

LINGKUNGAN

**LAPORAN
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009**



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**BIOREMEDIASI TANAH TERCEMAR MINYAK
MENGUNAKAN KONSORSIUM MIKROBA**

**Ketua Peneliti
Dr. Ni'matuzahroh**

**Anggota:
Drs. Agus Supriyanto, M.Kes.
Drs. Moch. Affandi, M.Si.
Fatimah, S.Si., M.Kes.**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis
Nasional**

Nomor : 27/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

**Universitas Airlangga
Oktober, 2009**

LINGKUNGAN

**LAPORAN
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009**



lc
lc
LP. 91/10
BIO

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**BIOREMEDIASI TANAH TERCEMAR MINYAK
MENGUNAKAN KONSORSIUM MIKROBA**

**Ketua Peneliti
Dr. Ni'matuzahroh**

**Anggota:
Drs. Agus Supriyanto, M.Kes.
Drs. Moch. Affandi, M.Si.
Fatimah, S.Si., M.Kes.**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis
Nasional**

Nomor : 27/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

**Universitas Airlangga
Oktober, 2009**

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN

1. JUDUL : **BIOREMEDIASI TANAH TERCEMAR MINYAK
MENGUNAKAN KONSORSIUM MIKROBA**

2. Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Ni'matuzahroh
b. Jenis Kelamin : Perempuan
c. NIP. : 132011697
d. Pangkat/golongan : Penata Tk 1 /III d
e. Jabatan : Lektor Kepala
f. Bidang Keahlian : Mikrobiologi
g. Fakultas / Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi
h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

NO	NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS / JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Drs. Agus Supriyanto, M.Kes.	Mikrobiologi	Sains dan Teknologi/ Biologi	Universitas Airlangga
2.	Drs. Moch. Affandi, M.Si	Ekologi	Sains dan Teknologi/ Biologi	Universitas Airlangga
3.	Fatimah S.Si., M.Kes.	Mikrobiologi	Sains dan Teknologi/ Biologi	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :


a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-
c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 100.000.000,-

Mengetahui:

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi


Drs. Salamun, M/Kes.
NIP. 131696506

Surabaya,
Ketua Peneliti,


Dr. Ni'matuzahroh
NIP.132011697

Mengetahui

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat




Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA., drh.
NIP. 131837004

BIOREMEDIASI TANAH TERCEMAR MINYAK MENGGUNAKAN KONSORSIUM MIKROBA

RINGKASAN

Minyak merupakan salah satu sumber kontaminan utama di permukaan tanah. Pencemaran minyak di tanah telah menimbulkan masalah yang berarti bagi lingkungan. Bioremediasi tanah tercemar minyak menggunakan konsorsium mikroba diusulkan menjadi metoda alternatif dalam penanganan limbah minyak. Penelitian bertujuan untuk 1) mendapatkan mikroba indigenus dari kelompok bakteri dan khamir yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon minyak dari berbagai lokasi tercemar minyak; 2) mengetahui pengaruh kombinasi jenis mikroba, konsentrasi inokulum mikroba, dan waktu inkubasi dalam bioremediasi tanah tercemar minyak; 3) dan mengetahui efektivitas penambahan jenis mikroba, jenis nutrisi, jenis biosurfaktan dan gabungan metode bioaugmentasi, biostimulasi dan penambahan biosurfaktan untuk mengoptimalkan proses bioremediasi. Mikroba potensial pendegradasi minyak (bakteri dan khamir) diisolasi dari tanah tercemar minyak di lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo dan Depo Pertamina Surabaya. Konsorsium mikroba dibuat dengan mencampurkan mikroba potensial hasil isolasi dengan variasi jenis dan konsentrasi inokulum. Penambahan nutrisi menggunakan jenis organik (pupuk kotoran ayam dan pupuk kandang) dan anorganik (NPK). Biosurfaktan yang diujikan adalah biosurfaktan bakteri *Pseudomonas* dan *Acinetobacter* hasil isolasi dari sumur minyak Wonocolo yang dikoleksi di Laboratorium Mikrobiologi F. Saintek Unair. Penelitian dilakukan dalam skala laboratorium dengan sampel tanah yang diambil dari lokasi sumur minyak di Bojonegoro (tanah tercemar minyak) dan tanah yang tidak tercemar minyak (tanah subur dan pasir). Bioremediasi dilakukan dengan variasi konsorsium mikroba potensial, nutrisi, biosurfaktan, dan gabungan ketiganya. Penelitian dilakukan secara suksesif selama 6 bulan dengan pengaturan kelembapan tanah. Pengambilan data dilakukan seminggu sekali dengan menghitung jumlah sel mikroba heterotrofik, mikroba hidrokarbonoklastik, mengetahui dominansi mikroba yang berperan dalam proses biodegradasi, pengukuran kadar minyak di tanah dan pengukuran faktor lingkungan tanah. Data yang didapatkan berupa jumlah sel mikroba (CFU/ gram), dominansi mikroba di tanah (jenis mikroba per perlakuan), kadar residu minyak (mg/gram tanah), persentase minyak yang terdegradasi (%), suhu, kelembapan, pH dan kadar C/N/P tanah. Data dianalisis secara deskriptif dan statistik menggunakan Anova faktorial dengan derajat signifikansi $\alpha = 0,05$ dan dilanjutkan dengan uji t untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Hasil penelitian berhasil mendapatkan 13 isolat bakteri dan 3 khamir potensial pendegradasi hidrokarbon, yaitu dari genus *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus Flavobacterium*, *Candida* dan *Rhodotorulla*. Jenis mikroba penyusun konsorsium dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap bioremediasi tanah tercemar minyak. Jenis mikroba, konsentrasi inokulum, jenis nutrisi (organik dan anorganik) dan konsentrasi nutrisi (3,6,9 %) tidak memberikan pengaruh terhadap bioremediasi minyak pada tanah yang mengandung mikroba indigenus hidrokarbonoklastik dengan jumlah yang cukup. Jenis biosurfaktan berpengaruh terhadap biodegradasi minyak. Gabungan metode bioaugmentasi, biostimulasi dan penambahan biosurfaktan efektif digunakan dalam bioremediasi minyak. Bakteri dan khamir hidrokarbonoklastik hasil isolasi mempunyai prospek untuk digunakan sebagai mikroba penyusun konsorsium dalam upaya bioremediasi limbah minyak. Uji lanjut untuk mengungkap efektivitas formula konsorsium mikroba secara *in situ* sangat dibutuhkan untuk menunjang aplikasinya di lingkungan.

BIOREMEDIATION OF OIL POLLUTED SOIL USING MICROBIAL CONSORTIUM

SUMMARY

Petroleum hydrocarbon has become one of the most common contaminant of large soil surface due to widespread use of petroleum product. It was a serious problem in environment. Bioremediation of oil contaminated soil using indigenous microbes was purposed as an alternative method to eliminate this pollutant. This research was aimed 1) to collect bacteria and yeast which capable of degrading petroleum hydrocarbon from different area of oil polluted soil; 2) to know the influence of microbial types, the concentration of microbial consortium, and time of incubation on oil bioremediation in soil; 3) to know the effect of nutrient types, biosurfactant, and mix of bioaugmentation, biostimulation and biosurfactant addition to ameliorate the bioremediation process. Potential microbes (bacteria and yeast) were collected from Wonocolo oil well – Bojonegoro and Pertamina oil storage - Surabaya. Microbial consortia were design by combination of potential microbial isolates with variation of types and concentration of inoculums. Organic nutrient (chicken droppings and cow manure) and inorganic nutrient (NPK) with different concentrations, and biosurfactant from *Pseudomonas dan Acinetobacter* were used. This research was conducted in laboratory scale using soil sample form oil contaminated area and soil mixture (garden soil and sand) by regulation of soil humidity. Collecting data were done each one week by monitoring the number of heterotrophic microbes (CFU/g), the number of hydrocarbonoclastic microbes (CFU/g), microbial domination of each treatment (microbial species), total hydrocarbons petroleum residue (%), and environmental parameters value such as soil temperature ($^{\circ}\text{C}$), soil humidity, pH, and C/N/P content in soil. Datas were analysed descriptively and statistically using Anova and continued by t-test. This research successfully obtained 13 bacteria and 3 yeast which capable of degrading hydrocarbons, such as *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus Flavobacterium*, *Candida dan Rhodotorulla*. Microbial types and time of incubations influence on bioremediation of crude oil in soil. Microbial types, inoculums concentrations, nutrient types, and concentration of tested nutrient (3,6,9 %) didn't give influence on oil bioremediation in soil that have contains sufficient indigenous hydrocarbonoclastic microbes. The types of biosurfactant influence on biodegradation of crude oil. Combination of bioaugmentation, biostimulation, and biosurfactant was effective to increase oil biodegradation in soil. Hydrocarbonoclastic microbial isolates from Wonocolo oil well and Pertamina oil storage - Surabaya are prospective to be used as microbial consortia for oil bioremediation effort. The future research focused on the effectiveness of this microbial consortium in *in situ* oil bioremediation was extremely needed for its application in environment.

PRAKATA

Segala puji bagi Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia, melalui dana DIPA Universitas Airlangga /APBN Rupiah Murni yang telah menerima proposal penelitian Strategis Nasional kami di tahun 2009 dan memberikan bantuan finansial sehingga penelitian ini dapat terselenggara dengan baik.

Dalam kesempatan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- 1) Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Prof. Dr. Bambang Sektiari, L., DEA., Drh yang telah memberikan kemudahan selama pelaksanaan penelitian ini
- 2) Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Drs. Salamun, M.Kes. yang telah memberikan semangat dan penyediaan fasilitas ruangan dan alat untuk terselenggaranya penelitian ini.
- 3) Ketua Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Dr. Alfiah Hayati, yang telah memberikan semangat, dan penyediaan fasilitas ruangan dan alat untuk terselenggaranya penelitian ini.
- 4) Staf pengajar Departemen Biologi F. Sains dan Teknologi Universitas Airlangga atas segala saran, masukan, dukungan semangat, bantuannya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.
- 5) Mahasiswa/wi Program Studi S1 dan S2 Biologi (mahasiswa/wi di laboratorium Mikrobiologi) atas segala bantuan waktu, tenaga, fikiran, dan semangatnya untuk bergabung dalam penelitian ini.
- 6) Karyawan di Departemen Biologi dan Departemen Kimia atas segala bantuan fisik dan dukungannya yang sangat menunjang kelancaran pelaksanaan penelitian ini.
- 7) Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang turut memberi bantuan baik waktu, tenaga, dan pikiran dalam pelaksanaan penelitian ini.

Semoga Allah membalas semua kebaikan amalan Bapak, Ibu dan adik-adik sekalian. Semoga hasil penelitian ini bisa bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di Indonesia dan dapat diaplikasikan nantinya bagi kepentingan masyarakat.

Tim Peneliti:

Dr. Ni'matuzahroh, Peneliti Utama
Drs. Agus Supriyanto, M.Kes., Peneliti
Drs. Moch. Affandi, M.Si., Peneliti
Fatimah, S.Si., M.Kes., Peneliti
Suwarni, Teknisi

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	1
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN	2
SUMMARY	3
PRAKATA	4
DAFTAR ISI.....	5
DAFTAR TABEL.....	7
DAFTAR GAMBAR.....	8
DAFTAR LAMPIRAN.....	10
BAB I PENDAHULUAN.....	11
1.1. Latar Belakang Permasalahan.....	11
1.2. Rumusan masalah	12
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	13
2.1. Minyak Bumi	13
2.2. Biodegradasi minyak	14
2.3. Bioremediasi	15
2.4. Persyaratan Berlangsungnya Bioremediasi	16
2.5. Bioaugmentasi.....	17
2.6. Biostimulasi.....	18
2.7. Penggunaan Hidrokarbon oleh Bakteri	18
2.8. Pengamatan dan Analisis Proses Biodegradasi Hidrokarbon	19
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE – 1	
3.1. Tujuan Khusus	21
3.2. Manfaat Penelitian	21
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	23
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.2. Bahan dan Alat	23
4.3. Prosedur Penelitian	23
4.3.1. Pengambilan sampel tanah	27
4.3.2. Isolasi mikroba potensial pendegradasi hidrokarbon dari tanah tercemar minyak	27

4.3.3	Identifikasi bakteri dan khamir.....	27
4.3.4	Skreening biodegradasi hidrokarbon polyaromatik oleh bakteri dan khamir hasil isolasi.....	28
4.3.5	Pembuatan konsorsium mikroba	28
4.3.6	Skreening Produksi biosurfaktan	28
4.3.7	Persiapan bahan nutrisi untuk uji biostimulasi	29
4.3.8	Persiapan tanah untuk perlakuan	29
4.3.9	Uji bioremediasi	30
4.3.10	Pengukuran parameter biodegradasi minyak	36
4.4.	Analisa Data.....	38
4.5.	Jadwal Waktu Pelaksanaan	39
4.6.	Luaran Penelitian	39
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		40
5.1.	Eksplorasi mikroba hidrokarbonoklastik.....	40
5.2	Uji potensi degradasi komponen hidrokarbon minyak oleh bakteri dan khamir hasil isolasi.....	41
5.3.	Uji pertumbuhan berbagai variasi konsorsium mikroba pada kultur cair dengan substrat minyak mentah dan solar.....	44
5.4.	Uji skrining produksi biosurfaktan isolate bakteri hidrokarbonoklastik....	46
5.5.	Uji bioremediasi minyak mentah di tanah dengan variasi jenis mikroba penyusun konsorsium dan konsentrasi inokulum mikroba yang diamati pada waktu inkubasi berbeda.....	48
5.6.	Uji bioremediasi minyak mentah dengan variasi jenis dan konsentrasi nutrisi yang diamati pada waktu inkubasi berbeda.....	51
5.7.	Uji bioremediasi minyak mentah dengan variasi jenis biosurfaktan yang diamati pada waktu inkubasi berbeda.....	53
5.8.	Uji bioremediasi minyak mentah dengan gabungan metode biostimulasi, bioaugmentasi dan penambahan biosurfaktan yang diamati pada waktu inkubasi berbeda.....	55
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		57
DAFTAR PUSTAKA		59
LAMPIRAN.....		61
B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH		73
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN		74

DAFTAR TABEL

No.	Judul Tabel	Halaman
4.1.	Perlakuan jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba	31
4.2.	Perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba dengan waktu inkubasi	31
4.3.	Perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi nutrient	34
4.5.	Jadwal dan waktu Pelaksanaan	39
5.1.	Keanekaragaman bakteri hidrokarbonoklastik (pendegradasi hidrokarbon) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak	40
5.2.	Keanekaragaman khamir hidrokarbonoklastik (pendegradasi hidrokarbon) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak	40
5.3.	Pengelompokkan isolat bakteri dan khamir berdasarkan kemampuan tumbuh pada minyak mentah dan solar sebagai satu-satunya sumber karbon.	41
5.4.	Uji degradasi hidrokarbon poliaromatik isolate bakteri dan khamir menggunakan metode sublimasi	42
5.5.	Bakteri dan khamir hidrokarbonoklastik potensial hasil isolasi dari tanah tercemar minyak yang terpilih sebagai penyusun konsorsium mikroba	43

DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
5.1.	Hasil penghitungan log jumlah sel mikroba pada uji pertumbuhan konsorsium mikroba pada substrat minyak mentah	44
5.2.	Hasil penghitungan log jumlah sel mikroba pada uji pertumbuhan konsorsium mikroba pada substrat solar	45
5.3.	Nilai tegangan permukaan supernatant kultur mikroba yang ditumbuhkan pada tiga jenis substrat berbeda solar, minyak goreng, dan molase	46
5.4.	Nilai aktivitas emulsifikasi supernatant kultur bakteri yang ditumbuhkan pada tiga jenis substrat berbeda solar, minyak kelapa sawit, dan molase	47
5.5.	Nilai aktivitas emulsifikasi supernatant kultur khamir yang ditumbuhkan pada tiga jenis substrat berbeda solar, minyak kelapa sawit, dan molase	47
5.6.	Grafik rata-rata $^{10}\log$ TPC bakteri dan khamir dengan perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba	48
5.7.	Grafik rata-rata TPH <i>crude oil</i> residu (g/g-tanah) dengan perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba	49
5.8.	Kurva pertumbuhan pada berbagai perlakuan selama 4 minggu	50
5.9.	Kadar <i>crude oil</i> residu pada berbagai perlakuan selama 4 minggu.....	50
5.10.	Gambar 4.10. Jumlah total bakteri dalam tanah tercemar minyak mentah dengan penambahan kombinasi jenis dan konsentrasi nutrisi selama waktu inkubasi 6 minggu.	52
5.11.	Kadar residu minyak mentah dalam tanah tercemar minyak mentah dengan penambahan kombinasi jenis dan konsentrasi nutrisi selama waktu inkubasi 6 minggu	52
5.12.	Persentase kadar minyak dengan perlakuan penambahan berbagai produk biosurfaktan. BA (<i>P. putida</i> pada molase), BB (<i>Acinetobacter sp.</i> pada molase) dan BC (<i>P. pseudomallei</i> minyak kelapa sawit) pada sampel tanah steril	54
5.13.	Persentase kadar minyak dengan perlakuan penambahan berbagai produk surfaktan. BA (<i>P. putida</i> pada molase), BB (<i>Acinetobacter sp.</i> pada molase) dan BC (<i>P. pseudomallei</i> minyak kelapa sawit) pada sampel tanah non steril.	54
5.14.	Gambar 5.14. Grafik Total Plate Count (TPC) mikroba heterotrofik (bakteri, yeast dan kapang) dan bakteri hidrokarbonoklastik (log waktu inkubasi 0,2,4 minggu) pada perlakuan tanah steril	55

- 5.15 Gambar 5.14. Grafik Total Plate Count (TPC) mikroba heterotrofik (bakteri, yeast dan kapang) dan bakteri hidrokarbonoklastik (log waktu inkubasi 0,2,4 minggu) pada perlakuan tanah non steril 56
- 5.16 Kadar minyak residu dalam berbagai perlakuan yang diamati dalam 0,2, dan 4 minggu inkubasi. 56

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul Lampiran	Halaman
1.	Lokasi penambangan minyak tradisional Ds. Wonocolo Kec. Kedewan, Bojonegoro	61
2.	Tanah yang digunakan sebagai substrat bioremediasi	62
3.	Isolat bakteri dan khamir hidrokarbonoklastik beserta suspensinya.	63
4.	Karakteristik morfologi koloni mikroba hasil isolasi dari tanah tercemar minyak.....	64
5.	Karakteristik morfologi dan fisiologis bakteri hidrokarbonoklastik (memberikan hasil positif pada uji degradasi hidrokarbon poliaromatik) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak di lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro dan Depo Pertamina Surabaya.	65
6.	Karakteristik morfologi dan fisiolog bakteri hidrokarbonoklastik (memberikan hasil negatif pada uji degradasi hidrokarbon poliaromatik) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak di lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro dan Depo Pertamina Surabaya.	66
7.	Hasil uji Karakteristik fisiolog yeast hidrokarbonoklastik hasil isolasi dari tanah tercemar minyak di lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro dan Depo Pertamina Surabaya.	67
8.	Hasil penghitungan jumlah total koloni mikroba pada uji pertumbuhan perbedaaan formula konsorsium pada kultur cair dengan substrat minyak mentah dan solar pada 0 dan 7 hari inkubasi.	68
9.	Dominansi mikroba selama uji pertumbuhan perbedaaan formula konsorsium pada kultur cair dengan substrat minyak mentah dan solar pada 0 dan 7 hari inkubasi.	69
10.	Hasil skreeing uji produksi biosurfaktan bakteri dan khamir pada substrat molase,minyak kelapa sawit dan solar.	70
11.	<i>Total Plate Count</i> (TPC) mikroba heterotrofik (bakteri, yeast, dan kapang) dan bakteri hidrokarbonoklastik (log cfu/ml) selama waktu inkubasi 0, 2 dan 4 minggu pada perlakuan tanah steril dan non steril	72

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Pemulihan lahan dari pencemaran merupakan salah satu cara untuk meningkatkan tersedianya lahan subur untuk tumbuhnya tanaman sehingga mengurangi terjadinya efek pemanasan global (*Global Warming*). Di Indonesia, pencemaran hidrokarbon minyak di tanah diperkirakan akan terus meningkat seiring dengan meningkatnya aktivitas pengeboran minyak dan penggunaan derivat-derivatnya. Bioremediasi tanah dari pencemaran hidrokarbon minyak merupakan upaya pemulihan lahan tercemar minyak menggunakan aktivitas mikroorganisme sehingga bersifat aman bagi lingkungan dan diharapkan dapat dilakukan dengan biaya yang murah.

Penelitian tentang bioremediasi minyak di lingkungan sudah mulai dikembangkan di Indonesia, akan tetapi banyak yang sebatas pada uji kemampuan mikroba dalam proses biodegradasi senyawa hidrokarbon. Penentuan formulasi konsorsium mikroba pengurai hidrokarbon minyak (mikroba hidrokarbonoklastik) dan pengembangan teknik bioremediasi tidak banyak dikerjakan. Berbagai formula paten mikroba untuk bioremediasi minyak mayoritas produk luar negeri dan ditawarkan dengan harga yang juga tidak murah. Aplikasi produk-produk tersebut untuk penanganan kasus pencemaran di Indonesia juga masih belum bisa menjamin keberhasilannya.

Teknik bioremediasi yang mengembangkan berbagai metode biostimulasi (pemberian unsur nutrisi di tanah) dan bioaugmentasi (inokulasi mikroba potensial) sering dikaji secara terpisah dan kurang memperhatikan faktor yang menjadi kendala kedua metode tersebut. Efektivitas bioremediasi minyak di tanah sangat bergantung pada banyak faktor yaitu karakteristik lahan yang tercemar, kadar dan jenis hidrokarbon pencemar, jenis dan kelimpahan mikroba indigenus baik yang berpotensi mengurai hidrokarbon maupun tidak, tersedianya kecukupan nutrisi untuk berlangsungnya metabolisme mikroba pengurai di tanah, serta faktor fisik, kimia dan biologi yang menjamin berlangsungnya interaksi antara substrat pencemar dan mikroba pengurai dan antar mikroba di tanah.

Diversitas jenis, kelimpahan mikroba potensial indigenus tanah maupun yang akan diinokulasikan dalam bentuk konsorsium, variasi nutrisi yang digunakan untuk meningkatkan metabolisme mikroba pengurai, dan peningkatan ketersediaan substrat minyak untuk metabolisme oleh mikroba sangat berpengaruh dalam keberhasilan bioremediasi minyak di

tanah. Oleh sebab itu penelitian tentang eksplorasi mikroba hidrokarbonoklastik indigenus yang berpotensi dalam biodegradasi berbagai senyawa hidrokarbon minyak untuk digunakan sebagai mikroba konsorsium, uji penambahan berbagai unsur nutrisi dan biosurfaktan dalam upaya bioremediasi minyak di tanah sangat dibutuhkan.

