



**PENGELOLAAN TANAH
TERCEMAR MINYAK SEBAGAI
MEDIA TANAM :
KAJIAN PERAN MULTISIMBIOSIS
ORGANISME**



Penerbit :
Absolute Media
Yogyakarta

Yuni Sri Rahayu

PENGELOLAAN TANAH TERCEMAR MINYAK SEBAGAI MEDIA TANAM : KAJIAN PERAN MULTISIMBIOSIS ORGANISME

Penerbit :



ABSOLUTE MEDIA

Yogyakarta

PENGELOLAAN TANAH TERCEMAR MINYAK SEBAGAI MEDIA TANAM : KAJIAN PERAN MULTISIMBIOSIS ORGANISME

Penulis :
Yuni Sri Rahayu

Editor :
Yuliani

Edisi Pertama, Cetakan Pertama
Desember 2019



Diterbitkan oleh :
Absolute Media
Yogyakarta

ISBN 978-602-492-040-1

ISBN



Hak cipta dilindungi oleh Undang-undang. Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan cara apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberi kekuatan, petunjuk dan kemudahan kepada kami sehingga buku monograf yang berjudul **Pengelolaan Tanah Tercemar Minyak Sebagai Media Tanam: Kajian Peran Multisimbiosis Organisme** dapat terselesaikan.

Buku monograf ini dapat digunakan sebagai referensi dan penunjang teori dalam berbagai mata kuliah terkait seperti Fisiologi Tumbuhan, Ilmu Hara, Ekofisiologi, dan Mikrobiologi. Selain itu buku monograf ini dapat digunakan sebagai referensi dalam menunjang pengelolaan lahan bekas eksplorasi minyak atau tanah-tanah yang tercemar minyak atau senyawa hidrokarbon dengan kadar yang tinggi, agar dapat dilakukan bioremediasi sehingga lahan tersebut dapat digunakan sebagai media tanam. Parameter pertumbuhan tanaman yang meningkat melalui kajian multisimbiosis dari berbagai organisme tanah dalam interaksinya dengan tumbuhan dalam meningkatkan ketersediaan unsur hara esensial dan menurunkan senyawa yang “merugikan” pertumbuhan tanaman menjadi bahan diskusi dan pembahasan khusus sehingga tanaman mampu bertahan dengan pertumbuhan yang baik.

Terima kasih kami haturkan kepada Universitas Negeri Surabaya yang telah memfasilitasi dalam bentuk penyediaan dana penelitian sehingga hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan buku monograf ini. Termasuk kepada semua pihak yang turut mendukung penyusunan buku monograf ini. Kami menyadari bahwa buku monograf ini masih jauh dari sempurna. Untuk itu, berbagai saran dan masukan sangat kami harapkan demi sempurnanya buku monograf ini sesuai dengan yang diharapkan.

Surabaya, Desember 2019

Penulis

RINGKASAN

Minyak bumi merupakan campuran kompleks hidrokarbon dengan senyawa organik oksigen, nitrogen, dan senyawa-senyawa logam seperti nikel, tembaga maupun besi. Kontaminasi minyak dapat menyebabkan masalah pada lingkungan karena senyawa minyak yang mengkontaminasi tanah dapat mengeluarkan senyawa toksik yang merusak tanah. Selain itu senyawa hidrokarbon yang terdapat pada minyak bumi dapat bersifat racun bagi manusia, hewan maupun tumbuhan. Salah satu upaya untuk memperbaiki tanah yang tercemar minyak yaitu melalui bioremediasi yang saat ini masih dianggap merupakan teknologi yang efektif untuk mentransformasikan komponen-komponen toksik menjadi produk-produk kurang toksik tanpa adanya gangguan terhadap lingkungan sekitarnya. Mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan dalam proses bioremediasi minyak bumi diantaranya yaitu mikoriza, bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, dan bakteri penambat N₂ melalui pemanfaatan multisimbiotik organisme dengan memanfaatkan tanaman Legum.

Pada simbiosis antara tanaman legum, bakteri bintil akar dan jamur mikoriza (simbiosis tripartit) masing-masing komponen simbiosis memiliki peranan yang berbeda. Tanaman berperan memberi fotosintat baik untuk bakteri *Rhizobium* dan jamur mikoriza, *Rhizobium* memberi N untuk tanaman melalui kegiatan fiksasi N, dan jamur mikoriza memberi P dan unsur hara lainnya untuk tanaman dan *Rhizobium*. Pola interaksi ini memberikan suatu informasi pola mekanisme hubungan simbiosis pada tanaman legum sehingga tanaman mampu bertahan pada kondisi lingkungannya.

Analog dengan pola simbiosis inilah yang akan diterapkan pada kajian yang mendasari pengelolaan tanah tercemar minyak bumi dalam penelitian ini yaitu diawali dengan proses pengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *indigenous* yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfat, mendegradasi

senyawa hidrokarbon, termasuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikoriza *indigenous* tanah tercemar minyak. Selanjutnya mengkaji bakteri dan mikoriza *indigenous* yang efektif “berperan” di tanah tercemar minyak. Kajian berikutnya digunakan untuk mengkaji pola interaksi antara bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, bakteri pelarut fosfat, bakteri rhizobium dan jamur mikoriza yang sudah diperoleh dari kajian berikutnya, melalui tanaman uji jenis Legum. Kajian ini menggunakan tanah yang termasuk area tercemar minyak di wilayah Bojonegoro dan di wilayah lumpur Lapindo Sidoarjo, yang memiliki cemaran minyak bumi.

Hasil kajian ini diharapkan dapat digunakan untuk menyusun model bioremediasi pada tanah tercemar minyak dengan menggunakan keuntungan yang diperoleh dari pola hubungan multisimbiosis antar organisme serta peran masing-masing simbiosis dalam pola hubungan tersebut sehingga tanaman uji tenggang terhadap tanah tercemar minyak. Selain itu, perlu diketahui bahwa selama ini penggunaan tanaman dalam proses bioremediasi tanah tercemar minyak khususnya di daratan jarang dilakukan. Oleh karena itu, dalam kajian ini dicari penjelasan tentang pola hubungan multisimbiotik pada tanaman Legum sebagai tanaman uji yang digunakan untuk menyusun model Bioremediasi tanah tercemar minyak. Model ini sangat berguna sebagai pijakan dalam mengelola tanah tercemar minyak agar dapat digunakan sebagai media tanam sehingga tanaman menjadi tenggang.

Spesies bakteri yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi pada tanah tercemar minyak adalah lima spesies bakteri, namun dari kelima spesies bakteri tersebut terdapat dua bakteri yang memiliki spesies yang sama, yaitu *Pseudomonas pseudomallei*. Oleh karena itu, dalam penelitian ini berhasil diisolasi dan diidentifikasi empat spesies bakteri yaitu *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas fluorescens-25*, *Flavobacterium odoratum*, dan *Enterococcus sp.* Bakteri *Pseudomonas fluorescens-25*, dan *Enterococcus sp.* merupakan bakteri yang efektif mendegradasi senyawa hidrokarbon, sedangkan

Flavobacterium odoratum, dan *Enterococcus sp.* merupakan bakteri yang efektif melarutkan fosfat.

Hasil eksplorasi mikoriza pada tanah tercemar minyak bumi didapatkan 7 tipe spora mikoriza yaitu *Glomus sp* (2 tipe spora), *Gigaspora sp* (3 tipe spora), *Acaulospora sp* (1 tipe spora) dan *Sclerocystis sp* (1 tipe spora). Tanaman yang dapat bersimbiosis dengan mikoriza pada tanah tercemar minyak bumi antara lain adalah *Stachytarpheta mutabilis*, *Lantana camara L*, *Imperata cylindrica L*, *Calotropis gigantea*, *Eupatorium odoratum L*, *Sida rhombifolia L* dan *Tectona grandis L*. Kepadatan spora tertinggi adalah pada tanah yang ditumbuhi tanaman *Sida rhombifolia*, yaitu 61 spora/50 g tanah.

Secara umum interaksi multisimbiosis organisme antara mikoriza, bakteri baik bakteri pelarut hidrokarbon maupun bakteri pelarut fosfat, maupun bakteri rhizobium dan tanaman Legum memberikan hasil yang secara positif menurunkan bahan organik pencemar minyak dengan ditunjukkannya terhadap penurunan *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH), peningkatan berbagai parameter pertumbuhan mikoriza, bakteri penambat N, dan tanaman dibandingkan dengan interaksi organisme coba yang hanya melibatkan tanaman dan mikoriza saja, ataupun bakteri saja. Data ini memberikan penguatan untuk merekomendasikan bahwa model bioremediasi yang disusun pada tanah tercemar minyak seharusnya melibatkan multisimbiotik organisme antara mikoriza, bakteri bakteri penambat N, bakteri pelarut fosfat, dan bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon *indigenous* dengan melibatkan tanaman Legum yang dijumpai di sekitar lingkungan sehingga tanaman memiliki potensi besar sebagai tanaman bioremediatory yang sudah teradaptasi dengan lingkungan yang tercemar minyak.

Berdasarkan hasil analisis dan model bioremediasi tanah tercemar minyak yang sudah disusun, maka pola pengelolaan tanah tercemar minyak yang diusulkan meliputi (1). Pemanfaatan mikroorganisme *indigenous* (bakteri dan mikorhiza) daerah tercemar minyak, (2). Pemanfaatan tanaman sebagai agen hayati memiliki peran penting keberhasilan bioremediasi tanah

tercemar minyak, yaitu tanaman yang memiliki potensi kemampuan sebagai bioremediator yang berasal dari daerah wilayah tercemar minyak, (3). Pengolahan struktur dan tekstur tanah berdasarkan sifat kimia dan fisika tanah yang memungkinkan berlangsungnya multisimbiosis organisme dapat menjalankan metabolisme dan fungsinya dengan baik sesuai peran masing-masing simbion, (4). Memanfaatkan peran simbiosis tripartite antara tanaman Legume, mikoriza, dan bakteri penambat N sehingga terjalin hubungan multisimbiotik organisme antara tanaman Legume, bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, mikoriza, bakteri penambat N. Sebagai konsekuensinya akan terjadi peningkatan proses degradasi senyawa hidrokarbon (akibat tercemar minyak) dan proses mineralisasi sehingga unsur-unsur esensial yang diperlukan tanaman akan tersedia bagi tanaman, melengkapi peran simbion dari mikoriza dan bakteri penambat N. Ketersediaan hara yang baik dan memadai bagi tanaman serta diturunkannya senyawa hidrokarbon yang melebihi ambang batas bagi tanaman akan menyebabkan keberhasilan pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Dengan demikian, pengelolaan tanah tercemar minyak dengan pendekatan yang menekankan interaksi peran yang baik antara tanaman dan organisme tanah akan menjadikan status hara tanaman juga terpelihara dengan baik mengingat media tanam juga mampu menyediakan unsur hara sesuai kebutuhan agar tanaman dapat tenggang dengan baik.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN.....	iv
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan	7
BAB II METODOLOGI PEMECAHAN MASALAH	8
A. Jenis Penelitian.....	8
B. Desain Penelitian	8
C. Tahap Pelaksanaan Penelitian	10
E. Analisis Data	20
BAB III KAJIAN TEORI MUTAKHIR.....	21
A. Mikoriza	21
B. Bakteri Pelarut Fosfat	24
C. Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon	27
D. Bakteri Rhizobium.....	32
E. Pertumbuhan Tanaman dan Tanah Tercemar Minyak	35
F. Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak	37

BAB IV PEMBAHASAN	40
A. Sifat Kimia dan Fisika Tanah Tercemar Minyak	40
B. Isolasi dan Identifikasi Bakteri dan Mikoriza	42
C. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Meningkatkan Ketersediaan Hara Esensial	60
D. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Menurunkan Kadar Total Petroleum Hydrocarbone (TPH)	66
E. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Pembentukan Bintil Akar dan Infeksi Mikoriza	70
F. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Pertumbuhan Tanaman Uji	71
G. Model Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak	77
BAB V SIMPULAN DAN REKOMENDASI	81
A. Simpulan	81
B. Rekomendasi	81
DAFTAR PUSTAKA	83
GLOSARIUM	101
INDEKS	104

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2.1	Rancangan Penelitian Tahap II..... 9
Tabel 2.2	Rancangan Penelitian untuk Tahap III..... 9
Tabel 4.1.	Analisis Sifat Kimia Tanah pada Cuplikan Tanah Tercemar Minyak.....40
Tabel 4.2.	Analisis Sifat Kimia Tanah pada Cuplikan Tanah Tercemar Minyak..... 41
Tabel 4.3.	Spesies bakteri hasil isolasi dari tanah tercemar minyak.....43
Tabel 4.4	Morfologi Koloni Bakteri pada Tanah tercemar Minyak44
Tabel 4.5	Pewarnaan gram pada kelima bakteri hasil isolasi dari tanah tercemar minyak 45
Tabel 4.6	Uji biokimia (fisiologi) isolat bakteri dari tanah tercemar minyak48
Tabel 4.7	Genus mikoriza yang bersimbiosis dengan tanaman di tanah tercemar minyak bumi..... 55
Tabel 4.8	Jumlah mikoriza tiap genus56
Tabel 4.9	Karakteristik morfologis mikoriza di tanah tercemar minyak bumi, Bojonegoro 56
Tabel 4.10	Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar P-tersedia Diukur Setelah Hari Ke-30 61
Tabel 4.11	Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar N Diukur Setelah Hari Ke-30 63

Tabel 4.12	Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap C/N Rasio Tanah Diukur Setelah Hari Ke-30	66
Tabel 4.13	Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar TPH Tanah Diukur Setelah Hari Ke-30	67
Tabel 4.14	Data Bintil Akar dan Persentase Mikoriza pada Tanaman Kedelai.....	70
Tabel 4.15	Hasil Uji Duncan pada Parameter Pertumbuhan Tanaman Kedelai	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 4.1. Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar P-tersedia Diukur Setelah Hari Ke-30	61
Gambar 4.2. Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar N Diukur Setelah Hari Ke-30	64
Gambar 4.3. Model bioremediasi tanah tercemar minyak dengan memanfaatkan pola multisimbiotik organisme.....	77

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Minyak bumi merupakan campuran kompleks hidrokarbon dengan senyawa organik oksigen, nitrogen, dan senyawa-senyawa logam seperti nikel, tembaga maupun besi (Eneh, 2011). Senyawa hidrokarbon yang terdapat pada minyak bumi dapat bersifat racun bagi manusia, hewan maupun tumbuhan (Pérez-Hernández *et al.*, 2016). Sifat fisik tanah (kadar air, batas cair dan plastik) terpengaruh karena kontaminasi minyak. Selain itu konduktivitas hidrolis relatif pada tanah tercemar minyak sebesar 0,57, sedangkan pada tanah yang tidak terkontaminasi memiliki konduktivitas hidrolis relatif sebesar 0,46. Hal ini menunjukkan bahwa konduktivitas hidrolis turun sebesar 10% karena kontaminasi minyak (Devatha *et al.*, 2019).

Kontaminasi minyak dapat menyebabkan masalah pada lingkungan karena senyawa minyak yang mengkontaminasi tanah dapat mengeluarkan senyawa toksik yang merusak tanah (Devata *et al.*, 2019). Kontaminasi minyak dapat disebabkan karena aktivitas pertambangan. Pada tanah bekas pertambangan memiliki kandungan unsur hara yang sangat rendah dan senyawa hidrokarbon yang sangat tinggi, maka tanah bekas pertambangan tersebut tidak dapat digunakan sebagai media bagi tanaman, sehingga tanah tersebut perlu diolah terlebih dahulu agar dapat dijadikan media tanam bagi tanaman (Wang *et al.*, 2018). Salah satunya adalah melalui bioremediasi yang dianggap merupakan teknologi yang efektif untuk mentransformasikan komponen-komponen toksik menjadi produk-produk kurang toksik tanpa adanya gangguan terhadap lingkungan sekitarnya.

Mikoriza merupakan hubungan simbiotik mutualisme antara sistem perakaran tanaman dengan

kelompok jamur tanah tertentu yang bersifat obligat (Wahid *et al.*, 2019). Interaksi antara tanaman inang dan mikoriza merupakan interaksi saling menguntungkan dimana mikoriza memperoleh sumber karbon yang berasal dari produk fotosintesis yang dilakukan oleh tumbuhan, sementara tumbuhan memperoleh bantuan atau kemudahan dalam penyerapan unsur hara tanah (Tran *et al.*, 2019). Jamur mikoriza arbuskular (AMF = *Arbuscular Mycorrhizal Fungi*) mampu meningkatkan deposisi karbon organik tanah melalui sekresi protein tanah terkait glomalin (*Glomalin-Related Soil Protein/GRSP*) dan modulasi partisi karbon tanaman (Zhang *et al.*, 2019).

Inokulasi mikoriza arbuskular (AM = *Arbuscular Mycorrhizae*) dapat menghasilkan respons positif, netral atau negatif pada pertumbuhan dan penyerapan nutrisi mineral tanaman inang, khususnya P, Zn, dan nutrisi mikro lainnya. Hal ini bergantung dengan jenis spesies mikoriza dan interaksi yang terjadi dengan tumbuhan inang. Namun secara umum, konsentrasi P, Cu, Zn dan S meningkat dengan inokulasi AMF (Tran *et al.*, 2019). Manfaat lainnya dari jamur mikoriza adalah meningkatkan resistensi tanaman inang terhadap patogen (misalnya Nematoda) (Baum *et al.*, 2015), perbaikan struktur tanah dan mencegah kehilangan nutrisi tanah (Bender *et al.*, 2015; Pellegrino *et al.*, 2015). Jamur mikoriza dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman karena kemampuannya untuk meningkatkan penyerapan unsur hara esensial yaitu fosfor (P), yang merupakan unsur hara makro yang diperlukan oleh tumbuhan dalam jumlah yang besar (Billah *et al.*, 2019).

Mengingat kemampuan jamur mikoriza dalam mengatasi keadaan lingkungan yang kurang menguntungkan (cekaman), termasuk kemampuan meningkatkan serapan hara baik hara makro maupun hara mikro ke tubuh tanaman, menjadikan pemanfaatan jamur mikoriza ini sebagai salah satu alternatif untuk meningkatkan ketahanan tanaman yang ditumbuhkan pada tanah tercemar minyak, yang selanjutnya lebih detil dapat digunakan untuk mengetahui mekanisme

ketenggangan tanaman yang toleran terhadap tanah tercemar minyak. Untuk jangka panjang, diketahuinya mekanisme ini dapat digunakan sebagai pencarian agen hayati yang dapat digunakan dalam proses bioremediasi pada tanah tercemar minyak. Apalagi penelitian terkait dengan peranan jamur mikoriza pada tanah tercemar minyak masih belum banyak diungkap termasuk diantaranya penggunaan tanaman uji dalam proses bioremediasi. Oleh karena itu, penggunaan tanaman uji dalam penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui tingkat kebermanfaatan tanah hasil bioremediasi melalui pemanfaatan berbagai jenis organisme yang memiliki sifat menguntungkan bagi tanaman agar ketenggangan tanaman dapat ditingkatkan.

Selain mikoriza, organisme yang mampu meningkatkan ketersediaan P adalah bakteri pelarut fosfat. Bakteri ini mempunyai kemampuan melarutkan P yang tidak larut dan menjadikan tersedia bagi tanaman dengan cara melarutkan asam-asam organik (Chen and Liu, 2019). Kadar P rata-rata di tanah kurang lebih berkisar 0,05% (w/w) dengan dua bentuk utama yaitu P anorganik (Pi) dan P organik (Po). Namun demikian, hanya 0,1% dari P yang bisa dimanfaatkan oleh tanaman, menjadikan P sebagai faktor pembatas untuk pertumbuhan tanaman (Lambers dan Plaxton, 2018). Dengan keberadaan bakteri pelarut fosfat maka dapat membantu tumbuhan untuk memenuhi kebutuhan unsur hara P. Pada umumnya bakteri pelarut fosfat dapat melarutkan P organik dengan melepaskan asam organik yang dapat berdampak pada penurunan pH yang dapat memicu pemutusan ikatan rantai P organik (Billah *et al.*, 2019).

Sementara itu, hidrokarbon di lingkungan dapat mengalami biodegradasi khususnya oleh bakteri dan jamur. Bakteri pendegradasi hidrokarbon minyak bumi dapat memanfaatkan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi yang digunakan untuk metabolisme bakteri (Xu *et al.*, 2018). Jalur degradasi hidrokarbon oleh bakteri menggunakan jalur oksidasi dengan memanfaatkan enzim.

Tremblay *et al.* (2017) melaporkan bahwa terdapat lebih dari 79 genus bakteri yang mampu mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Beberapa bakteri tersebut berasal dari genus *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, dan *Rhodococcus* (Ji *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2014; Varjani dan Upasani, 2016; Sarkar *et al.*, 2017; Varjani, 2017; Xu *et al.*, 2017).

Mengingat sifat yang menguntungkan pada bakteri dan jamur tertentu dalam meningkatkan ketersediaan P di tanah maupun yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon pada tanah tercemar minyak, menjadikan jenis mikroba ini layak untuk dilibatkan sebagai upaya mencari model bioremediasi tanah tercemar minyak bersama-sama dengan mikoriza dengan menggunakan tanaman uji. P yang banyak tersedia bagi tanaman akan menjadikan tanaman lebih bagus pertumbuhan dan ketahanannya. Hidrokarbon yang lebih terdegradasi akan menghasilkan mineral atau unsur hara yang dapat digunakan untuk pertumbuhan tanaman.

Tanaman legum merupakan tanaman unik karena mampu melakukan fiksasi N bebas dari udara melalui pemanfaatan bakteri bintil akar. Pada simbiosis antara tanaman legum, bakteri bintil akar dan jamur mikoriza (simbiosis tripartit) masing-masing komponen simbiosis memiliki peranan yang berbeda. Tanaman berperan memberi fotosintat baik untuk bakteri *Rhizobium* dan jamur mikoriza, *Rhizobium* memberi N untuk tanaman melalui kegiatan fiksasi N, dan jamur mikoriza memberi P dan unsur hara lainnya untuk tanaman dan *Rhizobium*. Pola interaksi ini memberikan suatu informasi pola mekanisme hubungan simbiosis pada tanaman legum sehingga tanaman mampu bertahan pada kondisi lingkungannya.

Analog dengan pola simbiosis inilah yang akan diterapkan pada kajian yang mendasari pengelolaan tanah tercemar minyak bumi dalam penelitian ini yaitu diawali dengan proses pengisolasi dan mengidentifikasi bakteri indigenous yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfat, mendegradasi senyawa hidrokarbon, termasuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikoriza *indigenous* tanah tercemar minyak. Selanjutnya mengkaji bakteri dan mikoriza *indigenous* yang paling efektif “berperan” di tanah tercemar minyak. Kajian berikutnya akan diteruskan untuk mengkaji pola interaksi antara bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, bakteri pelarut fosfat, bakteri rhizobium dan jamur mikoriza yang sudah diperoleh dari kajian berikutnya, melalui tanaman uji jenis Legum. Kajian ini menggunakan tanah yang termasuk area tercemar minyak di wilayah Bojonegoro dan di wilayah lumpur Lapindo Sidoarjo, yang memiliki cemaran minyak bumi.

Hasil kajian ini diharapkan dapat digunakan untuk menyusun model bioremediasi pada tanah tercemar minyak dengan menggunakan keuntungan yang diperoleh dari pola hubungan multisimbiosis antar organisme serta peran masing-masing simbiosis dalam pola hubungan tersebut sehingga tanaman uji tenggang terhadap tanah tercemar minyak. Selain itu, perlu diketahui bahwa selama ini penggunaan tanaman dalam proses bioremediasi tanah tercemar minyak khususnya di daratan jarang dilakukan. Oleh karena itu, dalam kajian ini dicari penjelasan tentang pola hubungan multisimbiotik pada tanaman Legum sebagai tanaman uji yang digunakan untuk menyusun model Bioremediasi tanah tercemar minyak. Model ini sangat berguna sebagai pijakan dalam mengelola tanah tercemar minyak agar dapat digunakan sebagai media tanam sehingga tanaman menjadi tenggang.

