

Optimasi Pemberian Pupuk Gramafix dalam Degradasi Cemaran Minyak Bumi oleh Bakteri *Indigenous* secara *In Vitro*

Linda Safitri, Agung Suprihadi¹⁾, Endang Kusdiyantini¹⁾, Yeti Darmayati²⁾

¹⁾Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia

²⁾Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Penelitian Oseanografi - LIPI, Jakarta 13340 email: lindha_v22k@yahoo.com

ABSTRAK

Pencemaran minyak bumi berdampak buruk bagi kehidupan di ekosistem laut, khususnya di daerah pesisir. Salah satu metode penanganan masalah pencemaran adalah bioremediasi dengan menggunakan bakteri-bakteri yang mampu mendegradasi dan memanfaatkan hidrokarbon minyak bumi sebagai sumber karbon. Salah satu teknik bioremediasi adalah dengan biostimulasi, yaitu dengan penambahan nutrisi yang dapat meningkatkan proses degradasi minyak bumi oleh bakteri pendegradasi. Nutrisi yang digunakan berupa pupuk lepas lambat, salah satunya adalah pupuk Gramafix. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi pupuk Gramafix yang paling optimal dalam meningkatkan degradasi cemaran minyak bumi oleh bakteri *indigenous*. Empat konsentrasi pupuk Gramafix yang menjadi perlakuan adalah P₁ (0,085 g), P₂ (0,171 g), P₃ (0,341 g), dan P₄ (0,682 g), serta perlakuan kontrol negatif (tanpa pupuk dan bakteri) dan kontrol positif (dengan bakteri, tanpa pupuk). Pengamatan dilakukan sebanyak 4 kali yaitu pada hari ke 0, 7, 14 dan 28. Parameter yang digunakan adalah berat minyak bumi menggunakan metode gravimetri, jumlah total sel bakteri menggunakan metode *Acridine Orange Direct Counting* dan faktor lingkungan berupa kadar nitrogen, kadar fosfor, suhu, oksigen terlarut, pH serta salinitas. Analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji ANOVA dan uji beda *Duncan*. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan P₃ mampu meningkatkan proses degradasi minyak bumi oleh bakteri pendegradasi dengan persentase tertinggi yaitu 65,91% dalam 28 hari inkubasi, selain itu juga memiliki jumlah total sel bakteri lebih banyak dibandingkan perlakuan lainnya. Kesimpulan penelitian ini adalah penambahan pupuk Gramafix 0,341 g paling optimum untuk meningkatkan degradasi minyak bumi oleh bakteri pendegradasi.

Kata Kunci: *Pencemaran, minyak bumi, bioremediasi, biostimulasi, pupuk lepas lambat.*

ABSTRACT

Petroleum pollution has bad impact for life in marine ecosystems, particularly in coastal areas. One method of handling the pollution is bioremediation using bacteria that are able to degrade and utilize petroleum hydrocarbons as carbon source. One technique of bioremediation is biostimulation, that is the addition of nutrients that can improve the process of oil degradation by degrading bacteria. Nutrient slow-release fertilizer are used, one of which is Gramafix. The purpose of this study was to determine the optimal concentration of Gramafix in increasing degradation of petroleum contaminants by *indigenous* bacteria. Four concentrations of Gramafix as treatments are P₁ (0,085 g), P₂ (0,171 g), P₃ (0,341 g) and P₄ (0,682 g), as well as the negative control treatment (no fertilizer and bacteria) and positive control (with bacteria, without fertilizer). Observations were carried out four times, on 0, 7, 14 and 28 days of incubation. The parameters used are heavy oil using the gravimetric method, the total number of bacterial cells using *Acridine Orange Direct Counting* and environmental factors such as nitrogen contents, phosphorus contents, temperature, dissolved oxygen, pH and salinity. Analysis of the data using a completely randomized design (CRD) with ANOVA and *Duncan* test. The results showed the P₃ can improve the process of oil degradation by bacteria that degrade the highest percentage of 65,91% in the 28 days of incubation, it also has more bacterial cells than other treatments. The result of this study is the addition of 0,341 g Gramafix is optimum for enhancing the degradation of petroleum hydrocarbons by degrading bacteria.

Keywords: *Pollution, petroleum, bioremediation, biostimulation, slow-release fertilizer.*

1. Pendahuluan

Minyak bumi merupakan bahan utama energi yang banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Berbagai produk dihasilkan dari olahan minyak bumi, seperti aspal, bahan bakar diesel, bensin, minyak pelumas, dan lain-lain. Kebutuhan akan minyak bumi semakin meningkat seiring dengan meningkatnya kebutuhan manusia. Pesatnya perkembangan di sektor industri minyak tidak hanya memberikan dampak positif berupa peningkatan kesejahteraan rakyat, tetapi juga memberikan dampak negatif berupa pencemaran lingkungan.

Teknologi pengolahan limbah yang saat ini mulai diterapkan adalah metode bioremediasi. Berkembangnya teknologi ini karena teknik penerapannya yang relatif mudah di lapangan dengan biaya operasional yang murah, serta cukup potensial diterapkan di Indonesia. Teknik bioremediasi memiliki dua pendekatan utama dalam pemanfaatan mikroba, yaitu *bioaugmentation* (penambahan mikroba) dan biostimulasi (penambahan nutrisi) (Venosa & Zhu, 2003 dalam Nugroho, 2006). Biostimulasi menurut Barnum (2005) adalah penggunaan nutrisi untuk memacu pertumbuhan dan meningkatkan aktivitas bakteri *indigenous*, sehingga proses degradasi senyawa hidrokarbon minyak bumi semakin meningkat.

