

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI
SENYAWA HIDROKARBON PADA TANAH BENGKEL DI
DESA SUKO KECAMATAN SUKODONO**

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

SALMA FARAH SYIFA ZAYYANNA

09040121065

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA
2024**

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Salma Farah Syifa Zayyanna

NIM : 09040121065

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2021

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul "ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI SENYAWA HIDROKARBON PADA TANAH BENGKEL DI DESA SUKO KECAMATAN SUKODONO" Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 16 Januari 2025

Yang menyatakan,



Salma Farah Syifa Zayyanna

NIM. 09040121065

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi

Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Senyawa Hidrokarbon
Pada Tanah Bengkel Di Desa Suko Kecamatan Sukodono

Diajukan Oleh:

Salma Farah Syifa Zayyanna

NIM: 09040121065

Telah diperiksa dan disetujui
di Surabaya, 24 Desember 2024

Dosen Pembimbing Utama



Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si
NIP. 198506252011012010

Dosen Pembimbing Pendamping



Dr. Moch Irfan Hadi, M.KL.
NIP. 198604242014031003

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Salma Farah Syifa Zayyanna ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 7 Januari 2025

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si.
NIP. 198506252011012010

Penguji II



Dr. Moch Irfan Hadi, M.KL.
NIP. 198604242014031003

Penguji III



Eko Teguh Pribadi, SKM, M.Kes.
NIP. 198001152014031001

Penguji IV



Saiku Rokhim, M.KKK.
NIP. 198612212014031001

Mengetahui.

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Ampel Surabaya



Saepul Hamdani, M.Pd.
NIP. 196507312000031002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Salma Farah Syifa Zayyanna
NIM : 09090121065
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi
E-mail address : farah.syifa1012@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)

yang berjudul :

[Solusi dan Karakterisasi Bakteri Pendeградasi Senyawa Hidrokarbon
pada Tanah Benakel Di Desa Sukro Kecamatan Sutodono

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 16 Januari 2025

Penulis

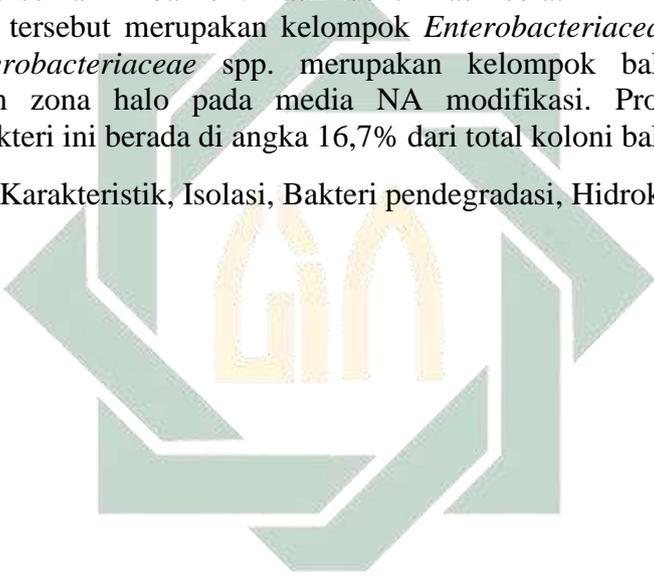
(Salma Farah Syifa Zayyanna)
nama terang dan tanda tangan

ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI SENYAWA HIDROKARBON PADA TANAH BENGKEL DI DESA SUKO KECAMATAN SUKODONO

Hidrokarbon seperti minyak bumi dan turunannya, menghasilkan limbah beracun, termasuk oli bekas, yang merusak lingkungan dan makhluk hidup. Kendaraan bermotor menjadi sumber utama pencemaran limbah ini. Mikroorganisme alami dapat digunakan sebagai solusi pengurai, sehingga penelitian tentang bakteri pengurai sangat penting. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri pendegradasi limbah oli dan jenis bakterinya. Penelitian ini adalah deskriptif eksploratif dengan menggunakan metode purposive sampling. Hasil pengamatan pada isolasi menggunakan media NA modifikasi terdapat koloni bakteri yang tumbuh sehingga menunjukkan adanya kelompok bakteri yang mampu hidup pada lingkungan tercemar limbah oli. Hasil Identifikasi isolat B1⁻⁷ menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan kelompok *Enterobacteriaceae* spp. Kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp. merupakan kelompok bakteri yang dapat menghasilkan zona halo pada media NA modifikasi. Proporsi keberadaan kelompok bakteri ini berada di angka 16,7% dari total koloni bakteri.

Kata kunci: Karakteristik, Isolasi, Bakteri pendegradasi, Hidrokarbon, Zona halo



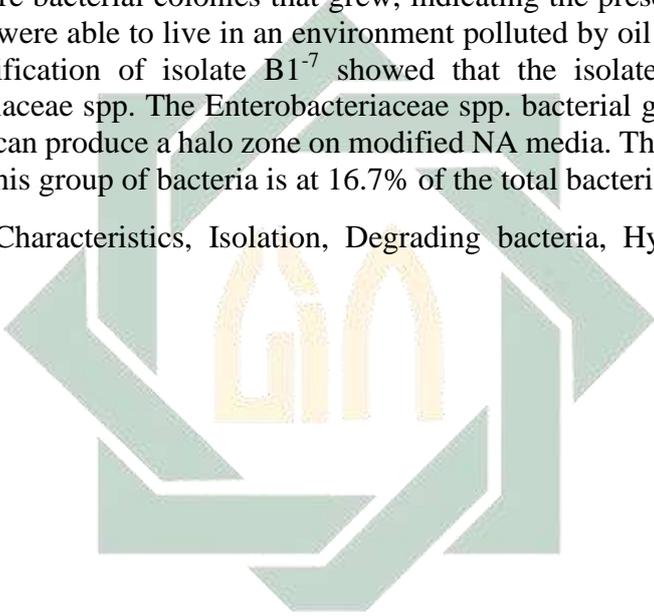
UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROCARBON COMPOUND DEGRADING BACTERIA IN WORKSHOP SOIL IN SUKO VILLAGE SUKODONO DISTRICT

Hydrocarbons such as petroleum and its derivatives, produce toxic waste, including used oil, which damages the environment and living things. Motor vehicles are the main source of this waste pollution. Natural microorganisms can be used as decomposing solutions, so research on decomposing bacteria is very important. This study aims to determine the presence of waste oil degrading bacteria and the types of bacteria. This study is descriptive exploratory using the purposive sampling method. The results of observations on isolation using modified NA media showed that there were bacterial colonies that grew, indicating the presence of a group of bacteria that were able to live in an environment polluted by oil waste. The results of the identification of isolate B1⁻⁷ showed that the isolate was a group of Enterobacteriaceae spp. The Enterobacteriaceae spp. bacterial group is a group of bacteria that can produce a halo zone on modified NA media. The proportion of the presence of this group of bacteria is at 16.7% of the total bacterial colonies.

Keywords: Characteristics, Isolation, Degrading bacteria, Hydrocarbons, Halo zone



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, yang telah melimpahkan karunia dan hidayah-Nya sehingga skripsi dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Senyawa Hidrokarbon Pada Tanah Bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono”, dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat tugas akhir mahasiswa Program Studi S1 Biologi.

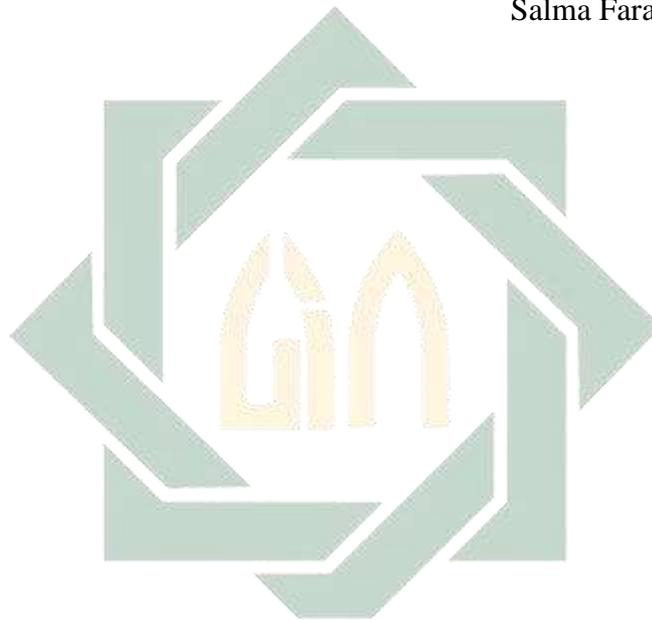
Penyusunan skripsi ini penulis upayakan dengan semaksimal mungkin dengan bantuan berbagai pihak. Maka dari itu, penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Akh. Muzakki, M.Ag., Grad.Dip.SEA., M.Phil., Ph.D. selaku Rektor UIN Sunan Ampel Surabaya.
2. Dr. A. Saepul Hamdani, M. Pd. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Ampel Surabaya.
3. Asri Sawiji. M.T. selaku Ketua Jurusan Sains Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Ampel Surabaya
4. Esti Tyastirin, M. KM. selaku Ketua Program Studi Biologi UIN Sunan Ampel Surabaya.
5. Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si. dan Dr. Moch Irfan Hadi, M.KL. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini.
6. Eko Teguh Pribadi, SKM, M.Kes. dan Saiku Rokhim, M.KKK. sebagai dosen penguji skripsi ini.
7. Orang tua yang selalu mendoakan, memberikan motivasi penulis untuk selalu semangat dan mendukung baik dari material maupun spiritual.
8. Sahabat yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Pihak lain yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Dalam hal itu, penulis menyadari masih adanya kekurangan atau keterbatasan dalam penyusunan skripsi. Penulis berharap adanya saran dan kritik yang berguna untuk kedepannya. Akhir kata, penulis berharap supaya skripsi dapat bermanfaat dalam menambah informasi dan wawasan bagi para pembaca untuk penelitian kedepannya.

Surabaya, 23 Desember 2024

Salma Farah Syifa Zayyanna



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR ISI

PERNYATAAN KEASLIAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
1.5 Batasan Penelitian	8
BAB II	9
KAJIAN PUSTAKA.....	9
2.1 Hidrokarbon	9
2.2 Limbah Oli	11
2.3 Mikroba Pendegradasi Limbah Oli	14
2.4 Isolasi dan Identifikasi Bakteri.....	15
2.4.1 Isolasi Bakteri	15
2.4.2 Identifikasi Bakteri.....	17
BAB III	24
METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian.....	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.3 Alat dan Bahan.....	25
3.4 Prosedur Penelitian.....	25
3.4.1 Pengambilan Sampel.....	25
3.4.2 Sterilisasi Alat dan Media	26
3.4.3 Pembuatan Media.....	26

3.4.4 Isolasi Bakteri.....	28
3.4.5 Uji Pendegradasi Hidrokarbon.....	28
3.4.6 Pemurnian Koloni	29
3.4.7 Identifikasi dengan Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis.....	29
3.4.8 Uji Biokimia.....	31
3.5 Analisis Data.....	34
3.5.1 Perhitungan Proporsi Keberadaan Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon	35
BAB IV	36
HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Pendegradasi Limbah Oli	36
4.2 Karakterisasi Makroskopis Bakteri	38
4.3 Karakterisasi Mikroskopis Bakteri.....	40
4.4 Uji Biokimia.....	43
4.5 Jenis Kelompok Bakteri Teridentifikasi.....	48
4.6 Interpretasi Zona Halo.....	54
BAB V	62
PENUTUP	62
5.1 Kesimpulan	62
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA.....	64
LAMPIRAN	70

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Standar Baku Mutu Limbah Cair Menurut Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 006 Tahun 2021	13
Tabel 3. 1 Rencana Pelaksanaan Penelitian	24
Tabel 4. 1 Karakterisasi Makroskopis Koloni Bakteri	38
Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Mikroskopis	40
Tabel 4. 3 Hasil Pengamatan Bakteri secara Uji Biokimia	43
Tabel 4. 4 Perbandingan Hasil Uji Biokimia dengan Karakteristik Bakteri	47



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4. 1 Hasil isolasi bakteri pendegradasi limbah oli.....	37
Gambar 4. 2 Hasil pengamatan zona halo.....	56



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Dokumentasi Kegiatan	70
Lampiran 2 Perhitungan Proporsi Keberadaan Bakteri Pendegradasi	71



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Minyak bumi adalah salah satu sumber energi utama yang saat ini masih di gunakan dan diperlukan untuk menunjang kegiatan masyarakat. Kebutuhan manusia tiap harinya semakin meningkat hal ini mengakibatkan pertumbuhan permintaan terhadap minyak bumi juga ikut meningkat (Muraza & Galadima, 2015). Seiring dengan tingginya angka permintaan terhadap minyak bumi hal ini juga akan berakibat semakin banyaknya limbah yang dihasilkan dari pengolahan minyak bumi. Pengolahan limbah minyak bumi yang kurang tepat dan penanganannya terhadap tumpahan ataupun buangan ke lingkungan akan berakibat rusaknya lingkungan sekitar (Charlena, 2010). Kerusakan yang ditimbulkan dari buangan atau tumpahan minyak bumi akan akan mempengaruhi lingkungan karena minyak bumi memiliki karakteristik yang sulit untuk didegradasi. Minyak bumi juga memiliki tingkat viskositas yang tergolong tinggi dan juga memiliki tingkat densitas yang tinggi karena minyak bumi memiliki kandungan senyawa organik yang lebih berat seperti senyawa resin dan aspalten (Hao & Lu, 2009).

Pencemaran tanah selama ini banyak disumbang oleh industri minyak bumi dan gas hal ini merupakan salah satu masalah terbesar yang ada di dunia. kerusakan akibat tumpahan minyak bumi, kebocoran minyak, ataupun timbunan oli bekas merupakan persoalan yang perlu segera untuk mendapatkan penanganan. Salah satu jenis limbah yang berasal dari pengolahan minyak bumi ataupun penggunaan kendaraan bermotor adalah oli bekas. Limbah oli bekas sampai saat ini merupakan masalah serius karena penanganan yang

kurang tepat akibat buangan dari limbah oli bekas dapat mengganggu lingkungan sekitar. Limbah oli bekas juga menjadi masalah karena jumlahnya yang relatif besar, selain itu limbah oli bekas memiliki sifat dan karakteristik limbah yang tergolong ke dalam limbah B3 (Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, 2004).

Limbah oli bekas mengandung logam berat seperti besi, timah, cadmium, mangan, seng dan sebagainya. Dalam ilmu kimia limbah oli bekas ini merupakan senyawa yang dapat digolongkan sebagai senyawa hidrokarbon. Limbah oli bekas dapat dikatakan sebagai hidrokarbon karena memiliki kandungan karbon dan hydrogen (Banerjee *et al.*, 2016). Senyawa ini secara umum ditemukan pada minyak bumi (bahan bakar minyak, oli, gas LPG), plastik, parafin, isopropil alkohol, dan aspal (Sihag *et al.*, 2014). Limbah oli bekas memiliki sifat *non-biodegradable* dan senyawa yang terdapat di dalamnya memiliki sifat toksik. Sifat toksisitas senyawa pada limbah oli bekas seperti *polychlorinated Biphenyls* (PCBs) dan *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAHs). Senyawa ini digolongkan ke dalam senyawa toksisitas karena memiliki panjang untaian rantai karbon yang kurang dari 9 sehingga sulit untuk diurai (Welan *et al.*, 2019). Pencemaran yang lingkungan yang terjadi karena tumpahan, timbunan limbah oli, dan penanganan limbah yang kurang tetap dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan lingkungan yang serius. Kerusakan lingkungan yang terjadi akan semakin sulit ditangani apabila penanganan terhadap tumpahan atau timbunan limbah oli tidak ditangani dengan baik sejak dini.

Limbah oli ketika terbuang ke lingkungan baik berupa tumpahan atau ditimbun hal tersebut akan merusak lingkungan merusak flora tanah dan juga akan berimbas kepada tumbuhan dan hewan yang berada di sekitar area buangan atau area tumpahan limbah oli. Oli bekas adalah salah satu senyawa yang bersifat racun dan dapat berdampak langsung terhadap kehidupan makhluk hidup. Di samping itu limbah oli bekas juga berdampak tidak langsung terhadap komponen biotik dan abiotik yang terdapat di dalam tanah (LAPI-ITB, 2001). Pencemaran akibat limbah oli salah satunya yang terbesar berasal dari kendaraan bermotor. Limbah oli bekas yang berasal dari kendaraan bermotor dalam beberapa penelitian menyebutkan bahwa limbah oli bekas memiliki sifat yang beracun dan berbahaya. Limbah oli bekas bersifat racun dan berbahaya karena memiliki kandungan benzena toluena, etilbenzena, xylena. Senyawa tersebut merupakan senyawa yang bersifat karsinogenik dan toksik. Kandungan limbah oli bekas ini lah yang membuat limbah oli bekas digolongkan sebagai limbah berbahaya dan beracun (Ervayenri, 2005).

