

Isolasi Dan Seleksi Bakteri Sebagai Agen Bioremediasi Limbah Cair Pabrik Kayu Putih

Tri Rahyuningsih¹, Umi Isnatin², Parwi³

¹Fakultas Pertanian, Universitas Merdeka Ponorogo, Jl. Pacar 30, Ponorogo, 63418
E-mail: trihayuningsih10@yahoo.co.id

²Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Darussalam Gontor, Jl. Sanan No.Km. 6, Ponorogo, 63471
E-mail: uniaGROUND@yahoO.com

³Fakultas Pertanian, Universitas Merdeka Ponorogo, Jl. Pacar 30, Ponorogo, 63418
E-mail: p.parwi@yahoo.com

Abstract— This study aims to isolate and select bacteria as a bioremediation agent for wastewater of cajeput factory. The wastewater of cajeput factory has not been utilized for liquid organic fertilizer because it still contains cajeput oil (phenol compound) which can disrupt plant growth. Therefore it is necessary to look for bacteria that have the ability to integrate of management wastewater. Wastewater samples is taken by random sampling in tri locations, namely the initial shelter, the second shelter and the waste disposal area. Bacteria are developed in liquid media, then isolated and identified on solid media. Identification of bacteria based on colony morphology, cell morphology and biochemical testing. Phenol degradation test was carried out using a completely randomized design with tri replications. Treatment of types of bacterial isolates namely B0 = Control, B1 = *Bacillus*, B2 = *Pseudomonas*, B3 = *Flavobacterium*. The results showed that there were tri bacterial isolates found in wastewater of cajeput factory namely *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* and *Flavobacterium sp*. The highest amount of bacterial colonies was found in waste shelters of 2.41×10^6 colonies. The most effective bacteria in degrading phenol is *Pseudomonas sp*.

Keywords—: Bioremediation; wastewater; Cajeput.

I. PENDAHULUAN

Penyulingan daun kayu putih di pabrik kayu putih menghasilkan minyak kayu putih mentah sebagai produk utama (Lukito, 2012). Dalam pengolahan minyak kayu putih dihasilkan limbah padat (sisa daun, ranting) dan limbah cair dari proses distilasi. Pada pabrik minyak kayu putih, proses produksi minyak kayu putih dilakukan dengan teknik penyulingan secara uap langsung dengan mengalirkan uap air pada bak penyulingan atau tangki distilasi. Proses ini menghasilkan ekstrak campuran minyak dengan air. Proses separasi dilakukan untuk memisahkan minyak dengan air. Separasi menghasilkan minyak kayu putih mentah dan limbah cair yang masih mengandung minyak atsiri dan senyawa organik lainnya (senyawa fenol). Minyak kayu putih merupakan senyawa fenol dalam bentuk Pinene (suhu didih 156 – 160 oC), Sineol (suhu didih 174 – 177 oC), Benzildehyd (179 oC), Terfenol (218 oC) dan Sesquiterpen (230 – 277 oC) (Sukardjo, 2001).

II. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada lahan pembuangan limbah cair pabrik kayu putih di Desa Sidoharjo Kecamatan Pulung, Kabupaten Ponorogo. Lokasi penelitian berada pada 111o30' – 111o36' bujur timur dan 7o50' – 7o54' lintang selatan. Ketinggian tempat 250 m diatas permukaan laut. Sampel limbah cair diambil dilahan pembuangan limbah cair pabrik kayu putih. Sampel dianalisa di laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Merdeka Ponorogo.

Bahan yang digunakan adalah alkohol 70% aquades, laktosa, glukosa, H₂O₂ 3%, larutan yodium, indikator BTB

(Brom Thymol Blue), kristal violet, larutan Malachit Green, medium Indol, medium NA (nutrien Agar), medium Simmon's Citrate Agar, medium TSIA, minyak emersi, reagen Kovac's, reagen Barrit A dan B, reagen Methyl Red, safranin.

A. Pengambilan sampel

Sampel penelitian akan diambil berupa limbah cair pabrik kayu putih. Pengambilan sampel dilakukan pada 3 tempat yaitu tempat pembuangan awal limbah, tempat penampungan dan lahan pembuangan limbah. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode random sampling. Sampel limbah cair diambil sebanyak 250 ml kemudian dimasukkan dalam botol yang steril dan diletakan dalam Cool box. Sampel disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 5oC sebelum dilakukan analisa di laboratorium.

