

BIOREMEDIASI TANAH TERKONTAMINASI HIDROKARBON MENGGUNAKAN TEKNIK BIOAUGMENTASI

Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soils Using Bioaugmentation Method

Radjali Amin¹⁾, F. Madubun²⁾, D. Rahyuni³⁾

¹⁾ Jl. Gedongkuning, Yogyakarta, 55198, Indonesia/Institut Teknologi Yogyakarta
e-mail: r.amin@ity.ac.id

²⁾ Jl. Pura Demak Barat nomor 31, Denpasar, 80119, Indonesia/ Institut Sains dan Teknologi
Nadhlatul Ulama Bali
e-mail: hw2191@gmail.com

³⁾ Jl. Gedongkuning, Yogyakarta, 55198, Indonesia/Institut Teknologi Yogyakarta
e-mail: dewirahyuni@gmail.com

Abstract

Among various bioremediation methods, bioaugmentation is the one which frequently used. In this study, bioaugmentation was conducted by utilising *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, and *Brevibacterium flavum*. Many studies on and implementations of this method have been conducted. However, this method still needed to be studied especially with reference to its implementations to small automotive workshops, which their number was increasing, as the sources of the soil contamination. The objective of this study was to identify the most effective bacteria in removing total hydrocarbon content (TPH) from contaminated soils and to understanding several characteristics of the method. Laboratory research was set up and the experimental design was complete randomised design (CRD) with three replications. Statistical test of Anova with α 5% was carried out to evaluate the results of the study. The treatments of this study were three species of bacteria which were inoculated separately into the contaminated soils. The parameters were TPH, pH and the density of bacteria consortiums. The highest effective removal of TPH was showed by *P. aeruginosa*, 64,1% ($\delta \pm 2,61\%$), followed by *B. flavum* and *B. cereus*. This treatment had pH dropped two points and the density of bacteria consortium increased 6-10 times. The main limitation of this study was the number of parameters which was a few resulting difficulties in understanding the hydrocarbon degradation processes. The results of this study may give significant contributions to managers of small automotive workshops in cities which currently are not managed their spills properly.

Keywords : *Bacillus*; biotechnology; *Brevibacterium*; microorganism; *Pseudomonas*

PENDAHULUAN

Keputusan Menteri (Kepmen) Lingkungan Hidup (LH) nomor 128 tahun 2003 tentang Tata Cara dan Persyaratan Teknis Pengelolaan Limbah Minyak Bumi dan Tanah Terkontaminasi oleh Minyak Bumi Secara Biologis, mensyaratkan bahwa limbah minyak bumi yang dihasilkan

merupakan limbah Bahan Berbahaya dan Beracun (B3) yang berpotensi menimbulkan pencemaran atau kerusakan lingkungan, oleh karena itu perlu dilakukan pengelolaan dengan baik. Kepmen LH ini juga menyebutkan metode bioremediasi tanah terkontaminasi hidrokarbon meliputi *landfarming*, *biopile* dan *composting*. Dari ketiga metode tersebut hanya *composting*

atau pengomposan yang akan diteliti di sini. Di dalam Kepmen LH ini juga dijelaskan ada dua komponen penting di dalam pengomposan yaitu bahan organik dan mikroorganisma. Bahan organik dapat berupa pupuk kandang, sisa tumbuhan atau seresah daun, serpihan kayu, dan kompos; sementara mikroorganisma dapat berupa bakteri.

Sejarah mencatat dengan jelas, penggunaan bakteri *Pseudomonas* sp. di dalam upaya bioremediasi lingkungan yang tercemar oleh karena tumpahan minyak dari kapal tanker Exxon Valdez di Alaska. Sebanyak 11 juta galon atau setara dengan 50 juta liter minyak mentah yang diangkutnya pada tahun 1989 tumpah ke laut dan sebagian terbawa ke pantai. Ini merupakan kejadian tumpahan minyak terparah ke lingkungan hingga saat ini. Proses remediasi lingkungan dengan penambahan inoculum bakteri, atau yang dikenal dengan istilah bioaugmentasi (Van Gestel, Mergaert, Swings, Coosemans, & Ryckeboer, 2003), terutama bakteri *Pseudomonas* sp. pada kasus kecelakaan lingkungan ini berhasil meremediasi lingkungan (Button, Robertson, McIntosh, & Jüttner, 1992) bahkan bakteri ini mampu mempercepat proses remediasi sebesar tiga kali lebih cepat daripada proses alami (Harvey, Elashvili, Valdes, Kamely, & Chakrabarty, 1990). Penelitian lebih lanjut terhadap komponen lingkungan abiotis yang dilakukan oleh Bragg, Prince, Harner, dan Atlas (1994) beberapa saat setelah kejadian itu juga menyimpulkan, salah satunya, adalah adanya peranan konsentrasi nitrogen di material terkontaminasi. Sementara Harvey *et al.* (1990) melihat peranan temperatur yang relatif tinggi, $\geq 30^{\circ}\text{C}$, sebagai faktor yang mempercepat proses bioremediasi.

Dari kasus pencemaran hidrokarbon di lingkungan yang besar, seperti kasus kapal tanker Exxon Valdez, kasus – kasus pencemaran hidrokarbon secara kecil-kecilan juga sering terjadi. Sedemikian

kecilnya dan atau seringnya sehingga menjadikan hal ini lumrah atau merupakan hal yang wajar dapat diterima. Praktek perbengkelan, utamanya bengkel-bengkel otomotif kecil seperti bengkel sepeda motor, semakin menjamur sejalan dengan semakin tingginya jumlah kendaraan bermotor roda dua. Biasanya pada bengkel-bengkel ini tumpahan hidrokarbon seperti oli (bekas) dan bensin dibiarkan begitu saja meresap ke dalam tanah. Bila hujan turun maka tumpahan ini akan terbawa di air permukaan masuk ke parit atau merembes ke dalam air tanah. Dari sinilah potensi pencemaran dan kerusakan lingkungan dapat berasal (Chen *et al.*, 2015; Khamforoush, Bijan-Manesh, & Hatami, 2013).

