

Seleksi dan Karakterisasi Isolat Bakteri Termofilik Penghasil Biosurfaktan Dari Minyak Bumi Untuk Pengembangan Teknologi Microbial Enhanced Oil Recovery

Rica Denis*, Ari Femi Agustiya

Universitas Bengkulu, Indonesia¹

Akademi Analis Kesehatan Harapan Bangsa Bengkulu, Indonesia²

Email: ricadenis@unib.ac.id^{1*}

Keywords :	Abstract
Biosurfactant; Crude oil; Microbial Enhanced Oil Recovery; Mature oil wells; Thermophilic bacteria	<i>Improving oil recovery from old wells is a key challenge in the petroleum industry, as a portion of oil reserves remains trapped in the reservoir after conventional production. Conventional methods can only recover about one-third of the initial oil reserves, so alternative technology is needed to recover the remaining trapped oil. One alternative technology being developed is Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), utilizing biosurfactant-producing microorganism activity. Biosurfactants have advantages over chemical surfactants because they are biodegradable, non-toxic, and stable under extreme reservoir conditions. This study aims to determine the ability of thermophilic bacterial isolates from old-well petroleum to produce biosurfactants, and identify isolate characteristics based on morphological and physiological properties. The study involved isolate selection using a hemolytic activity test on blood agar medium, followed by colony and cell morphology characterization, Gram staining, endospore staining, and physiological-biochemical tests. The results show that of 33 thermophilic bacterial isolates tested, 16 isolates showed potential as biosurfactant producers based on the formation of clear zones on blood agar medium. After further characterization, 11 distinct isolates were obtained with characteristics potentially applicable to MEOR technology. These isolates were able to adapt to thermophilic conditions and produce biosurfactants that reduce oil-water interfacial tension, thereby potentially increasing oil recovery from old reservoirs. Identification results show that the isolates belong to the genera Bacillus, Enterobacter, Citrobacter, and Syntrophococcus, which are known to have biosurfactant-producing capability. This study provides baseline information on the potential of indigenous bacteria as biological agents in developing more environmentally friendly oil-production enhancement technology.</i>
Kata kunci:	Abstrak
Bakteri termofilik; Biosurfaktan; <i>Microbial Enhanced Oil Recovery</i> ; Minyak bumi; Sumur minyak tua	Peningkatan perolehan minyak bumi dari sumur tua menjadi salah satu tantangan dalam industri perminyakan karena sebagian cadangan minyak masih tertinggal di dalam reservoir setelah proses produksi konvensional. Metode konvensional hanya mampu mengambil sekitar sepertiga dari cadangan minyak awal, sehingga diperlukan teknologi alternatif untuk mengambil sisa minyak terperangkap. Salah satu teknologi alternatif yang dikembangkan adalah Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme penghasil biosurfaktan. Biosurfaktan memiliki keunggulan dibandingkan surfaktan kimia karena bersifat biodegradable, tidak toksik, dan stabil pada kondisi reservoir ekstrem. Penelitian ini bertujuan mengetahui

kemampuan isolat bakteri termofilik dari minyak bumi sumur tua dalam menghasilkan biosurfaktan serta mengidentifikasi karakteristik isolat berdasarkan sifat morfologi dan fisiologinya. Penelitian dilakukan melalui tahap seleksi isolat menggunakan uji aktivitas hemolitik pada medium agar darah, kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi morfologi koloni, morfologi sel, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, serta uji fisiologis dan biokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 33 isolat bakteri termofilik yang diuji, sebanyak 16 isolat menunjukkan potensi sebagai penghasil biosurfaktan berdasarkan terbentuknya zona bening pada medium agar darah. Setelah dilakukan karakterisasi lebih lanjut, diperoleh 11 isolat berbeda yang memiliki karakteristik potensial untuk diaplikasikan dalam teknologi MEOR. Isolat tersebut mampu beradaptasi pada kondisi termofilik dan menghasilkan biosurfaktan yang berperan menurunkan tegangan antarmuka minyak-air sehingga berpotensi meningkatkan perolehan minyak bumi dari reservoir tua. Hasil identifikasi menunjukkan isolat-isolat tersebut termasuk dalam genus *Bacillus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, dan *Syntrophococcus*, yang telah diketahui memiliki kemampuan menghasilkan biosurfaktan. Penelitian ini memberikan informasi dasar mengenai potensi bakteri indigenous sebagai agen biologis dalam pengembangan teknologi peningkatan produksi minyak yang lebih ramah lingkungan.

PENDAHULUAN

Minyak bumi terbentuk sebagai hasil akhir dari penguraian bahan-bahan organik (sel-sel dan jaringan hewan atau tumbuhan laut) yang tertimbun selama berjuta tahun di dalam tanah, baik di daerah daratan atau pun di daerah lepas pantai (Tsany, 2021; Rachmawati, 2022). Hal ini menunjukkan bahwa minyak bumi merupakan sumber daya alam yang tidak dapat diperbaharui. Terbentuknya minyak bumi sangat lambat, oleh karena itu perlu penghematan dalam penggunaannya secara efektif dan efisien (Hadi, 2005; Astin, 2024). Kebutuhan energi dunia yang terus meningkat sementara cadangan minyak bumi semakin menipis mendorong upaya ekstraksi minyak dari sumur-sumur tua yang dianggap tidak produktif.

Banyak sumur minyak tua yang terdapat di Indonesia, salah satunya adalah di wilayah Sumatera Selatan, di Kabupaten Muara Enim, lokasi lapangan minyak Jirak. Sumur minyak tua ini dianggap sudah tidak produktif lagi, tetapi sebenarnya masih memiliki kandungan minyak yang masih bisa dieksploitasi (Anonim, 2004; Nurhayati, 2022). Metode pemulihan primer dan sekunder hanya mampu mengambil sekitar 35-55% dari minyak awal di reservoir, sehingga masih ada minyak yang terperangkap dan dapat diekstraksi dengan teknologi tersier.

Penelitian sebelumnya oleh Joshi et al., (2024) menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* SMP-2 yang diisolasi dari makanan fermentasi dapat menghasilkan biosurfaktan lipopeptida hingga 8,13 g/L dan menurunkan tegangan permukaan air dari 72 mN/m menjadi 37 mN/m. Penelitian lain oleh (Manurung et al., 2025) berhasil mengisolasi bakteri termofilik penghasil biosurfaktan dari sumur minyak di Sumatera Selatan, dengan tiga isolat yang secara signifikan menghasilkan biosurfaktan yaitu *Pseudomonas citronellolis*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Burkholderia glumae*. Selain itu, penelitian tentang uji stabilitas biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* DS1 menunjukkan bahwa biosurfaktan tersebut stabil pada pH 4-10, suhu hingga 120°C, dan konsentrasi NaCl hingga 10%. Uji core flooding dengan biosurfaktan menghasilkan perolehan minyak tambahan sebesar 5,4%, menunjukkan potensi besar aplikasi biosurfaktan dalam MEOR.

Salah satu upaya meningkatkan perolehan minyak bumi dari sumur yang sudah tidak produktif adalah dengan penggunaan mikroba yang dikenal dengan metode MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery). Ada dua kelompok teknik MEOR yang digunakan saat ini dalam meningkatkan pengambilan kembali cadangan minyak bumi yaitu teknik in-situ dan ex-situ. Teknik yang pertama yaitu menstimulasi bakteri potensial yang sudah tersedia atau hidup dalam reservoir (bakteri indigen) untuk menghasilkan bioproduk yang bermanfaat bagi peningkatan pengambilan kembali minyak bumi dari sumur-sumur tua minyak bumi. Teknik yang kedua adalah menginjeksikan bioproduk yang dihasilkan oleh bakteri ke dalam reservoir (Huntoro, 1998; Indrianti, 2022). Teknik in-situ lebih ekonomis karena memanfaatkan bakteri indigenous yang sudah beradaptasi dengan kondisi reservoir .

Kesenjangan penelitian (research gap) terletak pada terbatasnya informasi mengenai isolat bakteri termofilik indigenous dari sumur minyak tua di Indonesia yang telah dikarakterisasi secara komprehensif untuk aplikasi MEOR. Penelitian sebelumnya lebih banyak berfokus pada isolasi dan identifikasi awal, tanpa karakterisasi menyeluruh terhadap morfologi, fisiologi, dan biokimia isolat serta identifikasi genusnya. Selain itu, penelitian tentang bakteri termofilik dari sumur minyak tua di Sumatera Selatan masih sangat terbatas .

