

BIODEGRADASI MINYAK OLEH *Rhodotorula* dan *Candida* HASIL ISOLASI DARI PELABUHAN TANJUNG PERAK SURABAYA

Tri Nurhariyati, Ni'matuzahroh, Tini Surtiningsih

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga

ABSTRACT

A research about isolation and capability of isolat yeast from Tanjung Perak Harbor, Surabaya in degrading kerosen, gas oil, and lubricant were conducted. This research were done to know the influence of *Rhodotorula*, *Candida* and Mix of *Rhodotorula* and *Candida*; the influence of oil type and interaction of both (between yeast and oil) in decreasing oil weight. Research design was laboratory experimental and using the factorial 4×3 with five replication. The data were analyzed by two-way ANOVA ($p: 0.05$) and followed by t test. The result of the biodegradation test showed that the kind of yeast, the kind of oil weight and interaction of both influence in decreasing of oil weight. The most decreasing of oil weight obtained by mix of *Rhodotorula* and *Candida* (82.55%), kerosen (66.59%) and combination mix of yeast (*Rhodotorula* and *Candida*) and kerosen (89.32%).

Key words: biodegradation, *Candida*, oil, *Rhodotorula*, Tanjung Perak Harbor

PENGANTAR

Pencemaran lingkungan oleh senyawa hidrokarbon minyak terus mengalami peningkatan dan telah menimbulkan dampak yang berarti bagi kesehatan organisme hidup (Atlas, 1991). Lapisan minyak di permukaan air akan mengganggu kehidupan organisme di dalam air karena menghalangi difusi oksigen dari udara ke dalam air dan menghalangi masuknya sinar matahari ke dalam air. Selain itu air yang tercemar oleh minyak juga tidak dapat dikonsumsi oleh manusia karena sering kali dalam cairan berminyak terdapat zat-zat beracun seperti senyawa benzen, dan toluen (Wardhana, 1995).

Limbah minyak di lingkungan perairan berasal dari berbagai sumber dan dapat terdiri atas berbagai jenis minyak, khususnya pencemaran oleh produk minyak bumi (Connel dan Miller, 1995; Mulyono, 1991). Produk minyak bumi antara lain adalah minyak tanah, minyak solar, dan minyak pelumas.

Upaya yang umum dilakukan untuk mengatasi pencemaran minyak adalah dengan cara kimia yang dapat dilaksanakan dengan mudah dan cepat, tetapi penanggulangan secara kimia dapat memusnahkan flora dan fauna laut dan dapat membunuh mikroba pengurai minyak, sehingga memperlambat pemulihan lingkungan (McCannaughey dan Zoottoli, 1983). Untuk itu perlu dicari penanggulangan pencemaran minyak yang tidak berbahaya dan penanggulangan secara biologi (biodegradasi) merupakan alternatif untuk mengatasi pencemaran minyak yang ramah lingkungan.

Biodegradasi merupakan suatu proses yang penting artinya bagi rehabilitasi lingkungan yang tercemar

oleh minyak bumi maupun produk-produknya, dengan memanfaatkan aktivitas mikroba untuk menguraikan pencemar minyak menjadi bentuk lain yang lebih sederhana, tidak berbahaya, dan diharapkan memiliki nilai tambah bagi lingkungan (Leahy dan Colwell, 1990).

Keberadaan mikroorganisme (bakteri, jamur, dan Khamir) pendegradasi hidrokarbon tersebar luas di alam. Mikroorganisme tertentu dapat mendegradasi senyawa hidrokarbon dan menggunakannya sebagai sumber energi (Brock *et al.*, 1994; Pandia dkk., 1995). Mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon banyak dijumpai pada kawasan tercemar minyak. Respons populasi khamir terhadap polusi minyak diselidiki oleh Ahearn dan Meyer (1972) dalam Kohlmeier dan Kohlmeier (1979) dan mengungkapkan bahwa kepadatan populasi khamir di kawasan tercemar minyak lebih tinggi dibandingkan dengan kawasan tidak tercemar. Isolasi khamir dari kawasan tercemar minyak di Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya telah dilakukan oleh Nurhariyati (2001), berhasil didapatkan 9 isolat khamir, di antaranya adalah dari genus *Rhodotorula* dan *Candida*.