Al-Qur'an juga menjelaskan terkait dengan bagaimana manusia yang kurang memperhatikan perilakunya sehingga merusak lingkungan sekitarnya. hal tersebut dijelaskan dalam Qur'an surah Ar-Rum ayat 41 :

يَرْجِعُونَ لَعَلَّهُمْ عَمِلُوا الَّذِي بَعْضٌ لِيُذِيقَهُم النَّاسُ أَيْدِي كَسَبَتْ بِمَا وَالْبَحْرُ الْبَرِّ فِي الْفَسَادِ ظَهَرَ

Artinya : *“Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)”* (QS. Ar-Rum : 41).

Ayat diatas menjelaskan bagaimana sikap manusia yang kurang memperhatikan lingkungan dapat mengakibatkan kerusakan. Kerusakan ini ditimbulkan akibat ulah manusia itu sendiri. Tafsir Zubdatut Tafsir Min Fathil Qadir menjelaskan dalam ayat ini bahwa manusia akan mendapat kerusakan

akibat perbuatan mereka. Hal ini terjadi untuk mengingatkan manusia kepada Allah SWT.

Pengelolaan dan penanganan terhadap limbah hidrokarbon atau minyak bumi membutuhkan metode yang tepat dan efisien guna dapat mencegah terjadinya kerusakan yang berkelanjutan. Metode pengelolaan pada lingkungan tercemar hidrokarbon terutama minyak bumi yang banyak digunakan adalah penanganan secara kimia dan fisika. Metode penanganan secara fisika dan kimia sangat efektif untuk tujuan jangka pendek, akan tetapi membutuhkan banyak biaya dan menimbulkan dampak negatif pada lingkungan dan ekosistem. Penanganan limbah hidrokarbon atau minyak bumi yang memanfaatkan mikroorganisme merupakan salah satu pilihan lain yang cukup baik. Mikroorganisme ini dimanfaatkan dengan menggunakan mikroorganisme alami yang berada di lingkungan sekitar dan menggunakannya sebagai agen bioremediasi untuk mengurangi kadar limbah di sekitar (Pertiwi *et al.*, 2011).

Salah satu metode untuk mengurangi dampak lingkungan akibat kerusakan adalah bioremediasi. Bioremediasi merupakan salah satu metode alternatif yang lebih efektif efisien dan ramah lingkungan. Bioremediasi adalah suatu metode dimana memanfaatkan organisme lain untuk menanggulangi pencemaran. Bioremediasi umumnya menggunakan bakteri sebagai agen biologi untuk pemecah atau menguraikan senyawa yang mencemari lingkungan. Limbah oli bekas sebagai senyawa hidrokarbon dapat diuraikan dengan bantuan bakteri tanah. Bakteri dapat digunakan sebagai agen biologi dalam pencemaran hidrokarbon karena kemampuan bakteri untuk menguraikan

senyawa hidrokarbon dan biomassa. Untuk mengetahui bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa hidrokarbon perlu dilakukan penelitian untuk mencari bakteri potensial (Andrews *et al.*, 2004; Dhar *et al.*, 2012).

Menurut hasil penelitian yang dilakukan Sumiardi (2019) menunjukkan adanya bakteri yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon. Bakteri ini memiliki karakteristik yang mampu dalam mengurangi kadar BOD dan mampu tumbuh pada media ber pH netral. Penelitian ini tidak menjelaskan jenis bakteri yang ditemukan. Penelitian ini dilakukan guna mengetahui ada tidaknya bakteri yang mampu bertahan pada kawasan yang tercemar limbah oli. Perlu adanya penelitian lanjutan guna mengetahui jenis bakteri agar dapat dilakukan upaya peningkatan penanganan limbah terutama limbah oli.

Bakteri *Bacillus* sp. Merupakan kelompok bakteri yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon. Penelitian yang dilakukan oleh Manalu (2017) menjelaskan bahwa dari semua inventarisasi bakteri dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon atau minyak bumi. Penyeleksian terhadap bakteri yang mampu mendegradasi hidrokarbon atau minyak bumi ini dilakukan dengan media LB (luria-bertani) yang di kumpulkan di sekitar area Sumatra selatan ini terdiri atas kelompok bakteri *Bacillus* sp. *pseudomonas* sp. *Klebsiella* sp. *Streptococcus* sp. dan *Staphylococcus* sp. Pada beberapa kelompok ini dilakukan perlakuan untuk menyeleksi kelompok yang paling baik yang telah di modifikasi dengan penambahan minyak mentah. Penelitian ini mendapatkan bahwa kelompok bakteri *Bacillus* sp. merupakan kelompok yang paling baik dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon atau minyak bumi.

Kecamatan Sukodono merupakan salah satu kecamatan yang berada di kota Sidoarjo. Kecamatan Sukodono berdasarkan badan pusat statistik tahun 2023 menjelaskan bahwa kecamatan ini merupakan salah satu kecamatan yang ada di kota besar yaitu Sidoarjo yang memiliki lahan pertanian berupa sawah dan juga perkebunan. Laporan tahunan 2021 hingga 2022 menunjukkan bahwa Kecamatan Sukodono memiliki potensi yang cukup baik terhadap sektor pertanian dan juga perkebunan. Kecamatan Sukodono yang terletak di antara kota Surabaya dan Sidoarjo merupakan salah satu alasan mengapa mulai banyaknya bengkel-bengkel kecil yang beroperasi. Beroperasinya bengkel-bengkel kecil ini berpotensi terjadinya pencemaran lingkungan terutama limbah oli. Penanganan limbah oli yang kurang tepat dapat mengakibatkan kerusakan pada unsur tanah yang terdapat di Kecamatan Sukodono. Kerusakan unsur tanah ini pada akhirnya akan mempengaruhi produktivitas lahan persawahan dan juga perkebunan yang ada di Kecamatan Sukodono (BPS Kabupaten Sidoarjo, 2023).

Berdasarkan uraian latar belakang ini terkait dengan banyaknya bengkel- bengkel kecil yang beroperasi memunculkan kekhawatiran terhadap pencemaran lingkungan. Kurangnya edukasi kepada masyarakat terkait dengan pengolahan limbah dan juga pentingnya menjaga lingkungan sekitar dapat mengakibatkan kerusakan lingkungan yang serius. Sehingga peneliti ingin melakukan penelitian terkait dengan bagaimana keberadaan bakteri yang ada pada area perbengkelan terutama pada Kecamatan Sukodono. Bakteri yang ditemukan pada area perbengkelan di Kecamatan Sukodono diamati untuk mengetahui bagaimana kemampuannya dalam mendegradasi senyawa

hidrokarbon, terutama tumpahan oli. Penelitian ini diharapkan mampu untuk digunakan sebagai penelitian awal guna mengetahui potensi bakteri alami yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Jenis bakteri apa saja yang dapat diisolasi dari tanah tercemar limbah hidrokarbon (oli bekas) pada tanah bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono ?
2. Bagaimana karakteristik bakteri pendegradasi hidrokarbon dari tanah tercemar limbah hidrokarbon (oli bekas) pada tanah bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono?
3. Bagaimana proporsi keberadaan bakteri pendegradasi hidrokarbon (oli bekas) pada tanah bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui jenis bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar limbah hidrokarbon (oli bekas) pada tanah bengkel Desa Suko Kecamatan Sukodono.
2. Untuk mengetahui karakteristik bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar limbah hidrokarbon (limbah oli) pada tanah bengkel Desa Suko Kecamatan Sukodono.
3. Untuk mengetahui proporsi keberadaan bakteri pendegradasi hidrokarbon (oli bekas) pada tanah bengkel Desa Suko Kecamatan Sukodono.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi dasar bagi Akademisi atau peneliti terkait dengan bakteri yang mampu mendegradasi limbah hidrokarbon (oli bekas).
2. Memberikan informasi dan wawasan kepada para pembaca dan masyarakat bahwa pada tanah bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono terdapat bakteri yang mampu mendegradasi limbah hidrokarbon (oli bekas) dan dapat di kembangkan sebagai agen remediasi.

1.5 Batasan Penelitian

1. Sampel yang digunakan berasal dari tanah bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono.
2. Sampling dilakukan dengan teknik *purposive sampling*. Pengambilan dilakukan pada bengkel yang beroperasi lebih dari 5 tahun.
3. Pengamatan morfologi koloni bakteri secara mikroskopis dan makroskopis.
4. Pengamatan morfologi bakteri secara mikroskopis dilihat dari pewarnaan gram, pewarnaan endospora dan uji Biokimia.
5. Analisis biokimia yang dilakukan meliputi,
 - a. Uji Katalase
 - b. Uji Oksidase
 - c. Uji Sulfat, Uji *Indole*, Uji Motilitas (Jenis Media SIM)
 - d. Uji H₂S, Uji Fermentasi Gula (Jenis Media TSIA)

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Hidrokarbon

Hidrokarbon adalah suatu senyawa yang tersusun atas atom karbon dan juga atom hidrogen. Metana merupakan bentuk paling sederhana dari senyawa hidrokarbon. Metana merupakan senyawa yang memiliki bentuk tetrahedron. Bentuk tetrahedron adalah bentuk struktur kimia ketika suatu atom dikelilingi oleh 4 atom lain sehingga membentuk limas segitiga. Ikatan-ikatan pada senyawa hidrokarbon dapat dibedakan menjadi dua ikatan hidrokarbon jenuh dan hidrokarbon tak jenuh. Hidrokarbon jenuh adalah senyawa hidrokarbon yang pada rantai karbonnya berikatan secara tunggal. Contoh hidrokarbon pada senyawa hidrokarbon jenuh adalah alkana. Pada hidrokarbon tak jenuh merupakan senyawa hidrokarbon yang memiliki ikatan rangkap. Ikatan rangkap pada hidrokarbon tak jenuh bisa berupa ikatan rangkap dua atau biasa disebut dengan alkena. Ikatan rangkap pada hidrokarbon tak jenuh yang berupa ikatan rangkap tiga biasa disebut alkuna.

Pada bidang ilmu kimia senyawa hidrokarbon dijelaskan merupakan suatu senyawa yang terdiri atas atom karbon dan atom hidrogen. Seluruh atom antara hidrogen dan karbon yang berikatan satu dengan yang lain dikelompokkan ke dalam tiga macam jenis hidrokarbon. Hidrokarbon dapat dibagi menjadi 3 jenis berdasarkan ikatan rantai karbonnya. Berdasarkan bentuk ikatannya senyawa hidrokarbon juga dapat dibedakan menjadi hidrokarbon alifatik hidrokarbon alisiklik dan hidrokarbon aromatik. Hidrokarbon alifatik adalah senyawa hidrokarbon dimana setiap atom karbon

saling berikatan satu sama lain membentuk rangkaian tunggal. Rangkaian tunggal pada ikatan senyawa hidrokarbon alifatik bisa berupa ikatan alkana, ikatan alkena dan ikatan alkuna (Riswiyanto, 2009). Hidrokarbon alifatik adalah suatu senyawa hidrokarbon yang memiliki susunan atom yang saling berikatan antara satu dengan yang lain membentuk suatu untaian rantai lurus atau bercabang. Ikatan hidrokarbon alifatik ini tidak bersifat aromatik. Ikatan hidrokarbon alifatik adalah ikatan hidrokarbon yang berupa ikatan tunggal ataupun ganda terhadap ikatan lain. Ikatan hidrokarbon ini dapat mengikat unsur lain selain atom hidrogen. Unsur yang dapat diikat selain unsur hidrogen dapat berupa unsur oksigen atau nitrogen atau unsur-unsur lain. Hidrokarbon alifatik secara umum merupakan suatu senyawa yang bersifat *flammable*. *Flammable* adalah suatu sifat dari suatu senyawa yang memungkinkan senyawa tersebut untuk mudah terbakar. Sifat *flammable* inilah yang membuat kebanyakan hidrokarbon alifatik banyak dimanfaatkan sebagai bahan bakar. Contoh hidrokarbon alifatik adalah metana atau asetilen (Aprilyanti, 2020).

Hidrokarbon alisiklik merupakan suatu senyawa hidrokarbon yang memiliki bentuk menyerupai cincin. Senyawa hidrokarbon alisiklik berbeda dengan alifatik hidrokarbon ini merupakan suatu senyawa organik yang bersifat alifatik dan siklik. Hidrokarbon alisiklik biasanya membentuk suatu cincin karbon yang dapat berupa senyawa hidrokarbon jenuh ataupun senyawa hidrokarbon tidak jenuh. Senyawa hidrokarbon alisiklik merupakan suatu senyawa hidrokarbon yang tidak memiliki sifat aromatik. Senyawa hidrokarbon alisiklik memiliki bentuk rantai bercabang dengan sifat alifatik (Febriana *et al.*, 2014).

Senyawa hidrokarbon aromatik adalah suatu senyawa hidrokarbon yang terdiri atas senyawa hidrokarbon yang saling berikatan. Senyawa hidrokarbon aromatik dapat berupa ikatan tunggal ataupun ganda diantara atom karbon yang lain. Senyawa hidrokarbon aromatik memiliki konfigurasi enam atom karbon. Enam atom karbon pada senyawa hidrokarbon aromatik biasa disebut dengan istilah cincin benzena. Pada senyawa hidrokarbon aromatik dapat membentuk ikatan monosiklik ataupun polisiklik. Pada hidrokarbon aromatik ada satu atom karbon yang boleh digantikan oleh atom yang lain. Senyawa hidrokarbon aromatik dapat digantikan oleh atom lain berupa oksigen nitrogen sulfur. Sebagai contoh senyawa hidrokarbon aromatik adalah senyawa furan. Senyawa hidrokarbon aromatik merupakan suatu senyawa yang membentuk heterosiklik. Karena ikatan heterosiklik inilah yang membuat senyawa hidrokarbon aromatik biasanya memiliki sifat toksin dan juga karsinogenik (Rachmawani et al., 2016).

2.2 Limbah Oli

Pemakaian kendaraan bermotor seperti sepeda motor mobil dan juga alat bergerak lainnya akan menghasilkan limbah oli bekas. Oli bekas yang dihasilkan dari kegiatan manusia akan menghasilkan dua jenis yaitu oli industri dan juga oli hitam (Saleh & Nelvidawati, 2023). Oli industri (*light industrial oil*) merupakan limbah oli yang berasal dari kegiatan industrial. Oli industri atau *light industrial oil* hanya membutuhkan perlakuan sederhana seperti pemanasan atau penyaringan. Oli hitam merupakan limbah oli yang berasal dari kegiatan otomotif terutama untuk pelumasan (Raharjo, 2007). Oli hitam biasanya banyak ditemukan pada area perbengkelan otomotif sebagai bahan

pelumas kendaraan. Oli hitam digolongkan ke dalam limbah B3 karena pengolahannya yang membutuhkan perlakuan khusus. Kegiatan otomotif kurang memperhatikan bagaimana pengolahan limbah oli hitam (Surtikanti & Surakusumah, 2004).

Pelumas seperti oli yang telah digunakan dan sudah tidak dapat digunakan lagi sebagai pelumas tergolong dalam limbah Berbahaya dan Beracun. Limbah pelumas seperti oli bekas di kelompokkan dalam limbah bahan berbahaya dan beracun karena limbah ini dapat mencemari lingkungan dan merusak lingkungan (Pitrandjalisari, 2009). Penanganan limbah oli bekas merupakan suatu yang dianjurkan untuk mengatasi masalah dampak lingkungan. Buangan limbah oli bekas dapat menyebabkan munculnya lapisan tipis pada permukaan air. Lapisan tipis pada permukaan air akibat buangan limbah oli bekas ini akan mengakibatkan kebutuhan oksigen untuk makhluk hidup sulit terpenuhi. Limbah oli bekas yang semakin banyak akan memunculkan dampak negatif terhadap lingkungan. Lapisan tipis yang muncul akibat buangan limbah oli bekas ini akan mengalami proses dekomposisi. Proses dekomposisi hidrokarbon adalah suatu proses di mana kandungan oksigen pada air akan terlepas sehingga kebutuhan oksigen untuk makhluk hidup akan berkurang (Rubiono & Yasi, 2017).

Tabel 2. 1 Standar Baku Mutu Limbah Cair Menurut Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 006 Tahun 2021

No.	Parameter	Kandungan dalam Oli Bekas (Mg/L)	Mutu Limbah Cair (Mg/L)
1.	Tembaga (Cu)	7	10- 60
2.	Timbal (Pb)	138	0,5-3
3.	Seng (Zn)	780	50-300
4.	Krom (Cr)	4	2,5-15
5.	Perak (Ag)	7	5-40

Sumber: Peraturan Menteri Lingkungan Hidup no. 006 tahun 2021

Tabel 2.1 menjelaskan dalam sebuah penelitian terkait dengan kandungan oli bekas kendaraan bermotor. Penelitian tersebut menjelaskan bagaimana oli pelumas bekas pada kendaraan bermotor juga memiliki kandungan yang cukup berbahaya dan melebihi batas ambang mutu dari peraturan menteri lingkungan hidup nomer 6 tahun 2021. Peraturan ini memuat tentang batasan kandungan senyawa dalam limbah dan juga sifat toksisitas limbah sehingga dapat di golongan kedalam golongan limbah B3. Tabel 2.1 menunjukkan bahwa limbah oli pelumas memiliki nilai kandungan yang melebihi dari yang telah di tentukan, sehingga perlu penanganan baik dalam pengumpulan dan juga pembuang limbah itu sendiri. Penggolongan limbah oli bekas sebagai bahan berbahaya dan beracun merupakan salah satu alasan untuk penanganan yang terhadap limbah tersebut (Yolantika *et al.*, 2015).

