

**ANALISIS KEMAMPUAN BAKTERI DARI PERAIRAN TERCEMAR YANG  
BERPOTENSI SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI LIMBAH HIDROKARBON  
MINYAK SOLAR**

**TESIS**



Oleh :  
**AINUN RAMADHANI TRI WAHYUNI**  
**NIM. 176080100111010**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MINAT LINGKUNGAN**

**PROGRAM PASCASARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**ANALISIS KEMAMPUAN BAKTERI DARI PERAIRAN TERCEMAR YANG  
BERPOTENSI SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI LIMBAH HIDROKARBON  
MINYAK SOLAR**

**TESIS**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memenuhi Gelar Magister Perikanan di  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**



**Oleh :  
AINUN RAMADHANI TRI WAHYUNI  
NIM. 176080100111010**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MINAT LINGKUNGAN**

**PROGRAM PASCASARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019  
TESIS**

**ANALISIS KEMAMPUAN BAKTERI DARI PERAIRAN TERCEMAR YANG  
BERPOTENSI SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI LIMBAH HIDROKARBON  
MINYAK SOLAR**

Oleh :  
**AINUN RAMADHANI TRI WAHYUNI**  
NIM. 176080100111010

Telah dipertahankan didepan penguji  
Pada tanggal 13 September 2019  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

Ketua

Anggota



**Prof. Dr. Ir. Endang Yuli Herawati, MS**  
NIP. 195707041984032001

**Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc**  
NIP. 197903312005011003

Tanggal : 11 OCT 2019

Tanggal : 11 OCT 2019

Mengetahui,



**Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS**  
NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal : 11 OCT 2019

Ketua  
Program Magister



**Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si**  
NIP. 19660825 199203 1 001

Tanggal : 11 OCT 2019

JUDUL TESIS :

ANALISIS KEMAMPUAN BAKTERI DARI PERAIRAN TERCEMAR YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI LIMBAH HIDROKARBON MINYAK SOLAR

IDENTITAS MAHASISWA

NAMA : Ainun Ramadhani Tri Wahyuni

NIM : 176080100111010

PROGRAM STUDI : Budidaya Perairan

MINAT : Lingkungan

KOMISI PEMBIMBING

KETUA : Prof. Dr. Ir. Endang Yuli Herawati, MS

NIP : 195707041984032001

ANGGOTA : Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc

NIP : 197903312005011003

KOMISI PENGUJI

PENGUJI 1 : Dr. Ir. Muhammad Musa, MS

NIP : 195705071986021002

PENGUJI 2 : Dr. Ir. Yahya, MP

NIP : 196307061990031005

UJIAN KELAYAKAN : 13 November 2108

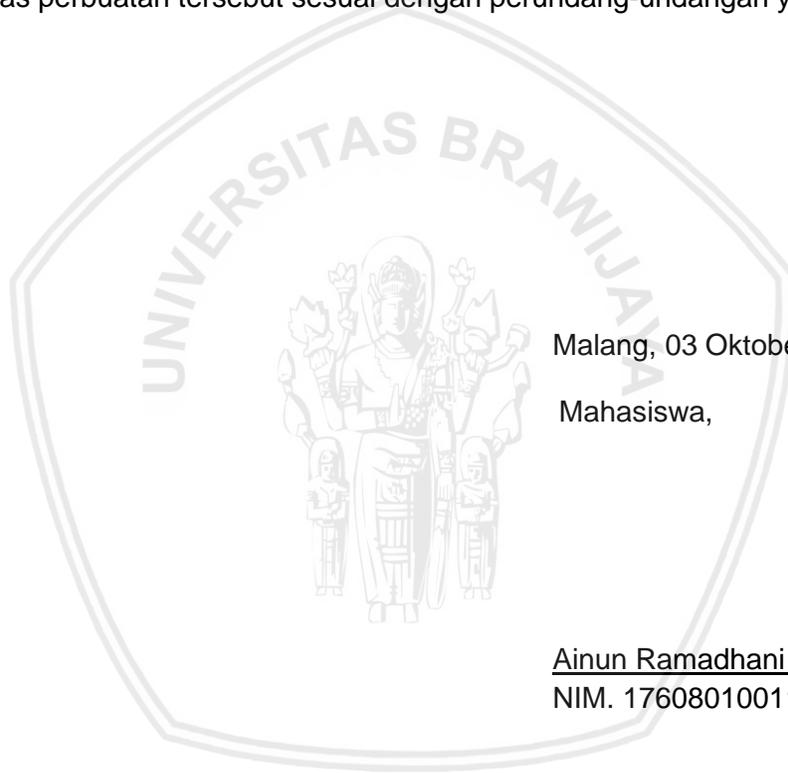
SEMINAR PROPOSAL : 13 Desember 2018

SEMINAR HASIL : 20 Juni 2019

UJIAN TESIS : 13 September 2019

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa pada naskah tesis ini merupakan hasil karya saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak pernah terdapat tulisan, pendapat atau bentuk lain yang telah diterbitkan oleh orang lain kecuali tertulis dalam laporan ini di daftar pustaka. Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan laporan tesis ini hasil jiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan perundang-undangan yang berlaku.



Malang, 03 Oktober 2019

Mahasiswa,

Ainun Ramadhani Tri Wahyuni  
NIM. 176080100111010

## RIWAYAT HIDUP



AINUN RAMADHANI TRI WAHYUNI, dilahirkan di Kabupaten Situbondo Jawa Timur tepatnya di Perumahan Panji Permai Kecamatan Panji pada tanggal 22 Februari 1995. Penulis merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara pasangan Bapak Markacung, S.H., M.H dan Ibu Herlin Wahyuningsih, S.Pd. Riwayat pendidikan penulis pernah menempuh jenjang sekolah dasar di SDN 01 Mimbaan Kabupaten Situbondo pada tahun 2001-2007. Pendidikan sekolah menengah pertama ditempuh di SMPN 02 Situbondo Kabupaten Situbondo pada tahun 2007-2010. Penulis kemudian melanjutkan Pendidikan sekolah menengah atas di SMAN 01 Situbondo Kabupaten Situbondo pada tahun 2010-2013. Menempuh pendidikan Strata 1 (S1) di Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2013-2017 dan menyandang gelar S.Pi. Pendidikan Strata 2 (S2) ditempuh di Program Magister Budidaya Perairan pada tahun 2017 hingga saat ini. Penulis menyelesaikan Pendidikan S2 dengan membuat tulisan ilmiah berupa Tesis yang berjudul “Analisis Kemampuan Bakteri dari Perairan Tercemar yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Limbah Hidrokarbon Minyak Solar”.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang kepada semua pihak yang telah berperan serta dalam membantu kelancaran hingga penulisan laporan tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang sebesar – besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Allah S.W.T yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan laporan skripsi ini.
2. Sujud dan terimakasih saya persembahkan kepada papa saya dan alm. Mama saya serta kakak-kakak saya atas dorongan yang kuat baik materil maupun immaterial dan doa yang tiada henti.
3. Prof. Dr. Ir. Endang Yuli Herawati, MS dan Bapak Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan wawasan selama penyelesaian laporan tesis ini.
4. Bapak Dr. Ir. Muhammad Musa, MS dan Bapak Dr. Ir. Yahya, MP selaku dosen penguji dalam laporan tesis ini.
5. Ibu Mega selaku laboran yang telah membantu selama penelitian ini.
6. Zulkifli Unzila Ardhi, Safitri Permata Sari, Abd. Aziz Amin dan teman-teman Pascasarjana angkatan 2017 yang telah memberikan motivasi serta semangat dalam penyelesaian laporan tesis ini.

## UCAPAN TERIMAKASIH

### Disampaikan Terima Kasih Kepada :

Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Universitas Brawijaya

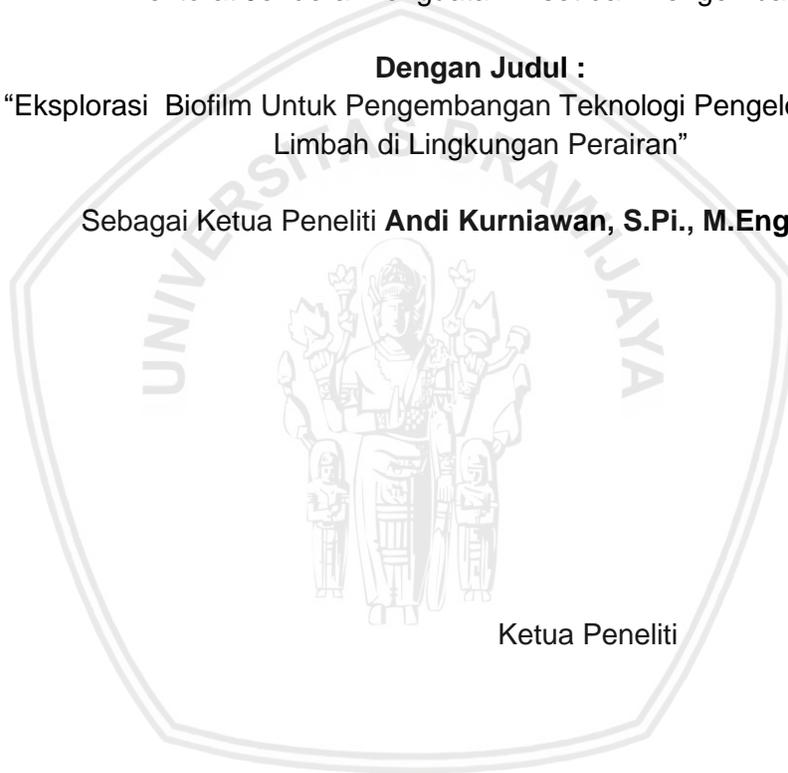
### Yang Telah Membiayai :

Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi.  
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan

### Dengan Judul :

“Eksplorasi Biofilm Untuk Pengembangan Teknologi Pengelolaan Air dan  
Limbah di Lingkungan Perairan”

Sebagai Ketua Peneliti **Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc**



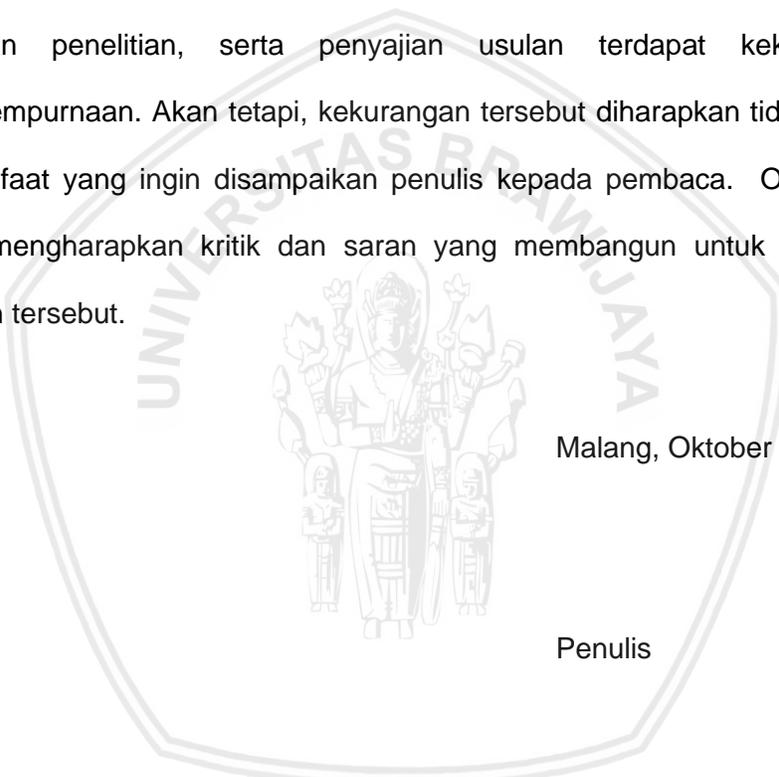
Ketua Peneliti

Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc  
NIP. 19790331 200501 1 003

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Tesis yang berjudul “Analisis Kemampuan Bakteri Dari Perairan Tercemar Yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Limbah Hidrokarbon Minyak Solar ”.

Penulis menyadari akan keterbatasan baik dalam pengambilan metode dan rancangan penelitian, serta penyajian usulan terdapat kekurangan dan ketidaksempurnaan. Akan tetapi, kekurangan tersebut diharapkan tidak mengurangi nilai manfaat yang ingin disampaikan penulis kepada pembaca. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk kebaikan hasil penelitian tersebut.



Malang, Oktober 2018

Penulis

## RINGKASAN

**AINUN RAMADHANI TRI WAHYUNI.** Program Studi Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Tesis tentang **ANALISIS KEMAMPUAN BAKTERI DARI PERAIRAN TERCEMAR YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI LIMBAH HIDROKARBON MINYAK SOLAR** (Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Endang Yuli Herawati, MS dan Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc**)

---

Pencemaran yang disebabkan oleh tumpahan atau cecceran minyak solar dilingkungan perairan dapat dipulihkan dengan berbagai cara. Pemulihan tumpahan minyak solar di laut dapat dilakukan dengan cara fisik yaitu dengan menggunakan bahan kimia seperti pelarut organik dengan atau tanpa surfaktan. Hal ini dapat mengakibatkan keracunan pada organisme air dan juga dapat meningkatkan biaya pemulihan. Selain cara di atas, metode lain yang dapat digunakan dalam proses pembersihan perairan yang tercemar oleh minyak solar adalah secara biologi yaitu dengan proses bioremediasi menggunakan bakteri. Mekanisme yang dilakukan oleh bakteri untuk bioremediasi limbah minyak solar disebut dengan biodegradasi. Metode ini memiliki banyak kelebihan yaitu lebih murah, lebih aman dan tidak menghasilkan senyawa toksik terhadap lingkungan perairan (Kittel *et al.*, 1994).

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember-Januari 2018. Pelaksanaan kultur bakteri akan dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Sedangkan analisis kandungan limbah minyak solar dilaksanakan di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi UIN Malang. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen.

Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahapan. Tahap pertama adalah penentuan bakteri *indigenous* yang berpotensi sebagai agen bioremediasi hidrokarbon minyak solar. Tahap kedua adalah menguji dan menganalisis kemampuan bakteri *indigenous*, bakteri *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar. Parameter analisis degradasi meliputi *Total Petroleum Hidrokarbon* (TPH), *Gas Chromatography* (GC-MS) dan uji aktivitas enzim monooksigenase dan enzim dioksigenase.

Pada penelitian ini didapatkan bakteri *indigenous* yang diisolasi dari perairan tercemar minyak solar yang mampu dijadikan sebagai agen bioremediasi limbah hidrokarbon. Secara keseluruhan sel isolat bakteri mampu tumbuh dalam media minyak solar serta terdapat perbedaan kemampuan bakteri *indigenous*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar pada konsentrasi 15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm. Hasil persentase penurunan degradasi minyak solar 15 ppm tertinggi oleh bakteri *indigenous* sebesar 67%, sedangkan persentase penurunan degradasi minyak solar 30 ppm tertinggi oleh gabungan bakteri *indigenous+Gordonia terrae* sebesar 77% dan persentase penurunan degradasi minyak solar 45 ppm tertinggi oleh gabungan bakteri *indigenous+Gordonia terrae* sebesar 86%.

## SUMMARY

**AINUN RAMADHANI TRI WAHYUNI.** Master Program of Aquaculture. Faculty of Fisheries and Marine Science. University of Brawijaya, Malang. Thesis regarding ANALYSIS OF BACTERIA ABILITY FROM THE POLLUTED WATERS THAT POTENTIALLY FUNCTION AS BIOREMEDIATION AGENT OF SOLAR OIL HYDROCARBON WASTE (Under the guidance of **Prof. Dr. Ir. Endang Yuli Herawati, MS and Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc**)

---

The pollution caused by spills or splashes of diesel oil in the waters environment can be restored by several ways. The restoration of diesel oil spills in the sea can be done by physical way namely by using chemical substance like organic solvent or without surfactant. This can cause to poisonings on water organisms and also can increase restoration cost. Besides the way aforementioned, the other method that can be used in the cleaning process of polluted waters by diesel oil is biologically namely by bioremediation process using bacteria. The mechanism done by the bacteria to bio-remediate the diesel oil waste is called biodegradation. This method has some advantages which are cheaper, safer, and not resulting toxic compound towards waters environment (Kittel *et al.*, 1994).

This research was done in December-January 2018. The objective of this research is to obtain indigenous bacteria that potentially function as the agent of bioremediation of hydrocarbon waste from the polluted waters and to analyze and compare the ability of indigenous bacterium, *Gordonia terrae* and the combination of both in degrading the diesel oil hydrocarbon waste. The method used in this research is experimental method.

This research is conducted in two phases. The first phase is the determination of indigenous bacterium that potentially functions as the agent of bioremediation of diesel oil hydrocarbon. The second phase is testing and analyzing the ability of indigenous bacterium, *Gordonia terrae* and the combination of both in degrading the diesel oil hydrocarbon waste. The parameter of degradation analysis covers *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH), *Gas Chromatography* (GC-MS) and activities testing of monooxygenase enzyme and dioxygenase enzyme.

In this research, indigenous bacterium isolated from polluted waters from diesel oil that can be made as the bioremediation agent of hydrocarbon waster is found. Holistically, bacterial isolate cells can grow in the medium of diesel oil and there is a difference between ability of indigenous bacterium, *Gordonia terrae* and the combination of both in degrading diesel oil hydrocarbon waste in concentrate 15 ppm, 30 ppm, and 45 ppm. The highest percentage result of diesel oil degradation decrease of 15 ppm is by indigenous bacterium of 67%, while the highest percentage result of diesel oil degradation decrease of 30 ppm is by the combination of indigenous bacterium and *Gordonia terrae* of 77% and the highest percentage result of diesel oil degradation decrease of 45 ppm is by the combination of indigenous bacterium and *Gordonia terrae* of 86%.

## DAFTAR ISI

<b>IDENTITAS PENGUJI .....</b>	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS.....</b>	<b>v</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH.....</b>	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>ix</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan .....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Hidrokarbon.....	6
2.2 Pencemaran Minyak Solar.....	9
2.3 Solar.....	10
2.4 Dampak Pencemaran Minyak Solar.....	11
2.5 Bioremediasi.....	13
2.6 Bakteri Hidrokarbonoklastik .....	14
2.7 Degradasi Hidrokarbon Oleh Bakteri .....	15
2.8 Faktor Yang Mempengaruhi Biodegradasi.....	16
2.8.1 Derajat Keasaman (pH) .....	17
2.8.2 Suhu.....	17
2.8.3 Oksigen .....	17
2.8.4 Nutrisi .....	18
2.9 Parameter Analisis Degradasi .....	18
2.9.1 <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (TPH).....	18
2.9.2 <i>Gas Chromatography</i> (GC/MS) .....	19
2.9.3 Uji Aktivitas Enzim .....	19

<b>3. KERANGKA PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
3.1 Landasan Teori.....	21
3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	22
3.3 Hipotesis.....	24
3.4 Kerangka Operasional dan Analisis Data.....	24
3.5 Definisi Operasional dan Pengukurannya .....	27
3.6 Kebaruan Penelitian .....	27
3.7 Strategi Publikasi.....	29
<b>4. MATERI dan METODE .....</b>	<b>30</b>
4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	30
4.2 Materi Penelitian.....	31
4.2.1 Alat-alat Penelitian.....	31
4.2.2 Bahan-bahan Penelitian .....	31
4.3 Metode Penelitian.....	32
4.4 Prosedur Penelitian .....	33
4.4.1 Tahap I.....	34
4.4.2 Tahap II .....	39
<b>5. HASIL dan PEMBAHASAN .....</b>	<b>46</b>
5.1 Parameter Kualitas Air <i>Insitu</i> .....	46
5.2 Isolasi Bakteri Pendeградasi Minyak Solar .....	49
5.3 Total Kepadatan Bakteri (Sel/ml) .....	50
5.4 <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (TPH).....	56
5.5 Derajat Keasaman (pH) .....	61
5.6 Biochemical Oxygen Demand (BOD).....	64
5.7 Chemical Oxygen Demand (COD).....	67
5.9 Uji Aktivitas Enzim .....	72
5.9.1 Enzim Monooksigenase.....	73
5.9.2 Enzim Dioksigenase .....	75
5.10 Hubungan Parameter Degradasi .....	77
5.10.1 Hubungan Parameter Kepadatan Bakteri dan <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (TPH) .....	77
5.10.2 Hubungan Parameter pH dan Kepadatan Bakteri .....	78
5.10.3 Hubungan <i>Biochemical Oxygen Demand</i> (BOD) dan <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (TPH) .....	80
5.10.4 Hubungan <i>Chemical Oxygen Demand</i> (COD) dan <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (TPH) .....	81
5.11 Hasil Uji GC/MS.....	83
5.11.1 Konsentrasi Minyak Solar 15 ppm .....	83
5.11.2 Konsentrasi Minyak Solar 30 ppm .....	86
5.11.3 Konsentrasi Minyak Solar 45 ppm .....	88
5.12 Identifikasi Bakteri .....	91
<b>6. KESIMPULAN dan SARAN .....</b>	<b>93</b>
6.1 Kesimpulan.....	93
6.2 Saran.....	93

DAFTAR PUSTAKA.....	94
LAMPIRAN.....	101



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Molekuler Hidrokarbon Alifatik .....	7
2. Struktur Senyawa Aromatik .....	9
3. Kerangka Konseptual Penelitian .....	24
4. Kerangka Operasional .....	26
5. Lokasi Penelitian .....	31
6. Isolat Bakteri <i>Indigenous</i> .....	51
7. Isolat Bakteri <i>Eksogenous</i> .....	51
8. Grafik Kepadatan Bakteri Bakteri <i>Indigenous</i> (sel/ml) .....	52
9. Grafik Kepadatan <i>Gordonia terrae</i> (sel/ml) .....	53
10. Grafik Kepadatan Gabungan Bakteri <i>Indigenous</i> + <i>Gordonia terrae</i> (sel/ml) .....	54
11. Grafik <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (ppm) .....	58
12. Grafik Hasil Pengukuran Derajat Keasaman (pH) .....	63
13. Grafik Pengukuran <i>Biochemical Oxygen Demand</i> (BOD) .....	66
14. Grafik Pengukuran <i>Chemical Oxygen Demand</i> (COD) .....	69
15. Grafik Hasil Uji Aktivitas Enzim Monooksigenase (U/mL) .....	75
16. Grafik Hasil Uji Aktivitas Enzim Dioksigenase (U/mL) .....	77
17. Regresi Kepadatan Bakteri (sel/ml) dan TPH (ppm) .....	79
18. Regresi Parameter pH dan Kepadatan Bakteri (sel/ml) .....	80
19. BOD (mg/L) dan <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (ppm) .....	82
20. COD (mg/L) dan <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> (ppm) .....	83
21. Hasil Analisis Uji GC/MS Konsentrasi Minyak Solar 15 ppm .....	85
22. Hasil Analisis Uji GC/MS Konsentrasi Minyak Solar 30 ppm .....	89
23. Hasil Analisis Uji GC/MS Konsentrasi Minyak Solar 45 ppm .....	90
24. Identifikasi Bakteri <i>Indigenous</i> .....	93

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penelitian Terdahulu .....	29
2. Hasil Pengukuran Parameter Kualitas Air .....	47
3. Nilai rasio BOD:COD .....	71
4. <i>Biodegradability Index</i> .....	72
5. Senyawa-senyawa hasil GCMS konsentrasi minyak solar 15 ppm .....	86
6. Senyawa-senyawa hasil GCMS konsentrasi minyak solar 30 ppm .....	88
7. Senyawa-senyawa hasil GCMS konsentrasi minyak solar 45 ppm .....	91



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi Penelitian .....	102
2. Hasil Persentase Penurunan TPH .....	105
3. SPSS 25 Uji <i>Total Petroleum Hydrocarbon</i> .....	106
4. Regresi Kepadatan Bakteri (sel/ml) dan TPH (ppm) .....	107
5. Regresi pH dan Kepadatan Bakteri (sel/ml) .....	108
6. Regresi BOD (ppm) dan TPH (ppm) .....	109
7. Regresi COD (ppm) dan TPH (ppm) .....	110



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Minyak bumi merupakan salah satu sumber energi bagi kehidupan manusia di dunia. Selain sebagai sumber energi, minyak bumi juga merupakan bahan baku untuk berbagai kegiatan seperti industri minyak pelumas mesin, pelarut, plastik, fiber, deterjen, farmasi dan juga kosmetik (Bartha dan Bossert 1984). Salah satu contoh dari minyak bumi adalah solar. Minyak solar merupakan salah satu fraksi dari minyak bumi yang diperoleh dengan cara destilasi, dipisahkan berdasarkan titik didih dengan atom karbon per molekulnya  $C_{15}$ - $C_{18}$  dan dengan titik didih  $300^{\circ}\text{C}$ - $400^{\circ}\text{C}$  (Pertamina, 2018). Umumnya minyak solar banyak digunakan sebagai bahan bakar bagi mesin diesel kendaraan bermotor pada industri dapur kecil dan juga pada bahan bakar mesin diesel kapal.

Potensi yang dimiliki oleh minyak solar sangat bermanfaat, maka produksi yang meliputi kegiatan eksplorasi, eksploitasi, pengolahan dan transportasi akan semakin meningkat. Keadaan tersebut memberikan dampak positif yaitu permasalahan terkait sumber energi dapat teratasi. Namun, keadaan tersebut akan menyebabkan pencemaran lingkungan semakin meningkat, baik pada lingkungan terestrial maupun akuatik yang berasal dari kegiatan dan sisa pembersihan tangki penampungan, kebocoran pipa ataupun tumpahan selama proses transportasi (Ebuehi *et al.*, 2015). Dimana tumpahan minyak solar tersebut akan mengkontaminasi lingkungan dengan limbah yang mengandung senyawa hidrokarbon. Berdasarkan Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup No. 19 tahun 2010 tentang baku mutu air limbah bagi usaha dan/atau kegiatan pengolahan minyak bumi kadar maksimum TPH ialah sebesar 20 ppm.

Limbah yang berada di perairan terdiri dari beragam polutan organik, hidrokarbon yang berasal dari petroleum dan hidrokarbon yang berasal dari halogen dianggap paling berbahaya bagi lingkungan perairan (Misran, 2012). Pencemaran limbah minyak solar di perairan akan memberikan dampak jangka panjang terutama bagi biota laut. Ketika minyak solar di dalam laut dapat termakan oleh biota-biota laut, sebagian senyawa hidrokarbon dapat dikeluarkan bersamaan dengan makanannya, sedangkan sebagian lagi dapat terakumulasi dalam senyawa lemak dan protein dalam tubuh organisme. Sifat akumulasi ini dapat dipindahkan dari organisme satu ke organisme lain melalui rantai makanan. Jadi, akumulasi limbah hidrokarbon didalam zooplankton dapat berpindah ke ikan pemangsanya. Demikian seterusnya bila ikan tersebut dimakan ikan yang lebih besar, hewan-hewan laut lainnya dan bahkan akan sampai pada manusia (Leppchen, 2016).

Pencemaran yang disebabkan oleh tumpahan atau ceceran minyak solar di lingkungan perairan dapat dipulihkan dengan berbagai cara. Pemulihan tumpahan minyak solar di laut dapat dilakukan dengan cara fisik yaitu dengan menggunakan bahan kimia seperti pelarut organik dengan atau tanpa surfaktan. Campuran-campuran bahan pelarut minyak dikumpulkan dengan metode penyaringan, secara mekanik dengan menggunakan penyerap minyak yang membantu merubah minyak menjadi bentuk yang dapat diangkut untuk penyimpanan jangka pendek dan secara fisikokimia dengan menggunakan agen-agen kimia. Hal ini dapat mengakibatkan keracunan pada organisme air dan juga dapat meningkatkan biaya pemulihan. Selain cara di atas, metode lain yang dapat digunakan dalam proses pembersihan perairan yang tercemar oleh minyak solar adalah secara biologi yaitu dengan proses bioremediasi menggunakan bakteri. Penelitian-penelitian yang telah dilakukan ditemukan beberapa mikroorganisme yang dapat mendegradasi minyak buangan.

Bosser dan Bartha (1984) dalam Yojana (1995), menemukan genus bakteri yang dapat hidup di lingkungan minyak bumi. Bakteri yang mendominasi yaitu dari genus *Alcaligenes*, *Arthr-obacter*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Achroornobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, dan *Pseudomonas*. Penelitian Yojana (1995), menemukan isolat bakteri pendegradasi minyak bumi dari tumpahan minyak di pelabuhan Dumai yaitu *Bacillus* sp, *Fnterobacter aerogene.s*, *Pseudomona.s chlororaphi.s*, *Rothia dentocuriosa*, *Cor}mebacterium sp*. Penelitian Linda (1995), menemukan isolat bakteri pendegradasi dari sumur minyak bumi yaitu *Aeromonas* sp, *Alcaligenes .sp*, *Bacillus substidi.s*, *Bacillus antraci.s*, dan *E nterobacter aerogenes*. Mekanisme yang dilakukan oleh bakteri untuk bioremediasi limbah minyak solar disebut dengan biodegradasi. Metode ini memiliki banyak kelebihan yaitu lebih murah, lebih aman dan tidak menghasilkan senyawa toksik terhadap lingkungan perairan (Kittel *et al.*, 1994).

