

Isolation and characterization of bacteria from Waste Sugar Mill Arasoe-Kab.Bone As Raw Material Producing Bioplastics Degraded (Poly-B-hydroxybutyrate)

Nur Haedar* , Risco B. Gobel, Muh. Ruslan Umar dan Ambeng

Jurusan Biologi FMIPA Unhas

*email: nda.nawir@gmail.com

ABSTRACT

Plastic is a material widely used in everyday life but difficult to degrade in the environment that would cause environmental problems. One solution to this problem is to find a plastic material that easily degraded in the environment. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a polymer which is easily degraded and can be produced by microorganisms especially bacteria under conditions of excess carbon source. This study aims to obtain bacterial isolates from Arasoe sugar factory waste that potentially produce PHB. Isolation of bacteria from sewage plants conducted using SPC method. NA medium with 1% glucose addition were use to grow the isolated bacteria. Qualitative selection methods using reagents Sudan Black were use to selected the isolates. Result showed that PHB-producing bacteria isolated from sugar factory waste Arasoe with SPC method obtained that the highest number of bacterial colonies were found on the ground and the lowest of the dregs. From 43 isolates that had been purified and obtained qualitatively, 11 isolates were able to accumulate PHB.

Key word: bioplastic, poly- β -hydroxybutyrate, sugar mill waste

PENDAHULUAN

Plastik merupakan material yang banyak dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Plastik konvensional yang banyak beredar di pasaran kebanyakan berbahan dasar sumber daya tidak terbarukan misalnya petroleum, gas alam dan lain-lain. Plastik ini banyak terakumulasi di alam karena plastik ini tidak mudah untuk terdegradasi. Hal ini yang menyebabkan plastik dianggap sebagai penyumbang sumber pencemar terbesar di alam.

Salah satu cara yang dikembangkan untuk mengatasi masalah sampah plastik adalah penggunaan plastik *biodegradable*. Jenis plastik ini mudah diuraikan oleh mikroorganisme sehingga tidak mencemari lingkungan dan dapat dipecah secara alami oleh mikroorganisme tersebut menjadi senyawa yang ramah lingkungan (Byguys, 2008).

Penelitian tentang polyhidroksibutirat sebagai bahan dasar plastik terdegradasi berlangsung sangat pesat karena plastik ini memiliki keistimewaan mudah terdegradasi oleh bakteri tanah, termotabil, fleksibel, dihasilkan oleh mikroba sehingga merupakan suatu bahan yang terbaru. Kendala dalam komersialisasi PHB yaitu masih mahal biaya produksi karena proses ini masih menggunakan substrat glukosa (Young *et al.*, 1994).

Beberapa genera bakteri seperti *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, dan *Micrococcus* dari beberapa spesies algae mampu mengakumulasi granula PHB yang diakumulasi oleh sel bakteri yang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung konsentrasi karbon tinggi tetapi nitrogen dan fosfatnya terbatas (Margino *et al.*, 2000).

Salah satu upaya untuk menekan biaya produksi perlu dilakukan penelitian dari sudut pandang mikrobiologi, diantaranya ialah menemukan mikroba unggul baru penghasil PHB atau menemukan substrat yang memiliki nilai ekonomi rendah, misalnya limbah pabrik gula.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Sampel yang merupakan sumber isolat berupa ampas (*bagasse*), blotong (*filter mud*) dan abu ketel (*boiler ash*) yang dihasilkan setelah proses ekstraksi pada pabrik gula. Selain itu dilakukan juga pengambilan sampel tanah di daerah sekitar pembuangan limbah dari pabrik gula.

Isolasi Bakteri dari Sampel

Isolasi bakteri dari sampel dilakukan dengan melakukan pengenceran bertingkat. Kemudian setiap seri pengenceran di tumbuhkan pada medium nutrient agar dalam cawan petri. Setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah itu, setiap koloni yang menunjukkan morfologi yang berbeda dipindahkan pada media yang sama sampai diperoleh kultur murni.

Seleksi Bakteri Penghasil PHB

Preparasi kultur bakteri

Kultur murni bakteri yang telah diperoleh sebelumnya ditumbuhkan pada medium nutrient agar yang telah disuplementasi dengan sumber glukosa 1 % kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C.

