



Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Lipolitik Pada *Glycerine Pitch* Dari Limbah Industri Oleokimia

Gimelliya Saragih, Politeknik Teknologi Kimia Industri, Indonesia

Poltak Evencus Hutajulu, Politeknik Teknologi Kimia Industri, Indonesia

Benny Rio Fernandez, Politeknik Teknologi Kimia Industri, Indonesia

Sry Wahyuni, Politeknik Teknologi Kimia Industri, Indonesia

Dinda Rizka Fadhillah, Politeknik Teknologi Kimia Industri, Indonesia

Abdillah, Politeknik Teknologi Kimia Industri, Indonesia

Rhaidatul Fatiah, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Indonesia

ABSTRACT

The purpose of this study was to isolate and identify lipolytic bacteria in glycerine pitch from oleochemical industry waste. Glycerine pitch samples were taken, put and mixed into 98% NaCl solution, then glycerine pitch in the stomacher and then swabbed sterilely into Brain Heart Infusion (BHI) agar media, then put into a shaker incubator at a speed of 200 rpm and incubated for 24 hours, then planted on agar medium using a spread plate, then the medium was incubated again for 24 hours at a temperature of 37°C. The colonies that grew on the media were counted for the number of bacterial colonies, identified by gram staining and biochemical tests. The results showed that there was an average growth of bacterial colonies of 24×10^4 CFU / mL, the results of gram staining showed gram positive and the presence of lipolytic bacterial activity in biochemical tests.

ARTICLE HISTORY

Submitted 19/11/2024
Revised 30/11/2024
Accepted 03/12/2024

KEYWORDS

bakteria lipolitik; glycerine pitch; gram staining; gram positive; uji biokimia

CORRESPONDENCE AUTHOR

✉ gimelliya@ptki.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.30743/cheds.v7i1.10184>

1. PENDAHULUAN

Pertumbuhan produksi minyak sawit mentah di Indonesia saat ini mengalami kenaikan yang sangat pesat. Pada tahun 2019 tercatat produksi minyak sawit mentah Indonesia yang dihasilkan adalah sebanyak 47 juta ton. Konsumsi domestik minyak sawit mentah hanya mengambil 32,3% saja dari total produksi kumulatif (baik minyak sawit mentah maupun minyak inti sawit) dengan pemanfaatan terbanyak setelah industri pangan adalah untuk produksi biodiesel (Aghietyas, et al., 2021).

Gliserol kasar, produk samping pada produksi biodiesel dan fatty acid dihasilkan dengan persentase sekitar 10% (w/w) dan didalamnya masih terkandung pengotor sekitar 20%. Dengan metoda destilasi, gliserol kasar bisa dimurnikan untuk menghasilkan gliserin yang memiliki kemurnian lebih dari 95% (Luque, dkk., 2012). Proses pemurnian gliserol ini akan menghasilkan limbah yang disebut dengan *glycerin pitch* (GP) yang ditemukan pada bagian bawah produk pada unit destilasi. Hingga tahun 2019, diketahui kapasitas produksi gliserin di Indonesia sebesar 0,888 juta ton, dengan produksi saat ini sekitar 2150.000 ton/tahun. Mengantisipasi kebijakan B-30 produksi gliserin dapat ditingkatkan sebesar 500.000 ton/tahun (Aghietyas, et al., 2021). Hal ini tentu akan menghasilkan limbah produksi yang jauh lebih tinggi dari tahun-tahun sebelumnya.

Peraturan pemerintah di Indonesia mengkategorikan limbah GP ini sebagai limbah berbahaya yang memerlukan penanganan khusus untuk menghilangkannya. Salah satu upaya yang dilakukan sebelum limbah GP dibuang ke lingkungan yaitu dengan metode pengolahan menggunakan mikroba. Secara biologis mikroba dapat mendegradasi senyawa organik (Amelia, J. R., et al., 2023) dan (Trismawati, T. 2023).