Menurut Mustafa, (2006) reservoir minyak bumi di Indonesia sebagian besar memiliki kondisi oksigen yang relatif sedikit, dengan suhu di atas 40°C bahkan dapat mencapai 90°C atau lebih. Bakteri yang dapat tumbuh dan melakukan aktivitas hidupnya di dalam reservoir minyak, diantaranya adalah bakteri termofilik. Menurut (Grave et al., 1957) dalam (Donaldson, 1989) melaporkan sejumlah mikroba yang bersifat aerobik dan anaerobik ada dalam air reservoir. Variasi terbesar dari mikroba itu dilaporkan oleh Lazar (1983) dalam Donaldson (1989), adalah termasuk genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Clostridium* dan beberapa *Enterobacteriaceae*. Kelompok bakteri yang telah diketahui mampu memproduksi biosurfaktan adalah *Bacillus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Acinetobacter* (Richana et al., 1997; Purwoko et al., 1997 dalam Akhsin, 2002). Penelitian terbaru oleh (Sonbhadra & Pandey, 2025) menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* memiliki potensi besar untuk aplikasi MEOR karena biosurfaktan yang dihasilkan stabil pada berbagai kondisi lingkungan ekstrem .

Urgensi penelitian ini didasarkan pada kebutuhan akan teknologi MEOR yang efektif dan ramah lingkungan untuk meningkatkan perolehan minyak dari sumur tua di Indonesia. Dengan semakin menipisnya cadangan minyak bumi dan meningkatnya kebutuhan energi, teknologi ini menjadi sangat penting untuk diterapkan. Penelitian ini menjadi penting karena memberikan informasi dasar tentang karakteristik bakteri indigenous yang dapat digunakan sebagai agen biologis dalam MEOR, yang selama ini masih belum banyak dieksplorasi .

Biosurfaktan merupakan molekul yang cenderung terkonsentrasi pada batas fase minyak-air sehingga biosurfaktan berperan dalam menurunkan tegangan permukaan minyak-air. Biosurfaktan terdiri atas dua bagian fungsional, yaitu yang bersifat hidrofilik (polar) pada satu sisi dan hidrofobik (non polar) pada sisi lain dalam satu molekul (Horowitz et al., 1990 dalam Aditiawati, 2001; Hanisa, 2024). Biosurfaktan bersifat nontoksik dan dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis yaitu glikolipida, lipopeptida, asam lemak, dan fosfolipida tergantung pada jenis mikroba penghasilnya. Lipopeptida merupakan salah satu jenis senyawa penting yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp, yang dikenal dengan nama surfaktin (Fiechter, 1992 dalam Purwoko et al., 1999; Ilmiati, 2022). Biosurfaktan menawarkan

keunggulan dibandingkan surfaktan kimia karena ramah lingkungan, biodegradable, dan stabil pada kondisi ekstrem .

Metode MEOR memanfaatkan bioproduk hasil aktifitas metabolisme mikroba, salah satunya adalah biosurfaktan. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri akan mengakibatkan meningkatnya kontak antara bakteri dengan substrat (minyak). Biosurfaktan akan mengubah sifat fisik minyak yang ada di dalam reservoir sumur minyak menjadi lebih rendah viskositasnya, sehingga dapat membantu terlepasnya sisa cadangan minyak dari batuan reservoir (Ningrum, 2019; Kusnaa, 2022). Menurut Mustafa (2006) sebagian mikroba memiliki kemampuan untuk menghasilkan beberapa senyawa seperti biosurfaktan dan gas, yang berpotensi dalam peningkatan perolehan minyak bumi. Penelitian oleh Purwasena et al. (2024) menunjukkan bahwa bakteri *Halomonas meridiana* BK-AB4 yang diisolasi dari lingkungan dengan salinitas tinggi dapat memproduksi biosurfaktan pada suhu 65°C dan menurunkan tegangan antarmuka hingga 1,817 dyne/cm, menunjukkan potensinya untuk aplikasi MEOR pada kondisi reservoir ekstrem .

Kebaruan (novelty) penelitian ini terletak pada: (1) penggunaan isolat bakteri termofilik indigenous dari sumur minyak tua di Sumatera Selatan yang belum banyak dieksplorasi; (2) karakterisasi komprehensif yang mencakup morfologi, fisiologi, dan biokimia hingga tingkat genus; (3) identifikasi genus bakteri termofilik penghasil biosurfaktan dari sumur minyak tua dengan kedalaman bervariasi, yang memberikan kontribusi pada pemahaman tentang distribusi bakteri termofilik pada berbagai kedalaman sumur. Penelitian ini melengkapi penelitian sebelumnya yang hanya berfokus pada isolasi awal tanpa karakterisasi menyeluruh .

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri termofilik dari sumur minyak tua dalam menghasilkan biosurfaktan serta mengidentifikasi karakteristik isolat berdasarkan sifat morfologi dan fisiologinya. Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi dasar tentang potensi bakteri indigenous sebagai agen biologis dalam pengembangan teknologi MEOR, yang dapat meningkatkan perolehan minyak dari sumur tua secara ramah lingkungan dan berkelanjutan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium dengan pendekatan analitis untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofilik penghasil biosurfaktan dari sampel minyak bumi sumur tua. Jenis penelitian ini merupakan penelitian terapan yang bertujuan untuk menyeleksi dan mengidentifikasi karakteristik isolat bakteri termofilik yang berpotensi untuk dikembangkan dalam teknologi Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) (Arikunto, 2016). Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh bakteri termofilik yang berhasil diisolasi dari sampel minyak bumi sumur tua pada penelitian pendahuluan, sedangkan sampel yang digunakan adalah 33 isolat bakteri termofilik yang telah diisolasi dari tiga sumur minyak tua dengan kedalaman berbeda di Kabupaten Muara Enim, Sumatera Selatan. Teknik pengambilan sampel pada penelitian pendahuluan menggunakan teknik multiple sampling dengan mengambil sampel minyak bumi dari tiga titik sumur yang berbeda berdasarkan kedalaman, yaitu sumur dengan kedalaman kurang dari 297 meter, sumur dengan kedalaman antara 297 sampai 518 meter, dan sumur dengan kedalaman lebih dari 518 meter. Sampel minyak bumi tersebut kemudian diisolasi untuk mendapatkan isolat bakteri termofilik murni.

Instrumen penelitian yang digunakan meliputi peralatan utama untuk uji mikrobiologi

dan karakterisasi. Untuk uji seleksi biosurfaktan digunakan medium agar darah (blood agar) dengan metode tusuk. Untuk karakterisasi morfologi koloni digunakan medium NA (Nutrient Agar) dalam tiga bentuk yaitu NA lempeng, NA tegak, dan NA miring. Untuk pengamatan morfologi sel digunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x, serta peralatan untuk pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Untuk uji fisiologis dan biokimia digunakan medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar) untuk uji fermentasi gula dan produksi H₂S, medium SC (Simon's Citrat) untuk uji sitrat, medium MR-VP untuk uji methyl red dan Voges-Proskauer, medium urea agar untuk uji hidrolisis urea, medium pati untuk uji hidrolisis pati, serta medium NB (Nutrient Broth) dengan BTB (Brom Timol Blue) dan tabung Durham untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, fruktosa, laktosa, maltosa). Semua prosedur pengujian mengikuti protokol standar mikrobiologi seperti yang dijelaskan dalam buku panduan Cappucino (1992), Lay (1994), dan Hadioetomo (1993). Uji validitas dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif pada setiap pengujian untuk memastikan keakuratan hasil. Kontrol positif menggunakan bakteri yang telah diketahui karakteristiknya, sedangkan kontrol negatif menggunakan media tanpa inokulasi bakteri. Uji reliabilitas dilakukan dengan pengulangan pengujian sebanyak tiga kali (triplo) untuk setiap isolat guna memastikan konsistensi dan reproduibilitas hasil yang diperoleh.