Hidrokarbon, seperti oli bekas dan bensin, adalah senyawa karsinogenik (Kim, Jahan, Kabir, & Brown, 2013; Prakash, Saxena, Sharma, Singh, & Singh, 2015) dan beracun bagi makhluk hidup (Hilpert, Mora, Ni, Rule, & Nachman, 2015). Dampaknya terhadap manusia mungkin tidak terjadi sesaat namun terjadi dalam jangka waktu yang relatif panjang atau lama bila waktu kontak dengan hidrokarbon kurang intensif (Udiharto, 2000). Sifatnya yang hidrofobik dan rekalsitran membuat ketersediaan nutrien atau hara bagi tumbuhan menjadi terikat atau tidak tersedia atau *unavailable* (Prakash *et al.*, 2015). Penelitian – penelitian yang membuktikan efek-efek negatif terhadap makhluk telah banyak dilaksanakan, beberapa dari mereka seperti penelitian yang dilaksanakan oleh Kisic, Jurisic, Durn, Mesic, dan Mesic (2010) yang menyimpulkan bahwa hidrokarbon mampu mengubah karakteristik kimia tanah sehingga berpengaruh terhadap kerapatan tanaman dan hasil panen beberapa palawija; penelitian yang dilaksanakan oleh Heipieper dan Martínez (2010) terhadap pengaruh hidrokarbon terhadap mikroorganisma mengkonfirmasi bawah hidrokarbon bersifat racun dan membunuh mikroorganisma atau menghambat aktivitas mikroorganisma (Hua & Wang, 2014). Hal

ini menjadi catatan penting di dalam penelitian ini karena di lain pihak penelitian ini akan menggunakan mikroorganisma untuk bioremediasi tanah terkontaminasi hidrokarbon; penelitian yang dilakukan oleh Kim et al. (2013) terhadap uap atau gas hidrokarbon terhadap manusia ternyata bersifat mutagenik dan karsinogenik.

Proses bioremediasi yang dilaksanakan oleh mikroorganisma terjadi dengan memanfaatkan proses fisiologis mikroorganisma yang terdapat secara indijen (Patowary, Patowary, Kalita, & Deka, 2016; Shekhar, Godheja, & Modi, 2015) atau yang ditambahkan atau diinokulasikan atau ditularkan ke dalam tanah yang akan diremediasi (Kavitha Ramadass, Megharaj, Venkateswarlu, & Naidu, 2018).

Ekosistem mempunyai kemampuan untuk memperbaiki dirinya sendiri melalui proses biofisik yang ada padanya sehingga ketika pencemaran terjadi, maka zat-zat pencemar dapat ternetralisasi sendiri, namun kemungkinan proses ini akan

membutuhkan waktu relatif lama. Oleh sebab itu, upaya mempercepat proses pemulihan lingkungan perlu dilakukan salah satunya adalah dengan penambahan mikroorganisma ke dalam media tercemar atau yang biasa dikenal dengan bioaugmentasi (Xu & Lu, 2010). Lebih jauh Xu dan Lu (2010) menyebutkan bahwa upaya pemanfaatan bakteri indijen di tanah terkontaminasi hidrokarbon terbukti telah berhasil menurunkan kandungan *total petroleum hydrocarbon* (TPH) sebesar 23,2% dalam waktu 4 minggu. Mikroorganisma, termasuk bakteri, yang ditemukan secara indijen di dalam tanah terkontaminasi dapat menguraikan hidrokarbon menjadi CO₂ dan H₂O sehingga tidak bersifat racun bagi bakteri (Prakash et al., 2015; Samanta, Singh, & Jain, 2002).

Penggunaan bakteri bioaugmentasi di dalam bioremediasi tanah terkontaminasi hidrokarbon telah marak diteliti (Bao et al., 2012) dan jenis bakteri yang telah digunakanpun beraneka (Tabel 1).

Tabel 1. Beberapa Jenis Bakteri yang Diteliti Untuk Bioremediasi Tanah Terkontaminasi Hidrokarbon

No.	Bakteri	Referensi
1.	<i>Pseudomonas</i> sp.	Button et al. (1992)
2.	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Sphingomonas</i> spp.	Bastiaens et al. (2000)
3.	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.	Kanaly dan Harayama (2000)
4.	<i>Neptunomonas naphthovorans</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Oceanospirillum linum</i> , <i>Vibrio splendidus</i> , <i>V. cyclotrophicus</i>	Hedlund dan Staley (2001)
5.	<i>Pseudomonas putida</i>	Samanta, Bhushan, dan Jain (2001)
6.	<i>Paracoccus</i> sp.	Xu dan Lu (2010)
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.	K Ramadass, Megharaj, Venkateswarlu, dan Naidu (2016)
8.	<i>Corynebacteria</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Actinobacillus</i>	Ubogu, Odokuma, dan Akponah (2019)
9.	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	Oyewole, Zobeashia, Oladoja, Musa, dan Terhempa (2020)
10	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. halotolerans</i>	Deng, Jiang, Chen, Gao, dan Liu (2020)

METODE PENELITIAN

Parameter tanah terkontaminasi di dalam penelitian ini yang dianalisis dan metode analisisnya disajikan seperti di dalam Tabel 2.

Tabel 2. Parameter dan Metode Analisisnya

Parameter	Satuan	Metode Analisis	Frekuensi
TPH	%	<i>Chromatography gas</i>	awal, akhir
C organik	mg/kg	SNI 13-4720-1998	awal
N total	mg/kg	SNI-472-1998	awal
P	mg/kg	Isric 6 th 2002	awal
Lengas	%	SNI 13-4719-1998	awal
pH	-	SNI 06-6989.11-2004	mingguan
Kerapatan bakteri	CFU/g	<i>Total Plate Count (TPC)</i>	awal, akhir

Penelitian dilaksanakan dalam skala laboratorium selama 30 hari atau satu bulan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan untuk masing-masing perlakuan. Hasil pengukuran dan atau analisis laboratorium kemudian dievaluasi dengan menggunakan metode statistik analisis varians (Anova) dengan α sebesar 5% Uji lanjutan Beda Nyata Terkecil (BNT) atau *Least Significant Difference (LSD)* test dengan α sebesar 5% akan dilakukan jika pada Anova ditemukan beda nyata antar perlakuan.

Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, dan *Brevibacterium flavum* yang inokulumnya didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi dan Pangan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sebelum diaplikasikan, bakteri-bakteri ini diencerkan berseri sebanyak 10^{-8} dengan tujuan untuk melepas mikroba dari substratnya sehingga lebih mudah dalam aplikasinya.

Penelitian yang dilakukan oleh Kavitha Ramadass et al. (2018) di Australia Selatan menggunakan tanah terkontaminasi hidrokarbon dari perbengkelan mobil dan mirip dengan ini, tanah terkontaminasi hidrokarbon di dalam penelitian ini diambil dari sebuah bengkel sepeda motor di Yogyakarta. Sebelum dilakukan penelitian, tanah dihomegenisasi dengan cara penyaringan dengan menggunakan saringan 2 mm. Setelah itu kondisi awal tanah terkontaminasi dianalisis parameter-parameternya: TPH, pH, lengas, C organik, N, P (Tabel 1) di laboratorium Balai Teknik Kesehatan Lingkungan (BTKL, sekarang menjadi Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit-BBTKLPP). Yogyakarta.

