

Isolasi Bakteri Penghasil Poli- β -Hidroksi Butirat (PHB) dari Limbah Cair Tapioka

Isolation Bacteria produce Poly- β -Hydroxy Butirate (PHB) from Tapioca Liquid Waste

Ifandari, Reny Pratiwi

Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Setia Budi Surakarta, email: if7099@yahoo.com, reny.pratiwi@gmail.com

ABSTRAK

Limbah cair tapioka merupakan limbah yang kaya akan sumber karbon dan berpotensi sebagai bahan baku pembuatan Poli- β -Hidroksi Butirat (PHB). Limbah ini belum dimanfaatkan secara optimal. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat bakteri yang menghasilkan PHB sehingga limbah cair tapioka dapat dimanfaatkan secara optimal sebagai bahan pokok pembuatan PHB tanpa penambahan agen bakteri lain di luar limbah.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi USB dan laboratorium Biologi Tanah, UNS. Sampel limbah cair tapioka didapatkan dari daerah desa Margoyoso, kab. Pati, prov. Jawa Tengah. Teknik isolasi bakteri dengan seri pengenceran dari 10^2 sampai 10^6 yang ditumbuhkan secara taburan pada medium nutrient agar. Dari 46 koloni yang dipisahkan, didapatkan 15 plate yang positif menghasilkan PHB. Komunitas bakteri yang ada pada tiap biakan dari ke 15 plate terdiri dari 4 jenis. Jenis bakteri yang adalah bentuk bacill panjang, basil pendek, cocus dan spiral.

Kata kunci: isolasi, bakteri, limbah, tapioka, PHB

ABSTRACT

Tapioca liquid waste is the source of carbon waste and potential source as raw material making of PHB. This Waste not yet been exploited optimally. The aim of this research was getting bacterium isolat produces PHB so that tapioca liquid waste can be exploited optimal as raw material making of PHB without added other bakteri agent outside waste.

This research conducted by researcher in Microbiological laboratory USB and Biological soil laboratory UNS. Sampel tapioka liquid waste got from Margoyoso area, Pati, Central Java. Isolation bacterium done with dilution series from 10^2 until 10^6 which was growth by pour plate at nutrient agar medium. The result got 46 dissociated colony, from its got 15 plate which are positive yield PHB. Community Bacterium was founded in every breeding from to 15 plate consist of 4 type. There was four Bacterium types which is form long bacillus, short bacillus, spiral and cocus.

Kata kunci: isolation, bacteria, tapioca waste, PHB

PENDAHULUAN

Plastik pada akhir – akhir ini seakan menjadi bahan pokok bagi kehidupan. Penggunaan plastik sangat vital di kehidupan. Semua produk dalam proses pengemasannya menggunakan plastik. Hal ini membawa dampak dengan meningkatnya limbah plastik buangan yang dihasilkan. Sampah plastik menjadi masalah yang paling susah dipecahkan. Limbah plastik tergolong limbah yang tidak bisa diuraikan dan menjadi masalah sendiri dalam tanah. Adanya limbah plastik dalam tanah menghalangi keterserapan air dari permukaan tanah ke dalam tanah, belum lagi masalah kesuburan tanah yang menurun akibat adanya plastik dalam tanah. Oleh karena itu perlu dilakukan pemecahan permasalahan agar semua

proses pengemasan dan higienitas terjadi dan juga limbahnya tidak merusak lingkungan.

Solusi dari keadaan tersebut adalah penggunaan plastik terdegradasi. Plastik terdegradasi adalah plastik yang berasal dari bahan organik yang dapat didegradasi oleh mikroorganisme di lingkungan. Bahan utama plastik terdegradasi adalah bahan dari hasil pertanian seperti singkong, jagung dan dapat juga dari hidrolisis limbah sawit (Artianto, 2003). Salah satu jenis plastik terdegradasi adalah golongan Polihidroksil Alkanoat (PHA). PHA dan kopolimernya diproduksi dari substrat tertentu yang kaya sumber karbonnya tapi minimum kandungan mineralnya (Yogesh et al. 2012).

PHA juga dihasilkan dari hasil penunbuan bakteri tertentu pada substrat tertentu. Salah satu kopolimer dari PHA adalah Poli- β -hidroksi butirat (PHB). PHB merupakan salah satu biji plastik yang berkualitas bagus. Sehingga keberadaan PHB memiliki nilai ekonomi yang penting. Bakteri yang dapat mensintesis PHA antara lain kelompok dari genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Aeromonas*, *Rhodobacter* dan beberapa kelompok Archaea. (Ojumu et al, 2004). Substrat yang telah digunakan sebagai bahan antara lain: hidrolisat tapioka (Aremu et al 2011), limbah Pati Sagu (Atifah dkk, 2007), dan limbah cair tapioka (Sangyoka et al .2012).

