

JURNAL

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL
BIOSURFAKTAN PADA KOLAM TANAH *GATHERING STATION* – *EOR*
PLANT DI PT. BUMI SIAK PUSAKO – PERTAMINA HULU, PROVINSI
RIAU**

**OLEH:
SUSI SUSANTI GULTOM**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIVERSITAS RIAU
PEKANBARU
2019**

**Isolation and Identification of Biosurfactant Producing Bacteria from Soil
Around the *Gathering Station-Eor Plant* PT. Bumi Siak Pusako – Pertamina
Hulu**

By:

Susi Susanti Gultom ¹⁾, M. Hasbi ²⁾, Eko Purwanto ²⁾
Susigultom8@gmail.com

ABSTRACT

Oil spilled polluted soil present around the Gathering Station (GS) pool of the PT. Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu. The presence of the oil may trigger gene mutation in specific bacteria in that area and they become able to produce biosurfactant for degrading the oil. A study aims to obtain the biosurfactant producing bacteria was conducted in April 2018. 100 grams of polluted soil samples were taken from the area around the Gathering Station pool. The soil was grinded and mixed with 40 ml Brain-Heart Infusion (BHI) media, and then was incubated for 1 x 24 hours. The bacteria were then grown using Blood Agar media and then was purified using MacConcey media. The pure bacteria were tested (biochemical and emulsification tests). Morphological and biochemical characteristics shown that there were 5 species of bacteria, namely *Escheria coli*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Bacillus careus*, *Proteus* sp. and *Klebsiella* sp. Result of Emulsification index shown that all bacteria obtained were potencial for producing biosurfactant.

Keywords: *Oil spill, Escheria, Pseudomonas, Bacillus, Proteus, Klebsiella*

1) Student of the Fisheries and Marine Science Faculty, Riau University

2) Lectured of the Fisheries and Marine Science Faculty, Riau University

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL
BIOSURFAKTAN PADA KOLAM TANAH *GATHERING STATION* – EOR
PLANT DI PT. BUMI SIAK PUSAKO – PERTAMINA HULU, PROVINSI
RIAU**

Oleh :
Susanti Gultom ¹⁾, M. Hasbi ²⁾, Eko Purwanto ²⁾
Susigultom8@gmail.com

ABSTRAK

Kolam tanah *Gathering Station* merupakan kolam yang terkontaminasi oleh minyak bumi. Ketika bakteri berada pada suatu lingkungan yang terkontaminasi oleh minyak, bakteri tersebut akan menjadi bakteri biosurfaktan. Hal ini karena bakteri dapat melakukan mutasi gen sesuai dengan lingkungan yang ada. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri penghasil biosurfaktan dan untuk mengetahui spesies bakteri yang ada di kolam tanah *Gathering Station - EOR Plant* PT. Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu. Sampel tanah yang diambil dari kolam *Gathering Station - EOR Plant* di PT. Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu kemudian dilakukan isolasi. Bakteri murni yang telah diperoleh, kemudian dilakukan identifikasi dengan pengamatan morfologi, uji biokimia dan uji molekuler (PCR). Berdasarkan hasil penelitian dalam uji Biokimia diperoleh 5 isolat bakteri murni yaitu: *Escheria coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., *Proteus* sp. dan *Klebsiella* sp. Hasil uji emulsifikasi diperoleh bakteri yang paling berpotensi menghasilkan surfaktan adalah *Bacillus* sp. dengan indeks emulsifikasi sebesar 85%, oleh karena itu dilakukan uji PCR terhadap bakteri tersebut. Melalui uji DNA dan analisis BLAST diketahui spesies bakteri pada *Bacillus* sp memiliki kekerabatan/kemiripan dengan gen dari bakteri *Bacillus cereus*. Besarnya kemiripan sekuen DNA tersebut berkisar 99%-100%.

Kata Kunci: *Cemaran minyak, Escheria, Pseudomonas, Bacillus, Proteus, Klebsiella*

1) Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau

2) Dosen Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Riau

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara di dunia yang memiliki banyak industri minyak bumi dan gas (MIGAS). Cadangan minyak bumi di Indonesia menurut SKK Migas dihitung mulai tahun 2012 sekitar 3,6 milyar barrel dan separuhnya berada di Provinsi Riau (Riau Pos.com, 2013). PT. Bumi Siak Pusako –

Pertamina Hulu perusahaan minyak bumi di Provinsi Riau.

Sebagai penyumbang devisa Negara yang cukup besar, produksi minyak bumi PT. Bumi Siak Pusako akan berdampak besar terhadap pencemaran minyak diperairan. Sandra (2011) menyatakan bahwa minyak dapat menutupi lapisan permukaan perairan dan menyebabkan terbentuknya lapisan film yang menghambat penetrasi

cahaya matahari sehingga berdampak terhadap rendahnya oksigen di perairan yang menyebabkan kematian bagi ikan. Oleh sebab itu, cemaran minyak bumi harus segera ditanggulangi. Berbagai cara telah digunakan untuk menangani pencemaran minyak, baik secara fisika maupun kimia. Namun, semua upaya tersebut selain membutuhkan biaya yang sangat besar, juga dapat menimbulkan efek negatif bagi lingkungan. Salah satu cara penanganan pencemaran minyak bumi secara alami adalah dengan bioremediasi yang memanfaatkan mikroorganisme yaitu bakteri, *yeast* atau fungi. Bakteri yang mampu mendegradasi minyak bumi disebut sebagai bakteri biosurfaktan (Kosaric, 1992; Lin *et al.*, 1994).