Di Indonesia perkembangan penelitian khamir pemecah minyak belum begitu pesat jika dibandingkan dengan perkembangan penelitian bakteri pemecah minyak. Penelitian-penelitian tentang peran khamir dalam mendegradasi minyak merupakan kajian yang masih perlu terus dikembangkan. Oleh sebab itu, penelitian ini diarahkan untuk mengungkap kemampuan khamir hasil isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya (*Rhodotorula* dan *Candida*) dalam mendegradasi minyak tanah, minyak solar dan minyak pelumas.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri isolat khamir dari genus *Rhodotorula* dan *Candida* yang merupakan hasil isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya, minyak tanah, minyak solar dan minyak pelumas bekas kapal Mesrania SAE 40, media mineral cair, dan media *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA).

Cara Kerja

Perbanyak isolat khamir uji

Biakan murni khamir uji (*Rhodotorula* dan *Candida*) diperbanyak dalam media agar miring SDA. Hasil perbanyak isolat khamir uji dipergunakan sebagai stok khamir selama penelitian.

Pembuatan media mineral cair

Media mineral cair (modifikasi *Czapex Broth*) diperoleh dengan cara melarutkan NaNO_3 2 g, KCl 0,5 g, MgSO_4 0,5 g, dan FeSO_4 0,01g ke dalam air laut sebanyak 1000 ml. Kemudian ditambahkan KH_2PO_4 0,35 g yang terlebih dahulu dilarutkan dengan sedikit aquades. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan magnetik stirer dan diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter. pH disesuaikan dengan cara menambahkan NaOH atau HCl 1 N, sehingga diperoleh larutan dengan pH 6,6–6,8. Media tersebut kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

Pembuatan kurva pertumbuhan khamir uji

Pembuatan kurva pertumbuhan khamir uji dilakukan sebagai berikut. Disiapkan 16 botol untuk setiap jenis khamir uji, yang masing-masing botol diisi dengan 16 ml air mineral, 4 ml suspensi khamir uji dengan OD 0,3 dan 2 ml substrat minyak. Selanjutnya disebut kultur khamir. Kultur khamir kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu ruangan. Selanjutnya pertumbuhan kultur diamati setiap hari dengan menggunakan metode kerapatan optik (OD) dan setiap 2 hari sekali dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Nilai OD yang diperoleh kemudian diplotkan pada grafik fungsi waktu (hari) terhadap nilai absorbansi (600 nm), sedangkan nilai TPC diubah dahulu dalam fungsi log sehingga diperoleh grafik fungsi waktu (hari) terhadap jumlah sel/ml (log).

Perbanyak kultur murni untuk uji biodegradasi

Perbanyak kultur murni dilakukan sebagai berikut. Disiapkan 6 Erlenmeyer (diberi nomor 1 s/d 6), yang masing-masing diisi dengan 200 ml media mineral cair. Erlenmeyer nomor 1, 2, dan 3 ditambahkan suspensi *Rhodotorula*

dengan OD 0,5 sebanyak 4 ml dan Erlenmeyer nomor 4, 5, dan 6 ditambahkan suspensi *Candida* dengan OD 0,5 sebanyak 4 ml pula. Selanjutnya Erlenmeyer ditambah minyak uji masing-masing sebanyak 6 ml. Erlenmeyer nomor 1 dan 4 ditambah minyak tanah, Erlenmeyer nomor 2 dan 5 ditambah minyak solar, dan Erlenmeyer nomor 3 dan 6 ditambah dengan minyak pelumas. Kultur yeast selanjutnya diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu ruangan selama 7 hari. Selanjutnya kultur khamir pada masing-masing Erlenmeyer diinokulasikan ke dalam tabung agar miring SDA dan diinkubasi pada suhu kamar selama 4 hari setelah itu biakan siap digunakan untuk pembuatan starter khamir uji.