Keberadaan limbah cair tapioka di beberapa wilayah banyak menjadi masalah yang berarti bagi masyarakat. Adanya limbah yang dibuang lingkungan menyebabkan kontaminasi air tanah dan penyakit bagi masyarakat sekitar. Limbah tapioka jika tidak diolah dengan benar menimbulkan banyak penyakit antara lain; gatal – gatal, bau tidak sedap, dan mencemari perairan. Kandungan bahan organik sangat tinggi pada limbah cairnya. Bahan organik yang ada dalam limbah dapat dimanfaatkan sebagai substrat hidup bagi mikrobia, terutama bakteri. Limbah cair yang tidak diolah secara benar akan menimbulkan bau. Adanya bau itu dapat terjadi akibat adanya aktivitas mikroorganisme. Adanya komunitas bakteri yang ada pada limbah cair tapioka, dimungkinkan terdapat jenis – jenis bakteri yang dapat menghasilkan PHA dan kopolimernya.

Permasalahan yang akan diteliti adalah :

1. Apakah di dalam limbah cair tapioka terdapat bakteri yang dapat menghasilkan senyawa kelompok PHA?
2. Seberapa besar isolate – isolate bakteri tersebut mampu menghasilkan senyawa PHB ?

METODE

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah; elenmeyer, tabung reaksi, gelas benda, tabung cuvet, gelas ukur, gelas kimia, cawan petri, corong, sendok tanduk, rak tabung, ose, Bunsen, pipet tetes, senrifuge, spuit, oven,

autoklaf, neraca analitik, incubator, enkas, *hotplate*, *waterbath*, *shaker incubator*, UV transluminator, spektrofotometer UV.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah limbah cair tapioca yang diambil dari daerah desa Margoyoso, kab. Pati, medium *Nutrien Agar* (NA), Medium *Nutrient Broth* (NB) Medium Minimal Mineral (MSM), pewarna Sudan Black sebagai indikator, *Sodium hypoklorit*, aseton, dietil eter, H₂SO₄ pekat, buffer fosfat, PHB murni sebagai standart, spiritus, akuades steril.

Prosedur Kerja

Prosedur kerja pada penelitian ini terdiri dari bagian persiapan, proses isolasi bakteri, proses pengkulturan isolate pada medium MSM dan pengukuran produk PHB.

Pembuatan medium *Nutrient Agar* (NA)

Ditimbang 5 gram bactopecton, 5 gram ekstrak ragi dan 20 gram *bacto agar*. Bahan – bahan yang ditimbang dilarutkan dengan 1 liter dan dipanasi sampai larut sempurna. Medium yang telah larut kemudian disterilisai pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan medium *Nutrient Broth* (NB)

Ditimbang 5 gram *bactopecton* dan 5 gram ekstrak ragi. Bahan – bahan yang ditimbang dilarutkan dengan 1 liter dan dipanasi sampai larut sempurna. Selanjutnya disterilisai pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Medium Minimal Mineral (MSM)

Bahan yang digunakan dalam pembuatan Medium Minimal Mineral adalah 3 gr sodium klorida, 1,5 gr *dipotassium hydrogen orto posfat*, 1 gr magnesium sulfat, 5 gr sukrosa, 0.5 gram ammonium nitrate, dan 1 liter akuades diatur pada pH 7. Medium kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Untuk medium MSM agar dibuat dengan menambahkan agar pada MSM cair sebanyak 1,5 %.

Pengambilan Sampel limbah

Sampel diambil dari ketiga titik pengambilan. Masing – masing sampel dimasukkan pada wadah berupa botol gelap dan dibawa menggunakan thermostat. Hal ini dimaksudkan agar aktivitas mikrobial diminimalkan. Sampel kemudian dibawa ke laboratorium mikrobiologi dan dilakukan penanaman pada media yang telah dipersiapkan.

Isolasi bakteri dari limbah

Diambil 1 mL limbah cair tapioca dimasukkan dalam tabung dan ditambah 9 mL aquades steril. Setelah itu dibuat seri pengenceran pada 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 dan 10^6 . Setelah itu diambil 1 mL dan ditambahkan medium NA cair sebanyak 20 ml dan dicampur. Setelah itu diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 – 48 jam. Koloni pada *plate* dihitung, jika masih *spreading* dilakukan pengenceran sampai didapatkan koloni yang dapat terpisah dengan baik.

Pemurnian Isolat

Setiap koloni kemudian ditanam pada NA *plate* untuk dilakukan proses pemurnian *isolate*. Setelah didapatkan koloni yang sama pada setiap *plate* diambil satu koloni dan ditanam pada medium NB.

