

**EFEKTIVITAS KOMBINASI BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DENGAN
SAPONIN *Sapindus rarak* DALAM MENURUNKAN KADAR TOTAL PETROLEUM
HIDROKARBON**

TESIS

oleh
EVI OCTAVIANY
176090100111011



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019



**EFEKTIVITAS KOMBINASI BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DENGAN
SAPONIN *Sapindus rarak* DALAM MENURUNKAN KADAR TOTAL PETROLEUM
HIDROKARBON**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

oleh

EVI OCTAVIANY

176090100111011



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019





HALAMAN PENGESAHAN TESIS
EFEKTIVITAS KOMBINASI BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DENGAN
SAPONIN *Sapindus rarak* DALAM MENURUNKAN KADAR TOTAL PETROLEUM
HIDROKARBON

EVI OCTAVIANY
176090100111011

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 19 Juni 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

Irfan Mustafa, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP 197812312008011021

Dr. Suharjono, MS
NIP 196302231988021001

Mengetahui
Ketua Program Studi Magister Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Nia Kurniawan, S.Si, MP., D.Sc
NIP 197810252003121002

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

EFEKTIVITAS KOMBINASI BAKTERI HIDROKARBONOKLASTIK DENGAN SAPONIN *Sapindus rarak* DALAM MENURUNKAN KADAR TOTAL PETROLEUM HIDROKARBON

Nama : Evi Octaviany

NIM : 176090100111011

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Irfan Mustafa, S.Si., M.Si., Ph.D

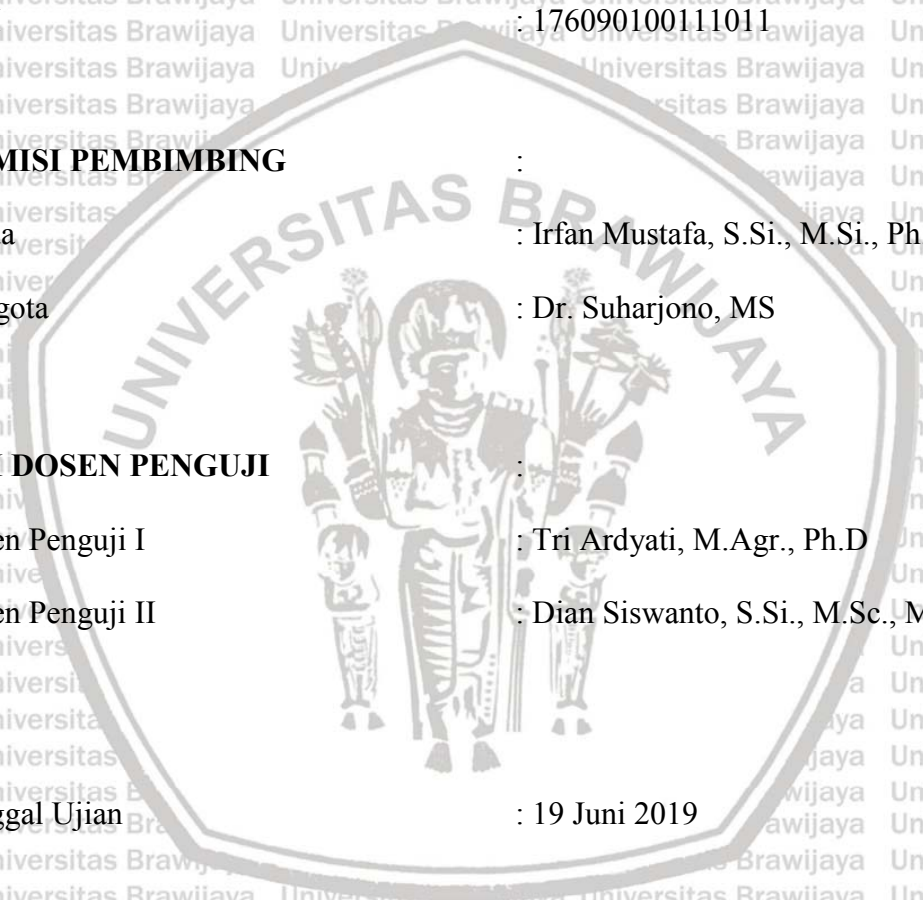
Anggota : Dr. Suharjono, MS

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji I : Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D

Dosen Penguji II : Dian Siswanto, S.Si., M.Sc., M.Si., Ph.D

Tanggal Ujian : 19 Juni 2019



HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 19 Juni 2019

Materai

Nama : Evi Octaviany

NIM : 176090100111011

RIWAYAT HIDUP

Evi Octaviany lahir di Kota Tarakan pada tanggal 01 Oktober 1995, merupakan anak dari Bapak Sumari dan Ibu Siti Maimunah. Pendidikan SD sampai dengan SMA diselesaikan di Kota Tarakan. Setelah lulus SMA tahun 2009, pendidikan yang ditempuh selanjutnya yaitu studi Sarjana di Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Muhammadiyah Malang mulai tahun 2013 dan lulus pada tahun 2017. Lulus dari studi Sarjana, dilanjutkan ke jenjang Magister di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang mulai tahun 2017 dan menyelesaikan studi pada tahun 2019 dengan tugas akhir berjudul “Efektivitas Kombinasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dengan Saponin *Sapindus rarak* dalam Menurunkan Kadar Total Petroleum Hidrokarbon”. Pengalaman kerja selama jenjang studi Sarjana yaitu sebagai Sekretaris di Kantor Pusat Pengembangan Bioteknologi di Universitas Muhammadiyah Malang pada tahun 2016-2018.

Malang, 19 Juni 2019

Penulis



PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



RINGKASAN

Efektivitas Kombinasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dengan Saponin *Sapindus rarak* dalam Menurunkan Kadar Total Petroleum Hidrokarbon

Evi Octaviany, Irfan Mustafa, Suharjono

Program Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya

2019

Surfaktan memiliki peran penting dalam meningkatkan biodegradasi minyak bumi. Salah satu surfaktan alami yang jarang dieksplorasi dalam membantu biodegradasi limbah minyak bumi adalah saponin. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis pengaruh kombinasi saponin komersial dari tanaman *Sapindus rarak* dengan bakteri hidrokarbonoklastik terisolasi dalam menurunkan kadar total petroleum hidrokarbon.

Bakteri hidrokarbonoklastik diisolasi dari sampel tanah tercemar minyak bumi di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur, dengan metode *enrichment* dalam medium *Bushnell-Haas broth* dengan konsentrasi minyak bumi 0,5 %. Isolat bakteri yang diperoleh diseleksi dengan dua tahap. Tahap pertama, isolat diinokulasikan dalam medium *nutrient broth* yang mengandung saponin 0 %, 8 %, dan 12 % untuk memperoleh isolat bakteri yang toleran terhadap saponin. Tahap kedua, isolat diinokulasikan ke dalam medium *Bushnell-Haas broth* yang mengandung saponin 0,5 % untuk memperoleh isolat bakteri yang tidak dapat mendegradasi saponin. Isolat yang lolos seleksi dibuat kurva pertumbuhannya dalam medium *Bushnell-Haas broth* dengan konsentrasi minyak bumi 0,5 % dan dipilih berdasarkan laju pertumbuhan tercepat. Isolat terpilih digunakan pada uji biodegradasi minyak bumi 0,5 % dalam medium *Bushnell-Haas broth* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan perlakuan keberadaan isolat terpilih dan saponin 0,5 %. Penurunan total petroleum hidrokarbon (TPH) minyak bumi dihitung berdasarkan kandungan TPH dengan metode gravimetri. Data TPH dianalisis ragam ANOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf α 0,05. Bakteri unggul diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA dan dikonstruksikan dalam bentuk pohon filogeni.

Bakteri sebanyak 34 isolat telah diisolasi dan dimurnikan dari tanah tercemar minyak bumi. Hasil seleksi tahap pertama, mendapatkan sembilan isolat yaitu IHT1.3, IHT1.5, IHT3.8, IHT3.14, IHT3.17, IHT3.19, IHT3.20, IHT3.23, dan IHT3.24 yang memiliki toleransi tinggi terhadap saponin 12 %. Berdasarkan hasil seleksi tahap berikutnya, tiga dari sembilan isolat tersebut (IHT1.3, IHT1.5, dan IHT3.24) tidak memiliki aktivitas degradasi saponin konsentrasi 0,5 %. Ketiga isolat bakteri tersebut dianalisis kurva pertumbuhannya. Isolat IHT3.24 memiliki laju pertumbuhan paling cepat sehingga digunakan pada uji berikutnya.

Perlakuan kombinasi isolat IHT3.24 dan saponin mampu menurunkan TPH minyak bumi sebesar 38 % setelah inkubasi 30 hari. Nilai ini lebih tinggi daripada nilai perlakuan yang hanya diberi bakteri yaitu sebesar 20 %. Data ini menunjukkan bahwa kombinasi bakteri dan saponin lebih efektif dalam mendegradasi minyak bumi dibandingkan dengan

degradasi minyak bumi oleh bakteri tanpa pemberian saponin. Isolat bakteri IHT1.3, IHT1.5, dan IHT3.24 berdasarkan sekuen 16S rDNA secara berurutan teridentifikasi sebagai *Ochrobactrum pseudogrignonense* (99,6 %), *Pseudomonas mendocina* (99,2 %), dan *Ochrobactrum pituitosum* (97,8 %).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan saponin *Sapindus rarak* lebih efektif meningkatkan kemampuan bakteri hidrokarbonoklastik dalam mendegradasi minyak bumi dari Desa Wonocolo hingga dua kali lipat dibanding bakteri tanpa pemberian saponin. Saponin sebagaimana surfaktan diketahui mampu mensolubilisasi minyak bumi sehingga bakteri dapat lebih cepat menyerap substrat tersebut. Kombinasi tersebut dapat dikembangkan sebagai agen bioremediasi ekosistem tercemar minyak bumi.



SUMMARY

Effectiveness of Combination of Hydrocarbonoclastic Bacterium with *Sapindus rarak* Saponin in Reducing Total Petroleum Hydrocarbon Level

Evi Octaviany, Irfan Mustafa, Suharjono

Biology Master Program, Biology Department, Mathematics and Natural Sciences Faculty,
Brawijaya University

2019

Surfactants have an important role in enhancing the biodegradation of petroleum. A natural surfactant that is rarely explored in helping biodegradation of petroleum waste is saponins. The purpose of this research is to understand the effect of combining saponin from *Sapindus rarak* plant with isolated hydrocarbonoclastic bacterium in decreasing the level of total petroleum hydrocarbons.

Hydrocarbonoclastic bacteria were isolated from crude-oil contaminated soil at Wonocolo Village, Bojonegoro Regency, East Java Province. Bacteria were isolated using enrichment culture method with three consecutive stages in Bushnell-Haas broth medium containing 0.5 % crude oil. Isolated bacteria were screened within two stages. The first stage, isolates were inoculated into nutrient broth medium containing 0 %, 8 %, and 12 % saponin to obtain saponin-tolerant isolates. The second stage, isolates were inoculated into Bushnell-Haas broth medium containing 0.5 % saponin to obtain isolates incapable of degrading saponin. The isolates that passed the screening were made their growth curves in Bushnell-Haas broth medium with 0.5 % crude oil and selected according to the fastest growth rate. Selected isolate was used in biodegradation test of 0.5 % crude oil in Bushnell-Haas broth medium. The test was done with factorial Complete Random Design with two treatments, i.e. existence of isolated bacterium and 0.5 % saponin. Reduction of crude-oil total petroleum hydrocarbons (TPH) was calculated based on the level of TPH. Data of TPH were statistically analyzed using Analysis of Variance at the level of α 0.05. Superior bacteria were identified based on 16S rDNA sequences and constructed in the form of phylogeny trees.

Thirty-four bacterial isolates were obtained from the crude-oil contaminated soil. Nine isolates (IHT1.3, IHT1.5, IHT3.8, IHT3.14, IHT3.17, IHT3.19, IHT3.20, IHT3.23, and IHT3.24) were highly tolerance to 12 % saponins. Among them, three isolates (IHT1.3, IHT1.5, and IHT3.24) were unable to degrade saponin at a concentration of 0.5 %. Growth curves of those isolates were analyzed. Isolate IHT3.24 showed the fastest growth rate so that it was used on the next test.

A treatment that combining isolate IHT3.24 and saponin showed 38 % reduction of crude oil TPH within 30 days. The value was higher than that used the isolate without addition of saponin that was 20 %. This data demonstrated that a combination of a bacterium and saponin was more effective in degrading crude oil than a bacterium it self without saponin. Isolates of IHT1.3, IHT1.5, and IHT3.24 were identified as *Ochrobactrum pseudogrignonense* (99,6 %), *Pseudomonas mendocina* (99,2 %), and *Ochrobactrum pituitosum* (97,8 %), respectively.

The result of this experiment indicated that addition of *Sapindus rarak* saponin improved the ability of a hydrocarbonoclastic bacterium in degradation of crude oil twice as much as the bacterium without saponin. Saponins as surfactant act as crude-oil solubilizing agents so that the bacterium can uptake crude oil faster.



KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat, karunia, serta hidayah-Nya, sehingga tugas akhir yang berjudul “Efektivitas Kombinasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dengan Saponin *Sapindus rarak* dalam Menurunkan Kadar Total Petroleum Hidrokarbon” dapat diselesaikan dengan baik. Tugas akhir ini dapat diselesaikan berkat bimbingan, bantuan dan motivasi dari banyak pihak. Oleh karena itu, dengan ketulusan hati dihanturkan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Dosen pembimbing I Bapak Irfan Mustafa, S.Si., M.Si., Ph.D yang telah menyediakan waktu, mendampingi, dan memberi pengarahan dan saran-saran selama proses pembuatan tesis dari awal hingga selesai.
2. Dosen Pembimbing II Bapak Dr. Suharjono, MS yang telah menyediakan waktu, mendampingi, dan memberi pengarahan dan saran-saran.
3. Ibu Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D dan Bapak Dian Siswanto, S.Si., M.Sc., M.Si., Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan tesis.
4. Sumari sebagai ayah dan Siti Maimunah sebagai Ibu, terimakasih atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak terkira selama ini.
5. Dewi Febriana, Finda Ayu Nopita, Siti Nur Fatkurrohmah, dan Kurnia Wahyu Mubaidillah keempat saudara kandung yang selalu memberi motivasi dan masukan dalam menyelesaikan tesis ini.
6. Ibu Dra. Nanik Dwirahayu sebagai laboran di Laboratorium Mikrobiologi yang sangat membantu dalam peminjaman alat dan media serta selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan tesis ini.
7. Alifia Isabella, Moh. Dliyaudin, dan Rubiyatna Sakaroni sebagai sahabat yang telah menemani, memberikan saran dan masukan, serta membantu dalam menyelesaikan tesis ini.
8. Anggota *Working Group Mikrobiologi* atau Laboratorium Mikrobiologi yang tidak dapat disebutkan namanya, yang telah membantu dan memberikan banyak masukan.
9. Segenap dosen dan staf pengajar di Jurusan Biologi FMIPA UB yang telah memberikan bantuan dan bimbingan.
10. Dinas Pendidikan Kalimantan Utara yang telah membantu pembiayaan dalam penelitian tesis ini.
11. Semua pihak yang tidak mungkin disebutkan satu-persatu yang telah terlibat banyak membantu sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Semoga tesis ini bermanfaat bagi semua pihak yang berkepentingan. Kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan tesis ini lebih sempurna lagi.

Malang, 19 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiviii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Pengertian dan Karakter Minyak Bumi	4
2.2 Pencemaran Tanah oleh Minyak Bumi	6
2.3 Mikroorganisme Pendegradasi Hidrokarbon	6
2.4 Mekanisme <i>Uptake</i> dan Biodegradasi Hidrokarbon oleh Bakteri	8
2.5 Peran Surfaktan dalam Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi	11
2.6 <i>Sapindus rarak</i> Penghasil Surfaktan Saponin	12
2.7 Faktor Pembatas Biodegradasi Hidrokarbon	13
2.8 Kerangka Konsep	15
BAB III. METODE PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Kerangka Operasional	17
3.3 Pengambilan dan Pengukuran Parameter Fisiko-Kimiawi Tanah	18
3.4 Isolasi dan Purifikasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon	20
3.5 Pengukuran Kadar CMC Saponin <i>Sapindus rarak</i>	21
3.6 Seleksi Bakteri Toleran terhadap Saponin dan Tidak Mendegradasi Saponin	21
3.7 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Hidrokarbonoklastik	22
3.8 Uji Biodegradasi Minyak Bumi dengan Kandidat dengan Kombinasi Saponin dan Bakteri Terpilih	23
3.9 Identifikasi Bakteri Berdasarkan Sekuen 16S rDNA	24
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Pengukuran Fisiko-Kimiawi Tanah Penambangan di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro	27
4.2 Isolat Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Lokasi Penambangan Minyak Bumi	27

Tradisional di Wonocolo	28
4.3 Nilai CMC (<i>Critical Micelle Concentration</i>) Berdasarkan Tegangan Antarmuka air	28
4.4 Isolat Bakteri Hidrokarbon yang Mampu Bersinergi dengan Saponin	29
4.5 Pola Pertumbuhan Bakteri Hidrokarbonoklastik Terpilih	34
4.6 Penurunan Total Petroleum Hidrokarbon oleh Saponin dan IHT3.24	35
4.7 Identifikasi Bakteri Berdasarkan Sekuen 16S rDNA	37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	48



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Kandungan dan komposisi minyak bumi	4
2.	Komposisi masing-masing perlakuan biodegradasi hidrokarbon	23
3.	Komposisi <i>Polymerase Chain Reaction</i>	26
4.	Faktor fisiko-kimiawi tanah dari lokasi pengambilan sampel	27

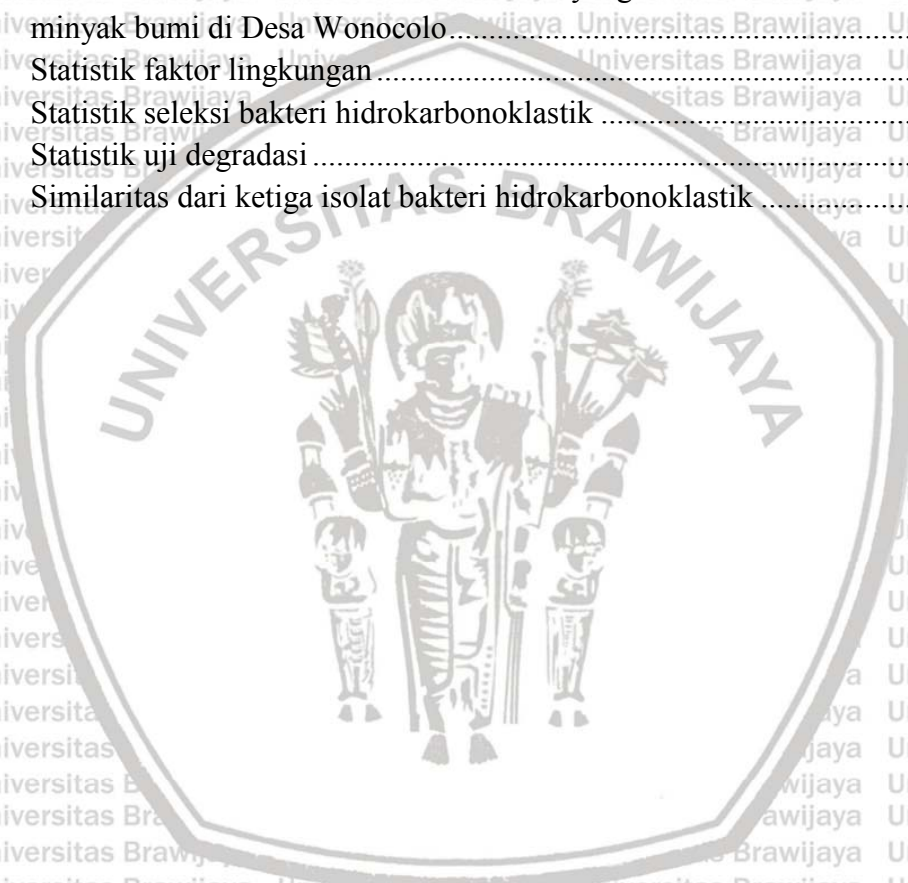


DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Struktur parafin	5
2.	Struktur naphthene	5
3.	Struktur benzene (a); naphthalene (b); phenantherene (c)	5
4.	Reaksi degradasi hidrokarbon alifatik	9
5.	Kerangka konsep penelitian	16
6.	Kerangka operasional penelitian	18
7.	Lokasi pengambilan sampel tanah dari Desa Wonocolo, Kecamatan Kedawen, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur	20
8.	Pengaruh berbagai konsentrasi saponin terhadap tegangan antarmuka air	29
9.	Densitas sel dari bakteri hidrokarbonoklastik dalam medium <i>nutrient broth</i> dengan penambahan saponin pada hari pertama	30
10.	Densitas sel dari bakteri hidrokarbonoklastik dalam medium <i>nutrient broth</i> dengan penambahan saponin pada hari kedua	31
11.	Densitas sel dari bakteri hidrokarbonoklastik dalam medium <i>nutrient broth</i> dengan penambahan saponin pada hari ketiga	32
12.	Densitas sel dari bakteri hidrokarbonoklastik dalam medium <i>Bushnell-Haas broth</i> dengan konsentrasi 0,5 % saponin	34
13.	Degradasi minyak bumi dalam medium <i>Bushnell-Haas broth</i> konsentrasi minyak bumi 0,5 % pada masing-masing perlakuan dan kontrol	36
14.	Pohon filogeni isolat IHT1.3 dengan isolat acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA menurut algoritma <i>Neighbor-Joining</i> dan model <i>Tamura-Nei</i>	38
15.	Pohon filogeni isolat IHT1.5 dengan isolat acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA menurut algoritma <i>Neighbor-Joining</i> dan model <i>Tamura-Nei</i>	39
16.	Pohon filogeni isolat IHT3.24 dengan isolat acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA menurut algoritma <i>Neighbor-Joining</i> dan model <i>Tamura-Nei</i>	39

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
LG1.	Kurva standar bakteri hidrokarbonoklastik	48
LG2.	Kurva pertumbuhan bakteri hidrokarbonoklastik	49
LG3.	Pita 16S rDNA bakteri hidrokarbonoklastik	49
LG4.	Isolasi bakteri hidrokarbonoklastik dari tanah tercemar minyak bumi	50
LG5.	Seleksi bakteri hidrokarbonoklastik	51
LG6.	Pengukuran CMC	52
LG7.	Pengecatan gram ketiga isolat bakteri terpilih	52
LG8.	Uji kadar TPH	53
LT1.	Karakteristik makro dan mikro bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak bumi di Desa Wonocolo	54
LT2.	Statistik faktor lingkungan	55
LT3.	Statistik seleksi bakteri hidrokarbonoklastik	57
LT4.	Statistik uji degradasi	63
LT5.	Similaritas dari ketiga isolat bakteri hidrokarbonoklastik	64



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

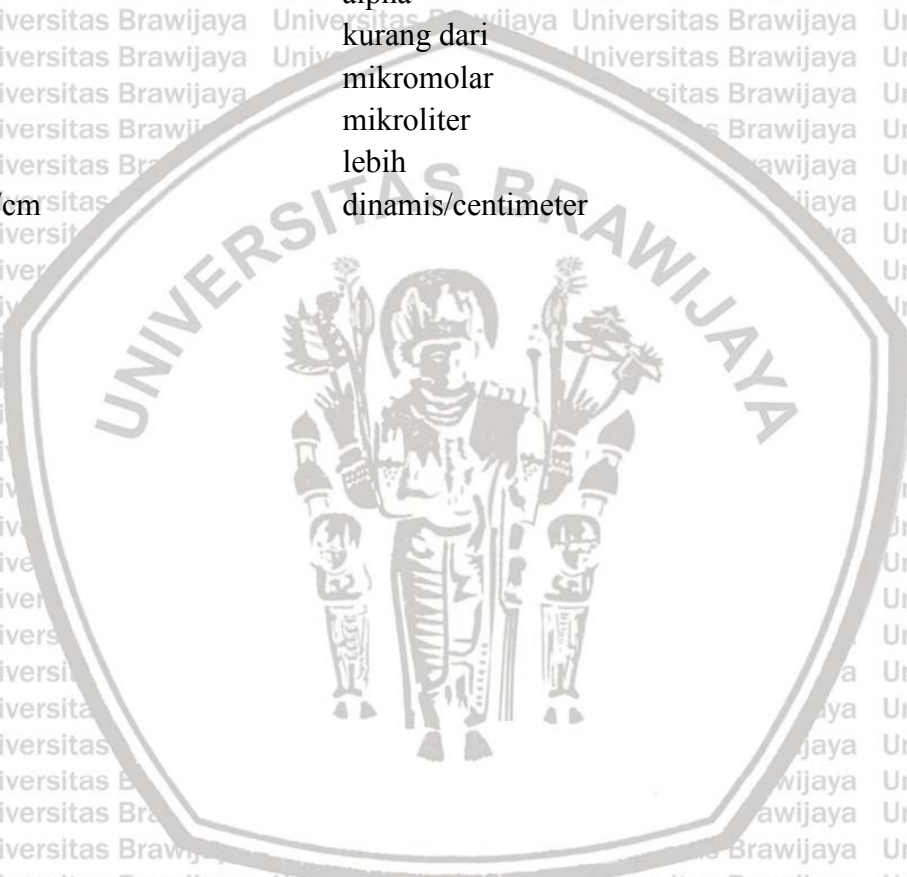
Simbol/Singkatan	Keterangan
PT.	Perseroan Terbatas
E&P	eksplorasi dan produksi
PHE	<i>plate heat exchanger</i>
WMO	<i>World Meteorological Organization</i>
dkk	dan kawan-kawan
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
16S rDNA	16 subunit <i>ribosomal deoxyribo nucleic acid</i>
Ni	nikel
Cu	<i>cuprum</i> (tembaga)
Pb	<i>plumbum</i> (timbal)
Fe	<i>ferrum</i> (besi)
O ₂	oksigen
NAH7	naphthalene 7
MGEs	<i>mobile genetic elements</i>
incP-9	inkompabilitas 9
KoA	koenzim-a asetil
pH	potensial hidrogen
TPH	total petroleum hidrokarbon
RAL	rancangan acak lengkap
OD	<i>optical density</i>
m	meter
cm	centimeter
g	gram
g/L	gram/liter
mL	mililiter
nm	nanometer
rpm	rotasi per menit
MgSO ₄	<i>magnesium sulfat</i>
CaCl ₂	<i>calcium chloride</i>
KNO ₃	<i>kalium nitrat</i>
FeCl ₃	<i>feri chloride</i>
K ₂ HPO ₄	<i>dipotassium phosphate</i>
KH ₂ PO ₄	<i>monobasic potassium phosphate</i>
NA	<i>nutrient agar</i>
HCL	hidrogen chloride
Na ₂ SO ₄	natrium sulfat
SPSS	<i>statistical package for the social sciences</i>
MEGA-5	<i>manual sequence alignment 5</i>
ng	nanogram
IHT	isolat hidrokarbon tanah

Simbol/Singkatan

Nama Unit

titik
,
%
&
<
°C
μL
±
+
α
≤
μM
μL
>
dyne/cm

titik
koma
persen
dan
kurang
derajat Celcius
mikroliter
kurang lebih
tambah
alpha
kurang dari
mikromolar
mikroliter
lebih
dinamis/centimeter



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penambangan minyak bumi memberikan pemasukan devisa yang signifikan bagi negara. Di Indonesia, terdapat beberapa perusahaan nasional dan multinasional yang bergerak di bidang penambangan minyak bumi yaitu PT. Pertamina, PT. Chevron Pacific Indonesia, Total E&P Indonesia, PHE ONWJ, CNOOC SES Ltd, Conoco Philips Indonesia Ltd, Chevron Indonesia, PHE WMO, dan Petro China (Andafcorp, 2015). Salah satu badan usaha milik daerah yang dikelola oleh masyarakat lokal adalah Mobil Cepu yang berlokasi di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur. Badan usaha ini memiliki dampak positif dalam peningkatan perekonomian masyarakat di sekitarnya.