Biosurfaktan merupakan bahan aktif permukaan yang dihasilkan oleh bakteri yang dapat menguraikan minyak baik di lingkungan perairan ataupun pada permukaan tanah. Biosurfaktan yang diproduksi secara alami memiliki beberapa keunggulan, diantaranya lebih ramah lingkungan, bahan bakunya tersedia dalam jumlah besar dan lebih ekonomis (Kosaric, 1992; Lin *et al.*, 1994).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada April - Mei 2018. Sampel diambil dari kolam Tanah *Gathering Station* – *Eor Plant* PT. Bumi Siak Pusako - Pertamina Hulu. Sterilisasi alat dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Isolasi bakteri, uji biokimia, uji emulsifikasi dan sterilisasi bahan dilakukan di UPT Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan Dinas Kesehatan Provinsi Riau. Uji molekuler

dilakukan di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Sekuensing dilakukan di PT. Genetika *Science* Indonesia Jakarta Barat.

Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil dari enam kolam *Gathering Station* PT. Bumi Siak Pusako - Pertamina Hulu. Sampel diambil dengan menggunakan sendok steril kemudian di kompositkan, lalu dimasukkan kedalam botol sampel steril dan dimasukkan kedalam *cool box* yang telah berisi es batu. Adapun tujuan dari pengkompositan sampel ini adalah untuk mengurangi biaya dalam proses identifikasi di laboratorium.

2. Penanganan Sampel

Sampel tanah yang diambil dari kolam *Gathering Station* – *Eor Plant* PT. Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu dibawa ke laboratorium, kemudian digerus dengan menggunakan lumping penggerus. Setelah halus, sampel ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke dalam 45 ml larutan *Phosphat Buffered Saline* (BPS). Selanjutnya, sampel pada larutan BPS dimasukkan sebanyak 2 ml ke dalam media penyubur BHI dan diaduk dengan *incubator shaker* selama 1 x 24 jam (Singkoh, 2011).

3. Isolasi Bakteri

Sampel pada media BHI diambil sebanyak 0.1 ml dengan menggunakan *sprit*, lalu di tanam kedalam media padat BA dan MC kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37⁰C dengan posisi cawan petri terbalik. Bakteri yang menampakkan morfologi berbeda

diambil koloninya dan dipindahkan ke media baru MC, lalu diinkubasi selama 1 x 24 jam dengan suhu 37°C. Tujuan dari pemindahan bakteri ke dalam media baru adalah untuk mendapatkan isolat murni.

4. Identifikasi Isolat

Setelah bakteri murni diperoleh, kemudian dilakukan pengamatan morfologi, uji biokimia, uji pewarnaan gram, uji emulsifikasi dan uji molekuler yang mengacu pada buku identifikasi bakteri *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Seventh Edition*.

Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan gram mengacu pada Samosir (2016), yaitu:

1. Bakteri dalam media BA dan MC diambil menggunakan jarum ose steril kemudian dioleskan pada *object glass*
2. Kemudian ditetaskan *crystal violet*, didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan.
3. Selanjutnya ditetesi larutan *iodine* dengan perlakuan yang sama seperti sebelumnya. Selanjutnya diberi larutan pemucat yaitu alkohol 90%, tetes demi tetes sampai zat warna ungu tidak terlihat lagi, lalu dicuci pada air mengalir dan dikering anginkan.
4. Kemudian ditetaskan safranin selama 30 detik, lalu dicuci dan dibiarkan kering di udara. Kemudian diamati dibawah mikroskop.

Uji Katalase

Prosedur uji katalase mengacu pada Wahid (2009), yaitu: Bakteri murni dalam media MC diambil menggunakan jarum ose steril, lalu dioleskan pada *object glass*, kemudian pada pada *object glass*

ditetaskan sebanyak 1 tetes larutan H₂O₂3% lalu diamati perubahan gas pada bakteri.

Uji Oksidase

Prosedur uji oksidase yaitu: bakteri murni pada MC diambil dengan jarum ose lalu dipindahkan ke dalam *Oxidase Strip* dan dilihat perubahannya. Jika *Oxidase Strip* berubah menjadi ungu, bakteri bersifat positif (+), tetapi jika tidak berubah warna, maka bakteri bersifat negatif (-).

Uji Motilitas

Prosedur uji katalase mengacu pada Sudarsono (2008), yaitu: bakteri murni pada MC dipindahkan ke media SIM dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Kemudian diamati perubahan media.

Uji Indol

Uji indol mengacu pada Widyawati (2012), yaitu: bakteri murni pada MC dipindahkan ke dalam media SIM dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian, bakteri diberikan larutan *reagen kovacs* 5 tetes dan diamati perubahan warnanya.

Uji Sitrat

Uji sitrat mengacu pada Sudarsono (2008), yaitu: bakteri murni pada MC dipindahkan ke dalam media miring SCA dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan medianya.

Uji Sulfida (H₂S)

Bakteri murni pada MC dipindahkan ke dalam TSIA dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahannya (H₂S) (Hadioetomo, 1993).

Uji TSIA

Prosedur uji TSIA mengacu pada Yusuf (2009), yaitu: bakteri murni pada media MC diinokulasi sebanyak satu ose ke dalam media TSIA dengan cara menusuk tegak lurus pada bagian *butt* (tusuk) dan cara *zig zag* pada bagian *slant* (miring) dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diamati perubahan warnanya.

5. Uji emulsifikasi

Prosedur uji emulsifikasi, yaitu:

1. 3 ml supernatant bakteri dan 1 ml minyak tanah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian di vortex selama 2 menit.
2. Selanjutnya diamkan selama 1 x 24 jam hingga foam terbentuk stabil, lalu diukur tinggi foamnya.

