri dapat diartikan sebagai campuran berbagai bakteri yang memiliki hubungan kooperatif, komensal dan mutualisme karena setiap spesies tunggal bakteri hanya mampu mendegradasi sejumlah senyawa tertentu pada komponen minyak sehingga dengan adanya gabungan berbagai spesies bakteri, maka degradasi hidrokarbon akan lebih efektif (Roling *dkk.* 2002: 5537; Nugroho 2006: 124). Salah satu contoh konsorsium bakteri yang digunakan dalam bioremediasi adalah campuran dari *Pseudomonas spp.*, *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Acinetobacter*. Konsorsium bakteri tersebut mampu mendegradasi senyawa *phenantrene* hingga 92,75% dibandingkan hanya dengan inokulasi satu spesies bakteri yaitu sebesar 85,52%--87,75% (Nasseri *dkk.* 2010: 206).

#### 2.6. Mekanisme Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi oleh Bakteri

Degradasi hidrokarbon minyak bumi oleh bakteri umumnya dilakukan dalam kondisi aerob. Degradasi secara aerob akan lebih cepat dan lebih efektif dibandingkan dengan degradasi anaerob karena menggunakan energi yang lebih sedikit dan menghasilkan energi yang lebih banyak dibandingkan reaksi anaerob (Malatova 2005: 6--7). Mekanisme degradasi hidrokarbon minyak bumi secara umum diawali mikroba berlekatan dengan hidrokarbon minyak bumi secara optimal melalui mekanisme adhesi spesifik untuk mengeliminir komponen heteropolisakarida anionik yang terdapat pada bagian kapsul atau dinding sel

bakteri maupun melalui proses emulsifikasi dengan menghasilkan biosurfaktan. Aktivitas biodegradasi minyak bumi terjadi secara intraselular dan diaktivasi oleh molekul oksigen melalui reaksi oksidasi yang menggunakan enzim oksigenase. Biodegradasi terjadi pada jalur peripheral untuk mengkonversi senyawa hidrokarbon secara bertahap menjadi senyawa intermediet seperti senyawa asetil CoA. Asetil CoA akan memasuki siklus asam trikarboksilat dan menghasilkan  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  serta energi untuk pertumbuhannya (Gambar 2.6.(1)) (Fritsche & Hofrichter 2000: 147; Nugroho 2006: 122).



Gambar 2.6.(1) Mekanisme degradasi hidrokarbon minyak bumi secara aerob oleh bakteri

[Sumber : Fritsche & Hofrichter 2000: 147.]

## 2.7. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Proses Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Keberhasilan proses biodegradasi sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan. Berbagai faktor tersebut diantaranya komposisi minyak, komunitas mikroba serta kondisi lingkungan (suhu, oksigen, pH dan nutrien) (Leahy & Colwell 1990: 305). Faktor-faktor tersebut dapat diuraikan sebagai berikut:

### 1. Komposisi minyak (struktur kimia)

Biodegradasi suatu senyawa berkaitan erat dengan struktur senyawa hidrokarbon maupun konsentrasi minyak. Biodegradasi hidrokarbon minyak bumi oleh mikroba terjadi pada hidrokarbon jenuh terlebih dahulu dan diikuti dengan hidrokarbon aromatik. Konsentrasi hidrokarbon minyak yang tinggi memiliki tingkat toksik yang tinggi pula sehingga dapat menyebabkan laju biodegradasi hidrokarbon minyak bumi menurun (Leahy & Colwell 1990 : 305).

### 2. Komunitas mikroba

Degradasi hidrokarbon minyak bumi juga tergantung oleh komunitas mikroba (Leahy & Colwell 1990: 310). Beberapa karakteristik penting yang harus dimiliki mikroba hidrokarbonoklastik diantaranya memiliki enzim oksigenase dan mengikat hidrokarbon, menghasilkan emulsifier, mengoptimalkan kontak antara mikroorganisme dengan hidrokarbon (Rosenberg & Ron 1996: 101). Selain itu, proses biodegradasi hidrokarbon minyak bumi dipengaruhi oleh jumlah mikroba hidrokarbonoklastik karena jumlah mikroba yang cukup akan menghasilkan banyak produk enzim tertentu yang dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi (Nugroho 2006: 93).

### 3. Suhu

Suhu mempengaruhi proses biodegradasi yang juga akan mempengaruhi populasi mikroba, laju degradasi hidrokarbon. Menurut Atlas dan Bartha 1992,

umumnya suhu optimum untuk mendegradasi hidrokarbon minyak bumi adalah 20--30 °C (*lihat Saadoun & Al-Ghzawi 2005: 179*). Laju biodegradasi akan menurun seiring menurunnya suhu maupun sebaliknya (*Zhu dkk. 2001: 22*). Suhu yang rendah akan menurunkan laju aktivitas enzim, dan volatilitas alkana dengan rantai pendek yang bersifat toksik akan menurun dan kelarutannya di air mengalami peningkatan sehingga menghambat atau memperlambat laju biodegradasi (*Leahy & Colwell 1990: 307*).

#### 4. Oksigen

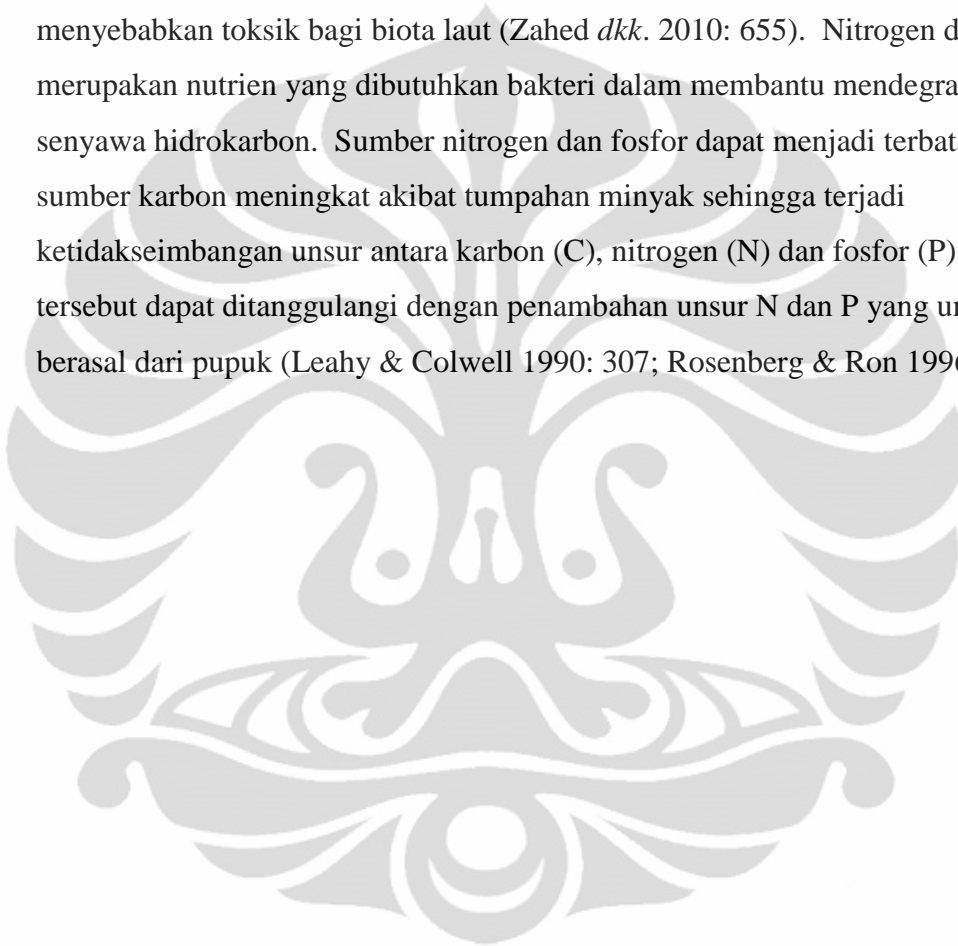
Oksigen merupakan salah faktor utama yang dibutuhkan dalam proses biodegradasi hidrokarbon yang melibatkan enzim oksigenase agar molekul hidrokarbon dapat digunakan sebagai sumber karbon oleh mikroba untuk metabolisme sel (*Nugroho 2006: 40*). Proses biodegradasi hidrokarbon akan lebih efektif ketika dalam kondisi aerob karena bakteri secara efektif dapat mendegradasi senyawa alifatik dan aromatik (*Prince dkk. 2003: 464*). Degradasi senyawa alifatik, siklik, serta aromatik oleh bakteri dan fungi melibatkan oksidasi substrat melalui oksigenase sehingga oksigen diperlukan sebagai katalis enzim oksidasi (*Leahy & Colwell 1990: 307*).

#### 5. pH

pH di lingkungan perairan laut umumnya bersifat sedikit alkali (basa) dan stabil (*Saadoun & Al-Ghzawi 2005: 181*). Umumnya bakteri heterotrof dan fungi lebih menyukai pH yang mendekati netral. Bakteri tidak dapat mendegradasi hidrokarbon pada kondisi pH yang ekstrim (*Leahy & Colwell 1990: 309*). Namun demikian, laju biodegradasi akan meningkat seiring meningkatnya pH, dan optimum ketika pH berada pada kondisi sedikit alkali (*Dibble & Bartha 1979: 736*).

## 6. Nutrien

Nutrien merupakan sumber pendukung mikroba untuk dapat tetap hidup, tumbuh, dan berkembang biak serta menghasilkan enzim-enzim untuk mendegradasi hidrokarbon. Konsentrasi nutrien yang rendah dapat menghambat laju degradasi senyawa hidrokarbon, sedangkan konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan toksik bagi biota laut (Zahed *dkk.* 2010: 655). Nitrogen dan fosfor merupakan nutrien yang dibutuhkan bakteri dalam membantu mendegradasi senyawa hidrokarbon. Sumber nitrogen dan fosfor dapat menjadi terbatas karena sumber karbon meningkat akibat tumpahan minyak sehingga terjadi ketidakseimbangan unsur antara karbon (C), nitrogen (N) dan fosfor (P). Hal tersebut dapat ditanggulangi dengan penambahan unsur N dan P yang umumnya berasal dari pupuk (Leahy & Colwell 1990: 307; Rosenberg & Ron 1996: 113).



## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Bidang Dinamika Laut, Pusat Penelitian Oseanografi (P2O) LIPI di Jl. Pasir Putih I, Ancol, Jakarta Utara selama 7 bulan dari April--Oktober 2011.

### 3.2. Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain autoklaf [Tomy SX-500], *clean bench* [Sanyo MCV-B131F(T)], *incubator shaker*, *incubator statis* [Sanyo, MIR-153], UV spektrofotometer ultraspec 3300 pro [Amersham Pharmacia Biotech], vortex [Mixer Fisher 02215366], mikroskop epifluoresense [Nikon], mikroskop [Euromex], mikropipet [pipetPAL] berukuran 200  $\mu$ l, dan 1000  $\mu$ l, *magnetic stirrer* [IKA RH Basic 2 ], timbangan analitik [Sartorius], *syringe* 50 ml [Terumo], *syringe filter* (0,45  $\mu$ m; 25 mm) [Millex-LH], *vacuum pump* [Eyela Type A-10005], pipet Pasteur [Fisherbrand], *beaker glass* 1.000 ml [Pyrex, Iwaki TE-32], oven [Heraeus], tabung *falcon* 50 ml, tabung *falcon* 15 ml, cawan petri steril, bunsen, jarum ose, cawan porselen, spatula *stainless* steril, kaca objek, kaca penutup, inkubator 4°C, botol polipropilen 1 l steril, jerigen air, spidol, rak *microtube* 200  $\mu$ l, spatel *drygalsky*, gelas ukur kaca bersih, botol labu bersih, bulb, tabung gelas 50 ml bersih, labu erlenmeyer, desikator, *hand counter*, termometer [Ysi], DO meter [Horiba Ysi 55], standar pH, pH meter [Fisher Accumet], ORP meter, baterai, dan gelas Polipropilen.



### 3.2.2. Bahan

#### 3.2.2.1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian adalah *Alcanivorax* sp. TE-9, *Bordetella* sp. F2 dan *Pseudomonas balearica* ST 101 koleksi biakan Laboratorium Mikrobiologi, Bidang Dinamika Laut, Pusat Penelitian Oseanografi (P2O) LIPI.

#### 3.2.2.2. Medium

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan dan peremajaan bakteri adalah *Marine Agar* (MA). Medium air laut alami steril yang diperkaya dengan N dan P serta *yeast extract* 1% (b/v) untuk adaptasi bakteri. Medium air laut alami dan sedimen serta *Arabian Light Crude Oil* (ALCO) yang berasal dari Cilacap dicampur dan digunakan sebagai medium uji hidrokarbon minyak bumi.

#### 3.2.2.3. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan diantaranya *acridine orange* [Merck], akuades, alkohol 70%, alkohol 96%, safranin [ALS Environmental], *Hucker's crystal violet* [ALS Environmental], *Lugol's iodine* [ALS Environmental], *alcohol aseton*, *bacto peptone* [Conda Pronadisa], *bacto agar* [Merck], DCM (*Dichloromethane*) [Merck], *ferri fosfat* [Merck],  $K_2HPO_4$  [Merck], larutan *n-hexane* [Merck], *sudan black* [Merck], minyak imersi [Olympus],  $NH_4NO_3$  [Merck],  $Na_2SO_4$  *anhydrous* [Merck], dan *yeast extract* [Nacalai Tesque].

#### 3.2.2.4. Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan diantaranya larutan NaCl 0,8%, masker, sarung tangan, tisu, *aluminium foil*, kertas label, kapas, *pipet tips* [Watson] berukuran 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, membran filter selulosa nitrat Whatman (0,45  $\mu$ m-- $\varnothing$ 47 mm), dan membran filter polikarbonat Whatman (0,2  $\mu$ m-- $\varnothing$ 25 mm).

### 3.3. Cara Kerja

Skema kerja penelitian terdapat pada lampiran 1.

#### 3.3.1. Rancangan penelitian

Penelitian bersifat eksperimental yang disusun berdasarkan metode *split plot* yang terdiri atas *main plot* (variasi jumlah inokulum bakteri) dan *sub plot* (waktu inkubasi) dengan 3 ulangan (Sudjana 1980: 227). Metode bioaugmentasi dilakukan dengan menguji berbagai jumlah inokulum konsorsium bakteri ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , dan  $10^{10}$  sel/ml) ke dalam medium uji hidrokarbon minyak bumi. Pemilihan jenis bakteri dan total inokulum konsorsium bakteri berdasarkan pada penelitian Arifah (2010: 36). Total inokulum konsorsium bakteri  $10^8$  sel/ml dijadikan sebagai nilai tengah. Medium uji hidrokarbon minyak bumi tanpa inokulum konsorsium bakteri sebagai kontrol positif (K+), sedangkan medium uji hidrokarbon minyak bumi yang disterilisasi sebagai kontrol negatif (K(-)). Medium uji hidrokarbon minyak bumi diinkubasi pada hari ke-0, 2, 5, 9, 14 dan 28. Inkubasi dilakukan di dalam *incubator shaker* pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan pengocokan 100 rpm.

Tabel 3.3.(1). Perlakuan yang diujikan ke dalam medium tercemar minyak bumi

Kode	Perlakuan
K(-)	Sedimen dicemari minyak 10 g + air laut alami sampai volume 15 ml tanpa inokulum konsorsium bakteri (steril)
K (+)	Sedimen dicemari minyak 10 g dan air laut alami sampai volume 15 ml tanpa inokulum konsorsium bakteri
K6	Sedimen dicemari minyak 10 g + air laut alami sampai volume 15 ml dengan inokulum konsorsium bakteri $10^6$ sel/ml
K7	sedimen dicemari minyak 10 g + air laut alami sampai volume 15 ml dengan inokulum konsorsium bakteri $10^7$ sel/ml
K8	Sedimen dicemari minyak 10 g + air laut alami sampai volume 15 ml dengan inokulum konsorsium bakteri $10^8$ sel/ml
K9	Sedimen dicemari minyak 10 g + air laut alami sampai volume 15 ml dengan inokulum konsorsium bakteri $10^9$ sel/ml
K10	Sedimen dicemari minyak 10 g + air laut alami sampai volume 15 ml dengan inokulum konsorsium bakteri $10^{10}$ sel/ml

### 3.3.2. Pembuatan Medium

#### 3.3.2.1. *Marine Agar (MA)*

Medium MA dibuat berdasarkan Zobell (1941: 97). Sebanyak 5 g *bacto peptone*, 3 g *yeast extract*, 0,01 g *ferri fosfat* ( $\text{Fe}(\text{PO}_4)$ ), 15 g *bacto agar* dilarutkan dengan 750 ml air laut dan ditambahkan dengan akuades hingga 1000 ml. Medium dipanaskan dan dihomogenisasi dengan *magnetic stirrer*. Medium yang telah homogen disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Medium tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri ± 15--20 ml dan didiamkan hingga mengeras.

#### 3.3.2.2. Medium Air Laut Alami

Sebanyak 0,5 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dan 0,1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dilarutkan dalam 1.000 ml air laut Cilacap dan dihomogenkan. Medium air laut alami tidak disteril untuk medium uji hidrokarbon minyak bumi tetapi medium air laut untuk tahap adaptasi disterilisasi terlebih dahulu.

#### 3.3.2.3. Medium Tahap Adaptasi Bakteri

Medium tahap adaptasi bakteri hidrokarbonoklastik terdiri atas medium air laut alami steril yang diperkaya N dan P serta 1% (b/v) *yeast extract*.

### 3.3.3. Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture* *Alcanivorax* sp. TE-9, *Bordetella* sp. F2, dan *Pseudomonas balearica* ST 101.

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* dilakukan dengan menginokulasikan biakan bakteri ke dalam 6 tabung berisi 5 ml medium agar miring. Medium yang digunakan adalah medium MA. Inokulasi biakan bakteri dilakukan dengan metode *streak* menggunakan jarum tanam bulat (ose). Tabung reaksi berisi biakan bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Tiga tabung biakan digunakan sebagai *stock culture* dan disimpan pada suhu 4 °C

dalam lemari pendingin, sedangkan 3 tabung lainnya digunakan sebagai *working culture* dan disimpan pada suhu ruang.

#### 3.3.4. Karakterisasi Bakteri Hidrokarbonoklastik

Pengamatan karakterisasi bakteri dilakukan untuk mengetahui karakter morfologi yang dimiliki oleh mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian. Pengamatan karakter morfologi dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik berdasarkan Benson (2001: 64--66).

##### 3.3.4.1. Pengamatan Makroskopik

Koloni bakteri diinokulasikan dengan cara gores pada medium MA dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 30 °C. Pengamatan makroskopik meliputi bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni, dan tepi koloni.

##### 3.3.4.2. Pengamatan Mikroskopik

###### 3.3.4.2.1. Pembuatan Preparat Olesan Bakteri

Kaca preparat dibersihkan dengan alkohol 70% . Beberapa ose akuades steril diletakkan di atas permukaan kaca preparat. Sebanyak satu ose biakan bakteri diletakkan dalam tetesan akuades dan diratakan. Tetesan akuades yang berisi bakteri dikeringkan dan difiksasi dengan melewati kaca preparat di atas nyala api spirtus sebanyak 3--4 kali.

###### 3.3.4.2.2. Pewarnaan Gram

Larutan gram A (*Hucker Crystal Violet*) ditetaskan di atas kaca preparat olesan bakteri sebanyak 2--3 tetes dan dibiarkan selama 1 menit. Olesan bakteri dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas isap secara hati-hati. Preparat olesan bakteri ditetesi larutan gram B (*mordan Lugol's Iodin*) sebanyak

1--2 tetes dan dibiarkan selama 1 menit. Olesan bakteri dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas isap secara hati-hati. Preparat olesan bakteri ditetesi larutan gram C (alkohol aseton) sebanyak 1--2 tetes dan dibiarkan selama 30 menit. Olesan bakteri dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas isap secara hati-hati. Preparat olesan bakteri ditetesi larutan gram D (safranin) sebanyak 1--2 tetes dan dibiarkan selama 30 menit. Olesan bakteri dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas isap secara hati-hati. Preparat olesan bakteri diamati dibawah mikroskopik pada perbesaran 1000x menggunakan minyak imersi (Gandjar *dkk.* 1992: 32).

