

III. METODE PENELITIAN

Pada tahun kedua akan dilakukan pembuatan model bioremediasi skala mikrokosmos yang mendekati karakter hutan mangrove sebenarnya. Hasil yang diharapkan pada tahap ini adalah ditemukannya model bioremediasi yang efektif dalam mengurangi beban cemaran minyak bumi pada hutan mangrove. Langkah-langkah yang akan dikerjakan pada tahap kedua antara lain :

1. Karakterisasi hutan mangrove yang tercemar minyak bumi.
2. Pembuatan miniatur hutan mangrove (mikrokosmos) yang mempunyai karakter menyerupai hutan mangrove yang sebenarnya.
3. Melakukan proses bioremediasi pada miniatur hutan mangrove yang telah dibuat tercemar menggunakan konsorsium bakteri indigenus hidrokarbonoklastik
4. Memantau kinerja bioremediasi selama satu siklus

1. Karakterisasi hutan mangrove yang tercemar minyak bumi.

Karakterisasi hutan mangrove meliputi: (1) jenis-jenis vegetasi yang tumbuh di hutan mangrove tersebut, (2) konsentrasi TPH 3) faktor-faktor lingkungan seperti suhu, pH, salinitas, dan nutrisi seperti N total dan P terlarut, K terlarut pada air dan tanah yang merupakan media tumbuh tanaman mangrove, dan 4) jumlah total bakteri. Hasil karakterisasi ini digunakan sebagai dasar pembuatan miniatur mikrokosmos sehingga kondisi mikrokosmos mendekati kondisi hutan mangrove sebenarnya (Modifikasi Zhu, *et al.*, 2001)

2. Pembuatan miniatur hutan mangrove (mikrokosmos) yang mempunyai karakter menyerupai hutan mangrove yang sebenarnya

Berdasarkan karakter hutan mangrove yang tercemar minyak bumi selanjutnya dibuat miniatur hutan mangrove di rumah kaca dengan faktor –faktor lingkungan yang memenuhi karakter yang mendekati hutan mangrove sebenarnya dan dilakukan pencemaran buatan berupa minyak bumi dengan kandungan minyak disesuaikan dengan pencemaran yang terjadi pada hutan mangrove sebenarnya.

Pembuatan mikrokosmos dilakukan sebanyak empat unit, masing-masing unit dibuat menggunakan bak dari kaca dengan ukuran panjang 60 cm, lebar 50 cm dan tinggi 50 cm. Masing-masing unit diisi dengan tanah dan air dari hutan mangrove yang telah disesuaikan pHnya dengan pH air dan tanah di hutan mangrove. Selanjutnya ditanami bibit tanaman mangrove sesuai dengan jenis vegetasi yang ada di hutan mangrove. Masing-masing

unit ditunggu hingga tanaman yang ditanam tumbuh dengan baik, jika ada tanaman yang mati dilakukan penanaman baru. Setelah kondisi mikrokosmos stabil yang ditandai tanaman mangrove tumbuh dengan baik, selanjutnya ditambahkan minyak mentah sebagai bahan pencemar sebanyak 5% (v/v), dibiarkan selama 24 jam. Dilakukan sampling awal air dan tanah untuk dianalisis TPH awal sebelum proses bioremediasi dimulai.

3. Melakukan proses bioremediasi pada miniature hutan mangrove yang telah dibuat tercemar menggunakan konsorsium bakteri indigenous hidrokarbonoklastik

Setelah dilakukan sampling awal, masing-masing mikrokosmos diset sebagai berikut: mikrokosmos yang pertama digunakan sebagai kontrol yaitu tidak ditambah kultur bakteri dan tidak ditambah nutrisi (N,P, dan K), mikrokosmos kedua hanya ditambah nutrisi N, P, dan K dengan rasio optimum, mikrokosmos ketiga hanya ditambahkan kultur bakteri saja dengan jumlah optimum, dan mikrokosmos keempat ditambah nutrisi N, P, dan K dengan rasio sama dengan mikrokosmos kedua dan ditambah kultur bakteri dengan jumlah sama dengan mikrokosmos ketiga. Proses bioremediasi dimulai sejak ditambahkan kultur bakteri pada mikrokosmos. Selama proses bioremediasi semua unit mikrokosmos diaerasi menggunakan aerator dengan kecepatan udara yang sama. (Modifikasi: Lee, *et al.*, 1995; Margesin and Schinner, 2001).