B. Rumusan Masalah

Untuk mengetahui bagaimana mengelola tanah tercemar minyak dengan memanfaatkan peranan mikroorganisme yang membangun hubungan multisimbiotik dengan tanaman Legum, maka perlu terlebih dahulu ditetapkan beberapa rumusan masalah yang nantinya informasi tersebut dapat digunakan untuk membangun model bioremediasi tanah tercemar minyak sebagai upaya pengelolaan tanah yang berbasis pemanfaatan multisimbiotik mikroorganisme. Rumusan masalah tersebut adalah sebagai berikut:

1. Spesies bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, dan mikoriza *indigenus* apa saja yang ditemukan pada tanah tercemar minyak?
2. Bagaimanakah efektifitas bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, bakteri pelarut fosfat, serta mikoriza *indigineous* yang ditemukan pada tanah tercemar minyak?
3. Bagaimanakah pertumbuhan tanaman Legum dengan memanfaatkan multisimbiosis atau interaksi antara bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, rhizobium dan mikoriza pada media tanam tanah tercemar minyak?
4. Bagaimanakah persentase infeksi mikoriza pada tanaman kedelai dengan kombinasi interaksi antara bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, rhizobium dan mikoriza pada media tanam tanah tercemar minyak?
5. Bagaimanakah pertumbuhan bintil akar efektif tanaman kedelai dengan kombinasi interaksi antara bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, rhizobium dan mikoriza pada media tanam tanah tercemar minyak?

6. Bagaimanakah kadar TPH pada tanaman kedelai dengan kombinasi interaksi antara bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, rhizobium dan mikoriza pada media tanam tanah tercemar minyak?

C. Tujuan

Berdasarkan jawaban dari rumusan masalah yang sudah dikemukakan, akan digunakan untuk menyusun model bioremediasi tanah tercemar minyak yang berbasis pemanfaatan multisingbiotik organisme dengan tanaman sebagai dasar untuk pengelolaan tanah tercemar minyak. Melalui model bioremediasi inilah akan digunakan sebagai dasar dalam mengelola tanah tercemar minyak agar tanah dapat digunakan sebagai media tanam dan tanaman yang hidup di atasnya dapat tenggang sehingga pertumbuhannya optimal.

BAB II

METODOLOGI PEMECAHAN MASALAH

A. Jenis dan Tahapan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu penelitian eksplorasi dan penelitian eksperimen. Dalam penelitian yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, dan mikoriza *indigenous* dilakukan secara eksplorasi yang selanjutnya disebut sebagai penelitian Tahap I. Sementara penelitian eksperimen dilakukan dengan melakukan pengamatan atau observasi terhadap hubungan kausal antara munculnya suatu akibat (variabel respons) dan sebab (variabel manipulasi) tertentu, melalui suatu upaya sengaja yang dilakukan oleh peneliti. Penelitian eksperimen dilakukan ketika bertujuan untuk mengetahui efektifitas bakteri yang sudah diisolasi dan diidentifikasi di Tahap I. Selanjutnya bakteri hasil dari penelitian Tahap II digunakan untuk mengetahui pola interaksi antara bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, rhizobium, dan mikoriza dalam mempengaruhi berbagai parameter pertumbuhan tanaman, yang selanjutnya disebut Penelitian Tahap III. Pada Tahap III ini, dilakukan uji efektifitas kombinasi organisme multisimbiotik terhadap berbagai parameter pertumbuhan yang sudah ditetapkan.

Berdasarkan serangkaian hasil penelitian ini akan disusun model bioremediasi tanah tercemar minyak berdasarkan peran masing-masing organisme dalam hubungan multisimbiotik, yang diharapkan akan digunakan sebagai pijakan dasar dalam mengelola tanah tercemar minyak untuk dijadikan sebagai media tanam sehingga tanaman yang ditanam akan tenggang yang diikuti dengan pertumbuhan yang juga akan optimal.

B. Desain Penelitian

Pada Tahap I yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi hidrokarbon, dan mikoriza *indigenous* yang ditemukan pada tanah tercemar minyak, dilakukan dengan metode eksplorasi.

Dilakukan dengan cara mengambil cuplikan sampel tanah tercemar minyak, mengisolasi jenis bakteri yang ada, mengidentifikasi spesiesnya dan menentukan isolate bakteri yang dominan. Hal yang sama dilakukan juga untuk identifikasi spora mikoriza yang berasal dari tanah tercemar minyak.

Pada Tahap II yang bertujuan untuk menemukan jenis organisme yang efektif untuk digunakan dalam bioremediasi tanah tercemar minyak digunakan rancangan penelitian acak lengkap dengan satu faktor yaitu faktor jenis organisme dengan tiga ulangan. Untuk memperjelas dibuat skema rancangan penelitian sebagai berikut (desain yang sama juga akan dilakukan untuk organisme yang lain):

Tabel 2.1 Rancangan Penelitian Tahap II

Jenis organisme	Ulangan		
	A1-1	A1-2	A1-3
Bakteri A1	A1-1	A1-2	A1-3
Bakteri A2	A2-1	A2-2	A2-3
Dst ...			

Pada Tahap III dilakukan kombinasi organisme yang efektif yaitu antara mikoriza- bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon – bakteri pelarut fosfat – rhizobium yang diujikan pada tanaman Legum (kedelai) sebagai tanaman uji yang ditumbuhkan pada tanah tercemar minyak. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak lengkap (RAL) pola satu faktor. Rancangan ini digunakan karena dalam penelitian ini dilakukan di laboratorium/*greenhouse* dengan asumsi lingkungan yang homogen. Faktor yang digunakan adalah kombinasi dari organisme coba yang akan diujikan pada tanaman legum dengan pengulangan tiga kali.

Tabel 2.2 Rancangan Penelitian untuk Tahap III

Jenis kombinasi organisme coba	Ulangan		
	1	2	3
Mikoriza (M)			
B.Pelarut Fosfat (BF)			
B.Pendegradasi hidrokarbon (BPH)			
Rhizobium (R)			
M-BF			
M-BPH			

Jenis kombinasi organisme coba	Ulangan		
	1	2	3
M-R			
BF-BPH			
BF-R			
BPH-R			
M-BF-BPH			
M-BPH-R			
M-BF-R			
BF-BPH-R			
M-BF-BPH-R			
Kontrol			

C. Tahap Pelaksanaan Penelitian

Prosedur Penelitian untuk isolasi dan identifikasi bakteri tanah tercemar minyak dirinci dalam langkah-langkah berikut:

1. Langkah Penelitian Tahap I

- a. Langkah Kerja untuk isolasi dan identifikasi bakteri
 - 1) Pengambilan Sampel
Sampel yang digunakan diambil dari tanah tercemar minyak yang berasal dari daerah sekitar pertambangan minyak di Bojonegoro dan tanah Lapindo Sidoarjo.
 - 2) Pembuatan Media Pembenihan
 - a) Media Modifikasi Czapek Broth
Diperoleh dengan cara melarutkan NaNO_3 2 g, KCL 0,5 g, MgSO_4 0,5 g, FeSO_4 0,01 g ke dalam akuades sebanyak 1000 ml, kemudian ditambahkan KH_2PO_4 0,35 g yang terlebih dahulu dilarutkan dengan sedikit akuades kemudian larutan dihomogenkan dan di ukur pH-nya dengan menggunakan pH meter. pH disesuaikan dengan cara menambahkan NaOH atau HCl 1 N, sehingga diperoleh larutan dengan pH 7. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam enlermeyer, selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C .
 - b) Media Mineral *Kaldu Nutrient Agar* (KNA)

Diperoleh dengan cara membuat ekstrak daging yaitu dengan memotong 1 kg daging kecil-kecil tanpa lemak dan mendidihkan dalam 1 liter air sampai volumenya tinggal separo. Kemudian diambil filtratnya dengan cara disaring. Menambahkan filtrate tersebut dengan aquades sampai volumenya 1000 ml, memasukkan kedalamnya 15 g agar-agar batangan, gula 500 g, memanaskan hingga mendidih hingga agar-agar larut. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C.

c) Isolasi Awal Sampel

Bakteri diisolasi dari tanah tercemar minyak dari daerah sekitar pertambangan minyak di Bojonegoro. 10 gram sampel tanah dimasukkan ke dalam 90 ml akuades steril, dan dihomogenkan. Kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi media Czapek Broth tanpa sukrosa dengan larutan Pb-asetat 0,393 ppm (dilakukan pengenceran), dan sampel tersebut diinkubasi pada suhu 30 °C selama 7 hari, sampel yang telah diinkubasi selama 7 hari diinokulasi dengan menggunakan metode tuang (*Pour plate method*) sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri yang berisi media KNA dan diinkubasi pada suhu 30 °C. Bakteri yang tumbuh diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi media KNA hingga didapatkan isolate murni. Koloni bakteri yang tumbuh diamati secara morfologi, pewarnaan gram dan uji fisiologis.

3) Identifikasi Isolat

Identifikasi isolat bakteri meliputi pengamatan makroskopis koloni isolate bakteri, pewarnaan gram pada sel bakteri dan uji fisiologi.

a) Pengamatan makroskopik koloni isolate bakteri meliputi: 1. Bentuk koloni, 2. Diameter

koloni, 3. Warna koloni, 4. Tepi koloni, 5. Elevasi.

b) Pewarnaan gram

Pewarnaan gram merupakan pengecatan bertingkat, yaitu pengecatan yang menggunakan lebih dari dua macam zat dan dilakukan secara bertahap untuk mengetahui bentuk dan jenis gram bakteri. Prosedur pelaksanaan:

- Mengambil 1-2 lup air steril pada gelas obyek steril, kemudian mengambil satu ose biakan secara aseptik dan meletakkan di atas kaca obyek dan diratakan.
- Tahap selanjutnya adalah memfiksasi kaca obyek yang berisi biakan di atas nyala api. Setelah gelas obyek kering, ditambahkan 2-3 tetes Kristal violet di atas kaca obyek dan didiamkan selama 1,5 menit. Kemudian kaca obyek di cuci dengan air mengalir dan dikering-anginkan. Setelah itu kaca obyek ditetesi iodine dan didiamkan selama 1,5 menit. Kaca obyek yang telah ditetesi dicuci dengan air mengalir dan dikering-anginkan.
- Tahap berikutnya adalah menambahkan larutan (Alkohol 95%) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikering-anginkan. Dan yang terakhir adalah menambahkan larutan safranin selama 1,5 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering-anginkan. Kemudian olesan diamati di bawah mikroskop.

4) Uji fisiologis

Uji fisiologis menggunakan *Microbact Identification System*, uji ini digunakan untuk mengetahui karakteristik fisiologis bakteri gram negatif, sehingga diketahui genus dan jenis bakteri. Format dalam bentuk test-strip atau microplate yang sederhana, hasil dengan jelas

terlihat sebagai reaksi-reaksi warna berbeda yang dapat diinterpretasikan menggunakan Microbact. Setiap kit terdiri dari 12 (12A, 12B) atau 24 (24E) miniatur tes biokimia. Identifikasi organisme didasarkan pada perubahan pH dan pemakaian substrate.

Prosedur:

- Mendapatkan suatu kultur murni bakteri tersangka berusia 18-24 jam
- Melakukan tes oksidase untuk menentukan pilihan kit yang akan dipakai
- Membuat suspensi bakter dengan melarutkan dalam saline (garam fisiologis)
- Menambahkan 100 μ l suspensi (4 tetes) suspensi ke setiap lubang kit
- Menambahkan mineral oil ke lubang-lubang yang berwarna hitam
- Menginkubasi pada suhu 35°C +/- 2°C selama 18/24 jam
- Memindahkan dari inkubator dan menambahkan reagen yang sesuai yaitu:
 - Nitrate reduction test (o-nitrophenyl- β -d-galactopyronoside (ONPG))
Diletakkan pada lubang 7(ONPG) setelah pembacaan ONPG reaksi, yaitu satu tetes nitrate reagen A dan nitrate reagen B.
 - 2 tetes reagen indole pada lubang 8 dibaca dalam 2 menit
 - Masing-masing 1 tetes reagen VP I dan VP II pada lubang 10 dibaca dalam 15-30 menit.
 - 1 tets reagent TDA pada lubang 12 dibaca seketika.
- Karakter fisiologis yang diuji yaitu: Oksidase, Motility, Nitrate, Lysine, Ornithine, H₂S, Glucose, Mannitol, Xylose, ONPG, Indole, Urease, V.P, Citrate, TDA, Gelatin, Malonate, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Sucrose, Lactose, Arabinose, Adonitol, Raffinose, Salicine, Arginine.

- Mencatat perubahan warna pada setiap lubang di kit setelah diinkubasi menggunakan chart warna yang disediakan dan menambahkan penjumlahan dari hasil positif untuk memberikan satu kode oktal.
- Memasukkan kode oktal ke dalam komputer dan menentukan identitas dari organisme menggunakan microbact software.
- Untuk menentukan identifikasi bakteri gram positif menggunakan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition* dan *Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria Third Edition*. Untuk menentukan identifikasi bakteri kita dengan bakteri yang sesungguhnya menggunakan rumus koefisien kesamaan yaitu:

$$\text{Koefisien kesamaan} = \frac{A}{A + B + C} \times 100\%$$

Keterangan:

A: Ciri positif untuk kedua galur

B: Ciri positif galur satu, ciri negatif galur dua

C: Ciri negatif galur satu, ciri positif galur dua

Data diperoleh melalui pengamatan yaitu dengan melakukan pengamatan secara morfologi koloni, pewarnaan gram dan karakteristik fisiologi rhizobakteri.

- b. Langkah Kerja untuk isolasi dan identifikasi mikoriza
- Pengambilan sampel berasal dari tanah tercemar minyak bumi di daerah Bojonegoro dan lumpur Lapindo Sidoarjo. Tanah diambil secara komposit pada kedalaman 0–20 cm. Faktor lingkungan yang diamati antara lain adalah pH tanah, suhu tanah, kelembapan tanah dan intensitas cahaya.
- Isolasi jamur mikoriza dilakukan dengan teknik mengekstrak spora dengan cara tuang saring yakni dengan mencampurkan tanah sampel sebanyak

50 g dengan 500 ml air dan diaduk sampai butiran-butiran tanah tersuspensi, kemudian disaring dalam satu set saringan dengan nomor mesh 10, 20, 40, 60, 80, 100. Tanah yang diambil adalah tanah yang ada pada saringan 20 dan 40. Teknik tuang saring tersebut kemudian dilanjutkan dengan teknik sentrifugasi dan hasil saringan kemudian ditambahkan aquades sampai 30 ml kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Diambil pelet kemudian ditambahkan sukrosa 80% sebanyak 15 ml, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2000 rpm selama 1 menit. Supernatan dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop (Faiza *et al.*, 2013).

Untuk mengetahui simbiosis MVA pada tanaman naungan dilakukan pewarnaan dengan menggunakan pewarna *Lactofenol trypan blue* 0,05% pada akar tanaman tersebut. Spora yang telah diperoleh dari tanah tercemar minyak bumi kemudian dihitung kepadatan spora dengan menghitung banyaknya spora yang ditemukan tiap 50 g tanah.

2. Langkah Penelitian Tahap II

a. Tahap Persiapan Penelitian

1) Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan disterilisasi antara lain tabung reaksi dan Erlenmeyer. Tabung reaksi dan Erlenmeyer disumbat dengan kapas pada mulutnya. Sebelum disterilisasi alat-alat tersebut dibungkus menggunakan kertas payung (kertas coklat). Sterilisasi dilakukan menggunakan oven pada 160°C selama 2 jam. Selang kecil yang menghubungkan aerator dan Erlenmeyer di sterilkan menggunakan 3 tutup bayclin yang di larutkan dalam 3 liter air.

2) Membuat kaldu nutrient cair

Untuk membuat kaldu nutrient cair dengan melarutkan *beef extract* 100 gram, pepton 5 gram

kedalam 1 liter aquades. Setelah homogen, suspensi ini di isikan ke dalam tabung reaksi sebanyak 7-9 ml dan Erlenmeyer sebanyak 100 ml. Kemudian ditutup dengan kapas serapat mungkin dan ditutup lagi menggunakan aluminium foil. Setelah itu semua medium tersebut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

- 3) Perbanyakkan bakteri pada medium cair
Sebelum melakukan pengenceran bakteri terlebih dahulu harus dibiakkan pada medium kaldu nutrient cair di erlenmeyer dengan teknik aseptik dan diinkubasi selama 48 jam. Pemiakan dimaksudkan untuk menghasilkan jumlah bakteri lebih banyak.
- 4) Perbanyakkan bakteri pada medium cair
 - a) Perhitungan konsentrasi sel bakteri
Apabila suspensi terlalu pekat maka dapat di encerkan secara seri (*dilution method*). Pehitungan jumlah sel bakteri dengan *haemocytometer* (Hadioetomo, 1993).

b. Persiapan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah pada lapisan 0-25 cm, dicampur secara homogen dan dianalisis kadar TPH, N, P C, dan K pada awal penelitian.

c. Tahap Pelaksanaan Penelitian

- 1) Isolat bakteri yang tumbuh pada kaldu nutrien dihitung populasinya secara langsung menggunakan *haemocytometer*, hingga diperoleh jumlah selnya 10^7 sel/ml.
- 2) Disiapkan erlenmeyer berukuran 250 ml diisi tanah sebanyak 100 gram. Erlenmeyer yang berisi sampel tanah tersebut disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 2 jam.

- 3) Ditambahkan ke dalamnya 5 ml urea 0,05% gram/volume. Selanjutnya diisi dengan akuades steril sebanyak 100 ml dan diaduk rata.
- 4) Inokulum yang sudah siap diinokulasikan ke masing-masing erlenmeyer yang berisi tanah. Adapun kontrol dilakukan dengan penambahan akuades steril. Setiap langkah kerja di atas dilakukan pada *Laminar Air Flow*.
- 5) Agar terjadi aerasi, 16 sampel dalam erlenmeyer tersebut diberi aerator. Udara yang masuk ke dalam erlenmeyer disterilkan terlebih dulu menggunakan larutan $KMnO_4$.
- 6) Beberapa parameter yang diamati yaitu *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH), suhu dan pH (dengan pH meter), kelembaban tanah menggunakan soil tester pada awal dan akhir penelitian.
- 7) Pada hari terakhir penelitian (hari ke-30), masing-masing tanah diambil 100 gram kemudian diujikan kadar TPH, kadar unsur hara P, N dan C/N rasio.

3. Langkah Penelitian Tahap III

Variabel penelitian yang digunakan dalam penelitian Tahap III ketika menguji kombinasi multisimbiotik organisme meliputi:

- a. Variabel Eksperimen adalah :
Jenis kombinasi multisimbiotik organisme
- b. Variabel Respon adalah:
Kadar Total Petroleum Hidrokarbon (TPH) di tanah dan tanaman, kadar P dan N tersedia, dan C/N ratio, persentase infeksi mikoriza, jumlah bintil akar efektif, pertumbuhan tanaman legum (biomassa tanaman).

Variabel penelitian dan definisi operasional variabel penelitian pada Tahap III adalah:

- a. Bakteri pendegradasi hidrokarbon adalah bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak Bojonegoro yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon paling

tinggi yang diperoleh dari hasil penelitian tahap kedua, yaitu *Pseudomonas fluorescens-25*.

- b. Bakteri pelarut fosfat adalah bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak Bojonegoro yang mampu melarutkan fosfat sehingga ketersediaan fosfat di tanah paling tinggi peningkatannya, yang diperoleh dari hasil penelitian tahap kedua, yaitu *Flavobacterium odoratum*.
- c. Mikoriza adalah spora jamur mikoriza yang diisolasi dari tanah tercemar minyak yang sudah diperoleh dari penelitian sebelumnya, yaitu *Glomus moseae*.
- d. Rhizobium adalah bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak Bojonegoro yang mampu memfiksasi N bebas dari udara, yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya, yaitu *Rhizobium japonicum*.
- e. Kombinasi organisme coba adalah kombinasi antara organisme coba (bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, mikoriza, dan rhizobium) yang dikombinasikan untuk mengetahui efektivitasnya dalam meningkatkan ketenggangan tanaman kedelai yang ditanam pada tanah tercemar minyak.
- f. Efektivitas kombinasi organisme coba adalah kemampuan kombinasi organisme coba dalam menurunkan kadar TPH tanah, meningkatkan ketersediaan hara N dan P dalam tanah serta menurunkan C/N rasio tanah. Semakin tinggi kemampuan kombinasi organisme coba dalam menurunkan TPH dan meningkatkan ketersediaan hara N dan P, maka dapat dikatakan semakin efektif.
- g. Kadar TPH adalah kadar TPH tanah yang dinyatakan dalam satuan ppm, diukur pada saat awal dan akhir penelitian dengan metode Gravimetri.
- h. Kadar P adalah kadar P total dalam tanah yang dinyatakan dalam %, diukur pada saat awal dan akhir penelitian dengan Spectrophotometer UV-VIS.
- i. Kadar N adalah kadar N total tanah yang dinyatakan dalam %, diukur pada saat awal dan akhir penelitian dengan metode Kjeldahl.

D. Analisis Data

Pada tahap pertama dilakukan analisis data penelitian secara deskriptif, sedangkan pada tahap kedua untuk mengetahui bakteri yang efektif, dilakukan dengan uji T yang dilengkapi dengan analisis secara deskriptif. Pada tahap ketiga dilakukan ANAVA satu arah yang dilanjutkan dengan DMRT dan dilengkapi dengan analisis deskriptif kualitatif.

BAB III

KAJIAN TEORI MUTAHIR

A. Mikoriza

Mikoriza merupakan interaksi berupa simbiosis mutualisme yang saling menguntungkan antara jamur dan akar tumbuhan spermatophyta (Chairul *et al.*, 2019). Dalam hal ini tumbuhan menyediakan senyawa karbon berupa glukosa hasil fotosintesis yang digunakan jamur sebagai bahan respirasi, sedangkan jamur menyediakan mineral yang penting bagi tumbuhan (Jacquemyn and Merckx, 2019).

Jamur mikoriza merupakan kelompok jamur endofit obligat (filum Mucoromycota, subfilum Glomeromycotina) yang membentuk simbiosis dengan sebagian besar tumbuhan darat (Spatafora *et al.*, 2016). Interaksi antara jamur mikoriza dan akar tumbuhan memiliki dampak positif dimana jamur mikoriza dapat meningkatkan serapan hara tanaman, mengurangi stres abiotik tanaman (Auge' *et al.*, 2016) dan meningkatkan resistensi tumbuhan terhadap patogen (Jung *et al.*, 2012).

Jamur Arbuskular Mikoriza (*Arbuscular Mycorrhizal Fungi* = AMF) umumnya dikenal sebagai pupuk hayati. Inokulasi AMF dapat meningkatkan toleransi tanaman inang terhadap berbagai situasi yang kurang menguntungkan atau cekaman seperti salinitas, logam berat, kekeringan, dan suhu ekstrem. AMF, sebagai simbion akar alami, menyediakan nutrisi anorganik bagi tanaman, sehingga meningkatkan pertumbuhan dan hasil panen dalam kondisi cekaman. Peran AMF sebagai pupuk hayati berpotensi memperkuat kemampuan adaptasi tanaman terhadap perubahan lingkungan (Begum *et al.*, 2019). Respons tumbuhan terhadap jamur mikoriza berbeda-beda bergantung pada jenis tumbuhan inang (Tran *et al.*, 2019).

Liang *et al.*, (2018) melaporkan bahwa jamur mikoriza dapat memicu pertumbuhan dari *Phragmites*

australis. Mikoriza secara signifikan memiliki efek positif terhadap peningkatan massa dan jumlah daun serta pertumbuhan *Phragmites australis*. Bernoula dan Stout (2019) menyelidiki efek inokulasi dengan jamur mikoriza pada tanaman padi di dua tanah yang berbeda kondisi yaitu pada kondisi rumah kaca dan pertanian biasa (sawah). Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa inokulasi dengan jamur mikoriza meningkatkan kolonisasi akar baik di tanah dengan kondisi *green house* maupun pertanian biasa (sawah), terlepas dari ketersediaan P tanah. Selain dampak positif mikoriza pada pertumbuhan tanaman, ternyata mikoriza juga memiliki efek negatif yaitu mikoriza juga meningkatkan kepadatan larva kumbang air beras pemakan akar dan pertumbuhan larva ulat grayak pemakan daun.

Pada umumnya mikoriza lebih banyak ditemukan pada daratan kering daripada daratan basah seperti rawa-rawa. Hal ini disebabkan karena mikoriza memiliki peluang bertahan hidup yang lebih rendah pada daratan basah yang disebabkan karena kondisi anaerob pada daratan basah. Namun pada penelitian Xu *et al.*, (2016) menunjukkan bahwa mikoriza dapat tumbuh dan berkembang serta berasosiasi dengan tanaman yang berhabitat di daratan basah. Mikoriza dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman darat karena mikoriza dapat meningkatkan penyerapan unsur hara tanah oleh akar terutama pada lingkungan yang kekurangan (miskin) unsur hara seperti pada tanah tercemar minyak (Tarraf *et al.*, 2017).