Tanah-tanah dan bahan penelitian lainnya dimasukkan ke dalam wadah yang kemudian disebut dengan reaktor dan ditempatkan pada ruangan dengan temperatur dan kelembaban yang terkendali 27°C ($\delta \pm 2^{\circ}\text{C}$) dan 85% ($\delta \pm 10\%$). Shekhar et al. (2015) menyebutkan temperatur optimal untuk pertumbuhan bakteri pengurai hidrokarbon berkisar antara 27°C sampai 37°C , walaupun masing-masing bakteri dapat mempunyai temperatur optimal spesifiknya, contohnya seperti *P. aeruginosa* pada 30°C dan *B. cereus* pada 40°C . Agar kelembaban terjaga, reaktor ditutup dengan plastik (Gambar 1).



Gambar 1. Beberapa Reaktor dan Alat Pengukur Kelembaban dan Temperatur di Dalam Penelitian

Perlakuan dengan kode perlakuan untuk masing-masing reaktor di dalam penelitian ini dapat dijelaskan :

1. R1 = Reaktor berisi 300 g tanah terkontaminasi hidrokarbon + inokulum bakteri *B. cereus* 10% (v/w)
2. R2 = Reaktor berisi 300 g tanah terkontaminasi hidrokarbon + inokulum bakteri *B. flavum* 10% (v/w)
3. R3 = Reaktor berisi 300 g tanah terkontaminasi hidrokarbon + inokulum bakteri *P. aeruginosa* 10% (v/w)
4. K = Reaktor kontrol, 300 g tanah terkontaminasi hidrokarbon tanpa penambahan bakteri

Efisiensi pengurangan (EP) TPH dihitung dengan menggunakan rumus (1) (Agarry & Jimoda, 2013).

$$EP\% = \frac{TPH_{awal} - TPH_{akhir}}{TPH_{awal}} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

EP : Efisiensi Pengurangan

Dinyatakan oleh Qian et al. (2014), (Kurniawan & Effendi, 2014) Nwankwegu dan Onwosi (2017) dan Agarry dan Jimoda (2013) bahwa pengurangan TPH dalam tanah karena proses bioremediasi biasanya akan mengikuti *first – order kinetic* dan untuk mengetahui kecepatan degradasi TPH tersebut akan dihitung dengan rumus *first – order kinetic* (2) (Jørgensen, Puustinen, & Suortti, 2000).

$$TPH_{akhir} = TPH_{awal} e^{-kt} \quad (2)$$

Keterangan:

e : bilangan alam

k : laju atau konstanta pengurangan TPH

t : lama pengukuran dalam hari

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Awal Bahan Penelitian

Bahan utama penelitian ini adalah tanah terkontaminasi hidrokarbon dengan

karakteristik seperti ditambihkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik Tanah Terkontaminasi Pada Kondisi Awal

No.	Parameter	Satuan	Tanah Terkontaminasi
1.	TPH	%	2,18
2.	C Organik	mg/kg	16.387,00
3.	N Total	mg/kg	616,25
4.	P	mg/kg	89,93
5.	Lengas	%	2,98
6.	pH	--	7,4

Sumber: Data Primer, 2019

Konsentrasi TPH di dalam tanah terkontaminasi sebesar 2,18% ini termasuk tinggi dengan memperhatikan Kempen LH nomor 128 tahun 2003 yang mensyaratkan jika konsentrasi TPH $\geq 1\%$ maka tanah terkontaminasi perlu dibioremediasi untuk menurunkannya, karena potensinya mencemari lingkungan.

Berdasarkan Petunjuk Teknis Evaluasi Kesuburan Tanah (PPT, 1995) kandungan C organik di dalam tanah terkontaminasi termasuk klasifikasi Rendah (10.000 – 20.000 mg/kg), dan sudah barang tentu akan menurunkan produktivas lahannya (Kisic et al., 2010).

Kavitha Ramadass et al. (2018) menyampaikan empat unsur utama yang dibutuhkan untuk menunjang proses bioremediasi yaitu C,N, P, dan K. Lebih lanjut, Leys, Bastiaens, Verstraete, dan Springael (2005), memberikan perbandingan optimal C, N, P untuk bioremediasai yaitu sebesar masing-masing 100:10:1. Selain daripada itu C/N rasio juga dapat digunakan untuk menilai optimalnya tidaknya suatu media untuk pertumbuhan bakteri dan makhluk hidup lainnya (Kavitha Ramadass et al., 2018). Rasio dari unsur-unsur tersebut yang terdapat di dalam tanah terkontaminasi ada di dalam Tabel 4.

Tabel 4. Rasio Unsur-unsur Utama yang Dibutuhkan oleh Bakteri di Dalam Bioremediasi

No.	Unsur	Rasio	
		Tanah Terkontaminasi	Standar*
1.	C	182,2	100,0
2.	N	6,9	10,0
3.	P	1,0	1,0
4.	C/N	26,6	>15,0**

* sumber dari Leys et al. (2005); ** sumber dari Wieczorek, Marchut-Mikolajczyk, dan Antczak (2015)

Dari Tabel 4 diketahui jika rasio N pada tanah terkontaminasi di bawah standar, maka dapat disesuaikan dengan penambahan unsur N yang berasal dari pupuk buatan seperti urea atau pupuk organik seperti kompos yang kaya akan unsur N. Penambahan bahan organik ke dalam media bioremediasi untuk mempercepat atau meningkatkan proses bioremediasi dikenal dengan istilah biostimulasi (Kavitha Ramadass et al., 2018; Van Gestel et al., 2003).