1.2. Rumusan Masalah

- 1) Bagaimanakah diversitas jenis mikroba tanah yang berpotensi dalam mendegradasi hidrokarbon minyak ?
- 2) Bagaimanakah efektivitas variasi konsorsium mikroba yang digunakan dalam metode bioaugmentasi terhadap bioremediasi minyak di tanah ?
- 3) Bagaimanakah efektivitas variasi nutrisi yang digunakan dalam metode biostimulasi terhadap bioremediasi minyak di tanah ?
- 4) Bagaimanakah efektivitas variasi jenis biosurfaktan terhadap bioremediasi minyak di tanah ?
- 5) Bagaimanakah efektivitas penggabungan antara variasi konsorsium mikroba, nutrisi, dan biosurfaktan terhadap bioremediasi minyak di tanah ?

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Minyak Bumi

Minyak bumi di kenal dengan sebutan petroleum. Petroleum berasal dari bahasa latin “*petra*” yang berarti batuan dan “*oleum*” yang berarti minyak. Minyak bumi adalah campuran senyawa yang sangat komplek yang sebagian besar terdiri atas hidrokarbon dan sebagian kecil sulfur, oksigen, dan nitrogen (Atlas, 1992). Minyak bumi merupakan suatu senyawa organik yang sebelum di olah bewarna kuning kehitaman, kental, berupa cairan yang mudah terbakar dan berada di bawah permukaan bumi. Minyak mentah ini diproses dengan sistem pemecahan (*cracking*) menjadi minyak tanah, bensin, minyak pelumas, parafin, dan sebagainya (Hatch dan Malar, 1981 *dalam* Nugroho, 2006). Perbedaan sifat dan struktur kimia minyak ditentukan oleh perbedaan jumlah hidrokarbon dalam minyak bumi (Schmidt, 1985). Menurut Hutagalung (1990) minyak bumi dapat dibagi dalam 3 (tiga) fraksi, yaitu:

1. Fraksi ringan, yang berbentuk gas dan mempunyai 1-5 atom C.
2. Fraksi cairan, yang mudah menguap dan mempunyai 6-14 atom C.
3. Fraksi berat, mempunyai lebih dari 14 atom C.

Minyak bumi didasarkan atas komposisi senyawa hidrokarbonnya dibagi dalam beberapa bentk, antara lain:

1. Parafin/alkana

Parafin menyusun komponen minyak kasar sebanyak 25%, diperoleh dari fraksi ringan titik didih rendah 40° - 230° C. Parafin terbagi lagi menjadi isoparafin (rantai karbon bercabang pada posisi nomor 2) dan parafin normal (rantai karbon lurus).

2. Sikloparafin/sikloalkana/naftene

Hidrokarbon dengan struktur cincin, mengisi sekitar 30-60% dari minyak bumi, bentuk sikloparafin yang sering digunakan adalah siklopentana dan sikloheksana.

3. Hidrokarbon aromatik

Hidrokarbon aromatik merupakan golongan khusus senyawa hidrokarbon siklik yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi. Hidrokarbon aromatik yang diperoleh dari titik didih tinggi disebut naften aromatik/siklo-alkano-aromatik, yang mempunyai struktur gabungan sikloparafin dan aromatik (Gandjar, 1989).

2.2. Biodegradasi Minyak

Biodegradasi adalah terjadinya perubahan senyawa kimia kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana melalui bantuan mikroorganisme (Wignyanto, 1997 dalam Cholia, 2002). Biodegradasi senyawa hidrokarbon di alam terutama dilakukan oleh bakteri dan fungi (Baker and Herson, 1994). Komponen hidrokarbon memiliki perbedaan dalam kemudahan degradasi oleh mikroba pendegradasi. Hidrokarbon dapat didegradasi dengan kecepatan yang berbeda tergantung pada jenis dan komponen penyusun hidrokarbon. Urutan kecepatan degradasi hidrokarbon mulai dari normal alkana, alkana bercabang, molekul aromatik berberat molekul rendah, dan alkana siklik (Leahy and Colwell, 1990). Beberapa golongan mikroba menguraikan hidrokarbon dengan jalur oksidasi yang mengubah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Perbedaan antara biodegradasi bahan bakar pada tanah dan ekosistem akuatik berhubungan dengan pergerakan, distribusi minyak, dan kehadiran partikel yang mempengaruhi sifat fisik dan kimia minyak serta meningkatkan kemudahan biodegradasi oleh mikroba (Leahy and Colwell, 1990).

Menurut Leahy and Colwell (1990), biodegradasi senyawa hidrokarbon dipengaruhi oleh beberapa faktor fisika dan kimia antara lain, komposisi minyak atau hidrokarbon, bentuk fisik minyak atau hidrokarbon, konsentrasi minyak atau hidrokarbon, temperatur, oksigen, nutrien, salinitas, aktivitas air dan pH. Faktor biologis yang mempengaruhi biodegradasi antara lain, degradasi hidrokarbon oleh bakteri, fungi, atau mikroorganisme lain, efek adaptasi terhadap senyawa hidrokarbon, adaptasi dengan perubahan komposisi genetik komunitas mikroba, peranan plasmid dalam adaptasi, dan inokulasi.

3. Bioremediasi

Bioremediasi adalah suatu cara untuk menurunkan substansi berbahaya menjadi kurang toksik atau menjadi tidak toksik atau mengubahnya pada level aman bagi lingkungan dengan bantuan organisme hidup (mikroorganisme, tumbuhan dan hewan). (Gordon, 1994). Bioremediasi merupakan salah satu metode untuk mengaplikasikan prinsip-prinsip biologi untuk menghilangkan bahan-bahan kimia berbahaya dari air tanah, tanah, dan lumpur (Bookson Jr, 1995 dalam Nugroho, 2006). Bioremediasi pencemaran hidrokarbon di lingkungan dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain dengan menginokulasikan bakteri yang dapat mendegradasi senyawa pencemar (*bioseeding/bioaugmentation*); meningkatkan kemampuan biodegradasi bakteri indigenus dengan perbaikan faktor-faktor yang menghambat pertumbuhannya, misalnya penambahan nutrisi

(*bioenrichment/biostimulation*), perbaikan aerasi (*bioventing*); dan meningkatkan ketersediaan substrat bagi mikroorganisme (*bioavailability*) dengan pemberian surfaktan atau biosurfaktan (Korda *et al.*, 1997). Penambahan biosurfaktan dalam teknik bioremediasi dapat mempercepat laju biodegradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme dengan jalan peningkatan kontak permukaan antara fase hidrokarbon dan air melalui emulsifikasi atau solubilisasi (Deziel *et al.*, 1996 dalam Ni'matuzahroh, 2008).

2.4. Persyaratan Berlangsungnya Bioremediasi

Gordon (1994) menyebutkan ada tiga faktor yang mempengaruhi bioremediasi, yaitu mikroba, nutrisi dan faktor lingkungan. Ketiga faktor tersebut diuraikan sebagai berikut:

a. Nutrisi

Mikroba sangat bergantung pada nutrisi untuk bertahan hidup. Mampu atau tidaknya mikroba bertahan hidup akan terlihat dari kecukupan nutriennya. Nutrien-nutrien merupakan pendukung untuk hidup, berkembang biak dan menghasilkan enzim-enzim untuk mendegradasi hidrokarbon. Nutrien yang dibutuhkan oleh mikroba bervariasi menurut jenis mikrobanya, namun seluruh mikroba memerlukan nitrogen, fosfor dan karbon.

Selain itu, ada beberapa mineral-mineral lain yang dibutuhkan dalam jumlah kecil seperti potasium, mangan, kalsium, besi, tembaga, kobalt, dan seng. Senyawa-senyawa tersebut biasanya berbentuk garam-garam inorganik dan biasanya sudah terdapat dalam jumlah yang cukup di lingkungan baik tanah maupun air sehingga tidak memerlukan perhatian khusus pada proses bioremediasi.

Karbon merupakan elemen dasar untuk seluruh bentuk kehidupan dan karbon dibutuhkan dalam jumlah yang lebih besar dari pada elemen-elemen lain. Pada struktur molekul minyak bumi, terdapat sejumlah karbon yang dapat didekomposisi mikroba. Kandungan bahan organik karbon berkurang karena digunakan sebagai sumber energi mikroba, dimana rantai karbon menghasilkan energi yang tinggi.

Nitrogen ditemukan pada protein, enzim, komponen dinding sel dan asam nukleat dari mikroba. Metabolisme mikroba tidak akan terjadi tanpa nitrogen (Wistreich dan Lechtman, 1988 dalam Nugroho, 2006).

a. Kondisi Lingkungan

Menurut Nugroho (2006) Selain membutuhkan nutrisi, mikroba membutuhkan kondisi lingkungan tertentu untuk hidup, karena pertumbuhan mikroba dan aktivitas enzim dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan yang akhirnya mempengaruhi laju degradasi. Beberapa diantaranya adalah :

a. Oksigen

Biodegradasi didominasi oleh proses oksidasi. Enzim-enzim bakteri akan mengkataliskan pemasukan oksigen kedalam hidrokarbon sehingga molekul dapat dikonsumsi untuk metabolisme sel. Karena itu, oksigen adalah kebutuhan terpenting dalam proses biodegradasi minyak bumi.

b. pH

Untuk mendukung pertumbuhan mikroba, pH tanah harus berada antara 6-8, dengan pH optimal 7. Nilai pH tanah asam dapat dinaikkan dengan penambahan kapur dan pH tanah basa dapat diturunkan dengan penambahan sulfur.

c. Temperatur

Temperatur merupakan faktor yang penting dalam biodegradasi walaupun degradasi hidrokarbon terjadi pada rentang temperatur yang cukup besar. Temperatur menjadi penting karena pada temperatur rendah, pergerakan molekul cenderung lambat dan molekul-molekul yang menyatu cenderung tidak ikut bereaksi. Peningkatan temperatur akan meningkatkan kemungkinan terjadinya reaksi dan meningkatkan laju difusi. Laju reaksi enzimatik secara umum dapat meningkat setiap kenaikan 10°C temperatur selama enzim tidak berubah sifatnya. Semakin tinggi reaksi enzimatik maka semakin cepat proses biodegradasinya.

d. Kelembaban

Air diperlukan oleh mikroba karena air merupakan penyusun terbesar sitoplasma sel. Selain itu air juga penting karena kebanyakan reaksi enzim terjadi pada fasa larutan. Air juga diperlukan untuk transpor masuk dan keluar sel (Atlas and Bartha, 1985). Air bukan merupakan faktor pembatas dalam bioremediasi minyak bumi dilaut namun merupakan faktor yang harus dikontrol untuk bioremediasi minyak bumi pada tanah. Mikroba tanah memerlukan kelembaban yang cukup untuk dapat tumbuh. Secara umum, tanah harus lembab, namun tidak basah. Kelembaban tanah ideal yang diperlukan adalah antara 20% - 80%. Secara berkala, kelembaban harus ditambahkan ke dalam tanah karena tanah akan menjadi kering karena evaporasi, yang meningkat selama operasi aerasi.

e. Tekstur Tanah

Tekstur tanah mempengaruhi permeabilitas, kelembaban dan kepadatan dari tanah. Untuk meyakinkan bahwa penambahan oksigen, distribusi nutrien, dan kelembaban tanah dapat berlangsung dalam rentang tepat, maka tekstur tanah harus diperhatikan. Misalnya, tanah lempung sangat sulit diareasi dan mengakibatkan rendahnya oksigen. Selain itu, kesulitan

juga terjadi untuk mendistribusikan nutrisi secara seragam dan menahan air untuk masuk ke dalam tanah (presipitasi).

c. Mikroba

Venosa 2002 dalam Nugroho, 2006 menyatakan bahwa ada 2 pendekatan utama dalam pemanfaatan mikroba sebagai salah satu syarat berlangsungnya bioremediasi minyak bumi, yaitu **bioaugmentasi** (penambahan mikroba pendegradasi minyak bumi untuk membantu proses degradasi) dan **biostimulasi** (penambahan nutrisi untuk menstimulasi pertumbuhan mikroba *indigenous*). Biostimulasi dilakukan karena proses biodegradasi hidrokarbon hanya dapat terpenuhi bila seluruh kebutuhan dasar mikroba terpenuhi.

Mikroba yang dapat menggunakan hidrokarbon sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi dikenal dengan mikroba hidrokarbonoklastik. Distribusi mikroba hidrokarbonoklastik tersebar luas baik di daratan, lautan maupun estuari serta pada seluruh kondisi iklim dari tropik sampai kutub (Atlas, 1992). Mikroba tersebut biasanya berjumlah kurang dari 1% dari populasi alami mikroba, tetapi dapat berjumlah lebih dari 10% pada ekosistem tercemar minyak bumi (US Congress, 1991 dalam Nugroho, 2006). Mikroba tersebut sebagian besar adalah bakteri, sedangkan ragi (fungi uniseluler) dan kapang (fungi berfilamen) juga diketahui dapat tumbuh pada substrat hidrokarbon.

Beberapa genus bakteri potensial pendegradasi hidrokarbon minyak antara lain : a) kelompok bakteri aerob yaitu *Acromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomycete*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Methylobacter*, *Methylobacterium*, *Methylococcus*, *Methylocystis*, *Methylomonas*, *Micromonospora*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, dan b) bakteri anaerob yaitu *Methanobacterium*, *Microspora*, *Desulfovibrio* dan *Spirillum*

Dari kelompok khamir (ragi) yang dapat mendegradasi hidrokarbon antara lain adalah: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Rhodotorul*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*. Sedangkan dari kelompok kapang (jamur berfilamen) yang mampu mendegradasi hidrokarbon yaitu *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Paecilomyces*, dan *Penicillium*

2.5. Bioaugmentasi

Bioaugmentasi adalah pemberian mikroba ke lingkungan tercemar. Mikroba dapat berasal dari lokasi terdapatnya pencemaran (*indigenous*), masukan dari luar lokasi yang tercemar (*non indigenous*), mikroba hasil rekayasa genetika yang telah berhasil dikultur dan

diadaptasikan pada substrat pencemar tertentu. Metode ini merupakan satu dari teknik bioremediasi yang paling efektif dan umumnya diterapkan di lingkungan perairan dan tanah (Atlas and Bartha, 1998).

Keberhasilan aplikasi metode bioaugmentasi bergantung pada karakteristik lingkungan dan berbagai faktor biotik dan abiotik di lingkungan yang tercemar tersebut. Tujuan dari bioaugmentasi adalah untuk mengatasi ketiadaan/kekurangan mikroba potensial limbah pada lokasi tercemar dengan jalan mensuplai dan meningkatkan jumlah mikroba potensial pendegradasi (Ni'matuzahroh, 2008).

2.6. Biostimulasi

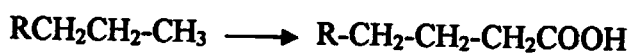
Biostimulasi adalah penambahan nutrisi untuk menstimulasikan pertumbuhan mikroba *indigenous* (Venosa and Zhu, 2003). Menurut Alexander (1999) dan Korda *et al.* (1997) biostimulasi merupakan penambahan nutrisi – nutrisi, seperti nitrogen dan fosfor untuk menstimulasi mikroorganisme dalam tanah. Biostimulasi umumnya dilakukan dengan menambahkan air dan nutrisi (sumber nitrogen, fosfor, dan mikroelemen). Jenis sumber nutrisi, perbandingan komposisi antar karbon, nitrogen, dan fosfor (C/N/P) telah menjadi kajian yang terus menerus dilakukan.

2.7. Penggunaan Hidrokarbon oleh Bakteri

Hidrokarbon oleh bakteri digunakan sebagai sumber karbon dan sumber energi. Bakteri menguraikan hidrokarbon dengan jalan mengubahnya menjadi senyawa yang lebih sederhana (Manahan, 1983). Metabolisme mikroba dari masing-masing hidrokarbon berbeda antara hidrokarbon alifatik, hidrokarbon alisiklik dan hidrokarbon aromatik.

1. Oksidasi alkana

a. Perubahan CH₃ terminal menjadi COOH



b. Oksidasi atom karbon pada posisi β



c. Oksidasi atom C pada posisi terulang lagi, juga menghasilkan CO₂ + H₂O dan asam. Sehingga pada saat setiap satu seri oksidasi ada dua macam atom C yang hilang.

2. Degradasi Hidrokarbon aromatik

Banyak senyawa ini digunakan sebagai donor elektron secara aerobik oleh mikroorganisme seperti bakteri dari genus *Pseudomonas*. Metabolisme senyawa ini oleh bakteri diawali dengan pembentukan Protocatechuate atau catechol atau senyawa yang secara

struktur berhubungan dengan senyawa ini. Kedua senyawa ini selanjutnya didegradasi menjadi senyawa yang dapat masuk ke dalam siklus Krebs (siklus asam sitrat), yaitu suksinat, asetil KoA, dan piruvat (Hadi, 2008).

2.8. Pengamatan dan Analisis Proses Biodegradasi Hidrokarbon

Proses biodegradasi hidrokarbon minyak bumi bisa diamati baik secara langsung (pengamatan visual) maupun tidak langsung dengan menggunakan beberapa parameter di laboratorium. Adapun pengamatan dan analisis terhadap proses biodegradasi tersebut adalah :

a. *Perhitungan jumlah mikroorganisme*

Cara perhitungan jumlah mikroorganisme merupakan cara yang lazim dilakukan di laboratorium. Perhitungan jumlah mikroorganisme merupakan indikator terjadinya proses biodegradasi minyak bumi. Jumlah mikroorganisme akan meningkat bila ia mampu hidup dengan memanfaatkan substrat yang ada dalam senyawa hidrokarbon tersebut. Menurut Munawar, *et al.* (2007) dalam penelitiannya mikroba tanah yang digunakan dalam proses bioremediasi menunjukkan bahwa jumlah total bakteri baik perlakuan dibalik maupun tidak dibalik meningkat sampai usia 4 minggu dan menurun pada usia 6 minggu.

b. *Pengukuran jumlah biomassa mikroorganisme*

Penentuan biomassa mikroorganisme merupakan bagian penting dalam kesatuan biologi makhluk hidup dan telah banyak diteliti (Atlas dan Bartha, 1985). Zat-zat organik sebagai nutrisi akan diambil dan dimanfaatkan oleh bakteri melalui pembelahan pembesaran sel-selnya. Namun, peningkatan jumlah sel tidak selalu disertai dengan peningkatan biomassa (Pelczar dan Chan, 1988).

Penurunan konsentrasi minyak bumi

Analisis penurunan konsentrasi minyak bumi dilakukan sebagai analisis penurunan total konsentrasi minyak hasil proses biodegradasi. Sejalan dengan berlangsungnya proses biodegradasi maka reaksi pemutusan rantai karbon akan berjalan. Reaksi ini secara kuantitatif ditandai dengan semakin berkurangnya senyawa minyak bumi didalamnya. Telah terjadi penurunan jumlah minyak mentah sebesar 88,25% oleh bakteri indigenous tanah di daerah pantai pada waktu inkubasi 6 minggu pada perlakuan dibalik (Munawar *et. al.*, 2007).

Mikroba penambat nitrogen

Sumber utama N berasal dari gas N_2 dari atmosfer. Kadar gas nitrogen di atmosfer ini sekitar 79% dari volumenya. Walaupun jumlahnya sangat besar tetapi belum dapat

dimanfaatkan oleh tanaman tingkat tinggi, kecuali telah menjadi bentuk yang tersedia (Yuwono, 2006). Untuk dapat memanfaatkan komponen tersebut harus melalui proses biologis yang dikenal dengan fiksasi nitrogen baik simbiotik maupun non simbiotik

Fiksasi nitrogen melalui mikroba simbiotik salah satunya dengan bakteri. Bakteri ini mempunyai kemampuan sebagai penyedia hara bagi tanaman. Peran bakteri ini terhadap tanaman khususnya berkaitan dengan masalah ketersediaan nitrogen bagi tanaman inangnya (Yuwono, 2006).

Fiksasi nitrogen melalui mikroba non simbiotik dapat terjadi oleh bakteri yang hidup bebas di daerah perakaran. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini tidak akan menyebabkan perubahan morfologi perakaran, meningkatkan jumlah akar rambut, menyebabkan percabangan akar lebih berperan dalam penyerapan hara. Bakteri ini meningkatkan efisiensi penyerapan nitrogen dan menurunkan kehilangan akibat pencucian, denitrifikasi, atau bentuk kehilangan nitrogen lain. Bakteri ini mempunyai beberapa pengaruh positif terhadap pertumbuhan tanaman diantaranya mempengaruhi perkecambahan benih, dan memperbaiki pertumbuhan tanaman (Rahmawati, 2005). Contoh bakteri penambat nitrogen yaitu *Azospirillum Lipoverum*, *Azotobacter Beijerinckii*, *Rhodospirillum sp.* yang fotosintetis, *Clostridium* yang merupakan jasad bersifat anerob, *Beijerinckia* yang aerob, *Actinomycetes*, *Azotobacter paspal*, *Azotobacter rhodospirillum* dan *Klebsella* (Yuwono, 2006).

Kemampuan maksimum penambatan nitrogen oleh jasad ini berkisar 20 sampai 40 kg per hektar N per tahun (Yuwono, 2006).

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Khusus

- 1) Mengeksplorasi mikroba indigenus potensial pengurai hidrokarbon minyak di tanah dan membuat formulasi konsorsium mikroba untuk dijadikan produk mikroba untuk penanggulangan pencemaran minyak
- 2) Mengetahui efektivitas variasi konsorsium mikroba dalam bioremediasi minyak di tanah
- 3) Mengetahui efektivitas variasi nutrisi yang digunakan dalam metode biostimulasi terhadap bioremediasi minyak di tanah.
- 4) Mengetahui efektivitas variasi jenis biosurfaktan terhadap bioremediasi minyak di tanah.
- 5) Mengetahui efektivitas penggabungan antara konsorsium mikroba, nutrisi, dan biosurfaktan terhadap bioremediasi minyak di tanah.

3.2. Manfaat Penelitian

Penelitian ini akan menghasilkan formula konsorsium mikroba potensial yang merupakan gabungan mikroba indigenus dan eksogenus yang sengaja ditambahkan untuk meningkatkan efisiensi biodegradasi minyak di tanah dan informasi tentang efektifitas metode bioaugmentasi, biostimulasi dan gabungan kedua metode dalam bioremediasi minyak di tanah.

Penelitian ini sangat dibutuhkan untuk :

- 1) Pemulihan lahan-lahan yang tercemar minyak untuk menjadi lahan yang produktif bagi pertanian. Keberadaan mikroba hidrokarbonoklastik dan fiksasi nitrogen non simbiotik yang dirancang dalam konsorsium mikroba diharapkan dapat mereduksi cemaran minyak dan membantu memulihkan kesuburan tanah.
- 2) Mengurangi dampak dari pencemaran minyak pada ketersediaan air tanah yang sangat vital bagi kehidupan manusia. Air tanah menjadi terbebas dari rembesan atau intrusi minyak sehingga tidak berbahaya untuk digunakan oleh masyarakat di sekitar kawasan lahan yang tercemar.
- 3) Menyediakan paket teknologi untuk pengolahan limbah minyak hasil industri dan rumah tangga yang belum ada penanganannya hingga saat ini. Formulasi konsorsium mikroba dan formulasi nutrisi yang dihasilkan dalam penelitian ini akan membantu

penanganan limbah minyak baik hasil aktivitas industri maupun rumah tangga / domestik.