Minyak bumi merupakan suatu senyawa kompleks yang terdiri dari berbagai komponen dengan berat molekul yang spesifik. Komponen minyak bumi yang didegradasi ataupun ditransformasi oleh bakteri akan menyebabkan berkurangnya berat minyak. Komponen minyak bumi contohnya adalah hidrokarbon yang terdiri dari unsur karbon dan hidrogen. Unsur karbon dalam rantai hidrokarbon minyak bumi yang didegradasi akan digunakan bakteri sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan (Aske, 2002).

Tumpahan minyak mentah menyebabkan jumlah karbon meningkat, sehingga bakteri *indigenous* akan langsung beradaptasi pada lingkungan tercemar. Bakteri *indigenous* merupakan mikroorganisme pertama yang akan langsung berinteraksi dengan minyak mentah dalam lingkungan tercemar (Tyagi et al., 2011). Bakteri *indigenous* yang mampu mendegradasi hidrokarbon dikenal sebagai bakteri hidrokarbonoklastik (Syakti, 2005).

Tambahan nutrisi diperlukan sebagai stimulan untuk meningkatkan kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon minyak mentah, berupa nitrat dan fosfor. Nutrien merupakan faktor yang berpengaruh besar dalam sintesis dan

pertumbuhan sel serta dalam aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri untuk mendegradasi hidrokarbon (Darmayati et al., 2009).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rosepta (2012) mengenai biostimulasi cemaran minyak bumi di daerah pesisir, beberapa pupuk telah diuji coba sebagai nutrisi tambahan untuk memacu pertumbuhan dan meningkatkan aktivitas bakteri pendegradasi. Hasilnya, pupuk Gramafix mampu meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas bakteri pendegradasi minyak bumi, sehingga proses bioremediasi minyak bumi meningkat. Pupuk Gramafix merupakan jenis pupuk lepas lambat (*slow release fertilizer*) yang sering diaplikasikan pada tanaman hias daun. Unsur hara dalam pupuk Gramafix cukup lengkap dengan komposisi perbandingan N:P:K secara berturut-turut adalah 22:7:11.

Berdasarkan penelitian tersebut, untuk melengkapi informasi tentang bioremediasi dengan teknik biostimulasi menggunakan bahan nutrisi dari pupuk Gramafix, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait optimasi jumlah pupuk Gramafix yang perlu ditambahkan sebagai nutrisi tambahan bagi bakteri *indigenous* pendegradasi minyak mentah. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jumlah pupuk Gramafix yang paling optimal dalam meningkatkan degradasi cemaran minyak bumi oleh bakteri *indigenous* secara *in vitro*.

2. Metode

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Kelautan, Pusat Penelitian Oceanografi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Ancol, Jakarta Utara. Waktu penelitian dilakukan dari bulan Oktober 2013 sampai Maret 2014.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah akuades steril, *deionized water*, air laut steril, alkohol 70% dan 96%, *Acridine Orange*, minyak bumi mentah *Arabian Light Crude Oils* (ALCO), sampel sedimen koleksi LIPI P20 yang berasal dari Nusakambangan Timur Cilacap dan air laut dari pantai Karang Suci Cilacap, pupuk Gramafix®, minyak imersi, sodium fosfor, *Dichloromethane* (DCM), *n-hexane*, *sudan black*, NaOH 3N, larutan oksidasi, membran filter *cellulose acetate Whatmann®*, *Molybdate reagent*, *amino acid reagent*, *NitraVer Nitrate reagent*, syringe filter *cellulose acetate Advantec®*, tisu dan *thypol*.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *falcon tube* 50 ml, erlenmeyer, *hot plate*, magnet stirrer, botol sampel, autoklaf, gelas ukur, mikropipet, mikrotip (5 mL, 1 mL dan 0,1 mL), alumonium foils, timbangan analitik, plate timbangan, baskom, gelas beker, karet gelang, selotip, cawan proselin, membran filter, *vaccum pump*, blender, spatula, tabung ekstraksi, *clean bench*, inkubator shaker, *centrifuge*, HACH DR 2800, gelas preparat, kaca penutup, mikroskop *epiflourescens*, pinset.

2.3 Cara Kerja

a. Pembuatan Mousse Oil

Konsentrasi minyak yang akan diuji harus memenuhi 100.000 ppm, untuk itu harus ditambah *mousse oil*. Pembuatan *mousse oil* dilakukan dengan cara mencampurkan ALCO dan air laut dengan perbandingan 1:3. ALCO sebanyak 50 mL dihomogenkan dengan 50 mL air laut menggunakan blender selama 15 menit, setelah tercampur sempurna kemudian ditambahkan lagi 50 mL air laut dan dihomogenkan kembali dengan blender selama 15 menit. Terakhir, 50 mL air laut ditambahkan kembali dan di-blender selama 15 menit. ALCO dan air yang telah tercampur sempurna menjadi *mousse oil* siap ditambahkan pada sedimen.

