

Isolasi, Karakterisasi dan Potensi Bakteri Aerob Sebagai Pendegradasi Limbah Organik

Dinda Zahidah, Maya Shovitri

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: maya@bio.its.ac.id

Abstrak—Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri aerob yang mampu mendegradasi amilum, protein dan selulosa. Penelitian ini berhasil memurnikan dan mengkarakterisasi isolat bakteri C5 yang cenderung masuk ke genus *Bacillus*. Berdasarkan uji kualitatif amilolitik, selulolitik dan proteolitik, diketahui bahwa isolat C5 memiliki indeks amilolitik (IA) sebesar 0,93, indeks selulolitik (IS) sebesar 1,95 dan indeks proteolitik (IP) sebesar 1,39.

Kata Kunci—Amilolitik, Bakteri, Bioaktivator, Lipolitik Proteolitik, Selulolitik.

I. PENDAHULUAN

Limbah cair domestik adalah limbah yang berasal dari berbagai aktivitas rumah tangga. Dalam berbagai kegiatannya, limbah cair domestik terbagi dalam dua kategori, yang pertama adalah limbah cair domestik yang berasal dari air cucian, dan yang kedua adalah limbah cair yang berasal dari *water closet* (WC), seperti tinja dan air seni [1]. Tangki septik adalah tempat penampungan limbah kotoran manusia (tinja). Di dalam tangki septik, tinja yang banyak mengandung bahan organik akan didegradasi oleh mikroorganisme pengurai menjadi gas dan bahan organik sederhana lainnya. Sedangkan sisa bahan yang tidak dapat diuraikan akan mengendap menjadi lumpur (*sludge*) [2]. Proses biodegradasi limbah organik ini pada umumnya memakan waktu lebih lama dibanding kecepatan penumpukan tinja [3].

Penelitian ini bertujuan untuk mencari isolat bakteri yang berpotensi sebagai pendegradasi limbah organik. Potensi tersebut dideteksi dengan adanya kemampuan dalam mendegradasi amilum, selulosa dan protein.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Limbah Domestik

Air limbah domestik merupakan air limbah yang telah digunakan yang berasal dari rumah tangga atau pemukiman, perdagangan, daerah kelembagaan atau daerah rekreasi, meliputi air buangan dari kamar mandi, WC (*water closet*), tempat cuci atau tempat memasak. Limbah cair domestik mengandung 99,9% air dan 0,1% zat padat. Zat padat terdiri

dari 85% protein; 25% karbohidrat; 10% lemak dan sisanya zat anorganik terutama butiran pasir, garam dan logam [4].

B. Tinja

Tinja (*faeces*) adalah bahan buangan yang dikeluarkan dari tubuh manusia melalui anus sebagai sisa dari proses pencernaan makanan di sepanjang sistem saluran pencernaan (*tractus digestifus*). Pengertian tinja mencakup juga air seni (*urine*) yang dikeluarkan dari tubuh manusia melalui sistem urogenitalis. Komposisi tinja tanpa air seni terdiri dari air sebanyak 66%-80%, bahan organik tinja sebanyak 88%-97%, Nitrogen sebanyak 5,7%-7,0%, Fosfor (sebagai P_2O_5) sebanyak 3,5%-5,4%, Potasium (sebagai K_2O) sebanyak 1,0%-2,5%, Karbon sebanyak 40%-55%, dan Kalsium (sebagai CaO) sebanyak 4%-5% [5].

C. Bakteri Perombak Bahan Organik

Di alam, organisme perombak bahan organik memegang peranan penting karena sisa organik yang telah mati diurai menjadi unsur-unsur yang dikembalikan ke dalam tanah (N, P, K, Ca, Mg, dan lain-lain) dan atmosfer (CH_4 atau CO_2) sebagai hara yang dapat digunakan kembali oleh tanaman, sehingga siklus hara berjalan sebagai-mana mestinya dan proses kehidupan di muka bumi dapat berlangsung. Mikroorganisme perombak bahan organik merupakan aktivator biologis yang tumbuh alami atau sengaja diberikan untuk mempercepat perombakan bahan organik. Beberapa jenis bakteri yang umum ditemukan dalam sampah/buangan antara lain adalah *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Bacillus* spp., *Flavobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Streptomyces* spp., *Thermonospora* spp., *Microplysora* spp., *Thermoactinomyces* spp., dan lain sebagainya [6].