Uji Skreening Produksi PHB

Isolate yang ditanam pada NB diambil 1 ml ditanam pada medium MSM agar dengan metode pour plate. Diinkubasi pada suhu 36°C selama 3 x 24 jam. *Plate* diambil diamati pertumbuhan koloninya. Koloni kemudian diwarnai dengan pewarna sudan black 0,02 % (w/v) pada pelarut etanol 70%. Waktu kontak koloni dengan cat antara 15 – 20 menit, setelah itu dicuci dengan etanol 96%. setelah itu diamati warna koloni setelah di-*washing*.

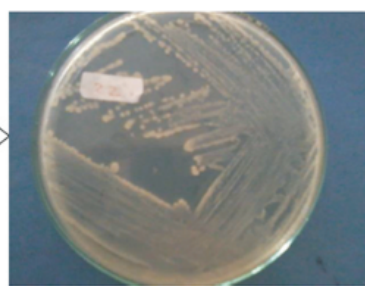
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang didapat dari penelitian ini adalah didapatkan 46 kultur dari tiap koloni yang dipisahkan. Pemilihan koloni yang dipisahkan berdasarkan perbedaan penampakan koloni yang tumbuh. Kultur murni yang tumbuh ada yang bersifat aerob 43 isolat dan 3 isolat bersifat fakultatif anaerob.

Kultur murni kemudian ditanam pada medium MSM agar, setelah itu diinkubasi selama 3 hari pada suhu 35°C . Koloni yang tumbuh kemudian dicat dengan Sudan Black. Berdasarkan perulangan pengambilan dan pengkulturan didapatkan 15 sampel yang positif menghasilkan PHB. Isolat positif menghasilkan PHB berwarna biru kehitaman koloninya jika dicat dengan sudan black (Gambar 4). Isolat yang tidak menghasilkan PHB berwarna putih (Gambar 3).



Gambar 1. Hasil Penanaman Limbah



Gambar 2. Pemisahan Koloni



Gambar 3. Isolat tidak menghasilkan PHB



Gambar 4. Isolat yang menghasilkan PHB

Medium MSM merupakan medium yang minimal nutrisi yang dapat digunakan sebagai medium tumbuh beberapa jenis bakteri yang berpotensi penghasil PHA ataupun PHB. Medium ini disuplement sumber karbon baik berupa gula maupun karbohidrat rantai panjang seperti pati. Bakteri yang positif terhadap pewarnaan Sudan Black, memiliki cadangan karbon di dalam sel yang berupa PHB. Granula PHB mampu menyerap pewarna sudan Black sehingga warnanya tetap biru kehitaman walau sudah dilakukan pembilasan. Hal ini sesuai dengan penelitian Panigrahi and Ujwala (2013) Screening dan Isolasi bakteri dari tanah.

Sisa pati pada limbah cair tapioka masih cukup banyak. Hanya saja sifat dari limbah cair tapioca mempunyai pH rendah antara 4 – 5,5. Keberadaan komunitas bakteri yang ada di limbah terbatas jenisnya. Jenis – jenis bakteri yang ada pada limbah dilihat potensinya dalam menghasilkan PHB. Pengujian potensi bakteri dalam memproduksi PHB diuji dalam medium MSM cair dengan sumber karbon glukosa 20%. Inokulum dari 15 *plate* uji dengan nomer seperti pada Tabel 1. ditanam pada MSM cair sebanyak

100 μ L sel. Setelah 3 x 24 jam pada suhu 36^o C dipanen dengan cara mensentrifuge pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang berupa sel dipipet sebanyak 1 mL diukur berat basah dan berat kering masa sel. Besarnya produksi PHB dilihat dari berat kering massa sel saja.

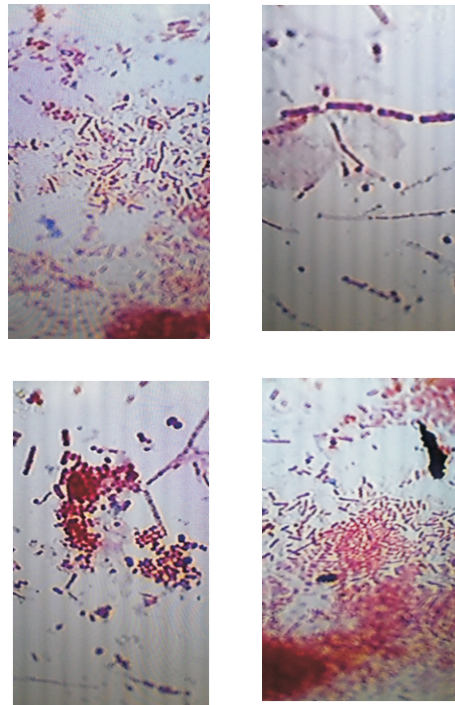
Berdasarkan hasil pengujian didapatkan berat kering massa sel yang berkisar antara 0,585 gr/mL hingga 0,940 gr/mL. Hasil yang tidak berbeda jauh antar no koloni hasil isolasi. Jumlah ini dimungkinkan karena massa sel dari jenis – jenis bakteri sama besar.