Jamur mikoriza memfasilitasi tanaman inang untuk dapat tumbuh di bawah cekaman lingkungan dengan memediasi serangkaian komunikasi seluler kompleks antara sel tumbuhan dan jamur mikoriza yang mengarah ke peningkatan laju fotosintesis dan sifat-sifat terkait pertukaran gas lainnya serta peningkatan penyerapan air (Birhane *et al.*, 2012). Lebih lanjut, jamur mikoriza dapat mempengaruhi fiksasi CO₂ oleh tanaman inang dengan meningkatkan "efek sink" sehingga meningkatkan laju pergerakan fotoassimilasi dari bagian udara ke akar (Begum *et al.*, 2019).

Pada kondisi cekaman P (kadar P yang tersedia rendah), asosiasi antara tanaman dengan mikoriza meningkatkan ketersediaan P pada tumbuhan inang. Garcés-Ruiz *et al.*, (2017) melaporkan bahwa mikoriza meningkatkan laju penyerapan unsur P pada tumbuhan jagung. Selain itu simbiosis antara mikoriza dan tanaman inang secara positif dapat meningkatkan konsentrasi unsur hara N, P, dan Fe pada *Pelargonium graveolens* L. yang tumbuh pada kondisi cekaman air (kekeringan) (Amiri *et al.*, 2017). Selain itu inokulasi mikoriza juga meningkatkan kadar P dan N pada jaringan tumbuhan *Chrysanthemum morifolium* (Wang *et al.*, 2018) dan meningkatkan berat kecambah dengan meningkatkan kadar air, kadar CO₂ sel, kadar P dan N pada tumbuhan *Leymus chinensis* (Jixiang *et al.*, 2017).

Nwoko (2014) melakukan penelitian untuk mendeskripsikan pengaruh jamur mikoriza terhadap kinerja *Phaseolus vulgaris* di bawah tanah yang terkontaminasi minyak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang diinokulasi dengan mikoriza secara signifikan memiliki kandungan klorofil yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman non mikoriza. Selain itu *total petroleum hydrocarbon* (TPH) pada tanah tercemar minyak menurun dari kondisi awal setelah diberi perlakuan dengan mikoriza. Hal ini menunjukkan adanya penguraian hidrokarbon yang dipicu oleh peranan mikoriza.

Garcés-Ruiz *et al.*, (2018) meneliti komunitas mikoriza yang dapat hidup dan berasosiasi dengan tanaman-tanaman yang berhabitat di wilayah terkontaminasi minyak. Berdasarkan hasil investigasi tersebut diperoleh 15 (lima belas) spesies mikoriza terdeteksi. *Acaulospora* merupakan mikoriza yang paling banyak ditemukan dengan persentase kelimpahan 73%, dan sisanya yaitu *Archaeospora* (19.6%) dan beberapa kelompok dari genera *Glomeraceae* (*Rhizophagus*, *Glomus*, *Sclerocystis*, *Dominikia* dan *Kamienskia*).

B. Bakteri Pelarut Fosfat

Fosfat (P) merupakan unsur hara makro yang penting bagi tumbuhan terkait dengan fungsi penting P sebagai unsur penyusun *Adenosine Tri-Phosphate* (ATP) yang berperan dalam metabolisme tumbuhan. Pada dasarnya total jumlah P dalam tanah cukup tinggi, namun sayangnya jumlah P yang tersedia untuk tumbuhan tergolong rendah, hanya 0,01 hingga 0,2 mg/kg tanah (Handayanto dan Hairiah, 2007). Oleh karena itu, dibutuhkan proses pemecahan P kompleks tanah menjadi P yang tersedia bagi tumbuhan.

Bakteri pelarut fosfat merupakan bakteri yang dapat melarutkan P menjadi P yang sifatnya dapat diserap oleh akar tumbuhan (*Available phosphate*/P yang tersedia). Arfarita *et al.* (2017) melaporkan bahwa *Pseudomonas plecoglossicida* merupakan salah satu bakteri yang dapat berperan sebagai pelarut P. Bakteri tersebut memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai biofertilizer. Pelarutan P oleh bakteri pelarut fosfat melalui reaksi antara asam organik yang dikeluarkan dari bahan-bahan organik dengan pengikat P seperti Al, Fe, dan Ca, atau Mg untuk membentuk *chelate* organik yang stabil untuk membebaskan ion P yang terikat (Gupta *et al.*, 2012).

Identifikasi bakteri pelarut fosfat dapat dilakukan dengan menggunakan *bromocresol green* pada suhu 37°C selama 12 hari sebagai indikator untuk pewarna bakteri pelarut fosfat. Pada bakteri yang berwarna hijau pada perlakuan *bromocresol green* ditetapkan sebagai bakteri pelarut fosfat, selain itu karakteristik lain bakteri pelarut fosfat yaitu membentuk zona bening (*halo zone/ clear zone*) pada media pertumbuhan. Untuk memastikan apakah isolat yang diuji adalah pelarut fosfat, maka bakteri akan ditumbuhkan pada media cair yang mengandung asetilena. Bakteri yang dapat melarutkan P akan menurunkan kadar asetilena pada media pertumbuhan (Girigiri *et al.*, 2019).

Bahan potensial sebagai sumber isolat bakteri pelarut fosfat dapat diperoleh dari kompos. Penggunaan kompos

sebagai sumber isolat bakteri pelarut fosfat memiliki fungsi ganda, yaitu sebagai sumber bahan organik tanah dan sebagai sumber energi dan pembawa untuk bakteri pelarut fosfat yang sesuai. Atekan *et al.* (2014) melaporkan bahwa isolasi bakteri pelarut fosfat dari kompos limbah tebu secara kuantitatif dan kualitatif sangat potensial dalam melarutkan P dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ di media Pikovskaya. Secara umum, peningkatan kelarutan P berkorelasi linier dengan penurunan pH media.

Bakteri pelarut fosfat telah banyak diterapkan pada bidang pertanian untuk memfasilitasi penyerapan unsur hara tanaman dan mencegah adanya penyakit tanaman (Khan *et al.*, 2013). Lin *et al.*, (2018) melaporkan bahwa bakteri pelarut fosfat dapat meningkatkan efisiensi fitoremediasi tumbuhan *W. trilobita* pada tanah yang tercemar logam yaitu tembaga (Cu). Bakteri pelarut fosfat juga memiliki efek positif terhadap mikroflora tanah untuk meningkatkan kualitas tanah yang kemudian dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman *W. trilobita* pada tanah yang tercemar tembaga. Seiring dengan peningkatan pertumbuhan tanaman *W. trilobita* maka terjadi peningkatan penyerapan Cu oleh *W. trilobita* sebagai agen fitoremediasi.

Bakteri pelarut fosfat sendiri dapat dibagi menjadi dua kelas: (1) Mikroorganisme pelarutan P_i yang mengeluarkan asam organik untuk melarutkan senyawa P_i dan (2) Mikroorganisme mikro yang mengeluarkan fosfatase untuk melarutkan senyawa P organik yang dimetabolisme secara enzimatik. Penerapan kedua kelas bakteri pelarut fosfat tersebut dalam tanah menurunkan pH tanah dan membentuk kompleks P anorganik di sekitar rizosfer tanaman, akibatnya meningkatkan pasokan P yang tersedia untuk tanaman dan hal ini akan memperkuat aktivitas mikroorganisme menguntungkan lainnya, seperti *Rhizobium* dan *Trichoderma*. Aplikasi ini mempromosikan penyerapan unsur hara tanah (Chen and Liu, 2019).

Mikroorganisme tanah dalam hal ini secara umum telah ditemukan lebih efektif dalam membuat P tersedia untuk tanaman dari sumber anorganik dan organik melalui proses pelarutan dan mineralisasi senyawa P kompleks (Khan *et al.*, 2014). Dari berbagai strategi yang diadopsi oleh mikroba, keterlibatan asam organik yang memiliki massa molekul rendah yang disekresikan oleh mikroorganisme telah menjadi teori yang diakui dan diterima secara luas sebagai sarana utama pelarutan P (Marra *et al.*, 2012). Di lingkungan alami atau dalam kondisi *in vitro*, ion mineral *chelate* atau pH yang rendah (asam) dapat memicu pelarutan P. Akibatnya, pengasaman sel mikroba dan sekitarnya menyebabkan pelepasan ion P dari mineral P oleh substitusi H⁺ untuk Ca²⁺ (Khan *et al.*, 2014). Bakteri pelarut fosfat ditemukan menghasilkan asam seperti asam asetat, asam format (asam monokarboksilat); laktat, glukonat, glikolat (hidroksi asam monokarboksilat); 2-keto glukonat (asam keto monokarboksilat); oksalat, suksinat (asam dikarboksilat); malic (asam hidroksi dikarboksilik); dan sitrat (asam hidroksi trikarboksilik) dalam media cair (Prabhu *et al.*, 2019).

Mekanisme utama pelarutan P oleh bakteri adalah melalui pengasaman. Selama proses pengasaman, senyawa organik yang dikeluarkan oleh bakteri pelarut fosfat dapat menurunkan tingkat keasaman dari 7.0 ke 2.0. Di antara asam-asam organik, asam glukonat merupakan asam yang sering dihasilkan oleh bakteri pelarut fosfat. Asam glukonat terutama diproduksi bakteri oleh enzim glukosa dehidrogenase dalam jalur oksidasi langsung glukosa (Suleman *et al.*, 2018). Selain itu, produksi simultan asam organik yang berbeda oleh strain bakteri pelarut fosfat dapat berkontribusi pada potensi yang lebih besar untuk pelarutan Pi.

Selain berperan dalam pelarutan P, bakteri pelarut fosfat juga memiliki peran positif lain bagi tumbuhan. Bakteri pelarut fosfat seperti Gram-negatif *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* dan *Chromobacterium violaceum* juga mampu mengeluarkan antibiotik dan memberikan perlindungan bagi

tanaman terhadap patogen yang ditularkan melalui tanah. Selain itu beberapa bakteri pelarut fosfat seperti *Pseudomonas putida* memiliki kemampuan untuk mensintesis enzim kunci yaitu *1-aminocyclopropane-1-carboxylate* (ACC) deaminase yang menghidrolisis ACC menjadi NH₃ dan α-ketobutirat dan dengan demikian mengurangi efek penghambatan dari etilen (C₂H₄) (Khan *et al.*, 2014).

Hubungan simbiosis antara bakteri pelarut fosfat dan tanaman bersifat sinergis karena bakteri memberikan P yang tersedia bagi tanaman dan tanaman memasok senyawa karbon (terutama gula), yang dapat dimetabolisme untuk pertumbuhan bakteri. Bakteri telah dilaporkan melarutkan P di bawah pengaruh tekanan abiotik seperti kekeringan, pH rendah atau tinggi, salinitas, dan suhu (Vassilev *et al.*, 2012). Chen *et al.*, (2019) melaporkan bahwa ko-inokulasi bakteri pelarut fosfat dengan bakteri pemfiksasi nitrogen lebih efektif dalam pelarutan P serta peningkatan pertumbuhan tanaman pada kondisi cekaman lingkungan dibandingkan dengan hanya inokulasi tunggal. Pada kondisi tanah yang tercemar minyak bumi, bakteri pelarut fosfat dapat menurunkan kadar TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*) hingga sampai 92,1 % penurunan TPH dibandingkan dengan kondisi awal (Girigiri *et al.*, 2019).

C. Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Hidrokarbon merupakan senyawa kimia yang berdampak negatif bagi lingkungan dan kesehatan manusia. Hidrokarbon minyak menjadi masalah lingkungan karena pencemaran hidrokarbon yang semakin meluas menyebabkan gangguan fungsi lingkungan terutama air dan tanah. Untungnya, tidak seperti organisme tingkat tinggi, beberapa bakteri memiliki kapasitas katabolik untuk menggunakan minyak bumi hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi. Bakteri tersebut dikenal dengan bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon (Al-Hawash *et al.*, 2018).

Sebagian besar hidrokarbon minyak bumi yang ditemui di lingkungan dapat terdegradasi oleh bakteri yang secara alami terdapat pada wilayah yang terkontaminasi minyak bumi. Bakteri tersebut dapat hidup di lingkungan yang terkontaminasi minyak bumi karena bakteri tersebut dapat memanfaatkan karbon yang diperoleh dari pemecahan hidrokarbon untuk keperluan pertumbuhan dan reproduksi. Bakteri tersebut dikenal dengan bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon (Kleindienst *et al.*, 2015)

Bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon merupakan kelompok bakteri yang dapat memecah senyawa hidrokarbon. Bakteri memiliki potensial yang besar untuk meningkatkan kandungan unsur hara yang tersedia bagi tumbuhan yang hidup pada tanah tercemar senyawa hidrokarbon. Pawlik *et al.* (2017) melakukan penelitian untuk karakterisasi bakteri endofit yang mendegradasi senyawa hidrokarbon yang berasosiasi dengan tumbuhan *Lotus corniculatus* L. dan *Oenothera biennis* L. Bakteri tersebut diisolasi dari daerah yang tercemar minyak bumi atau senyawa hidrokarbon. Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil bahwa mayoritas bakteri pelarut hidrokarbon yang dikarakterisasi berasal dari genus *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, dan *Rhodococcus*. Lebih dari 90% dari total isolat dapat tumbuh dalam medium dengan minyak diesel. Beberapa bakteri pelarut fosfat tersebut dapat menggunakan n-heksadekana sebagai sumber karbon dan energinya.

Mikroorganisme memainkan peran katalitik dalam degradasi limbah minyak (Das dan Chandran, 2011). *Pseudomonas* sp. adalah bakteri hidrokarbonoklastik yang secara alami memiliki kemampuan memecah senyawa hidrokarbon dengan memutus rantai karbon (Mansur *et al.*, 2014). *Pseudomonas* sp. juga memiliki kemampuan untuk melarutkan unsur P sehingga menjadi P tersedia di tanah (Yasser *et al.*, 2014; Sarker *et al.*, 2014) dan dengan demikian dapat dimanfaatkan untuk tumbuhan dalam melakukan metabolisme sel. Jangim *et al.*, (2013) melaporkan bahwa

Pseudomonas sp. juga memiliki kemampuan untuk melakukan denitrifikasi dan melepas nitrogen bebas ke atmosfer. Banyak studi bioremediasi telah membuktikan bahwa *Pseudomonas* sp. dapat memecah rantai senyawa hidrokarbon (Fathepure, 2014; Sharma *et al.*, 2014), yang merupakan komponen utama minyak tetapi sulit untuk memecah *Hidrokarbon Poli Aromatik* (PAH) yang memiliki struktur ikatan yang lebih kuat.

Studi terbaru telah mengidentifikasi bakteri dari lebih dari 79 genera yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak bumi (Tremblay *et al.*, 2017); beberapa bakteri tersebut seperti *Acromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, dan *Streptobacillus* (Sarkar *et al.*, 2017).

Bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon dapat memecah ikatan rantai hidrokarbon pada kondisi aerob maupun anaerob bergantung pada jenis bakteri dan kondisi lingkungan. Bakteri aerob pendegradasi senyawa hidrokarbon dapat melakukan katabolisme hidrokarbon alifatik dengan memutus ikatan rantai hidrokarbon melalui reaksi hidroksilasi yang melibatkan enzim monooksigenase (Das and Chandran, 2011). Hasil hidroksilasi tersebut kemudian memasuki jalur metabolisme perifer dari sel bakteri dan selanjutnya dioksidasi, memecah ikatan C-C pada hidrokarbon secara bertahap, menghasilkan konstituen yang lebih kecil yang memasuki jalur metabolisme utama sel melalui oksidasi (Moreno *et al.*, 2017).

Pada bakteri anaerob pendegradasi senyawa hidrokarbon, memecah rantai hidrokarbon melalui jalur metabolik yang menggunakan akseptor elektron alternatif untuk oksigen (O₂) (mis., Nitrat, ion logam, dan). Jenis akseptor elektron dapat bervariasi bergantung pada zona reduksi-oksidasi yang berbeda, dan mikroorganisme yang ada di dalamnya. Secara umum, akseptor elektron alternatif

pertama yang digunakan oleh mikroorganisme untuk proses katabolisme senyawa hidrokarbon setelah penipisan oksigen atmosfer adalah nitrat, karena bakteri pereduksi nitrat pada umumnya merupakan anaerob fakultatif. Mangan, besi, dan sulfat mengandung potensi redoks di bawah nitrat dan dapat digunakan oleh spesies bakteri pereduksi ion anorganik yang sesuai.

Metanogenesis memiliki potensi redoks yang lebih rendah daripada ion logam dan belerang dan bergantung pada produk sampingan yang dihasilkan dari spesies bakteri fermentatif dan asetogenik untuk memasok akseptor elektron (mis., H_2/CO_2 , format/asetat) (Ghattas *et al.*, 2017; Abbasian *et al.*, 2016). Lima jalur dominan telah diidentifikasi untuk degradasi hidrokarbon bakteri anaerob. Jalur anaerobik ini meliputi (1) penambahan fumarat ke rantai hidrokarbon, (2) hidroksilasi rantai hidrokarbon, (3) karboksilasi aromatik, (4) hidrasi alkena/alkin, dan (5) metanogenesis terbalik (Abbasian *et al.*, 2016).

1. Penambahan Fumarate ke Rantai Hidrokarbon

Penambahan fumarate ke rantai senyawa hidrokarbon oleh spesies bakteri anaerob menghasilkan kaskade penataan ulang rantai senyawa hidrokarbon, yang akhirnya diproses melalui jalur oksidasi dan menghasilkan alkilsuksinat. Alkilsuksinat ini kemudian dapat terdegradasi oleh proses ligasi, penataan kembali kerangka karbon, dan beta-oksidasi. Senyawa hidrokarbon alifatik dan aromatik dapat terdegradasi melalui metode ini (Musat *et al.*, 2015).

Mekanisme degradasi senyawa hidrokarbon ini berlangsung dengan sintetase alkilsuksinat yang memfasilitasi pengikatan n-alkana ke karbon subterminal atau terminal (dengan propana) dari fumarate. Produk yang dihasilkan adalah 2- (1-metilalkil) suksinat (atau 2-alkilsuksinat). 2- (1-Methylalkyl) suksinat kemudian diatur ulang menjadi (2-metilalkil) -mialilil-KoA, dan

didekarboksilasi menjadi turunan 4-metilalkil-CoA yang mengalami oksidasi (Bian *et al.*, 2015),

Sejumlah bakteri nitrifikasi dan pereduksi sulfat (mis., *Thauera aromatic* dan *Desulfobacula toluolica*) dapat memanfaatkan toluena sebagai sumber karbon tunggal dan memecahnya melalui penambahan fumarate ke rantai karbon. Dalam proses ini, benzylsuccinate synthase (BSS) memfasilitasi pengikatan dari toluena ke fumarat, membentuk (R) -benzilsuksinat, yang kemudian dimetabolisme oleh jalur oksidasi (Musat *et al.*, 2015).

2. Hidroksilasi Independen Oksigen dari Rantai Senyawa Hidrokarbon

Untuk degradasi berbagai senyawa aromatik dan heteroaromatik yang tersubstitusi etil dan propil hidrokarbon, hidroksilasi oksigen-independen dari rantai hidrokarbon adalah metode umum yang dilakukan oleh bakteri. Etilbenzena dehydrogenase (EBDH) mengkatalisasi hidroksilasi rantai hidrokarbon dengan H₂O (tidak seperti O₂ dalam sistem aerobik) dan mengubah aromatik mono dan bicyclic yang tersubstitusi dengan cincin senyawa menjadi alkohol (mis., konversi etilbenzena menjadi (S) -1-phenylethanol). Kemudian reaksi dehidrogenase enzimatik, karboksilase, dan ligase dilakukan oleh bakteri sebelum struktur thiolitik dibelah menjadi benzoil-KoA dan asetil-KoA (Rabus *et al.*, 2016).

3. Karboksilasi Senyawa Aromatik

Meskipun kepastian mutlak proses karboksilasi sebagai mekanisme pendegradasi senyawa hidrokarbon dibutuhkan penguatan lebih lanjut dalam literatur, identifikasi karboksilat turunan senyawa hidrokarbon asam aromatik dengan gugus karboksil turunan CO₂ memberikan bukti untuk pendegradasi senyawa hidrokarbon melalui proses karboksilasi (Widdel *et al.*, 2010)

4. Hidrasi Alkena / Alkil

Senyawa hidrokarbon alkena dan alkil dalam kondisi anaerob dapat terdegradasi melalui penambahan molekul air menjadi ikatan rangkap dua atau rangkap tiga, yang mengubah senyawa hidrokarbon menjadi alkohol, keton, atau aldehida (Grossi *et al.*, 2011).

5. Metanogenesis Terbalik

Dekomposisi mikroba terhadap metana sebagian besar difasilitasi melalui proses *reverse methanogenesis* oleh Archaea. Metanotrof anaerob dari domain archaea diperkirakan menggunakan reaksi sebaliknya metilkoenzim M reduktase (enzim kunci dalam proses metanogenesis) untuk aktivasi metana. Namun, bakteri *Methyloirabilis oxyfera* memiliki kapasitas untuk mengubah NO dari nitrit tereduksi menjadi N₂ dan O₂, yang memungkinkan meto monooksigenase untuk mendegradasi metana (Cui *et al.*, 2015).

D. Bakteri Rhizobium

Karakteristik bakteri Rhizobium yaitu bakteri yang hidup bebas, gram negatif, aerob, dan fakultatif anaerob, motil, serta kemo-heterotrof. Rhizobium bertahan di tanah sebagai heterotrof saprofit ketika mereka tidak menginfeksi tanaman legum yang merupakan inang bagi Rhizobium. Rhizobium adalah bakteri yang menghabiskan sebagian besar hidupnya di tanah, namun Rhizobium lebih dikenal karena peranan mereka di dalam nodul akar legum, di mana Rhizobium dapat mengubah nitrogen bebas di atmosfer menjadi bentuk yang dapat digunakan oleh tanaman inang. Ketika populasi tanaman legum melimpah maka jumlah Rhizobium dalam akar lebih banyak dibandingkan dengan Rhizobium yang ada di tanah (Setu *et al.*, 2019).

Genus bakteri Rhizobium terdiri dari beragam spesies pengikat nitrogen simbiotik yang berasosiasi dengan

akar tanaman dalam keluarga Leguminosae (Gonzales *et al.*, 2019). Simbiosis antara rhizobium dan tanaman legum memiliki sumber utama nitrogen bebas yang berasal dari biosfer. Simbiosis tersebut menjadi potensi untuk meningkatkan hasil pertanian dan mengurangi ketergantungan pada pupuk berbasis nitrogen. Adanya potensi tersebut meningkatkan ketertarikan ilmuwan untuk mempelajari lebih lanjut mengenai Rhizobium dan proses simbiosisnya pada tanaman. Fiksasi gas N₂ bebas di udara menjadi amonia oleh bakteri bintil akar (rhizobia) disebut proses fiksasi N₂ akibat adanya simbiosis (diCenzo *et al.*, 2019). Manfaat proses fiksasi ini dapat dimaksimalkan dalam pertanian dengan dua strategi umum. Yang pertama adalah mengoptimalkan jumlah N₂ yang dapat dimanfaatkan oleh bio-inokulan rhizobial. Hal ini akan mengakibatkan peningkatan tidak hanya laju fiksasi N₂ dalam nodul tetapi juga daya saing strain inokulan di tanah dan rhizosfer. Strategi kedua adalah merekayasa sepenuhnya simbiosis pengikat N₂ dengan tanaman non-legum (Oldroyd and Dixon, 2014).

Rhizobia pemfiksasi nitrogen memiliki siklus hidup yang kompleks (Poole *et al.*, 2018). Rhizobia ditemukan sebagai bakteri yang hidup bebas di lingkungan tanah umum dan di rhizosfer. Rhizobia harus bersaing dengan anggota komunitas mikroba lain untuk membentuk populasi yang stabil (Li *et al.*, 2016). Pada rhizosfer, rhizobia dapat menginfeksi inang legum yang kompatibel, di mana kondisi pertumbuhan bervariasi sesuai dengan tahap perkembangan simbiotik. Kondisi ini termasuk kondisi asam dan oksidatif (Hawkins *et al.*, 2017), pertumbuhan linier di sepanjang benang infeksi oksidatif, dan diferensiasi simbiosis setelah dilepaskan ke dalam sel inang. Setiap tahap pertumbuhan bebas dan simbiotik membutuhkan seperangkat gen dan kemampuan metabolisme yang unik. Pengembangan strain inokulan komersial generasi berikutnya harus menjelaskan hal ini dan sifat biologis lainnya, termasuk pertumbuhan

skala industri dan kelangsungan hidup selama pengeringan. (O' Callaghan, 2016).