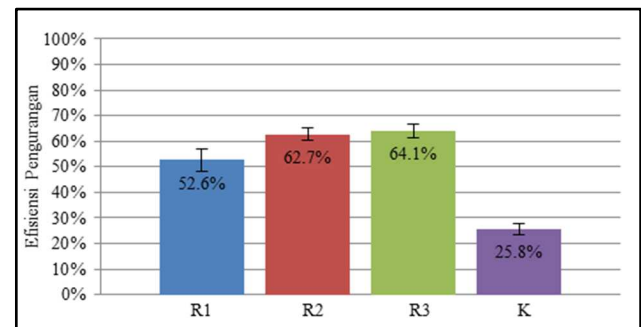
Karena toksitas hidrokarbon terhadap bakteri, maka semakin tinggi TPH akan menghambat proses bioremediasi (Shekhar et al., 2015), sehingga upaya penurunan TPH sebelum bioremediasi dilaksanakan adalah upaya yang tepat untuk meningkatkan efektivitas pengurangan TPH di dalam tanah terkontaminasi oleh bakteri. Shekhar et al. (2015) di dalam percobaan bioremediasinya menggunakan tiga tingkat TPH yang berbeda, 5%, 10%, dan 15%, dan menyimpulkan bahwa pada konsentrasi TPH terendah, 5%, bakteri memberikan kinerja yang paling optimal dibandingkan dengan konsentrasi – konsentrasi lainnya. Di dalam Proses bioremediasi dengan memanfaatkan bakteri membutuhkan pH media yang netral atau 7,0 (Deng et al., 2020; Patowary et al., 2016; Shekhar et al., 2015; Wieczorek et al., 2015) dan ini lebih rendah daripada pH tanah terkontaminasi, 7,4. Namun walaupun terlihat relatif tinggi

hal ini berlaku untuk bakteri-bakteri bioremediasi tertentu, misalnya *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *E. coli* justru optimal pertumbuhannya pada pH 7,5 (Shekhar et al., 2015). Karena penelitian ini menggunakan bakteri *P. aeruginosa* dan *B. cereus*, sementara itu pH tanah terkontaminasi mirip dengan pH optimalnya maka diharapkan penelitian bioremediasi ini dapat memberikan EP yang tinggi.

Memperhatikan hasil analisis tanah terkontaminasi pada tahap awal, dimana hanya N saja yang relatif lebih rendah dari standar maka diharapkan proses bioremediasi dengan teknik bioaugmentasi tidak mengalami kendala, lebih-lebih tanah ini mempunyai pH yang cocok dengan dua dari tiga bakteri yang akan dipakai.

Bioaugmentasi

EP TPH di dalam tanah terkontaminasi hidrokarbon melalui teknik bioaugmentasi pada akhir masa penelitian disajikan di dalam Gambar 2.



Gambar 2. Efisiensi Pengurangan TPH di Dalam Tanah Terkontaminasi oleh Bioaugmentasi dan Kontrol. Garis Vertikal adalah Nilai Standar Deviasi

Uji Anova menunjukkan bahwa nilai $P < 5\%$ sehingga ada beda yang nyata antara masing-masing perlakuan. Nilai BNT hasil uji lanjutan adalah 0,0308, sehingga dengan menjumlahkan nilai ini dengan nilai rerata

EP, dapat diketahui perlakuan mana yang berbeda satu dengan lainnya (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil Perhitungan dan Uji BNT

Perlakuan	Rerata	Rerata+BNT	Simbol
K	0.258	0.289	a
R1	0.526	0.557	b
R2	0.627	0.658	c
R3	0.641	0.671	cd

Pada Tabel 5 diketahui bahwa K berbeda secara nyata dengan semua perlakuan. Hanya perlakuan R2 dan R3 tidak berbeda secara nyata. Jika dilihat dari jenis bakterinya, maka EP bakteri *B. flavum* dan *P. aeruginosa* tidak berbeda secara nyata.

Pada lahan-lahan terkontaminasi hidrokarbon bakteri *B. cereus* dapat dengan mudah ditemukan secara *in-situ* atau bakteri indigen dan mampu memanfaatkan hidrokarbon di dalam tanah sebagai sumber carbon dan energi (Janaki, Thenmozhi, & Muthumari, 2016; Shekhar et al., 2015). Sedangkan di dalam menjalankan proses bioremediasinya, *B. cereus* memproduksi biosurfaktan (Janaki et al., 2016) dan jenis biosurfaktan yang dihasilkan adalah rhamnolipid (Patowary et al., 2016) yang termasuk di dalam kelompok glycolipid dan mengandung gula dan lemak (Renung Reningtyas & Mahreni, 2015).

Di dalam penelitian Patowary et al. (2016), konsorsium *B. pumilus* dan *B. cereus* mampu mendegradasi hingga 84,15% dalam waktu lima minggu dimana angka ini jauh lebih besar daripada hasil penelitian ini, 52,6% ($\delta \pm 5,53\%$), yang dilaksanakan selama kurang lebih empat minggu namun lebih tinggi daripada penelitian yang dilaksanakan oleh Shekhar et al. (2015) yang hanya mampu mendegradasi TPH sebesar 52% selama 15 hari.

B. flavum atau disebut juga *Corynebacterium glutamicum* (Forquin-Gomez, Weimer, Sorieul, Kalinowski, & Vallaeys, 2014) tidak banyak dikenal di dalam upaya bioremediasi tanah

terkontaminasi hidrokarbon, walaupun beberapa genus *Corynebacterium* mampu melakukannya seperti *C. venale* (Samanta et al., 2002), *C. pseudotuberculosis* (Ali, Dashti, Al-Mailem, Eliyas, & Radwan, 2012), *C. kutscheri* (Thavasi, Jayalakshmi, & Banat, 2011). *B. flavum* lebih terkenal di dalam bidang bioteknologi putih yaitu teknologi pemanfaatan mikroorganisma untuk bahan konsumsi sebagai bakteri pefermentasi. Beberapa contoh penelitian yang menggunakan *B. flavum* di bidang produksi makanan adalah seperti di dalam Tabel 6.

Tabel 6. Beberapa Penelitian *B. flavum* Untuk Produksi Makanan

No.	Produk Bioteknologi	Referensi
1.	Produksi L-valine untuk produk-produk makanan sehat	Huang, Zeng, Liang, Wu, dan Huang (2018)
2.	Produksi threonine untuk produk-produk makanan sehat	Andriiash, Zabolotna, Tkachenko, Blume Ya, dan Shulga (2015)
3.	Produksi lysine	(S Irshad, M Faisal, et al., 2015; S Irshad, AS Hashmi, et al., 2015; Shagufta Irshad et al., 2015; Tabassum et al., 2015)
4.	Produksi L-tryptophan untuk makanan sehat dan medis	Mohamed, El Nady, Ali, Abdel-Razik, dan Ibrahim (2018)

Dari beberapa hasil penelitian yang terbatas ini diketahui kalau proses bioremediasi tanah terkontaminasi hidrokarbon yang dilakukan oleh *B. flavum* sama seperti *B. cereus* dan *P. aeruginosa* yaitu dengan memproduksi biosurfaktan dan sangat toleran terhadap *anionic surfactant*, namun bersifat inhibitor terhadap *cationic surfactant*. Sifat ini berkebalikan dengan sifat *P. aeruginosa* terhadap surfaktan (Anaukwu et al., 2016).