D. Proses Pengolahan Limbah Tangki Septik

Proses pengolahan limbah domestik yang terjadi pada tangki septik adalah proses pengendapan dan stabilisasi secara anaerobik. Tangki septik bisa dianggap sebagai proses pengolahan awal (primer). Proses anaerobik sangat penting dalam proses pengolahan air limbah di suatu daerah yang memiliki iklim sedang. Proses anaerobik dibentuk oleh bakteri anaerobik khusus yang merupakan konversi dasar,

dalam kondisi anaerobik, padatan limbah dibentuk menjadi biogas yang merupakan metana dan karbondioksida.

Proses anaerobik terdiri dari 4 tahapan, yakni:

1. Hidrolisis, meliputi proses degradasi bahan organik limbah seperti protein, polisakarida, lemak.
2. Acidogenesis, merupakan proses oksidasi anaerobik dari asam lemak dan alkohol dan proses fermentasi dari asam amino dan karbohidrat menjadi asam lemak (*volatile fatty acids*) seperti butirat dan propionat dan gas hidrogen.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2COOH \text{ (asam propionat)} + 2CO_2 + 2H_2$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH \text{ (asam butirat)} + 2CO_2 + 4H_2$$
3. Acetogenesis, merupakan tahapan pengkonversian butirat dan propionate menjadi asetat.

$$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$$

$$CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$$
4. Methanogenesis, merupakan proses konversi dari asetat, hidrogen dan karbondioksida menjadi gas metan.

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \text{ [7]}$$

III. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2012 hingga Januari 2013 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

B. Sumber Inokulum dan Isolasi Bakteri

Sumber inokulum adalah bioaktivator cair. Isolasi dilakukan dengan metode pengenceran bertingkat dan dilanjutkan dengan metode sebar (*spread plate*) secara aseptik di atas medium padat NA. Inokulum kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

C. Purifikasi dan Pengamatan Isolat Bakteri

Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipurifikasi supaya didapatkan isolat murni. Satu koloni bakteri yang tumbuh dari medium pengenceran diambil dan digoreskan dengan metode 16 gores ke permukaan medium yang baru kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pemandahan koloni bakteri dilakukan secara bertahap minimal sebanyak 3 kali. Kemudian, dilakukan pengamatan makroskopis meliputi pengamatan terhadap morfologi koloni bakteri. Setelah didapatkan koloni bakteri murni dengan pengamatan makroskopis, maka selanjutnya dilakukan pengamatan mikroskopis.

D. Identifikasi dan Uji Biokimia

Bakteri diidentifikasi dan diuji karakter biokimianya secara bertahap menurut bagan alir dikotomi berdasarkan *Bergey's*

Manual of Determinative Bacteriology [8]. Pada tahap awal identifikasi dilakukan uji morfologi bakteri dengan melakukan pewarnaan Gram, pewarnaan tahan asam dan pewarnaan endospora. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji fermentasi glukosa, uji kebutuhan oksigen, uji katalase, uji ketahanan Na^+ , dan uji oksidase. Sebelum melakukan pengujian, isolat bakteri diremajakan pada medium padat NA hingga diperoleh isolat yang berumur 24 jam.

E. Uji Potensi Enzim Amilase, Selulase dan Protease Bakteri

Potensi enzim amilase dilakukan dengan cara isolat bakteri digores pada medium *Starch Agar*. Isolat bakteri diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Lalu, diteteskan beberapa tetes *Gram's iodine* pada biakan bakteri, dan diamati zona bening yang terbentuk. Pengujian potensi bakteri selulolitik secara kualitatif dilakukan dengan menguji kemampuan isolat bakteri aerob dalam mendegradasi selulosa. Isolat bakteri diinokulasikan pada medium yang mengandung substrat selulosa murni, yaitu *carboxy methyl cellulose* (CMC) [9], dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh dicuci dengan larutan *Congo Red* 0,1% selama sepuluh menit dan dibilas menggunakan NaCl 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di daerah sekitar koloni. Pengujian potensi bakteri proteolitik dilakukan dengan cara isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Skim Milk Agar*. Setelah diinkubasi 48 jam pada suhu 37°C, disekitar isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease akan terlihat zona bening. Indeks amilolitik, selulolitik dan proteolitik diukur dengan cara berikut [10]:

$$IA/IS/IP = \frac{X1 - X2}{X2} \quad (1)$$

Keterangan:

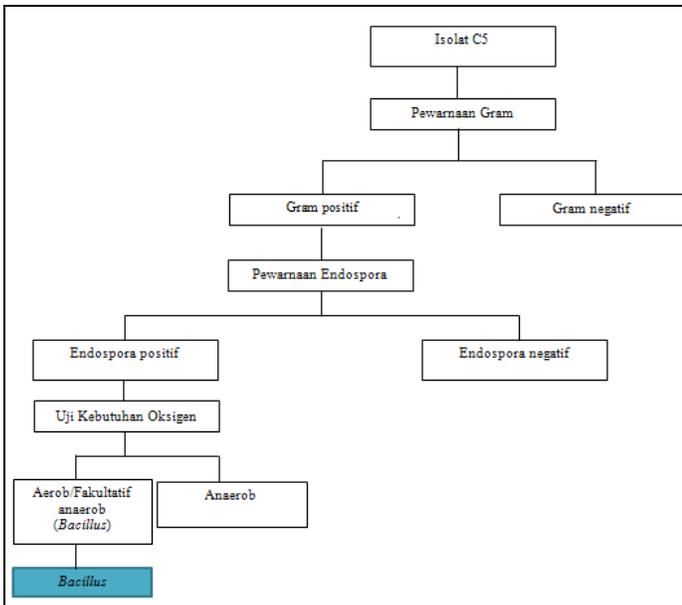
IA/IS/IP = Indeks aktivitas amilolitik, selulolitik, proteolitik
 X1 = Rata-rata diameter zona bening
 X2 = Rata-rata diameter koloni

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dari pengenceran bertingkat didapatkan isolat bakteri aerob C5. Selanjutnya isolat bakteri diuji karakter biokimia yang dilakukan secara bertahap menurut bagan alir dikotomi berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [8]. Gambar 1 menunjukkan bentuk sel dan karakter Gram isolat bakteri C5. Dari Gambar 2, terlihat bahwa isolat C5 cenderung masuk ke dalam genus *Bacillus*, yang ditunjukkan dengan karakter Gram positif basil, endospora positif berbentuk bulat atau oval dan bersifat aerob hingga fakultatif anaerob.



Gambar. 1. Karakter Gram dan bentuk sel isolat bakteri C5.



Gambar. 2. Bagan alir dikotomi isolat C5 berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Potensi biodegradasi diukur berdasarkan kemampuan amilolitik, selulolitik dan proteolitik. Potensi amilolitik diukur berdasarkan kemampuan isolat bakteri dalam mensekresikan enzim amilase. Pengujian enzim amilase secara kualitatif dilakukan dengan menguji aktivitas bakteri aerob dalam mendegradasi amilum pada medium *Starch Agar*. Aktivitas amilase ditentukan berdasarkan zona bening yang terbentuk pada medium yang telah ditambahkan larutan *Gram's iodine mordant*. Bakteri yang memiliki aktivitas enzim amilase ekstraseluler dapat menghidrolisis pati (amilosa dan amilopektin) yang terkandung dalam medium *Starch Agar*, sehingga pati yang telah terdegradasi tidak dapat berikatan dengan I_2 dan menghasilkan zona bening di sekeliling koloni bakteri (Gambar 3). Daerah yang patinya belum terhidrolisis akan berwarna biru ungu dikarenakan adanya ikatan antara pati dengan I_2 [11].