Prosedur penelitian dilaksanakan dalam dua tahap utama, yaitu tahap seleksi dan tahap karakterisasi. Tahap seleksi dimulai dengan menginokulasikan 33 isolat bakteri termofilik pada medium agar darah menggunakan metode tusuk, kemudian diinkubasi pada suhu 40°C selama 48 jam. Pemilihan suhu inkubasi 40°C didasarkan pada sensitivitas medium agar darah terhadap suhu tinggi dan untuk menjaga kompatibilitas dengan kondisi reservoir minyak bumi di Indonesia yang memiliki suhu antara 40°C hingga 90°C (Mustafa, 2006). Isolat yang menunjukkan zona bening di sekitar koloni pada medium agar darah dianggap positif menghasilkan biosurfaktan dan selanjutnya dikarakterisasi. Tahap karakterisasi meliputi: (1) pengamatan morfologi koloni pada media NA lempeng, NA tegak, dan NA miring setelah inkubasi 48 jam pada suhu 40°C; (2) pengamatan morfologi sel melalui pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora dengan pengamatan mikroskopis; (3) uji fisiologis dan biokimia yang meliputi uji katalase, uji motilitas pada medium semi-solid, uji sitrat, uji methyl red, uji Voges-Proskauer, uji indol, uji fermentasi gula dengan TSIA, uji hidrolisis pati, uji hidrolisis urea, dan uji fermentasi karbohidrat (glukosa, fruktosa, laktosa, maltosa). Semua pengujian biokimia dilakukan sesuai prosedur standar dan hasilnya dibandingkan dengan karakteristik pada Bergey's Manual of Determinative Bacteriology edisi ke-8 (Buchanan & Gibbon, 1974) dan edisi ke-9 (Holt et al., 1994) untuk identifikasi genus. Pengolahan dan analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif dengan menyajikan hasil pengamatan dalam bentuk tabel dan narasi. Data yang diperoleh dari setiap pengujian dikompilasi dan dianalisis untuk menentukan karakteristik setiap isolat, kemudian dilakukan pengelompokan isolat berdasarkan kesamaan karakteristiknya. Identifikasi genus dilakukan dengan mencocokkan karakteristik morfologi dan biokimia yang diperoleh dengan kunci determinasi dalam Bergey's Manual.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi isolat bakteri termofilik dari sumur minyak tua yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan

Isolat bakteri termofilik yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil isolasi dan seleksi bakteri termofilik yang telah dilakukan pada penelitian pendahuluan (Lampiran 1). Isolat bakteri termofilik tersebut kemudian diseleksi kembali untuk mengetahui potensinya dalam menghasilkan biosurfaktan menggunakan uji aktivitas hemolitik pada medium agar darah. Hasil seleksi menunjukkan bahwa dari 33 isolat bakteri termofilik yang diuji, sebanyak 16 isolat menunjukkan aktivitas hemolitik positif yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada medium agar darah (Tabel 4.1). Zona bening yang terbentuk mengindikasikan adanya aktivitas biosurfaktan yang menyebabkan lisis sel darah merah, sesuai dengan mekanisme kerja biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan dan mengubah permeabilitas membran sel (Cooper & Zajic, 1980; Purwoko et al., 1999).

Tabel 4.1. Isolat Bakteri Termofilik Dari Sumur Minyak Tua Yang Berpotensi Menghasilkan Biosurfaktan

Kategori	Isolat Bakteri Termofilik		Isolat bakteri termofilik yang terseleksi berpotensi penghasil biosurfaktan		Keterangan
	Jumlah	Kode Isolat	Jumlah	Kode Isolat	
I	4	B ₉ , B ₁₃ , B ₁₄ , B ₁₉	1	B ₁₃	Sumur minyak dengan kedalaman sumur < 297 meter
	26	D ₂ , D ₅ , D ₉ , D ₁₀ , D ₁₁ , D ₁₂ , D ₁₄ , D ₁₉ , D ₂₅ , D ₂₇ , D ₂₈ , E ₁ , E ₄ , E ₈ , E ₁₁ , E ₁₅ , E ₁₆ , E ₁₇ , E ₂₁ , E ₂₃ , E ₂₄ , F ₂ , G ₅ , G ₇ , G ₈ , G ₉	12	D ₂ , D ₅ , D ₁₀ , D ₁₄ , E ₁ , E ₁₁ , E ₁₅ , E ₁₇ , E ₂₃ , F ₂ , G ₇ , G ₈	Sumur minyak dengan kedalaman sumur 297 sampai 518 meter
	3	I ₁ , I ₃ , J ₁	3	I ₁ , I ₃ , J ₁	Sumur minyak dengan kedalaman sumur > 518 meter
	33		16		

Sumber: Hasil penelitian, 2026.

Berdasarkan Tabel 4.1, distribusi isolat yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan bervariasi berdasarkan kedalaman sumur. Kelompok I (kedalaman < 297 meter) hanya menghasilkan 1 isolat positif dari 4 isolat yang diuji (25%), kelompok II (kedalaman 297-518 meter) menghasilkan 12 isolat positif dari 26 isolat yang diuji (46,15%), dan kelompok III (kedalaman > 518 meter) menghasilkan 3 isolat positif dari 3 isolat yang diuji (100%). Proporsi isolat positif tertinggi terdapat pada kelompok III, namun jumlah isolat terbanyak terdapat pada kelompok II. Hal ini mengindikasikan bahwa kedalaman sumur dan kondisi lingkungan yang menyertainya mempengaruhi keberadaan dan aktivitas bakteri termofilik penghasil

biosurfaktan. Semakin dalam sumur, suhu dan tekanan semakin tinggi, yang dapat membatasi jenis bakteri yang dapat bertahan hidup, namun bakteri yang mampu bertahan pada kondisi ekstrem tersebut berpotensi besar menghasilkan biosurfaktan.

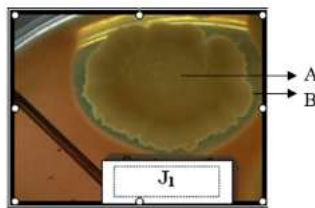
Pada kedalaman sumur minyak tua 297 sampai 518 meter merupakan jumlah isolat yang terbanyak bila dibandingkan dengan kedalaman sumur minyak tua kurang dari 297 meter dan lebih dari 518 meter. Perbedaan jumlah isolat pada setiap kedalaman sumur disebabkan oleh perbedaan kondisi lingkungan, terutama suhu dan ketersediaan nutrisi. Dari kedalaman sumur yang berbeda dimungkinkan memiliki suhu yang berbeda juga. Pada sumur yang paling dalam kemungkinan memiliki suhu yang paling tinggi bila dibandingkan dengan sumur yang lebih dangkal. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 4.1, sumur dengan kedalaman antara 297 sampai 518 meter diduga memiliki suhu yang sedang bila dibandingkan dengan kedalaman sumur yang lain dan kemungkinan suhu tersebut merupakan suhu yang lebih cocok untuk pertumbuhan bakteri kelompok termofilik penghasil biosurfaktan. Hal ini didukung oleh pendapat Asnawati (2001) yang menyatakan bahwa suhu reservoir minyak bumi terutama ditentukan oleh kedalamannya, makin dalam sumur minyak maka makin tinggi suhunya. Penelitian oleh Sonbhadra & Pandey (2025) juga mengkonfirmasi bahwa faktor lingkungan seperti suhu dan pH sangat mempengaruhi produksi biosurfaktan oleh bakteri termofilik.

Selain suhu, kemungkinan lain yang mempengaruhi pertumbuhan dari isolat bakteri tersebut adalah nutrisi di dalam sumur minyak itu sendiri. Untuk menghasilkan metabolit, mikroba memerlukan sumber karbon, nitrogen dan mineral lainnya. Karbon dan nitrogen merupakan dua unsur makro yang digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan mikroba. Hal ini sesuai dengan pernyataan Desai dan Desai (1993) dalam Mangunwidjaja (1999) bahwa komposisi biosurfaktan dipengaruhi oleh nisbah C dan N dalam medium pertumbuhan. Optimasi nisbah C dan N amat penting karena biosurfaktan yang diproduksi oleh mikroba memerlukan sumber nutrisi yang optimum untuk menghasilkan metabolit. Penelitian oleh Purwasena et al. (2024) menunjukkan bahwa optimasi sumber karbon sangat penting untuk produksi biosurfaktan, di mana penggunaan POME (Palm Oil Mill Effluent) sebagai sumber karbon menghasilkan biosurfaktan dengan nilai tegangan antarmuka yang sangat rendah (1,817 dyne/cm). Hal ini menegaskan bahwa ketersediaan nutrisi yang sesuai di dalam sumur minyak sangat menentukan kemampuan bakteri dalam menghasilkan biosurfaktan.