Bakteri lipolitik merupakan salah satu mikroba yang dapat mengurangi senyawa fosfolipid pada limbah GP menggunakan media spesifik (Khairani, et al., 2023), dimana mikroorganisme yang mengandung enzim lipase memecah lemak dan minyak pada ikatan ester dan triasilgliserol menjadi lemak dan gliserol yang larut dalam air (Chairunnisa, et al., 2019), enzim lipase juga dapat membebaskan gliserol dan asam lemak serta menghidrolisis trigliserol (Melati, et al.,

2020) dan (Siregar, M. S., et al 2024). *Biokimia Pangan*. umsu press. Produk metabolisme primer dari aktivitas lipolitik mikroorganisme berfungsi dengan baik pada emulsi minyak dalam air (Nur, M. P. 2023).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi bakteri lipolitik pada GP dari limbah industri oleokimia dan mengidentifikasi bakteri lipolitik pada GP dari limbah industri oleokimia secara morfologi dan biokimia.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Jenis Penelitian

penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen langsung yaitu mengambil sampel GP dari limbah industri oleokimia kemudian diisolasi dan diidentifikasi morfologi dan aktivitas biokimia.

2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan mei - juni 2024 di Laboratorium Teknologi Bioproses Politeknik Teknologi Kimia Industri Medan.

2.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah Peralatan gelas laboratorium, vortex mixer, *inkubator/shaker*, inkubator, colony counter, Mikroskop Olympus CX23, Autoclave Sterilizer Portable SS XFS-280A dan Hot plate Stirrer Thermo Scientific Cimarec SP88857105. Bahan yang digunakan adalah *glycerin pitch*, larutan fisiologis, media Brain Heart Infusion (BHI) agar, media nutrien agar (NA), bahan untuk pewarnaan gram dan uji biokimia.

2.4 Prosedur

• Isolasi Bakteri lipolitik dan Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Sampel GP sebanyak 5 gram dimasukan kedalam botol M150 dimana didalamnya sudah terdapat larutan NaCl 0,98% sebanyak 45 ml, kemudian siapkan media Brain Heart Infusion (BHI), selanjutnya diambil 1 mL larutan (sampel+NaCl) yang sudah dicampurkan kemudian dimasukkan kedalam media BHI agar, lalu dimasukkan ke dalam incubator shaker dengan kecepatan 200 rpm dan diinkubasi selama 24 jam sampai bakteri tumbuh. 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^{-4} (Sembiring, R.E, 2019) dan (Suherman, D. 021) . Kemudian diambil 1 mL suspensi pada seri pengenceran terakhir ditanam kedalam medium agar secara *spread plate* (sebar). Medium diinkubasi selama pada 24 jam pada suhu 37°C untuk menumbuhkan koloni mikroorganisme, selanjutnya koloni dihitung dengan alat colony counter. Hasil perhitungan koloni dimasukkan ke dalam rumus perhitungan dibawah ini:

$$CFU/mL = \text{Jumlahkoloni Bakteri} \times \frac{1}{Fp} \times \frac{1}{VS}$$

Dimana:

1. Fp = Faktor Pengenceran
2. VS = Volume Sampel

• Karakterisasi dan Morfologi

Karakteristik dan morfologi bakteri yang tumbuh secara makroskopis seperti bentuk koloni, warna koloni, elevasi, tepi koloni dan permukaan koloni akan diamati pada isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media NA (*Nutrient Agar*). Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan melakukan pewarnaan gram. Uji biokimia bakteri dilakukan untuk mengidentifikasi isolat bakteri yang di dapat, kemudian dilakukan pengujian seperti: uji SIM (*Sulfid Indol Motility*), uji katalase, uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), dan uji *Simmon sitrat* (Khairani, et al., 2023)

• Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri yang diisolasi. Gelas objek disterilkan dengan alkohol 70 % kemudian di fiksasi. Letakkan satu tetes aquadest pada gelas objek, kemudian di suspensikan satu ose biakan koloni bakteri, ratakan dan fiksasi diatas nyala api. Tambahkan satu tetes kristal violet (amonium oksalat) selama $\frac{1}{2}$ menit. Kelebihan zat warna dibuang, ditetesi langsung dengan larutan lugol diamkan selama $\frac{1}{2}$ menit, lalu ditetesi / dicuci dengan larutan acetone iodine selama $\frac{1}{2}$ menit, kemudian bilas dengan aquades sampai tidak ada zat warna yang mengalir. Larutan karbol fuksin ditetaskan selama $\frac{1}{2}$ menit, kelebihan zat warna dicuci dengan aquadest steril, lalu dikeringkan. Setelah kering lalu tetesi minyak imersi. Setelah selesai, dapat dilihat menggunakan mikroskop perbesaran

100x, amati warna dan bentuk dari bakteri. Warna ungu menunjukkan bakteri gram positif, dan warna pink menunjukkan bakteri gram negatif.