B. Pengayaan

Sampel limbah cair dipipet 5 ml, kemudian dimasukkan kedalam wadah yang berisi 1000 ml media Nutrient Agar. Media di rotari dengan kecepatan 150 rpm selama 7 hari atau setelah mengeluarkan busa.

C. Isolasi

Kultur dalam media NA paa bagian atas diambil 1 ml, kemudian dimasukkan dalam media aquades untuk mendapatkan pengenceran 10-1 sampai 10-6. Adapun cara pengenceran sebagai berikut ambil 1 ml dari media kultur kemudian dimasukkan dalam wadah yang telah berisi aquades 9 ml sehingga didapatkan pengenceran 10-1. Untuk membuat pengenceran 10-2 maka ambil 1 ml dari pengenceran 10-1 dan dimasukkan dalam wadah yang berisi 9

ml aquades. Hal yang sama dilakukan sampai mendapat pengenceran 10-3 ,10-4 ,10-5 ,10-6. Kemudian masing-masing hasil pengenceran ditumbuhkan pada 2 medium NA padat yaitu media NA murni dan media NA yang ditambah limbah cair. Media diinkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu 28 – 30 oC. Peubah pengamatan meliputi bentuk, warna, tepian permukaan dan elevasi koloni.

D. Pemurnian

Pemurnian dilakukan dengan cara mengamati koloni bakteri yang memiliki perbedaan dalam morfologi. Bakteri yang memiliki ciri khusus dimurnikan dengan cara mengambil isolat dan ditumbuhkan dalam media NA padat pada cawan petri lalu diinkubasi selama 5 hari pada suhu kamar. Pada akhir inkubasi pengamatan dilakukan untuk mengamati keseragaman bentuk morfologi bakteri dan apabila kultur belum murni ditandai adanya morfologi tidak sama maka dilakukan pemurnian sampai kultur benar benar murni. Setelah didapatkan isolat yang murni maka dilakukan identifikasi berdasarkan makroskopik, mikroskopik dan uji biokimia.

E. Identifikasi

Berdasarkan karakter dari masing-masing isolat bakteri yang mampu mendegradasi ditumbuhkan dalam media NA diidentifikasi dengan menggunakan Bergey’s manual of Determinative Bacteriology 8th edition (Bunchan & Gibbons, 1974) dan Bergey’s manual of Determinative Bacteriology 9th edition (Holt et al. 1994).

F. Uji degradasi fenol

Uji degradasi fenol dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Perlakuan jenis isolate bakteri yaitu B0 = control, B1 = Bacillus, B2 = Pseudomonas, B3 = Flavobacterium. Parameter yang diamati kadar fenol. Data dianalisa dengan menggunakan analisis ragam dan dilanjutkan analisis beda nyata bila terdapat perbedaan pada analisis ragam.

Kemampuan bakteri dalam mendegradasi fenol dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media ramsay. Media ramsay memiliki konsentrasi fenol sebesar 500 ppm tentukan kadar fenol setelah 48 jam dengan menggunakan metode folin ciocalteau. Kadar fenol ditetapkan dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 750. Laju degradasi fenol diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$V = (S_0 - S_1) / t$$

V = laju degradasi, S0 = kadar fenol awal, S1= kadar fenol akhir, t = waktu

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Jumlah koloni bakteri

Berdasarkan hasil pengamatan visual maka limbah cair pabrik kayu putih dapat dibedakan menjadi 3 berdasarkan karakteristik warna, kadar bau minyak atsiri dan bau busuk (Tabel 1). Adapun berdasarkan pengamatan jumlah koloni maka terjadi perbedaan jumlah koloni bakteri yang terdapat pada ketiga pengambilan sampel. Jumlah koloni bakteri tertinggi terdapat pada bak penampungan II dan terendah pada bak penampungan I (Tabel 1). Hal ini menandakan

bahwa pada bak penampungan II terdapat proses pengadaan bakteri yang lebih cepat dibanding pada 2 bak penampungan yang lainnya.