Setelah itu bakteri dari tiap koloni juga dicat dengan pewarna *gram*. Berdasarkan hasil pengecatan didapatkan hasil seperti pada Gambar 5.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi bakteri yang ada dalam medium MSM, didapatkan hasil semua slide bakteri membentuk koloni yang masih bercampur yang terdiri dari empat bentuk bakteri yaitu : batang panjang, batang pendek, *cocus* dan spirial. Komunitas jenis bakteri yang terbanyak adalah batang panjang>batang pendek >*cocus*>spirial. Komunitas ini yang membentuk PHB pada medium MSM.

Tabel 1. Koloni yang menghasilkan PHB

No	No Kultur koloni	Berat Kering gr / ml
1	37	0,880
2	36	0,900
3	19	0,830
4	31	0,585
5	13	0,760
6	23	0,770
7	18	0,855
8	28	0,900
9	211	0,900
10	22	0,905
11	172	0,855
12	24	0,910
13	232	0,825
14	222	0,680
15	192	0,940



Gambar.5. Morfologi Bakteri dengan Pengecatan Gram

Limbah cair tapioca memiliki sifat yang pH sangat rendah antara 4 – 5,5 dan ditambah lagi kandungan sianida yang tinggi. Hal ini mempengaruhi pada jenis – jenis bakteri yang dapat tumbuh pada keadaan lingkungan yang ekstrim. Jenis – jenis bakteri yang telah diketahui dapat menghasilkan PHB antara lain *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *E.coli*, *Rastonia eutropha*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus necator* dan lain – lain. Jika dilihat dari bentuk morfologi, komunitas bakteri yang ada dalam limbah cair tapioca adalah dari genus *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* dan jenis lain yang berbentuk spiral.

KESIMPULAN

Terdapat komunitas bakteri penghasil PHB pada limbah cair tapioca yang dapat ditumbuhkan pada medium MSM. Komunitas bakteri terdiri dari empat jenis bakteri dengan bentuk batang panjang, batang pendek, cocus dan spiral.

DAFTAR PUSTAKA

- Aremu Mo, Aransiola E.F. layokun Sk. And Solomon. 2011. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Pseudomonas putida* strain KT 2440 on Cassava Hydrolysisate medium. Res. J. Chem Sci. Vol 1 (4) pp. 67 – 73
- Artianto, S. 2003. Kajian Biodegradasi Bioplastik Poli-β-hidroksialkanoat dengan penambahan Pemlastis Dimetil Ftalat dan Dimetil Glikol dalam Media Padat Buatan. Skripsi. Jurusan Teknologi Industri Pertanian. Universitas Hasanudin.
- Atifah N, Khaswar Syamsu, Ani Suryani. 2007. Kajian Fermentasi Bioplastik Poli-β-Hidroksi Alkanoat (PHA) oleh *Ralstonia Eutropha* Menggunakan Sumber Karbon Hidrolisat pati Sagu. Jurnal Teknologi Pertanian Vol 8(3) pp 160 - 171.
- Haedar N, Fahrudin, Firdaus Zenta dan Nurlaela. 2013. Produksi Poly-β-hidroksi butirat (PHB) pada Isolat Bakteri dari Molasses dan Tanah pabrik gula. Respository.unhas.ac.id.
- Ojumu Tv, Yu J and Solomon .2004. Minireview: Production of Polyhydroxy alkanoates , bacterial biodegradable polimer. African J Of Biotechnology Vol 3 (1) pp 18 – 24.
- Ostle A and J.G Holt. 1982. Nile blue A as a Fluorescent stain for Poly – B- Hydroxybutirate. Applied and Environmental Microbiology. Vo 1. 44 (1). pp 238 – 241.
- Panigrahi Sunitha and Ujwala Badveli .2013. Screening, Isolation and Quantification of PHB-Producing Soil Bacteria. www.ijesi.org Volume 2(9) PP.01-06
- Sangyoka, S, N. Poomipuk and A Reungsang. 2012. Optimum condition for the production of Polyhydroxybutyrate from Cassava waste water by the newly Isolated *Cupriavidus sp*. KKU 38. Sains Malaysiana 41(10). pp 1211 – 1216.
- Yogesh C, Bhavana P, Fulekar. 2012. PHA production Application and its Bioremediation in environment. I.Res.J.Environment Sci Vol 1 (2) pp. 46 – 52