

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Limbah Cair Rumah Potong Hewan (RPH)

Isolation and Identification of Biosurfactant Producing Bacteria from Slaughterhouse Wastewater

Kristina Sinaga^{1*}, M. Hasbi¹, Eko Purwanto¹

¹Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau
email: kristinasinaga250@gmail.com

(Received: 13 Maret 2021; Accepted: 27 Maret 2021)

ABSTRAK

Air limbah rumah potong hewan kaya akan minyak dan lemak dan dapat dihuni oleh bakteri penghasil biosurfaktan. Isolasi bakteri diperlukan untuk mengetahui bakteri penghasil biosurfaktan yang dapat digunakan untuk menjaga daerah tercemar minyak dan lemak melalui proses bioremediasi. Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penghasil biosurfaktan, telah dilakukan penelitian pada bulan Juli hingga September 2020. Pengambilan sampel dilakukan pada limbah rumah potong hewan di Jalan Cipta Karya Pekanbaru Provinsi Riau dan pengambilan sampel dilakukan sebanyak tiga kali. Isolasi dilakukan dengan TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian sampel bakteri ditanam dengan TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan diisolasi selama 24 jam. Kemudian diidentifikasi menggunakan uji biokimia dan morfologi dilakukan untuk mengetahui jenis bakterinya. Indeks Emulsifikasi kemudian dihitung dengan menggunakan TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan minyak tanah. Hasil penelitian menunjukkan indeks emulsifikasi adalah *Flavobacterium* 53%, *Agrobacterium* 53%, *Serratia* 60%, *Salmonella* 52,5%, *Salmonella* 52,4%, *Proteus* 65,7%, *Clostridium* 62% dan *Aeromonas* 59,5%. *Proteus* menunjukkan Indeks Emulsifikasi tertinggi, itu diperiksa menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan terbukti bahwa spesies tersebut adalah *Proteus vulgaris*.

Kata Kunci: *Proteus vulgaris*, Indeks Emulsifikasi, Limbah Cair Rumah Potong Hewan

ABSTRACT

The slaughterhouse wastewater is rich of oil and fat and it may inhabit by biosurfactant producing bacteria. Isolation of the bacteria is needed in order to find out a biosurfactant producing bacteria that can be used to maintain the oil and fat polluted area through bioremediation process. To isolate and identify the biosurfactant-producing bacteria, a study has been conducted on July to September 2020. The samples were obtained from slaughterhouse wastewater at Cipta Karya street Pekanbaru, Riau Province and samplings were conducted three times. The isolation was conducted by TSB (*Tryptic Soy Broth*) and incubated for 24 hours. Then the bacterial samples were planted by TSA (*Tryptic Soy Agar*) and isolated for 24 hours. Then, it was identified using biochemical and morphological tests were carried out to find out the types of bacteria. The Emulsification Index was then calculated by using TSB (*Tryptic Soy Broth*) and kerosene. Results shown that the emulsification index were *Flavobacterium* 53%, *Agrobacterium* 53%, *Serratia* 60%, *Salmonella* 52. 5%, *Salmonella* 52.4%, *Proteus* 65.7%, *Clostridium* 62% and *Aeromonas* 59.5%. As *Proteus* is shown the highest Emulsification Index, it was check using a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) and it is proved that the species is *Proteus vulgaris*

Keyword: *Proteus vulgaris*, Emulsification Index, slaughterhouse liquid waste

1. Pendahuluan

Rumah Potong Hewan atau RPH adalah suatu bangunan atau kompleks bangunan

dengan desain dan syarat tertentu yang digunakan sebagai tempat memotong hewan konsumsi masyarakat umum. RPH merupakan

unit pelayanan masyarakat dalam penyediaan daging yang aman, sehat, utuh dan halal (ASUH) serta berfungsi sebagai sarana untuk melaksanakan: pemotongan hewan secara benar, pemeriksaan kesehatan hewan sebelum dipotong dan pemantauan serta surveilans penyakit hewan dan *zoonosis*.

Dalam proses produksinya, RPH menghasilkan dua jenis limbah, yaitu limbah padat dan limbah cair. Limbah padat berupa rumen (struktur sistem pencernaan seperti lambung), kotoran sapi dan rumput sisa pakan. Sedangkan limbah cair RPH mengandung larutan darah, protein, lemak dan padatan tersuspensi yang menyebabkan tingginya bahan organik dan nutrisi, tingginya variasi jenis dan residu yang terlarut ini akan memberikan efek mencemari sungai dan badan air (Kundu *et al.*, 2013).