Penggunaan medium agar darah untuk seleksi biosurfaktan didasarkan pada kemampuan biosurfaktan untuk melisis sel darah merah melalui mekanisme penurunan tegangan permukaan. Metode ini merupakan metode skrining awal yang umum digunakan dan telah terstandarisasi untuk mendeteksi produksi biosurfaktan oleh mikroorganisme (Youssef et al., 2004; Walter et al., 2010). Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni pada medium agar darah mengindikasikan aktivitas hemolitik yang disebabkan oleh biosurfaktan yang dihasilkan bakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Joshi et al. (2024) yang menggunakan metode hemolisis untuk skrining awal produksi biosurfaktan dari *Bacillus subtilis*, di mana zona hemolisis yang terbentuk menunjukkan produksi biosurfaktan yang efektif.

Berdasarkan seleksi isolat bakteri termofilik dari sumur minyak tua dapat dijelaskan bahwa 16 dari 33 isolat bakteri termofilik menunjukkan aktivitas hemolitik positif yang menandakan potensi produksi biosurfaktan. Dari metabolisme pertumbuhan bakteri tersebut, bakteri menghasilkan bioproduk yang merupakan metabolit ekstraseluler yaitu biosurfaktan.

Produksi biosurfaktan ini akan mengubah kondisi antar muka dengan membentuk lapisan tipis (film) di sekitar permukaan hidrofobik dan menjadikannya lebih hidrofilik. Hal ini menyebabkan membran sel darah merah lebih mudah untuk dilewati sehingga cairan di dalam sel darah merah keluar, mengubah permeabilitas dan menurunkan tegangan permukaan sehingga sel darah merah mengalami lisis. Hal ini sesuai dengan pendapat Cooper dan Zajic (1980) dalam Purwoko et al. (1999) yang menyatakan bahwa biosurfaktan memiliki sifat aktif permukaan karena biosurfaktan memiliki struktur kimia yang bersifat hidrofilik (polar) pada satu sisi dan hidrofobik (non polar) pada sisi lain dalam satu molekul. Sifat amfifilik inilah yang memungkinkan biosurfaktan menurunkan tegangan antarmuka minyak-air dan meningkatkan mobilitas minyak dalam reservoir (Banat et al., 2010; Fiechter, 1992).



Gambar 1. Hasil Pengamatan Kerusakan pada Permukaan Spesimen Aspal

Sumber: Manual Pengujian Bina Marga (2023).

Pada penelitian ini, inkubasi suhu yang digunakan adalah 40°C. Hal ini dilakukan karena medium agar darah yang digunakan sensitif terhadap suhu yang lebih tinggi, apalagi bila ingin disamakan dengan suhu seleksi dari penelitian pendahuluan yang mencapai 80°C. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa biosurfaktan dapat dihasilkan oleh bakteri pada inkubasi suhu 40°C, mengingat bahwa dalam Mustafa (2006) yang menyatakan reservoir minyak bumi di Indonesia memiliki suhu 40°C bahkan mencapai 90°C atau lebih. Oleh karena itu bakteri yang dibutuhkan untuk meningkatkan perolehan minyak di Indonesia harus menggunakan bakteri yang mampu beradaptasi pada suhu yang tinggi. Penelitian oleh Joshi et al. (2024) menunjukkan bahwa biosurfaktan dari *Bacillus subtilis* stabil pada berbagai kondisi fisik termasuk variasi suhu, pH, dan salinitas, yang mendukung potensi aplikasi biosurfaktan pada kondisi reservoir yang ekstrem.

Isolat bakteri termofilik yang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan tersebut masih mampu menghasilkan biosurfaktan di atas suhu 40°C. Hal ini merujuk dari Denger dan Schink (1995) dalam Aditiawati (2001) bahwa kultur bakteri yang digunakan untuk uji semikuantitatif produksi biosurfaktan diinkubasi pada suhu 50°C dan dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat menghasilkan biosurfaktan. Selain itu juga merujuk dari penelitian Scot (2007) yang melaporkan bahwa biosurfaktan dari *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 dan *Bacillus* strain HS3 tetap mempertahankan kemampuannya sebagai bahan aktif permukaan setelah diinkubasi pada suhu 80°C, nilai pH dan konsentrasi kadar garam selama sembilan hari. Stabilitas biosurfaktan pada suhu tinggi ini sangat penting untuk aplikasi MEOR karena kondisi reservoir umumnya memiliki suhu tinggi dan tekanan tinggi. Kemampuan biosurfaktan untuk tetap aktif pada kondisi ekstrem ini menjadi salah satu kriteria penting dalam seleksi mikroba untuk MEOR (Khire, 2010; Mukherjee et al., 2006). Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa biosurfaktan masih dapat dihasilkan bila inkubasi suhu ditingkatkan hingga mencapai 80°C.

Selain suhu, pH dan salinitas, yang mempengaruhi perbedaan kemampuan menghasilkan biosurfaktan diduga juga karena perbedaan jenis dan sifat genetis isolat bakteri. Setiap genus atau spesies bakteri memiliki kemampuan genetik yang berbeda dalam memproduksi biosurfaktan, dan faktor lingkungan seperti ketersediaan nutrisi dan kondisi fisiko-kimia juga mempengaruhi ekspresi gen yang terkait dengan produksi biosurfaktan (Satpute et al., 2010; Fiechter, 1992). Penelitian oleh Joshi et al. (2024) menunjukkan bahwa optimasi parameter lingkungan seperti pH, suhu, dan sumber karbon sangat penting untuk produksi biosurfaktan.

Isolat bakteri termofilik yang berpotensi mampu menghasilkan biosurfaktan ini dapat diterapkan dalam Micobial Enhanced Oil Recovery (MEOR) karena telah memenuhi syarat bahwa isolat bakteri dari penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut bersifat anaerob fakultatif, di mana pada proses isolasi pada penelitian pendahuluan, cawan-cawan petri yang telah diinokulasikan bakteri dimasukkan kedalam toples (dikondisikan dalam keadaan anaerob) dan dari pertumbuhan di dalam medium Zobell cair yang diinokulasikan bakteri menjadi keruh bila dibandingkan dengan kontrol yaitu medium Zobell cair yang tidak diinokulasikan bakteri dan kekeruhannya tersebar diseluruh medium dan merupakan bakteri termofilik setelah dilakukan seleksi suhu hingga 80°C. Mengingat kondisi reservoir minyak bumi di Indonesia memiliki kondisi oksigen yang relatif sedikit dan suhu yang tinggi yang menyebabkan bakteri yang tumbuh di dalam reservoir minyak bumi adalah bakteri yang mampu beradaptasi pada kondisi tersebut. Selain itu juga biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri akan menurunkan tegangan permukaan antara minyak-air. Menurut Makmur dan Sudibjo (1989 : 163) bahwa dengan turunnya tegangan permukaan minyak-air maka gaya kapiler pada daerah penyempitan pori-pori dapat dikurangi, sehingga sisa minyak dalam pori-pori dapat didesak dan diproduksi.

Karakterisasi

Karakterisasi isolat bakteri termofilik dari sumur minyak tua yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan

Isolat bakteri yang didapat dari seleksi II, selanjutnya dikarakterisasi secara morfologi koloni, morfologi sel dan sifat-sifat fisiologis. Karakterisasi secara morfologi koloni dilakukan pada medium NA lempeng, NA miring, dan NA tegak.