### 3.3.5. Tahap Adaptasi Bakteri Hidrokarbonoklastik

Tahap adaptasi bakteri hidrokarbonoklastik dibuat berdasarkan Nugroho (2007: 15) yang telah dimodifikasi. Bakteri hidrokarbonoklastik diremajakan menggunakan medium MA dengan metode gores pada cawan petri, dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30 °C. Sebanyak satu ose bakteri diinokulasikan ke tabung yang berisi 80 ml medium cair (air laut alami steril yang diperkaya N dan P serta 1% (b/v) *yeast extract*) yang mengandung 50 ppm minyak steril jenis ALCO. Kultur bakteri diinkubasi di *incubator shaker* pada suhu 30 °C selama 48 jam. Selanjutnya, sebanyak 10% (v/v) dari kultur bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair dengan konsentrasi minyak sebesar 100 ppm dan diinkubasi di *incubator shaker* pada suhu 30 °C selama 48 jam. Adaptasi selanjutnya terus dilakukan dengan masa inkubasi 2 hari, dan dengan konsentrasi minyak yang lebih tinggi (10 kali lipat dari konsentrasi sebelumnya) sampai mencapai konsentrasi 100.000 ppm (10%). Satu ose dari masing-masing kultur bakteri pada semua konsentrasi minyak di *streak* di medium MA dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam, lalu perbanyak bakteri dilakukan untuk medium adaptasi dengan konsentrasi minyak 100.000 ppm pada medium MA selama 72 jam.

### 3.3.6. Pembuatan Konsorsium Bakteri

Bakteri hidrokarbonoklastik yang telah diperbanyak di medium MA dimasukkan dan koloni bakteri dikerik dengan spatel *drygalsky*. Selanjutnya suspensi bakteri diambil sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung *falcon* steril yang baru. Masing-masing suspensi bakteri dihitung total sel bakterinya menggunakan metode *Acridine Orange Direct Count* (AODC) dengan mikroskop fluoresensi. Sel bakteri yang telah diketahui totalnya diencerkan dengan air laut steril untuk mendapatkan total sel bakteri ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , dan  $10^{10}$  sel/ml) untuk diinokulasikan ke dalam medium uji hidrokarbon minyak bumi.

Jumlah total sel bakteri (sel/ml) bakteri dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Keterangan:

$C_1$  = total biakan tunggal sel bakteri yang diketahui (sel/ml)

$C_2$  = total biakan tunggal sel bakteri yang diinginkan (sel/ml)

$V_1$  = volume total biakan tunggal bakteri sebelum diencerkan (ml)

$V_2$  = volume awal biakan tunggal bakteri setelah diencerkan (ml)

(Harley & Presscot 2002: 417).

Volume suspensi bakteri yang diperoleh dibagi tiga untuk mendapatkan volume masing-masing suspensi bakteri penyusun konsorsium, setiap konsorsium terdiri dari campuran tiga jenis bakteri (Lampiran 12).

Salah satu contoh perhitungan volume suspensi bakteri yang akan diinokulasikan ke dalam medium uji hidrokarbon minyak bumi (sedimen + air laut (10 g/15 ml)) berdasarkan Darmayati (2009: 20) dengan uraian sebagai berikut:

Total sel bakteri setiap strain per ml suspensi bervariasi sehingga dilakukan pengenceran untuk memperoleh total sel bakteri yang sama pada setiap jenisnya dengan menambahkan larutan NaCl 0,8 % steril. Total sel bakteri yang terkecil dijadikan patokan, misalnya *Bacillus* sp. L41 sebesar  $1,35 \times 10^9$  sel/ml.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 1,4 \cdot 10^9 \text{ sel/ml} = (15 + V_1) \times 10^8 \text{ sel/ml}$$

$$12,5 V_1 = 15$$

$$V_1 = 1,2 \text{ ml}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh  $V_1$  yaitu volume suspensi konsorsium bakteri yang diinokulasikan kedalam medium uji sebesar 1,2 ml. Konsorsium bakteri terdiri atas tiga jenis bakteri sehingga volume suspensi bakteri untuk setiap bakteri yang diinokulasikan adalah 0,4 ml.

### 3.3.7. Pembuatan Larutan untuk Penghitungan Total Sel Bakteri (sel/ml)

Pembuatan larutan untuk penghitungan total sel bakteri dengan metode *Acridine Orange Direct Count* (AODC) berdasarkan Hobbie *dkk.* (1977: 1225--1226) dan Gómez-Ullate *dkk.* (2008: 4) yang telah dimodifikasi. Pembuatan larutan tersebut terdiri dari 25 ml *acridine orange*, 4 ml formaldehid 40%, dan 200 ml larutan NaCl 2% serta 100 ml *sudan black*.

#### 3.3.7.1 Larutan *Acridine Orange* 0,05%

Sebanyak 0,6 g  $K_2HPO_4$  dan 0,2 g  $KH_2PO_4$  dilarutkan dalam 250 ml akuades dengan *magnetic stirrer*, lalu ditambah 0,1 g *Acridine Orange* (AO). Larutan disaring dengan membran filter selulosa nitrat (0,45  $\mu\text{m}$ -- $\varnothing$  47 mm) dan disimpan dalam botol gelap pada suhu 4°C.

#### 3.3.7.2 Larutan NaCl 2%

Sebanyak 20 g NaCl dilarutkan dengan 1.000 ml akuades dan dihomogenisasi selama  $\pm$  15 menit. Larutan tersebut disaring dengan membran filter selulosa nitrat (0,45  $\mu\text{m}$ -- $\varnothing$  47 mm) dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Sebanyak 25 ml larutan AO 0,05%, 200 ml NaCl 2%, dan 4 ml formalin 40% dicampur dan dihomogenisasikan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan tersebut disimpan dalam botol gelap steril pada suhu 4 °C hingga siap untuk digunakan.

### 3.3.7.3 Larutan *Sudan Black*

Larutan *sudan black* dibuat dengan mencampurkan 4 mg *sudan black* serbuk dengan 50 ml etanol, dan di *stirrer* hingga larut. Selanjutnya ditambahkan 50 ml akuades dan dihomogenkan kembali dan disaring dengan membran filter selulosa nitrat (0,45  $\mu\text{m}$ -- $\text{Ø}$  47 mm). Larutan disimpan dalam botol gelap pada suhu 4°C hingga siap untuk digunakan.

### 3.3.7.4 Larutan NaCl (0,8%)

Pembuatan larutan NaCl (0,8 %) dilakukan dengan menambahkan 8 g NaCl ke dalam 1.000 ml akuades dan di *stirrer* hingga larut. Larutan salin tersebut disaring dengan membran filter selulosa nitrat (0,45  $\mu\text{m}$ -- $\text{Ø}$  47 mm) dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C, 2 atm selama 15 menit.

## 3.3.8. Penyiapan Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi

### 3.3.8.1. Pembuatan *Mousse Oil*

*Mousse oil* dibuat dengan mencampurkan 100 ml minyak jenis ALCO tidak steril dengan 300 ml air laut Cilacap (1:3) dan diblender sebanyak 15 kali dalam waktu 1 menit setiap satu kali blender. *Mousse oil* diinkubasi selama 5 hari pada suhu 4 °C.

### 3.3.8.2 Homogenisasi Sedimen

Sedimen diambil dari lima titik sampling pantai Cilacap dengan 3 ulangan menggunakan sekop steril. Selanjutnya dimasukkan ke botol polipropilen steril. Sampel dibawa ke Jakarta menggunakan *Cool Box* yang berisi es. Selanjutnya sampel dikeluarkan dari botol polipropilen steril. Sedimen diayak dengan saringan sedimen (porositas 40  $\mu\text{m}$  - 250  $\mu\text{m}$ ) untuk mendapatkan sedimen dengan ukuran butiran yang seragam. Sedimen dari setiap titik sampling yang telah diayak dihomogenisasikan menggunakan spatula steril pada wadah *stainless steel*



yang telah dibersihkan dengan diklorometana dan alkohol 70%. Sedimen dari masing-masing titik sampling yang telah homogen diambil sebanyak 450 g dan dihomogenisasi kembali selama 30 menit. Sedimen yang telah homogen dari ke lima titik sampling diekstraksi sebagai contoh untuk mengetahui konsentrasi awal minyak dengan maserasi dan pengukuran konsentrasi minyak menggunakan metode gravimetri.

### 3.3.8.3 Pembuatan Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi

Sebanyak 4,75 g *mousse oil* dimasukkan kedalam tabung *falcon* 50 ml dan sedimen sebanyak 10 g, lalu dimasukkan air laut alami hingga 15 ml serta diinokulasikan berbagai inokulum konsorsium bakteri sebesar  $10^6$ -- $10^{10}$  sel/ml.

### 3.3.9. Pengukuran Variabel Utama Penelitian

Pengukuran variabel penelitian yang utama dalam proses bioremediasi adalah pengukuran konsentrasi minyak (%) dan jumlah total sel bakteri (sel/ml).

#### 3.3.9.1 Perhitungan Jumlah Total Sel Bakteri (sel/ml)

Perhitungan jumlah total sel bakteri dilakukan dengan metode AODC dengan mikroskop epifluoresense. Membran filter polikarbonat Whatman (0,2  $\mu\text{m}$ -- $\varnothing$  25 mm) direndam dalam larutan *sudan black* selama 24 jam. Membran filtertersebut dibilas satu kali dengan akuades steril dan diletakkan di atas penyangga saringan (*filter holder*).

Masing-masing medium uji yang telah diinkubasi (hari ke-0,2,5,9, 14 dan 28) diambil sebanyak 100  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi 0,9 ml *acridine orange*. Sebanyak 1 ml medium uji tersebut disaring dengan membran filter yang telah direndam *sudan black* steril. Membran filter tersebut diletakkan pada kaca objek yang telah diberi minyak imersi terlebih dahulu. Minyak imersi ditetaskan kembali di atas permukaan membran filter dan ditutup dengan kaca penutup, selanjutnya ditetesi kembali dengan minyak imersi.

Penghitungan jumlah total sel bakteri dilakukan secara langsung di bawah mikroskop epifluoresense pada 10 bidang pandang berbeda dengan perbesaran 10 x 100. Jumlah total sel bakteri per ml dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Jumlah total sel bakteri} = \left\{ N \times \frac{V_1 + V_2}{V_2} \times A \times DF \right\} \frac{1}{V_3 \times a}$$

Keterangan:

N = rata-rata sel bakteri pada 10 bidang pandang

V<sub>1</sub> = volume larutan *acridine orange* (ml)

V<sub>2</sub> = volume sampel dalam larutan *acridine orange* (ml)

V<sub>3</sub> = volume larutan sampel yang disaring (ml)

A = luas area permukaan membran filter polikarbonat (20 mm)

a = luas bidang pandang mikroskop ( $\pi r^2 = 3,14 \times (0,07)^2 = 0,015386 \text{ mm}^2$ )

DF = 1/faktor pengenceran

(Zimmerman & Reil 1974: 875--877; Hobbie *dkk.* 1977: 1225--1226; Boulos *dkk.* 1999: 79).

### 3.3.9.2. Ekstraksi Hidrokarbon Minyak Bumi

Total hidrokarbon minyak bumi dalam medium uji diukur dengan metode gravimetri berdasarkan Greenberg 1992 (*lihat* Herdiyantoro (2005: 27)) yang telah dimodifikasi. Senyawa hidrokarbon diekstrak menggunakan pelarut *Dichloromethane* (DCM) dan n-heksana (1:1) dengan dilakukan pengocokan. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu  $\pm 18^\circ\text{C}$  selama 5 menit untuk memisahkan larutan DCM-hexana dengan minyak dari medium uji hidrokarbon minyak bumi. Ekstrak hidrokarbon minyak bumi diambil menggunakan pipet pasteur dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 3 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> *anhydrous*. Tabung reaksi tersebut ditutup dan didiamkan selama 24 jam.

Ekstrak senyawa hidrokarbon minyak yang berada di tabung reaksi tersebut dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah di oven dan ditimbang

terlebih dahulu. Cawan porselen dioven pada suhu 100 °C selama 30 menit dan disimpan didalam desikator ± 30 menit. Perlakuan diulangi sampai berat cawan porselen konstan sebelum dimasukkan ekstrak hidrokarbon minyak. Cawan yang telah berisi ekstrak hidrokarbon minyak ditutup dengan *aluminium foil* hingga hasil ekstrak menguap. Selanjutnya cawan porselen ditimbang kembali. Berat minyak terukur adalah selisih antara berat cawan akhir dengan awal.

Rumus perhitungan berat minyak bumi terukur adalah:

$$BM = x - y$$

Keterangan:

BM = berat minyak bumi (g)

x = berat cawan porselen + berat minyak bumi (g),

y = berat cawan porselen kosong (g).

Rumus perhitungan persentase degradasi minyak bumi adalah

$$\% B = \frac{(BM_o - BM_n)}{BM_o} \times 100\%$$

Keterangan:

% B = persen degradasi (%),

BM<sub>o</sub> = berat minyak awal (g),

BM<sub>n</sub> = berat minyak akhir (g).

### 3.3.10. Pengukuran Kondisi Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi.

Pengukuran kondisi medium uji hidrokarbon minyak bumi yang diukur terdiri atas *Dissolved Oxygen* (DO), suhu, dan pH.

#### 3.3.10.1. Pengukuran Oksigen Terlarut (DO) dan Suhu

Pengukuran oksigen terlarut dan suhu dilakukan menggunakan alat DO meter HORIBA YSI 55. *Probe* DO meter dikalibrasi terlebih dahulu sebelum digunakan dalam medium uji hidrokarbon minyak bumi, lalu pengukuran dimulai setelah *probe* dimasukkan selama sepuluh detik.

### 3.3.10.2. Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter HORIBA Navi D-54. *Probe* pH meter dikalibrasi terlebih dahulu sebelum digunakan dalam medium uji hidrokarbon minyak bumi, lalu pengukuran dimulai setelah *probe* dimasukkan selama sepuluh detik.

### 3.3.11. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian berupa data persentase rata-rata degradasi hidrokarbon minyak bumi, total sel bakteri, oksigen terlarut, pH, dan suhu dalam bentuk tabel dan grafik. Interpretasi data ke dalam bentuk grafik dilakukan dengan program *Microsoft Office Excel 2007*. Data tersebut ditabulasikan untuk selanjutnya dianalisis secara deskriptif. Data persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi juga dianalisis dengan uji F dengan tingkat kesalahan 5 % dan dilanjutkan dengan uji lanjut LSD ( $\alpha = 0,05$ ) serta korelasi sederhana antara rata-rata persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi dengan jumlah total sel bakteri.

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Pengamatan Morfologi Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam pengujian degradasi hidrokarbon minyak bumi adalah *Pseudomonas balearica* ST 101, *Alcanivorax* sp. TE-9, dan *Bordetella* sp. F2. Pengamatan karakter morfologi bakteri meliputi pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik koloni bakteri meliputi bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni dan tepi koloni, sedangkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dilakukan dengan pengecatan gram.

Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Pseudomonas balearica* ST 101 adalah sebagai berikut: bentuk koloni bulat, warna koloni putih, tekstur koloni granular, dan tepi koloni *entire*. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Alcanivorax* sp. TE-9 adalah sebagai berikut: bentuk koloni bulat, warna koloni putih, tekstur koloni granular, dan tepi koloni *entire*. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Bordetella* sp. F2 adalah sebagai berikut: bentuk koloni bulat, warna koloni putih transparan, tekstur koloni granular, dan tepi koloni *entire*. Hasil pengamatan makroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.1.(1), Tabel 4.1.(2), dan Tabel 4.1.(3), serta Gambar 4.1.(1).

Pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik melalui pengecatan gram. Hasil pengecatan gram dari *Pseudomonas balearica* ST 101 berbentuk batang dan sel berwarna merah serta berukuran  $(0,6--1,0) \times (4,7--5,0) \mu\text{m}$ . *Alcanivorax* sp. TE-9 berbentuk batang dan sel berwarna merah serta berukuran  $(0,5--0,7) \times (2,5--3,0) \mu\text{m}$ . *Bordetella* sp. F2. berbentuk kokobasilus dan sel berwarna merah serta berukuran  $(0,3--0,7) \times (1,6--2,0) \mu\text{m}$  (Gambar 4.1.(2)). Sel yang berwarna merah menunjukkan bahwa bakteri digolongkan ke dalam bakteri gram negatif. Menurut Madigan *dkk.* (2012: 323--324), *Pseudomonas* merupakan kelompok bakteri gram negatif yang memiliki sel berbentuk batang. Menurut

Yakimov *dkk.* (1998: 339), *Alcanivorax* merupakan kelompok bakteri gram negatif. Hasil pengamatan mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 4.1.(1), Tabel 4.1.(2), dan Tabel 4.1.(3), serta Gambar 4.1.(1).

Tabel 4.1.(1). Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik *Pseudomonas balearica* ST 101 pada medium MA

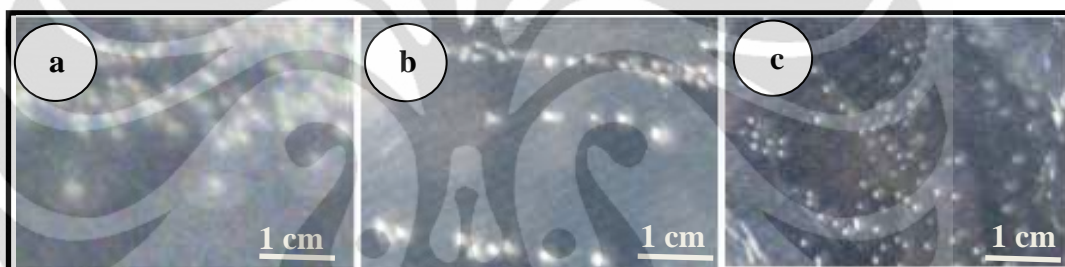
Karakter Morfologi		Keterangan
Makroskopik		
a.	Bentuk koloni	Bulat
b.	Warna koloni	Putih
c.	Tekstur koloni	Granular
d.	Tepi koloni	<i>Entire</i>
Mikroskopik		
a.	Bentuk koloni	Batang
b.	Ukuran sel	(0,6--1,0) x (4,7--5,0) $\mu\text{m}$
c.	Jenis gram	Negatif

Tabel 4.1.(2). Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik *Alcanivorax* sp. TE-9 pada medium MA

Karakter Morfologi		Keterangan
Makroskopik		
a.	Bentuk koloni	Bulat
b.	Warna koloni	Putih
c.	Tekstur koloni	Granular
d.	Tepi koloni	<i>Entire</i>
Mikroskopik		
a.	Bentuk koloni	Batang
b.	Ukuran sel	(0,5--0,7) x (2,5--3,0) $\mu\text{m}$
b.	Jenis gram	Negatif

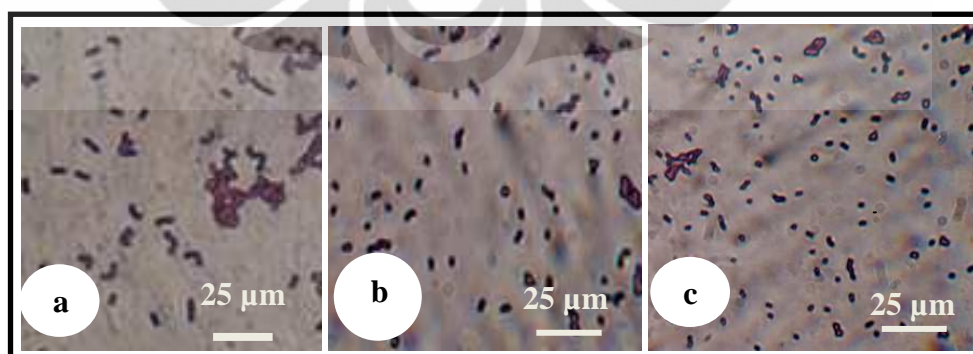
Tabel 4.1.(3). Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik *Bordetella* sp. F2 pada medium MA

Karakter Morfologi		Keterangan
Makroskopik		
a.	Bentuk koloni	Bulat
b.	Warna koloni	Putih transparan
c.	Tekstur koloni	Granular
c.	Tepi koloni	<i>Entire</i>
Mikroskopik		
a.	Bentuk koloni	Kokobasilus
b.	Ukuran sel	( 0,3--0,7) x (1,6--2,0) $\mu\text{m}$
b.	Jenis gram	Negatif



Gambar 4.1.(1). Hasil pengamatan makroskopik bakteri pada medium MA, a. *Pseudomonas balearica* ST 101, b. *Alcanivorax* sp. TE-9, c. *Bordetella* sp. F2