Tabel 1.
Karakteristik air limbah kayu putih

Tempat pengambilan sampel	Warna	Bau minyak atsiri	Bau busuk
A (Bak penampungan I)	Jernih	+++	-
B (Bak Penampungan II)	Coklat tua	++	+
C (Lahan pembuangan)	Coklat Jernih	+	-

Tabel 2.
Jumlah koloni bakteri

Tempat pengambilan sampel	Jumlah koloni bakteri
A (Bak penampungan I)	1,23 x 10 ³
B (Bak Penampungan II)	2,41 x 10 ⁶
C (Lahan pembuangan)	1,96 x 10 ⁴

B. Identifikasi bakteri

Hasil pengkayaan bakteri pada media NA cair terdapat 3 isolat bakteri yang memiliki ciri yang berbeda (Tabel 3). Semua isolat bakteri memiliki bentuk koloni bulat dan permukaan koloni halus, mengkilat serta memiliki bentuk sel berupa batang. Perbedaan ketiga isolat terletak pada warna koloni dan hasil uji biokimia.

Bakteri isolat 1 memiliki ciri morfologi sebagai berikut : bentuk koloni bulat, warna koloni putih susu, Gram positif, metil red negatif, indol negatif, H2S negatif, mortalitas negatif, simons sitrat negatif, oksidase negatif, katalase positif, glukosa negatif, laktosa negatif, manitol negative, berdasarkan ciri tersebut maka isolate 1 merupakan Bacillus sp . Penelitian ini memiliki hasil yang serupa dengan penelitian Darmayasa (2008) yang menyatakan bahwa bakteri Bacillus mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu: warna koloni putih kekuningan, termasuk bersifat Gram positif, dan dalam kelompok sel berbentuk batang. Bakteri mempunyai hasil uji katalase positif dan oksidase negatif, motil, metil red negatif, reaksi indol negative, H2S negative dan mortalitas negatif.

Bakteri isolat 2 memiliki ciri morfologi sebagai berikut : bentuk koloni bulat, warna koloni putih kekuningan, Gram negatif, metil red positif, indol negatif, H2S negatif, mortalitas positif, simons sitrat positif, oksidase negatif, katalase positif, glukosa positif, laktosa negatif, manitol negative, berdasarkan ciri tersebut maka isolat 2 merupakan Pseudomonas sp. Bakteri pseudomonas mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu: warna koloni agak kekuningan, termasuk bersifat Gram negatif, dan dalam kelompok sel berbentuk batang dan lurus dengan ukuran 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm. Bakteri bersifat fakultatif, uji katalase positif dan oksidase negatif, motil, metil red positif, suhu optimum pertumbuhan pada 30-37 C dan tumbuh baik pada NaCl 3-7%. (Feliatra et al, 2004).

Bakteri isolat 3 memiliki ciri morfologi sebagai berikut : bentuk koloni bulat, warna koloni krem, Gram negatif, metil red negatif, indol negatif, H2S negatif, mortalitas negatif, simons sitrat negatif, oksidase positif, katalase positif,

gukosa negatif, laktosa negatif, manitol negative, oleh sebab itu maka isolat 3 merupakan *Flavobacterium* sp. Menurut Khurnuyani et al., (2015), bakteri *Flavobacterium* sp memiliki ciri hasil uji gula-gula negatif pada fermentasi glukosa, manitol, maltose, laktosa dan sukrosa. Uji indol didapat positif, sedangkan uji H₂S dan sitrat didapatkan hasil negatif dan motilitas negative.

Tabel 3.

Hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia isolat bakteri

Pengamatan/ Uji biokimia	Isolat bakteri		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	Bulat
Permukaan koloni	Mengkilat	Mengkilat	Mengkilat
Warna koloni	Putih susu	Putih kekuningan	Krem
Gram	+	-	-
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang
Metil red	-	+	-
Indol	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Mortalitas	-	+	-
Simons sitrat	-	+	-
Oksidase	-	-	+
Katalase	+	+	+
Uji Karbohidrat			
Glukosa	-	+	-
Laktosa	-	-	-
Manitol	-	-	-
Species	<i>Bacillus</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Flavobacterium</i> sp

C. Kemampuan degradasi fenol

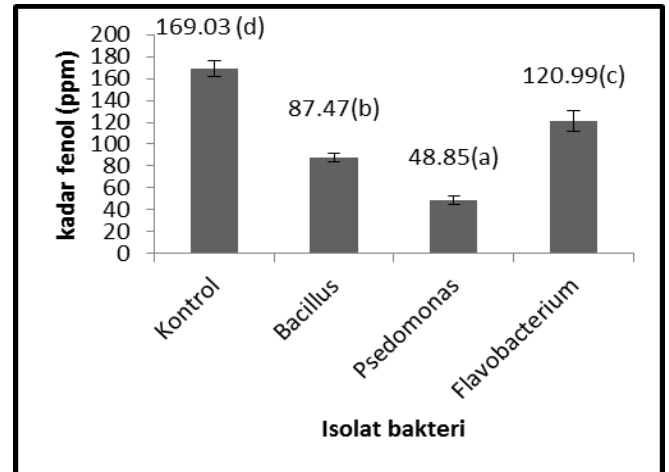
Degradasi limbah cair yang mengandung fenol dapat dilakukan secara biologis dengan memanfaatkan mikroorganisme. Senyawa fenol dapat digunakan oleh mikroba sebagai sumber makanan dan terdegradasi dalam tubuh mikroba menjadi bahan-bahan yang tidak berbahaya seperti asam asetat, gas metana, dan karbondioksida (Juwita et al, 2014). Bakteri dari limbah cair rumah sakit yang dapat mendegradasi fenol adalah *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterobacter* dan *Flavobacterium* (Khusnuryani et al, 2015).

Kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi fenol dapat dilihat dari penurunan kadar fenol pada media bakteri. Semakin besar penurunan kadar fenol maka kemampuan bakteri dalam mendegradasi fenol semakin besar. Isolat *pseudomonas* memiliki kemampuan mendegradasi fenol yang paling tinggi dibanding dengan kedua isolat bakteri yang lainnya. Isolat *pseudomonas* mampu menurunkan kadar fenol dari 500 ppm menjadi 48.85 ppm. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan terendah dalam degradasi fenol adalah *flavobacterium* yaitu terjadi degradasi dari 500 ppm menjadi 120.99 ppm. Penurunan fenol tertinggi diakibatkan oleh bakteri *pseudomonas* sp yaitu 66%, sedangkan kontrol terjadi penurunan fenol sebesar 19% (Prayitno dan Sopiah, 2016).

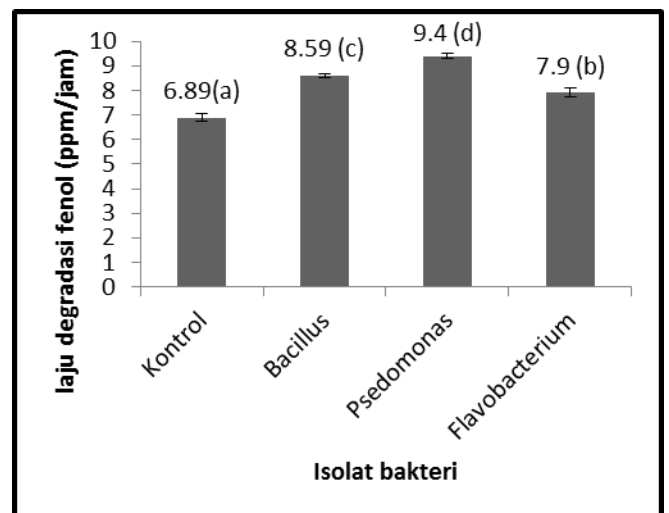
Laju degradasi kadar fenol berbanding terbalik dengan penurunan kadar fenol. Semakin besar penurunan kadar fenol maka laju degradasi fenol semakin besar. Laju degradasi fenol tertinggi diakibatkan oleh isolat

pseudomonas dan terendah diakibatkan oleh *flavobacterium*. Isolat *Pseudomonas* memiliki laju degradasi sebesar 9.4 ppm/jam, sedangkan *flavobacterium* sebesar 7.9 ppm/jam. Molin dan Nilsson (1985) menyatakan bahwa penggunaan bakteri *Pseudomonas putida* dalam kultur berkelanjutan dapat digunakan untuk mempercepat laju degradasi fenol.