Salah satu cara mengatasi limbah oli adalah dengan menggunakan teknik bioremediasi. Bioremediasi adalah proses pengurangan atau penguraian limbah menggunakan agen biologi. Limbah oli merupakan salah satu masalah yang cukup serius untuk diperhatikan. Pengolahan limbah yang kurang baik akan dapat merusak lingkungan sekitar. Kerusakan lingkungan yang terjadi akibat pengolahan limbah yang kurang baik akan berdampak pada kehidupan manusia baik secara langsung ataupun tidak langsung. Penanganan terhadap limbah yang dilakukan dengan baik dan benar untuk menjaga lingkungan sekitar (Yahya, 2019). Pemanfaatan agen biologi merupakan salah satu langkah yang dapat di gunakan untuk penanganan limbah.

2.3 Mikroba Pendegradasi Limbah Oli

Proses degradasi hidrokarbon merupakan salah satu kegiatan yang telah dilakukan sejak tahun 70-an. Potensi mikroba sebagai agen untuk pendegradasian hidrokarbon telah dieksploitasi sejak dahulu. Pengeksploitasian terhadap mikroba sebagai agen pendegradasi hidrokarbon dilakukan dengan pencarian melalui lahan pertanian yang tercemar oleh buangan minyak. Pencarian terhadap kultur murni ataupun kultur campuran untuk mencari kemampuan mikroba dalam mendegradasi minyak bumi. Biasanya mikroba campuran memiliki kemampuan yang lebih baik dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon (Holifah, *et al.*, 2018).

Pencemaran lingkungan yang terjadi akibat minyak bumi merupakan pencemaran yang serius. Pencemaran lingkungan karena kontaminasi minyak bumi biasanya diakibatkan karena tumpahan tidak sengaja, penyimpanan yang kurang tepat, atau kebocoran. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk

penanganan terhadap pencemaran lingkungan akibat limbah oli bekas adalah dengan metode biodegradasi. Biodegradasi merupakan metode alternatif yang dapat digunakan untuk penanganan akibat cemaran limbah oli. Metode biodegradasi adalah metode yang memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode fisika kimia terhadap pemulihan lingkungan. Metode biodegradasi relatif memiliki harga yang lebih murah dan juga aman untuk lingkungan (Sumiardi, 2021).

Proses biodegradasi senyawa hidrokarbon dipengaruhi oleh faktor kimia. Faktor kimia yang mempengaruhi ini berkaitan dengan ketersediaan nutrisi, tidak adanya senyawa penunjang pertumbuhan dan tidak ada induktor enzim yang diperlukan. Selain faktor kimia ada juga faktor lingkungan berkaitan dengan kondisi fisik. Faktor lingkungan ini bisa berupa pH yang terlalu tinggi atau rendah suhu yang terlalu tinggi atau rendah dan sebagainya. Faktor mikroorganisme berkaitan dengan ketersediaan populasi mikroorganisme pendegradasi polutan hidrokarbon dan kepadatan populasi mikroorganisme pendegradasi polutan hidrokarbon yang rendah (Sumiardi, 2021).

2.4 Isolasi dan Identifikasi Bakteri

2.4.1 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri adalah suatu proses mengambil bakteri dari alam asalnya untuk di kultur atau di tumbuhkan pada media yang telah di buat. Isolasi bakteri juga bisa digunakan untuk mendapatkan bakteri murni dari alam untuk kegiatan penelitian atau pembelajaran (Singleton & Sainsbury, 2006). Isolasi bakteri memiliki prinsip yaitu memisahkan bakteri satu dengan yang lain dari alam. Isolasi bakteri dapat dilakukan

dengan menumbuhkannya dalam media buatan. Isolasi bakteri ini nantinya akan mendapatkan biakan biakan murni pada media yang telah dibutasel-sel mikroba akan membentuk koloni sel yang tetap pada tempatnya (Sabbathini & Pujiyanto, 2017). Adapun beberapa teknik isolasi bakteri menurut (Hadioetomo, 1993) yaitu:

1. Metode Cawan Gores (*Streak Plate*)

Metode cawan gores adalah suatu metode yang digunakan untuk memurnikan suatu biakan. Metode cawan gores biasanya dilakukan pada isolat bakteri alam untuk mendapatkan isolat bakteri murni. Selain bertujuan untuk memurnikan bakteri metode gores juga bertujuan untuk meremajakan isolat bakteri ke media yang baru. Teknik dalam metode gores terbagi dalam beberapa macam hal ini mempengaruhi koloni yang tumbuh (Hadioetomo, 1993):

- A. Metode gores sinambung: Metode goresan di mana goresan menyambung terus-menerus untuk meremajakan isolat bakteri ke media baru (Hadioetomo, 1993).
- B. Metode gores T: Suatu metode yang digunakan untuk mendapatkan koloni tunggal dengan membagi wilayah goresan menjadi beberapa bagian. (Hadioetomo, 1993).
- C. Metode gores kuadran: Suatu metode menggores dengan membagi ke dalam 4 kuadran pembagian ini bertujuan untuk mendapatkan koloni yang terpisah sehingga koloni yang diperoleh adalah koloni tunggal bakteri. Biasanya koloni bakteri yang tumbuh akan mengikuti bekas

goresan dan membentuk zigzag. Koloni yang di gores dengan metode ini bertujuan untuk pemurnian (Hadioetomo, 1993).

2. Metode *Spread Plate*

Metode *spread plate* merupakan suatu metode yang digunakan untuk menginokulasikan bakteri pada media yang sudah padat. Metode ini menggunakan alat yang disebut spreader untuk menyebarkan inokulum. Metode ini digunakan untuk bakteri yang memiliki ciri-ciri koloni menyebar (Hadioetomo, 1993).

3. Metode *Pour Plate*

Metode *pour plate* adalah suatu teknik inokulasi mikroorganisme dengan cara meletakkan inokulum sebelum menuangkan media kultur. Metode ini digunakan untuk bakteri aerob dan anaerob (Hadioetomo, 1993).

4. Teknik Pengenceran

Teknik pengenceran merupakan suatu cara yang digunakan untuk mengurangi tingkat konsentrasi kontaminasi pada suatu sampel. Teknik pengenceran bertujuan untuk memudahkan pembacaan hasil uji. Teknik pengenceran biasanya menggunakan perbandingan 1:10. Media pengencer dapat berupa berbagai jenis, bisa berupa media pemperkaya atau media fisiologis (Hadioetomo, 1993).

2.4.2 Identifikasi Bakteri

A. Pengamatan Makroskopis

Pengamatan makroskopis adalah pengamatan yang dilakukan pada koloni bakteri berupa pengamatan terhadap bentuk koloni,

elevasi koloni, pigmen koloni, ukuran koloni ataupun tepian koloni. Pengamatan makroskopis menjadi sangat penting untuk dilakukan karena setiap jenis bakteri memiliki ciri-ciri bentuk koloni yang berbeda-beda. perbedaan bentuk koloni bakteri terjadi karena karakteristik dari tiap bakteri yang berbeda-beda (Hadioetomo, 1993).

B. Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis adalah suatu pengamatan yang dilakukan untuk mengetahui struktur dari sel bakteri atau untuk mengetahui bagaimana bentuk dari bakteri tersebut. Pengamatan mikroskopis dapat dilakukan dalam banyak hal, baik berupa pewarnaan gram atau uji biokimia (Barrow & Feltham, 1993).

1. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram adalah metode yang dilakukan untuk identifikasi bakteri. Pewarnaan gram biasa dilakukan menggunakan dua jenis pewarna, kristal violet dan juga safranin. Kedua jenis pewarna ini akan mengindikasikan perbedaan dari lapisan dinding sel (Waluyo, 2010). Pewarnaan gram akan menghasilkan dua jenis bakteri yaitu bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Bakteri gram negatif adalah bakteri yang memiliki lapisan dinding sel lebih tipis daripada bakteri gram positif. Perbedaan ini terjadi karena bakteri gram negatif memiliki lapisan yang disebut lipopolisakarida dan pada gram positif memiliki dinding sel berupa peptidoglikan yang tebal (Pelczar & Chan, 1986). Perbedaan dinding sel inilah yang mengakibatkan terjadinya proses dekolorisasi pada gram negatif

sehingga pada proses tersebut pewarna pertama berupa kristal violet akan menghilang dan akan digantikan oleh pewarna kedua berupa safranin. Karena masuknya pewarna safranin bakteri gram negatif akan berwarna merah. Begitu juga sebaliknya bakteri gram positif tidak terpengaruh terhadap dekolorisasi akan berwarna biru keunguan (Hadioetomo, 1993).

2. Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora adalah suatu metode yang digunakan untuk mewarnai endospora pada suatu bakteri. Pewarnaan endospora memanfaatkan pewarna *malachite green*. Metode ini digunakan untuk mewarnai endospora melalui proses pemanasan. Metode pewarnaan endospora ini dilakukan dengan dua jenis pewarna yaitu *malachite green* dan juga safranin. Hasil akhir pewarnaan endospora bakteri akan berwarna merah sedangkan adanya endospora akan berwarna hijau karena pemberian *malachite green* (Bunchanan, 2003).

3. Uji Biokimia

Uji biokimia adalah suatu teknik pemanfaatan bahan kimia untuk mengidentifikasi dan juga membedakan suatu biakan dengan biakan lain melalui reaksi-reaksi kimia. Reaksi kimia yang terjadi merupakan hasil dari sifat fisiologis dari tiap biakan (Barrow & Feltham, 1993).

Beberapa jenis uji biokimia antara lain:

A. Uji *Sulfide, Indole, Motility* (Media SIM)

Uji *Sulfide, Indole, Motility* ini menggunakan media yang disebut dengan media SIM. Media *sulfide, indole, motility* memiliki

kandungan pepton dan juga natrium tiosulfat sebagai substrat sulfur yang berperan sebagai indikator H₂S. Media ini berbentuk agar yang bersifat semi solid sehingga media ini dapat digunakan untuk respirasi anaerob (Diyaningsih, 2019). Kandungan sulfur pada media ini akan menciptakan reaksi kimia munculnya endapan gelap berwarna hitam sebagai hasil reaksi pembentukan H₂S. Keberadaan indol dapat dideteksi dengan penambahan reagen kovac yang akan menghasilkan suatu lapisan pereaksi yang akan membentuk cincin merah. Media SIM (*Sulfide Indole Motility*) juga memiliki kemampuan untuk mengetahui kultur biakan memiliki kemampuan untuk bergerak atau tidak. Pergerakan ini ditandai dengan munculnya sebaran bakteri pada wilayah yang telah dilakukan penusukan (Castro, 2019).

B. Uji Katalase

Uji katalase adalah suatu metode uji untuk mengetahui apakah biakan yang telah ditumbuhkan memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim. Metode uji katalase ini memanfaatkan hidrogen *peroxide* untuk mengetahui bagaimana reaksinya terhadap bakteri. Hal positif pada metode uji katalase ini adalah ditandai dengan munculnya gelembung-gelembung udara pada tetesan H₂O₂ pada biakan. Apabila munculnya gelembung pada tetesan, dapat disimpulkan bahwa bakteri dapat melakukan (Hadioetomo, 1993).

C. Uji Oksidase

Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim oksidase. Metode uji oksidase ini

dilakukan dengan cara bakteri digoreskan pada oksidase strip. Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru atau ungu kehitaman dapat disimpulkan bakteri tersebut oksidase positif (+), dan jika tidak terjadi perubahan warna maka dapat dikatakan oksidase negatif (-) oksidase (Wadjudjy & Setiadi, 2020).

D. Uji Fermentasi Gula dan H₂S (Media *Triple Sugar Iron Agar*)

Uji fermentasi gula adalah suatu uji untuk mengetahui apakah dia akan bakteri dapat melakukan fermentasi terhadap tiga macam gula. Tiga macam gula yang terdapat pada media berupa glukosa laktosa dan sukrosa. Pada media yang digunakan mengandung indikator fenol red hal ini yang menyebabkan media akan berubah warna dari merah orange menjadi kuning yang menandakan bahwa terjadinya proses fermentasi terhadap gula. Perbedaan massa antara glukosa laktosa dan sukrosa dapat digunakan sebagai uji kualitatif untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi. Berdasarkan letaknya dapat diketahui biakan bakteri mampu memfermentasi paling baik dari ketiga jenis gula. Selain metode uji gula pada media TSIA juga dapat dilakukan uji pembentukan gas CO₂. Pembentukan gas CO₂ ini merupakan salah satu metode untuk mengetahui apakah bakteri tergolong *high fermented* atau *low fermented*. Pada media TSIA juga terdapat kandungan senyawa *iron* untuk mengetahui apakah bakteri mampu menghasilkan H₂S. Bakteri yang mampu menghasilkan H₂S akan mengubah bagian bawah media TSIA menjadi berwarna gelap (Buchanan & Gibbons, 1970).

E. Uji Pendegradasi Hidrokarbon

Uji degradasi diamati munculnya daerah halo pada koloni bakteri yang telah disuspensikan pada media NA yang telah dimodifikasi dengan penambahan oli. Semakin besar daerah halo yang dihasilkan oleh suatu biakan maka semakin besar pula dugaan bahwa biakan tersebut adalah mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon (Yolantika *et al.*, 2015). Porsi keberadaan bakteri yang membentuk daerah halo dan yang tidak membentuk daerah halo disajikan dalam bentuk persentase untuk mempermudah mengetahui bagaimana keberadaan koloni bakteri yang membentuk daerah halo.

Zona atau daerah halo yang terbentuk dapat menjadi indikator aktivitas enzim lipase. Penurunan kadar lemak terjadi melalui proses hidrolisis yang menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol. Asam yang terbentuk berperan dalam mengurai minyak kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana. Namun, asam lemak bebas ini rentan mengalami kerusakan, sehingga menyebabkan penurunan kadar lemak (Chairunnisa *et al.*, 2019). Penelitian serupa oleh Yolantika *et al.* (2015) mengungkapkan bahwa bakteri yang mampu membentuk zona halo merupakan koloni yang diduga memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon pada tanah yang tercemar minyak bumi. Semakin luas zona halo yang dihasilkan oleh suatu kultur, semakin besar potensi bahwa kultur tersebut merupakan mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon. Koloni bakteri yang membentuk zona halo menunjukkan toleransi

terhadap lingkungan tercemar dan memiliki potensi untuk mendegradasi hidrokarbon pada tanah yang terkontaminasi minyak bumi.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksploratif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis kelompok bakteri dan keberadaan bakteri yang terisolasi pada tanah tercemar limbah hidrokarbon (oli bekas) di bengkel Desa Suko Kecamatan Sukodono.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September hingga Oktober 2024. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Jadwal kegiatan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Rencana Pelaksanaan Penelitian

No.	Kegiatan	Bulan ke-												
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	
1.	Penyusunan proposal skripsi													
2.	Seminar proposal skripsi													
3.	Persiapan alat dan bahan													
4.	Pengambilan sampel di lapangan													
5.	Isolasi sampel di laboratorium													
6.	Pemurnian bakteri													
7.	Pengamatan makroskopis													
8.	Identifikasi pewarnaan gram dan uji fisiologis													
9.	Analisis Data													
10.	Penyusunan draft skripsi													
11.	Seminar hasil													

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sekop untuk pengambilan sampel tanah, cawan petri, bunsen, jarum ose (ose bulat dan ose lurus), spatula, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, mikropipet dan tip, inkubator, LAF/BSC, mikroskop, kaca preparat, timbangan analitik, autoklaf, vortex, *hotplate*, *freezer*, sarung tangan, masker, kamera digital, rak tabung, *beaker glass*, *magnetic stirrer bar*, pipet ukur, bulb, plastic wrap, aluminium foil.

Bahan yang digunakan adalah tanah bengkel, aquades, media NA (*Nutrient Agar*), media TSIA (*Triple sugar iron agar*), media SIM (*Sulfide indol motility*), Tween 80, H₂O₂, NaCl, kristal violet, larutan lugol, safranin, oli bekas, alkohol, *phenol red*, *malachite green*, *reagen kovac*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel diambil dengan metode *purposive sampling*. Sampel tanah diambil dari tiga lokasi bengkel yang berada di Desa Suko Kecamatan Sukodono. Pada tiap bengkel diambil sebanyak 2 titik pengambilan sampel. Titik pengambilan sampel ini berada di area service kendaraan dan area penimbunan buangan oli. Kriteria sampel yang diambil meliputi sampel tanah berwarna hitam, licin, dan berbau oli.

Pengambilan sampel tanah pada tiga lokasi bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono dilakukan sebanyak 10 gram. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan cara mengambil secara langsung menggunakan spatula hingga sampel tanah mencapai 10 gram. Pengambilan sampel

tanah pada area tanah yang tercemar limbah oli. Area tanah yang diambil memiliki kedalaman kurang lebih 1 cm sampai 5 cm dari permukaan tanah.