- **Uji SIM (*Sulfid Indol Motility*)**

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan dengan cara tusuk pada media SIM secara tegak, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Hasil positif apabila pertumbuhan bakteri menyebar disekitar bekas tusukan jarum ose menandakan motil, sedangkan jika hanya berupa garis di sepanjang tusukan saja akan menandakan hasil negatif (non motil).

- **Uji Katalase**

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose lalu diletakkan pada permukaan object glass steril, kemudian ditetesi reagen Hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% 1-2 tetes pada preparat. Hasil positif akan ditandai dengan terdapatnya gelembung-gelembung oksigen dan hasil negatif apabila tidak terbentuk gelembung udara.

- **Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)**

Biakan bakteri diambil sebanyak 1 kemudian diinokulasi dengan cara tusuk pada media TSIA dengan cara menusuk ose sampai sepertiga dasar tabung. Kemudian diangkat dan digores secara zig-zag pada bagian miring permukaannya setelah itu diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37° C. Perubahan yang terjadi setelah diinkubasi apabila warna medium kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi basa, warna menjadi hitam menandakan terbentuknya H_2S dan bila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas.

- **Uji SC (*Simmon Citrat*)**

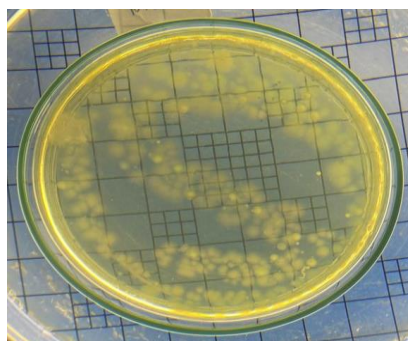
Diambil satu ose isolat bakteri kemudian ditanam pada media *Simmon citrat* dengan cara menggoreskan jarum ose secara zig-zag. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Hasil positif ditandai apabila timbul warna biru terang medium dan warna hijau pada medium menunjukkan hasil negatif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada proses penelitian isolasi dan bakteri lipolitik pada *glycerine pitch* dari limbah industri oleokimia dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dan identifikasi bakteri meliputi pewarnaan gram dan uji biokimia meliputi uji SIM (*Sulfid Indol Motility*), uji katalase, uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), dan uji *Simmon citrat*. Dari data hasil penelitian

3.1 Isolasi Bakteri lipolitik dan Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Biakan isolasi bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C pada media BHI agar diamati pertumbuhan dan jumlah koloni bakteri menggunakan *colony counter*. Dari hasil pengamatan pertumbuhan dan jumlah koloni mikroba dapat dilihat pada gambar dan tabel 1 dibawah ini:



Gambar 1. Koloni bakteri sampel GP setelah inkubasi selama 24 jam

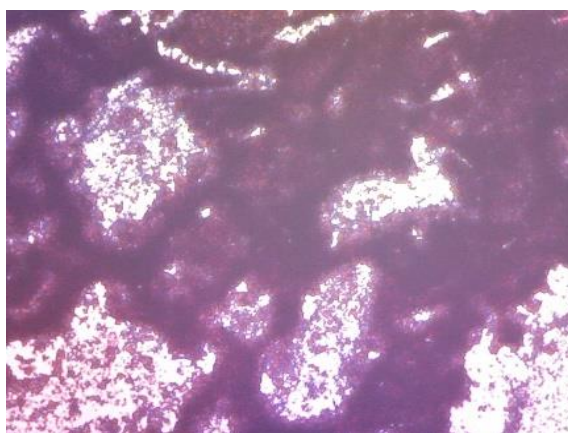
Tabel 1. Jumlah Koloni Bakteri Pada Pengenceran 10^{-4}

Percobaan	Jumlah Koloni Bakteri (CFU/mL)
1	24
2	23
3	25
Total	72
Rata - rata	24
CFU/mL	24×10^4

Dari hasil perhitungan jumlah koloni bakteri yang didapat dari isolasi Bakteri nilai koloni yang optimum sebesar 25×10^4 CFU/mL, banyaknya jumlah koloni bakteri berpotensi sebagai agen pendegradasi GP. Untuk mengetahui potensi masing-masing isolate bakteri dalam mendegradasi lipid dan lemak perlu dilakukan pengukuran indeks aktivitas bakteri lipolitik. Yang nantinya koloni bakteri yang membentuk zona bening terbesar memiliki tingkat aktivitas lipolitik yang tinggi (Khairani, et al, 2023).