Sistem pengelolaan untuk perusahaan besar biasanya menggunakan alat yang canggih, modern, dan berkualitas tinggi, sedangkan alat yang sederhana seperti tali, pipa, jerigen, kayu, dan mesin truk digunakan oleh penambang tradisional seperti Mobil Cepu. Dampak negatif yang paling sering terjadi dari aktivitas industri perminyakan yaitu pencemaran tanah yang disebabkan oleh aktivitas penyulingan (Arifudin & Murtalaksono, 2016). Tanah yang tercemar minyak bumi berdampak tidak baik bagi manusia, tanaman, hewan (Merkl dkk., 2005; Rivera-Casado dkk., 2015) dan mikroorganisme yang ada di sekitar area tersebut (Akpor dkk., 2007; Peng dkk., 2008).

Tanah yang tercemar minyak bumi mengandung senyawa hidrokarbon. Hidrokarbon adalah suatu campuran komponen organik yang kompleks dengan berat molekul yang berbeda. Senyawa hidrokarbon mempunyai titik didih dan panjang rantai yang bervariasi. Semakin panjang rantai hidrokarbon maka titik didih dan densitasnya semakin besar begitu pula sebaliknya (Jonker dkk., 2006). Hidrokarbon memiliki sifat toksik dan karsinogenik sehingga dapat menyebabkan kematian bagi makhluk hidup (Zam, 2010). Senyawa hidrokarbon dapat diatasi oleh mikroba dengan mekanisme biodegradasi.

Biodegradasi adalah proses perombakan senyawa organik kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh aktivitas mikroorganisme. Biodegradasi menggunakan mikroorganisme indigenus memiliki keuntungan yaitu mampu menghilangkan berbagai senyawa yang terkandung di lokasi tercemar dengan sifat ketahanannya terhadap senyawa tersebut (Gentry dkk., 2004; Tyagi dkk., 2011). Namun, untuk meningkatkan kelarutan senyawa hidrofobik diperlukan bantuan surfaktan.

Surfaktan (*surface active agent*) adalah molekul yang dapat menurunkan tegangan permukaan, mengandung gugus hidrofilik (suka air) dan gugus lipofilik (suka minyak/lemak) (Sheats & Foster, 1997). Penggunaan surfaktan dilingkungan tidak boleh melebihi kadar *critical micelle concentration* (CMC) atau batas konsentrasi pembentukan misel yang artinya tegangan antarmuka akan konstan walaupun konsentrasi surfaktan ditingkatkan. Semakin tinggi konsentrasi surfaktan melebihi nilai CMC, maka semakin tidak efisien. Hal ini dikarenakan penggunaan dosis surfaktan yang melebihi nilai CMC dapat mengakibatkan terjadinya emulsi balik (*reemulsification*) (Eris dkk., 2017).

Salah satu senyawa surfaktan alami yang memiliki kemampuan untuk meningkatkan degradasi hidrokarbon minyak bumi adalah saponin. Saponin adalah komponen tumbuhan yang umum dimanfaatkan oleh masyarakat untuk obat, mencuci pakaian, dan mandi. Saponin adalah senyawa glikosida steroid atau triterpen yang banyak ditemukan pada berbagai jenis tanaman (Wina dkk., 2005). Tanaman lokal Indonesia yang banyak mengandung saponin yaitu *Sapindus rarak*. Saponin diketahui memiliki sifat antimikroorganisme, terutama terhadap bakteri, jamur, dan protozoa (Pasaribu dkk., 2014). Peneliti lain menjelaskan bahwa saponin jika dibandingkan dengan rhamnolipid memiliki hasil yang lebih efektif dan lebih cepat dalam membantu mendegradasi hidrokarbon (Kaczorek dkk., 2008).

Penelitian kemampuan saponin dari *Sapindus rarak* yang merupakan tumbuhan lokal Indonesia dalam mensolubilisasi hidrokarbon untuk proses biodegradasi minyak bumi belum diketahui. Aplikasi saponin dari tumbuhan *Sapindus mukorosi* dan *Quillaya* dalam bioremediasi tanah yang tercemar *polycyclic aromatic hydrocarbon* yang telah dilakukan di luar negeri, memberikan efek yang negatif terhadap bakteri sehingga menghambat proses degradasi (Takayuki dkk., 2012). Kombinasi antara isolat bakteri dan saponin dari *Sapindus rarak* penting untuk dikaji lebih lanjut. Harapannya, saponin dari *Sapindus rarak* dapat bersinergi dengan bakteri dalam proses biodegradasi sehingga, dapat diaplikasikan untuk bioremediasi tanah yang tercemar hidrokarbon di daerah beriklim tropis. Hasil penelitian ini dapat dijadikan solusi dalam mengatasi permasalahan pencemaran minyak bumi di lingkungan khususnya di tanah tercemar.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan terkait penelitian ini adalah:

1. Bagaimana toleransi bakteri hidrokarbonoklastik dari tanah tercemar minyak bumi di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro terhadap saponin dan potensinya untuk tidak mendegradasi saponin?
2. Bagaimana potensi kombinasi bakteri hidrokarbonoklastik terpilih dengan saponin dalam menurunkan kadar total petroleum hidrokarbon minyak bumi?
3. Berdasarkan sekuen 16S rDNA, bakteri spesies apakah yang mampu bersinergi dengan saponin dalam menurunkan kadar total petroleum hidrokarbon minyak bumi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan terkait penelitian ini adalah:

1. Mengevaluasi toleransi bakteri hidrokarbonoklastik dari tanah tercemar minyak bumi di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro terhadap saponin dan potensinya untuk tidak mendegradasi saponin.
2. Menganalisis potensi kombinasi bakteri hidrokarbonoklastik terpilih dengan saponin dalam menurunkan kadar total petroleum hidrokarbon minyak bumi.
3. Mengidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA isolat bakteri terpilih yang mampu bersinergi dengan saponin dalam menurunkan kadar total petroleum hidrokarbon minyak bumi.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu diperolehnya informasi tentang penggunaan kombinasi isolat bakteri dengan pemberian saponin alami komersial untuk memperbaiki kualitas lingkungan tercemar hidrokarbon. Hasil penelitian ini dapat diterapkan untuk penelitian lebih lanjut mengenai bioremediasi pada daerah atau kawasan yang beriklim tropis, sehingga membantu pemerintah dalam mengelola ekosistem tercemar.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian dan Karakter Minyak bumi

Minyak bumi ditemukan bersama-sama dengan gas alam. Minyak bumi yang telah dipisahkan dari gas alam disebut minyak mentah. Minyak bumi merupakan campuran senyawa organik kompleks dari suatu proses alami yang terdiri dari senyawa hidrokarbon dalam kondisi tekanan dan suhu atmosfer berupa fasa cair atau padat, termasuk aspal, lilin mineral, dan bitumin. Minyak bumi yang baru keluar dari sumur eksplorasi mengandung bermacam-macam zat kimia, lebih dari separuh (50-98 %) dari zat-zat tersebut merupakan hidrokarbon dan sisanya merupakan senyawa nonhidrokarbon seperti sulfur, nitrogen, oksigen yang memiliki kadar bervariasi, volatilitas, *specific gravity*, dan viskositas yang beragam (Speight, 1991). Hidrokarbon adalah senyawa organik yang terdiri atas karbon dan hidrogen. Hidrokarbon merupakan salah satu kontaminan yang dapat berdampak buruk, baik bagi manusia maupun lingkungan.

Minyak bumi dapat dibedakan menjadi:

1. Minyak bumi ringan (*light minyak bumi*), mengandung kadar logam dan belerang rendah, berwarna terang dan bersifat encer (viskositas rendah).
2. Minyak bumi berat (*heavy minyak bumi*), kadar logam dan belerangnya tinggi, viskositasnya tinggi sehingga perlu dipanaskan supaya meleleh. Kandungan minyak bumi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kandungan dan komposisi minyak bumi

Komponen dari minyak bumi	Komposisi (%)
Karbon	84
Hidrogen	14
Belerang	1-3
Nitrogen	<1
Oksigen	<1
Logam (Ni, Cu, Pb, As, Fe, V)	<1
Garam (NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂)	<1

(Sumber: Speight, 1991)

Speight (1991) membagi komponen hidrokarbon menjadi tiga kelas:

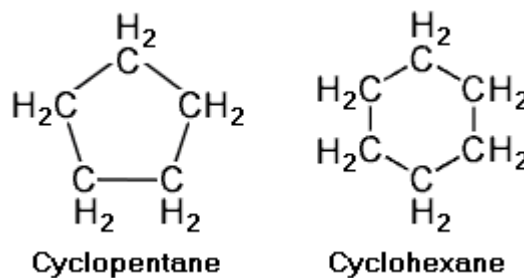
1. *Parrafins* adalah *saturated hydrocarbons* dengan rantai lurus atau bercabang, namun tanpa struktur cincin (Gambar 1).



Gambar 1. Struktur parafin

(Sumber: Wikiwand, 2018)

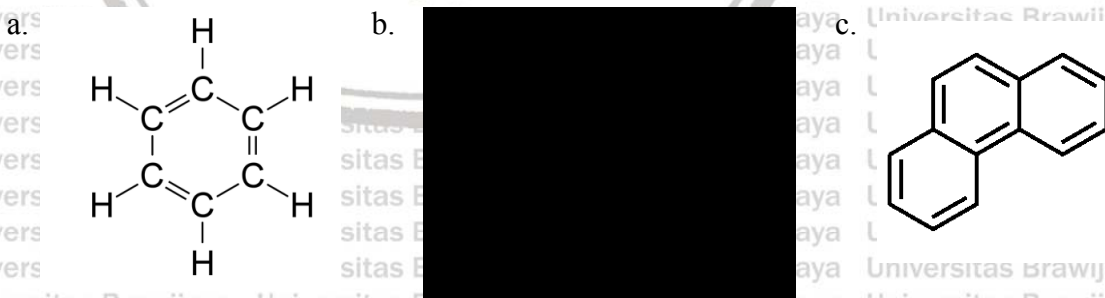
2. *Naphthenes* adalah *saturated hydrocarbons* yang memiliki satu atau lebih cincin, masing-masing cincin memiliki satu atau lebih gugus rantai *paraffinic* (lebih dikenal sebagai *alicyclic hydrocarbons*) (Gambar 2).



Gambar 2. Struktur naphthene

(Sumber: Beychok, 1967)

3. *Aromatics* adalah hidrokarbon yang mengandung satu atau lebih inti *aromatic*, seperti sistem cincin *benzene*, *naphthalene*, dan *phenantherene* (Gambar 3).



Gambar 3. Struktur *benzene* (a); *naphthalene* (b); *phenantherene* (c)

(Sumber: Albus, 2018)

2.2 Pencemaran Tanah oleh Minyak Bumi

Pencemaran tanah adalah suatu keadaan yang terjadi karena perubahan kondisi tata lingkungan yang merugikan kehidupan makhluk hidup yang disebabkan oleh kehadiran zat-zat asing sehingga tanah tidak dapat dimanfaatkan dengan baik (Susilo, 2003). Tanah yang tercemar minyak bumi umumnya berbentuk seperti ruang pembakaran, tempat pembuangan bahan kimia, sedimen laut, sumur pembuangan, tempat lindi, area pelatihan pemadam kebakaran, lubang *landfill* dan pembuangan, tangki penyimpanan, tempat pelarutan pelumas, *surface impoundments*, dan tempat perawatan mesin (Dutta, 2002).

Minyak bumi dan turunannya merupakan salah satu contoh zat pencemar hidrokarbon yang banyak digunakan manusia dan berpotensi mencemari lingkungan (Notodarmojo, 2005). Tanah yang tercemar oleh minyak bumi diketahui meningkatkan karbon organik, serta mengurangi *nitrat* dan *fosfor* pada tanah (Okolo, 2005). Menurut Suryatmana (2006), pencemaran lingkungan akibat minyak bumi dapat berasal dari:

1. Tumpahan minyak pada lahan yang diakibatkan oleh proses distribusi minyak melalui pipa dan alat.
2. Timbunan limbah dari hasil kegiatan usaha minyak bumi yang berpotensi mencemari tanah di sekitar lokasi kegiatan.
3. Limbah dari pengeboran berupa lumpur bor serta serbuk bor yang mengandung berbagai residu minyak (*separator, oil catcher, dissolve air flotation, chemical unit, free water knock out*).
4. Tangki pemisah atau tangki penimbun minyak tanah (*floating storage, tanker, storage tank*).

2.3 Mikroorganisme Pendegradasi Hidrokarbon

Biodegradasi merupakan istilah yang digunakan untuk pengelolaan lingkungan atau proses remediasi. Bahan organik dapat didegradasi secara aerob maupun anaerob, tetapi dalam kondisi aerob jauh lebih cepat dibandingkan anaerob (Das & Chandran, 2011). Degradasi hidrokarbon minyak bumi dapat dilakukan dengan perlekatan sel mikroorganisme ke substrat (Hommel, 1990). Sebuah istilah yang terkait dengan biodegradasi adalah biomineralisasi, yaitu bahan organik diubah menjadi mineral. Biodegradasi umumnya terjadi pada bahan-bahan organik yang didegradasi oleh mikroorganisme. Beberapa bahan yang dapat didegradasi oleh mikroorganisme adalah komponen hidrokarbon (misalnya minyak

bumi), *polychlorinated biphenyls*, *polyaromatic* hidrokarbon, bahan farmasi, *radionuclides*, dan logam.

Cookson (1995) menjelaskan beberapa faktor yang diperlukan dalam mendegradasi kontaminan, antara lain:

1. Keberadaan mikroorganisme pendegradasi kontaminan.
2. Keberadaan substrat yang menjadi sumber karbon.
3. Keberadaan *inducer* yang dapat mendorong pembentukan enzim spesifik.
4. Keberadaan sistem akseptor dan donor elektron.
5. Kondisi lingkungan yang mendukung reaksi katalisis enzim.
6. Nutrien yang menunjang pertumbuhan bakteri dan produksi enzim.
7. Tidak adanya material/substansi yang bersifat toksik terhadap mikroorganisme pendegradasi.
8. Keberadaan organisme yang dapat mendegradasi produk metabolit.
9. Keberadaan organisme yang dapat mencegah terbentuknya senyawa toksik.
10. Kondisi lingkungan yang dapat menyebabkan mikroorganisme menjadi lebih kompetitif sehingga meningkatkan keberlangsungan reaksi di lingkungan.

Proses degradasi hidrokarbon bergantung pada aktivitas mikroorganisme dan Lingkungannya. Mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi petroleum hidrokarbon dan komponen serupa lainnya banyak terdapat di habitat laut, air tawar, dan tanah. Degradasi material organik di lingkungan alami umumnya dilakukan oleh dua kelompok mikroorganisme, yaitu bakteri dan jamur. Bakteri mewakili beragam jenis organisme prokariotik yang banyak tersebar di biosfer. Bakteri dapat ditemukan di hampir semua lingkungan, namun hal ini tidak berarti bahwa semua strain bakteri ada di seluruh alam (Baker & Herson, 1994). Lebih dari 200 spesies bakteri, khamir, dan kapang terbukti dapat mendegradasi hidrokarbon mulai dari metana sampai komponen dengan lebih dari 40 atom karbon (Zhu dkk., 2001). Bakteri dalam biodegradasi hidrokarbon lebih menguntungkan dibandingkan khamir dan kapang karena bakteri merupakan organisme yang paling banyak jumlahnya dan lebih tersebar luas dibandingkan kapang dan khamir. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di darat hingga lautan dan tempat-tempat yang ekstrim. Penggunaan bakteri yang berasal dari sumber pencemaran memiliki keuntungan, yaitu tidak perlu melakukan pengontrolan kondisi sumber polutan agar bakteri dapat tumbuh dengan optimal karena bakteri indigenus sudah teradaptasi dengan lingkungan asalnya (Lucky, 2012).

Bakteri yang mampu menggunakan sumber karbon yang terdapat di dalam senyawa hidrokarbon minyak bumi disebut bakteri hidrokarbonoklastik (Kostka dkk., 2011). Bakteri ini mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan memanfaatkannya sebagai sumber karbon dan energi yang diperlukan bagi pertumbuhannya. Bakteri hidrokarbonoklastik diantaranya adalah *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Brevibacillus*, dan *Bacillus* (Kostka dkk., 2011). Menurut Zhao dkk., (2009) bakteri pendegradasi hidrokarbon berasal dari Genus *Agmenellum*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Berjerinckia*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Cyclotrophicus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Lutibacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, dan *Paenibacillus*. Bakteri di daerah tropis yang mampu melakukan biodegradasi hidrokarbon *Pseudomonas*, *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia*, dan *Mycobacterium* (Chaillan dkk., 2004). Bakteri-bakteri tersebut banyak terdapat di dalam perairan atau sedimen yang tercemar oleh minyak bumi.

2.4 Mekanisme *Uptake* dan Biodegradasi Hidrokarbon oleh Bakteri

Mikroorganisme di Lingkungan sangat beragam dan secara efisien dapat menurunkan berbagai jenis polutan. Sebagian besar proses biodegradasi berjalan lambat sehingga polutan menjadi toksik ketika terakumulasi di lingkungan (Chao dkk., 2009). Secara umum, hidrokarbon dengan jumlah cincin aromatik dan berat molekul tinggi akan didegradasi lebih lambat daripada jumlah cincin substituen alkil dan berat molekul rendah oleh mikroorganisme indigenus (Lors dkk., 2010). Bakteri pedegradasi hidrokarbon rantai lurus dalam minyak bumi, jumlahnya relatif sedikit dibandingkan bakteri pendegradasi hidrokarbon aromatik, diantaranya adalah *Nocardia*, *Pseudomonas*, dan *Mycobacterium*.

Tipe dari petroleum hidrokarbon ada tiga yaitu alifatik, alisiklik, dan aromatik. Langkah pendegradasian hidrokarbon alifatik secara aerobik lebih mudah dibandingkan alisiklik dan aromatik. Alifatik adalah rantai lurus (n-alkana C10 ke C18), rantai n-alkana yang lebih pendek bersifat toksik pada sel dengan kelarutan air yang lebih tinggi sedangkan rantai n-alkana yang lebih panjang memiliki ketersediaan hayati rendah dengan kelarutan air yang rendah. Alifatik jenuh dan alkena mekanisme *uptake*-nya sama. Alkana memiliki kesamaan struktural dengan asam lemak dan parafin, banyak mikroorganisme dapat memanfaatkan n-alkana sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Proses atau mekanisme biodegradasi alifatik dapat dilakukan dengan dua jalur. Biodegradasi molekul

hidrokarbon dikendalikan oleh sistem enzim spesifik melalui jalur oksidasi (Li & Chen, 2009). Dalam proses degradasi hidrokarbon, bakteri harus memiliki elemen genetik bergerak (MGEs) seperti plasmid. Jalur pertama dimulai dengan penggabungan langsung satu atom oksigen ke satu karbon akhir alkana oleh enzim monooksigenase yang menghasilkan pembentukan alkohol. Jalur kedua, enzim dioksigenase dapat memasukkan dua atom oksigen ke dalam alkana untuk membentuk hidroperoksida. Hasil akhir dari kedua jalur adalah produksi asam lemak. Asam lemak dikatabolisme dalam jalur oksidasi β (Gambar 4).

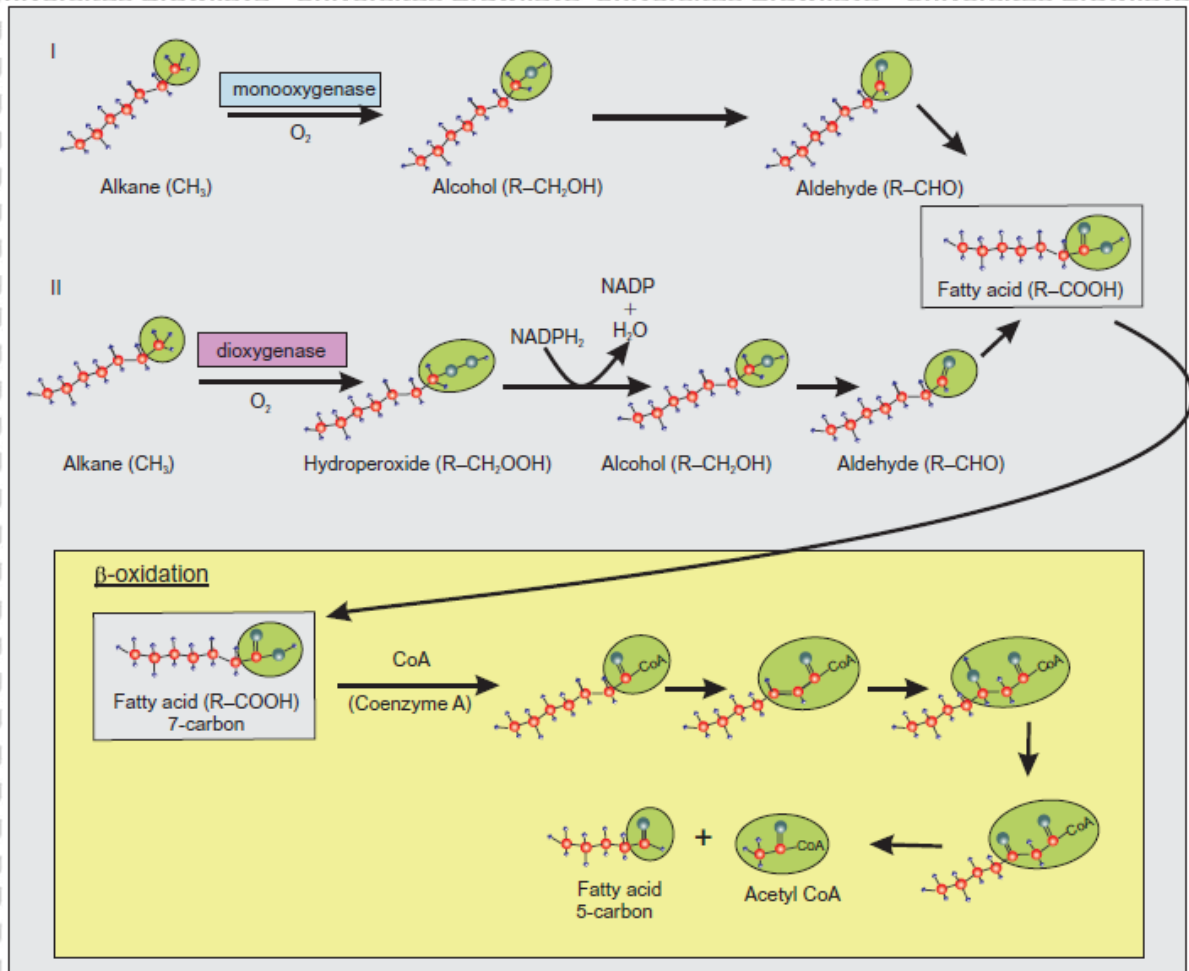


FIGURE 17.12 Aerobic biodegradation of alkanes.

Gambar 4. Reaksi degradasi hidrokarbon alifatik secara aerobik

(Sumber: Roane dkk., 2015)

Proses biodegradasi aerobik senyawa alisiklik diperkirakan terjadi karena reaksi komensalistik dan kometabolik seperti contoh reaksi pada sikloheksana. Dalam rangkaian reaksi ini, satu organisme mengubah sikloheksana menjadi sikloheksanol (langkah 1) secara kometabolisme selama oksidasi propana menggunakan monooksigenase, tetapi tidak dapat mengubah senyawa lebih lanjut. Organisme kedua yang tidak dapat mengoksidasi

sikloheksana menjadi sikloheksanol dapat melakukan transformasi selanjutnya (langkah 2 dan seterusnya) termasuk laktonisasi, pembukaan cincin dan mineralisasi senyawa alifatik yang tersisa. Proses biodegradasi aerobik senyawa aromatik yang paling umum adalah hidroksilasi (-OH) yang melibatkan penggabungan oksigen molekular. Enzim yang terlibat dalam transformasi awal ini adalah monooksigenase untuk mikroorganisme eukariotik dengan cara detoksifikasi katekol dan ekskresi bukan dengan cara mineralisasi atau mikroorganisme prokariotik (bakteri) dengan enzim dioksigenase. Mikroorganisme prokariotik mengubah cincin aromatik dengan enzim dioksigenase menjadi cis-dihidrodiol (trans-dihidrobena). Cis-dihidrodiol diformat ulang untuk membentuk intermediet dihidroksilasi, katekol. Cincin katekol dipecah oleh dioksigenase menjadi dua yaitu dua kelompok hidroksil (jalur ortho) atau satu kelompok hidroksil (jalur meta) dan selanjutnya terdegradasi dan digunakan sebagai sumber karbon dan energi.