Tabel 4. 2 Karakteristik koloni bakteri

Isolat	Morfologi koloni				
	NA Lempeng			NA tegak	NA miring
	Bentuk	Tepian	Elevasi		
B ₁₃	Bulat dengan tepian menyebar	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Arborescent</i>
D ₂	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
D ₅	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
D ₁₀	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
D ₁₄	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
E ₁	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
E ₁₁	Bulat dengan tepian kerang	<i>Undulate</i>	<i>Low convex</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Echinulate</i>
E ₁₅	Bulat dengan tepian menyebar	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Arborescent</i>
E ₁₇	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>

E ₂₃	Bulat dengan tepian menyebar	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Arborescent</i>
F ₂	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
G ₇	Bulat dengan tepian menyebar	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Arborescent</i>
G ₈	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
I ₁	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>
I ₃	Bulat dengan tepian kerang	<i>Undulate</i>	<i>Low convex</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Echinulate</i>
J ₁	Berbenang-benang	<i>Ramose</i>	<i>Effuse</i>	<i>Echinulate</i>	<i>Effuse</i>

Sumber: Hasil penelitian, 2026.

Pada NA lempeng, isolat D₂, D₅, D₁₀, D₁₄; E₁, E₁₇; F₂; G₈, I₁, J₁, memiliki bentuk berbenang-benang, tepian *ramose*, dan elevasi *effuse*. Isolat B₁₃; E₁₅, E₂₃; G₇, memiliki bentuk bulat dengan tepian menyebar, tepian *ramose*, dan elevasi *effuse*, sedangkan untuk isolat E₁₁ dan I₃, memiliki bentuk bulat dengan tepian kerang, tepian *undulate*, dan elevasi *low convex*.

Dari Tabel 4.3.1. tabel di atas dapat terlihat bahwa pada agar lempeng ada tiga bentuk yaitu bulat dengan tepian menyebar, berbenang-benang, bulat dengan tepian kerang. Tiga bentuk tersebut, yang paling banyak adalah bentuk berbenang-benang. Bentuk dari koloni bakteri yang ditumbuhkan pada agar lempeng setelah masa inkubasi 48 jam dapat dilihat pada Lampiran 7 gambar 7.2. Koloni bakteri tampak berbenang-benang, koloni bakteri tampak bulat dengan tepian yang menyebar dan bentuk koloni bakteri bulat dengan tepian kerang. Selain dari bentuk, koloni bakteri tersebut memiliki tepian *ramose* dan *undulate*, dan untuk elevasi terdapat dua macam elevasi yaitu *effuse* dan *low covex*, sedangkan pada morfologi koloni bakteri pada NA tegak, dapat teramati bentuk *echinulate* (Lampiran 7. gbr. 7.3.) dan morfologi koloni bakteri pada NA miring, dapat teramati bentuk *effuse*, *echinulate* dan *arborescent* (Lampiran 7. gbr. 7.4.). Pada media NA lempeng baik itu bentuk, tepian, dan elevasi, NA tegak, NA miring teramati bahwa terdapat perbedaan pertumbuhan bakteri. Dari perbedaan yang muncul inilah berarti dapat dikatakan bahwa isolat bakteri ini kemungkinan berasal dari genus yang berbeda.

Karakteristik morfologi sel bakteri penghasil biosurfaktan

Morfologi sel bakteri dapat dilakukan dengan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Pewarnaan ini dapat dilakukan dengan pengamatan secara mikroskopis. Pewarnaan Gram yang dilakukan akan mempermudah untuk melihat bentuk dari bakteri, warna bakteri yang terbentuk setelah dilakukannya pewarnaan akan mengindikasikan apakah bakteri tersebut termasuk bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif atau dengan kata lain mengamati reaksi dari bakteri tersebut terhadap zat warna yang diberikan. Pewarnaan Gram dilakukan secara bertingkat, menggunakan beberapa jenis zat warna, dan ada urutan dalam pemberian zat warna ini. Ini mengingat bentuk dan sifat sel bakteri yang berbeda penerimaannya terhadap zat warna. Dari pewarnaan Gram yang dilakukan, isolat bakteri B₁₃, D₂, D₁₄, E₁₁ merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk *basil*, isolat bakteri D₅, D₁₀, E₁, E₁₅, E₂₃, F₂ G₇, I₃, E₁₇ dan J₁ merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk *basil* dan sisanya adalah bakteri Gram negatif bentuk kokus yaitu G₈, dan I₁, dapat dilihat pada Lampiran 7 gambar 7.5.

Isolat bakteri kebanyakan adalah Gram negatif yaitu 12 dari 16 isolat bakteri (Tabel 4.3.2.). Bakteri Gram negatif, memiliki dinding sel yang tipis, tidak seperti bakteri Gram positif yang memiliki dinding sel yang lebih tebal, maka bakteri Gram negatif ini tidak kuat untuk

mengikat zat warna utama (kristal violet), dan mudah terlunturkan oleh zat peluntur (alkohol) sehingga dapat terwarnai oleh zat penutup (safranin) dan menghasilkan warna merah. Bakteri Gram positif ini memiliki dinding sel yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri Gram negatif, di mana akan lebih kuat mengikat zat warna utama (kristal violet) sehingga tidak dapat dilunturkan dengan zat peluntur (alkohol) dan tidak dapat diwarnai oleh zat penutup (safranin) dan menghasilkan warna ungu atau biru. Menurut Suriawiria (1990 : 45) hasil Gram positif dan Gram negatif disebabkan oleh perbedaan kandungan dinding sel bakteri, yaitu bahwa kandungan senyawa peptidoglikan pada dinding sel Gram positif tebal kalau dibandingkan pada dinding sel Gram negatif. Dari isolat bakteri, bentuk *basil* dan berwarna merah yang berarti Gram negatif adalah yang paling banyak.

Tabel 4. 3 Morfologi sel bakteri penghasil biosurfaktan

Isolat	Morfologi Sel		
	Bentuk sel	Sifat Gram	Endospora
B ₁₃	<i>Basil</i>	(+)	Ada
D ₂	<i>Basil</i>	(+)	Ada
D ₅	<i>Basil</i>	(-)	Ada
D ₁₀	<i>Basil</i>	(-)	Ada
D ₁₄	<i>Basil</i>	(+)	Ada
E ₁	<i>Basil</i>	(-)	Ada
E ₁₁	<i>Basil</i>	(+)	Ada
E ₁₅	<i>Basil</i>	(-)	Tidak ada
E ₁₇	<i>Basil</i>	(-)	Tidak ada
E ₂₃	<i>Basil</i>	(-)	Ada
F ₂	<i>Basil</i>	(-)	Ada
G ₇	<i>Basil</i>	(-)	Ada
G ₈	<i>Kokus</i>	(-)	Tidak ada
I ₁	<i>Kokus</i>	(-)	Tidak ada
I ₃	<i>Basil</i>	(-)	Ada
J ₁	<i>Basil</i>	(-)	Ada

Sumber: Hasil penelitian, 2026.

Pada isolat bakteri, untuk mengetahui adanya endospora atau tidak, dilakukan pewarnaan spora, di mana pada pewarnaan ini dilakukan pemanasan pada uap panas. Pemanasan menyebabkan lapisan luar endospora mengembang, sehingga zat warna dapat masuk. Dari seluruh isolat bakteri tersebut ada yang dapat membentuk endospora dan ada juga yang tidak membentuk endospora. endospora terlihat berwarna hijau sedangkan sel vegetatif terlihat berwarna merah. Menurut (Dwidjoseputro, 1994) ada spesies yang sama sekali tidak dapat membentuk endospora, ada pula spesies yang dapat membentuk endospora, apabila menghadapi keadaan luar yang tidak sesuai. Bakteri dalam bentuk endospora lebih tahan terhadap desinfektan, sinar dan terutama terhadap kekeringan, panas dan kedinginan. Hal ini disebabkan karena dinding endospora sedikit banyak impermeabel, dan terhubung endospora itu mengandung sangat sedikit air, maka keadaan ini menyebabkan endospora tidak mudah mengalami perubahan suhu.

Hasil Uji-uji fisiologis dan biokimia bakteri penghasil biosurfaktan

Semua isolat bakteri, selanjutnya dikarakterisasi melalui beberapa uji fisiologis dan biokimia meliputi : uji katalase, uji motilitas, uji sitrat, uji methyl red, uji Voges-Proskauer, uji indol, uji fermentasi gula, gas, dan H₂S dengan TSIA, uji hidrolisis pati, uji hidrolisis urea, dan fermentasi karbohidrat (glukosa, fruktosa, laktosa, maltosa).