Aktivitas emulsifikasi didefinisikan sebagai tingginya lapisan emulsi (*busa/foam*) dibagi dengan (tinggi sampel ditambah dengan hidrokarbon) yang dinyatakan sebagai persentase (Maneerat dan Phetrong, 2007). Setelah proses uji emulsifikasi dilakukan, selanjutnya uji molekuler. Uji molekuler ini dilakukan terhadap bakteri yang memiliki nilai indeks emulsifikasi tertinggi.

6. Uji Molekuler

Isolasi DNA

Bakteri murni yang memiliki nilai indeks emulsifikasi tertinggi kemudian di isolasi ke dalam media NA cair dan di inkubasi selama 1 x 24 jam.

Sekuensing DNA

Hasil PCR dikirim ke PT. Genetika *Science* Indonesia, Jakarta Barat untuk disekuensing (pengurutan nukleotida). Sebanyak

50 µl amplikon dimasukkan ke tabung 1.5 µl kemudian tabung di-*seal* menggunakan parafilm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Parameter Kualitas Air

Secara umum pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh parameter kualitas sedimen yang meliputi suhu dan pH. Hasil pengukuran kualitas air di PT. Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Parameter Kualitas Air pada kolam Tanah *Gathering Station – Eor Plant*

No	Parameter	Baku Mutu PERMEN LH No.19 Tahun 2010
1	Suhu	37°C 40°C
2	pH	7 6-9

Suhu yang diperoleh pada saat di lapangan sebesar 37°C dan masih berada pada kisaran yang telah ditentukan oleh PERMEN LH No.19 Tahun 2010. Suhu merupakan salah satu parameter perairan yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan organisme di perairan. Berdasarkan kisaran suhu aktivitasnya, bakteri yang di dapat merupakan bakteri mesofil yang dapat hidup pada suhu antara 15⁰-55⁰C dengan suhu optimum 25⁰-40⁰C (Madigan *et al.*, 2009).

Bakteri yang dapat hidup pada suhu 33°C merupakan bakteri yang dapat berpotensi menghasilkan biosurfaktan. Hal ini sesuai dengan pendapat Waluyo (2004) bahwa bakteri penghasil biosurfaktan adalah jenis bakteri mesofilik, yaitu bakteri yang dapat tumbuh baik pada suhu 15⁰C -55⁰C.

Sedangkan nilai pH yang di dapat adalah 7. Kondisi pH tersebut

merupakan kondisi yang cukup baik untuk pertumbuhan bakteri. Menurut Prescott *et al.* (2008), nilai pH minimum dan maksimum untuk pertumbuhan kebanyakan spesies bakteri adalah 4-9. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri berkaitan dengan aktivitas enzim. Umumnya enzim bekerja optimum pada rentang pH 6-8.

Pengamatan Morfologi Bakteri

Bakteri murni yang diperoleh sebanyak 5 jenis yaitu: *Escheria coli* (S1₁), *Pseudomonas aeruginosa* (S2₁), *Bacillus careus* (S1₂), *Proteus* sp. (S2₂) dan *Klebsiella* sp. (S3₂). Isolat murni selanjutnya dilakukan pengamatan secara morfologi. Pengamatan morfologi meliputi warna koloni dan bentuk sel. Hasil pengamatan morfologi bakteri yang ditemukan dapat dilihat pada tabel 2. Tabel 2. Pengamatan Morfologi Pada Koloni Bakteri

N o	Nama Isolat	Warna Koloni	Bentuk Sel
1	<i>Escheria coli</i> (S1 ₁)	Putih	Batang
2	<i>Pseudomonas</i> sp.(S2 ₁)	Hijau	Batang
3	<i>Bacillus</i> sp.(S1 ₂)	Putih	Batang
4	<i>Proteus</i> sp. (S2 ₂)	Putih	Batang
5	<i>Klebsiella</i> sp. (S3 ₂)	Merah muda	Batang

Dari hasil pengamatan morfologi diperoleh 5 isolat bakteri yang berbeda, yaitu: 3 isolat bakteri berwarna putih, 1 isolat berwarna merah muda dan 1 isolat bakteri lainnya berwarna hijau. Untuk lebih jelas, dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Pengamatan warna koloni bakteri.

Setelah dilakukan pengamatan secara morfologi, kemudian dilakukan uji pewarnaan gram, uji biokimia sederhana (uji katalase, uji sitrat, uji TSIA dan uji motilitas), uji emulsifikasi dan uji molekuler terhadap bakteri yang memiliki indeks emulsifikasi tertinggi.

Uji Biokimia Bakteri

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram menunjukkan bahwa, 4 isolat merupakan bakteri Gram negatif dan 1 isolat merupakan bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif batang adalah bakteri yang berubah warna menjadi merah ketika dilakukan uji pewarnaan Gram. Sedangkan bakteri Gram positif

batang adalah bakteri yang tidak berubah warna ketika dilakukan uji pewarnaan Gram. Hal ini sesuai dengan pendapat Monica (2015) bahwa pada pewarnaan bakteri Gram

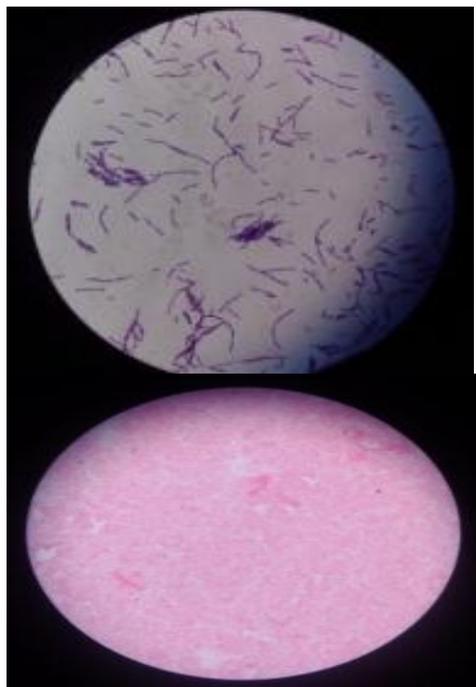
negatif batang ditandai dengan warna merah muda karena dinding sel bakteri Gram negatif mengandung lipid yang lebih tinggi dibanding Gram positif (Gambar 2).