Rhizobium adalah merupakan kelompok bakteri yang penting untuk menyediakan nitrogen bagi lingkungan dan akar kacang polong (Legum) (Tariq *et al.*, 2014). Rhizobium memiliki kapasitas ekologis untuk mengurangi polutan organik dan menjadikannya berguna untuk merehabilitasi tanah yang tercemar. Selain itu Rhizobium juga dapat merangsang kelangsungan hidup dan bekerja dengan bakteri tanah polutan lainnya, sehingga mengurangi konsentrasi dari pencemaran yang ada pada tanah khususnya pencemaran akibat minyak bumi, karena tindakan sinergis dari Rhizobium yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman sehingga dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap tanah yang tercemar (Hao *et al.*, 2014).

Hubungan simbiosis antara tanaman legum dan rhizobia, menarik perhatian peneliti yang terlibat dalam pemulihan tanah yang terkontaminasi logam berat. Logam berat berperan penting dalam fiksasi nitrogen secara simbiotik melalui rhizobium. Khususnya, enzim nitrogenase tergantung pada kofaktor yang mengandung molibdenum dan zat besi (FeMo-co), vanadium dan besi (VFe-co), atau dua molekul besi (FeFe-co). Namun jumlah logam berat yang berlebih malah dapat menghambat nodulasi akar dan menghambat pertumbuhan tanaman (González-Guerrero, 2014).

Famili Leguminosae (Fabaceae) adalah salah satu yang paling beragam di antara tanaman darat dan memiliki lebih dari 700 genera dan 20.000 spesies. Legum telah diusulkan sebagai spesies yang relevan untuk fitoremediasi, sebagian besar karena kemampuan mereka untuk dapat hidup di tanah marginal dan tanah yang miskin unsur hara (Hao *et al.*, 2014). Walaupun demikian kadar

logam berat yang tinggi tetap dapat menghambat pertumbuhan tanaman legum. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman legum yang bersimbiosis dengan rhizobium dapat toleran terhadap logam Cu, Zn, dan Pb (Grison *et al.*, 2015).

Fiksasi nitrogen simbiotik oleh kacang-kacangan sangat penting karena dapat memasok nitrogen dalam jumlah besar ke ekosistem dan berkontribusi pada produksi tanaman. Hubungan simbiotik antara legum dan rhizobia dimulai dengan saling adanya pengenalan molekul sinyal yang dikeluarkan dari kedua pasangan (tanaman legume dan rhizobia). Di rhizosfer, flavonoid yang dikeluarkan dari tanaman dapat dikenali oleh rhizobia yang kompatibel dan menginduksi produksi sinyal *lipochito oligosaccharida*, yang disebut faktor Nod (*Nod Factor* = *NF*), oleh rhizobia. *NF* yang dikeluarkan oleh rhizobia dapat dikenali oleh legum, sehingga menghasilkan aktivasi reaksi simbiosis yang mengarah pada infeksi rhizobial dan pembentukan nodul akar (Shimoda *et al.*, 2019).

E. Pertumbuhan Tanaman dan Tanah Tercemar Minyak

Kontaminasi minyak menyebabkan keprihatinan lingkungan geografis yang serius dan berdampak buruk pada lingkungan tanah akibat pelepasan produk sampingan yang bersifat toksik. Karakterisasi sampel tanah yang terkontaminasi dan tidak terkontaminasi dilakukan dengan *spektroskopi inframerah transformasi fourier (FTIR/ Fourier Transform Infra Red)*. Hasil yang diperoleh mengungkapkan sifat fisik tanah (kadar air, cairan dan limit plastik) yang terkena dampak kontaminasi minyak. Konduktivitas hidrolis relatif ditetapkan sebagai 0,46 (tidak terkontaminasi) dan 0,57 (terkontaminasi) untuk sampel

tanah. Hal ini menunjukkan bahwa konduktivitas hidrolis turun 10% karena kontaminasi minyak (Devatha *et al.*, 2019).

Pencemaran minyak merupakan salah satu masalah lingkungan yang serius karena minyak mengandung kontaminan logam berat dan senyawa hidrokarbon. Hal ini mengakibatkan tumpukan partikel pada tanah sehingga menghambat difusi udara melalui pori-pori tanah (Sutton *et al.*, 2013). Kemudian, berdampak pula pada perubahan sifat fisik seperti batas Atterberg, yang merupakan sifat permeabilitas (Akunwumi *et al.*, 2014) dan sifat kimia seperti pH, total senyawa karbon organik, nutrisi mineral tanah seperti natrium, kalium, sulfat, fosfat dan nitrat tanah, yang secara tidak langsung berdampak negatif pada pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan dan mikroorganisme (Wang *et al.*, 2010).

Kontaminasi tanah oleh pencemaran minyak hidrokarbon sangat menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman, karena perubahan sifat fisik dan kimia tanah, serta gangguan aktivitas mikroba tanah (Alonge, 2016). Tingkat pencemaran minyak hidrokarbon pada tanah secara langsung mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Tingkat pencemaran minyak tanah yang tinggi memicu gangguan pada perkecambahan biji sebagai akibat dari gangguan pengudaraan tanah yang menyebabkan kondisi anaerob pada tanah. Secara kontras pencemaran minyak hidrokarbon yang rendah memiliki dampak positif pada pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan sebagai hasil dari mineralisasi senyawa organik oleh mikroorganisme, ketersediaan nutrisi, serta kelembaban (Bamidele, 2011; Jain, 2011; Athar, 2016).

Pada tanah yang tercemar minyak, konsentrasi unsur hara tanah sangat rendah. Hal ini menjadi faktor pembatas bagi tumbuhan. Pada tanah tercemar minyak memiliki kandungan unsur N yang rendah (Hanifah *et al.*, 2018).

Unsur hara nitrogen (N) merupakan unsur hara esensial bagi tumbuhan. Dimana unsur hara nitrogen merupakan penyusun dari asam nukleat tumbuhan serta penyusun protein. Semua proses metabolisme dan regulasi tumbuhan melibatkan peran unsur hara N mengingat N sebagai penyusun enzim dan hormon pertumbuhan (Leghari *et al.*, 2016), sehingga rendahnya unsur N pada tanah tercemar minyak dapat berdampak negatif pada pertumbuhan dan kelangsungan hidup tumbuhan.

F. Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak

Bioremediasi merupakan metode yang dapat dilakukan untuk membersihkan lingkungan yang terkontaminasi hidrokarbon (Varjani, 2017). Bioremediasi merupakan metode remediasi yang ramah lingkungan untuk menghilangkan hidrokarbon minyak bumi karena tidak memerlukan intervensi bahan kimia dan mekanik yang dapat mengganggu struktur tanah (Truskewycz *et al.*, 2019).

Biostimulasi dan bioaugmentasi merupakan dua pendekatan utama dalam bioremediasi. Biostimulasi meliputi perbaikan nutrisi tanah khususnya N dan P, oksigenasi, pengaturan temperatur dan pH, dan penambahan surfaktan pada wilayah yang terkontaminasi untuk menstimulasi pertumbuhan dari mikroba pendegradasi senyawa hidrokarbon yang ada pada wilayah terkontaminasi dan untuk meningkatkan laju biodegradasi. Bioaugmentasi meliputi penambahan mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon pada lingkungan yang terkontaminasi untuk mendukung komunitas mikroba pendegradasi yang ada secara alami di lingkungan terkontaminasi (Abed *et al.*, 2014; Hassanshahian *et al.*, 2014).

Bioremediasi melibatkan proses degradasi, eradikasi, imobilisasi, atau detoksifikasi beragam limbah kimia dan bahan berbahaya fisik yang berada di sekitar

mikroorganisme. Mikroorganisme bertindak sebagai pembersih polutan yang ada di tanah, air, dan sedimen. Hal ini disebabkan karena mikroorganisme mampu menghasilkan enzim yang terlibat dalam pendegradasian senyawa polutan dan juga disebabkan karena kemampuan hidup mikroorganisme pada wilayah yang tercemar limbah seperti limbah minyak (Abatenh *et al.*, 2017).

Efisiensi bioremediasi tergantung pada banyak faktor; termasuk, sifat kimia dan konsentrasi polutan, karakteristik fisikokimia lingkungan, dan ketersediaan untuk mikroorganisme. Proses bioremediasi dengan bantuan mikroorganisme dipengaruhi oleh faktor biotik maupun abiotik. Faktor biotik mempengaruhi degradasi senyawa organik melalui persaingan antara mikroorganisme untuk sumber karbon yang terbatas, interaksi antagonis antar mikroorganisme atau pemangsaan mikroorganisme oleh protozoa dan bakteriofag. Faktor abiotik meliputi pH, suhu, kelembaban, struktur tanah, kelarutan dalam air, nutrisi, potensi redoks dan kandungan oksigen, kurangnya sumber daya manusia yang terlatih di bidang ini dan bioavailabilitas fisik-kimia dari polutan (konsentrasi kontaminan, jenis, kelarutan, struktur kimia dan toksisitas). Biodegradasi dapat terjadi pada kisaran pH yang luas; Namun, pH 6,5 hingga 8,5 umumnya optimal untuk biodegradasi di sebagian besar sistem akuatik dan terestrial. Kelembaban memengaruhi laju metabolisme kontaminan karena memengaruhi jenis dan jumlah bahan terlarut yang tersedia serta tekanan osmotik sistem terestrial dan akuatik (Madhavi dan Mohini, 2012).

Tingkat degradasi kontaminan seringkali tergantung pada konsentrasi kontaminan dan jumlah "katalis" yang ada. Dalam konteks ini, jumlah "katalis" mewakili jumlah organisme yang dapat memetabolisme kontaminan serta jumlah enzim yang diproduksi oleh masing-masing sel. Ekspresi enzim spesifik oleh sel dapat meningkatkan atau menurunkan laju degradasi kontaminan (Abatenh *et al.*, 2017).

Effendi dan Aminati (2019) menyatakan bahwa penggunaan senyawa oksidan kimia ke dalam proses bioremediasi dengan mikroorganisme dapat meningkatkan laju degradasi hidrokarbon pada tanah tercemar minyak. Senyawa oksidan yang dapat digunakan yaitu fotokatalistik TiO₂ di bawah radiasi sinar matahari. Penambahan fotokatalistik lebih efektif dari pada hanya menggunakan mikroorganisme semata. Namun, peningkatan laju degradasi tidak selalu sebanding dengan peningkatan konsentrasi TiO₂. Proses degradasi dipengaruhi juga oleh aktivitas mikroba asli (*indigenous*) dan energi yang berasal dari sinar UV tetapi tidak dipengaruhi secara signifikan oleh intensitas UV. Tingkat degradasi TPH tertinggi diberikan oleh mikrokosmos tanah di mana konsentrasi TiO₂ 2% ditambahkan.

Takacs *et al.*, (2018) melaporkan bahwa pemanfaatan simbiosis tripartite dengan menggunakan inokulasi bakteri seperti rhizobium, jamur mikoriza, dan tanaman seperti tanaman kacang kedelai lebih efektif dalam proses bioremediasi pada tanah tercemar dibandingkan dengan bioremediasi yang hanya memanfaatkan peran satu jenis mikroorganisme saja. Selain itu bioremediasi dengan multisimbiosis antara bakteri, mikoriza, dan tanaman juga dapat meningkatkan produksi tanaman, laju fotosintesis, dan dapat meningkatkan aktivitas akar dalam proses penyerapan unsur hara tanah sehingga dapat berdampak pada peningkatan pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

BAB IV PEMBAHASAN

A. Sifat Kimia dan Fisika Tanah Tercemar Minyak

1. Sifat Kimia Tanah Tercemar Minyak

Hasil analisis sampel tanah terhadap sifat kimia ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Analisis Sifat Kimia Tanah pada Cuplikan Tanah Tercemar Minyak

No	Parameter	Nilai (satuan)	Kadar Pembanding untuk Kriteria penilaian sifat kimia tanah
1	TPH	41.200 mg/kg	Sangat Tinggi
2	Nitrogen (N)	0,20%	Rendah < 0,21
3	Phosphat (P)	0,01%	Sangat rendah < 10
4	Kalium (K)	0,22%	Rendah (0,1-0,2)
5	Karbon (C)	8,53%	Sangat tinggi > 4
6	C/N rasio	42,7	Sangat tinggi (>15)

Data pada Tabel 4.1 menunjukkan kadar TPH dan C berkategori sangat tinggi, oleh karena itu nilai C/N rasio juga tinggi. Sementara itu kadar unsur hara (N, P, dan K) masih menunjukkan pada kategori rendah atau bahkan sangat rendah. Kondisi tanah tercemar minyak tersebut sesuai dengan sifat-sifat yang ditemukan pada minyak bumi yang merupakan campuran kompleks hidrokarbon dengan senyawa organik, parafin, senyawa gas (seperti metana, etana, propana, dan butana), ion logam (besi, nikel, tembaga, vanadium, dll.) (Borah, 2018). Tingginya kadar TPH tanah menunjukkan kondisi pencemaran minyak yang tinggi. TPH merupakan pengukuran konsentrasi pencemar hidrokarbon minyak dalam tanah atau berat seluruh pencemar hidrokarbon

minyak dalam sampel tanah yang sering dinyatakan dalam satuan mg hidrokarbon/kg tanah. Termasuk diantaranya ketersediaan N, P, dan K yang terjerap pada konstituen minyak dan senyawa hidrokarbon tersebut sehingga kadar ketersediaannya rendah atau bahkan sangat rendah.

2. Sifat Fisika Lingkungan Sekitar Pengambilan Sampel tanah

Hasil pengukuran terhadap kondisi lingkungan seperti pada Tabel 4.2 berikut ini.

Tabel 4.2. Analisis Sifat Kimia Tanah pada Cuplikan Tanah Tercemar Minyak

No	Parameter	Hasil pengukuran
1	Suhu udara	34 - 36 °C
2.	Kelembaban	54-68%
3.	pH	5.8 - 7.5
4.	Suhu tanah	33 - 34 °C

Berdasarkan hasil analisis fisika lingkungan pengambilan sampel tanah menunjukkan bahwa lingkungan lokasi pengambilan sampel tanah cenderung bersuhu panas dan dengan pH cenderung asam mengarah ke pH netral dengan kadar kelembaban tanah yang sedang.

Perubahan faktor lingkungan mempengaruhi kegiatan degradasi TPH, peningkatan N dan P serta penurunan C/N rasio oleh bakteri yang ada ada di media tanah. Penurunan pH dapat terjadi karena aktivitas metabolisme yang menghasilkan asam-asam organik. Asam organik yang dihasilkan ini dapat menyebabkan kondisi tanah menjadi asam dan pH menjadi turun. Sementara Wang *et al.*, (2019) melaporkan bahwa kondisi optimal untuk proses degradasi minyak yaitu pada suhu 45°C, pH 7.0, 1% NaCl. Lebih lanjut Pawar (2015) menyatakan bahwa rentang pH optimal untuk aktivitas degradasi bakteri yaitu antara 7,5 – 8, sehingga

pH yang cenderung asam menuju netral pada penelitian ini kemungkinan dapat menjadi salah satu faktor belum maksimalnya proses degradasi TPH.

Suhu tanah dapat mempengaruhi degradasi secara langsung ataupun tidak langsung. Secara langsung, aktivitas mikrobial berhubungan dengan peningkatan temperatur, reaksi metabolik pada umumnya akan meningkat bersama dengan meningkatnya suhu.

Kadar air tanah memainkan peran penting dalam bioremediasi tanah. Air yang cukup harus tersedia di tanah untuk mendukung kegiatan mikroba. Jumlah air yang terbatas dalam tanah menghambat aktivitas mikroba, sementara air yang berlebihan dapat mengisi pori-pori di tanah dan menghambat difusi oksigen menuju mikroorganisme sehingga suasana menjadi anaerob (Bahmani *et al.*, 2018).

B. Isolasi dan Identifikasi Bakteri dan Mikoriza

1. Bakteri Pelarut Fosfat dan Bakteri Pendegradasi Senyawa Hidrokarbon

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data hasil isolasi bakteri dari tanah tercemar minyak yang disajikan sebagai berikut.

a. Spesies bakteri yang terdapat pada tanah yang tercemar minyak bumi

Spesies bakteri diperoleh dari pengamatan morfologi terhadap koloni, pewarnaan gram, karakteristik fisiologi melalui uji biokimia menggunakan *Microbact identification system*. Hasil uji bakteri gram dicocokkan dengan buku *Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteriology* dan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Edition*.

Tabel 4.3. Spesies Bakteri Hasil Isolasi dari Tanah Tercemar Minyak

No	Kode Isolat Bakteri	Kode Microbact 2000	Hasil Identifikasi	
			Nama Spesies	Percent Probability
1.	B1 (gram negatif)	767563765	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	99,99%
2.	B2 (gram negatif)	605130321	<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>	98,56%
3.	A1 (gram negatif)	600100000	<i>Flavobacterium odoratum</i>	66,31%
4.	A2 (gram negatif)	605520371	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	96,15%
5.	A3 (gram positif)	-	<i>Enterococcus sp.</i>	75%

Tabel 4.3 menunjukkan ada 5 macam bakteri yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari isolasi pada tanah tercemar minyak. Perlu diketahui bahwa bakteri dengan kode isolat B1 dan B2 berasal dari cuplikan tanah 1 dan isolat bakteri dengan kodel A1, A2 dan A3 berasal dari cuplikan tanah 2. Identifikasi bakteri tersebut berdasarkan pengamatan morfologi koloni, pewarnaan gram, dan uji fisiologi biokimia.

1) Pengamatan morfologi koloni

Pengamatan morfologi koloni bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak dilakukan dengan memperhatikan aspek bentuk, diameter, warna, tepi, elevasi, struktur dalam serta pengamatan pewarnaan gram untuk menentukan klasifikasi bakteri sebagai gram positif atau gram negatif. Data hasil pengamatan morfologi bakteri disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Morfologi Koloni Bakteri pada Tanah tercemar Minyak

Pengamatan Makroskopis Koloni Bakteri							Pewarnaan gram
Isolat	Bentuk	Diameter	Warna	Tepi	Elevasi	Struktur dalam	
B1	Tidak teratur dan menyebar	0,5-1 cm	Kuning	Licin /rata	Cembung	Tidak tembus cahaya	Gram negatif batang
B2	Bundar	2-4 mm	Putih susu	Licin /rata	Cembung rendah	Berbutir kasar	Gram negatif batang
A1	Bundar	0,5-1mm	merah	Licin /rata	datar	Tidak tembus cahaya	Gram negatif batang
A2	Tidak teratur dan menyebar	0,5-1 cm	kuning	Licin /rata	cembung	Tidak tembus cahaya	Gram negatif batang pendek tidak berspora
A3	Tidak teratur dan menyebar	1-2cm	putih	Licin /rata	cembung	Tidak tembus cahaya	Gram positif kokus

Keterangan:

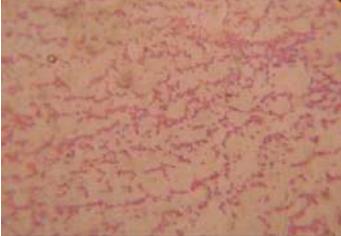
- B1 : *Pseudomonas pseudomallei*
 B2 : *Pseudomonas fluorescens-25*
 A1 : *Flavobacterium odoratum*
 A2 : *Pseudomonas pseudomallei*
 A3 : *Enterococcus sp.*

2) Pewarnaan gram

Pewarnaan gram yang dilakukan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Hasil dari pewarnaan gram dari bakteri yang diisolasi dari tanah tercemar minyak disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5. Pewarnaan gram pada kelima bakteri hasil isolasi dari tanah tercemar minyak

Isolat	Pewarnaan Gram	Hasil pewarnaan gram, dengan perbesaran 1000x
B1	Gram negatif	
B2	Gram negatif	
A1	Gram negatif	
A2	Gram negatif	

A3	Gram positif	
----	--------------	---

Keterangan:

- B1 : *Pseudomonas pseudomallei*
 B2 : *Pseudomonas fluorescens-25*
 A1 : *Flavobacterium odoratum*
 A2 : *Pseudomonas pseudomallei*
 A3 : *Enterococcus sp.*

Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa, isolat B1, B2, A1, dan A2 merupakan bakteri gram negatif, sedangkan isolat A3 merupakan bakteri gram positif. Dasar yang membedakan bakteri dalam kelompok gram positif atau negatif adalah hasil pewarnaan dari keempat reagen yang dipakai dalam pewarnaan. Pada pemberian warna dasar kristal violet, semua sel akan membentuk kompleks CV-I (Crystal violet-Iodine) yang akan berikatan dengan Mg-RNA komponen dinding sel, membentuk kompleks Mg-RNA-CV-I yang tidak larut dalam alkohol. Lugol sebagai larutan penguat kompleks Mg-RNA-CV-I. Alkohol 95% sebagai senyawa dekolerasi akan melarutkan lemak. Pada bakteri gram (+) kandungan lemaknya sedikit, pada waktu pencucian dengan alkohol, lemak akan larut dan membentuk pori yang kecil yang kemudian tertutup oleh protein yang terdehidrasi alkohol, sehingga pori tertutup. Akibatnya pewarna primer sulit dicuci dan sel menjadi berwarna biru keunguan. Lemak pada sel gram negatif (-) banyak, sehingga waktu pelarutan alkohol menghasilkan pori yang besar yang tidak

dapat tertutup oleh pori yang terdehidrasi, akibatnya alkohol mencuci semua kompleks Mg-RNA-CV-I dan sel kehilangan warna. Reagent yang keempat dalam pewarnaan yaitu safranin yang digunakan untuk menggantikan warna dasar yang telah hilang karena tercuci alkohol, bakteri gram (-) akan berwarna merah dan bakteri gram (+) tetap berwarna ungu.

3) Karakterisasi bakteri indiginous pada tanah tercemar minyak

Identifikasi bakteri berdasarkan uji aktivitas biokimia dilakukan dengan cara membandingkan aktivitas biokimia setiap bakteri. Aktivitas biokimia setiap bakteri berbeda. Hal ini disebabkan karena setiap bakteri mempunyai aktifitas enzimatik yang berbeda. Tabel 4.6 menunjukkan data uji biokimia/fisiologis bakteri yang terdapat pada tanah tercemar minyak.

Tabel 4.6 Uji biokimia (fisiologi) isolat bakteri dari tanah tercemar minyak

Sampel bakteri		Uji fisiologis		Oksidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine	
		Indeksi	reaksi	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
B ₁	Hasil	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		
	Octal kode																														
B ₂	Hasil	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	
	Octal kode																														
A ₁	Hasil	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Octal kode																														
A ₂	Hasil	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Karakteristik fisiologis meliputi sifat serta kemampuan bakteri tumbuh pada media (Lysine, Ornithine, Arginin , ONPG, indole, TDA, Gelatin, Malonate - asam amino) H₂S, citrate, Urease, V-P, (Glucose, Mannitol, Xylose, ONPG, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Sucrose, Lactose, Arabinose, Adonitol, Raffinose, Salicin - karbohidrat).

Isolat B1, *Pseudomonas pseudomallei* bakteri dengan oksidase positif, motil, dan dapat mereduksi nitrate, mengalami reaksi negatif pada uji pembentukan H₂S, termasuk dalam hal uji Indole, Thryptophan deaminase, gelatin, Adonitol dan Salicin. Sementara menunjukkan reaksi positif bila diuji pada Lysine, Ornithine, asam dari glukosa, Manitol, dan Xylose. Uji positif juga ditunjukkan pada ONPG, hidrolisis urea, penggunaan sitrat, penghambatan malonat, dan reaksi pembentukan asam dari Inositol, Sorbitol, Sucrose, Lactose, Arabinose, Raffinose, dan Arginin dehidrolase.

Isolat B2, *Pseudomonas fluorescens* merupakan bakteri dengan oksidase positif, motil, dan tidak dapat mereduksi nitrate. Bakteri ini mengalami reaksi negatif pada uji pembentukan Lysin dehidrogenase, Ornithin dekarboksilasil, produksi H₂S, termasuk dalam hal uji asam dari Manitol, INPG, Indole Gelatin, penghambatan malonat, pembentukan asam dari Inositol dan asam dari sorbitol, serta pembentukan asam dari Adonitol, Raffinosa dan Salicin. Sementara menunjukkan reaksi positif bila diuji pada asam dari glukosa, xylose, hidrolisis urea, penggunaan sitrat, thryptophan deaminase, asam dari Sorbitol dan Arabinose serta Arginin dehidrolase.

Isolat A1, *Flavobacterium odoratum*, merupakan bakteri dengan oksidase positif, motil, dan tidak dapat mereduksi nitrate. Bakteri ini mengalami positif terhadap uji hidrolisis urea sedangkan dari serangkaian uji fisiologis lainnya yang disediakan menunjukkan reaksi negatif.