- 4) Membuat produk mikroba hasil eksplorasi dari Indonesia yang dapat dikomersialkan dan berpeluang untuk diajukan patent. Produk tersebut diharapkan dapat bersaing dengan produk luar baik dari aktivitas maupun harga jualnya. Produk mikroba pengurai minyak ini juga sudah sangat ditunggu oleh pemerintah kota Surabaya dalam rangka sosialisasi penanganan limbah minyak rumah tangga.

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya.

Waktu

Penelitian dilaksanakan selama 9 bulan.

4.2. Bahan dan Alat

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah : sampel tanah, bahan untuk pembuatan media cair selektif hidrokarbon (NaCl, NaNO₃, CaCl₂, MgSO₄.7H₂O, KCl, FeSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, MnSO₄.H₂O, NaMoO₄.2H₂O, H₃BO₃, CoCl₂.6H₂O, K₂HPO₄, H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, BaSO₄, NaOH, HCl), substrat hidrokarbon (alifatik, aromatik), media pertumbuhan mikroba (*Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Potato Dekstrosa Agar* (PDA), *Saboroud Dekstrosa Agar* (SDA), antibiotik (chloramphenicol, rose bengal), pelarut hidrokarbon untuk ekstraksi produk biosurfaktan, hidrokarbon uji untuk aktivitas biosurfaktan(kerosen dan solar).

Alat

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah : alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium mikrobiologi (tabung rekasi, cawan petri, gelas Beaker, labu Erlenmeyer, gelas ukur), neraca analitik (Shimadzu AEL-200), pH meter, autoklaf (Ogawa Jeiki), vortex, pH meter, higrometer, shaker inkubator, spektrofotometer (spectronic 20 Bausch-Lomb), evaporator, tensiometer du-Noüy, dan *freeze dryer*.

4.3. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian secara garis besar disajikan dalam bentuk bagan alir yang disajikan pada awal tahapan prosedur penelitian ini. Sedangkan paparan penjelasan diuraikan kemudian.

Skema Metode Pelaksanaan Penelitian

Pengambilan sampel tanah dari lahan tercemar minyak



Isolasi dan skrining mikroba potensial hidrokarbonoklastik



Persiapan tanah untuk kultur bakteri



Pembuatan kultur uji bioremediasi dengan variasi jenis mikroba, konsentrasi inokulum, penambahan nutri, biosurfaktan dan waktu lama waktu inkubasi



Pengadukan dan penyemprotan air



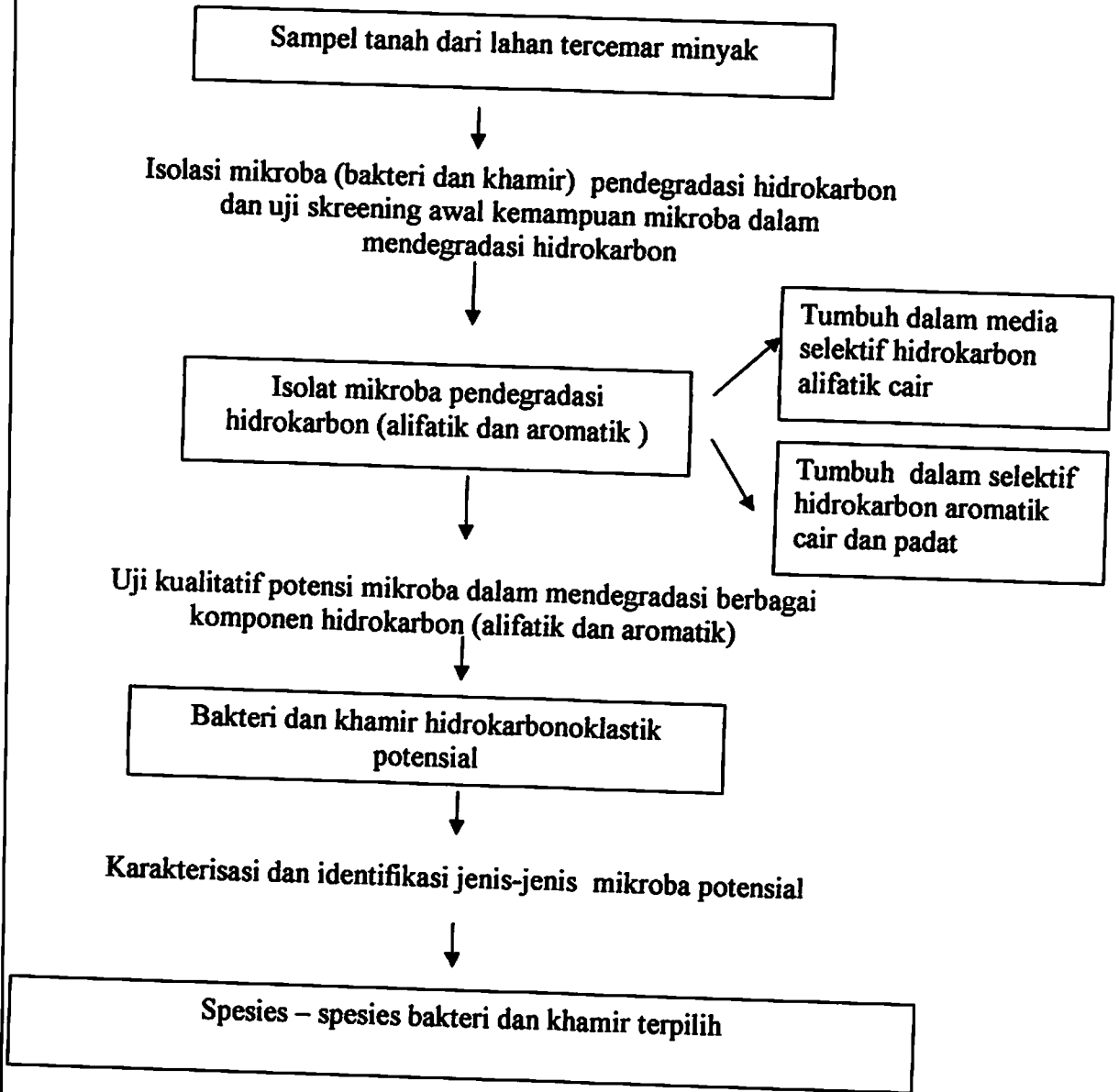
Penghitungan jumlah sel mikroba (bakteri dan khamir)



Penghitungan TPH

Bagan Alir Penelitian

Tahap I : Isolasi mikroba potensial pendegradasi hidrokarbon dari tanah tercemar minyak sebagai bahan penyusun konsorsium mikroba



Keluaran :

- Didapatkan isolat-isolat mikroba dari kelompok bakteri dan khamir pengurai hidrokarbon

Indikator :

- Pertumbuhan bakteri dan khamir pada media selektif hidrokarbon cair dan padat

Tahap II Uji bioremediasi tanah tercemar minyak menggunakan konsorsium mikroba dengan berbagai perlakuan untuk mengoptimalkan upaya bioremediasi

Berbagai variasi konsorsium mikroba potensial



Uji pengaruh penambahan berbagai kombinasi jenis dan konsentrasi inokulum terhadap bioremediasi tanah tercemar minyak dengan waktu inkubasi berbeda



Konsorsium mikroba terbaik dalam bioremediasi



Optimalisasi bioaugmentasi menggunakan konsorsium mikroba terbaik dengan penambahan variasi biosurfaktan dan nutrisi dalam bioremediasi tanah tercemar minyak

Variasi jenis biosurfaktan
(*P. putida*, *Acinetobacter sp.* dan
P. pseudomallei)

Variasi jenis nutrisi organik (pupuk kotoran ayam, pupuk kandang sapi) dan anorganik (pupuk NPK) dengan konsentrasi berbeda (0, 3, 6, 9 % g/g)

Uji bioremediasi tanah tercemar minyak dengan berbagai perlakuan



Formula terbaik kombinasi antara konsorsium mikroba, nutrisi dan biosurfaktan dalam bioremediasi tanah tercemar minyak

Uji bioremediasi tanah tercemar minyak dengan formula terbaik pada variasi waktu



Data efektivitas formula konsorsium mikroba dalam bioremediasi



Keluaran :

1. Diketahui formula konsorsium mikroba terbaik untuk bioremediasi minyak
2. Diketahui kombinasi konsorsium, nutrisi dan biosurfaktan terbaik untuk mengoptimalkan proses bioremediasi

Indikator :

1. Jumlah mikroba (bakteri dan fungi heterotrof)
2. Jumlah mikroba (bakteri dan fungi) hidrokarbonoklastik
3. Dominansi mikroba tanah
4. Penurunan kadar minyak di tanah
5. Faktor lingkungan tanah (suhu, pH, kelembapan) dan C/N/P tanah

4.3.1. Pengambilan sampel tanah

Sampel tanah diambil dari tanah yang tercemar hidrokarbon minyak (tempat penampungan minyak di Tanjung Perak, Surabaya dan pengeboran minyak rakyat di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedewan, Kabupaten Bojonegoro) dan tanah yang bebas dari pencemaran hidrokarbon. Lapisan tanah yang diambil adalah lapisan 0 -15 cm dari permukaan tanah. Sampel tanah dimasukkan dalam kontainer bersuhu 4°C dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis karakteristik fisik, kimia dan mikrobiologinya.

4.3.2. Isolasi mikroba potensial pendegradasi hidrokarbon dari tanah tercemar minyak

100 gram sampel tanah tercemar minyak dihomogenkan dan disuspensikan dalam 900 air fisiologis steril. Suspensi mikroba diendapkan. Supernatan yang mengandung mikroba ditumbuhkan pada media mineral cair dan padat yang mengandung senyawa hidrokarbon alifatik dan aromatik dalam bentuk campuran yaitu solar dan *crude oil*. Kultur cair di-shaker dengan 150 rpm. Kultur padat dan cair diinkubasi pada suhu kamar (28°C) selama 1-2 minggu. Mikroba hasil skrining pada substrat *crude oil* dan *solar* ditumbuhkan dalam berbagai media pertumbuhan untuk mengisolasi bakteri dan khamir hidrokarbonoklastik. Kenekaragaman jenis koloni mikroba yang tumbuh pada masing-masing kultur dicatat untuk diketahui jenis mikroba dominan yang tumbuh pada masing-masing substrat uji. Koloni mikroba dimurnikan untuk mendapatkan isolat tunggal dan kemudian dibuat stok mikroba pada medium padat *Nutrien Agar* untuk bakteri dan *Sabouroud Dextrosa Agar* untuk khamir.

4.3.3. Identifikasi bakteri dan khamir

Isolat tunggal bakteri dan khamir diidentifikasi untuk mengetahui jenisnya melalui pengamatan karakteristik makroskopis koloni, mikroskopis bentuk sel mikroba dengan pengecatan Gram (bakteri) dan karakteristik fisiologis. Uji fisiologi pada bakteri dilakukan dengan melakukan uji oksidase, motilitas dan serangkaian uji biokimiawi menggunakan *Microbact 2000 Gram Negative Bacilli*. Sedangkan uji identifikasi khamir menggunakan program *VITEK 2 System Version: 03.01* (BioMerieux) yang dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya.

4.3.4. Skreening biodegradasi hidrokarbon poliaromatik oleh bakteri dan khamir hasil isolasi

Isolat tunggal bakteri dan khamir juga diuji kemampuannya dalam mendegradasi hidrokarbon poliaromatik menggunakan metode sublimasi (Alley and Brown, 2000). Hidrokarbon poliaromatik yang diujikan terdiri dari 5 jenis yaitu Phenantren (Phn), Phenotiazine (Ptz), Dibenzotiopen (Dbz), Fluoren, (Fln), and Pyren (Pyr). Prinsip dari metode ini pembentukan lapisan tipis dari senyawa hidrokarbon poliaromatik (dengan cara sublimasi) pada permukaan agar yang telah diinokulasi oleh mikroba uji. Biakan diinkubasi selama 1 minggu. Adanya zona terang disekitar koloni membuktikan bahwa isolat mikroba berpotensi dalam mendegradasi komponen hidrokarbon aromatik yang diujikan. Data kemampuan masing-masing jenis mikroba hidrokarbonoklastik yang dapat diisolasi dijadikan landasan penentuan penyusunan formula dalam konsorsium mikroba yang dibuat.

4.3.5. Pembuatan konsorsium mikroba

Konsorsium mikroba potensial dibuat dengan menggabungkan suspensi bakteri hidrokarbonoklastik (BH), bakteri fiksasi nitrogen non simbiotik (BFN) dan fungi hidrokarbonoklastik (FH) hasil isolasi. Bakteri hidrokarbonoklastik dan fiksasi nitrogen ditumbuhkan pada media *Nutrien Broth* (NB), sedangkan fungi (khamir) ditumbuhkan pada media *Saboroud Dextrose Broth* (SDB). Kultur mikroba uji diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan fase eksponensial. Masing-masing jenis mikroba diatur sampai kekeruhan (*Optical Density / OD*) 0,5 yang diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 610 nm.

Konsorsium dibuat dengan melakukan variasi jenis (bakteri, bakteri + fungi, bakteri + bakteri fiksasi nitrogen non simbiotik) dengan perbandingan konsentrasi mikroba (0, 20, 40) % volume /100 gram tanah.

3.6. Skreening produksi biosurfaktan

Uji penapisan produksi biosurfaktan dilakukan pada isolat bakteri dan khamir hasil isolasi dengan menggunakan tiga jenis substrat yaitu molase, solar dan minyak goreng. Pemilihan substrat pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui spesifikasi jenis biosurfaktan yang dihasilkan dan pertimbangan biaya produksi. Media uji produksi biosurfaktan terdiri dari 500 ml air mineral sintetik (modifikasi), substrat produksi (3% v/v) dan suspensi mikroba uji (3 % (v/v)) dengan nilai absorbansi 0,5 yang diukur pada panjang gelombang 600

nm. Kultur diinkubasi selama 7 hari, pada shaker dengan agitasi 150 rpm pada suhu 30 °C. Setelah 7 hari inkubasi, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm, 25 menit pada suhu 4°C. Adanya biosurfaktan yang dihasilkan oleh isolat mikroba uji diindikasikan melalui pengukuran tegangan supernatan kultur menggunakan tensiometer du Nouy dan mengukur aktivitas emulsifikasi supernatan kultur menggunakan empat jenis minyak uji yaitu : crude oil, minyak goreng, solar dan minyak tanah. Aktivitas emulsifikasi dilakukan dengan mengambil 2 ml supernatant dan ditambahkan dengan 2 ml minyak uji. Campuran difortek selama 2 menit dan diendapkan. Fase emulsi yang terbentuk diukur dan dimasukkan dalam rumus untuk menghitung persentasi emulsi yang terbentuk. Kestabilan emulsi diamati dalam kurun waktu 1 dan 24 jam dan dinyatakan dengan nilai AE (1jam) dan AE(24 jam). Biakan yang menunjukkan produksi terbaik dalam menghasilkan biosurfaktan dipilih untuk digunakan dalam uji bioremediasi dengan penambahan biosurfaktan.

4.3.7. Persiapan bahan nutrisi untuk uji biostimulasi

Nutrisi yang digunakan dalam penelitian berfungsi untuk menambah unsur nitrogen, fosfor dan kalium. Sumber nutrisi dipilih dari bahan organik berupa pupuk kotoran ayam, pupuk kotoran sapi, dan dari anorganik berupa pupuk NPK. Konsentrasi untuk pupuk organik yang diujikan adalah 30, 60 dan 90 gram per 100 gram tanah tercemar minyak, sedangkan untuk pupuk anorganik digunakan adalah sampai dosis yang tidak meracuni tanah.

4.3.8. Persiapan tanah untuk perlakuan

Sampel tanah yang digunakan dalam penelitian diambil dari dua lokasi berbeda yaitu: 1) tanah dari sekitar lokasi pengeboran minyak di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedewan, Kabupaten Bojonegoro dan tanah subur yang dibeli dari Pasar Bunga Kayoon Surabaya. Perbedaan lokasi pengambilan tanah dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh keanekaragaman jenis mikroba indigenus dalam uji bioremediasi limbah minyak.

Tanah yang akan dilakukan uji bioremediasi diperlakukan dengan dua cara yaitu 1) tanah dikeringkan pada suhu 80°C dengan oven (dilakukan untuk menghilangkan bakteri indigenus dari tanah); 2) tanah yang tidak dikeringkan (sesuai dengan kondisi di alam dan diharapkan mempertahankan keberadaan mikroba indigenus tanah). Tanah-tanah yang sudah steril dan tidak steril dimasukkan masing-masing 10 gram ke dalam botol – botol steril bermulut lebar sebanyak perlakuan yang akan dikerjakan. 0,4 gr *crude oil* dimasukkan ke dalam masing-masing 10 gram dari sampel tanah steril dan tidak steril, diaduk sampai homogen dan minyak dibiarkan meresap ke dalam tanah selama 30 menit.

4.3.9. Uji bioremediasi

Pada penelitian ini, uji bioremediasi dilakukan berbagai tujuan, yaitu : 1) menguji efektivitas variasi jenis mikroba penyusun konsorsium dan konsentrasi inokulum terhadap bioremediasi limbah minyak yang dilakukan dalam media cair dan pada tanah; 2) mengetahui pengaruh penambahan bakteri fiksasi nitrogen terhadap peningkatan bioremediasi limbah minyak; 3) mengetahui pengaruh penambahan nutrisi yang diberikan dengan variasi jenis dan konsentrasi nutrisi terhadap bioremediasi limbah minyak yang telah ditambahkan konsorsium mikroba (gabungan uji biostimulasi dan bioaugmentasi) ; 4) menguji pengaruh penambahan biosurfaktan dan penggabungan antara penambahan nutrisi, biosurfaktan dalam bioremediasi limbah minyak. Masing-masing uji disajikan berturut-turut dibawah ini .

4.3.9.1. Perlakuan I: Uji efektivitas variasi konsorsium mikroba yang digunakan dalam metode bioaugmentasi terhadap bioremediasi minyak pada medium cair dan tanah

Percobaan bioremediasi minyak pada kultur cair menggunakan media dasar berupa air mineral sintetis yang ditambah dengan 2% minyak(minyak mentah dan solar) dan 4% inokulum. Ada 3 jenis formula yang diujikan, yaitu : F1 (3 bakteri dan 3 khamir); F2 (6 bakteri dan 3 khamir); dan F3 (12 bakteri dan 3 khamir). Isolat – isolat yang digunakan merupakan isolat mikroba hidrokarbonoklastik hasil isolasi dari tanah tercemar minyak dari kawasan sumur minyak Wonocolo dan Depo Pertamina Surabaya. Kultur diinkubasi selama 7 hari dengan agitasi 150 rpm dan suhu 30°C. Pada akhir masa inkubasi dilakukan pengamatan berupa penghitungan jumlah mikroba (CFU/ml) bakteri dan khamir penyusun konsorsium. Efektivitas variasi konsorsium dalam biodegradasi minyak di media cair dievaluasi dari pertumbuhan mikroba pada kultur uji.

Sedangkan pada percobaan efektivitas variasi konsorsium pada media tanah dilakukan dengan cara mengambil sampel tanah dari daerah pengeboran minyak Desa Wonocolo. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 3 x 4 x 6 dengan dua kali ulangan. Perlakuannya terdiri dari tiga faktor. Faktor pertama adalah jenis konsorsium mikroba, yang terdiri dari konsorsium bakteri (B), konsorsium khamir (K), dan konsorsium bakteri dan khamir (BK). Faktor kedua adalah konsentrasi konsorsium mikroba, yaitu 0% (kontrol), 10%, 20%, dan 40%. Faktor ketiga adalah lama waktu inkubasi, yaitu minggu ke-0 (M0) sampai dengan minggu ke-6 (M6). Rincian perlakuannya dapat dilihat pada tabel 3.1.dan 3.2. berikut.

Tabel 4.1. Perlakuan jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba

Jenis konsorsium mikroba	Konsentrasi inokulum (%)			
	0% (kontrol)	10%	20%	40%
B	B0	B10	B20	B40
K	K0	K10	K20	K40
BK	BK0	BK10	BK20	BK40

Tabel 4.2. Perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba dengan waktu inkubasi

Kombinasi jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba	lama waktu inkubasi (minggu)					
	M0	M1	M2	M3	M4	M6
Kontrol (B0, K0, BK0)	kontrol-M0	kontrol-M1	kontrol-M2	kontrol-M3	kontrol-M4	kontrol-M6
B10	B10-M0	B10-M1	B10-M2	B10-M3	B10-M4	B10-M6
B20	B20-M0	B20-M1	B20-M2	B20-M3	B20-M4	B20-M6
B40	B40-M0	B40-M1	B40-M2	B40-M3	B40-M4	B40-M6
K10	K10-M0	K10-M1	K10-M2	K10-M3	K10-M4	K10-M6
K20	K20-M0	K20-M1	K20-M2	K20-M3	K20-M4	K20-M6
K40	K40-M0	K40-M1	K40-M2	K40-M3	K40-M4	K40-M6
BK10	BK10-M0	BK10-M1	BK10-M2	BK10-M3	BK10-M4	BK10-M6
BK20	BK20-M0	BK20-M1	BK20-M2	BK20-M3	BK20-M4	BK20-M6
BK40	BK40-M0	BK40-M1	BK40-M2	BK40-M3	BK40-M4	BK40-M6

Traian cara kerja adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan 240 botol kaca berukuran 100 ml yang berisi 10 g tanah perlakuan.
- Memasukkan 0,5 ml (~0,4986 g) minyak mentah (*crude oil*) ke dalam 10 g tanah dalam botol perlakuan secara aseptik.
- Menghitung volume suspensi bakteri (10 jenis) dan khamir (3 jenis) yang harus diambil dari tiap stok suspensi mikroba uji dengan $A_{600} = 1$ untuk semua perlakuan konsorsium bakteri.
- Memasukkan suspensi konsorsium mikroba yang telah disiapkan dalam tanah perlakuan dengan ketentuan sebagai berikut.

1. Kontrol : tanah+*crude oil*

2. B10 : tanah+*crude oil*+0,5 ml konsorsium bakteri
 3. B20 : tanah+*crude oil*+1 ml konsorsium bakteri
 4. B40 : tanah+*crude oil*+2 ml konsorsium bakteri
 5. K10 : tanah+*crude oil*+0,5 ml konsorsium khamir
 6. K20 : tanah+*crude oil*+1 ml konsorsium khamir
 7. K40 : tanah+*crude oil*+2 ml konsorsium khamir
 8. BK10 : tanah+*crude oil*+0,5 ml konsorsium bakteri dan khamir
 9. BK20 : tanah+*crude oil*+1 ml konsorsium bakteri dan khamir
 10. BK40 : tanah+*crude oil*+2 ml konsorsium bakteri dan khamir.
- e. Menginkubasinya pada suhu ruang (25°C) selama lama waktu 0, 1, 2, 3, 4, 6 minggu untuk TPC mikroba dan 0, 2, 4, 6, 8 untuk TPH minyak mentah (*crude oil*) residu. Kelembaban tanah dalam botol perlakuan dijaga dengan cara menyemprotkan akuades steril sebanyak 1–2 semprot (~1–2 ml).