3.4.2 Sterilisasi Alat dan Media

Sterilisasi alat merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi tingkat kontaminasi. Sterilisasi alat ini meliputi alat yang berbahan glassware. Sterilisasi alat ini dengan menggunakan metode uap basah. Metode sterilisasi uap basah ini menggunakan autoklaf. Penggunaan sterilisasi ini dengan pengaturan suhu di 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15- 30 menit. Sterilisasi alat lain seperti BSC (*Biological Safety Cabinet*) atau LAF (*Laminar Air Flow*) dengan menggunakan bantuan sinar UV. Sterilisasi dengan gelombang cahaya UV ini berlangsung selama 30 menit. Pembersihan lingkungan perlakuan penelitian dengan menggunakan alkohol 70% yang di semprotkan atau di usap.

3.4.3 Pembuatan Media

A. Media NA (*Nutrient agar*) Modifikasi

Media *Nutrien agar* merupakan media dasar umum yang tidak selektif. Media ini cocok di gunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme yang tidak memerlukan nutrisi tertentu. Media ini juga dapat digunakan sebagai media untuk perhitungan jumlah koloni bakteri (*enumerasi*). Penelitian ini menggunakan media NA dengan 28 gram serbuk media NA di larutkan dalam 1000 ml air suling. Media NA juga di tambahkan oli, tween 80 (2% dari total volume) dan juga *neutral red* sebagai bahan tambahan untuk membantu proses seleksi pada

sampel yang ada. Media ini di panaskan hingga mendidih dan tercampur sepenuhnya. Media yang telah tercampur sempurna selanjutnya di sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah selesainya proses sterilisasi maka media siap digunakan.

B. Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Media TSIA merupakan media yang dapat digunakan untuk identifikasi bakteri baik bakteri *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacteriaceae* dan *Escherichia*. Media ini dibuat dengan melarutkan 64,5 gram dalam 1000 ml air suling. Media ini di panaskan hingga mendidih dan tercampur sepenuhnya. Media yang telah tercampur sempurna. Media dipindahkan ke dalam tabung, kemudian di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan diatur dalam bentuk media miring (Setyazaky & Harryes, 2024).

C. Media SIM (*Sulfide Indole Motility*)

Media SIM merupakan media diferensial, media ini mampu membedakan antara bakteri. Media ini mampu membedakan dengan cara melihat kemampuan bakteri dalam memproduksi Sulfat. Media SIM juga dapat mengetahui bakteri memiliki enzim triptonase, media SIM juga memiliki kemampuan mendeteksi bakteri motil. Media SIM dibuat dengan melarut 30 gram media dalam 1000 ml air suling. Media ini homogenkan diatas *hotplate stirrer* hingga larut. Media di pindahkan dalam tabung dan di sterilisasi pada 121°C selama 15 menit (Ismail *et al.*, 2017).

3.4.4 Isolasi Bakteri

Cara isolasi bakteri untuk mengetahui jenis bakteri yang terdapat pada tanah tercemar limbah oli yaitu dengan cara mengambil sampel tanah menggunakan spatula steril sebanyak 10 gram di 2 titik pada tiga lokasi bengkel. Kemudian tanah tersebut disuspensikan dengan cara memasukkannya ke dalam erlenmeyer yang berisi larutan NaCl sebanyak 90ml. Tahap pengenceran ini dilakukan hingga pengenceran 10^{-7} . Isolat diambil dari tiga pengenceran terakhir yaitu 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Sampel tanah yang telah diencerkan di tuang ke dalam cawan petri menggunakan mikropipet sebanyak 1 ml. Kemudian dituangkan media *Nutrient Agar* yang telah dimodifikasi dengan tambahan oli, tween 80 (2% dari total volume) dan juga *phenol red*. Cawan petri kemudian ditutup lalu dihomogenkan dengan cara membentuk angka 8. Kemudian, sisi samping cawan petri ditutup dengan plastik wrap, lalu di tunggu hingga media memadat. Setelah media padat di inkubasi dengan suhu 37°C selama 72 jam. Diamati keberadaan bakteri yang membentuk daerah halo dan yang tidak membentuk daerah halo.

3.4.5 Uji Pendegradasi Hidrokarbon

Uji degradasi diamati munculnya daerah halo pada koloni bakteri yang telah disuspensikan pada media NA yang telah dimodifikasi dengan penambahan oli. Semakin besar daerah halo yang dihasilkan oleh suatu biakan maka semakin besar pula dugaan bahwa biakan tersebut adalah mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon (Yolantika *et al.*, 2015). Porsi keberadaan bakteri yang membentuk daerah halo dan yang tidak

membentuk daerah halo disajikan dalam bentuk persentase untuk mempermudah mengetahui bagaimana keberadaan koloni bakteri yang membentuk daerah halo.

3.4.6 Pemurnian Koloni

Pemurnian koloni dengan men-*streak* masing-masing koloni yang memiliki karakteristik makroskopis yang berbeda. Masing-masing koloni di-*streak* pada media NA untuk setiap koloni yang memiliki karakteristik yang berbeda. Koloni di-*streak* dengan pembagian empat kuadran. Selanjutnya, koloni diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam, lalu kemurnian isolat diamati berdasarkan karakteristik makroskopis dan mikroskopis. Kemurnian koloni diamati secara makroskopis dan mikroskopis untuk mengetahui koloni telah murni atau belum. Jika koloni belum murni, maka koloni tersebut dimurnikan kembali hingga didapatkan koloni murni. Koloni yang telah murni kemudian diidentifikasi secara mikroskopis, makroskopis dan uji biokimia.

3.4.7 Identifikasi dengan Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis

A. Pengamatan Makroskopis Bakteri

Pengamatan makroskopis koloni ini dilakukan pada koloni bakteri yang dapat menghasilkan daerah halo pada media NA yang telah dimodifikasi. Koloni bakteri yang tumbuh pada media NA yang telah dimodifikasi akan diremajakan pada media NA baru. Pengamatan bentuk koloni dilakukan pada media NA yang baru. Pengamatan terhadap

karakteristik makroskopis pada koloni bakteri yang diamati meliputi ukuran koloni, bentuk koloni, elevasi, tepian koloni, dan warna.

B. Pengamatan Mikroskopis Bakteri

1) Pewarnaan Gram

Isolasi bakteri dalam media NA diambil menggunakan ose secara steril kemudian di suspensikan dengan aquades yang berada di atas objek glass. Langkah selanjutnya, preparat difiksasi dilewatkan api bunsen sampai kering, lalu ditetaskan menggunakan kristal violet, lalu didiamkan selama 1 menit, dibilas dengan air mengalir dan di angin-anginkan. Langkah selanjutnya, preparat ditetesi larutan iodin kemudian didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan dengan tisu. Larutan iodin berfungsi untuk pengikat warna utama dinding sel. Preparat yang telah dikeringkan, ditetesi kembali dengan 1 tetes alkohol, didiamkan selama 30 detik. Setelah itu, dibilas dengan air dan dikeringkan dengan tisu. Alkohol berfungsi untuk peluntur warna. Tahap terakhir yaitu penambahan larutan safranin. Preparat yang telah ditetesi safranin didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan. Safranin berfungsi untuk warna pembanding. Preparat kemudian Pembentukan koloni bakteri berupa warna biru keunguan menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif. Warna merah pada bakteri menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif.

2) Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora metode Schaeffer-fulton merupakan suatu metode pewarnaan terhadap endospora. Pewarnaan endospora ini menggunakan pewarna *malachite green*. Pewarna ini ditetaskan pada sampel koloni yang diambil pada objek glass. Setelah ditetaskan dengan malachite green objek glass harus melalui proses pemanasan dengan uap air hal tersebut dilakukan agar warna *malachite green* dapat menyerap ke dalam bakteri. Setelah proses pemanasan dilakukan proses pembilasan menggunakan air mengalir. Bakteri yang telah dilakukan proses pembilasan selanjutnya diberikan pewarna pembanding berupa safranin. Hasil pewarnaan diperoleh bahwa bakteri akan berwarna merah hingga merah muda dengan titik berwarna hijau. Titik berwarna hijau tersebut merupakan endospora yang dimiliki oleh bakteri.

3.4.8 Uji Biokimia

Identifikasi menggunakan metode uji biokimia merupakan suatu metode selektif untuk mengetahui karakteristik fisiologis dari bakteri. Media yang digunakan untuk uji biokimia bergantung pada kebutuhan fisiologis karakteristik dari bakteri. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji oksidase, uji katalase, uji fermentasi gula, uji sulfat, uji indol, uji motilitas. Uji biokimia yang dilakukan pada penelitian ini untuk menentukan kelompok jenis bakteri yang dapat mendegradasi limbah oli.

A. Uji Oksidase

Uji oksidase merupakan salah satu metode identifikasi untuk mengetahui suatu bakteri memiliki kemampuan untuk menghasilkan

enzim oksidase. Metode uji oksidase menggunakan oksidase-strip. Metode ini dilakukan dengan cara menggoskan koloni bakteri yang akan diuji oksidase pada oksidase-strip. Hasil goresan koloni bakteri pada oksidase-strip diamati perubahan warna yang terjadi pada oksidase-strip. Perubahan warna koloni menjadi biru keunguan menandakan bahwa koloni bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim oksidase. Apabila tidak terjadi perubahan warna dapat disimpulkan bahwa koloni bakteri tidak memiliki kemampuan untuk mengoksidasi.

B. Uji Katalase

Pengujian ini dilakukan dengan cara biakan bakteri pada cawan petri ditetaskan H_2O_2 pada koloni bakteri tersebut. Hasil uji katalase diamati pada koloni yang telah ditetesi oleh H_2O_2 . Reaksi positif terhadap uji katalase dengan ditetaskan H_2O_2 ini berupa munculnya gelembung udara. Pada koloni bakteri yang negatif oksidase tidak akan ditemukan gelembung udara pada tetesan H_2O_2 .

C. Uji Fermentasi Gula

Uji fermentasi gula menggunakan media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Media TSIA mengandung tiga jenis gula antara lain yaitu glukosa, laktosa dan sukrosa. Media TSIA dapat digunakan untuk identifikasi karakteristik bakteri dalam memfermentasi kelompok gula tersebut. Uji fermentasi gula ini dilakukan dengan cara menggoskan isolat bakteri dengan ose steril pada media TSIA, kemudian media TSIA ditusuk menggunakan jarum ose secara tegak lurus di tengah media. Kemudian

media di inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil perubahan warna pada bagian agar miring pada media TSIA yang berubah warna dari merah menjadi kuning menandakan bahwa koloni bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk memfermentasi gula.

D. Uji Sulfat

Uji sulfat merupakan metode identifikasi karakteristik dari koloni bakteri untuk dapat menghasilkan senyawa H₂S. Media SIM memiliki kandungan FeSO₄ yang berfungsi untuk indikator terbentuknya H₂S. Media SIM di letakan pada tabung reaksi untuk proses identifikasi. Metode yang digunakan untuk identifikasi yaitu dengan metode tusuk pada bagian media SIM yang terdapat pada tabung reaksi. Perubahan warna hitam atau muncul endapan berwarna hitam pada bagian bawah media SIM menandakan bahwa koloni bakteri mampu menghasilkan H₂S.

E. Uji Indol

Uji indol merupakan salah satu metode uji untuk identifikasi karakteristik bakteri. Uji indol merupakan metode uji untuk mengetahui suatu bakteri memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa indol. Metode uji indol menggunakan media SIM. Media SIM merupakan suatu media yang dibuat dengan memasukkan media SIM pada tabung reaksi. Metode ini dilakukan dengan cara mengambil biakan dengan jarum ose, lalu ditusukkan secara tegak lurus. Setelah dilakukan penusukan media SIM di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian ditetaskan reagen *kovac* dan didiamkan selama 20-60 menit. Reaksi bakteri

menandakan positif reaksi indol dengan ditandai munculnya lapisan cincin berwarna merah. Tidak adanya perubahan warna pada setelah penetesan menandakan bahwa bakteri negatif reaksi indol.

F. Uji Motilitas

Metode uji motilitas merupakan salah satu metode uji karakteristik bakteri yang bertujuan untuk mengetahui apakah suatu bakteri memiliki kemampuan untuk bergerak. Kemampuan bergerak ini didasari pada struktur bentuk dari bakteri tersebut. Metode uji motilitas menggunakan media SIM. Media SIM yang telah siap pada tabung reaksi akan ditusukkan menggunakan jarum ose dengan penusukan tegak lurus. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan lama waktu 24 jam. Reaksi positif motilitas ditandai dengan hasil tusukan yang melebar pada media SIM. Koloni yang tidak melebar setelah dilakukan penusukan menandakan bahwa bakteri tersebut tidak memiliki kemampuan untuk bergerak atau negatif motilitas.

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini meliputi hasil identifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan biokimia. Data makroskopis meliputi karakteristik koloni bakteri seperti bentuk koloni, tepian koloni elevasi dan juga identifikasi secara mikroskopis meliputi pewarnaan gram dan juga pewarnaan endospora untuk mengetahui bentuk bakteri gram bakteri dan uji biokimia yang dilakukan akan mendapati hasil uji untuk karakteristik bakteri. Hasil uji biokimia meliputi uji gula, uji katalase, uji oksidase, uji indol, uji sulfat, uji motilitas, uji kandungan H₂S. Data yang diperoleh dari setiap perlakuan dan uji yang

dilakukan akan diidentifikasi dengan buku identifikasi *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (3rd ed).

3.5.1 Perhitungan Proporsi Keberadaan Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Perhitungan proporsi keberadaan bakteri pendegradasi hidrokarbon dihitung sebagai berikut (Irene *et al.*, 2020):

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2) \times (d)]}$$

Keterangan :

$\sum C$: jumlah total koloni dari semua cawan yang dihitung (koloni)

N : jumlah koloni per ml (cfu/ml)

n1: jumlah cawan pada pengenceran pertama (ml)

n2 : jumlah cawan pada pengenceran kedua (ml)

d : tingkat pengenceran yang diperoleh dari cawan yang pertama dihitung (ml).

Proporsi bakteri yang berpotensi mendegradasi dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Proporsi (\%)} = \frac{N}{\text{Total bakteri}} \times 100\%$$

Semakin besar daerah halo yang dihasilkan oleh suatu biakan maka semakin besar pula dugaan bahwa biakan tersebut adalah mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon (Yolantika *et al.*, 2015).

BAB IV

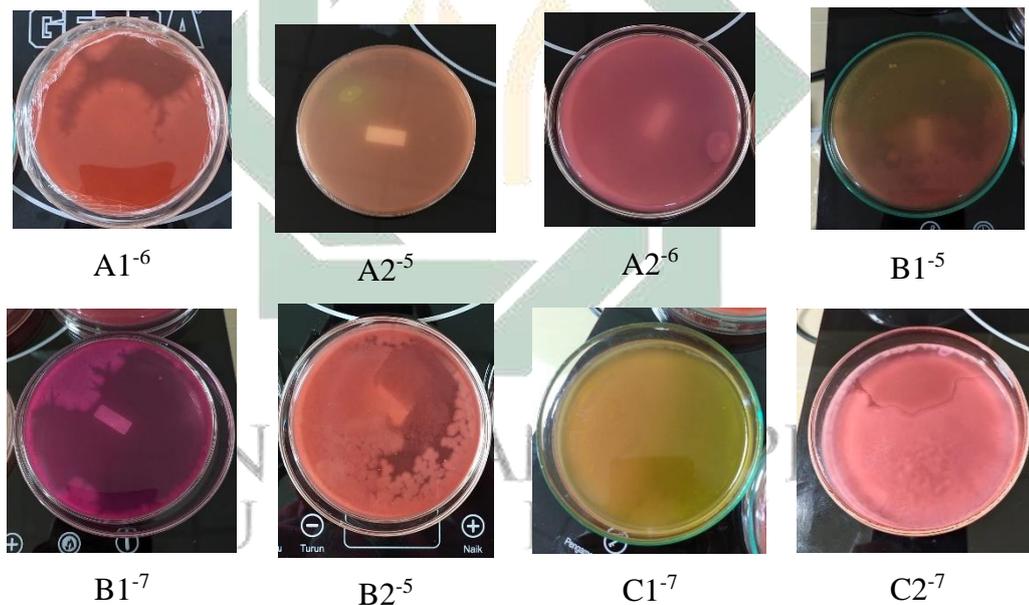
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Pendegradasi Limbah Oli

Pengambilan sampel dilakukan pada tiga bengkel di daerah desa Suko kecamatan Sukodono dan diambil pada dua titik pengambilan di setiap bengkel. Sampel yang diambil merupakan sampel tanah pada area bengkel yang tercemar oleh limbah oli meliputi area bengkel dan area penimbunan limbah oli. Pengambilan sampel ini dilakukan pada area permukaan hingga kedalaman 5 cm. Sampel yang diambil nantinya akan dihomogenkan agar seluruh sampel tercampur menjadi satu kesatuan. Sampel diambil sebanyak 10 gram pada tiap titik. Sampel disimpan pada wadah untuk dilakukan isolasi di laboratorium. Sampel yang telah diambil akan diencerkan agar koloni yang tumbuh tidak terlalu banyak pada cawan petri. Pengenceran dilakukan menggunakan metode pengenceran bertingkat. Pengenceran 10^{-1} didapat dari penimbangan sampel sebanyak 10 gram ke dalam 90 ml media pengencer NaCl steril. Pengenceran berikutnya diambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya dan dilarutkan dalam 9 ml media pengencer NaCl steril. Metode pengenceran dilakukan hingga didapati pengenceran 10^{-7} .