b. Pembuatan Medium Uji Degradasi Minyak Bumi

Uji degradasi minyak dilakukan dengan menggunakan *falcon tube* 50 mL steril yang berisi medium dengan komposisi sebagai berikut : 11,25 mL air laut; 10 g sedimen dari pesisir Cilacap; 4,75 g *mousse oil* dan pupuk Gramafix. Pembuatan medium pada *falcon tube* ini dilakukan secara aseptis. Selanjutnya medium diinkubasi dalam *incubator shaker* pada temperatur 30°C dengan kecepatan 100 rpm selama 28 hari. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke 0, 7, 14 dan 28 untuk dilakukan penghitungan terhadap *total petroleum hydrocarbon*, jumlah total sel bakteri, nilai total N dan P, serta kondisi lingkungannya.

c. Pengukuran Degradasi Minyak Bumi

Ekstraksi minyak yang terkandung dalam sampel dilakukan dengan metode gravimetri (Darmayati, 2009). Pelarut yang digunakan adalah

5 mL DCM-hexane dengan perbandingan 1:1. Sampel dikocok dan didiamkan selama 5 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6500 rpm, temperatur 20°C selama 5 menit untuk memisahkan larutan DCM-hexane dengan minyak

dari medium yang semula membentuk dua lapisan. Lapisan minyak berada pada bagian atas dipindahkan ke dalam tabung reaksi baru yang telah diberikan 4 g sodium sulfat (Na_2SO_4) menggunakan pipet *Pasteur*. Sodium sulfat berfungsi untuk menarik lapisan air. Proses penambahan DCM-hexane, pengocokan sampel dan sentrifugasi diulang sampai semua minyak terambil dari medium. Tabung reaksi berisi hasil ekstraksi ditutup dengan *aluminium foil* setelah ekstraksi selesai dan didiamkan selama 24 jam. Hasil ekstraksi kemudian diambil dengan menggunakan pipet *Pasteur* dan dituang ke dalam cawan porselin yang telah diketahui berat kosongnya. Cawan berisi hasil ekstraksi lalu ditimbang, kemudian ditutup dengan *aluminium foil* untuk mencegah masuknya debu dan dibiarkan selama 24 jam. Cawan porselin tersebut ditimbang kembali setelah kering. Selisih berat awal dengan berat akhir merupakan berat total hidrokarbon minyak bumi.

Berat minyak digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri dalam mendegradasi minyak. Menurut Darmayati (2009) dan Umroh (2011), persentase degradasi minyak bumi ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ degradasi minyak} = \frac{S_0 - S_t}{S_0} \times 100\%$$

Keterangan :

S_0 = berat minyak bumi pada 0 hari inkubasi

S_t = berat minyak bumi pada t hari inkubasi

d. Perhitungan Jumlah Total Sel Bakteri

Jumlah total sel dihitung dengan metode *Acridine Orange Direct Count* dengan mikroskop *epiflourescens* (Hobbie et al., 1985 modifikasi oleh Darmayati, 2009). Sebanyak 1 mL medium uji yang mengandung sel bakteri dimasukkan ke dalam 9 mL air laut steril, kemudian ditambahkan 2,29 mL larutan *Acridine Orange*, dibiarkan selama 5 menit. Sampel tersebut dapat disimpan dalam tempat penyimpanan sampel dengan temperatur 4°C untuk pengamatan setelah 24 jam. Pengenceran dilakukan dengan memasukkan 100 μL sampel yang telah ditambahkan larutan *Acridine Orange* ke dalam 900 μL larutan *Acridine Orange* di *microtube*. Sampel kemudian disaring dengan menggunakan filter membran polikarbonat *millipore* berdiameter 25 mm dengan poritas 0,22 μm yang telah direndam larutan *suddan black* dan dibilas dengan akuades saring steril. Filter membran diambil dengan pinset steril, kemudian diletakkan di atas gelas benda yang telah ditetesi akuades saring steril. Akuades saring steril juga ditetaskan pada permukaan filter

membran dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop *epifluorescens* dengan perbesaran 10 x 100.

Perhitungan jumlah total sel dilakukan secara langsung di bawah mikroskop *epifluorescens* pada 10 bidang pandang berbeda, kemudian diolah menggunakan rumus jumlah total sel sebagai berikut (Hobbie *et al.*, 1985 dalam Darmayati, 2009):

$$\text{Total sel} = \left\{ \frac{n \times \left[\frac{71+72}{72} \right] \times T}{V_3 \times A} \right\} \times \text{df}$$

Keterangan :

n : rata-rata jumlah sel dari 10 pidang pandang

V₁: Vol larutan *Acridine orange* (mL)

V₂:Vol sampel dalam larutan *Acridine orange* (mL)

V₃:Volume larutan sampel yang disaring (mL)

T : Konstanta (314)

A: Luas area pandang mikroskop (0,015386 mm²)

df: 1/faktor pengenceran

e. Analisis Kandungan Nitrogen dan Fosfor

Analisis kandungan nitrogen dan fosfor menggunakan metode HACH yang dimodifikasi dengan metode analisis air standar (APHA, 2005). Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan. Alat yang akan digunakan dicuci bersih dengan menggunakan larutan HCl dan dibilas dengan akuades sampai benar-benar bersih. Sampel berbagai perlakuan sebanyak 6 mL disaring menggunakan membran filter selulosa asetat, lalu dimasukkan ke dalam tabung kaca. Sampel kemudian ditambahkan dengan 1,25 mL larutan oksidasi. Langkah berikutnya, sampel dioksidasi dengan autoklave pada suhu 120°C tekanan 1 atm selama 30 menit, kemudian didiamkan selama 5 menit. Larutan NaOH 3 N sebanyak 0,05 mL ditambahkan ke dalam sampel yang telah dioksidasi.