Perlu diketahui bahwa ketika proses biodegradasi terjadi, konsentrasi hidrokarbon terlarut dapat menjadi jenuh saat proses pengambilan bakteri karena laju pelarutan hidrokarbon sangat cepat untuk mempertahankan kenaikan substrat oleh pertumbuhan populasi. Laju pelarutan ditentukan berdasarkan periode waktu distribusi substrat saat terlepas dan memberikan kontribusi pada akumulasi hidrokarbon di dalam tanah (Enell dkk., 2008). Ketika laju populasi melampaui laju pelarutan hidrokarbon, maka konsentrasi hidrokarbon terlarut akan turun menjadi jenuh dan pertumbuhan eksponensial akan terhenti.

Berbagai jenis bakteri mampu mendegradasi hidrokarbon melalui proses metabolisme atau kometabolisme. Johnsen & Karlson (2004) menambahkan bahwa isolasi bakteri pendegradasi hidrokarbon dari tanah sering ditemukan pada kelompok *Sphingomonas* dan *Mycobacteria*. *Sphingomonas* memiliki membran sel luar *glucosphingolipid* dengan komposisi *mono-* atau *tetra-sakaridahidrofilik* dan residu *dihydrosphingosine lipofilik*. Hidrokarbon dengan berat molekul rendah, seperti naftalena, fenantrena, dan antrasena, mudah terdegradasi oleh bakteri di dalam tanah dan dalam uji skala laboratorium. Sangat sedikit bakteri mempunyai kemampuan untuk melakukan proses utilisasi pada lima atau lebih cincin aromatik hidrokarbon sebagai sumber karbon dan sumber energi (Peng dkk., 2008). Sebagian besar bakteri tersebut adalah Gram negatif sehingga bakteri ini memainkan peranan yang lebih penting daripada bakteri Gram positif pada proses degradasi hidrokarbon dengan berat molekul tinggi (Chauhan dkk., 2008). Bakteri lebih dominan digunakan dibandingkan jamur, alga, dan *cyanobacteria* untuk proses biodegradasi senyawa kompleks hidrokarbon menjadi senyawa sederhana. Bakteri dapat memanfaatkan ruang penuh tipe reaksi katabolik biokimia untuk memulai proses

biodegradasi dengan strategi berbeda terhadap beberapa jenis senyawa hidrokarbon (Kolvenbach dkk., 2014).

2.5 Peran Surfaktan dalam Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi

Surfaktan memiliki kemampuan untuk mensolubilisasi hidrokarbon minyak bumi (Lamichhane dkk., 2017). Surfaktan dikategorikan sebagai senyawa *nonionik*, *kationik*, *anionik* atau *zwitterionik* berdasarkan muatan *ion* pada gugus *hidrofilik* (Paria, 2008).

Biosurfaktan terbagi menjadi dua jenis yaitu surfaktan berbasis mikrobal seperti *glikolipid* (*rhamnolipid*, *trehalolipid*, dan *sorborolipids*), *lipopeptida*, *surfactin*, *lichenysin* dan *phospholipid* (Vijayakumar & Saravanan, 2015; Gudina dkk., 2016) dan surfaktan nabati seperti saponin (Blyth dkk., 2015). Biosurfaktan memiliki banyak manfaat seperti produksinya hemat biaya, biodegradabel, toksisitasnya rendah dan memiliki ketahanan terhadap lingkungan dibandingkan dengan surfaktan sintetis (Banat dkk., 2014).

Penggunaan biosurfaktan untuk degradasi hidrokarbon pada konsentrasi tertentu, dapat mengakibatkan tegangan permukaan menjadi konstan walaupun konsentrasi surfaktan ditingkatkan. Bila surfaktan ditambah melebihi konsentrasinya maka surfaktan akan beragregasi dan membentuk misel yaitu dengan menghambat dan mereduksi flokulasi dan penggabungan (*coalescence*) partikel yang terdispersi, sehingga kestabilan partikel yang terdispersi makin meningkat. Misel merupakan gerombolan kecil molekul yang gugus hidrokarbonnya (non polar) ada di bagian tengah dan gugus hidrofiliknya berada di bagian luar. Terbentuknya misel menyebabkan tegangan antarmuka minyak-air telah jenuh sehingga molekul surfaktan yang teradsorpsi pada antarmuka minyak-air juga lebih sedikit. Akibatnya, kemampuannya dalam menurunkan tegangan antarmuka lebih kecil atau tidak mampu lagi menurunkan tegangan antarmuka sehingga stabilitas emulsi cenderung tetap setelah mencapai maksimum (Jaya, 2005). Konsentrasi terbentuknya misel ini disebut *critical micelle concentration* (CMC). Tegangan antarmuka akan menurun hingga CMC tercapai. Setelah CMC tercapai, tegangan antarmuka akan konstan yang menunjukkan bahwa antarmuka menjadi jenuh dan terbentuk misel yang berada dalam keseimbangan dinamis dengan monomernya (Supriningsih, 2010).

Misel yang terbentuk menyebabkan emulsifikasi hidrokarbon, sehingga mudah didegradasi oleh bakteri. Dengan adanya surfaktan, substrat yang berupa cairan akan teremulsi menjadi misel dan menyebarkan ke permukaan sel bakteri. Substrat yang padat dipecah oleh surfaktan, sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel. Pelepasan surfaktan ini

bergantung pada substrat hidrokarbon. Ada substrat yang menyebabkan biosurfaktan hanya melekat pada permukaan membran sel, tetapi tidak dilepaskan ke dalam medium dan ada beberapa substrat hidrokarbon (misal *heksadekan*) yang menyebabkan biosurfaktan juga dilepaskan ke dalam medium.

Hidrofobisitas senyawa hidrokarbon minyak menjadikan limbah tersebut sulit larut dalam air sehingga membatasi kecepatan degradasinya oleh mikroorganisme di perairan maupun di tanah (Ni'matuzahroh dkk., 2003). Penambahan surfaktan dalam biodegradasi dapat meningkatkan kelarutan minyak dan meningkatkan ketersediaannya untuk didegradasi oleh bakteri pengurai minyak (bakteri hidrokarbonoklastik). Peranan surfaktan yang berbeda dan beragam dipengaruhi oleh struktur molekulnya. Molekul surfaktan divisualisasikan dengan bentuk seperti berudu ataupun bola raket yang terdiri atas bagian kepala dan ekor. Bagian kepala merupakan bagian nonpolar dengan bentuk anion, kation, atau nonion, sedangkan ekor dapat berupa rantai linier atau cabang hidrokarbon.

2.6 *Sapindus rarak* Penghasil Surfaktan Saponin

Lerak (*Sapindus rarak*) merupakan jenis tanaman yang berasal dari Asia Tenggara serta dapat tumbuh dengan baik pada hampir semua jenis tanah dan keadaan iklim, dari dataran rendah sampai pegunungan dengan ketinggian 450-1500 m dari permukaan laut. Lerak diklasifikasikan ke dalam Divisi Spermatophyta, Subdivisi Angiospermae, Kelas Dicotyledoneae, Subkelas Rosidae, Bangsa Sapindales, Suku Sapindaceae, Marga *Sapindus* dan Spesies *Sapindus rarak* (Afriastini, 1990).

Senyawa aktif yang telah diketahui dari buah lerak adalah saponin dan sesquiterpen. Mayoritas saponin yang terdapat di alam terutama dihasilkan oleh tanaman yaitu saponin dan triterpen. Saponin terdapat pada berbagai spesies tanaman, baik tanaman liar maupun tanaman budidaya. Saponin merupakan golongan surfaktan non-ionik (Davin dkk., 2017). Pabrik pembuatan surfaktan dari tanaman *Sapindus rarak*, tersebar luas di Pulau Jawa. Saponin biasa digunakan masyarakat untuk membersihkan kotoran dan mengawetkan warna pakaian karena ramah lingkungan dan tidak merusak alam.

Saponin tertentu dapat diperoleh dari beberapa tanaman sebagai bahan baku untuk sintesis hormon steroid yang digunakan dalam bidang kesehatan (Robinson dkk., 1995). Di bidang bioteknologi saponin dapat digunakan sebagai agen biodegradasi. Saponin digunakan untuk meningkatkan kelarutan hidrokarbon karena dapat menurunkan tegangan antarmuka antara minyak dan air (Doong & Lei., 2003). Interaksi antara bakteri *Spingomonas* sp. dengan saponin konsentrasi 0,25-5 % dari tanaman *Sapindus mukorossi* mampu

menurunkan konsentrasi pyrene dan penathrene (hidrokarbon aromatik) lebih cepat (Kobayashi dkk., 2012). Saponin komersial dengan konsentrasi 5 % mampu bersinergi dengan bakteri untuk menurunkan kadar hidrokarbon, tetapi pada konsentrasi 10 % saponin dapat bersifat toksik (Soeder dkk., 1996).

Konsentrasi misel yang tinggi menyebabkan biosurfaktan dapat diabsorpsi ke dalam sel mikroorganisme (Kaczorek dkk., 2010). Saponin yang dihasilkan dari jaringan *Quillaya* memberikan efek yang positif dalam biodegradasi hidrokarbon dibandingkan rhamnolipid. Saponin pada konsentrasi rendah (kurang dari CMC) dapat mengubah hidrofobisitas permukaan sel sehingga meningkatkan afinitas mikroorganisme (Kaczorek dkk., 2008). Selain itu, penambahan kultur murni *Sphingomonas* yang dikombinasi dengan saponin secara signifikan dapat meningkatkan degradasi hidrokarbon lebih cepat dibandingkan jika hanya diinokulasikan kultur murni. Saponin yang diberikan tidak menghambat pertumbuhan sel dan menunjukkan kestabilan dalam degradasi hidrokarbon (Kobayashi dkk., 2012).

2.7 Faktor Pembatas Biodegradasi Hidrokarbon

Berbagai isolat mampu mendegradasi berbagai macam hidrokarbon, tetapi seringkali proses tersebut berlangsung terlalu lama untuk menurunkan konsentrasi kontaminan secara signifikan, akibat adanya batasan biologis, kimiawi, maupun fisik. Tanpa memerhatikan karakter teknologi pengolahan secara terperinci, seluruh teknik biodegradasi memerlukan mikroorganisme yang tepat di lokasi yang tepat dengan kondisi lingkungan yang tepat agar biodegradasi dapat terjadi dengan baik (Baker & Herson, 1994). Kecepatan biodegradasi dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti konsentrasi dan komposisi bahan pencemar, kadar air, ketersediaan oksigen, suhu, biomassa, pH, bahan organik, nutrisi, serta adaptasi. Keberhasilan proses degradasi dapat ditunjukkan oleh enzim potensial yang dihasilkan mikroorganisme (Fahrudin, 2010).

Bahan organik penting untuk mikroorganisme, tidak hanya sebagai unsur hara, tetapi juga sebagai pengkondisi sifat fisik tanah yang memengaruhi karakteristik agregat dan air tanah (Darliana, 2009). Kadar bahan organik yang rendah menandakan bahwa di lokasi tersebut pelapukan tumbuhan dan binatang sangat sedikit dan tanah lebih didominasi oleh kandungan zat kapur sehingga menyebabkan pH cenderung ke basa (Yuliani & Rahayu, 2017).

Tingkat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor yang berpengaruh pada laju pertumbuhan mikroorganisme. Keasaman tanah umumnya stabil dan bersifat alkali.

Kebanyakan bakteri dan jamur heterotrof menyukai pH netral, dengan jamur lebih toleran pada kondisi asam. Nilai pH optimum untuk ketersediaan unsur hara tanah adalah 7 karena semua unsur makro tersedia secara maksimum untuk pertumbuhan berbagai bakteri di tanah (Faiza dkk., 2013). Keasaman tanah ditentukan oleh kadar atau kepekatan hidrogennya. Jika ion hidrogen di dalam tanah terlalu tinggi maka tanah akan bereaksi asam. Sebaliknya jika kadar kation lebih tinggi dari ion hidrogen maka tanah akan bereaksi basa. Kadar air berkaitan dengan pH. Bila kadar air tanah bertambah ketika ditambahkan air maka nilai pH akan menurun. Nilai pH turun karena bakteri yang berada dalam minyak bumi mampu mendegradasi hidrokarbon dengan membentuk asam-asam organik dari hasil fermentasi. Keasaman berpengaruh pada laju transpor membran dan keseimbangan reaksi mikroorganisme. Biodegradasi hidrokarbon pada awalnya secara oksidasi oksigen dan enzim *oksigenase* menghasilkan asam lemak. Asam lemak dioksidasi membentuk asam asetat. Asam asetat menyebabkan penurunan pH pada proses biodegradasi (Fahrudin, 2010). Biodegradasi minyak bumi dapat terhambat akibat penurunan pH secara drastis (Zhu dkk., 2001).

Kadar air merupakan salah satu faktor penting yang mendukung keberhasilan biodegradasi hidrokarbon. Kadar air disesuaikan agar mikroorganisme dapat hidup, tumbuh, dan melakukan aktivitas metabolisme mendegradasi hidrokarbon. Mikroorganisme tidak dapat hidup dan aktif di dalam minyak bumi yang tidak mengandung air. Bakteri bergantung pada suplai air yang cukup untuk dapat tumbuh dan bereproduksi (Baker & Herson, 1994).

Mikroorganisme akan menjadi lebih aktif ketika diberikan penambahan nutrisi yang fungsinya untuk mengoksidasi hidrokarbon. Nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme dalam biodegradasi minyak bumi harus mengandung mineral. Mikroorganisme akan memanfaatkan minyak sebagai sumber karbon untuk melakukan metabolisme.

Mikroorganisme diklasifikasikan ke dalam golongan *psychrophiles* (suhu optimal antara 5 °C dan 15 °C), *mesophiles* (suhu optimal antara 25 °C dan 40 °C), atau *thermophiles* (suhu optimal antara 40 °C dan 60 °C) (Baker & Herson, 1994). Walaupun sebagian besar biodegradasi dilaksanakan pada kondisi *mesofil*, kemampuan untuk mendegradasi kontaminan juga ditemukan pada mikroorganisme *psychrophiles* dan *thermophiles* (Zhu dkk., 2001). *Corynebacterium* yang diisolasi dari 17 tanah yang tercemar minyak di Antartika mampu mendegradasi hidrokarbon pada suhu 1 °C (Kerry-Williams & Noble., 1997). Mikroorganisme *thermophiles* dapat mendegradasi bahan peledak pada tanah kompos dengan suhu 55 °C (Baker & Herson, 1994). Laju degradasi hidrokarbon tertinggi biasanya terjadi pada suhu antara 30 °C – 40 °C pada lingkungan tanah, 20 °C sampai 30 °C

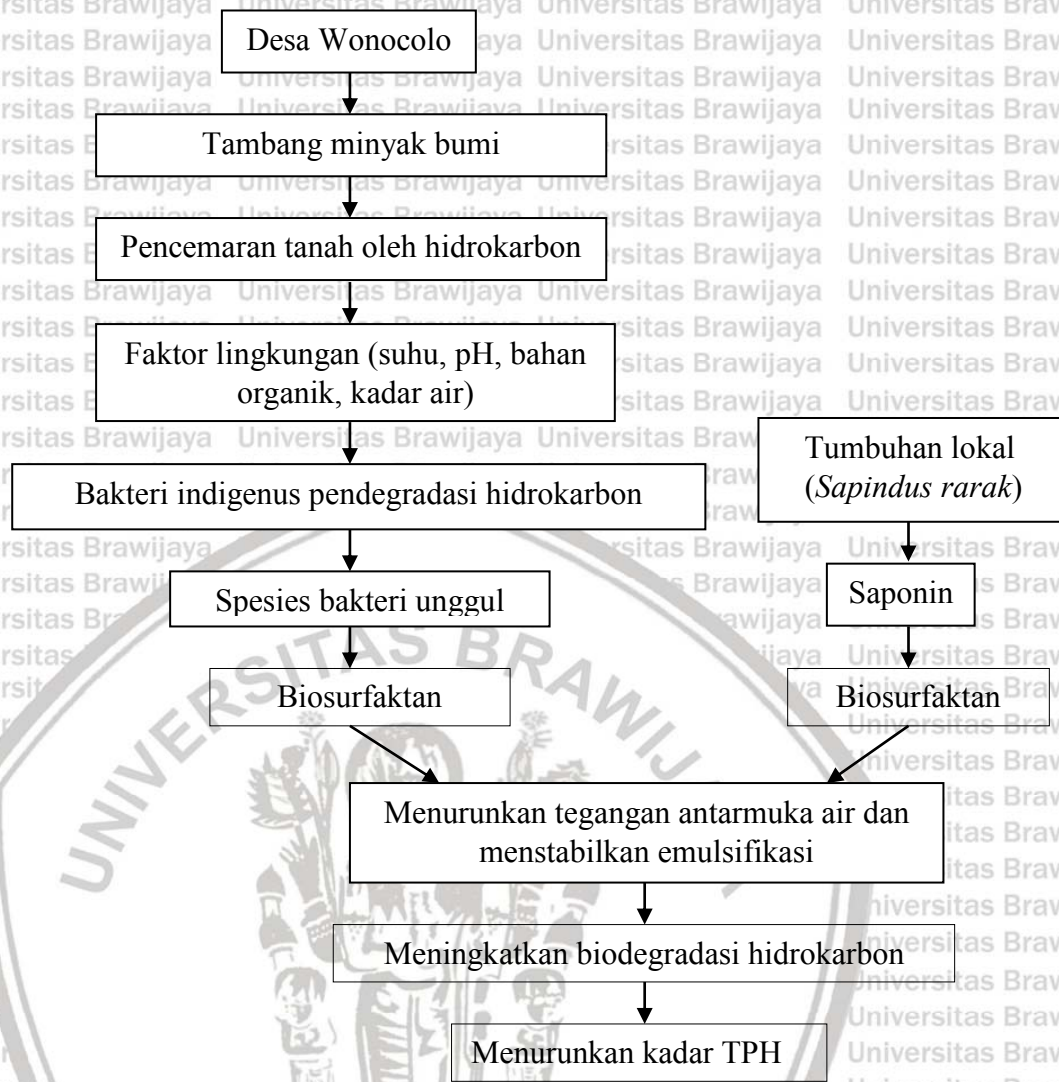
pada beberapa lingkungan perairan, dan 15 °C sampai 20°C pada lingkungan pantai (Bossert & Bartha, 1984).

2.8 Kerangka Konsep

Bojonegoro merupakan salah satu Kabupaten penghasil minyak bumi di Indonesia, khususnya berada di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedawen, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur. Pertambangan minyak bumi di Desa Wonocolo masih tergolong tradisional. Aktivitas pertambangan seringkali menyebabkan terjadinya tumpahan minyak bumi di tanah sekitar pertambangan. Minyak bumi tersebut mengandung senyawa hidrokarbon yang berbahaya bagi makhluk hidup dan lingkungan di sekitarnya.

Tanah yang tercemar minyak bumi umumnya terdapat bakteri indigenus yang sudah teradaptasi dan mampu diisolasi dari tanah tercemar minyak bumi tersebut. Efektivitas biodegradasi dapat ditingkatkan dengan pemberian surfaktan untuk meningkatkan kelarutan hidrokarbon yang bersifat hidrofobik, sehingga hidrokarbon menjadi lebih tersedia bagi bakteri untuk didegradasi. Surfaktan alami memiliki potensi untuk digunakan dalam biodegradasi minyak bumi karena sifatnya yang ramah lingkungan dibandingkan surfaktan sintetis. Salah satu surfaktan alami adalah saponin yang berasal dari tanaman.

Di Indonesia, saponin dari tanaman *Sapindus rarak* berbeda spesies dengan yang ditemukan di negara lain. Saponin biasanya diolah dan digunakan oleh masyarakat sebagai pencuci batik tulis, emas, dan perak. Penggunaan saponin dari tanaman lokal Indonesia dalam membantu degradasi hidrokarbon minyak bumi masih belum banyak dieksplorasi. Harapannya penelitian ini dapat menunjukkan potensi saponin yang dikombinasikan dengan bakteri hidrokarbonoklastik (bioaugmentasi) dalam meningkatkan efektivitas biodegradasi hidrokarbon minyak bumi.



Gambar 5. Kerangka konsep penelitian

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 24 Agustus 2018 hingga 20 April 2019. Sampel tanah diambil dari tempat penambangan minyak bumi tradisional di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedawen, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur, Indonesia. Saponin dari tanaman *Sapindus rarak* diperoleh secara komersial (kemurnian 98 %). Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

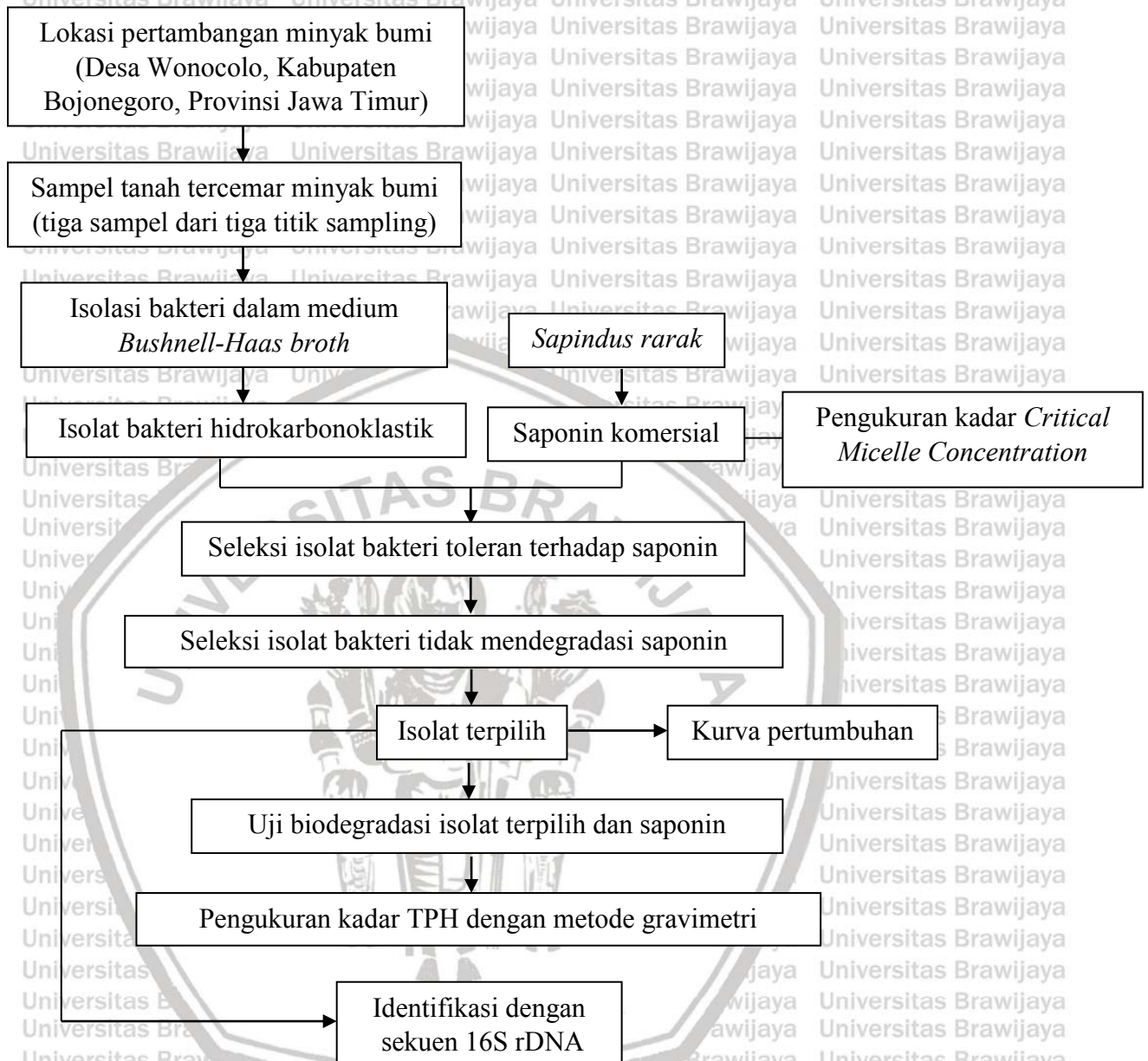
3.2 Kerangka Operasional

Pertambangan minyak bumi tradisional terdapat di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah yang tercemar hidrokarbon minyak bumi yang diperoleh dari lokasi tersebut. Sampel tanah diaklimatisasi untuk mengkultur bakteri hidrokarbonoklastik dengan menggunakan metode *enrichment* pada media *Bushnell-Haas broth* dengan konsentrasi minyak bumi 0,5 %. *Enrichment* dilakukan tiga tahap dalam media *Bushnell-Haas broth* dengan pH 6,8. Kultur dibuat seri pengenceran dan disebar pada media *Bushnell-Haas agar* yang diberi minyak bumi 25 μ L. Setiap koloni bakteri dimurnikan dalam medium *nutrient agar* hingga diperoleh isolat tunggal.

Masing-masing isolat bakteri diseleksi berdasarkan toleransi dan aktivitas degradasinya terhadap saponin komersial dari *Sapindus rarak*. Bakteri di seleksi dalam dua tahap. Tahap pertama, bakteri diuji tolerannya pada berbagai konsentrasi saponin. Isolat bakteri diinokulasikan ke medium *nutrient broth* pada beberapa konsentrasi saponin. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tinggi saponin digunakan untuk seleksi berikutnya. Seleksi tahap kedua dilakukan untuk mendapatkan bakteri toleran terhadap konsentrasi tinggi saponin, tetapi tidak memanfaatkan saponin sebagai sumber nutrisi. Isolat bakteri diinokulasikan ke media *Bushnell-Haas broth* tanpa minyak bumi tetapi mengandung saponin 0,5 %. Jika bakteri tumbuh maka bakteri tersebut mampu memanfaatkan saponin sebagai sumber karbon. Isolat terpilih diuji potensinya dalam mendegradasi hidrokarbon.