4. Memantau kinerja bioremediasi selama satu siklus

Selama proses bioremediasi dilakukan pemantauan dengan melakukan pengukuran pH dan suhu serta sampling terhadap air dan tanah setiap minggu untuk dianalisis konsentrasi TPH, N total, P terlarut, K terlarut dan populasi bakteri. Satu siklus bioremediasi ditentukan berdasarkan konsentrasi TPH akhir yaitu sampai konsentrasi TPH mencapai kurang dari 1% (Kep Men KLH No. 128 tahun 2003).

4.1. Menentukan konsentrasi TPH air dan tanah

Sampel air diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 10 ml CH_2Cl_2 (diklorometan atau methylene chloride) dikocok dengan kuat dan disentrifugasi ($3000 \times g$ selama 10 menit) untuk mengendapkan pengotor dan air. Selanjutnya supernatan (fase pelarut) dipisahkan ke vial yang baru yang sudah diketahui beratnya (berat vial awal) lalu diuapkan dengan cara membiarkan selama 24 jam sampai tertinggal fraksi hidrokarbon dalam dinding vial (berat vial akhir). Penentuan TPH dalam air dilakukan sebagai berikut:

TPH (%) = $\frac{\text{gram berat awal akhir} - \text{berat awal}}{z} \times 100$ (Modifikasi Minai-Tehrani and Herfatmansesh, 2007).

Untuk mengetahui tingkat degradasi minyak bumi dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{Degradasi TPH (\%)} = \frac{\text{TPH awal} - \text{TPH akhir}}{\text{TPH awal}} \times 100\%$$

4.2. Menentukan N total

Ditimbang 0,5 g atau ml contoh, masukan ke dalam tabung ditambahkan 1 g campuran selen dan 3 ml asam sulfat pekat, didestruksi hingga suhu 350°C (3-4 jam). Destruksi selesai bila keluar uap putih dan didapat ekstrak jernih (sekitar 4 jam). Tabung diangkat, didinginkan dan kemudian ekstrak diencerkan dengan air bebas ion hingga tepat 50 ml, dikocok sampai homogen, dibiarkan semalam agar partikel mengendap. Dipipet ke dalam tabung reaksi masing-masing 2 ml ekstrak dan deret standar. Ditambahkan berturut-turut larutan Sanga Tartrat dan Na-fenat masing-masing sebanyak 4 ml, dikocok dan dibiarkan 10 menit. Ditambahkan 4 ml NaOCl 5 %, dikocok dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 636 nm setelah 10 menit sejak pemberian pereaksi ini. Catatan: Warna biru indofenol yang terbentuk kurang stabil. Upayakan agar diperoleh waktu yang sama antara pemberian pereaksi dan pengukuran untuk setiap deret standar dan contoh. (Sulaiman, dkk., 2005)

4.3. Menentukan P

Ditimbang 2,5 g atau ml contoh, ditambah pengestrak Bray dan Kurt I sebanyak 25 ml, kemudian dikocok selama 5 menit. Saring dan bila larutan keruh dikembalikan ke atas saringan semula (proses penyaringan maksimum 5 menit). Dipipet 2 ml ekstrak jernih ke dalam tabung reaksi. Contoh dan deret standar masing-masing ditambah pereaksi pewarna fosfat sebanyak 10 ml, dikocok dan dibiarkan 30 menit. Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 693 nm. Kadar P (ppm)

$$\begin{aligned} &= \text{ppm kurva} \times \text{ml ekstrak} / 1.000 \text{ ml} \times 1.000 \text{g/g contoh} \times \text{fp} \times 142/190 \times \text{fk} \\ &= \text{ppm kurva} \times 25/1.000 \times 1.000/2,5 \times \text{fp} \times 142/190 \times \text{fk} \\ &= \text{ppm kurva} \times 10 \times \text{fp} \times 142/190 \times \text{fk} \quad (\text{Sulaiman, dkk., 2005}) \end{aligned}$$