Isolat A2, *Pseudomonas pseudomallei* merupakan bakteri dengan oksidase positif, motil, dan tidak dapat mereduksi nitrate. Bakteri ini mengalami reaksi negatif pada uji pembentukan Lysin dehidrogenase, Ornithin dekarboksilasil, produksi H₂S, termasuk dalam hal uji asam dari Manitol, Indole Gelatin, triptophan deaminase, uji gelatin, penghambatan malonat, asam dari Inositol dan asam dari sorbitol, serta pembentukan asam Raffinosa dan Salicin. Sementara menunjukkan reaksi positif bila diuji pada asam dari glukosa, xylose, ONPG, hidrolisis urea, penggunaan sitrat, asam dari Sorbitol, sukrosa, laktosa, arabinosa, adonitol dan Arginin dehidrolase.

Isolat A3, *Enterococcus sp.* merupakan bakteri dengan oksidase positif, motil, dan dapat mereduksi nitrate. Bakteri ini mengalami reaksi negatif pada uji produksi H₂S, reaksi Indole, triptophan deaminase, asam dari inositol, asam dari laktose, Odonitol dan Salicin. Sementara serangkaian uji fisiologis lainnya menunjukkan reaksi positif.

Spesies bakteri yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi pada tanah tercemar minyak adalah lima spesies bakteri, namun dari kelima spesies bakteri tersebut terdapat dua bakteri yang memiliki spesies yang sama. Oleh karena itu, dalam penelitian ini berhasil diisolasi dan diidentifikasi empat spesies bakteri. Bakteri

tersebut adalah *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas fluorescens-25*, *Flavobacterium odoratum*, dan *Enterococcus sp.*

b. Peran Bakteri Pelarut Fosfat dan Bakteri Pendegradasi Senyawa Hidrokarbon

Salah satu organisme yang mampu meningkatkan ketersediaan P adalah bakteri pelarut fosfat. Bakteri ini mempunyai kemampuan melarutkan P yang tidak larut dan menjadikan tersedia bagi tanaman dengan cara melarutkannya dengan bantuan asam-asam organik. Beberapa jenis bakteri dan fungi yang mempunyai kemampuan ini antara lain: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Bacillus*. Dalam aktivitasnya mikroba ini menghasilkan asam-asam organik seperti asam sitrat, laktat, glukonat, 2-ketoglukonat, oksalat, glikonat, asetat, malat, fumarat, suksinat, tartarat, malonat, glutarik, propionik, butyrik, glikoksalat, dan asam adipat (Kumar *et al.*, 2018; Satyaprakash *et al.*, 2017). Meningkatnya asam-asam organik tersebut biasanya diikuti dengan penurunan pH, sehingga mengakibatkan terjadinya pelarutan P yang terikat misalnya oleh Ca.

Sementara itu, peneliti lain membuktikan bahwa beberapa jenis mikroba mampu untuk menggunakan sumber karbonnya dalam proses perombakan senyawa hidrokarbon diantaranya *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Serratia* dan *Shigella* (Bassey *et al.*, 2019). Lustosa *et al.*, (2018) melaporkan bahwa bakteri yang diisolasi dari mangrove seperti *Bacillus aerophilus*, *Exiguobacterium profundum*, *Pseudomonas xanthomarina*, *Proteobacterium*, *Bacillus aerophilus*, *Pseudomonas sp.* dan *Bacillus*

sp. memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa hidrokarbon.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa isolat bakteri yang berhasil diidentifikasi adalah spesies bakteri tanah yang memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat. Namun demikian karena bakteri-bakteri tersebut diisolasi dari tanah yang tercemar minyak, maka hal ini sekaligus mengindikasikan bahwa bakteri-bakteri tersebut juga sekaligus memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon yang terdapat dalam jumlah relatif tinggi pada tanah tercemar minyak yang digunakan yang diindikasikan dengan nilai TPH dan C yang tinggi pada sampel tanah uji (Tabel 4.1). Hal ini dapat dipahami mengingat bakteri akan memenuhi kebutuhan energinya untuk tumbuh dan melangsungkan kegiatan metabolismenya dengan cara menggunakan sumber-sumber yang ada di lingkungannya. Tentunya untuk keempat bakteri tersebut adalah digunakannya senyawa hidrokarbon yang relatif tinggi di lingkungannya.

Adapun mekanisme bakteri dalam melarutkan P adalah dengan cara mengubah status ketersediaan P menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman. Mikroorganisme tanah mempengaruhi kelarutan senyawa P melalui sekresi asam-asam organik yang menghasilkan P anorganik (P_i) dan mobilisasi P_i untuk keperluan mikroorganisme sendiri (Kumar *et al.*, 2018). Peran yang dilakukan adalah dengan mentransformasi P diantaranya melalui mekanisme 1) Melarutkan P dengan mengeluarkan asam organik untuk melarutkan senyawa P_i , 2) Memanfaatkan enzim fosfatase untuk melarutkan senyawa P organik yang dimetabolisme secara enzimatik (Chen and Liu, 2019), dan 3) proses pelarutan dan mineralisasi senyawa P kompleks (Khan *et al.*, 2014).

Sementara itu, mengingat bakteri yang ditemukan juga memiliki kemampuan dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon, maka harus dipahami bahwa sebetulnya biodegradasi minyak bumi merupakan proses alami, yang melibatkan mikroorganisme yang dapat mentransformasikan dan mendekomposisikan hidrokarbon minyak bumi menjadi komponen-komponen lain yang lebih sederhana (Das dan Chandran, 2011). Adapun mekanisme transformasi dan dekomposisi yang dilakukan oleh mikroorganisme salah satu contohnya adalah pemecahan hidrokarbon n-alkana. Pemecahan molekul hidrokarbon n-alkana oleh mikroorganisme diinisiasi oleh sistem enzim monooksigenase multi kompleks (ω -hidroksilase) yang dapat mengoksidasi alkana menjadi alkohol primer. Selanjutnya alkohol primer yang terbentuk dioksidasi menjadi senyawa aldehid dan akhirnya menjadi asam lemak. Asam lemak yang dihasilkan dapat langsung diuraikan menjadi CO_2 melalui proses α -oksidasi atau digunakan sebagai nutrisi (sumber karbon dan energi) untuk pertumbuhan sel melalui proses β -oksidasi (Das dan Chandran, 2011).

Bakteri dalam aktivitas hidupnya memerlukan molekul karbon sebagai salah satu sumber nutrisi dan energi untuk melakukan metabolisme dan perkembangbiakannya. Secara khusus, kelompok mikroorganisme yang mampu menggunakan sumber karbon yang berasal dari senyawa hidrokarbon disebut mikroorganisme pendegradasi senyawa hidrokarbon (Lustosa *et al.*, 2018). Genus bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon diantaranya *Acromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pandoraea*,

Pseudomonas, *Staphylococcus*, dan *Streptobacillus* (Sarkar *et al.*, 2017).

2. Mikoriza

Terdapat empat genus mikoriza *indigenous* yang mampu bersimbiosis dengan tanaman di tanah tercemar minyak bumi, yaitu *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora* dan *Sclerocystis*. Satu genus mikoriza tersebut dapat menginfeksi lebih dari satu tanaman (Tabel 4.7). Persentase spora pada tanah tercemar minyak bumi seluas 275 m², dimana *Glomus* sp 1 merupakan genus spora mikoriza yang mendominasi pada tanah tercemar minyak bumi dengan persentase penyebaran sebesar 69,83% (169 spora) (Tabel 4.8). Karakteristik dan morfologi mikoriza dari berbagai spora yang ditemukan dapat dideskripsikan berdasarkan bentuk, warna, ukuran dan ciri lain (Tabel 4.9).

Tabel 4.7 Genus Mikoriza yang Bersimbiosis dengan Tanaman di Tanah Tercemar Minyak Bumi

No	Genus Mikoriza	Tanaman
1	Glomus	<i>Stachytarpheta mutabilis</i> (keji beling)
		<i>Lantana camara</i> L (tembelekan)
		<i>Imperata cylindrica</i> L (alang-alang)
		<i>Calotropis gigantea</i> (rembega)
		<i>Eupatorium odoratum</i> L (serunai)
		<i>Sida rhombifolia</i> L (otok)
2	Gigaspora	<i>Stachytarpheta mutabilis</i> (keji beling)
		<i>Lantana camara</i> L (tembelekan)
3	Acaulospora	<i>Sida rhombifolia</i> L (otok)
4	Sclerocystis	<i>Stachytarpheta mutabilis</i> (keji beling)
		<i>Tectona grandis</i> L (jati)

Tabel 4.8 Jumlah Mikoriza Tiap Genus

Tanaman	A ₁	A ₂	B ₂	B ₂	B ₃	C	D	Rerata Σspora (per 50 gr tanah)	Infeksi Akar
<i>Stachytarpheta mutabilis</i> (keji beling)	24	3	1	1	-	1	-	30	+
<i>Lantana camara</i> L (tembelekan)	13	-	-	-	1	-	-	14	+
<i>Imperata cylindrica</i> L (alang-alang)	13	6	-	-	-	-	-	19	+
<i>Calotropis gigantean</i> (rembega)	6	3	-	-	-	-	-	9	+
<i>Eupatorium odoratum</i> L (serunai)	35	20	-	-	-	-	-	55	+
<i>Sida rhombifolia</i> L (otok)	37	23	-	-	-	-	1	61	+
<i>Tectona grandis</i> L (jati)	41	12	-	-	-	1	-	54	+
Jumlah	169	67	1	1	1	2	1	242	
% spora pada tanah seluas 275 m² (%)	69,83	27,68	0,41	0,41	0,41	0,83	0,41	100	

Keterangan:

A₁ = *Glomus* sp 1 B₂ = *Gigaspora* sp 2 D = *Acaulospora* sp
 A₂ = *Glomus* sp 2 B₃ = *Gigaspora* sp 3
 B₁ = *Gigaspora* sp 1 C = *Sclerocystis* sp

Tabel 4.9 Karakteristik Morfologis Mikoriza di Tanah Tercemar Minyak Bumi

Spora	Bentuk	Warna	Ukuran	Ciri lain	Sumber
 <i>Glomus</i> sp 1 (10 x 40)	Bulat	Coklat tua	Lolos pada saringan 437 μm (no mesh 40)	Hifa berbentuk lurus	Anonim (2011) dan Margareth (2011)
	Bulat	Kuning Muda	Lolos pada saringan 437 μm (no mesh 40)	Hifa berbentuk lurus	Anonim (2011) dan Margareth (2011)

Spora	Bentuk	Warna	Ukuran	Ciri lain	Sumber
<i>Glomus</i> sp 2 (10 x 40)			mesh 40)		
 <i>Sclerocystis</i> (10 x 10)	Batang	Kuning Muda	Lolos pada saringan 437 µm (no mesh 40)	Terdapat ornamen seperti duri	Burni dkk (2007)
 <i>Gigaspora</i> sp 1 (10 x 40)	Oval	Coklat tua	Lolos pada saringan 875 µm (no mesh 20)	Memiliki "bulbous" (penyanga spora) pada pangkal hifa	Anonim (2011) dan Margareth (2011)
 <i>Gigaspora</i> sp 2 (10 x 40)	Bulat	Kuning Kecoklatan	Lolos pada saringan 875 µm (no mesh 20)	Memiliki "bulbous" (penyanga spora) pada pangkal hifa	Anonim (2011) dan Margareth (2011)
 <i>Gigaspora</i> sp 3 (10 x 10)	Bulat	Coklat tua	Lolos pada saringan 875 µm (no mesh 20)	Memiliki "bulbous" (penyanga spora) pada pangkal hifa	Anonim (2011) dan Margareth (2011)
 <i>Acaulospora</i> sp (10 x 10)	Bulat	Coklat Kemerahan	Lolos pada saringan 875 µm (no mesh 20)	Memiliki "bulbous" (penyanga spora) pada pangkal hifa	Anonim (2011) dan Margareth (2011)

Selain data karakteristik spora mikoriza, diukur pula faktor lingkungan yang mendukung pertumbuhan spora. Adapun hasil analisis faktor lingkungan yang diperoleh meliputi pH 6,5; suhu tanah 34°C; kelembapan tanah 66% dan intensitas cahaya 2593 Cd. Keadaan lingkungan ini sesuai untuk pertumbuhan spora mikoriza pada tanah tercemar minyak bumi.

Hasil eksplorasi yang dilakukan pada tanah tercemar minyak bumi di wilayah Bojonegoro diperoleh tujuh genus spora mikoriza, antara lain *Glomus* sp 1, *Glomus* sp 2, *Gigaspora* sp 1, *Gigaspora* sp 2, *Acaulospora* sp dan *Sclerocystis* sp. Keberagaman spora mikoriza yang ditemukan di tanah tercemar minyak bumi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yang meliputi faktor biotik dan faktor abiotik. Suatu sistem akar tanaman dapat diinfeksi oleh lebih dari satu genus mikoriza, meskipun keberhasilan dalam menginfeksi tanaman berbeda. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh pengaruh kecocokan mikoriza dengan tanaman inang serta jenis tanaman yang menjadi inang mikoriza. Kokkoris *et al.*, (2019) melaporkan bahwa tanaman liar lebih adaptif dan dapat memaksimalkan simbiosis dengan mikoriza dibandingkan dengan tanaman budidaya.

Jenis mikoriza yang mendominasi tanah tercemar minyak bumi, yaitu mikoriza genus *Glomus* sp 1 dengan persentase penyebaran sebesar 69,83% dengan jumlah spora 169 spora pada areal tanah seluas 275 m². Faktor yang memengaruhi spora jenis *Glomus* sp 1 berkembang baik pada tanah tercemar minyak bumi salah satunya adalah pH tanah, adapun besar pH yang diperoleh adalah sebesar 6,5. Hal ini sesuai dengan pernyataan Asrianti *et al.*, (2016) bahwa pH optimum untuk *Glomus* sp. yaitu antara 5,5 – 8.

Ketersediaan unsur hara adalah faktor lain yang juga sangat memengaruhi jenis mikoriza yang mendominasi tanah tercemar minyak bumi, salah satunya

adalah unsur P. Tanah yang tercemar minyak bumi cenderung memiliki kadar P yang rendah karena unsur P terfiksasi oleh logam Al dan Fe. Tanaman yang ada pada tanah tercemar minyak bumi dapat meningkatkan pengambilan unsur P apabila akar tanaman tersebut bersimbiosis dengan mikoriza (Ingraffia *et al.*, 2019). Inokulasi dengan mikoriza dapat meningkatkan permukaan luar untuk keperluan penyerapan unsur hara dan memicu translokasi unsur hara pada tumbuhan inang (Rouphael *et al.*, 2015).

Menurut Lu *et al.*, (2019) secara umum *Glomus* mendominasi komunitas di seluruh wilayah, yang kedua adalah *Archaeospora*. Proporsi *Glomus* meningkat dari 67% menjadi 85% ketika pohon inang tumbuh dari tahap 9 tahun menjadi 32 tahun, sedangkan proporsi *Archaeospora* menurun dari 22% menjadi 7% ketika tanaman inang tumbuh. Margarettha (2011) melaporkan bahwa mikoriza genus *Glomus* sp (9 tipe spora) lebih banyak dibandingkan spora mikoriza dari genus *Acaulospora* sp (3 tipe spora) dan *Entrophora* sp (1 tipe spora).

Kepadatan spora pada tiap sampel tanah dari ketujuh tanaman sangat bervariasi, yakni berkisar antara 9–61 spora/50 g tanah. Kepadatan spora tertinggi adalah pada tanah yang ditanami tanaman *Sida rhombifolia* L yakni sebanyak 61 spora/50 g tanah. Kepadatan spora yang diperoleh pada tanah tercemar minyak bumi serta tanaman yang bersimbiosis dengan spora tersebut menunjukkan potensi *Mikoriza Vesikular Arbuskular* (MVA) untuk dapat digunakan sebagai bioremediator pada tanah tercemar minyak bumi.

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat diketahui bahwa dengan adanya mikoriza pada tanah tercemar minyak bumi serta kepadatan yang cukup tinggi mengindikasikan bahwa tanah tercemar minyak bumi dapat melakukan restorasi sendiri meskipun dalam

jangka waktu yang cukup lama. Selain itu, mikoriza indigenous ini dapat digunakan untuk agen hayati untuk pengelolaan tanah tercemar minyak dengan cara mengoptimalkan pertumbuhan yang maksimal dari asosiasi mikoriza dan tumbuhan inang yang ada di tanah tercemar minyak.

C. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Meningkatkan Ketersediaan Hara Esensial

1. Kadar P-tersedia

Berdasarkan analisis terhadap efektifitas bakteri hasil identifikasi dari tanah tercemar minyak terhadap kadar P-tersedia diperoleh hasil seperti pada Tabel 4.10 berikut ini.

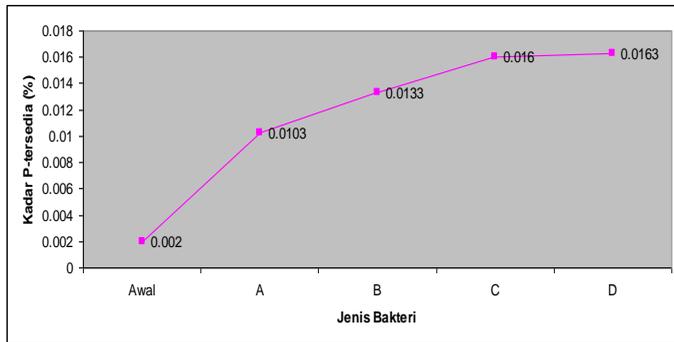
Tabel 4.10. Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar P Diukur Setelah Hari Ke-30

Jenis Bakteri*	Kadar P-tersedia (%)	Persentase Peningkatan P-tersedia (%)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	0.0103 ± 0.1520	21.00
<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>	0.0133 ± 0.0008	29.13
<i>Flavobacterium odoratum</i>	0.0160 ± 0.0101	55.34
<i>Enterococcus sp</i>	0.0163 ± 0.0116	58.25

* Kadar P awal = 0,01% (kategori sangat rendah)

Pada Tabel 4.10. diketahui bahwa secara keseluruhan telah terjadi peningkatan kadar P di dalam tanah. Peningkatan kadar P-tersedia paling tinggi terjadi pada tanah dengan pemberian bakteri *Enterococcus sp*. Bakteri tersebut dapat meningkatkan kadar P-tersedia di dalam tanah sebesar 0.0163% dengan persentase kenaikan kadar P-tersedia hingga 58.25%. Kenaikan tersebut lebih besar daripada pemberian bakteri dari genus lainnya. Kadar P-tersedia paling rendah pada akhir penelitian yaitu 0.0103% yang terjadi pada tanah dengan

pemberian bakteri *Pseudomonas pseudomallei* dengan persentase peningkatan kadar P-tersedia 21 %. Berdasarkan data pada Tabel 4.10, maka dapat dibuat grafik peningkatan kadar P-tersedia pada Gambar 4.1 berikut ini.



Gambar 4.1. Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar P-tersedia Diukur Setelah Hari Ke-30

Keterangan :

- Awal = hari ke-0 tanpa sterilisasi tanah
- A, B, C, D = hari ke-30.
- A = penambahan *Pseudomonas pseudomallei*
- B = penambahan *Pseudomonas fluorescens-25*
- C = penambahan *Flavobacterium odoratum*
- D = penambahan *Enterococcus sp*

Grafik di atas menunjukkan peningkatan kadar P-tersedia di dalam tanah. Penambahan bakteri *Enterococcus sp* menunjukkan kadar P-tersedia di dalam tanah mengalami peningkatan paling tinggi. Kadar P-tersedia paling rendah terjadi pada tanah dengan penambahan bakteri *Pseudomonas pseudomallei* yaitu 0.0103%.

Berdasarkan analisis data hasil penelitian menunjukkan bahwa telah terjadi kenaikan kadar P-tersedia di tanah. Pada Tabel 4.10 dapat diketahui bahwa

secara keseluruhan telah terjadi peningkatan kadar P-tersedia di dalam tanah. Peningkatan kadar P-tersedia paling tinggi terjadi pada tanah dengan pemberian kombinasi bakteri *Enterococcus sp.* Bakteri tersebut dapat meningkatkan kadar P-tersedia di dalam tanah sebesar 0.0163% dengan persentase kenaikan kadar P-tersedia hingga 58.25%. Kenaikan tersebut lebih besar daripada pemberian bakteri lainnya. Kadar P-tersedia paling rendah pada akhir penelitian yaitu 0.0103% yang terjadi pada tanah dengan pemberian bakteri *Pseudomonas pseudomallei* dengan persentase peningkatan kadar P-tersedia 21 %.

Bakteri-bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon yang terkandung di dalam minyak bumi, yang mudah ditemukan pada tanah yang tercemar minyak bumi. Namun berdasarkan data pada Tabel 4.10. dan Gambar 4.1. menunjukkan bahwa bakteri yang ditambahkan ke dalam tanah memiliki kemampuan juga dalam meningkatkan ketersediaan P-tersedia di dalam tanah. Artinya, bakteri-bakteri tersebut juga memiliki kemampuan melarutkan P yang terjerap kuat pada tanah tercemar minyak menjadi P-tersedia di tanah.

Dari data penelitian (Tabel 4.10 dan Gambar 4.1) menunjukkan bahwa penggunaan bakteri *Enterococcus sp* paling efektif dalam meningkatkan kadar P-tersedia di dalam tanah. Peningkatan P-tersedia di dalam tanah disebabkan karena adanya asam-asam organik yang dihasilkan oleh bakteri diantaranya adalah asam sitrat, glutamat, suksinat, laktat, oksalat, glioksalat, malat, fumarat, tartarat, dan α -ketobutirat. Mikroba menghasilkan asam-asam organik tersebut melalui proses katabolisme glukosa dan siklus asam trikarboksilat (TCA), yang merupakan kelanjutan dari reaksi glikolisis. Asam-asam organik tersebut berikatan dengan ion-ion yang mengikat P dan menurunkan pH, sehingga P akan

berubah dari P terikat menjadi P-tersedia (Kumar *et al.*, 2018). Oleh sebab itu, mikroorganisme tanah yang dapat melarutkan fosfat memegang peranan dalam memperbaiki defisiensi P pada tanah tercemar minyak.

Pelarutan P oleh mikroorganisme tergantung pada pH tanah. Meningkatnya asam-asam organik yang dihasilkan dalam metabolisme bakteri biasanya diikuti dengan penurunan pH, sehingga mengakibatkan terjadinya pelarutan P yang terikat. Pada pH netral atau basa yang memiliki kandungan kalsium tinggi, sehingga terjadi pengendapan kalsium fosfat. Mikroorganisme mampu melarutkan P dan mengubahnya sehingga dengan mudah menjadi P tersedia bagi tanaman (Suleman *et al.*, 2018).

2. Kadar N

Berdasarkan analisis terhadap kadar N di tanah diperoleh hasil seperti pada Tabel 4.11 berikut ini.

Tabel 4.11 Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar N Diukur Setelah Hari Ke-30

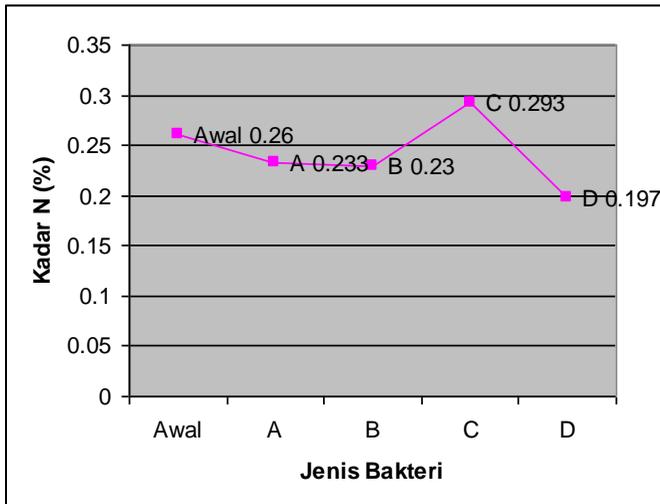
Jenis Bakteri*	Kadar N (%)	Kriteria Hardjowigeno (2003)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	0.233 ± 0.05	Sedang
<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>	0.230 ± 0.04	Sedang
<i>Flavobacterium odoratum</i>	0.293 ± 0.11	Sedang
<i>Enterococcus sp</i>	0.197 ± 0.07	Rendah

*Kadar N awal = 0,20% (kategori rendah)

Tabel 4.11. menjelaskan peningkatan kadar N di dalam tanah. Peningkatan kadar N tertinggi terjadi pada tanah dengan penambahan bakteri *Flavobacterium odoratum*. Kadar N 0.293% menurut Hardjowigeno (2003) termasuk dalam kriteria sedang. Kadar N terendah pada akhir penelitian terjadi pada tanah dengan

penambahan *Enterococcus sp.* Kadar N pada tanah tersebut mengalami penurunan menjadi 0.197% dari kadar N pada tanah tanpa penambahan jenis bakteri (0,20%). Kadar N 0.197% menurut Hardjowigeno (2003) termasuk dalam kriteria rendah.