Uji efektivitas pemberian saponin terhadap degradasi hidrokarbon dilakukan berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Percobaan dilakukan dengan

menggunakan satu kontrol dan tiga perlakuan dengan tiga kali ulangan. Isolat terpilih diidentifikasi berdasarkan similaritas sekuen 16S rDNA (Gambar 6).



Gambar 6. Kerangka operasional penelitian

3.3 Pengambilan dan Pengukuran Parameter Fisiko-Kimiawi Sampel Tanah

Sampel tanah diperoleh dari tempat penambangan minyak bumi tradisional di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedawen, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur, Indonesia. Sampel tanah diambil dari satu lokasi dengan tiga titik sampling yang berbeda. Titik sampling A, B, dan C berturut-turut memiliki jarak 0-5 m, 25-30 m, dan 50-55 m dan dari titik pengeboran minyak (Gambar 7). Masing-masing ulangan sampel diambil secara acak

dari lima titik yang berbeda dan dikomposit menjadi satu. Sampel tanah diambil pada kedalaman 0-10 cm dari permukaan tanah kemudian disimpan di dalam kantong plastik steril. Sampel disimpan dalam *coolbox* yang diisi es selama perjalanan menuju laboratorium. Sifat fisiko-kimiawi tanah yang terdiri dari pH, kadar air, dan bahan organik dari lokasi diukur di laboratorium, sedangkan suhu dan titik koordinat diukur di lokasi pengambilan sampel menggunakan termometer dan GPS. Koordinat lokasi pengambilan sampel tanah adalah S 07° 02' 40,5° dan E 111° 39' 37,7° di ketinggian 191 m untuk titik sampling A, S 07° 02' 41,0° dan E 111° 39' 37,0° di ketinggian 187 m untuk titik sampling B, dan S 07° 02' 41,5° dan E 111° 39' 37,1° di ketinggian 182 m untuk titik sampling C. Keasaman (pH) tanah diukur dengan cara sampel tanah digerus sebanyak 10 g dan ditambahkan ke dalam 25 mL akuades sampai mengendap, kemudian diukur dengan menggunakan pH meter. Kadar air tanah diukur dengan menimbang tanah sebanyak 10 g, dipanaskan di dalam oven dengan suhu 105 °C hingga didapatkan berat kering ± 24 jam. Berat sampel tanah ditimbang sebagai berat kering hingga mencapai berat kering yang konstan. Kadar air tanah dihitung dengan rumus 1 (Rusdiana dkk., 2000).

$$\text{Berat kering} = \frac{(W_t - w_t)}{(W_t - w)} \times 100\%$$

$$\text{Kadar air (\%)} = 100\% - \% \text{ berat kering [1]}$$

Keterangan:

W_t = berat tanah + berat cawan sebelum dikeringkan (g)

w_t = berat tanah + berat cawan sesudah dikeringkan (g)

w = berat cawan (g)

Total bahan organik tanah diperoleh dengan pengabuan. Tanah yang sudah kering diayak kemudian dihaluskan. Tanah ditimbang sebanyak 2 g dan diletakkan ke dalam cawan porselen. Tanah dibakar di dalam tungku *furnace* pada suhu 500 °C sampai warnanya berubah menjadi merah keabu-abuan ± 3 jam. Tanah ditimbang kembali setelah proses pembakaran. Total bahan organik tanah dihitung dengan rumus 2 (Combs & Nathan, 1998; Basso dkk., 2011).

$$\text{Bahan organik tanah (\%)} = (W - w) \times (W)^{-1} \times 100\% \text{ [2]}$$

Keterangan:

W = berat tanah sebelum dibakar (g)

w = berat tanah sesudah dibakar (g)



Gambar 7. Lokasi pengambilan sampel tanah di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedawen, Kabupaten Bojonegoro, Provinsi Jawa Timur, Indonesia (tanda merah dengan huruf A, B, dan C berturut-turut menandakan titik sampling A, B, dan C)

3.4 Isolasi dan Purifikasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Sampel tanah sebanyak 2 g disuspensikan dalam 100 mL media *Bushnell-Haas broth* di labu Erlenmeyer 250 mL dengan konsentrasi minyak bumi 0,5 % dan pH 6,8. Komposisi media *Bushnell-Haas broth* terdiri atas 0,85 % NaCl, 0,02 g/L MgSO₄, 0,002 g/L CaCl₂, 0,1 g/L KNO₃, 0,05 g/L FeCl₃, 3,6 g/L K₂HPO₄, dan 1,2 g/L KH₂PO₄ (modifikasi dari Udgire dkk., 2015). Kultur diinkubasi pada inkubator *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang (27 °C) selama 168 jam. Hasil *Enrichment* pada medium pertama sebanyak 5 mL diinokulasikan ke dalam media *Bushnell-Haas broth* kemudian dilakukan hal sama hingga *enrichment* ketiga. Kultur diinkubasi selama 168 jam sampai terbentuknya misel. *Enrichment* bertahap dilakukan untuk memperoleh strain bakteri yang efektif dalam mendegradasi minyak bumi (Udgire dkk., 2015).

Kultur bakteri pada *enrichment* ketiga, dibuat seri pengenceran hingga 10⁻⁷ dalam larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %) dengan perbandingan volume 1:9 (kultur: larutan garam fisiologis) (Panda & Sarkar, 2012). Suspensi bakteri diinokulasikan pada media *Bushnell-Haas agar* mengandung *bacto agar* 1,5 % yang telah ditambahkan minyak bumi sebanyak 25 µL dengan metode *spread plate*. Kultur diinkubasi dengan suhu 30 °C selama 120 jam. Isolat bakteri selanjutnya dimurnikan dalam medium *nutrient agar* menggunakan metode *kuadran streak*.

3.5 Pengukuran Kadar *Critical Micelle Concentration* Saponin *Sapindus rarak*

Tegangan antarmuka aquabides diukur setelah diberi saponin dengan menggunakan tensiometer *Du Nouy*. Saponin dilarutkan ke dalam aquades dengan konsentrasi 0, 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, dan 20 % dengan volume masing-masing larutan 20 mL. Campuran aquades dengan saponin diaduk hingga seluruhnya larut dalam air. Tensiometer *Du Nouy* dikalibrasi dengan cara memutar kalibrasi indikator hingga menunjukkan skala gaya tarik pada angka nol. Cincin *Du Nouy* dicelupkan ke masing-masing konsentrasi larutan saponin dalam tempat yang berisikan air hangat 50 °C yaitu etanol 22 mL, benzena 28,9 mL, gliserin 63,1 mL (Francy dkk., 1991). Cincin *Du Nouy* dipasang pada ujung lengan penahan cincin, kemudian sekrup penunjuk skala gaya tarik diputar hingga lengan penahan cincin mengambang. Nilai gaya tarik yang ditunjuk oleh kalibrasi indikator dicatat sebagai nilai dalam satuan dyne/cm. Larutan dituang ke dalam bejana dangkal dan diletakkan di atas penampang bejana dangkal. Letak cincin *Du Nouy* diatur tepat di tengah bejana dangkal dengan kedalaman permukaan atas cincin setara dengan permukaan larutan. Sekrup pemutar jarum penunjuk skala diputar perlahan-lahan searah jarum jam hingga cincin lepas dari permukaan larutan, kemudian besar gaya tarik yang ditunjuk jarum dicatat. Tegangan antarmuka dihitung dengan rumus 3 (Francy dkk., 1991).

$$\gamma = \gamma^{\circ} \times \frac{\theta}{\theta^{\circ}} \quad [3]$$

Keterangan:

γ = tegangan antarmuka sampel

γ° = tegangan antarmuka *Ultra High Pure Water*

θ = tegangan antarmuka sampel yang terbaca pada alat

θ° = tegangan antarmuka *Ultra High Pure Water* yang terbaca pada alat

3.6 Seleksi Bakteri Toleran terhadap Saponin yang Tidak Mendegradasi Saponin

Isolat bakteri diseleksi dengan dua tahap, terdiri dari tiga perlakuan konsentrasi saponin di tahap pertama, dan satu perlakuan di tahap kedua, masing-masing dengan tiga kali ulangan. Parameter yang diamati yaitu nilai *optical density* (OD) pertumbuhan bakteri pada medium yang digunakan. Seleksi tahap pertama dilakukan untuk mendapatkan isolat yang toleran terhadap saponin. Isolat diinokulasikan pada medium *nutrient broth* dan diinkubasi pada *shaker* dengan laju 120 rpm selama 20 jam pada suhu ruang. Nilai OD masing-masing isolat disetarakan kemudian diinokulasikan sebanyak 3 mL ke dalam 27 mL media *nutrient broth* dalam botol kultur yang mengandung saponin dengan masing-masing konsentrasi 0 %, 8 %, dan 12 %. Kultur diinkubasi dalam *shaker* pada suhu ruang, laju 120 rpm selama 72 jam. Pertumbuhan isolat bakteri dideteksi setiap hari menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Isolat yang menunjukkan pertumbuhan (OD tertinggi) pada konsentrasi tinggi saponin digunakan untuk seleksi tahap berikutnya. Seleksi tahap dua dilakukan untuk mendapatkan isolat yang tidak dapat memanfaatkan saponin sebagai sumber karbonnya. Isolat ditumbuhkan dalam media *Bushnell-Haas broth* dan diinkubasi pada *shaker* dengan suhu ruang, laju 120 rpm selama 20 jam. Nilai *optical density* (OD 600) dari masing-masing isolat disetarakan kemudian diinokulasikan sebanyak 3 mL ke dalam 27 mL media *Bushnell-Haas broth* dengan konsentrasi saponin 0,5 % dalam botol kultur. Kultur diinkubasi dalam *shaker* pada suhu ruang dengan laju 120 rpm selama 72 jam. Pertumbuhan isolat bakteri dideteksi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Bakteri yang tumbuh optimum menunjukkan kemampuan dalam memanfaatkan saponin sebagai sumber karbon, tidak digunakan lebih lanjut. Data dianalisis menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan $\alpha \leq 0,05$. Hasil yang berbeda nyata diuji lebih lanjut. Data dianalisis menggunakan *software* SPSS 16.0 for *Windows*. Isolat bakteri yang paling berpotensi dan toleran konsentrasi tinggi saponin tetapi tidak memanfaatkan saponin sebagai nutrisi pertumbuhannya, maka isolat tersebut dibuat stok dalam medium *nutrient agar* dan dibuat kurva pertumbuhannya.

3.7 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Hidrokarbonoklastik

Isolat terpilih disubkultur dengan cara sebanyak 3 ose diinokulasikan ke dalam medium *Bushnell-Haas broth* 50 mL mengandung minyak bumi 0,5 % diinkubasi pada *shaker* dengan laju 120 rpm pada suhu ruang selama 168 jam. Kultur sebanyak 10 mL diinokulasikan ke dalam medium *Bushnell-Haas broth* 100 mL dengan komposisi medium dan kondisi inkubasi yang sama.

Kurva standar jumlah sel bakteri dibuat menggunakan kultur berumur 120 jam yang ditumbuhkan dalam media *Bushnell-Haas broth* dan diencerkan dengan perbandingan kultur dalam media *Bushnell-Haas broth* (0:8; 1:7; 2:6; 3:5; 4:4; 5:3; 6:2; 7:1). Setiap seri pengenceran dihitung densitas atau jumlah sel bakteri secara langsung menggunakan hemositometer dengan mikroskop cahaya. Perbedaan nilai kerapatan optik media kultur menunjukkan densitas sel bakteri diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Data OD dan densitas sel setiap tingkat pengenceran media kultur tersebut dibuat kurva dengan nilai OD (sumbu y) dan jumlah sel bakteri (sumbu x). Kurva standar densitas sel digunakan untuk menentukan jumlah bakteri pada kultur pertumbuhan bakteri.

Kurva pertumbuhan dibuat dengan kultur bakteri sebanyak 5 mL ditumbuhkan ke dalam medium *Bushnell-Haas broth* 50 mL dengan minyak bumi 0,5 % diinkubasi dalam *shaker* dengan laju 120 rpm pada suhu ruang selama 120 jam. Nilai *optical density* masing-masing isolat disetarakan kemudian diinokulasikan sebanyak 10 mL ke dalam 100 mL medium *Bushnell-Haas broth* dengan minyak bumi 0,5 % yang diinkubasi dalam *shaker* dengan laju 120 rpm pada suhu ruang selama 120 jam. Kultur bakteri setiap 12 jam diambil 4 mL dan diukur OD pada panjang gelombang 600 nm. Data kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan hubungan antara waktu inkubasi dengan densitas sel bakteri untuk menentukan fase pertumbuhan yang digunakan sebagai kultur starter dan untuk menentukan satu isolat yang pertumbuhannya paling cepat untuk digunakan dalam uji TPH.

3.8 Uji Biodegradasi Minyak Bumi oleh Bakteri Terpilih dan Saponin

Isolat bakteri dalam medium *Bushnell-Haas agar* diinkubasi pada suhu 30 °C selama 336 jam. Isolat sebanyak 3 ose diinokulasikan ke medium *Bushnell-Haas broth* 50 mL dengan konsentrasi minyak bumi 0,5 % diinkubasi dalam *shaker* pada suhu ruang dengan laju 120 rpm selama 57 jam. Kultur bakteri sebanyak 10 mL diinokulasikan ke dalam medium *Bushnell-Haas broth* 100 mL dengan komposisi seperti tabel 2. Masing-masing kultur diinkubasi ke dalam inkubator *shaker* pada suhu ruang. Medium kultur pada umur inkubasi 10 dan 30 hari diukur kadar total petroleum hidrokarbonnya.

Tabel 2. Komposisi masing-masing perlakuan biodegradasi hidrokarbon dalam medium *Bushnell-Haas broth*

Perlakuan	Komposisi		
	Isolat Bakteri	Minyak bumi (0,5 %)	Saponin (0,5 %)
PH1	+	+	+
PH2	+	+	-
PH3	-	+	+
Kontrol	-	+	-

Keterangan :

PH (perlakuan hidrokarbon)

K (Kontrol)

+ (komposisi yang ada dalam medium)

- (komposisi yang tidak terdapat dalam medium)

Kadar TPH dalam media kultur diukur dengan prinsip gravimetri (modifikasi Panda & Sarkar, 2012). Medium kultur bakteri ditambahkan dengan 1 mL HCL untuk menghentikan aktivitas bakteri. Sampel kultur bakteri diekstraksi menggunakan corong pisah kapasitas 100 mL. Sampel kultur bakteri 50 mL dan 30 mL n-heksana dimasukkan dalam corong pisah, dikocok perlahan dan memutar selama 5 menit kemudian didiamkan

sampai larutan n-heksana terpisah dan terbentuk lapisan n-heksana dan air. Lapisan n-heksana mengandung minyak bumi yang belum terdegradasi. Lapisan air dibuang, n-heksana disaring dengan kertas saring (*whatman*) yang diolesi dengan Na_2SO_4 sebanyak 0,5 g tanpa diberikan air. Supaya Na_2SO_4 tidak masuk ke dalam botol maka kertas saring dilapisi sebanyak 2 kali dengan urutan kertas saring- Na_2SO_4 -kertas saring- Na_2SO_4 . Filtrat ditampung dalam botol kultur yang telah ditimbang beratnya. Proses ini dilakukan hingga seluruh larutan hasil degradasi terekstraksi. Botol kultur dimasukkan ke dalam oven tanpa tutup dengan suhu 50°C selama 48 jam atau sampai n-heksana habis menguap dan yang tersisa hanya minyak bumi. Botol kultur dikeluarkan dari oven dan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang, kemudian ditimbang dan dicatat berat botol kultur yang telah terdapat sisa minyak bumi didalamnya. Data dianalisis *One Way Analysis of Varians* (ANOVA) dengan $\alpha \leq 0,05$. Data dianalisis menggunakan *software* SPSS 16.0 for Windows.

Kadar *minyak bumi* dihitung dengan rumus 4 (Nababan, 2008).

$$\text{TPH} = \text{W2} - \text{W1} \quad [4]$$

Keterangan:

W2 = berat botol kultur dengan *minyak bumi* yang diperoleh (g)

W1 = berat botol kultur kosong (g)

Minyak bumi yang terdegradasi dapat diketahui dengan rumus 5 (Nababan, 2008).

$$\text{TPH Degradasi} = \frac{\text{hasil TPH kontrol (awal)} - \text{hasil TPH perlakuan}}{\text{hasil TPH kontrol}} \times 100\% \quad [5]$$

3.9 Identifikasi Bakteri Berdasarkan Sekuen 16S rDNA

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media *nutrient agar* dengan metode *pour plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Kromosom DNA bakteri diisolasi menggunakan *i-genomic Soil DNA Extraction Mini Kit* dari *iNtRON Biotechnology, Inc.* Masing-masing isolat bakteri diambil tiga koloni dan disuspensikan ke dalam 50 μL akuades steril pada *microtube* 1,5 mL. Suspensi sel bakteri ditambahkan larutan EG sebanyak 400 μL dan larutan *inhibitor remover* sebanyak 80 μL kemudian dihomogenasi menggunakan vortex selama 10 menit. Sampel disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL ditambahkan larutan EPT 100 μL dan diinkubasi dalam es selama satu menit. Sampel disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama tiga menit. Supernatan sebanyak 300 μL dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru dan ditambahkan larutan *buffer* EB 300 μL dibolak-balik sebanyak 5-6 kali. Sampel ditambahkan 300 μL etanol 100 % dan dihomogenasikan dengan cara dibolak-balik sebanyak 5-6 kali. Sampel sebanyak 800 μL ditambahkan ke dalam *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama

satu menit, dan larutan yang masuk ke dalam *collection tube* dibuang. Sampel ditambahkan sisa sampel 100 μL dan disentrifus dengan kecepatan dan waktu yang sama. Larutan yang masuk ke dalam *collection tube* dibuang. *Spin column* berisi sampel dipindahkan pada *collection tube* yang baru. Sampel ditambahkan 700 μL larutan *buffer* EWA yang sudah ditambahkan 28 mL etanol. Sampel disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama satu menit, larutan yang masuk ke dalam *collection tube* dibuang. Sampel ditambahkan 700 μL larutan *buffer* EWB yang ditambahkan 40 mL etanol. Sampel disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama satu menit, larutan yang masuk ke dalam *collection tube* dibuang. Sampel disentrifus kembali, larutan yang masuk ke dalam *collection tube* dibuang, *Spin column* dipindahkan ke dalam *microtube* 15 mL yang baru. Sampel ditambahkan 50 μL *buffer* EE dan diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit. Sampel disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama satu menit. *Spin column* dibuang, dan *genomic DNA* yang tertinggal di *microtube* disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suspensi DNA dikonfirmasi keberadaannya dengan elektroforesis gel agarosa, sedangkan kemurnian dan konsentrasinya diketahui dengan spektrofotometer Nanodrop.

Kromosomal DNA dielektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8 %. Agarosa sebanyak 0,24 g dilarutkan dalam 30 mL TBE dengan pemanasan hingga mendidih. Sebelum memadat agarosa ditambahkan *ethidium bromide* sebanyak 2 μL kemudian dituangkan pada cetakan yang telah dipasang sisir pembentuk sumuran sampel. Gel agarosa yang telah padat dan cetakannya dimasukkan ke dalam *chamber* berisi *buffer* TBE sampai gel terendam. Masing-masing sumuran diisi campuran suspensi DNA dan *loading dye* dengan perbandingan 1:1. *Power supply* dinyalakan dan dilakukan *running* selama 20 menit pada tegangan 100 volt. Setelah *running* berakhir, gel dipindahkan ke UV-transiluminator untuk visualisasi DNA. Hasil yang diperoleh didokumentasi dengan program GelDoc untuk disimpan hasilnya pada komputer dan dianalisis kualitas serta kuantitasnya.

Sekuen 16S rDNA diamplifikasi menggunakan *forward primer* 27f (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG -3') dan *reverse primer* 1495r (5'- CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA -3') (Gochhait dkk., 2007). Sekuen 16S rDNA diamplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi PCR mix yang ditampilkan pada tabel 3. Program PCR amplifikasi 16S rDNA meliputi denaturasi awal $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus denaturasi $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik, *annealing* $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik dan ekstensi $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 1,5 menit dan diakhiri dengan ekstensi akhir pada $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 7 menit. Hasil yang diperoleh dikonfirmasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5 %.

Amplifikon 16S rDNA disekuensing di 1st BASE PT. *Genetika Science* (Jakarta). Sekuen diukur menggunakan *software sequence scanner*. Sekuen 16S rDNA dari kedua primer digabungkan dengan fitur *contig*. Sekuen diedit menggunakan *software BioEdit* dan MEGA 5. Sekuen dilakukan *BLAST* untuk mengidentifikasi spesies isolat bakteri dengan cara dibandingkan dengan sekuen-sekuen lain yang terdapat di *database National Center Biotechnology Information*.

Tabel 3. Komposisi *Polymerase Chain Reaction*

Bahan	Volume	Konsentrasi akhir
GoTaqGreen Master Mix, 2x	25 µL	1 x
<i>Forward primer</i> (27f), 10 µM	2 µL	0,1-1,0 µM
<i>Reverse primer</i> (1495r), 10 µM	2 µL	0,1-1,0 µM
DNA <i>template</i>	2 µL	40-250 ng
<i>Nuclease-free water</i>	19 µL	

Sumber: (Anonymous, 2016)

Isolat teridentifikasi dengan nilai similaritas tertinggi dianalisis dengan *database* NCBI dan dibuat pohon filogeni. Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan *phylogeny* yang terdapat di MEGA 5 dengan *bootstrap* 1000, diinferensi menggunakan metode *Neighbor Joining* dianalisis menurut model *Tamura-Nei*. Hasil identifikasi spesies secara filogeni tersebut menunjukkan hubungan kekerabatan berdasarkan garis keturunan dan jarak evolusi isolat, serta matriks similaritas berdasarkan persentase jumlah nukleotida yang sama dan berbeda antar isolat (Suharjono & Setia., 2015).

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Parameter Fisiko-Kimiawi Tanah Pertambangan di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro

Bahan organik dari ketiga titik sampling tanah pertambangan berkisar 0,53 % sampai 0,68 % (Tabel 4), sedangkan tanah dapat dikatakan normal jika kadar bahan organiknya berkisar 3 – 5 % (Hakim dkk., 1986). Tanah di lokasi tersebut lebih didominasi oleh zat kapur sehingga menyebabkan bahan organiknya rendah. Keasaman (pH) tanah di titik sampling A, B, dan C yaitu 6,82, 6,54, dan 7,20. Kadar air pada titik sampling A sebesar 32,54 %, titik sampling B sebesar 32,06 % dan titik sampling C sebesar 32,24 %. Normalnya tanah memiliki kadar air dari 60 % hingga 80 % (Wesley, 2012). Suhu udara berkisar 32° C – 33° C, sedangkan suhu tanah berkisar 33° C - 34° C. Data penelitian menunjukkan pencemaran minyak bumi pada tanah mengakibatkan bahan organik tanah di tiga lokasi tersebut tergolong rendah sehingga memengaruhi faktor lingkungan lainnya. Korelasi positif dan signifikan ($\alpha < 0,05$) antara faktor fisiko-kimiawi dapat dilihat pada lampiran tabel 2. Selain itu, penghijauan atau tingkat kerindangan di lokasi tersebut juga sangat kurang dibuktikan dengan data intensitas cahaya di ketiga lokasi tersebut. Intensitas cahaya di titik sampling A yaitu 2549 lux lebih tinggi ($\alpha < 0,05$) daripada titik sampling B dan C, dikarenakan tingkat kerindangan di lokasi titik sampling A sangat rendah. Intensitas cahaya, suhu udara dan suhu tanah yang tinggi, berpengaruh terhadap rendahnya kadar air tanah. Semakin tinggi suhu tanah maka akan semakin rendah kadar air tanahnya. Suhu tanah di lokasi tersebut tergolong tinggi diakibatkan adanya kegiatan pembakaran gas suar (*flaring*) di lokasi pengeboran migas tepatnya di beberapa sumur di dekat lokasi titik sampling A dan titik sampling C. Selain itu, data diambil pada siang hari pukul 13.00, sehingga menyebabkan suhu tanah meningkat karena sinar matahari yang tinggi menyebabkan rendahnya kadar air tanah karena semua kering diserap oleh panas matahari.