4.4. Menentukan K

Ditimbang 2,0 g atau ml contoh, dimasukkan ke dalam botol kocok dan ditambahkan 10 ml HCl 25% lalu kocok dengan mesin kocok selama 5 jam. Dimasukan ke dalam tabung reaksi dibiarkan semalam atau disentrifuse. Dipipet 0,5 ml ekstrak jernih contoh ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 9,5 ml air bebas ion (pengenceran 20x) dan dikocok. Dipipet 2 ml ekstrak contoh encer dan deret standar masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ekstrak contoh encer dan deret standar K diukur langsung dengan alat flamefotometer (Sulaiman, dkk., 2005)

4.5. Menentukan populasi bakteri

Sampel air dan tanah masing-masing diencerkan menggunakan medium *alkaline saline peptone water* (Oxoid CM1117B) sampai pengenceran 10^{-7} , selanjutnya pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} diambil 1 ml dan dituangkan ke dalam medium Nutrient Agar (CM0003B) lempeng dalam cawan petri steril. Diinkubasi pada suhu ruang selama 2 x 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung berdasarkan *Standard Plate Count* (Modifikasi Ayotamuno *et al.*, 2007).

5. Melakukan pengamatan terhadap pertumbuhan tanaman mangrove

5.1. Tinggi tanaman

Tinggi tanaman mangrove dapat dibedakan menjadi tinggi akar dan tinggi batang. Tinggi akar diukur menggunakan meteran mulai dari permukaan tanah (sedimen) sampai lipatan akar, sedangkan tinggi batang diukur mulai dari batas akar tertinggi sampai titik tumbuh batang. Tinggi tanaman diukur setiap minggu.

5.2. Jumlah daun

Jumlah daun diukur setiap minggu sampai berakhirnya waktu bioremediasi.

5.3. Kadar klorofil

Kadar klorofil daun diukur menggunakan alat klorofilmeter. Dari masing-masing tanaman diukur seluruh daun dan dari masing-masing daun diukur kadar klorofilnya pada 6 (enam) titik yang berbeda. Kadar klorofil diukur setiap minggu.

6. Analisis Data

Data konsentrasi TPH, N total, P terlarut, K terlarut, populasi bakteri, tinggi tanaman, jumlah daun, kadar klorofil dianalisis varian, jika terdapat perbedaan antar

perlakuan mikrokosmos dilanjutkan uji lanjut Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf nyata (α) 5%. Selanjutnya untuk mengetahui besarnya pengaruh masing-masing faktor yang menentukan proses bioremediasi yang meliputi populasi bakteri, K terlarut, P terlarut, dan N total terhadap konsentrasi TPH dilakukan analisis regresi multilinier dengan model $Y = aX_1 + bX_2 + cX_3 + dX_4$. Keterangan Y : konsentrasi TPH, X_1 : populasi bakteri, X_2 : K terlarut, X_3 : P terlarut, dan X_4 : N total, dan a, b, c dan d adalah koefisien regresi masing-masing variabel dependen X_1 , X_2 , X_3 , dan X_4 (Steel and Torrie, 1981). Data dianalisis menggunakan Program Statistics-6.

IV. HASIL PENELITIAN

A. Kemajuan penelitian yang telah dilakukan

Tahap-tahap penelitian yang sudah dilakukan meliputi:

1. Karakterisasi hutan mangrove yang tercemar minyak bumi.

Hasil karakterisasi hutan mangrove didapatkan jenis vegetasi yang tumbuh di hutan mangrove didominasi oleh genus *Rhizophora*, terutama *Rhizophora apiculata*. Konsentrasi TPH sebesar 0,44% , suhu 36°C, pH 5,79, salinitas 2 ‰, N total :0,36 ; P-Bray I :18,17 ; K-dd : 1,92

2. Pembuatan miniatur hutan mangrove (mikrokosmos) yang mempunyai karakter menyerupai hutan mangrove yang sebenarnya

Berdasarkan karakter hutan mangrove yang tercemar minyak bumi selanjutnya dibuat miniatur hutan mangrove di rumah kaca dengan faktor –faktor lingkungan yang memenuhi karakter yang mendekati hutan mangrove sebenarnya dan dilakukan pencemaran buatan berupa minyak bumi dengan kandungan minyak disesuaikan dengan pencemaran yang terjadi pada hutan mangrove sebenarnya.