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.(2). Hasil pengamatan mikroskopik bakteri dengan pengecatan gram, a. *Pseudomonas balearica* ST 101, b. *Alcanivorax* sp. TE-9, c. *Bordetella* sp. F2

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## 4.2. Tahap Adaptasi Bakteri Hidrokarbonoklastik

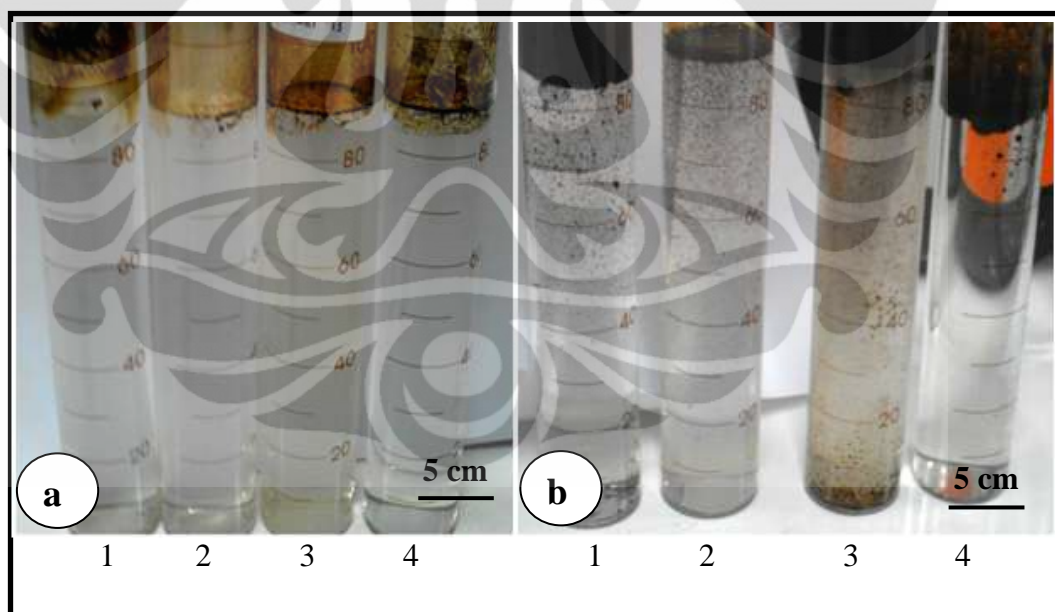
Bakteri yang digunakan sebagai inokulum bakteri dalam pengujian degradasi hidrokarbon minyak bumi adalah *Alcanivorax* sp. TE-9, *Bordetella* sp. F2, dan *Pseudomonas balearica* ST 101. Bakteri tersebut diadaptasikan pada konsentrasi minyak sebesar 50 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 10.000 ppm, dan 100.000 ppm. Adaptasi bakteri dilakukan secara bertingkat untuk merangsang kemampuan bakteri dan mengetahui ketahanan hidup bakteri terhadap konsentrasi minyak yang semakin tinggi. Menurut Leahy & Colwell (1990: 306), konsentrasi minyak yang tinggi menghambat proses degradasi hidrokarbon minyak bumi.

Tahap adaptasi bakteri menggunakan medium air laut alami yang diperkaya dengan  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  serta variasi konsentrasi minyak bumi. Kedua senyawa tersebut mengandung unsur N dan P serta sumber nutrisi anorganik untuk pertumbuhan bakteri yang secara alamiah jumlahnya terbatas di air laut. Senyawa  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$  dan pupuk merupakan nutrisi yang umum digunakan dalam bioremediasi (Venosa & Zhu 2005: 145). Menurut Bragg *dkk.* (1993), nitrogen merupakan unsur pokok protein asam nukleat yang berperan dalam pertumbuhan, perbanyakan dan pembentukan dinding sel. Fosfor merupakan komponen utama asam nukleat dan lemak sel membran yang berperan dalam proses pemindahan energi secara biologi (lihat Herdiyantoro 2005: 35). Senyawa nitrogen yang terlarut dalam air laut umumnya dalam bentuk nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) dan ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Semua mikroba menggunakan ammonium sebagai sumber nitrogen dalam proses metabolisme sel. Fosfor juga dibutuhkan untuk pembentukan enzim selular yang berfungsi untuk proses sintesis dan degradasi hidrokarbon. Menurut Yaima (2011: 72), sumber fosfor dapat berasal dari  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  atau campurannya. Senyawa fosfor yang terdapat di laut umumnya dalam bentuk fosfat. Sebagian fosfor terlarut organik berada dalam bentuk orthofosfat (O- $\text{PO}_4$ ).

Medium adaptasi bakteri mengalami perubahan secara visual berupa bulatan-bulatan kecil dan kekeruhan pada medium yang tampak jelas terjadi pada konsentrasi minyak sebesar 100.000 ppm, kecuali kontrol (Gambar 4.2.(1)).



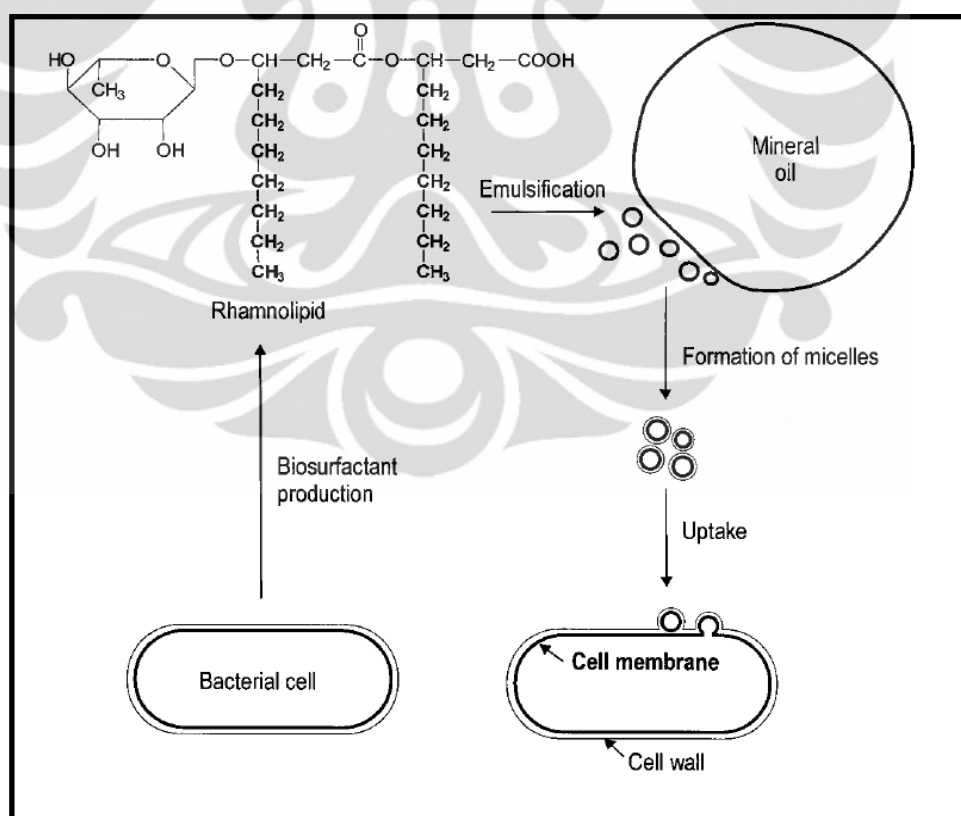
Bulatan-bulatan kecil tidak tampak jelas pada medium dengan konsentrasi minyak sebesar 10.000 ppm. Hal tersebut diduga waktu inkubasi yang lama ( $\pm$  48 jam) tetapi konsentrasi minyak bumi rendah, sehingga proses degradasi lebih cepat. Bulatan-bulatan kecil yang tampak pada medium adaptasi diduga merupakan butiran-butiran emulsi minyak hasil dari pemecahan senyawa hidrokarbon. Butiran yang tampak pada medium diduga *Alcanivorax* sp. TE-9, *Bordetella* sp. F2 dan *Pseudomonas balearica* ST 101 mampu menghasilkan biosurfaktan dan enzim ekstraselular emulsifikasi. Hasil penelitian Salam *dkk.* (2011: 249) menunjukkan bahwa *Pseudomonas* strain LP1 menghasilkan biosurfaktan sehingga dapat mendegradasi *crude oil* sebesar 92,34% dan Cappello *dkk.* (2007: 189) melaporkan *Alcanivorax borkumensis* menghasilkan biosurfaktan jenis glikolipid. Fritsche & Hofrichter (2000: 152) juga menyatakan bahwa *Pseudomonas* spp. menghasilkan biosurfaktan jenis *rhamnolipid*.



Gambar 4.2.(1) Perubahan kondisi medium adaptasi setelah diinkubasi selama 48 jam, a. kultur bakteri pada konsentrasi 10.000 ppm, b. kultur bakteri pada konsentrasi 100.000 ppm, 1. *Pseudomonas balearica* ST 101, 2. *Alcanivorax* sp. TE-9, 3. *Bordetella* sp. F2, 4. kontrol

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Menurut Christofi & Ivshina (2005: 311--314) dan Cooper & Zajic 1980: 229), biosurfaktan dapat meningkatkan kelarutan minyak maupun menurunkan tegangan permukaan minyak dengan membuat minyak terdispersi menjadi butiran-butiran kecil. Butiran minyak tersebut memiliki luas permukaan lebih besar sehingga memperbesar kontak permukaan antara bakteri dengan minyak. Hal tersebut mempercepat proses degradasi minyak bumi atau meningkatkan laju degradasi hidrokarbon minyak bumi. Menurut Blanchard (2008: 37), enzim ekstraselular emulsifikasi terdiri atas polisakarida yang berasosiasi dengan protein. Polisakarida tersebut akan menghasilkan emulsi protein ekstraselular yang dapat menyebabkan emulsi pada hidrokarbon hidrofobik. Emulsi dilepaskan dari permukaan sel bakteri oleh enzim esterase yang dapat mengaktifkan emulsi protein kompleks sehingga minyak terdispersi (Gambar 4.2.(2)).



Gambar 4.2.(2) Mekanisme penggunaan hidrokarbon minyak bumi oleh bakteri melalui biosurfaktan

[Sumber : Fritsche & Hofrichter 2000: 152.]

Perubahan medium menjadi keruh terlihat jelas hanya pada medium yang diinokulasikan *Bordetella* sp. pada konsentrasi 100.000 ppm (Gambar 4.2.(1)), sedangkan medium yang diinokulasikan bakteri *Pseudomonas balearica* ST 101 dan *Alcanivorax* sp. TE-9 tidak menunjukkan kekeruhan. Kekeruhan pada medium yang diinokulasikan *Bordetella* sp. merupakan hasil metabolit-metabolit sekunder hasil perombakan hidrokarbon minyak bumi dan melimpahnya jumlah total sel bakteri. Menurut Bushel & Slater 1981, bahwa kekeruhan medium merupakan indikasi adanya proses biologis tengah berlangsung (lihat Nugroho 2007: 16). Adanya perubahan kondisi medium perlakuan yang berbeda juga menunjukkan kemampuan dan aktivitas bakteri yang berbeda dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Hal tersebut disebabkan setiap bakteri memiliki spesifitas substrat yang berbeda. Hatmanti & Darmayati (2010: 6) melaporkan bahwa *Pseudomonas balearica* ST 101 dapat mendegradasi *phenothiazine*, *dibenzothiophene*, dan *pyrene*, sedangkan *Alcanivorax* sp. TE-9 dapat mendegradasi *fluoranthene*, *naphtalene*, *phenanthrene*, *phenothiazine*, *dibenzothiophene*, *fluorene*, *pyrene* serta *Bordetella* sp. F2 dapat mendegradasi *fluoranthene*, *phenanthrene*, *phenothiazine*, *dibenzothiophene*, *pyrene*.

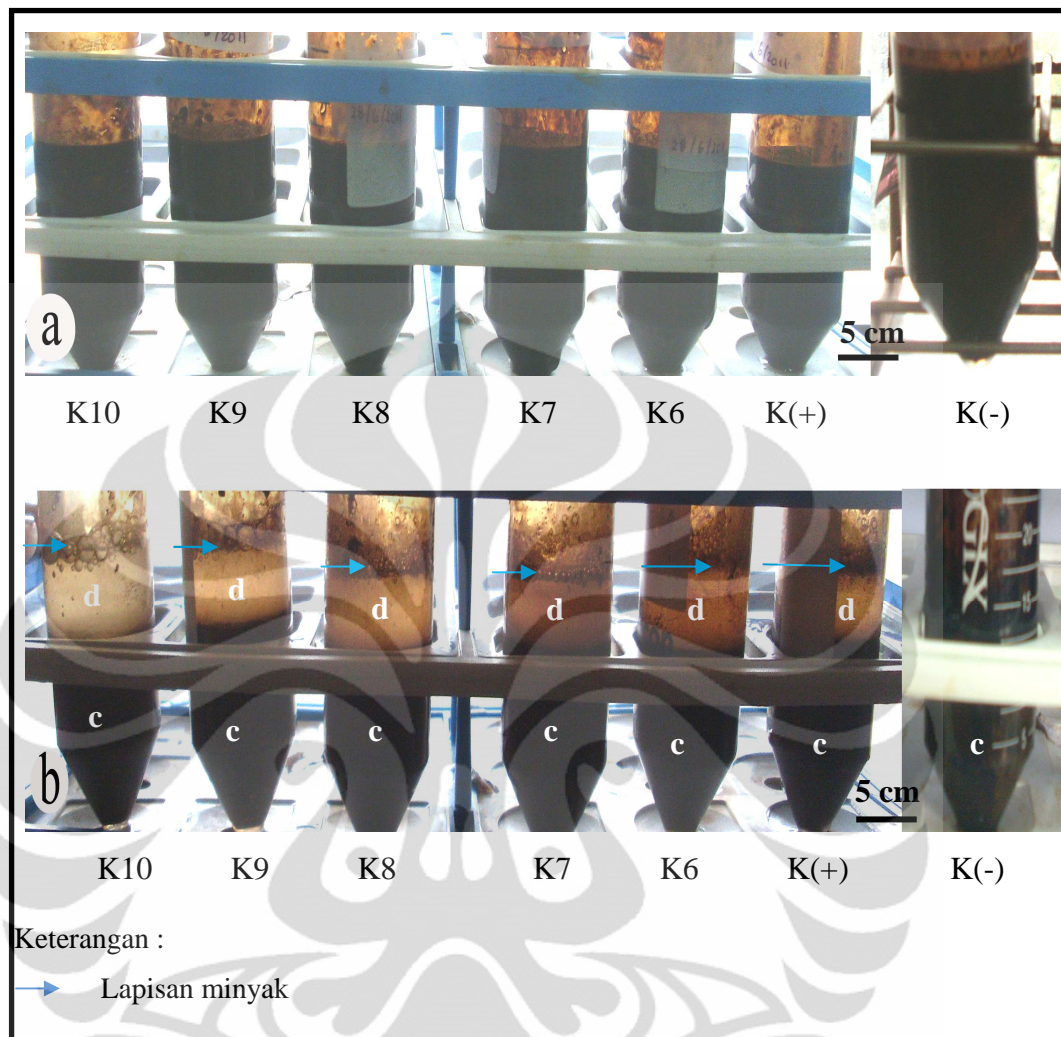
Bakteri yang telah diadaptasi sampai konsentrasi minyak sebesar 100.000 ppm (10%) ditumbuhkan kembali pada medium MA karena jumlah total sel bakteri tidak mencapai  $10^{11}$  sel/ml. Hal tersebut disebabkan waktu inkubasi pada perlakuan yang diberikan terlalu singkat yaitu 48 jam, sehingga menyebabkan pertumbuhan sel bakteri belum mencapai  $10^{11}$  sel/ml. Menurut Nugroho (2007: 16), waktu inkubasi selama 48 jam merupakan fase logaritma untuk bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Menurut Leahy & Colwell (1990: 305--306) bahwa komposisi dan konsentrasi minyak mempengaruhi laju degradasi yang juga mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Hasil penelitian Pérez Silva (2006: 74) menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 dapat tumbuh optimal (fase logaritma) di hari ke-11 pada medium garam mineral yang telah ditambahkan campuran *crude oil* jenis Mesa 30 (dari Venezuela) dan Puerto Escondido (dari Kuba) sebesar 0,2 %.

#### 4.3. Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Bioaugmentasi) terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi (secara kualitatif)

Jumlah inokulum bakteri (*Pseudomonas balearica* ST 101, *Alcanivorax* sp. TE-9 dan *Bordetella* sp. F2) yang digunakan dalam pengujian degradasi hidrokarbon minyak bumi adalah  $10^6$  sel/ml,  $10^7$  sel/ml,  $10^8$  sel/ml,  $10^9$  sel/ml, dan  $10^{10}$  sel/ml. Inokulum konsorsium bakteri tersebut diujikan pada sedimen dan air laut yang dicemari minyak dalam bentuk *mousse oil* (*chocolate mousse*). *Mousse oil* digunakan agar minyak dapat berikatan dengan sedimen dan menyerupai kondisi seperti di alam, serta secara alamiah minyak yang tumpah ke laut akan tersebar membentuk *mousse oil*. Menurut Leahy & Colwell (1990: 306) minyak yang tersebar di perairan dapat membentuk *mousse oil*, yaitu air di dalam minyak akibat pengaruh angin dan ombak laut.

Sedimen yang telah dicemari minyak ditambahkan air laut sampai 15 ml karena bakteri membutuhkan kadar air yang cukup dalam proses degradasi hidrokarbon minyak bumi dan mikroba akan hidup aktif di interfase antara minyak dan air. Menurut Leahy & Colwell (1990: 308) bahwa kadar air yang terbatas dapat menghambat pertumbuhan dan metabolisme sel selama proses degradasi hidrokarbon minyak bumi. Air laut yang digunakan ditambahkan nutrisi untuk semua perlakuan. Nutrien yang ditambahkan mengandung unsur N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) dan P ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) yang dilarutkan dalam air laut untuk mencegah terjadinya defisiensi nutrisi, sehingga diharapkan bakteri tetap dapat hidup sampai hari ke-28. Prince & Atlas (2005: 278--279) menyatakan bahwa lingkungan laut dan estuaria yang tercemar oleh tumpahan minyak dalam jumlah total besar dapat menyebabkan ketidakseimbangan unsur nitrogen dan fosfor. Nasser *dkk.* (2010: 2000) juga menyatakan bahwa penambahan nutrisi dapat dilakukan untuk mencegah terjadinya defisiensi nutrisi untuk bakteri.

Perlakuan terbaik dari variasi jumlah inokulum konsorsium bakteri dapat diketahui secara visual. Hasil pengujian inokulum konsorsium bakteri selama 28 hari terhadap degradasi hidrokarbon minyak bumi menunjukkan adanya perubahan kondisi medium uji hidrokarbon minyak bumi (Gambar 4.3.(1)).