Pada uji katalase, semua isolat bakteri menunjukkan hasil positif, yaitu ditandai dengan terbentuknya gelembung O₂ disekeliling pertumbuhan koloni bakteri setelah isolat tersebut ditetesi H₂O₂ 3% (lihat Lampiran 7. gbr. 7.6.), hal ini berarti isolat bakteri dapat menguraikan hydrogen peroksida menjadi air dan O₂ serta bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim katalase. Uji katalase ini sendiri adalah untuk mengetahui adanya enzim katalase yang berfungsi dalam menguraikan H₂O₂ yang bersifat racun. Menurut Lay (1994 : 87) hydrogen peroksida akan bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini akan menginaktivasi enzim dalam sel. Hydrogen peroksida terbentuk pada metabolisme aerob sehingga mikroorganisme yang hidup dalam keadaan aerob harus menguraikan bahan toksik tersebut dan ditambahkan oleh Cappucinno (1992 : 171) bahwa hydrogen peroksida dapat dihasilkan oleh mikroorganisme aerob, anaerob fakultatif ataupun mikroaerofilik yang mana selama proses degradasi hydrogen peroksida karbohidrat merupakan sumber energi.

Pada Uji sitrat, hanya isolat I₁ yang menunjukkan uji positif, di mana media *Simon's Citrat* (SC) agar yang berwarna hijau menunjukkan perubahan warna hijau menjadi biru setelah masa inkubasi, sedangkan untuk seluruh isolat yang lain menunjukkan uji negatif dengan terlihatnya media SC (*Simon's Citrat*) tetap berwarna hijau (lihat Lampiran 7. gbr. 7.7.), ini berarti bakteri tersebut tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya. Menurut Hadioetomo (1993 : 144) Media SC (*Simon's Citrat*) agar adalah salah satu medium yang umum digunakan untuk menguji kemampuan penggunaan sitrat diantara bakteri, medium ini adalah medium sintetik yang mengandung sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya, sedangkan sumber nitrogennya digunakan garam amonium dan bukan asam amino, agar sitrat juga mengandung indikator BTB (*Brom Timol Blue*) yang dapat merubah warna dari hijau menjadi biru bila keadaan menjadi alkalin.

Pada uji motilitas, diperoleh hasil bahwa isolat bakteri G₈ dan I₁ menunjukkan uji negatif, sedangkan isolat bakteri B₁₃, D₅, E₁₅, E₂₃, F₂, G₇, D₂, D₁₄, D₁₀, E₁, E₁₇, E₁₁, I₃, dan J₁, menunjukkan uji positif (lihat Lampiran 7. gbr. 8). Untuk uji motilitas ini, uji positif diindikasikan dengan terlihatnya perluasan pada daerah tusukan pada medium *semi solid*. Dengan adanya perluasan tersebut berarti dapat diasumsikan bahwa bakteri tersebut melakukan pergerakan karena bakteri tersebut memiliki flagel. Menurut Irianto (2006 : 67-68) adanya flagel pada tubuh bakteri menunjukkan bahwa bakteri dapat bergerak sendiri. Flagel ini tidak ditemukan pada semua jenis bakteri. Oleh karena itu dapat atau tidaknya bakteri bergerak digunakan sebagai salah satu ciri dalam determinasi jenis bakteri.

Pada uji *methyl red* dengan menggunakan medium MR-VP, semua isolat menunjukkan uji positif dengan terbentuknya warna merah setelah media MR-VP yang berwarna kuning yang telah diinokulasikan bakteri ditetesi dengan *methyl red* setelah masa inkubasi (lihat Lampiran 7. gbr. 9). Menurut Lay (1994 : 84) beberapa bakteri memfermentasikan glukosa dan menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam sehingga akan menurunkan pH medium menjadi 5 atau lebih rendah.

Pada uji *Voges-Proskauer*, semua isolat menunjukkan uji negatif. Ini terlihat dari tidak adanya perubahan warna pada medium MR-VP yang berwarna kuning setelah penambahan reagen *Barrit's A* dan *B*. Lain halnya bila uji tersebut bernilai positif, yaitu ditunjukkan dengan perubahan warna medium dari kuning menjadi merah muda. Uji negatif ini menandakan bahwa bakteri tersebut tidak dapat melakukan fermentasi 2,3-butanadiol. Menurut Cappucino (1992 : 145) uji *Voges-Proskauer* untuk melihat kemampuan dari beberapa mikroorganisme dalam memproduksi bentuk tidak asam atau netral dari produk acetylmethyl carbinol yang berasal dari asam organik yang dihasilkan dari metabolisme glukosa sedangkan menurut Lay (1994 : 85) uji ini untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melaksanakan fermentasi 2,3 – butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 – butanadiol sebagai produk utama maka akan terjadi penumpukan bahan tersebut pada media pertumbuhan (lihat Lampiran 7. gbr. 10).

Pada uji Fermentasi gula, gas dan H₂S, terlihat pada lampiran 7 gambar 11., bahwa pada bagian bawah (*butt*) medium berwarna kuning dan bagian atas (*slant*) medium tetap berwarna merah. Hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi fermentasi glukosa di dalam medium tersebut. Uji Fermentasi gula H₂S dan Gas bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan gula sebagai sumber karbonnya. Semua isolat tidak dapat menghasilkan H₂S, ini terlihat dengan tidak terbentuknya warna hitam pada medium yang diinokulasi. Menurut Lay (1994 : 93) medium TSIA mengandung ferrous sulfat yang apabila bereaksi dengan H₂S yang dihasilkan oleh bakteri akan membentuk FeS yang berwarna hitam.

Pada uji indol, semua isolat menunjukkan uji negatif, ini terlihat dari terbentuknya cincin kuning pada permukaan media, yang berarti isolat tersebut tidak dapat memecah asam amino tryptopan. Uji ini dilakukan dengan pemberian reagen *Kovac's* (lihat Lampiran 7. gbr. 12.). Menurut Lay (1994 : 92) pemupukan indol dalam medium biakan dapat diketahui dengan penambahan reagen. Reagen akan bereaksi dengan indol dan menghasilkan senyawa yang tidak larut dalam air dan berwarna merah pada permukaan medium.

Pada uji urea, semua isolat bernilai uji negatif kecuali isolat J₁ bernilai uji positif, di mana setelah diinokulasikan bakteri dan diinkubasi, terjadi perubahan warna medium dari warna kuning menjadi warna merah keunguan yang berarti isolat J₁ mampu menghidrolisis urea dan mengubah pH netral menjadi pH basa yang ditunjukkan dari perubahan warna medium tersebut (lihat Lampiran 7. gbr. 13.). Menurut Lay (1994 : 101) beberapa mikroba mampu menghasilkan enzim urease yang menguraikan urea menjadi ammonium dan CO₂. Aktivitas enzim urease dapat diamati dengan menumbuhkan mikroba dalam medium biakan yang mengandung urea dan indikator pH (biasanya *phenol red*). Bila urea dihidrolisiskan, NH₄⁺ terakumulasi dalam medium biakan dan menyebabkan pH medium menjadi basa.

Pada uji hidrolisis pati, semua isolat bakteri menunjukkan uji positif. Ini terlihat dari terbentuknya zona bening di sekeliling area pertumbuhan bakteri setelah ditetesi dengan iodium. Zona bening yang terbentuk disebabkan karena reaksi iodium dengan pati. Larutan iodium adalah indikator pati. Bila pada medium tidak terbentuk zona bening dan hanya terbentuk lingkaran berwarna biru kehitaman, maka uji tersebut dikatakan negatif (lihat Lampiran 7. gbr. 14.). Menurut Capuccino (1992 : 127), pati adalah polisakarida yang bila dihidrolisis dengan bantuan eksoenzim amilase akan menjadi maltosa dan glukosa. Zat pati akan bereaksi dengan yodium di mana proses yodisasi akan menghasilkan molekul yang mengabsorpsi cahaya kecuali biru, bila zat pati telah diuraikan menjadi maltosa dan glukosa

maka warna tidak akan terjadi dan hal ini menandai proses hidrolisis pati. Dari pengamatan yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa semua isolat mampu menghidrolisis pati.