Tabel 4. Faktor fisiko-kimiawi tanah dari lokasi pengambilan sampel

Variabel analisa	Konsentrasi Variabel		
	Titik Sampling A	Titik Sampling B	Titik Sampling C
pH	6,82b	7,20c	6,54a
Suhu udara (°C)	33,05b	32,94a	33,04b
Suhu tanah (°C)	34,18b	33,94a	34,46c
Kadar air tanah %	32,54a	32,06a	32,24a
Intensitas cahaya (lux)	2549c	1970a	2217b
Bahan organik tanah (%)	0,53a	0,68c	0,57b

4.2 Isolat Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Lokasi Penambangan Minyak Bumi Tradisional di Wonocolo

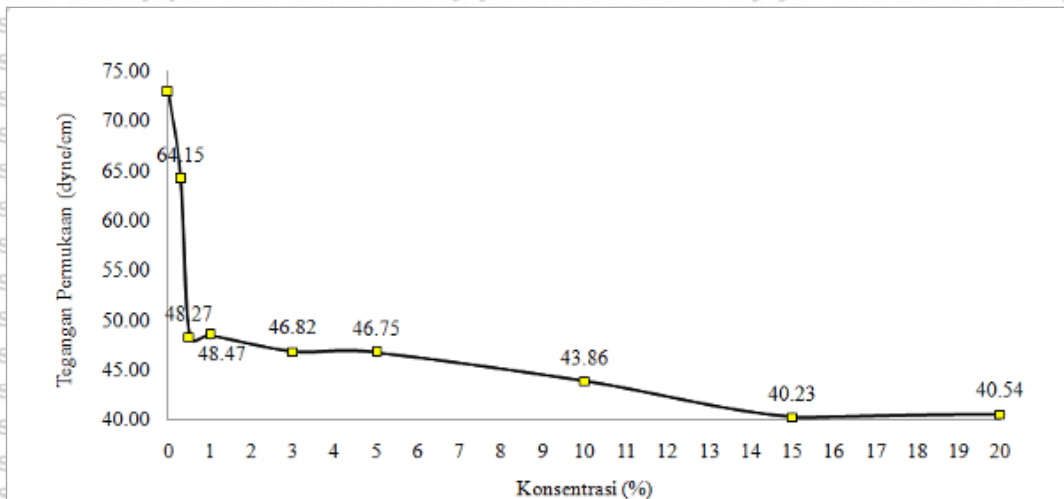
Sampel tanah dari ketiga titik sampling diisolasi dengan metode *enrichment*. Diantara ketiga titik sampling, isolat bakteri paling banyak ditemukan di titik sampling A karena lokasinya berada di atas bukit dengan ketinggian 192 m. Suhu tanah di titik sampling A lebih tinggi karena intensitas cahaya yang masuk ke tanah lebih banyak. Bakteri hidrokarbonoklastik dapat tumbuh lebih banyak di lokasi yang memiliki suhu tinggi $> 33\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Wesley, 2012), karena itu di titik sampling A bakteri yang ditemukan lebih bervariasi dibandingkan di titik sampling B yang berlokasi di bawah bukit dan titik sampling C yang berlokasi di dekat saluran air. Bakteri yang berhasil diisolasi dari tanah tercemar hidrokarbon di tiga titik sampling yaitu tiga puluh empat isolat. Berdasarkan pewarnaan Gram, enam isolat adalah Gram positif dan dua puluh delapan isolat adalah Gram negatif dengan bentuk sel kokus dan basil (Lampiran tabel 1). Morfologi koloni serupa yaitu berbentuk bulat, delapan belas koloni bakteri memiliki elevasi flat, sedangkan enam belas koloni memiliki elevasi konveks. Koloni bakteri ukurannya bervariasi dari 0,32 – 2,28 mm. Sel bakteri berbentuk kokus berjumlah enam isolat dan sel bakteri berbentuk basil berjumlah dua puluh delapan isolat. Banyaknya isolat yang berhasil diisolasi dari sampel tanah ini disebabkan proses *enrichment* yang dilakukan sebanyak tiga kali, nutrisi untuk pertumbuhan bakteri tersedia sehingga bakteri dapat tumbuh lebih banyak. Semua isolat tersebut ditumbuhkan pada medium selektif *Bushnell-Haas agar*.

4.3 Nilai *Critical Micelle Concentration* (CMC) berdasarkan Tegangan Antarmuka air

Tegangan antarmuka saponin diukur antara 0,3 % hingga 20 %. Air yang digunakan sebagai kontrol memiliki nilai tegangan antarmuka sebesar 110,5 dyne/cm. Air mempunyai tegangan antarmuka yang lebih besar dibandingkan kebanyakan cairan lainnya dikarenakan gaya kohesifnya lebih besar berdasarkan ikatan hidrogennya (Charlena, 2009). Data penelitian menunjukkan, semakin tinggi konsentrasi saponin yang diberikan maka tegangan antarmuka akan semakin rendah (Gambar 8).

Pada konsentrasi 0,3 % hingga 0,5 % saponin, tegangan antarmuka menurun dari 64,15 dyne/cm menjadi 48,27 dyne/cm, kemudian pada konsentrasi 1 % saponin, tegangan antarmuka kembali naik menjadi 48,47 dyne/cm (Gambar 8). Konsentrasi 1 % hingga 20 % saponin nilai CMC-nya menunjukkan angka yang konstan, karena saponin tidak mampu lagi menurunkan tegangan antarmuka sehingga stabilitas emulsi cenderung tetap hingga

konsentrasi 20 % (Jaya, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa nilai CMC untuk surfaktan saponin dari *sapindus rarak* terletak pada konsentrasi 0,5 % saponin. Konsentrasi tersebut yang digunakan sebagai acuan pada tahap seleksi dalam medium *Bushnell-Haas broth* dan untuk pengujian kadar penurunan total petroleum hidrokarbon.

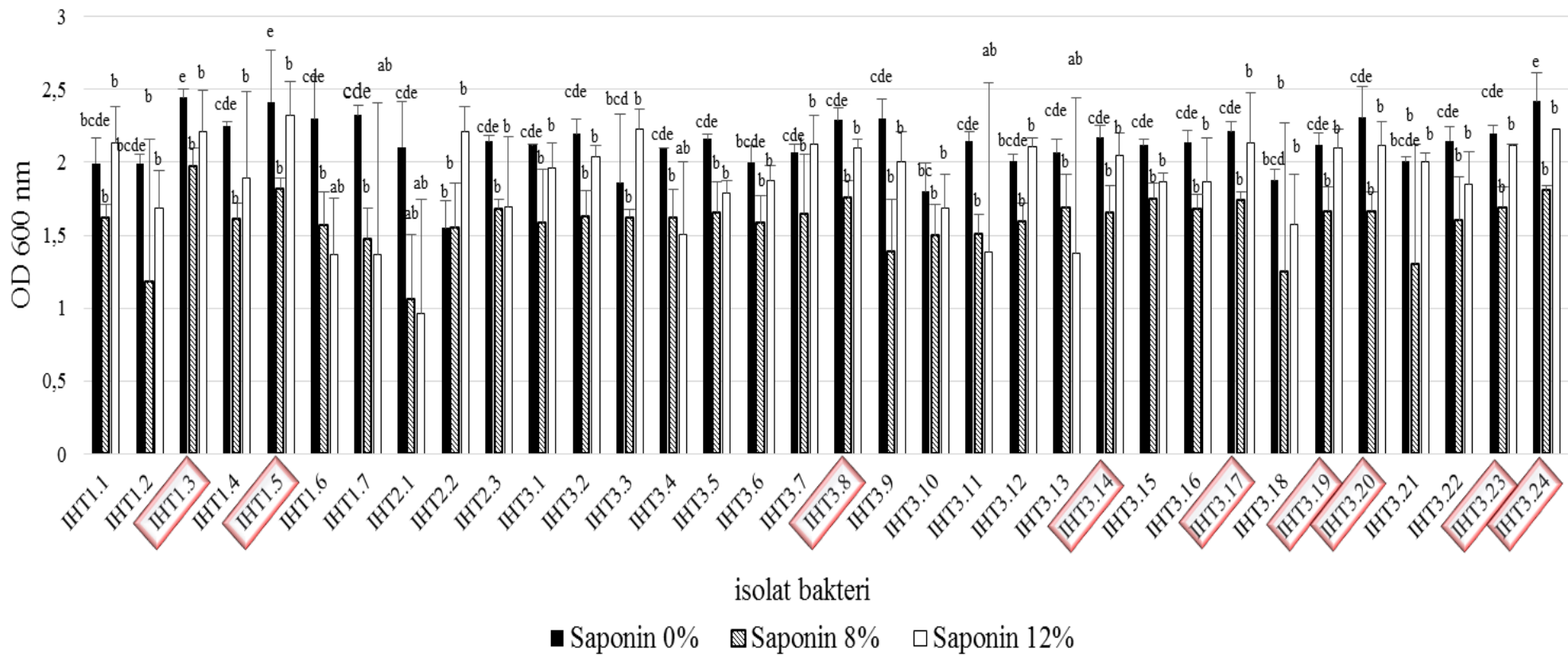


Gambar 8. Pengaruh berbagai konsentrasi saponin terhadap tegangan antarmuka air

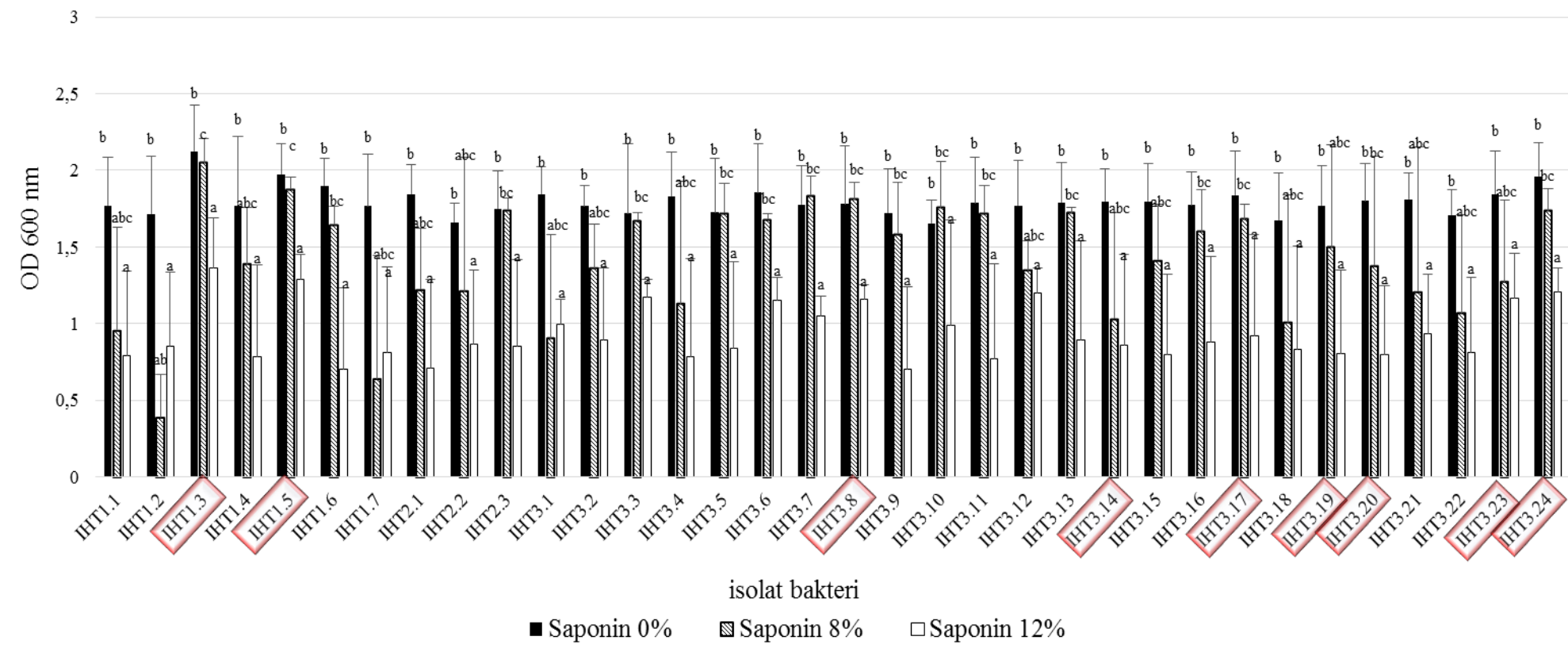
4.4 Isolat Bakteri Hidrokarbonoklastik yang Mampu Bersinergi dengan Saponin

Bakteri hidrokarbonoklastik diseleksi berdasarkan kemampuan pertumbuhannya pada medium *nutrient broth* dan *Bushnell-Haas broth*. Tahap pertama, isolat bakteri diinokulasikan pada medium *nutrient broth* dengan konsentrasi 0 %, 8 %, dan 12 % saponin. Bakteri hasil seleksi pertama berjumlah sembilan isolat yaitu IHT1.3, IHT1.5, IHT3.8, IHT3.14, IHT3.17, IHT3.19, IHT3.20, IHT 3.23, IHT3.24 (Gambar 9). Densitas sel bakteri hari kedua dan ketiga tidak berbeda nyata (Gambar 10 & 11), sehingga data hasil seleksi pada hari pertama menjadi acuan untuk seleksi tahap kedua.

Bakteri hidrokarbonoklastik tumbuh secara signifikan pada hari pertama di dalam medium yang mengandung saponin. Nilai OD bakteri hidrokarbonoklastik tersebut tidak berbeda nyata pada inkubasi hari kedua dan ketiga. Hal ini menunjukkan kultur bakteri berada pada fase pertumbuhan stasioner, jumlah sel baru yang diproduksi sama dengan jumlah sel yang mati atau pertumbuhannya sepenuhnya berhenti dan menghasilkan pertumbuhan yang konstan (Marecik dkk., 2012). Hal ini disebabkan bakteri kehabisan nutrisi, penurunan pH ataupun kurangnya udara pada medium, menyebabkan sel bakteri mengalami perubahan secara fisiologis. Perubahan ini bertujuan agar sel tetap bertahan hidup pada periode waktu yang lebih lama ataupun pada kondisi yang buruk sampai kondisi menjadi optimal (penambahan nutrisi) (Carrero-Colon dkk., 2006). Fase pertumbuhan



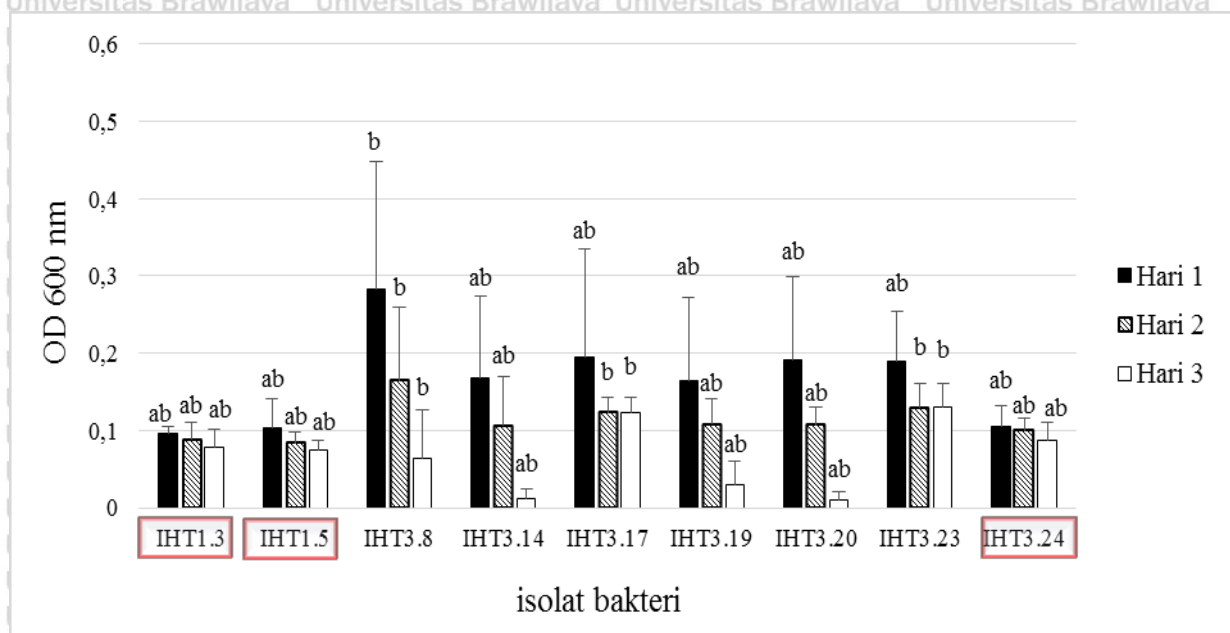
Gambar 9. Densitas sel dari bakteri hidrokarbonoklastik dalam medium *nutrient broth* dengan penambahan saponin pada hari pertama (pigura merah menunjukkan isolat yang memiliki toleransi tinggi terhadap saponin)



Gambar 10. Densitas sel dari bakteri hidrokarbonoklastik dalam medium *nutrient broth* dengan penambahan saponin pada hari kedua (pigura merah menunjukkan isolat yang memiliki toleransi tinggi terhadap saponin)

stasioner ini dibuktikan dengan tidak adanya perubahan pertumbuhan yang signifikan (peningkatan kepadatan sel secara signifikan) pada waktu inkubasi hari kedua dan ketiga (Gambar 10 & 11). Adanya saponin dengan beberapa konsentrasi, tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan sel bakteri. Ekstrak saponin dari beberapa tumbuhan diketahui mampu menyebabkan berbagai macam mekanisme toksisitas sel mulai dari tingkat selular hingga molekular (Guo dkk., 2008). Hasil penelitian ini menunjukkan, saponin dengan konsentrasi 12 % tidak berdampak negatif pada pertumbuhan bakteri hidrokarbonoklastik. Sebanyak sembilan isolat yang dipilih mampu tumbuh dengan baik karena bakteri tersebut memiliki resistensi yang tinggi terhadap konsentrasi saponin yang tinggi. Pertumbuhan bakteri sangat baik diduga karena medium yang digunakan adalah medium *nutrient broth* yang kaya akan nutrisi. Pada penelitian lain dijelaskan bahwa saponin dengan konsentrasi 10 % dapat memiliki efek toksik pada beberapa sel bakteri (Soeder dkk., 1996). Bakteri yang toleran saponin 12 % diuji aktivitas degradasi saponinnya.

Tahap kedua, sembilan isolat bakteri diinokulasi ke dalam medium *Bushnell-Haas broth* dengan konsentrasi saponin 0,5 % (Al-Wasify & Hamed, 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tiga isolat yaitu IHT1.3, IHT1.5, dan IHT3.24, tidak menggunakan saponin sebagai sumber karbon tunggal untuk nutrisi pertumbuhan. Isolat tersebut memiliki OD yang sama selama tiga hari waktu inkubasi, OD kurang dari 0,1 (Gambar 12). Isolat lain dari bakteri hidrokarbonoklastik tumbuh secara signifikan pada inkubasi hari pertama dan kepadatan selnya menurun secara signifikan pada waktu inkubasi kedua dan ketiga. Keenam isolat tersebut mampu menggunakan saponin sebagai sumber karbon tunggal untuk nutrisi pertumbuhan. Jadi, keenam isolat tersebut tidak dipilih sebagai kandidat bakteri hidrokarbonoklastik. Pertumbuhan bakteri pada seleksi tahap kedua dengan medium *Bushnell-Haas broth* jauh lebih rendah dibandingkan seleksi tahap pertama pada medium *nutrient broth* dikarenakan nutrisi pada medium *Bushnell-Haas broth* hanya mengandung mineral saja. Ketiga isolat bakteri hidrokarbonoklastik dipilih berdasarkan kemampuan tumbuh pada medium *nutrient broth* yang mengandung saponin pada konsentrasi tinggi dan berdasarkan ketidakmampuannya menggunakan saponin sebagai sumber karbon tunggal sebagai nutrisi pertumbuhan.



Gambar 12. Densitas sel dari bakteri hidrokarbonoklastik dalam medium *Bushnell-Haas broth* dengan konsentrasi 0,5 % saponin (semua isolat memiliki nilai OD 0,1 pada jam ke-0 setelah inokulasi dan pigura merah menunjukkan isolat yang tidak memanfaatkan saponin untuk pertumbuhannya)

4.5 Pola Pertumbuhan Bakteri Hidrokarbonoklastik Terpilih

Pola pertumbuhan dari ketiga isolat pada fase adaptasi terjadi selama 24 jam, dilanjutkan dengan fase eksponensial yaitu fase bakteri aktif membelah dan responsif. Fase eksponensial isolat IHT1.3 terjadi selama 144 jam dimulai dari jam 24, IHT1.5 dan IHT3.24 terjadi selama 120 jam dimulai dari jam 24 (Lampiran Gambar 2). Pada fase ini terjadi pembelahan biner, sehingga isolat bakteri dapat diambil untuk digunakan sebagai starter untuk uji penurunan kadar hidrokarbon. Fase stasioner dan kematian pada jam terakhir terjadi selama 168 jam dimulai dari jam 148. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah walaupun nutrisi sudah mulai habis. Data penelitian lain menjelaskan bahwa *Actinobacillus* sp. dan *Micrococcus* sp. LII yang merupakan bakteri hidrokarbonoklastik menunjukkan fase eksponensial setiap 48 jam dan berhenti pada jam 192 (Sumarsih dkk., 2017). Selain itu Sumarsih dkk., (2017) menjelaskan bahwa fase eksponensial *Pseudomonas putida* TI dalam medium mineral dengan konsentrasi hidrokarbon 1 % terjadi selama 192 jam dan dimulai dari jam 96. Fase eksponensial dari IHT1.3, IHT1.5, dan IHT3.24 lebih cepat dibandingkan isolat bakteri *Actinobacillus* sp., *Micrococcus* sp. LII, dan *Pseudomonas putida* TI. Jenis dan jumlah hidrokarbon yang diinokulasikan ke dalam medium mineral berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan

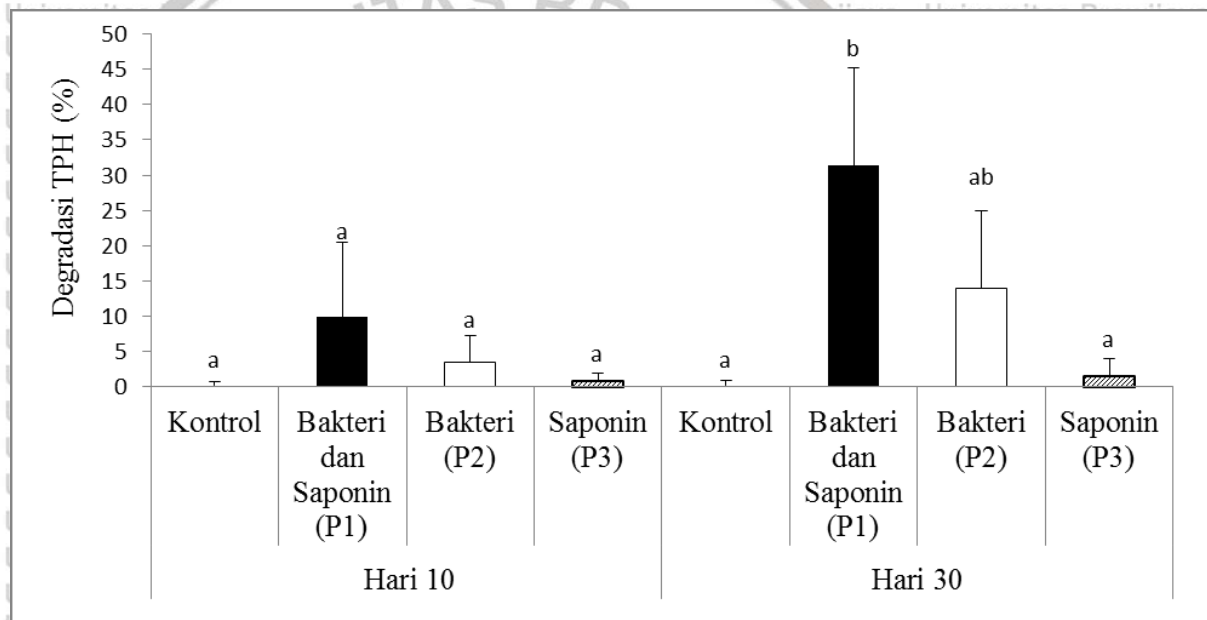
isolat bakteri. Hidrokarbon yang digunakan oleh IHT1.3, IHT1.5, dan IHT3.24 dalam medium mineral yaitu hidrokarbon minyak bumi, sedangkan hidrokarbon yang digunakan oleh beberapa isolat bakteri dari penelitian Sumarsih dkk., (2017) yaitu hidrokarbon jenis *hexadecane*, *naphthalene* dan *toluenes*.

Kecepatan pertumbuhan dari masing-masing isolat dihitung untuk menentukan isolat yang digunakan pada uji TPH. Isolat yang dipilih yang memiliki laju pertumbuhan paling cepat. Data penelitian menunjukkan, kecepatan pertumbuhan dari IHT1.3 adalah 0,025 generasi/jam, IHT1.5 adalah 0,029 generasi/jam, dan IHT3.24 adalah 0,055 generasi/jam. Setiap bakteri memiliki waktu tumbuh yang berbeda-beda. Rendahnya pertumbuhan dari masing-masing isolat dikarenakan medium yang digunakan adalah medium mineral dengan komposisi 0,5 % minyak bumi sebagai satu-satunya sumber karbon dalam medium tersebut. Titik maksimal densitas sel IHT1.3, IHT1.5, dan IHT3.24 yaitu berkisar $6,93 \times 10^7$ CFU/mL, sampai dengan $8,48 \times 10^8$ CFU/mL. Data hasil penelitian ketiga isolat, IHT3.24 memiliki laju pertumbuhan yang paling cepat dibandingkan dengan IHT1.3 dan IHT1.5, sehingga isolat tersebut digunakan untuk tahap berikutnya yaitu untuk uji TPH.