Dari hasil analisis pada Tabel 4.11. dibuat grafik pada Gambar 4.2. di bawah ini.



Gambar 4.2. Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar N Diukur Setelah Hari Ke-30

Keterangan :

- Awal = hari ke-0 tanpa sterilisasi tanah
- A, B, C, D = hari ke-30.
- A = penambahan *Pseudomonas pseudomallei*
- B = penambahan *Pseudomonas fluorescens-25*
- C = penambahan *Flavobacterium odoratum*
- D = penambahan *Enterococcus sp*

Grafik 4.2 menunjukkan perubahan N sebelum dan setelah 30 hari penelitian, perubahan kadar N di

dalam tanah diakibatkan penambahan jenis bakteri. Namun menurut kriteria Hardjowigeno (2003) secara umum kadar N tidak berubah, artinya kadar N tetap berada pada kriteria sedang yaitu berkisar 0.21%-0.50%.

Peningkatan kadar N di dalam tanah terjadi karena adanya penguraian senyawa hidrokarbon oleh bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon. Bakteri ini mampu menghasilkan enzim hidroksilase, yang dapat mengoksidasi hidrokarbon. Bakteri ini mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon minyak bumi dengan cara memotong rantai hidrokarbon menjadi lebih pendek, serta menggunakannya sebagai sumber karbon tunggal dan energi untuk proses respirasi aerob (Das dan Chandran, 2011). Proses degradasi akan melepaskan N yang terikat pada senyawa hidrokarbon, sehingga N meningkat. Penurunan N pada media tanah dengan penambahan bakteri dapat terjadi karena imobilisasi N oleh bakteri itu sendiri, teroksidasi oleh udara dan terlarut dalam tanah yang tergenang air. N merupakan unsur yang sangat penting bagi bakteri, karena unsur penyusun asam amino, protein, dan berbagai struktur sel yang mengandung protein. Semua proses metabolisme dan regulasi melibatkan peran unsur hara N mengingat N sebagai penyusun enzim dan hormon (Leghari *et al.*, 2016).

3. Kadar C/N rasio

Berikut ini adalah data perubahan C/N rasio yang diperoleh dalam penelitian dengan menggunakan jenis bakteri yang berbeda pada tanah tercemar minyak bumi.

Tabel 4.12. Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap C/N Rasio Tanah Diukur Setelah Hari Ke-30

Jenis Bakteri	C/N rasio	Kriteria hardjowigeno (2003)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	15.64 ± 9.56	Sedang
<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>	16.73 ± 5.28	Tinggi
<i>Flavobacterium odoratum</i>	11.72 ± 3.50	Sedang
<i>Enterococcus sp</i>	17.11 ± 4.95	Tinggi

*C/N rasio awal = 42,7 (kategori sangat tinggi)

Pada Tabel 4.12 menunjukkan perubahan nilai C/N rasio tanah akibat kerja bakteri indigenous yang berbeda. Menurut Hardjowigeno (2003) angka C/N rasio tersebut termasuk dalam kriteria tinggi yang berkisar antara 16-25. Namun demikian pada Tabel 4.12 diperoleh C/N rasio yang mendekati C/N rasio tanah sebesar 11.72, yaitu dengan penambahan bakteri *Flavobacterium odoratum*. C/N rasio tanah sebesar 11.72 masih dalam kriteria sedang yang mendekati C/N rasio tanah yaitu berkisar antara 11-15.

Tingginya C/N rasio berdasarkan data yang diperoleh mengindikasikan bahwa bahan organik yang ada pada tanah tercemar minyak bumi belum semua terdegradasi. Jadi unsur C dan N masih relative tinggi yang terikat dalam bahan organik tersebut.

D. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Menurunkan Kadar Total Petroleum Hydrocarbone (TPH)

Dari hasil analisis terhadap kadar TPH dengan pemberian jenis bakteri yang berbeda pada tanah tercemar minyak bumi, diperoleh data pada Tabel 4.13. berikut ini.

Tabel 4.13. Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar TPH Tanah Diukur Setelah Hari Ke-30

Jenis Bakteri	Kadar TPH (mg/kg)	Persentase Penurunan TPH (%)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	26235 ± 2580.0	36,32
<i>Pseudomonas fluorescens-25</i>	25390 ± 1186.0	38,37
<i>Flavobacterium odoratum</i>	26030 ± 1420.0	36,82
<i>Enterococcus sp</i>	25420 ± 1373.3	38,30

*Kadar TPH awal = 41.200 mg/Kg

Pada Tabel 4.13 dapat diketahui bahwa persentase penurunan TPH tertinggi sebesar 38.37 % dengan penambahan bakteri *Pseudomonas fluorescens-25*, yang ditunjukkan dengan kadar TPH terendah pada akhir penelitian yaitu sebesar 25390 mg/kg. Persentase penurunan TPH terendah yaitu sebesar 36,32 % pada tanah dengan penambahan bakteri *Pseudomonas pseudomallei*, yang ditunjukkan dengan kadar TPH sebesar 26030 mg/kg.

Dari data tersebut dapat diketahui bahwa telah terjadi penurunan TPH pada tanah tercemar minyak akibat penambahan bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon. Dari data penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian jenis bakteri berpengaruh terhadap kadar TPH dan persentase penurunan TPH. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang paling optimal dalam meningkatkan degradasi TPH adalah *Pseudomonas fluorescens-25* yang menunjukkan bahwa bakteri ini adalah bakteri pendegradasi hidrokarbon, karena mampu menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon tunggal.

Penurunan TPH disebabkan karena proses degradasi senyawa-senyawa hidrokarbon oleh bakteri yang ditambahkan ke dalam tanah tercemar minyak bumi.

Perbedaan hasil TPH yang didegradasi pada akhir penelitian dapat disebabkan oleh berbagai faktor. Selain faktor kemampuan bakteri itu sendiri dalam mendegradasi senyawa-senyawa hidrokarbon juga dapat disebabkan karena faktor lingkungan yang mendukung kelangsungan proses degradasi senyawa hidrokarbon oleh bakteri menjadi optimal.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan mikroorganisme yang aktif dalam tanah tercemar minyak dan mampu mendegradasi beberapa polutan diantaranya adalah *petroleum hydrocarbon*. Bakteri ini mendegradasi bahan organik karbon dan menggunakannya sebagai sumber energi, sehingga kandungan bahan organik karbon di dalam tanah tercemar minyak bumi menjadi berkurang, termasuk dapat mendegradasi komponen hidrokarbon aromatik, termasuk benzena dan toluena (Meenakshisundaram dan Bharathiraja, 2014).

Mekanisme biodegradasi benzena diawali dengan pemecahan cincin aromatik oleh enzim dioksigenase. Mikroba membentuk senyawa dihidrodil pada komponen aromatik bercincin tunggal. Selanjutnya mikroba melakukan metabolisme dan menghasilkan senyawa katekol atau protokatekol. Senyawa ini kemudian dipecah dengan satu dari dua mekanisme yaitu mekanisme ortho (*Ortho pathway*) atau mekanisme meta (*Meta-cleavage pathway*).

Mekanisme ortho yaitu memotong inti aromatik dari katekol atau protokatekol antara dua gugus hidroksil menjadi bentuk mukonat dan mukonolaktone. Selanjutnya terjadi metabolisme 4-oksiadipat enol-laktone diikuti 3-oksiadipat (β -ketoadipat). Dilanjutkan dengan proses metabolisme terakhir yaitu siklus Krebs yang menghasilkan senyawa antara asetil-CoA dan suksinat (Dobslaw dan Engesser, 2014). Mekanisme meta yaitu memotong cincin yang berdekatan antara dua kelompok hidroksil, dan menghasilkan 2-hidroksil-mukonik semi aldehyd. Hasil metabolisme selanjutnya adalah asam piruvat, asam format dan

asetaldehid, kemudian masuk ke siklus Krebs yang pada akhirnya menghasilkan H₂O, CO₂ dan senyawa-senyawa lanjutan (Mahiudddin *et al.*, 2012).

Selain benzena, degradasi senyawa fenol dapat dilakukan lebih mudah dibandingkan dengan senyawa hasil sintetik derivat atau homolog aromatis. Hal ini lebih disebabkan karena senyawa ini telah lebih lama dikenali oleh bakteri pendegradasi. Proses pemecahan fenol dan mineralisasi dilakukan berbagai organisme melalui pemecahan cincin aromatis fenol. Fenol hidroksilase adalah enzim pertama yang terlibat dalam metabolisme oksidatif fenol, diikuti oleh degradasi lebih lanjut baik melalui jalur meta atau ortho. Fenol hidroksilase mengubah fenol menjadi katekol, yang kemudian dikonversi melalui jalur meta menjadi semialdehida 2-hidroksimukonat oleh enzim catechol 2,3-dioksigenase (Ahmad *et al.*, 2016).

Biodegradasi oleh mikroba dilakukan dengan mengubah substansi melalui proses metabolisme atau enzimatik. Hal ini didasarkan pada dua proses: pertumbuhan dan kometabolisme. Dalam pertumbuhan, polutan organik digunakan sebagai sumber tunggal karbon dan energi. Proses ini menghasilkan degradasi lengkap (mineralisasi) polutan organik. Kometabolisme didefinisikan sebagai metabolisme suatu senyawa organik dengan adanya substrat pertumbuhan yang digunakan sebagai karbon utama dan sumber energi (Joutey *et al.*, 2013). Sebelum proses biodegradasi dilakukan, bakteri terlebih dahulu melakukan biotransformasi yaitu mengubah senyawa hidrokarbon menjadi senyawa lain, namun dalam hal ini proses mineralisasi tidak sempurna (Serrano-Gonzalez *et al.*, 2018). Setelah biotransformasi baru dilanjutkan dengan mineralisasi untuk degradasi hidrokarbon secara utuh.

Rendahnya persentase penurunan kadar TPH akibat penambahan jenis bakteri pendegradasi hidrokarbon kemungkinan disebabkan karena proses degradasi senyawa hidrokarbon yang dilakukan oleh bakteri tersebut masih pada

tahap biotransformasi. Artinya pada tahap tersebut hanya dihasilkan senyawa-senyawa lanjutan yang belum terdegradasi secara sempurna. Senyawa-senyawa lanjutan tersebut akan dimineralisasikan oleh bakteri lain yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon.

E. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Pembentukan Bintil Akar dan Infeksi Mikoriza

Data hasil penelitian mengenai bintil akar pada tanaman kedelai pada berbagai kombinasi coba mikroorganisme disajikan pada Tabel 4.14 berikut.

Tabel 4.14 Pengaruh Kombinasi Organisme Terhadap Data Bintil Akar dan Persentase Mikoriza pada Tanaman Kedelai

Perlakuan	Σ Biomassa Bintil Akar (g)	Biomassa Bintil Aktif (g)	Biomassa Bintil Non Aktif (g)	Persentase infeksi mikoriza (%)
M	-	-	-	41,43
R	0,20	0,17	0,03	-
B1	-	-	-	-
B2	-	-	-	-
B3	-	-	-	-
MR	-	-	-	-
MB1	0,09	0	0,09	-
MB2	0,14	0,06	0,08	-
MB3	-	-	-	-
MRB1B3	0,20	0,12	0,08	31,97
MRB2B3	0,12	0,06	0,06	44,78
MB1B2	-	-	-	32,35
MB1B3	0,14	0,04	0,10	48,62
MB2B3	0,10	0	0,10	21,57
RB1B2	0,17	0,15	0,02	-
RB1B3	-	-	-	-
RB2B3	0,09	0,07	0,02	-
RB1	-	-	-	-
RB2	-	-	-	-
RB3	-	-	-	-
B1B2	0,09	0,02	0,06	-
B1B3	0,09	0,02	0,06	-
B2B3	-	-	-	-
MRB1	-	-	-	-
MRB2	-	-	-	32,26
MRB3	0,12	0,08	0,05	51,72
MRB1B2	0,15	0,10	0,05	-
Kontrol	-	-	-	-

Keterangan:

M : Mikoriza (*Glomus* sp)

R : *Rhizobium*

B1 : *Pseudomonas fluorescens-25*

B2 : *Flavobacterium odoratum*

B3 : *Enterococcus* sp

Tabel 4.14 menunjukkan bahwa biomassa tertinggi terdapat pada perlakuan MRB1B3, sementara biomassa terendah terdapat pada MB1. Sementara biomassa bintil akar aktif tertinggi terdapat pada perlakuan R, RB1B2, MRB1B3 namun terdapat banyak perlakuan yang tidak berhasil menghasilkan bintil akar aktif. Perlakuan terbaik yang memberikan persentase infeksi mikorhiza optimal terdapat pada perlakuan MB1B3 dan MRB3.

Berdasarkan hasil analisis terhadap jumlah bintil akar, biomassa bintil aktif, biomassa bintil non aktif, dan persentase infeksi mikoriza (Tabel 4.14) secara umum menunjukkan bahwa terbentuknya bintil akar pada tanaman kedelai dipengaruhi oleh keberadaan bakteri *Rhizobium* pada media termasuk juga interaksi dengan bakteri lainnya serta keberadaan mikoriza. Sementara itu persentase infeksi mikoriza tergantung pada keberadaan mikoriza, bahkan interaksi dengan bakteri lainnya justru memberikan hasil yang lebih baik. Takacs *et al.*, (2018) melaporkan multisimbiosis antara mikoriza, bakteri, dan tanaman inang memberikan efek yang lebih besar terhadap pembentukan kolonisasi akar dan memiliki dampak yang lebih besar terhadap proses bioremediasi hidrokarbon.

F. Peranan Multisimbiosis Organisme Dalam Pertumbuhan Tanaman Uji

Data hasil pertumbuhan tanaman kedelai akibat perlakuan dengan kombinasi organisme disajikan pada Tabel 4.15 berikut.

Tabel 4.15. Pengaruh Kombinasi Organisme Terhadap Parameter Pertumbuhan Tanaman Kedelai

Perlakuan	Pertumbuhan tanaman			
	Rerata Tinggi Tanaman (cm)	Rerata Biomassa (g)	Rerata Panjang Akar (cm)	Rerata Jumlah Daun
M	47,83 abcde	1,10 ab	15,33 a	9,00 abcde
R	21,00 ab	0,37 ab	7,17 a	2,67 a
B1	49,75 abcd	4,15 abc	52,00 b	19,50 abcde
B2	23,33 ab	1,30 ab	14,30 a	8,00 abcde
B3	45,33 abcd	2,33 ab	19,70 a	12,67 abcde
MR	16,67 a	0,20 a	8,20 a	6,67 abcde
MB1	34,67 abc	0,23 a	6,00 a	6,00 abcd
MB2	55,67 abcde	2,93 abc	12,00 a	16,00 abcde
MB3	18,50 a	0,15 a	5,67 a	4,33 ab
MRB1B3	64,00 bcde	3,50 abc	12,67 a	19,00 abcde
MRB2B3	46,40 abcd	1,37 ab	7,17 a	10,67 abcde
MB1B2	107,00 fg	3,34 abc	9,33 a	20,33 bcdef
MB1B3	108,00 fg	2,97 abc	16,67 a	21,00 cdef
MB2B3	73,33 cdef	3,47 abc	6,17 a	17,00 abcde
RB1B2	123,33 g	7,50 d	16,00 a	35,00 f
RB1B3	49,33 abcde	2,90 abc	8,40 a	13,67 abcde
RB2B3	50,67 abcde	1,00 ab	17,00 a	9,33 abcde
RB1	64,00 bcde	2,43 abc	12,00 a	15,00 abcde
RB2	32,67 abc	1,70 abc	8,40 a	11,00 abcde
RB3	33,33 abc	0,23 a	5,00 a	8,00 abcde
B1B2	33,67 abc	0,83 ab	6,67 a	6,67 abcde
B1B3	49 abcde	1,83 bc	8,67 a	10,67 abcde
B2B3	56 abcde	4,73 c	15,67 a	23,00 ef
MRB1	36 abcd	0,43 ab	9,00 a	10,33 abcde
MRB2	41,77 abcd	0,90 a	9,17 a	4,67 abc
MRB3	90,67 efg	3,70 bc	12,00 a	21,67 def
MRB1B2	79,67 def	2,90 abc	11,17 a	15,33 abcde
Kontrol	26,33 ab	0,70 ab	9,67 a	7,00 abcde

Keterangan

- M : Mikoriza (*Glomus* sp)
- R : *Rhizobium*
- B1 : *Pseudomonas fluorescens-25*
- B2 : *Flavobacterium odoratum*
- B3 : *Enterococcus* sp

Data pertumbuhan tanaman kedelai pada 90 hari setelah tanam (HST) dapat dianalisis sebagaimana berikut.

1. Biomassa Tanaman Kedelai

Uji ANAVA menunjukkan bahwa hasil biomassa yang diperoleh adalah signifikan artinya perlakuan pemberian berbagai kombinasi organisme coba berpengaruh terhadap biomassa tanaman kedelai. Untuk mengetahui beda pada masing-masing perlakuan dilakukan analisis lanjutan menggunakan uji Duncan. Hasil uji Duncan (Tabel 4.15) menunjukkan bahwa terdapat beda perlakuan antara MB₃, MR, RB₃, MB₁ dengan B₂B₃ dan RB₁B₂, sedangkan perlakuan yang lain tidak berbeda nyata. Berdasarkan Tabel 1 diketahui pula bahwa perlakuan RB₁B₂ memberikan biomassa yang tertinggi, sedangkan perlakuan yang memberi biomassa yang terendah terdapat pada perlakuan MB₃ dan MR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dengan kombinasi tiga organisme coba, baik Mikorhiza dan Bakteri (MB₁B₂, MB₁B₃) maupun *Rhizobium* dan Bakteri (RB₁B₂) ataupun mikorhiza, *Rhizobium* dan Bakteri (M, R, B₃) memberikan biomassa tanaman kedelai yang terbaik dibandingkan hanya dengan satu organisme coba (B, M, R) atau dua kombinasi organisme coba.

2. Tinggi Tanaman Kedelai

Uji ANAVA menunjukkan bahwa hasil tinggi tanaman yang diperoleh adalah signifikan artinya perlakuan pemberian berbagai kombinasi organisme coba berpengaruh terhadap tinggi tanaman kedelai. Untuk mengetahui beda pada masing-masing perlakuan dilakukan analisis lanjutan menggunakan uji Duncan. Hasil uji Duncan (Tabel 4.15) menunjukkan bahwa terdapat beda perlakuan antara MR, MB₃ dengan MB₁B₂, RB₁, MRB₃, RB₁B₂ dan MRB₁B₂, sedangkan perlakuan yang lain tidak berbeda nyata. Berdasarkan Tabel 4.15 diketahui pula bahwa perlakuan pada RB₁B₂ menunjukkan tinggi tanaman yang tertinggi, sedangkan

perlakuan yang tinggi tanaman yang terendah terdapat pada perlakuan MR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dengan kombinasi tiga organisme coba, baik Mikorhiza dan Bakteri (MB1B2,MB1B3) maupun *Rhizobium* dan Bakteri (RB1B2) ataupun mikorhiza, *Rhizobium* dan Bakteri (M,R,B3) tinggi tanaman kedelai yang terbaik dibandingkan hanya dengan satu organisme coba (B,M,R) atau dua kombinasi organisme coba.

3. Panjang Akar Tanaman Kedelai

Uji ANAVA menunjukkan bahwa hasil panjang akar tanaman yang diperoleh adalah signifikan artinya perlakuan pemberian berbagai kombinasi organisme coba berpengaruh terhadap panjang akar tanaman kedelai. Untuk mengetahui beda pada masing-masing perlakuan dilakukan analisis lanjutan menggunakan uji Duncan. Hasil uji Duncan (Tabel 4.15) menunjukkan bahwa terdapat beda perlakuan antara B1 dengan semua perlakuan, sedangkan perlakuan yang lain tidak berbeda nyata. Berdasarkan Tabel 4.15 diketahui pula bahwa perlakuan B1 memberikan panjang akar tanaman yang tertinggi, sedangkan perlakuan yang panjang akar tanaman yang terendah terdapat pada perlakuan RB3.

4. Jumlah Daun Tanaman Kedelai

Hasil test dengan Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data berdistribusi normal, dan hasil analisis varians menunjukkan bahwa ada pengaruh perlakuan organisme coba terhadap jumlah daun tanaman Kedelai. Hasil ANAVA menunjukkan signifikansi 0,004. Selanjutnya uji Duncan (Tabel 4.15) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang nyata pada setiap perlakuan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat beda perlakuan antara R dengan B2B3 dan RB1B2, sedangkan perlakuan yang lain tidak berbeda nyata. Berdasarkan Tabel 4.15 diketahui pula bahwa perlakuan MRB3 memberikan jumlah daun tanaman

yang tertinggi. Sementara perlakuan yang memberikan jumlah daun yang terendah terdapat pada perlakuan R. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dengan kombinasi tiga organisme coba (MB1B3), memberikan jumlah daun tanaman kedelai yang terbaik dibandingkan hanya dengan satu organisme coba (B,M,R) atau dua kombinasi organisme coba.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum pemberian dengan kombinasi tiga organisme coba, baik Mikorhiza dan Bakteri maupun *Rhizobium* dan Bakteri ataupun mikorhiza, *Rhizobium* dan Bakteri memberikan pengaruh terbaik pada biomassa, tinggi tanaman, panjang akar dan jumlah daun tanaman kedelai dibandingkan hanya dengan satu organisme coba atau dua kombinasi organisme coba (Tabel 4.15). Hal ini dapat dipahami ketika kita mengkaji dari masing-masing peran dari bakteri, mikoriza dan *Rhizobium* yang digunakan dalam penelitian ini.

Pada kondisi tanah tercemar minyak yang memiliki kadar P yang tersedia rendah, asosiasi antara tanaman dengan mikoriza meningkatkan ketersediaan P pada tumbuhan inang. Garces-Ruiz *et al.*, (2017) melaporkan bahwa mikoriza meningkatkan laju penyerapan unsur P pada tumbuhan jagung. Selain itu simbiosis antara mikoriza dan tanaman inang secara positif dapat meningkatkan konsentrasi unsur hara N, P, dan Fe pada *Pelargonium graveolens* L. yang tumbuh pada kondisi cekaman air (kekeringan). (Amiri *et al.*, 2017). Selain itu inokulasi mikoriza juga meningkatkan kadar P dan N pada jaringan tumbuhan *Chrysanthemum morifolium* (Wang *et al.*, 2018) dan meningkatkan berat kecambah dengan meningkatkan kadar air, kadar CO₂ sel, kadar P dan N pada tumbuhan *Leymus chinensis* (Jixiang *et al.*, 2017).

Pada penelitian sebelumnya juga ditunjukkan bahwa Lumpur Lapindo sebagai media tanam tempat ujicoba memiliki juga kandungan logam berat yang tinggi, oleh

karena itu dengan mikoriza akan berakibat positif pada tanaman karena dilaporkan bahwa inokulasi mikoriza dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan yang dapat meningkatkan toleransi tumbuhan terhadap keracunan logam berat (Abdelhameed dan Metwally, 2019). Li *et al.*, (2016) melaporkan bahwa simbiosis antara mikoriza dengan tumbuhan dapat mengurangi serapan logam Arsenik (As) dan dapat mereduksi keracunan As pada tumbuhan. Selain itu Abdelhameed dan Metwally (2019) melaporkan bahwa inokulasi dengan mikoriza dapat menurunkan kadar Cadmium (Cd) pada tanah yang tercemar logam Cd.

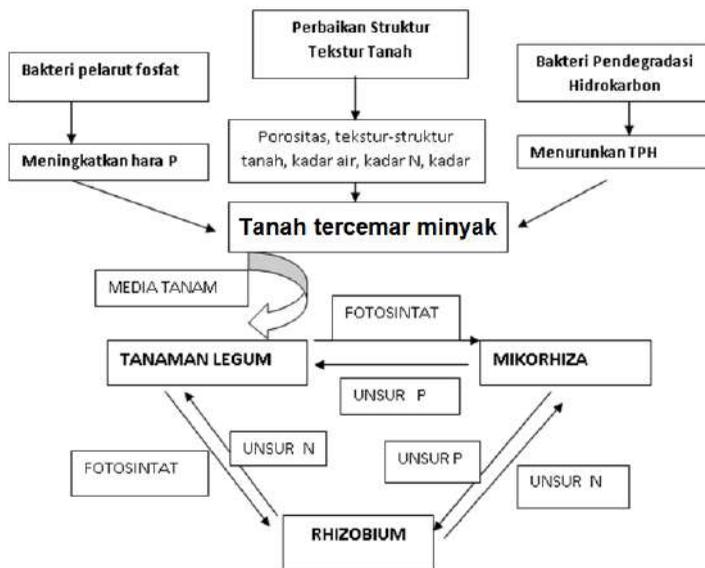
Kehadiran populasi mikroba yang mampu mengurai minyak sekaligus yang memiliki kemampuan dalam melarutkan P digunakan dalam penelitian ini. Terdapat 3 isolat *indigenous* yang digunakan dalam penelitian ini yang diisolasi dari penelitian sebelumnya. Kehadiran bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon memberikan kemungkinan bahwa melimpahnya senyawa hidrokarbon yang ada pada tanah tercemar minyak akan dapat dipecah menjadi senyawa atau unsur yang bermanfaat bagi tanaman.