Analisis kandungan nitrogen dilakukan dengan menggunakan alat kolorimeter HACH dan reagen nitratVer. Blanko yang digunakan adalah sampel tanpa penambahan reagen. Sampel yang telah ditambahkan reagen dikocok selama 1 menit, kemudian didiamkan selama 5 menit.

Analisis kandungan fosfor dilakukan dengan menggunakan alat kolorimeter HACH. Blanko yang digunakan adalah sampel tanpa penambahan reagen. Sampel yang telah ditambahkan reagen molybdate dikocok 15 kali, selanjutnya ditambahkan reagen asam amino dan didiamkan selama 10 menit.

Parameter Lingkungan

Kondisi lingkungan yang diukur yaitu pH, suhu, salinitas dan oksigen terlarut. Pengukuran pH dilakukan dengan alat pHmeter, sedangkan pengukuran salinitas dengan refraktometer. Pengukuran oksigen terlarut dan suhu dilakukan dengan menggunakan alat DO meter dan sebelum pemakaian, alat sudah terlebih dahulu dikalibrasi.

Periode pengukuran degradasi minyak seiring dengan pengukuran jumlah total sel bakteri dan parameter lingkungan yaitu pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan 28. Waktu pengukuran degradasi minyak pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan 28 karena disesuaikan dengan pola peningkatan jumlah sel bakteri dan pola penurunan konsentrasi minyak pada penelitian sebelumnya (Darmayati *et al.*, 2008; Darmayati, 2009). Perlakuan yang diujikan

pada penelitian ini merupakan variasi konsentrasi penambahan pupuk yang berdasarkan penelitian Rosepta (2012), yaitu 0,682 g pupuk Gramafix. Berbagai variasi konsentrasi pupuk dari 0,682 g pupuk Gramafix dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan yang diujikan

Kode	Perlakuan
P ₀	10 g sedimen steril + air laut tercemar minyak 100.000 ppm + 0 g pupuk Gramafix
P ₀₊	10 g sedimen + air laut tercemar minyak 100.000 ppm + 0 g pupuk Gramafix
P ₁	10 g sedimen + air laut tercemar minyak 100.000 ppm + 0,085 g pupuk Gramafix
P ₂	10 g sedimen + air laut tercemar minyak 100.000 ppm + 0,171 g pupuk Gramafix
P ₃	10 g sedimen + air laut tercemar minyak 100.000 ppm + 0,341 g pupuk Gramafix
P ₄	10 g sedimen + air laut tercemar minyak 100.000 ppm + 0,682 g pupuk Gramafix

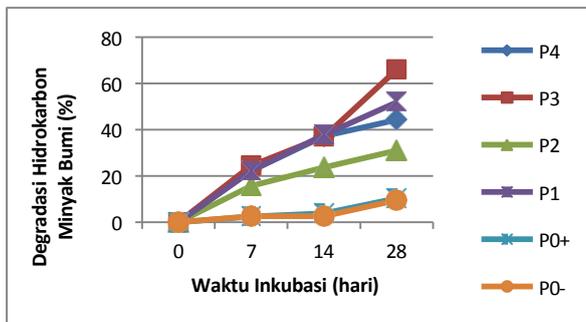
g. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh diuji normalitas dan heterogenitasnya, kemudian dilanjutkan dengan analisis sidik ragam dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui pengaruh perlakuan dengan menggunakan uji *One Way ANOVA*, selanjutnya dilakukan uji beda dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Degradasi Minyak Bumi dan Total Sel Bakteri

Persentase degradasi minyak bumi selama 28 hari inkubasi ditunjukkan pada Gambar 1. Penambahan pupuk lepas lambat Gramafix mampu meningkatkan degradasi minyak pada semua perlakuan.



Gambar 1. Degradasi minyak bumi selama inkubasi 28 hari. P0-= kontrol negatif; P0+= kontrol positif; P1= 0,085 g pupuk Gramafix; P2= 0,171 g pupuk Gramafix, P3= 0,341 g pupuk Gramafix; P4= 0,682 g pupuk Gramafix.

Berdasarkan Gambar 1. terlihat bahwa dalam 28 hari inkubasi, degradasi minyak bumi pada kontrol positif (P₀₊) sebesar 10,3% dan pada kontrol negatif (P₀₋) sebesar 9,5%. Perlakuan dengan teknik biostimulasi, yaitu dengan penambahan pupuk Gramafix berbagai konsentrasi, degradasi minyaknya sebesar 31,03% - 65,91%. Nilai ini lebih besar dibandingkan dengan persentase degradasi pada kontrol. Menurut Padayache & Lin (2011), penambahan pupuk akan mempercepat laju degradasi minyak bumi, karena menjamin ketersediaan nutrisi bagi bakteri *indigenus* dalam memanfaatkan hidrokarbon.