Tabel 3. Uji Biokimia Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Kode	S1 ₁	S2 ₁	S1 ₂	S2 ₂	S3 ₂
Uji Biokimia					
Gram	-	-	+	-	-
Oksidase	-	+	-	-	-
Katalase	+	+	+	+	+
TSIA	K	M	M	K	K
	K	M	M	M	K
Indol (I)	+	-	-	-	-
Gerakan (M)	+	+	+	+	+
H ₂ S (S)	-	-	-	+	-
Uji Gula					
Sitrat	-	+	-	+	+
Urea	-	-	-	+	+
Glukosa	+	-	±	+	+
Laktosa	+	-	-	-	+
Manit	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	-	+
Sakarosa	±	-	+	+	+
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus areus</i>	<i>Proteus sp.</i>	<i>Klebsiella sp.</i>

Keterangan:

- + : Uji bersifat positif
- : Uji bersifat Negatif



Gambar 2. Bakteri Gram Negatif Positif Batang

Hasil uji katalase kelima isolat bakteri menunjukkan bahwa semua isolat memiliki katalase positif dengan adanya gelembung oksigen (Tabel 3). Bakteri katalase positif akan memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ dimana parameter yang menunjukkan adanya aktivitas katalase tersebut adalah munculnya gelembung-gelembung udara, sedangkan pada bakteri katalase negatif tidak menghasilkan gelembung udara. Hal ini didukung oleh Susana (2017), uji katalase positif isolat bakteri ditandai dengan gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa organisme yang bersangkutan menghasilkan enzim

katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Udiharto (1996) berpendapat bahwa uji katalase dilakukan untuk melihat pengaruh enzim katalase terhadap bakteri pengurai minyak. Kebanyakan bakteri menggunakan enzim katalase untuk memecahkan H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 .

Uji TSIA dilakukan dengan menggunakan metode tegak miring. Hasil uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) pada 5 isolat, diperoleh 2 isolat S_{1_1} dan S_{3_2} mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa. Hal ini dapat dilihat dari warna bagian atas media kuning dan bagian bawah media kuning. Isolat bakteri S_{2_1} dan S_{1_2} tidak mampu memfermentasi karbohidrat. Isolat S_{2_2} hanya mampu memfermentasi Glukosa. Hal ini didukung oleh Cappuccino and Sherman (2002) yang menyatakan bahwa uji TSIA di tandai dengan bagian atas berwarna kuning dan bagian bawah berwarna kuning menunjukkan laktosa dan sukrosa mampu difermentasikan. Apabila bagian atas berwarna merah dan bagian bawah berwarna kuning, hanya glukosa saja yang mampu difermentasikan, tetapi bila bagian atas berwarna merah dan bagian bawah juga berwarna merah artinya, bakteri tidak mampu memfermentasikan karbohidrat.

Hasil dari uji indol menunjukkan bahwa 4 isolat (S_{2_1} , S_{1_2} , S_{2_2} dan S_{3_2}) merupakan indol negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya lapisan berwarna merah muda pada permukaan biakan. Sedangkan 1 isolat (S_{1_1}) merupakan indol positif ditandai dengan terbentuknya lapisan berwarna merah muda pada permukaan biakan. Menurut Choirunisa (2011), hasil uji indol yang diperoleh negatif karena

tidak terbentuk lapisan (cincin) berwarna merah muda pada permukaan biakan, artinya bakteri ini tidak membentuk indol dari triptophan sebagai sumber karbon dan dapat diketahui dengan menambahkan larutan kovaks seperti Ehrlich yang mengandung para-dimetil-aminobenzaldehida.

Hasil uji motil ke-5 isolat bakteri (S_{1_1} , S_{2_1} , S_{1_2} , S_{2_2} dan S_{3_2}) menunjukkan bahwa semua isolat bersifat motil karena terlihat adanya penyebaran bakteri pada media. Menurut Sudarsono (2008), uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut bergerak (motil) dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak (non motil). Karakteristik bakteri penghasil biosurfaktan adalah tidak berklorofil, motil, tidak berspora dan bersifat aerob. Untuk kelangsungan hidupnya bakteri biosurfaktan akan mendapatkan sumber makanan, oksigen serta energi yang berasal dari hasil proses dekomposisi (Notowinarso dan Agustina, 2015).

Hasil uji sulfida (H_2S) pada penelitian ini menunjukkan bahwa 4 isolat (S_{1_1} , S_{2_1} , S_{1_2} dan S_{3_2}) tidak menghasilkan sulfida / H_2S negatif karena tidak terjadi perubahan warna menjadi hitam pada bagian dasar dan 1 isolat bakteri (S_{2_2}) menghasilkan sulfida dan terjadi perubahan warna yaitu pada bagian dasar berwarna hitam. Menurut Rahayu (2014), bakteri yang tidak menghasilkan gas H_2S yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan hitam pada bagian dasar media agar.