Pewarnaan Koloni Bakteri Penghasil PHB (Chandrashekharaiyah, 2005)

Setiap isolat bakteri selanjutnya ditanam kembali ke media nutrien agar yang disuplementasi dengan sumber glukosa 1% dengan metode titik kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Setelah

inkubasi, pada media tersebut ditetaskan secara berlebih pereaksi *sudan black* dan dibiarkan selama 30 menit kemudian dicuci dengan alkohol 95 %. Koloni bakteri yang menghasilkan PHB ditunjukkan oleh koloni bakteri yang mampu menyerap pereaksi *sudan black*. Kemampuan tersebut dapat terlihat dengan penampakan koloni yang berwarna biru keunguan.

Pewarnaan granula PHB pada Sel Bakteri (Yanti et al, 2009)

Pewarnaan ini menggunakan 2 jenis *reagen*, yaitu pereaksi *sudan black* dan safranin. Pertama dibuat olesan bakteri di atas kaca preparat, kemudian dikeringkan di atas pembakar spiritus selama beberapa detik untuk melekatkan bakteri di atas kaca preparat. Setelah itu, ditetaskan beberapa tetes pereaksi *sudan black* di atas preparat, dibiarkan selama 5-10 menit kemudian preparat didekolorisasi dengan pencucian menggunakan xylen lalu dikeringkan. Kemudian ditetaskan safranin dan dibiarkan selama 10 detik kemudian dicuci dengan aquades mengalir. Selanjutnya diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran tinggi menggunakan bantuan minyak imersi. Bakteri penghasil PHB dapat terlihat sebagai bakteri berwarna merah dengan granula PHB berwarna gelap.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi Bakteri Penghasil PHB

Sebagai langkah awal untuk memperoleh bakteri yang mampu mengakumulasi PHB yakni dengan melakukan isolasi bakteri dari substrat yang mengandung sumber karbon yang cukup tinggi. Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan sebagai sumber isolat adalah limbah pabrik gula yakni tetes, abu ketel, blotong dan ampas. Selain itu, tanah disekitar pabrik gula juga digunakan sebagai sumber isolat

dengan asumsi bahwa tanah di sekitar pabrik gula mengandung tumpahan limbah pabrik gula. Tabel 1. Hasil Isolasi dari Berbagai Sampel

No.	Sumber Isolat	Jumlah Koloni Tiap Seri Pengenceran (CFU)			Nilai SPC (CFU/ml)
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
1.	Tanah	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	3,1 x 10 ⁶
		31	5	4	
2.	Tetes	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	2,4x 10 ³
		24	2	1	
3.	Blotong	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	7,3 x 10 ⁴
		73	Swam	15	
4.	Abu ketel	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	5,6 x 10 ⁴
		56	18	7	
5.	Ampas	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	8,0 x 10 ³
		Swam	8	2	

Hasil isolasi bakteri dari limbah pabrik gula Arasoe-Bone dengan menggunakan metode Standart Plate Count (SPC) (Tabel 1) menunjukkan hasil yang bervariasi. Jumlah koloni bakteri terbanyak diperoleh dari tanah disekitar pabrik gula

yakni 3,1 x 10⁶ CFU/ml sedangkan terendah diperoleh dari tetes yaitu 2,4 x 10³ CFU/ml, koloni yang menunjukkan karakteristik yang berbeda selanjutnya dimurnikan untuk pengamatan morfologi koloni dan sel.