Persentase degradasi minyak bumi yang terjadi pada perlakuan kontrol positif (P₀₊) sebesar 10,33%. Degradasi minyak bumi terjadi pada perlakuan kontrol positif dikarenakan terdapat bakteri *indigenus* di dalam sedimen yang ditambahkan pada medium uji. Bakteri *indigenus* langsung berinteraksi dan memanfaatkan hidrokarbon dalam minyak mentah sesaat setelah terjadi tumpahan minyak (Boufadel et al., 2007).

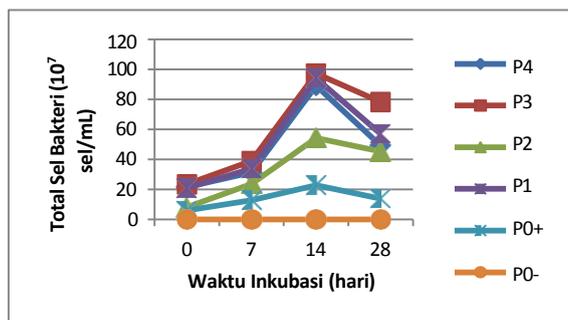
Persentase degradasi minyak bumi pada kontrol positif (P₀₊) lebih rendah dibandingkan perlakuan lainnya yang terdapat bakteri pendegradasi minyak bumi di dalam sedimennya. Hal ini disebabkan karena total sel bakteri pada P₀₊ hanya sebesar $5,9 \times 10^7 - 23 \times 10^7$, lebih rendah bila dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan karena terjadinya ketidakseimbangan nutrisi, yaitu kondisi dimana

jumlah karbon jauh lebih banyak dibanding nutrisi lainnya, seperti nitrogen dan fosfor, sehingga bakteri *indigenus* tidak mampu mendegradasi hidrokarbon minyak bumi secara optimal. Menurut Tyagi et al. (2011), lingkungan tercemar minyak bumi akan menyebabkan jumlah karbon meningkat drastis dan terjadi ketidakseimbangan nutrisi didalamnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase degradasi minyak bumi pada perlakuan kontrol negatif (P₀₋) sebesar 9,54% selama 28 hari inkubasi. Degradasi ini terjadi karena berbagai reaksi fisik-kimia selama masa inkubasi. Sebagian komponen minyak bumi akan mengalami pelarutan dan penguapan selama diinkubasi dengan *rotary shaker*. Menurut Doerffer (1992) dalam Nugroho (2006), senyawa hidrokarbon akan mengalami degradasi secara alamiah karena faktor-faktor lingkungan, meskipun laju degradasinya berlangsung lambat. Proses degradasi tersebut meliputi penguapan, teremulsi dalam air, serta teradsorpsi pada partikel padat. Suhu juga dapat menyebabkan terjadi penguapan hidrokarbon, terutama senyawa berberat molekul rendah yang biasanya bersifat toksik.

Persentase degradasi P₀₊ yang hampir sama dengan persentase degradasi P₀₋ diduga disebabkan karena bakteri pendegradasi di dalam perlakuan P₀₊ belum optimal dalam mendegradasi hidrokarbon. Nutrisi dalam perlakuan P₀₊ hanya tersedia dalam jumlah terbatas yang berasal dari sedimen dan air laut, sehingga bakteri memerlukan waktu yang lebih lama untuk mendegradasi minyak bumi secara alami tanpa adanya tambahan nutrisi dari pupuk.

Persentase degradasi minyak bumi pada berbagai perlakuan menunjukkan bahwa persentase degradasi tertinggi selama 28 hari inkubasi terdapat pada perlakuan P₃. Tingginya degradasi pada perlakuan P₃ didukung dengan kepadatan total sel bakteri. Kepadatan total sel bakteri pada perlakuan P₃ menunjukkan rata-rata tertinggi dibandingkan perlakuan lain, yaitu kisaran $2,3 \times 10^8 - 9,7 \times 10^8$ sel/mL (Gambar 2). Penelitian yang dilakukan oleh Kostka et al. (2011) menunjukkan bahwa tingginya degradasi hidrokarbon diiringi dengan tingginya kepadatan total sel bakteri.



Gambar 2. Jumlah total sel bakteri selama waktu inkubasi 28 hari. P0- = kontrol negatif; P0+ = kontrol positif; P1 = 0,085 g pupuk Gramafix; P2 = 0,171 g pupuk Gramafix, P3 = 0,341 g pupuk Gramafix; P4 = 0,682 g pupuk Gramafix.

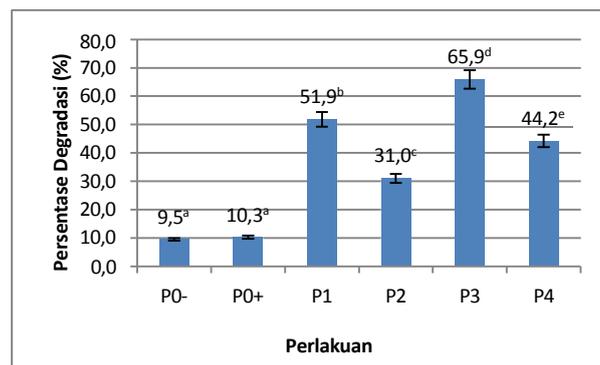
Bakteri merupakan salah satu agen yang berperan penting dalam bioremediasi. Hasil penelitian Pagoray (2009) menunjukkan bahwa peran bakteri sangat membantu untuk mempercepat proses biodegradasi hidrokarbon. Berdasarkan hasil penelitian, penambahan pupuk telah terbukti mampu meningkatkan jumlah total sel bakteri. Kepadatan total sel bakteri selama 28 hari inkubasi pada perlakuan dengan penambahan nutrisi dari pupuk Gramafix menunjukkan nilai rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan pupuk (kontrol).