Mikrokosmos yang dibuat sebanyak empat unit (Gambar 7), masing-masing unit dibuat menggunakan bak dari kaca dengan ukuran panjang 60 cm, lebar 50 cm dan tinggi 50 cm. Masing-masing unit diisi dengan tanah dan air dari hutan mangrove yang telah disesuaikan pHnya dengan pH air dan tanah di hutan mangrove. Selanjutnya ditanami bibit tanaman mangrove *Rhizophora apiculata*. Masing-masing unit ditunggu hingga tanaman yang

ditanam tumbuh dengan baik, jika ada tanaman yang mati dilakukan penanaman baru. Setelah kondisi mikrokosmos stabil yang ditandai tanaman mangrove tumbuh dengan baik, selanjutnya ditambahkan minyak mentah sebagai bahan pencemar sebanyak 5% (v/v), dibiarkan selama 24 jam. Dilakukan sampling awal air dan tanah untuk dianalisis TPH awal sebelum proses bioremediasi dimulai.



Gambar 7. Empat buah mikrokosmos yang dibuat

3. Melakukan proses bioremediasi pada miniature hutan mangrove yang telah dibuat tercemar menggunakan konsorsium bakteri indigenous hidrokarbonoklastik

Setelah dilakukan sampling awal, masing-masing mikrokosmos diset sebagai berikut: mikrokosmos yang pertama digunakan sebagai kontrol yaitu tidak ditambah kultur bakteri dan tidak ditambah nutrisi (N,P, dan K), mikrokosmos kedua hanya ditambah nutrisi N, P, dan K dengan rasio optimum, mikrokosmos ketiga hanya ditambahkan kultur bakteri saja dengan jumlah optimum, dan mikrokosmos keempat ditambah nutrisi N, P, dan K dengan rasio sama dengan mikrokosmos kedua dan ditambah kultur bakteri dengan jumlah sama dengan mikrokosmos ketiga (Gambar 8-11).



Gambar 8. Mikrokosmos Kontrol yang tidak ditambah N dan P maupun kultur bakteri (Mikrokosmos I)



Gambar 9. Mikrokosmos yang ditambah N dan P tetapi tidak ditambah kultur bakteri (Mikrokosmos II)



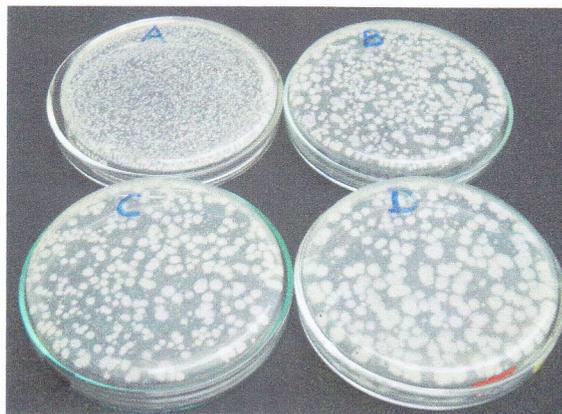
Gambar 10. Mikrokosmos yang tidak ditambah N dan P tetapi ditambah kultur bakteri (Mikrokosmos III)



Gambar 11. Mikrokosmos yang ditambah N dan P dan ditambah kultur bakteri (Mikrokosmos IV)

4. Memantau kinerja bioremediasi selama satu siklus

Selama proses bioremediasi dilakukan pemantauan dengan melakukan pengukuran pH dan suhu serta sampling terhadap air dan tanah setiap minggu untuk dianalisis konsentrasi TPH, N total, P terlarut, K terlarut dan Populasi bakteri (Gambar 12). Pengukuran parameter tersebut dilakukan seminggu sekali dan sampai dengan saat ini telah dilakukan tiga kali pengukuran parameter. Hasil lengkapnya disajikan pada Tabel 1-4.