Tabel 2. Pengamatan Morfologi dan Sel Isolat Bakteri dari Pabrik Gula Arasoe

No.	Sumber Isolat	Kode Isolat	Pengamatan ciri morfologi				Bentuk Sel	Sifat Gram
			Warna	Bentuk Koloni	Pinggiran Koloni	Elevasi		
1.	Tanah	TA1	Kuning bening	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Flat</i>	Basil	Positif
		TA2	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>	Batang	Positif
		TA3	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Bulat	Positif
		TA4	Kuning transparan	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Bulat	Positif
		TA5	Putih keruh	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Effuse</i>	Batang	Positif
		TA6	Putih keruh	<i>Circular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Effuse</i>	Bulat	Positif
2.	Tetes	MA 1	Krem	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Effuse</i>	Batang	Positif
		MA2	Putih keruh	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Batang	Negatif
		MA3	Putih	<i>Irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>Convex papillate</i>	Batang	Positif
		MA4	Putih kekuningan	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Batang	Positif
		MA5	Putih kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>	Batang	Positif
		MA6	Putih	<i>Irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>	Bulat	Negatif
		MA7	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Bulat	Positif
		MA8	Kuning transparan	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Batang	Positif
3.	Blotong	BA1	Krem, mengkilap	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>raised</i>	Batang	Positif
		BA2	Putih kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>	Batang	Positif
		BA3	Putih	<i>Irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>	Bulat	Negatif
		BA4	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Bulat	Positif
		BA5	Kuning transparan	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Bulat	Positif
		BA6	Kuning	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Bulat	Positif
		BA7	Krem	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Effuse</i>	Batang	Positif
		BA8	Putih keruh	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Batang	Negatif
		BA9	Putih	<i>Irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>Convex papillate</i>	Batang	Positif
		BA10	Putih kekuningan	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Batang	Positif
		BA11	Putih keruh	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Effuse</i>	Batang	Positif
4.	Abu	KA1	Krem bening,	<i>Irregular</i>	<i>undulate</i>	<i>Low convex</i>	Batang	Negatif

	Ketel		mengkilap					
		KA2	Krem	<i>circulair</i>	<i>entire</i>	<i>Low convex</i>	Batang	Negatif
		KA3	Krem pucat	<i>Filamen</i>	<i>Lobate</i>	<i>flat</i>	Batang	Negatif
		KA4	Putih keruh	<i>Irreguler</i>	<i>Lobate</i>	<i>Effuse</i>	Batang	Positif
		KA5	Putih	<i>Irreguler</i>	<i>undulate</i>	<i>Convex papillate</i>	Batang	Positif
		KA6	Putih kekuningan	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Batang	Positif
		KA7	Putih keruh	<i>Irreguler</i>	<i>Lobate</i>	<i>Effuse</i>	Batang	Positif
		KA8	Krem	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>flat</i>	Batang	Negatif
		KA9	Krem	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Bulat	Positif
		KA10	Krem	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>flat</i>	Bulat	Negatif
5.	Ampas	AA1	Krem	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>flat</i>	Batang	Negatif
		AA2	Krem	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Bulat	Positif
		AA3	Krem	<i>Irreguler</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>	Batang	Positif
		AA4	Krem	<i>Filamen</i>	<i>Lobate</i>	<i>flat</i>	Bulat	Positif
		AA5	Krem	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Bulat	Positif
		AA6	Krem	<i>Irreguler</i>	<i>undulate</i>	<i>flat</i>	Batang	Positif
		AA7	Krem	<i>Filamen</i>	<i>Lobate</i>	<i>flat</i>	Bulat	Positif
		AA8	Krem	<i>Circulair</i>	<i>Entire</i>	<i>Low convex</i>	Bulat	Positif

Jumlah isolat bakteri yang didapatkan dari sampel asal Pabrik Gula Arasoe-Bone sebanyak 43 isolat yakni 6 isolat dari tanah, 8 isolat dari tetes, 11 isolat dari blotong, 10 isolat dari abu ketel, dan 8 isolat dari ampas.

Penentuan jumlah isolat ini didasarkan pada perbedaan morfologi koloni dari setiap isolat bakteri tersebut. Berdasarkan pengamatan sel bakteri didapatkan bahwa bakteri tersebut ada yang bersifat gram positif dan ada pula yang bersifat gram negatif dengan bentuk yang berbeda-beda, ada yang bulat dan ada pula yang batang. Hal ini sesuai dengan yang dijelaskan oleh Byrom (1987), bahwa bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan granula PHB di dalam selnya dapat berasal

dari golongan bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif.

Seleksi Bakteri Penghasil PHB

Seleksi bakteri pengakumulasi PHB dilakukan dengan menumbuhkan pada medium nutrient agar yang disuplementasi dengan glukosa 1 % dengan metode titik yang selanjutnya diwarnai dengan reagen *Sudan black* dan pencucian dengan alkohol 95 % dan terakhir dengan safranin. Hasil pengamatan menunjukkan tidak semua koloni mampu menyerap reagen *Sudan black*, seperti terlihat pada Tabel 3. Menurut Chandrashekharaiiah (2005), koloni bakteri yang mampu menghasilkan PHB setelah pewarnaan koloni dengan reagen *Sudan black* akan berwarna biru gelap, meskipun setelah dicuci dengan alkohol 95%.