4.6 Penurunan Total Petroleum Hidrokarbon oleh Saponin dan IHT3.24

Total petroleum hidrokarbon yang terdegradasi pada hari ke-10 inkubasi *shaker* untuk perlakuan kombinasi bakteri IHT3.24 dan saponin (P1), bakteri IHT3.24 (P2) dan saponin (P3) relatif sama ($\alpha > 0,05$), meskipun demikian ada kecenderungan peningkatan TPH yang terdegradasi pada perlakuan bakteri IHT3.24 dan saponin (P1) serta bakteri IHT3.24 saja (P2) (Gambar 13). Senyawa yang terdegradasi terdiri dari alifatik, alisiklik, dan aromatik. Mekanisme degradasi perlakuan kombinasi bakteri dan saponin dimulai pada tahap saponin mensolubilisasi minyak bumi yang ada di dalam medium cair atau mengubah minyak tersebut menjadi partikel-partikel yang lebih kecil sehingga lebih mudah menempel pada sel bakteri. Selanjutnya, hidrokarbon masuk ke sel bakteri diproses dengan enzim monoksigenase atau dioksigenase dengan mekanisme degradasi alifatik, alisiklik, dan aromatik. Perlakuan saponin dan bakteri IHT3.24 (P1) pada hari ke-10 mampu mendegradasi minyak bumi sebanyak 13,4 % dan pada hari ke-30 terjadi peningkatan degradasi hingga 38,2 % pada pH 6,8. Penurunan minyak bumi terjadi 2 kali lipat dari 13,4 % menjadi 38 %. Data penelitian sebelumnya, bakteri *Pseudomonas* yang diisolasi dari air tercemar minyak bumi di daerah Beijing, China dikombinasikan dengan surfaktan sintetik yaitu Brij 30 dan Tween 80 berturut-turut mampu mendegradasi minyak sebesar 47,3 % dan

48,0 % dalam waktu inkubasi 14 hari (Tian dkk., 2016). Isolat *Rhodococcus* sp. yang dikombinasikan dengan tween 80 pada pH 7 mampu mendegradasi minyak bumi sebesar 23 % dalam waktu 60 hari inkubasi (Chekroun dkk., 2018). Proses degradasi dari kombinasi saponin dan bakteri IHT3.24 lebih lambat dibandingkan kombinasi *Pseudomonas* dan surfaktan sintetik, tetapi lebih cepat dibandingkan isolat *Rhodococcus* sp. yang dikombinasikan dengan tween 80. Surfaktan sintetik diatur dengan pH yang sedikit basa, sedangkan biosurfaktan pHnya netral. Keasaman (pH) optimum untuk degradasi hidrokarbon dalam medium cair yaitu 6,8 – 7,6 (Udiharto, 1996). Keasaman (pH) yang digunakan oleh *Pseudomonas* dalam medium cair yaitu 7,5 (Tian dkk., 2016), berbeda dengan kombinasi saponin dan bakteri IHT3.24 yang menggunakan pH netral yaitu 6,8. Perlakuan IHT3.24 (P2) mampu mendegradasi minyak bumi sebanyak 4 % pada hari ke-10 dan meningkat menjadi 20 % pada hari ke-30. Data penelitian lain, isolat *Ochrobactrum*



Gambar 13. Degradasi minyak bumi dalam medium *Bushnell-Haas broth* konsentrasi minyak bumi 0,5 % pada masing-masing perlakuan dan kontrol *Ochrobactrum* yang diisolasi dari tanah tercemar minyak bumi di Burnpur, India diketahui mampu mendegradasi minyak sebanyak 40 % dengan pH 7 selama 21 hari masa inkubasi (Bhattacharya dkk., 2015). Sedangkan, isolat *Rhodococcus* sp. yang diisolasi dari air tercemar minyak bumi di Algeria, mampu mendegradasi minyak bumi sebesar 18 % dalam waktu 60 hari inkubasi (Chekroun dkk., 2018). Bakteri IHT3.24 yang diisolasi dari tanah tercemar minyak bumi di Desa Wonocolo, mampu mendegradasi minyak bumi sebesar 20 % dengan pH 6,8 dalam waktu inkubasi 30 hari. Bakteri IHT3.24 lebih baik dalam

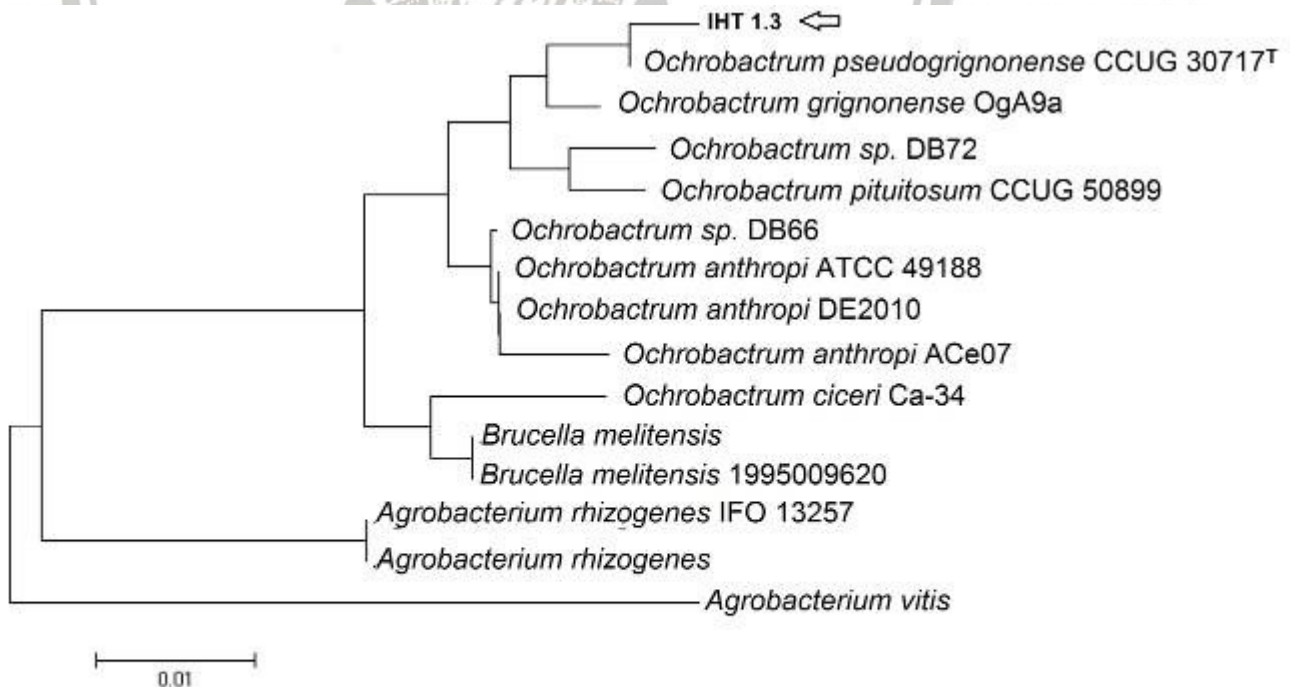
mendegradasi minyak bumi dibandingkan dengan isolat *Rhodococcus* sp. yang hanya mampu mendegradasi 18 % dalam waktu 30 hari. Perlakuan pH dan waktu inkubasi sangat berpengaruh terhadap laju proses degradasi. Deng dkk., (2014) menjelaskan bahwa tingkat degradasi tertinggi dari minyak bumi pada isolat *Achromobacter* sp. HZ01 terjadi pada pH 7,5 sebanyak 95 % dalam waktu inkubasi 30 hari. Semakin tinggi pH medium maka semakin cepat proses degradasi berlangsung. Hal ini dibuktikan dari penelitian *Achromobacter* sp. HZ01 dan *Ochrobactrum* menggunakan pH 7 – 7,5 dalam proses degradasi minyak, sedangkan IHT3.24 hanya menggunakan pH 6,8. Semakin tinggi pH dalam medium maka semakin banyak minyak yang terdegradasi. Pada pH 6,5 - 5 laju degradasi hidrokarbon menurun drastis karena pada level tersebut, dapat menyebabkan transpor membran dan keseimbangan reaksi bakteri terganggu sehingga terjadi penghambatan pada sebagian besar proses degradasi minyak bumi (Thavasi dkk., 2007). Perlakuan saponin (P3) pada hari ke-10 maupun pada hari ke-30 hasilnya tidak berbeda nyata dengan kontrol karena saponin tidak mendegradasi minyak tetapi mendispersi. Perlakuan saponin (P3) dalam medium mineral cair, diperoleh hasil bahwa ada sekitar 1 % minyak bumi yang teremulsi baik pada waktu 10 atau 30 hari. Hal ini disebabkan proses penguapan n-heksan teremulsi di dalam oven pada suhu 50° C. Pada suhu tersebut n-heksan dan senyawa hidrokarbon yang berat molekulnya rendah akan menguap (Canipa-Morales dkk., 2003).

4.7 Spesies Bakteri Hidrokarbonoklastik Berdasarkan Sekuen 16S rDNA

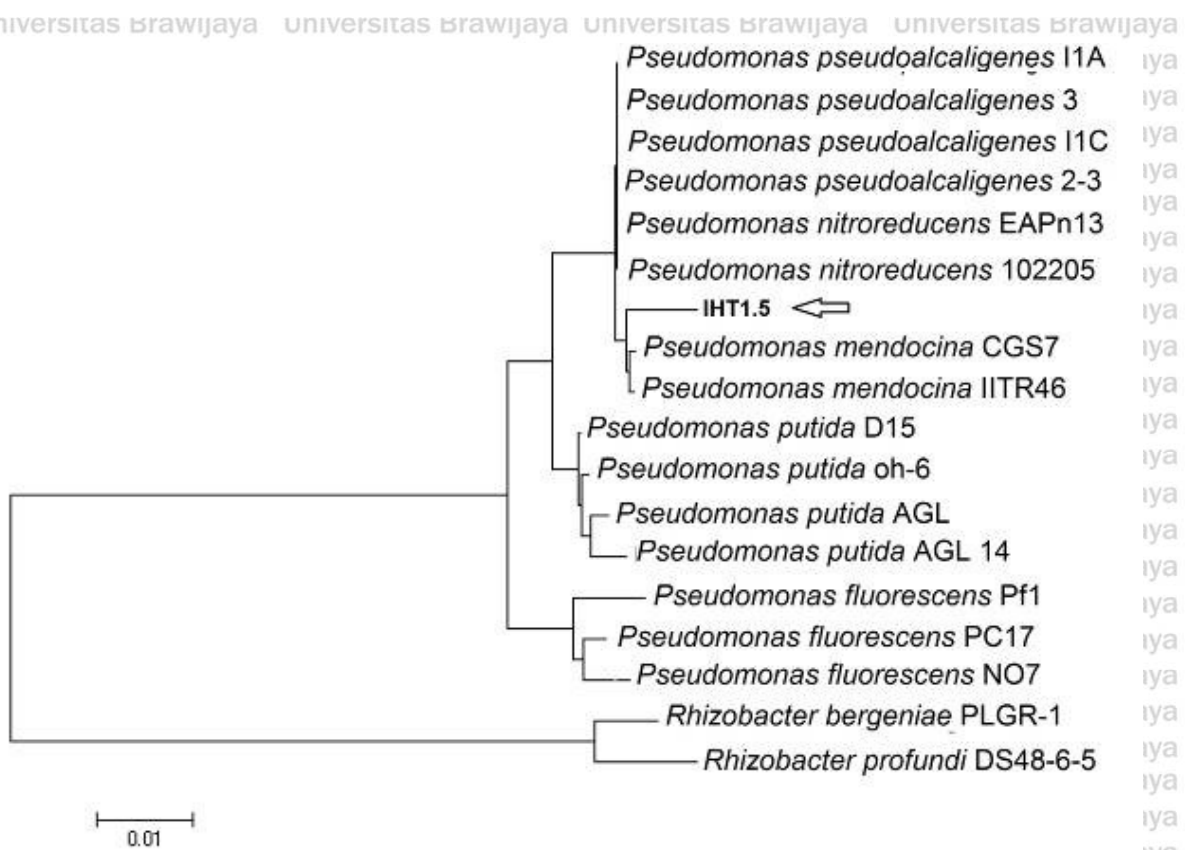
Bakteri hidrokarbonoklastik yang toleran dan tumbuh pada konsentrasi tinggi saponin dan tidak mendegradasi saponin adalah IHT3.24, IHT1.3, dan IHT1.5, berturut-turut teridentifikasi sebagai Spesies *Ochrobactrum puitosum* similaritas 97,8 %, *Ochrobactrum pseudogrignonense* similaritas 99,6 %, dan *Pseudomonas mendocina* similaritas 99,2 %. Pohon filogeni ditampilkan pada Gambar 14,15, dan 16. *Ochrobactrum* adalah bakteri Gram-negatif dengan bentuk basil yang terdistribusi secara luas di alam. *Ochrobactrum* banyak ditemukan di sampel klinis dan di lingkungan yang tercemar minyak bumi, baik di tanah dan juga di air (Trepia dkk., 2018). *Ochrobactrum* secara fenotip dan genotip sangat mirip dengan Genus *Brucella*, sehingga sering terjadi kesalahan identifikasi. *Ochrobactrum* adalah bakteri tanah saprofitik sedangkan *Brucella* adalah patogen yang sangat efektif melakukan replikasi di dalam sel dan dapat menyebabkan penyakit kronis pada sejumlah hewan dan manusia (Christopher dkk., 2010; Hagiya dkk., 2013). *Ochrobactrum* sp. dapat

tumbuh dengan baik dalam kondisi medium yang mengandung hidrokarbon sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. *Ochrobactrum* sp. dapat menurunkan berbagai senyawa hidrokarbon tercemar di tanah ataupun air (Bhattacharya dkk., 2015). Beberapa senyawa hidrokarbon yang telah dilaporkan dapat didegradasi oleh *Ochrobactrum* yaitu fenantrena (Ghosal dkk., 2010), fenol (Kilic, 2009), nikotin (Yuan dkk., 2006), parathion metil (Qiu dkk., 2007), dan masih banyak lagi hidrokarbon lainnya.

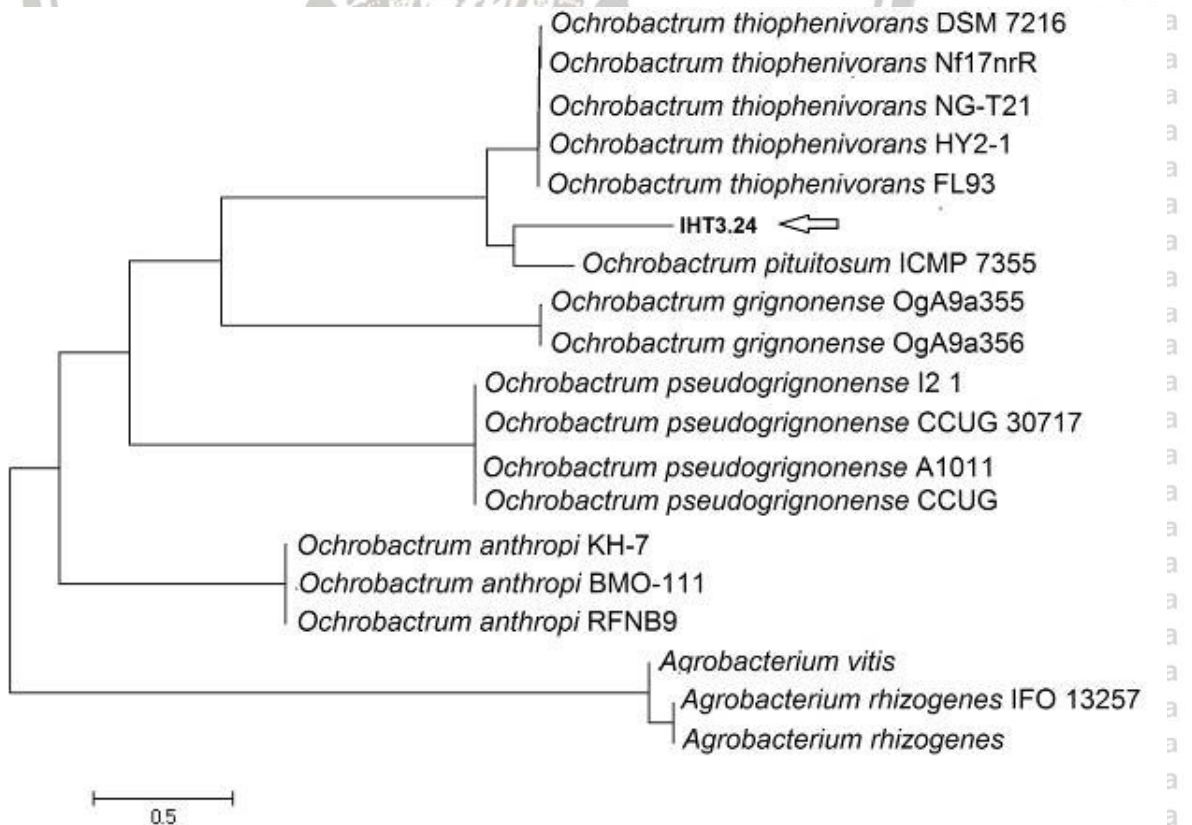
Penelitian lain menjelaskan bahwa plasmid IncP-9 terdeteksi dalam Genus *Ochrobactrum* dan *Pseudomonas* (Dealtry dkk., 2018). Dalam proses biodegradasi minyak, bakteri harus memiliki elemen genetik bergerak (MGEs) seperti plasmid. Dalam plasmid bakteri hidrokarboklastik mengandung operon yang mengkode beberapa enzim untuk mendegradasi hidrokarbon. Plasmid katabolik yang bertanggung jawab untuk degradasi hidrokarbon yaitu incP-9 atau Inkompatibilitas (inc) Plasmid21. Plasmid incP-9 berperan untuk memulai proses degradasi minyak. Pada penelitian ini, isolat yang telah diuji mampu mendegradasi TPH yaitu *Ochrobactrum pituitosum*. *Ochrobactrum pituitosum* mampu menurunkan kadar TPH yang sebelumnya 0,5 % menjadi 0,2 - 0,3 %. Hal ini memungkinkan bahwa *Ochrobactrum pituitosum* mengandung incP-9 atau Inkompatibilitas (inc) Plasmid21 yang berfungsi dalam mengkode enzim untuk mendegradasi hidrokarbon.



Gambar 14. Pohon filogeni isolat IHT1.3 dengan isolat acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA menurut algoritma *Neighbor-Joining* dan model *Tamura-Nei*



Gambar 15. Pohon filogeni isolat IHT1.5 dengan isolat acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA menurut algoritma *Neighbor-Joining* dan model *Tamura-Nei*



Gambar 16. Pohon filogeni isolat IHT3.24 dengan isolat acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA menurut algoritma *Neighbor-Joining* dan model *Tamura-Nei*

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian ini:

1. Isolat IHT1.3, IHT1.5, dan IHT3.24 memiliki toleransi tinggi terhadap saponin 12 % dan ketiganya tidak memanfaatkan surfaktan tersebut sebagai nutrisi dalam pertumbuhannya.
2. Bakteri IHT3.24 yang dikombinasikan dengan saponin memiliki potensi lebih tinggi dalam menurunkan kadar hidrokarbon minyak bumi, yaitu dengan presentase degradasi sebesar 38 % dalam waktu 30 hari, daripada tanpa pemberian saponin.
3. Isolat bakteri IHT3.24 yang mampu bersinergi dengan saponin teridentifikasi sebagai *Ochrobactrum pituitosum* dengan kemiripan 97,8 %.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan:

1. Masih terdapat dua isolat potensial yang belum melalui uji degradasi TPH yaitu *Ochrobactrum pseudogrigonense* IHT1.3 dan *Pseudomonas mendocina* IHT1.5. Kedua isolat ini dapat diuji pada penelitian berikutnya.
2. Jenis substrat senyawa hidrokarbon yang terdegradasi belum diketahui secara spesifik. Pada penelitian selanjutnya, hasil degradasi dapat diuji dengan *Gas Chromatography Mass Spectrophotometry* untuk mengetahui jenis substrat hidrokarbon (*aliphatic* atau *aromatic*) yang terdegradasi.
3. Untuk tahap selanjutnya perlu ada uji skala mikrokosmos, uji konsorsium bakteri, uji variasi konsentrasi saponin, uji modulasi biosurfaktan oleh ketiga isolat, dan uji deteksi gen oxygenase.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriastini, J.J. 1990. Daftar Jenis Nama Tanaman. Jakarta: Wakarta Penebar Swadaya.
- Akpor, O.B., Igbinsosa, O.E. & Igbinsosa, O.O. 2007. Studies on The Effect of Petroleum Hydrocarbon on The Microbial and Physico-Chemicals Characteristics of Soil. *Afr. J. Biotechnol*, 6: 1939-1943.
- Albus, S. 2018. *Organic Chemistry Project*. (Online: [https:// infograph. venngage. com/p/116075/organic-chemistry-project](https://infograph.venngage.com/p/116075/organic-chemistry-project)). Diakses tanggal 23 Mei 2018.
- Al-Wasify, S., & Hamed, S.R. 2014. Bacterial Biodegradation of Crude Oil Using Local Isolates. *International Journal of Bacteriology*, ID 863272: 1-8.
- Andacorp, 2015. 10 Perusahaan Minyak Terbesar di Indonesia. (online: <http://www.andacorp.com/10-perusahaan-minyak-terbesar-di-indonesia/>). Diakses tanggal 24 Oktober 2018.
- Anonymous. 2016. *PCR Master Mix Protocol*. USA: Madison.
- Arifudin, Y, M., & Murtiaksono, K. 2016. Bioremediasi Tanah Bertekstur Klei Tercemar Minyak Bumi: Aplikasi Teknik Biopile dengan Penambahan Pasir. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*, 6 (1): 13-19.
- Baker, K. H., & Herson, D. S. 1994. *Bioremediation*. New York: McGraw-Hill.
- Banat, I.M., Satpute, S.K., Cameotra, S.S., Patil, R., & Nyayanit, N.V. 2014. Cost Effective Technologies and Renewable Substrates for Biosurfactants Production. *Front. Microbiol*, 5. Article 697.
- Basso, B., Gargiulo, O., Paustian, K., Robertson, G. P., Porter, C., Grace, P. R., & Jones, J. W. 2011. Procedures for Initializing Soil Organic Carbon Pools in The DSSAT-CENTURY Model for Agricultural Systems. *Soil Science Society of America Journal*, 75 (1): 69-78.
- Beychok, M. R. 1967. *Aqueous Wastes from Petroleum and Petrochemical Plants (1st ed.)*. Jhon Wiley and Sons. LCCN 67019834.
- Bhattacharya, M., Biswas, D., Sana, S., & Datta, S. 2015. Biodegradation of Waste Lubricants by A Newly Isolated *Ochrobactrum* sp. C1. *3 Biotech*, 5 (5): 807-817.
- Blyth, W., Shahsavari, E. M., Paul, D., & Ball, A. S. 2015. Biosurfactant from Red Ash Trees Enhances The Bioremediation of PAH Contaminated Soil at A Former Gasworks Site. *J. Environ*, 162: 30-36.
- Bossert, I., & Bartha, R. 1984. The Fate of Petroleum in Soil Ecosystems. In: Atlas, R.M., Ed., *Petroleum Microbiology*. New York: Macmillan. 440-445.
- Canipa-Morales, N. K., Galán-Vidal, C. A., Guzmán-Vega, M. A., & Jarvie, D. M. 2003. Effect of Evaporation on C7 Light Hydrocarbon Parameters. *Organic geochemistry*, 34 (6): 813-826.
- Carrero-Colon, M., Nakatsu, C.H., & Konopka, A. 2006. Effect of Nutrient Periodicity on Microbial Community Dynamics. *Appl Environ Microbiol*, 72 (5): 3175-3183.
- Chaillan, F., Fleche, A. L., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A., & Oudot, J. 2004. Identification and Biodegradation Potential of Tropical Aerobic Hydrocarbon-Degrading Microorganisms. *Research In Microbiology*, 155: 587-595.

- Chao, B., Nagarajan, K., & Loh, K.C. 2009. Biodegradation of Aromatic Compounds: Current Status and Opportunities for Biomolecular Approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (2): 207-228.
- Charlena. 2009. Degradasi Hidrokarbon pada Tanah Tercemar Minyak Bumi dengan Isolat A10 dan D8. *Jurnal biosains*, Bogor: Seminar Nasional Sains II.
- Chauhan, A., Faziurrahman, J.G., & Jain, R.K. 2008. Bacterial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Strategies for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48 (1): 95-113.
- Chekroun, K.B., Sánchez, E., Baghour, M. 2014. The Role of Algae in Bioremediation of Organic Pollutants. *Int Res J Pub Environl Health* 1 (2): 19-32.
- Christopher, S., Umapathy, B. L., & Ravikumar, K. L. 2010. Brucellosis: Review on The Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. *Journal of laboratory physicians*, 2 (2): 55.
- Combs, S. M., & Nathan, M. V. 1998. Recommended Chemical Soil Test Procedures for The North Central Region. *North Central Region Publication*, 221: 55-57.
- Cookson, J.T. 1995. *Bioremediation Engineering: Design and Application*. New York: McGraw-Hill.
- Darlina, I. 2009. *Fitoremediasi Sebagai Teknologi Alternatif Perbaikan Lingkungan*. Bandung: Universitas Bandung Raya.
- Das, N., & Chandran, P. 2011. *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview*. Biotechnology Research International.
- Davin, M., Starren, A., Deleu, M., Lognay, G., Colinet, G., & Fauconnier, M.L. 2017. Could Saponins be Used to Enhance Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aged-Contaminated Soils. *Chemosphere*, 194: 414-421.
- Dealtry, S., Ghizelini, A. M., Mendonça-Hagler, L., Chaloub, R. M., Reinert, F., de Campos, T. M., & Smalla, K. 2018. Petroleum Contamination and Bioaugmentation in Bacterial Rhizosphere Communities from *Avicennia schaueriana*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49 (4): 757-769.
- Deng, M. C., Li, J., Liang, F. R., Yi, M., Xu, X. M., Yuan, J. P., & Wang, J. H. 2014. Isolation and Characterization of A Novel Hydrocarbon-Degrading *Bacterium achromobacter* Sp. HZ01 from The Crude Oil Contaminated Seawater at The Daya Bay, Southern China. *Marine Pollution Bulletin*, 83 (1): 79-86.
- Doong, R., & Lei, W. 2003. Solubilization and Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas Putida* in The Presence of Surfactant. *J. Hazard. Meter*, B96: 15-27.
- Dutta, S. 2002. *Environmental Treatment Technologies for Hazardous and Medical Waste*. New Delhi: Tata McGraw Hill.
- Enell, A., Fuhrman, F., Lundin, L., Warfvinge, P., & Thelin, G. 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ash: Determination of Total and Leachable Concentrations. *Environmental Pollution*, 152 (2): 285-292.
- Eris, F. R., Hambali, E., Suryani, A., & Permadi, P. 2017. Performance of Surfactant Methyl Ester Sulphonate Solution for Oil Well Stimulation in Reservoir Sandstone TJ Field. *Earth and Environmental Science*, 65: 1-7.
- Fahrudin. 2010. *Bioteknologi Lingkungan*. Bandung: Alfabeta.