Bioremediasi merupakan suatu proses pemulihan (remediasi) lingkungan yang tercemar limbah organik maupun limbah anorganik dengan memanfaatkan organisme salah satunya adalah bakteri. Kemampuan bakteri dalam memecahkan rantai hidrokarbon diawali dengan pelarutan hidrokarbon dalam fase cair oleh surfaktan yang dihasilkan permukaan sel mikroorganisme tersebut (Rosenberg *et al.*, 2012). Pertumbuhan mikroorganisme dalam hidrokarbon sering diikuti dengan pengemulsian sumber karbon yang tidak larut dalam medium kultur karena adanya agen polimer ekstraseluler yang dibentuk selama fermentasi hidrokarbon (Zajic *et al.*, 2017). Biodegradasi senyawa hidrokarbon oleh bakteri yang terdapat pada limbah minyak solar dipengaruhi oleh faktor fisika, kimia dan biologi. Faktor fisika-kimia yang berpengaruh terhadap biodegradasi hidrokarbon antara lain komposisi dan struktur kimia hidrokarbon, konsentrasi hidrokarbon, suhu, oksigen, salinitas,

pH, nutrisi, cahaya dan tekanan osmotik. Faktor biologis meliputi mikroorganisme yang ada, karakter, jumlah sel, serta enzim yang dimiliki oleh organisme tersebut. . Dari sejumlah besar penelitian dilaporkan bahwa: alkana dengan bobot molekul rendah lebih cepat didegradasi oleh isolat bakteri campuran (konsorsium) dibandingkan dengan isolat bakteri tunggal (Gerdes *et al.*, 2015). Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh isolat bakteri *indigenous* dari Pelabuhan Tanjung Perak, Surabaya serta menganalisis kemampuan bakteri *indigenous*, *Gordonia terrae* (bakteri *eksogenous*) dan gabungan keduanya dalam proses bioremediasi hidrokarbon minyak solar.

## 1.2 Rumusan Masalah

Penelitian mengenai bakteri pendegradasi limbah minyak solar dinilai sangat penting karena hal ini diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif *water treatment* untuk mengurangi pencemaran perairan khususnya pencemaran yang disebabkan oleh minyak solar. Berdasarkan uraian diatas maka dapat dirumuskan permasalahan yang menjadi fokus penelitian ini yaitu :

1. Apakah terdapat bakteri *indigenous* yang berpotensi sebagai agen bioremediasi limbah hidrokarbon dari perairan tercemar?
2. Bagaimana kemampuan bakteri *indigenous*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian mengenai bakteri pendegradasi minyak solar yaitu :

1. Untuk mendapatkan bakteri *indigenous* yang berpotensi sebagai agen bioremediasi limbah hidrokarbon dari perairan tercemar.

2. Untuk menganalisis dan membandingkan kemampuan bakteri *indigenous*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diantaranya adalah :

1. Mahasiswa

Dengan mempelajari secara langsung dapat menambah pengetahuan ataupun wawasan yang lebih tentang bakteri pendegradasi limbah minyak solar.

2. Instansi Terkait

Dapat dijadikan sebagai sumber informasi keilmuan mengenai pengolahan limbah minyak solar dengan menggunakan bakteri.

3. Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan

Dapat dijadikan sebagai sumber informasi keilmuan mengenai pentingnya pengolahan limbah minyak solar untuk meminimalisir terjadinya pencemaran di perairan guna meningkatkan pengelolaan sumberdaya perairan secara berkelanjutan dan untuk penulisan serta penelitian lebih lanjut lagi.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hidrokarbon

Hidrokarbon merupakan senyawa dominan yang menyusun minyak bumi. Hidrokarbon memiliki unsur karbon dan hidrogen yang berikatan. Menurut Hafiluddin (2011), minyak bumi mengandung lebih dari 90 % hidrokarbon. Kandungan tersebut menyebabkan minyak bumi yang tumpah akibat aktivitas pengeboran di tanah sulit terdegradasi. Setiap komposisi senyawa pada hidrokarbon minyak bumi berbeda dan bergantung pada sumber penghasil minyak bumi tersebut.

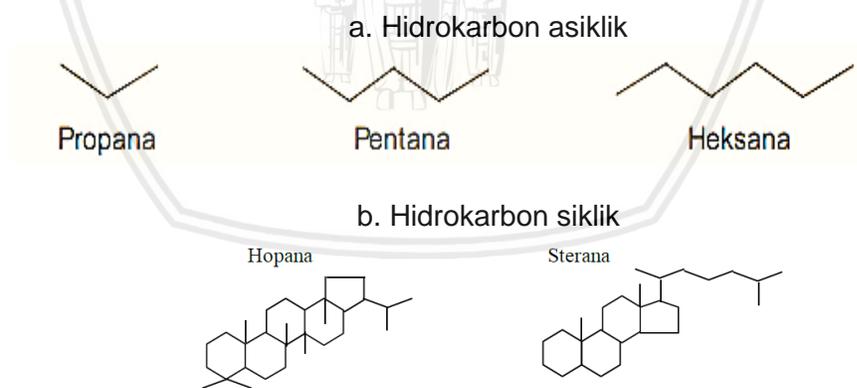
Hidrokarbon dalam minyak bumi memiliki struktur yang berbeda-beda sehingga dapat dikelompokkan menjadi beberapa bagian yaitu hidrokarbon poli aromatik, hidrokarbon aromatik, hidrokarbon alifatik dan sikloalkana. Hidrokarbon aromatik terdiri dari 1 molekul benzena yang memiliki 6 buah atom tersusun menyerupai cincin dan ganda. Hidrokarbon poli aromatik sering disebut PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbon*) merupakan senyawa hidrokarbon aromatic yang menyatu. PAH memiliki toksisitas tinggi yang dapat menyebabkan hilangnya cairan sel (Munir, 2006). Hidrokarbon alifatik memiliki cincin atom karbon linier, bercabang atau melingkar tertutup. Parafin (alkana) , Olefin (alkana) dan Alkana termasuk dalam golongan hidrokarbon Alifatik. Sikloalkana merupakan hidrokarbon alisiklik tunggal dan banyak (Munawar, 2012).

#### 2.1.1 Hidrokarbon Alifatik

Hidrokarbon alifatik terdiri atas rantai atom karbon yang tidak mencakup bangun siklik dan sering disebut juga sebagai hidrokarbon rantai terbuka atau hidrokarbon asiklik (Gambar 1). Hidrokarbon alifatik berasal dari sumber alami

termasuk biogenik dan dari sumber antropogenik (petrogenik). Senyawa asiklik disebut alkana atau parafin dengan susunan rantai karbon lurus (*linear arrangement*) dan susunan rantai karbon bercabang yang disebut iso-alkana atau alkana bercabang. Senyawa siklik memiliki rantai karbon melingkar yang terdiri dari kombinasi lima atau enam karbon yang biasa ditemukan pada petroleum (Pine *et al.*, 1988).

Senyawa hidrokarbon alifatik dapat dibedakan menjadi tiga yaitu senyawa alkana (ikatan tunggal), senyawa alkena (ikatan ganda), senyawa alkuna (ikatan rangkap tiga) (Suprihanto, 2005). Alkana merupakan zat nonpolar, zat yang tidak larut dalam air dengan kerapatan zat cair kurang dari 1 g/mL (Pine *et al.*, 1988). Alkana disebut juga senyawa hidrokarbon jenuh atau parafin. Atom karbon alkana yang dirangkaikan dalam runtunan tunggal yang bersambung, alkana tersebut dikenal dengan hidrokarbon normal. Bentuk *n*-alkana yang paling sederhana adalah metana (CH<sub>4</sub>) yang merupakan komponen utama dari gas alam dan hasil dekomposisi anaerobik dari bahan organik .



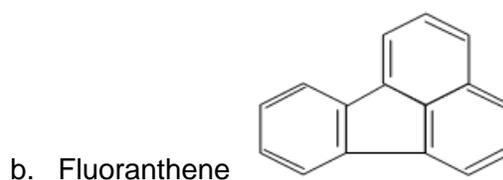
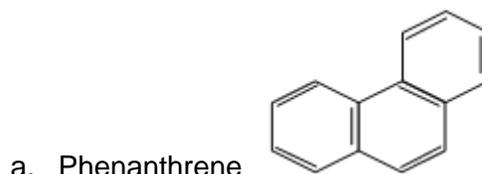
**Gambar 1.** Struktur Molekuler Hidrokarbon Alifatik (Sumber : Pine *et al.*, 1988).

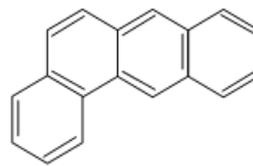
### 2.1.2 *Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH)*

Polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) adalah senyawa yang terdiri dari dua atau lebih cincin aromatik (benzene) yang memiliki enam atom karbon. Contoh senyawa PAH diantaranya adalah phenanthrene, fluoroanthene dan benz[a]anthracene yang masing-masing memiliki tiga sampai empat cincin aromatik (benzene), kecuali pada fluoroanthene yang juga berikatan dengan siklopentana (Gambar 2). PAH merupakan senyawa kimia karsinogenik yang terbentuk oleh pembakaran bahan organik yang tidak sempurna pada proses antropogenik seperti pembakaran fosil dan proses alami seperti kebakaran hutan (Itoh *et al.*, 2018).

PAH secara umum dibentuk oleh berbagai macam proses, seperti biogenesis, diagenesis bahan organik yang memproduksi bahan bakar fosil dan pembakaran tidak sempurna dari bahan organik. Nugraha (2011), membagi tiga kategori sumber PAH, yaitu:

1. PAH petrogenik, yang terkait dengan petroleum (minyak), termasuk minyak mentah dan produk penyulingannya.
2. PAH biogenik, yang berasal dari proses biologi atau tahap awal dari diagenesis pada sedimen laut (misal: perylene).
3. PAH Pyrogenik, yang berasal dari pembakaran bahan bakar fosil (minyak dan batu bara) dan material organik seperti kayu.





c. Benz[a]anthracene

**Gambar 2.** Struktur Senyawa Aromatik (Sumber : Itoh *et al.*, 2018).

## 2.2 Pencemaran Minyak Solar

Berdasarkan Peraturan Pemerintah RI Nomor 19 Tahun 1999, Pencemaran laut adalah masuknya atau dimasukkannya makhluk hidup, zat energi dan atau komponen lain ke dalam lingkungan laut oleh kegiatan manusia sehingga kualitas air laut menjadi turun sampai ke tingkat tertentu yang menyebabkan lingkungan laut tidak sesuai dengan baku mutu dan atau fungsinya. Pencemaran laut oleh hidrokarbon minyak solar di suatu lingkungan dapat disebabkan oleh peristiwa seperti kecelakaan kapal tangker pembawa minyak bumi, kebocoran kapal tenker, kebocoran saluran minyak bumi dan kebocoran atau tumpahan selama operasi pemboran lepas pantai (Udiharto, 2014).

Menurut Konvensi Hukum Laut III (*United Nations Conventiom on the Law of the Sea = UNCLOS III*), pencemaran laut adalah perubahan pada lingkungan laut termasuk muara sungai (estuaria) yang dapat menimbulkan akibat yang buruk sehingga dapat merugikan terhadap sumber daya laut hayati (*marine living resources*), bahaya terhadap kesehatan manusia, aktivitas pada laut serta hasil perikanan menjadi terganggu, turunnya kualitas air laut serta mutu kegunaan dan manfaatnya (Misran, 2012). Laut yang ditumpahi oleh minyak bumi akan sulit dibersihkan sehingga dapat menyebabkan terhalangnya masuknya sinar matahari dan dapat mengurangi kadar oksigen terlarut. Dampak pencemaran minyak bumi terhadap organisme laut sulit diketahui karena pengaruhnya baru tampak dalam waktu yang lama. Pengaruh kontaminasi minyak pada komunitas organisme mulai

dari kecil sekali (*neglibable*) bahkan sampai kemusnaan total (*catastrophic*) (Nugroho, 2006).

Komponen minyak yang tidak larut di dalam air akan mengapung pada permukaan air laut dan menyebabkan air laut berwarna hitam. Beberapa komponen minyak akan tenggelam dan terakumulasi di dalam sedimen sebagai deposit air hitam pada pasir dan batu-batuan di pantai. Kira-kira 5 juta ton dari minyak mentah dan dari hasil penyulingan masuk ke lingkungan ekosistem dalam bentuk tumpahan minyak. Bila hal ini tidak segera ditanggulangi, maka dalam waktu singkat laju pencemaran laut semakin tidak terkendali (Mukhtasor, 2006).

### 2.3 Solar

Minyak solar berasal dari Gas Oil yang merupakan fraksi minyak bumi dengan kisaran titik didih antara 250°C sampai 350°C yang disebut juga *midle destilat*. Komposisinya terdiri dari senyawa hidrokarbon dan non-hidrokarbon. Senyawa hidrokarbon yang ditemukan dalam minyak solar terdiri dari alkana, parafinik, naftenik dan olepin. Sedangkan untuk senyawa non-hidrokarbon terdiri dari senyawa yang mengandung unsur-unsur non-logam, yaitu sulfur, nitrogen dan oksigen serta unsur logam seperti vanadium, nikel, dan besi (Bento *et al.*, 2015).

Minyak solar adalah suatu produk destilasi minyak bumi yang khusus digunakan untuk bahan bakar mesin Compression Ignation (udara yang dikompresi menimbulkan tekanan dan panas yang tinggi sehingga membakar solar yang disemprotkan Injector) dan di Indonesia minyak solar ditetapkan dalam peraturan Dirjend Migas No. 002/P/DM/MIGAS/2007. Syarat umum yang harus dimiliki oleh minyak solar adalah harus dapat menyala dan terbakar sesuai kondisi ruang bakar. Minyak solar sebagai bahan bakar memiliki karakteristik yang dipengaruhi oleh sifat-sifat seperti Cetana Number (CN), Cetana Index (CI), nilai panas, densitas, titik

analin dan kandungan sulfur. Menurut spesifikasi minyak solar di Indonesia mempunyai berat jenis antara 0,820–0,870 pada temperature 60°F, dengan demikian dapat diperkirakan mempunyai nilai panas kotor minimal 10800 kkal/kg karena semakin rendah berat jenisnya semakin tinggi nilai panas kotornya (Qomarudin *et al.*, 2015).

Minyak solar merupakan bahan bakar minyak jenis distilat yang digunakan untuk mesin *Compression ignition* atau pada mesin diesel yang dikompresi. Pada langkah induksinya adalah udara, udara yang dikompresi akan menimbulkan tekanan dan panas yang tinggi sehingga dapat membakar solar yang disemprotkan oleh injektor dengan kualitas bakarnya ditunjukkan oleh angka cetan (*Cetane Number*) (Zulkifliani *et al.*, 2017). Pada sifat utama pada solar memiliki karakteristik sebagai berikut :

1. Tidak berwarna atau bewarna kuning muda dan berbau.
2. Tidak terlalu mudah menguap pada suhu normal.
3. Suhu nyalanya (*flash point*) adalah 350°C.
4. Titik nyalanya/suhu minimum mulai terbakar bila dekat api adalah 40°C-100°C. Angka ini cukup tinggi (lebih aman dalam pemakaian) dibandingkan dengan bensin pada suhu 10°C-15°C.
5. Berat jenis solar sekitar 0,82-0,86.
6. Tenaga panas yang dihasilkan adalah 10.170 kcal/kg.

#### **2.4 Dampak Pencemaran Minyak Solar**

Solar memiliki berat jenis lebih kecil dibandingkan dengan air. Apabila solar tumpah pada suatu perairan maka lapisan solar akan mengapung dan menutupi permukaan air. Peristiwa tersebut dapat menghalangi penetrasi cahaya matahari serta menghambat difusi oksigen. Oksigen merupakan hal yang utama dibutuhkan

oleh biota air untuk respirasi dan cahaya matahari untuk proses fotosintesis. Pencemaran minyak solar bila tidak segera diatasi maka akan berdampak besar serta merugikan biota air maupun biota darat (Merasbi *et al.*, 2013).

Soesanto (1973) dalam Sulistyono *et al.* (2012), menjelaskan akibat-akibat jangka pendek dari pencemaran minyak solar sudah banyak dilaporkan. Molekul-molekul hidrokarbon minyak bumi dapat merusak membran sel yang berakibat pada keluarnya cairan sel dan berpenetrasinya bahan tersebut ke dalam sel. Ikan-ikan yang hidup di lingkungan yang tercemar oleh minyak dan senyawa hidrokarbon akan mengalami berbagai gangguan struktur dan fungsi tubuh. Secara langsung minyak dapat menimbulkan kematian pada ikan. Hal ini disebabkan oleh kekurangan oksigen, keracunan karbondioksida dan keracunan langsung oleh bahan beracun yang terdapat dalam minyak. Sedangkan akibat jangka panjang menurut Sumadhilaga (1973) dalam Sulistyono *et al.* (2012), pencemaran minyak ternyata dapat pula menimbulkan beberapa masalah yang serius terutama bagi biota yang masih muda. Mengingat dampak pencemaran minyak bumi baik dalam konsentrasi rendah maupun tinggi cukup serius, maka manusia terus berusaha untuk mencari teknologi yang paling mudah, murah dan tidak menimbulkan dampak lanjutan.

Dampak pencemaran minyak selain mempengaruhi biota juga akan mempengaruhi pula keselamatan jalur pelayaran pada pelabuhan atau dermaga. Berdasarkan hasil penyelidikan IMO (*Internasional Maritime Organization*) tahun (1975), pada dampak pencemaran minyak apabila tumpah ke suatu perairan salah satunya Pelabuhan, akan mempengaruhi terhadap perekonomian pada jalur laut, serta akan mempengaruhi keselamatan kerja kegiatan kapal dan bongkar muat salah satunya adalah mengalami resiko kebakaran dan gangguan lain yang sangat besar jika ada kapal yang melintas di atasnya.

## 2.5 Bioremediasi

Bioremediasi merupakan penggunaan mikroorganisme yang telah dipilih untuk ditumbuhkan pada lingkungan yang mengandung polutan tertentu sebagai upaya untuk menurunkan kadar polutan tersebut. Bioremediasi didefinisikan sebagai teknologi yang menggunakan mikroba untuk mengolah bahan kontaminan melalui mekanisme biodegradasi alamiah atau meningkatkan mekanisme biodegradasi alamiah dengan menambahkan mikroba, nutrisi, donor elektron dan atau akseptor elektron (Yulia *et al.*, 2012). Tujuan akhir bioremediasi adalah memineralisasi kontaminan yaitu mengubah senyawa kimia berbahaya menjadi kurang berbahaya seperti hidrokarbon.

Bioremediasi adalah penggunaan mikroorganisme, khususnya mikroba untuk mendegradasi lingkungan yang berbahaya (*toxic*) menjadi bentuk yang tidak berbahaya (*less toxic*). Dalam aplikasinya, proses bioremediasi menggunakan bakteri dan jamur atau tanaman untuk mendegradasi substansi yang berbahaya, baik bagi kesehatan manusia dan /atau lingkungan. Mikroorganisme yang digunakan untuk mendegradasi, dapat berasal langsung dari daerah yang terkontaminasi (bakteri *indigenus*) atau dapat pula mikroorganisme yang diisolasi dari tempat lain kemudian diaplikasikan pada daerah yang terkontaminasi (bakteri *endogenous*) (Vidali, 2011).

Bioremediasi merupakan proses bahan organik berbahaya didegradasi secara biologis menjadi senyawa lain misalnya CO<sub>2</sub>, metana, air, garam organik, biomassa dan hasil samping yang sedikit lebih sederhana dari senyawa semula. Proses ini didasarkan pada siklus karbon yaitu dengan pendaurulangan bentuk senyawa organik dan anorganik melalui reaksi oksidasi dan reduksi. Bioremediasi dapat dilakukan langsung pada lingkungan tercemar (*insitu*) dengan menggunakan

mikroorganisme yang ada pada lingkungan tersebut, atau diluar lingkungan tercemar (exsitu), yaitu dengan menggunakan inokulan yang dapat mendegradasi cemaran kontaminan organik. Salah satu bioremediasi ex situ yaitu dengan menambahkan kultur bakteri terhadap medium yang terkontaminasi. Hal ini disebut dengan bioaugmentasi (Venosa dan Zhu, 2013).

## 2.6 Bakteri Hidrokarbonoklastik

Dalam ekosistem terdapat beberapa mikroba yang mampu melakukan degradasi sehingga kondisi lingkungan dapat bersifat lebih baik (Kim *et al.*, 2015). Hidrokarbon petroleum dapat didegradasikan oleh mikroba seperti bakteri, jamur, yeast, dan mikroalga (Bundy *et al.*, 2014). Mikroorganisme tersebut diisolasi berdasarkan kemampuan mereka untuk memetabolisme berbagai sumber karbon, seperti komponen alifatik dan aromatik. Bakteri mempunyai peran yang terbaik dalam degradasi hidrokarbon, alasan utama karena bakteri tersebut menggunakan hidrokarbon dari minyak sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan energi. Dari sejumlah besar penelitian dilaporkan bahwa: alkana dengan bobot molekul rendah lebih cepat didegradasi oleh isolat bakteri campuran (konsorsium) dibandingkan dengan isolat bakteri tunggal (Gerdes *et al.*, 2015).

Aktivitas hidup bakteri memerlukan senyawa karbon sebagai salah satu sumber nutrisi dan energi untuk melangsungkan proses metabolisme dan perkembangbiakan. Beberapa bakteri memiliki kemampuan yang khas yaitu menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Bakteri jenis ini tersebar luas di alam dan dikenal sebagai bakteri hidrokarbonoklastik. Bakteri ini dapat memetabolisme hidrokarbon dengan dikatalisis enzim-enzim katabolik pendegradasi hidrokarbon yang dihasilkan secara intraseluler (Fritsche dan Hofrichter, 2008).

Beberapa jenis bakteri yang dapat mendegradasi hidrokarbon paling efektif di lingkungan alami antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. laterospor* dan *Gordinia* sp. (Charvalho, 2015). Ada beberapa kelebihan yang didapat dari mikroorganisme pendegradasi minyak solar antara lain populasinya alami, mudah beradaptasi dan dapat berkembang dengan baik di lingkungannya. Bakteri tersebut dapat menghasilkan biosurfaktan, dimana dengan produksi biosurfaktan yang besar pada umumnya mempunyai kemampuan yang besar juga dalam menguraikan senyawa hidrokarbon, mikroorganisme yang demikian sangat berpotensi untuk digunakan dalam mengurangi cemaran minyak yang terdapat di laut (Ghazali *et al.*, 2014). Bakteri hidrokarbonoklastik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan biosurfaktan dan menggunakan hidrokarbon petroleum sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi.

## 2.7 Degradasi Hidrokarbon Oleh Bakteri

Proses bioremediasi pada pencemaran minyak bumi sangat membutuhkan kehadiran mikroba hidrokarbonoklastik. Menurut Nugroho (2006), karakteristik bakteri hidrokarbonoklastik yang tidak dimiliki oleh mikroba lain adalah kemampuannya mengekspresikan enzim  $\omega$ -hidroksilase, yaitu enzim pengoksidasi hidrokarbon, sehingga bakteri ini mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak bumi dengan cara memotong rantai hidrokarbon tersebut menjadi lebih pendek. Selain itu, mikroba hidrokarbonoklastik memiliki kemampuan untuk menempel pada hidrokarbon, kesanggupan memproduksi *emulsifier*, serta memiliki mekanisme untuk membebaskan diri (*desorption*) dari hidrokarbon (Nugroho, 2016).

Degradasi hidrokarbon minyak solar terjadi bila mikrob menempel di permukaan butiran-butiran minyak karena enzim oksigenase yang dibutuhkan untuk memecah rantai karbon terikat pada membrane sel. Proses penguraian hidrokarbon

oleh mikrob dimulai dengan terjadinya pelekatan mikrob pada globula minyak, yang dilanjutkan dengan pelarutan hidrokarbon oleh surfaktan. Hidrokarbon yang telah teremulsi selanjutnya diserap ke dalam sel dan diurai melalui proses katabolisme. Proses katabolisme diawali dengan proses hidroksilasi n-alkana yang menghasilkan alkohol primer, yang selanjutnya dioksidasi oleh enzim dehidrogenase dan menghasilkan asam lemak. Jika system oksidasi mikrob pengurai hidrokarbon berjalan secara optimal, maka asam lemak yang terbentuk ini akan diurai sempurna menjadi energi, H<sub>2</sub>O dan CO<sub>2</sub> melalui proses beta oksidasi ( $\beta$ -oksidasi) (Godfrey, 2016).

Kemampuan bakteri mendegradasikan minyak solar disebabkan karena bakteri menghasilkan enzim yang mampu memecah senyawa organik kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana. Enzim monooksigenase dan enzim dioksigenase yang dihasilkan oleh bakteri mampu membuka ikatan karbon pada cincin aromatik dan menghasilkan alcohol primer. Enzim dioksigenase yang dihasilkan oleh bakteri mendegradasi PAH dan membentuk cis-dihidrodiol. Senyawa ini kemudian didehidrogenasi untuk membentuk dihidroksi-PAH yang merupakan substrat untuk enzim membuka cincin. Melalui pemberian satu molekul oksigen maka enzim monooksigenase juga dapat mendegradasi PAH dan membentuk arene oksida, selanjutnya molekul-molekul ini akan digunakan oleh mikroba sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan energy (Hasyimuddin et al., 2016).

## **2.8 Faktor Yang Mempengaruhi Biodegradasi**

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi beberapa faktor sehingga proses biodegradasi juga dipengaruhi oleh faktor yang sama. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses biodegradasi antara lain suhu, pH, keadaan nutrisi, ketersediaan Oksigen ( Plohl *et al.*, 2011).

### 2.8.1 Derajat Keasaman (pH)

Sebagian besar untuk mendukung pertumbuhan mikroba pada proses biodegradasi terjadi pada derajat keasaman (pH) netral. Nilai pH yang ekstrim akan berpengaruh negatif pada kecepatan laju degradasi hidrokarbon oleh bakteri (Andiana, 2014). Dalam biodegradasi endapan minyak menunjukkan bahwa nilai pH 7-8 menghasilkan biodegradasi yang mendekati nilai optimal (Nugroho, 2006).

### 2.8.2 Suhu

Pada suhu rendah viskositas minyak meningkat dan volatilitas senyawa toksik menurun sehingga menghambat proses biodegradasi (Atlas, 1981). Hidrokarbon rantai pendek alkana lebih mudah larut pada suhu rendah, tetapi pada suhu tinggi senyawa aromatik lebih mudah larut. Secara umum dengan menaikkan suhu sampai batas tertentu maka laju biodegradasi juga akan meningkat. Laju biodegradasi laut dapat dicapai pada suhu 15 – 20°C (Walker dan Colwell, 2014).

### 2.8.3 Oksigen

Oksigen yaitu komponen penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba pada lingkungan hidrokarbon. Oksigen dibutuhkan oleh mikroorganisme, baik oksigen yang terlarut dalam air maupun dalam bentuk oksigen bebas yang diperoleh melalui udara. Oksigen adalah kebutuhan terpenting dalam proses biodegradasi minyak bumi. Pada saat proses biodegradasi, oksigen digunakan untuk proses reaksi oksidasi dan respirasi mikroorganisme (Andina, 2014).

Menurut Sharpley (1996), mikroorganisme pendegradasi minyak bumi sebagian besar tergolong dalam mikroorganisme aerob. Oksigen digunakan sebagai jalur mengaktifkan enzim oksigenase dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon. Pada saat oksigen terbatas maka pertumbuhan bakteri akan terhambat, untuk

memenuhi kebutuhan oksigen dapat dipenuhi dengan aerasi yaitu dengan cara pengocokan dengan shaker.

#### **2.8.4 Nutrisi**

Mikroba sangat bergantung pada nutrisi untuk bertahan hidup. Mampu atau tidaknya mikroba bertahan hidup akan terlihat dari kecukupan nutriennya. Menurut Gordon (1994), 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. Karbon merupakan elemen paling dasar untuk seluruh bentuk kehidupan dan karbon dibutuhkan dalam jumlah yang lebih besar daripada elemen–elemen lain, Karbon biasanya terikat dengan elemen H (Hidrogen), O (Oksigen) dan N (Nitrogen).

### **2.9 Parameter Analisis Degradasi**

#### **2.9.1 Total Petroleum Hidrocarbon (TPH)**

TPH adalah jumlah hidrokarbon minyak bumi yang terukur dari media lingkungan. TPH merupakan senyawa organik yang terdiri dari hidrogen dan karbon contohnya benzene, toluena, etilbenzena dan isomer xylene. Hidrokarbon minyak bumi (PHC-Petroleum Hidrokarbon) adalah berbagai jenis senyawa hidrokarbon yang terdapat dalam minyak bumi. Dalam satu jenis campuran minyak bumi akan terdapat rantai hidrokarbon dengan rantai C5-C23. Dengan demikian, TPH didefinisikan sebagai metoda analisis yang digunakan untuk mengukur jumlah hidrokarbon minyak bumi dalam suatu media (Asia *et al.*, 2016).

### 2.9.2 Gas Chromatography (GC/MS)

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasar pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam di bawah pengaruh pergerakan fase yang bergerak. Kromatografi bertujuan untuk pemisahan komponen dari matriks sampel dan tetap dibiarkan dalam fase diam kemudian ditentukan untuk analisis (Mulja dan Suharman, 1995). Prinsip kerja GC adalah memisahkan senyawa organik hidrokarbon dengan meneruskan arus gas melalui fasa diam. Waktu tambat pada GC menunjukkan identitas senyawa yang dapat memberikan informasi kualitatif, yaitu ada tidaknya senyawa tertentu dan secara kuantitatif dapat menunjukkan banyaknya masing-masing senyawa dalam suatu campuran (Nugroho,2006).