Tabel 3. Seleksi Isolat Bakteri Asal Pabrik Gula Arasoe-Bone Penghasil PHB dengan Reagent *Sudan Black*

No.	Kode Isolat	Kemampuan menyerap <i>sudan black</i> berdasarkan warna koloni
Tanah		
1.	TA1	-
2.	TA2	-
3.	TA3	-
4.	TA4	-
5.	TA5	-
6.	TA6	-
Tetes		
7.	MA 1	+++
8.	MA2	-
9.	MA3	-
10.	MA4	+++
11.	MA5	++
12.	MA6	+
13.	MA7	++
14.	MA8	+

Blotong		
15.	BA1	-
16.	BA2	-
17.	BA3	-
18.	BA4	-
19.	BA5	-
20.	BA6	-
21.	BA7	-
22.	BA8	++
23.	BA9	++
24.	BA10	++
25.	BA11	-
Abu Ketel		
26.	KA1	-
27.	KA2	-
28.	KA3	-
29.	KA4	-
30.	KA5	-
31.	KA6	-
32.	KA7	-
33.	KA8	-
34.	KA9	+++
36.	KA10	++
Ampas		
37.	AA1	-
38.	AA2	-
39.	AA3	-
40.	AA4	-
41.	AA5	-
42.	AA6	-
43.	AA7	-
44.	AA8	-

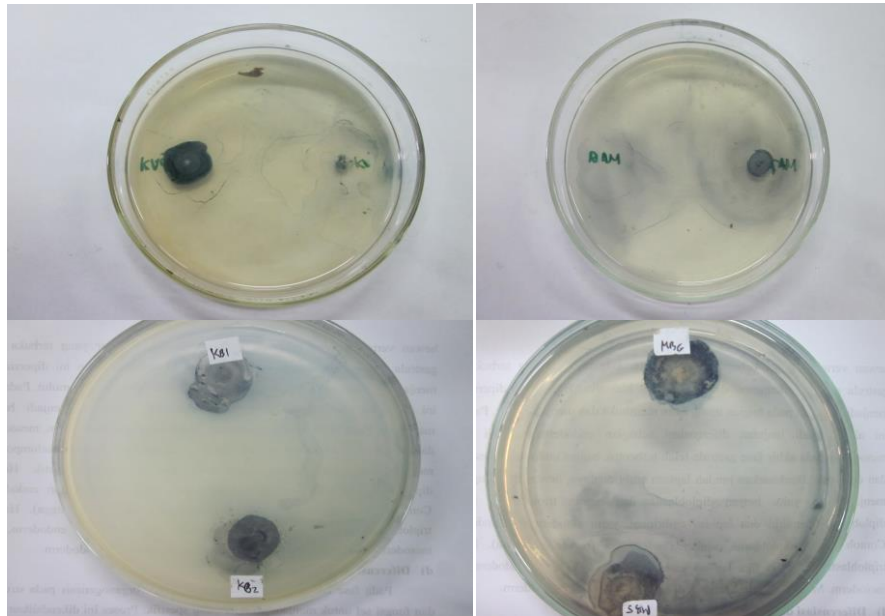
Hasil seleksi secara kualitatif pada ke 43 isolat yang diperoleh dari limbah pabrik gula Arasoe-Bone menunjukkan hanya 11 yakni isolat yang mampu mengakumulasi PHB. Penampakan visual dari hasil seleksi secara kualitatif ini ditunjukkan pada Gambar 1. Warna hitam atau gelap ini bertingkat-tingkat, hal ini sesuai dengan banyaknya kadar granula PHB yang dikandung oleh sel bakteri tersebut.

Warna hitam atau gelap ini bertingkat-tingkat, hal ini sesuai dengan banyaknya kadar granula PHB yang dikandung oleh sel bakteri tersebut. dapat diwarnai dengan pewarna *Sudan Black B* atau *Nile Blue* sehingga PHB tersebut terlihat sebagai titik biru atau gelap di dalam

Hasil pewarnaan granula PHB pada sel bakteri ditunjukkan pada Gambar 2. Granula PHB diketahui bersifat sudanofilik (dapat diwarnai oleh pewarnaan lipid

sitoplasma sel dengan warna sel merah akibat pewarnaan dengan pewarnaan safranin (Bhawsar, 2011).