4.3.9.2. Perlakuan II : Uji pengaruh penambahan bakteri fiksasi nitrogen terhadap bioremediasi limbah minyak

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua kali pengulangan. Perlakuan terdiri dari dua faktor, yaitu jenis bakteri fiksasi nitrogen dan waktu inkubasi. Percobaan terdiri dari 4 perlakuan, 1 kontrol positif, dan 1 kontrol negatif dengan rincian sebagai berikut :

- kontrol positif (KP) berisi tanah asli (yang tidak disterilkan) + *crude oil*
- kontrol negatif (KN) berisi tanah steril + *crude oil*
- perlakuan I (P1) berisi tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik
- perlakuan II (P2) berisi tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik + *Azotobacter chroococcum*
- perlakuan III (P3) berisi tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik + *Beijerinckia indica*
- perlakuan IV (P4) berisi tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik + *Azotobacter chroococcum* dan *Beijerinckia indica*.

Jraian cara kerja adalah sebagai berikut :

- 1. Menyiapkan 130 botol yang sudah berisi tanah dan *crude oil*.
- 2. Menyiapkan tiga botol yang berisi starter bakteri konsorsium hidrokarbonoklastik dan dua botol yang berisi suspensi bakteri fiksasi nitrogen.

c. Mengelompokkan botol-botol perlakuan, dan menambahkan suspensi bakteri ke tiap botol dengan ketentuan seperti dibawah ini:

- 20 botol berisi tanah tidak disterilkan untuk kontrol positif tidak ditambahkan bakteri tetapi ditambahkan air fisiologis steril sebanyak 1,25 ml.
- 20 botol berisi tanah steril untuk kontrol negatif tidak ditambahkan bakteri tetapi ditambahkan air fisiologis steril sebanyak 1,25 ml.
- 20 botol berisi tanah steril yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik selanjutnya disebut perlakuan P1 dan ditambahkan air fisiologis steril sebanyak 0,25 ml.
- 20 botol berisi tanah steril yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik dan 0,25 ml *Azotobacter chroococcum* selanjutnya disebut perlakuan P2
- 20 botol berisi tanah steril yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik dan 0,25 ml *Beijerinckia indica* selanjutnya disebut perlakuan P3
- 30 botol berisi tanah steril yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik 0,125 ml *Azotobacter chroococcum* dan 0,125 ml *Beijerinckia indica* selanjutnya disebut perlakuan P4 (10 botol digunakan untuk penghitungan kelembaban).

d. Menginkubasi 10 botol dari tiap-tiap kontrol dan perlakuan untuk penghitungan jumlah sel bakteri (TPC) dan 10 botol untuk mengukur kadar *crude oil* residu (TPH) dengan waktu inkubasi 0, 1, 2, 3, 4, 6, dan 8 minggu. Setiap minggunya dilakukan penyiraman air dengan *sprayer* agar kelembaban tanah terjaga.

4.3.9.3. Perlakuan III : Uji efektivitas variasi nutrisi yang digunakan dalam metode biostimulasi terhadap bioremediasi minyak di tanah.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua kali pengulangan. Perlakuan terdiri dari dua faktor, yaitu jenis nutrisi dan konsentrasi nutrisi. Jenis nutrisi yang digunakan adalah NPK (N), kotoran ayam (A), dan pupuk kotoran sapi (S). Sedangkan konsentrasi nutrisi yang digunakan adalah 3 g, 6 g, dan 9 g per 10 g tanah. Rincian perlakuannya adalah sebagai berikut :

Tabel 4.3 Perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi nutrisi

Jenis nutrisi	Konsentrasi nutrisi (g/10 g-tanah)			
	0 (Kontrol)	3	6	9
N	N0	N3	N6	N9
A	A0	A3	A6	A9
S	S0	S3	S6	S9

Keterangan :

- Kontrol : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri
- N3 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 3 g NPK
- N6 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 6 g NPK
- N9 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 9 g NPK
- A3 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 3 g kotoran ayam
- A6 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 6 g kotoran ayam
- A9 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 9 g kotoran ayam
- S3 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 3 g pupuk kotoran sapi
- S6 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 6 g pupuk kotoran sapi
- S9 : tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri + 9 g pupuk kotoran sapi

Uraian cara kerja dijelaskan dibawah ini

1. Menyiapkan 300 botol bersih yang telah berisi campuran tanah dan nutrisi dalam berbagai konsentrasi (3 g/10 g, 6 g/10 g, dan 9 g/10 g).
Memasukkan minyak mentah yang telah disterilkan ke tiap botol sebanyak 0,5 ml/ 10 g-tanah dengan pipet volum, dan menyebarkan diseluruh permukaan tanah.
Menyiapkan tiga botol yang berisi starter bakteri konsorsium hidrokarbonoklastik (10 jenis bakteri)
Mengelompokkan botol-botol perlakuan, dan menambahkan suspensi bakteri ke tiap botol dengan ketentuan seperti dibawah ini:
 - 72 botol berisi tanah yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik tanpa penambahan nutrisi (perlakuan kontrol)
 - 24 botol berisi tanah dan 3 g NPK yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan N3)
 - 24 botol berisi tanah dan 6 g NPK yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan N6)

24 botol berisi tanah dan 9 g NPK yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan N9)

24 botol berisi tanah dan 3 g kotoran ayam yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan A3)

24 botol berisi tanah dan 6 g kotoran ayam yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan A6)

24 botol berisi tanah dan 9 g kotoran ayam yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan A9)

24 botol berisi tanah dan 3 g pupuk kotoran sapi yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan S3)

24 botol berisi tanah dan 6 g pupuk kotoran sapi yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan S6)

24 botol berisi tanah dan 9 g pupuk kotoran sapi yang masing-masing diisi dengan 1 ml konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (perlakuan S9)

5. Menginkubasi 12 botol dari tiap-tiap perlakuan untuk analisis penghitungan jumlah sel bakteri dengan waktu inkubasi 0, 1, 2, 3, 4, 6, dan 8 minggu dan 12 botol dari tiap-tiap perlakuan untuk analisis penghitungan kadar residu minyak mentah dengan waktu inkubasi 0, 1, 2, 4, dan 6 minggu. Setiap minggunya dilakukan penyiraman air dengan *sprayer* agar kelembababan terjaga.

4.3.9.4. Perlakuan IV: Uji variasi jenis biosurfaktan dan gabungan perlakuan (biosurfaktan, nutrisi dan inokulum mikroba) terhadap bioremediasi minyak yang diukur pada waktu inkubasi berbeda.

Pada perlakuan ini, sampel tanah yang digunakan untuk percobaan adalah sampel tanah yang tersusun atas tanah subur dan pasir dengan perbandingan 1:1. Sampel tanah diperlakukan dengan dua kondisi, yaitu dengan sterilisasi dan tanpa sterilisasi. Perlakuan sterilisasi digunakan untuk mengetahui peran bakteri indigenus tanah dalam bioremediasi minyak. Konsorsium mikroba dan nutrisi yang digunakan dalam perlakuan diambil dari kombinasi terbaik dari hasil penelitian sebelumnya yaitu konsorsium F3 20% (v/gr tanah) dengan nutrisi NPK (3%). Sedangkan biosurfaktan yang diuji merupakan biosurfaktan bakteri *Pseudomonas putida* (BA), *Acinetobacter sp.* (BB) yang ditumbuhkan pada substrat molase dan *Pseudomonas pseudomallei* (BC) yang ditumbuhkan pada substrat minyak kelapa sawit..

Biosurfaktan yang diujikan adalah pada berbagai kisaran nilai tegangan permukaan antara 41-44 mN/m. Kombinasi perlakuan yang dilakukan meliputi 20 kombinasi.

- NS	- SS
- NS + F	- SS + F
- NS + U	- SS + U
- NS + F + U	- SS + F + U
- NS + F + BA	- SS + F + BA
- NS + F + BB	- SS + F + BB
- NS + F + BC	- SS + F + BC
- NS + F + BA + U	- SS + F + BA + U
- NS + F + BB + U	- SS + F + BB + U
- NS + F + BC + U	- SS + F + BC + U

Keterangan :

NS = sampel tanah yang tidak disterilkan

SS = sampel tanah yang disterilkan

F = formula mikroba

U = nutrisi (NPK 3%)

Semua perlakuan diinkubasi dalam suhu ruang (27°C) , selama 4 minggu. Setiap minggunya dilakukan pengadukan sebanyak 3 kali dan penyiraman air dengan *spray* agar kelembapan tanah terjaga. Pengukuran parameter hasil bioremediasi diamati dari pertumbuhan mikroba (bakteri dan khamir) dan kadar minyak (*crude oil*) tanah yang dilakukan pada hari ke 0, 2, dan 4 minggu. Pengukuran parameter fisik tanah meliputi pH, temperatur, dan kelembapan tanah dilakukan setiap minggu.

3.10. Pengukuran parameter biodegradasi minyak

3.10.1. Metode Total Plate Count (TPC) mikroba heterotrofik dan hidrokarbono klastik.

Sampel tanah pada masing-masing perlakuan disuspensikan ke dalam 90 ml air fisiologis steril. Dihomogenkan dan diendapkan. 1 ml supernatan kemudian dilakukan seri pengenceran menggunakan air fisiologis steril dalam tabung reaksi. Pada pengenceran yang ditentukan, 1 ml suspensi mikroba ditumbuhkan pada berbagai jenis media padat *Nutrien Agar*, *Sabouroud Dektrosa Agar* untuk menumbuhkan bakteri dan fungi heterotrofik.

Sedangkan untuk menumbuhkan mikroba hidrokarbonoklastik dilakukan dengan menumbuhkannya pada media padat selektif hidrokarbon. Biakan diinkubasi selama 24 – 48 jam untuk mikroba heterotrofik dan sampai 5-7 hari untuk mikroba hidrokarbonoklastik. Koloni yang tumbuh dihitung dengan mengalikan dengan faktor pengenceran dan dinyatakan dalam CFU / g sampel tanah. Dinamika pertumbuhan mikroba selama uji bioremediasi dilihat dengan mengplotkan log jumlah mikroba dengan waktu inkubasi selama perlakuan.

4.3.10.2. Metode Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)

Pengukuran kadar minyak pada setiap sampel dilakukan dengan menggunakan ekstraksi menggunakan toluene dan diamati dengan spektrofotometer (Spektronik 21). Dari kadar minyak residu pada setiap sampel perlakuan dapat dinyatakan dalam persen minyak yang terdegradasi selama uji bioremediasi. Uraian metode penelitian disajikan secara rinci sebagai berikut.

- a. Sampel tanah pada botol-botol dikeringkan (dihilangkan airnya) dengan oven selama ± 3 hari dengan suhu 75°C .
- b. Menggerus tanah dengan mortar sampai halus sekaligus menghomogenkan tanah
- c. Menimbang 1 g tanah yang sudah halus kemudian memasukkannya ke dalam tabung reaksi.
- d. Menambahkan 5 ml toluen kemudian menghomogenkan dengan *vortex* selama 10 detik dan didiamkan selama 10 menit.
- e. *Crude oil* yang larut dalam toluen kemudian disaring dengan kertas saring Whatman nomor 1 menggunakan corong kaca.
- f. Larutan diencerkan dengan cara mengambil 0,5 ml hasil saringan kemudian menambahkan 4,5 ml toluen
- g. Mengukur nilai *Optical Density* (OD) hasil pengenceran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.
- h. Memasukkan hasil pengukuran ke dalam persamaan kurva baku sehingga diperoleh kadar *crude oil* (ml/g tanah) dan dikonversikan menjadi satuan g/g tanah.

3.10.3. Penghitungan Kelembaban

Botol yang berisi tanah basah ditimbang beratnya sebagai berat awal

Tanah dalam botol dikeringkan dalam oven selama 3 hari pada suhu 150°C .

Botol yang sudah kering tanahnya dan beratnya konstan kemudian ditimbang sebagai berat akhir.

- d. Mengeluarkan tanah dalam botol dan kemudian menimbang berat tanah tersebut
- e. Menimbang berat botol kosong
- f. Menghitung kelembaban dengan cara

Berat air yang hilang = berat awal – berat akhir

$$\text{Kelembaban} = \frac{\text{berat air yang hilang}}{\text{berat tanah kering}} \times 100\%$$

4.4. Analisa Data

Dari berbagai perlakuan uji bioremediasi diperoleh data berupa: 1) nilai rata-rata *Total Plate Count* (cfu/ml) mikroba heterotrof dan hidrokarbonoklastik, 2) berat minyak yang tersisa dari aktivitas uji bioremediasi. Data-data tersebut dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) faktorial dengan derajat signifikansi 5 % dilanjutkan dengan uji Least Significant Different (LSD). Sedangkan, respon berbagai perlakuan yang meliputi : uji pertumbuhan, uji degradasi hidrokarbon poliaromatik, uji produksi biosurfaktan, data dominansi mikroba serta data parameter lingkungan (fisik dan kimiawi) dianalisis secara deskriptif.

4.5. Jadwal Waktu Pelaksanaan

Kegiatan/Bulan	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Persiapan dan konsolidasi tim	█									
2. Pengambilan sampel tanah dari lahan tercemar minyak, peremajaan bakteri, dan pembuatan media pertumbuhan	█									
3. Isolasi bakteri dan khamir potensial pendegradasi hidrokarbon		█	█							
4. Uji screening pertumbuhan bakteri dan khamir pada berbagai jenis hidrokarbon penyusun minyak (hidrokarbon alifatik dan aromatik)		█	█							
5. Pembuatan konsorsium mikroba (bakteri dan khamir)			█	█	█					
6. Pengambilan tanah dari lahan tercemar dan karakterisasi dan perlakuan awal pada tanah			█	█	█					
7. Uji bioremediasi minyak di tanah oleh konsorsium mikroba dengan variasi perlakuan (jenis mikroba, konsentrasi inokulum, nutrisi dan biosurfaktan).				█	█	█	█	█	█	
8. Pengamatan perlakuan terhadap respon pertumbuhan mikroba, dominansi mikroba, penurunan kadar minyak di tanah, dan perubahan faktor kimiawi tanah				█	█	█	█	█	█	
9. Pengumpulan data				█	█	█	█	█	█	
10. Analisa data						█	█	█	█	
1. Penyusunan laporan							█	█	█	
2. Seminar akhir								█	█	
3. Perbaikan laporan									█	

6. Luaran Penelitian

Penelitian ini akan menghasilkan metode bioaugmentasi, biostimulasi dan penambahan biosurfaktan yang dapat meningkatkan efisiensi bioremediasi minyak di lahan tercemar. Data penelitian akan dipakai sebagai acuan untuk upaya bioremediasi minyak di lahan tercemar secara *in situ*. Disamping itu, hasil penelitian diharapkan dapat dipublikasikan di jurnal Internasional dan di jurnal nasional terakreditasi di Indonesia yang terkait dengan mikrobiologi lingkungan, ekologi dan potensi biodiversitas mikroba Indonesia.

BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Eksplorasi mikroba hidrokarbonoklastik

Hasil eksplorasi mikroba (bakteri dan khamir) dari sampel tanah yang diambil di enam titik sampling di sumur pengeboran minyak rakyat di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedewan, Kabupaten Bojonegoro Jawa Timur dan Depo Pertamina Surabaya didapatkan 16 isolat bakteri dan 3 isolat khamir. Hasil identifikasi dengan pengamatan karakteristik makroskopis koloni, mikroskopis seluler dan karakteristik fisiologis menggunakan program Microbact 2000 (untuk bakteri) dan program VITEK 2 System Version: 03.01 (BioMerieux) untuk khamir telah berhasil mengidentifikasi sampai tingkat spesies. Kode isolate dan nama spesies hasil identifikasi serta persen probabilitasnya disajikan pada tabel 4.1., 4.2. Uraian karakteristik fisiologis dari masing-masing isolate disajikan dalam lampiran 1 dan lampiran 2.

Tabel 5.1 Keanekaragaman bakteri hidrokarbonoklastik (pendegradasi hidrokarbon) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak

Lokasi pengambilan sampel tanah	Kode isolat	Nama spesies	% Probabilitas
Depo PERTAMINA Surabaya	T1-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79,16%
	T1-4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	94,65%
	T1-8	<i>Pseudomonas putida</i>	96,01%
	T2-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,41%
	T3-3	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	99,84%
Pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro	P1-2	<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>	88,07%
	P1-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,82%
	P2-1	<i>Acinetobacter faecalis-type II</i>	67,61%
	P3-4	<i>Pseudomonas cepacia</i>	99,20%
	P3-7	<i>Actinobacillus sp.</i>	66,53%
	P3-8	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	77,03%
	P4-2	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	96,15%
	P4-4	<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>	65,15%

Tabel 5.2. Keanekaragaman khamir hidrokarbonoklastik (pendegradasi hidrokarbon) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak

Lokasi pengambilan sampel tanah	Kode isolat	Nama spesies	% Probabilitas
Depo PERTAMINA Surabaya	T5-1Y	<i>Candida famata</i>	94%
Pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro	P1-2Y	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	93%
	P3-3Y	<i>Candida parapsilosis</i>	96%

Dari isolat yang didapatkan, ditemukan hampir mayoritas spesies bakteri yang didapatkan adalah dari genus *Pseudomonas*. Hal tersebut didukung oleh beberapa peneliti yang mengungkapkan bahwa genus *Pseudomonas* merupakan genus bakteri potensial yang dikenal memiliki diversitas enzim untuk mendegradasi hidrokarbon baik dari alifatik, aromatik sampai poliaromatik (Cerniglia, *et al.*, 1982; Atlas *et al.*, 1992).

5.2. Uji potensi degradasi komponen hidrokarbon minyak oleh bakteri dan khamir hasil isolasi

Uji potensi kemampuan masing-masing isolat dalam mendegradasi minyak dilakukan dengan melakukan uji pertumbuhan masing-masing isolat bakteri/khamir pada kultur cair dengan minyak bumi dan solar sebagai satu-satunya sumber karbon. Penggunaan minyak mentah dan solar sebagai media uji diharapkan dapat menapis potensi mikroba dalam mendegradasi komponen alifatik, aromatik mengingat di solar juga mengandung banyak komponen aromatik. Potensi mikroba dalam mendegradasi minyak mentah dan solar dapat diurutkan dengan mengamati pertumbuhan mikroba dari kekeruhan kultur dan emulsifikasi substrat yang dihasilkan oleh masing-masing kultur uji. Hasil uji pertumbuhan pada minyak mentah dan solar masing-masing isolat pada media cair disajikan pada tabel 4.3.

Tabel 5.3 Pengelompokkan isolat bakteri dan khamir berdasarkan kemampuan tumbuh pada minyak mentah dan solar sebagai satu-satunya sumber karbon.

Substrat	Visualisasi kultur setelah 7 hari inkubasi			
	Emulsi sangat halus, suspensi sangat keruh	Emulsi halus, suspensi keruh	Emulsi kasar, suspensi keruh	Emulsi halus, suspensi bening
Minyak mentah	T1-4	T2-4	T3-3	T1-8
	P4-2	T1-2	P2-1	P3-7
	P4-4	P3-4	P3-3Y	P1-4
		P3-8		P1-2Y
		P1-2		
Solar		T5-1Y		
	P3-8	P2-1	T3-3	P1-2
		P3-4	T1-2	P1-4
		P3-7	T1-8	P1-2Y
		P4-2	P3-3Y	
		P4-4		
		T2-4		
		T1-4		
	T5-1Y			

Emulsi yang terbentuk dalam kultur dengan substrat hidrokarbon (minyak mentah dan solar) merupakan indikasi secara tidak langsung produksi biosurfaktan oleh mikroba uji. Biosurfaktan adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroba yang mempunyai karakteristik mampu menurunkan tegangan permukaan dan bersifat dapat mengemulsi substrat. Emulsifikasi substrat merupakan salah satu mekanisme yang dikembangkan oleh bakteri hidrokarbonoklastik untuk dapat mendegradasi minyak melalui peningkatan kontak substrat dengan sel mikroba. Emulsi yang terbentuk juga dapat meningkatkan bioavailabilitas hidrokarbon (ketersediaan substrat yang hidrofob) untuk dimetabolisme oleh mikroba pengurai minyak (Desai *et al* 1990; Ghoswami and Singh, *et al.*, 1991; Ni'matuzahroh, 1998).

Kemampuan bakteri dan khamir hasil uji dalam mendegradasi hidrokarbon poliaromatik juga dilakukan menggunakan metode sublimasi. Hasil uji degradasi hidrokarbon poliaromatik isolat bakteri dan khamir disajikan pada tabel 4.4.

Table 5.4. Uji degradasi hidrokarbon poliaromatik isolate bakteri dan khamir menggunakan metode sublimasi

Kode cawan	Strain bakteri/khamir	Hidrokarbon poliaromatik				
		Phn	Ptz	Dbz	Fln	Pyr
1	<i>Acinetobacter faecalis-type II</i> P1 (2)	-	-	-	-	-
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P1 (4)	-	-	-	-	-
3	<i>Acinetobacter faecalis-type II</i> P2 (1)	-	-	-	-	-
4	<i>Pseudomonas cepacia</i> P3 (4)	-	-	-	-	-
5	<i>Actinobacillus sp.</i> P3 (7)	-	-	-	-	-
6	<i>Pseudomonas stutzeri</i> P3 (8)	-	+	-	+	+
7	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> P4 (2)	-	-	-	+	+
8	<i>Pseudomonas fluorescens-25P4</i> (4)	-	-	-	-	-
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T1 (2)	-	+	-	-	-
10	<i>Aeromonas hydrophila</i> T1 (4)	-	-	-	+	-
11	<i>Pseudomonas putida</i> T1 (8)	-	-	-	-	+
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T2 (4)	+	+	-	-	-
13	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> T3(3)	-	-	-	-	-
14	<i>Candida famata</i> T5-1Y	+	-	-	-	-
15	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> P1-2Y	-	+	-	+	+
16	<i>Candida parapsilosis</i> P3-3Y	+	+	-	+	+
17	<i>Beijerinckia</i> *	-	-	-	-	-
18	<i>Azotobacter</i> *	-	-	-	-	+

eterangan :

- (+) menunjukkan terbentuknya daerah bening di sekitar koloni; (-) tidak terbentuk daerah bening; (sd): sedang diuji. Inkubasi masing-masing isolat dilakukan selama 7 hari setelah sublimasi
- PAH yang digunakan: Phenantren (Phn), Phenotiazine (Ptz), Dibenzotiopen (Dbz), Fluoren, (Fln), dan Pyren (Pyr).

3. Uji degradasi PAH dilakukan dengan metode Sublimasi (Alley & Brown 2000). Parameter yang diamati pembentukan daerah bening di sekitar koloni setelah sublimasi. Isolat yang mampu membentuk daerah bening di sekitar koloninya, diduga mampu mendegradasi PAH tertentu.