Jumlah total sel bakteri (Gambar 2) menunjukkan penurunan pada hari ke-28, hal ini diduga karena semakin sedikit senyawa hidrokarbon yang tersisa pada medium uji, maka sumber makanan bagi bakteri juga berkurang, sehingga kemungkinan adanya kompetisi antar bakteri dapat terjadi.

Penurunan total sel bakteri pada hari ke-28 juga diduga karena terdapat beberapa senyawa yang sulit didegradasi oleh bakteri yang terkandung dalam minyak mentah, sehingga beberapa bakteri yang tidak mampu mendegradasi senyawa tersebut akan mati. Bakteri membutuhkan proses adaptasi untuk merombak senyawa hidrokarbon yang sulit didegradasi atau disebut senyawa rekalsitran, yaitu berupa senyawa benzena, toluena, etilbenzena, dan isomer xylene (BTEX). Hanya dengan proses diagenesis yang lambat, yang meliputi penyesuaian genetik (pembentukan plasmid) dan sintesis enzim, bakteri dapat mendegradasi senyawa rekalsitran (Nugroho, 2006).

Analisis data persentase degradasi selama 28 hari inkubasi dengan uji ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan penambahan pupuk memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai degradasi (sig. < 0,05). Uji beda Duncan menunjukkan bahwa nilai degradasi antara perlakuan P₁, P₂, P₃

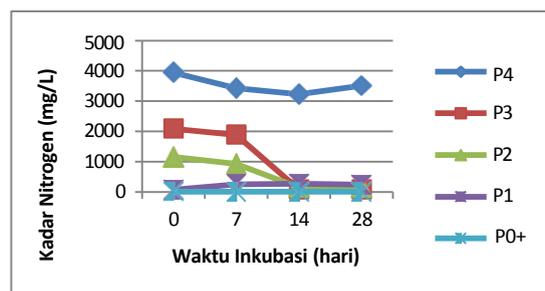
dan P₄ saling berbeda nyata, sedangkan perlakuan P₀₋ dan P₀₊ berbeda tidak nyata (Gambar 3).



Gambar 3. Persentase degradasi minyak bumi selama 28 hari inkubasi. Huruf yang sama pada persentase degradasi menunjukkan berbeda tidak nyata. P0- = kontrol negatif; P0+ = kontrol positif; P1 = 0,085 g pupuk Gramafix; P2 = 0,171 g pupuk Gramafix, P3 = 0,341 g pupuk Gramafix; P4 = 0,682 g pupuk Gramafix.

3.2 Faktor Lingkungan

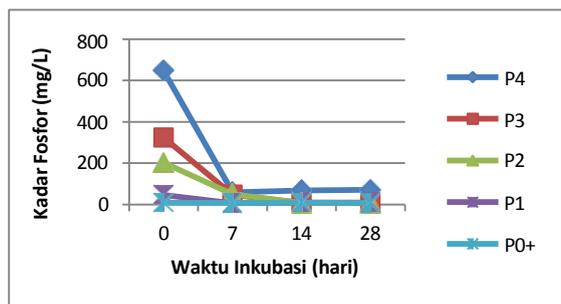
Kadar nitrogen selama 28 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kadar nitrogen seluruh perlakuan selama waktu inkubasi 28 hari.

Kadar nitrogen pada perlakuan P₃ menunjukkan adanya penurunan yang paling besar. Penurunan ini menunjukkan bahwa nitrogen dimanfaatkan oleh bakteri *indigenus* dalam aktivitasnya mendegradasi senyawa hidrokarbon, sehingga penurunan kadar nitrogen ini sesuai dengan jumlah total sel bakteri dan persentase degradasi minyak bumi pada perlakuan P₃, yakni paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya.

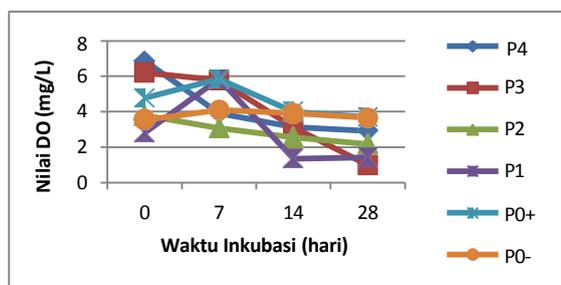
Nutrisi penting lain yang dibutuhkan oleh bakteri selain karbon dan nitrogen adalah fosfor. Karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya, sedangkan nitrogen dan fosfor merupakan penyusun senyawa-senyawa penting dalam sel yang menentukan aktivitas pertumbuhan bakteri (Darmayati et al., 2009). Kadar fosfor selama 28 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Kadar fosfor seluruh perlakuan selama waktu inkubasi 28 hari.