Pembuatan starter isolat khamir uji

Pembuatan starter khamir dilakukan sebagai berikut. Biakan khamir uji pada tabung miring secara aseptik diisi dengan 5 ml larutan garam fisiologis steril untuk melepaskan koloni khamir dari media agar. Selanjutnya suspensi khamir dipindahkan ke dalam Erlenmeyer dan dilakukan pengenceran dengan larutan garam fisiologis hingga OD yang didapat adalah 0,3 pada panjang gelombang 600 nm. Sedangkan cara membuat starter isolat khamir campur dilakukan dengan mencampur suspensi *Rhodotorula* dan *Candida* yang masing-masing OD-nya 0,3 pada panjang gelombang yang sama 600 nm.

Biodegradasi minyak oleh isolat khamir uji

Suspensi khamir (starter) dengan OD 0,3 pada panjang gelombang 600 nm digunakan untuk uji biodegradasi. Suspensi khamir tersebut sebanyak 4 ml diinokulasikan pada media uji biodegradasi yang terdiri dari media mineral cair sebanyak 16 ml dan substrat minyak uji sebanyak 2 ml. Inkubasi dilakukan pada shaker inkubator dengan kecepatan 100 rpm pada suhu kamar selama 14 hari. Setelah proses biodegradasi, dilakukan analisis residu substrat minyak dengan menggunakan alat *Oil Content Meter*.

Pengukuran kadar minyak

Kadar minyak hasil uji biodegradasi diukur dengan menggunakan alat *Oil Content Meter*. Pengukuran kadar minyak yang dilaporkan adalah penurunan kadar minyak yang dinyatakan dalam persentase (%), Pengukuran penurunan kadar minyak tersebut menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{PM} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

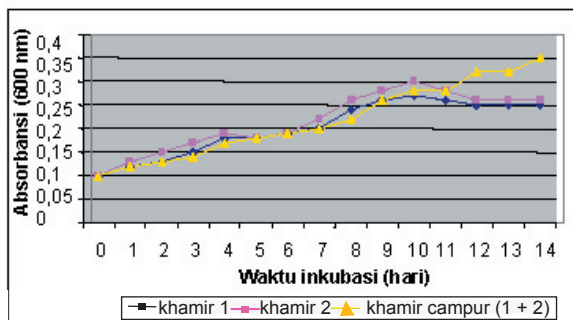
PM = Penurunan kadar minyak (%)

A = Kadar minyak awal (ppm)

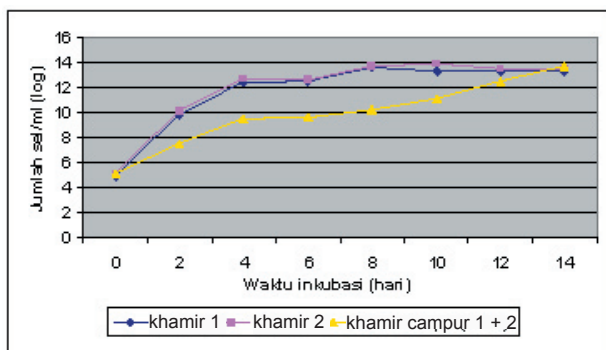
B = Kadar minyak setelah uji biodegradasi (ppm)

HASIL

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa biomassa khamir dengan pengukuran OD dan TPC yang disajikan dalam kurva pertumbuhan khamir. Nilai OD yang diperoleh diplotkan pada grafik fungsi waktu (hari) terhadap nilai absorbansi 600 nm. Nilai TPC diubah terlebih dahulu dalam fungsi log sehingga diperoleh grafik fungsi waktu (hari) terhadap jumlah sel/ml (log).



Gambar 1. Kurva pertumbuhan khamir pada minyak tanah dengan pengukuran OD (*Optical Density*), pada panjang gelombang 600 nm.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan khamir pada minyak tanah dengan penghitungan TPC.

Kurva pertumbuhan *Rhodotorula*, *Candida* dan khamir campur (*Rhodotorula* dan *Candida*) dalam media mineral cair dengan penambahan minyak tanah (media biodegradasi), disajikan pada Gambar 1 dan 2 di atas. Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa pada media biodegradasi dengan umur 14 hari, *Rhodotorula* dan *Candida* berada pada fase stasioner, sedangkan untuk khamir campur masih

dalam fase eksponensial. Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa biomassa khamir campur sampai umur kultur 14 hari adalah paling besar (13,68), kemudian diikuti oleh *Candida* (13,54) dan *Rhodotorula* (13,27). Dengan demikian pertumbuhan khamir campur lebih baik daripada khamir tunggal, karena khamir campur dengan umur kultur 14 hari memiliki biomassa yang paling besar dan masih dalam fase eksponensial, sehingga pertumbuhan khamir masih dimungkinkan meningkat lagi.