Kromatografi gas merupakan metode analisis senyawa pada suatu sampel yang dipisahkan secara fisik sebelum pengukuran, sedangkan spektrometri massa adalah suatu metode analisis dimana sampel dikonversi menjadi ion-ion gas dan kemudian dilakukan pengukuran terhadap massa ion-ion tersebut. Diagram alir prosedur kerja GC-MS. GC berfungsi sebagai *inlet* sampel bagi MS dan MS berfungsi sebagai detektor GC. Data yang dihasilkan oleh GC-MS akan ditampilkan dengan kromatogram (GC) dan spektrum massa (MS) dimana sumbu x menunjukkan waktu penyimpanan (*retention time*) dan sumbu y menunjukkan intensitas. Masing-masing puncak (*peak*) pada kromatogram menunjukkan satu senyawa. Spektrum massa memiliki *base peak* dan dapat memberikan informasi tentang berat molekul dan struktur kimia (Khopkar, 2003).

### 2.9.3 Uji Aktivitas Enzim

Biodegradasi komponen hidrokarbon oleh bakteri dimediasi oleh beberapa jenis enzim degradatif. Jenis enzim degradatif yang terlibat dalam degradasi

hidrokarbon dapat dibagi menjadi dua berdasarkan mekanisme kerja enzim, yaitu enzim perifer dan enzim fisi. Enzim perifer bekerja untuk mengenali dan mengkonversi hidrokarbon menjadi molekul yang lebih mudah masuk ke dalam sel sehingga lebih mudah didegradasi, contohnya yaitu enzim lipase. Enzim fisi bekerja mendegradasi molekul tersebut melalui jalur metabolisme sel, contohnya yaitu kelas enzim monooksigenase dan dioksigenase (Mishra dan Singh, 2012).

Kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon dipengaruhi oleh adanya enzim katabolik yang mampu memecah senyawa hidrokarbon menjadi senyawa metabolit yang mampu masuk ke dalam siklus asam sitrat. Enzim katabolik yang paling berperan penting dalam proses katabolisme hidrokarbon yang masuk ke dalam sel bakteri adalah enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi hidrokarbon tahap pertama. Tahap pertama katabolisme alkana dan aromatik oleh bakteri masing-masing diinisiasi oleh enzim monooksigenase dan dioksigenase (Jauhari *et al.*, 2014). Enzim yang dihasilkan oleh bakteri hidrokarbonoklastik dapat mendegradasi hidrokarbon melalui satu atau lebih jalur metabolik karena enzim-enzim tersebut tidak mampu mendegradasi semua jenis senyawa hidrokarbon (Mishra *et al.*, 2014; Macaulay, 2014). Enzim fisi yang bekerja pada proses degradasi alkane bergantung dari panjang rantai karbon alkana tersebut, sehingga bakteri yang mampu mendegradasi alkana umumnya memiliki beberapa gen yang menyandi berbagai variasi enzim alkana monooksigenase (Van Beilen *et al.*, 2003).

### 3. KERANGKA PENELITIAN

#### 3.1 Landasan Teori

Pencemaran air adalah masuk atau dimasukannya makhluk hidup, zat, energi dan atau komponen lain ke dalam air dan atau berubahnya tatanan air oleh kegiatan manusia atau proses alam sehingga kualitas air menurun sampai ketinggian tertentu yang menyebabkan air kurang atau tidak dapat lagi berfungsi sesuai dengan peruntukannya (UU No. 23, 1997). Salah satu limbah yang masuk kedalam perairan yaitu limbah minyak solar. Limbah minyak solar merupakan buangan yang berasal dari hasil eksplorasi produksi minyak, pemeliharaan fasilitas produksi, fasilitas penyimpanan, pemrosesan dan tangki penyimpanan minyak pada kapal laut (Hasyimuddin *et al.*, 2016).

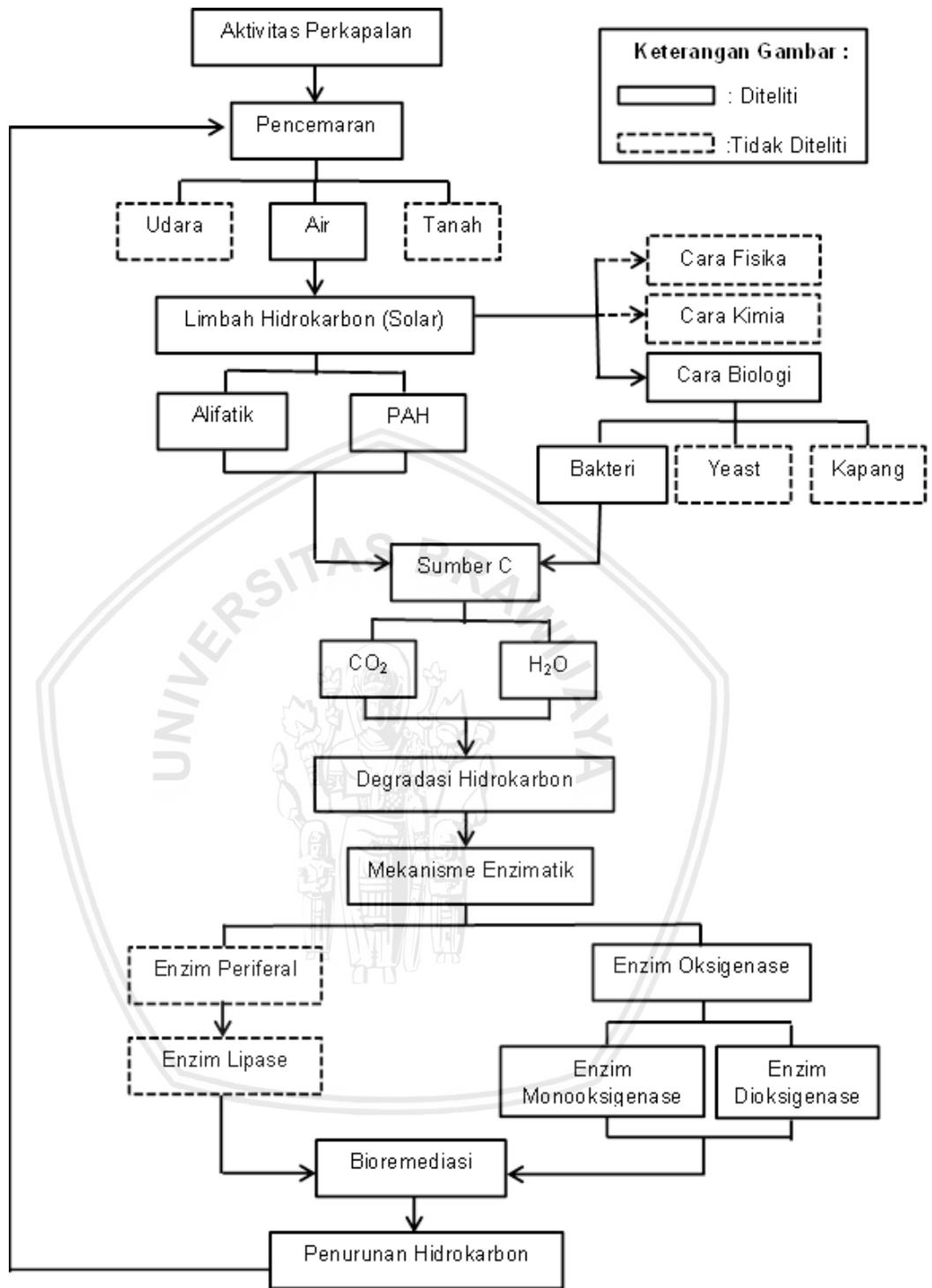
Pencemaran lingkungan oleh limbah solar terus mengalami peningkatan dan telah menimbulkan dampak yang berarti bagi kesehatan organisme hidup. Limbah minyak solar merupakan B3 (Bahan Beracun dan Berbahaya) yang secara langsung toksik serta menimbulkan bahaya potensial bagi manusia dan lingkungan. Limbah minyak solar mengandung senyawa hidrokarbon, dimana hidrokarbon merupakan senyawa yang terdiri dari unsur karbon (C) dan hidrogen (H). Komposisi minyak solar terdiri dari rangkaian rantai hidrokarbon, di dalam perairan laut dan berbahaya bagi kehidupan biota laut. Oleh karena itu, rangkaian rantai hidrokarbon tersebut perlu didegradasi menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Degradasi minyak solar secara fisika dan kimia telah banyak digunakan dan memiliki kelebihan yaitu efisien serta mampu menurunkan kadar polutan pada minyak solar secara maksimal namun memiliki kelemahan yaitu tidak ekonomis terutama jika diaplikasikan dalam skala industri. Salah satu metode yang menjadi

pilihan dengan upaya bioremediasi yakni suatu proses yang memanfaatkan kemampuan katalitik organisme hidup khususnya mikroorganisme untuk memperbesar laju atau tingkat penghancuran polutan, sehingga pencemaran lingkungan dapat diperbaiki atau dihilangkan (Hajar, 2012) mikroorganismenya yaitu bakteri, *yeast*, atau fungi. Bakteri banyak dipilih dibandingkan *yeast* atau fungi karena memiliki kecepatan pertumbuhan yang tinggi serta kemudahan untuk memperbanyak jumlah selnya. Hidrokarbon yang didegradasi digunakan sebagai sumber karbon utama oleh bakteri dalam proses metabolisme. Bakteri merupakan organisme yang mempunyai penyebaran terluas di alam. Hal tersebut karena bakteri mampu hidup pada berbagai habitat dan mampu menguraikan senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana untuk memperoleh zat-zat tertentu yang dibutuhkan dalam rangka mempertahankan hidupnya (Hatmanti, 2010). Untuk lebih jelasnya disajikan pada kerangka konsep pada Gambar 3.

### **3.2 Kerangka Konsep Penelitian**

Limbah solar dari aktivitas industri perkapalan masuk dalam perairan dan mengganggu aktivitas biota perairan. Peran bakteri sangat penting dalam mendegradasi limbah solar dan untuk lebih jelasnya disajikan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kerangka Konseptual Penelitian

### 3.3 Hipotesis

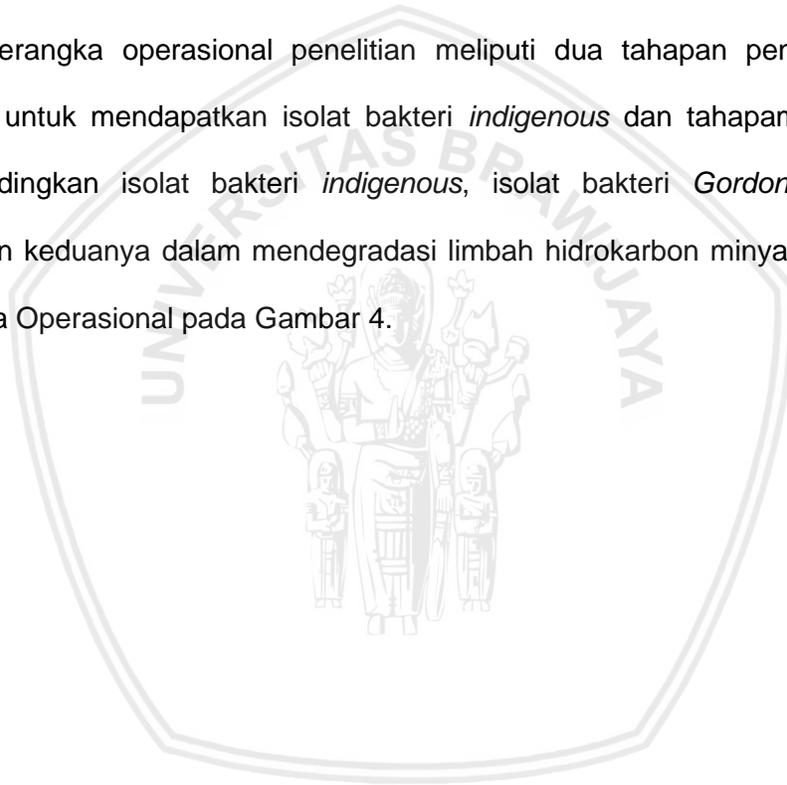
Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

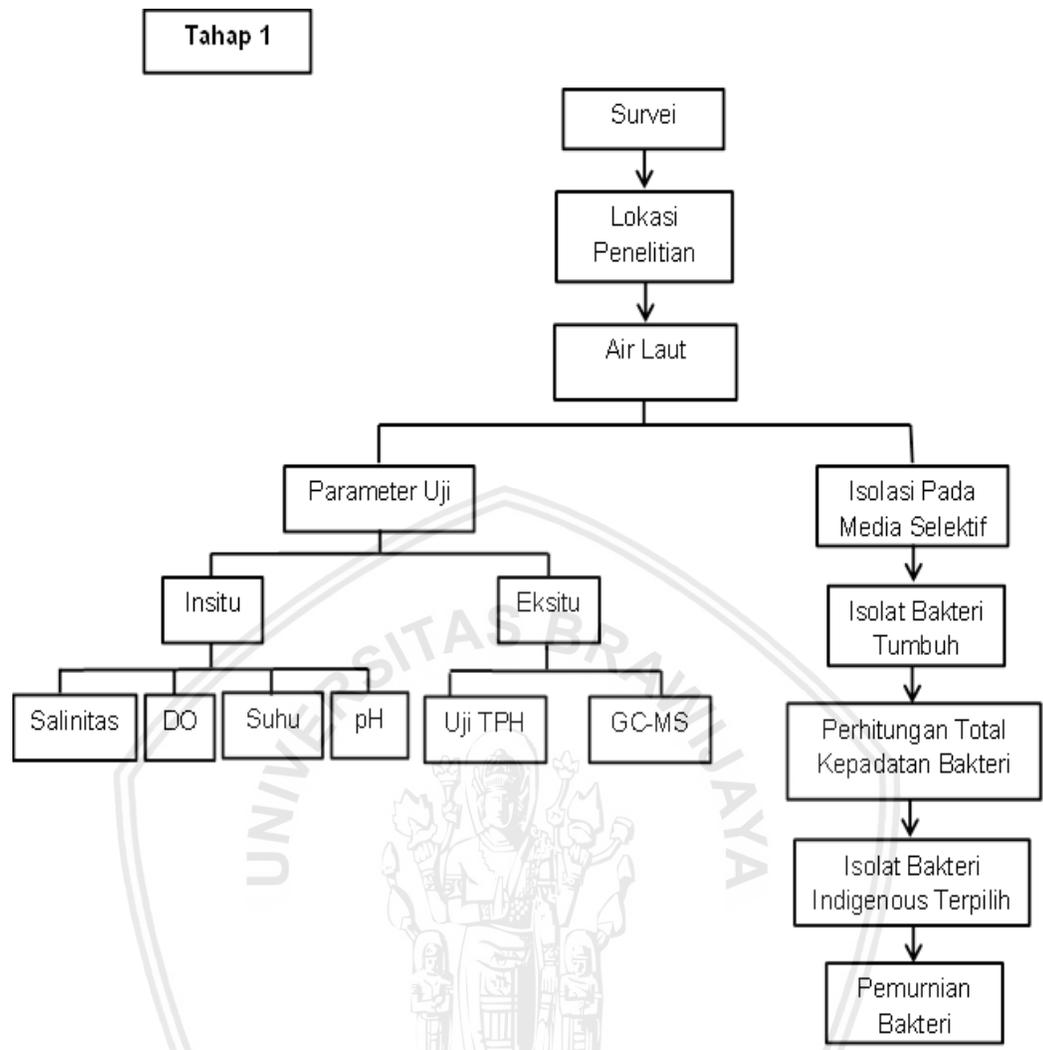
$H_0$  : Tidak terdapat perbedaan kemampuan bakteri *indigenous*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar.

$H_1$  : Terdapat perbedaan kemampuan bakteri *indigenous*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar.

### 3.4 Kerangka Operasional dan Analisis Data

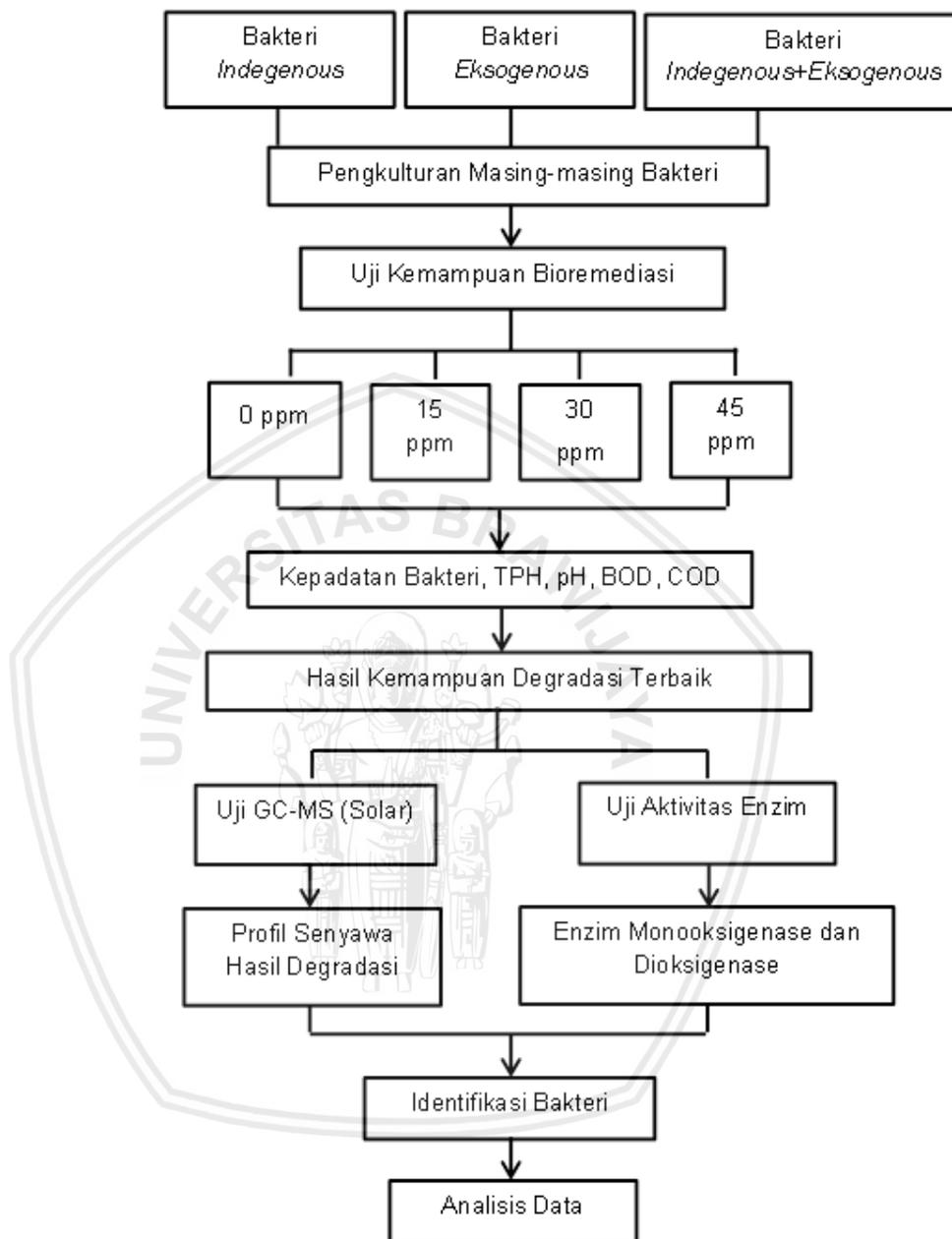
Kerangka operasional penelitian meliputi dua tahapan penelitian. Tahap pertama untuk mendapatkan isolat bakteri *indigenous* dan tahapam kedua untuk membandingkan isolat bakteri *indigenous*, isolat bakteri *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar. Bagan Kerangka Operasional pada Gambar 4.





**Gambar 4.** Kerangka Operasional

Tahap 2



### 3.5 Definisi Operasional dan Pengukurannya

Berdasarkan pada teori dan hipotesis dalam penelitian ini, maka variabel penelitian dan definisi operasional variabel pengukurannya adalah sebagai berikut;

1. Variabel bebas didefinisikan sebagai variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (Sugiyono, 2009). Dalam penelitian ini, variabel bebas yang digunakan adalah sampel air laut dan sampel isolat bakteri.
2. Variabel terikat merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2009). Dalam penelitian ini, variabel terikat adalah kandungan limbah minyak solar yang terdapat dalam sampel di analisis menggunakan TPH.
3. Variabel kontrol juga disebut sebagai variabel kendali dan merupakan variabel kendali karena variabel ini perlu dikontrol Sugiyono (2009). Dalam penelitian ini, variabel kontrol adalah parameter kualitas air.

### 3.6 Kebaruan Penelitian

Kebaruan dalam penelitian ini yang belum pernah dilakukan sebelumnya adalah :

1. Analisis penggunaan isolat bakteri gabungan (bakteri *indigenous* + bakteri *eksogenous*) sebagai agen bioremediasi hidrokarbon dan menguji aktivitas enzim pendegradasi minyak solar belum pernah dilakukan sebelumnya. Berdasarkan kajian literature (Tabel 1), penelitian mengenai bioremediasi menggunakan bakteri hanya menggunakan isolat bakteri *indigenous*.

**Tabel 1.** Penelitian Terdahulu

No	Judul	Hasil	Kebaruan Penelitian	Referensi
1	Konsentrasi Sludge Minyak Bumi dalam Proses Bioremediasi Memanfaatkan Bakteri Indigen dan Lamtoro Gung.	Peneliti memperoleh dan memanfaatkan isolat bakteri <i>indigenus</i> sebagai agen bioremediasi minyak bumi.	Menggunakan perlakuan dengan menambahkan isolat bakteri <i>eksogenous</i> .	Alghafari <i>et al.</i> , 2016
2	Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin dari Perairan Pelabuhan Gresik	Media yang digunakan dalam mengisolasi bakteri pendegradasi solar dan bensin adalah <i>PCA</i> .	Media yang digunakan dalam mengisolasi bakteri <i>indigenus</i> adalah <i>Bushnell-Hass</i> .	Nasikhin dan Maya, 2013
4	Distribution of Hydrocarbon-Degrading Bacteria in the Soil Environment and Their Contribution to Bioremediation	Mengisolasi bakteri pendegradasi limbah minyak solar dari beberapa tanah yang tercemar.	Lokasi pengambilan sampel dilakukan di perairan yang tercemar oleh limbah solar.	Fukuhara <i>et al.</i> , 2013
5	Invitro Bioemediation Of Oil Refinery Waste By <i>indigenus</i> Bacteria	Mendapatkan isolat bakteri dengan penambahan inokulum campuran bakteri <i>indigeneous</i> .	Menggunakan penggabungan atau campuran bakteri <i>indigenus</i> dan <i>eksogenous</i> .	Zam, 2011
6	Optimasi Konsentrasi Inokulum, Rasio C:N:P Dan pH Pada Proses	Menganalisis kemampuan bakteri pendegradasi limbah penggilingan	Menganalisis kemampuan bakteri pendegradasi limbah solar dengan uji aktivitas Enzim Monooksigenase.	Zam, 2010

	Bioremediasi Limbah Penggilingan Minyak Bumi Menggunakan Kultur Campuran	minyak bumi dengan Uji GC-MS.		
--	--	-------------------------------	--	--

### 3.7 Strategi Publikasi

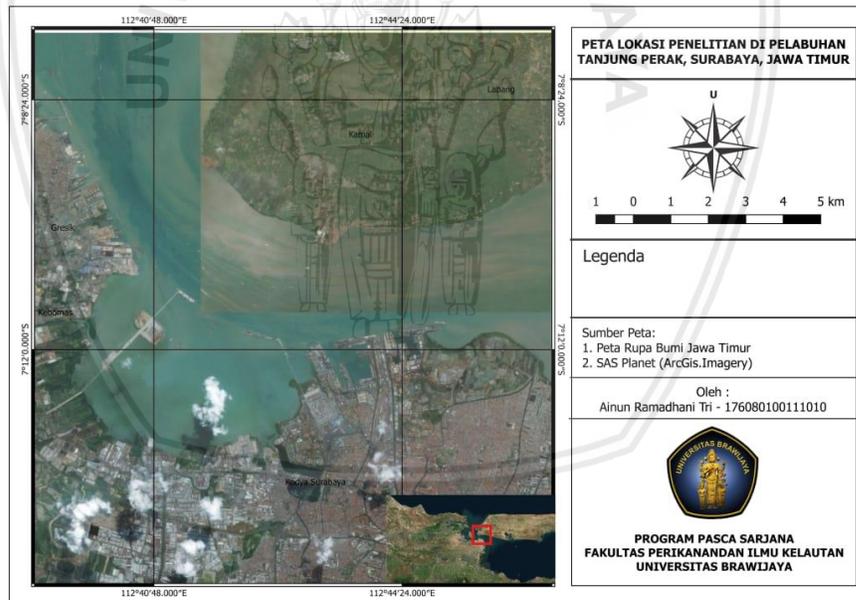
Hasil penelitian mengenai Analisis Kemampuan Bakteri Dari Perairan Tercemar Yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Limbah Hidrokarbon Minyak Solar akan dipublikasi di Jurnal *Indonesian Journal of Biotechnology (IJBiotech)*. Jurnal *IJBiotech* merupakan salah satu jurnal terindeks *scopus* dengan ISSN 2089-2241. Publikasi karya ilmiah merupakan tahapan setelah pelaksanaan penelitian. Publikasi dipersyaratkan pada pelaksanaan Kurikulum Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.



## 4. MATERI dan METODE

### 4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Desember-Januari 2018. Pelaksanaan kultur bakteri akan dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Sedangkan analisis kandungan limbah minyak solar dilaksanakan di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi UIN Malang. Lokasi penelitian ini terletak pada posisi  $112^{\circ}43'22''$  garis Bujur Timur dan  $07^{\circ}11'54''$  Lintang Selatan. Peta lokasi penelitian disajikan pada **Gambar 5**.



**Gambar 5.** Lokasi Penelitian

## 4.2 Materi Penelitian

### 4.2.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah GPS, kamera, botol sampel, DO meter, timbangan analitik, timbangan digital, gelas arloji, batang sendok tanduk, gelas ukur, gelas beaker, labu erlenmeyer, *hot plate*, batang pengaduk kaca (spatula), autoklaf, pipet, *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, *incubator shaker*, cawan petri, *L glass*, tabung reaksi, rak tabung, jarum ose, corong, corong pisah, pH meter, spektrofotometer, lemari inkubator, kaca preparat, mikroskop, kulkas, plastik *wrap*, alumunium *foil*, plastik tahan panas, kapas, kertas saring, kertas coklat pembungkus dan ruang lemari asam.

### 4.2.2 Bahan-bahan Penelitian

Bahan- bahan yang digunakan pada penelitian meliputi, sampel air laut yang tercemar minyak solar di Pelabuhan Tanjung Perak, minyak solar, aquades, alkohol 70%, kloroform, HCL 3N dan bakteri *eksogenous* dari spesies *Gordonia terrae*. Media pertumbuhan isolat yang digunakan adalah Bushnell-Hass yang terdiri dari  $K_2HPO_4$  1 g/L,  $KH_2PO_4$  1 g/L,  $NH_4NO_3$  1 g/L,  $MgSO_4$  0,2 g/L,  $CaCl_2$  0,02 g/L dan  $FeCl_3$  0,05 g/L dengan nilai pH 7,0. Bahan tersebut untuk media cair, sedangkan pada media padat ditambahkan dengan *bacto agar* sebagai bahan pematid media. Pada media uji biokimia, menggunakan media *Simon Citrate Agar* (SCA) untuk uji sitrat, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) untuk uji TSIA, media Nutrien Gelatin untuk uji hidrolisis gelatin. Uji reagen pewarnaan gram menggunakan kristal violet, safranin, iodium, alkohol serta minyak imersi digunakan pada pengamatan menggunakan mikroskop.

#### 4.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini metode eksperimen. Dimana metode eksperimen merupakan metode yang dilaksanakan di laboratorium. Dengan tujuan melaksanakan percobaan untuk melihat suatu hasil yang diinginkan. Metode eksperimen di laboratorium merupakan kegiatan yang dilakukan dengan melaksanakan manipulasi terhadap obyek penelitian untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan serta berapa besar hubungan sebab akibat antara dua faktor atau lebih (Sari dan Manan, 2012). Kelompok eksperimen adalah kelompok yang menjadi perhatian utama peneliti. Umumnya kelompok ini diberi perlakuan tertentu dan dilihat hasilnya, kemudian dibandingkan dengan hasil kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan tertentu. Penelitian eksperimen selalu dilakukan dalam penelitian eksakta seperti penelitian di laboratorium (Juliandi *et al.*, 2014).