Untuk mengurangi beban pencemaran di perairan dilakukan pengolahan secara biologi yaitu Bioremediasi. Bioremediasi merupakan penggunaan mikroorganisme sebagai upaya untuk menurunkan tegangan permukaan perairan. Jenis mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri. Bakteri yang digunakan adalah bakteri yang mampu mendegradasi kandungan minyak dan lemak pada limbah cair RPH atau yang mampu menghasilkan biosurfaktan, dimana biosurfaktan merupakan kemampuan mikroorganisme yang terdiri atas molekul hidrofobik dan hidrofilik, yang mampu mengikat molekul hidrokarbon tidak larut air dan mampu menurunkan tegangan permukaan. Biosurfaktan dihasilkan secara alami sehingga lebih ramah lingkungan dan dapat diurai secara biologi, tidak seperti kebanyakan surfaktan sintetik lainnya.

Femi-Ola *et al.* (2015) menyatakan bahwa bakteri penghasil biosurfaktan ada di mana-mana dan mendiami beberapa lingkungan dengan berbagai suhu, nilai pH dan salinitas. Beberapa bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* dan *Flavobacterium* dilaporkan menghasilkan biosurfaktan. Tanah dan air terkontaminasi dengan hidrokarbon dan ladang minyak yang dihasilkan air berlimpah dalam bakteri penghasil biosurfaktan, di mana mereka memproduksi biosurfaktan untuk mengeksploitasi hidrokarbon sebagai sumber karbon.

Saptarini (2009) menyatakan bahwa permukaan daging yang baru disembelih biasanya mengandung sekitar 10^2 - 10^4 bakteri per inci terutama terdiri dari bakteri mesofilik yang berasal dari saluran pencernaan dan permukaan luar hewan tersebut. Bakteri yang paling banyak mengkontaminasi daging, yakni: *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Campylobacter* dan *Salmonella* (Angraeini, 2005)

2. Metode Penelitian

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juli-September 2020 di UPTD Rumah Potong Hewan Jalan Cipta Karya Pekanbaru Provinsi Riau.

2.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode survei, di mana limbah cair yang terdapat pada kolam pembuangan limbah RPH digunakan sebagai sampel penelitian untuk dilakukan isolasi serta identifikasi bakteri penghasil biosurfaktan. Dalam pengambilan sampel dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel limbah cair dilakukan secara acak menggunakan Gayung *Stainless steel* pada kolam pembuangan dan dikompositkan ke dalam wadah botol kaca yang memiliki volume 250 mL, kemudian botol sampel tersebut dimasukkan ke dalam *cool box* yang telah diisi es batu agar suhu pada *cool box* tersebut mendekati suhu 4°C, guna untuk mengawetkan sampel sebelum dilakukan isolasi dan identifikasi.

2.3.2. Isolasi bakteri

Air sampel yang telah diambil dimasukkan kedalam Erlenmeyer yang berisi larutan TSB (*Tryptic Soy Broth*) 50 ml dan air sampel limbah 1 ml. Selanjutnya erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* dan dimasukkan kedalam shaker selama 24 jam. Air sampel yang telah dilakukan pengayaan kemudian dilakukan pengenceran dengan menggunakan metode seri pengenceran. Air

sampel diambil sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl (0.9%) sehingga didapat pengenceran 10^{-1} demikian seterusnya sampai pengenceran 10^{-6} .

Sampel yang telah diencerkan diambil pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dan ditumbuhkan pada media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dengan metode sebar (spread plate) Sampel diambil sebanyak 0,1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam cawan petri yang telah berisi media tumbuh kemudian diratakan menggunakan batang L lalu cawan petri dibungkus dengan kertas AVS dan kemudian diinkubasi dengan posisi cawan petri terbalik selama 24-48 jam pada suhu $27^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$. Untuk uji selanjutnya, dilakukan penanaman pada agar miring media TSA untuk mendapatkan kultur murni.