Perlakuan kontrol juga dapat menurunkan kadar fenol. Fenol merupakan bahan yang mudah menguap sehingga bila terdapat tindakan yang dapat mempercepat penguapan maka akan menyebabkan degradasi fenol. Pada penelitian ini kadar fenol ditentukan dengan adanya perlakuan aerasi sehingga kegiatan ini akan menyebabkan kadar fenol berkurang.



Gambar 1. Degradasi fenol oleh masing masing isolat bakteri



Gambar 2. Laju degradasi fenol oleh masing masing isolat bakteri

IV. KESIMPULAN

Limbah cair pabrik kayu putih memiliki jumlah koloni bakteri yang berbeda tergantung posisi pengambilan sampel. Jumlah koloni bakteri terbanyak pada bak penampungan II sebesar $2,41 \times 10^6$ koloni. Hasil pengkayaan bakteri dari Limbah cair pabrik kayu putih teridentifikasi 3 isolat bakteri yaitu *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* dan *Flavobacterium sp*. Bakteri yang paling efektif dalam mendegradasi fenol adalah *Pseudomonas sp*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aissam H, Penninckx MJ, Benlemlih M, 2007. Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1203–1208
- Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons (CoE). 1974. *Bergey Manual of determinative bacteriology*. 8th Ed. S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin & R.Y. Stanier (Eds) Baltimore.
- Darmayasa I. B. G. 2008. Isolasi dan identifikasi bakteri pendegradasi lipid (lemak) pada beberapa tempat pembuangan limbah dan estuari DAM Denpasar. *Jurnal Bumi Lestari*, Vol. 8 No. 2: 122-127
- Feliatra, I. Efendi, E. Suryadi, 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan *Jurnal Natur Indonesia* 6(2): 75-80
- Holt, J.G. Krieg, N.R. Scoath, P.H.A. Staley, J.T. Williams, S.T. 1994. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9 Edition*. E Waverly Company. USA. 787 hlm.
- Juwita R, Fibriarti B.L, Roza R.M, 2014. Isolasi dan karakterisasi bakteri pendegradasi fenol dari limbah cair Rumah Sakit Umum Daerah Arifin Achmad Pekanbaru. *JOM FMIPA Volume 1 No. :229-237*
- Khamid, M. A. dan S. A. Mulasari, 2012. Identifikasi bakteri aerob pada lindi hasil sampah dapur di dusun Sukunan Yogyakarta. *KES MAS* Vol. 6 No. 1 : 1 – 74
- Khurnuyani A., E. Martini, T. Wibawa, T. Widada, 2015. Karakteristik bakteri pendegradasi fenol dan pembentuk biofilm dari sumber alami dan artifisial. *Kaunia* 9 (1) : 40 - 50
- Lukito M. 2012. Model pendugaan biomassa tanaman kayu putih (KASUS BKPH Sukun KPH Madiun). *Jurnal Agri-tek*, 12(2) : 36-48
- Molin, G and I. Nilsson. 1985. Degradation of phenol by *Pseudomonas putida* ATTC 11172 in continuous culture at different ratios of biofilm surface to culture volume. *Applied Environmental Microbiology* 50 (4): 946-950.
- Prayitno J dan Sopiah N, 2016. Degradasi Senyawa Fenol Oleh Bakteri Yang Diisolasi dari Area Pertambangan Minyak Bumi. *Jurnal Teknologi Lingkungan* Vol. 17, No 2: 126-131
- Suhandi D, Purwoko T, Pangastuti A, 2006. Biodegradasi Fenol oleh Isolat *Bacillus* spp asal Sumur Minyak Kawengan, Cepu. *Bioteknologi* 3 (1): 8-13
- Sukardjo, J.S. 2001. *Pengkajian Daya Guna Limbah Organik Daun Kayu Putih KPH Gundih Sebagai Pupuk Organik*. [Tesis]. Surakarta: Program Studi Ilmu Lingkungan Program Pasca Sarjana UNS.