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 12 perlakuan dan 3 ulangan. Menurut Kusrieningrum (2008), rumus yang digunakan untuk menentukan ulangan yang diberikan adalah :

$$t(n-1) \geq 15$$

Faktor pertama adalah isolat bakteri (A), yaitu :

A<sub>1</sub> : Isolat bakteri *indigenous*

A<sub>2</sub> : Isolat bakteri *Gordonia terrae*

A<sub>3</sub> : Bakteri *indigenous*+ *Gordonia terrae*

Faktor kedua adalah konsentrasi minyak solar (B), yaitu :

B<sub>1</sub> : Konsentrasi minyak solar 15 ppm

B<sub>2</sub> : Konsentrasi minyak solar 30 ppm

B<sub>3</sub> : Konsentrasi minyak solar 45 ppm

A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> = Perlakuan isolat bakteri *indigenus* dengan konsentrasi minyak solar  
15 ppm

A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> = Perlakuan isolat bakteri *indigenus* dengan konsentrasi minyak solar  
30 ppm

A<sub>1</sub>B<sub>3</sub> = Perlakuan isolat bakteri *indigenus* dengan konsentrasi minyak solar  
45 ppm

A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> = Perlakuan isolat bakteri *Gordonia terrae* dengan konsentrasi minyak  
solar 15 ppm

A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> = Perlakuan isolat bakteri *indigenus* dengan konsentrasi minyak solar  
30 ppm

A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> = Perlakuan isolat bakteri *Gordonia terrae* dengan konsentrasi minyak  
solar 45 ppm

A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> = Perlakuan isolat bakteri *indigenus*+ *Gordonia terrae* dengan  
konsentrasi minyak solar 15 ppm

A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> = Perlakuan isolat bakteri *indigenus*+ *Gordonia terrae* dengan  
konsentrasi minyak solar 30 ppm

A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> = Perlakuan isolat bakteri *indigenus*+ *Gordonia terrae* dengan  
konsentrasi minyak solar 45 ppm

#### 4.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dalam dua tahap. Tahap I meliputi isolasi bakteri dari sampel air laut yang bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri idegeneous. Tahap II meliputi menganalisis dan membandingkan kemampuan isolat bakteri tunggal (*indigenus* dan *eksogenous*) dan gabungan keduanya (*indigenus* dan *eksogenous*) dalam mendegradasi hidrokarbon. Parameter yang akan diamati adalah kadar minyak solar yang tersisa, kepadatan sel bakteri, TPH dan kualitas air

pada hari 0, 7 dan 14. Sedangkan untuk analisa profil senyawa sesudah dan sebelum proses bioremediasi akan diuji dengan GC-MS. Untuk uji enzim akan menganalisa aktivitas enzim monooksigenase dan enzim dioksigenase dari sampel yang merupakan hasil terbaik.

#### 4.4.1 Tahap I

##### a. Pengambilan Sampel

Lokasi pengambilan sampel penelitian ini dilakukan di lingkungan perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Sampel air laut diambil dengan metode *purposive sampling* pada stasiun yang paling tercemar oleh minyak solar. Kandidat stasiun yang terpilih diantaranya adalah Jamrud Utara Pelabuhan Tanjung Perak, Berlian Barat Tanjung Perak dan Intan Pelabuhan Tanjung Perak. Waktu pengambilan sampel dilakukan pada saat musim kemarau.

##### b. Analisis Kualitas Air

###### • Salinitas

Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat yaitu refraktometer. Berikut adalah prosedur pengukuran salinitas :

1. Mengangkat penutup kaca prisma.
2. Mengambil 1 – 2 tetes air sampel yang diukur.
3. Menutup kembali kaca prisma dengan hati-hati agar tidak terjadi gelembung.
4. Melihat nilai salinitas melalui kaca pengintai.
5. Membersihkan permukaan prisma dengan tissue setelah selesai digunakan.

###### • Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter Hach Tipe Sension TM . Berikut adalah prosedur pengukuran pH :

1. Menghidupkan alat dengan cara menekan tombol power.
2. Selanjutnya menekan tanda Ceklis/grafik dan display akan muncul CAL, kemudian menekan ceklis selama 4-5 detik lagi dan layar muncul CAL. pH, CAL 1.
3. Memasukkan buffer pH 7, kemudian tekan ceklis dan layar akan keluar nilai pH, kemudian jika hasil memenuhi kriteria alat, maka akan muncul permintaan CAL 2.
4. Memasukkan buffer pH 4, kemudian menekan ceklis dan layar akan keluar nilai pH, kemudian jika hasil memenuhi kriteria alat, maka akan muncul permintaan CAL 3.
5. Memasukkan buffer pH 10, kemudian menekan ceklis dan layar akan keluar nilai pH, kemudian jika hasil memenuhi kriteria alat, maka alat OK.
6. Setelah itu, memasukkan pH meter ke dalam sampel air dan melihat nilai pH pada layar.
7. Mencatat hasilnya.

- **Suhu**

Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan alat yaitu thermometer Hg. Berikut adalah prosedur pengukuran suhu :

1. Memasukkan thermometer ke dalam perairan sekitar 10 cm dan ditunggu sekitar 2 menit sampai air raksa dalam skala thermometer menunuk atau berhenti pada skala tertentu.
2. Mencatat dalam skala  $^{\circ}\text{C}$ .
3. Membaca skala pada termometer dan jangan sampai tangan menyentuh thermometer.

- **Oksigen Terlarut (DO)**

Pengukuran DO dilakukan dengan menggunakan alat yaitu DO meter.

Berikut adalah prosedur pengukuran DO :

1. Tekan tombol "ON" pada DO meter.
2. Ujung batang dikalibrasi menggunakan aquades agar tidak terkontaminasi dengan sample sebelumnya.
3. Batang dicelupkan pada DO meter ke air sampel.
4. Angka yang ditunjukkan pada layar dilihat dan dicatat menggunakan alat tulis.
5. Ujung batang dikalibrasi menggunakan aquades agar netral kembali.
6. Tekan tombol "OFF" pada DO meter.

- **Biological Oxygen Demand (BOD)**

Berikut adalah prosedur pengukuran BOD :

1. Mengambil sampel air sebanyak 500 mL diencerkan di beaker glass dengan air suling yang sudah diaerasi selama 2 jam sehingga volumenya menjadi 2000 mL.
2. Membagi sample menjadi 6 botol winkler.
3. Menambahkan 1 ml  $MnSO_4$  dan 1 ml alkali iodide azida ke dalam botol winkler BOD hari ke 0, sementara itu ke 5 botol winkler lainnya dimasukkan ke dalam inkubator.
4. Menutup botol winkler BOD hari ke 0 dan menghomogenkan hingga terbentuk gumpalan yang sempurna.
5. Membiarkan gumpalan mengendap 5 menit sampai 10 menit.
6. Menambahkan 5 ml  $H_2SO_4$  pekat, menutup dan menghomogenkan hingga endapan larut sempurna.
7. Mengambil 50 ml sampel dan memasukkannya ke dalam Erlenmeyer 150 ml

8. Meneteskan indikator amilum/ kanji berwarna biru kemudian menitrasi sampel dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  sampai warna biru tepat hilang dan mencatat volume  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  yang terpakai.
9. Botol winkler selanjutnya diukur nilai DO nya seperti tahapan 4-8.

BOD dihitung dengan menggunakan rumus :

$$DO = \frac{V \text{ Thisulfat} \times N \text{ Thiosulfat} \times 1000 \times BeO_2 \times P}{V \text{ Sampel}}$$

$$BOD = DO_0 - DO_5$$

Keterangan :

$DO_0$  = Oksigen terlarut 0 hari

$DO_5$  = Oksigen terlarut 5 hari

$BeO_2$  = 8

P = Pengenceran

- **Chemical Oxygen Demand (COD)**

Berikut adalah prosedur pengukuran COD :

1. Memasukkan sampel sebanyak 100 mL ke dalam erlenmeyer.
2. Menambahkan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 4 N dan kalium permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) masing-masing sebanyak 5 mL dan 10 mL.
3. Memanaskan larutan sampai mendidih.
4. Menambahkan asam oksalat ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) sebanyak 10 mL.
5. Menitrasi dengan menggunakan kalium permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) dalam keadaan masih panas, hingga larutan berubah warna merah muda.
6. Mencatat volume titrat yang digunakan.

COD dihitung dengan menggunakan rumus :

$$COD = \frac{A-B \times N \text{ Fas} \times 1000 \times BeO_2 \times P}{V \text{ Sampel}}$$

Keterangan :

A = mL titran blanko

B = mL titrasi sampel

BeO<sub>2</sub> = 8

N = Normalitas FAS

P = Pengenceran

### c. Isolasi Bakteri *Indigenus*

Sumber isolat diambil dari Pelabuhan Tanjung Perak, Surabaya di daerah yang terkena tumpahan minyak terbanyak. Media yang digunakan adalah *Bushnell-Hass* yang terdiri dari K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 gr/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 gr/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 gr/L, MgSO<sub>4</sub> 0,2 gr/L, CaCl<sub>2</sub> 0,02 gr/L dan FeCl<sub>3</sub> 0,05 gr/L yang dilarutkan dalam 250 ml air laut (Andina, 2014). Ke dalam media tersebut ditambahkan minyak solar sebanyak 10% (v/v) sebagai sumber karbon dan pH medium ini adalah 6,8-7 (Pikoli *et al.*, 2010).

Isolasi dilakukan dengan teknik *spread-plate* menggunakan pengenceran 10<sup>-8</sup> dengan air laut steril. Sampel air laut diambil sebanyak 1 ml untuk dibiakkan di atas lempeng agar media yang mengandung solar 0,1 ml dan bacto agar sebagai pematat lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 120 jam (Pikoli *et al.*, 2010). Setelah diinkubasi koloni bakteri yang representatif hasil isolasi digoreskan pada medium LBa (*Luria Bertani*) dalam cawan petri dengan metode *quadrat streak-plate*. Koloni bakteri yang telah murni kemudian dipindahkan ke medium LBa miring sebagai stok murni.

#### 4.4.2 Tahap II

##### a. Pembuatan Suspensi Isolat Bakteri $10^6$ sel/ml

Adapun prosedur pembuatan suspensi bakteri adalah sebagai berikut :

1. Mengambil bakteri 1-2 ose dengan jarum ose..
2. Masukkan NaCl fisiologis 0,85 % ke dalam tabung reaksi steril.
3. Campuran kemudian dihomogenkan dengan vortex, kekeruhan campuran dibandingkan dengan kekeruhan Mac Farland 0,5 Standard yang setara dengan  $10^6$  sel/ml.

Larutan Mac Farland 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan  $1 \times 10^6$  sel/ml. Urutan kerja pembuatan larutan McFarland 0,5 menurut Nurhayati (2007), adalah sebagai berikut. Sebanyak 0,05 ml Barium Clorida ( $\text{BaCl}_2$ ) 1% dalam akuades ditambahkan 9,95 ml Asam Sulfat( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1%. Kemudian disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung.

##### b. Kultur Bakteri

Adapun prosedur pengkulturan bakteri *indigenus* dan *eksogenous* adalah sebagai berikut :

1. Biakan bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.
2. Jarum ose yang sudah ada bakterinya dicelupkan pada media *Luria Bertani Broth* (LBb).
3. Media disimpan pada inkubator dengan suhu  $35^\circ\text{C}$  selama 24 jam.
4. Setelah 24 jam media LB akan berubah menjadi keruh yang menandakan bahwa bakteri telah tumbuh. Bakteri ini kemudian dilihat kepadatannya.
5. Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu  $10^6$  CFU/ml.

6. Bakteri dari media LB diambil dan diencerkan dengan Nafis sebanyak 9 ml sehingga didapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^{-6}$  CFU/ml.
7. Bakteri dibiakkan dengan metode cawan sebar (*Spread plate*).

**c. Uji Kemampuan Isolat Bakteri Dalam Mendegradasi Minyak Solar**

Masing-masing perlakuan isolat bakteri terdiri dari bakteri indigenous, bakteri ekosogenous dan gabungan kedua bakteri indigenous+eksogenous yang telah dimurnikan sejumlah  $10^6$  ditambahkan ke dalam medium *Luria Bertani Broth* (10 ml) yang mengandung minyak solar sebesar 15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm. Kultur diinkubasi pada suhu ruang dan digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Kemudian dilakukan analisis TPH pada hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Sedangkan estimasi kepadatan bakteri dihitung pada hari ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14. Bakteri *eksogenous* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Gordonia terrae* yang telah terbukti mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon (Kang *et al.*, 2015).

**d. Total Kepadatan Bakteri**

Kepadatan sel isolat bakteri masing-masing perlakuan dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* pada hari ke- 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 14. Sampel bakteri diencerkan ke dalam *ependorf* yang telah terisi aquadest steril, kemudian sampel tersebut dicampurkan dengan pewarna *trypan blue* untuk membedakan antara sel bakteri hidup dan sel bakteri mati. Papan hitung terdiri dari kotak yang panjangnya 1 mm, lebar dan dalamnya 0,1 mm, atau volumenya  $0,1 \text{ mm}^3$ . Dalam kotak ini ada 1 kotak besar yang masing-masing terbagi lagi menjadi 16 kotak kecil yang sama besarnya. Dalam penelitian ini dihitung jumlah bakteri di dalam 5 kotak besar terdiri dari 4 kotak yang berdiagonal dan 1 kotak di sudut yang lain. Jadi yang

dihitung ada 5 x 16 kotak kecil = 80 kotak kecil. Rumus untuk menghitung kepadatan bakteri yaitu :

$$\text{Kepadatan Bakteri (cell/ml)} = \text{Jumlah Bakteri} \times 250000 \times 10 \times 3,4$$

**e. Total Petroleum Hidrocarbon (TPH)**

Analisis kadar minyak bumi secara Gravimetri dapat dilakukan dengan cara media Bushnell-Hass yang mengandung minyak solar hasil perlakuan dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan 5 ml HCl 3N dan 60 ml n-heksan hasil pemurnian dengan destilasi bertingkat pada suhu 60°C, kemudian dikocok selama ± 15 menit lalu didiamkan sampai n-heksan terpisah. Terdapat 3 lapisan yaitu minyak solar, n-heksan dan air. Air dibuang, lapisan minyak solar dan n-heksan disaring dengan kertas saring yang telah diolesi ± 0,5 gr Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang telah ditimbang. Erlenmeyer dipanaskan pada suhu 60°C (sesuai dengan titik didih n-heksan) sampai n-heksan habis, airnya habis menguap dan yang tersisa hanya minyak (APHA, 1981). Erlenmeyer tersebut diangkat dan didiamkan sampai dingin lalu ditimbang dan dicatat beratnya. Kemudian dihitung kadar minyak solar menggunakan rumus :

$$\text{Kadar minyak (g)} = (W2 - W1)$$

Keterangan :

W1 = berat Erlenmeyer (g)

W2 = berat Erlenmeyer dengan kadar minyak yang diperoleh (g)

**f. Kromatografi Gas (GC/MS)**

Kromatografi gas dilakukan 2 kali, pada sampel sebelum perlakuan dan pada perlakuan terbaik dari hasil optimasi. Sampel analisis GC/MS yang diujikan yaitu

perlakuan bakteri pada setiap konsentrasi minyak solar 15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm. Tujuan analisis dengan GC/MS adalah untuk mengetahui komposisi dan jenis senyawa yang terkandung di dalam sampel sebelum dan sesudah proses bioremediasi. Alat yang digunakan adalah GC jenis HP-5890 dengan detektor FID dan suhu 300°C, kolom GC adalah kapiler kaca (panjang 30 m dan diameter 0,25 mm) dengan tekanan 100 kPa dan aliran kolom 1,6 mL/menit, sedangkan gas pembawa sampel yang akan dianalisis yaitu helium.

**g. Uji Aktivitas Enzim**

• **Pembuatan larutan stok buffer 20 mM Tris-HCl**

Sebanyak 3,79 g Tris dilarutkan dalam 800 mL akuabides dan pH larutan diset hingga pH 7 melalui penambahan HCl pekat, kemudian ditambahkan akuabides hingga volume larutan mencapai 1000 mL sehingga didapatkan larutan buffer 31,25 mM Tris-HCl sebagai larutan stok. Buffer ini kemudian diencerkan untuk didapatkan buffer Tris-HCl 20 mM.

• **Panen Bakteri**

Sel dipanen dengan cara disentrifuse pada kecepatan 5000 rpm. Supernatan dipisahkan dan pelet dicuci dua kali dengan 1 mL buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4. Pelet kemudian diresuspensikan dalam 500 µL buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4. Pelet lalu disonikasi menggunakan *ultrasonic disintegrator* dengan diameter *probe* 3 mm, daya 80%, dan dalam interval 30 s *on* serta 15 s *off* selama 4 menit. Hasil sonikasi lalu disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh kemudian digunakan untuk uji aktivitas enzim.

- **Uji Aktifitas Enzim Monooksigenase**

Supernatan yang didapatkan digunakan untuk uji aktivitas enzim alkane monooksigenase. Campuran reaksi mengandung buffer Tris-HCl 20 mM; NADH 0,1 mM; larutan heksadekana (1% heksadekana dalam 80% DMSO), serta ekstrak enzim kasar. Reaksi dimulai dengan menambahkan 2  $\mu$ L larutan heksadekana ke dalam campuran reaksi. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 detik dan diinkubasi selama 6 menit. Absorbansi campuran diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 340 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan besarnya aktivitas enzim (Jauhari *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2013; Mishra dan Singh, 2012).

- **Uji Aktifitas Enzim Dioksigenase**

Supernatan yang didapatkan digunakan untuk uji aktivitas enzim toluene dioksigenase. Campuran reaksi mengandung buffer Tris-HCl 20 mM; NADH 0,1 mM; larutan toluena (1% toluena dalam 80% DMSO), serta ekstrak enzim kasar. Reaksi dimulai dengan menambahkan 2  $\mu$ L larutan toluena ke dalam campuran reaksi. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks selama 3 detik dan diinkubasi selama 6 menit. Absorbansi campuran diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 340 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan besarnya aktivitas enzim. Hal yang sama juga dilakukan untuk uji aktivitas enzim naftalena dioksigenase menggunakan substrat naftalena (Jauhari *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2013; Mishra dan Singh, 2012).

- **Analisis Data Uji Aktivitas Enzim**

Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang membutuhkan 1  $\mu\text{mol}$  NADH untuk mengoksidasi substrat per menit per mL enzim. Besarnya aktivitas enzim ditentukan dari nilai absorbansi yang didapat setelah pengukuran campuran reaksi enzimatik menggunakan *microplate reader* dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{\Delta A_{340} \times V_e \text{ mL}}{a_{340} \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \times V_s \text{ mL} \times t \text{ menit} \times l \text{ cm}}$$

Keterangan :

$a_{340}$  = absorptivitas molar NADH, sebesar  $6,22 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$V_e$  = volume enzim, sebesar 1 mL

$V_s$  = volume sampel enzim, sebesar 0,01 mL

$T$  = waktu inkubasi, sebesar 5 menit

$l$  = *pathlength*, sebesar 0,05 cm

**d. Identifikasi Bakteri *Indigenus***

Hasil isolat bakteri *indigenus* yang telah didapatkan, selanjutnya diidentifikasi dengan metode KIT API (*Analytical Profile Index*) 20E. Uji biokimia untuk identifikasi bakteri digunakan API 20E. Isolat murni bakteri ditumbuhkan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Isolat yang telah dibiakkan selama 24 jam selanjutnya diambil 1 ose dan dibiakkan terlebih dahulu dalam 5 ml NaCl 0,85%. Suspensi bakteri selanjutnya dimasukkan ke dalam strip kertas API yang terdiri atas 20 mikrotabung yang telah berisi reagen kering. Setelah 24 jam diamati perubahan warna yang terjadi pada mikrotube. Data hasil uji biokimia selanjutnya dimasukkan ke dalam software API KIT 20E.

e. **Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, akan diuji normalitas terlebih dahulu selanjutnya dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman One Way ANOVA menggunakan software program SPSS 25 untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Apabila terdapat perbedaan antar perlakuan maka analisis dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan software SPSS untuk mengetahui kemampuan bakteri *indigenus*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar.



## 5. HASIL dan PEMBAHASAN

### 5.1 Parameter Kualitas Air *In situ*

Menurut Ismoyo (1994) dalam Agustiniingsih *et.al* (2006), kualitas air adalah suatu keadaan dan sifat-sifat fisik, kimia dan biologi suatu perairan yang dibandingkan dengan persyaratan untuk keperluan tertentu, seperti kualitas air untuk air minum, pertanian dan perikanan, rumah sakit, industri dan lain sebagainya. Sehingga menjadikan persyaratan kualitas air berbeda-beda sesuai dengan peruntukannya. Kualitas air yang diukur pada penelitian ini meliputi: oksigen terlarut (DO), derajat keasaman (pH), suhu dan salinitas. Kualitas air laut yang digunakan untuk biota laut dan aktivitas lain secara ideal harus memenuhi standar, baik secara fisik, kimia, dan biologi. Nilai kualitas perairan laut yang melampaui ambang batas maksimum untuk peruntukannya akan digolongkan sebagai perairan tercemar. Adapun hasil pengukuran kualitas air beberapa parameter fisika dan kimia perairan Tanjung Perak Surabaya disajikan pada Tabel 2 sebagai berikut.

**Tabel 2.** Hasil Pengukuran Parameter Kualitas Air

Parameter	Satuan	Hasil Pengukuran
Oksigen Terlarut (DO)	mg/L	4,5
Derajat Keasaman (pH)	-	8
Suhu	°C	29,3
Salinitas	Ppt	34

- Oksigen Terlarut (DO)

Hasil pengukuran oksigen terlarut (DO) di perairan pelabuhan Tanjung Perak sebesar 4,5 mg/L. Hal ini diduga karena perairan pelabuhan Tanjung Perak mendapat masukan bahan organik yang berlebihan. Masukan bahan organik selain berasal dari kegiatan pelabuhan juga berasal dari dua sungai yang bermuara ke perairan pelabuhan Tanjung Perak. Kondisi konsentrasi DO yang rendah pada perairan pelabuhan Tanjung Perak menunjukkan perairan tersebut berada dalam kondisi tidak sesuai bagi kehidupan biota laut. Karena berdasarkan Kep. Men. LH No.51 Tahun 2004, perairan laut yang diperuntukan bagi kehidupan biota laut memiliki kadar DO lebih besar dari 5 mg/l.

- Derajat Keasaman (pH)

Hasil pengukuran Derajat Keasaman (pH) di perairan pelabuhan Tanjung Perak sebesar 8. Nilai pH menjadi faktor yang penting dalam perairan karena nilai pH pada air akan menentukan sifat air menjadi bersifat asam atau basa yang akan mempengaruhi kehidupan biologi di dalam air. Perubahan keasaman air, baik ke arah alkali maupun asam, akan sangat mengganggu kehidupan ikan dan hewan air lainnya. Kisaran pH yang cocok bagi organisme akuatik tidak sama tergantung pada jenis organisme tersebut (Djoharam *et al.*, 2018). Kondisi pH dapat mempengaruhi tingkat toksisitas suatu senyawa kimia, proses biokimiawi perairan, dan proses metabolisme organisme air. Menurut Kordi dan Tancung (2007) dalam Djoharam *et al.* (2018), derajat keasaman merupakan faktor yang penting dalam proses pengolahan air untuk perbaikan kualitas air.

- Suhu

Suhu merupakan parameter yang penting dan berpengaruh secara langsung maupun tidak langsung terhadap kehidupan biota perairan. Nilai suhu di perairan pelabuhan Tanjung Perak sebesar 29,3°C. Kisaran suhu tersebut masih berada pada level normal, berdasarkan standar baku mutu Kep.Men.LH. No. 51 tahun 2004 untuk biota laut yaitu antara 28 -32°C, dengan kondisi bervariasi setiap saat (siang, malam dan musim). Hal ini berarti bahwa suhu perairan Tanjung Perak masih mendukung kehidupan organisme yang ada di dalamnya dan kisaran tersebut juga memperlihatkan bahwa tidak ada lonjakan yang berarti dari suhu. Aktivitas biologis –fisiologis di dalam ekosistem perairan sangat dipengaruhi oleh suhu. Menurut Effendi (2003), kenaikan suhu akan meningkatkan laju metabolisme pada organisme.

- Salinitas

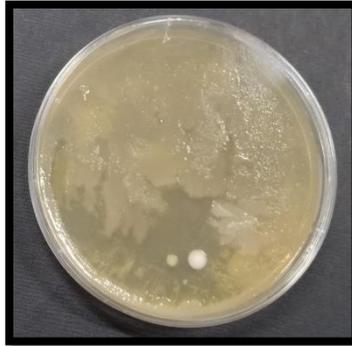
Perairan pelabuhan Tanjung Perak memiliki salinitas sebesar 34,0 ppt. Salinitas air laut bebas bersifat ultra-haline yaitu memiliki kisaran salinitas antara 30 -36. Sedangkan daerah pantai mempunyai variasi salinitas yang lebih besar. Semua organisme dalam perairan dapat hidup pada perairan yang mempunyai perubahan salinitas kecil. Salinitas pada perairan laut dapat dipengaruhi oleh penguapan, presipitasi dan *run off* dari tanah-tanah di daratan. Menurut Agustini Sih et al. (2005), faktor yang menyebabkan salinitas berfluktuasi adalah topografi pasang surut, serta jumlah air tawar yang masuk ke perairan laut. Sementara kadar salinitas untuk pertumbuhan optimal biota laut adalah berkisar antara 30-33 ppt (Effendi, 2011).

## 5.2 Isolasi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar

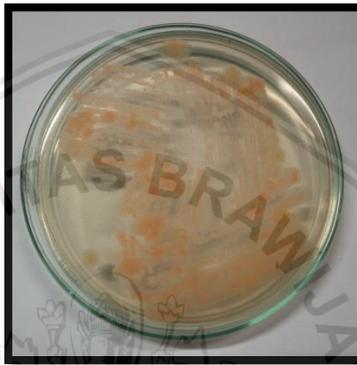
Isolasi bakteri yang dilakukan dalam penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri indigenous dari perairan tercemar limbah hidrokarbon minyak solar. Hasil isolasi yang telah dilakukan, diperoleh isolat bakteri pendegradasi minyak solar yang tumbuh pada media selektif. Isolat yang diperoleh berwarna putih seperti susu, memiliki bentuk koloni bulat, tepi rata dan elevasi koloni cembung. Hasil isolasi bakteri *indigenous* dapat dilihat pada Gambar 6 dibawah ini.

Bakteri *eksogenous* yang digunakan pada penelitian ini adalah *Gordonia terrae*. *Gordonia terrae* merupakan salah satu bakteri yang bersifat aerobik. Bakteri ini hidup dan ditemukan pada lingkungan tanah ataupun air (Grisold *et al.*, 2007). *Gordonia terrae* adalah bakteri gram positif dan bersifat non-motil. *Gordonia terrae* merupakan bakteri patogen. Bakteri *eksogenous* dapat dilihat pada Gambar 7 dibawah ini.

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Actinobacteria
Class	: Actinobacteria
Order	: Actinobacteria
Family	: Gordoniaceae
Genus	: Gordonia
Species	: <i>Gordonia terrae</i>



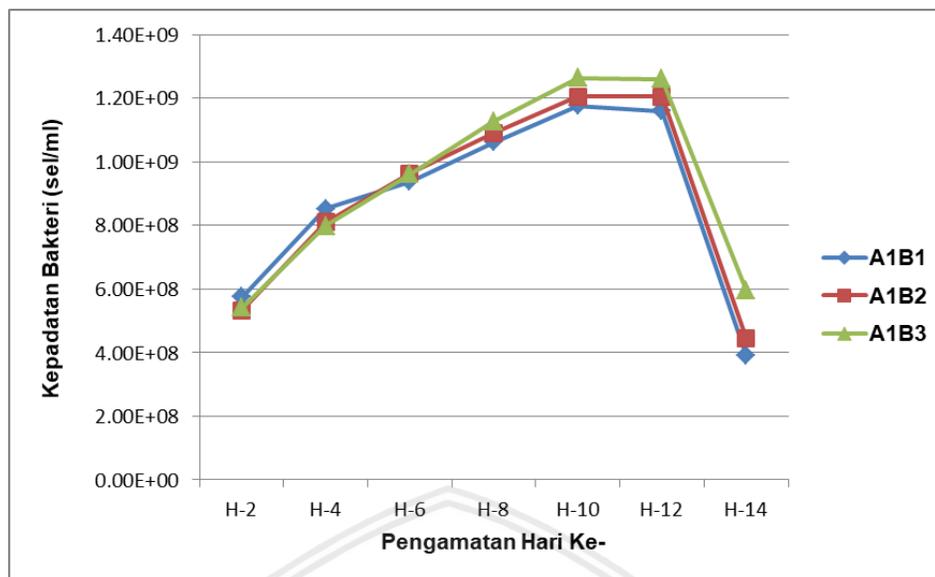
**Gambar 6.** Isolat Bakteri *Indigenous*



**Gambar 7.** Isolat Bakteri *Eksogenous*

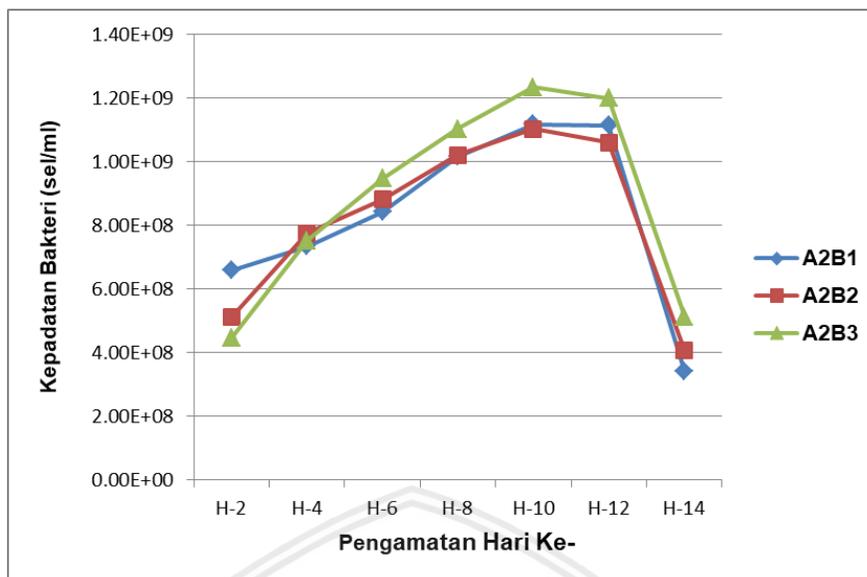
### 5.3 Total Kepadatan Bakteri (Sel/ml)

Pengamatan pertumbuhan sel bakteri dalam penelitian ini bertujuan untuk mempelajari respon kemampuan tumbuh setiap isolat bakteri (bakteri indigenous, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya) yang digunakan sebagai agen bioremediasi terhadap substrat minyak solar (15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm) pada media pertumbuhannya. Pertumbuhan sel isolat bakteri masing-masing perlakuan dihitung dengan alat *haemocytometer* dan menggunakan *colony counter* dengan pengenceran  $10^{-1}$  selama 14 hari. Setiap isolat bakteri memiliki perbedaan pada pertumbuhan selnya. Kurva kepadatan bakteri dapat dilihat pada Gambar 8, 9 dan 10 dibawah ini.