Kadar fosfor yang diperoleh selama 28 hari inkubasi secara umum mengalami penurunan. Kadar fosfor pada perlakuan P₃ menunjukkan penurunan di setiap hari pengamatan. Penurunan nilai total fosfor ini menunjukkan bahwa bakteri juga mengonsumsi fosfor sebagai unsur penting dalam pertumbuhan dan metabolisme selnya meskipun dalam jumlah yang lebih sedikit dibanding nitrogen. Menurut Baker & Herson (1994 dalam Umroh, 2011), fosfor merupakan komponen utama asam nukleat dan lemak membran sel (fosfolipid) yang berperan dalam proses pemindahan energi secara biologi dan pembentukan asam amino.

Sathiskumar *et al.* (2008) menyebutkan bahwa oksigen terlarut dibutuhkan bakteri untuk mendegradasi minyak bumi. Nilai oksigen terlarut selama 28 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 6.

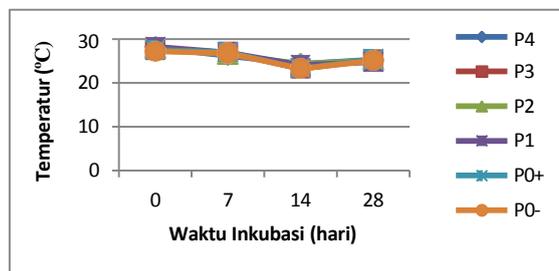


Gambar 6. Nilai oksigen terlarut seluruh perlakuan selama waktu inkubasi 28 hari.

Nilai oksigen terlarut pada perlakuan P₃ selama 28 hari inkubasi menunjukkan pola penurunan yang sangat drastis sehingga nilai oksigen terlarut pada perlakuan P₃ lebih rendah dibanding perlakuan lainnya. Rendahnya nilai oksigen terlarut ini diduga disebabkan oleh aktivitas bakteri yang tinggi dalam mendegradasi minyak bumi. Hal ini menunjukkan bahwa oksigen sangat berperan untuk kelangsungan hidup bakteri.

Faktor lingkungan lain yang penting dalam biodegradasi adalah suhu, walaupun degradasi

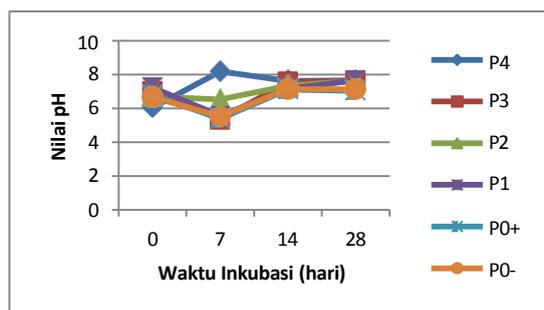
hidrokarbon terjadi pada rentang suhu yang cukup luas (Atlas & Bartha, 1992 dalam Rosepta, 2012). Suhu yang terlalu rendah dan terlalu tinggi akan menghambat proses metabolisme bakteri. Suhu selama inkubasi terdapat pada Gambar 7.



Gambar 7. Nilai temperatur seluruh perlakuan selama waktu inkubasi 28 hari.

Suhu berbagai perlakuan selama 28 hari inkubasi berkisar antara 23,3 - 28,2 °C. Nilai tersebut masih dalam kisaran suhu yang sesuai untuk kehidupan bakteri dalam proses mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Menurut Atlas & Bartha (1998), kisaran suhu yang dapat ditolerir oleh bakteri adalah 10°C sampai 45°C. Sathiskumar *et al.* (2008) menyebutkan bahwa pada suhu 30°C bakteri pendegradasi hidrokarbon dapat berkembang dengan baik dan pada 35°C merupakan kondisi optimum dalam proses biodegradasi.

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi proses bioremediasi. Perubahan nilai pH dapat mempengaruhi kepadatan total sel bakteri dan laju biodegradasi. Nilai pH selama 28 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 8.

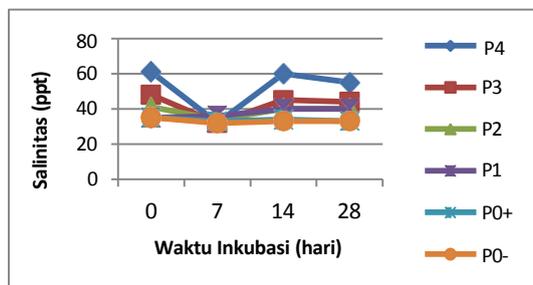


Gambar 8. Nilai pH selama waktu inkubasi 28 hari.

Nilai pH pada berbagai perlakuan dari hari ke 0 - 28 berkisar antara 5,33 – 8,19. Nilai pH yang optimum dalam proses biodegradasi minyak berkisar antara 6,5 – 8 (Atlas & Bartha, 1992 dalam Zhu *et al.*, 2001). Nilai pH pada perlakuan P₃ yang memiliki nilai degradasi tertinggi, berkisar antara 5,33 - 7,63. Nilai ini masih dalam rentang nilai pH yang sesuai untuk aktivitas

bakteri, sehingga tidak menghambat aktivitas bakteri dalam mendegradasi minyak bumi.

Salinitas merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi laju degradasi minyak bumi oleh bakteri. Nilai salinitas selama 28 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Nilai salinitas seluruh perlakuan selama waktu inkubasi 28 hari.