Walaupun secara statistik, R2 dan R3 tidak berbeda secara nyata di dalam mendegradasi TPH, namun EP tertinggi didapat dari penerapan R3 yaitu bioaugmentasi dengan menggunakan bakteri *P. aeruginosa*, yaitu sebesar 64,1% ($\delta \pm 2,61\%$). Angka ini lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kavitha Ramadass et al. (2018) yang hanya mencapai sekitar 22%, namun tidak lebih tinggi daripada penelitian Shekhar et al. (2015) yang mampu mencapai 68%.

Sama seperti *B. cereus*, pada lahan-lahan terkontaminasi hidrokarbon, bakteri *P. aeruginosa* ditemukan secara *in-situ* atau merupakan bakteri indigen dan mampu memanfaatkan hidrokarbon di dalam tanah sebagai sumber carbon dan energi (Shekhar et al., 2015). *P. aeruginosa* sudah dikenal mempunyai kemampuan mendegradasi TPH di dalam tanah terkontaminasi (Das & Chandran, 2010; K Ramadass et al., 2016; Kavitha Ramadass et al., 2018). Dari proses pemanfaatan ini ada yang menghasilkan biosurfaktan (Manna Sahoo, Datta, & Biswas, 2011; Thavasi et al., 2011) dari tipe glycolipid (Das & Chandran, 2010; Sharma et al., 2015). Biosurfaktan ini mampu menurunkan hidrofobitas hidrokarbon sehingga nutrien dan hidrokarbon dapat terlepas dan menjadi tersedia bagi tumbuhan dan makhluk hidup lainnya (Anaukwu et al., 2016; Banat, Satpute, Cameotra, Patil, & Nyayanit, 2014; Franzetti, Di Gennaro, Bevilacqua, Papacchini, & Bestetti, 2006; Kavitha Ramadass et al., 2018).

Sensitifitas atau tingkat toleransi ketiga bakteri ini terhadap hidrokarbon menurut Zafra, Absalón, Cuevas, dan Cortés-Espinosa (2014), dari yang paling toleran ke kurang toleran adalah: *P. aeruginosa* > *B. flavum* > *B. cereus*. Dengan memahami tingkat toleransi ini maka dapat dipahami mengapa EP hidrokarbon oleh ketiga bakteri ini tidaklah sama, walaupun secara statistik tidak berbeda nyata, dan

berurutan sesuai dengan tingkat toleransinya. Dengan tingkat toleransi yang tinggi, *P. aeruginosa* lebih tahan terhadap TPH yang ada di dalam tanah sehingga proses degradasinya lebih tinggi daripada yang kurang toleran. Selain daripada sensitivitas bakteri, EP juga dapat dipengaruhi oleh TPH awalnya. Semakin tinggi TPH awal akan semakin kecil EP-nya, hal ini sejalan dengan sifat hidrokarbon yang bersifat toksik terhadap bakteri (Heipieper & Martínez, 2010; Hua & Wang, 2014; Wiczorek et al., 2015). Wiczorek et al. (2015) memberikan batasan 3%TPH adalah batas maksimal yang layak dibioremediasi secara langsung oleh bakteri.

Penurunan TPH secara alami, tanpa proses bioremediasi dicatat oleh Lee, Oh, dan Kim (2008) dapat terjadi sekitar 9%, oleh Kavitha Ramadass et al. (2018) sebesar 18%, namun di dalam penelitian ini lebih besar daripada itu yaitu mencapai 25,8% ($\delta +2,17\%$) dan lebih kecil daripada penelitian yang dilaksanakan oleh Deng et al. (2020) yaitu sebesar 26,6% dan Tuhuloula, Suprpto, Altway, dan Juliastuti (2019) yaitu sebesar 35%.

Laju Degradasi TPH

Nilai EP kadang belum bisa mencerminkan efektivitas pengurangan TPH secara nyata karena faktor waktu tidak diperhitungkan di dalam perhitungannya. Untuk itu, guna mengetahui nilai efektivitas yang lebih akurat maka dihitung laju degradasi (k) TPH dengan menggunakan rumus (2). Di dalam rumus ini, faktor waktu telah diperhitungkan. Laju degradasi (k) TPH pada penelitian ini dan beberapa penelitian yang lain disajikan di dalam Tabel 7.

Tabel 7. Laju Degradasi (k) TPH Berdasarkan Perlakuan

Referensi	Perlakuan/Bakteri	k ($\pm\delta$)
Penelitian ini	R1/ <i>B. cereus</i>	0,025 (\pm 0,0033)
	R2/ <i>B. flavum</i>	0,033 (\pm 0,0021)
	R3/ <i>P. aeruginosa</i>	0,034 (\pm 0,0025)
	Kontrol/Alami	0,010 (\pm 0,0010)
Shekhar et al. (2015)	<i>B. cereus</i>	0,049
Borah dan Yadav (2014)	<i>B. cereus</i>	0,039
Xu dan Lu (2010)	<i>Paracoccus</i> sp.	0,009
Patowary et al. (2016)	Konsorsium <i>B. pumilus</i> dan <i>B. cereus</i>	0,053
Tuhuloula et al. (2019)	Konsorsium <i>B. cereus</i> dan <i>P. putida</i>	0,047
Zam (2011)	Kontrol/Alami	0,020
	Konsorsium 10 bakteri indijen	0,076
	Kontrol/Alami	0,014

Nilai k di dalam penelitian ini (Tabel 7) kurang lebih sama dengan hasil – hasil penelitian lainnya yang dilaksanakan oleh para peneliti.

Proses bioremediasi terutama yang terjadi pada media yang terkontaminasi oleh berbagai jenis hidrokarbon akan lebih rumit dan biasanya membutuhkan kombinasi dari beberapa bakteri yang bekerja sama atau yang disebut dengan konsorsium bakteri (Nwankwegu & Onwosi, 2017; Patowary et al., 2016). Tabel 7 di atas menunjukkan fenomena itu, dimana beberapa nilai k atau laju degradasi pada konsorsium bakteri lebih besar daripada yang bukan konsorsium, dan Tabel 7 ini juga mengkonfirmasi kalau proses degradasi TPH secara alami selalu lebih lambat atau rendah dari pada bioaugmentasi.