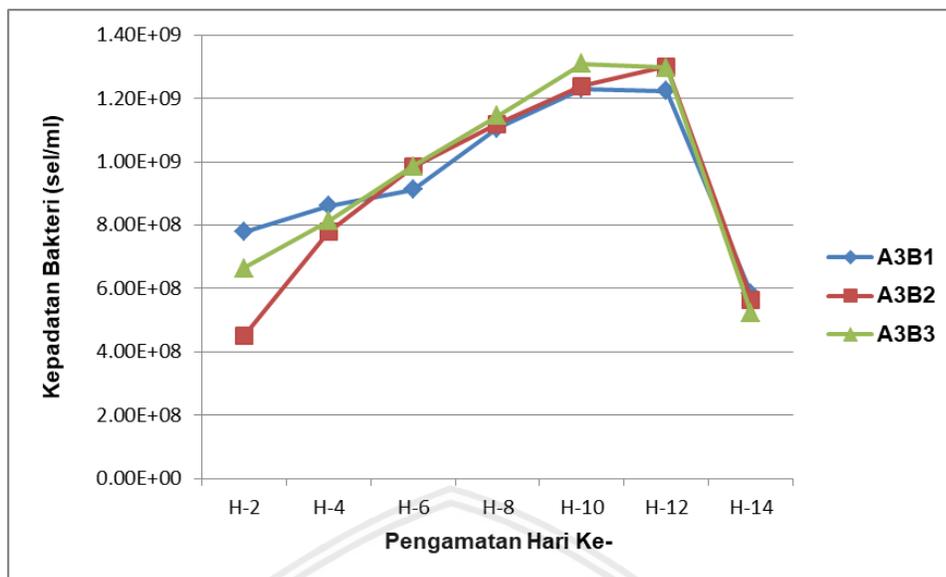
**Gambar 8.** Grafik Kepadatan Bakteri Bakteri *Indigenus* (sel/ml)

Grafik A adalah perlakuan bakteri indigenus dengan konsentrasi minyak solar 15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm (A1B1, A1B2 dan A1B3). Pada perlakuan A1B1 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar  $5.75E+08$  sel/ml kemudian terus meningkat memasuki fase eksponensial sampai hari ke-10 sebesar  $1.18E+09$  sel/ml dan memasuki fase stasioner hingga mengalami penurunan menuju fase kematian pada hari ke-12 sampai hari ke-14 sebesar  $4.76E+08$  sel/ml. Pada perlakuan A1B2 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar  $5.33E+08$  sel/ml mengalami peningkatan memasuki fase eksponensial dari hari ke hari sampai pada hari ke-10 sebesar  $1.20E+09$  sel/ml dan memasuki fase stasioner hingga terjadi penurunan menuju fase kematian pada hari ke-14 sebesar  $5.30E+08$  sel/ml. Pada perlakuan A1B3 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar  $5.41E+08$  sel/ml terus mengalami peningkatan memasuki fase eksponensial sampai hari ke-10 sebesar  $1.26E+09$  sel/ml dan memasuki fase stasioner hingga terjadi penurunan menuju fase kematian pada hari ke-14 sebesar  $5.95E+08$  sel/ml.



**Gambar 9.** Grafik Kepadatan *Gordonia terrae* (sel/ml)

Grafik B adalah perlakuan perlakuan *Gordonia terrae* dengan konsentrasi minyak solar 15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm (A2B1, A2B2 dan A232). Pada perlakuan A2B1 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar  $6.57E+08$  sel/ml terus mengalami peningkatan memasuki fase eksponensial sampai hari ke-10 sebesar  $1.12E+09$  sel/ml dan memasuki fase stasioner hingga terjadi penurunan menuju fase kematian dari hari ke-12 sampai hari ke-14 sebesar  $4.25E+08$  sel/ml. Pada perlakuan A2B2 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar  $5.10E+08$  sel/ml terus mengalami peningkatan memasuki fase eksponensial sampai hari ke-10 sebesar  $1.10E+09$  sel/ml dan memasuki fase stasioner terjadi penurunan memasuki fase stasioner dari hari ke-12 sampai hari ke-14 sebesar  $4.85E+08$  sel/ml. Pada perlakuan A2B3 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar  $4.45E+08$  sel/ml terus mengalami peningkatan memasuki fase eksponensial sampai hari ke-10 sebesar  $1.26E+09$  sel/ml dan memasuki fase stasioner terjadi penurunan memasuki fase stasioner dari hari ke-12 sampai hari ke-14 sebesar  $5.13E+08$  sel/ml.



**Gambar 10.** Grafik Kepadatan Gabungan Bakteri *Indigenous+Gordonia terrae* (sel/ml)

Berdasarkan gambar diatas didapatkan grafik hasil kepadatan bakteri yang berbeda-beda pada setiap perlakuan. Grafik C adalah perlakuan gabungan bakteri *indigenous+Gordonia terrae* dengan konsentrasi minyak solar 15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm (A3B1, A3B2 dan A3B3). Pada perlakuan A3B1 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar 7.79E+08 sel/ml kemudian terus meningkat sampai hari ke- 10 sebesar 1.23E+09 sel/ml dan mengalami penurunan pada hari ke-12 sampai hari ke- 14 sebesar 5.84E+09 sel/ml. Pada perlakuan A3B2 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar 4.51E+08 sel/ml terus mengalami peningkatan sampai hari ke-10 sebesar 1.24E+09 sel/ml dan terjadi penurunan pada hari ke-14 sebesar 5.64E+08 sel/ml. Pada perlakuan A3B3 didapatkan hasil pengukuran kepadatan bakteri pada hari ke-2 sebesar 6.63E+08 sel/ml terus mengalami peningkatan sampai hari ke-10 sebesar 1.31E+09 sel/ml dan terjadi penurunan dari hari ke-12 sampai hari ke-14 sebesar 5.30E+08 sel/ml.

Hasil dari semua perlakuan didapatkan nilai kepadatan terendah oleh bakteri eksogenous (*Gordonia terrae*) diikuti oleh bakteri indigenous dan kepadatan tertinggi oleh gabungan kedua bakteri indigenous+*Gordonia terrae*. Semakin tinggi konsentrasi minyak solar yang diberikan pada perlakuan, semakin tinggi pula hasil kepadatan bakteri dalam media. Peningkatan tersebut terjadi karena nutrisi pada media yang mengandung minyak solar tinggi digunakan oleh bakteri untuk pertumbuhannya. Berbagai fase pertumbuhan bakteri dapat diamati selama waktu inkubasi berlangsung, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, dan fase kematian. Setiap fase merepresentasikan periode pertumbuhan bakteri yang berhubungan dengan perubahan fisiologi kultur sel dan laju pertumbuhan pada setiap fase berbeda secara signifikan (Maier *et al.*, 2009).

Perbedaan kepadatan bakteri pada masing-masing perlakuan disebabkan karena proses adaptasi yang berbeda-beda. Bakteri akan menunjukkan perbedaan pola pertumbuhan, periode waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh maupun beradaptasi, dan metabolit yang dihasilkan (Yuliana, 2008). Proses adaptasi meliputi sintesis enzim baru yang sesuai dengan mediannya serta pemulihan terhadap metabolit yang bersifat toksik (alkohol, asam, basa) pada waktu media lama. Pada fase lag terlihat jumlah populasi bakteri cukup rendah, hal tersebut terjadi karena bakteri membutuhkan proses adaptasi secara alamiah. Fase tersebut waktu yang diperlukan sel bakteri untuk melakukan adaptasi serta sel bakteri tidak melakukan pembelahan diri. Menurut Madigan (2012), bahwa fase lag suatu populasi mikroba dapat berlangsung cepat atau lambat tergantung pada karakteristik mikroba.

Selanjutnya pada bakteri akan mengalami populasi sel yang meningkat, sehingga bakteri tersebut mulai telah memasuki fase eksponensial. Fase tersebut merupakan tahapan setelah akhir dari fase lag yang ditandai dengan membelahnya

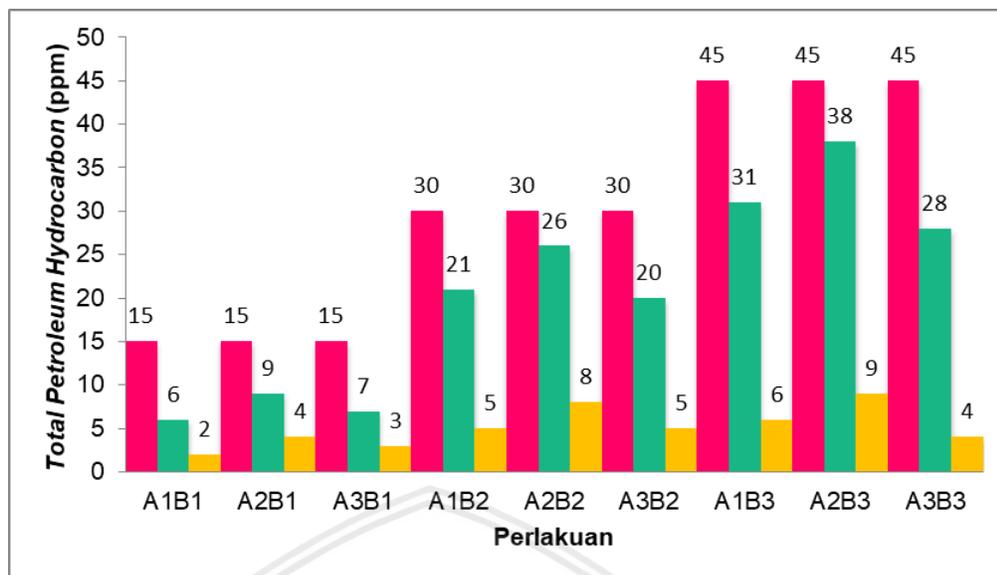
sel bakteri. Pada fase perbanyakan sel akan melakukan konsumsi nutrisi pada media dan jumlah sel akan meningkat pada batas tertentu, dalam keadaan tertentu akan konstan sampai terjadi perubahan komposisi media yang cukup signifikan (Purwoko, 2007). Pada fase statis terjadi berkurangnya nutrisi serta penumpukan produk beracun. Fase statis ini terdapat beberapa sel yang tumbuh dan membelah dengan jumlah sel hidup menjadi tetap dan disisi lain terdapat sel yang mati (Pelczar, 2008 *dalam* Rohmah, 2017). Bakteri pada fase statis tidak melakukan pembelahan sel karena faktor yang bermacam –macam, yaitu seperti nutrisi dalam media tersebut habis, akumulasi metabolit toksik (asam, basa dan alkohol), penurunan kadar oksigen dan ketersediaan air pada media sehingga pada fase ini biasanya sel-sel akan mengalami adaptasi terhadap kondisi yang kurang menguntungkan (Purwoko, 2007). Pada fase kematian, sel-sel akan mati lebih cepat dibandingkan dengan terbentuknya sel-sel baru. Laju kematian pada bakteri mengalami percepatan menjadi eksponensial bergantung dari spesies bakteri tersebut, semua sel akan mati dalam waktu beberapa hari, atau beberapa bulan (Pelczar, 2008 *dalam* Rohmah, 2017).

Menurut Purwoko (2007), bakteri akan mampu bertahan beberapa jam pada fase statis dan akhirnya masuk dalam fase kematian, disisi lain terdapat bakteri yang hanya mampu bertahan sampai harian dan mingguan pada fase statis dan akhirnya memasuki fase kematian. Fase kematian terjadi pada media minyak solar karena ketersediaan nutrisi sebagai sumber karbon yang ada pada minyak solar, nutrisi N, P dan C untuk pertumbuhan bakteri mulai berkurang. Penurunan tersebut diduga ketersediaan nutrisi yang semakin berkurang. Menurut Astuti (2012), Penurunan jumlah sel dapat diakibatkan nutrisi yang mulai berkurang tetapi jumlah total sel bakteri tinggi sehingga menyebabkan kompetisi.

#### 5.4 *Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)*

Nilai *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) dalam limbah minyak bumi harus sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. Berdasarkan Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup No. 19 tahun 2010 tentang baku mutu air limbah bagi usaha dan/atau kegiatan pengolahan minyak bumi kadar maksimum *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) ialah sebesar 20 ppm. Nilai TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) pada baku mutu air laut daerah pelabuhan ditentukan dibawah 5 mg/liter atau 5 ppm, sedangkan untuk biota laut dibawah 1 mg/liter atau 1 ppm (Ristiati *et al.*, 2016).

Pengujian *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan setiap isolat bakteri yang digunakan (Bakteri *Indigenous*, *Gordonia terrae* dan gabungan Bakteri *Indigenous+Gordonia terrae*) dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan konsentrasi minyak solar yang digunakan dibawah baku mutu air limbah bagi usaha dan/atau kegiatan pengolahan minyak bumi yaitu sebesar 15 ppm, sedangkan diatas baku mutu air limbah bagi usaha dan/atau kegiatan pengolahan minyak bumi yaitu sebesar 30 ppm dan 45 ppm. Hasil proses bioremediasi limbah minyak solar oleh bakteri *indigenous*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dapat dilihat pada Gambar 11 dibawah ini.



**Gambar 11.** Grafik *Total Petroleum Hydrocarbon* (ppm)

Berdasarkan grafik diatas dapat dilihat bahwa seluruh isolat menunjukkan kemampuan dalam mendegradasi minyak solar. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa pada perlakuan minyak solar 15 ppm penurunan konsentrasi minyak solar tertinggi selama 14 hari oleh bakteri *indigenus* (A1B1) sebesar 2 ppm, kemudian oleh gabungan bakteri *indigenus*+*Gordonia terrae* (A3B1) sebesar 3 ppm dan penurunan terendah oleh bakteri *Gordonia terrae* (A2B1) sebesar 4 ppm. Pada perlakuan minyak solar 30 ppm penurunan tertinggi oleh gabungan bakteri *indigenus*+*Gordonia terrae* (A3B2) sebesar 5 ppm diikuti oleh bakteri *indigenus* (A1B2) sebesar 5 ppm dan yang terendah oleh bakteri *Gordonia terrae* (A2B2) sebesar 8 ppm. Pada perlakuan minyak solar 45 ppm penurunan konsentrasi minyak solar tertinggi oleh gabungan bakteri *indigenus*+*Gordonia terrae* (A3B3) sebesar 4 ppm, kemudian oleh bakteri *indigenus* (A1B3) sebesar 6 ppm dan penurunan terendah oleh bakteri eksogenous (A2B3) sebesar 9 ppm. Hasil pengukuran *Total Petroleum Hydrocarbon* akan dianalisis menggunakan *software* SPSS 25.

Biodegradasi minyak solar selain dapat diketahui melalui pertumbuhan bakteri yang mendegradasinya, dapat pula diketahui cara menghitung kadar minyak sisa degradasi menggunakan gravimetri. Hasil uji biodegradasi pada minyak solar menunjukkan semua isolat bakteri memiliki kemampuan dalam mendegradasi minyak diindikasikan oleh adanya penurunan kadar minyak setelah pengujian. Masing-masing isolat bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda-beda dalam mendegradasi minyak solar. Hasil penelitian penurunan konsentrasi minyak solar terbaik oleh gabungan bakteri *indigenus+eksogenous* (*Gordonia terrae*). Astuti (2003), mengatakan penambahan kultur campuran akan meningkatkan degradasi minyak bumi. Hal ini disebabkan kultur campuran memiliki kemampuan mendegradasi komponen minyak bumi yang berbeda-beda, sehingga memiliki kemampuan enzimatik yang lebih lengkap dalam mendegradasi minyak bumi.

Zhu *et al.* (2001), menyatakan bahwa biodegradasi minyak bumi di alam secara alamiah tidak hanya didegradasi oleh satu spesies namun juga melibatkan lebih dari satu mikroorganisme atau dikenal sebagai konsorsium. Adanya gabungan spesies mikroorganisme dalam hal ini bakteri, maka degradasi hidrokarbon akan lebih efektif. Jumlah mikroorganisme yang cukup akan menghasilkan banyak produk enzim tertentu seperti enzim oksigenase yang lebih bervariasi dalam jenis dan tingkat penguraiannya dibanding dengan biakan tunggal sehingga dapat mendegradasi minyak bumi dengan lebih cepat (Nugroho, 2006). Konsorsium bakteri juga diketahui merupakan isolat penghasil biosurfaktan yang terbesar. Hal ini menyebabkan tingkat degradasi minyak solar dengan menggunakan konsorsium jauh lebih cepat karena dengan dihasilkannya biosurfaktan memungkinkan senyawa hidrokarbon dapat lebih tersedia secara biologis terhadap mikroorganisme

(Nababan, 2008). Selain itu, produksi biosurfaktan yang tinggi pada umumnya berkaitan erat dengan kemampuan bakteri dalam menguraikan senyawa hidrokarbon minyak bumi.

**Dependent Variable:**

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	120.296 <sup>a</sup>	8	15.037	25.375	0.000
Intercept	685.037	1	685.037	1156.000	0.000
Sampel	120.296	8	15.037	25.375	0.000
Error	10.667	18	0.593		
Total	816.000	27			
Corrected Total	130.963	26			

a. R Squared = .919 (Adjusted R Squared = .882)

Pengolahan data dilakukan pada parameter *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) bertujuan untuk menganalisis dan mengetahui pengaruh perlakuan yang diberikan selama penelitian serta menjawab hipotesis. Berdasarkan pengolahan data yang dilakukan dengan metode *one way anova* perlakuan yang diberikan pada penelitian ini memiliki pengaruh berbeda nyata. Data hasil pengamatan Total Petroleum Hydrocarbon sebelumnya telah di uji normalitas dengan SPSS dan didapatkan hasil data dengan sebaran normal, dengan signifikansi 0,000.

Menurut Trihendrandi (2012), jika data memiliki nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka data tersebut termasuk dalam kategori normal (dapat dilihat pada Lampiran 2). Hasil *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) selama pengamatan 14 hari menunjukkan berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap semua perlakuan dan didapatkan nilai koefisien determinasi  $R^2$  sebesar 0.882. Kemudian dilakukan uji lanjutan dengan uji Duncan dan didapatkan hasil perlakuan A3B3 (Gabungan Isolat Bakteri *Indigenous+Gordonia terrae*) memiliki pengaruh yang paling besar terhadap proses degradasi limbah hidrokarbon minyak solar.

Kultur campuran bakteri (Bakteri indigenous+*Gordonia terrae* A3B3) memiliki efektifitas degradasi senyawa hidrokarbon yang paling tinggi dibandingkan dengan bakteri tunggal. Hal ini mengindikasikan bahwa degradasi senyawa hidrokarbon lebih efektif bila digunakan konsorsium dengan komponen jenis bakteri yang lebih banyak. Telah lama diketahui bahwa jenis bakteri yang berbeda memiliki proses degradasi senyawa hidrokarbon yang berbeda pula karena perbedaan enzim yang dimiliki. Bakteri konsorsium adalah campuran populasi bakteri yang membentuk komunitas dan memiliki peran yang saling menguntungkan dalam aktivitasnya (Thompson *et al.* 2005).

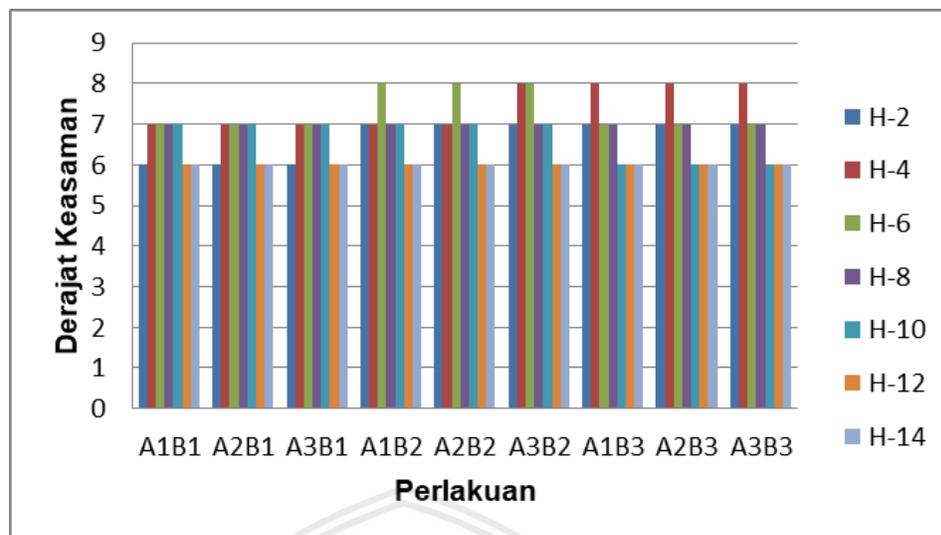
Bioremediasi menggunakan mikroorganisme dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba indigen dan juga mikroba eksogen. Mikroba indigen adalah mikroba yang berasal dari lingkungan itu sendiri, sedangkan mikroba eksogen adalah mikroba yang didatangkan dari luar media yang tercemar. Dalam proses bioremediasi penggunaan mikroorganisme indigenous (indigen) saja masih belum maksimum sehingga diperlukan inokulasi mikroorganisme exogenous (eksogen) yang merupakan kultur campuran (konsorsium) beberapa jenis bakteri atau jamur yang potensial dalam mendegradasi pencemar tersebut (Arief, 2010).

Tingginya tingkat degradasi TPH pada perlakuan dapat dipengaruhi oleh faktor penguapan dan kemampuan dari konsorsium bakteri hidrokarbonoklastik yang ditambahkan dalam mendegradasi senyawa-senyawa hidrokarbon. Proses bioremediasi dengan bantuan mikroorganisme dapat dilakukan menggunakan isolat tunggal maupun campuran. Pada konsorsium memiliki kemampuan mendegradasi minyak solar secara signifikan. Bakteri tunggal memiliki kemampuan yang terbatas dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon, sedangkan konsorsium bakteri memiliki tingkat degradasi yang tinggi untuk mendegradasi senyawa hidrokarbon.

Bakteri konsorsium (campuran) bekerja secara sinergis dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon yang kemudian dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan energi (Charlena, 2010). Kombinasi isolat bakteri diketahui mempunyai kemampuan lebih baik dalam mendegradasi hidrokarbon dibandingkan dengan isolat tunggalnya. Isolat konsorsium merupakan isolat penghasil biosurfaktan yang terbesar, itu sebabnya tingkat degradasi minyak solar dengan menggunakan isolat konsorsium jauh lebih cepat karena dengan dihasilkan senyawa yang bersifat pengemulsi tersebut memungkinkan senyawa hidrokarbon dapat lebih tersedia secara biologis terhadap mikroorganismenya. Bakteri Konsorsium akan mengubah komposisi minyak menjadi fraksi ringan dalam minyak solar sehingga kekentalan (viskositas) akan menurun (Yani, 2009).

### **5.5 Derajat Keasaman (pH)**

Pengamatan biodegradasi minyak solar oleh isolat bakteri dapat dilakukan dengan mengamati perubahan parameter yang terjadi pada media degradasi salah satunya adalah derajat keasaman (pH). Fluktuasi pH merupakan indikator yang dapat menentukan suatu proses biodegradasi telah terjadi atau tidak. Hasil pengukuran derajat keasaman (pH) pada semua perlakuan selama masa inkubasi 14 hari dapat dilihat pada gambar 12 dibawah ini.



**Gambar 12.** Grafik Hasil Pengukuran Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan grafik diatas pengukuran derajat keasaman (pH) yang dilakukan selama 14 hari menunjukkan perbedaan hasil pada setiap perlakuan. Perlakuan konsentrasi minyak solar 15 ppm (A1B1, A2B1 dan A3B1) nilai pH menunjukkan kenaikan pada hari ke-4 sampai hari ke-10, kemudian mengalami penurunan di hari ke-12 dan hari ke-14 sebesar 6. Perlakuan konsentrasi minyak solar 30 ppm (A1B2, A2B2 dan A3B2) nilai pH hari ke-2 dan ke-4 sebesar 7, kemudian meningkat sebesar 8 dihari ke-6 kembali pada nilai pH 7 pada hari ke-8 dan ke-10 setelah itu menurun pada hari ke-12 dan ke-14 sebesar 6. Perlakuan konsentrasi minyak solar 45 ppm (A1B3, A2B3 dan A3B3) menunjukkan hasil pengukuran pH pada hari ke-2 sebesar 7, kemudian meningkat di hari ke-4 sebesar 8. Setelah itu terus mengalami penurunan hingga hari ke-14 sebesar 6-7.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada proses awal degradasi minyak solar terjadi penurunan pH, kemudian meningkat lagi dan kembali turun pada akhir masa inkubasi. Perubahan pH yang terjadi dalam media degradasi diduga menunjukkan adanya aktivitas bakteri dalam merombak senyawa hidrokarbon. Penurunan nilai pH pada akhir inkubasi disebabkan oleh aktivitas metabolisme isolat

bakteri selama proses degradasi hidrokarbon minyak bumi yang membentuk metabolitmetabolit asam (Nugroho, 2006).

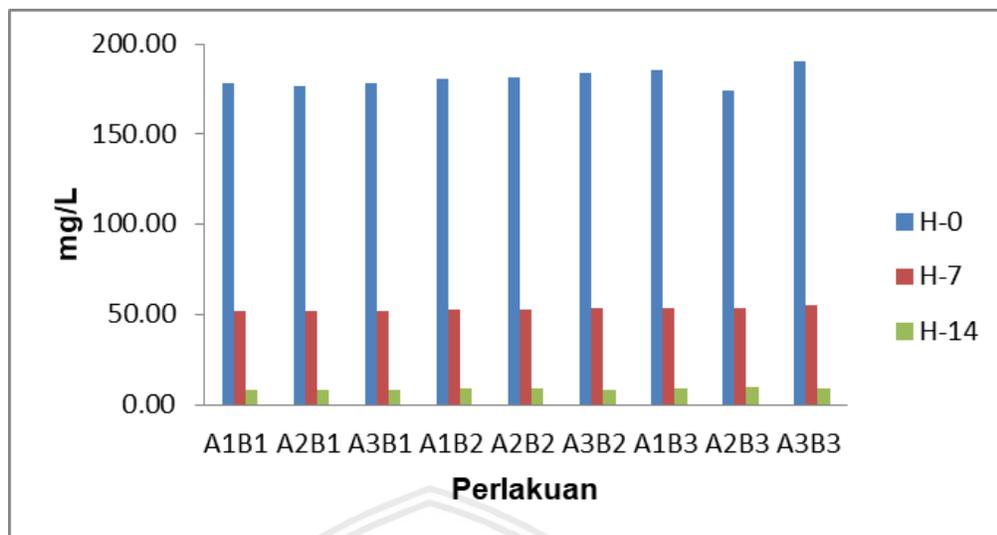
Peningkatan pH yang terjadi selama masa inkubasi diduga disebabkan karena adanya kemampuan bakteri dalam melakukan respon toleransi asam dengan mekanisme pompa hidrogen. Beberapa bakteri diduga memiliki kemampuan melakukan upaya homeostasis terhadap keasaman lingkungan (Ristiati et al., 1995). Selain itu, peningkatan pH juga diduga karena adanya senyawa ester yang merupakan hasil samping dari proses degradasi dan akibat adanya penambahan nutrient  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pada media degradasi minyak solar. Adanya senyawa  $\text{NO}_3$  sebagai sumber nitrogen akan menghasilkan  $\text{OH}^-$  sehingga terjadi peningkatan pH.  $\text{NO}_3^-$  oleh sel bakteri akan diubah ke dalam bentuk  $\text{NH}_4$  agar dapat digunakan. Hal tersebut dilakukan melalui pertukaran ion  $\text{K}^+$  dari dalam sel dan menukarnya dengan ion  $\text{H}^+$  yang banyak terdapat di lingkungannya, sehingga keasaman lingkungan mengalami penurunan. Peningkatan jumlah biosurfaktan menyebabkan terjadinya peningkatan pH. Semakin banyak biosurfaktan yang terbentuk maka pH akan semakin meningkat atau dapat dinyatakan bahwa laju biodegradasi akan meningkat seiring meningkatnya pH (Nugroho, 2006).

Penurunan pH diakibatkan degradasi limbah minyak bumi menghasilkan *volatile organic acid* (VOA) dalam jumlah tinggi dengan cara menghidrolisis limbah diikuti dengan konversi biologi bentuk intermediet VOA menjadi asam (Ezeronye, 2015). Menurut Harayama *et al.* (1999) biodegradasi *n*-alkana pada umumnya diinisiasi oleh sistem enzim kompleks oksigenase. Pada umumnya inisiasi penyerangan terjadi langsung pada gugus metil terminal, membentuk alkohol primer yang selanjutnya akan dioksidasi lebih lanjut menjadi aldehida dan asam lemak, sehingga mengakibatkan penurunan pH.