- Faiza, R., Rahayu, Y.S., & Yuliani. 2013. Identifikasi Spora Jamur Mikoriza Vesikular Arbuskular (MVA) pada Tanah Tercemar Minyak Bumi di Bojonegoro. *Lentera Bio*, 2 :1-7.
- Francy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.L., & Ward, C.H. 1991. Emulsification of Hydrocarbons by Surface Bacteria. *J ind Microbiol*, 8: 234-246.
- Gentry, T.J., Rensing, C., & Pepper, I.L. 2004. New Approaches for Bioaugmentation as A Remediation Technology. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec*, 34: 447-494.
- Ghosal, D., Chakraborty, J., Khara, P., & Dutta, T. K. 2010. Degradation of Phenanthrene Via Meta-Cleavage of 2-Hydroxy-1-Naphthoic Acid by *Ochrobactrum* Sp. Strain PWTJD. *FEMS microbiology letters*, 313 (2): 103-110.
- Gudina, E.J., Teixeira, J.A., & Rodrigues, L.R. 2016. Biosurfactants Produced by Marine S. *Journal of Environmental Management 199 microorganisms with therapeutic applications. Mar. Drugs*, 14: 46-61.
- Guo, Y. Q., Liu, J-X., Lu, Y. 2008. Effect of Tea Saponin on Methanogenesis, Microbial Community Structure and Expression of Mera Gene, In Cultures of Rumen Microorganisms. *Lett Appl Microbiol*, 47: 421-426.
- Hagiya, H., Ohnishi, K., Maki, M., Watanabe, N., & Murase, T. 2013. Clinical Characteristics of *Ochrobactrum Anthropi* Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (4): 1330-1333.
- Hakim, N., Nyakpa, M. Y., Lubis, A. M., Nugroho, S. G., Saul, M. R., Diha, M. A., & Bailey, H. H. 1986. *Dasar-Dasar Ilmu Tanah*. Universitas Lampung, 488.
- Hommel, R. K. 1990. Formation and Phylogenetic Role of Biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 89 (1): 158-119.
- Jaya, H. S. 2005. *Profil Stabilitas Emulsi Fraksi Ringan Minyak Bumi dalam Air dengan Penambahan Surfaktan Nonionik*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Institut Pertanian Bogor.
- Johnsen, A.R., & Karlson, U. 2004. Evaluation of Bacterial Strategies to Promote The Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 (4): 452-459.
- Jonker, M. T. O., Brils, J. M., Sinke, A. J. C., Murk, A. J., & Koelmans, A. A., 2006. Weathering and Toxicity of Marine Sediments Contaminated with Oils and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (5): 1345-1353.
- Kaczorek, E., Chrzanowski, A., Pijanowska, A., & Olszanowski. 2008. Yeast and Bacteria Cell Hydrophobicity and Hydrocarbon Biodegradation in The Presence of Natural Surfactants: Rhamnolipides And Saponins. *Bioresource Technology*, 99: 4285-4291.
- Kaczorek, E., Urbanowicz, A., & Olszanowski, A. 2010. The Influence of Surfactants on Cell Surface Properties of Aeromonas Hydrophila During Diesel Oil Biodegradation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81: 363-368.
- Kerry-Williams, S. M., & Noble, W. C. 1997. Plasmids in Group JK Coryneform Bacteria Isolated in A Single Hospital. *J Hyg (Lond)*, 97 (2): 255-263.
- Kilic, N. K. 2009. Enhancement of Phenol Biodegradation by *Ochrobactrum* Sp. Isolated from Industrial Wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63 (6): 778-781.

- Kobayashi, T., Kaminaga, H., Navarro, R. R., & Imura, Y. 2012. Application of Aqueous Saponin on The Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Contaminated Soil. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 47 (8): 1138-1151.
- Kolvenbach, B.A., Helbling, D.E., Kohler, H.P.E., & Corvini, P.F. 2014. Emerging Chemicals and The Evolution of Biodegradation Capacities and Pathways in Bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 8–14.
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T. C., & Huettel, M. 2011. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and The Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Appl Environ Microbiol.*, 77 (22): 7962-7974.
- Lamichhane, S., Bal Krishna, K.C., & Sarukkalige, R., 2017. Surfactant-Enhanced Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *J. Environ. Manag.*, 199: 46–61.
- Li, J.L., & Chen, B.H. 2009. Surfactant-Mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Materials*, 2 (1): 76–94.
- Lors, C., Ryngaert, A., Perie, F., Diels, L., & Damidot, D. 2010. Evolution of Bacterial Community During Bioremediation of PAHs in A Coal Tar Contaminated Soil. *Chemosphere*, 81 (10): 1263-1271.
- Lucky, W. N. 2012. *Kajian Kemampuan Degradasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Fenol dari Limbah Cair Rumah Sakit Tipe C*. Yogyakarta: UIN.
- Marecik, R., Wojtera-Kwiczor, J., Tawniczak, T., Cyplik, P., Szulc, A., Piotrowska-Cyplik, A., & Chrzanowski, T. 2012. Rhamnolipids Increase The Phytotoxicity of Diesel Oil Towards Four Common Plant Species in A Terrestrial Environment. *Water Air Soil Pollutant*, 223: 4275–4282.
- Merkel, N., Kraft, R.S., & Infante, C. 2005. Phytoremediation in The Tropics-Influence of Heavy Crude Oil on Root Morphological Characteristics of Graminoids. *Environment. Pollut*, 138: 86-91.
- Nababan, B. 2008. *Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar Darilaut Belawan*. Medan: Tesis untuk Memperoleh Gelar Magister Sains dalam Program Studi Biologi pada Sekolah Pascasarjana USU.
- Ni'matuzahrer., Yachya, A., & Tanjung, M. 2003. Studi Perbandingan Biosurfaktan *Pseudomonas aeruginosa* IA7d dan Surfaktan Sintetik Tween-80 dalam Biodegradasi Solar oleh Mikroba Perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. *Berk. Penel. Hayati*, 12: 13–18.
- Notodarmojo, S. 2005. *Pencemaran Tanah dan Air Tanah*. Bandung: ITB.
- Okolo, J.C. 2005. Enchancing Crude Oil Degradation in A Sandy Soil: Effect of Addition of Poultry Manure. *Global Journal of Environmental Sciences*, 4 (1): 5-10.
- Panda, J., & Sarkar, P. 2012. Isolation and Identification of Chromium-Resistant Bacteria: Test Application for Prevention of Chromium Toxicity in Plant. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 47 (2): 237-249.
- Paria, S. 2008. Surfactant-Enhanced Remediation of Organic Contaminated. *Adv. Colloid Interface Sci*, 138 (1): 24-58.

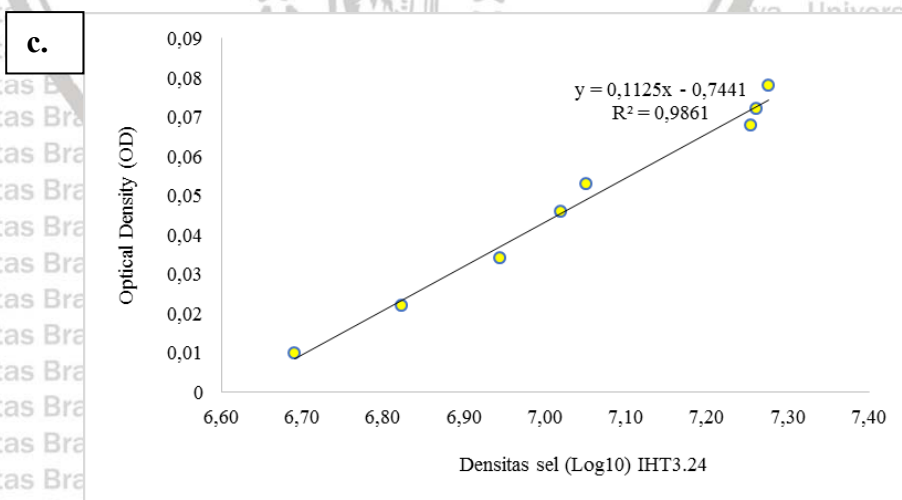
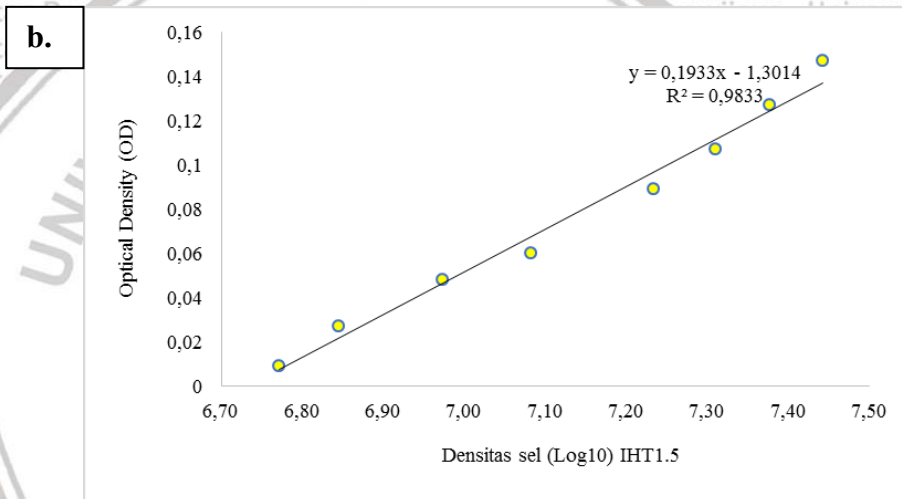
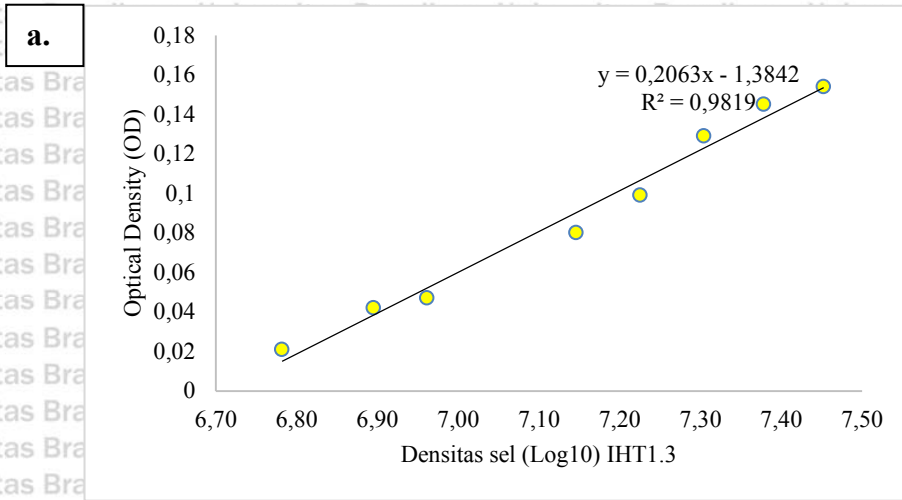
- Pasaribu, T., Astuti, D.A., Wina, E., Sumiati., & Setiyono, A. 2014. Saponin Content of *Sapindus rarak* Pericarp Affected by Particle Size and Type of Solvent, its Biological Activity on *Eimeria tenella* Oocysts. *Int. J. Poult. Sci*, 13 (6): 347-352.
- Peng, R.H., Xiong A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., & Yao, Q.H. 2008. Microbial Degradation of Polyaromatic Hydrocarbons. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 32 (6): 927-955.
- Qiu, X., Zhong, Q., Li, M., Bai, W., & Li, B. 2007. Biodegradation of P-Nitrophenol by Methyl Parathion-Degrading *Ochrobactrum* sp. B2. *International biodeterioration & biodegradation*, 59 (4): 297-301.
- Rivera-Casado, N.A., Montes, H.M.C., Rodriguez, V.R., Esparza, G.F.J., Pérez, V.J., Ariza, C.A., Ferrera-Cerrato, R., Gómez, G.O., & Calva, C.G. 2015. The Fatty Acid Profile Analysis of *Cyperus Laxus* Used for Phytoremediation of Soils from Aged Oil Spill-Impacted Sites Revealed That This is A C18:3 Plant Species. *PLoS ONE*. 10: e0140103.
- Roane, T.M., Pepper, I.L., & Gentry, T.J. 2015. *Microorganisms and Metal Pollutants. In Environmental Microbiology*. Academic Press. pp. 415-439.
- Robinson, L. A., Smith, L. J., Fontaine, M. P., Kay, H. D., Mountjoy, C. P., & Pirruccello, S. J. 1995. C-Myc Antisense Oligodeoxyribonucleotides Inhibit Proliferation of Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*, 60: 1582-1591.
- Rusdiana, O., Fakuara, Y., Kusmana, C., & Hidayat, Y. 2000. Respon Pertumbuhan Akar Tanaman Sengon (*Paraserianthes falcataria*) terhadap Kepadatan dan Kandungan Air Tanah Podsolik Merah Kuning. *Jurnal Manajemen Hutan Tropika*, 6: (2).
- Sheats, W.B., & Foster, C. N. 1997. *Concentrated Products from Methyl Ester Sulfonates*. (Online: http://www.chemiton.com/papers_brochures/Concentrated_Products.doc.pdf). Diakses tanggal 9 Februari 2018.
- Soeder, C. J., Papaderos, A., Kleespies, M., Kenifel, H., Haegel, F. H., & Webb, L. 1996. Influence of Phytogenic Surfactant (*Quillaya* Saponin And *Soya lecithin*) on Bio-Elimination of *Phenetren* and *Fluoranthene* by Three Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 44: 654-659.
- Speight, J. G. 1991. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. New York: Marcel Dekker.
- Suharjono & Setia, I. N. 2015. Chitinolytic Assay and Identification of Bacteria Isolated from Shrimp Waste Based on 16S rDNA Sequences. *Advances in Microbiology*, 5 (7): 541-548.
- Sumarsih, S., Ni'matuzahroh, F., Puspitasari, M., & Rusdiana, M. 2017. Effect of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons on The Oxygenase Production from Hydrocarbonoclastic Bacteria. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 52 (6): 1062-1069.
- Supriningsih, D. 2010. *Pembuatan Metil Ester Sulfonat (MES) sebagai Surfaktan untuk Enhanced Oil Recovery (EOR)*. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Suryatmana, P. 2006. Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi dengan Penambahan *Azotobacter chroococcum* AC04 sebagai Bakteri Penghasil Biosurfaktan. Disertasi Institut Teknologi Bandung. Tarigan, R. dan Kuswandi. Mikrobiologi. JICA, Malang.

- Susilo, H.A. 2003. *Minning Landscape Design and Mangement. National Seminar of Bioremediation and Rehabilitation in Surrounding Minning Land*. Hotel Salak Bogor. PKSPL IPB.
- Takayuki, K., Kaminaga, H., Ronald, R., Navarro, & Iimura, I. 2012. Application of Aqueous Saponin on The Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Contaminated Soil. *Journal of Environmental Science and Health*, 47: 1138–1145.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I.M. 2007. Effect of Salinity, Temperature, pH and Crude Oil Concentration on Biodegradation of *Crude Oil* by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Environ. Sci*, 1 (2): 51-57.
- Tian, W., Yao, J., Liu, R., Zhu, M., Wang, F., Wu, X., & Liu, H. 2016. Effect of Natural and Synthetic Surfactants on Crude Oil Biodegradation by Indigenous Strains. *Ecotoxicology and environmental safety*, 129: 171-179.
- Trêpa, J., Mendes, P., Gonçalves, R., Chaves, C., Brás, A.M., Mesa, A., & da Cunha, J.G.S. 2018. *Brucella* Vertebral Osteomyelitis Misidentified as an *Ochrobactrum anthropi* Infection. *IDCases*, 11: 74-76.
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., & Carvalho, C.C. 2011. Bioaugmentation And Biostimulation Strategies to Improve The Effectiveness of Bioremediation Processes. *Biodegradation*, 22: 231-241.
- Udgire, M., Shah, N., & Jadhav, M. 2015. Enrichment, Isolation and Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4 (6): 708-713.
- Udiharto, M. 1996. *Bioremediasi Minyak Bumi*. Prosiding Pelatihan dan Lokakarya Peranan Bioremediasi dalam Pengelolaan Lingkungan, kerjasama LIPI-BPPT dan HSF, Jakarta; Indonesian.
- Vijayakumar, S., & Saravanan, V. 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Res. J. Microbiol*, 10: 181-192.
- Wesley, L.D. 2012. *Mekanika Tanah untuk Tanah Endapan dan Residu*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Wikiwand, 2018. Alkana. (online: <http://www.wikiwand.com/id/Alkana>). Diakses tanggal 18 Juni 2018.
- Wina, E., Pasaribu, T., Sumiati., Setiyono, A., & Astuti, D.A. 2005. Pengaruh Tepung *Sapindus rarak* sebagai Pakan Aditif Terhadap Performa dan Profil Lipida Ayam Broiler yang Diinfeksi *Eimeria tenella*. *JITV*, 19 (4): 263-271.
- Yuan, Y. J., Lu, Z. X., Huang, L. J., Bie, X. M., Lü, F. X., & Li, Y. 2006. Optimization of A Medium for Enhancing Nicotine Biodegradation by *Ochrobactrum intermedium* DN2. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (3): 691-697.
- Yuliani & Rahayu, Y.S. 2017. Pemberian Seresah Daun Jati dalam Meningkatkan Kadar Hara dan Sifat Fisika Tanah pada Tanah Kapur. Prosiding Seminar Nasional Biologi 2016, ISBN: 9786020951119.
- Zam, S. I., 2010. Optimasi Konsentrasi Inokulum, Rasio C:N:P dan pH pada Proses Bioremediasi Limbah Pengilangan Minyak Bumi Menggunakan Kultur Campuran. *El-Hayah* 1 (2): 23- 34.
- Zhao, H.P., Wu, Q.S., Wang, L., Zhao, X.T., & Gao, H.W. 2009. Degradation of *Phenanthrene* by Bacterial Strain Isolated. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 16 (1): 9-24.

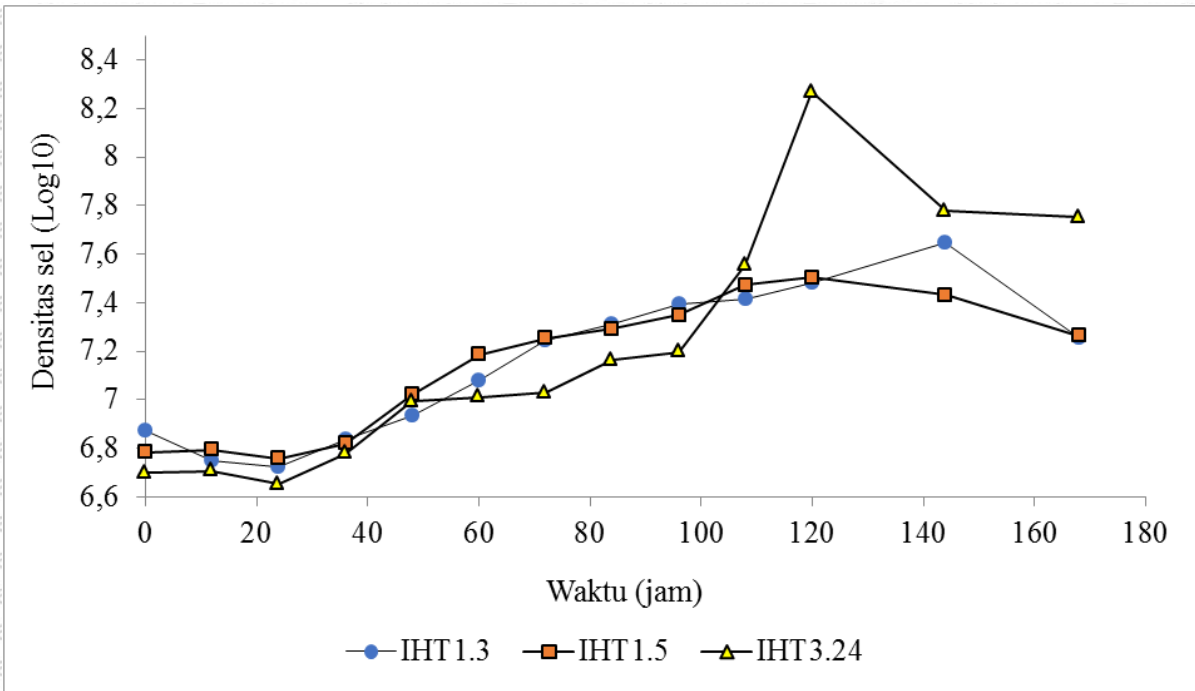
Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T., & Lee, K. 2001. *Guidelines for The Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwaters*. US. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Risk Management Research Laboratory, Land Remediation and Pollution Control Division, 26 W. Martin Luther King Drive, Cincinnati, OH 45268, USA.



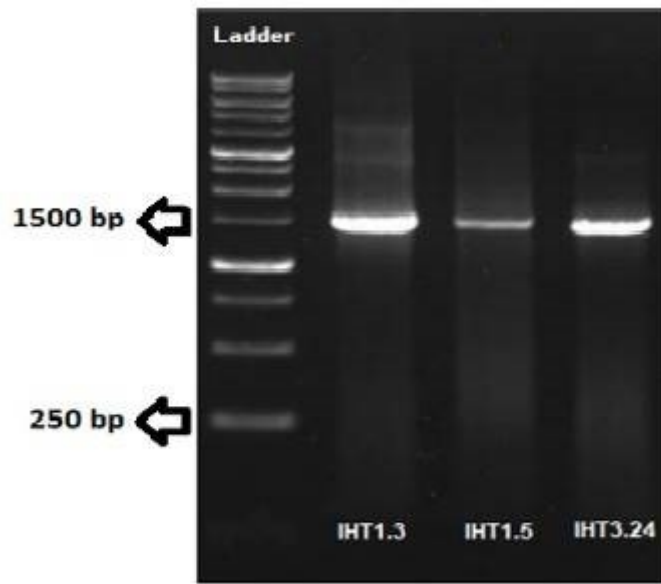
LAMPIRAN



LG1. Kurva standar bakteri hidrokarbonoklastik (a. *Ochrobactrum pseudogrignonense*; b. *Pseudomonas mendocina*; c. *Ochrobactrum pituitosum*)



LG2. Kurva pertumbuhan bakteri hidrokarbonoklastik pada medium *Bushnell-Hass broth*



LG3. Pita 16S rDNA bakteri hidrokarbonoklastik



Enrichment ke- 1 (H-1)



Enrichment ke-1 (H-7)



Enrichment ke-2 (H-1)



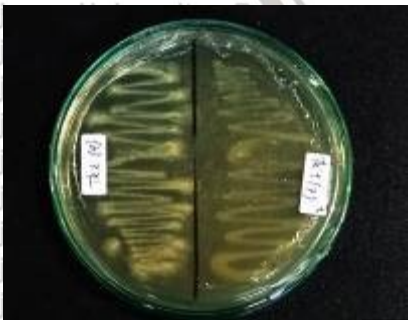
Enrichment ke-2 (H-7)



Enrichment ke-3 (H-1)



Enrichment ke-3 (H-7)



Beberapa sampel isolat yang telah dimurnikan

LG4. Isolasi bakteri hidrokarbonoklastik dari tanah tercemar minyak bumi

Medium NB selama 3 Hari dan 3 kali ulangan



Saponin 0% H-1



Saponin 0% H-2



Saponin 0% H-3



Saponin 8% H-1



Saponin 8% H-2



Saponin 8% H-3



Saponin 12% H-2



Saponin 12% H-3

Medium BHB selama 3 Hari dan 3 kali ulangan



Saponin 0,5 % H-1



Saponin 0,5 % H-2



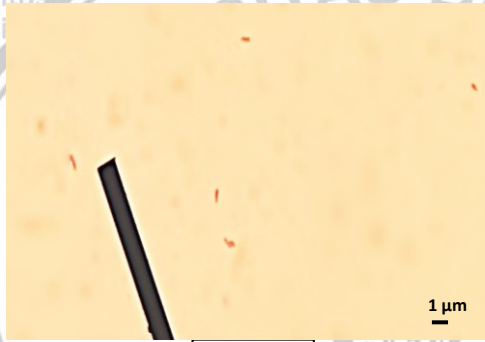
Saponin 0,5 % H-3

LG5. Kekeruhan media pada seleksi bakteri hidrokarbonoklastik berdasarkan densitas selnya

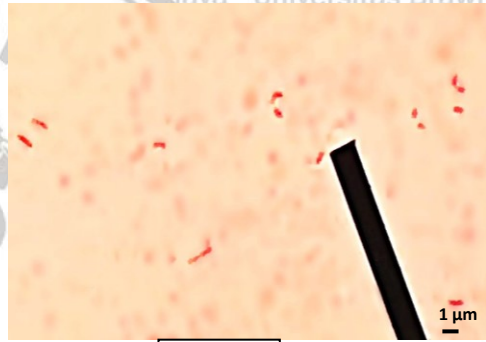


Konsentrasi saponin 0,3 % -20 %

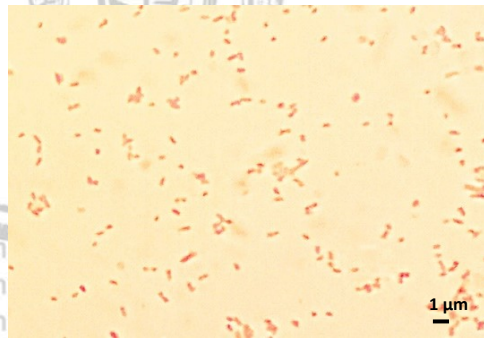
LG6. Pengukuran CMC



IHT1.5



IHT1.3



IHT3.24

LG7. Pengecatan Gram ketiga isolat bakteri terpilih



Salah satu sampel perlakuan H-10



Memisahkan minyak dan medium



Menyaring air dengan Na_2SO_4



Setelah n-Heksan di uapkan dengan suhu 50°C

LG8. Tahapan uji kadar TPH



LT1. Karakteristik makro dan mikro bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak bumi di Desa Wonocolo

Operational Taxonomy Unic

Karakter			IHT1.3	IHT1.2	IHT1.3	IHT1.4	IHT1.5	IHT1.6	IHT1.7	IHT2.1	IHT2.2	IHT2.3	IHT3.1	IHT3.2	IHT3.3	IHT3.4	IHT3.5	IHT3.6	IHT3.7	IHT3.8	IHT3.9	IHT3.10	IHT3.11	IHT3.12	IHT3.13	IHT3.14	IHT3.15	IHT3.16	IHT3.17	IHT3.18	IHT3.19	IHT3.20	IHT3.21	IHT3.22	IHT3.23	IHT3.24		
Koloni	Bentuk	Bulat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Elevasi	Datar	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	
	Tepian	Cembung		-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	
		Rata		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pigmentasi	Putih		+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
		Krem		-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
	Diameter	0-1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
1-2			-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	
>2			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sel	Bentuk	Kokus	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Basil	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Gram	Positif	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Negatif	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LT2. Statistik faktor lingkungan

KadarAirTanah

		Subset for alpha = 0.05	
		1	
Konsentrasi	N		
Tukey HSD ^a	TITIK SAMPLING B	3	32,0667
	TITIK SAMPLING C	3	32,2300
	TITIK SAMPLING A	3	32,5467
	Sig.		,075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