Berkaitan dengan konsorsium bakteri dan berbagai jenis hidrokarbon yang

mengontaminasi tanah, berapa penelitian (Tabel 8) berhasil mengidentifikasi beberapa bakteri dan jenis hidrokarbon yang mampu diuraikannya atau *preferred* karena satu species bakteri mungkin mempunyai *preference* atau kemampuan mendegradasi hidrokarbon tertentu saja (Patowary et al., 2016).

Tabel 8. Beberapa Contoh Bakteri Dan Preference-nya Terhadap Jenis Hidrokarbon

Bakteri	Hidrokarbon	Preference	Ref.
1. <i>P. aeruginosa</i>	Bensin (<i>petrol</i>)	+++	Shekhar et al. (2015)
2. <i>B. cereus</i>		++	
<i>B. cereus</i>	1. Solar (<i>diesel</i>)	++++	Borah dan Yadav (2014)
	2. Minyak mentah (<i>crude oil</i>)	+++	
	3. Minyak tanah (<i>kerosene</i>)	++++	
	4. Oli mesin (<i>engine oil</i>)	+	

Keterangan: Semakin banyak + maka semakin *preferred*

Kerapatan Bakteri

Hasil perhitungan kerapatan ketiga bakteri pada awal dan akhir penelitian menunjukkan peningkatan seperti yang disajikan di dalam Tabel 9.

Tabel 9. Kerapatan Bakteri pada Tanah Terkontaminasi

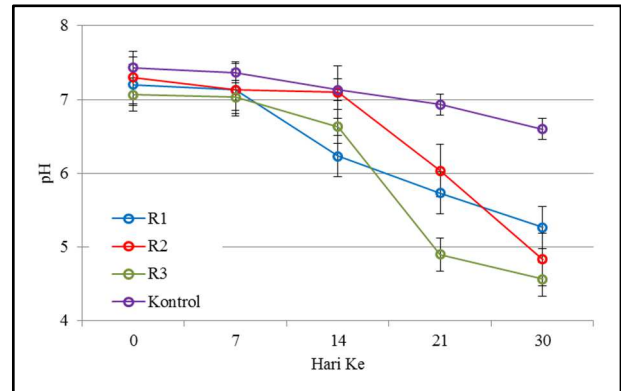
Perlakuan	Rerata TPC (CFU/g)		
	Sebelum	Sesudah	Perbedaan
R1	1,18 x 10 ⁷	1,18 x 10 ⁸	naik 10,0 x
R2	5,35 x 10 ⁶	6,58 x 10 ⁷	naik 12,3 x
R3	5,95 x 10 ⁶	3,90 x 10 ⁷	naik 6,6 x
K	3,50 x 10 ⁶	1,25 x 10 ⁷	naik 3,6 x

Kerapatan konsorsia bakteri di tanah terkontaminasi di dalam penelitian ini termasuk normal atau wajar. Jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Shekhar et al. (2015) di empat lahan terkontaminasi di India, dengan mengumpulkan 20 sampel tanah terkontaminasi, kisaran kerapatan konsorsia bakteri antara $2,58 \times 10^6$ CFU/g dan $4,26 \times 10^6$ CFU/g dengan nilai median sebesar $3,22 \times 10^6$ CFU/g.

Dalam waktu 30 hari, telah terjadi penambahan atau berkembang densitas populasi bakteri di dalam media berupa tanah terkontaminasi hidrokarbon yang besarnya kurang sekitar 10 x lebih besar daripada semula. Peningkatan kerapatan bakteri ini sebagai salah satu indikator bahwa ketiga bakteri ini dapat *survive* di dalam media terkontaminasi hidrokarbon. Hal ini seperti yang disampaikan oleh Wieczorek et al. (2015) yang memberikan batasan maksimal TPH yang aman bagi sebagian besar bakteri adalah 3%, sementara di dalam penelitian ini TPH awalnya adalah 2,18%. Efek toksisitas hidrokarbon yang mungkin terjadi pada bakteri, yang biasanya berupa pelarutan dinding sel bakteri yang terdiri dari protein (Samanta et al., 2002), dapat dikatakan tidak terjadi atau belum bersifat toksik terhadap ketiga bakteri ini. Namun demikian, kerapatan ketiga bakteri ini lebih kecil daripada penelitian yang dilakukan oleh Sarkar et al. (2017) yang dalam waktu empat minggu menemukan peningkatan densitas beberapa bakteri yang ditelitinya dan semula sebesar $\approx 10^6 - 10^7$ CFU/g menjadi $2,7 \times 10^9$ CFU/g atau meningkat sekitar 100 x lebih besar.

pH Tanah Terkontaminasi

Sejalan dengan proses bioremediasi, salah satu parameter reaktor yang diukur adalah pH yang hasilnya seperti disajikan di dalam Gambar 3.



Gambar 3. Nilai pH di Dalam Reaktor Bioremediasi dan Kontrol. Garis Vertikal adalah Nilai Standar Deviasi

Secara umum di dalam Gambar 3 dapat dilihat penurunan pH antara Kontrol dan Perlakuan yang lain lebih kecil. Penurunan pH Kontrol:R1:R2:R3 = 0,14:0,48:0,73:0,57. Kecenderungan ini sama dengan penelitian yang dilaksanakan oleh Zam (2011), dengan penurunan pH kontrol vs pH perlakuan = 0,12 vs 0,36.

Proses menurunnya pH ini memberikan indikasi telah terjadinya proses bioremediasi (Wieczorek et al., 2015) dan rendah pH-nya maka semakin besar EP-nya. Dijelaskan oleh Okerentugba dan Ezeronye (2003) bahwa penurunan ini disebabkan oleh proses degradasi hidrokarbon melalui proses hidrolisis yang menghasilkan banyak *volatile organic acid* (VOA) yang diikuti dengan konversi biologi menjadi asam. Secara khusus, Harayama, Kishira, Kasai, dan Shutsubo (1999) menyatakan bahwa penurunan pH di dalam proses bioremediasi, dari hidrokarbon yang didominasi oleh gugus *n-alkane* akan diuraikan oleh enzim oksigenase yang membentuk alkohol dan berakhir pada pembentukan aldehida dan asam lemak yang bersifat asam. Namun, hingga sampai seberapa rendah dan seberapa lama pH ini terus turun belum dapat dijabarkan di dalam penelitian ini. pH yang terlalu rendah pada akhirnya juga akan mempengaruhi bakteri dan proses bioremediasi (Wieczorek et al., 2015).