Penurunan nilai pH pada pertengahan masa inkubasi disebabkan oleh aktivitas metabolisme konsorsium bakteri selama proses degradasi hidrokarbon minyak bumi yang membentuk metabolit-metabolit asam. Nugroho (2008), mengatakan bahwa biodegradasi alkana yang terdapat dalam minyak bumi akan membentuk alkohol dan selanjutnya menjadi asam lemak. Asam lemak hasil degradasi alkana akan dioksidasi lebih lanjut membentuk asam asetat dan asam propionat, sehingga dapat menurunkan nilai pH media degradasi minyak bumi. Setelah minyak bumi teremulsi hampir seluruhnya, pH akan terus menurun disebabkan oleh aktivitas bakteri yang membentuk metabolit-metabolit asam, terutama metabolit hasil degradasi hidrokarbon (Ristiati, 2013).

#### **5.6 Biochemical Oxygen Demand (BOD)**

Nilai BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) menggambarkan jumlah oksigen yang dibutuhkan oleh mikroba aerob dalam mengoksidasi bahan organik menjadi karbondioksida dan air. Tujuan pengukuran parameter BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) dalam penelitian ini untuk mengetahui nilai BOD dalam media perlakuan selama masa inkubasi 14 hari. Nilai BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) merupakan salah satu indikator kualitas limbah. BOD dibutuhkan oleh bakteri aerob untuk memecah bahan organik dalam air (Chadra *et al.*, 2012). Hasil pengukuran *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) semua perlakuan selama penelitian dapat dilihat pada Gambar 13 dibawah ini.



**Gambar 13.** Grafik Pengukuran *Biochemical Oxygen Demand* (BOD)

Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat hasil pengukuran *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) menunjukkan hasil yang berbeda-beda pada setiap perlakuan. Perlakuan konsentrasi minyak solar 15ppm (A1B1, A2B1, A3B1) menunjukkan penurunan nilai *Chemical Oxygen Demand* (COD) dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) awal pada semua perlakuan berkisar 77.06 ppm-78.82 ppm, kemudian mulai menurun pada hari ke-7 sebesar 26.90 ppm-27.20 ppm dan terus menurun sampai hari ke-14 sebesar 5.63 ppm-5.73 ppm. Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 30 ppm (A1B2, A2B2, A3B2) menunjukkan perbedaan nilai *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) pada hari ke-0 di semua perlakuan berkisar 92.65 ppm-93.18 ppm, kemudian mulai menurun pada hari ke-7 sebesar 30.66 ppm-30.79 ppm dan terus menurun sampai hari ke-14 sebesar 6.88 ppm-6.93 ppm.

Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 45 ppm (A1B3, A2B3, A3B3) menunjukkan penurunan nilai *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Nilai *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) awal pada semua perlakuan

berkisar 93.75 ppm-94.10 ppm, kemudian mulai menurun pada hari ke-7 sebesar 39.93 ppm-31.02 ppm dan terus menurun sampai hari ke-14 sebesar 6.97 ppm-7.01 ppm. Baku mutu pembuangan limbah proses dari kegiatan pengolahan minyak bumi untuk kadar maksimum BOD 80 mg/L. Pada semua perlakuan menunjukkan hasil pengukuran *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) semakin menurun dan tidak melebihi kadar maksimum BOD yang telah ditetapkan pada Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup tahun 2010. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa setiap isolat bakteri memiliki kemampuan menurunkan BOD yang berbeda-beda.

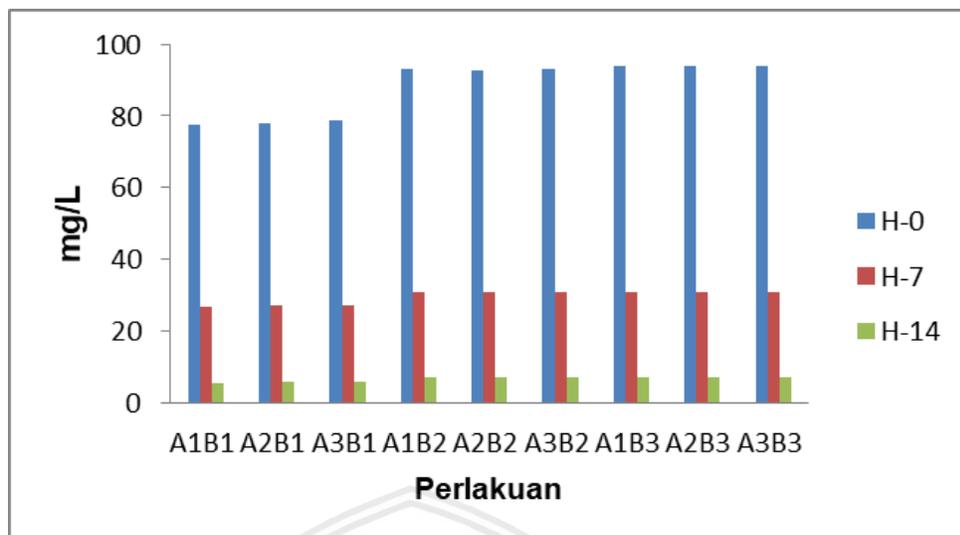
Bakteri aerob mengkonsumsi oksigen sehingga jumlah bakteri akan bertambah dan proses degradasi akan semakin cepat. Nilai *BOD* limbah minyak solar mengalami penurunan disebabkan bakteri pendegradasi cemaran bahan organik pada limbah mampu menguraikan bahan cemaran organik dalam air limbah. Nilai *BOD* yang kecil menunjukkan residu zat organik juga sedikit. Hal tersebut disebabkan karena *BOD* merupakan indikator yang mengukur jumlah oksigen yang dibutuhkan untuk menguraikan bahan cemaran organik di dalam limbah. Semakin besar jumlah bahan cemaran organik, oksigen yang dibutuhkan untuk menguraikan semakin besar, sehingga nilai *BOD*-nya besar. Apabila bahan cemaran organik di dalam limbah sudah terurai oleh bakteri pendegradasi, jumlahnya akan semakin sedikit, oksigen yang dibutuhkan juga semakin sedikit sehingga nilai *BOD*-nya kecil (Waluyo, 2017).

Penurunan BOD disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme dalam mendegradasi senyawa-senyawa organik untuk keperluan hidupnya. Semakin kecil kandungan BOD menunjukkan jumlah bahan organik dalam limbah sedikit, sebab oksigen yang dibutuhkan juga semakin sedikit. Dalam  $BOD_5$ , bahan organik yang dapat terdekomposisi adalah bahan organik yang hanya dapat terurai secara biologi

dan yang terurai sekitar 75%. BOD hanya mereduksi bahan organik dalam keadaan aerob (Paramita et al., 2012). BOD tinggi dalam media tidak diinginkan karena akan mengurangi DO Biodegradasi akan memaksimalkan proses penguraian zat organik sehingga mengakibatkan penurunan kadar BOD, dikarenakan degradasi lemak terus berjalan, sehingga kadar lemak akan semakin menurun. Dengan menurunnya kadar lemak, maka jumlah oksigen yang dikonsumsi mikroba dalam proses penguraian akan semakin menurun (Fidiastuti dan Endang, 2017).

### 5.7 Chemical Oxygen Demand (COD)

Pengukuran COD (*Chemical Oxygen Demand*) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi total bahan kimia organik yang terdapat pada limbah minyak solar sebelum dan sesudah bioremediasi. Tujuan pengukuran COD (*Chemical Oxygen Demand*) dalam penelitian ini untuk mengetahui nilai COD (*Chemical Oxygen Demand*) dalam media perlakuan selama masa inkubasi 14 hari. COD (*Chemical Oxygen Demand*) menyatakan jumlah total oksigen yang dibutuhkan untuk mengoksidasi semua bahan organik yang terdapat di perairan, menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Terjadinya proses degradasi dapat dilihat dari perubahan konsentrasi *Chemical Oxygen Demand* (COD). Konsentrasi COD (*Chemical Oxygen Demand*) merupakan gambaran konsentrasi bahan pencemar di dalam suatu limbah. Hasil pengukuran *Chemical Oxygen Demand* (COD) semua perlakuan selama penelitian dapat dilihat pada gambar 14 dibawah ini.



**Gambar 14.** Grafik Pengukuran *Chemical Oxygen Demand* (COD)

Berdasarkan grafik diatas menunjukkan hasil pengukuran *Chemical Oxygen Demand* (COD) berbeda-beda. Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 15 ppm (A1B1, A2B1, A3B1) menunjukkan penurunan nilai *Chemical Oxygen Demand* (COD) dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Nilai *Chemical Oxygen Demand* (COD) awal pada semua perlakuan berkisar 176.33 ppm-178.20 ppm, kemudian mulai menurun pada hari ke-7 sebesar 51.50 ppm-52.05 ppm dan terus menurun sampai hari ke-14 sebesar 8.30 ppm-8.40 ppm. Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 30 ppm (A1B2, A2B2, A3B2) menunjukkan perbedaan nilai *Chemical Oxygen Demand* (COD) dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Nilai *Chemical Oxygen Demand* (COD) pada hari ke-0 di semua perlakuan berkisar 180.50 ppm-184.25 ppm, kemudian mulai menurun pada hari ke-7 sebesar 52.62 ppm-53.56 ppm dan terus menurun sampai hari ke-14 sebesar 8.52 ppm-8.70 ppm.

Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 45 ppm (A1B3, A2B3, A3B3) menunjukkan penurunan nilai *Chemical Oxygen Demand* (COD) dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Nilai *Chemical Oxygen Demand* (COD) awal pada semua perlakuan berkisar 183.45 ppm-190.15 ppm, kemudian mulai menurun pada hari ke-7 sebesar

53.35 ppm-55.03 ppm dan terus menurun sampai hari ke-14 sebesar 8.67 ppm-9.10 ppm. Baku mutu pembuangan limbah proses dari kegiatan pengolahan minyak bumi untuk kadar maksimum COD 160 mg/L. Pada semua perlakuan menunjukkan hasil pengukuran *Chemical Oxygen Demand* (COD) semakin menurun dan tidak melebihi kadar maksimum BOD yang telah ditetapkan pada Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup tahun 2010.

Semua perlakuan menunjukkan perbedaan hasil pada setiap isolat bakteri dan konsentrasi minyak solar yang diberikan terjadi penurunan nilai COD, hal ini karena oksigen telah digunakan oleh bakteri untuk melakukan aktivitas degradasi zat-zat organik kompleks menjadi sederhana. Dalam kondisi aerobik, oksigen berperan dalam mengoksidasi bahan organik dengan menghasilkan nutrient. Nutrient akan digunakan bakteri sebagai energi dan zat organik kompleks akan dioksidasi menjadi lebih sederhana. Dalam penguraian menjadi senyawa sederhana yang melalui proses dekomposisi bahan organik, terdapat dua tahap yaitu bahan organik diurai menjadi bahan anorganik dan bahan anorganik yang tidak stabil kemudian akan mengalami oksidasi menjadi anorganik stabil. (Farikhah, 2012).

Penurunan konsentrasi COD terjadi karena adanya degradasi TPH dan senyawa-senyawa kimia lain yang terdapat dalam limbah oleh kultur bakteri hidrokarbonoklastik. Semakin tinggi konsentrasi COD dalam suatu limbah, maka akan semakin tinggi bahan pencemar terdapat dalam limbah tersebut, begitu juga sebaliknya. Penurunan konsentrasi COD juga diakibatkan terjadinya kompetisi antar populasi pada perlakuan tersebut, sehingga bakteri-bakteri beradaptasi menggunakan substrat selain hidrokarbon, seperti asam lemak dan senyawa lainnya yang terdapat dalam limbah minyak tersebut. Penggunaan senyawa-senyawa lain ini mengakibatkan penurunan COD yang cukup tinggi, sedangkan degradasi

hidrokarbon menjadi rendah. Menurut Astuti (2003), jika terdapat lebih dari satu pengguna substrat dalam satu kultur, maka kemungkinan mikroorganisme untuk termutasi akan lebih besar. Akibat dari mutasi ini mikroorganisme akan memiliki kemampuan untuk memanfaatkan substrat lainnya untuk pertumbuhan (Zam, 2010).

## 5.8 Rasio BOD:COD

Nilai parameter BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) terkandung dalam nilai parameter COD (*Chemical Oxygen Demand*). Kemampuan mikroorganisme khususnya bakteri untuk mendegradasi bahan pencemar (minyak solar) dapat ditentukan dengan menggunakan rasio BOD:COD. Level degradasi pada suatu limbah dapat dilihat dari nilai rasio BOD:COD. Perubahan hasil degradasi minyak solar oleh bakteri ditandai dengan kenaikan rasio BOD:COD. Nilai rasio BOD:COD didapat dengan cara membagi konsentrasi nilai BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) dan konsentrasi nilai COD (*Chemical Oxygen Demand*) (Putri *et al.*, 2013). Nilai rasio BOD:COD dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3 dibawah ini.

**Tabel 3.** Nilai rasio BOD:COD

Rasio BOD : COD			
Sampel	H-0	H-7	H-14
A1B1	0.44	0.52	0.67
A2B1	0.44	0.52	0.68
A3B1	0.44	0.52	0.68
A1B2	0.52	0.58	0.81
A2B2	0.51	0.58	0.79
A3B2	0.51	0.57	0.81
A1B3	0.51	0.58	0.77
A2B3	0.54	0.58	0.73
A3B3	0.49	0.56	0.80

Berdasarkan tabel diatas didapatkan hasil nilai rasio BOD:COD berbeda pada semua perlakuan yang diberikan. Perlakuan konsentrasi minyak solar 15 ppm (A1B1, A2B1, A3B1) menunjukkan peningkatan nilai rasio BOD:COD dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Rasio BOD:COD awal pada semua perlakuan sebesar 0,44 terus meningkat di hari ke-7 sampai hari ke-14 sebesar 0,67-0,68. Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 30 ppm (A1B2, A2B2, A3B2) menunjukkan peningkatan nilai rasio BOD:COD dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Rasio BOD:COD pada hari ke-0 di semua perlakuan berkisar 0,51-0,52 terus mengalami peningkatan dari hari ke-7 sampai hari ke-14 sebesar 0,79-0,71.

Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 45 ppm (A1B3, A2B3, A3B3) menunjukkan peningkatan nilai rasio BOD:COD dari hari ke-0, ke-7 dan ke-14. Rasio BOD:COD awal pada semua perlakuan berkisar 0,49-0,51 terus meningkat dari hari ke-7 sampai hari ke-14 sebesar 0,73-0,80. Peningkatan nilai rasio BOD:COD yang mengindikasikan terjadinya penurunan kadar senyawa organik kompleks yang sulit terdegradasi. Dari hasil rasio BOD:COD pada penelitian ini limbah minyak solar setelah perlakuan termasuk dalam kategori limbah *biodegradable* (limbah yang dapat terurai) yaitu dengan nilai rasio BOD:COD  $>0,6$  (dapat dilihat pada Tabel 4).

**Tabel 4.** *Biodegradability Index*

<b>Nilai Rasio BOD:COD</b>	<b><i>Biodegradability</i></b>
<b><math>&gt;0,6</math></b>	<i>biodegradable</i>
<b>0,3-0,6</b>	diperlukan treatment
<b><math>&lt;0,3</math></b>	<i>non-biodegradable</i>

Menurut Mangkoedihardjo dan Samudro (2010), rasio BOD:COD merupakan indikator dari efek keluaran zat organik yang terkandung di dalam air, air limbah, lindi, kompos dan material-material lain yang serupa yang terjadi di lingkungan baik di lingkungan alam maupun di lingkungan buatan manusia. Perbandingan BOD dan COD yang sangat rendah yaitu  $< 0,01$  menunjukkan bahwa bahan-bahan pencemar organik yang masuk bersifat sukar terurai (*persistent/nonbiodegradable*). Sebagaimana disebutkan oleh Srinivas (2008) tentang *biodegradability index* pada Tabel 4.

Rasio BOD:COD di analisis untuk mengetahui angka perbandingan untuk mengetahui tingkat biodegradabilitas senyawa organik yang dikandung air limbah. Peningkatan pH dalam penelitian ini juga terbukti mampu menaikkan tingkat biodegradabilitas limbah minyak solar. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan rasio BOD:COD yang mengindikasikan terjadinya penurunan kadar senyawa organik kompleks yang sulit terdegradasi. Derajat keasaman atau pH air limbah memiliki pengaruh terhadap perubahan rasio BOD:COD air limbah. Rasio BOD:COD mengalami peningkatan maksimum pada pH netral dibandingkan pH basa (Setiadi *et al.* 2007). Ketika suatu limbah tingkat degradasinya semakin tinggi, maka rasio BOD:COD tersebut akan berbanding lurus menjadi semakin besar (Tamyiz, 2015).

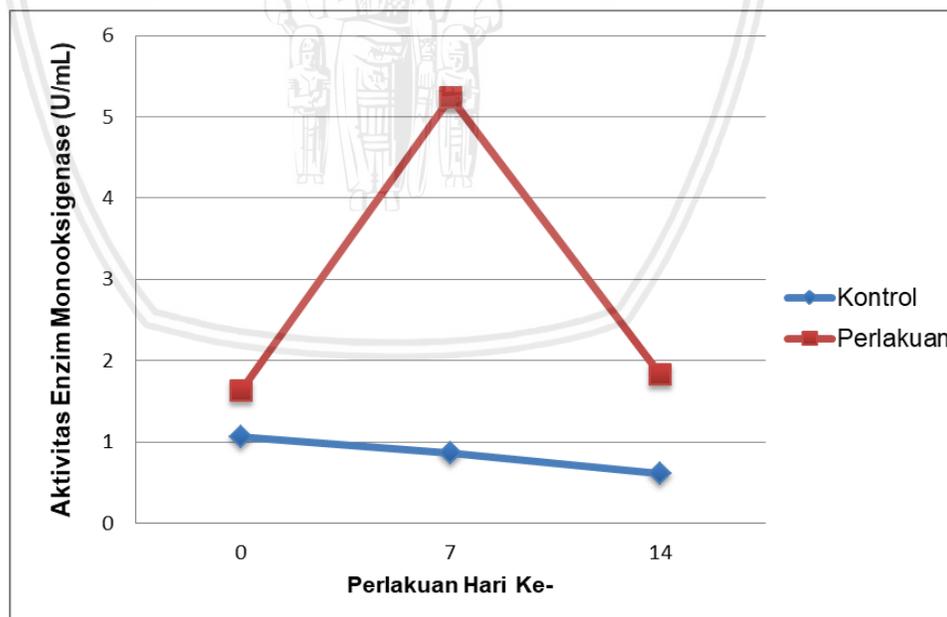
## 5.9 Uji Aktivitas Enzim

Keberhasilan proses biodegradasi banyak ditentukan oleh aktivitas enzim. Saat proses bioremediasi terjadi, enzim-enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme memodifikasi polutan beracun dengan mengubah struktur kimia polutan tersebut. Enzim mempercepat proses tersebut dengan cara menurunkan energi aktivasi, yaitu energi yang dibutuhkan untuk memulai suatu reaksi. Enzim yang dihasilkan juga

berperan untuk mengkatalis reaksi degradasi, sehingga tidak membutuhkan waktu yang lama untuk mencapai keseimbangan (Macaulay, 2014). Pada penelitian ini aktivitas enzim yang diuji adalah enzim monooksigenase dan enzim dioksigenase.

### 5.9.1 Enzim Monooksigenase

Enzim monooksigenase adalah enzim yang bekerja mengkatalis reaksi tahap pertama dalam degradasi alkana, yaitu mengkatalis inkorporasi atom O melalui proses oksidasi saat reaksi hidroksilasi alkana berlangsung. Beberapa bakteri bisa mengoksidasi hidrokarbon alifatik dengan bantuan enzim monooksigenase dan menghasilkan produk akhir berupa asetil Ko-A yang akan dikatabolisis melalui siklus asam sitrat. Sampel yang diujikan dalam penelitian ini adalah label A3B3, dimana sampel ini adalah perlakuan gabungan isolat bakteri indigenous+*Gordonia terra*. Hasil perhitungan uji aktivitas enzim monooksigenase pada penelitian dapat dilihat pada gambar 15 dibawah ini.



**Gambar 15.** Grafik Hasil Uji Aktivitas Enzim Monooksigenase (U/mL)

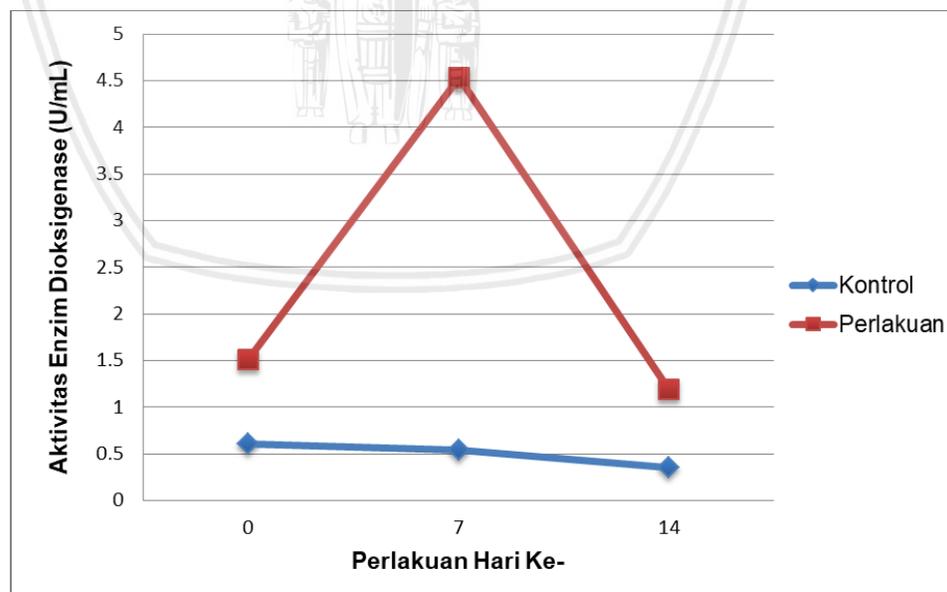
Uji aktivitas enzim monooksigenase dilakukan pada masa inkubasi ke 0, 7 dan 14. Berdasarkan grafik di atas dapat dilihat aktivitas enzim monooksigenase meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi dan kemudian menurun. Pada masa inkubasi ke-0 aktivitas enzim monooksigenase sebesar 1.508 U/mL kemudian meningkat pada masa inkubasi ke-7 sebesar 4.530 U/mL dan pada masa inkubasi ke-14 mengalami penurunan sebesar 1.186 U/mL. Aktivitas enzim monooksigenase akan meningkat ketika terjadi penambahan substrat hidrokarbon dalam medium. Bakteri akan mensintesis enzim monooksigenase untuk mendegradasi hidrokarbon dalam minyak solar menjadi alkohol yang akan diubah kembali menjadi asam asetat dan asam karboksilat yang akan digunakan dalam aktivitas metabolisme untuk dapat bertahan hidup dan mengakibatkan nilai TPH dalam medium terus menurun hingga hari ke-14 masa inkubasi (Kim dan Gadd, 2008).

Beberapa bakteri bisa mengoksidasi hidrokarbon alifatik dengan bantuan enzim monooksigenase dan menghasilkan produk akhir berupa asetil Ko-A yang akan dikatabolisis melalui siklus asam sitrat. Tahap awal biodegradasi hidrokarbon secara aerob dengan memasukkan molekul oksigen ke dalam hidrokarbon oleh enzim oksigenase, seperti *n*-alkana yang akan dioksidasi menggunakan enzim hidroksilase (oksigenase) yang terjadi pada gugus rantai C terminal (*peripheral*). Hasil oksidasi *n*-alkana akan membentuk alkohol primer. Alkohol akan diubah menjadi asam lemak maupun asam dikarboksilat melalui aldehyd yang melibatkan alkohol dehidrogenase dan aldehyd dehidrogenase. Asam lemak akan diubah membentuk senyawa intermediet berupa Asetil CoA melalui jalur  $\beta$ - oksidasi. Asetil CoA akan memasuki siklus asam trikarboksilat di dalam sel mikroorganisme untuk menghasilkan CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O serta energi untuk pertumbuhan mikroorganisme

tersebut. Pada sebagian besar enzim monooksigenase, sebagai donor elektron adalah NADH atau NADPH, meskipun dalam prosesnya penggabungan molekul oksigen direduksi oleh NADH dan NADPH. Selain itu, terdapat dua protein terlarut, yaitu rubredoksin dan rubredoksin reduktase. Rubredoksin reduktase berperan dalam transport elektron dari NADH ke rubredoksin dan membran yang mengikat alkana monooksigenase (Tontowi, 2008).

### 5.9.2 Enzim Dioksigenase

Enzim dioksigenase berfungsi mengkatalisis penyatuan oksigen ke dalam molekul substrat. Enzim dioksigenase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi adisi gugus hidroksil melalui inkorporasi kedua atom O pada  $O_2$  melalui proses oksidasi saat reaksi hidroksilasi poliaromatik berlangsung. Sampel yang diujikan dalam penelitian ini adalah label A3B3, dimana sampel ini adalah perlakuan gabungan isolat bakteri indigenus+*Gordonia terra*. Hasil perhitungan uji aktivitas enzim monooksigenase dapat dilihat pada gambar 16 dibawah ini.



**Gambar 16.** Grafik Hasil Uji Aktivitas Enzim Dioksigenase (U/mL)

Uji aktivitas enzim dioksigenase dilakukan pada masa inkubasi ke 0, 7 dan 14. Berdasarkan grafik diatas didapatkan hasil aktivitas enzim dioksigenase pada masa inkubasi ke-0 sebesar 1.636 U/mL, kemudian mengalami peningkatan pada masa inkubasi ke-7 sebesar 5.238 U/mL dan pada masa inkubasi ke-14 mengalami penurunan sebesar 1.829 U/mL. Enzim dioksigenase semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi dan mencapai aktivitas maksimum pada masa inkubasi ke-7 lalu menurun pada ke-14. Aktivitas enzim dioksigenase relatif lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas enzim monooksigenase. Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan gabungan bakteri indigenous+*Gordonia terrae* memiliki aktivitas enzim dioksigenase dan yang dibuktikan dengan meningkatnya aktivitas enzim ketika terjadi penambahan substrat hidrokarbon. Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang gabungan bakteri indigenous+*Gordonia terrae* dimiliki oleh adalah enzim induktif. Enzim induktif (adaptif) adalah enzim yang dihasilkan oleh sel hanya sebagai tanggapan terhadap adanya substrat hidrokarbon yang digunakan sebagai sumber karbon oleh bakteri.

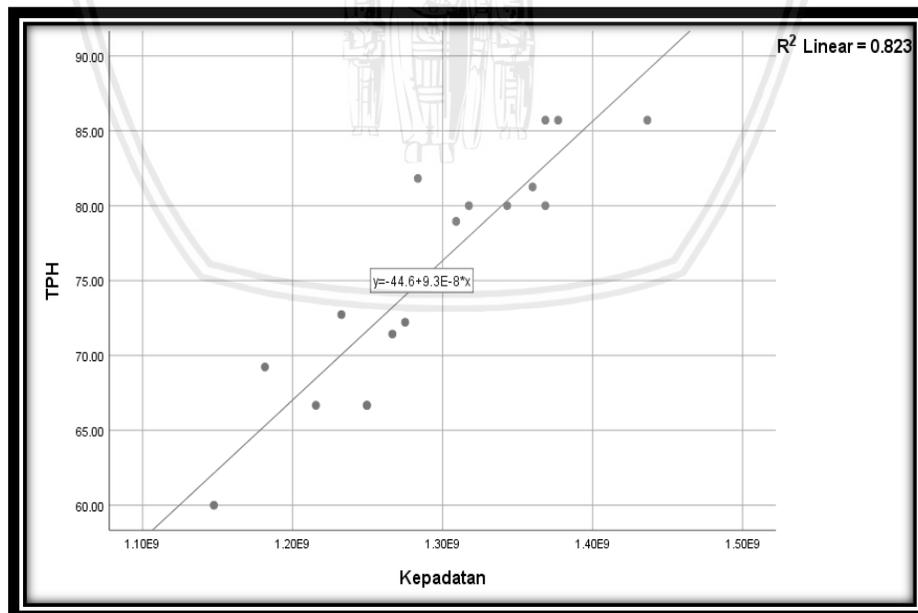
Enzim dioksigenase yang dihasilkan oleh bakteri mampu membuka ikatan karbon pada cincin aromatik dan menghasilkan alkohol primer. Hidrokarbon aromatik, akan dikatalisis menggunakan enzim dioksigenase sekuensial dioksigenase membentuk beberapa senyawa yang lebih sederhana diantaranya catechol atau cis-cis muconate. Pada tahap selanjutnya dua senyawa ini akan didegradasi menjadi suksinat, piruvat, atau asetil Ko-A sehingga bisa dikatabolisasi melalui siklus asam sitrat. Sementara itu dengan menggunakan dua molekul oksigen, enzim dioksigenase yang dihasilkan oleh bakteri mendegradasi *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) dan membentuk *cis*-Dihidrodiol. Senyawa ini kemudian didehidrogenasi untuk membentuk dihidroksi-PAH yang merupakan substrat untuk

enzim membuka cincin. Melalui pemberian satu molekul oksigen maka enzim dioksigenase dapat mendegradasi PAH dan membentuk arene oksida, selanjutnya molekul-molekul ini akan digunakan oleh mikroba sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan energi.