* Bakteri *Beijerinckia* dan *Azotobacter* juga diikuti dalam uji potensi degradasi hidrokarbon poliaromatik, karena kedua bakteri pemfiksasi nitrogen tersebut juga merupakan penyusun konsorsium bakteri dalam uji bioremediasi (pada perlakuan pengaruh penambahan bakteri fiksasi nitrogen dalam bioremediasi limbah minyak)

Dari hasil uji dengan metode sublimasi, diketahui bahwa dari ke-13 isolat bakteri yang diuji, 6 isolat bakteri menunjukkan dapat mendegradasi hidrokarbon poliaromatik dengan kemampuan yang bervariasi. *Pseudomonas stutzeri* P3 (8) merupakan bakteri yang dapat memberikan hasil positif pada 3 dari 5 hidrokarbon poliaromatik yang diujikan. Sedangkan, pada uji dengan isolate khamir, menunjukkan bahwa ketiga spesies khamir uji berpotensi dalam mendegradasi hidrokarbon poliaromatik dengan *Candida parapsilosis* P3-3Y memiliki kemampuan terbaik.

Dari uji potensi kemampuan tumbuh pada dua jenis substrat minyak dan diperkuat dengan uji degradasi pada hidrokarbon poliaromatik maka diputuskan untuk memilih sepuluh bakteri dan tiga khamir untuk digunakan dalam uji bioremediasi. Isolat mikroba tersebut diuraikan dalam tabel 4.5. Karakteristik dari masing-masing isolat tersebut dijelaskan dalam lampiran 1 dan 2.

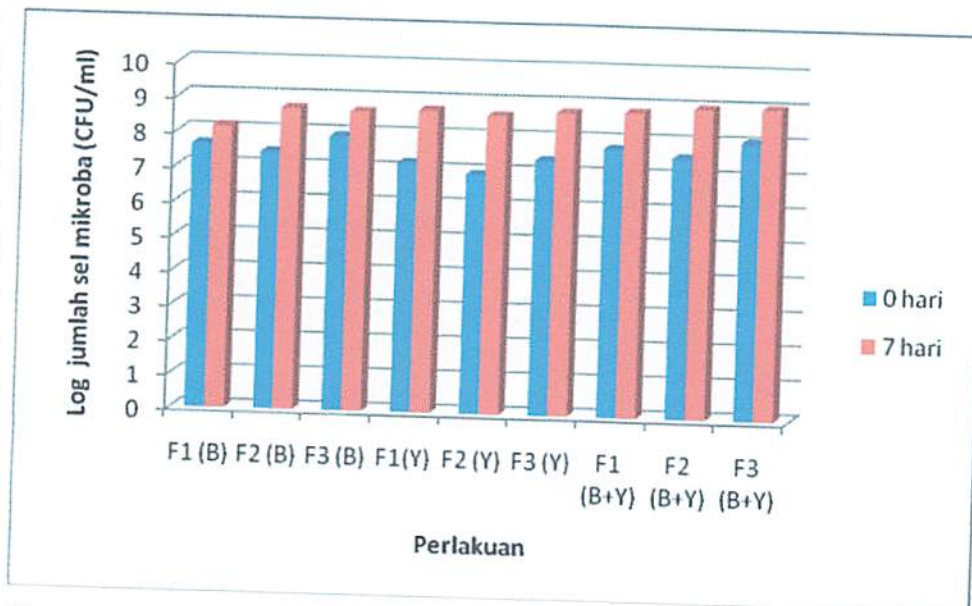
Tabel 5.5. Bakteri dan khamir hidrokarbonoklastik potensial hasil isolasi dari tanah tercemar minyak yang terpilih sebagai penyusun konsorsium mikroba

Sampel tanah	Kode isolat	Nama isolat mikroba
PERTAMINA Tanjung Perak, Surabaya	T1-4	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	T1-8	<i>Pseudomonas putida</i>
	T2-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	T3-3	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>
	T5-1Y	<i>Candida famata</i>
Penambangan minyak mentah tradisional Ds. Wonocolo Kec. Kedewan, Bojonegoro	P2-1	<i>Acinetobacter faecalis-type II</i>
	P3-4	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	P3-7	<i>Actinobacillus sp.</i>
	P3-8	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	P4-2	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
	P4-4	<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>
	P1-2Y	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	P3-3Y	<i>Candida parapsilosis</i>

5.3. Uji pertumbuhan berbagai variasi konsorsium mikroba pada kultur cair dengan substrat minyak mentah dan solar

Sebelum melakukan uji bioremediasi di tanah, terlebih dahulu dilakukan uji pertumbuhan berbagai variasi konsorsium mikroba menggunakan kultur cair dengan substrat minyak mentah (*crude oil* dan solar). Respon pertumbuhan dievaluasi dengan menghitung jumlah mikroba (bakteri, khamir, dan total bakteri dan khamir) dan diamati dominansi mikroba yang tumbuh selama waktu inkubasi (7 hari). Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui efektivitas jumlah mikroba penyusun konsorsium dalam biodegradasi minyak. Data hasil pengamatan disajikan dalam gambar 4.6. dan 4.7 Data hasil penghitungan secara rinci disajikan dalam lampiran.

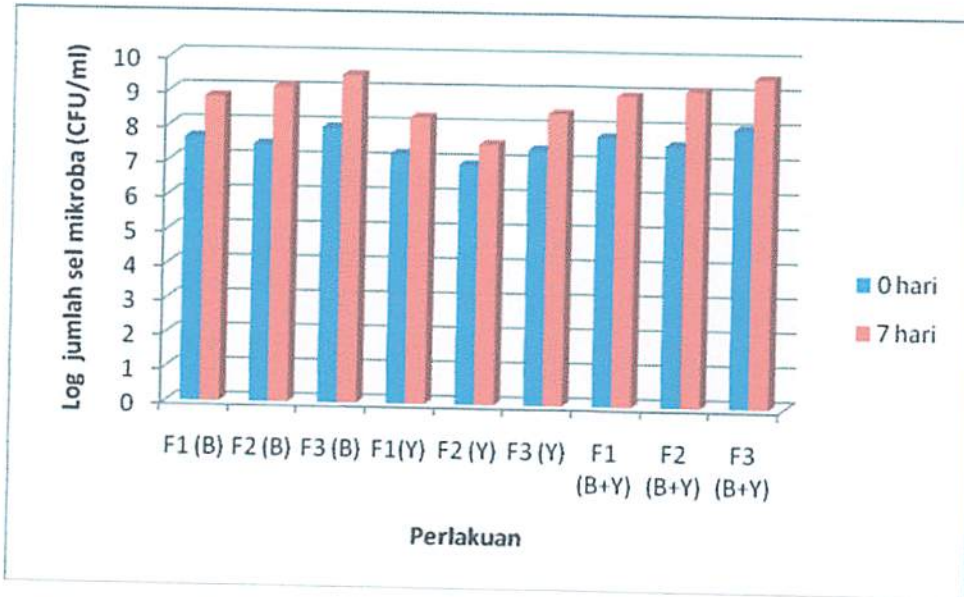
a) Pada substrat minyak mentah



Keterangan : F1 = konsorsium mikroba (3 bakteri dan 3 khamir)
F2 = konsorsium mikroba (6 bakteri dan 3 khamir)
F3 = konsorsium mikroba (12 bakteri dan 3 khamir)
B = bakteri
Y = khamir
B+Y = bakteri dan khamir

Gambar 5.1. Hasil penghitungan log jumlah sel mikroba pada uji pertumbuhan konsorsium mikroba pada substrat minyak mentah

b) Pada substrat solar



Keterangan : F1 = konsorsium mikroba (3 bakteri dan 3 khamir)
F2 = konsorsium mikroba (6 bakteri dan 3 khamir)
F3 = konsorsium mikroba (12 bakteri dan 3 khamir)
B = bakteri
Y = khamir
B+Y = bakteri dan khamir

Gambar 5.2. Hasil penghitungan log jumlah sel mikroba pada uji pertumbuhan konsorsium mikroba pada substrat solar

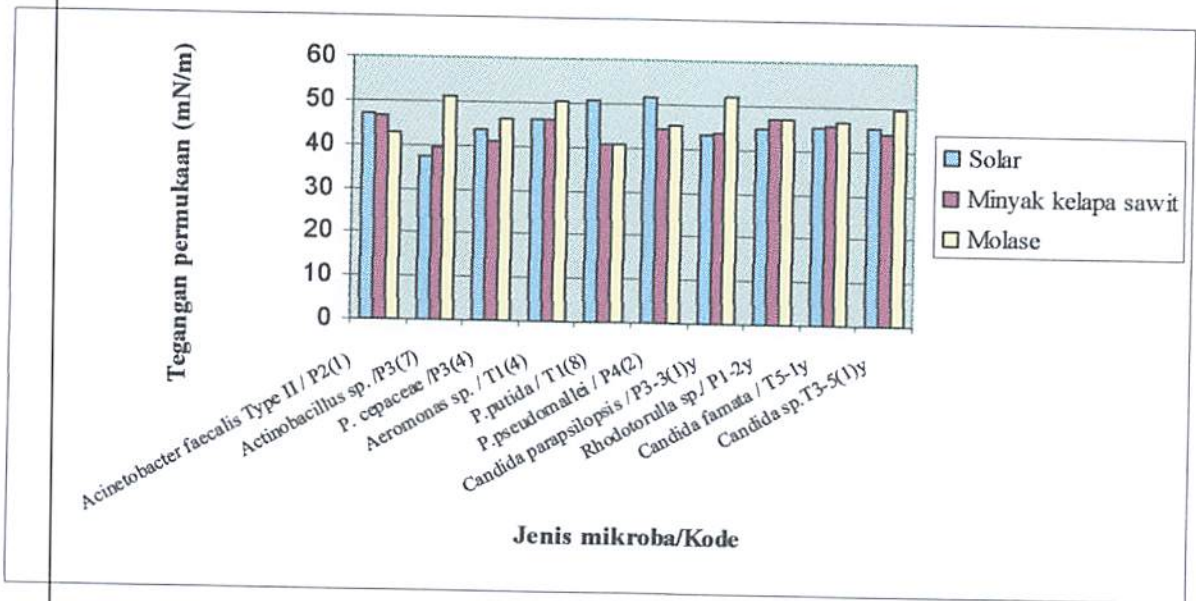
Dari grafik pada gambar diatas, dapat disimpulkan bahwa formula F3 menghasilkan jumlah sel mikroba yang lebih banyak dari F2 dan F1. Akan tetapi, jika dibandingkan, formula F2 tidak memberikan perbedaan yang berarti. Semakin tinggi keanekaragaman mikroba yang digunakan akan semakin mempercepat proses biodegradasi minyak. Sinergi antar mikroba sangat dibutuhkan dalam menyempurnakan mineralisasi limbah minyak di alam. Dari hasil pengamatan terhadap dominansi mikroba (data disajikan pada lampiran), diketahui bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *P. pseudomallei*, *P. stutzeri* tumbuh lebih banyak dibandingkan dengan bakteri lain. Kedua spesies *Candida* juga tumbuh lebih baik dibanding dengan *Rhodotorulla*.

Dari hasil penelitian ini, membuktikan bahwa konsorsium mikroba yang tersusun dari bakteri dan khamir hasil isolasi dari Wonocolo dan Pertamina Surabaya berpotensi digunakan dalam uji bioremediasi.

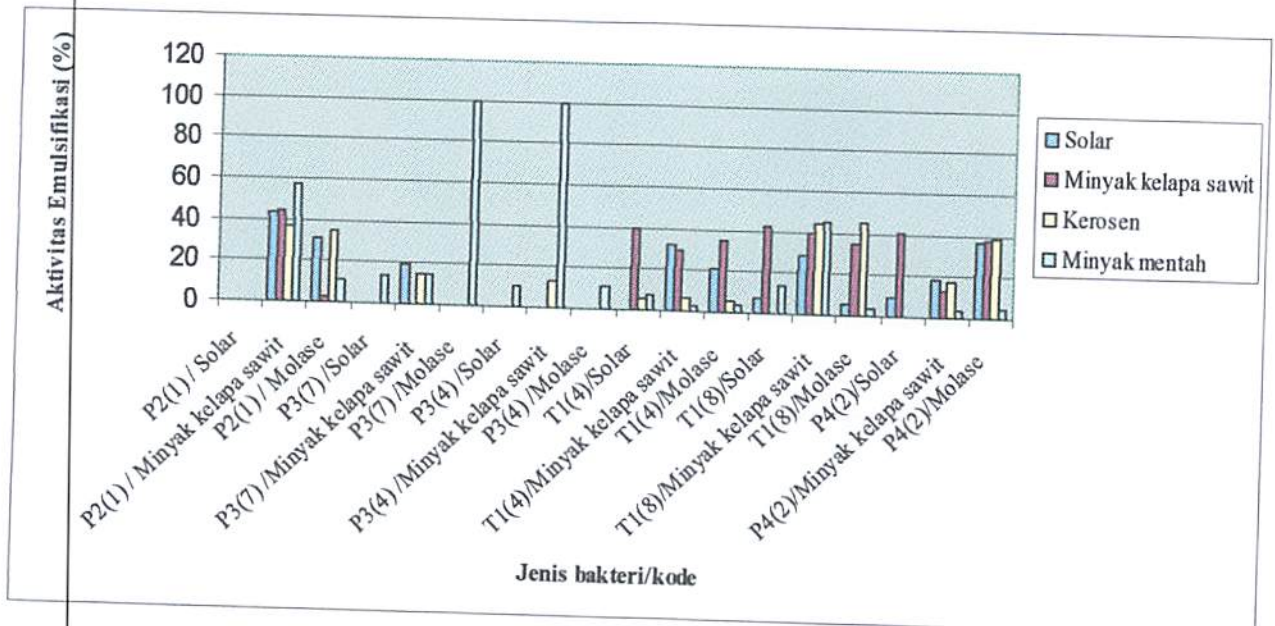
5.4. Uji skrining produksi biosurfaktan isolate bakteri hidrokarbonoklastik

Faktor yang menjadi kendala dalam biodegradasi limbah minyak di tanah dalam proses bioremediasi oleh mikroba tanah adalah kelarutan minyak yang rendah dalam air. Hidrofobisitas minyak tersebut akan mengurangi kontak sel mikroba pendegradasi dengan substrat (minyak). Upaya meningkat ketersediaan substrat minyak dalam tanah, antara lain adalah dengan menambahkan biosurfaktan yang dapat meningkatkan emulsi minyak sehingga dapat meningkatkan ketersediaan substrat minyak untuk didegradasi oleh mikroba pengurai minyak.

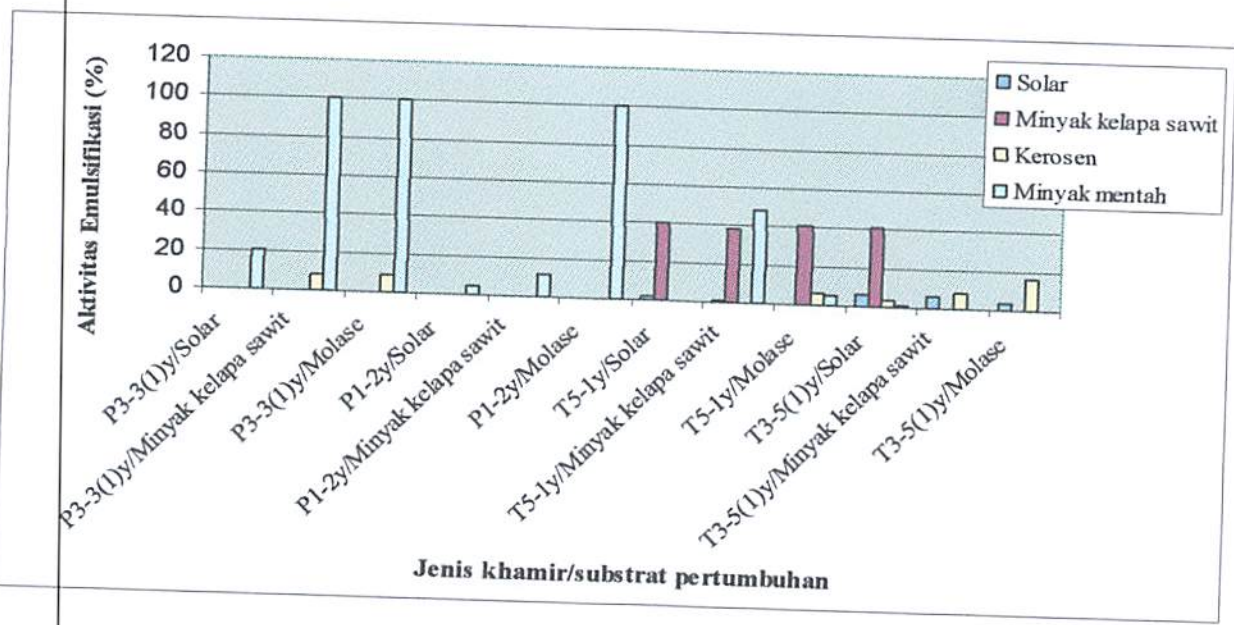
Uji skrining potensi mikroba hidrokarbonoklastik dalam memproduksi biosurfaktan dilakukan untuk mengetahui kemampuan masing-masing isolat untuk menggunakan jenis substrat yang berbeda dan spesifikasi karakteristik biosurfaktan yang dihasilkan oleh masing-masing mikroba. Jenis substrat pertumbuhan untuk uji biosurfaktan juga divariasikan dengan tujuan sekaligus untuk mendapatkan produk biosurfaktan dengan substrat yang murah. Potensi mikroba uji dalam menghasilkan biosurfaktan dideteksi dari rendahnya nilai tegangan permukaan supernatan kultur dan besarnya nilai aktivitas emulsifikasi supernatan pada berbagai hidrokarbon uji. Data hasil uji skrining produksi biosurfaktan isolat bakteri dan khamir disajikan pada gambar 4.3, 4.4, dan 4.5. Sedangkan data lengkap disajikan pada lampiran



Gambar 5.3. Nilai tegangan permukaan supernatant kultur mikroba yang ditumbuhkan pada tiga jenis substrat berbeda solar, minyak goreng, dan molase



Gambar 5.4 Nilai aktivitas emulsifikasi supernatant kultur bakteri yang ditumbuhkan pada tiga jenis substrat berbeda solar, minyak kelapa sawit, dan molase



Gambar 5.5. Nilai aktivitas emulsifikasi supernatant kultur khamir yang ditumbuhkan pada tiga jenis substrat berbeda solar, minyak kelapa sawit, dan molase

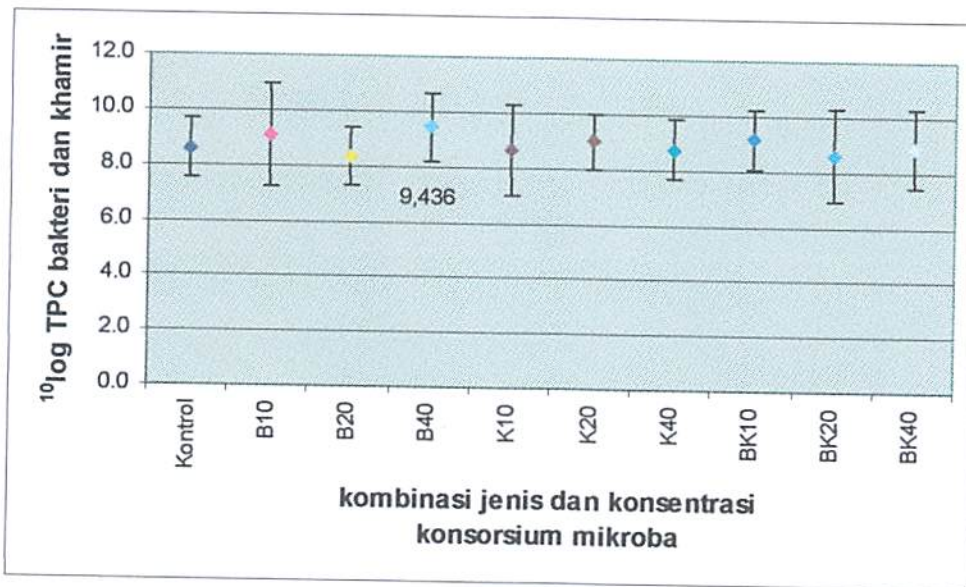
Data penelitian menunjukkan bahwa produksi biosurfaktan dipengaruhi oleh jenis mikroba dan substrat pertumbuhan. Dari pengukuran nilai tegangan permukaan supernatant kultur uji dan pengukuran nilai aktivitas emulsifikasi menggunakan berbagai minyak (kerosene, solar, minyak goreng, dan minyak mentah) diketahui bahwa setiap mikroba uji mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menurunkan tegangan permukaan kultur dan

mengemulsi minyak. Bakteri *Pseudomonas putida* T1-8, *Pseudomonas pseudomallei* dan *Acinetobacter faecalis* P2-1 berpotensi untuk diuji lanjut karena supernatan kultur bakteri-bakteri tersebut dapat menurunkan nilai tegangan permukaan lebih dari 10 mN/m dibanding kontrol dan dapat mengemulsi empat jenis minyak uji.

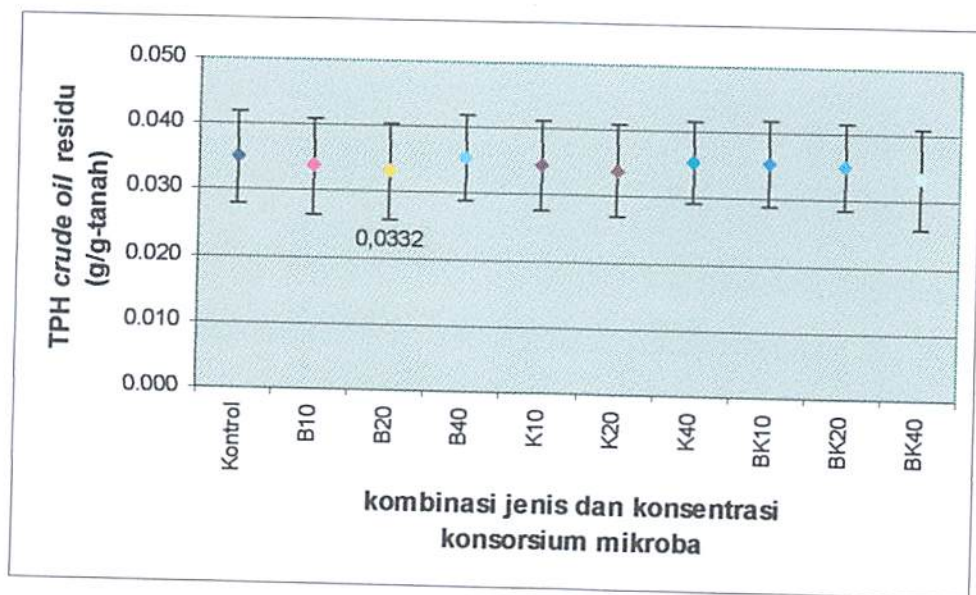
Dengan pertimbangan harga substrat produksi, maka biosurfaktan pada molase dan minyak goreng lebih menarik untuk dikembangkan baik untuk berbagai kegunaan maupun untuk upaya bioremediasi lingkungan. Kompatibilitas jenis-jenis biosurfaktan yang diduga berbeda yang dihasilkan oleh masing-masing mikroba dalam uji bioremediasi diujikan pada tahap akhir pada penelitian ini.