KESIMPULAN

Pencemaran lingkungan oleh tumpahan hidrokarbon yang banyak dan “biasa” terjadi di bengkel-bengkel otomotif kecil merupakan potensi pencemar lingkungan karena kurang atau tidak adanya upaya pengelolaan lingkungan oleh pengelola bengkel.

Penelitian ini menggunakan tanah terkontaminasi yang diambil dari bengkel otomotif kecil dan menunjukkan bahwa walaupun tanah terkontaminasi itu tidak dikelola, TPH-nya akan berkurang secara alami karena di dalamnya terdapat bakteri indigen yang mampu menguraikan hidrokarbon menjadi senyawa atau unsur yang lebih ramah lingkungan.

Pemulihan tanah terkontaminasi hidrokarbon secara alami dapat dipercepat dengan penambahan inokulum bakteri, yang dikenal dengan teknik bioaugmentasi. Teknik ini mudah dilaksanakan sehingga sumber pencemaran dari bengkel kecil dapat ditekan. Urutan hasil proses bioremediasi dari yang terbaik ke yang kurang baik adalah *P. aeruginosa* > *B. flavum* > *B. cereus*. EP tertinggi ditunjukkan oleh bakteri *P. aeruginosa* dengan persentase degradasi TPH sebesar 64,1% (δ +2,61%), terjadi penurunan pH sekitar 2 angka, dan peningkatan kerapatan bakteri sekitar 6-10 kali dari kerapatan awal bakteri.

Proses bioremediasi tanah terkontaminasi terjadi dengan ditandai penurunan pH tanah, namun hal ini masih perlu dikaji lebih lanjut, terutama di dalam memahami seberapa rendah dan lama pH ini turun.

Informasi bioremediasi oleh bakteri *B. flavum* atau *C. glutamicum* tidak terbilang rendah sehingga dapat direkomendasikan sebagai bakteri pengurai TPH yang cukup efektif. Sayangnya, ini tidak banyak ditemukan di dalam publikasi – publikasi ilmiah dibandingkan dengan bakteri *P. aeruginosa* dan *B. cereus* yang digunakan di dalam penelitian ini, sehingga hasil

penelitian ini telah memberikan kontribusi terhadap hasil dan data bioremediasi oleh *B. flavum*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada pengelola bengkel sepeda motor “Jaya Raya Motor”, Yogyakarta diucapkan terima kasih atas izinnya kepada para peneliti untuk menggunakan sebagian tanah terkontaminasinya untuk diteliti.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarry, S., & Jimoda, L. (2013). Application of Carbon-Nitrogen Supplementation from Plant and Animal Sources in In-situ Soil Bioremediation of Diesel Oil: Experimental Analysis and Kinetic Modelling.
- Ali, N., Dashti, N., Al-Mailem, D., Eliyas, M., & Radwan, S. (2012). Indigenous soil bacteria with the combined potential for hydrocarbon consumption and heavy metal resistance. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(3), 812-820.
- Anaukwu, C. G., Ezemba, C. C., Anakwenze, V. N., Agu, K. C., Nwankwegu, A. S., Okeke, B. C., & Awah, N. S. (2016). Influence of anionic, cationic and non-ionic surfactants on growth of hydrocarbon utilizing bacteria. *American Journal of Current Microbiology*, 4(1), 10-16.
- Andriyash, G., Zabolotna, G., Tkachenko, A., Blume Ya, B., & Shulga, S. (2015). Threonine synthesis of *Brevibacterium flavum* mutant strain. *Threonine: Food Sources, Functions and Health Benefits*, 1-26.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014).

- Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 697.
- Bao, M.-t., Wang, L.-n., Sun, P.-y., Cao, L.-x., Zou, J., & Li, Y.-m. (2012). Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Marine pollution bulletin*, 64(6), 1177-1185.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., & Diels, L. (2000). Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(5), 1834-1843.
- Borah, D., & Yadav, R. (2014). Biodegradation of complex hydrocarbon by a novel *Bacillus cereus* strain. *Journal of Environmental Science and Technology*, 7(3), 176-184.
- Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J., & Atlas, R. M. (1994). Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, 368(6470), 413-418.
- Button, D. K., Robertson, B. R., McIntosh, D., & Jüttner, F. (1992). Interactions between marine bacteria and dissolved-phase and beached hydrocarbons after the Exxon Valdez oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), 243-251. Retrieved from <https://aem.asm.org/content/aem/58/1/243.full.pdf>
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33(6), 745-755.
- Das, N., & Chandran, P. (2010). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- Deng, Z., Jiang, Y., Chen, K., Gao, F., & Liu, X. (2020). Petroleum Depletion Property and Microbial Community Shift After Bioremediation Using *Bacillus halotolerans* T-04 and *Bacillus cereus* 1-1. *Frontiers in Microbiology*, 11, 353.
- Forquin-Gomez, M.-P., Weimer, B. C., Sorieul, L., Kalinowski, J., & Vallaëys, T. (2014). The family Brevibacteriaceae. *Prokaryotes Actinobacteria*. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 141-153.
- Franzetti, A., Di Gennaro, P., Bevilacqua, A., Papacchini, M., & Bestetti, G. (2006). Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. *Chemosphere*, 62(9), 1474-1480.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., & Shutsubo, K. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 63-70.
- Harvey, S., Elashvili, I., Valdes, J. J., Kamely, D., & Chakrabarty, A. M. (1990). Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant. *Bio/Technology*, 8(3), 228-230. doi:10.1038/nbt0390-228
- Hedlund, B. P., & Staley, J. T. (2001). *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 61-66.
- Heipieper, H., & Martínez, P. (2010). Toxicity of hydrocarbons to