## 5.10 Hubungan Parameter Degradasi

### 5.10.1 Hubungan Parameter Kepadatan Bakteri dan *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH)

Hasil pertumbuhan bakteri akan berhubungan langsung dengan seberapa banyak minyak yang berhasil didegradasi atau dijadikan sebagai sumber nutrisi oleh bakteri. Dalam penelitian ini dilakukan analisis hubungan parameter kepadatan bakteri (X) dengan parameter TPH (Y) bakteri pendegradasi limbah minyak solar. Analisis regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas (X) terhadap variabel terikat (Y). Hasil regresi kepadatan bakteri dan TPH dapat dilihat pada (Lampiran 4) dan grafik dibawah ini.



**Gambar 17.** Regresi Kepadatan Bakteri (sel/ml) dan *Total Petroleum Hydrocarbon* (ppm)

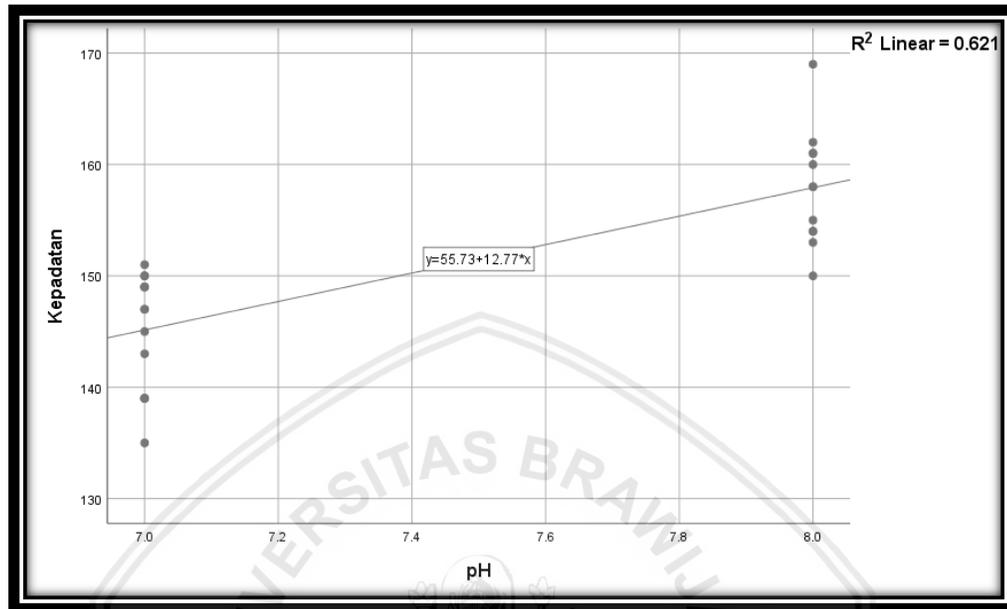
Berdasarkan hasil regresi menggunakan analisis SPSS 25 didapatkan nilai koefisien determinasi  $R^2$  antara parameter kepadatan bakteri dengan parameter Total Petroleum Hydrocarbon adalah 82%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan variabel X (Kepadatan bakteri) dengan variabel Y (TPH) dikategorikan sangat kuat, karena berada pada kriteria penafsiran (interpretasi) 80%-100%. Semakin tinggi kepadatan bakteri dalam suatu media perlakuan, maka persentase penurunan konsentrasi minyak solar akan tinggi. Hasil pada hubungan parameter ini dapat dikatakan bahwa terjadi pertumbuhan isolat yang cukup baik dan bakteri yang digunakan dapat memanfaatkan komponen minyak solar yang ada dalam media.

Bakteri menggunakan minyak solar, fosfor dan nitrogen yang terkandung dalam media sebagai nutrisi untuk pertumbuhan selnya dan juga menggunakan minyak solar sebagai sumber energinya dengan cara memotong rantai hidrokarbon minyak solar menjadi komponen organik untuk kelangsungan hidup bakteri dibawah kondisi stabil. Kemampuan bakteri untuk mengasimilasi senyawa hidrokarbon yang bersifat hidrofob dan tidak larut dalam air sangat didukung oleh peranan senyawa pengemulsi yang di hasilkan oleh bakteri tersebut, senyawa pengemulsi tersebut dapat diekskresikan oleh bakteri kedalam medium pertumbuhannya atau tetap berada pada permukaan sel bakteri. Kondisi tersebut pada gilirannya akan dapat membantu sel bakteri untuk mendegradasi minyak solar (Chen *et al.*, 2015).

### **5.10.2 Hubungan Parameter pH dan Kepadatan Bakteri**

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri ini dapat dimanfaatkan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri seperti pH, Aktivitas bakteri secara signifikan dipengaruhi oleh pH. Berdasarkan faktor tersebut, maka dilakukanlah pengamatan tentang pengaruh pH (X) terhadap pertumbuhan bakteri

(Y). Hubungan parameter pH dan kepadatan bakteri pada penelitian ini dapat pada (Lampiran 5) dan regresi dibawah ini.



**Gambar 18.** Regresi Parameter pH dan Kepadatan Bakteri (sel/ml)

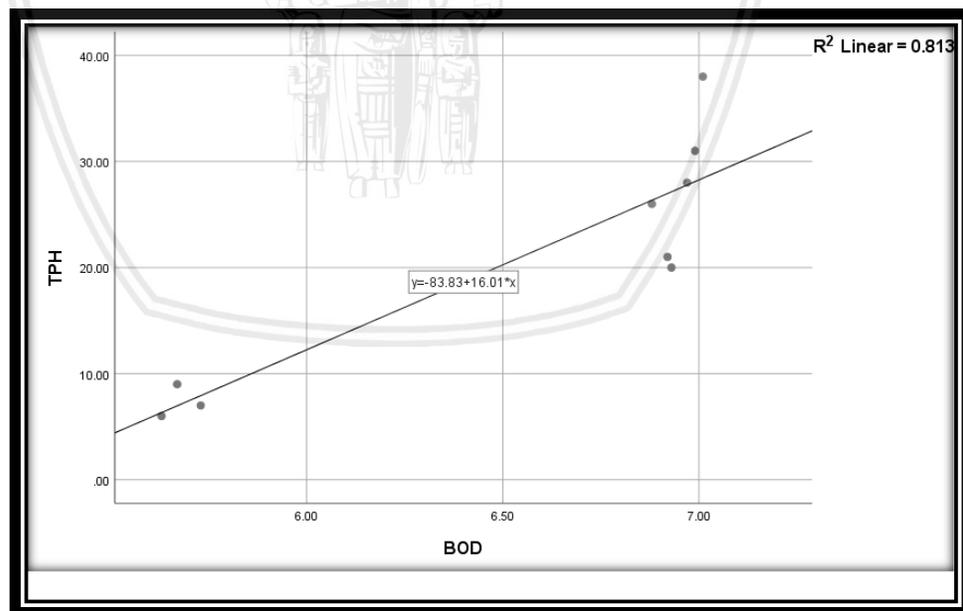
Berdasarkan hasil regresi menggunakan analisis SPSS 25 didapatkan nilai koefisien determinasi  $R^2$  antara parameter pH dengan parameter kepadatan bakteri adalah 62%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan variabel X (pH) dengan variabel Y (Kepadatan bakteri) dikategorikan kuat, karena berada pada kriteria penafsiran (interpretasi) 60%-79%. Parameter pH mempengaruhi pertumbuhan bakteri selama masa inkubasi 14 hari. Aktivitas bakteri pendegradasi minyak solar secara signifikan dipengaruhi oleh pH.

Terdapat 3 pH pertumbuhan pada bakteri yaitu pH optimum, pH maksimum dan pH minimum. Dari ketiga pH diatas biasanya pH yang paling cocok untuk pertumbuhan bakteri disebut pH optimum. pH minimum merupakan pH terendah dimana bakteri tidak dapat tumbuh, sedangkan pH maksimum merupakan pH tertinggi dimana bakteri tidak dapat tumbuh, ketiga jenis pH pertumbuhan itu sesuai

dengan karakteristik kebutuhan bakteri untuk hidup pada pH tertentu. Bila pH lingkungan tidak sesuai untuk aktivitas enzim secara optimal, maka bakteri tidak dapat melakukan metabolisme dengan baik. Akibatnya bakteri tidak dapat tumbuh dengan optimal (Hafsan, 2011).

### 5.10.3 Hubungan *Biochemical Oxygen Demand (BOD)* dan *Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)*

BOD adalah jumlah oksigen yang dibutuhkan oleh bakteri untuk menguraikan (mengoksidasikan) hampir semua zat organik yang terlarut dan sebagian zat-zat organik yang tersuspensi dalam media. Dalam penelitian ini dilakukan analisis hubungan parameter BOD(X) dengan parameter TPH (Y) bakteri pendegradasi limbah minyak solar. Analisis regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas (X) terhadap variabel terikat (Y). Hasil regresi BOD dan TPH dapat dilihat pada (Lampiran 6) dan grafik dibawah ini.



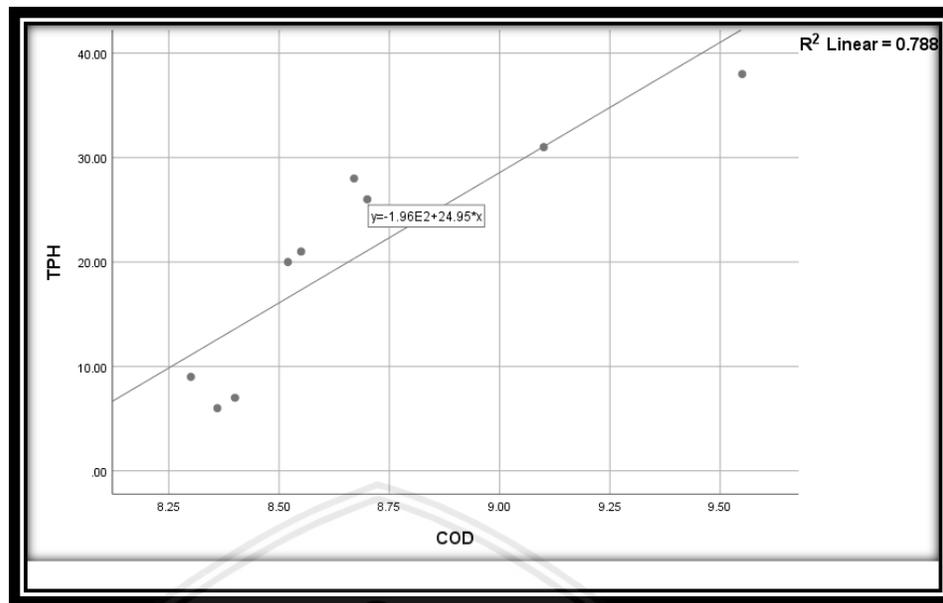
**Gambar 19.** Biochemical Oxygen Demand (mg/L) dan *Total Petroleum Hydrocarbon* (ppm)

Berdasarkan hasil regresi menggunakan analisis SPSS 25 didapatkan nilai koefisien determinasi  $R^2$  antara parameter BOD dengan parameter Total Petroleum Hydrocarbon adalah 81%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan variabel X (BOD) dengan variabel Y (TPH) dikategorikan sangat kuat, karena berada pada kriteria penafsiran (interpretasi) 80%-100%. Nilai BOD mempengaruhi proses biodegradasi limbah minyak solar dilihat dari hasil regresi parameter Total Petroleum Hydrocarbon.

Keberhasilan degradasi bahan organik dapat juga dilihat dari penurunan kadar BOD. Parameter BOD digunakan untuk mengukur banyaknya oksigen yang dikonsumsi oleh mikroba dalam proses penguraian bahan organik yang terlarut dalam limbah cair. Sebuah angka BOD yang tinggi menunjukkan kelimpahan substrat organik yang dapat digunakan oleh mikroorganisme aerobik. Ketika kandungan BOD tinggi, menunjukkan bahwa mikroorganisme sering menggunakan banyak oksigen terlarut untuk degradasi bahan organik (Ramakrisnan, 2013).

#### **5.10.4 Hubungan *Chemical Oxygen Demand* (COD) dan *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH)**

Nilai COD menunjukkan limbah minyak bumi tersebut banyak mengandung senyawa organik terutama hidrokarbon. Sehingga jumlah oksigen yang dibutuhkan untuk mengoksidasi senyawa tersebut menjadi senyawa yang lebih sederhana semakin tinggi. Dalam penelitian ini dilakukan analisis hubungan parameter COD (X) dengan parameter TPH (Y) bakteri pendegradasi limbah minyak solar. Analisis regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas (X) terhadap variabel terikat (Y). Hasil regresi COD dan TPH dapat dilihat pada (Lampiran 7) dan grafik dibawah ini.



**Gambar 20.** Chemical Oxygen Demand (mg/L) dan Total Petroleum Hydrocarbon (ppm)

Berdasarkan hasil regresi menggunakan analisis SPSS 25 didapatkan nilai koefisien determinasi  $R^2$  antara parameter COD dengan parameter Total Petroleum Hydrocarbon adalah 78%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan variabel X (COD) dengan variabel Y (TPH) dikategorikan kuat, karena berada pada kriteria penafsiran (interpretasi) 60%-79%. Nilai COD mempengaruhi parameter Total Petroleum Hydrocarbon selama masa inkubasi 14 hari.

Jumlah bahan organik yang dapat teroksidasi dapat ditentukan melalui COD atau secara tidak langsung melalui jumlah oksigen yang digunakan untuk mengoksidasi bahan-bahan organik secara kimiawi yang disebut COD. Dalam penelitian ini yang akan dioksidasi adalah senyawa hidrokarbon minyak bumi yang dioksidasi oleh mikroorganisme. Lamanya proses degradasi dan besarnya ukuran sampel akan mempengaruhi nilai COD maka nilai CODnya akan semakin besar. Hal ini berarti semakin lama waktu degradasi dan semakin kecil ukuran sampel maka semakin banyak senyawa organik dari limbah minyak bumi yang larut dalam

air. Semakin besar nilai TPH maka akan semakin banyak senyawa organik yang larut dalam media sehingga nilai COD akan meningkat juga (Zhu et al., 2001).

### **5.11 Hasil Uji GC/MS**

Kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon tidak hanya dilihat dari pola penurunan konsentrasi TPH dari awal hingga akhir pada proses perlakuan, tetapi dapat juga dilihat dari hasil pengujian *Gas Chromatography-Mass Spectrometer* (GC-MS) berdasarkan pembentukan produk akhir metabolisme maupun metabolit antara. Analisis GC-MS dilakukan sebanyak dua kali pada awal dan akhir perlakuan. Kromatografi merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menguraikan suatu campuran. Komponen-komponen dalam kromatografi akan terdistribusi ke dalam dua fase, yaitu fase diam dan fase bergerak (Khopkar, 2003).

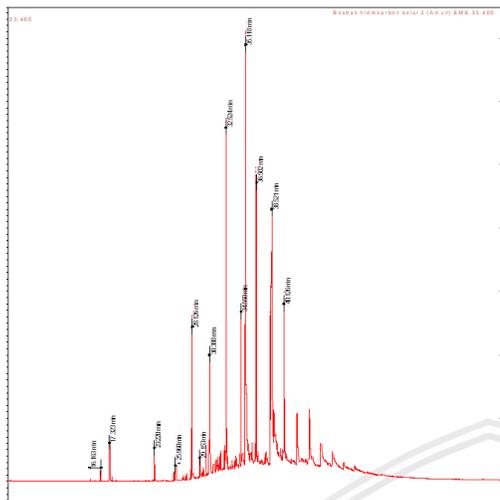
#### **5.11.1 Konsentrasi Minyak Solar 15 ppm**

Analisis GC/MS dilakukan hanya untuk perlakuan terbaik dari hasil optimasi. Tujuan analisis dengan GC/MS adalah untuk mengetahui komposisi dan jenis senyawa yang terkandung di dalam sampel sebelum dan sesudah proses bioremediasi. Pengujian *Gas Chromatography-Mass Spectrometer* (GC-MS) dalam penelitian ini dilakukan pada sampel yang memiliki persentase penurunan TPH tertinggi di setiap konsentrasi minyak solar yang diberikan. Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 15 ppm sampel yang diujikan adalah sampel dengan label A1B1, dimana sampel ini adalah perlakuan isolat bakteri indigenous. Perlakuan A1B1 memiliki hasil persentase penurunan TPH sebesar 67% (dapat dilihat pada Lampiran 1) Hasil pengujian GC-MS disajikan dalam bentuk tabel 5 dan Gambar 21 dibawah ini.

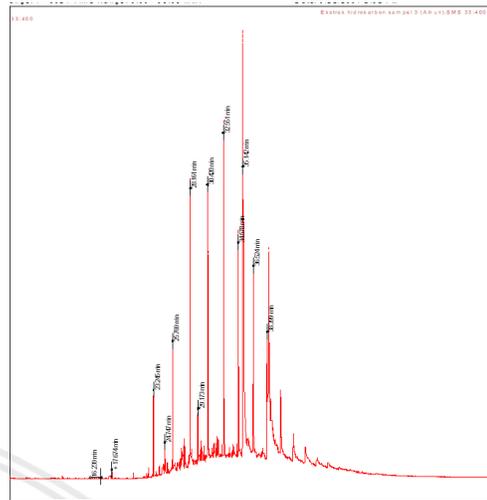
**Tabel 5.** Senyawa-senyawa hasil GCMS konsentrasi minyak solar 15 ppm

GC/MS Minyak Solar 15 ppm					
No	Senyawa Awal	Rata-rata Luas Area	Senyawa Akhir	Rata-rata Luas Area	Penurunan Luas Area (%)
1	<i>Azulene</i> (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	463608	<i>Cyclohexan</i> (C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> )	54150	88
2	<i>Naphthalene</i> (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	4177673	<i>Cyclohexanone</i> (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	79117	98
3	<i>Hexatriacontane</i> (C <sub>36</sub> H <sub>74</sub> )	1097403	<i>2,3-Dimethyldecane</i> (C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> )	293887	73
4	<i>Tetratetracontane</i> (C <sub>44</sub> H <sub>90</sub> )	2990803	<i>Heptadecane 2,6-</i> (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	281887	91
5	<i>Pentanoicacid</i> (C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> )	1430541	<i>Hydroxylamine, O-</i> <i>decyl-</i> (C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> )	1177316	18
6	<i>Tritetracontane</i> (C <sub>43</sub> H <sub>88</sub> )	5327751	<i>Nonadecane</i> (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	4448532	17
7	<i>Heptadecane</i> (C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> )	9758343	<i>Methylundecane</i> (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> )	1092826	89
8	<i>Dodecane</i> (C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> )	6742810	<i>1-Octanoal,2-Butyl-</i> (C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O)	3210342	52
9	<i>Hentriacontane</i> (C <sub>31</sub> H <sub>64</sub> )	16102837	<i>Dodecane</i> (C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> )	11541471	28
10	<i>2-Hexyl-1-octanoal</i> (C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O)	10862162	<i>Decane,2-methyl-</i> (C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> )	5493556	49
11	<i>Octadecanoicacid</i> (C <sub>33</sub> H <sub>66</sub> O <sub>3</sub> )	13991344	<i>1-Decanol,2-hexyl</i> (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O)	7487701	46
12	<i>Pentatriacontane</i> (C <sub>35</sub> H <sub>72</sub> )	10673869	<i>Hexadecanoicacid</i> (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	3418556	68
13	<i>9-Octadecenoicacid</i> (C <sub>34</sub> H <sub>66</sub> O <sub>2</sub> )	7161285	<i>Heptacosane</i> (C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> )	1815923	75
14	<i>Tetrapetracontane</i> (C <sub>54</sub> H <sub>110</sub> )	5279266	<i>8-Octadecenoic acid</i> (C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	4183646	21

**A. GC/MS Sebelum Perlakuan**



**B. GC/MS Setelah Perlakuan**

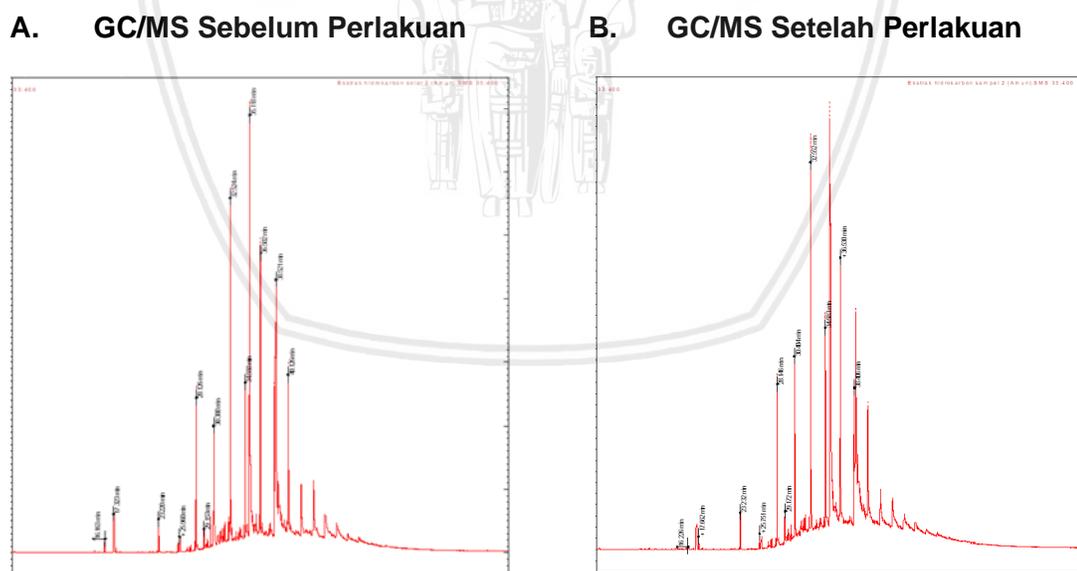


**Gambar 21.** Hasil Analisis Uji GC/MS Konsentrasi Minyak Solar 15 ppm

Hasil perbandingan profil kromatogram menunjukkan degradasi senyawa hidrokarbon berantai panjang dan membentuk rantai senyawa hidrokarbon lebih pendek. Berdasarkan tabel di atas didapatkan hasil pada penelitian ini 14 senyawa rantai panjang sebelum perlakuan dan 14 senyawa rantai pendek setelah perlakuan. Masing-masing senyawa memiliki nilai rata-rata luas yang berbeda dan nilai persentase penurunan senyawa hidrokarbon yang berbeda. Persentase penurunan senyawa hidrokarbon tertinggi dari senyawa *Napthalene* (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>) sebesar 98%, sedangkan persentase penurunan terendah dari senyawa *Tritetracontane* (C<sub>43</sub>H<sub>88</sub>) sebesar 17%. Kedua contoh uji pada profil kromatogram dalam Gambar 12 menunjukkan pengurangan luas area dari kurva dan indikasi penurunan konsentrasi hidrokarbon setelah perlakuan. Berkurangnya luas area pada setiap senyawa yang muncul dapat disebabkan karena menguapnya senyawa-senyawa hidrokarbon rantai pendek atau juga dapat menunjukkan aktivitas biodegradasi oleh bakteri.

### 5.11.2 Konsentrasi Minyak Solar 30 ppm

Analisis GC/MS dilakukan hanya untuk hasil optimasi yang memberikan hasil perlakuan terbaik. Tujuan analisis dengan GC/MS adalah untuk mengetahui komposisi dan jenis senyawa yang terkandung di dalam sampel sebelum dan sesudah proses bioremediasi. Pengujian *Gas Chromatography-Mass Spectrometer* (GC-MS) dalam penelitian ini dilakukan pada sampel yang memiliki persentase penurunan TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) tertinggi di setiap konsentrasi minyak solar yang diberikan. Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 30 ppm sampel yang diujikan adalah sampel dengan label A3B2, dimana sampel ini adalah perlakuan gabungan isolat bakteri indigenous+*Gordonia terrae*. Perlakuan A3B2 memiliki hasil persentase penurunan TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) sebesar 77% (dapat dilihat pada Lampiran 1). Hasil pengujian GC-MS dapat dilihat pada tabel 6 dan gambar 22 dibawah ini.



**Gambar 22.** Hasil Analisis Uji GC/MS Konsentrasi Minyak Solar 30 ppm

**Tabel 6.** Senyawa-senyawa hasil GCMS konsentrasi minyak solar 30 ppm

GC/MS Minyak Solar 30 ppm					
No	Senyawa Awal	Rata-rata Luas Area	Senyawa Akhir	Rata-rata Luas Area	Penurunan Luas Area (%)
1	<i>Camphor</i> (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	463608	<i>Camphor</i> (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	96222	79
2	<i>Naphthalene</i> (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	4177673	<i>Azulene</i> (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	231741	94
3	<i>Hexatriacontane</i> (C <sub>36</sub> H <sub>74</sub> )	1097403	<i>Hexadecane</i> (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> )	498633	55
4	<i>Tetratetracontane</i> (C <sub>44</sub> H <sub>90</sub> )	2990803	<i>Nonadecane</i> (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	1405767	53
5	<i>Pentanoicacid</i> (C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> )	1430541	<i>Octane</i> (C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> )	46827	97
6	<i>Tritetracontane</i> (C <sub>43</sub> H <sub>88</sub> )	5327751	<i>Nonadecane</i> (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	610753	89
7	<i>Heptadecane</i> (C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> )	9758343	<i>1-Octanoal, 2-butyl-</i> (C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O)	6506666	33
8	<i>Pentadecane</i> (C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> )	6742810	<i>1-Octanoal,2-Butyl-</i> (C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O)	1935619	71
9	<i>Hentriacontane</i> (C <sub>31</sub> H <sub>64</sub> )	16102837	<i>10-Methylnonadecane</i> (C <sub>20</sub> H <sub>44</sub> )	12587702	22
10	<i>2-Hexyl-1-octanoal</i> (C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O)	14585782	<i>1-Octanoal, 2-butyl-</i> (C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O)	10862162	26
11	<i>Octadecanoicacid</i> (C <sub>33</sub> H <sub>66</sub> O <sub>3</sub> )	13991344	<i>Pentadecane</i> (C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> )	8914780	36
12	<i>Pentatriacontane</i> (C <sub>35</sub> H <sub>72</sub> )	10673869	<i>Hexadecanoicacid</i> (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	3026173	72
13	<i>Pentatriacontane</i> (C <sub>35</sub> H <sub>72</sub> )	11002639	<i>1-Decanol,2-hexyl-</i> (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O)	7161285	35
14	<i>Tetrapetracontane</i> (C <sub>54</sub> H <sub>110</sub> )	5279266	<i>9-Octadecenoic acid</i> (C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	5255659	0.45

Hasil perbandingan profil kromatogram menunjukkan degradasi senyawa hidrokarbon berantai panjang dan membentuk rantai senyawa hidrokarbon lebih pendek. Berdasarkan tabel di atas didapatkan hasil pada penelitian ini muncul 14 puncak sebelum perlakuan yang mewakili jumlah senyawa hidrokarbon dan

penyusunnya dan 17 senyawa rantai pendek setelah perlakuan. Masing-masing senyawa memiliki nilai rata-rata luas yang berbeda dan nilai persentase penurunan senyawa hidrokarbon yang berbeda. Persentase penurunan senyawa hidrokarbon tertinggi dari senyawa *Pentanoicacid* (C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>) sebesar 97%, sedangkan persentase penurunan terendah dari senyawa *Tetrapetracontane* (C<sub>54</sub>H<sub>10</sub>) sebesar 0,45%. Kedua contoh uji pada profil kromatogram dalam Gambar 17 menunjukkan pengurangan luas area dari kurva dan indikasi penurunan konsentrasi hidrokarbon setelah perlakuan. Berkurangnya luas area pada setiap senyawa yang muncul dapat disebabkan karena menguapnya senyawa-senyawa hidrokarbon rantai pendek atau juga dapat menunjukkan aktivitas biodegradasi oleh bakteri.

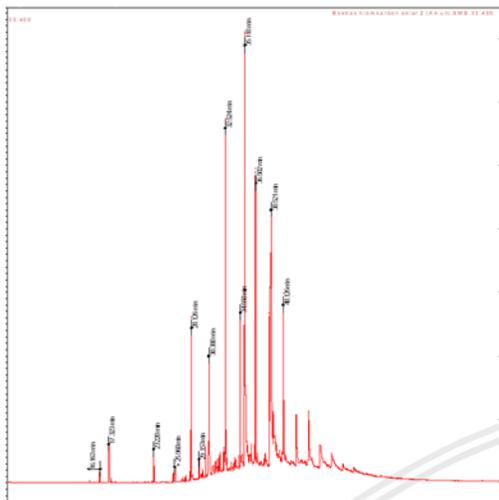
### 5.11.3 Konsentrasi Minyak Solar 45 ppm

Analisis GC/MS dilakukan hanya untuk hasil optimasi yang memberikan hasil perlakuan terbaik. Tujuan analisis dengan GC/MS adalah untuk mengetahui senyawa intermediet yang terbentuk selama proses degradasi hidrokarbon saat kultivasi pada media dengan penambahan substrat hidrokarbon selama 14 hari. Pengujian *Gas Chromatography-Mass Spectrometer* (GC-MS) dalam penelitian ini dilakukan pada sampel yang memiliki persentase penurunan TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) tertinggi di setiap konsentrasi minyak solar yang diberikan. Pada perlakuan konsentrasi minyak solar 45 ppm sampel yang diujikan adalah sampel dengan label A3B3, dimana sampel ini adalah perlakuan gabungan isolat bakteri indigenous+*Gordonia terrae*. Perlakuan A3B3 memiliki hasil persentase penurunan TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) sebesar 86% (dapat dilihat pada Lampiran 1). Hasil pengujian GC-MS dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar 23 dibawah ini.