Uji sitrat menunjukkan bahwa 3 isolat (S_{2_1} , S_{2_2} dan S_{3_2}) memberikan hasil positif ditandai dengan perubahan warna media dari

hijau menjadi biru dan 2 isolat lainnya (S₁ dan S₂) adalah negatif. Menurut (Hadioetomo dalam Yulvizar, 2013) bila bakteri mampu tumbuh dengan menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon maka terlihat perubahan warna pada permukaan agar miring media tumbuh bakteri menjadi biru. Menurut Suhandono *et al.* (2011), reaksi sitrat adalah mikroba yang dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dengan menggunakan *citrate permease* untuk membawanya ke dalam sel lalu memecahnya dengan sitrat menjadi piruvat dan CO₂. Na₂CO₃ yang bisa dideteksi oleh *bromthymol blue* sebagai indikator pada medium.

Uji Emulsifikasi

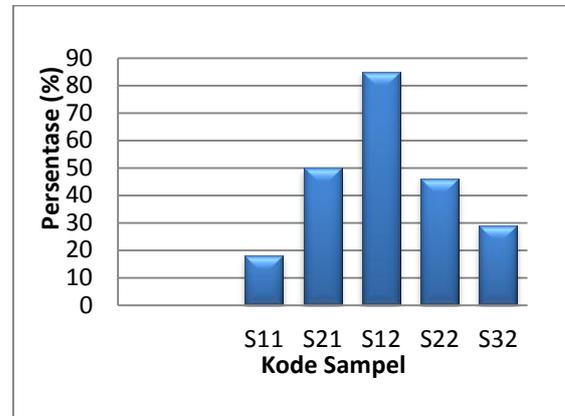
Hasil uji emulsifikasi dinyatakan sebagai indeks emulsifikasi. Indeks emulsifikasi berhubungan dengan konsentrasi surfaktan. Semakin kecil konsentrasi biosurfaktan, kemampuan senyawa tersebut untuk mengemulsikan minyak juga semakin berkurang. Adapun nilai indeks emulsifikasi dari seluruh isolat dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Uji Emulsifikasi

No	Kode Sampel	Sampel 3:1 ml		
		Sampel (cm)	Minyak (cm)	Busa (%)
1	S ₁	3.5	0.3	18
2	S ₂	2.5	0.1	50
3	S ₁ ₂	2.1	-	85
4	S ₂ ₂	3.4	0.1	29
5	S ₃ ₂	2.4	-	46

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa nilai indeks emulsifikasi (busa/foam) yang diperoleh pada sampel S₁ sebesar 18%, Sampel S₂₁ 50%, sampel S₁₂ 85%, sampel S₂₂ 29% dan sampel S₃₂ 46%. Dari hasil tersebut menyatakan bahwa semua

bakteri yang di peroleh berpotensi menghasilkan surfaktan. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada gambar grafik di bawah ini:



Gambar 3. Grafik Uji Emulsifikasi

Semakin tinggi *foam* yang terbentuk maka semakin tinggi pula indeks emulsifikasi yang dicapai. Hal ini terjadi karena semakin banyak biosurfaktan yang diproduksi, semakin meningkat pula kelarutan minyak dalam air. Willumsen and Karlson (1997) menyatakan bahwa surfaktan di dalam campuran tersebut akan mencegah terjadinya pemisahan dan akan menghasilkan lapisan minyak yang teremulsi. Nilai Emulsifikasi mengindikasikan bahwa emulsi yang menghasilkan nilai di atas 50% dinyatakan sebagai penghasil biosurfaktan yang baik. Nilai Emulsifikasi tertinggi pada penelitian ini dicapai oleh isolat bakteri S₁₂ (*Bacillus cereus*) yaitu 85%, sehingga dapat dikatakan sebagai bakteri penghasil biosurfaktan yang baik. Sedangkan nilai emulsifikasi terendah dihasilkan oleh isolat S₁ *Escherichia coli* yaitu 23.3%. Menurut Nababan (2008), mikroorganisme dengan produksi biosurfaktan yang besar pada umumnya juga mempunyai kemampuan yang besar dalam menguraikan senyawa hidrokarbon

melalui pelarutan ataupun emulsifikasi.

Genus *Bacillus cereus* telah banyak dilaporkan mampu menghasilkan beberapa jenis biosurfaktan seperti Fengycin, Iturin A dan Surfactin. Lipopeptide siklik surfactin, dihasilkan oleh *Bacillus cereus* adalah salah satu biosurfaktan yang paling kuat. Biosurfaktan ini mampu menurunkan tegangan permukaan hingga 27,9 mN/m pada konsentrasi 0,005% (Desai dan Banat, 1997). Dari hasil penelitian Alexander (1977) menyatakan bahwa spesies mikroorganisme yang mampu memproduksi biosurfaktan adalah *Agrobacterium*, *Athrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* dan *Xanthomonas* dari golongan bakteri; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporidium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* dari golongan Fungi; dan *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* dari golongan *Actinomycetes*.

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki nilai indeks emulsifikasi 50% yang artinya bakteri ini dapat dinyatakan sebagai bakteri penghasil biosurfaktan. *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus* sp. telah dilaporkan merupakan bakteri penghasil biosurfaktan. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Priya dan Usharani (2009); Oliveira *et al.* (2013); Bezza *et al.* (2015) menyatakan bahwa *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan genera bakteri yang sangat dikenal sebagai penghasil biosurfaktan. Bakteri ini banyak ditemukan di lingkungan terkontaminasi hidrokarbon dan strain dari genera ini telah banyak dilaporkan sebagai penghasil biosurfaktan sekaligus pendegradasi hidrokarbon yang

efisien. Penelitian Chikere *et al.* (2016); Syafrizal *et al.* (2010), menambahkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri hidrokarbonoklastik yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon pada solar sebagai komponen untuk keperluan metabolismenya sehingga dapat dimanfaatkan sebagai pendegradasi limbah mengandung hidrokarbon yang ada di lingkungan sekitar, salah satunya adalah limbah minyak bumi berupa lumpur berminyak.