- microorganisms *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
- Hilpert, M., Mora, B. A., Ni, J., Rule, A. M., & Nachman, K. E. (2015). Hydrocarbon Release During Fuel Storage and Transfer at Gas Stations: Environmental and Health Effects. *Current Environmental Health Reports*, 2(4), 412-422. doi:10.1007/s40572-015-0074-8
- Hua, F., & Wang, H. Q. (2014). Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(2), 165-175. doi:10.1080/13102818.2014.906136
- Huang, Q.-G., Zeng, B.-D., Liang, L., Wu, S.-G., & Huang, J.-Z. (2018). Genome shuffling and high-throughput screening of *Brevibacterium flavum* MDV1 for enhanced L-valine production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(8), 121.
- Irshad, S., Faisal, M., Hashmi, A., Javed, M., Baber, M., Awan, A., & Anjum, A. (2015). Mass production and recovery of l-lysine by microbial fermentation using *Brevibacterium flavum*. *J Anim Plant Sci*, 25, 290-294.
- Irshad, S., Hashmi, A., Javed, M., Babar, M., Awan, A., & Anjum, A. (2015). Optimization Of Physico-Chemical Parameters For Hyper-Production Of Lysine By Mutated Strain Of *Brevibacterium flavum*. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 25(3), 784-791.
- Irshad, S., Hashmi, A. S., Babar, M. E., Awan, A. R., Javed, M. M., & Anjum, A. A. (2015). Bioconversion of Agricultural By-Products to Lysine by *Brevibacterium flavum* and Physico-Chemical Optimization for Hyper-production. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 37(2).
- Janaki, S., Thenmozhi, S., & Muthumari, R. (2016). A study on hydrocarbon degradation by biosurfactant producing *Bacillus cereus* in oil contaminated soil samples. *Int. J. Life Sci. Sci. Res*, 2, 324-332.
- Jørgensen, K., Puustinen, J., & Suortti, A.-M. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107(2), 245-254.
- Kanally, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of bacteriology*, 182(8), 2059-2067.
- Khamforoush, M., Bijan-Manesh, M.-J., & Hatami, T. (2013). Application of the Haug model for process design of petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation by composting process. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(3), 533-544.
- Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international*, 60, 71-80.
- Kisic, I., Jurisic, A., Durn, G., Mesic, H., & Mesic, S. (2010). Effects of hydrocarbons on temporal changes in soil and crops. *Afr. J. Agric. Res*, 5, 1821-1829.
- Kurniawan, A., & Effendi, A. J. (2014). Biodegradasi residu total petroleum hidrokarbon di bawah konsentrasi 1% (W/W) hasil proses bioremediasi. *J.Manusia Lingkungan*, 21(3), 9.
- Lee, S.-H., Oh, B.-I., & Kim, J.-g. (2008). Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity.

- Bioresource technology*, 99(7), 2578-2587.
- Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W., & Springael, D. (2005). Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(6), 726-736.
- Manna Sahoo, S., Datta, S., & Biswas, D. (2011). Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2, 32-36.
- Mohamed, H. B., El Nady, G. H., Ali, A., Abdel-Razik, A., & Ibrahim, S. (2018). Production Of L-Tryptophan By Mutants Of *Corynebacterium glutamicum*. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 26(Special issue (2A)), 1187-2018.
- Nwankwegu, A. S., & Onwosi, C. O. (2017). Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environmental Technology & Innovation*, 7, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eti.2016.11.003>
- Okerentugba, P., & Ezeronye, O. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2(9), 288-292.
- Oyewole, O., Zobeashia, S. L. T., Oladoja, O., Musa, I., & Terhemba, I. (2020). Isolation of bacteria from diesel contaminated soil for diesel remediation. *Journal of Bio-Science*, 28, 33-41.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an efficient bacterial consortium for the potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1092.
- PPT (1995). Petunjuk Teknis Evaluasi Kesuburan Tanah. *Laporan Teknis* No.14. Versi 1,0. 1. REP II Project, CSAR, Bogor
- Prakash, V., Saxena, S., Sharma, A., Singh, S., & Singh, S. K. (2015). Treatment of oil sludge contamination by composting. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6(3), 1.
- Qian, X., Shen, G., Wang, Z., Guo, C., Liu, Y., Lei, Z., & Zhang, Z. (2014). Co-composting of livestock manure with rice straw: Characterization and establishment of maturity evaluation system. *Waste Management*, 34(2), 530-535. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.007>
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2016). Soil bacterial strains with heavy metal resistance and high potential in degrading diesel oil and n-alkanes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(12), 2863-2874.
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of the Total Environment*, 636, 968-974. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.379>
- Renung Reningtyas, R., & Mahreni, M. (2015). Biosurfaktan. *Eksergi, Vol XII, No. 2. 2015*, 12(2), 12-22.
- Samanta, S., Bhushan, B., & Jain, R. (2001). Efficiency of naphthalene and salicylate degradation by a recombinant *Pseudomonas putida* mutant strain defective in glucose

- metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(5), 627-631.
- Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in biotechnology*, 20(6), 243-248.
- Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K., & Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource technology*, 242, 15-27.
- Sharma, D., Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Adgaba, N., Khan, K. A., Pruthi, V., & Al-Waili, N. (2015). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20 isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil and its physicochemical characterization. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17636-17643. doi:10.1007/s11356-015-4937-1
- Shekhar, S. K., Godheja, J., & Modi, D. (2015). Hydrocarbon bioremediation efficiency by five indigenous bacterial strains isolated from contaminated soils. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(3), 892-905.
- Tabassum, A., Hashmi, A. S., Masood, F., Iqbal, M. A., Tayyab, M., Nawab, A., . . . Mahmood, A. (2015). Bioconversion of agriculture waste to lysine with UV mutated strain of *brevibacterium flavum* and its biological evaluation in broiler chicks. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28(4).
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Banat, I. M. (2011). Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource technology*, 102(2), 772-778. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.099
- Tuhuloula, A., Suprpto, S., Altway, A., & Juliastuti, S. R. (2019). Biodegradation of Extractable Petroleum Hydrocarbons by Consortia *Bacillus cereus* and *Pseudomonas putida* in Petroleum Contaminated-Soil. *Indonesian Journal of Chemistry*, 19(2), 347-355.
- Ubogu, M., Odokuma, L. O., & Akponah, E. (2019). Autochthonous Microbial Bioaugmented Remediation of Crude Oil Contaminated Soil in the Niger Delta.
- Udiharto, M. (2000). Hubungan Antara Tingkat Toksisitas dan Hidrokarbon Aromatik yang Terkandung dalam Lumpur Pengeboran dan Bahan Dasarnya. *Lembaran Publikasi Lemigas*, 3, 3-8.
- Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., & Ryckeboer, J. (2003). Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*, 125(3), 361-368.
- Wieczorek, D., Marchut-Mikolajczyk, O., & Antczak, T. (2015). Changes in microbial dehydrogenase activity and pH during bioremediation of fuel contaminated soil. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 96(4).
- Xu, Y., & Lu, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of hazardous materials*, 183(1-3), 395-401.

- Zafra, G., Absalón, Á. E., Cuevas, M. D. C., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(2), 1826.
- Zam, S. I. (2011, 19 Februari 2011). *Bioremediasi Limbah Pengilangan Minyak Bumi Dengan Menggunakan Bakteri Indigen Secara Invitro (Invitro Bioremediation Of Oil Refinery Waste By Indigenous Bacteria)*. Paper presented at the Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa 2011, Surabaya.