Nilai salinitas seluruh perlakuan selama 28 hari inkubasi berkisar antara 32 – 61 ppt. Tingginya salinitas pada tiap perlakuan disebabkan karena kandungan unsur hara yang dimiliki pupuk Gramafix. Perlakuan P₄ yang memiliki nilai salinitas tertinggi disebabkan karena jumlah pupuk yang ditambahkan lebih banyak dibandingkan perlakuan lainnya. Tingginya nilai salinitas tidak terlalu berpengaruh dalam degradasi minyak bumi, dilihat dari hasil akhir pada perlakuan P₄ yang mengalami degradasi hingga 44,2% selama 28 hari inkubasi. Penelitian yang dilakukan oleh Rosepta (2012) menunjukkan hal yang sama, yakni dengan kondisi salinitas yang mencapai 62 ppt, bakteri pendegradasi masih mampu mendegradasi minyak hingga 55,40%. Nilai salinitas pada perlakuan P₃ berkisar antara 32 – 48 ppt. Nilai salinitas tersebut masih sesuai bagi bakteri pendegradasi untuk melakukan aktivitas degradasi minyak bumi.

4. Kesimpulan

Perlakuan P₃ dengan penambahan pupuk Gramafix sebesar 0,341 g memiliki nilai persentase degradasi yang paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Persentase degradasi minyak bumi pada perlakuan P₃ paling besar daripada perlakuan P₁, P₂ dan P₄ selama 28 hari inkubasi, yakni sebesar 65,91%. Perlakuan P₃ juga memiliki jumlah total sel bakteri lebih banyak, sehingga perlakuan P₃ paling optimum untuk aplikasi bioremediasi dengan teknik biostimulasi terhadap cemaran minyak bumi secara *in vitro*.

Daftar Pustaka

- Aske, N. 2002. Characterisation of Crude Oil Components, Asphaltene Aggregation and Emulsion Stability by means of Near Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Thesis*. Norwegian University of Science and Technology, Norwegia.
- Atlas R.M. & R. Bartha. 1992. Hydrocarbon Biodegradation and Oil spill Bioremediation. *Adv. Microbial Ecol.* 12: 287-338.
- Baker K.H. & D.S. Herson. 1994. Bioremediation. Mc. Graw-Hill Inc, New York.
- Barnum, S. 2005. Biotechnology: An Introduction, 2nd Edition. Miami University Thomson Brooks/Cole, United States.
- Boufadel, M.C., M.T. Suidan & A.D. Venosa. 2007. Tracer Studies in a Laboratory Beach Subjected to Waves. *J. Environ. Eng.* 133 (7): 722-732.
- Darmayati, Y. 2009. Pemanfaatan Bakteri Laut dalam Bioremediasi Ekosistem Pantai Berpasir Tercemar Minyak : Uji Coba Biostimulasi, Bioaugmentasi, dan Kombinasinya dalam Skala Laboratorium dan Demplot. *Laporan Akhir*. Pusat Penelitian Oseanografi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta.
- Darmayati, Y., S. Harayama, A. Yamazoe, A. Hatmanti, Sulistianti, R. Nuchsin & D.H. Kurnarso. 2008. Hydrocarbonoclastic Bacteria From Jakarta Bay And Seribu Islands. *Marine Res. Indonesia* 1(33): 55-64.
- Doerffer, J.W. 1992. Oil Spill Response in the Marine Environment, 1st Ed. Pergamon Press, Tokyo.
- Kostka, J.E., O. Prakash, W.A. Overholt, S.J. Green, G. Freyer & A.Canion. 2011. Hydrocarbon-degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deep Water Horizon Oil Spill. *Appl. Environ. Microb.* 77(22): 7962–7974.
- Nugroho, A. 2006. Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Pagoray, H. 2009. Biostimulasi dan Bioaugmentasi untuk Bioremediasi Limbah Hidrokarbon serta Analisis Berkelanjutan. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Rosepta, B.F. 2012. Pengaruh Jenis Pupuk Lepas Lambat terhadap Kemampuan Bakteri *Indigenous* mendegradasi Hidrokarbon Minyak Mentah Pada Sedimen Tercemar. *Skripsi*. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.

- Sathishkumar, M., A.R. Binupriya, S.H. Baik & S.E. Yun. 2008. Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. *Clean Soil Air Water* 36: 92–96.
- Syakti, D.A. 2005. Multi Proses Remediasi di dalam Penanganan Tumpahan Minyak (*Oil Spill*) di Perairan Laut dan Pesisir. *Seminar Bioremediasi*. Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman.
- Tyagi, M., M. Manuela, C. Fonseca & R. Carvalhos. 2011. Bioaugmentation and Biostimulation Strategies to Improves the Effectiveness of Bioremediation Process. *Biodegrad.*22: 231-241.
- Umroh. 2011. Bioremediasi Pencemaran Minyak Di Sedimen Pantai Balongan, Indramayu dengan Menggunakan Bakteri *Alcanivorax sp.* Te-9 Skala Laboratorium. *Akuatik, J. Sumberdaya Perairan* 5(2): 23-31.
- Venosa, A.D. & X. Zhu. 2003. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. *Spill Sci.& Technol. Bull.* 8(2): 163–178.
- Zhu, X., A.D. Venosa, M.T. Suidan & K. Lee. 2001. Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.