Gambar 4.3.(1). Perubahan kondisi medium uji hidrokarbon minyak bumi, a. Medium uji hidrokarbon minyak bumi dengan inkubasi hari ke-0, b. Medium uji hidrokarbon minyak bumi dengan inkubasi hari ke-28, c. Sedimen dicemari minyak, d. Perubahan kejernihan medium

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

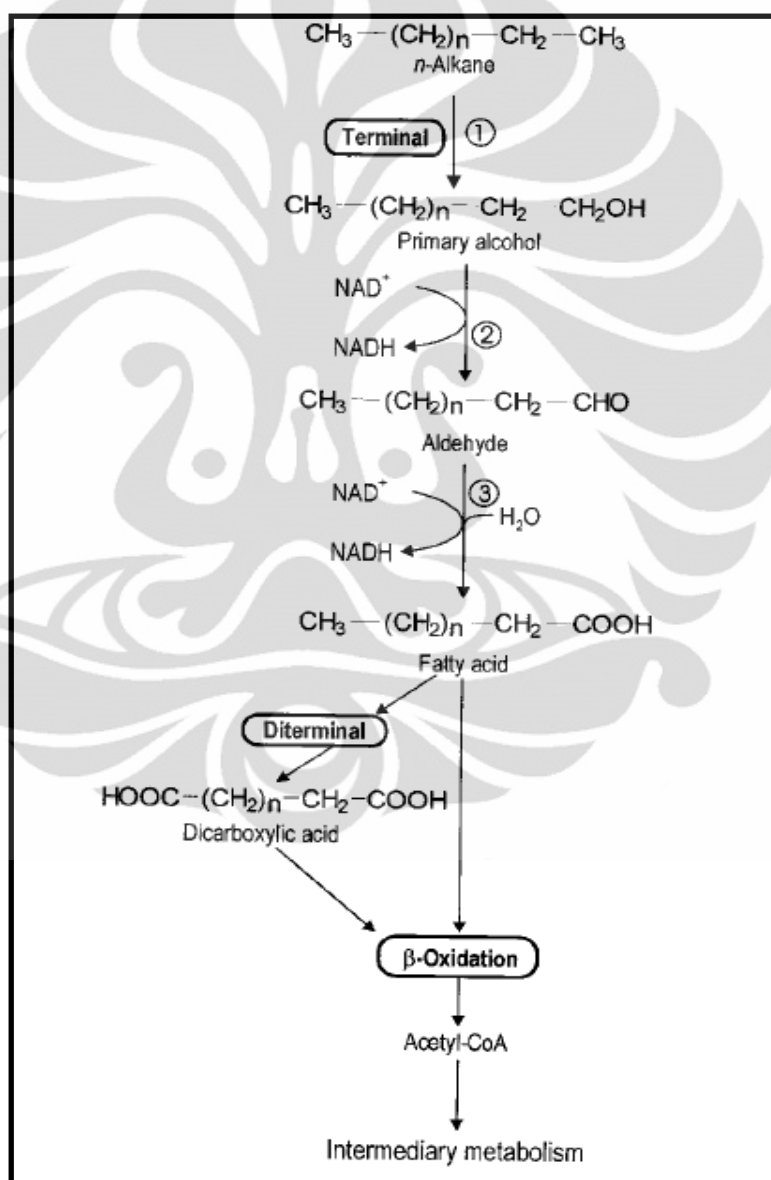
Perlakuan K(+), K6, K7, K8, K9, dan K10 pada medium uji hidrokarbon minyak bumi memperlihatkan perubahan medium yang semakin jernih seiring dengan lamanya waktu inkubasi, sedangkan perlakuan K(-) tidak mengalami perubahan medium (keruh) serta perlakuan dengan jumlah inokulum bakteri yang semakin tinggi (K10) menghasilkan perubahan medium lebih jernih (Gambar 4.3.(1)). Lapisan minyak juga terlihat dibagian permukaan air pada medium uji

hidrokarbon. Perlakuan K6 menunjukkan lapisan minyak pada permukaan air lebih tebal dibandingkan perlakuan K7, K8, K9, dan K10.

Perubahan medium yang semakin jernih menunjukkan telah terjadi degradasi hidrokarbon minyak bumi. Medium yang lebih jernih diduga disebabkan banyaknya jumlah total sel bakteri hidrokarbonoklastik sehingga biosurfaktan yang dihasilkan lebih banyak, maka akan semakin tinggi pula kemampuannya dalam menurunkan tegangan permukaan pada minyak bumi sehingga butiran-butiran emulsi (misel) yang terbentuk akan lebih cepat dan hidrokarbon minyak bumi juga dapat lebih cepat terdegradasi. Medium yang jernih juga mengindikasikan bakteri dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi atau menggunakan minyak bumi sebagai sumber karbon dan sebagian besar hasil degradasinya menghasilkan air sehingga medium menjadi jernih. Prince & Atlas (2005 : 275) menyatakan bahwa kelompok bakteri dan archaea serta fungi tertentu dapat menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan.

Berikut salah satu contoh mekanisme proses biodegradasi hidrokarbon pada alkana (Gambar 4.3.(2)). Menurut Nugroho (2006: 122), bakteri harus dapat kontak dengan hidrokarbon sebelum proses pendegradasian hidrokarbon melalui mekanisme adhesi spesifik dengan mengeliminir komponen heteropolisakarida anionik yang terdapat pada bagian dinding selnya, sehingga memudahkan sel bakteri kontak dengan senyawa hidrofobik dan proses emulsifikasi senyawa hidrokarbon oleh bakteri dengan cara memproduksi biosurfaktan. Selanjutnya, hidrokarbon minyak bumi harus memasuki sitoplasma sel bakteri terlebih dahulu sebelum terjadi biodegradasi melalui dua mekanisme yaitu pelarutan hidrokarbon oleh surfaktan yang dihasilkan pada lapisan antara minyak bumi dengan bakteri dan adhesi fisik antara bakteri dengan tetesan minyak sehingga hidrokarbon dapat didegradasi tanpa dilarutkan terlebih dahulu. Proses transpor minyak bumi dari permukaan sel ke lokasi pemecahan hidrokarbon dapat dilakukan oleh transport membran seperti difusi atau transpor aktif. Menurut Fritsche & Hofrichter (2000: 148) & Nugroho (2006: 131), tahap awal biodegradasi hidrokarbon secara aerob dengan memasukkan molekul oksigen ke dalam hidrokarbon oleh enzim oksigenase seperti n-alkana yang akan dioksidasi menggunakan enzim  $\omega$ -

hidroksilase (oksigenase) yang terjadi pada gugus rantai C terminal. Hasil oksidasi n-alkana akan membentuk alkohol primer. Alkohol akan diubah menjadi asam lemak maupun asam dikarboksilat melalui aldehyd yang melibatkan alkohol dehidrogenase dan aldehyd dehidrogenase. Asam lemak akan diubah membentuk asetil koenzim A melalui proses  $\beta$ -oksidasi. Asetil koenzim A akan memasuki siklus asam trikarboksilat didalam sel mikroba untuk menghasilkan  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  serta energi untuk pertumbuhan mikroba.



Gambar 4.3.(2). Jalur degradasi periferalkana, 1. n-alkana oleh  $\omega$ -hidroksilase (oksigenase), 2. Alkohol dehidrogenase, 3. Aldehyd dehidrogenase

[Sumber: Fritsche & Hofrichter 2000: 150.]

#### 4.4. Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Keberhasilan inokulasi bakteri (bioaugmentasi) dapat diketahui dengan persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi selama 28 hari melalui ekstraksi hidrokarbon minyak bumi menggunakan metode gravimetri. Ekstraksi menggunakan pelarut diklorometana (DCM) dan heksana. Pemilihan pelarut didasarkan daya tarik pelarut kimia terhadap minyak. DCM dapat menarik minyak pada sedimen, sedangkan heksana hanya dapat menarik minyak yang berada pada air. Menurut Philp *dkk.* (2005: 240), bahwa pelarut yang umum digunakan dalam ekstraksi hidrokarbon minyak bumi adalah diklorometana, heksana, atau etil asetat. Penimbangan ekstraksi hidrokarbon minyak bumi selama 0, 2, 5, 9, 14, dan 28 hari dapat dilihat pada Tabel 4.4. Hasil penimbangan ekstraksi hidrokarbon minyak bumi selama inkubasi hari ke-0, 2, 5, 9, 14 dan 28 menunjukkan nilai yang beragam untuk setiap perlakuan.

Hasil penimbangan ekstraksi hidrokarbon minyak bumi sampai inkubasi hari ke-28 (Tabel 4.4) menunjukkan perlakuan K(+), K6, K7, K8, K9, dan K10 dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi sebesar 32,90%--55,92%, sedangkan perlakuan K(-) yaitu tanpa adanya bakteri hanya sebesar 3,47%. Perlakuan K6, K7, K8, K9, dan K10 dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi sebesar 42,54--55,92 %, sedangkan K(+) hanya sebesar 32,90 % (Tabel 4.3). Hal tersebut menunjukkan bioaugmentasi (inokulum bakteri) mampu meningkatkan efektivitas degradasi minyak bumi dibandingkan dengan perlakuan tanpa inokulasi bakteri dan tanpa adanya bakteri. Hasil yang diperoleh sesuai dengan OTA (1991: 14) dan Singh & Lin (2010: 6883) yang menyatakan bahwa inokulasi bakteri (bioaugmentasi) dapat mempercepat proses degradasi hidrokarbon minyak bumi dibandingkan tanpa inokulasi bakteri maupun secara fisik (suhu 121°C). Nasser *dkk.* (2010: 206) juga melaporkan bahwa bioaugmentasi dapat mendegradasi PAH pada tanah terkontaminasi.





Tabel 4.4. Perbandingan rerata jumlah total minyak (%) yang terdegradasi pada medium pengujian inokulum konsorsium bakteri terhadap degradasi hidrokarbon minyak bumi

Waktu	Perlakuan						
	K(-) ± SD	K(+) ± SD	K6 ± SD	K7 ± SD	K8 ± SD	K9 ± SD	K10 ± SD
0	0 ±0,00A (A)	0 ±0,00A (A)	0 ±0,00A (A)	0 ±0,00A (A)	0 ±0,00A (A)	0 ±0,00A (A)	0 ±0,00A (A)
2	1,26±0,24B (A)	6,13±0,66G (B)	12,07±0,70H (C)	13,26±0,62I (D)	14,67±0,38 J (E)	14,92 ±0,36L (F)	15,06 ±0,57L (G)
5	1,56±0,23C (A)	14,90±0,66K (B)	25,18±0,49N (C)	26,55±0,60O (D)	27,03±0,41P (DE)	27,50±0,92P (DE)	28,09±1,03P (E)
9	2,31,±0,60D (A)	16,62±0,70M (B)	28,30±0,53P (C)	35,16±0,90S (D)	37,69±0,40U (E)	39,32±0,47V (F)	40,46±1,09V (FG)
14	2,98±0,23E (A)	28,56±0,66Q (B)	36,67±0,18T (C)	39,74±0,25V (D)	43,25±0,6W (E)	46,58±0,58X (F)	48,26±0,97Y (G)
28	3,47 ±0,55F (A)	32,90±0,72R (B)	42,54±0,54W (C)	42,71±0,5W (CD)	45,95±0,53X (E)	52,14±0,52Z (F)	55,92±0,99Z (G)

Keterangan :

1. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama tidak menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0.05$ )
2. Huruf dalam tanda kurung dibaca horizontal membandingkan antara perlakuan dengan waktu inkubasi yang sama
3. Huruf tanpa tanda kurung dibaca vertikal membandingkan antara waktu pada perlakuan yang sama

Hasil ekstraksi hidrokarbon minyak bumi juga menunjukkan bahwa perlakuan K10 menghasilkan persentase degradasi hidrokarbon tertinggi (55,92 %) (Tabel 4.4). Jumlah inokulum konsorsium bakteri yang semakin besar menghasilkan persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi semakin besar pula, karena jumlah sel bakteri yang tinggi ( $\log 9,28$ -- $\log 9,47$ ). Hal tersebut disebabkan bakteri yang diinokulasikan mendominasi populasi mikroba indigenos sehingga minyak yang terdegradasi semakin besar. Menurut Vasudevan & Rajaram (2001: 411), populasi mikroba berperan penting dalam proses degradasi hidrokarbon dan dapat meningkatkan laju degradasi hidrokarbon.

Kontrol positif (K(+)) merupakan pengujian bakteri indigenos terhadap hidrokarbon minyak bumi dan menunjukkan terjadinya degradasi hidrokarbon minyak bumi hingga tingkat tertentu (Tabel 4.4). Namun demikian, persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi pada K(+) lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan K6, K7, K8, K9 dan K10. Hal tersebut diduga jumlah komunitas bakteri hidrokarbonoklastik yang terbatas atau kemampuan degradasi oleh mikroba rendah. Menurut Zhu *dkk.* (2001: 4), minyak yang tumpah ke lingkungan dapat didegradasi secara alami oleh berbagai mikroba yang khusus memiliki kemampuan dalam mendegradasi minyak, tetapi membutuhkan waktu lama.

Kontrol negatif (K(-)) merupakan pengujian degradasi hidrokarbon minyak bumi tanpa adanya bakteri tetapi diberi pemanasan. Perlakuan K(-) juga mengalami degradasi hidrokarbon minyak bumi. Penurunan hidrokarbon minyak bumi disebabkan medium disterilisasi sampai suhu  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  sehingga minyak terdegradasi. Menurut Zhu *dkk.* (2001: 4 & 14) & Harayama (1999: 64) bahwa hidrokarbon dengan berat molekul kurang dari C15 (titik didih  $<250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) lebih mudah menguap seperti golongan senyawa alkana dan secara alamiah laju penguapan hidrokarbon minyak bumi tergantung dari karakteristik fisik minyak, ombak, angin dan suhu.

Berdasarkan persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa perlakuan dengan inokulum konsorsium bakteri (K6, K7, K8, K9, dan K10) lebih baik dibandingkan perlakuan kontrol. Selain itu, inokulum konsorsium bakteri yang semakin banyak, maka semakin

tinggi tingkat persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi. Berdasarkan uji F (Lampiran 9) diketahui inokulum bakteri (bioaugmentasi) dan waktu inkubasi, baik dalam bentuk faktor tunggal maupun interaksinya berpengaruh nyata terhadap persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi. Adanya interaksi yang nyata antar kedua faktor tersebut menunjukkan keterkaitan antara jumlah inokulum konsorsium bakteri dan waktu inkubasi, yang menggambarkan besarnya konsentrasi hidrokarbon minyak bumi yang terdegradasi.

Pengujian lanjutan dengan uji LSD 5 % terhadap persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi yang menunjukkan adanya bioaugmentasi (inokulum bakteri) berpengaruh nyata terhadap K(+) dan berpengaruh sangat nyata terhadap K(-). Hasil uji LSD 5 % terhadap persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi juga menunjukkan pengaruh interaksi optimum pada perlakuan K10, K9, K8, K7 dan waktu inkubasi 9 hari, sedangkan perlakuan K6 dan K(+) optimum pada hari ke-14 ( $P < 0,05$ ). Perlakuan dengan waktu yang optimum dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi dapat diinokulasikan bakteri hidrokarbonoklastik kembali untuk mempertahankan atau meningkatkan proses degradasi hidrokarbon minyak bumi maupun pemberian kembali nutrisi seperti N dan P.

#### **4.5. Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Bioaugmentasi) dan Waktu Inkubasi terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi**

##### **4.5.1 Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Bioaugmentasi) terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi**

Seluruh perlakuan berada pada lingkungan sama, namun jumlah inokulum konsorsium berbeda sehingga degradasi yang terjadi diduga berasal dari aktivitas bakteri. Inokulum konsorsium bakteri yang digunakan terdiri atas *Alcanivorax* sp. TE-9, *Pseudomonas balearica* ST 101, dan *Bordetella* sp. F2. Semua perlakuan menunjukkan terjadinya degradasi hidrokarbon minyak bumi selama 28 hari. Persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi tertinggi sampai terendah terjadi pada perlakuan K10 (55,92%) diikuti dengan perlakuan K9 (52,14 %), K8 (45,95%), K7 (42,71%), K6 (42,54 %), dan K(+) (32,90 %) (Gambar 4.5.(1)).

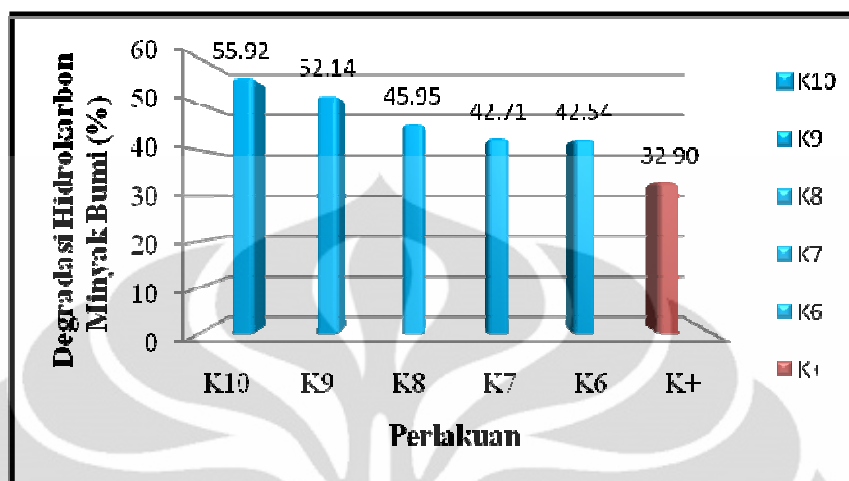
Tingginya persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi pada perlakuan K10 karena jumlah inokulum konsorsium bakteri paling tinggi ( $1 \times 10^{10}$  sel/ml). Selain itu, adanya sinergisme antara bakteri yang diinokulasikan (eksogenus) dan atau dengan bakteri indigenos sehingga hidrokarbon minyak bumi yang terdegradasi lebih besar dibandingkan tanpa inokulum konsorsium bakteri. Menurut U.S.EPA (1998: 7) bahwa tumpahan minyak di alam diuraikan oleh sejumlah total mikroba yang bekerja secara sinergis dan saling tergantung satu sama lainnya. Hal tersebut diakibatkan adanya kometabolisme. Kometabolisme menyebabkan proses penguraian suatu senyawa oleh mikroba yang membutuhkan keberadaan senyawa lain, karena tanpa senyawa tersebut maka mikroba tidak dapat melakukan metabolisme dan memperbanyak sel dengan baik.

Perlakuan K10, K9, dan K8 juga menghasilkan persentase degradasi yang tinggi dibandingkan perlakuan K7 dan K6 (Gambar 4.5.(1)). Hal tersebut disebabkan bakteri yang diinokulasikan merupakan bakteri yang memiliki kemampuan tinggi dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Sedangkan perlakuan K6 dan K7 menghasilkan degradasi lebih rendah dibandingkan perlakuan K8, K9, dan K10, yang diduga jumlah populasi bakteri indigenus lebih dominan daripada populasi bakteri yang diinokulasikan. Hal tersebut mengindikasikan jumlah inokulum konsorsium bakteri sangat menentukan dalam mempercepat proses degradasi hidrokarbon minyak bumi. Macnaughton *dkk.* (1999: 3573) menyatakan bahwa proses degradasi dengan inokulum bakteri dapat bekerja optimal apabila jumlah inokulum konsorsium bakteri sama atau lebih banyak daripada populasi bakteri indigenos. Romich *dkk.* 1995 juga menyatakan jumlah inokulum konsorsium bakteri yang tepat merupakan salah satu tahapan penting dalam menentukan tingkat keberhasilan untuk mendegradasi hidrokarbon minyak bumi (*lihat Sang-Jun Kim 2003: 40*). Menurut Hatmanti & Darmayati (2010: 6), *Pseudomonas balearica* ST 101 berperan dalam mendegradasi *phenothiazine*, *dibenzothiophene*, dan *pyrene*, sedangkan *Alcanivorax* sp. TE-9 mendegradasi *fluoranthene*, *naphtalene*, *phenanthrene*, *phenothiazine*, *dibenzothiophene*, *fluorene*, *pyrene* dan *Bordetella* sp. F2 mendegradasi *fluoranthene*, *phenanthrene*, *phenothiazine*, *dibenzothiophene*, dan *pyrene*.

Perlakuan K(+) memberikan persentase degradasi terendah yaitu 32,90 % dibandingkan perlakuan dengan inokulum bakteri (K6, K7, K8, K9, dan K10) yang berkisar 42,54--55,92 %. Rendahnya persentase hidrokarbon minyak yang terdegradasi, diduga terdapat bakteri indigenos yang tidak dapat menggunakan senyawa hasil metabolisme untuk sumber karbon dan pertumbuhan bakteri. Hal tersebut menunjukkan bakteri yang diinokulasikan memiliki kemampuan yang tinggi dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Menurut Atlas & Cerniglia (1995: 335), hidrokarbon minyak bumi yang tersebar di alam dapat didegradasi oleh mikroba bila kondisi lingkungan menunjang proses degradasi tersebut sehingga pencemaran lingkungan oleh polutan organik dapat dipulihkan dengan sendirinya. Namun demikian, beban pencemaran di lingkungan seringkali lebih besar dibandingkan laju degradasi hidrokarbon minyak bumi secara alami. Akibatnya zat pencemar menjadi terakumulasi sehingga diperlukan inokulasi bakteri untuk mempercepat proses degradasi hidrokarbon minyak bumi. Chaineau *dkk.* (2005: 1496) menyatakan bahwa senyawa antara yang tidak dapat terdegradasi lebih lanjut memberikan kemungkinan umpan balik negatif pada seluruh proses degradasi. Senyawa antara berasal dari hasil proses metabolisme sel selama proses degradasi hidrokarbon minyak bumi.