Kemampuan bakteri yang dtambahkan dalam melarutkan P juga memberikan keuntungan terhadap pertumbuhan tanaman. Seperti diketahui bahwa cadangan P dalam tanah umumnya berada dalam bentuk tidak tersedia bagi tanaman. Beberapa mikroba tanah mempunyai kemampuan melarutkan P yang tidak larut dan menjadikan tersedia bagi tanaman, yang dapat dilarutkan dengan asam organik. Dalam aktivitasnya mikroba pelarut P akan menghasilkan asam-asam organik diantaranya asam asetat, asam format (asam monokarboksilat); laktat, glukonat, glikolat (hidroksi asam monokarboksilat); 2-keto glukonat (asam keto monokarboksilat); oksalat, suksinat (asam dicarboksilat); malic (asam hidroksi dicarboxylic); dan sitrat (asam tricarboxylichydroxy) (Prabhu *et al.*, 2019). Meningkatnya asam-asam organik tersebut biasanya diikuti dengan penurunan pH. Di lingkungan alami atau dalam kondisi *in vitro*, ion mineral *chelate* atau pH yang rendah (asam) dapat

memicu pelarutan fosfat. Akibatnya, pengasaman sel mikroba dan sekitarnya menyebabkan pelepasan ion P dari mineral P oleh substitusi H^+ untuk Ca^{2+} (Khan *et al.*, 2014). Meningkatkan kadar P yang tersedia dalam tanah dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman mengingat unsur P adalah elemen penting dalam asam nukleat, fosfolipid, protein-fosfat dan metabolit. Dimana hal ini mencakup semua aspek fisiologis dari pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Mehra *et al.*, 2018).

G. Model Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak

Berdasarkan kajian hasil penelitian, berikut ini disusunlah model bioremediasi tanah tercemar minyak.



Gambar 4.3. Model bioremediasi tanah tercemar minyak dengan memanfaatkan pola multisimbiotik organisme.

Dari model di Gambar 4.3 menunjukkan bagaimana peran tiap-tiap organisme yang membangun hubungan multisimbiotik, yaitu antara tanaman legum, bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, mikoriza, dan bakteri rhizobium. Seperti diketahui bahwa tanaman legum adalah tanaman yang memiliki kekhasan karena kemampuannya melakukan simbiosis mutualisme dengan bakteri penambat N_2 , yaitu rhizobium sehingga tanaman legum mampu melakukan fiksasi N_2 melalui pemanfaatan bakteri yang ada di bintil akarnya.

Pada model tersebut menggambarkan bagaimana simbiosis yang terjadi antara tanaman legum, rhizobium yang merupakan bakteri yang “menginfeksi” bintil akar dan jamur mikoriza (melalui mekanisme simbiosis tripartit), masing-masing komponen simbiosis memiliki peranan yang berbeda. Tanaman berperan memberi fotosintat baik untuk bakteri rhizobium dan jamur mikoriza, sedangkan bakteri rhizobium mensuplai N untuk tanaman melalui kegiatan fiksasi N_2 . Jamur mikoriza memberi P dan unsur hara lainnya untuk tanaman dan rhizobium.

Simbiosis tripartit yang melibatkan interaksi antara organisme mikoriza, rhizobium, dan tanaman legum dikuatkan pola interaksinya melalui kehadiran bakteri pelarut fosfat dan bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon dalam system lingkungan dimana tanaman hidup. Kehadiran bakteri pelarut fosfat yang memiliki kemampuan mengubah unsur P yang terjerap dalam kondisi yang tidak mudah dimanfaatkan oleh tanaman menjadi bentuk tersedia sehingga dapat dimanfaatkan tanaman melalui mekanisme dilepaskan ke rhizosfer asam fosfatase dan asam-asam organik lainnya. Di sisi lain, senyawa hidrokarbon yang tinggi di dalam tanah tercemar minyak akan difasilitasi untuk didegradasikan menjadi senyawa yang lebih sederhana atau dimineralisasikan menjadi unsur-unsur yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman melalui peran bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, yang tidak jarang juga memiliki kemampuan dalam melarutkan P. Tingginya senyawa hidrokarbon yang sudah

diturunkan kadarnya oleh bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, dapat ditunjukkan oleh salah satu indikator yaitu penurunan kadar TPH di tanah tercemar minyak yang dibarengi dengan diturunkannya rasio C/N rasio yang mengarah pada C/N rasio tanah.

Perbaikan struktur dan tekstur tanah yang menekankan dari sifat fisika dan kimia tanah juga memegang peran penting mengingat peran masing-masing simbiosis yang membangun hubungan multisimbiotik organisme sangat ditentukan oleh faktor lingkungan yang membangun sifat fisika dan kimia tanah agar semua organisme dapat menjalankan mekanisme metabolisme yang menopang hidupnya dengan optimal.

Berdasarkan hasil analisis dan model bioremediasi tanah tercemar minyak yang sudah disusun, maka pola pengelolaan tanah tercemar minyak yang diusulkan adalah sebagai berikut.

1. Pemanfaatan mikroorganisme *indigenous* (bakteri dan mikorhiza) daerah tercemar minyak,
2. Pemanfaatan tanaman sebagai agen hayati memiliki peran penting keberhasilan bioremediasi tanah tercemar minyak, yaitu tanaman yang memiliki potensi kemampuan sebagai bioremediator yang berasal dari daerah wilayah tercemar minyak,
3. Pengolahan struktur dan tekstur tanah berdasarkan sifat kimia dan fisika tanah yang memungkinkan berlangsungnya multisimbiosis organisme dapat menjalankan metabolisme dan fungsinya dengan baik sesuai peran masing-masing simbiosis,
4. Memanfaatkan peran simbiosis tripartite antara tanaman legume, mikoriza, dan bakteri penambat N₂ sehingga terjalin hubungan multisimbiotik organisme antara tanaman Legume, bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, mikoriza, bakteri penambat N. Sebagai konsekuensinya akan terjadi

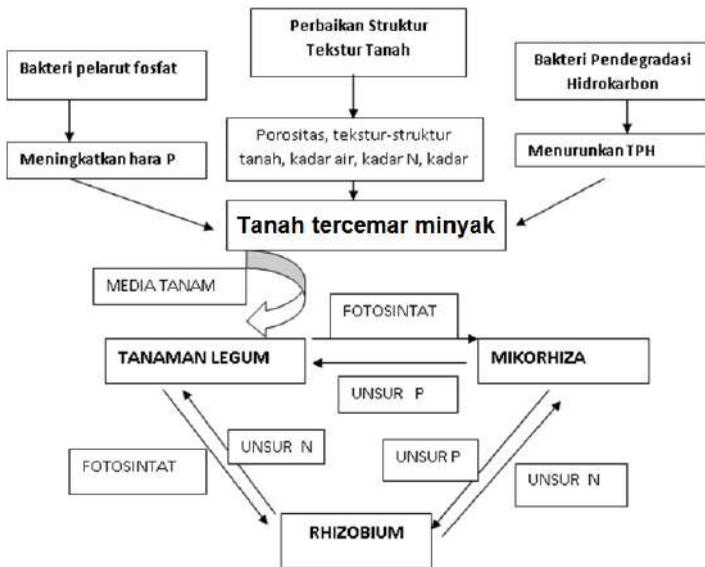
peningkatan proses degradasi senyawa hidrokarbon (akibat tercemar minyak) dan proses mineralisasi sehingga unsur-unsur esensial yang diperlukan tanaman akan tersedia bagi tanaman, melengkapi peran simbiosis dari mikoriza dan bakteri penambat N. Ketersediaan hara yang baik dan memadai bagi tanaman serta diturunkannya senyawa hidrokarbon yang melebihi ambang batas bagi tanaman akan menyebabkan keberhasilan pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Dengan demikian, pengelolaan tanah tercemar minyak dengan pendekatan yang menekankan interaksi peran yang baik antara tanaman dan organisme tanah akan menjadikan status hara tanaman juga terpelihara dengan baik mengingat media tanam juga mampu menyediakan unsur hara sesuai kebutuhan agar tanaman dapat tumbuh dengan baik.

BAB V

SIMPULAN DAN REKOMENDASI

A. Simpulan

Berdasarkan kajian hasil analisis data, model bioremediasi tanah tercemar minyak dengan memanfaatkan multisimbiotik organisme adalah sebagai berikut.



B. Rekomendasi

Berdasarkan hasil analisis dan model bioremediasi tanah tercemar minyak yang sudah disusun, maka pola pengelolaan tanah tercemar minyak yang diusulkan adalah sebagai berikut.

1. Pemanfaatan mikroorganisme *indigenous* (bakteri dan mikorhiza) daerah tercemar minyak,

2. Pemanfaatan tanaman sebagai agen hayati memiliki peran penting keberhasilan bioremediasi tanah tercemar minyak, yaitu tanaman yang memiliki potensi kemampuan sebagai bioremediator yang berasal dari daerah wilayah tercemar minyak,
3. Pengolahan struktur dan tekstur tanah berdasarkan sifat kimia dan fisika tanah yang memungkinkan berlangsungnya multisimbiosis organisme dapat menjalankan metabolisme dan fungsinya dengan baik sesuai peran masing-masing simbiosis,
4. Memanfaatkan peran simbiosis tripartite antara tanaman legume, mikoriza, dan bakteri penambat N₂ sehingga terjalin hubungan multisimbiotik organisme antara tanaman Legume, bakteri pelarut fosfat, bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon, mikoriza, bakteri penambat N. Sebagai konsekuensinya akan terjadi peningkatan proses degradasi senyawa hidrokarbon (akibat tercemar minyak) dan proses mineralisasi sehingga unsur-unsur esensial yang diperlukan tanaman akan tersedia bagi tanaman, melengkapi peran simbiosis dari mikoriza dan bakteri penambat N. Ketersediaan hara yang baik dan memadai bagi tanaman serta diturunkannya senyawa hidrokarbon yang melebihi ambang batas bagi tanaman akan menyebabkan keberhasilan pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Dengan demikian, pengelolaan tanah tercemar minyak dengan pendekatan yang menekankan interaksi peran yang baik antara tanaman dan organisme tanah akan menjadikan status hara tanaman juga terpelihara dengan baik mengingat media tanam juga mampu menyediakan unsur hara sesuai kebutuhan agar tanaman dapat tenggang dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., and Wassie, M. 2017. Application of microorganisms in bioremediation-review *Journal of Environmental Microbiology*. 1(1):02-09.
- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M. A., Naidu, R. 2016. Review on the Genetics of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbon Degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 178, 224–250.
- Abdelhameed, R. E., and Metwally, R. A. 2019. Alleviation of cadmium stress by arbuscular mycorrhizal symbiosis. *International Journal of Phytoremediation*, 1–9. doi:10.1080/15226514.2018.1556584.
- Abed, R. M. M., Al-Sabahi, J., Al-Maqrashi, F., Al-Habsi, A. and Al-Hinai, M., 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 89, pp. 58-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.006>.
- Ahmad, S. A., Shamaan, N. A., Syed, M. A., Khalid, A., Ab Rahman, N. A., Khalil, K. A., ... Shukor, M. Y. 2016. Meta-cleavage pathway of phenol degradation by *Acinetobacter* sp. strain AQ5NOL 1. *Rendiconti Lincei*, 28(1), 1–9. doi:10.1007/s12210-016-0554-2.
- Akunwumi, I. I., Diwa, D., and Obianigwe, N. 2014. Effects of crude oil contamination on the index properties, strength and permeability of lateritic clay. *Int J Appl Sci Eng Res* 3:816–824
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., & Ma, F. 2018. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*,

- Alonge, O. O., 2016. Analysis of the phytotoxic effects of diesel fuel contaminated derno-podzoluivisolic soils on plants and the impact of biopreparation pseudomin in detoxification under different soil moisture conditions. *International Journal of Advanced Biotechnology Research*, 6, (3): 370-372.
- Amiri, R., Ali, N., Nematollah, E., and Mohammad, R. S. 2017. Nutritional status, essential oil changes and water-use efficiency of rose geranium in response to arbuscular mycorrhizal fungi and water deficiency stress. *Symbiosis* 73, 15-25. doi: 10.1007/s13199-016-0466-z
- Anonim. 2011. *Eksplorasi, Isolasi dan Identifikasi Fungi Mikoriza Arbuskular Dan Bakteri Endosimbiotik Mikoriza dari Rizosfir Kelapa Sawit*. (<http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/52916/BAB%20III%20Eksplorasi,%20Isolasi%20Dan%20Identifikasi%20Fungi%20Mikoriza%20Arbuskular%20Dan%20Bakteri.pdf?sequence=5>) diakses tanggal 2 Agustus 2012
- Asrianti, A., Tuheteru, F. D., Husna., Kandari, AM., Mekuo, I. S., and Masnun. 2016. Status and Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi isolated from rhizosphere of Endemic and Endangered Species of Kalapi (Kalappia celebica Kosterm). *European Journal of Sustainable Development*, 5, 4, 395-402
- Arfarita, N., Lestari, M. W., Murwani, I., and Higuchi, T. 2017. Isolation of indigenous phosphate solubilizing bacteria from green bean rhizospheres. *Journal of Degraded Andmining Landsmanagement*. Volume 4, Number 3: 845-851.
- Atekan, Nuraini, Y., Handayanto, E., and Syekhfani. 2014. *Journal Of Degraded And Mining Lands Management*. Volume 1, Number 4: 175-182
- Athar, H. U., Ambreen, S., Javed, M., Hina, M., Rasul, S., Zafar, Z. U., Manzoor, H., Ogbaga, C. C., Afzal, M., Al-Qurainy, F and Ashraf, M., 2016. Influence of sublethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic

- capacity of maize (*Zea mays* L.) plants. *Environ Sci Pollut Res.* 23, (18): 18320–18331.
- Auge', R. M., Toler, H. D., and Saxton, A. M. 2016. Mycorrhizal stimulation of leaf gas exchange in relation to root colonization, shoot size, leaf phosphorus and nitrogen: a quantitative analysis of the literature using metaregression. *Front Plant Sci*; 7: 1084. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01084> PMID: 27524989.
- Bahmani, F., Ataei, S. A., and Mikaili, M. A. The Effect of Moisture Content Variation on the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soils: Modeling and Experimental Investigation. *Journal of Environmental Analytical Chemistry.* 5(2). doi: 10.4172/2380-2391.1000236.
- Bamidele, J. F and Igiri, A., 2011. Growth of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) in soil contaminated with crude petroleum oil. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 15, (2): 303-306.
- Bassey, I.U., Odokuma, L.O., Ogugbue, C.J., and Umeojiaku, C.F. 2019. Hydrocarbon Degradation Potentials Of Bacterial Species Isolated From Leachate Of Lemna Wasted UMP Site Calabar. *International Journal of Science, Engineering and Technology Research (IJSETR).* Volume 8, Issue 6.
- Baum, C., El-Tohamy, W., and Gruda, N. 2015. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Scientia Horticulturae.* 187, 131–141.
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., and Zhang, L. 2019. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 10:1068. doi: 10.3389/fpls.2019.01068.
- Bender, S. F., Conen, F., and van der Heijden, M. G. A. 2015. Mycorrhizal effects on nutrient cycling, nutrient leaching and

N₂O production in experimental grassland. *Soil Biology & Biochemistry*. 80, 283–292.
doi:10.1016/j.soilbio.2014.10.016

- Bernaola, L., and Stout, M. J. 2019. The net effect of colonization by AM fungi on herbivores may depend on the balance of the positive effects resulting from increases in concentrations of plant nutrients and the negative effects resulting from increases in plant defenses against herbivores. *Scientific Report Nature*. 9:14037. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50354-2>.
- Bian, X.-Y., Mbadanga, S. M., Liu, Y.-F., Yang, S.-Z., Liu, J.-F., Ye, R.-Q., Gu, J.-D., Mu, B.-Z. 2015. Insights into the Anaerobic Biodegradation Pathway of n-Alkanes in Oil Reservoirs by Detection of Signature Metabolites. *Sci. Rep.* 5, 9801.
- Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T. U., Munir, A., & Gurmani, A. R. 2019. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 1–13. doi:10.1080/01490451.2019.1654043
- Birhane, E., Sterck, F., Fetene, M., Bongers, F., and Kuyper, T. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* 169, 895–904. doi: 10.1007/s00442-012-2258-3.
- Borah, D. 2018. Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon: An Overview. Springer Nature Singapore Pte Ltd. *Microbial Action on Hydrocarbons*, <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-513>.
- Chairul, Noli, Z. A., Suwirman, Syahsuardi, and Reini. 2019. Exploration of Indigenous Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Post Mining Soil as Rehabilitation Strategy. *Journal Biology Science*. 19 (3): 218 – 223.
- Chen, Q., and Liu, S. 2019. Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32in

- Reclamation Soil in Shanxi, China. *Front. Microbiol.* 10:2171.doi: 10.3389/fmicb.2019.02171
- Cui, M., Ma, A., Qi, H., Zhuang, X., Zhuang, G. 2015. Anaerobic oxidation of methane: An “active” microbial process. *Microbiology Open.* 4, 1–11.
- Das, N. and P. Chandran, 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res. Int.* 10.4061/2011/941810.
- Devatha, C. P., Vishal, A. V., and Rao, J. P. C. 2019. Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Applied Water Science.* 9:89. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0970-4>.
- diCenzo, G. C., Zamani, M., Checucci, A., Fondi, M., Griffitts, J. S., Finan, T. M., and Mengoni, A. 2019. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Can. J. Microbiol.* 65: 1-33. [dx.doi.org/10.1139/cjm-2018-0377](https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0377).
- Dobslaw, D., and Engesser, K. H. 2015. Degradation of toluene by orthocleavage enzymes in Burkholderia fungorum FLU 100. *Microbial Biotechnology.* 8(1):143–154. doi:10.1111/1751-7915.12147.
- Effendi, A. J., and Aminati, T. 2019. Enhancing Bioremediation Of Crude Oil Contaminated Soil By Combining With Photocatalytic Process Using TiO₂ As Catalyst. *International Journal of GEOMATE.* Vol 17. Issue 64: 100-107.
- Eneh, O. C. 2011. A Review on Petroleum: Sources, Uses, Processing, Products, and the Environment. *Journal of Applied Sciences.* 11(12): 2084-2091.
- Faiza, R., Rahayu, Y. S., and Yuliani. 2013. Identifikasi Spora Jamur Mikoriza Vesikular Arbuskular (MVA) pada Tanah Tercemar Minyak Bumi di Bojonegoro. *LenteraBio* Vol. 2 No. 1: 7–11

- Fathepure, B.Z., 2014. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front. Microbiol.*, Vol. 5. 10.3389/fmicb.2014.00173
- Garcés-Ruiz, M., Calonne-Salmon, M., Plouznikoff, K., Misson, C., Navarrete-Mier, M., Cranenbrouck, S. 2017. Dynamics of short-term phosphorus uptake by intact mycorrhizal and non-mycorrhizal maize plants grown in a circulatory semi-hydroponic cultivation system. *Front. Plant Sci.* 8, 1471. doi: 10.3389/fpls.2017.01471
- Garcés-Ruiz, M., Senés-Guerrero, C., Declerck, S., Cranenbrouck, S. 2017. Community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with native plants growing in a petroleum-polluted soil of the Amazon region of Ecuador. *Microbiology Open*. 8:e703 <https://doi.org/10.1002/mbo3.703>
- Ghattas, A.-K., Fischer, F., Wick, A., Ternes, T.A. 2017. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. *Water Res.* 116, 268–295.
- Girigiri, B., Ariole, C. N., and Stanley, H. O. 2019. Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil Using Biofertilizer from Nitrogen-fixing and Phosphate-solubilizing Bacteria. *American Journal of Nanosciences*. Vol. 5, No. 4, 2019, pp. 27-38. doi: 10.11648/j.ajns.20190504.11
- González-Guerrero, M., Matthiadis, A., Saez, Á., Long, T. 2014. Fixating on metals: New insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Front. Plant Sci.* 5, 45.
- González, V., Santamaría, R. I, Bustos, P., Pérez-Carrascal, O. M., Vinuesa, P., Juárez, S., Martínez-Flores, I., Cevallos, M. Á., Brom, S., Martínez-Romero, E., and Romero, D. 2019. Phylogenomic Rhizobium Species Are Structured by a Continuum of Diversity and Genomic Clusters. *Front. Microbiol.* 10:910. doi: 10.3389/fmicb.2019.00910

- Grison, C.M., Jackson, S., Merlot, S., Dobson, A., Grison, C. 2015. *Rhizobium metallidurans* sp. nov., a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the anthyllis vulneraria Zn-hyperaccumulator. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1525–1530.
- Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Rontani, J.-F., Cros, M. Hirschler-Réa, A. 2011. Anaerobic oxidation of n-alkenes by sulphate-reducing bacteria from the genus *Desulfatiferula*: n-Ketones as potential metabolites. *Res. Microbiol.* 162, 915–922.
- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B. and Tewari, R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research* 167: 358– 363.
- Handayanto, E., dan Hairiah, K. 2007. *Biologi Tanah: Landasan Pengelolaan Tanah Sehat*. Pustaka Adipura: Yogyakarta.
- Hanifah, N. N., Yuliani, Fitrihidajati, H. 2018. Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Bumi dengan Penambahan Kompos Berbahan Baku Limbah Cair Tahu dan Kulit Pisang. *LenteraBio*. Vol. 7No. 1: 61–65
- Hao, X., Taghavi, S., Xie, P. Orbach, M.J., Alwathnani, H.A., Rensing, C. 2014. Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis. *Int. J. Phytoremediat.* 16, 179–202.
- Hardjowigeno, S. 2003. *Ilmu Tanah*. Jakarta: Akademi Pressindo
- Hassanshahian, M., Zeynalipour, M. S. and Musa, F. H. 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr Provenance). *Marine Pollution Bulletin*, vol. 82, no. 1-2, pp. 39-44.
- Hawkins, J.P., Geddes, B.A., and Oresnik, I.J. 2017. Succinoglycan production contributes to acidic pH tolerance in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Mol. Plant Microbe Interact.*

30(12): 1009-1019. doi:10.1094/MPMI-07-17-0176-R.
PMID:28871850.

- Ingraffia, R., Amato, G., Frenda, A. S., and Giambalvo, D. 2019. Impacts of arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake, N₂ fixation, N transfer, and growth in a wheat/faba bean intercropping system. *PLoS ONE*. 14(3):e0213672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213672>
- Jacquemyn, H., and Merckx, V. S. F. T. 2019. Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants. *Journal of Ecology*. 107: 1567–1581. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13165>.
- Jain, P. K., Gupta, V. K., Gaur, R. K., Lowry, M., Jaroli, D. P and Chauhan, U. K., 2011. Bioremediation of Petroleum oil Contaminated Soil and Water. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5: 1-26.
- Jangiam, W., J. Kalaya and B. Phonyotin. 2013. Isolation of Pseudomonas strain EM5 with an efficient nitrate-degrading activity and the optimum conditions for nitrate biodegradation using immobilized cells. *J. Sci. Technol. Humanit.*, 11: 105-115.
- Jixiang, L., Yingnan, W., Shengnan, S., Chunsheng, M., and Xiufeng, Y. 2017. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, photosynthesis and photosynthetic pigments of *Leymus chinensis* seedlings under salt-alkali stress and nitrogen deposition. *Sci. Total Environ.* 576, 234–241. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.091
- Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., and El Ghachtouli, N. 2013. Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. *Biodegradation - Life of Science*. doi:10.5772/56194.
- Jung, S. C., Martinez-Medina, A, Lo´pez-Ra´ez, J. A., and Pozo, M. J. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant

defences. *J Chem Ecol*; 38: 651–664.
<https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6> PMID:
22623151.