Metode isolasi menggunakan metode *pour plate* atau metode tuang. Metode tuang (*pour plate*) yang digunakan adalah suatu metode penumbuhan bakteri pada cawan petri dengan memasukkan sampel kemudian dilanjutkan dengan menuangkan media. Media yang telah dituang selanjutnya dihomogenkan dengan cara memutar cawan petri membentuk angka delapan dan didiamkan hingga media memadat. Sampel yang dilibatkan ke dalam cawan petri merupakan sampel yang telah diencerkan dari pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Sampel yang telah dipipetkan

selanjutnya akan ditambahkan media pertumbuhan berupa *Nutrien Agar* (NA) modifikasi yang telah ditambahkan modifikasi. Cawan petri yang berisi sampel dan media NA modifikasi ditunggu hingga memadat. Sampel yang telah memadat selanjutnya akan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan posisi cawan terbalik. Koloni bakteri yang tumbuh pada cawan petri selanjutnya akan dimurnikan media kultur baru dengan metode gores untuk mendapatkan koloni bakteri murni. Hasil penelitian didapatkan terdapat 8 isolat sesuai dengan kode pengambilan sampel masing-masing titik. Hasil isolat yang telah dimurnikan selanjutnya akan dilakukan identifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia untuk mengetahui jenis bakteri yang tumbuh.



Keterangan : A : Bengkel 1, B: Bengkel 2, C : Bengkel 3, 1: Penimbunan limbah oli, 2 : area service kendaraan

Gambar 4. 1 Hasil isolasi bakteri pendegradasi limbah oli

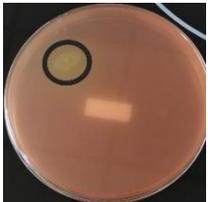
Hasil isolasi yang ditunjukkan pada gambar di atas menunjukkan terdapat koloni bakteri yang mampu tumbuh pada media Na yang telah dimodifikasi. Koloni bakteri yang tumbuh pada penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat bakteri yang mampu hidup dengan lingkungan yang tercemar oleh limbah oli. Pada tahapan

berikutnya koloni bakteri yang tumbuh akan dilakukan proses pemurnian koloni bakteri. Pemurnian koloni bakteri bertujuan untuk mendapatkan koloni bakteri yang berisi koloni tunggal. Hasil koloni tunggal yang diperoleh merupakan koloni yang tidak bercampur dengan koloni yang lain. Hasil pemurnian koloni tunggal ini selanjutnya akan dilakukan identifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia untuk mengetahui jenis bakteri yang tumbuh.

4.2 Karakterisasi Makroskopis Bakteri

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan melihat bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni dan pengamatan terhadap zona halo. Pengamatan morfologi koloni dilakukan pada isolat yang akan dilakukan uji lanjut berupa uji biokimia. Karakterisasi makroskopis bakteri terdapat pada tabel 4.1.

Tabel 4. 1 Karakterisasi Makroskopis Koloni Bakteri

No.	Kode	Bentuk Koloni	Tepi Koloni	Elevasi	Zona Halo	Gambar
1.	A2 ⁻⁵	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	Tidak Nampak	
2.	B1 ⁻⁵	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Tidak Nampak	
3.	B1 ⁻⁷	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Flat</i>	Nampak	

4. C2⁻⁷ Irregular Undulate Flat Tidak Nampak



Pada tabel 4.1 terlihat isolat A2⁻⁵, C2⁻⁷ dan B1⁻⁷ memiliki bentuk berupa *irregular* dan pada isolat B1⁻⁵ koloni bakteri memiliki bentuk *circular*. Pada penelitian yang telah dilakukan didapati terdapat tiga koloni yang memiliki bentuk *irregular* dan terdapat satu koloni yang memiliki bentuk *circular*. Pada isolat B1⁻⁵ koloni bakteri berwarna putih kekuningan dengan tepian koloni membentuk *convex* tanpa terlihat zona halo. Kelompok bakteri yang memiliki bentuk koloni *irregular* sangatlah banyak. Kelompok bakteri selain dilihat berdasarkan bentuk koloni juga dilihat berdasarkan tepi dan juga elevasi pada koloni. Bentuk koloni *irregular* merupakan suatu bentuk yang tidak teratur dan tidak simetris saat pertumbuhan di media padat. Koloni ini susah untuk didefinisikan dalam suatu bentuk tertentu karena ketidak simetrisan dan ketidak teraturannya (Madigan *et al.*, 2015).

Pada kelompok isolat A2⁻⁵ dan C2⁻⁷ koloni bakteri berwarna putih kekuningan dan isolat ini memiliki bentuk *irregular* dengan tepian membentuk *undulate* dengan elevasi koloni yang *flat*. Isolat A2⁻⁵ dan C2⁻⁷ keduanya tidak menunjukkan adanya zona halo yang terlihat. Isolat B1⁻⁷ merupakan koloni bakteri yang tumbuh dengan menunjukkan adanya zona halo. Koloni bakteri ini memiliki bentuk *irregular* yang tidak beraturan dengan tepian membentuk *lobate* dan elevasi yang *flat*. Pengambilan isolat pada penelitian dilakukan terhadap koloni yang memiliki bentuk yang berbeda. Isolat yang telah diidentifikasi secara makroskopis

selanjutnya dimurnikan ke media pertumbuhan baru untuk mendapatkan isolat murni dan untuk dilakukan uji biokimia.

4.3 Karakterisasi Mikroskopis Bakteri

Pengamatan terhadap karakterisasi mikroskopis bakteri penting untuk dilakukan untuk mengetahui struktur dari dinding sel suatu bakteri bentuk bakteri dan kemampuan bakteri dalam menghasilkan endospora. Pengamatan terhadap isolat dilakukan untuk mengetahui pengelompokan bakteri berdasarkan hasil pengamatan. Hasil pemurnian isolat bakteri yang dilakukan dari sampel tanah bengkel di desa Suko kecamatan Sukodono mendapati adanya 8 isolat. Isolat yang terdapat pada NA modifikasi selanjutnya dimurnikan dan hasil pemurnian dilakukan uji mikroskopis bakteri berupa pewarnaan gram dan juga pengamatan endospora. Hasil dari penelitian ini didapati sebagai berikut.

Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Mikroskopis

Isolat	Gram	Bentuk	Endospora
A2 ⁻⁵	+	Basil (R)	-
B1 ⁻⁵	-	Coccus (S)	-
B1 ⁻⁷	-	Basil (R)	-
C2 ⁻⁷	-	Basil (R)	-

Hasil pengamatan yang dilakukan terhadap delapan isolat dan menghasilkan empat isolat yang memiliki karakteristik berbeda. Pada isolat A2⁻⁵ merupakan isolat memiliki bentuk basil dengan memiliki gram positif. Bentuk sel bakteri dengan bentuk basil juga ditemukan pada isolat C2⁻⁷ dan B1⁻⁷. Isolat C2⁻⁷ dan B1⁻⁷ merupakan bakteri yang memiliki gram negatif. Terdapat satu isolat yaitu B1⁻⁵ yang memiliki bentuk *coccus* dan memiliki gram negatif. Pewarnaan gram digunakan untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif.

Menurut Lay (1994), perbedaan hasil pewarnaan gram ini terjadi karena struktur dinding sel kedua jenis bakteri tersebut berbeda. Perbedaan hasil dari pewarnaan gram menunjukkan perbedaan susunan pada dinding sel bakteri. Bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga mampu untuk mempertahankan pewarna kristal violet dan pada pengamatan warna yang muncul adalah warna ungu yang berasal dari kristal pada bakteri gram negatif lapisan peptidoglikan memiliki ukuran yang lebih tipis dan dilapisi oleh membran luar yang mengandung lipopolisakarida. Lapisan membran luar yang tipis menyebabkan bakteri gram negatif akan mengalami dekolorisasi pada saat pencucian menggunakan aseton atau alkohol. Hilangnya warna pada proses dekolorisasi mengakibatkan bakteri gram negatif memiliki warna merah atau merah muda karena masuknya zat warna safranin pada tahap terakhir ketika proses pewarnaan gram (Karyawati *et al.*, 2023).

Pada pengamatan mikroskopis juga dilakukan identifikasi dengan Pewarnaan endospora. Pewarnaan endospora merupakan suatu metode dalam uji mikrobiologi yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu bakteri memiliki endospora atau tidak. Perbedaan endospora akan mempengaruhi hasil uji suatu bakteri memiliki kemampuan sel vegetatif dan endospora yang dapat diamati di bawah mikroskop. Endospora merupakan suatu kemampuan yang dimiliki oleh bakteri sebagai mekanisme pertahanan diri. Kemampuan endospora ini merupakan mekanisme pertahanan diri suatu bakteri terhadap lingkungan yang ekstrem. Metode pewarnaan endospora ini menggunakan pewarna yang disebut dengan *malachite green*. Pewarna *malachite green* merupakan pewarna primer yang digunakan untuk mewarnai endospora. Pemberian warna ini akan dilakukan dengan

metode pemanasan untuk memasukkan warna pada sel bakteri. Pemberian warna pembanding seperti safranin untuk sel vegetatif juga dilakukan agar dapat membedakan antara endospora dan juga sel vegetatif yang lain.

Hasil dari proses pewarnaan endospora akan mendapatkan hasil endospora berwarna hijau sementara pada sel vegetatif yang lain akan berwarna merah. Pewarnaan endospora merupakan proses identifikasi yang cukup penting untuk mengetahui suatu bakteri bersifat mampu membentuk endospora atau tidak. Suatu bakteri memiliki kemampuan dalam membentuk endospora dapat diartikan bahwa bakteri tersebut mampu beradaptasi pada lingkungan yang tidak menguntungkan. Pada penelitian yang dilakukan didapati hanya terdapat satu isolat yang memiliki endospora. Isolat C2⁻⁷ merupakan isolat yang memiliki endospora.

Suatu bakteri yang bersifat patogen dan memiliki kemampuan endospora harus melalui penanganan yang cukup serius dan membutuhkan penelitian mikrobiologi terkait mekanisme sporulasi dan adaptasinya sebagai pembelajaran untuk pencegahan terhadap penyebaran penyakit yang dapat terjadi dalam memahami perilaku dan karakteristik bakteri yang memiliki relevansi medis dan lingkungan (Lawalata *et al.*, 2020).

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

4.4 Uji Biokimia

Uji biokimia merupakan salah satu tahapan untuk identifikasi untuk mengetahui jenis bakteri. Pada uji biokimia isolat bakteri yang didapatkan yang telah dimurnikan selanjutnya akan dilakukan uji terhadap beberapa senyawa. Uji terhadap beberapa senyawa ini berfungsi untuk mengetahui bagaimana kemampuan dari isolat bakteri yang telah diperoleh. Pada penelitian ini dilakukan beberapa uji biokimia meliputi uji fermentasi gula, uji H₂S, uji motilitas, uji oksidase, uji katalase dan uji indol. Uji biokimia yang dilakukan nantinya akan dibandingkan dengan karakteristik bakteri untuk mengetahui karakteristik dari bakteri yang diperoleh.

Tabel 4. 3 Hasil Pengamatan Bakteri secara Uji Biokimia

Isolat	Glukosa	Laktosa	Sukrosa	Gas	H ₂ S	Katalase	Oksidase	SIM
A2 ⁻⁵	+	-	-	-	-	+	-	-
B1 ⁻⁵	+	+	+	-	-	+	-	-
B1 ⁻⁷	+	+	+	-	-	+	-	-
C2 ⁻⁷	+	+	+	-	-	+	+	-

Pada penelitian yang dilakukan terdapat empat isolat dengan karakteristik uji biokimia yang berbeda dari total delapan isolat. Pada isolat A2⁻⁵ merupakan satu-satunya isolat yang menghasilkan warna *slant* merah dan bagian bawah berwarna kuning. Pada uji yang dilakukan terhadap semua isolat dengan media TSIA menghasilkan bagian *slant* berwarna kuning dan bagian bawah juga berwarna kuning. Hasil kuning pada bagian *slant* dan kuning bagian bawah menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan fermentasi terhadap glukosa, laktosa dan sukrosa yang terkandung dalam media TSIA. Pada isolat A2⁻⁵ pada bagian *slant*

menghasilkan warna merah dan pada bagian bawah menghasilkan warna kuning hal ini berarti isolat A2⁻⁵ memiliki kemampuan untuk memfermentasi glukosa tetapi tidak dapat memfermentasi laktosa dan sukrosa. Semua isolat yang dilakukan uji biokimia menggunakan media TSIA tidak terdapat bakteri yang mampu menghasilkan gas dan juga mampu membentuk H₂S.

Uji biokimia yang dilakukan pada penelitian ini juga menggunakan media SIM. Media SIM merupakan media yang digunakan bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam bergerak dan kemampuan bakteri dalam menghasilkan indol. Hasil uji yang diperoleh pada media SIM dari tiap isolat yang dilakukan pengujian uji biokimia didapati bahwa tidak adanya isolat yang menghasilkan indol ataupun bakteri yang memiliki kemampuan untuk bergerak. Uji biokimia yang dilakukan selain menggunakan media juga menggunakan senyawa seperti H₂O₂ dan juga uji oksidase menggunakan oksidase strip. Hasil penelitian yang diperoleh seluruh isolat memiliki kemampuan katalase dan hanya terdapat satu isolat yaitu C2⁻⁷ yang memiliki kemampuan oksidase.

Uji fermentasi gula merupakan suatu uji biokimia yang digunakan untuk mengidentifikasi kemampuan pada suatu mikroorganisme dalam memfermentasi gula. Uji fermentasi gula ini dapat menghasilkan bentuk yang dapat diamati baik berupa asam gas ataupun perubahan warna. Pada uji fermentasi gula biasanya menggunakan senyawa seperti glukosa, sukrosa dan laktosa. Selain penambahan senyawa gula pada uji fermentasi gula juga ditambahkan indikator pH. Penambahan indikator pH bertujuan untuk mengetahui atau menunjukkan terjadinya perubahan warna yang ditandai dengan terbentuknya senyawa bersifat asam. Uji fermentasi gula dapat diamati dengan keberadaan gas pada suatu media yang menandakan

terjadinya proses fermentasi. Hasil uji fermentasi gula dapat dikatakan negatif apabila tidak terjadi perubahan warna ataupun terbentuknya gas pada media yang digunakan. Uji fermentasi gula dapat berguna untuk memahami konsep metabolisme. Salah satu contohnya pada kelompok *Enterobacteriaceae* spp kelompok bakteri ini dapat dimanfaatkan untuk pengembangan bioteknologi dan juga diagnosa suatu penyakit (Raharja *et al.*, 2023).

Uji H₂S adalah metode penting untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri memproduksi hidrogen sulfida (H₂S), sering digunakan dalam penelitian mikrobiologi dan untuk mendeteksi patogen yang mempengaruhi kesehatan ikan dan hewan. Metode ini melibatkan inokulasi bakteri dalam media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dan inkubasi selama 24 jam. Hasilnya dapat menunjukkan perubahan warna hitam, yang menandakan adanya H₂S, atau tidak ada perubahan, yang menunjukkan bakteri tidak memproduksi H₂S. Kemampuan suatu bakteri untuk menghasilkan senyawa H₂S sangat berpengaruh terhadap pengidentifikasian. Pengidentifikasian ini dapat membantu untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki sifat patogen atau tidak terutama pada bidang kesehatan atau industri makanan (Reimena *et al.*, 2017).

Uji motilitas merupakan salah satu tahapan pada proses identifikasi bakteri. Uji motilitas dilakukan dengan mengamati pergerakan bakteri pada media. Uji motilitas penting dilakukan pada proses identifikasi untuk mengetahui suatu bakteri memiliki kemampuan bergerak atau tidak. Kemampuan gerak pada bakteri menunjukkan bahwa bakteri memiliki alat gerak. Metode uji ini dilakukan dengan mengamati hasil tusukan pada media semi padat. Hasil tusukan melebar melebihi penusukan yang telah dilakukan menandakan bahwa bakteri memiliki kemampuan

dalam bergerak. Ketika hasil tusukan yang dilakukan tidak menunjukkan adanya pelebaran dapat diartikan bahwa koloni bakteri tidak memiliki kemampuan untuk bergerak (Karyawati *et al.*, 2023). Prosedur ini biasanya dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium semi-padat, seperti *Sulfide Indole Motility* (SIM). Setelah periode inkubasi, pola pertumbuhan bakteri yang menyebar dari titik inokulasi mengindikasikan sifat motilitas bakteri, sementara pertumbuhan yang terbatas pada area inokulasi menunjukkan bahwa bakteri bersifat non-motil. Pengujian ini berperan penting dalam mengidentifikasi spesies bakteri berdasarkan keberadaan flagela sebagai organel penggeraknya (Fadilah *et al.*, 2022).