Secara keseluruhan, perbedaan persentase konsentrasi hidrokarbon minyak bumi yang terdegradasi diduga dipengaruhi oleh terbatasnya ketersediaan nutrisi seperti N dan P yang mempengaruhi aktivitas metabolisme bakteri, kompetisi antar mikroba untuk mendapatkan sisi permukaan hidrokarbon yang sebagai substrat dan tempat melekat, serta lamanya exposure dari senyawa hidrokarbon maupun konsentrasi senyawa hidrokarbon yang tinggi dari lingkungan maupun metabolit yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri. Oleh karena itu, umumnya bakteri memiliki mekanisme pertahanan diri dari lingkungan yang kurang menguntungkan, salah satunya dengan membentuk biofilm. Menurut Kokare *dkk.* (2009: 159) & Madigan *dkk.* (2012; 676), biofilm merupakan suatu agregat mikroba sejenis maupun berbeda jenis yang melekat pada permukaan substrat, dimana satu sel dengan sel lainnya saling terikat dan melekat pada substrat dengan perantara suatu matrik *extracellular polymeric substance* (EPS). Biofilm berpotensi sebagai sistem proteksi terhadap lingkungan yang kurang

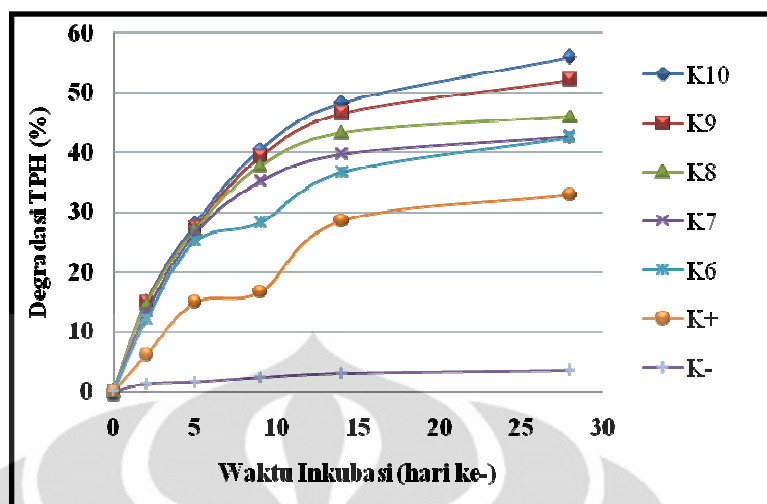
menguntungkan seperti kekurangan nutrisi, perubahan pH, suhu, dan kekeringan serta senyawa kimia yang merugikan.



Gambar 4.5.(1). Persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi pada inkubasi hari ke-28

#### 4.5.2 Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Gambar 4.5.(2) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan degradasi hidrokarbon minyak bumi selama 28 hari. Persentase degradasi tertinggi terjadi pada tahap awal inkubasi yaitu hari ke-2 yang berkisar antara 12,07--15,06 % pada perlakuan K10, K9, K8 K7, dan K6. Degradasi yang terjadi pada awal inkubasi diduga bakteri mendegradasi senyawa alifatik/alkana dan adanya pengaruh penambahan nutrisi  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  yang menstimulasi bakteri untuk dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi serta bakteri yang diinokulasikan memiliki kemampuan yang tinggi. Berdasarkan hasil penelitian Zahed (2010: 659) bahwa penambahan nutrisi  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (200 mg/L) dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (20 mg/L) dapat meningkatkan degradasi alkana. Menurut Pérez silva *dkk.* (2006: 75), pada tahap awal inkubasi senyawa alkana dan alifatik merupakan senyawa yang pertama kali terdegradasi. Hal tersebut disebabkan senyawa tersebut memiliki rantai karbon sederhana ( $\text{C} \leq 40$ ) sehingga lebih mudah teroksidasi dan terdegradasi (Pérez Silva *dkk.* 2006 :72).



Gambar 4.5.(2) Perubahan konsentrasi persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari

Perlakuan K(+) mampu mendegradasi hidrokarbon minyak bumi tertinggi pada hari ke-5 yaitu 14,90 % dibandingkan hari ke-2 hanya sebesar 6,13 % karena bakteri indigenos membutuhkan adaptasi terlebih dahulu terhadap hidrokarbon minyak bumi. Degradasi terus berlangsung hingga hari ke-28 tetapi persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi tidak lebih besar dibandingkan inkubasi hari ke-2 untuk perlakuan K6, K7, K8, K9 dan K10. Hal tersebut diduga bahwa pada hari ke-2 sampai hari ke-28 komponen hidrokarbon minyak bumi yang terdegradasi dalam bentuk aromatik atau senyawa hasil metabolisme bersifat toksik. Selain itu, tidak seluruh bakteri dapat menggunakan senyawa aromatik maupun senyawa hasil metabolismenya sebagai sumber karbon. Menurut Leahy & Colwell (1990: 305), mikroba akan mendegradasi senyawa n-alkana terlebih dahulu diikuti dengan alkana bercabang, aromatik dan siklik alkana.

Adanya peningkatan degradasi hidrokarbon minyak bumi menunjukkan bahwa bakteri dapat menggunakan hidrokarbon minyak bumi jenis ALCO sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri yang disertai dengan tingginya jumlah total sel bakteri. Namun demikian, laju degradasi hidrokarbon minyak bumi juga menurun seiring dengan lamanya waktu inkubasi. Laju degradasi yang semakin menurun disebabkan konsentrasi minyak yang tinggi maupun toksisitas yang dihasilkan selama proses degradasi serta bentuk atau struktur dari kimia yang terdapat pada minyak bumi.

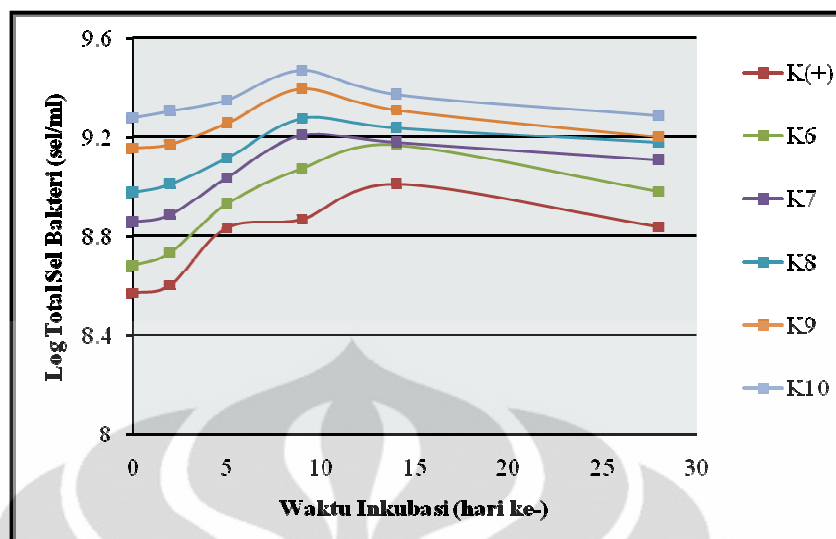


Menurut GESAMP 1977, bahwa proses degradasi hidrokarbon minyak bumi diawali dengan pemecahan senyawa sederhana seperti alkana sebelum senyawa yang lebih kompleks seperti aromatik. Senyawa alkana akan terdegradasi oleh oksidasi dari salah satu gugus metil terminal menjadi asam karboksilat dan selanjutnya terjadi proses degradasi secara bertahap, perlahan-lahan dengan konversi tuntas menjadi CO<sub>2</sub> dan air serta laju degradasi menurun, sedangkan degradasi golongan senyawa sikloalkana dan PAH relatif lambat dengan resultan pembentukan fraksi yang relatif persisten dan sukar diubah (*lihat* Connell & Miller 1995: 282).

#### **4.6. Pengaruh Jumlah Inokulum Konsorsium Bakteri (Biaugmentasi) dan Waktu Inkubasi Terhadap Jumlah Total Sel Bakteri**

Berbagai jumlah inokulum konsorsium bakteri ( $10^6$ -- $10^{10}$  sel/ml) diinokulasikan ke dalam medium pengujian hidrokarbon minyak bumi. Semua perlakuan, kecuali kontrol negatif menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (Gambar 4.6.(1)) pada medium. Hal tersebut mengindikasikan adanya penggunaan minyak bumi sebagai sumber karbon untuk aktivitas pertumbuhan.

Hasil penghitungan jumlah total sel bakteri (Gambar 4.6.(1)) menunjukkan semua perlakuan dan waktu inkubasi memperlihatkan jumlah total sel bakteri yang beragam dan pola pertumbuhan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa nutrien pada medium uji hidrokarbon minyak bumi dibutuhkan dalam pertumbuhannya termasuk kandungan minyak bumi di dalamnya. Secara keseluruhan, jumlah inokulum konsorsium bakteri tinggi juga menunjukkan jumlah total sel bakteri yang tinggi.



Gambar 4.6.(1) Jumlah total sel bakteri pada berbagai perlakuan selama masa inkubasi 28 hari

Inkubasi hari ke-0 sampai hari ke-2 untuk perlakuan K(+) tidak mengalami peningkatan jumlah total sel bakteri yang diduga merupakan fase lag karena jumlah total sel bakterinya tidak mengalami perubahan ( $\log 8,57$ -- $\log 8,60$ ) atau pertumbuhan yang lambat. Hal tersebut diduga bahwa bakteri indigenos membutuhkan waktu adaptasi untuk mensintesis enzim-enzim yang diperlukan dalam proses degradasi hidrokarbon minyak bumi. Perlakuan K(+) mengalami peningkatan jumlah total sel bakteri pada inkubasi hari ke-2 sampai hari ke-14 mencapai  $\log 9,01$  untuk K(+), dan K6 ( $\log 9,17$ ) tetapi peningkatan jumlah total sel bakteri pada inkubasi hari ke-5 sampai hari ke-9 untuk perlakuan K(+) mengalami pertumbuhan yang lambat dan mengalami peningkatan jumlah total sel bakteri kembali pada inkubasi hari ke-9 sampai hari ke-14 (Gambar 4.6.(1)). Peningkatan jumlah total sel bakteri yang terjadi merupakan fase logaritma karena bakteri indigenos telah teradaptasi dengan minyak sehingga dapat menggunakan sumber karbon utama yaitu minyak untuk pertumbuhannya. Oleh karena itu, bakteri dapat melakukan pembelahan sel sehingga jumlah total sel bakteri meningkat. Menurut Thiel (1999: 4), fase logaritma adalah fase meningkatnya jumlah total sel bakteri secara eksponensial karena sel terus membelah dengan laju yang konstan. Pertumbuhan yang lambat untuk K(+) pada inkubasi hari ke-5 sampai 9 diduga sejumlah total bakteri tertentu tidak dapat menggunakan senyawa dalam minyak bumi untuk pertumbuhannya. Namun demikian, diduga terdapat

bakteri yang memanfaatkan bakteri yang telah lisis, karena isi sel yang keluar dapat menjadi nutrisi bagi sebagian sel yang masih hidup sehingga tetap terjadi peningkatan jumlah total sel bakteri. Adanya peningkatan jumlah total sel bakteri pada K(+) menunjukkan bahwa bakteri indigenos yang berasal dari pantai Cilacap merupakan bakteri hidrokarbonoklastik.

Inkubasi medium uji hidrokarbon minyak bumi pada hari ke-0 sampai hari ke-2 untuk perlakuan K6, K7, K8, K9, dan K10 tidak menunjukkan fase lag (Gambar 4.6.(1)). Fase lag yang tidak terlihat menunjukkan bakteri memerlukan waktu adaptasi yang relatif pendek, karena dapat beradaptasi dengan baik terhadap medium. Menurut Madigan *dkk.* (2012: 125), fase lag suatu populasi mikroba dapat berlangsung cepat atau lambat tergantung pada karakteristik dari mikroba. Darmayati (2009: 23) menyatakan bakteri yang diinokulasikan memiliki kemampuan adaptasi tinggi terhadap minyak. Selain itu, bakteri indigenos dengan bakteri yang diinokulasikan diduga saling bersinergi dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Menurut U.S.EPA (1998: 7) bahwa minyak di alam diuraikan oleh sejumlah total mikroba yang bekerja secara sinergis dan saling tergantung satu sama lain.

Pengukuran jumlah total sel bakteri pada inkubasi hari ke-0 sampai hari ke-9 terjadi peningkatan jumlah total sel bakteri untuk perlakuan K10, K9, K8, K7, sedangkan K6 dan K(+) (tanpa inokulasi bakteri) masih terus mengalami peningkatan jumlah total sel bakteri sampai hari ke-14 (Gambar 4.6.(1)). Perlakuan dengan inokulum konsorsium bakteri tertinggi (K10) menunjukkan pertumbuhan bakteri yang tinggi dengan jumlah total sel bakteri mencapai (log 9,47). Jumlah total sel bakteri tertinggi berikutnya diikuti oleh perlakuan K9 yang mencapai (log 9,39), K8 sebesar (log 9,28), K7 (log 9,21) dan K6 (log 9,07). Hal tersebut mengindikasikan bahwa terjadi peningkatan konsumsi terhadap nutrisi termasuk minyak bumi dan diduga ketersediaan nutrisi termasuk minyak bumi relatif banyak pada awal inkubasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Chaineau *dkk.* (2005: 1496) menyatakan bahwa populasi bakteri bergantung pada ketersediaan nutrisi seperti C, N, dan P. Perlakuan K(-) tidak terdapat jumlah total sel bakteri, karena medium dilakukan proses sterilisasi sehingga tidak terjadi pertumbuhan kematian.

Pengukuran jumlah total sel bakteri pada inkubasi hari ke-9 sampai hari ke-28 terjadi penurunan jumlah total sel bakteri pada perlakuan K10 sampai mencapai log 9,287, K9 (log 9,201), K8 (log 9,179), sedangkan jumlah total sel bakteri pada inkubasi hari ke-14 sampai hari ke-28 untuk perlakuan K7 (log 9,107), K6 (log 8,981), dan K(+) (log 8,840). Penurunan jumlah total sel yang terjadi merupakan fase kematian, yang diduga ketersediaan substrat (nutrien) seperti N, P dan C untuk pertumbuhan bakteri berkurang serta bakteri membutuhkan waktu adaptasi untuk senyawa kompleks. Ketersediaan nutrien yang semakin berkurang tetapi jumlah total sel bakteri tinggi akan menyebabkan terjadinya kompetisi. Kompetisi yang semakin besar dalam memanfaatkan nutrien menyebabkan penyerapan nutrien oleh bakteri menjadi terbatas dan tidak optimal. Pertumbuhan bakteri terhambat akan menyebabkan proses degradasi menjadi terhambat sehingga hasil minyak yang terdegradasi menjadi tidak optimal atau menurun. Selain itu, diduga terdapat bakteri tertentu yang tidak dapat menggunakan senyawa aromatik maupun senyawa hasil metabolismenya sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya sehingga dapat bersifat toksik bagi bakteri dan menyebabkan kematian bakteri. Menurut Atlas (1981: 197) & Leahy *dkk.* (1990: 1569) semakin banyak sel bakteri akan menyebabkan defisiensi nutrien semakin cepat. Konsentrasi nutrien yang menurun dapat menjadi penghambat mikroorganisme dalam melakukan proses degradasi (Ghazali *dkk.* 2004: 65). Hee *dkk.* (1997: 97) menyatakan senyawa yang tidak terdegradasi lebih lanjut akan terakumulasi dan menjadi lebih toksik untuk bakteri.

Besarnya persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi dan jumlah total sel bakteri dapat dibuat hubungan/kaitan antar keduanya melalui analisis uji korelasi. Uji korelasi jumlah total sel bakteri terhadap degradasi hidrokarbon minyak bumi diperoleh nilai 0,739 ( $P < 0,01$ ). Nilai tersebut menunjukkan korelasi yang kuat ( $P < 0,01$ ) antara jumlah total sel bakteri terhadap rata-rata persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi di setiap perlakuan. Nilai tersebut juga menunjukkan bahwa semakin tinggi jumlah total sel bakteri maka persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi semakin besar pula. Jumlah total sel bakteri yang tinggi akan mendegradasi hidrokarbon minyak bumi lebih cepat tetapi meningkatnya jumlah total sel bakteri tidak selalu menghasilkan laju degradasi

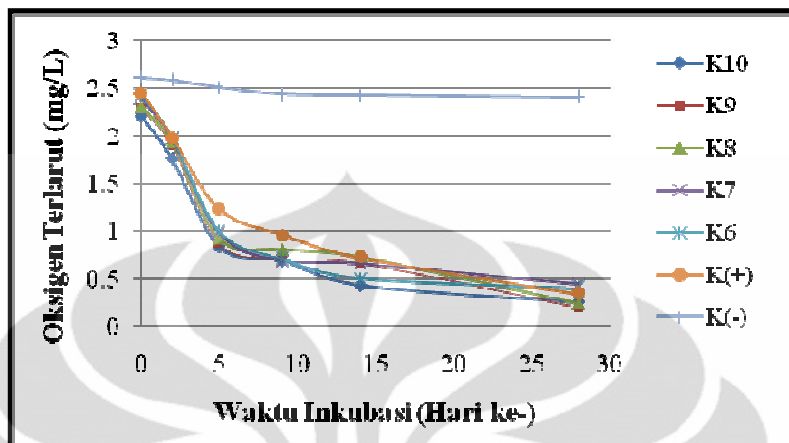
yang semakin besar. Menurut Chaineau *dkk.* (2005: 1490), populasi bakteri juga bergantung pada ketersediaan nutrisi. Namun demikian, dapat disimpulkan bahwa inokulum bakteri dan jumlah total sel bakteri merupakan salah satu faktor keberhasilan dalam mendegradasi hidrokarbon minyak bumi.

Degradasi hidrokarbon minyak bumi yang terjadi oleh mikroba menunjukkan adanya penggunaan minyak sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhannya maupun digunakan untuk metabolisme selnya. Fenomena tersebut diperkuat dengan adanya peningkatan jumlah total sel bakteri (Gambar 4.6.(1)). Menurut Fritsche & Hofrichter (2000: 148--149) bahwa hasil degradasi hidrokarbon seperti alkana menghasilkan alkohol, aldehid, dan asam lemak yang akan membentuk asetil CoA melalui proses  $\beta$ -oksidasi. Selanjutnya masuk ke dalam siklus asam trikarboksilat (siklus Krebs) yang akhirnya menghasilkan energi untuk pertumbuhan sehingga dapat meningkatkan jumlah total sel bakteri. Proses degradasi hidrokarbon minyak bumi juga dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan seperti oksigen terlarut (DO), suhu, dan pH.

#### 4.6.1 Oksigen Terlarut (DO)

Perlakuan dengan inokulum bakteri menunjukkan adanya penurunan oksigen terlarut sampai hari ke-28 (Gambar 4.6.1.(1)). Oksigen terlarut pada hari ke-0 (2,21--2,45), hari ke-2 (1,76--1,98), hari ke-5 (0,84--1,23), hari ke-14 (0,43--0,73), dan hari ke-28 (0,20--0,44). Adanya penurunan oksigen terlarut mengindikasikan bahwa bakteri hidrokarbonoklastik memanfaatkan oksigen untuk mendegradasi senyawa hidrokarbon. Menurut Leahy & Colwell (1990: 307) bahwa dalam proses katabolisme hidrokarbon alifatik, siklik, serta aromatik oleh bakteri dan fungi secara aerob, akan melibatkan oksigenase yang memerlukan oksigen dalam proses degradasi hidrokarbon minyak bumi. Menurut Cauwenberghe & Roote (1998: 2), bahwa oksigen digunakan oleh mikroorganisme sebagai akseptor elektron dalam menghasilkan energi untuk pertumbuhan, sehingga terjadi peningkatan jumlah total sel bakteri. Oleh karena adanya ketersediaan oksigen (kondisi aerob) dan nutrisi yang cukup,

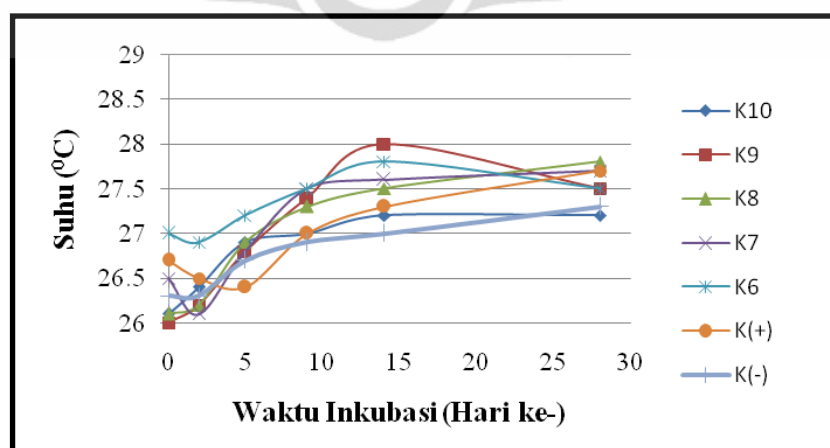
mikroorganisme dapat mengkonversi lebih cepat berbagai kontaminan organik menjadi  $\text{CO}_2$ , air dan peningkatan jumlah total sel bakteri.