SuhuUdara

		Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Konsentrasi	N		
Tukey HSD ^a	TITIK SAMPLING B	3	32,9433
	TITIK SAMPLING C	3	33,0400
	TITIK SAMPLING A	3	33,0567
	Sig.	1,000	,075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

pH

		Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
konsentrasi	N			
Tukey HSD ^a	TITIK SAMPLING C	3	6,5433	
	TITIK SAMPLING A	3		6,8233
	TITIK SAMPLING B	3		7,2067
	Sig.	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

SuhuTanah

		Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
konsentrasi	N			
Tukey HSD ^a	TITIK SAMPLING B	3	33,9467	
	TITIK SAMPLING A	3		34,1867
	TITIK SAMPLING C	3		34,4600
	Sig.	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

IntensitasCahaya

		Subset for alpha = 0.05			
		konsentrasi	1	2	3
Tukey HSD ^a	TITIK SAMPLING B	3	1970,0000		
	TITIK SAMPLING C	3		2217,3333	
	TITIK SAMPLING A	3			2549,3333
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

BahanOrganikTanah

		Subset for alpha = 0.05			
		konsentrasi	1	2	3
Tukey HSD ^a	TITIK SAMPLING A	3	,5300		
	TITIK SAMPLING C	3		,5767	
	TITIK SAMPLING B	3			,6867
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Correlations

		pH	SuhuUdara	SuhuTanah	KadarAirTana h	IntensitasCah aya	BahanOrgani kTanah
pH	Pearson Correlation	1	-,991**	-,991**	-,310	-,504	,742*
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,417	,166	,022
	N	9	9	9	9	9	9
SuhuUdara	Pearson Correlation	-,991**	1	,999**	,233	,390	-,654
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,547	,299	,056
	N	9	9	9	9	9	9
SuhuTanah	Pearson Correlation	-,991**	,999**	1	,220	,384	-,648
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,570	,307	,059
	N	9	9	9	9	9	9
KadarAirTanah	Pearson Correlation	-,310	,233	,220	1	,747*	-,728*
	Sig. (2-tailed)	,417	,547	,570		,021	,026
	N	9	9	9	9	9	9
IntensitasCahaya	Pearson Correlation	-,504	,390	,384	,747*	1	-,947**
	Sig. (2-tailed)	,166	,299	,307	,021		,000
	N	9	9	9	9	9	9
BahanOrganikTanah	Pearson Correlation	,742*	-,654	-,648	-,728*	-,947**	1
	Sig. (2-tailed)	,022	,056	,059	,026	,000	
	N	9	9	9	9	9	9

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

LT3. Statistik seleksi bakteri hidrokarbonoklastik

OD 0% Hari ke 1

Tukey HSD^a

ISOLAT	N	1	2	3	4	5
KONTROL	3	.0000				
IHT2.2	3		1.5513			
IHT3.10	3		1.8000	1.8000		
IHT3.3	3		1.8610	1.8610	1.8610	
IHT3.18	3		1.8787	1.8787	1.8787	
IHT1.1	3		1.9937	1.9937	1.9937	1.9937
IHT1.2	3		1.9950	1.9950	1.9950	1.9950
IHT3.6	3		2.0027	2.0027	2.0027	2.0027
IHT3.21	3		2.0050	2.0050	2.0050	2.0050
IHT3.12	3		2.0093	2.0093	2.0093	2.0093
IHT3.13	3			2.0653	2.0653	2.0653
IHT3.7	3			2.0713	2.0713	2.0713
IHT3.4	3			2.0987	2.0987	2.0987
IHT2.1	3			2.1070	2.1070	2.1070
IHT3.1	3			2.1177	2.1177	2.1177
IHT3.15	3			2.1180	2.1180	2.1180
IHT3.19	3			2.1237	2.1237	2.1237
IHT3.16	3			2.1417	2.1417	2.1417
IHT2.3	3			2.1460	2.1460	2.1460
IHT3.11	3			2.1483	2.1483	2.1483
IHT3.22	3			2.1490	2.1490	2.1490
IHT3.5	3			2.1627	2.1627	2.1627
IHT3.14	3			2.1687	2.1687	2.1687
IHT3.2	3			2.1960	2.1960	2.1960
IHT3.23	3			2.2017	2.2017	2.2017
IHT3.17	3			2.2140	2.2140	2.2140
IHT1.4	3			2.2530	2.2530	2.2530
IHT3.8	3			2.2913	2.2913	2.2913
IHT1.6	3			2.2993	2.2993	2.2993
IHT3.9	3			2.3017	2.3017	2.3017
IHT3.20	3			2.3053	2.3053	2.3053
IHT1.7	3				2.3250	2.3250
IHT1.5	3					2.4147
IHT3.24	3					2.4173
IHT1.3	3					2.4453

OD 8% Hari ke 1

Tukey HSD^a

ISOLAT	N	0.05	
		1	2
KONTROL	3	.0000	
IHT2.1	3	1.0630	1.0630
IHT1.2	3		1.1810
IHT3.18	3		1.2513
IHT3.21	3		1.3077
IHT3.9	3		1.3940
IHT1.7	3		1.4773
IHT3.10	3		1.5000
IHT3.11	3		1.5120
IHT2.2	3		1.5513
IHT1.6	3		1.5730
IHT3.1	3		1.5867
IHT3.6	3		1.5867
IHT3.12	3		1.5963
IHT3.22	3		1.6030
IHT1.4	3		1.6140
IHT3.4	3		1.6203
IHT3.3	3		1.6217
IHT1.1	3		1.6227
IHT3.2	3		1.6360
IHT3.7	3		1.6523
IHT3.14	3		1.6543
IHT3.5	3		1.6567
IHT3.20	3		1.6693
IHT3.19	3		1.6697
IHT3.16	3		1.6850
IHT2.3	3		1.6860
IHT3.13	3		1.6887
IHT3.23	3		1.6930
IHT3.17	3		1.7443
IHT3.15	3		1.7537
IHT3.8	3		1.7577
IHT3.24	3		1.8097
IHT1.5	3		1.8213
IHT1.3	3		1.9780

OD 12% hari ke 1

Tukey HSD^a

ISOLAT	N	0.05	
		1	2
KONTROL	3	.0000	
IHT2.1	3	.9640	.9640
IHT1.6	3	1.3690	1.3690
IHT1.7	3	1.3707	1.3707
IHT3.13	3	1.3730	1.3730
IHT3.11	3	1.3883	1.3883
IHT3.4	3	1.5083	1.5083
IHT3.18	3		1.5763
IHT3.10	3		1.6850
IHT1.2	3		1.6863
IHT2.3	3		1.6983
IHT3.5	3		1.7873
IHT3.22	3		1.8457
IHT3.16	3		1.8643
IHT3.15	3		1.8703
IHT3.6	3		1.8733
IHT1.4	3		1.8903
IHT3.1	3		1.9617
IHT3.9	3		2.0073
IHT3.21	3		2.0073
IHT3.2	3		2.0363
IHT3.14	3		2.0510
IHT3.19	3		2.0947
IHT3.8	3		2.0950
IHT3.12	3		2.1110
IHT3.20	3		2.1143
IHT3.23	3		2.1183
IHT3.7	3		2.1210
IHT1.1	3		2.1347
IHT3.17	3		2.1363
IHT2.2	3		2.2113
IHT1.3	3		2.2127
IHT3.3	3		2.2300
IHT3.24	3		2.2300
IHT1.5	3		2.3200

OD 8% Hari ke 2

Tukey HSD^a

ISOLAT	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
KONTROL	3	.0000		
IHT1.2	3	.3897	.3897	
IHT1.7	3	.6407	.6407	.6407
IHT3.1	3	.9057	.9057	.9057
IHT1.1	3	.9573	.9573	.9573
IHT3.18	3	1.0100	1.0100	1.0100
IHT3.14	3	1.0327	1.0327	1.0327
IHT3.22	3	1.0713	1.0713	1.0713
IHT3.4	3	1.1320	1.1320	1.1320
IHT3.21	3	1.2107	1.2107	1.2107
IHT2.2	3	1.2130	1.2130	1.2130
IHT2.1	3	1.2243	1.2243	1.2243
IHT3.23	3	1.2737	1.2737	1.2737
IHT3.12	3	1.3513	1.3513	1.3513
IHT3.2	3	1.3637	1.3637	1.3637
IHT3.20	3	1.3807	1.3807	1.3807
IHT1.4	3	1.3897	1.3897	1.3897
IHT3.15	3	1.4147	1.4147	1.4147
IHT3.19	3	1.5000	1.5000	1.5000
IHT3.9	3		1.5833	1.5833
IHT3.16	3		1.6010	1.6010
IHT1.6	3		1.6470	1.6470
IHT3.3	3		1.6747	1.6747
IHT3.6	3		1.6797	1.6797
IHT3.17	3		1.6843	1.6843
IHT3.5	3		1.7207	1.7207
IHT3.11	3		1.7220	1.7220
IHT3.13	3		1.7243	1.7243
IHT3.24	3		1.7397	1.7397
IHT2.3	3		1.7413	1.7413
IHT3.10	3		1.7570	1.7570
IHT3.8	3		1.8130	1.8130
IHT3.7	3		1.8377	1.8377
IHT1.3	3			2.0497
IHT1.5	3			2.0570

Tukey HSD^a

OD 12% Hari ke 2

Subset for alpha = 0.05

ISOLAT	N	1
KONTROL	3	.0000
IHT1.6	3	.6977
IHT3.9	3	.7003
IHT2.1	3	.7103
IHT3.11	3	.7723
IHT1.4	3	.7813
IHT3.4	3	.7820
IHT1.1	3	.7863
IHT3.20	3	.7980
IHT3.15	3	.7983
IHT3.19	3	.8057
IHT1.7	3	.8107
IHT3.22	3	.8130
IHT3.18	3	.8290
IHT3.5	3	.8387
IHT1.2	3	.8510
IHT2.3	3	.8520
IHT3.14	3	.8583
IHT2.2	3	.8653
IHT3.16	3	.8767
IHT3.2	3	.8893
IHT3.13	3	.8897
IHT3.17	3	.9217
IHT3.21	3	.9337
IHT3.10	3	.9900
IHT3.1	3	.9940
IHT3.7	3	1.0490
IHT3.6	3	1.1540
IHT3.8	3	1.1580
IHT3.23	3	1.1633
IHT3.3	3	1.1717
IHT3.12	3	1.1953
IHT3.24	3	1.2070
IHT1.5	3	1.2843
IHT1.3	3	1.3640
Sig.		.180

OD 8% hari ke 3

Tukey HSD^{a,b}

ISOLAT	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
KONTROL	3	.0000	
IHT1.2	3	1.1987	
IHT2.1	3	1.2467	
IHT3.6	3	1.6063	
IHT3.12	3	1.6070	
IHT1.4	3	1.6150	
IHT1.6	3	1.6200	
IHT3.3	3	1.6287	
IHT3.13	3	1.6300	
IHT2.2	3	1.6493	
IHT3.16	3	1.6673	
IHT3.2	3	1.6737	
IHT3.15	3	1.6743	
IHT3.10	3	1.6783	
IHT3.4	3	1.6830	
IHT3.9	3	1.6867	
IHT3.5	3	1.6893	
IHT3.21	3	1.7153	
IHT1.7	2	1.7155	
IHT3.19	3	1.7247	
IHT3.22	3	1.7363	
IHT3.7	3	1.7430	
IHT3.20	3	1.7573	
IHT3.17	3	1.7720	
IHT3.23	3	1.7800	
IHT1.5	3	1.7817	
IHT1.1	3	1.7840	
IHT3.8	3	1.7867	
IHT2.3	3	1.7887	
IHT3.1	3	1.7933	
IHT3.24	3	1.8190	
IHT3.18	3	1.8207	
IHT3.14	3	1.8287	
IHT1.3	3	1.9410	
IHT3.11	3		941.5543

OD 0% Hari ke 3

Tukey HSD^a

ISOLAT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
KONTROL	3	.0000			
IHT2.2	3		1.4030		
IHT3.10	3		1.8047	1.8047	
IHT3.3	3		1.8683	1.8683	
IHT3.18	3		1.9107	1.9107	1.9107
IHT3.6	3		1.9273	1.9273	1.9273
IHT1.1	3		1.9667	1.9667	1.9667
IHT3.12	3			2.0467	2.0467
IHT1.2	3			2.0623	2.0623
IHT3.21	3			2.0763	2.0763
IHT2.1	3			2.0950	2.0950
IHT1.6	3			2.1377	2.1377
IHT1.4	3			2.1597	2.1597
IHT3.22	3			2.1630	2.1630
IHT3.13	3			2.1637	2.1637
IHT3.16	3			2.1987	2.1987
IHT3.8	3			2.1993	2.1993
IHT3.2	3			2.2177	2.2177
IHT3.9	3			2.2183	2.2183
IHT3.15	3			2.2307	2.2307
IHT3.20	3			2.2307	2.2307
IHT3.7	3			2.2370	2.2370
IHT3.1	3			2.2390	2.2390
IHT3.14	3			2.2407	2.2407
IHT3.19	3			2.2420	2.2420
IHT3.5	3			2.2420	2.2420
IHT3.11	3			2.2443	2.2443
IHT3.17	3			2.2730	2.2730
IHT2.3	3			2.2867	2.2867
IHT3.23	3			2.2870	2.2870
IHT3.24	3			2.2933	2.2933
IHT1.7	3			2.3193	2.3193
IHT1.5	3			2.3530	2.3530
IHT3.4	3			2.3547	2.3547
IHT1.3	3				2.4827
Sig.		1.000	.070	.090	.059

OD 0,5% Saponin medium BHB hari ke 1

Tukey HSD^a

ISOLAT	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
KONTROL	3	.0000	
IHT1.3	3	.0957	.0957
IHT1.5	3	.1040	.1040
IHT3.13	3	.1310	.1310
IHT3.6	3	.1333	.1333
IHT3.24	3	.1360	.1360
IHT1.2	3	.1370	.1370
IHT3.1	3	.1393	.1393
IHT3.11	3	.1427	.1427
IHT3.2	3	.1437	.1437
IHT2.1	3	.1457	.1457
IHT2.3	3	.1480	.1480
IHT1.6	3	.1583	.1583
IHT3.3	3	.1617	.1617
IHT1.1	3	.1620	.1620
IHT3.19	3	.1637	.1637
IHT3.5	3	.1643	.1643
IHT3.22	3	.1660	.1660
IHT3.14	3	.1673	.1673
IHT3.9	3	.1703	.1703
IHT3.10	3	.1707	.1707
IHT1.4	3	.1717	.1717
IHT3.12	3	.1743	.1743
IHT3.7	3	.1777	.1777
IHT3.16	3	.1877	.1877
IHT3.23	3	.1900	.1900
IHT3.18	3	.1903	.1903
IHT3.20	3	.1910	.1910
IHT2.2	3	.1923	.1923
IHT3.17	3	.1950	.1950
IHT1.7	3	.2003	.2003
IHT3.4	3	.2233	.2233
IHT3.15	3	.2243	.2243
IHT3.8	3		.2830
IHT3.21	3		.3570

OD 12% hari ke 3

Tukey HSD^{a,b}

ISOLAT	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
KONTROL	3	.5593	
IHT3.10	3	1.0990	1.0990
IHT3.12	3	1.1080	1.1080
IHT1.7	3	1.1783	1.1783
IHT3.4	3	1.4653	1.4653
IHT3.13	3	1.5027	1.5027
IHT1.6	3	1.5507	1.5507
IHT3.19	3	1.5577	1.5577
IHT3.9	3	1.5733	1.5733
IHT3.20	3	1.6100	1.6100
IHT3.1	3	1.6163	1.6163
IHT3.3	3	1.6167	1.6167
IHT3.16	3	1.6200	1.6200
IHT1.1	3	1.6213	1.6213
IHT3.2	3	1.6293	1.6293
IHT3.6	3	1.6333	1.6333
IHT3.23	3		1.6400
IHT3.15	3		1.6470
IHT3.17	3		1.6490
IHT1.4	3		1.6583
IHT3.22	3		1.6603
IHT2.3	3		1.6620
IHT3.8	3		1.6630
IHT3.18	3		1.6650
IHT3.14	3		1.6697
IHT3.21	3		1.6790
IHT3.5	3		1.6810
IHT3.7	3		1.7007
IHT2.1	3		1.7157
IHT2.2	3		1.7160
IHT1.2	3		1.7260
IHT3.24	2		1.7375
IHT1.3	3		1.7453
IHT1.5	3		1.7673
IHT3.11	3		1.7763
Sig.		.051	.815

OD 0,5% saponin medium BHB hari ke 2

Tukey HSD^a

OD 0,5% saponin medium BHB hari ke 3

Tukey HSD^a

Subset for alpha = 0.05

ISOLAT	N	OD 0,5% saponin medium BHB hari ke 2		ISOLAT	N	OD 0,5% saponin medium BHB hari ke 3	
		1	2			1	2
				KONTROL	3	.0000	
IHT1.5	3	.0843	.0843	IHT1.5	3	.0843	.0843
IHT1.4	3	.0853	.0853	IHT1.4	3	.0853	.0853
IHT1.2	3	.0873	.0873	IHT1.2	3	.0873	.0873
IHT3.6	3	.0880	.0880	IHT3.24	3	.0880	.0880
IHT1.3	3	.0887	.0887	IHT1.3	3	.0887	.0887
IHT3.1	3	.0947	.0947	IHT3.1	3	.0947	.0947
IHT3.24	3	.1000	.1000	IHT1.6	3	.1000	.1000
IHT3.14	3	.1070	.1070	IHT3.14	3	.1070	.1070
IHT3.20	3	.1073	.1073	IHT3.20	3	.1073	.1073
IHT3.3	3	.1077	.1077	IHT3.3	3	.1077	.1077
IHT3.19	3	.1087	.1087	IHT3.19	3	.1087	.1087
IHT3.9	3	.1093	.1093	IHT3.9	3	.1093	.1093
IHT1.7	3		.1170	IHT1.7	3		.1170
IHT3.22	3		.1177	IHT3.22	3		.1177
IHT2.2	3		.1193	IHT2.2	3		.1193
IHT1.6	3		.1220	IHT3.6	3		.1220
IHT3.17	3		.1233	IHT3.17	3		.1233
IHT3.13	3		.1250	IHT3.13	3		.1250
IHT3.21	3		.1250	IHT3.21	3		.1250
IHT3.23	3		.1297	IHT3.23	3		.1297
IHT3.10	3		.1327	IHT3.10	3		.1327
IHT3.16	3		.1347	IHT3.16	3		.1347
IHT3.12	3		.1377	IHT3.12	3		.1377
IHT2.1	3		.1383	IHT2.1	3		.1383
IHT1.1	3		.1413	IHT1.1	3		.1413
IHT3.4	3		.1443	IHT3.4	3		.1443
IHT3.7	3		.1447	IHT3.7	3		.1447
IHT3.18	3		.1473	IHT3.18	3		.1473
IHT3.11	3		.1477	IHT3.11	3		.1477
IHT2.3	3		.1487	IHT2.3	3		.1487
IHT3.2	3		.1503	IHT3.2	3		.1503
IHT3.5	3		.1510	IHT3.5	3		.1510
IHT3.15	3		.1570	IHT3.15	3		.1570
IHT3.8	3		.1650	IHT3.8	3		.1650
				Sig.		.090	.631

LT4. Hasil uji degradasi

TPHDegradasiHari10

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Kontrol	3	,3301
Saponin	3	,8667
Bakteri	3	3,4667
Bakteri_Saponin	3	9,8667
Sig.		,223

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

TPHDegradasiHari30

Tukey HSD^{a,b}

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol	3	,3384	
Saponin	2	1,6500	
Bakteri	3	13,9667	13,9667
Bakteri_Saponin	2		31,3667
Sig.		,391	,237

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,667.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



IHT3.24																		
MK382471.1_Ochrobactrum_pituitosum_strain_ICMP_7355_16S	0,022																	
KU949758.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_HY2-1	0,023	0,016																
KF844054.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_NG-T21	0,023	0,010	0,016															
KY819002.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_FL93_16S	0,024	0,032	0,021	0,037														
NR_042599.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_DSM_7216	0,025	0,054	0,047	0,055	0,049													
HQ406743.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_NF17nrR	0,024	0,023	0,021	0,013	0,013	0,020												
NR_115044.1_Ochrobactrum_grignonense_strain_OgA9a	0,030	0,028	0,001	0,015	0,022	0,013	0,014											
NR_114149.1_Ochrobactrum_grignonense_strain_NBRC_102586	0,032	0,015	0,001	0,015	0,022	0,013	0,014	0,000										
JQ612513.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_KH-7	0,054	0,022	0,008	0,022	0,028	0,019	0,021	0,007	0,007									
JX455164.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_BMO-111	0,054	0,054	0,020	0,055	0,049	0,050	0,050	0,048	0,048	0,054								
FJ266319.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_RFNB9	0,054	0,054	0,047	0,055	0,049	0,050	0,050	0,048	0,048	0,000								
KT799664.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_I2_1_16S	0,033	0,075	0,069	0,076	0,071	0,072	0,072	0,070	0,070	0,076	0,061	0,061						
NR_042589.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_CCUG_30717	0,032	0,027	0,013	0,027	0,013	0,023	0,021	0,013	0,013	0,020	0,049	0,049	0,070					
JX266314.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_A1011_16S	0,032	0,027	0,013	0,027	0,013	0,023	0,021	0,013	0,013	0,020	0,049	0,049	0,070	0,000				
KF844052.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_NG-T7_16S	0,033	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,012	0,012	0,017	0,019	0,022	0,003	0,005	0,001			
NR_043398.1_Agrobacterium_rhizogenes_strain_IFO_13257_16S_ribosomal_RNA_partial_sequence	0,135	0,129	0,129	0,129	0,129	0,129	0,129	0,131	0,130	0,132	0,135	0,135	0,131	0,128	0,128	0,130		
D14501.1_Agrobacterium_rhizogenes_gene_for_16S_ribosomal_RNA_complete_sequence	0,141	0,134	0,134	0,134	0,134	0,134	0,134	0,136	0,136	0,133	0,134	0,135	0,132	0,133	0,135	0,017		
D14502.1_Agrobacterium_vitis_gene_for_16S_ribosomal_RNA_complete_sequence	0,025	0,027	0,013	0,027	0,013	0,023	0,021	0,013	0,013	0,020	0,049	0,049	0,070	0,128	0,128	0,130	0,017	0,000
IHT3.24																		
MK382471.1_Ochrobactrum_pituitosum_strain_ICMP_7355_16S	97,8																	
KU949758.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_HY2-1	97,7	98,4																
KF844054.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_NG-T21	97,7	99	98,4															
KY819002.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_FL93_16S	97,6	96,8	97,9	96,3														
NR_042599.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_DSM_7216	97,5	94,6	95,3	94,5	95,1													
HQ406743.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_NF17nrR	97,6	97,7	97,9	98,7	98,7	98												
NR_115044.1_Ochrobactrum_grignonense_strain_OgA9a	97	97,2	99,9	98,5	97,8	98,7	98,6											
NR_114149.1_Ochrobactrum_grignonense_strain_NBRC_102586	96,8	98,5	99,9	98,5	97,8	98,7	98,6	100										
JQ612513.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_KH-7	94,6	97,8	99,2	97,8	97,2	98,1	97,9	99,3	99,3									
JX455164.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_BMO-111	94,6	94,6	98	94,5	95,1	95	95	95,2	95,2	94,6								
FJ266319.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_RFNB9	94,6	94,6	95,3	94,5	95,1	95	95	95,2	95,2	94,6	100							
KT799664.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_I2_1_16S	96,7	92,5	93,1	92,4	92,9	92,8	92,8	93	93	92,4	93,9	93,9						
NR_042589.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_CCUG_30717	96,8	97,3	98,7	97,3	98,7	97,7	97,9	98,7	98,7	98	95,1	95,1	93					
JX266314.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_A1011_16S	96,8	97,3	98,7	97,3	98,7	97,7	97,9	98,7	98,7	98	95,1	95,1	93	100				
KF844052.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_NG-T7_16S	96,7	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,8	98,8	98,3	98,1	97,8	99,7	99,5	99,9			
NR_043398.1_Agrobacterium_rhizogenes_strain_IFO_13257_16S_ribosomal_RNA_partial_sequence	86,5	87,1	87,1	87,1	87,1	87,1	87,1	86,9	87	86,8	86,5	86,5	86,9	87,2	87,2	87		
D14501.1_Agrobacterium_rhizogenes_gene_for_16S_ribosomal_RNA_complete_sequence	85,9	86,6	86,6	86,6	86,6	86,6	86,6	86,4	86,4	86,7	86,6	86,6	86,5	86,8	86,7	86,5	98,3	
D14502.1_Agrobacterium_vitis_gene_for_16S_ribosomal_RNA_complete_sequence	97,5	97,3	98,7	97,3	98,7	97,7	97,9	98,7	98,7	98	95,1	95,1	93	87,2	87,2	87	98,3	100
IHT3.24																		
MK382471.1_Ochrobactrum_pituitosum_strain_ICMP_7355_16S	97,8																	
KU949758.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_HY2-1	97,7																	
KF844054.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_NG-T21	97,7																	
KY819002.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_FL93_16S	97,6																	
NR_042599.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_DSM_7216	97,5																	
HQ406743.1_Ochrobactrum_thiopenivorans_strain_NF17nrR	97,6																	
NR_115044.1_Ochrobactrum_grignonense_strain_OgA9a	97																	
NR_114149.1_Ochrobactrum_grignonense_strain_NBRC_102586	96,8																	
JQ612513.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_KH-7	94,6																	
JX455164.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_BMO-111	94,6																	
FJ266319.1_Ochrobactrum_anthropi_strain_RFNB9	94,6																	
KT799664.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_I2_1_16S	96,7																	
NR_042589.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_CCUG_30717	96,8																	
JX266314.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_A1011_16S	96,8																	
KF844052.1_Ochrobactrum_pseudogrignonense_strain_NG-T7_16S	96,7																	
NR_043398.1_Agrobacterium_rhizogenes_strain_IFO_13257_16S_ribosomal_RNA_partial_sequence	86,5																	
D14501.1_Agrobacterium_rhizogenes_gene_for_16S_ribosomal_RNA_complete_sequence	85,9																	
D14502.1_Agrobacterium_vitis_gene_for_16S_ribosomal_RNA_complete_sequence	97,5																	