5.5. Uji bioremediasi minyak mentah di tanah dengan variasi jenis mikroba penyusun konsorsium dan konsentrasi inokulum mikroba yang diamati pada waktu inkubasi berbeda

Pada penelitian ini, formulasi mikroba penyusun konsorsium dibagi menjadi bakteri, khamir dan bakteri+khamir. Konsentrasi inokulum yang digunakan bervariasi dari 0,10, 20, dan 40%. Penentuan konsentrasi inokulum didapatkan dengan membandingkan konsentrasi dari beberapa artikel ilmiah terkait dengan bioremediasi hidrokarbon di tanah. Hasil penelitian disajikan pada Gambar 4.6. dan 4.7.



Gambar 5.6. Grafik rata-rata $10 \log$ TPC bakteri dan khamir dengan perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba



Keterangan : Kontrol = tanpa penambahan konsorsium mikroba
 B10 = konsorsium bakteri dengan konsentrasi 10%
 B20 = konsorsium bakteri dengan konsentrasi 20%
 B40 = konsorsium bakteri dengan konsentrasi 40%
 K10 = konsorsium khamir dengan konsentrasi 10%
 K20 = konsorsium khamir dengan konsentrasi 20%
 K40 = konsorsium khamir dengan konsentrasi 40%
 BK10 = konsorsium bakteri dan khamir dengan konsentrasi 10%
 BK20 = konsorsium bakteri dan khamir dengan konsentrasi 20%
 BK40 = konsorsium bakteri dan khamir dengan konsentrasi 40%

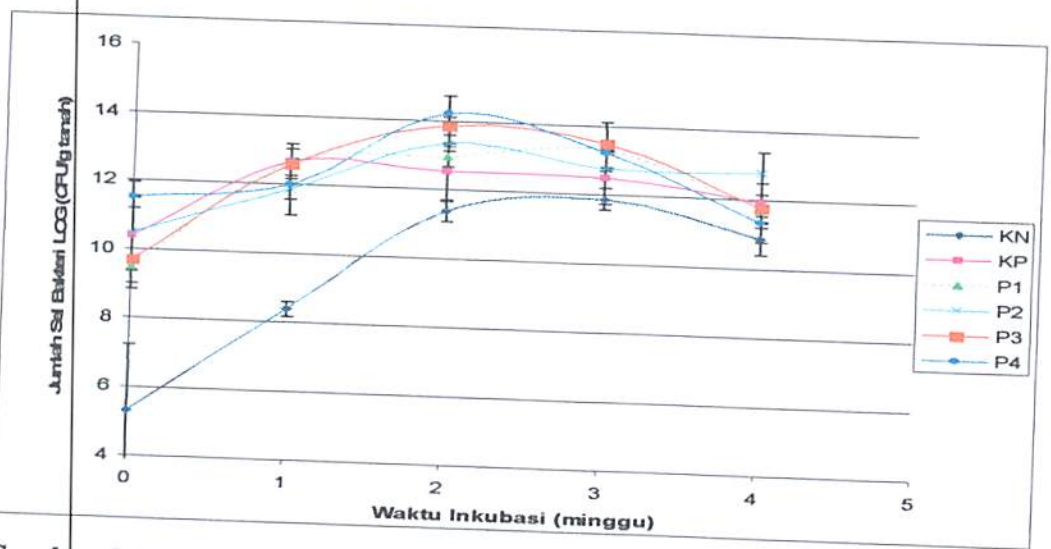
Gambar 5.7. Grafik rata-rata TPH *crude oil* residu (g/g-tanah) dengan perlakuan kombinasi jenis dan konsentrasi konsorsium mikroba

Dari gambar diatas diketahui bahwa jenis mikroba penyusun konsorsium dan konsentrasi inokulum mikroba tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap biodegradasi minyak. Hal tersebut disebabkan, pada sampel tanah yang digunakan dalam uji ternyata masih mengandung kelimpahan mikroba hidrokarbonoklastik indigenus yang cukup tinggi. Hal tersebut dibuktikan dari penghitungan jumlah mikroba pada sampel kontrol. Penambahan mikroba dengan variasi jenis dan konsentrasi inokulum tidak memberikan perubahan yang signifikan. Akan tetapi, dari keseluruhan uji, perlakuan dengan penambahan bakteri dengan inokulum 20% memberikan hasil yang paling baik. Jenis dan jumlah mikroba hidrokarbonoklastik di tanah sangat menentukan keberhasilan proses biodegradasi senyawa hidrokarbon di alam.

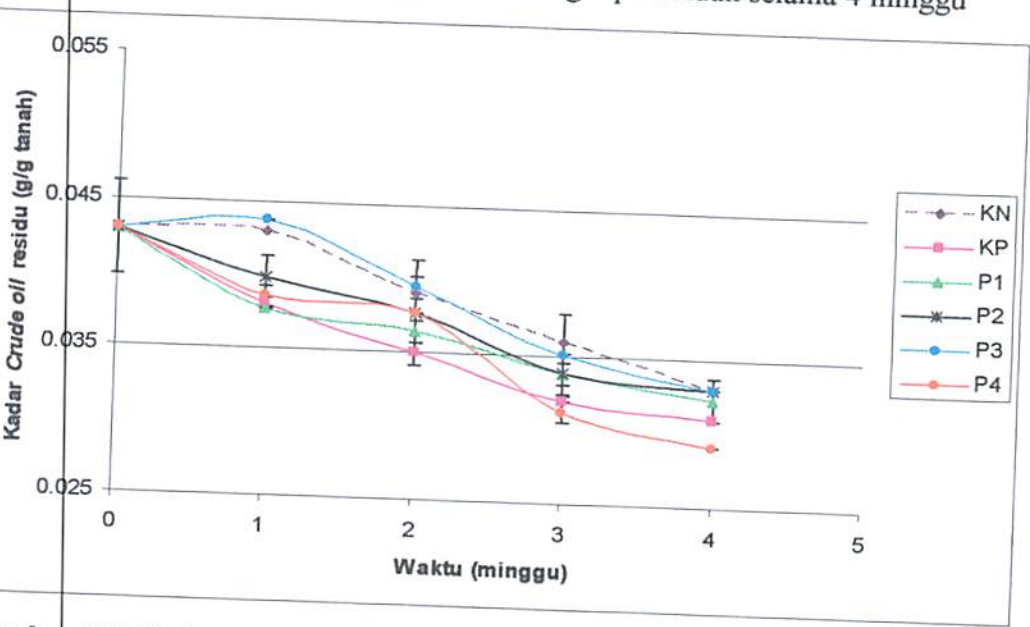
Kombinasi formula lain yang juga dikaji dalam penelitian ini adalah pengaruh keberadaan bakteri fiksasi nitrogen dalam formula konsorsium dalam bioremediasi minyak di

tanah. Bioaugmentasi dengan menggunakan mikroba indogenus tanah dapat menghindari resiko efek antagonistik dari perlakuan penambahan mikroba potensial di tanah. Beberapa bakteri tanah seperti *Azotobacter* dan *Beijerinckia* merupakan mikroba indigenus tanah yang potensial dalam memfiksasi nitrogen. Kemampuan dua bakteri tersebut untuk tumbuh pada kultur dengan substrat minyak dan uji skrining degradasi hidrokarbon poliaromatik dapat diketahui bahwa kedua mikroba tersebut juga tergolong bakteri hidrokarbonoklastik.

Hasil penelitian dari uji pengaruh penambahan bakteri fiksasi nitrogen baik dalam bentuk tunggal maupun gabungan dalam konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik hasil isolasi dari tanah tercemar minyak (Wonocolo dan Depo Pertamina) disajikan pada Gambar 4.8. dan 4.9.



Gambar 5.8. Kurva pertumbuhan pada berbagai perlakuan selama 4 minggu



Gambar 5.9. Kadar crude oil residu pada berbagai perlakuan selama 4 minggu.

Keterangan:

KN = tanah steril + *crude oil*

KP = tanah yang tidak terkontaminasi minyak + *crude oil*

P1 = tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik

P2 = tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik +
Azotobacter chroococcum

P3 = tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik +
Beijerinckia indica

P4 = tanah steril + *crude oil* + konsorsium mikroba hidrokarbonoklastik +
Azotobacter chroococcum dan *Beijerinckia indica*

Dari hasil penelitian diketahui bahwa konsorsium bakteri yang ditambahkan pada sampel tanah tercemar minyak berpotensi dalam mendegradasi minyak. Hal tersebut dibuktikan secara nyata pada hasil data dari sampel tanah dengan perlakuan sterilisasi. Berkurangnya mikroba hidrokarbonoklastik indigenus karena sterilisasi memberikan perbedaan yang nyata dalam pertumbuhan mikroba dan kadar minyak residu jika dibanding dengan sampel tanah dimana masih didapatkan mikroba indigenus.

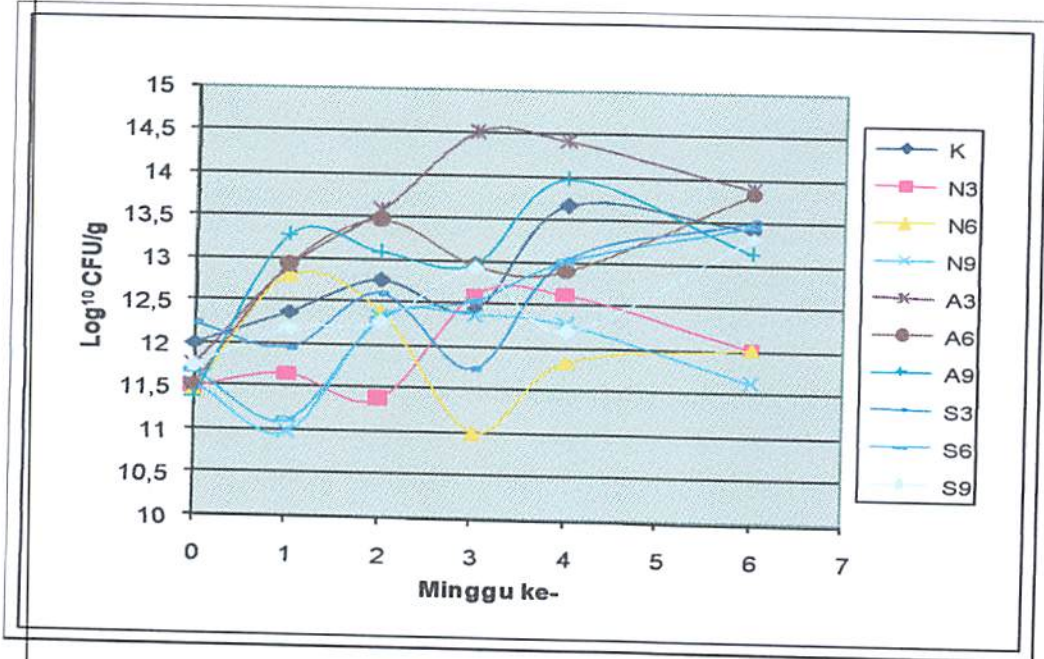
Penambahan bakteri fiksasi nitrogen dalam konsorsium berpengaruh dalam biodegradasi minyak di tanah. Keberadaan kedua bakteri fiksasi nitrogen dengan penambahan *Azotobacter chroococcum* dan *Beijerinckia indica* paling tinggi dalam meningkatkan biodegradasi minyak mentah di tanah.

5.6. Uji bioremediasi minyak mentah dengan variasi jenis dan konsentrasi nutrisi yang diamati pada waktu inkubasi berbeda.

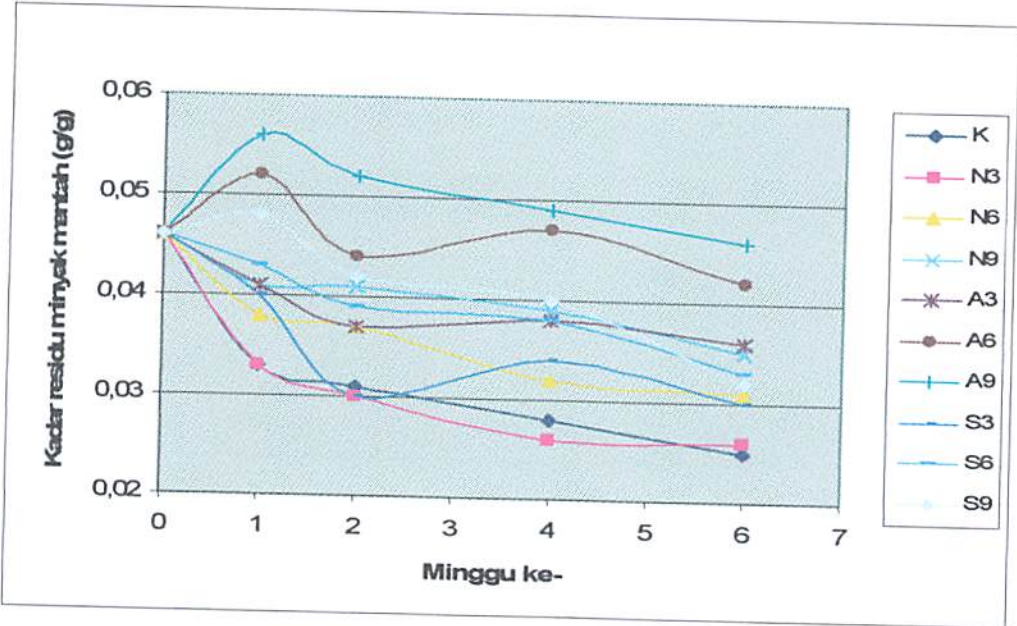
Pertumbuhan mikroba pengurai minyak di tanah dipengaruhi oleh tersedianya nutrisi yang menjamin proses metabolismenya. Salah satu unsur makro yang sangat dibutuhkan oleh mikroba pengurai minyak adalah nitrogen (N), phosphor (P) dan kalium (K). Pada beberapa penelitian terkait bioremediasi minyak menjelaskan pengaruh perbandingan kadar N/P/K di tanah terhadap kecepatan biodegradasinya. Keberadaan unsur makro tersebut dalam bentuk bahan organik dan anorganik serta pengaruh berbagai konsentrasinya dalam biodegradasi minyak mentah di tanah dengan penambahan konsorsium mikroba dilakukan pada penelitian ini. Data hasil penelitian disajikan pada Gambar 4.10. dan Gambar 4.11.

Dari jenis nutrisi yang digunakan, didapatkan hasil yang bervariasi. Pemberian nutrisi dalam bentuk bahan organik ternyata berpengaruh dalam pertumbuhan mikroba pengurai minyak dan mikroba heterotrof indigenus tanah. Hal tersebut jelas terlihat pada pemberian nutrisi dari kotoran ayam (perlakuan A). Akan tetapi, peningkatan jumlah mikroba tersebut tidak berdampak penting dalam berkurangnya kadar minyak dalam sampel tanah. Sumber

nitrogen dari NPK dengan konsentrasi 3% meningkatkan jumlah pertumbuhan mikroba dan menurunkan kadar minyak paling tinggi.



Gambar 5.10. Jumlah total bakteri dalam tanah tercemar minyak mentah dengan penambahan kombinasi jenis dan konsentrasi nutrisi selama waktu inkubasi 6 minggu



Gambar 5.11. Kadar residu minyak mentah dalam tanah tercemar minyak mentah dengan penambahan kombinasi jenis dan konsentrasi nutrisi selama waktu inkubasi 6 minggu

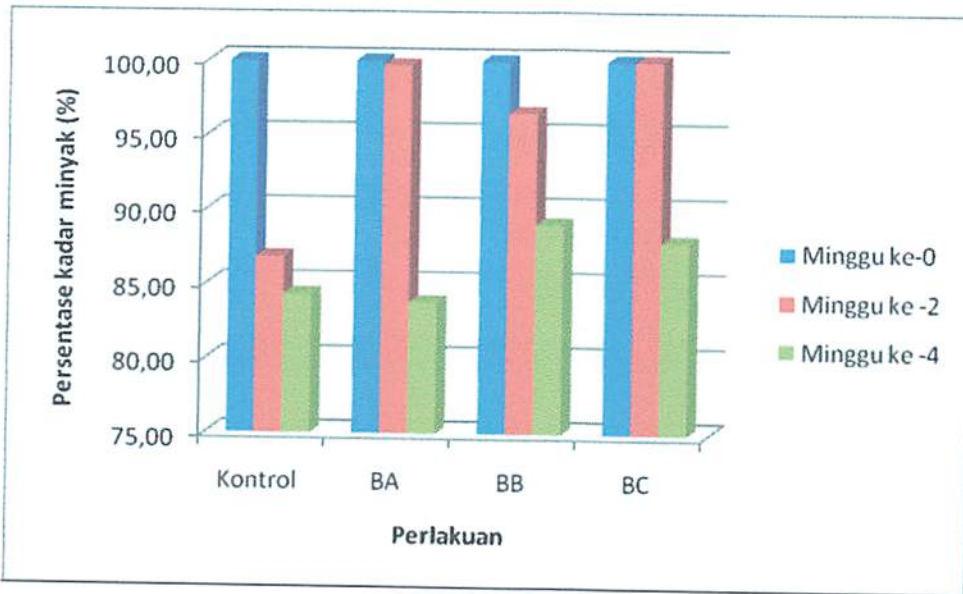
Keterangan :

- K = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik (kontrol)
- N3 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 3% pupuk NPK
- N6 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 6% pupuk NPK
- N9 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 9% pupuk NPK
- A3 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 3% pupuk kotoran ayam
- A6 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 6% pupuk kotoran ayam
- A9 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 9% pupuk kotoran ayam
- S3 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 3% pupuk kotoran sapi
- S6 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 6% pupuk kotoran sapi
- S9 = tanah + minyak mentah + konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik + 9% pupuk kotoran sapi

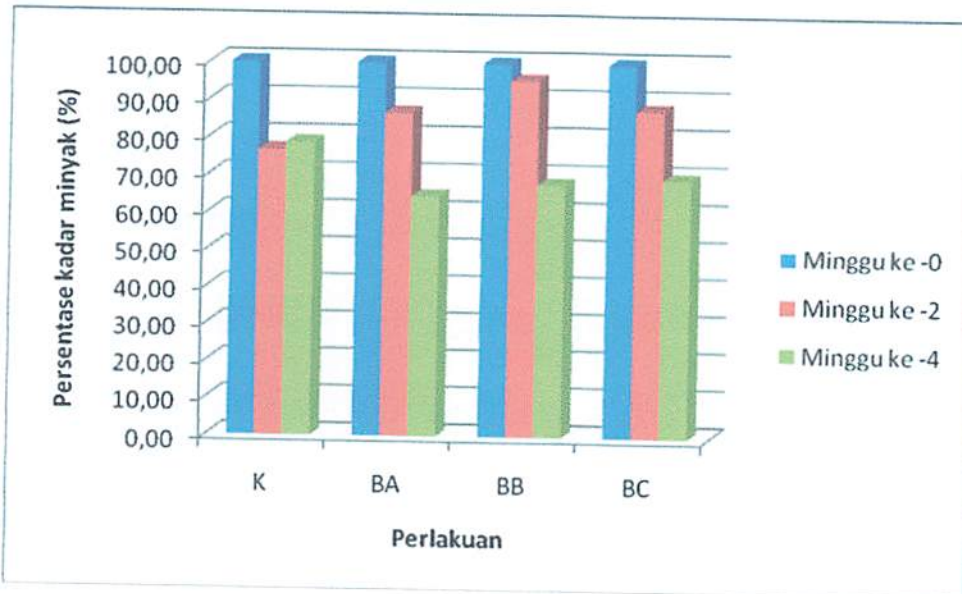
5.7. Uji bioremediasi minyak mentah dengan variasi jenis biosurfaktan yang diamati pada waktu inkubasi berbeda.

Rendahnya kelarutan minyak dalam air menjadi faktor yang membatasi kecepatan degradasinya di lingkungan. Salah satu upaya untuk meningkatkan emulsifikasi minyak di tanah adalah dengan penambahan biosurfaktan. Jenis biosurfaktan, konsentrasi biosurfaktan dan kecocokan biosurfaktan dengan membran mikroba pengurai minyak sangat menentukan kecepatan biodegradasi minyak mentah di tanah.

Efektivitas tiga jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri hidrokarbonoklastik dalam degradasi minyak mentah diuji pada penelitian ini. Biosurfaktan ditambahkan dalam bentuk produk kasar dalam supernatan bakteri. Data uji penambahan biosurfaktan *P. putida* (molase), *Acinetobacter sp.* (molase) dan *P. pseudomallei* (minyak kelapa sawit) disajikan pada Gambar 4.12. dan Gambar 4.13.