Pada uji biodegradasi minyak, data yang diperoleh berupa penurunan kadar minyak yang dinyatakan dalam persentase (%). Rerata dan simpangan baku penurunan kadar minyak (%) pada uji biodegradasi minyak dengan menggunakan jenis khamir (*Rhodotorula*, *Candida* dan khamir campur) dalam substrat minyak (minyak tanah, minyak solar dan minyak pelumas) tertera pada Tabel 1, 2, dan 3. Pada penelitian ini, jenis khamir, jenis substrat minyak serta kombinasi keduanya diteliti pengaruhnya terhadap penurunan kadar minyak dalam uji biodegradasi.

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku penurunan kadar minyak (%), pada uji biodegradasi dengan perlakuan jenis khamir (*Rhodotorula*, *Candida* dan khamir campur)

	Jenis khamir (A)			
	Kontrol (A1)	Rhodo torula (A2)	Candida (A3)	Khamir campur (A4)
Rerata penurunan kadar minyak (%)	11,90 ^a	74,97 ^b	82,14 ^c	82,55 ^c
Simpangan baku	4,05	5,72	5,35	5,62

Keterangan: Nilai rerata pada baris yang sama dan diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata (p < 0,05)

Tabel 2. Rerata dan simpangan baku penurunan kadar minyak (%), pada uji biodegradasi dengan perlakuan jenis minyak (minyak tanah, minyak solar dan minyak pelumas)

	Jenis minyak (B)		
	m. tanah (B1)	m. solar (B2)	m. pelumas (B3)
Rerata penurunan kadar minyak (%)	66,59 ^a	65,10 ^b	56,98 ^c
Simpangan baku	31,05	30,36	30,07

Keterangan: Nilai rerata pada baris yang sama dan diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata (p < 0,05)

Tabel 3. Rerata dan simpangan baku penurunan kadar minyak (%), pada uji biodegradasi dengan kombinasi perlakuan jenis khamir dan jenis minyak

	Kombinasi jenis khamir dan jenis minyak											
	A1B1	A1B2	A1B3	A2B1	A2B2	A2B3	A3B1	A3B2	A3B3	A4B1	A4B2	A4B3
Rerata penurunan kadar minyak (%)	14,61 ^a	14,31 ^a	6,78 ^b	9,74 ^c ^{eg}	77,57 ^{cg}	7,59 ^d	82,68 ^e	87,35 ^f	76,38 ^g	89,32 ^f	81,17 ^e	77,17 ^g
Simpangan baku	1,16	1,13	2,38	2,02	1,53	1,76	3,03	1,83	3,45	1,64	3,12	1,48

Keterangan: Nilai rerata pada baris yang sama dan diikuti superskrip berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

PEMBAHASAN

Pengukuran biomassa khamir dalam uji biodegradasi menggunakan 2 cara pengukuran yaitu pengukuran TPC (*Total Plate Count*) dan kerapatan optik (*Optical Density*). Pengukuran biomassa hanya dilakukan pada uji biodegradasi minyak tanah., Biomassa khamir, disajikan dalam kurva pertumbuhan khamir. Hasil pengukuran massa sel dengan pengukuran OD, didapatkan kurva pertumbuhan dengan pola yang hampir sama dengan hasil pengukuran TPC. Pengukuran biomassa khamir dengan pengukuran OD digunakan sebagai pembandingan.

Hasil penghitungan sel dengan pengukuran TPC, didapatkan peningkatan jumlah sel khamir uji, yang berarti terdapat pertumbuhan. Dari hasil penghitungan TPC didapat bahwa khamir awal yang digunakan pada uji biodegradasi berjumlah 10^3 /ml dan setelah uji biodegradasi berlangsung terjadi peningkatan sampai 10^{12} /ml. Faktor-faktor yang mendukung pertumbuhan khamir dalam penelitian ini antara lain adalah ketersediaan nutrisi di dalam media biodegradasi yang dibutuhkan khamir untuk pertumbuhannya. Selain karbon, khamir juga membutuhkan unsur lain dalam pertumbuhannya seperti dinyatakan dalam Timotius (1982) yang menyatakan bahwa selain karbon, mikroorganisme membutuhkan mineral. Mineral yang dibutuhkan dalam jumlah relatif besar antara lain adalah pospor, nitrogen, kalium, magnesium, natrium, dan besi. Mineral-mineral tersebut telah ada dalam media biodegradasi.