2.3.3. Uji Emulsifikasi

Langkah awal emulsifikasi yaitu dilakukan centrifuge dengan larutan TSB serta 1 koloni isolat bakteri, kemudian hasil centrifuge di ambil 3 ml dan dicampurkan dengan 3 ml minyak tanah, kemudian dibiarkan selama 24 jam untuk menghitung Indeks Emulsifikasi. Adapun rumus Indeks Emulsifikasi yaitu :

$$\text{IE}(24) = \frac{\text{Tinggi Lapisan Emulsi}}{\text{Tinggi Total Larutan}} \times 100 \%$$

2.3.4. Identifikasi Bakteri

Identifikasi isolat dilakukan secara morfologi dan biokimia. Sifat morfologi yang diamati meliputi morfologi koloni sedangkan karakterisasi secara biokimiawi yang dilakukan antara lain; pewarnaan gram, uji katalase, uji motilitas, katalase, oksidase, H_2S , indol, Motalitas dan TSIA (Dwidjoseputro, 1954)

2.3.5. Pengukuran Kualitas Lingkungan RPH

Parameter lingkungan yang diukur langsung di kolam meliputi Derajat keasaman (pH) dan Suhu menggunakan termometer. Sedangkan untuk analisis minyak dan lemak menggunakan sampel yang sama dengan

sampel isolasi bakteri yang di analisis di Laboratorium.

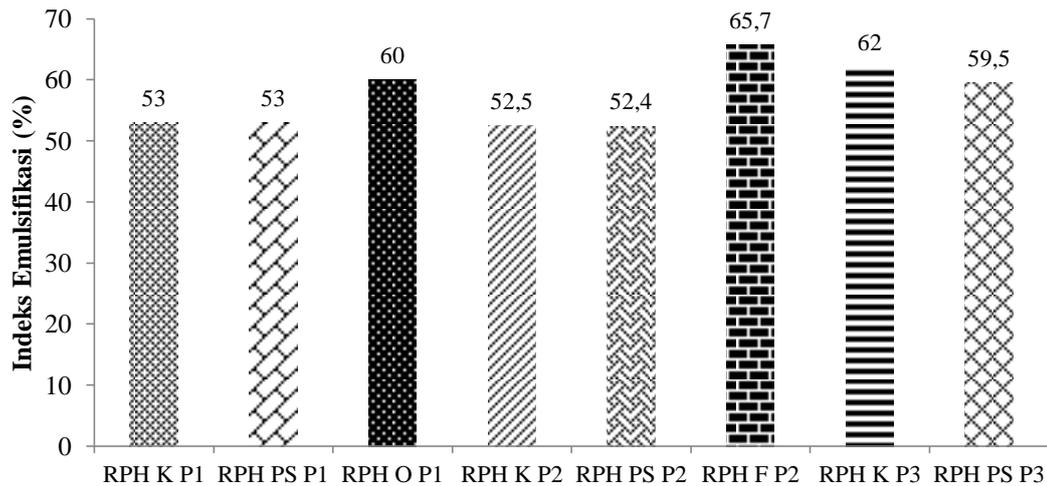
3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Keadaan Umum Daerah Penelitian

Unit Pelaksana Teknis Dinas Rumah Potong Hewan (RPH) berada di jalan Cipta Karya kelurahan Sialang Munggu Kecamatan Tampan. Luas RPH Sapi/Kerbau +-4,5 Ha yang terdiri dari bangunan diantaranya: Gedung Pemotongan RPH Ruminansia (Kapasitas gedung pemotongan RPH Ruminansia sebanyak 100 ekor dan rata-rata pemotongan sapi di RPH Kota Pekanbaru sebanyak 25-40 ekor per hari, kandang penampungan), kandang karantina, kantor, IPAL (Instalasi Pengolahan Air Limbah) sudah tidak berfungsi, kantin, workshop, ruang laboratorium, pos retribusi dan rumah pengolahan pupuk.