Gambar 4.6.1.(1) Perubahan oksigen terlarut pada medium uji hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari

#### 4.6.2 Suhu

Perlakuan K10, K9, K8, K7, K6, K(+) terjadi perubahan suhu (Gambar 4.6.2) tetapi masih berada pada kisaran 20--30  $^{\circ}\text{C}$ . Kisaran suhu pada hari ke-0 untuk semua perlakuan (26--27  $^{\circ}\text{C}$ ), hari ke-2 (26,1--26,9  $^{\circ}\text{C}$ ), hari ke 5 (26,4-27,2  $^{\circ}\text{C}$ ), hari ke-9 (26,9-27,5  $^{\circ}\text{C}$ ), hari ke-14 (27,2-28  $^{\circ}\text{C}$ ) dan hari ke-28 (27,2-27,8  $^{\circ}\text{C}$ ).

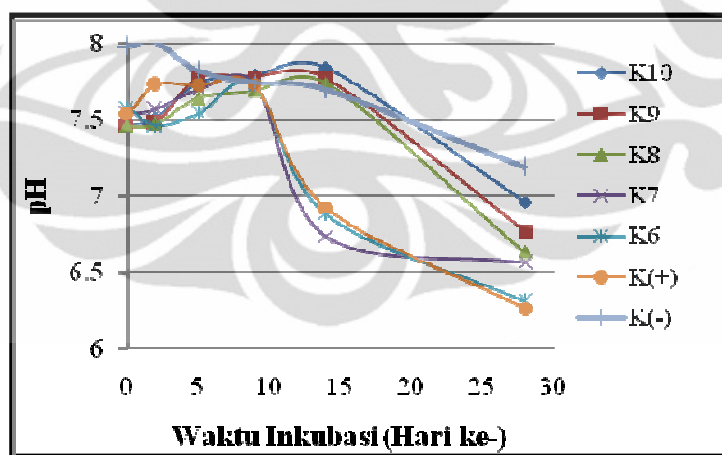


Gambar 4.6.2.(1) Perubahan suhu pada medium uji hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari

Kisaran suhu yang berada pada 20--30<sup>0</sup>C mengindikasikan proses degradasi masih dapat berlangsung (Gambar 4.6.2.(1)). Menurut Atlas dan Bartha 1992 (*lihat* Saadoun & Al-Ghzawi 2005: 179) bahwa bakteri masih dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi pada kisaran suhu tersebut (20--30<sup>0</sup>C). Namun demikian, aktivitas degradasi oleh bakteri akan menurun seiring menurunnya suhu (Zhu *dkk.* 2001: 22) sehingga menyebabkan jumlah total minyak yang terdegradasi semakin kecil. Sebaliknya, suhu tinggi dapat menurunkan viskositas minyak dan mempercepat proses degradasi (Margesin & Schinerr 2001: 650).

#### 4.6.3 Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) untuk perlakuan dengan bioaugmentasi berada pada kisaran 6,26--7,79 (Gambar 4.6.3(1)). Kisaran pH untuk perlakuan dengan bioaugmentasi pada hari ke-0 (7,46--7,58), hari ke-2 (7,34--7,73), hari ke-5 (7,54--7,77), hari ke 9 (7,62--7,79), hari ke-14 (6,73--7,84), dan hari ke-28 (6,26--6,96).



Gambar 4.6.3.(1) Perubahan pH pada medium uji hidrokarbon minyak bumi selama masa inkubasi 28 hari

Gambar 4.6.3.(1), pH tersebut masih berada pada kondisi optimum untuk proses degradasi. Menurut Yaima (2011: 72) bahwa pH optimum untuk bakteri antara 6--8, dan khamir 4--6, sedangkan fungi 3--7. Nilai pH untuk semua perlakuan secara keseluruhan, menunjukkan adanya peningkatan pH pada awal

inkubasi dan terjadi penurunan pH pada akhir inkubasi. Penurunan yang terjadi diduga disebabkan hasil metabolit asam-asam organik dari aktivitas metabolisme sel selama proses degradasi hidrokarbon minyak bumi. Menurut Rosenberg *dkk.* (1992: 338), alkana yang terdegradasi akan menghasilkan alkohol, aldehid dan asam lemak. Asam lemak akan teroksidasi menjadi asam asetat dan asam propionat. Peningkatan pH yang terjadi diduga disebabkan oleh senyawa ester yang merupakan hasil samping dari proses degradasi atau adanya mekanisme pompa hidrogen serta akibat adanya penambahan nutrisi  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Adanya senyawa nitrat sebagai sumber nitrogen akan menghasilkan  $\text{OH}^-$  sehingga terjadi peningkatan pH. Nitrat oleh sel bakteri akan diubah ke dalam bentuk ammonium agar dapat digunakan. Mekanisme pompa hidrogen dapat terjadi yang diduga bakteri tertentu memiliki kemampuan homeostatis terhadap keasaman lingkungan melalui pertukaran kation  $\text{K}^+$  berasal dari dalam sel dengan  $\text{H}^+$  dari lingkungan sehingga keasaman lingkungan mengalami penurunan. Churchil *dkk.* (1995: 26) menyatakan bahwa ester terbentuk karena adanya kombinasi antara asam lemak dengan alkohol.



## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Perlakuan dengan inokulum tertinggi (K10) yaitu  $1 \times 10^{10}$  sel/ml mampu mendegradasi hidrokarbon minyak bumi terbaik selama masa inkubasi 28 hari yang mencapai 55,92% dan meningkatkan total sel bakteri tertinggi sebesar log 9,47.
2. Perlakuan tanpa inokulasi bakteri (K(+)) menghasilkan persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi sebesar 32,90%, serta peningkatan total sel bakteri sebesar log 8,840 yang menunjukkan sebagian bakteri indigenos Cilacap merupakan bakteri hidrokarbonoklastik.

#### **5.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai tahap adaptasi terhadap minyak jenis ALCO dari masing-masing bakteri murni (*Alcanivorax* sp. TE-9, *Bordetella* sp. F2, dan *Pseudomonas balearica* ST 101).
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai jumlah inokulum konsorsium bakteri yang lebih tinggi dari  $1 \times 10^{10}$  sel/ml untuk memperoleh hasil persentase degradasi yang optimum.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek yang ditimbulkan oleh penambahan konsorsium bakteri terhadap organisme lain yang terdapat dalam lingkungan laut tersebut.
4. Perlu dilakukan penelitian analisis kimia senyawa hidrokarbon minyak bumi yang terbentuk selama proses degradasi.

## DAFTAR ACUAN

- Aberoumand, A. 2010. A review on *Pseudomonas* in marine fish. *World Journal of Fish and marine sciences* **2**(4): 291--296.
- Alvarez, P. J. J & W. A. Illman. 2006. *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey: ix + 612 hlm.
- Arifah, F. 2010. Formulasi konsorsium bakteri untuk degradasi minyak mentah pada sedimen yang tercemar minyak di pantai Pulau Pari, Kepulauan Seribu DKI Jakarta. Skripsi. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta: xii+74 hlm.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological review* **45** (1): 180--209.
- Atlas, R.M & C. E. Cerniglia. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *Bioscience* **45** (5): 332--338.
- Benson, H. J. 2001. *Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology*. The MacGraw-Hills Company, Inc., New York: xi + 478 hlm.
- Blanchard, W. H. 2008. Biodegradation potential of oil in arctic first-year sea ice. Project paper. University of New Hampshire: iv + 53 hlm.
- Boopathy, R. 2000. Factors Limiting Bioremediation Technologies. *Bioresource Technology* **74**: 63--67.
- Boulos, L., M. Prevost, B. Barbeau, J. Coallier & R. Desjardins. 1999. Live/Dead BacLightE: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Elsevier Science* **37**: 77--86.
- Cappelo, S., R. Denaro, M. Genovese, L. Giuliano & M. M. Yakimov., 2007. Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on “oil spill bioremediation” in mesocosms. *Microbiological Research* **162**: 185--190.
- Cauwenbergh, L, V & D. S. Roote. 1998. In situ bioremediation. Ground water remediation technologies analysis center. University of Pittsburgh: iii + 20 hlm.

- Chaineau, C. H., G. Rougeux., C. Yepremian & J. Oudot. 2005. Effects of Nutrient Concentration on the Biodegradation of Crude Oil and Associated Microbial Populations in the Soil. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 1490--1497.
- Christofi, N & I. Ivshina. 2005. Microbial surfactants and their use in soil remediation. *Dalam* : Fingerman, M & R. Nagabhushanam (eds). 2005. *Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystem*. Science Publishers, Inc., USA: xi + 396 hlm.
- Churcill, S., L.P. Griffin & P.F. Jones. 1995. Biodegradation Rate Enhancement of Hydrocarbon by an Oleophilic and Rhamnolipid Biosurfactant. *Journal of Environment Quality* **24**:19-28.
- Connell, D.W & G. J. Miller. 1995. *Kimia dan ekotoksikologi pencemaran* (Terjemahan). Ui Press, Jakarta: xiii + 520 hlm.
- Cooper & Zajic. 1980. Surface Active Compounds From Microorganism In Perlman (eds). *Applied Microbiology* **26**: 229-253
- Crawford, R. L. 1996. Introduction. *Dalam*: Crawford, R. L & D. L. Crawford (eds). 1996. *Bioremediation: Principles and Applications*. Cambridge University Press, New York: xi + 400 hlm.
- Darmayati, Y., S. Harayama., A. Yamazoe., A. Hatmanti., Sulistiani., R. Nuchsin & D. H. Kunarso. 2008. Hydrocarbonoclastic bacteria from Jakarta Bay and Seribu Islands. *Marine Research in Indonesia* **33**(1): 55--64.
- Darmayati, Y. 2009. *Pemanfaatan bakteri laut dalam bioremediasiekosistem pantai berpasir tercemar minyak: Uji coba biostimulasi, bioaugmentasi, dan kombinasinya dalam skala laboratorium dan demplot*. Laporan Akhir Pusat Penelitian Oseanografi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta: ii + 30 hlm.
- Darmayati, Y. 2011. Development of oil bioremediation research on marine environment in Indonesia. *Jurnal of coastal development* **12** (3): 105--110.
- Dibble, J. T & R. Bartha. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **37** : 729--739.

- Fritsche, W & Hofrichter, M. 2000. Aerobic Degradation by Microorganisms  
*Dalam* H.-J. Rehm and G. Reed (eds). 2000. *in Biotechnology: Environmental Processes II*, Volume 11b, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany: 155 hlm.
- Ghazali, F. M., R. N. Z. A. Rahman, A. B. Salleh & M. Basri. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Intl. Biodeteration and Biodegradation* **54**: 61--67.
- Gómez-Ullate, E., J.R. Bayon, D. Castro & S.J. Coupe. 2008. Efficiency of MPN method to indicate hydrocarbon biodegradation processes within permeable pavements. 11th International Conference on Urban Drainage, Edinburgh, Scotland, UK: 1--10.
- Harayama, S., H. Kishira., Y. Kasai & K. Shutsubo. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Marine Biotechnology Institute* **1** (1): 63--70.
- Harley, J. P & L. M. Prescott. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. (5th.ed.). The McGrawHill Companies: xiv + 466 hlm.
- Hatmanti, A & Y. Darmayati. 2010. Karakterisasi dan analisis kekerabatan bakteri potensial pendegradasi minyak dan poly-aromatics hydrocarbon (PAH) dari Perairan Teluk Jakarta. *Marine Research in Indonesia*: 1--10.
- Hee, S. B., J. M. Lee & S.T. Lee. 1997. *Biodegradation of the mixture of 2,4,6-trichlorophenol, 4-chlorophenol, and phenol by a defined mixed culture. Journal of General and Applied Microbiology* **43**: 97--103.
- Herdiantoro, D. 2005. Biodegradasi hidrokarbon minyak bumi oleh *Bacillus* sp. galur ICBB 7859 dan ICBB 7865 dari ekosistem air hitam Kalimantan Tengah dengan penambahan surfaktan. Skripsi. Universitas Pertanian Bogor, Bogor: xvii + 69 hlm.
- Hobbie, J. E., R. J. Daley & S. Jasper. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **33** (5): 1225--1228.
- Indonesia Maritime Club (=IMC). 2008. Menyoal penanganan pencemaran laut di Indonesia. Januari: 1 hlm. <http://Indonesia.maritime.club.html>., 20 Januari, pk. 16.30.

- Kementrian Lingkungan Hidup (=KLH). 2004. *Tatacara dan persyaratan teknis pengolahan limbah dan tanah terkontaminasi oleh minyak bumi secara biologis*. Himpunan peraturan di bidang pengelolaan lingkungan hidup dan penegakan hukum lingkungan Indonesia :1--1047.
- Kokare, C. R., S. Chakraborty. A. N. Khopade & K. R. Mahadik. 2009. Biofilm: Importance and Applications. *Indian Journal of Biotechnology* **8**: 158--168
- Lau Ning Ling, A. 2003. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in oil contaminated beach sediment. Thesis. University of Singapore: xxi + 162 hlm.
- Leahy, J. G & R. R. Colwell. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbial Reviews* **54** (3): 305--315.
- Leahy, J. G., C. C. Somerville., K. A. Cunningham, G. A. Adamantiades, J. J. Byrd & R. R. Colwell. 1990. Hydrocarbon mineralization in sediments and plasmid incidence in sediment bacteria from the Campeche Bank. *Applied and Environmental Microbiology* **56** (6): 1565--1570.
- Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. Chang & D. C White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8): 3566--3574.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl & D. P. Clark. 2012. *Biology of microorganism. 13<sup>th</sup> ed.* Pearson Education Inc., San Fransisco: ii + 1044 hlm.
- Malatova, K. 2005. *Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in Western New York State*. Department of Chemistry Rochester Institute of Technology, New York: xi + 97 hlm.
- Manahan, S. E. 2001. *Fundamentals of Environmental Chemistry*. CRC Press LLC, Inc. USA: 993 hlm.
- Margesin, R & F. Schinner. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology Biotechnology* **56**: 650--663.
- National Research Council (=NRC). 2003. Oil in the sea III: Inputs, Fates, and Effects. *National Academy of Science*. Washington, DC: 259 hlm.

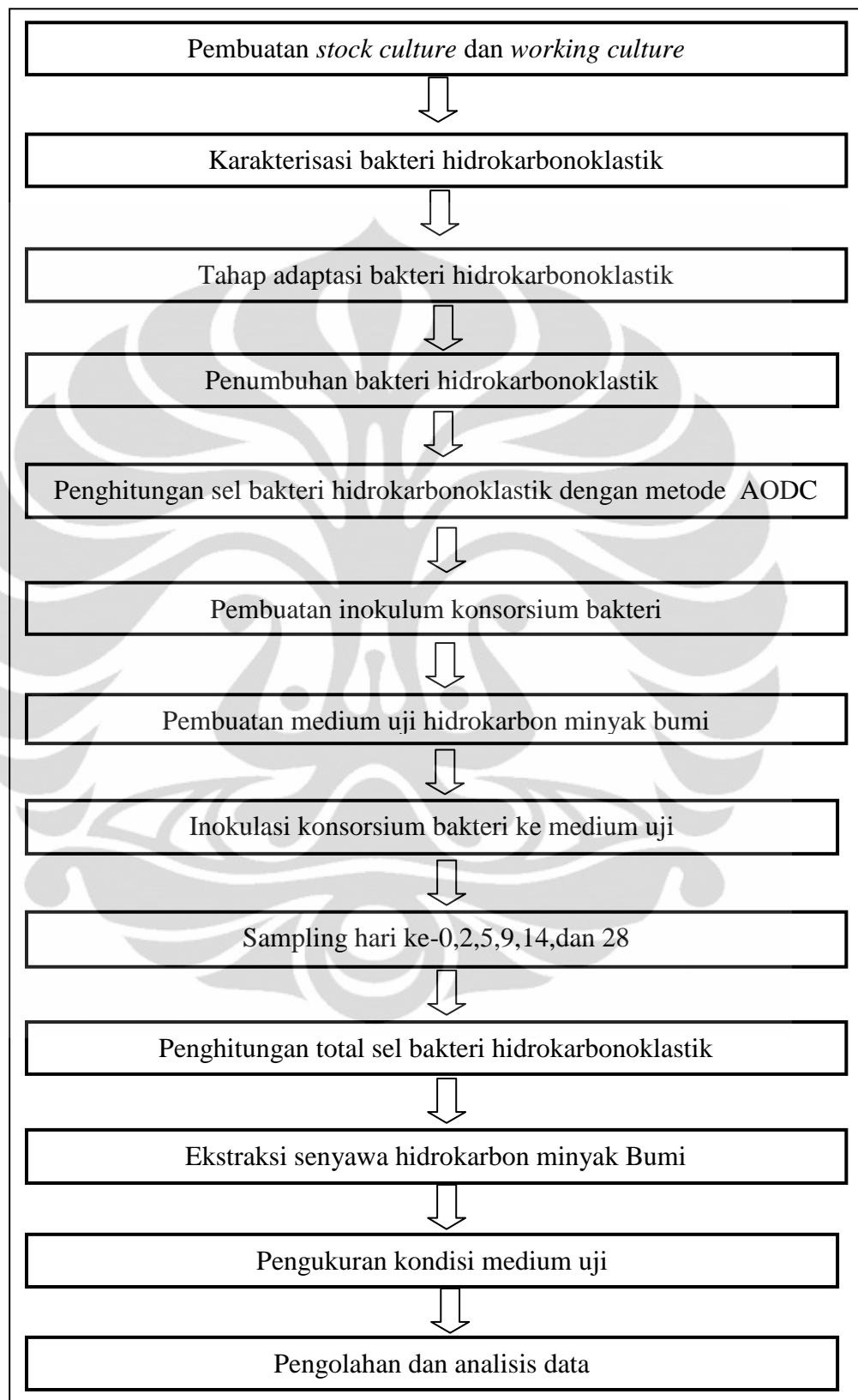
- Nasseri, S., R. R Kalantary, N. Nourieh, K. Naddafi, A. H. Mahvi & N. Baradaran. 2010. Influence of bioaugmentation in biodegradation of PAHs-contaminated soil in Bio-Slurry phase Reactor. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* **7**( 3): 199--208.
- Nugroho. A. 2006. *Bioremediasi hidrokarbon minyak Bumi*. Graha ilmu, Yogyakarta: xiv + 160 hlm.
- Nugroho, A. 2007. Dinamika populasi konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik : Studi kasus biodegradasi hidrokarbon minyak bumi skala laboratorium (the dynamic population of the bacterial hydrocarbonoclastic concorsium in the crude oil sludge degradation). *Jurnal ilmu dasar* **8** (1): 13--23.
- Office of Technology Assesment (=OTA). 1991. Bioremediation for marine oil spill: an analysis of oil spill responses technologies OTA BP-0-70-. Washington, DC: 31 hlm.
- Ouyang, W., H. Liu., V. Murygina., Y. Yu., Z. Xiu & S. Kalyuzhnyi. 2005. Comparison of the Bioaugmentation and Composting for Remediation of Oily Sludge: A Field Study in China. *Process Biochemistry* **40**: 3763--3768.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (=PP). 1999. Peraturan pemerintah republik Indonesia Nomor 19 tentang pengendalian pencemaran dan/atau perusakan laut, 2 hlm. [http://hukum.unsrat.ac.id/pp/pp\\_1999.htm](http://hukum.unsrat.ac.id/pp/pp_1999.htm) 20 Maret, 2012. pk 16.30.
- Pérez Silva, R. M., A. Ábalos Rodríguez., J. M. Gómez Montes de Oca & D. C. Moreno. 2006. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 Strain. *Tecnologiaquimica*. Vol. XXVI, No. 1.
- Philp, J.C., A. S. Whiteley, L. Ciric & M. Bailey. 2005. Environmental Pollution and Restoration: Role for Bioremediation. In. R.M. Atlas & J. Philp (eds.) 2005. *Bioremediation applied microbial solutions for real –world environmental cleanup*. ASM Press, Washington DC: xi+336 hlm.
- Prince, R. C., R. R. Lessard & J. R. Clark. 2003. Bioremediation of marine oil spills. *Oil & Gas Science and Technology* **58** (4): 463--468.
- Prince, R. & R. M. Atlas. 2005. Bioremediation of marine oil spill. In R.M. Atlas & J. Philp (eds.).2005. *Bioremediation applied microbial solutions for real –world environmental cleanup*. ASM Press, Washington D.C: xi+336 hlm.