Potensi selulolitik juga diukur berdasarkan kemampuan isolat bakteri dalam mensekresikan enzim selulase. Pengujian dilakukan dengan mengukur indeks selulolitik berdasarkan zona bening yang terlihat disekitar koloni bakteri yang tumbuh pada medium (*Carboxy methyl cellulose*) CMC.

Tabel 1. Potensi biodegradasi isolat bakteri C5.

Isolat C5	Indeks Amilolitik (IA)	Indeks Selulolitik (IS)	Indeks Proteolitik (IP)
	0.93	1.95	1.39



Gambar. 3. Hasil uji kualitatif amilolitik, selulolitik dan proteolitik pada isolat C5.

Hasil degradasi medium oleh enzim selulase terlihat sebagai zona bening setelah ditambahkan pewarna *Congo Red* 0,1% dan pembilasan dengan $NaCl$ 1% untuk menghilangkan warna, sedangkan medium agar yang masih mengandung selulosa terlihat berwarna merah karena adanya ikatan dengan pewarna *Congo Red* 0,1% (Gambar 4).

Demikian pula dengan potensi proteolitik, potensi ini diukur berdasarkan kemampuan isolat bakteri dalam mensekresikan enzim protease. Metode pengujian dilakukan dengan pengamatan zona bening yang dihasilkan dari penguraian protein menjadi asam amino oleh enzim protease yang dihasilkan bakteri pada medium susu skim (Gambar 4). Zona bening yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik terjadi karena adanya aktivitas protease yang memutuskan ikatan peptida dari kasein dalam susu skim. Medium susu skim mendukung pertumbuhan bakteri proteolitik karena mengandung kasein yang berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease [12].

Dari Gambar 3 terlihat bahwa, isolat C5 yang cenderung masuk dalam genus *Bacillus* tersebut, menunjukkan potensi amilolitik, selulolitik dan proteolitik. Isolat C5 memiliki indeks amilolitik (IA) sebesar 0.93, selulolitik (IS) sebesar 1.95 dan proteolitik (IP) sebesar 1.39.

Hasil penelitian ini dapat menjadi pendukung hasil-hasil penelitian sebelumnya. *Bacillus* merupakan genus bakteri penghasil enzim amilase ekstraseluler terbesar. Beberapa spesies dari genus ini, seperti *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* dan *B. amyloliquefasciens* seringkali digunakan untuk memproduksi enzim amilase secara komersial untuk berbagai keperluan [13]. Selanjutnya, selulase dan enzim pendegradasi selulosa lainnya, seperti xylanase merupakan enzim yang umum ditemukan pada kelompok *Bacillus* [14]. Gen yang bertanggung jawab atas aktivitas endoglukanase juga telah berhasil dikloning dari spesies kelompok *Bacillus* [15]. *Endo-β-glucanase* terutama bertanggung jawab untuk hidrolisis ikatan glikosidik internal untuk mengurangi panjang dari

rantai selulosa [16]. Salah satu spesies *Bacillus*, yakni *B. amyoliquefasciens* umum digunakan untuk produksi ethanol dan bahan kimia industri lainnya melalui proses hidrolisis selulosa [17]. Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang paling penting di dunia industri dalam beberapa tahun terakhir. *Bacillus* dapat tumbuh pada kisaran pH 7,0-11,0 dan menghasilkan protease ekstraseluler. Saat ini, sebagian besar enzim protease yang tersedia secara komersial berasal dari kelompok *Bacillus* sp. [18]. *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyoliquefasciens* dan *B. majovensis* merupakan anggota dari kelompok *Bacillus* sp. yang paling potensial digunakan untuk memproduksi enzim protease secara komersial. Savinase[®], Esperase[®], Maxacal[®], dan Maxinase[®] merupakan protease deterjen komersial yang diproduksi oleh *Bacillus* [19].

V. KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi isolat bakteri aerob C5 yang berdasarkan karakter biokimianya cenderung masuk dalam *Bacillus*.