Uji yang terakhir adalah uji fermentasi karbohidrat. Pada uji ini menggunakan tiga jenis gula yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa, dengan medium NB (*Nutrient Broth*) dan diberi BTB (*Brom Timol Blue*). Dari uji yang telah dilakukan, hanya isolat B₁₃, E₂₃ dan G₈ yang terbentuk gas di dalam tabung durham, yaitu pada fermentasi sukrosa, yang berarti fermentasi asam campuran dan sisanya isolat bakteri menunjukkan fermentasi asam laktat dari seluruh uji fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa, dan laktosa), dimana semua warna medium berubah menjadi kuning (lihat lampiran 7 gbr. 15., 16., dan 17.). Menurut Lay (1994 : 82) perubahan warna medium tanpa diikuti pembentukan gas pada uji fermentasi gula menandakan fermentasi tersebut merupakan fermentasi asam laktat, perubahan warna dengan diikuti pembentukan gas merupakan fermentasi asam campuran dan fermentasi tanpa adanya perubahan tetapi terbentuk gas menandakan terjadinya fermentasi alkohol.

Setelah semua isolat bakteri termofilik yang diperoleh dari minyak bumi yang berasal dari sumur minyak tua yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan dilakukan karakterisasi, beberapa isolat bakteri menunjukkan karakter yang sama yaitu isolat bakteri dengan kode D₅ dengan D₁₀, E₁ dan F₂, isolat bakteri dengan kode E₂₃ dengan G₇ dan isolat bakteri dengan kode D₂ dengan D₁₄. Dengan demikian isolat bakteri dengan kode D₁₀, E₁ dan F₂ karena menunjukkan karakter yang sama dengan D₅ diduga merupakan satu isolat yaitu D₅, isolat bakteri dengan kode G₇ karena menunjukkan karakter yang sama dengan E₂₃ diduga merupakan satu isolat yaitu E₂₃, dan isolat bakteri dengan kode D₁₄ karena menunjukkan karakter yang sama dengan D₂ diduga merupakan satu isolat yaitu D₂.

Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Identifikasi bakteri penghasil biosurfaktan dilakukan setelah seluruh karakterisasi dilakukan diperoleh 11 isolat bakteri. Isolat yang diperoleh dapat dikelompokkan ke dalam genus *Bacillus* sebanyak tiga isolat, *Enterobacter* sebanyak dua isolat, *Citrobacter* sebanyak empat isolat, dan *Syntronococcus* sebanyak dua isolat.

Berdasarkan hasil identifikasi dengan menggunakan *Bergey's manual of Determinative Bacteriology 8th edition* dan *Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9th edition* isolat yang masuk ke dalam genus *Bacillus* adalah isolat B₁₃, D₂, dan E₁₁ (Tabel 4.3.4.). Hasil karakterisasi morfologi sel isolat bakteri ini adalah bentuk sel batang, Gram Positif, membentuk endospora. Hasil karakteristik uji biokimia bakteri ini bersifat katalase positif dan bersifat motil. Menurut Buchanan & Gibbon (1974 : 529) *Bacillus* sp memiliki bentuk batang atau hampir lurus, ukuran 0,3-2,2 µm x 1,2-7 µm mayoritas bersifat motil, flagellum khas lateral, membentuk endospora tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangium, kemoorganotrof, metabolisme dengan respirasi sejati, fermentasi sejati atau kedua-duanya tergantung substrat dan bersifat aerob atau anaerob fakultatif.

Sifat anaerob fakultatif dari genus *Bacillus* sp tersebut sangat cocok pada kondisi reservoir sumur minyak yang memiliki konsisi oksigen yang relatif sedikit. Menurut Mustafa (2006) bakteri yang dibutuhkan untuk meningkatkan perolehan minyak di Indonesia harus menggunakan bakteri yang bersifat anaerob fakultatif. Hasil seleksi tahap dua menunjukkan bahwa *Bacillus* sp dapat menghasilkan biosurfaktan. Menurut Kadarwati *et al.*, (2004); Horowitz *et al.*, (1990) dalam Aditiawati *et al.*, (2001 : 4) beberapa mikroba penghasil biosurfaktan yang pernah diteliti diantaranya adalah *Bacillus subtilis* dan *Bacillus*

licheniformis strain JF-2, beberapa strain *Bacillus subtilis* dapat menghasilkan *surfaktin*, suatu biosurfaktan lipopeptida yang telah dipatenkan. *Bacillus licheniformis* 86 dapat menghasilkan surfaktan BL86 atau lichenolysin. Cooper dan Zajic (1980) dalam Akhsin (2002 : 8) biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dapat menurunkan tegangan muka medium cair dari 74 m N/m menjadi 27 m N/m.

Potensi bakteri dari genus *Bacillus* sp untuk dimanfaatkan dalam MEOR sangat besar dilihat dari karakteristik yang dimiliki oleh bakteri tersebut yaitu mampu menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi serta dapat menghasilkan biosurfaktan yang membantu membebaskan minyak bumi yang terperangkap dalam batuan reservoir. *Bacillus* adalah genus dari kelompok bakteri termofilik yang sering dijumpai diberbagai tempat yang bersuhu ekstrim. Menurut Brock & Madigan (1991 : 326); Ratnakomala (1997 : 12-13) *Bacillus* merupakan spesies yang sering dijumpai pada kisaran suhu yang luas. *Bacillus* mampu hidup pada suhu minimum 30°C , optimum 60°C dan maksimum 72°C, dan dari suatu penelitian pendahuluan mengenai MEOR telah dilakukan di laboratorium Biokonversi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Minyak dan Gas Bumi “Lemigas”. Pada penelitian ini berhasil diisolasi 2 spesies bakteri termofilik anaerob fakultatif dari air formasi pada sumur pemboran Maxus di Pulau Seribu. Berdasarkan pengamatan morfologi dan biokimia kedua isolat bakteri tersebut berbentuk batang dan termasuk ke dalam genus *Bacillus* yaitu *Bacillus stearothermophilus* dan *Bacillus* sp, serta memiliki temperatur pertumbuhan optimum sebesar 55°C. dalam penelitian ini diamati pengaruh metabolisme pertumbuhan bakteri *Bacillus stearothermophilus* tersebut terhadap pori-pori batuan reservoir serta tegangan permukaan minyak bumi karena menunjukkan kecenderungan adanya suatu senyawa biosurfaktan yang dihasilkan, akan tetapi jenis biosurfaktan apa yang dihasilkan oleh bakteri tersebut belum ada hasil penelitian yang melaporkan.

Isolat E₁₅, dan E₁₇ termasuk ke dalam genus *Enterobacter* (Tabel 4.3.4.) di mana hasil karakteristik morfologi sel didapatkan sel bakteri berbentuk batang, Gram negatif dan tidak membentuk endospora, hasil uji karakteristik uji biokimia didapatkan bakteri tersebut bersifat motil, katalase positif. Menurut Buchanan & Gibbon (1974 : 290 & 324) *Enterobacter* bersifat motil, sel bakteri berbentuk batang, Gram negatif

Isolat E₂₃, D₅, I₃ dan J₁ termasuk ke dalam genus *Citrobacter* (Tabel 4.3.4.). Hasil karakterisasi morfologi sel didapatkan sel bakteri berbentuk batang, Gram negatif, membentuk endospora, sedangkan hasil uji karakteristik uji biokimia didapatkan bakteri tersebut bersifat motil, katalase positif, *methyl red* positif, *Voges-Proskauer* negatif. Menurut Holt *et al.*, (1994 : 177) genus *Citrobacter* berbentuk batang, Gram negatif, biasanya motil, bersifat anaerobik fakultatif., katalase positif, *methyl red* positif, *Voges-Proskauer* negatif.

Genus *Enterobacter* dan *Citrobacter* termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae*, famili bakteri ini termasuk bakteri yang menghuni sumur minyak bumi. Variasi terbesar dari mikroba itu dilaporkan oleh Lazar (1983) dalam Donaldson (1989 : 83), adalah termasuk genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Clostridium* dan beberapa *Enterobacteriaceae*.