Menurut pendapat Amin dan Nurrachmi (2013), *Pseudomonas aeruginosa* diketahui sebagai bakteri yang memproduksi biosurfaktan jenis ramnolipid. Ramnolipid dapat mengurangi tegangan permukaan air dari 72 mN/m menjadi 25-30 mN/m dan dapat pula mengurangi tegangan permukaan antara air dan minyak dari 43 mN/m menjadi dibawah 1 mN/m. Selain menghasilkan biosurfaktan ramnolipid, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diketahui mampu mendegradasi HAP seperti naftalena, fenantrena dan pirena (Kumar *et al.*, 2006).

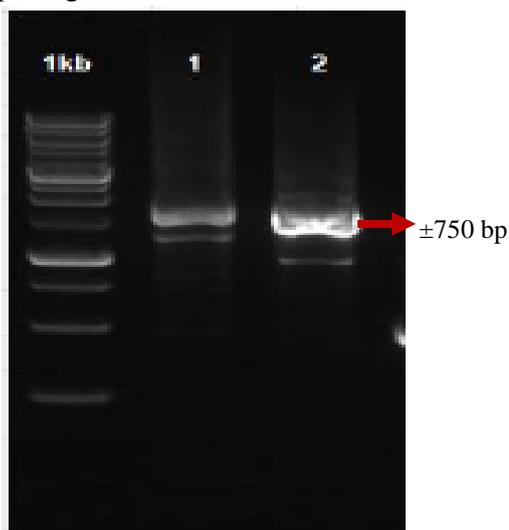
Pada isolat S1₁ (*Escheria coli*) dan S2₂ (*Proteus* sp.), diperoleh indeks emulsifikasi sebesar 18% dan 29%. Sejauh ini penelitian tentang bakteri *Escheria coli* dan *Proteus* sp. belum ada yang menyebutkan bahwa bakteri ini adalah bakteri penghasil biosurfaktan. Hasil penelitian Mufida *et al.* (2010) menyatakan bahwa *Proteus* sp. sering ditemukan di tanah dan di air serta merupakan flora normal pada saluran pencernaan manusia dan mamalia.

Selanjutnya, isolat bakteri *Klebsiella* sp. (S3₂) bakteri ini juga dapat menghasilkan surfaktan yang cukup baik dengan indeks emulsifikasi sebesar 46%. Menurut

Feliatra (2001) bakteri *Klebsiella* mampu hidup pada kondisi lingkungan yang tercemar hidrokarbon minyak bumi dan mampu mendegradasikan hidrokarbon minyak bumi serta bakteri ini memiliki kemampuan untuk tumbuh dan berkembang pada media yang berisi minyak mentah. Bakteri *Klebsiella* akan memanfaatkan hidrokarbon pada minyak bumi sebagai salah satu sumber karbon dalam metabolismenya. Penelitian lain yang telah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Klebsiella* diantaranya adalah penelitian (Will Fandri dalam Irda dan Suratni, 2015) pada instalansi pengolahan limbah cair industri kelapa sawit diketahui bahwa, *Klebsiella* merupakan bakteri kelompok lipolitik yang memiliki kemampuan dalam menghidrolisis lipid. Habitat alami dari *Klebsiella pneumoniae* adalah di tanah (Patrick, 2005; Elmer *et al.*, 2006).

DNA Hasil PCR

Adapun hasil PCR dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Elektroforesis DNA PCR Isolat S1₂

Hasil PCR pada gen *ubiquitin* menunjukkan bahwa, isolat S1₂ memiliki pita tebal dan tidak *smear*. Tebalnya pita menandakan isolat tersebut memiliki DNA yang cukup untuk analisis sekuen DNA. Besarnya ukuran pita yang dihasilkan sekitar 750 bp (*base pare*). Menurut Handoyo dan Rudiretna (2000), pita yang disekuensing ditentukan berdasarkan produk PCR yang menghasilkan pita dengan ukuran 600-1000 pb dan memiliki kualitas pita yang tebal dan tidak *smear*.

Sekuensing dan Analisis BLAST

Sekuensing adalah proses pengurutan basa nitrogen. Proses pengurutan DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa dari gen *ubiquitin*. Sekuen yang diperoleh kemudian diambil menggunakan BioEdit. Hasil analisis dari program BioEdit akan diperoleh urutan nukleotida dari gen *ubiquitin* (FASTA) yang akan digunakan pada analisis selanjutnya. Hasil FASTA sekuen 16S rDNA dari isolat bakteri S1₂ dapat dilihat pada Lampiran 1. Urutan DNA yang diperoleh kemudian di sejajarkan dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk memastikan sekuen DNA tersebut merupakan bagian dari gen *ubiquitin* dengan mencari kemiripannya (homologi) gen *ubiquitin* dari bakteri S1₂. Hasil identifikasi isolat dari program BLAST dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil sekuen isolat bakteri dengan Program BLAST

<i>Description</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2594	2594	100%	0.0	100%	MG890230.1
<i>Bacillus cereus</i>	2594	2594	100%	0.0	100%	KY312801.1
<i>Bacillus sp.</i>	2594	2594	100%	0.0	100%	<u>JF901711.1</u>
<i>Bacillus anthracis</i>	2590	2590	100%	0.0	99%	<u>KM817220.1</u>
<i>Uncultured bacterium</i>	2589	2589	99%	0.0	100%	<u>MH356588.1</u>
<i>Proteobacteria bacterium</i>	2589	2589	99%	0.0	100%	<u>MH061189.1</u>

Sumber: BLAST

Analisis BLAST menunjukkan bahwa gen *ubiquitin* pada bakteri pada isolat S₁₂ memiliki kemiripan dengan gen *ubiquitin* pada *Bacillus cereus*. Besarnya kemiripan tersebut berkisar 99%-100% dengan nilai *E-Value* = 0.0 dan *query cover* 100%. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh sekuen *ubiquitin* (750 bp) terpakai dalam analisis BLAST. Menurut Rukmana (2015), apabila nilai *E-Value* semakin rendah maka semakin akurat datanya, apabila *ident* semakin tinggi maka kemiripannya semakin tinggi.