3.2 Pewarnaan Gram

Tujuan dari pewarnaan gram adalah untuk mengidentifikasi bakteri yang telah tunggal termasuk kedalam bakteri gram positif maupun gram negatif. Isolat bakteri yang diisolasi dari GP kemudian dilakukan pewarnaan gram. Hasil dari uji pewarnaan gram dapat dilihat pada gambar 2 dibawah ini.



Gambar 2. Pengamatan Pewarnaan gram

Hasil pada gambar 2 pengamatan bakteri dengan menggunakan pewarnaan gram secara mikroskopik menunjukkan bakteri gram positif berbentuk batang (*bacillus*). Bakteri gram positif adalah bakteri yang mempertahankan zat warna ungu/violet saat dilakukan proses pewarnaan gram. Pengikatan zat warna ungu oleh bakteri dikarenakan dinding sel bakteri gram positif tersusun oleh peptidoglikan yang lebih tebal di bandingkan dengan bakteri gram negatif. Salah satu manfaat dari bakteri *bacillus sp* pada proses pembuatan polihidroksi alkanolat (PHA) Kresnawaty, I., et al., 2014) dan (Kurniawan, A., et al 2021).

3.3 Uji Aktivitas Biokimia

Untuk mengetahui sifat fisiologis isolat bakteri dapat dilakukan dengan pengujian aktivitas biokimia. Isolat bakteri memiliki aktivitas biokimia berbeda-beda dalam mendegradasi karbohidrat, lemak, dan protein menjadi molekul yang sederhana seperti asam amino dan monosakarida. Metabolisme dan penggunaan molekul organik dapat digunakan untuk indentifikasi dan karakterisasi bakteri. Untuk hasil uji aktivitas biokimia dari isolat bakteri dapat dilihat pada tabel 3.2 dan gambar 3.3 dibawah ini.

Tabel 2. Uji Biokimia bakteri isolat hasil penapisan

Isolat Bakteri	Uji Aktivitas Biokimia			
	SIM (Sulfid Indol Motility)	Katalase	TSIA (Triple Sugar Iron Agar)	SC (Simmon Sitrat)
1	+	+	Merah/ H ₂ S (-)	+
2	+	+	Merah/ H ₂ S (-)	+
3	+	+	Merah/ H ₂ S (-)	+



Gambar 3. Uji SIM, Katalase, TSIA dan Simon Citrat

Hasil dari tabel 2 menunjukkan hasil uji aktivitas biokimia yang dilakukan pada media SIM (Sulfid Indol Motility) bertujuan untuk sifat motilitas atau pergerakan bakteri disekitar bekas tusukan jarum ose. Jika bakteri menyebar disekitar bekas tusukan ose berarti bakteri bersifat motil (+) sedangkan jika hanya berupa garis di sepanjang tusukan saja akan menandakan non motil (-). Untuk uji keseluruhan sampel menunjukkan bakteri bersifat motil (+). Menurut (Rahmadian et al., 2018) dan (Khairani et al., 2023) mengatakan bahwa pertumbuhan bakteri tidak menyebar serta tumbuh luruh sesuai tusukan jarum ose menyatakan bahwa hasil yang negatif (non motil) sedangkan apabila pertumbuhan bakteri menyebar disekitar tusukan ose menandakan bahwa hasil yang positif (motil).

Uji Katalase bertujuan mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim untuk mendegradasi hidrogen peroksida (H_2O_2) ditandai dengan terdapatnya gelembung-gelembung oksigen dan hasil negatif apabila tidak terbentuk gelembung udara. Untuk keseluruhan sampel uji menunjukkan bakteri mampu menghasilkan enzim katalase terbukti terdapatnya gelembung-gelembung oksigen pada sampel. Menurut (Nurzhulian et al., 2021) komponen sel bakteri rusak dengan pemberian hidrogen peroksida yang bersifat toksik.

Uji (Triple Sugar Iron Agar) bertujuan membedakan kemampuan jenis bakteri dalam membebaskan sulfida menghasilkan gas H_2S juga memecahkan dextrosa, laktosa dan sukrosa. Dari hasil penelitian didapat pada tabel 3.2, bahwa pada uji TSIA pada slant berubah menjadi merah karena bakteri bersifat basa, tidak terbentuknya H_2S dan tidak memproduksi gas.

Uji SC (*Simmon Citrat*) bertujuan kemampuan bakteri dalam memanfaatkan sitrat untuk sumber karbon dan energi. Hasil uji Uji SC (*Simmon Citrat*) menunjukkan hasil positif ditandai timbulnya warna biru terang pada medium. Sitrat pada medium digunakan oleh bakteri sebagai sumber karbon dan energi menyebabkan perubahan warna pada media dari hijau menjadi biru (Kosasi et al., 2019).