3.2. Uji Emulsifikasi Bakteri

Jumlah isolat bakteri yang ditemukan pada air limbah RPH saat penelitian adalah 8 jenis isolat yang berbeda dengan 3 kali ulangan. Dari 8 isolat yang ditemukan dapat disimbolkan sebagai RPH K P1, RPH PS P1, RPH O P1, RPH K P2, RPH PS P2, RPH F P2, RPH K P3 dan RPH PS P3. Kemudian seluruh isolat dilakukan uji emulsifikasi. Purnomohadi (2010) menyatakan bahwa uji emulsifikasi digunakan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan mengemulsikan zat cair yang berbeda kepolarannya. Hasil uji emulsifikasi dinyatakan sebagai indeks emulsifikasi. Indeks emulsifikasi berhubungan dengan konsentrasi surfaktan, karena semakin kecil konsentrasi biosurfaktan, kemampuan senyawa tersebut untuk mengemulsikan minyak juga semakin berkurang. Aktivitas permukaan dan kemampuan emulsifikasi biosurfaktan tidak selalu berhubungan secara linier. Soforolipid merupakan contoh biosurfaktan yang memiliki kemampuan emulsifikasi yang lemah, walaupun dapat menurunkan tegangan permukaan. Oleh karena itu, uji emulsifikasi hanya digunakan sebagai indikasi awal adanya biosurfaktan yang disintesis oleh mikroba tertentu. Indeks emulsifikasi dari isolat bakteri RPH dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Indeks Emulsifikasi

3.3. Identifikasi Bakteri

Identifikasi Bakteri dilakukan dengan 2 metode, yaitu dengan metode uji biokimia dan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Dengan mengetahui karakteristik morfologi bakteri juga akan mendukung proses identifikasi bakteri.

Uji biokimia merupakan bagian dari prosedur identifikasi untuk menentukan genus atau spesies bakteri tertentu. Setiap spesies memiliki karakteristik morfologi yang dapat dibedakan sehingga dapat dijadikan sebagai dasar identifikasi.

Pada prinsipnya, uji biokimia dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mereaksikan senyawa kimia sehingga menghasilkan senyawa kimia yang lain yang dikaitkan dengan sifat bakteri itu sendiri. Umumnya, untuk mengetahui adanya reaksi tertentu diperlukan suatu senyawa indikator atau reagen yang berbeda-beda tergantung bahan kimia yang ditambahkan. Hasil uji

biokimia yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 1.

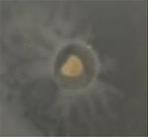
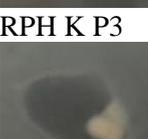
Hasil uji emulsifikasi yang telah dilakukan ditemukan sebanyak 8 jenis isolat bakteri penghasil biosurfaktan dengan bentuk, warna, tepian dan gram yang berbeda pada setiap bakteri (Tabel 2).

Capuccino dan Sherman (1992) menyatakan bahwa karakterisasi morfologi bertujuan untuk mengamati baik morfologi koloni maupun morfologi sel bakteri pada isolat bakteri yang telah lolos seleksi. Mikroorganisme yang ditumbuhkan pada media yang bervariasi akan menunjukkan penampakan makroskopis yang berbeda-beda pada pertumbuhannya. Perbedaan ini disebut dengan karakteristik kultur, yang digunakan sebagai dasar untuk memisahkan mikroorganisme dalam kelompok taksonomik. Isolat bakteri ini diamati morfologi koloni dengan melihat bentuk koloni, warna, tepian dan gram bakteri.

Tabel 1. Identifikasi Bakteri dengan Uji Biokimia

Uji Biokimia	Kode Sampel							
	RPH K P1	RPH PS P1	RPH O P1	RPH K P2	RPH PS P2	RPH F P2	RPH K P3	RPH PS P3
Gram	-	-	-	-	-	-	+	-
Indole	-	+	-	-	-	+	+	+
Motil	-	+	+	-	-	+	-	+
TSIA	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/+)	(+/+)	(+/+)	(+/-)	(+/-)
(H ₂ S/Gas)								
Oksidasi	+	-	-	-	-	-	-	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabel 2. Koloni Bakteri Murni

No.	Simbol	Bentuk	Warna	Tepian	Gram
1.	 RPH K P1	Bergelombang	Kuning	Bergelombang	Negatif
2.	 RPH PS P1	Bulat tak beraturan	Putih susu	Bergelombang	Negatif
3.	 RPH OP1	Bulat tak beraturan	Putih kekuningan	Bergelombang	Negatif
4.	 RPH KP2	Bulat tak beraturan	Kuning	Bergelombang	Negatif
5.	 RPH PS P2	Bulat tak beraturan	Putih susu	Bergelombang	Negatif
6.	 RPH F P2	Bulat tak beraturan	Putih susu	Bergelombang	Negatif
7.	 RPH K P3	Bulat tak beraturan	Kuning	Bergelombang	Positif
8.	 RPH PS P3	Bulat tak beraturan	Putih susu	Bergelombang	Negatif

3.4. Jumlah Bakteri Biosurfaktan Asal Limbah RPH

Setelah dilakukan isolasi 1x24 jam, maka pertumbuhan koloni bakteri mulai terlihat dengan baik. Koloni bakteri dihitung dengan metode hitungan cawan. Prinsip metode perhitungan cawan adalah jika sel mikroba

yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Jumlah bakteri dapat dilihat pada Tabel 3.