Gambar 5.12. Persentase kadar minyak dengan perlakuan penambahan berbagai produk biosurfaktan. BA (*P. putida* pada molase), BB (*Acinetobacter sp.* pada molase) dan BC (*P. pseudomallei* minyak kelapa sawit) pada sampel tanah steril



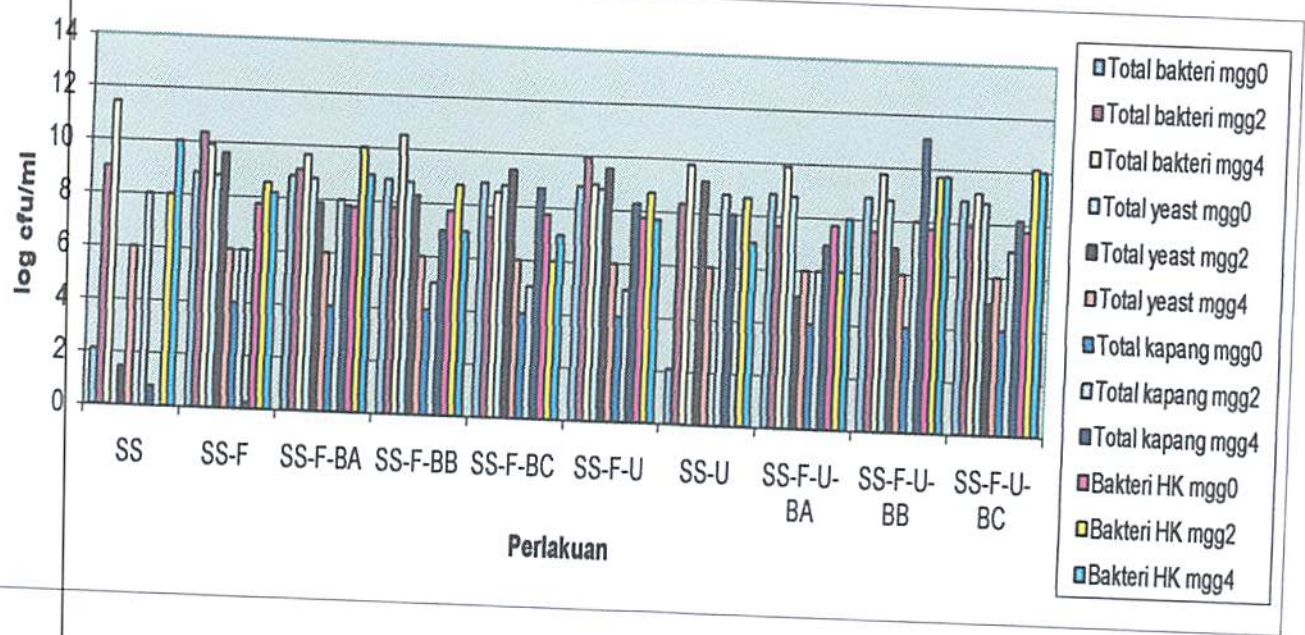
Gambar 5.13. Persentase kadar minyak dengan perlakuan penambahan berbagai produk biosurfaktan. BA (*P. putida* pada molase), BB (*Acinetobacter sp.* pada molase) dan BC (*P. pseudomallei* minyak kelapa sawit) pada sampel tanah non steril

Dari hasil penelitian dengan melakukan berbagai kombinasi perlakuan yang telah diuraikan dalam metode, diketahui bahwa jenis biosurfaktan berpengaruh terhadap degradasi minyak di tanah. Biosurfaktan *P. putida* dengan substrat molase paling efektif dalam uji biodegradasi minyak di tanah setelah 4 minggu inkubasi. Akan tetapi, jika dibanding dengan

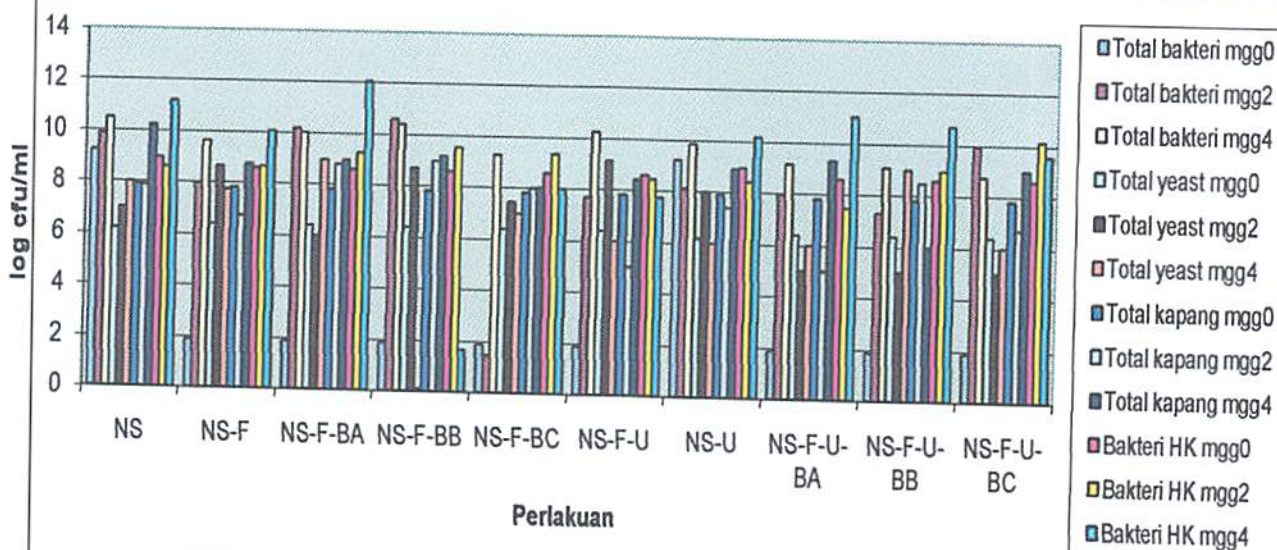
kontrol, penambahan ketiga biosurfaktan tidak memberikan hasil yang lebih baik dibanding kontrol setelah 2 minggu inkubasi. Faktor yang mempengaruhi hal tersebut antara lain adalah : konsentrasi biosurfaktan yang ditambahkan pada perlakuan, perbedaan kemampuan mobilitas emulsi yang terbentuk antara biosurfaktan dengan minyak mentah di tanah, dan kecocokan antara emulsi minyak dengan membrane sel mikroba pengurai minyak. Uji penambahan biosurfaktan dengan konsentrasi sama, kurang dan lebih dari CMC sangat dibutuhkan.

5.8. Uji bioremediasi minyak mentah dengan gabungan metode biostimulasi, bioaugmentasi dan penambahan biosurfaktan yang diamati pada waktu inkubasi berbeda.

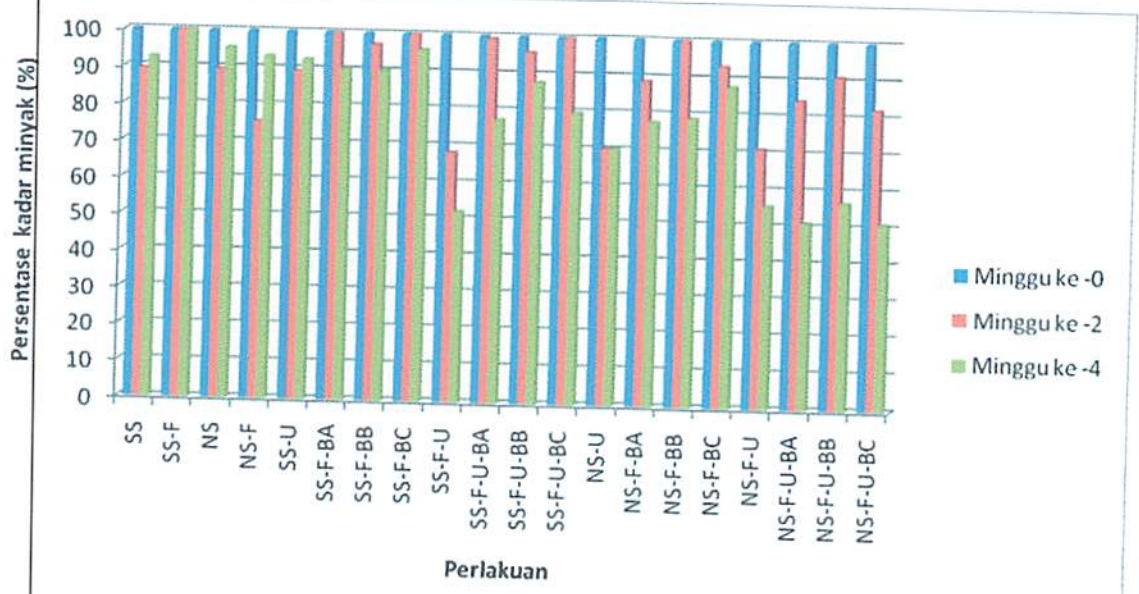
Penggabungan metode bioaugmentasi, biostimulasi dan penambahan biosurfaktan dalam biodegradasi minyak di tanah dilakukan dengan tujuan mengetahui kombinasi perlakuan yang terbaik dalam degradasi minyak mentah. Uji dilakukan dengan menggunakan sampel tanah yang disterilkan dan tidak disterilkan. Data hasil penelitian berupa data jumlah total mikroba yang diuraikan dengan menghitung jumlah total mikroba (bakteri, yeast, kapang) heterotrofik dan bakteri hidrokarbonoklastik serta persentase kadar minyak residu dalam sampel tanah, disajikan berturut – turut pada Gambar 5.14, 5.15. dan 5.16.



Gambar 5.14. Grafik Total Plate Count (TPC) mikroba heterotrofik (bakteri, yeast dan kapang) dan bakteri hidrokarbonoklastik (log waktu inkubasi 0,2,4 minggu) pada perlakuan tanah steril



Gambar 5.15. Grafik Total Plate Count (TPC) mikroba heterotrofik (bakteri, yeast dan kapang) dan bakteri hidrokarbonoklastik (log waktu inkubasi 0,2,4 minggu) pada perlakuan tanah non steril



Gambar 5.16. Kadar minyak residu dalam berbagai perlakuan yang diamati dalam 0,2, dan 4 minggu inkubasi

Dari gambar 5.16. diketahui bahwa gabungan perlakuan penambahan konsorsium mikroba, nutrisi dan biosurfaktan memberikan hasil yang paling efektif dalam menurunkan kadar minyak mentah di tanah.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6. 1. Kesimpulan

1. Mikroba potensial pendegradasi minyak dari kelompok bakteri dan khamir hasil isolasi dari tanah tercemar minyak di depo Pertamina, Tanjung Perak Surabaya dan pengeboran minyak rakyat desa Wonocolo, Kecamatan Kedewan, Kabupaten Bojonegoro yaitu dari genus *Acinetobacter* (1 spesies), *Actinobacillus* (1 spesies), *Aeromonas* (1 spesies), *Flavobacterium* (1 spesies), dan *Pseudomonas* (6 spesies), *Candida* (3 spesies) dan *Rhodotorulla* (1 spesies).
2. Bakteri dan khamir hasil isolasi memiliki variasi kemampuan degradasi seyawa hidrokarbon dalam minyak mentah.
3. Bakteri dan khamir hasil isolasi memiliki variasi kemampuan menghasilkan biosurfaktan dengan jenis substrat berbeda.
4. Konsorsium mikroba hasil isolasi berpotensi dalam mendegradasi minyak mentah
5. Jenis mikroba, konsentrasi inokulum, dan penambahan nutrisi tidak berpengaruh signifikan /kurang efektif dalam meningkatkan bioremediasi pada kondisi tanah tercemar minyak yang sudah mengandung keanekaragaman mikroba hidrokarbonoklastik yang tinggi.
6. Penambahan bakteri fiksasi nitrogen berpengaruh dalam meningkatkan bioremediasi tanah tercemar minyak
7. Waktu inkubasi berpengaruh nyata dalam bioremediasi tanah tercemar minyak mentah
8. Biosurfaktan *Pseudomonas putida* dalam molase efektif digunakan dalam bioremediasi tanah tercemar minyak mentah
9. Gabungan metode biostimulasi dengan NPK (3%), konsorsium mikroba (bakteri dan khamir), dan penambahan biosurfaktan efektif meningkatkan biodegradasi dalam upaya bioremediasi tanah tercemar minyak.

6.2. SARAN

- 1) Mengaplikasikan konsorsium mikroba pengurai minyak yang terdiri dari gabungan bakteri dan khamir untuk digunakan dalam uji bioremediasi tanah tercemar minyak mentah secara *in situ*

- 2) Menguji efektivitas penggunaan formulasi konsorsium mikroba minyak untuk pengolahan limbah hidrokarbon yang bersumber dari kegiatan domestik maupun limbah industri
- 3) Melakukan uji potensi berbagai jenis dan konsentrasi biosurfaktan dalam memobilisasi minyak di tanah guna mengungkap peran biosurfaktan dalam meningkatkan aksesibilitas substrat minyak di tanah
- 4) Mengungkap kinetika produksi biosurfaktan bakteri *Pseudomonas putida* dengan substrat molase untuk tujuan komersial

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1999. **Biodegradation and Bioremediation**. Second Edition. Academic Press.
- Alley, J.F. and Brown, L.R. 2000. Use of Sublimation to Prepare Solid Microbial Media with Water- Insoluble Substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, p.439-442.
- Atlas, R.M. 1992. Petroleum Microbiology. **Encyclopedia of Microbiology**. Vol. 39. Academic Press, Inc. California.
- Atlas, R dan Bartha, R. 1985. **Microbial Ecology**. London. The Benjamin/Cummings Publishing.
- Atlas, R dan Bartha, R. 1998. **Microbial Ecology: Fundamental and Application**. London. The Benjamin/Cummings Publishing.
- Baker, C. and Herson, D. 1994. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc. USA.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons. **Biodegradation**. 3: 351-365.
- Choliah, D. 2002. **Biodiversitas Logam Berat Cr (III) pada Industri Limbah Kulit**. Skripsi, FMIPA UNAIR.
- Desai J.D. and I.M. Banat. 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 47-64 Vol.61. No.1.
- Gandjar G. 1989. **Pencemaran Senyawa Hidrokarbon**. PAU Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Gibson, D.T., and V. Subramanian. 1984. Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons. **In Microbial Degradation of Organic Compounds**, D.T. Gibson, (ed). Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 182-252.
- Gordon, R. 1994. **Bioremediation and Its Application to Exxon Valdez Oil Spill in Alaska**. <http://www.geocities.com/capecanaveral/Lab/2094>. Diakses tanggal 28 Desember 2007
- Ghoshwami, P. and Singh, H.D., 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* spesies. **Biotechnology and Bioengineering**. 37: 1 – 11.
- Iadi, S. N. 2008. **Degradasi Minyak Bumi via "Tangan" Mikroorganisme**. <http://www.google.com>. Diakses tanggal 14 Nopember 2008.
- Iutagalung, H. P. 1990. **Pengaruh Minyak Mineral Terhadap Mikroorganisme Laut**. Oseana. Vol.XV No. 1. LIPI. Puslitbang Oseanologi. Jakarta.

- Korda, A. Santos, P., Tenente, A., and Santas, R. 1997. **Petroleum Hydrocarbon Bioremediation: Sampling and Analytical Technique, in Situ Treatments and Commercial Microorganisms Currently Used.** Applied Microbial Biotechnology.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environments. *Microbiol. Rev.* Vol. 54 No. 3: 305-315.
- Manahan, S. E. 1992. **Environmental Chemistry.** 3th edition. Williard Grant Press. Boston Massachusetts.
- Munawar, Mukhtasor, dan Surtiningsih, T. 2007. **Bioremediasi Tumpahan Minyak Mentah dengan Metode Biostimulasi Nutrien Organik di Lingkungan Pantai Surabaya Timur.** Berk. Penel. Hayati: 13 (91-96)
- Ni'matuzahroh. 1998. Biodegradation des hydrocarbures polyaromatiques par la bactéries marines *Sphingomonas sp.* 2MPII. **Thèse de Doctorat.** Université d'Aix Marseille II. France.
- Ni'matuzahroh. 2008. **Kajian Mikroba dalam Bioremediasi Limbah Pencemar.** *Proceeding Seminar Nasional Biodiversitas II Departemen Biologi Universitas Airlangga Surabaya.*
- Nugroho, A. 2006. **Bioremediasi Hidrokarbon Minyak bumi.** Graha Ilmu. Jakarta.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi.** Universitas Indonesia Press, Jakarta. 447-508.
- Rahmawati, N. 2005. **Pemanfaatan Biofertilizer pada Pertanian Organik.** Fakultas Pertanian Sumatera Utara. Medan.
- Schmidt, S. 1985. **Fuel Oil Manual.** 4th edition. Industry Press Inc. New York.
- Venosa, A. D. and Zhu, X. 2003. **Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Fresh Water Wetlands.** *Spill Science and Technology Bulletin*, 8(2):163-178.
- Yuwono, N. W. 2006. **Pupuk Hayati.** Artikel dari situs <http://www.ugm.ac.id>. Diakses tanggal 2 Maret 2008.

LAMPIRAN

Lampiran 1: Lokasi penambangan minyak tradisional Ds. Wonocolo Kec. Kedewan, Bojonegoro

Lokasi penambangan minyak tradisional di Ds. Wonocolo Kec. Kedewan Bojonegoro, tempat pengambilan sampel tanah yang digunakan untuk: (a) substrat perlakuan bioremediasi, (b) isolasi mikroba hidrokarbonoklastik.



Lampiran 2: Tanah yang digunakan sebagai substrat bioremediasi

Tanah yang digunakan sebagai substrat perlakuan bioremediasi dalam penelitian.

- a. tanah berwarna kuning
- b. tanah berwarna hitam

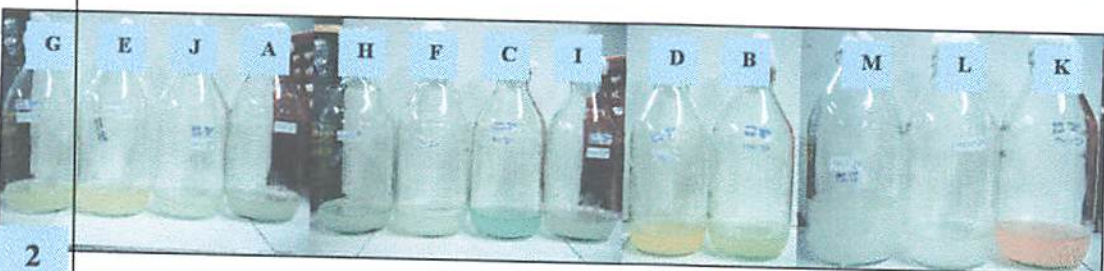
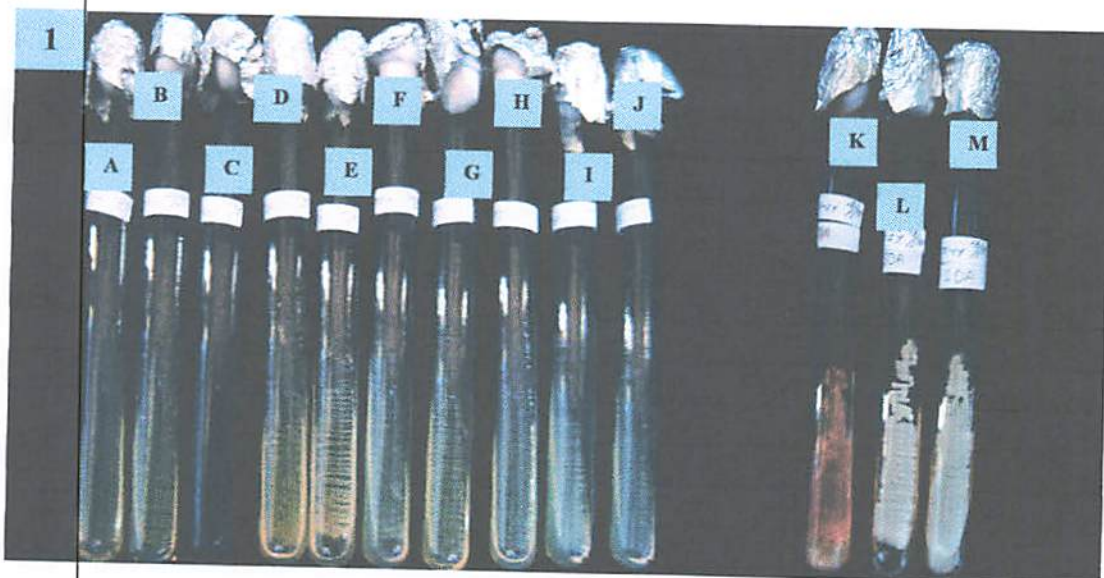


Tanah berwarna kuning dan hitam yang digunakan sebagai substrat perlakuan bioremediasi setelah diayak dengan mess.

- a. sebelum dicampur
- b. sesudah dicampur dengan perbandingan 1:1



Lampiran 3: Isolat bakteri dan khamir hidrokarbonoklastik beserta suspensinya



Keterangan:

1. Isolat mikroba dalam media miring
2. Suspensi tiap isolat mikroba
3. Konsorsium mikroba

- A. *Aeromonas hydrophila*
- B. *Pseudomonas putida*
- C. *Pseudomonas aeruginosa*
- D. *Flavobacterium meningosepticum*
- E. *Acinetobacter faecalis-type II*
- F. *Pseudomonas cepacia*
- G. *Actinobacillus sp.*
- H. *Pseudomonas stutzeri*
- I. *Pseudomonas pseudomallei*
- J. *Pseudomonas fluorescens-25*
- K. *Rhodotorula mucilaginosa*
- L. *Candida parapsilosis*
- M. *Candida famata*

- a. Konsorsium mikroba jenis B (Bakteri)
- b. Konsorsium mikroba jenis K (Khamir)
- c. Konsorsium mikroba jenis BK (Bakteri-Khamir)

Lampiran 4. Karakteristik morfologi koloni mikroba hasil isolasi dari tanah tercemar minyak

No.	Kode isolate>Nama spesies	Karakteristik koloni
A. BAKTERI		
1.	T1-2	Bentuk bulat, tepi tidak rata, datar, berpendar transparan
2.	T1-4	Bentuk bulat, rata, cembung, kekuningan, berpendar, ukuran 8.kecil
3.	T1-8	Bulat, rata, kecil, kuning
4.	T2-4	Bulat, transparan, berpendar, media kultur menjadi biru
5.	T3-3	Bulat, rata, cembung, transparan, putih
6.	P1-2	Bulat, tepi tidak rata, datar, diameter 4 mm, krem, mengkilat
7.	P1-4	Bulat, tepi rata, cembung, mengkilat, transparan, berpendar, diameter 1 mm
8.	P2-1	Bentuk bulat - tidak beraturan, tepi rata, datar, krem, mengkilat, diameter 2-4 mm
9.	P3-4	Bulat, tepi rata licin, cembung, kuning, mengkilat, diameter 4 mm
10.	P3-7	Bulat, konsentris, tepi rata, seperti kawah, mengkilat, krem, diameter 4 mm
11.	P3-8	Bentuk tidak beraturan/menyebar, tepi berombak, datar, berpendar, transparan
12.	P4-2	Bentuk menyebar, tidak beraturan, tepi berombak, datar, transparan, berpendar
13.	P4-4	Bulat, tepian berombak, timbul, transparan, mengkilat,berpendar, diameter 2-4 mm
B. YEAST		
14.	T5-1Y	Bulat, cembung, rata, mengkilat, putih, transparan, putih
15.	P1-2Y	Bulat, tepi licin, cembung, mengkilat, krem, diameter 2 mm
16.	P3-3Y	Bulat, tepi rata licin, cembung, mengkilat, putih, diameter 2-4 mm.