- Juhaidah, S.E., Yuliani, Rahayu, Y.S. 2009. Pengaruh Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* Dan Mikoriza Vesikular Arbuskular (MVA) *Glomus Agregatum* Terhadap Pertumbuhan Tanaman Kedelai (*Glycine Max L.*) Dan Kadar Total Petroleum Hidrokarbon (TPH) Pada Tanah Tercemar Minyak Bumi. Prosiding Seminar Nasional Biologi 2009, 17 Oktober 2009 di Jurusan Biologi, Universitas Negeri Surabaya, ISBN: 978-979-028-194-3.
- Khan S, Afzal M, Iqbal S Khan QM. 2013. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemo-sphere*. 90:1317–32. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.045. PMID:2305820.
- Khan M.S., Zaidi A., Ahmad E. 2014. *Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms*. In: Khan M., Zaidi A., Musarrat J. (eds) *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Springer, Cham
- Kleindienst, S., Paul, J. H., and Joye, S. B. 2015. Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 388–396. doi: 10.1038/nrmicro3452
- Kokkoris, V., Hamel, C., Hart, M. M. 2019. Mycorrhizal response in crop versus wild plants. *PLoS ONE* 14(8):e0221037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221037>.
- Kumar, A., Kumar, A., and Patel, H. 2018. Role of microbes in phosphorus availability and acquisition by plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 7, no. 5, pp. 1344–1347.
- Lambers, H., and Plaxton, W. C. 2018. P: back to the roots. *Annu. Plant Rev.* 48,3–22

- Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., Laghari, A. H., Bhabhan, G. M., Talpur, K. H., Bhutto, T. A., Wahocho, S. A., and Lashari, A. A. 2016. Role of Nitrogen for Plant Growth and Development: A Review. *Advanced in Environmental Biology*. 10 (9): 209-218.
- Liang, J. F., An, J., Gao, J. Q., Zhang, X. Y., Yu, F. H. 2018. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and soil nutrient addition on the growth of *Phragmites australis* under different drying-rewetting cycles. *PLoS ONE* 13(1):e0191999.
- Li, H., Chen, X. W., Wong, M. H. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi reduced the ratios of inorganic/organic arsenic in rice grains. *Chemosphere*, 145:224–230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.067>.
- Lin, M., Jin, M., Xu, K., He, L., and Cheng, D. 2018. Phosphate-solubilizing bacteria improve the phytoremediation efficiency of *Wedelia trilobata* for Cu-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 20(8), 813–822.
- Li, Z., Zu, C., Wang, C., Yang, J., Yu, H., and Wu, H. 2016. Different responses of rhizosphere and non-rhizosphere soil microbial communities to consecutive *Piper nigrum* L. monoculture. *Sci. Rep.* 6: 35825. doi:10.1038/srep35825. PMID:27775000.
- Lu, N., Xu, X., Wang, P., Zhang, P., Ji, B., and Wang, X. 2019. Succession in arbuscular mycorrhizal fungi can be attributed to a chronosequence of *Cunninghamia lanceolata*. *Scientific Reports*. 9:18057 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54452-z>
- Lustosa, M. A., López, J. A., Freire, K. C. S., Padilha, F. F., Hernández-Macedo, M. L., Cabrera-Padilla, R. Y. 2018. Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria. *Revista peruana de biología* 25(4): 453 – 456.
- Madhavi, G. N., and Mohini, D. D. 2012. Review paper on – Parameters affecting bioremediation. *International journal of life science and pharma research*. 2(3):77-80.

- Mahiudddin, M., Fakhruddin, A. N. M., and Al-Mahin, A. 2012. Degradation of Phenol via Meta Cleavage Pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1. *International Scholarly Research Network (ISRN) Microbiology*. Volume 2012, Article ID 741820, 6pages. doi:10.5402/2012/741820.
- Mansur, A.A., E.M. Adetutu, K.K. Kadali, P.D. Morrison, Y. Nurulita and A.S. Ball, 2014. Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of Azzawiya oil refinery, Libya. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21: 10725-10735.
- Margarettha. 2011. Eksplorasi dan Identifikasi Mikoriza Indigen Asal Tanah Bekas Tambang Batu Bara. *Jurnal Berita Biologi*, 10 (5): 641-646.
- Marra, L. M., Soares, C. R. F. S. S., de Oliveira, S. M., Ferreira, P. A. A. A., Soares, B. L., Carvalho, R. F., Lima, J. M., Moreira, F. M. 2012. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant Soil*. 357:289–307.
- Meenakshisundaram, M., and Bharathiraja, C. 2014. Isolation and Molecular Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soils from Tamilnadu. *Indian Journal of Applied Research*, Vol.4, Issue.7.
- Mehra, P., Pandey, B. K., Verma, L., and Giri, J. A. 2018. Novel Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Improves Phosphate Deficiency Tolerance. *Plant Cell Environ.* 42(4):1167-1179.
- Moreno, R. and Rojo, F. 2017. Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes in Bacteria. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*; Rojo, F., Ed.; Springer Science and Business Media LLC: Berlin, Germany. pp. 1–25.

- Musat, F. 2015. The anaerobic degradation of gaseous, nonmethane alkanes – From in situ processes to microorganisms. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 222–228.
- Nie, Y., Liang, J. L., Fang, H., Tang, Y. Q., and Wu, X. L. 2014. Characterization of a CYP153 alkane hydroxylase gene in a gram-positive *Dietzia* sp. DQ12-45-1b and its "team role" with *alkw1* in alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 163–173. doi: 10.1007/s00253-013-4821-1
- Nwoko, C. O. 2014. Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the Physiological Performance of *Phaseolus vulgaris* Grown under Crude Oil Contaminated Soil. *Journal of Geoscience and Environment Protection.* 2, 9- 1.
- O' Callaghan, M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(13): 5729-5746. doi:10.1007/s00253-016-7590-9. PMID:27188775.
- Oktavia, I., Yuliani, Rahayu, Y.S. 2009. Kemampuan Rhizobium Dalam Meningkatkan Pertumbuhan Tanaman Kedelai (*Glycine Max* (L) Merrill) Pada Tanah Tercemar Minyak Bumi Di Bojonegoro. Prosiding Seminar Nasional Biologi 2009, 17 Oktober 2009 di Jurusan Biologi, Universitas Negeri Surabaya, ISBN: 978-979-028-194-3).
- Oldroyd, G.E.D., and Dixon, R. 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 19-24. doi:10.1016/j.copbio.2013.08.006. PMID:24679253.
- Pawar, R. M. 2015. The Effect of Soil pH on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation & Biodegradation.* 6 (3). doi:10.4172/2155-6199.1000291.
- Pawlik, M., Cania, B., Thijs, S., Vangronsveld, J., and Piotrowska-Seget, Z. 2017. Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria

of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site. *Environ Sci Pollut Res.* 24:19640–19652

- Pérez-Hernández, I., Ochoa-Gaona, S., Adams, R. H., Rivera-Cruz, M. C., Pérez-Hernández, V., Jarquín-Sánchez, A., Martínez-Zurimendi, P. 2016. Growth of four tropical tree species in petroleum-contaminated soil and effects of crude oil contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1769–1783.
- Pellegrino, E., Öpik, M., Bonari, E., and Ercoli, L. 2015. Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of field studies from 1975 to 2013. *Soil Biology & Biochemistry*. 84, 210–217. doi:10.1016/j.soilbio.2015.02.020.
- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. 2018. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 16(5): 291–303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171. PMID:29379215.
- Prabhu, N., Borkar, S., and Garg, S. 2019. Phosphate solubilization by microorganisms. *Advances in Biological Science Research*, 161–176. doi:10.1016/b978-0-12-817497-5.00011-2
- Rabus, R., Boll, M., Heider, J., Meckenstock, R.U., Buckel, W., Einsle, O., Ermler, U., Golding, B.T., Gunsalus, R.P., Kroneck, P.M., 2016. Anaerobic Microbial Degradation of Hydrocarbons: From Enzymatic Reactions to the Environment. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 26, 5–28.
- Rahayu, Y.S. dan Yuliani. 2011. Kajian Pola Interaksi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon, Bakteri Pelarut Fosfat, Rhizobium dan Mikoriza Pada Tanaman Legum Sebagai Model Bioremediasi Pada Tanah Tercemar Minyak. Laporan Penelitian Hibah Fundamental 2010-2011. LPPM Unesa.
- Rahayu, Y. S. dan Guntur Trimulyono. 2012. Pengembangan Model Bioremediasi Lumpur Lapindo Berdasarkan Kajian Multisimbiotik Organisme. Laporan Hibah Strategi Nasional 2012. LPPM Unesa.

- Rahayu, Y.S., Yuliani, Trimulyono, G. 2018. Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria and Hydrocarbone Degradation Bacteria in Lapindo Mud Sidoarjo East Java Indonesia. *Journal of Engineering Science and Technology*. Volume 13, Issue 8. Page: 2318-2327.
- Rahayu, Y. S., Yuliani, Trimulyono, G. 2019. Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria and Hydrocarbone Degradation Bacteria in Oil Contaminated Soil in Bojonegoro, East Java, Indonesia. *Indonesian Journal of Science and Technology*, Volume 4, Issue 1, Page 134-147.
- Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., and Agnolucci, M. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi act as bio-stimulants in horticultural crops. *Sci. Hort.* 196, 91–108. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.002
- Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K. 2017. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresour. Technol.* 242, 15–27. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.010
- Sarker, A., N.M. Talukder and M.T. Islam. 2014. Phosphate solubilizing bacteria promote growth and enhance nutrient uptake by wheat. *Plant Sci. Today*, 1: 86-93.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E. U. B., Sadhana, B., and Vani, S. S. 2017. A review on phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 6, pp. 2133–2144.
- Serrano-Gonzalez, M. Y., Chandra, R., Castillo-Zacarias, C., Robledo-Padilla, F., Rostro-Alanis, M de J., and Parra-Saldivar, R. 2018. Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. *Defence Technology*. 14: 151 – 164.

- Setu, L. J., Ahmmed, B., and Kibria, K. Q. 2019. Identification And Characterization Of Rhizobium Bacteria. *International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR)*. Volume 6, Issue 2.
- Sharma, A., P. Kumar and M.B. Rehman. 2014. Biodegradation of diesel hydrocarbon in soil by bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa*: Laboratory scale study. *Int. J. Environ. Bioremediat. Biodegrad.*, 2: 202-212.
- Shimoda, Y., Nishigaya, Y., Yamaya-Ito, H., Inagaki, N., Umehara, Y., Hirakawa, H., Sato, S., Yamazaki, T., and Hayashi, M. 2019. The rhizobial autotransporter determines the symbiotic nitrogen fixation activity of *Lotus japonicus* in a host-specific manner. *PNAS*. 117 (3) 1806-1815.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O' Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., Stajich, J. E. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*; 108: 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042> PMID: 27738200.
- Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B. M., Mirza, M. S. 2018. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PLoS ONE*. 13(9):e0204408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204408>
- Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Al-Soud, W. A., Langenhoff, A. A. M., Grotenhuis, Rijnaarts, T. H. H. M., Smidt, H. 2013. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Appl Environ Microbiol*. 79:619–630
- Takács, T., Cseresnyés, I., Kovács, R., Parádi, I., Kelemen, B., Szili-Kovács, T., and Füzy, A. 2018. Symbiotic Effectivity of Dual and Tripartite Associations on Soybean (*Glycine max* L.

- Merr.) Cultivars Inoculated With Bradyrhizobium japonicum and AM Fungi. *Front. Plant Sci.* 9:1631.doi: 10.3389/fpls.2018.01631.
- Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T., Zahid M. and Zafar M. 2014. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30(2): 719- 725.
- Tarraf, W., Ruta, C., Tagarelli, A., De Cillis. F., De Mastro, G. 2017. Influence of arbuscular mycorrhizae on plant growth, essential oil production and phosphorus uptake of *Salvia officinalis* L. *IndCropProd.* 102:144–53.
- Tran, B. T. T., Watts-Williams, S. J., and Cavagnaro, T. R. 2019. Impact of an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth and nutrition of fifteen crop and pasture plant species. *Functional Plant Biology.* 46, 732–742 doi:10.1071/fp18327
- Tremblay, J., Yergeau, E., Fortin, N., Cobanli, S., Elias, M., King, T. L. 2017. Chemical dispersants enhance the activity of oil-and gas condensate-degradingmarine bacteria. *ISME J.*11, 2793–2808. doi: 10.1038/ismej.2017.129
- Varjani, S. J. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, vol. 223, pp. 277-286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>. [PMid:27789112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27789112/).
- Varjani, S. J., and Upasani, V. N. 2017. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 120, 71–83. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.02.006
- Vassilev, N., Eichler-Lobermann, B., Vassileva, M. 2012. Stress-tolerant P-solubilising microorgan-isms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 95(4):851

- Wahid, F., Sharif, M., Fahad, S., Adnan, M., Khan, I. A., Aksoy, E., Ali, A., Sultan, T., Alam, M., Saeed, M., Ullah, H., Basir, A., Noor, M., and Khan, N. A. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth and phosphorus uptake of mung bean plants fertilized with composted rock phosphate fed dung in alkaline soil environment. *Journal of Plant Nutrition*, 1–10. doi:10.1080/01904167.2019.1643371.
- Wang, D., Lin, J., Lin, J., Wang, W., and Li, S. 2019. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Bacillus subtilis* BL-27, a Strain with Weak Hydrophobicity. *Molecules*. 24, 3021; doi:10.3390/molecules24173021.
- Wang, X. Y., Feng, J., Zhao, J. M. 2010. Effects of crude oil residuals on soil chemical properties in oil sites, Momoge Wetland, China. *Environ Monit Assess*. 161:271–280.
- Wang, Z., Chen, Z., and Fu, X. 2019. Integrated Effects of Co-Inoculation with Phosphate-Solubilizing Bacteria and N₂-Fixing Bacteria on Microbial Population and Soil Amendment Under C Deficiency. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 16, 2442
- Wang, H., Kuang, S., Lang, Q., and Yu, W. 2018. Effects of Aged Oil Sludge on Soil Physicochemical Properties and Fungal Diversity Revealed by High Throughput Sequencing Analysis. *Hindawi Archaea* Volume 2018, Article ID 9264259, <https://doi.org/10.1155/2018/9264259>.
- Widdel, F., Musat, F. 2010. *Diversity and Common Principles in Enzymatic Activation of Hydrocarbons*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*; Kenneth, N.T., Ed.; Springer Science and Business Media LLC: Berlin, Germany, pp. 981–1009.
- Xu, X., Zhai, Z., Li, H., Wang, Q., Han, X., and Yu, H. 2017. Synergetic effect of bio-photocatalytic hybrid system: g-C₃N₄, and *Acinetobacter*, sp. JLS1 for enhanced degradation of C₁₆ alkane. *Chem. Eng. J.* 323, 520–529. doi: 10.1016/j.cej.2017.04.138

- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li H and Yu, H. 2018. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Front. Microbiol.* 9:2885. doi: 10.3389/fmicb.2018.02885
- Xu, Z. Y., Ban, Y. H., Jiang, Y. H., Zhang, X. L., Liu, X. Y. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi in wetland habitats and their application in constructed wetland: a review. *Pedosphere*.26:592–617.
- Yasser, M.M., A.S.M. Mousa, O.N. Massoud and S.H. Nasr. 2014. Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *J. Biol. Earth Sci.*, 4: B83-B90.
- Zhang H.Q., Liu T., Wang Y.Y., Tang M. 2019. Application of exogenous arbuscular mycorrhizal fungi increases soil organic carbon content and changes microbial community composition in poplar rhizosphere. *Plant Soil Environ.*, 65: 152–158.

GLOSARIUM

A

Arsenik, unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki simbol As dan nomor atom 33.

Asam organik, suatu senyawa yang mengandung gugusan karboksil, suatu istilah yang berasal dari karbonil dan hidroksil.

B

Bakteri pelarut fosfat, bakteri tanah yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfat anorganik tanah dari bentuk-bentuk fosfat yang tidak tersedia bagi tanaman menjadi bentuk-bentuk fosfat yang tersedia bagi tanaman.

Bakteri pelarut hidrokarbon, bakteri yang memiliki kemampuan untuk melarutkan senyawa hidrokarbon

Betaoksidasi, pemecahan asam lemak menjadi asetil koA

Bioremediasi, proses membersihkan limbah organik di lingkungan dengan menggunakan mikroorganisme

Biotransformasi, perubahan atau modifikasi senyawa kimia oleh enzim atau sel mikroba

C

Cadmium, suatu unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki lambang Cd dan nomor atom 48.

D

Degradasi hidrokarbon, pemecahan rantai hidrokarbon

E

Eksperimen, metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan terhadap terhadap variabel tertentu

Eksplorasi, tindakan mencari atau melakukan penjelajahan dengan tujuan menemukan sesuatu

Enzim, biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia organik.

F

Fiksasi nitrogen, proses alami atau industri yang menyebabkan nitrogen bebas (N_2) untuk bergabung secara kimia dengan unsur-unsur lain untuk membentuk senyawa

nitrogen yang lebih reaktif seperti amonia, nitrat, atau nitrit.

Fitoremediasi, upaya penggunaan tanaman dan bagian-bagiannya untuk dekontaminasi limbah

G

Glomus sp. jamur mikoriza yang biasa dimanfaatkan untuk inokulasi dengan tanaman inang pada kondisi cekaman

Gram negatif, bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop.

Gram positif, bakteri yang mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna biru atau ungu di bawah mikroskop.

H

Hidrokarbon, sebuah senyawa yang terdiri pada unsur atom karbon (C) dan juga atom hidrogen (H).

Hidroksilase, enzim yang terlibat dalam proses kimia yang memasukkan gugus hidroksil (-OH) ke dalam senyawa organik.

Hifa, struktur fungi berbentuk seperti tabung yang terbentuk dari pertumbuhan spora atau konidia

I

Imobilisasi, ketidakmampuan untuk bergerak secara aktif

Indigenous, bakteri yang berpotensi dalam proses biodegradasi dapat diisolasi dari limbah itu sendiri.

J

Jalur ortho, memotong inti aromatik dari katekol atau protokatekol antara dua gugus hidroksil menjadi bentuk mukonat dan mukonolaktona.

Jalur meta, memotong cincin yang berdekatan antara dua kelompok hidroksil, dan menghasilkan 2-hidroksil-mukonik semi aldehid.

K

Katabolisme, metabolisme yang merombak suatu substrat kompleks molekul organik menjadi komponen-komponen penyusunnya

Kolonisasi akar, bentuk proses simbiosis antara **akar** tanaman inang dan mikoriza.

L

Legum, tanaman dari jenis kacang-kacangan

M

Mikoriza, asosiasi simbiosis mutualistik antara jamur dengan sistem perakaran tanaman.

Mineralisasi, proses perubahan penyusunan organik menjadi materi anorganik

Minyak bumi, benda cair yang kental, berwarna gelap, yang biasa terdapat jauh di bawah permukaan bumi.

Multisimbiosis, hubungan antara lebih dari dua organisme dengan jenis yang berbeda

Mutualisme, hubungan saling menguntungkan antar organisme yang berbeda jenis

N

Nitrogen, suatu unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki lambang N dan nomor atom 7.

P

Pseudomonas, bakteri gram negatif aerob obligat yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi hidrokarbon

R

Rhizobium, mikroba tanah yang mampu mengikat nitrogen bebas di udara menjadi ammonia (NH_3) yang akan diubah menjadi asam amino.

S

Simbiosis, interaksi yang sangat erat antara dua jenis makhluk hidup sehingga membentuk hubungan yang sangat khas

T

TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*), jumlah hidrokarbon minyak bumi yang terukur di dalam suatu media lingkungan.

Tripartite, asosiasi yang melibatkan tiga organisme yang berbeda

U

Uji duncan, uji statistika yang digunakan untuk menguji perbedaan diantara semua pasangan perlakuan yang mungkin tanpa memperhatikan jumlah perlakuan.

INDEKS

A

Arsenik
Asam organik

B

Bakteri pelarut fosfat
Bakteri pelarut hidrokarbon

Betaoksidasi

Bioremediasi

Biotransformasi

C

Cadmium

D

Degradasi

E

Eksperimen

Eksplorasi

Enzim

F

Fiksasi nitrogen

Fitoremediasi

G

Glomus sp.

Gram negatif

Gram positif

H

Hidrokarbon

Hidroksilase

Hifa

I

Imobilisasi

Indiginous

J

Jalur ortho

Jalur meta

K

Katabolisme

Kolonisasi akar

L

Legum

M

Mikoriza

Mineralisasi

Minyak bumi

Multisimbiosis

Mutualisme

N

Nitrogen

P

Pseudomonas

R

Rhizobium

S

Simbiosis

T

TPH (*Total Petroleum Hydrocarbon*)

Tripartite

U

Uji duncan

BIODATA PENULIS



Yuni Sri Rahayu, dosen di jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya. Menempuh Pendidikan di S1 Pendidikan Biologi lulus tahun 1990. Lulus Program Magister di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada dengan bidang keahlian Fisiologi Tumbuhan/Ilmu Hara (1995). Lulus dari Program Doktor dari Hohenheim University, Jerman dengan topik disertasi Pengaturan Fitohormon terhadap Pertumbuhan Daun Akibat Perbedaan Suplai Jenis Nitrogen (2003). Matakuliah yang diampu di Jurusan Biologi diantaranya Fisiologi Tumbuhan, Ilmu Hara, Fitohormon, Farmakognosi, Hama Penyakit Tumbuhan, Hortikultura, dan Biokimia. Berbagai penelitian yang dilakukan terkait dengan kajian peran multisimbiotik organisme tanah dalam kaitannya dengan status hara tanaman dan ketenggangan tanaman terhadap berbagai kondisi cekaman lingkungan, termasuk proses bioremediasi tanah yang berada dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi tanaman (diantaranya salinitas tinggi, tercemar minyak, tanah berkapur, kekeringan, logam berat, dan bekas lahan tambang) serta beberapa penelitian terkait isolasi dan karakterisasi mikroorganisme yang berperan dalam menambat unsur hara yang diperlukan tanaman. Di dunia pendidikan juga dilakukan seperti pemetaan pendidikan karakter di Indonesia untuk satuan pendidikan SD, SMP, SMA, dan SMK, termasuk penelitian dalam bidang pendidikan lainnya. Buku yang pernah ditulis yaitu Buku Biologi Umum untuk Kelas Internasional (2010), *Biochemistry* (2016), Fitohormon (2018), Hara Tanaman dan asimilasinya (2019) serta dua buku yang dihasilkan bersama tim peneliti dari penelitian pemetaan karakter di Indonesia yaitu Jejak Budaya dalam Karakter Siswa Indonesia (2012) dan Identitas Kultural dan Karakter Siswa-Siswa di Indonesia dalam Perspektif Perubahan Global (2015).

BIODATA PENULIS



Yuni Sri Rahayu, dosen di jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya. Menempuh Pendidikan di S1 Pendidikan Biologi lulus tahun 1990. Lulus Program Magister di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada dengan bidang keahlian Fisiologi Tumbuhan/Ilimu Hara (1995). Lulus dari Program Doktor dari Hohenheim University, Jerman dengan topik disertasi Pengaturan

Fitohormon terhadap Pertumbuhan Daun Akibat Perbedaan Suplai Jenis Nitrogen (2003). Matakuliah yang diampu di Jurusan Biologi diantaranya Fisiologi Tumbuhan, Ilmu Hara, Fitohormon, Farmakognosi, Hama Penyakit Tumbuhan, Hortikultura, dan Biokimia. Berbagai penelitian yang dilakukan terkait dengan kajian peran multisimbiotik organisme tanah dalam kaitannya dengan status hara tanaman dan ketenggangan tanaman terhadap berbagai kondisi cekaman lingkungan, termasuk proses bioremediasi tanah yang berada dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi tanaman (diantaranya salinitas tinggi, tercemar minyak, tanah berkapur, kekeringan, logam berat, dan bekas lahan tambang) serta beberapa penelitian terkait isolasi dan karakterisasi mikroorganisme yang berperan dalam menambat unsur hara yang diperlukan tanaman. Di dunia pendidikan juga dilakukan seperti pemetaan pendidikan karakter di Indonesia untuk satuan pendidikan SD, SMP, SMA, dan SMK, termasuk penelitian dalam bidang pendidikan lainnya. Buku yang pernah ditulis yaitu Buku Biologi Umum untuk Kelas Internasional (2010), *Biochemistry* (2016), *Fitohormon* (2018), *Hara Tanaman dan asimilasinya* (2019) serta dua buku yang dihasilkan bersama tim peneliti dari penelitian pemetaan karakter di Indonesia yaitu *Jejak Budaya dalam Karakter Siswa Indonesia* (2012) dan *Identitas Kultural dan Karakter Siswa-Siswa di Indonesia dalam Perspektif Perubahan Global* (2015).



ISBN 978-602-492-040-1