Dalam kurva pertumbuhan dengan pengukuran TPC dan OD didapatkan fase eksponensial (logaritma) dan fase stasioner (fase tetap maksimum), tetapi tidak didapatkan fase lag dan fase kematian. Fase eksponensial terjadi pada saat terdapat kelebihan semua bahan nutrisi (Mulyono, 1991). Pada fase ini kecepatan pertumbuhan selalu maksimum, massa dan jumlah sel bertambah secara eksponensial. Fase stasioner disebabkan antara lain karena kekurangan nutrisi atau karena akumulasi hasil-hasil metabolisme akhir. Pada uji biodegradasi ini tidak ditemukan fase lag. Pada Fase lag kecepatan pertumbuhan adalah nol atau lebih dari nol,

tetapi belum mencapai maksimum. Fase ini merupakan gejala adaptasi terhadap lingkungan yang baru (Timotius, 1982).

Penelitian selanjutnya dilakukan untuk menguji kemampuan 2 jenis khamir hasil isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya yaitu genus *Rhodotorula* dan *Candida* dalam mendegradasi minyak (minyak tanah, minyak solar dan minyak pelumas), serta untuk menguji hipotesis yang berbunyi (1) terdapat pengaruh jenis khamir uji (isolat tunggal *Rhodotorula*, isolat tunggal *Candida* dan isolat ganda (campur) antara isolat *Rhodotorula* dan *Candida*) dalam penurunan kadar minyak, (2) terdapat pengaruh jenis minyak uji (minyak tanah, minyak solar, dan minyak pelumas) terhadap penurunan kadar minyak hasil uji biodegradasi, dan (3) terdapat pengaruh kombinasi antara jenis khamir uji dan jenis minyak uji terhadap penurunan kadar minyak.

Penggunaan khamir campur dalam uji biodegradasi ini, disebabkan karena di alam bebas terdapat banyak mikroorganisme dari berbagai genus maupun spesies yang hidup berkumpul di dalam suatu medium yang sama seperti di laut. Hubungan antargenus ataupun spesies tersebut menyebabkan pengaruh timbal balik. Pengaruh itu mungkin baik, mungkin buruk, atau pun mungkin tidak mempunyai efek sama sekali (Dwidjoseputro, 1985). Dengan adanya isolat khamir campur, peneliti berharap adanya hubungan yang sinergis, karena dalam hubungan ini dua spesies hidup bersama dan mengadakan kegiatan yang tidak saling mengganggu, akan tetapi kegiatan masing-masing justru saling menguntungkan (Dwidjoseputro, 1985).

Hasil uji biodegradasi menunjukkan ada pengaruh jenis khamir uji, jenis minyak uji, dan interaksi keduanya terhadap penurunan kadar minyak. Nilai penurunan kadar minyak tertinggi dicapai oleh khamir campur (82,55%), tetapi tidak berbeda nyata dengan *Candida* (82,14%). Minyak tanah merupakan jenis minyak yang paling tinggi tingkat penurunan kadarnya (66,59%), sedangkan nilai penurunan kadar minyak tertinggi dicapai oleh kombinasi antara khamir campur dengan minyak tanah (89,32%),

diikuti oleh kombinasi antara *Candida* dengan minyak solar (87,35%), keduanya tidak berbeda nyata.

Biodegradasi minyak bumi dan produk-produknya di perairan bergantung pada: (1) jenis dan komposisi hidrokarbon penyusun minyak, (2) kemampuan mikroba dalam mendegradasi minyak, dan (3) faktor lingkungan yang mempengaruhi aktivitas mikroba (Atlas, 1992).