Mekanisme biodegradasi hidrokarbon minyak bumi oleh bakteri *Bacillus cereus* dengan menggunakan hidrokarbon minyak bumi sebagai sumber karbon dan energi. Proses biodegradasi hidrokarbon minyak bumi akan menghasilkan CO₂, H₂O dan biomassa sel. Selama aktivitas berlangsung bakteri mengeluarkan metabolit-metabolit ke dalam media berupa asam, surfaktan dan gas yang dapat mempengaruhi lingkungannya diantaranya asam menurunkan pH dan surfaktan menurunkan tegangan antar muka media. Penurunan tegangan antar muka media menyebabkan minyak terdispersi dan memperbesar kontak permukaan antara bakteri dan minyak sehingga akan terjadi peningkatan biodegradasi hidrokarbon minyak

bumi. Sebelum biodegradasi berlangsung, hidrokarbon minyak bumi akan masuk ke dalam sitoplasma bakteri (Irawati, 2005).

Proses selanjutnya, bakteri memproduksi enzim yang dapat mendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Enzim mendegradasi senyawa tersebut dengan cara mengeksploitasi kebutuhan bakteri akan energi. Selama pertumbuhannya, bakteri akan mengeluarkan enzim yang akan bergabung dengan substansi membentuk senyawa kompleks enzim-substansi, kemudian terurai menjadi produk lain. Enzim tidak habis dalam reaksi tersebut tetapi dilepaskan kembali untuk reaksi selanjutnya dengan substansi lainnya. Proses ini terjadi berulang-ulang sampai semua substansi yang tersedia terpakai. Tingkat kemudahan hidrokarbon minyak bumi didegradasi oleh bakteri tergantung kepada struktur dan bobot molekulnya. Secara umum kemampuan biodegradasi naik dengan kenaikan panjang rantai. Panjang rantai optimum untuk didegradasi antara 10-20 rantai karbon (Satria, 2005).

Habitat utama *Bacillus cereus* adalah lingkungan dan saluran pencernaan. Terutama tanah dan air. Penanjung *et al.* (2015) menyatakan bakteri dari jenis ini tidak hanya dijumpai di tanah, air, makanan fermentasi tetapi juga ditemukan di perairan pantai.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan 5 isolat bakteri murni S1₁ (*Escheria coli*), S2₁ (*Pseudomonas aeruginosa*), S1₂ (*Bacillus cereus*), S2₂ (*Proteus* sp.) dan S3₂ (*Klebsiella* sp.). Jumlah bakteri penghasil biosurfaktan yang ditemukan pada kolam tanah *Gathering Station – Eor Plant* PT. Bumi Siak Pusako memiliki *range* antara 3.9×10^6 - 1.8×10^8 . Hasil uji emulsifikasi diketahui bahwa sampel S1₂ (*Bacillus cereus*) memiliki nilai emulsifikasi yang paling tinggi yaitu 85% dan nilai emulsifikasi terendah terdapat pada sampel S1₁ (*Escheria coli*) dengan indeks emulsifikasi 18%. Isolat *Bacillus* sp. merupakan isolat yang dilakukan uji lanjut DNA dengan menggunakan sekuens 16S rRNA dan analisis BLAST, uji lanjut ini dilakukan karena bakteri *Bacillus* sp. merupakan yang terbaik dalam menghasilkan surfaktan. Hasil identifikasi dengan menggunakan analisis 16S rRNA diketahui bahwa isolat *Bacillus* sp. memiliki tingkat homologi sebesar 100% terhadap spesies *Bacillus cereus*.

Saran

Penelitian selanjutnya disarankan perlu dilakukan uji lanjut analisis DNA terhadap semua jenis bakteri yang diperoleh agar spesies bakteri dapat diketahui, perlu dilakukan uji lanjut untuk melihat kemampuan dari masing-masing bakteri dalam mendegradasi berbagai jenis minyak.

DAFTAR PUSTAKA

Amin. B dan Nurrachmi. 2013. Kandungan Minyak dan Efeknya terhadap Kelimpahan

Diatom di Perairan Selat Rupat dan Selat Malaka. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Riau. Pekanbaru.

Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Second Edition. New York: John Wiley and Sons. 235 p.

Bezza, F.A. Beukes, M. Chirwa, E.M.N. 2015. Application of Biosurfactant Produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for Enhancing Petroleum Sludge Bioremediation. Proc Biochem. 50 (11): 1911-1922.

Capucino, J.G and Sherman, N. 2002. Microbiology a Laboratory Manual 6th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, P. 280.

Chikere, C.B., A.U. Okoye., G.C. Okpokwasili. 2016. Microbial Community Profiling of Active Oleophilic Bacteria Involved in Bioreactor-Based Crude-Oil Polluted Sediment Treatment. J. App Env Microbiol. 4(1): 10-20.

Choirunnisa, A.A. 2011. Uji Biokimia. <http://choalialmu89.blogspot.com/> 9 April 2011.

Desai, J.D. Banat, I.M. 1997. Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potential. Microbiol Mol Biol Rev. 61 (1): 47-64.

Elmer, W.K., S.D. Allen., W.M. Janda., P.C. Schreckenberger and W.C. Winn. 2006. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. Baltimore: Lippincott Williams Wilkins. 213-234 p.