3.5. Kualitas Air

penelitian yang telah dilakukan, parameter kualitas lingkungan yang di ukur di kolam pembuangan limbah RPH adalah derajat keasaman (pH), suhu serta pengukuran minyak dan lemak yang dilakukan di Laboratorium. Tujuan dari pengukuran

kualitas air RPH adalah untuk mengetahui keadaan tingkat keasaman air dan suhu air limbah RPH Pengukuran kualitas lingkungan RPH dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Hasil Pengukuran kualitas air selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Jumlah Bakteri Biosurfaktan Asal Limbah RPH

No.	Jenis Bakteri	Jumlah Koloni Bakteri (CFU/ml)
1.	<i>Flavobacterium</i>	51.260.000 (51,26 x 10 ⁶)
2.	<i>Agrobacterium</i>	108.413.333 (108,413 x 10 ⁶)
3.	<i>Serratia</i>	92.753.333 (93 x 10 ⁶)
4.	<i>Salmonella</i>	26.720.000 (27 x 10 ⁶)
5.	<i>Salmonella</i>	10.410.000 (10,41 x 10 ⁶)
6.	<i>Proteus</i>	20.890.000 (20,89 x 10 ⁶)
7.	<i>Clostridium</i>	63.750.000 (64 x 10 ⁶)
8.	<i>Aeromonas</i>	47.583.333 (48 x 10 ⁶)

Tabel 4. Parameter Kualitas Air Limbah RPH pada Ulangan 1-3

No	Parameter	Satuan	Nilai		
			Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
1	pH	-	6,5	6,6	6,8
2	Suhu	°C	30	29	25,5
3	Minyak dan Lemak	mg/L	0.3692	0.2964	0.1789

4. Kesimpulan dan Saran

Hasil penelitian diperoleh 8 isolat bakteri dengan 3 kali pengulangan pada limbah cair RPH yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan. Setelah itu dilakukan identifikasi dengan menggunakan uji biokimia.

Adapun hasil uji biokimia yaitu *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Clostridium* dan *Aeromonas*. Kemudian jenis bakteri yang telah diketahui dilakukan emulsifikasi dengan menggunakan media TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan minyak tanah. Hasil indeks emulsifikasi yaitu *Flavobacterium* 53%, *Agrobacterium* 53%, *Serratia* 60%, *Salmonella* 52,5%, *Salmonella* 52,4%, *Proteus* 65,7%, *Clostridium* 62% dan *Aeromonas* 59,5%. Karena *Proteus* menunjukkan Indeks Emulsifikasi tertinggi, dilakukan identifikasi dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan hasil identifikasi bakteri tersebut adalah *Proteus vulgaris*.

Berdasarkan pencemaran minyak yang sering terjadi di perairan, maka sebaiknya isolat bakteri yang ditemukan yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan perlu dilakukan

penelitian selanjutnya untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengurangi minyak dengan skala laboratorium.

Daftar Pustaka

- Anggraeni, Y. (2005). Sifat Fisik Daging Dada Ayam Broiler pada Berbagai Lama Postmortem di Suhu Ruang Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Cappucino, J.G. and N. Sherman. (1987). *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. California USA.
- Dwidjoseputro, D. (1985). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta. 576 hlm
- Femi-Ola, T., O. Oluwole, T. Olowomofe and H. Yakubu. (2015). Isolation and Screening of Biosurfactant Producing Bacteria from Soil Contaminated with Domestic Waste Water. *Br J Environ Sci*, 3: 58-63.
- Kundu, P., A. Dabsarkar and S. Mukherjee. (2013). Treatment of Slaughter House Wastewater in a Sequencing Batch

Reactor, Performance Evaluation and Biodegradation Kinetics. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International Article ID134872, II P.

Saptarini, K. (2009). Isolasi *Salmonella* spp. pada Sampel Daging Sapi di Wilayah Bogor serta Uji Ketahanannya terhadap Proses Pendinginan dan Pembekuan. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.