Lampiran 5. Karakteristik morfologi dan fisiologis bakteri hidrokarbonoklastik (memberikan hasil positif pada uji degradasi hidrokarbon poliaromatik) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak di lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro dan Depo Pertamina Surabaya

No.	Karakteristik	Kode isolat					
		P3(8) batang	P4(2) batang	T1(2) batang	T1(4) batang	T1(8) batang	T2(4) batang
1.	Cell form	-	-	-	-	-	-
2.	Gram reaction	-	-	-	-	-	-
3.	OXI (Oxidase)	+	+	+	+	+	+
4.	MOT (Motility)	+	+	+	+	+	+
5.	NIT (Nitrate Reduction)	+	+	+	+	-	+
6.	LYS (Lysine Decarboxylase)	+	-	+	-	+	-
7.	ORN (Ornithine Decarboxyl)	-	-	-	-	-	-
8.	H ₂ S (H ₂ S Production)	-	+	+	+	+	+
9.	GLU (Acid from Glucose)	-	+	-	+	-	-
10.	MAN (Acid from Mannitol)	-	+	+	+	-	-
11.	XYL (Acid from Xylose)	-	+	+	+	-	-
12.	ONP (ONPG)	-	+	-	+	-	+
13.	IND (Indole)	-	+	-	+	-	-
14.	UR (Urea Hydrolysis)	-	+	-	+	-	+
15.	VP (Voges Proskauer)	-	+	-	-	-	-
16.	CIT (Citrate Utilization)	+	-	+	-	+	+
17.	TDA (Tryptophan Deaminase)	-	-	-	-	-	-
18.	GEL (Gelatin Liquefaction)	-	-	+	-	-	-
19.	MAL (Malonate Inhibition)	-	+	-	-	-	+
20.	INO (Acid from Inositol)	-	+	-	-	-	-
21.	SOR (Acid from Sorbitol)	-	-	-	+	-	-
22.	RHA (Acid from Sorbitol)	-	+	-	-	-	-
23.	SUC (Acid from Sucrose)	-	+	-	-	-	-
24.	LAC (Acid from Lactose)	-	+	-	-	-	-
25.	ARA (Acid from Arabinose)	-	+	-	+	-	-
26.	ADO (Acid from Adonitol)	-	-	-	-	-	-
27.	RAF (Acid from Raffinose)	-	+	-	-	-	-
28.	SAL (Acid from Salicin)	-	+	-	+	-	-
29.	ARG (Arginin Dihydrolase)	+	+	+	-	+	+

Lampiran 6. Karakteristik morfologi dan fisiolog bakteri hidrokarbonoklastik (memberikan hasil negatif pada uji degradasi hidrokarbon poliaromatik) hasil isolasi dari tanah tercemar minyak di lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro dan Depo Pertamina Surabaya

No.	Karakteristik	Kode isolat						
		P3(4) batang	P3(7) batang	P2(1) batang	P4(4) batang	P1(2) batang	P1(4) batang	T3(3) batang
1.	Cell form	-	-	-	-	-	-	-
2.	Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+
3.	OXI (Oxidase)	+	+	+	+	+	+	+
4.	MOT (Motility)	-	-	-	+	-	+	-
5.	NIT (Nitrate Reduction)	-	-	-	+	+	+	-
6.	LYS (Lysine Decarboxylase)	-	-	-	+	+	+	-
7.	ORN (Ornithine Decarboxyl)	-	-	-	-	-	-	-
8.	H ₂ S (H ₂ S Production)	+	-	-	-	-	-	-
9.	GLU (Acid from Glucose)	-	-	-	+	+	+	-
10.	MAN (Acid from Mannitol)	-	-	-	-	-	-	-
11.	XYL (Acid from Xylose)	+	+	-	+	+	+	-
12.	ONP (ONPG)	-	-	-	-	-	-	+
13.	IND (Indole)	+	+	-	+	-	+	-
14.	UR (Urea Hydrolysis)	-	-	-	-	-	-	-
15.	VP (Voges Proskauer)	-	-	-	-	-	-	-
16.	CIT (Citrate Utilization)	-	-	-	+	+	-	-
17.	TDA (Tryptophan Deaminase)	-	-	-	-	-	-	-
18.	GEL (Gelatin Liquefaction)	-	-	-	-	-	-	-
19.	MAL (Malonate Inhibition)	-	-	-	+	+	-	-
20.	INO (Acid from Inositol)	-	-	-	-	-	-	-
21.	SOR (Acid from Sorbitol)	-	-	-	-	-	-	-
22.	RHA (Acid from Sorbitol)	-	-	-	-	-	-	-
23.	SUC (Acid from Sucrose)	-	-	+	-	-	-	-
24.	LAC (Acid from Lactose)	+	-	-	+	+	+	-
25.	ARA (Acid from Arabinose)	-	-	-	-	-	-	-
26.	ADO (Acid from Adonitol)	-	-	-	-	-	-	-
27.	RAF (Acid from Raffinose)	-	-	-	-	-	-	-
28.	SAL (Acid from Salicin)	-	-	-	-	-	-	-
29.	ARG (Arginin Dihydrolase)	-	-	-	-	-	+	-

Lampiran 7. Hasil uji Karakteristik fisiolog yeast hidrokarbonoklastik hasil isolasi dari tanah tercemar minyak di lokasi pengeboran minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro dan Depo Pertamina Surabaya

No	Biochemical details	Isolate Code		
		T5-1Y	P1-2Y	P3-3Y
1.	LysA	-	-	-
2.	IMLTa	+	+	-
3.	LeuA	+	+	+
4.	ARG	+	+	+
5.	ERYa	-	-	-
6.	GLYla	+	-	+
7.	TyrA	-	+	-
8.	BNAG	-	-	-
9.	ARBa	+	-	-
10.	AMYa	-	-	-
11.	dGALa	+	+	+
12.	GENa	+	+	-
13.	dGLUa	+	+	+
14.	LACa	-	-	-
15.	MAdGa	+	-	+
16.	dCELa	+	-	-
17.	GGT	-	-	-
18.	dMALa	+	-	+
19.	dRAFa	+	+	-
20.	NAGA1	-	-	-
21.	dMNEa	+	+	+
22.	dMELa	-	-	-
23.	dMLZa	+	-	+
24.	ISBEa	-	-	+
25.	IRHAa	-	-	-
26.	XLTa	+	-	-
27.	dSORa	+	+	+
28.	SACa	+	+	+
29.	URE	+	+	+
30.	AGLU	+	-	+
31.	dTURa	+	-	+
32.	dTREa	+	-	+
33.	NO3a	-	+	-
34.	IARAA	+	-	+
35.	dGATa	-	+	-
36.	ESC	-	-	-
37.	IGLTa	+	+	+
38.	dXYLa	+	-	+
39.	LATa	-	-	-
40.	ACEa	+	+	+
41.	CITa	-	-	+
42.	GRATas	-	+	-
43.	IPROa	+	+	+
44.	2KGa	+	-	+
45.	NAGa	+	-	+
46.	dGNTa	+	+	+

Lampiran 8. Hasil penghitungan jumlah total koloni mikroba pada uji pertumbuhan perbedaan formula konsorsium pada kultur cair dengan substrat minyak mentah dan solar pada 0 dan 7 hari inkubasi

a) Pada substrat minyak mentah

Hari	Uraian	Jumlah mikroba penyusun konsorsium pada masing-masing perlakuan			Log jumlah mikroba penyusun konsorsium pada masing-masing perlakuan		
		F1	F2	F3	F1	F2	F3
0	Jumlah total bakteri	44. 10 ⁶	28,2. 10 ⁶	86,9. 10 ⁶	7,643	7,450	7,939
	Jumlah total yeast	17. 10 ⁶	8,8. 10 ⁶	24,7. 10 ⁶	7,230	6,944	7,393
	Jumlah total mikroba	61. 10 ⁶	37. 10 ⁶	111,6.10 ⁶	7,785	7,568	8,048
7	Jumlah total bakteri	14,3. 10 ⁷	51,4. 10 ⁷	45,1.10 ⁷	8,155	8,711	8,654
	Jumlah total yeast	55,3. 10 ⁷	44,5 10 ⁷	59,4.10 ⁷	8,743	8,648	8,774
	Jumlah total mikroba	69,6. 10 ⁷	95,9. 10 ⁷	104,5. 10 ⁷	8,843	8,982	9,019

b) Pada substrat minyak solar

Hari	Uraian	Jumlah mikroba penyusun konsorsium pada masing-masing perlakuan			Log jumlah mikroba penyusun konsorsium pada masing-masing perlakuan		
		F1	F2	F3	F1	F2	F3
0	Jumlah total bakteri	44. 10 ⁶	28,2. 10 ⁶	86,9. 10 ⁶	7,643	7,450	7,939
	Jumlah total yeast	17. 10 ⁶	8,8. 10 ⁶	24,7. 10 ⁶	7,230	6,944	7,393
	Jumlah total mikroba	61. 10 ⁶	37. 10 ⁶	111,6.10 ⁶	7,785	7,568	8,048
7	Jumlah total bakteri	65,9. 10 ⁷	132,4. 10 ⁷	300.10 ⁷	8,819	9,122	9,477
	Jumlah total yeast	19,0. 10 ⁷	3,4. 10 ⁷	27.10 ⁷	8,279	7,531	8,431
	Jumlah total mikroba	94,9. 10 ⁷	135,8 10 ⁷	327. 10 ⁷	8,977	9,133	9,515

eterangan :

- = formula konsorsium mikroba dengan 3 jenis bakteri dan 3 jenis yeast
- = formula konsorsium mikroba dengan 6 jenis bakteri dan 3 jenis yeast
- = formula konsorsium mikroba dengan 12 jenis bakteri dan 3 jenis yeast

Lampiran 9. Dominansi mikroba selama uji pertumbuhan perbedaaan formula konsorsium pada kultur cair dengan substrat minyak mentah dan solar pada 0 dan 7 hari inkubasi

No.	Perlakuan	Dominansi	
		Bakteri	Yeast
Minyak mentah			
	F1	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. cepacea</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. pseudomallei</i> <i>Azotobacter</i>	<i>C. famata</i> <i>C. parapsilosis</i>
	F2	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. cepacea</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. pseudomallei</i> <i>P. fluorescens</i>	<i>C. famata</i> <i>C. parapsilosis</i>
	F3	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. pseudomallei</i>	<i>C. famata</i> <i>C. parapsilosis</i>
Solar			
	F1	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. cepacea</i> <i>P. pseudomallei</i>	<i>C. famata</i> <i>C. parapsilosis</i>
	F2	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. pseudomallei</i> <i>P. fluorescens</i>	<i>C. famata</i> <i>C. parapsilosis</i>
	F3	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. pseudomallei</i>	<i>C. famata</i> <i>C. parapsilosis</i>

Ceterangan :

- 1 = formula konsorsium mikroba dengan 3 jenis bakteri dan 3 jenis yeast
- 2 = formula konsorsium mikroba dengan 6 jenis bakteri dan 3 jenis yeast
- 3 = formula konsorsium mikroba dengan 12 jenis bakteri dan 3 jenis yeast

Lampiran 10. Data Skrening Produksi Biosurfaktan Bakteri dan Khamir Hasil Isolasi dari Tanah Tercemar Minyak

Nomor Isolat / substrat	TPC (Total Plate Count) (cfu/ml)		Biomassa sel(g)		PH akhir	Deteksi Biosurfaktan								TP
	Awal	Akhir	Awal	Akhir		AE 1h				AE 24h				
						S%	M%	K%	C%	S%	M%	K%	C%	
<i>Acinetobacter sp.</i> P2(1)/ S	368x10 ³	<3.0x10 ³	nd	nd	6,54	0	0	0	0	0	0	0	0	47
<i>Acinetobacter sp.</i> P2(1)/ M	>3.0x10 ⁵	2.5x10 ⁸	nd	0,0283	5,31	56,18	46,56	42,15	56,99	43,42	43,92	37,12	56,79	46,4
<i>Acinetobacter sp.</i> P2(1)/MO	(3.7x10 ⁵)	1.6x10 ¹⁰	nd	0,1406	5,7	38,38	10,68	34,65	11,14	31,2	2,6	34,65	11,14	43
<i>Actinobacillus sp.</i> P3(7) /S	8.8x10 ⁸	<3.0x10 ⁸ (4.0x10 ⁷)	nd	nd	6,56	0	0	0	9,69	0	0	0	13,77	37,3
<i>Actinobacillus sp.</i> P3(7)/M		<3.0x10 ⁷ (1.0x10 ⁷)	nd	0,0018	6,45	14	0	0	23,96	19,19	0	14,89	14,75	39,3
<i>Actinobacillus sp.</i> P3(7) /MO		<3.0x10 ¹⁰ (7.0x10 ⁹)	nd	0,3367	5,84	0	0	14,04	85,26	0	0	0	100	51,2
<i>P. cepaceae</i> P3(4) /S	2.6x10 ¹⁰	<3.0x10 ⁵	nd	nd	6,51	0	0	0	11,26	0	0	0	9,91	43,8
<i>P. cepaceae</i> P3(4) /M		1.2x10 ⁸	nd	0,0992	5,89	0	0	11,16	86,67	0	0	13,11	100	41,2
<i>P. cepaceae</i> P3(4) /MO		9.4x10 ⁵	nd	0,3906	6,31	0	0	13,67	27,67	0	0	0	10,67	46,3
<i>Aeromonas sp.</i> T1(4)/S	1.6x10 ⁶	<3.0x10 ¹¹ (1.0x10 ¹¹)	nd	nd	6,55	5,65	0	7,14	26,02	0	39,57	5,35	7,4	46
<i>Aeromonas sp.</i> T1(4)/M		4.6x10 ⁹	nd	0,1113	4,88	40,39	43,22	6,43	3,06	32,03	29,39	6,21	3,06	46,1
<i>Aeromonas sp.</i> T1(4)/MO		>3.0x10 ¹⁰ (3.3x10 ¹⁰)	nd	0,1284	5,94	38,74	47,1	26,93	16,67	21,45	35,49	5,23	3,96	50,4
<i>P. putida</i> T1(8)/S	1.2x10 ⁷	>3.0x10 ⁶ (1.4x10 ⁷)	nd	nd	6,27	10,56	54,04	0	49,3	7,75	42,88	0	13,77	50,6
<i>P. putida</i> T1(8)/M		1.2x10 ⁹	nd	0,0404	5,55	36,06	44,35	38,6	56,69	28,79	39,27	43,98	45,11	40,7
<i>P. putida</i> T1(8)/MO		2.8x10 ⁹	nd	0,0963	5,7	8,82	43.62	45,24	43,54	5,51	35,46	44,9	3,84	40,6
<i>P. pseudomallei</i> P4(2)/S	3.0x10 ⁴	4.9x10 ⁷	nd	nd	6,46	17,55	65,1	0	48,18	9,26	40,48	0	0,35	51,6
<i>P. pseudomallei</i> P4(2)/M		<3.0x10 ¹¹ (6.0x10 ¹⁰)	nd	nd	4,82	26,51	12,95	24,52	7,78	18,64	13,09	17,45	3,94	44,4
<i>P. pseudomallei</i> P4(2)/MO		<3.0x10 ⁹ (4.0x10 ⁸)	nd	0,0791	5,79	41,43	46,26	38,56	17,47	37,1	38,18	38,56	4,3	45,2
<i>Candida parapsilopsis</i> P3-3(1)y/S	4.0x10 ⁹	>3.0x10 ⁶	nd	0,0408	6,08	0	0	9,22	25,11	0	0	0	20,7	43,3

<i>Candida parapsilopsis</i> P3-3(1)y/M		>3.0x10 ⁸	nd	0,1194	5,69	0	0	5,94	100	0	0	7,92	100	43,6
<i>Candida parapsilopsis</i> P3-3(1)y/MO		>3.0x10 ⁵	nd	0,1013	6,27	0	0	7,14	100	0	0	9,18	100	52,2
<i>Rhodotorulla</i> P1-2y/S	1.6x10 ¹¹	<3.0x10 ⁶	nd	0,0026	6,38	0	0	8,82	5,9	0	0	0	4,54	45,1
<i>Rhodotorulla</i> P1-2y/M		<3.0x10 ⁸	nd	0,0158	6,35	0	0	0	13,33	0	0	0	11,42	46,8
<i>Rhodotorulla</i> P1-2y/MO		>3.0x10 ⁷	nd	0,2793		0	0	0	100	0	0	0	100	46,8
<i>Candida famata</i> T5-1y/S	1.2x10 ⁶	2.8x10 ⁶	nd	nd	6,26	5,6	43,01	0	45,03	1,83	40,53	0	0	45,2
<i>Candida famata</i> T5-1y/M		4.3x10 ⁷	nd	0,0086	6,17	45,17	44,34	49,06	48,49	1,28	38,95	0	48,16	45,6
<i>Candida famata</i> T5-1y/MO		7.2x10 ¹¹	nd	nd	6,19	0	0	8,66	15,59	0	41,18	6,38	5,3	46,5
T3-5(1)y/S	1.8x10 ⁵	1.0x10 ⁶	nd	0,0339	5,99	13,67	51,25	1,25	70,77	6,02	41,59	3,18	0,67	45,5
T3-5(1)y/M		1.8x10 ¹¹	nd	nd	4,95	6,05	0	7,74	0	6,15	0	7,79	0	43,9
T3-5(1)y/MO		>3.0x10 ¹³ (7.0x10 ¹³)	nd	nd	5,98	3,8	0	16,51	0	3,8	0	16,45	0	49,4

Keterangan :

AE = Aktivitas emulsifikasi diukur dari nilai kestabilan emulsi minyak uji oleh biosurfaktan dalam supernatan kultur

AE1 h = Kestabilan emulsi minyak uji yang diukur selama 1 jam inkubasi

AE 24 h = Kestabilan emulsi minyak uji yang diukur selama 24 jam inkubasi

TP = Tegangan permukaan supernatan kultur, diukur dengan Tensiometer Du Nouy

Nd = data tidak terdeteksi

Lampiran 11: Total Plate Count (TPC) mikroba heterotrofik (bakteri, yeast, dan kapang) dan bakteri hidrokarbonoklastik

(log cfu/ml) selama waktu inkubasi 0, 2 dan 4 minggu pada perlakuan tanah steril dan non steril

	Total bakteri mgg0	Total bakteri mgg2	Total bakteri mgg4	Total yeast mgg0	Total yeast mgg2	Total yeast mgg4	Total kapang mgg0	Total kapang mgg2	Total kapang mgg4	Bakteri HK mgg0	Bakteri HK mgg2	Bakteri HK mgg4
NS	9,208	9,873	10,483	6,176	7	8	7,904	7,893	10,217	8,956	8,594	11,182
NS-F	1,875	7,973	9,624	6,4	8,637	7,74	7,824	6,74	8,74	8,588	8,653	10,06
NS-F-B _A	1,875	10,175	10	6,4	6	8,954	7,824	8,778	8,939	8,588	9,234	12,03
NS-F-B _B	1,875	10,585	10,388	6,4	8,699	0,106	7,824	8,975	9,177	8,588	9,531	1,644
NS-F-B _C	1,875	1,465	9,27	6,4	7,44	7	7,824	8	8,021	8,588	9,34	8
NS-F-U	1,875	7,694	10,236	6,4	9,122	6	7,824	5	8,419	8,588	8,43	7,74
NS-U	9,208	8,12	9,858	6,176	8	6	7,904	7,398	8,891	8,956	8,419	10,176
NS-F-U-B _A	1,875	7,94	9,143	6,4	5	6	7,824	5	9,301	8,588	7,477	11,04
NS-F-U-B _B	1,875	7,301	9,06	6,4	5	9	7,824	8,477	6	8,588	8,944	10,699
NS-F-U-B _C	1,875	9,933	8,732	6,4	5	6	7,824	6,699	9	8,588	10,14	9,568

	Total bakteri mgg0	Total bakteri mgg2	Total bakteri mgg4	Total yeast mgg0	Total yeast mgg2	Total yeast mgg4	Total kapang mgg0	Total kapang mgg2	Total kapang mgg4	Bakteri HK mgg0	Bakteri HK mgg2	Bakteri HK mgg4
SS	2,1	8,996	11,43	0	1,45	6	0	8,002	0,74	0	8	10,001
SS-F	8,85	10,356	9,914	8,78	9,591	6	4	6	0,245	7,744	8,566	8,176
SS-F-B _A	8,85	9,097	9,655	8,78	7,875	6	4	8	7,778	7,744	10	9
SS-F-B _B	8,85	7,792	10,53	8,78	8,267	6	4	5	7	7,744	8,724	7
SS-F-B _C	8,85	7,568	8,51	8,78	9,39	6	4	5	8,712	7,744	6	7
SS-F-U	8,85	9,974	8,954	8,78	9,561	6	4	5	8,279	7,744	8,7	7,699
SS-U	2,1	8,344	9,803	0	9,21	6	0	8,76	8,011	0	8,653	7
SS-F-U-B _A	8,85	7,643	9,903	8,78	5	6	4	6	7	7,744	6	8
SS-F-U-B _B	8,85	7,574	9,757	8,78	7	6	4	7,996	11,11	7,744	9,708	9,728
SS-F-U-B _C	8,85	7,886	9,149	8,78	5	6	4	7	8,146	7,744	10,114	10

B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH

a) Seminar ilmiah

Hasil penelitian ini telah menghasilkan dua makalah yang dipublikasikan dalam forum seminar ilmiah (Indonesian National Congress 10th Society For Microbiology and International Symposia). Daftar judul makalah disajikan pada tabel berikut.

No.	Judul Makalah	Penyelenggara			Keterangan
		Lembaga	Tanggal	Tempat	
1.	Exploration of Polyaromatic Hydrocarbonoclastic Microbes from Oil Polluted Soil	Organisation of Indonesia Society for Microbiology	20 -21 November 2009	J.W. Marriott Hotel Surabaya	Indonesian National Congress 10 th Society For Microbiology and International Symposia (Oral Presentation)
2.	Screening of Biosurfactant Production of Hydrocarbonoclastic Microbes Isolated from Oil Polluted Soil	Organisation of Indonesia Society for Microbiology	20 -21 November 2009	J.W. Marriott Hotel Surabaya	Indonesian National Congress 10 th Society For Microbiology and International Symposia (Poster Presentation)

b) Publikasi ilmiah

Beberapa judul artikel sedang dipersiapkan atau dalam proses penulisan untuk dipublikasikan dalam jurnal internasional sehingga belum dapat disertakan dalam laporan ini.

Rencana judul yang akan dibuat adalah :

- 1) The influence of nitrogen fixing bacteria addition, incubation time and combination of both on bioremediation of crude oil-contaminated soil.
- 2) The influence of different types and concentration of nutrient on crude oil bioremediation
- 3) Optimalization of crude oil bioremediation in soil using combination methods of bioaugmentation, biostimulation and biosurfactant addition

Jurnal yang direncanakan untuk dituju adalah : 1) Journal of Bioremediation, Canadian Journal of Microbiology, dan African Journal of Microbiology.

C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Pada penelitian yang dilakukan pada tahun 2009 ini telah didapatkan hasil berupa 1) formula konsorsium mikroba tersusun dari bakteri dan yeast yang berpotensi dalam mendegradasi hidrokarbon minyak mentah, 2) Jenis dan konsentrasi nutrisi yang dibutuhkan dalam upaya biostimulasi, 3) Jenis biosurfaktan yang prospektif digunakan dalam bioremediasi minyak, dan 4) Waktu yang dibutuhkan untuk bioremediasi limbah minyak pada sampel tanah.

Hasil capaian tersebut diatas tentunya masih belum dapat diaplikasikan secara langsung di lapangan. Uji efektivitas konsorsium mikroba, pemberian nutrisi dan penambahan biosurfaktan dalam suatu **bioreaktor** yang menggambarkan simulasi proses bioremediasi di lapangan sangat perlu dilakukan. Oleh sebab itu peneliti akan mengusulkan melakukan penelitian lanjutan yang bertujuan ;

- 1) Melakukan upaya menciptakan kondisi terjaminnya aerasi dengan pemberian variasi bahan (*bulking agent*), pengaturan tingkat aerasi dan kelembapan yang menjamin proses biodegradasi minyak oleh konsorsium mikroba melalui pembuatan bioreaktor pengolah limbah minyak
- 2) Menguji efektivitas formula konsorsium mikroba, jenis dan konsentrasi nutrisi, serta biosurfaktan hasil penelitian tahun 2009 dalam proses bioremediasi limbah minyak pada bioreaktor hasil rancangan sebelum diaplikasikan langsung di lingkungan
- 3) Menguji efektivitas bioreaktor hasil rancangan dalam mengoptimalkan proses bioremediasi limbah minyak

Penelitian ini akan dilaksanakan dengan bekerjasama dengan peneliti dari program studi Ilmu dan Teknologi Lingkungan di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga..

Hasil yang diharapkan dalam penelitian lanjutan tersebut adalah dihasilkannya model bioreaktor pengolah limbah minyak lengkap dengan metode yang digunakan dalam bioremediasi limbah minyak.