Berdasarkan uji kualitatif amilolitik, selulolitik dan proteolitik, diketahui bahwa seluruh isolat C5 memiliki aktivitas enzim amilase, selulase dan protease. Isolat C5 (*Bacillus* sp.) memiliki IA sebesar 0.93, IS sebesar 1.95 dan IP sebesar 1.39.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] T.R. Agung, "Pengolahan Limbah Cair Domestik dengan Menggunakan Rotary Biological Contractor". *Jurnal Kimia dan Teknologi* ISSN 0216-163X (2012).
- [2] Firdus dan Z.A. Muchlisin, "Degradation Rate Of Sludge and Water Quality of Tangki septik (Water Closed) by Using Starbio and Freshwater Catfish as Biodegradator". *Jurnal Natural*, Vol.10, No. 1 (2010).
- [3] S.H.U Nuryani dan R. Sutanto, "Pengaruh Sampah Kota Terhadap Hasil dan Tahana Hara Lombok". *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*, Vol. 3, No. 1 (2002) 24-28B.
- [4] Sugiharto. *Dasar-dasar Pengelolaan Air Limbah*. Jakarta: UI Press. Jakarta (1987).
- [5] R. Saraswati, E. Santosa, dan E. Yuniarti. 2004. *Organisme Perombak Bahan Organik*. [Online] Available: <http://balittanah.litbang.deptan.go.id/dokumentasi/buku/pupuk/pupuk10.pdf>.
- [6] A.K. Sutoro, (2010). *Isolasi dan Identifikasi Kapang Pereduksi Fosfat dari Berbagai Bioaktivator*. Skripsi Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, Tidak Dipublikasikan.
- [7] Mara, D. *Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries*. Earthscan. London (2003).
- [8] J.G. Holt, N.R. Krig, P. Sneath, J. Staley, dan S. Williams, *Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology 9th Edition*. Lipincott Williams and Wilkins Company. Philadelphia USA (1994).
- [9] A. Meryandini, *Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya*. Makaira Sains No. 13 (2009) 33-38.
- [10] G. Lim, T. K. Tan, and N. A Rahim, Variations in amylase and protease activities among *Rhizopus* isolates. *MIRCEN J. Appl Microbiol Biotechnol* 3, (1987) 319-322.
- [11] B. V. McCleary, *Analysis of Feed Enzymes*. Di dalam: Bedford M. R. dan Partridge G. G., Editor. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Cabi Publishing. New York (2001).
- [12] A. Akhdiya, *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil*. Buletin Plasma Nutfah 9: (2003) 98-102.
- [13] Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A.. *Alpha-amylases from Microbial Sources: an Overview on Recent Developments*. Food Technol. Biotechnol. Vol. 44 No. 2, (2006) 173-184.
- [14] L. Wang, X. Huan, Y. Zhou, Q. Ma, and Y. Chen. "Simultaneous Cloning and Expression of Two Cellulase Genes from *Bacillus subtilis* Newly Isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor* Bedfordi)". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 397-400 (2009).
- [15] Bischoff, K., Liu, S., Hughes, S. "Cloning and Characterization of a Recombinant Family 5 Endoglucanase from *Bacillus licheniformis* Strain B-41361". *Process Biochem.* 42, (2007) 1150-1154.
- [16] Wang, Yujuan, Hang Yuan, Jun Wang, Zengliang Yu. *Truncation of the Cellulose Binding Domain Improved Thermal Stability of Endo-B-1,4-Glucanase from *Bacillus subtilis* JA18*. *Bioresource Technology*, 100 (2009) 345-349.
- [17] Y-J Lee, B-K Kim, B-H Lee, K-I Jo, N-K Lee, C-H Chung, Y-C Lee, and J-W Lee. *Purification and Characterization of Cellulase Produced by *Bacillus amyoliquefasciens* DL-3 Utilizing Rice Hull*. *Bioresource Technology* 99 (2008) 378-386.
- [18] E. Romero and J. Bautista, A.M. Garci'a-Martinez, O. Cremendes, and J. Parrado, "Bioconversion of Corn Distiller's Dried Grains with Solubles (CDDGS) to Extracellular Proteases and Peptones". *Process Biochem.* Vol. 42 (2007) 1492-7.
- [19] Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B. "An Overview on Fermentation, Down-Stream Processing and Properties of Microbial Alkaline Proteases". *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 60 (2002) 381-95.