- Roling, W. F. M., M. G. Milner, D. M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R. J. P. Swannell & I. M. Head. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (11): 5537--5548.
- Rosenberg, E., R. Legmann, A. Kushmaro, R. Taube & E.Z. Ron. 1992. Biodegradation: Petroleum bioremediation a multiphase problem. *Biodegradation* **3**: 337--350.
- Rosenberg, E & E. Z. Ron. 1996. Bioremediation of petroleum contamination. *Dalam*: Crawford, R. L & D. L. Crawford (eds). 1996. *Bioremediation: Principles and Applications*. Cambridge University Press, New York: xi + 400 hlm.
- Saadoun, I. M. K & Z. D. Al-Ghzawi. 2005. Bioremediation of petroleum contamination. *Dalam* : Fingerman, M & R. Nagabhushanam (eds). 2005. *Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystem*. Science Publishers, Inc., USA: xi + 396 hlm.
- Salam, L. B., O. S. Obayori, O. S. Akashoro & G. O. Okogie. 2011. Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil. *International Journal Of Agriculture and Biology* **13**: 245--250.
- Sang-Jun Kim, B. S. M. S. 2003. Bioaugmentation for the remediation of pesticide contaminated soil with microorganism directly enriched in soil or compost. Dissertation. The Ohio State University: xv + 160 hlm.
- Sing, C & J. Lin. 2010. Bioaugmentation efficiency of diesel degradation by *Bacillus pumilus* JLB and *Acinetobacter calcoaceticus* LT1 in contaminated soils. *African Journal of Biotechnology* **9** (41): 6881--6888.
- Singh, U. S & K. Kapoor. 2010. *Introductory microbiology*. Oxford Book Company, Jaipur: v + 316 hlm.
- Sudjana. 1980. *Disain dan analisis eksperimen*. Tarsito, Bandung: 285 hlm.
- Thiel, T. 1999. *Introduction to bacteria*. Departement of Biology. University of Missouri St. Louis, 9 hlm.

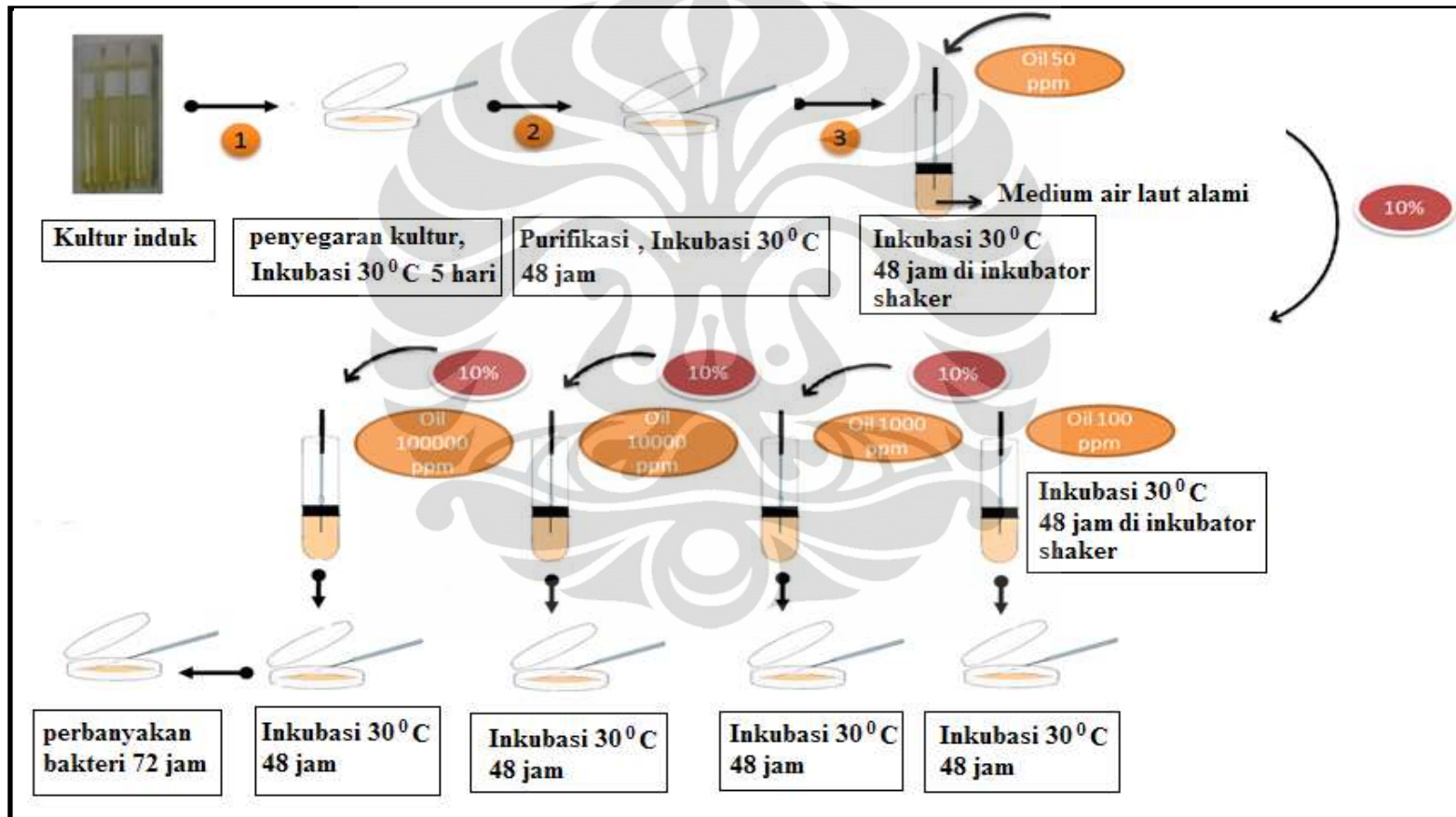
- United State Environmental Protection Agency (=U.S.EPA). 1998. *Fundamental principles of bioremediation (An aid to the development of bioremediation proposals)*. Environmental Response Division, U.S.A: iv + 24 hlm.
- Unterman, R. 1996. A history of PCB biodegradation. *Dalam*: Crawford, R. L & D. L. Crawford (eds). 1996. *Bioremediation: principles and applications*. Cambridge University Press, New York: xi + 400 hlm.
- Vasudevan, N & P. Rajaram. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International* **26**: 409--411.
- Venosa, A. D & X. Zhu. 2005. Guidance for the bioremediation of oil contaminated wetlands, marshes, and marine shorelines . *Dalam* : Fingerman, M & R. Nagabhushanam (eds). 2005. *Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystem*. Science Publishers, Inc., USA: xi + 396 hlm.
- Wang, F., S. Grundmann, M. Schmid, .U. Dorfler, S. Roherer, J. C. Munch, A. Hartmann, Xin Jiang & R. Schroll. 2007. Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil *Chemosphere* **67**: 896--902.
- Yaima, B. S. M. 2011. Bioremediation: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biotecnología Aplicada* **28**: 69--76.
- Zahed, M. A., M. H. Azis., M. H. Isa & L. Mohajeri. 2010. Enhancement biodegradation of n-alkanes from crude oil contaminated seawater. *International Journal of Environmental Research* **4** (4): 655--664.
- Zhu, X., A. D. Venosa., M. T. Suidan & K. Lee. 2001. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. Cincinnati, OH 45268: 156 hlm.
- Zimmerman & M. Reil. 1974. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. Zoology Department North Carolina State University, Canada: 882 hlm.
- Zobell, C. E. 1941. Studies on marine bacteria: the cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Dalam*: Carol, D & Litchfield (eds). 1976. *Marine microbiology*. Dowden, Hutchinson & Poss, Inc, *United states of America*: xvii + 519 hlm.



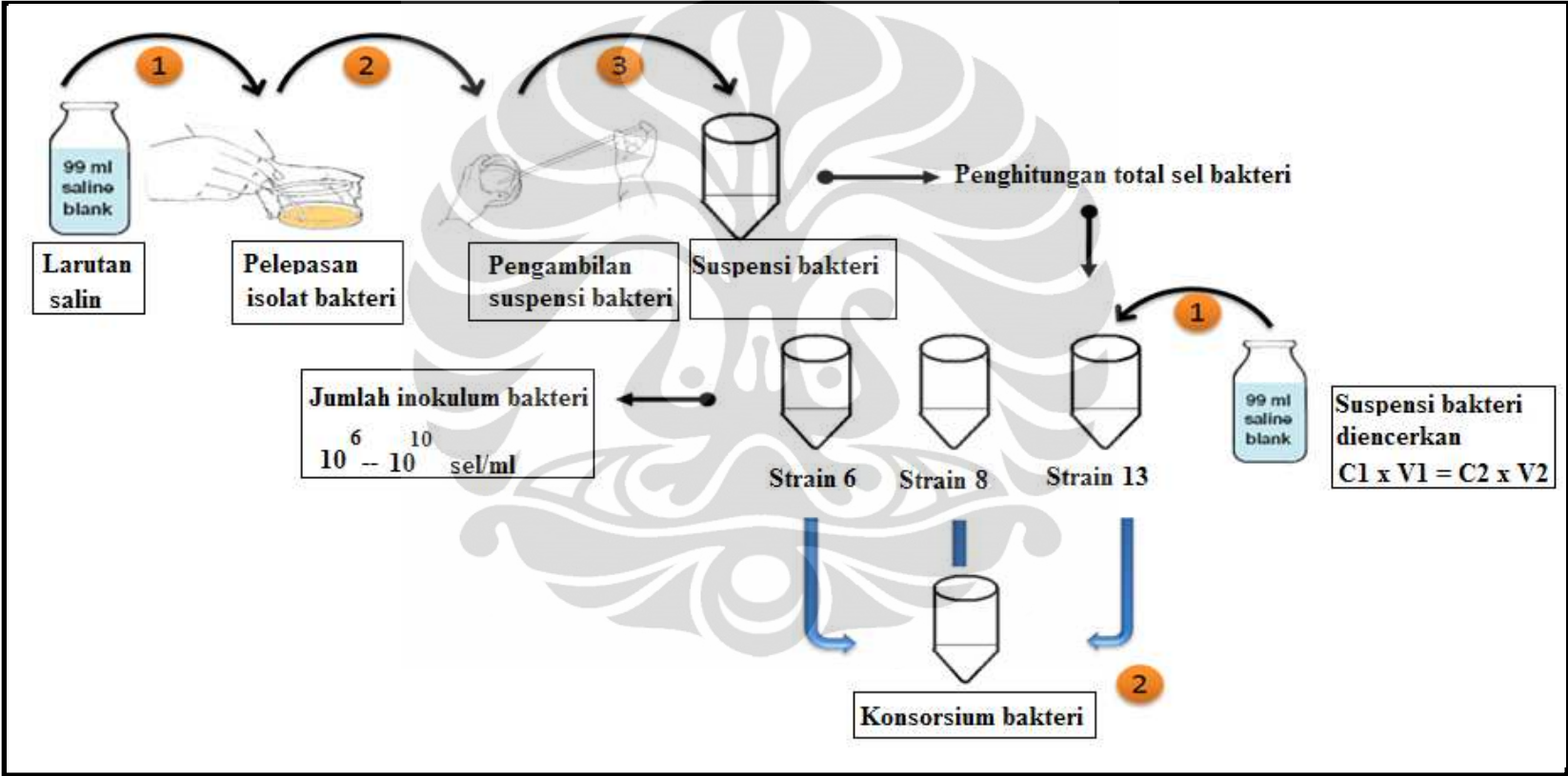
## Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian



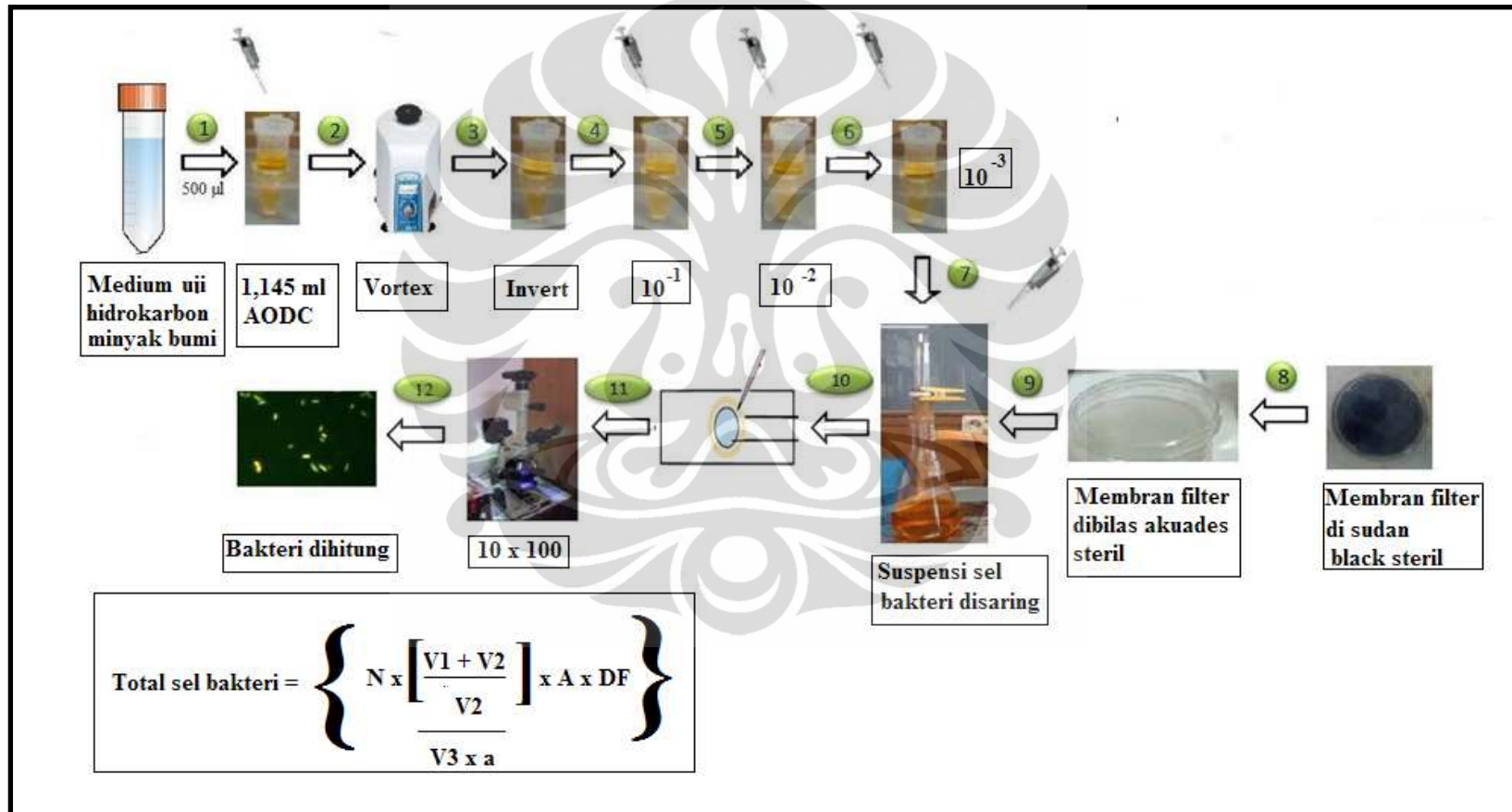
Lampiran 2. Skema Tahap Adaptasi Bakteri Hidrokarbonoklastik



Lampiran 3. Skema Pembuatan Konsorsium Bakteri

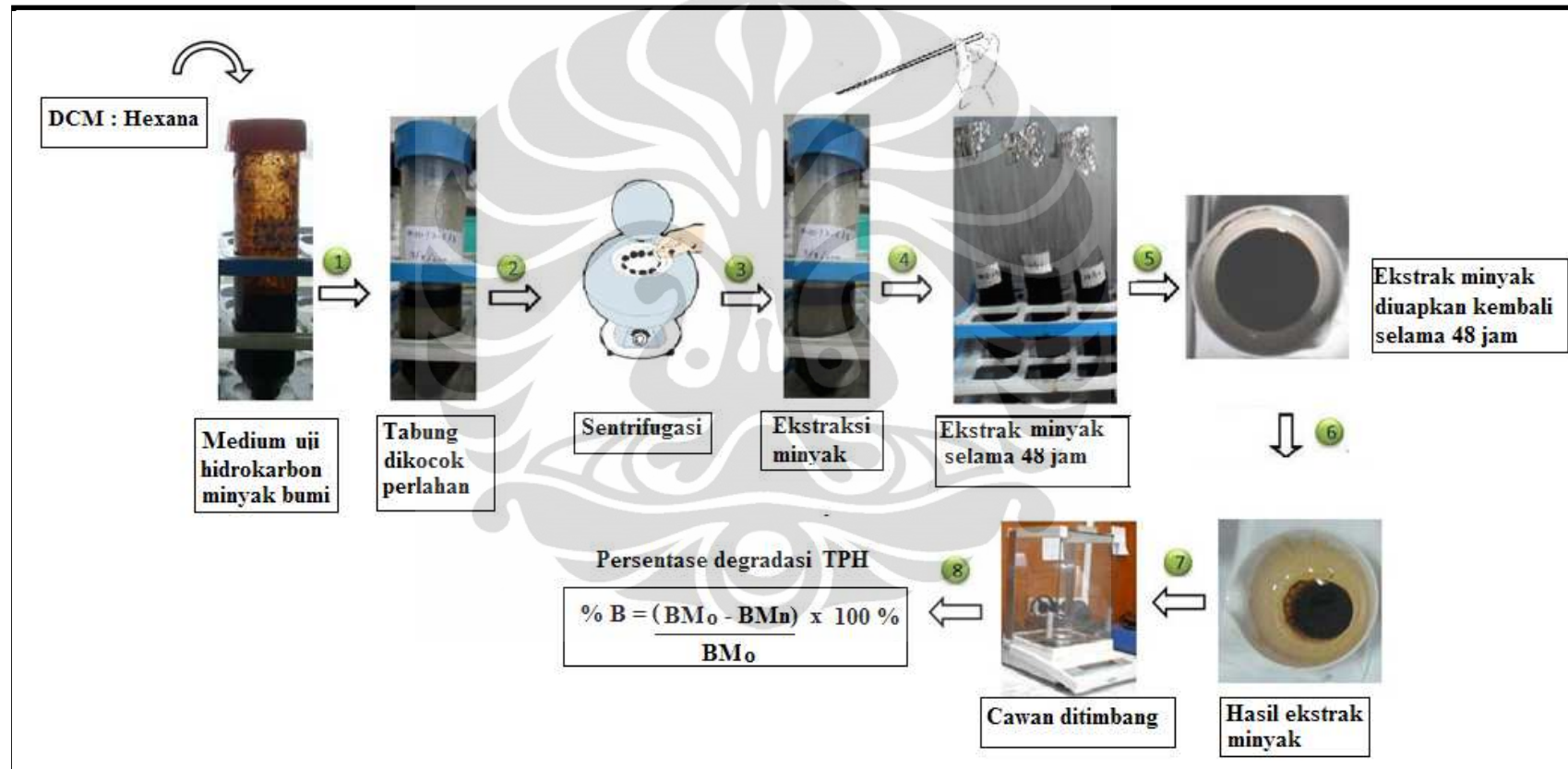


Lampiran 4. Penghitungan Total Sel Bakteri





Lampiran 5. Ekstraksi Hidrokarbon Minyak Bumi





## Lampiran 6

Tabel 1. Data Persentase Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi (%)