Gambar 12. Hasil penghitungan jumlah total bakteri pada minggu I (A:Mikrokosmos I ; B:Mikrokosmos II; C:Mikrokosmos III ; D:Mikrokosmos IV)

5. Melakukan pengamatan terhadap pertumbuhan tanaman mangrove yang meliputi tinggi tanaman, jumlah daun, dan kadar klorofil (Gambar 13).



Gambar 13. pengukuran kadar klorofil daun mangrove menggunakan klorofilmeter

Tabel 1. Hasil pengukuran parameter selama pemantauan proses bioremediasi pada mikrokosmos I (Kontrol)

Parameter	Awal	Minggu I	Minggu II
TPH	5 %	*)	*)
N total	*)	*)	*)
P	*)	*)	*)
K	*)	*)	*)
Salinitas	*)	*)	*)
pH	*)	*)	*)
Jumlah total populasi bakteri	Kepadatan $1,2 \cdot 10^9$ cfu/mL	$1,3 \cdot 10^8$ cfu/ml	*)
Tinggi tanaman	32	32,45	32,45
Rerata jumlah daun	4,5	5	5,5
Kadar klorofil	73,50	73,88	72,85

Keterangan : *) sedang dianalisis

Tabel 2. Hasil pengukuran parameter selama pemantauan proses bioremediasi pada mikrokosmos II(Penambahan N dan P)

Parameter	Awal	Minggu I	Minggu II
TPH	5 %	*)	*)
N total	*)	*)	*)
P	*)	*)	*)
K	*)	*)	*)
Salinitas	*)	*)	*)
pH	*)	*)	*)
Jumlah total populasi bakteri	Kepadatan $1,2 \cdot 10^9$ cfu/mL	$1,8 \cdot 10^7$ cfu/ml	*)
Tinggi tanaman	28	29	29
Jumlah daun	4,5	4,5	3,75
Kadar klorofil	74,13	75,57	75,14

Keterangan : *) sedang dianalisis

Tabel 3. Hasil pengukuran parameter selama pemantauan proses bioremediasi pada mikrokosmos III(Penambahan kultur konsorsium bakteri)

Parameter yang diukur	Awal	Minggu I	Minggu II
TPH	5 %	*)	*)
N total	*)	*)	*)
P	*)	*)	*)
K	*)	*)	*)
Salinitas	*)	*)	*)
pH	*)	*)	*)
Jumlah total populasi bakteri	Kepadatan $1,2 \cdot 10^9$ cfu/mL	$1,1 \cdot 10^8$ cfu/mL	*)
Tinggi tanaman	28	29,05	29,05
Jumlah daun	3	3,5	5,25
Kadar klorofil	71,87	72,17	71,43

Keterangan : *) sedang dianalisis

Tabel 4. Hasil pengukuran parameter selama pemantauan proses bioremediasi pada mikrokosmos IV (Penambahan N dan P dan kultur konsorsium bakteri)

Parameter yang diukur	Awal	Minggu I	Minggu II
TPH	5 %	*)	*)
N total	*)	*)	*)
P	*)	*)	*)
K	*)	*)	*)
Salinitas	*)	*)	*)
pH	*)	*)	*)
Jumlah total populasi bakteri	Kepadatan $1,2 \cdot 10^9 / \text{mL}$	$7,5 \cdot 10^7 \text{ cfu/mL}$	*)
Tinggi tanaman	26,9	27,7	27,7
Jumlah daun	4	4	4
Kadar klorofil	68,96	70,57	69,70

Keterangan : *) sedang dianalisis

Rencana Penelitian berikutnya :

Melanjutkan pengamatan terhadap proses bioremediasi dan membuat model bioremediasinya.

Rencana Luaran : Artikel ilmiah yang akan dimuat di Jurnal terakreditasi