Uji oksidase adalah metode untuk menilai kemampuan bakteri dalam mengoksidasi substrat tertentu melalui pengujian enzim oksidase, yang berperan penting dalam respirasi aerobik dan membantu dalam identifikasi spesies bakteri. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi ungu, yang berarti bakteri dapat melakukan oksidasi, sedangkan hasil negatif menunjukkan tidak ada perubahan warna, menandakan bakteri tidak memproduksi enzim tersebut. Uji ini sering dikombinasikan dengan tes biokimia lainnya, seperti uji katalase dan motilitas, untuk memberikan gambaran lebih lengkap tentang karakteristik mikroba (Tumbol, 2020).

Uji indol adalah suatu uji biokimia yang dilakukan untuk mengetahui bagaimana kemampuan bakteri dalam memecah asam amino triptofan menjadi senyawa indol. Uji indol yang digunakan untuk mengetahui kemampuan pembentukan asam amino triptofan ini akan menunjukkan lapisan berwarna merah ketika ditambahkan *reagen kovac*. Hasil penambahan *reagen kovac* menunjukkan warna merah merupakan hasil positif. Hasil positif ini didapat dari reaksi enzim

pada bakteri dengan senyawa *kovac* (Rifai, 2021). Uji biokimia seperti uji indol sangat membantu dalam metode identifikasi suatu bakteri dan membantu dalam mendiagnosa suatu penyakit.

Uji Katalase bertujuan untuk menentukan apakah suatu mikroorganisme tergolong bakteri yang mampu memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi oksigen. Pengujian ini dilakukan dengan mengoleskan kultur bakteri pada kaca objek, lalu menambahkan dua tetes larutan H_2O_2 3%. Adanya pembentukan gelembung gas menunjukkan bahwa enzim katalase pada bakteri tersebut telah menguraikan H_2O_2 , sehingga hasilnya dianggap positif. Enzim katalase memfasilitasi reaksi dekomposisi hidrogen peroksida menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2). Hidrogen peroksida (H_2O_2) bersifat merusak bagi sel karena dapat menyebabkan kerusakan pada komponen seluler seperti lipid, protein, dan DNA. Selain itu, H_2O_2 dapat menghambat kerja enzim-enzim penting (Fadilah *et al.*, 2022).

Tabel 4. 4 Perbandingan Hasil Uji Biokimia dengan Karakteristik Bakteri

Isolat	Gram	Glukosa	Laktosa	Sukrosa	Gas	H ₂ S	Bentuk	Katalase	Oksidase	Motil	Indol	Endospora
A2 ⁻⁵	+	+	-	-	-	-	Basil (R)	+	-	-	-	-
<i>Nocardia spp</i>	+	+	-	-	?	?	Basil (R)	+	-	-	?	-
B1 ⁻⁵	-	+	+	+	-	-	Coccus (S)	+	-	-	-	-
<i>Acinetobacter spp</i>	-	+	?	?	-	-	S/R	+	-	-	-	-
B1 ⁻⁷	-	+	+	+	-	-	Basil (R)	+	-	-	-	-
<i>Enterobacteriaceae spp</i>	-	+	+	+	-	-	Basil (R)	+	-	-	-	-
C2 ⁻⁷	-	+	+	+	-	-	Basil (R)	+	+	-	-	-
<i>Flavobacterium spp</i>	-	+	+	+	-	-	Basil (R)	+	+	-	-	-

Sumber : (Barrow & Feltham, 1993)

Keterangan : (?) tidak dilakukan pengujian oleh sumber

Tabel 4.4 didapati ada empat macam jenis bakteri yang mampu tumbuh atau berkembang di area tanah perbengkelan yang tercemar oleh limbah oli. Bakteri yang dapat tumbuh pada media NA modifikasi selanjutnya dilakukan uji biokimia untuk melihat bagaimana sifat-sifat yang dimiliki oleh tiap jenis kultur bakteri yang tumbuh. Uji biokimia yang telah dilakukan menghasilkan karakter bakteri seperti pada tabel. Karakteristik bakteri yang muncul diidentifikasi dengan merujuk pada buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (3rd ed). Pada hasil uji biokimia ditemukan jenis bakteri antara lain *Enterobacteriaceae* spp, *Flavobacterium* spp, *Acinetobacter* spp dan *Nocardia* spp.

4.5 Jenis Kelompok Bakteri Teridentifikasi

a. *Nocardia* spp

Isolat A2⁻⁵ terdiri dari bakteri gram negatif berbentuk batang yang di dapat dari tanah. Penelitian yang dilakukan untuk isolat A2⁻⁵ menunjukkan bahwa uji pada media TSIA hanya senyawa glukosa mengalami proses fermentasi. Pada media TSIA isolat A2⁻⁵ tidak membentuk gas dan tidak adanya pembentukan H₂S. Isolat A2⁻⁵ juga dilakukan uji biokimia berupa uji katalase yang menunjukkan hasil positif dan uji oksidase yang menunjukkan hasil negatif. Isolat A2⁻⁵ juga diinokulasikan pada media SIM. Hasil inokulasi isolat A2⁻⁵ pada media SIM menunjukkan hasil negatif. Media SIM tidak menunjukkan adanya pelebaran pada bekas tusukan untuk identifikasi motilitas dan juga tidak terbentuknya cincin merah yang menunjukkan uji indol pada media SIM. Uji pewarnaan endospora juga dilakukan pada isolat A2⁻⁵ untuk mengetahui keberadaan endospora pada isolat. Hasil uji endospora menunjukkan

tidak adanya endospora pada isolat A2⁻⁵. Hasil uji biokimia yang didapatkan dihubungkan dengan pemaparan yang terdapat pada buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (3rd ed) untuk mengetahui jenis bakteri. Melihat hasil pengujian yang dilakukan isolat A2⁻⁵ merujuk pada jenis kelompok bakteri *Nocardia* (Barrow & Feltham, 1993).

Bakteri *Nocardia* spp juga merupakan kelompok bakteri yang berperan dalam bioteknologi untuk dimanfaatkan sebagai pendegradasi limbah. Bakteri ini banyak dimanfaatkan dengan mengkombinasikannya dengan kelompok bakteri lain agar mendapatkan hasil yang lebih baik. Potensi bakteri *Nocardia* dalam memecahkan senyawa hidrokarbon merupakan salah satu kemampuan yang dimanfaatkan untuk menjadikan bakteri ini sebagai agen bioremediasi (Hamme *et al.*, 2003).

b. *Acinetobacter* spp

Isolat B1⁻⁵ terdiri dari bakteri gram negatif berbentuk bulat yang di dapat dari tanah. Penelitian yang dilakukan untuk isolat B1⁻⁵ menunjukkan bahwa uji pada media TSIA senyawa gula mengalami proses fermentasi. Pada media TSIA isolat B1⁻⁵ tidak membentuk gas dan tidak adanya pembentukan H₂S. Pada isolat B1⁻⁵ juga dilakukan uji biokimia berupa uji katalase yang menunjukkan hasil positif dan uji oksidase yang menunjukkan hasil negatif. Isolat B1⁻⁵ juga diinokulasikan pada media SIM. Hasil inokulasi isolat B1⁻⁵ pada media SIM menunjukkan hasil negatif. Media SIM tidak menunjukkan adanya pelebaran pada bekas tusukan untuk identifikasi motilitas dan juga tidak terbentuknya cincin merah yang menunjukkan uji indol pada media SIM. Uji pewarnaan endospora juga dilakukan pada isolat B1⁻⁵ untuk mengetahui keberadaan

endospora pada isolat. Hasil uji endospora menunjukkan tidak adanya endospora pada isolat B1⁻⁵. Hasil uji biokimia yang didapatkan dihubungkan dengan pemaparan yang terdapat pada buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (3rd ed) untuk mengetahui jenis bakteri. Melihat hasil pengujian yang dilakukan isolat B1⁻⁵ merujuk pada jenis kelompok bakteri *Acinetobacter* spp (Barrow & Feltham, 1993).

Acinetobacter spp juga merupakan kelompok bakteri yang digunakan pada beberapa pengolahan limbah. Kelompok bakteri ini pada penelitian yang dilakukan oleh Banin *et al.* (2021) bakteri *Acinetobacter* spp dikombinasikan dengan bakteri lain untuk dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi pada lingkungan perairan. Bakteri *Acinetobacter* spp memiliki kemampuan untuk tumbuh dengan baik pada semua media kompleks bakteri ini terdapat pada tanah dan juga air. Karena kemampuannya bertahan pada lingkungan ekstrim sehingga pada penelitian ini menunjukkan kemampuannya dalam mendegradasi limbah cair serta meningkatkan PH.

c. *Flavobacterium* spp

Isolat C2⁻⁷ terdiri dari bakteri gram negatif berbentuk batang yang di dapat dari tanah. Penelitian yang dilakukan untuk isolat C2⁻⁷ menunjukkan bahwa uji pada media TSIA senyawa gula mengalami proses fermentasi. Pada media TSIA isolat C2⁻⁷ tidak membentuk gas dan tidak adanya pembentukan H₂S. Pada isolat C2⁻⁷ juga dilakukan uji biokimia berupa uji katalase yang menunjukkan hasil positif dan uji oksidase yang menunjukkan hasil positif. Isolat C2⁻⁷ juga diinokulasikan pada media SIM. Hasil inokulasi isolat C2⁻⁷ pada media SIM menunjukkan hasil negatif. Media SIM tidak menunjukkan adanya pelebaran

pada bekas tusukan untuk identifikasi motilitas dan juga tidak terbentuknya cincin merah yang menunjukkan uji indol pada media SIM. Uji pewarnaan endospora juga dilakukan pada isolat C2⁻⁷ untuk mengetahui keberadaan endospora pada isolat. Hasil uji endospora menunjukkan tidak adanya endospora pada isolat C2⁻⁷. Hasil uji biokimia yang didapatkan dihubungkan dengan pemaparan yang terdapat pada buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (3rd ed) untuk mengetahui jenis bakteri. Melihat hasil pengujian yang dilakukan isolat C2⁻⁷ merujuk pada jenis kelompok bakteri *Flavobacterium* spp (Barrow & Feltham, 1993).

Menurut Sulistinah (2010) menjelaskan bahwa kelompok bakteri *flavobacterium* spp merupakan kelompok bakteri yang memiliki kemampuan untuk memanfaatkan beberapa jenis hidrokarbon untuk menjadi sumber energi bagi pertumbuhannya. *Flavobacterium* spp merupakan bakteri yang tergolong dalam bakteri hidrokarbonoklastik. Bakteri ini merupakan bakteri yang mampu menghasilkan biosurfaktan. *Flavobacterium* spp menghasilkan jenis biosurfaktan berupa flavolipid. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Flavobacterium* spp merupakan hasil dari konsumsi terhadap senyawa karbon dan nitrogen. Penelitian yang dilakukan oleh Rossiana *et al.* (2012) kombinasi *Flavobacterium* spp dengan bakteri lain mampu mengurangi nilai *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) pada tanah dibantu dengan tanaman sengon. Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi *flavobacterium* spp dengan bakteri lain mampu menurunkan kadar hidrokarbon pada tanah yang tercemar oleh oli bekas.

d. *Enterobacteriaceae* spp

Isolat B1⁻⁷ terdiri dari bakteri gram negatif berbentuk batang yang di dapat dari tanah. Penelitian yang dilakukan untuk isolat B1⁻⁷ menunjukkan bahwa uji pada media TSIA senyawa gula mengalami proses fermentasi. Pada media TSIA isolat B1⁻⁷ tidak membentuk gas dan tidak adanya pembentukan H₂S. Isolat B1⁻⁷ juga dilakukan uji biokimia berupa uji katalase yang menunjukkan hasil positif dan uji oksidase yang menunjukkan hasil negatif. Isolat B1⁻⁷ juga diinokulasikan pada media SIM. Hasil inokulasi isolat B1⁻⁷ pada media SIM menunjukkan hasil negatif. Media SIM tidak menunjukkan adanya pelebaran pada bekas tusukan untuk identifikasi motilitas dan juga tidak terbentuknya cincin merah yang menunjukkan uji indol pada media SIM. Uji pewarnaan endospora juga dilakukan pada isolat B1⁻⁷ untuk mengetahui keberadaan endospora pada isolat. Hasil uji endospora menunjukkan tidak adanya endospora pada isolat B1⁻⁷. Hasil uji biokimia yang didapatkan dihubungkan dengan pemaparan yang terdapat pada buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (3rd ed) untuk mengetahui jenis bakteri. Melihat hasil pengujian yang dilakukan isolat B1⁻⁷ merujuk pada jenis kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp (Barrow & Feltham, 1993).

Famili bakteri *Enterobacteriaceae* spp memainkan peran penting dalam proses dekomposisi di lingkungan tanah, berkontribusi terhadap siklus nutrisi dan meningkatkan kesuburan tanah melalui pemecahan bahan organik. Bakteri ini, yang dikenal karena kemampuannya mendegradasi berbagai zat organik, memiliki peran ekologis penting dalam mendukung ekosistem tanah yang sehat (Widyanti & Fatmawati, 2022). Selain itu, keberadaan *Enterobacteriaceae* spp

di tanah sering digunakan sebagai indikator biologis pencemaran, terutama di wilayah yang terpapar limbah atau bahan pencemar lainnya. Bakteri ini mampu bertahan dan beradaptasi di lingkungan yang tercemar, menjadikannya indikator yang sensitif terhadap kontaminasi biologis (Rohmah, 2017).

Penelitian yang dilakukan Nurjanah *et al.* (2017) Menunjukkan bahwa kelompok famili dari *Enterobacteriaceae* spp khususnya pada genus *Klebsiella*, *Enterobacter* dan *Citrobacter* memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan persentase mampu mengurangi kandungan senyawa hidrokarbon sebesar 67,99%, 66,17% dan 56,85%. Penelitian ini menunjukkan bahwa adanya kelompok famili *Enterobacteriaceae* spp yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan di mana famili dari *Enterobacteriaceae* spp menunjukkan adanya zona halo pada media NA modifikasi yang telah diberi tambahan senyawa hidrokarbon (limbah oli). Penyerapan senyawa hidrokarbon yang dilakukan oleh famili *Enterobacteriaceae* spp menunjukkan bahwa kelompok bakteri tersebut memiliki kemampuan khusus untuk mengubah senyawa hidrokarbon menjadi sumber energi.

Penelitian juga menunjukkan bahwa beberapa spesies *Enterobacteriaceae* spp memiliki kemampuan adaptasi terhadap kondisi lingkungan yang ekstrem, termasuk tanah dengan kandungan logam berat yang tinggi. Kemampuan ini diduga terkait dengan mekanisme resistensi yang memungkinkan bakteri ini untuk tetap hidup dan bahkan berkembang di lingkungan yang umumnya bersifat toksik bagi organisme lain (Khastini *et al.*, 2022). Mekanisme ini memperkuat peran ekologis *Enterobacteriaceae* spp di

lingkungan, baik sebagai pengurai maupun sebagai bioindikator pencemaran tanah, yang dapat dimanfaatkan untuk monitoring lingkungan dan pemulihan ekosistem yang terkontaminasi.

4.6 Interpretasi Zona Halo

Pada penelitian yang dilakukan terhadap tiga bengkel di Desa Suko Kecamatan Sukodono terdapat 8 koloni bakteri yang terindikasi memiliki kemampuan untuk mendegradasi limbah oli. Penelitian yang dilakukan menunjukkan koloni bakteri yang tidak membentuk zona halo dan membentuk zona halo. Koloni yang ditemukan terdapat empat isolat yang memiliki karakteristik berbeda. Bakteri memiliki kemampuan unik untuk mengubah senyawa limbah oli menjadi sumber karbon dan energi melalui proses yang dikenal sebagai bioremediasi. Limbah oli, yang sering mengandung senyawa berbahaya seperti hidrokarbon, dapat mencemari tanah dan air, serta mengganggu ekosistem (Nkwelang *et al.*, 2008). Bakteri memproduksi enzim yang membantu memecah ikatan kimia dalam senyawa hidrokarbon. Kemampuan memecah ikatan kimia pada senyawa hidrokarbon ini membantu bakteri untuk menggunakan produk hasil pemecahan sebagai sumber karbon dan sumber energi bagi bakteri itu sendiri (Pamungkas, 2012).