Feliatra. 2001. Buku Ajaran Mikrobiologi Laut. Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan

- Perairan Universitas Riau. Pekanbaru. 139 hal.
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Jakarta: Gramedia.
- Handoyo, D dan A. Rudiretna. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). UNITAS. 9: 17-29.
- Irawati T. 2005. Bioremediasi Tanah Terkontaminasi Minyak Bumi dengan Menggunakan *Bacillus popilliae* ICBB 7859 di PT. Caltex Pasif Indonesia. IPB Press. Bogor
- Irda, S. Suratni. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Limbah Cair Minyak Bumi GS Chevron Pasifik Indonesia di Desa Benar Kecamatan Rimba Melintang Rokan Hulir. Jurnal Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. 1 (4): 320-334.
- Kosaric, N. 1992. Biosurfactants in Industry. Pure & Appl. Chem., Vol. 64. (11) : 1731 - 1737.
- Kumar, M., V. Leona., A.D.S. Malterano., O.A. Ilzins., I.G. Castro and S.L. Fuenmayor. 2006. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant-Producing *Pseudomonas* sp. IR1. Naturforsch. 61: 203-212.
- Lin, S.C. 1994. Structural and Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. Application Appl. Environ. Microbiology. 1 (60): 31-38.
- Madigan, M., J. Martinko., P. Dunlap dan D. Clark. 2009. Biology of Microorganisms 12th Edition. Unit 1. 81p.
- Maneerat, S and K. Phetrong. 2007. Of Biosurfactant-producing Marine Bacteria and Characteristics of Selected Biosurfactant. Songklanakarin. Sci. Technol. 29 (3): 781–791.
- Monica, Periadnadi. 2015. Isolasi Bakteri Pendegradasi Limbah Cair Industri Minyak Sawit. Padang: Jurnal Biologi Universitas Andalas. Vol. 4, No. 1: 71-76.
- Nababan, B. 2008. Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar dari Laut Belawan. Tesis. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Rukmana, S. 2015. Perbandingan Sekuen Kapang *Trichoderms* sp. Berdasarkan Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA dengan Menggunakan Database NCBI. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Ibrahim Malang. Malang.
- Satria R. 2005. Bioremediasi Tanah Terkontaminasi Minyak Bumi oleh *Bacillus* sp. dan *Klebsiella* sp. Bogor : IPB Press.
- Penanjung, A.M.S., E.U. Ulfa., K. Senjarini., S. Arimurti. 2015. Karakteristik Isolat Bakteri Fibrinolitik Wu 021055 Asal Perairan Pantai Papuma, Jember. J. Bioteknologi dan Biosains Indonesia. 2 (1): 1-8.
- Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 19 Tahun 2010 tentang Baku Mutu Air Limbah Bagi Usaha dan/Atau Kegiatan Minyak dan Gas serta Panas Bumi. 30 November 2010. Jakarta.

- Prescott, et al. 2008. Microbiology 7th edition. USA: McGraw-Hill Book Company.
- Rahayu, S. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Sumber Air Panas Tamalantik Mamasa, Sulawesi Barat. Skripsi. Makasar: Universitas Hasanudin.
- Riau Pos.com. 2013. Potensi dan Tantangan Nasionalisasi Migas di Tengah Penurunan Produksi di Riau. Menakar Kemampuan Perusahaan Nasional-atau Daerah(online).<http://riaupos.com/berita.menakar-kemampuan-perusahaan-nasional-atau-daerah.html>. (diakses 10 April 2014).
- Samosir, M. F. 2016. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Potensial Probiotik pada Saluran Pencernaan Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara: Medan.
- Sandra, K. 2011. Studi Kelimpahan Diatom dan Konsentrasi Nitrat saat Pasang dan Surut di Perairan Pantai Kawasan Depo Pertamina Tanjung Uban. Skripsi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Pekanbaru.
- Sudarsono, A. 2008. Isolasi dan Karakteristik Bakteri pada Ikan Laut dalam Spesies Ikan Gindara (*Lepidocibium flavobronneum*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suhandono, S. A. Apriyanto, A. Pradita dan Anryansyah, R. 2011. Buku Panduan Praktikum Biosistemika Mikroba (Ver. Bahasa) – Unpublished. Rev. 2.
- Susana, M. 2017. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Heterotrofik pada Perairan Laut Kawasan Pemukiman dan Perairan Bersalinitas Rendah di Kelurahan Purnama Dumai, Provinsi Riau. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Udiharto, M. 1996. Bioremediasi Minyak Bumi. Prosiding Pelatihan dan Lokakarya Peranan Bioremediasi dalam Pengelolaan Lingkungan Kerjasama Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia dan Hanss Seidel Foundation (HSF) Jerman. Bogor.
- Wahid, N.Y.R. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Luka Ikan Mas koki (*Carassius auratus*) Akibat Infestasi Ektoparasit *Argulus* sp. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Waluyo, Lud. 2004. Mikrobiologi Umum. Universitas Muhammadiyah. Malang Press. Malang.
- Widyawati, R. 2012. Penuntun Praktek Mikrobiologi, Uji IMVic. <http://rodiahmikrobiologi.blogspot.com/2012/01/uji-imvic.html>. Tgl:31mei 2017.
- Willumsen, P.A and Karlson, U. 1997. Screening of Bacteria, Isolated from PAH Contaminated Soils, for Production of Biosurfactans and Bioemulsifiers. Biodegradation 7: 415–423.
- Yulfizar, C. 2013. Isolasi dan Identifikasi Baktteri Probiotik

pada *Rastrellinger* sp.
Skripsi. Universitas Syah
Kuala.

Yusuf, A. 2009. Analisis Risiko
Agen Hayati untuk
Pengendalian Patogen pada
Tanaman. Skripsi. Universitas
Riau.