Hasil uji biodegradasi menunjukkan bahwa minyak tanah adalah jenis minyak uji yang paling tinggi tingkat penurunan kadarnya. Hal ini berarti komposisi dan jenis hidrokarbon dalam minyak tanah lebih dapat dipengaruhi oleh khamir uji dalam menurunkan kadarnya. Minyak tanah lebih banyak mengandung hidrokarbon rantai lurus daripada minyak solar maupun minyak pelumas. Minyak tanah juga mengandung lebih banyak hidrokarbon alifatik daripada hidrokarbon aromatik, sedangkan dalam minyak solar dan minyak pelumas kandungan hidrokarbon aromatiknya lebih banyak daripada dalam minyak tanah (Connor *et al.*, 1968 dalam Lestiadewi, 2000). Hal ini sesuai dengan yang disebutkan pada Pandia (1995), bahwa daya penguraian senyawa hidrokarbon bervariasi. Pengaruh mikroorganisme besar sekali pada senyawa hidrokarbon yang mempunyai rantai lurus. Hal ini karena percabangan rantai dapat menghambat oksidasi β pada ujung rantai percabangan. Walaupun senyawa kimia stabil, senyawa dengan aromatis rendah lebih dapat dipengaruhi oleh oksidasi mikrobial.

Hasil uji biodegradasi juga menunjukkan bahwa nilai tertinggi dalam menurunkan kadar minyak dicapai oleh khamir campur. Hal ini kemungkinan dalam keadaan bersama dapat terjadi kerja sama sinergistik, alasan tersebut dapat dimungkinkan karena isolat *Rhodotorula* dan *Candida* secara tunggal diperoleh dari tempat yang sama sehingga jika dipelihara secara bersama dapat bekerja secara bersama (Wignyanto, 1999).

Mikroba termasuk khamir, menggunakan hidrokarbon minyak untuk pertumbuhannya dengan memotong hidrokarbon alifatik, sikloalifatik, dan aromatik. Mekanisme biodegradasi minyak sangat beragam tergantung pada komposisi hidrokarbon yang dikandungnya. Secara umum *n*-alkana lebih cepat didegradasi daripada alkana rantai cabang, *n*-alkana yang mudah dan cepat terdegradasi adalah yang mengandung C10–C18 (Mitchell, 1974).

KEPUSTAKAAN

- Atlas RM, 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Oil Spill. *J. Chem. Tech. Biotechnol* 52: 149–156.
- Atlas RM, 1992. Petroleum Microbiology. *Encyclopedia of Microbiology*. Volume 3. Academic Press. Inc. California
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, dan Parker J, 1994. *Biology of Microorganism*, Prentice-Hall International, Inc. Baltimore.
- Connell DW dan Miller GJ, 1995. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. Penerjemah anti, K. Penerbit Universitas Indonesia.
- Dwidjoseputro D, 1985. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djambatan.
- Kohlmeyer J dan Kohlmeyer E, 1979. *Marine Mycology*. Academic Press, New York.
- Leahy JG dan Colwell R, 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbon. *Environmental Microbiological Review*. Volume 54.
- Lestiadewi M, 2000. *Biodegradasi Minyak Solar dan Bekas Kapal oleh Bakteri Pemecah Hidrokarbon Pseudomonas putida*. Skripsi FMIPA Universitas Airlangga Surabaya.
- McCannaughey BH dan Zottoli R, 1983. *Introduction to Marine Biology*. The CV Mosby Company. St. Louis, Toronto London.
- Mitchell R, 1974. *Introduction to Environmental Microbiology*. Prentice – Hal Inc. USA.
- Mulyono M, 1991. *Hidrokarbon di dalam Lingkungan Perairan*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Minyak dan Gas Bumi. Lemigas, Jakarta.
- Nurhariyati, 2001. *Biodegradasi Minyak oleh Khamir Hasil Isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya*. Tesis Pascasarjana Unair.
- Pandia S, Husin A, dan Masyithah Z, 1995. *Kimia Lingkungan*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Timotius KH, 1982. *Mikrobiologi Dasar*. Universitas Kristen Satya Wacana Salatiga.
- Wardhana WA, 1995. *Dampak Pencemaran Lingkungan*. Penerbit Andi Offset, Yogyakarta.
- Wignyanto, 1999. *Biodegradasi Alkil Benzena Sulfanat Pendekatan Eksperimental Laboratik untuk Pengelolaan Limbah*. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.