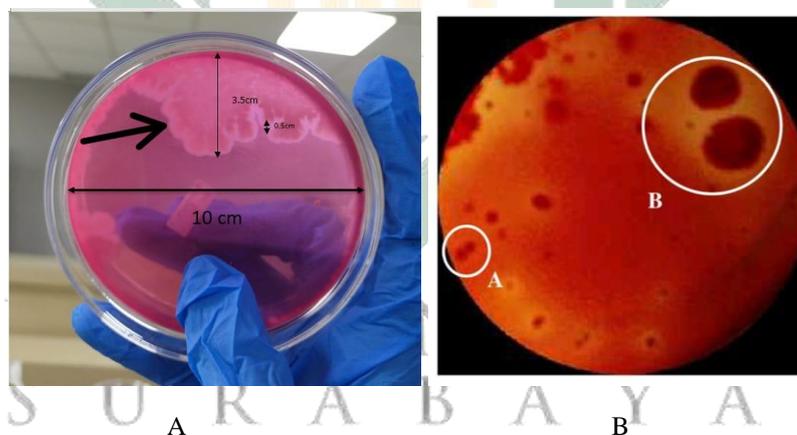
Proses penyerapan senyawa karbon yang berasal dari limbah oli ini membantu bakteri untuk tumbuh dan membelah diri. Senyawa karbon diperlukan untuk proses tumbuh dan perkembangan bakteri sehingga menghasilkan biomassa baru. Karbon dari senyawa oli yang terdegradasi akan terserap ke dalam struktur sel bakteri dan memberikan sumber energi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan reproduksi (Ashok *et al.*, 1995). Bakteri juga dapat menghasilkan metabolit

sekunder yang bermanfaat selama proses degradasi. Metabolit ini dapat membantu menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan berkontribusi pada peningkatan kualitas lingkungan (Atlas & Bartha, 1992). Keberhasilan proses bioremediasi sangat tergantung pada ketersediaan nutrisi dan kondisi lingkungan, seperti pH yang optimal bagi pertumbuhan mikroba (Rosenberg *et al.*, 1992).

Zona halo merupakan suatu zona yang terbentuk akibat adanya penyerapan atau penguraian senyawa yang terdapat di dalam media oleh bakteri yang dikultur. Hasil kultur pada media akan terlihat bagian yang jernih atau lebih bening. Perubahan pada media terjadi karena aktivitas enzimatik yang dilakukan oleh bakteri untuk mengurai senyawa limbah oli tersebut. Penambahan pigmen warna pada media NA modifikasi membantu untuk dapat melihat lebih jelas zona halo yang terbentuk. Zona halo yang terlihat menandakan bahwa bakteri tersebut memiliki aktivitas penguraian atau penyerapan terhadap limbah oli yang ditambahkan dalam media modifikasi.

Bakteri yang mampu untuk melakukan pendegradasian terhadap senyawa hidrokarbon dikenal juga dengan sebutan bakteri hidrokarbonoklastik. Bakteri hidrokarbonoklastik merupakan jenis bakteri yang memiliki karakteristik yaitu dapat menghasilkan enzim hidroksilase. Fungsi enzim hidroksilase yaitu untuk pengoksidasian hidrokarbon sehingga senyawa hidrokarbon akan menjadi untai rantai yang lebih pendek. Senyawa hidrokarbon yang telah menjadi potongan senyawa yang lebih pendek dapat digunakan bakteri untuk diserap menjadi sumber energinya. Menurut Miller (1995) bakteri mampu beradaptasi dengan lingkungan yang mengandung hidrokarbon melalui beberapa cara. Cara bakteri beradaptasi dengan lingkungan yang tercemar hidrokarbon yaitu pembentukan bagian

hidrofobik pada dinding sel sehingga tahan terhadap hidrokarbon, menghasilkan enzim untuk melarutkan hidrokarbon sehingga dapat diserap oleh bakteri dan bakteri mampu memodifikasi bagian membran untuk mengurangi toksisitas terhadap hidrokarbon (Susanti & Trinanda, 2020). Zona halo yang muncul menandakan bahwa bakteri tersebut memiliki potensi dalam mengatasi pencemaran limbah oli di lingkungan. Zona halo pada penelitian ini memiliki peran sebagai indikator aktivitas enzimatik yang berperan pada proses penguraian atau penyerapan terhadap limbah oli. Kemampuan membentuk zona halo yang lebih besar menandakan bahwa bakteri tersebut memiliki efektivitas dalam menguraikan limbah oli lebih baik. Zona halo yang terbentuk dari kultur bakteri yang diambil dari tanah yang tercemar limbah oli memiliki kemampuan membentuk zona halo yang lebih besar (Nababan, 2008).



Keterangan : A: Zona halo (Dokumentasi pribadi), B : Referensi zona halo (Yolantika *et al.*, 2015)

Gambar 4. 2 Hasil pengamatan zona halo

Penelitian yang dilakukan menunjukkan adanya koloni bakteri yang memunculkan zona halo. Isolat B1⁻⁷ merupakan isolat yang memunculkan zona halo. Isolat B1⁻⁷ yang teridentifikasi merupakan kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp. Kelompok bakteri ini ditemukan sebanyak $3,4 \times 10^6$ cfu/gr dari total koloni bakteri yang ditemukan sebanyak 2×10^7 cfu/gr. Hasil perhitungan

total koloni dengan total koloni bakteri yang menghasilkan zona halo jika ditampilkan dalam persentase proporsi keberadaan maka proporsi dari kelompok bakteri yang menghasilkan zona halo sebesar 16,7% dari total koloni bakteri. Hasil penelitian yang didapat menunjukkan bahwa terdapat jenis bakteri yang diduga mampu untuk pendegradasian hidrokarbon pada tanah bengkel yang tercemar limbah oli di Desa Suko Kecamatan Sukodono.

Pada penelitian lain (Nurjanah *et al.*, 2017) menunjukkan bahwa kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp memiliki kemampuan dalam mendegradasi hidrokarbon dengan persentase pengurangan sebesar 66,17%. Senyawa hidrokarbon dimanfaatkan oleh beberapa jenis bakteri untuk diubah menjadi sumber makanan. Senyawa hidrokarbon akan diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana untuk dapat diserap oleh bakteri. Pengubahan senyawa hidrokarbon menjadi senyawa lebih sederhana ini memanfaatkan kemampuan bakteri dengan cara mengoksidasi senyawa hidrokarbon (Nurjanah *et al.*, 2017). Hasil dari penelitian ini merupakan salah satu kekuasaan yang Allah tunjukkan kepada kita dimana ciptaan-Nya tidak akan ada yang sia-sia baik yang ada di langit ataupun bumi, baik yang besar maupun kecil bahkan yang tidak terlihat dengan mata telanjang sekalipun, misalnya bakteri. Sebagai mana firman Allah dalam Q.S. Al-Baqarah ayat 26:

﴿إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ

كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴿٢٦﴾

Artinya :

“*Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil daripada itu. Adapun orang-orang yang beriman mengetahui bahwa itu kebenaran dari Tuhannya. Akan tetapi, orang-orang kafir berkata, “Apa maksud Allah dengan perumpamaan ini?” Dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang disesatkan-Nya. Dengan itu pula banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Namun, tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu, selain orang-orang fasik*”. (Q.S. Al-Baqarah:26).

Menurut Ibnu Katsir menafsirkan pada ayat di atas bahwa seekor nyamuk atau makhluk yang lebih kecil dari itu menunjukkan bahwa Allah SWT memiliki kuasa untuk menciptakan semuanya baik yang berukuran besar ataupun yang berukuran kecil. Allah SWT tidak pernah menciptakan apapun dengan sia-sia. Ayat tersebut juga menjelaskan bahwa orang-orang beriman meyakini segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT memiliki manfaat bagi kehidupan manusia. Ayat tersebut membuktikan bahwa apapun yang diciptakan oleh Allah SWT memiliki manfaatnya masing-masing sebagaimana bakteri dan juga makhluk-makhluk kecil yang Allah SWT ciptakan. Sebagaimana pada penelitian ini membuktikan bahwa adanya bakteri yang mampu untuk mendegradasi limbah oli. Bakteri ini menunjukkan bahwa makhluk lebih kecil dari nyamuk juga memiliki manfaat. Sehingga pada penelitian ini membuktikan kuasa dan kebesaran Allah SWT terhadap apa yang ada di muka bumi ini.

Koloni bakteri yang tumbuh pada media NA modifikasi dengan penambahan limbah oli terdapat dua jenis Koloni yang membentuk zona halo dan yang tidak membentuk zona halo. Koloni membentuk zona halo menunjukkan adanya penyerapan terhadap limbah oli yang ditambahkan pada NA modifikasi. Pada koloni yang tidak membentuk zona halo menunjukkan bahwa koloni tersebut mampu beradaptasi pada media yang telah ditambahkan limbah oli. Limbah oli yang ditambahkan pada NA modifikasi berfungsi sebagai penghambat untuk bakteri yang tidak tahan terhadap limbah oli. Penambahan limbah oli juga bertujuan agar bakteri yang mampu menyerap limbah oli mampu untuk memanfaatkan limbah oli sebagai sumber energi atau bakteri tersebut memiliki tingkat toleransi yang tinggi terhadap limbah oli sehingga dapat tumbuh pada NA modifikasi.

Pada penelitian yang telah dilakukan, isolat yang tumbuh pada media NA modifikasi dengan penambahan limbah oli mendapati adanya empat macam isolat bakteri yang terduga sebagai bakteri pendegradasi limbah oli. Isolate bakteri yang terduga merupakan kelompok bakteri pendegradasi limbah oli meliputi kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp., *Flavobacterium* spp., *Nocardia* spp. dan *Acinetobacter* spp. Keempat isolat yang ditemukan tidak semua isolat membentuk zona halo. Isolat B1⁻⁷ merupakan isolat yang membentuk zona halo pada media na modifikasi. Isolat B1⁻⁷ merupakan kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp. Kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp merupakan kelompok bakteri yang diduga mampu untuk mendegradasi limbah oli.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Huyyirnah dan Rosmaniar (2021) menunjukkan adanya kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp yang tumbuh pada media identifikasi yang dibuat. Kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp merupakan kelompok bakteri yang memiliki kemampuan untuk tumbuh dan berkembang pada media yang berisi minyak bumi mentah. Kemampuan bertahan pada kondisi media yang berisi minyak bumi mentah merupakan salah satu dari kemampuan kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp dalam mengubah minyak bumi mentah sebagai sumber karbon dalam metabolismenya. Kemampuan kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp ini menjadikan kelompok ini sebagai salah satu agen pendegradasi hidrokarbon pada minyak bumi yang cukup baik (Irdasayuti, 2015).

Terdapat bakteri yang tidak menghasilkan zona halo tetapi dapat tumbuh pada media na yang telah dimodifikasi oleh limbah oli. Bakteri yang tidak dapat menghasilkan zona halo kemungkinan besar merupakan kelompok bakteri yang

memiliki toleransi terhadap lingkungan yang tercemar. Koloni bakteri yang tumbuh adalah koloni bakteri yang tidak bisa mengekspresikan enzim yang dibutuhkan untuk proses bioremediasi limbah oli. Proses bioremediasi menggunakan bakteri terjadi karena aktivitas enzimatik pada bakteri yang mengubah limbah oli menjadi sumber energi untuk dimanfaatkan oleh bakteri (Yolantika *et al.*, 2015). Pada penelitian yang telah dilakukan terdapat tiga kelompok bakteri yang tidak menampakkan zona halo. Ketiga kelompok bakteri ini diduga merupakan kelompok bakteri *Flavobacterium* spp., *Acinetobacter* spp dan *Nocardia* spp. Ketiga jenis bakteri ini merupakan bakteri yang mampu bertahan pada lingkungan ekstrim. Menurut Sulistinah (2010) menjelaskan bahwa kelompok bakteri *flavobacterium* merupakan kelompok bakteri yang memiliki kemampuan untuk memanfaatkan beberapa jenis hidrokarbon untuk menjadi sumber energi bagi pertumbuhannya.

Acinetobacter spp juga merupakan kelompok bakteri yang digunakan pada beberapa pengolahan limbah. Kelompok bakteri ini pada penelitian yang dilakukan oleh Maghfirotin (2021) bakteri *Acinetobacter* spp dikombinasikan dengan bakteri lain untuk dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi pada lingkungan perairan. Bakteri *Acinetobacter* spp memiliki kemampuan untuk tumbuh dengan baik pada semua media kompleks bakteri ini terdapat pada tanah dan juga air. Karena kemampuannya bertahan pada lingkungan ekstrim sehingga pada penelitian ini menunjukkan kemampuannya dalam mendegradasi limbah cair serta meningkatkan PH. Bakteri *Nocardia* spp juga merupakan kelompok bakteri yang berperan dalam bioteknologi untuk dimanfaatkan sebagai pendegradasi limbah. Bakteri ini banyak dimanfaatkan dengan mengkombinasikannya dengan kelompok bakteri lain agar mendapatkan hasil yang lebih baik. Potensi bakteri *Nocardia* spp dalam

memecahkan senyawa hidrokarbon merupakan salah satu kemampuan yang dimanfaatkan untuk menjadikan bakteri ini sebagai agen bioremediasi (Hamme *et al.*, 2003).



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB V PENUTUP

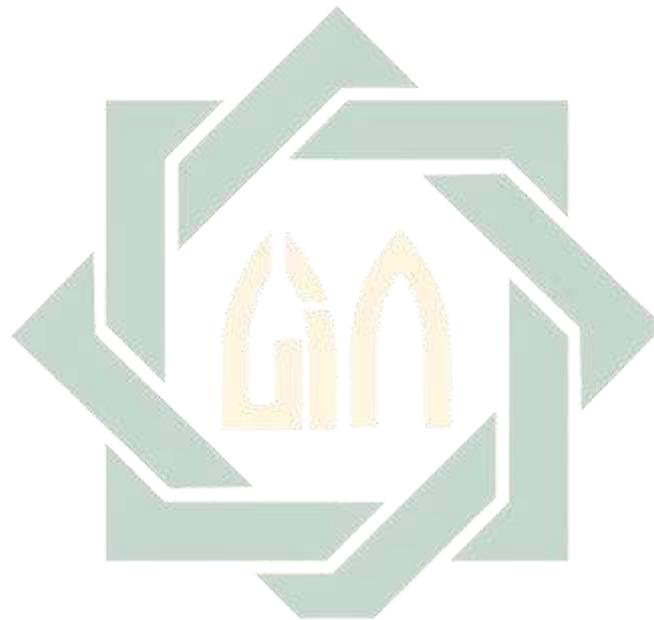
5.1 Kesimpulan

- a. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat empat jenis kelompok bakteri yang ditemukan pada tanah bengkel di desa Suko kecamatan Sukodono yang terdiri dari bakteri gram negatif yaitu *Enterobacteriaceae* spp, *Flavobacterium* spp dan *Acinetobacter* spp. Untuk bakteri gram positif ditemukan *Nocardia* spp.
- b. Berdasarkan hasil pengamatan karakteristik pada bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon (limbah oli). Isolat B1⁻⁷ memiliki bentuk koloni *irreguler* dengan tepian koloni membentuk lobate dan memiliki sudut elevasi berupa flat. Kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp merupakan bakteri dengan gram negatif berbentuk basil dengan kemampuan memfermentasi gula, tidak membentuk spora dan merupakan bakteri non motil.
- c. Pada penelitian ini kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* spp memiliki proporsi keberadaan terhadap bakteri lain yang ditemukan pada tanah bengkel di desa Suko kecamatan Sukodono ya itu sebesar 16,7%.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian lebih lanjut yaitu melakukan identifikasi hingga tahap spesies dengan penambahan uji biokimia dan uji DNA untuk dapat memastikan spesies yang ditemukan. Untuk pengembangan penelitian pemanfaatan bakteri sebagai agen pendegradasi limbah oli pada area perkotaan dapat dilakukan menggunakan isolat yang terdapat pada lingkungan sekitar. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan tiap

isolat yang ditemukan. Penambahan pengamatan terhadap faktor lingkungan seperti PH suhu dan juga kelembaban pada tanah dapat ditambahkan untuk mengetahui bagaimana pengaruh terhadap jenis bakteri yang tumbuh, Perlu juga ditambahkan terkait dengan radius dan konsentrasi pencemaran untuk mengetahui seberapa jauh terjadinya pencemaran dan efeknya terhadap lingkungan.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Jabbar, N. M., Al Zubaidy, E. A., & Mehrvar, M. (2010). Waste lubricating oil treatment by adsorption process using different adsorbents. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 4(2), 141-144.
- Andrews, J.E., P. Brimblecombe, L.D. Jickells, P.S. Liss, dan B. Reid. (2004). *An Introduction to Environmental Chemistry*. 2nd edition, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Aprilyanti, S. (2020). *Kimia Terapan (Aplikasi untuk Teknik Mesin)*. Penerbit CV. Sarnu Untung.
- Ashok, B. T., Saxena, S., Susarrat, J. (1995). Isolation and Characterization of Four Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria From Soil Near on Oil Refinery. *Letter in Applied Microbiology*. The Society for Applied Bacteriology. 21, 246 – 248.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (1992). Biodegradation of petroleum hydrocarbons: A review. *Environmental Pollution*, 79(3), 253-278.
- Banerjee, A., Roy, A., Dutta, S., Mondal, S. (2016). Bioremediation of hydrocarbon – a review. *International Journal of Advanced Research*, 4(6), 1303-1313.
- Banin, M. M., Yahya, Y., & Nursyam, H. (2021). Pengolahan limbah cair industri pembekuan ikan kaca piring (*Sillago sihama*) menggunakan kombinasi bakteri *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus megaterium*, *Nitrococcus* sp. dan *Pseudomonas putida* secara aerob. *Journal of Tropical AgriFood*, 3(1), 49-62.
- Castro, B. D. (2019). *Uji Cemaran Escherichia Coli Pada Air Minum Isi Ulang Di Kelurahan Oesapa Kota Kupang Tahun 2019* (Doctoral dissertation, Poltekkes Kemenkes Kupang).
- Charlena. (2010). *Bioremediasi Tanah Tercemar Limbah Minyak Berta Menggunakan Konsorsium Bakteri*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor, Indonesia.
- Chairunnisa, Riyanto, & Karim, A. (2019). Isolasi dan Uji Bakteri Lipolitik dalam Mendegradasi Minyak Pada Limbah Cair Kelapa Sawit di Kebun Marihat, Pematang Siantar Isolation and Testing of Lipolytic Bacteria in Oil Degradation of Palm Oil Mill Effluent (POME) at Marihat Pematang Siantar. *Jurnal Ilmiah Biologi UMA (Jibioma)*, 1(2), 44–52.
- Dhar, K.S., M.N. Dutta, dan Anwar. (2012). Biodegradation of petroleum hydrocarbon by two *Aspergillus* spp. and two *Penicillium* spp. isolated from the contaminated soil and water of ship breaking yard. *Asian J Microbiol Biotech Env Sci*. 14(1):143-48.