Perlakuan	Waktu (hari ke-)	Ulangan			Total	Rata-rata
		1	2	3		
K10	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	15.48	14.41	15.28	45.171	15.057
	5	29.04	28.24	27.00	84.276	28.092
	9	39.44	40.34	41.61	121.392	40.464
	14	47.71	49.35	47.73	144.795	48.265
	28	55.72	55.04	57.00	167.767	55.922
	K9	0	0.000	0.000	0.000	0.000
2		15.20	15.05	14.51	44.752	14.917
5		28.19	26.46	27.84	82.491	27.497
9		39.62	38.78	39.57	117.972	39.324
14		46.41	47.23	46.11	139.740	46.580
28		52.04	51.68	52.70	156.421	52.140
K8		0	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	15.11	14.50	14.40	44.009	14.670
	5	27.58	26.91	26.82	81.308	27.103
	9	38.08	37.70	37.29	113.067	37.689
	14	42.63	44.16	42.96	129.748	43.249
	28	45.49	46.53	45.84	137.858	45.953
	K7	0	0.000	0.000	0.000	0.000
2		13.97	12.92	12.88	39.772	13.257
5		27.04	26.74	25.89	79.662	26.554
9		34.14	35.85	35.49	105.474	35.158
14		39.69	40.01	39.51	119.208	39.736
28		42.47	42.68	42.96	128.100	42.710
K6		0	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	11.77	12.86	11.57	36.201	12.067
	5	24.69	25.10	25.76	75.554	25.185
	9	27.84	28.88	28.17	84.889	28.296
	14	36.66	36.86	36.50	110.024	36.675
	28	41.93	42.98	42.72	127.630	42.543
	K(+)	0	0.000	0.000	0.000	0.000
2		5.42	6.26	6.72	18.402	6.134
5		15.34	15.21	14.14	44.687	14.896
9		17.37	15.99	16.50	49.860	16.620
14		28.88	29.01	27.80	85.685	28.562
28		33.28	32.07	33.36	98.709	32.903
K(-)		0	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	1.21	1.52	1.05	3.780	1.260
	5	1.78	1.32	1.57	4.674	1.558
	9	2.44	1.65	2.83	6.928	2.309
	14	2.92	2.80	3.24	8.955	2.985
	28	2.88	3.98	3.56	10.421	3.474



## Lampiran 7

Tabel 2. Total Sel Bakteri (sel/ml)

Perlakuan	Waktu (hari ke-)	Total sel bakteri (sel/ml)			Rata-rata
		U1	U2	U3	
K(-)	0	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	2	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	5	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	9	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	14	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	28	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
K(+)	0	3.84E+08	3.78E+08	3.51E+08	3.71E+08
	2	3.93E+08	4.02E+08	4.11E+08	4.02E+08
	5	6.93E+08	6.81E+08	6.78E+08	6.84E+08
	9	7.50E+08	7.29E+08	7.41E+08	7.40E+08
	14	1.01E+09	1.11E+09	9.40E+08	1.02E+09
	28	6.87E+08	6.75E+08	7.11E+08	6.91E+08
K6	0	4.40E+08	4.61E+08	5.42E+08	4.81E+08
	2	5.21E+08	5.30E+08	5.77E+08	5.43E+08
	5	8.30E+08	8.60E+08	8.66E+08	8.52E+08
	9	1.09E+09	1.14E+09	1.32E+09	1.18E+09
	14	1.49E+09	1.52E+09	1.41E+09	1.47E+09
	28	9.43E+08	9.76E+08	9.49E+08	9.56E+08
K7	0	6.93E+08	7.17E+08	7.41E+08	7.17E+08
	2	7.83E+08	7.71E+08	7.59E+08	7.71E+08
	5	1.14E+09	1.11E+09	1.02E+09	1.09E+09
	9	1.68E+09	1.61E+09	1.55E+09	1.61E+09
	14	1.45E+09	1.57E+09	1.50E+09	1.51E+09
	28	1.18E+09	1.29E+09	1.37E+09	1.28E+09
K8	0	9.70E+08	9.25E+08	9.43E+08	9.46E+08
	2	1.08E+09	1.01E+09	9.70E+08	1.02E+09
	5	1.38E+09	1.32E+09	1.23E+09	1.31E+09
	9	1.94E+09	1.89E+09	1.85E+09	1.89E+09
	14	1.66E+09	1.79E+09	1.73E+09	1.73E+09
	28	1.44E+09	1.57E+09	1.52E+09	1.51E+09
K9	0	1.50E+09	1.38E+09	1.42E+09	1.44E+09
	2	1.57E+09	1.48E+09	1.41E+09	1.49E+09
	5	1.84E+09	1.74E+09	1.82E+09	1.80E+09
	9	2.52E+09	2.43E+09	2.49E+09	2.48E+09
	14	2.04E+09	2.11E+09	1.98E+09	2.05E+09
	28	1.50E+09	1.58E+09	1.68E+09	1.59E+09
K10	0	1.90E+09	1.97E+09	1.86E+09	1.91E+09
	2	2.05E+09	1.98E+09	2.03E+09	2.02E+09
	5	2.34E+09	2.24E+09	2.18E+09	2.25E+09
	9	2.90E+09	2.96E+09	2.99E+09	2.95E+09
	14	2.28E+09	2.40E+09	2.38E+09	2.35E+09
	28	1.93E+09	1.87E+09	2.01E+09	1.94E+09

## Lampiran 8

Tabel 3. Data Pengukuran Kondisi Medium Uji Hidrokarbon Minyak Bumi

Perlakuan	Waktu (hari ke-)	Faktor Lingkungan		
		DO	Suhu	pH
K (-)	0	2,61	26,3	7,98
	2	2,59	26,3	8,01
	5	2,51	26,7	7,82
	9	2,44	26,9	7,74
	14	2,43	27,0	7,70
	28	2,41	27,3	7,69
K (+)	0	2,45	26,7	7,53
	2	1,98	26,5	7,73
	5	1,23	26,4	7,72
	9	0,96	27,0	7,62
	14	0,72	27,3	6,92
	28	0,34	27,7	6,26
K10	0	2,21	26,1	7,46
	2	1,76	26,4	7,51
	5	0,84	26,9	7,74
	9	0,69	27,0	7,79
	14	0,43	27,2	7,84
	28	0,26	27,2	6,96
K9	0	2,28	26,0	7,46
	2	1,89	26,2	7,44
	5	0,86	26,8	7,77
	9	0,71	27,4	7,78
	14	0,66	28,0	7,77
	28	0,20	27,0	6,77
K8	0	2,30	26,1	7,46
	2	1,93	26,2	7,36
	5	0,92	26,9	7,64
	9	0,81	27,3	7,69
	14	0,73	27,5	7,74
	28	0,24	27,8	6,63
K7	0	2,39	26,5	7,54
	2	1,96	26,1	7,34
	5	0,97	26,8	7,70
	9	0,69	27,5	7,74
	14	0,66	27,6	6,73
	28	0,44	27,7	6,56
K6	0	2,42	27,0	7,58
	2	1,98	26,9	7,46
	5	0,99	27,2	7,54
	9	0,71	27,5	7,72
	14	0,50	27,8	6,88
	28	0,40	27,5	6,31

## Lampiran 9

Tabel 4. Data Persentase Degradasi Hidrokarbon Minyak Bumi (%) {Transf. Arc. Sin  $\sqrt{x/100}$ }

Perlakuan	Waktu (hari ke)	Ulangan			Total	Rata-Rata
		1	2	3		
K10	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.404	0.389	0.402	1.195	0.398
	5	0.571	0.560	0.544	1.676	0.559
	9	0.679	0.688	0.701	2.068	0.689
	14	0.765	0.788	0.748	2.302	0.767
	28	0.841	0.827	0.866	2.534	0.845
TK10		3.260	3.253	3.262	9.775	3.258
K9	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.400	0.398	0.391	1.189	0.396
	5	0.560	0.540	0.556	1.656	0.552
	9	0.681	0.672	0.680	2.033	0.678
	14	0.749	0.758	0.746	2.254	0.751
	28	0.813	0.794	0.814	2.420	0.807
TK9		3.204	3.162	3.187	9.552	3.184
K8	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.399	0.391	0.389	1.179	0.393
	5	0.553	0.545	0.544	1.643	0.548
	9	0.662	0.661	0.660	1.983	0.661
	14	0.745	0.746	0.705	2.196	0.732
	28	0.740	0.751	0.744	2.235	0.745
TK8		3.099	3.094	3.043	9.236	3.079
K7	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.396	0.362	0.360	1.117	0.372
	5	0.547	0.543	0.568	1.658	0.553
	9	0.624	0.642	0.638	1.904	0.635
	14	0.693	0.696	0.657	2.046	0.682
	28	0.705	0.698	0.734	2.137	0.712
TK7		2.964	2.941	2.957	8.862	2.954
K6	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.350	0.367	0.347	1.064	0.355
	5	0.521	0.523	0.546	1.590	0.530
	9	0.556	0.567	0.559	1.683	0.561
	14	0.650	0.652	0.649	1.952	0.651
	28	0.694	0.732	0.705	2.131	0.710
TK6		2.772	2.842	2.806	8.420	2.807
K(+)	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.235	0.230	0.283	0.748	0.249
	5	0.402	0.401	0.386	1.189	0.396
	9	0.440	0.406	0.413	1.259	0.420
	14	0.571	0.581	0.539	1.691	0.564
	28	0.615	0.602	0.616	1.833	0.611
TK(+)		2.263	2.219	2.237	6.719	2.240
K(-)	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.09341	0.062491	0.116018	0.272	0.091
	5	0.118173	0.105552	0.148532	0.372	0.124
	9	0.168728	0.155872	0.105074	0.430	0.143
	14	0.192231	0.177279	0.147504	0.517	0.172
	28	0.201613	0.160691	0.197496	0.560	0.187
TK(-)		0.774	0.662	0.715	2.151	0.717
Total Akhir		18.336	18.173	18.206	54.715	18.238

## Analisis Ragam :

Perlakuan	Kelompok			Total
	1	2	3	
K10	3.258	3.253	3.267	9.778
K9	3.196	3.171	3.186	9.553
K8	3.069	3.075	3.049	9.192
K7	2.940	2.950	2.934	8.823
K6	2.781	2.826	2.800	8.407
K(+)	2.249	2.236	2.237	6.722
K(-)	0.743	0.737	0.768	2.248
Total	18.237	18.246	18.241	54.724

## Tabel untuk total perlakuan :

Bioaugmentasi	Kelompok						Total
	0	2	5	9	14	28	
K10	0	1.195	1.676	2.068	2.304	2.534	9.778
K9	0	1.190	1.656	2.033	2.254	2.420	9.553
K8	0	1.179	1.643	1.983	2.153	2.235	9.192
K7	0	1.118	1.624	1.904	2.046	2.131	8.823
K6	0	1.064	1.577	1.683	1.952	2.132	8.407
K(+)	0	0.750	1.189	1.260	1.691	1.833	6.722
K(-)	0	0.336	0.375	0.455	0.521	0.561	2.248
Total	0	6.832	9.739	11.386	12.920	13.846	54.724

## Perhitungan analisis ragam :

$$FK : ((54,724)^2/126) = 23.76752$$

$$JKT : ((0,00)^2 + \dots + (0,197)^2) - FK = 9.2375$$

$$JKR : ((18,237)^2 + \dots + (18,241)^2) / 42 - FK = 3.5229E-04$$

$$JKA : ((9,778)^2 + \dots + (2,248)^2) / 18 - FK = 2.423742596$$

$$JKGalat a (JKGa) : ((3,258)^2 + \dots + (0,768)^2) / 6 - FK - JKR - JKA = 1.8019E-03$$

$$JKB (\text{waktu inkubasi}) : ((0,00)^2 + \dots + (13,846)^2) / 21 - FK = 6.251369$$

$$JKAB : ((0,00)^2 + \dots + (0,561)^2) / 3 - FK - JKA - JKB = 0.655884$$

$$JK Galat b (JKGb) : (JKT - JKR - JKA - JKGa - JKB - JKAB) = 0.017$$

Tabel : Analisis varian jumlah inokulum konsorsium bakteri dan waktu inkubasi terhadap rata-rata persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi (%)

sumber ragam	Db	JK	RJK	Fhitung	Ftabel 0.05
Petak Utama					
Kelompok	2	1.0891E-06	5.4455E-07	1.4916E-02	3.88529383
Perlakuan	6	2.351232297	0.391872049	1.07337E+04*	3.88529383
Galat a	12	4.3810E-04	3.6509E-05		
Anak Petak					
Waktu	5	6.224100549	1.24482011	17287.55638*	2.34558633
Perlakuan+waktu	30	0.658354333	0.021945144	304.7652577*	1.62203975
Galat(b)	70	0.005	7.20067E-05		
total	125	9.23917			
kka	0.43431686	0.006042242	1.391205866		
kkb		0.008485677	1.953798644		

Keterangan :

Simbol \* : berbeda nyata

### Uji Lanjut LSD

$$5\% : t_{a \ 0.05 \ (12)} = 1,782$$

$$5\% : t_{b \ 0.05 \ (70)} = 1,667$$

1. Pengaruh utama (bioaugmentasi) dan waktu terhadap rata-rata persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi (Uji kolom bioaugmentasi dan Uji Silang)

$$t' = \frac{((n-1) \times (KT \text{ Galat } b) \times (t_{b \ 0.05 \ (70)}) + (KT \text{ Galat } a) \times (t_{a \ 0.05 \ (12)}))}{((n-1) \times (KT \text{ Galat } b)) + (KT \text{ Galat } a)}$$

$$t' = \frac{((6-1) \times (7.20067E-05) \times (1,667) + (3.6509E-05) \times (1,782))}{((6-1) \times (7.20067E-05)) + ((3.6509E-05))}$$

$$t' = 1.677587771$$

$$s_y = \sqrt{\frac{2[(b-1)KT(\text{Galat } b) + KT(\text{Galat } a)]}{rb}}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{2[(6-1)(7.20067E-05) + (3.6509E-05)]}{3 \times 6}}$$

$$S_y = 0.00663779$$

$$LSD = t' \times S_y = 0.011135475$$

2. Pengaruh waktu inkubasi pada bioaugmentasi terhadap data persentase degradasi hidrokarbon minyak bumi (Uji kolom Bioaugmentasi)

$$LSD = t_{0,05/70} \cdot \sqrt{2KT \text{ Galat } b/3} = 1,667 \times \sqrt{2((7.20067E-05)/3)} = 0.011549853$$

Tabel interaksi bioaugmentasi x waktu inkubasi

Waktu	Bioaugmentasi						
	K(-)	K(+)	K6	K7	K8	K9	K10
0	0 A (A)	0 A (A)	0 A (A)	0 A (A)	0 A (A)	0 A (A)	0 A (A)
2	0.112 B (A)	0.250 G (B)	0.355 H (C)	0.373 I (D)	0.393 J (E)	0.397 L (F)	0.398 L (G)
5	0.125 C (A)	0.396 K (B)	0.526 N (C)	0.541 O (D)	0.548 P (E)	0.552 P (F)	0.559 P (G)
9	0.152 D (A)	0.42 M (B)	0.561 P (C)	0.635 S (D)	0.661 U (E)	0.678 V (F)	0.689 V (FG)
14	0.174 E (A)	0.564 Q (B)	0.651 T (C)	0.682 V (D)	0.718 W (E)	0.751 X (F)	0.768 Y (G)
28	0.187 F (A)	0.611 R (B)	0.711 W (C)	0.71 W (D)	0.745 X (E)	0.807 Z (F)	0.845 Z (G)

Keterangan :

Angka yang diikuti huruf yang sama pada dalam kolom yang sama tidak menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0.05$ )

Kesimpulan:

1. Bioaugmentasi yang optimum adalah K10 (jumlah inokulum konsorsium bakteri sebesar  $1 \times 10^{10}$  sel/ml ( $P < 0,05$ ))
2. Adanya pengaruh yang nyata antara interaksi kombinasi metode bioaugmentasi K10 (jumlah inokulum konsorsium bakteri sebesar  $1 \times 10^{10}$  sel/ml) dan waktu inkubasi 9 hari ( $P < 0,05$ )
3. Waktu yang optimum ( $P < 0,05$ ) untuk metode perlakuan K7, K8, K9, K10 adalah hari ke-9, sedangkan perlakuan K6 dan K (+) adalah hari ke-14

Lampiran 10  
Korelasi Sederhana Total Sel Bakteri Terhadap Persentase Degradasi Hidrokarbon  
Minyak Bumi (%)

**Korelasi**

	Degradasi TPH	sel_bakteri
Degradasi TPH Pearson Correlation	1	.739**
Sig. (2-tailed)		.000
N	126	126
sel_bakteri Pearson Correlation	.739**	1
Sig. (2-tailed)	.000	
N	126	126

Keterangan:

Tingkat kepercayaan ( $\alpha$ ) = 1% atau 0.01

Kriteria keputusan :

Menurut Sugiyono 2007, interpretasi koefisien korelasi (r) adalah

0,00--0,199 = sangat lemah

0,20--0,399 = rendah

0,40--0,599 = sedang

0,60--0,799 = kuat

0,80--1,000 = sangat kuat

Hasil perhitungan :

koefisien korelasi (r) = 0,739

Kesimpulan: Terdapat korelasi yang kuat antara total sel bakteri dengan peningkatan jumlah hidrokarbon minyak bumi yang terdegradasi karena berada pada rentang 0,60--0.799, sedangkan arah hubungan adalah positif karena nilai r positif, berarti semakin besar total sel bakteri maka semakin banyak hidrokarbon minyak bumi yang terdegradasi.



## Lampiran 11

Perhitungan Volume Larutan Salin Dalam Pengenceran Suspensi Bakteri Untuk  
Memperoleh Total Sel Bakteri  $2,32 \cdot 10^{11}$  sel/ml

Tabel 1. Total Sel Bakteri Awal

Strain bakteri	Total sel bakteri (sel/ml)
<i>Pseudomonas balearica</i> st 101	$1,06 \cdot 10^{13}$
<i>Alcanivorax</i> sp. TE-9	$2,32 \cdot 10^{11}$
<i>Bordetella</i> sp. F2	$3,83 \cdot 10^{11}$

Pengenceran dilakukan agar total sel seluruh bakteri menjadi seragam, dan bakteri yang memiliki total sel bakteri terkecil dijadikan standar awal.

Total sel bakteri  $10^{11}$  sel/ml

- *Alcanivorax* sp. TE-9 (tidak diencerkan)
- *Pseudomonas balearica* ST 101

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1,06 \cdot 10^{13} \text{ sel/ml} \times 1 \text{ ml} = 2,32 \cdot 10^{11} \text{ sel/ml} \times V_2$$

$$1,06 \cdot 10^{13} \text{ sel} = 2,32 \cdot 10^{11} \text{ sel/ml} \times V_2$$

$$V_2 = 45,7 \text{ ml}$$

Jadi, volume suspensi bakteri diencerkan dengan larutan salin hingga 45,7 ml

- *Bordetella* sp. F2

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$3,83 \cdot 10^{11} \text{ sel/ml} \times 24,5 \text{ ml} = 2,32 \cdot 10^{11} \text{ sel/ml} \times V_2$$

$$93,835 \cdot 10^{11} \text{ sel} = 2,32 \cdot 10^{11} \text{ sel/ml} \times V_2$$

$$V_2 = 40,4 \text{ ml}$$

Jadi, volume suspensi bakteri diencerkan dengan larutan salin hingga 40,4 ml

Lampiran 12  
Perhitungan Volume Suspensi Bakteri

---

$$C_1 \cdot V_1 = (20 + V_1) \cdot 10^{10} \text{ sel/ml}$$

$$2,32 \cdot 10^{11} \text{ sel/ml} \times V_1 = (20 + V_1) \cdot 10^{10} \text{ sel/ml}$$

$$23,2 \cdot V_1 = 20 + V_1$$

$$22,2 V_1 = 20$$

$$V_1 = 0,9 \text{ ml}$$

Jadi, volume konsorsium bakteri dengan total sel bakteri  $1 \times 10^{10}$  sel/ml yang diinokulasikan ke dalam medium uji sebesar 0,9 ml.

Lampiran 13  
Perhitungan Konsentrasi Minyak Bumi 100.000 ppm (10%)

---

1 ppm = 1 mg/1 kg atau 1 ppm = 1 mg/1 kL

2,5 ml minyak = 2 gr oil

7,5 ml air laut = 7,5 gr air laut

100.000 ppm =  $10^5$  mg oil / 1 kg sedimen = 1 gr oil / 10 gr sedimen

❖ 1 gr oil : 10 gr sedimen