Isolat G₈ dan I₁ (Tabel 4.3.4.) termasuk ke dalam genus *Syntrophococcus* Hasil karakterisasi morfologi sel didapatkan sel bakteri berbentuk bulat, Gram negatif, tidak membentuk endospora, sedangkan hasil uji karakteristik uji biokimia didapatkan yaitu bersifat

katalase positif, bersifat motil negatif. Menurut Holt *et al.*, (1994 : 347) Genus *Syntrophococcus* memiliki bentuk sel bulat dengan diameter 1.0-1.3 μm , Gram negatif, non motil; tidak memiliki flagel. Anaerobik dan oksidase negatif. Katalase negatif, tetapi ada beberapa bakteri yang menguraikan peroksida dengan enzim yang mengandung pseudokatalase. Gas mungkin diproduksi, karbohidrat mungkin atau tidak mungkin difermentasi, dan asam laktat mungkin tidak diproduksi. Jika asam laktat tersedia, ini bukan produk utama fermentasi. Memiliki tipe respirasi dari metabolisme dan membutuhkan gula sebagai donor elektron dan satu dari jenis terbatas aseptor electron untuk tumbuh efektif dalam medium yang miskin. Gula digunakan sebagai donor electron dengan asetat hanya sebagai produk organik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa dari 33 isolat bakteri termofilik yang diisolasi dari sumur minyak tua di Kabupaten Muara Enim, Sumatera Selatan, sebanyak 16 isolat (48,48%) menunjukkan potensi menghasilkan biosurfaktan yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada uji aktivitas hemolitik menggunakan medium agar darah. Karakterisasi morfologi dan fisiologi lebih lanjut mengelompokkan 16 isolat tersebut menjadi 11 isolat berbeda yang memiliki karakteristik potensial untuk aplikasi Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). Hasil identifikasi berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology menunjukkan bahwa 11 isolat tersebut termasuk dalam empat genus berbeda, yaitu *Bacillus* (3 isolat: B13, D2, E11), *Enterobacter* (2 isolat: E15, E17), *Citrobacter* (4 isolat: E23, D5, I3, J1), dan *Syntrophococcus* (2 isolat: G8, I1). Semua isolat memiliki kemampuan menghasilkan biosurfaktan yang berperan dalam menurunkan tegangan antarmuka minyak-air, dengan sebagian besar isolat (75%) bersifat Gram negatif, berbentuk basil, mampu membentuk endospora, dan menunjukkan aktivitas katalase positif serta motilitas positif. Distribusi isolat penghasil biosurfaktan bervariasi berdasarkan kedalaman sumur, dengan proporsi tertinggi ditemukan pada kedalaman > 518 meter (100%), namun jumlah terbanyak ditemukan pada kedalaman 297-518 meter (12 isolat), yang mengindikasikan bahwa kondisi lingkungan pada kedalaman tersebut paling mendukung pertumbuhan dan aktivitas bakteri termofilik penghasil biosurfaktan. Isolat-isolat ini memiliki karakteristik yang sesuai dengan kebutuhan teknologi MEOR, yaitu bersifat termofilik, anaerob fakultatif, dan mampu menghasilkan biosurfaktan yang stabil pada kondisi reservoir.

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk melakukan uji produksi biosurfaktan secara kuantitatif pada 11 isolat terpilih untuk menentukan isolat dengan produktivitas tertinggi, serta mengkarakterisasi jenis biosurfaktan yang dihasilkan (seperti glikolipida, lipopeptida, atau fosfolipida) menggunakan analisis FTIR, TLC, atau LC-MS/MS. Uji stabilitas biosurfaktan pada berbagai kondisi lingkungan (suhu tinggi, pH ekstrem, dan salinitas tinggi) perlu dilakukan untuk memastikan ketahanannya dalam kondisi reservoir yang sebenarnya. Selain itu, uji core flooding pada skala laboratorium sangat diperlukan untuk mengukur efektivitas biosurfaktan dalam meningkatkan perolehan minyak secara langsung, serta uji kompatibilitas dengan batuan reservoir dan fluida formasi. Penelitian lebih lanjut juga dapat dilakukan untuk mengoptimalkan kondisi produksi biosurfaktan melalui optimasi media pertumbuhan dan kondisi fermentasi, serta melakukan uji lapangan skala pilot untuk menguji

aplikasi bakteri indigenous ini secara langsung di sumur minyak tua. Kajian genomik dan proteomik juga direkomendasikan untuk mengidentifikasi gen-gen yang terlibat dalam produksi biosurfaktan dan memahami mekanisme regulasi ekspresi gen pada kondisi reservoir. Dengan demikian, penelitian ini memberikan fondasi penting bagi pengembangan teknologi MEOR yang lebih efektif dan ramah lingkungan di Indonesia.

REFERENSI

- Arikunto, S. (2016). *Prosedur Penelitian Pendekatan Praktis Jakarta: Rineka Cipta*.
- Astin, V. (2024). Produksi Dan Karakterisasi Biosurfaktan Dari Bakteri Indigen Isolat BSPP-1c ASAL Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang Serta Uji Potensi Antimikroba.
- Ayoib, CA, & Nosakhare, PO (2015). Budaya direksi dan praktik pengungkapan lingkungan perusahaan di Malaysia. *Jurnal Internasional Kewirausahaan Teknologi Bisnis*, 5(1), 99–114.
- HANISA, D. (2024). Produksi, Karakterisasi, Dan Uji Bioaktivitas Biosurfaktan Lipopeptida Dari Bakteri *Bacillus* Sp. ALP D1 Menggunakan Palm Oil Mill Effluent (POME) SEBAGAI SUMBER KARBON (Doctoral dissertation, UNIVERSITAS LAMPUNG).
- Hermanto, B. (2012). Pengaruh Pencapaian Pelatihan, Motivasi dan Masa Kerja Teknisi terhadap Produktivitas Teknisi di Bengkel Nissan di Yogyakarta, Solo dan Semarang. Tesis. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Ilmiati, I. (2022). Analisis Kemampuan Isolat Jamur *Aspergillus Niger* Dengan Penambahan Sumber Karbon Pada Media Tumbuh Dalam Menghasilkan Biosurfaktan Untuk Alternatif MEOR (Doctoral dissertation, Universitas Islam Riau).
- INDRIANTI, W. (2022). Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang dan Uji Potensi Antibakteri.
- Kusnaa, O. L. (2022). Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon sebagai Penghasil Enzim Lipase dan Protease dari Tanah Tercemar Minyak Bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- NINGRUM, M. A. (2019). Optimasi Produksi Biosurfaktan dengan Menggunakan Media Limbah Cair Kelapa Sawit dari Bakteri Lipolitik Isolat Lokal Terpilih.
- NURHAYATI, A. (2022). Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Indigen Isolat BSPP-1c Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang.
- Primack, HS (1983). Metode Menstabilkan Larutan Logam Polivalen. Paten AS No. 4.373.104.
- Rachmawati, F. (2022). Studi Biodegradasi Minyak Solar oleh Bakteri Lipolitik Isolat Lokal Penghasil Biosurfaktan.
- Roeva, O. (2012). Aplikasi Algoritma Genetika di Dunia Nyata. Dalam Konferensi Internasional tentang Teknik Kimia dan Material. Semarang, Indonesia: Departemen Teknik Kimia, Universitas Diponegoro
- Rohmawati, L. (2019). Pengaruh Supervisor dan Direktur Perempuan terhadap Risiko Bank dengan Kekuasaan CEO sebagai Variabel Moderasi (Studi Bank Komersial Indonesia). *Literasi Sintaksis; Jurnal Ilmiah Indonesia*, 4(9), 26–42.
- Rukiyah, AY, & Yulianti, Lia. (2014). *Asuhan Kebidanan Kehamilan Berbasis Kurikulum Berbasis Kompetensi*. Jakarta Timur: CV. Media TransInfo.

- Tsany, I. J. (2021). Studi Laboratorium Screening Microba Kompos Untuk Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) (Doctoral dissertation, Universitas Islam Riau).
- Wang, Ning Tao, Huang, Yi Shin, Lin, Meng Hsien, Huang, Bryan, Perng, Chin Lin, & Lin, Han Chieh. (2016). Infeksi hepatitis B kronis dan risiko cedera hati akibat obat antituberkulosis: Tinjauan sistematis dan meta-analisis. *Jurnal Asosiasi Medis Tiongkok*, 79(7), 368–374