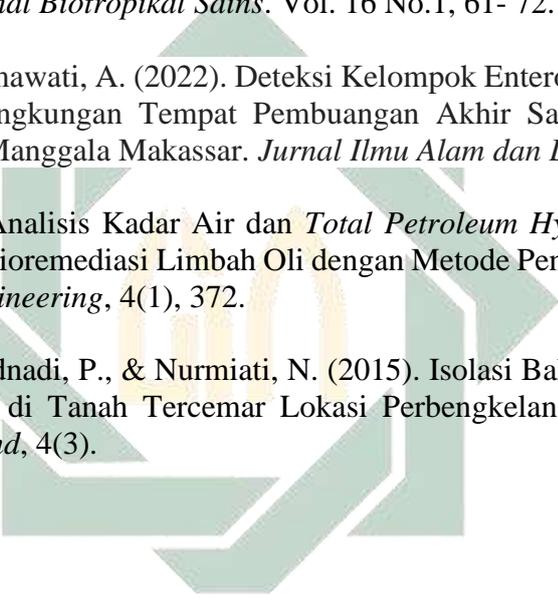
- Diyaningsih, N. L. D. (2019). *Identifikasi Bakteri Patogen Pada Alat Bedah Minor Di Ruang IGD RSD Mangusada* (Doctoral dissertation, Poltekkes Denpasar).
- Ervayenri, E. (2007). Dampak Pencemaran Minyak Bumi Terhadap Tanaman Kelapa Sawit (*Elais Guineensis*). *Jurnal Ilmiah Pertanian*, 4(1), 19-25.
- Fadilah, W., Rasyidah, R., & Mayasari, U. (2022). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Heterotrofik Pada Kawasan Perairan Pantai Indah Kalangan, Tapanuli Tengah. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 9(2), 306-317.
- Febriana, B. W. (2014). *Pengembangan modul kimia berbasis problem based learning (PBL) pada materi senyawa hidrokarbon dan turunannya kelas XI SMK Kesehatan Ngawi* (Doctoral dissertation, UNS (Sebelas Maret University)).
- Hadioetomo, R. (1993). *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Hamme, J. D. Van, Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549.
- Hao, R., dan A. Lu. 2009. *Biodegradation of heavy oils by halophilic bacterium*. *Prog Nat Sci*. 19:997-1001.
- Holifah, S., & Harjono, dan. (2018). Indonesian Journal of Chemical Science Analisis Penambahan Kotoran Kambing dan Kuda pada Proses Bioremediasi Oil Sludge di Pertambangan desa Wonocolo. *J. Chem. Sci*, 7(1), 1–8. p-ISSN 2252-6951 e-ISSN 2502-6844.
- Huyyirnah, H., & Rosmaniar, R. (2021). Modifikasi Medium *Menggunakan Saline-Water Soluble Fraction (SSF)* atau Fraksi Minyak Terlarut untuk Menumbuhkan Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon. *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(2), 72-81.
- Irene, D. S., Dirgayusa, I. G. N. P., & Puspitha, N. L. P. R. (2020). Identifikasi Bakteri yang Berpotensi Mendegradasi Hidrokarbon dari Substrat Mangrove dengan Tekstur Berpasir, Berlumpur, dan Tanah Liat. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*, 6(2), 175-184.
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C., & Putriani, P. (2017). Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Bioleuser*, 1(2).

- Karyawati, A. T., Mauboy, R. S., Amalo, D., Ruma, M. T. L., Momo, A. N., & Pada, B. A. (2023). Karakteristik bakteri pendegradasi pada tanah yang tercemar oli di lokasi perbengkelan otomotif Kota Mbay Kabupaten Nagekeo. *Jurnal Biotropikal Sains*, 20(2), 84–91.
- Khastini, R. O., Zahranie, L. R., Rozma, R. A., & Saputri, Y. A. (2022). Review : Peranan Bakteri Pendegradasi Senyawa Pencemar Lingkungan melalui Proses Bioremediasi. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(1), 345.
- LAPI-ITB 2001. *Evaluasi Bioremediasi Minas*. Bandung: LAPI –ITB
- Lawalata, H. J., Rompas, C. F., & Kansile, E. F. 2020. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Anggur Buah Pala (*Myristica fragrans Houtt*) Sebagai Penghasil Ekspolisakarida. *JSME (Jurnal Sains, Matematika & Edukasi)*, 8(1), 5-10.
- Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat (LPPM). 2004. *Eksperimen Laboratorium Pengolahan Lumpur Minyak PT Medco E&P Indonesia Menggunakan Reaktor Batch*. Pusat Penelitian Antar Universitas Bioteknologi Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- Manalu, R. T. (2017). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Asal Indonesia. *Sainstech Farma: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 10(2), 23-28.
- Meyer, R.F., E.D. Attanasi, dan F.A. Freeman. (2007). *Heavy oil and natural bitumen resources in geological basins of the world*. Geological Survey Open-File Report 2007- 1084. Reston, Virginia, USA.
- Miller, R.M. (1995). Surfactant enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. Di dalam: Skipper HD, Turco RF, editors. *Bioremediation: Science and Applications*. SSSA Special Publication 43. hlm 33-54.
- Muraza, O., dan A. Galadima. (2015). Aquathermolysis of heavy oil: A review an perspective on catalyst development. *Fuel*. 157:219-231.
- Nababan, B. (2008). Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar dari Laut Belawan. *Tesis*. Medan, Indonesia: Sekolah Pascasarjana, Universitas Sumatera Utara.
- Nkwelang, G., Kamga, H. F., Nkeng, G. E., & Antai, S. P. (2008). Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing microorganisms in tropical soil polluted with oily sludge. *African Journal of Biotechnology*, 7(8).

- Nurjanah, I., Mauludiyah, & Munir, M. (2017). Potensi Degradasi Minyak Solar oleh Bakteri Hidrokarbonoklastik di Perairan Pelabuhan Tanjung Perak Ika. *Journal of Marine Resources and Coastal Management*, 1(1), 31–38.
- Pamungkas, B. P. (2012). *Biodegradasi Cemaran Minyak Mentah Menggunakan Isolat Bakteri Dari Pertambangan Minyak Rakyat Cepu* (Bachelor's thesis, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta).
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. (1986), Penterjemah, Ratna Siri Hadioetomo dkk. *Dasar Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Pertiwi, S., Widjajanti, H., Yudono, B., & Wahyudi, H. (2011). Pemanfaatan Rumput *Fimbristylis* sp. dalam Proses Bioremediasi Tanah pada Berbagai Konsentrasi Limbah Minyak Bumi. *Jurnal Penelitian Sains*, 14(1), 57-61.
- Pitrandjalisari, V. (2009). Analisis Kelayakan Investasi Penggunaan Teknologi Crude Oil System di Departemen Power Plant PT Newmont Nusa Tenggara. *Jurnal Teknik Industri*, 10(2), 109-113.
- Rachmawani, D., Yulianda, F., Kusmana, C., Boer, M., & Parwati, E. (2016). Dampak Hidrokarbon Aromatik Terhadap Ekosistem Mangrove Di Kawasan Binalatung Kota Tarakan Kalimantan Utara (*Impact of Aromatic Hydrocarbon on Mangrove Ecosystem in Binalatung Area Tarakan City North Kalimantan*). *Jurnal manusia dan Lingkungan*, 23(3), 295-303.
- Raharja, H., Zubaidah, A., & Prasetyo, D. (2023). Analisis Biokimia Bakteri Kandidat Probiotik Yang Diisolasi Dari Saluran Pencernaan Udang Jerbung (*Penaeus Merquiensis*). *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 10(2), 158-162.
- Raharjo, W. P. (2007). Pemanfaatan Tea (*Three Ethyl Amin*) dalam Proses Penjernihan Oli Bekas Sebagai Bahan Bakar pada Peleburan Aluminium. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 8, 166–184.
- Reimena, R., Erina, E., Darniati, D., Fakhurrazi, F., Darmawi, D., & Budiman, H. (2017). 10. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Genus *Pediococcus* from Sumatran Orangutan (*Pongo abelii*) faeces at Kandi Zoo and Kinantan Zoo West Sumatera. *Jurnal Medika Veterinaria*, 11(1), 59-65.
- Rifai, K. R. (2021). Uji Indole sebagai Kegiatan Penjaminan Mutu Tambahan pada Hasil Pengujian Coliform dalam Sampel Air Mineral. *Indonesian Journal of Industrial Research*, 6(1), 1-6.
- Riswiyanto, S. (2009). *Kimia Organik*. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Rohmah, N. S. (2017). *Isolasi dan identifikasi bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi timbal (Pb) dari lumpur lapindo* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).

- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., and Ron, E. Z. (1992). Petroleum Bioremediation – A Multiphase Problem. *Biodeg.* 3, 213 – 226.
- Rubiono, G., & Yasi, R. M. (2017). Sosialisasi Manajemen Limbah Oli Bengkel Mobil: Pengabdian Masyarakat di Desa Pesucen Kecamatan Kalipuro Kabupaten Banyuwangi. *Jurnal Aplikasi Teknik dan Pengabdian Masyarakat*, 1(1), 5-9.
- Sabbathini, G. C., & Pujiyanto, S. (2017). Isolasi dan identifikasi bakteri genus *Sphingomonas* dari daun padi (*Oryza sativa*) di area persawahan Cibinong. *Jurnal Akademika Biologi*, 6(1), 59-64.
- Setyazaky, H., & Harryes, R. K. (2024, March). Identifikasi Bakteri *Salmonella* Sp. Pada Ikan Anggoli (*Pristipomoides Mulltidens*) Di Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, Dan Keamanan Hasil Perikanan Kupang, NTT. *In Seminar Nasional Kontribusi Vokasi* (Vol. 1, No. 1, pp. 153-160).
- Sihag, S., Pathak, H., & Jaroli. (2014). Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *Iinternatiional journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(3), 185–202.
- Singleton dan Sainsbury. (2006). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd Edition*. Sussex, England : John Wiley and Sons.
- Sulistinah, N. (2010). Kemampuan Flavobacterium SP Nub1 Dalam Menggunakan Alifatik Nitril Untuk Pertumbuhannya. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 11(3), 425-433.
- Sumiardi, A. (2019). Hidrokarbon Dari Tanah Tercemar Oli Bekas Di Kawasan Pt. Krakatau Steel Cilegon Banten. *J. Sci. Phar* Vol., 02(02), 28–33.
- Sumiardi, A. (2021). Laju Degradasi Senyawa Hidrokarbon yang Mencemari Tanah Oleh *Alterierythrobacter evoxidivorans* (DQ 304436) dengan Stimulasi Fertilizer. *Jurnal Lingkungan dan Sumberdaya Alam (Jurnal)*, 4(2), 117-129.
- Surtikanti, H. & W. Surakusumah. (2004). Studi Pendahuluan tentang Peranan Tanaman dalam Proses Bioremediasi Oli Bekas dalam Tanah Tercemar. *Jurnal Ilmiah Biologi Ekologi dan Biodiversitas Tropika* 2(1): 11-14.
- Susanti, W. I., & Trinanda, R. (2017). Potensi bakteri asal tanah rizosfer, sedimen tanah, dan pupuk kandang sapi untuk biodegradasi minyak berat dan oli bekas. *Jurnal Tanah dan Iklim*, 41(1), 37-44.

- Tumbol, R. A. (2020). Isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dibudidayakan di Kecamatan Dimembe Kabupaten Minahasa Utara Tahun 2019. *e-Journal Budidaya Perairan*, 8(1).
- Wadjudy, E. F., & Setiadi, S. (2020). Teknik Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Pada Ikan Toman (*Channa micropeltes*). *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 17(2), 155-159.
- Waluyo, L. (2010). *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang : Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Welan, Yuliana S.L., Refli, Rony S. & Mauboy. (2019). Isolasi dan Uji Biodegradasi Bakteri Endogen Tanah Tumpahan Oli Bekas di Kota Kupang. *Jurnal Biotropikal Sains*. Vol. 16 No.1, 61- 72.
- Widyanti, T., & Fatmawati, A. (2022). Deteksi Kelompok Enterobacteriaceae pada Tanah di Lingkungan Tempat Pembuangan Akhir Sampah Tamangapa Kecamatan Manggala Makassar. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 13(1).
- Yahya, H. (2019). Analisis Kadar Air dan *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) dari Proses Bioremediasi Limbah Oli dengan Metode Pengomposan. *Jurnal Serambi Engineering*, 4(1), 372.
- Yolantika, H., Periadnadi, P., & Nurmiati, N. (2015). Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon di Tanah Tercemar Lokasi Perbengkelan Otomotif. *Jurnal Biologi Unand*, 4(3).



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

LAMPIRAN

Lampiran 1 Dokumentasi Kegiatan



(Pengambilan sampel)



(Sampel tanah)



(Penimbangan sampel tanah)



(Inokulasi pada media NA modifikasi)



(Pengenceran)



(Pewarnaan Gram)



(Uji katalase)



(Sterilisasi)



(NA modifikasi)



(NA tanpa modifikasi)



(Pemurnian)



(Penimbangan phenol red)



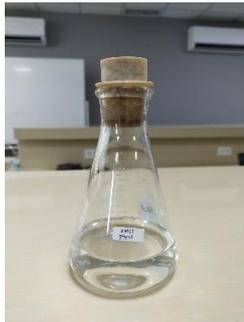
(Hasil NA modifikasi)



(Hasil NA modifikasi)



(Hasil NA modifikasi)



(NaCl steril)



(Pewarnaan endospora)



(TSIA)



(Uji oksidase)

Lampiran 2 Perhitungan Presentase Keberadaan Bakteri Pendegradasi

Total koloni bakteri

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) \times (d)]}$$

$$N = \frac{6}{[(1 \times 3) \times (10^{-7})]}$$

$$N = \frac{6}{3 \times 10^{-7}} = 2 \times 10^7 \text{ cfu/gr}$$

Bakteri zona halo

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n1) \times (d)]}$$

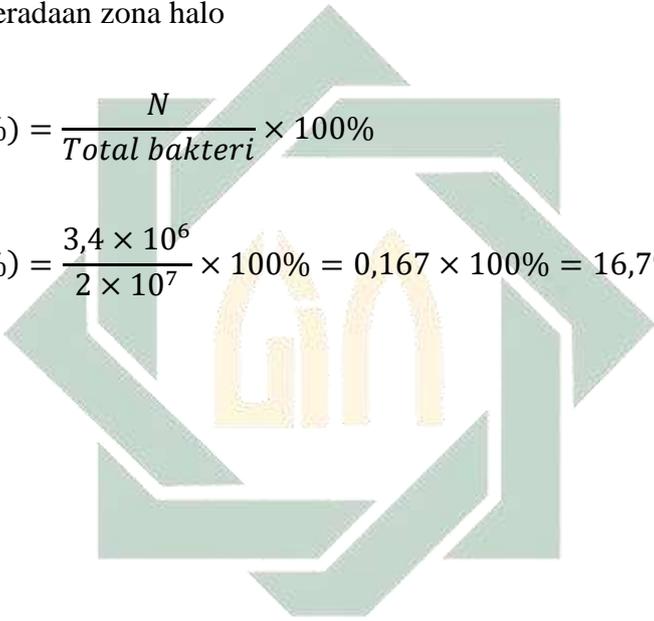
$$N = \frac{1}{[(1 \times 3) \times (10^{-7})]}$$

$$N = \frac{1}{3} \times 10^7 = 3,4 \times 10^6 \text{ cfu/gr}$$

Proporsi keberadaan zona halo

$$\text{Proporsi (\%)} = \frac{N}{\text{Total bakteri}} \times 100\%$$

$$\text{Proporsi (\%)} = \frac{3,4 \times 10^6}{2 \times 10^7} \times 100\% = 0,167 \times 100\% = 16,7\%$$



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A