4. SIMPULAN DAN SARAN

4.1 Simpulan

Kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan isolat bakteri lipolitik. Dari hasil perhitungan jumlah koloni bakteri yang didapat dari isolasi bakteri nilai koloni bakteri rata-rata 24×10^4 CFU/mL, banyaknya jumlah koloni bakteri berpotensi sebagai agen pendegradasi GP. Berdasarkan pewarnaan gram secara mikroskopis diketahui bahwa bakteri yang didapat adalah bakteri gram positif dan adanya aktivitas bakteri lipolitik pada uji biokimia.

4.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk mengaplikasikan bakteri *bacillus* yang didapat diaplikasikan sebagai agen pendegradasi *Glycerine Pitch* (GP).

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis/peneliti menyampaikan ucapan terima kasih kepada BPSDMI Kementerian Perindustrian atas pendanaan penelitian ini, Politeknik Teknologi Kimia Industri Medan yang memberikan sarana dan prasana dan tak lupa kepada pihak PT Unilever Oleochemical Indonesia atas suport hingga terlaksananya penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Aghietyas Choirun Az Zahra , Ilya Arina Rusyda , Andini Hizbiyati , Felix Giovani , Nabila Zahara , Bramantha Jiwandaru , David Gunawan , Giovani Andre Halim , Meiti Pratiwi , Astri Nur Istyami , Atmy Verani Rouly Sihombing , Ardiyan Harimawan , Dwiwahju Sasongko , Jenny Rizkiana. 2021. Novel Approach of Biodiesel Production Waste Utilization to Support Circular Economy in Biodiesel Industry. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 1143 (2021) 012030
- Amelia, J. R., Iryani, D. A., Indraningtyas, L., Sugiharto, R., Ginting, S., & Hasanudin, U. (2023). Pengelolaan Spent Bleaching Earth.
- Chairunnisa, R. dan A. K. (2019). Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA). 1(November 2019), 44–52.
- Khairani, K., & Manalu, K. (2023). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Lipolitik Dari Limbah Cair Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.).
- Kosasi, C., Lolo, W. A., & Sudewi, S. (2019). Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Alga *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh serta Identifikasi secara Biokimia. *Pharmakon*, 8(2), 351. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29301>
- Kresnawaty, I., Prakoso, H. T., Eris, D. D., & Mulyatni, A. S. (2014). Penapisan bakteri penghasil bioplastik polihidroksi alkanoat dari tanah tempat pembuangan sampah dan limbah cair pabrik kelapa sawit Screening of bioplastics polyhydroxy alkanoic producing bacteria from landfill and palm oil mill effluents. *Menara Perkebunan*, 82(1).
- Kurniawan, A., Asriani, E., & Sari, S. P. (2021). *Bioflok & Akuaponik Untuk Bangka Belitung: Buku Ajar*. Media Nusa Creative (MNC Publishing).
- Luque R and Melero J A 2012 Introduction to advanced biodiesel production (Woodhead Publishing Limited)
- Melati, I. (2020). Pusat Penelitian Limnologi LIPI. Rahayu 2005, 272–286
- Nur, M. P. (2023). Studi Bioremediasi Limbah Pome (Palm Oil Mill Effluent) Menggunakan Mikroba Lipolitik Isolat Lokal
- Nurzulian, V. M., Sulistyaningtyas, A. R., & Ethica, S. N. (2021). Karakterisasi Bakteri Lipolitik *Bacillus* sp. pada Wadi Organ Pencernaan Ikan Sidat (*Anguilla* sp.). *Pro Food (Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan)*, 7(2), 59– 67
- Rahmadian, C. A., Ismail, I., Abrar, M., Erina, E., Rastina, R., & Fahrimal, Y. (2018). Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Pseudomonas* sp pada Ikan Asin di Tempat Pelelangan Ikan Labuhanhaji Aceh Selatan. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 2(4), 493-502.
- Sembiring, R. E. (2019). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Dari Kolam Contact Pond Ipal Industri Minyak Sawit.
- Siregar, M. S., & Desi Ardilla, S. P. (2024). *Biokimia Pangan*. umsu press.
- Suherman, D. (2021). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Polyhydroxyalkanoate (PHA) Asal Limbah Pabrik Kelapa Sawit Kabupaten Morowali Utara.
- Trismawati, T. (2023). Buku Referensi analisa mengenai dampak lingkungan (sebuah praktik baik).