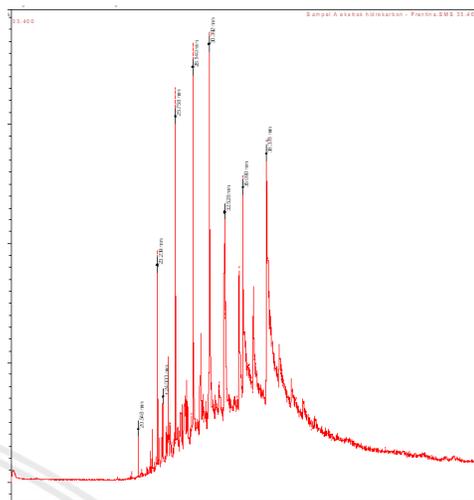
**Tabel 7.** Senyawa-senyawa hasil GCMS konsentrasi minyak solar 45 ppm

GC/MS Minyak Solar 45 ppm					
No	Senyawa Awal	Rata-rata Luas Area	Senyawa Akhir	Rata-rata Luas Area	Penurunan Luas Area (%)
1	<i>Camphor</i> (C10H16O)	-	-	-	100
2	<i>Naphthalene</i> (C10H8)	-	-	-	100
3	<i>Hexatriacontane</i> (C36H74)	1097403	<i>Hexadecane</i> (C16H34)	162935	85
4	<i>Tetrapetracontane</i> (C44H90)	2990803	<i>Nonadecane</i> (C19H40)	136268	95
5	<i>Pentanoic acid</i> (C19H38O2)	1430541	<i>Sulfurous acid</i> (C15H32O3)	742624	48
6	<i>Tritetracontane</i> (C43H88)	5327751	<i>Naphthalene, 2,6-dimethyl-</i> (C12H12)	258013	95
7	<i>Heptadecane</i> (C17H36)	9758343	<i>1-Heptanol, 2-propyl-</i> (C10H22O)	250855	97
8	<i>Pentadecane</i> (C15H32)	6742810	<i>1-Octanol, 2-butyl-</i> (C12H26O)	1341844	80
9	<i>Hentriacontane</i> (C31H64)	16102837	<i>Heptadecane</i> (C17H36)	1512173	91
10	<i>2-Hexyl-1-octanol</i> (C14H30O)	14585782	<i>Hydroxylamine</i> (C10H23O)	12223069	16
11	<i>Octadecanoic acid</i> (C33H66O2)	13991344	<i>1-Decanol, 2-hexyl</i> (C16H34O)	482018	97
12	<i>Pentatriacontane</i> (C35H72)	10673869	<i>2-Hexyl-1-octanol</i> (C14H30O)	501472	95
13	<i>Pentatriacontane</i> (C35H72)	11002639	<i>Pentanoic acid</i> (C17H34O2)	148492	99
14	<i>Tetrapetracontane</i> (C54H110)	5279266	-	-	100

## A. GC/MS Sebelum Perlakuan



## B. GC/MS Setelah Perlakuan



**Gambar 23.** Hasil Analisis Uji GC/MS Konsentrasi Minyak Solar 45 ppm

Berdasarkan hasil tabel GC/MS diatas didapatkan 14 senyawa rantai panjang sebelum perlakuan dan 11 senyawa rantai pendek setelah perlakuan. Gambar diatas menunjukkan hasil pengukuran pada awal sebelum dan sesudah dilakukannya uji degradasi oleh bakteri. Hasil perbandingan profil kromatogram menunjukkan degradasi senyawa hidrokarbon berantai panjang dan membentuk rantai senyawa hidrokarbon lebih pendek. Pada masing-masing puncak terdapat nomor yang menyatakan jenis senyawa yang terkandung dari minyak solar yang terukur. Hasil dari GCMS yang dilakukan pada akhir perlakuan selama masa inkubasi 18 hari menunjukkan puncak kurva yang dihasilkan menurun ketinggiannya dan jumlah dari puncaknya pun berkurang. Hal ini menunjukkan bahwa minyak solar telah didegradasi oleh gabungan bakteri indigenous+*Gordonia terrae*. Berdasarkan hasil uji GCMS pada awal dan akhir percobaan dapat dilihat bahwa ada beberapa senyawa yang berkurang dan ada juga yang hilang seperti senyawa *Camphor*, *Naphthalene* serta senyawa *Tetrapetracontane*.

### 5.12 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan untuk mengetahui jenis/spesies bakteri indigenous yang telah diisolasi dari lingkungan perairan tercemar limbah hidrokarbon minyak solar. Bakteri *indigenous* ini akan digunakan sebagai agen bioremediasi untuk mengurangi atau bahkan menghilangkan pencemaran limbah hidrokarbon minyak solar. Identifikasi bakteri indigenous dilakukan dengan menggunakan metode KIT API 20 E V5.0. Hasil identifikasi bakteri indigenous dapat dilihat pada gambar 24 dibawah ini.

VERY GOOD IDENTIFICATION						
Strip	API 20 E V5.0					
Profile	+ - + - + - + - + - + - + - + - + - + - ?					
Note	ID.NOT VALID BEFORE 48 HOURS					
Significant taxa	% ID	T	Test against			
Bacillus cereus	99.8	0.67	VP 99%			
Next taxon	% ID	T	Test against			
Bacillus subtilis	0.5	1.7	PNPG 1%	GLUa 99%	RHAa 75%	ARAa 10%

Gambar 24. Identifikasi Bakteri *Indigenous*

Berdasarkan hasil identifikasi tersebut dapat diketahui bahwa isolat bakteri indigenous mampu tumbuh hidup pada konsentrasi minyak solar 15, 30 dan 45 ppm adalah bakteri spesies *Bacillus cereus*. Isolat bakteri *indigenous* mempunyai warna koloni putih berpigmen kekuningan, bentuk yang irregular, dengan bentuk tepi yang tinggi (lobate), elevasi tinggi (raised), dan struktur dalam yang kasar dan beraturan. Secara khusus isolat ini dengan bentuk sel batang dan berujung tumpul yang terletak seperti rantai dengan panjang 3 –10 mikron, lebar 1 – 3 mikron, berspora sentral dan tidak bergerak, berkapsul, bersifat gram positif batang. Isolat ini dapat tumbuh dengan pH 7,0 – 7,4 dan suhu pertumbuhan 37°C, yang sifatnya aerob tetapi pertumbuhan jarang terjadi jika tidak ada oksigen. Dari hasil identifikasi ini

disimpulkan bahwa isolat bakteri indigenous ini tergolong genus *Bacillus*, dengan nama lengkap *Bacillus cereus* (Lusiana *et al.*, 2017).



## 6. KESIMPULAN dan SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Terdapat beberapa kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini, antara lain sebagai berikut :

1. Pada penelitian ini didapatkan bakteri *indigenus* yang diisolasi dari perairan tercemar minyak solar yang mampu dijadikan sebagai agen bioremediasi limbah hidrokarbon.
2. Secara keseluruhan sel isolat bakteri mampu tumbuh dalam media minyak solar serta terdapat perbedaan kemampuan bakteri *indigenus*, *Gordonia terrae* dan gabungan keduanya dalam mendegradasi limbah hidrokarbon minyak solar pada konsentrasi 15 ppm, 30 ppm dan 45 ppm.
3. Hasil persentase penurunan degradasi minyak solar 15 ppm tertinggi oleh bakteri *indigenus* (A1B1) sebesar 67%, sedangkan persentase penurunan degradasi minyak solar 30 ppm tertinggi oleh gabungan bakteri *indigenus*+*Gordonia terrae* (A3B2) sebesar 77% dan persentase penurunan degradasi minyak solar 45 ppm tertinggi oleh gabungan bakteri *indigenus*+*Gordonia terrae* (A3B3) sebesar 86%.

### 6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah diharapkan dapat melakukan penelitian peningkatan konsentrasi minyak solar yang diberikan, uji biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri pendegradasi minyak solar dan analisis molekuler untuk identifikasi bakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustiningih, D., Sasongko, S. B., & Sudarno. (2012). Analisis Kualitas Air dan Strategi Pengendalian Pencemaran Air Sungai Blukar Kabupaten Kendal. *Jurnal PRESIPITASI*.
- Alghifari, A., Estuningsih, S. P., dan Tanzerina, N. 2016. Konsentrasi Sludge Minyak Bumi dalam Proses Bioremediasi Memanfaatkan Bakteri Indigen dan Lamtoro Gung. *Jurnal Lahan Suboptimal*, 4(1), 31-37.
- Andina. F. 2014. Biodegradasi *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) dengan Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Air Laut dan Sedimen Pantai Karangsong Kabupaten Indramayu Jawa Barat. Skripsi. Universitas Padjadjaran Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Program Studi Ilmu Kelautan Jatinangor.
- Arenskotter, M., Bro'ker, D. & Steinbu'chel, A. (2004).Biology of themetabolically diverse genusGordonia. *Appl Environ Microbiol*70,3195–3204.
- Asia, I.O., Enweani, I.B., dan Eguavoen I.O., 2016. Characterization and Treatment of Sludge from the Petroleum Industry. *African J. Biotechn*.5(5):461-466.
- Atlas, RM. Bartha R.. 1981. *Microbiology Ecology, Fundamentals and Applications*. Addison Wesley Publishing Company, Inc.
- Auffret, M., Labbé, D., Thouand, G., Greer, C. W., & Fayolle-Guichard, F. (2009). Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Bartha R, Bossert I. 1984. The treatment and disposal of petroleum wastes. Di dalam: Atlas RM, editor. *Petroleum Microbiology*. New York (US): Macmillan Publishing Co. hlm 553-577.
- Bento FM, Camargo FA, Okeke BC, Frankenberger WT. 2015. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technol* 96(9): 1049-1055.
- Bourguignon, L. Y. W. (2014). Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions. *American Journal of Pathology*.
- Bundy JG, Paton G I, Cambell CD. 2014. *Combined Microbial Community Level and Single Species Biosensor ReSponses to Monitor Recovery of Oil Polluted Soil*. *Soil Biology & Biochemistry*. 36:1149-1159.

- Carvalho C, Da Fonseca MR. 2015. *Degradation of Hydrocarbons and Alcohols at Different Suhues and Salinities by Rhodococcus erythropolis DCL14*. FEMS Microbiology Ecology. 51 : 389-399.
- Dadrasnia, A., & Agamuthu, P. (2013). Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*.
- Djoharam, V., Riani, E. and Yani, M. (2018) 'ANALISIS KUALITAS AIR DAN DAYA TAMPUNG BEBAN PENCEMARAN SUNGAI PESANGGRAHAN DI WILAYAH PROVINSI DKI JAKARTA', *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan (Journal of Natural Resources and Environmental Management)*.
- Drevininkas, A., Laurin, P., Harris, S., Guoth, T., & Pasqualoni, R. (2005). Remedial approach for petroleum hydrocabon contaminated groundwater at a TTC bus garage in Toronto, Ontario. In *Proceedings, Annual Conference - Canadian Society for Civil Engineering*.
- Ebuehi OAT, Abibo IB, Shekwolo PD, Sigismund KI, Adoki A, Okoro IC. 2015. Remediation of crude oil contaminated soil by enhanced natural attenuation technique. *J A Sci Env Man*. 9(1):103-106.
- Effendi, H. (2003). *Telaah Kualitas Air bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan. KANISIUS (anggota IKAPI)*.
- Ezeronye. P.O., O., & O.U., E.2015. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*.
- Forget, N., Belzile, C., Rioux, P., & Nozais, C. (2011). Teaching the microbial growth curve concept using microalgal cultures and flow cytometry. *Journal of Biological Education*.
- Gallego, N. C., & Edie, D. D. (2001). Structure-property relationships for high thermal conductivity carbon fibers. *Composites - Part A: Applied Science and Manufacturing*.
- Gerdes B, Brinkmeyer R, Deckman G, Helmke E. 2015. *Influence of Cude Oil on Changes of Bacterial Communities in Artic Sea-ice*. FEMS Microbiology Ecology. 53 : 129-139.
- Ghazali MF, Zaliha NR, Abdul RN, Salleh AB, Basri M. 2014. *Biodegradation of Hdrocarbons in Soil by Microbial Consortium*. International Biodeteriorationand Biodegradation. 54 : 61-67.
- Godfrey T. 2016. *Mineral Oils and Drilling Muds*. New York (US): Stockton Press.

- Grisold, A. J. *et al.* (2007) 'Isolation of *Gordonia terrae* from a patient with catheter-related bacteraemia', *Journal of Medical Microbiology*.
- Hafiluddin. 2011. Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak dengan Teknik Bioaugmentasi dan Biostimulasi. *Embryo* Vol. 8 No. 1. Hal : 47 – 52.
- Hajar, Dachniar. 2012. Isolasi, Identifikasi dan Analisis Kemampuan Degradasi Hidrokarbon Bakteri Tanah Sampel B,Cilegon, Banten. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok.
- Hamdi, A.S. dan Bahrudin E. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi Dalam Pendidikan. DEEPUBLISH. Yogyakarta.
- Hassanshahian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., & Kariminik, A. (2013). Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Marine Pollution Bulletin*.
- Hasyimuddin., M.N. Djide. dan M.F.Samawi. 2016. Isolasi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar Dari Perairan Tercemar.
- Hatayama, T., Tanaka, N., Fuyuki, T., & Matsunami, H. (2007). Low-temperature interface modification by hydrocarbon radicals in heteroepitaxy of 3C-SiC on Si clean surface. *Journal of Electronic Materials*.
- Hatmanti. A. 2010. Pengenalan *Bacillus* sp.. Balitbang Lingkungan Laut, Puslitbang Oseanologi-LIPI. 25(1): 31-41.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2005). A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*.
- Ibrahim, H. M. M. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. *3 Biotech*.
- Ishikawa, T., Trislina, Yurenfrie, Ardianor, and S. Gumiri. 2006. Dissolved organic carbon concentration of a natural water body relationship to water color in Central Kalimantan, Indonesia. *Limnology* 7: 143-146.
- Itoh N, Numata M, Aoyagi Y, and Yarita T. 2008. Comparison of Low-Level Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediment Revealed by Soxhlet Extraction, Microwave-Assisted Extraction and Pressurized Liquid Extraction. *Anal Chim Acta* 612 (1): 44-52.
- Janaki, S., Thenmozhi, S., & Muthumari, R. (2016). A study on Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant Producing *Bacillus cereus* in Oil

- Contaminated Soil Samples. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*.
- Jauhari, N., Mishra, S., Kumari, B., dan Singh, S.N., 2014. Bacteria-mediated Aerobic Degradation of Hexacosane In Vitro Conditions, *Bioresource Technology*, 170, 62-68.
- Khopkar SM. 2003. Konsep Dasar Kimia Analitik. Diterjemahkan oleh A. Saptorahardjo. UI Press. Jakarta, Indonesia.
- Kim SJ, Choi DH, Sim DS, Oh YS, 2015. *Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand*. *ChemoSphere*. 59 : 845-852.
- Koma, D., Sakashita, Y., Kubota, K., Fujii, Y., Hasumi, F., Chung, S.-Y., & Kubo, M. (2003). Degradation of Car Engine Base Oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48 and *Gordonia* sp. NDKY76A. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. hal 21.
- Leppchen, Kathrin. 2016. *Microbial De-emulsification: A Highly Efficient Procedure for the Extractive Workup of Whole-Cell Biotransformations*. Institute of Technical Chemistry, Freiberg University of Technology Fierberg Germany.
- Lestari, A. B. 2018. 'Potensi Bakteri Penambat Nitrogen dan Penghasil Hormon IAA Dari Sampel Rhizosfer Paku Epifit Di Mulut Gua Anjani, Kawasan Karst Menoreh', *BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology*.
- Macaulay, B.M., 2014, Understanding the Behaviour of Oil-degrading Microorganisms to Enhance the Microbial Remediation of Spilled Petroleum, *Applied Ecology and Environmental Research*, 13 (1), 247-262.
- Maier, T., Güell, M. and Serrano, L. 2009. 'Correlation of mRNA and protein in complex biological samples.', *FEBS letters*.
- Merasbi M.R. 2013. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil. *Iranian Health Public Journal* : 28-32.
- Mukhtasor. 2006. Pencemaran Pesisir dan Laut. PT Paradnya Paramita, Jakarta.
- Mulja, Muhammad, Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Penerbit Airlangga University Press. Surabaya.
- Munir E. 2006. *Pemanfaatan mikroba dalam bioremediasi: Suatu Teknologi Alternatif Untuk Pelestarian Lingkungan*. Universitas Sumatera Utara Medan.

- Mishra, S. dan Singh, S.N., 2012, Microbial Degradation of n-Hexadecane in Mineral Salt Medium as Mediated by Degradative Enzymes, *Bioresource Technology*, 111, 148-154.
- Mishra, S., Singh, S.N., dan Pande, V., 2014, Bacteria Induced Degradation of Fluoroanthene in Minimal Salt Medium Mediated by Catabolic Enzymes In Vitro Condition, *Bioresource Technology*, 164, 299-308.
- Misran E. 2012. Aplikasi Teknologi Berbasiskan Membrandalam Bidang Bioteknologi Kelautan: Pengendalian Pencemaran. Medan: Fakultas teknik Program Studi Teknik Kimia Universitas Sumatera Utara.
- Nababan, E. B. 2008. 'A branch and bound algorithm in optimizing job shop scheduling problems', in *Proceedings - International Symposium on Information Technology 2008, ITSIm*.
- Nasikhin., M. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin dari Perairan Pelabuhan Gresik. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits Vol. 2, No.2, (2013) 2337-3520 (2301-928x Print)*. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).
- Nugraha MA. 2011. Karakteristik Lipid Biomarker pada Sedimen Estuari : Studi Kasus Muara Angke – Teluk Jakarta, Cimandiri – Pelabuhan Ratu dan Cilintang – Ujung Kulon. *Tesis*. Sekolah Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Nugroho, A. 2012. BIODEGRADASI SLUDGE MINYAK BUMI DALAM SKALA MIKROKOSMOS: Simulasi Sederhana Sebagai Kajian Awal Bioremediasi Land Treatment, *MAKARA of Technology Series*.
- Nugroho, A. 2016. Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi. Penerbit Graha Ilmu dan FTI Universitas Trisakti. Jakarta Barat. 159 hlm.
- Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, N. S., Chandran, P., & Khan, S. (2014). Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*.
- Patil, R. S., Kokate, M. R., & Kolekar, S. S. (2012). Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.
- Pertamina, 2018. *Industrial Diesel Oil (Minyak Diesel)*.
- Plohl, K., H. Lescovsek & Bricelj M. 2011. *Biological Degradation of Motor Oil in Water*. *Acta chim.* 49:279-280.

- Pikoli, MR, P. Aditiawat, DI Astuti. 2010. *Isolasi Bertahap dan Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik Pendegradasi Minyak Bumi dari Sumur Banko*. Laporan Penelitian Jurusan Biologi, ITB, Bandung.
- Pine SH, Hendrickson JB, Cram DJ, Hammond GS. 1988. *Kimia Organik 1*. Joedodibroto R, Hadiwidjono SWB, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari : *Organic Chemistry, fourth edition*.
- Purwoko, A. and Wolff, W. J. 2008. Low biomass of macrobenthic fauna at a tropical mudflat: An effect of latitude, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., and Ron, E. Z. 2012. Petroleum Bioremediation – A Multiphase Problem. *Biodeg.* 3, 213 – 226.
- Sari IP., A. Manan. 2012. Pola pertumbuhan *Tetraselmis chuii* pada skala laboratorium, intermediet dan masal. *Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 4(2) : 123-127.
- Sharpley, J.M. 1996. *Elementary Petroleum Microbiology*. Texas. Gulf Publishing Company.
- Sinjal, H. 2014. Efektifitas Ovaprim Terhadap lama Waktu Pemijahan, Daya Tetas telur dan Sintasan Larva Ikan Lele Dumbo, *Clarias gariepinus*. *Budidaya Perairan*. 2 (1). Hal : 14-21.
- Sugiyono. 2009. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Sulistiyono., Suntoro., M.Masykuri. 2012. Kajian Dampak Tumpahan Minyak Dari Kegiatan Operasi Kilang Minyak Terhadap Kualitas Air dan Tanah (Studi Kasus Kilang Minyak Pusdiklat Migas Cepu). *Jurnal EKOSAINS*. Vol. IV (2).
- Thompson, D. R., Bury, S. J., Hobson, K. A., Wassenaar, L. I., & Shannon, J. P. 2005. Stable isotopes in ecological studies. *Oecologia*.
- Udiharto, M. 1994. Aktivitas Mikroba Dalam Degradasi Minyak Bumi. Dalam *Proceeding : Diskusi Ilmiah VII Hasil Penelitian Lemigas. Lemigas. Jakarta. Hal 464-476*.
- Van Beilen, J.B., Kingma, J., dan Witholt, B., 1994, Substrate Specificity of the Alkane Hydroxylase System of *Pseudomonas oleovorans* GP01, *Enzyme Microbiology*, 16, 904-911.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.

- Venosa, AD., Zhu, X. (2003). Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shoreline and Freshwater wetland. *Spill Science and Technology Bulletin*, vol 8(2).
- Vidali, M..2011. Bioremediation. An Overview. *Pure Appl.Chem.*, Vol. 73, No. 7, hal 1163-1172.
- Walker, JD, RR Colwell, 1974. *Microbial degradation of model petroleum at low suhues*. *Microb. Ecol.* 1: 63-95.
- Yani, S., & Zhang, D. K. 2009. Transformation of organic and inorganic sulphur in a lignite during pyrolysis: Influence of inherent and added inorganic matter. *Proceedings of the Combustion Institute*.
- Yu, Y., Tang, L., Yang, W., Huang, T., Qiu, N., & Li, W. (2014). Salt structures and hydrocarbon accumulations in the Tarim Basin, northwest China. *AAPG Bulletin*.
- Yudono B, Estuningsih SP, Said M, Sabaruddin, Napoleon A. 2013. Eksplorasi bakteri indigen pendegradasi limbah minyak bumi di wilayah PT Pertamina UBEB Limau Muara Enim. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung, 2013*. 127-134.
- Yulia, L. R., B. Marsa dan S. R. Juliastuti. 2012. Bioremediasi Air Laut Terkontaminasi Minyak Bumi dengan Menggunakan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Fakultas Teknologi Industri. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. 5 hal.
- Zajic, J. E., Guignard, H., and Gerson, F. D. 2017. Emulsifying and Surface Active Agents From *Corynebacterium hydrocarbonoclastus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 19, 1285 – 1301.
- Zhu, S. and Chen, S. 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters, *Aquacultural Engineering*.
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Zulkifliani, Z., Suryatmana, P., Sylvia, A. R., and Syafrizal, S. 2017. Effects of Petrofilic Microorganisms and Bulking Agent on Hydrocarbon's Biodegradation Efficiency. *Scientific Contributions Oil and Gas*, 39(3).

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian



Lampiran Lanjutan



Perhitungan Kepadatan Bakteri



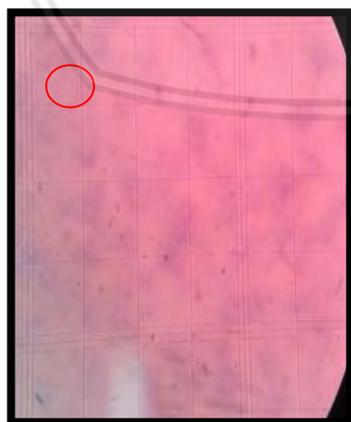
Pengukuran TPH



Pengukuran pH



Sampel Uji BOD dan COD



Pengamatan Mikroskopik Bakteri



Penghomogenan Sampel TPH



Ekstrak Hidrokarbon



Penimbangan Ekstrak Hidrokarbon

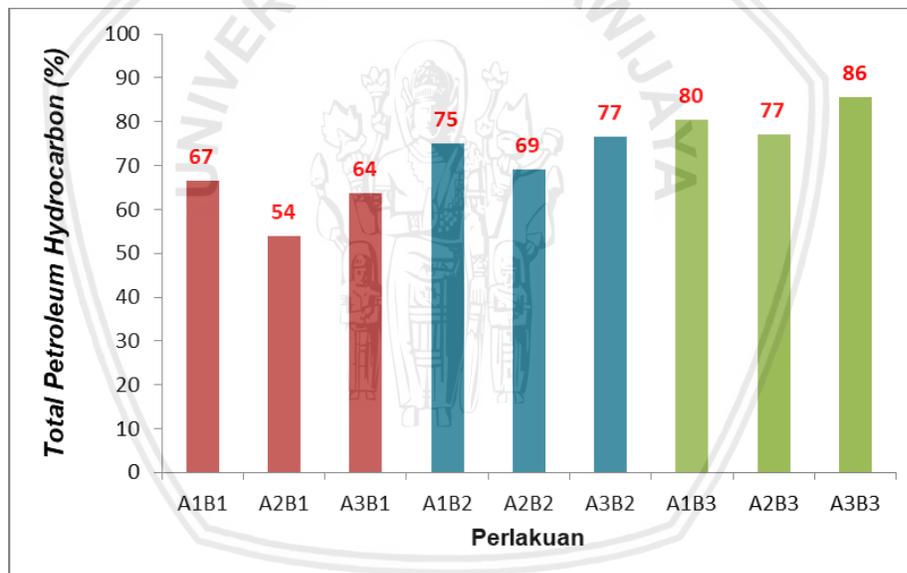


**Lampiran 2. Hasil Persentase Penurunan TPH**

**a. Tabel Persentase Penurunan TPH**

Sampel	Efisiensi Penurunan
A1B1	67
A2B1	54
A3B1	64
A1B2	75
A2B2	69
A3B2	77
A1B3	80
A2B3	77
A3B3	86

**b. Grafik Persentase Penurunan TPH**



Lampiran 3. SPSS 25 Uji Total Petroleum Hydrocarbon

- Uji Normalitas menggunakan SPSS 25

Shapiro-Wilk			
	Statistic	Df	Sig.
SR	,740	3	,000

- Uji ANOVA menggunakan SPSS 25

Dependent Variable:

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	120.296 <sup>a</sup>	8	15.037	25.375	0.000
Intercept	685.037	1	685.037	1156.000	0.000
Sampel	120.296	8	15.037	25.375	0.000
Error	10.667	18	0.593		
Total	816.000	27			
Corrected Total	130.963	26			

a. R Squared = .919 (Adjusted R Squared = .882)

- Uji Duncan menggunakan SPSS 25

		TPH					
Sampel		N	Subset				
			1	2	3	4	5
Duncan <sup>a,b</sup>	A1B1	3	2.0000				
	A3B1	3	2.6667	2.6667			
	A2B1	3		4.0000	4.0000		
	A2B3	3		4.0000	4.0000		
	A3B2	3			4.6667	4.6667	
	A1B2	3			5.3333	5.3333	
	A2B2	3				6.0000	
	A1B3	3					8.0000
	A3B3	3					8.6667
		Sig.		0.303	0.058	0.066	0.058

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = .593.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.  
b. Alpha = .05.

**Lampiran 4. Regresi Kepadatan Bakteri (sel/ml) dan TPH (ppm)**

- Uji Regresi menggunakan SPSS 25

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.907 <sup>a</sup>	.823	.811	3.34221

a. Predictors: (Constant), Kepadatan

- Uji ANOVA menggunakan SPSS 25

**ANOVA<sup>a</sup>**

Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	828.347	1	828.347	74.156	.000 <sup>b</sup>
	Residual	178.726	16	11.170		
	Total	1007.073	17			

a. Dependent Variable: TPH

b. Predictors: (Constant), Kepadatan

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-44.598	13.974		-3.192	.006
	Kepadatan	9.302E-8	.000	.907	8.611	.000

a. Dependent Variable: TPH

## Lampiran 5. Regresi pH dan Kepadatan Bakteri (sel/ml)

- Uji Regresi menggunakan SPSS 25

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.788 <sup>a</sup>	.621	.606	5.175

a. Predictors: (Constant), pH

- Uji ANOVA menggunakan SPSS 25

Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1054.331	1	1054.331	39.376	.000 <sup>b</sup>
	Residual	642.631	24	26.776		
Total		1696.962	25			

a. Dependent Variable: Kepadatan

b. Predictors: (Constant), pH

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	55.726	15.223		3.661	.001
	pH	12.774	2.036	.788	6.275	.000

a. Dependent Variable: Kepadatan

**Lampiran 6. Regresi BOD (ppm) dan TPH (ppm)**

- Uji Regresi menggunakan SPSS 25

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.902 <sup>a</sup>	.813	.786	5.23954

a. Predictors: (Constant), BOD

- Uji ANOVA menggunakan SPSS 25

**ANOVA<sup>a</sup>**

Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	835.831	1	835.831	30.446	.001 <sup>b</sup>
	Residual	192.169	7	27.453		
	Total	1028.000	8			

a. Dependent Variable: TPH

b. Predictors: (Constant), BOD

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-83.828	19.018		-4.408	.003
	BOD	16.013	2.902	.902	5.518	.001

a. Dependent Variable: TPH

Lampiran 7. Regresi COD (ppm) dan TPH (ppm)

- Uji Regresi menggunakan SPSS 25

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.888 <sup>a</sup>	.788	.758	5.57894

a. Predictors: (Constant), COD

- Uji ANOVA menggunakan SPSS 25

Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	810.128	1	810.128	26.029	.001 <sup>b</sup>
	Residual	217.872	7	31.125		
	Total	1028.000	8			

a. Dependent Variable: TPH

b. Predictors: (Constant), COD

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-195.983	42.506		-4.611	.002
	COD	24.950	4.890	.888	5.102	.001

a. Dependent Variable: TPH