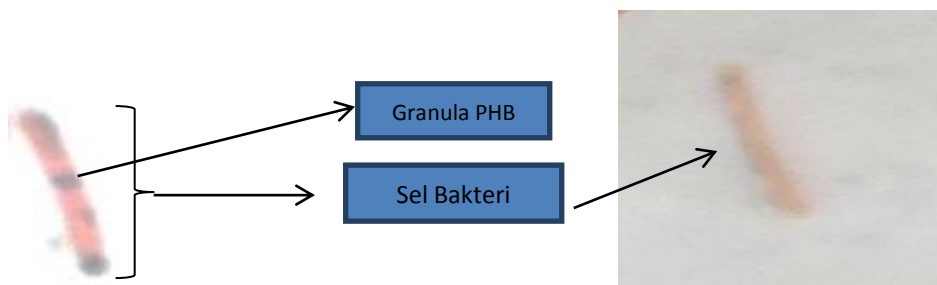
Sudan) atau granula lipid. Secara kimia, PHB adalah polilaktid dan atau polyester. Observasi dengan mikroskop cahaya, PHB.



Gambar 2. Pewarnaan Koloni Bakteri dengan reagen *Sudan black*

Sudan black sendiri merupakan pewarna yang spesifik untuk lipid. Pewarna *Sudan Black B* dapat mewarnai berbagai jenis lipid, diantaranya lemak netral, fosfolipid, dan sterol. Oleh karena itu, pewarna *Sudan Black* digunakan pada pewarnaan granula

PHB karena akan berikatan kuat dengan granula PHB sehingga meskipun dicuci dengan *xylol*, *Sudan black* akan tercuci dari sitoplasma sel, tetapi tidak pada granula PHB tersebut.



Gambar 2. Perbedaan sel bakteri yang mampu dan tidak mampu mengakumulasi PHB. (A) isolat MA1. (B) Isolat MA5

Sudan black sendiri merupakan pewarna yang spesifik untuk lipid. Pewarna *Sudan Black B* dapat mewarnai berbagai jenis lipid, diantaranya lemak netral, fosfolipid, dan sterol. Oleh karena itu, pewarna *Sudan*

Black digunakan pada pewarnaan granula PHB karena akan berikatan kuat dengan granula PHB sehingga meskipun dicuci dengan *xylol*, *Sudan black* akan tercuci

dari sitoplasma sel, tetapi tidak pada granula PHB tersebut.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari beberapa limbah pabrik gula diantaranya tetes, blotong dan abu ketel berhasil diisolasi 11 isolat bakteri yang mampu mengakumulasi PHB. Dugaan ini sesuai dengan hasil penelitian Du *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa bakteri yang hidup di lingkungan mengandung sumber C tinggi cenderung mengakumulasi material cadangan tertentu seperti granula lipid dan PHB.

Kesimpulan

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri dari Pabrik Gula Arasoe-Bone diperoleh 43 isolat yang menunjukkan karakteristik yang berbeda dan 11 isolat diantaranya menunjukkan kemampuan mengakumulasi PHB dalam selnya.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh BNOPTN dengan No. Kontrak 2058/UN4.20/PL.09/2013

DAFTAR PUSTAKA

- Byguys, 2008. Potensial Biodegradable Plastik. www.bagazz.wordpress.com. Diakses pada tanggal 26 September 2011. Makassar.
- Byrom, D., 1987. Polymer Synthesis by Microorganism : Technology and Economics (A Review). *Tib Tech.* 5:246-250.
- Byrom, D., 1993. The Synthesis of Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates from Bacteria, *Int. Biodegradation and Biodegradation.* 31 : 199-208.
- Margino, S., E. Martani, Soesanto, A. Yuswanto dan L. Sembiring, 2000. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Plastik Terdagradas, Poli- β -Hidroksibutirat : *Biologi.* 2 (10) : 583-597.
- Margono, 2011. Proses dan Optimalisasi Matematik Produksi Polyhydroxybutyrate oleh Bakteri Amilolitik Bacillus cereus IFO 13690. www.pasca.ugm.ac.id. Diakses pada tanggal 26 september 2011. Makassar.
- Martani, E., L. E. Handajani dan S. Hartadi, 1999. Production of Poly- β -Hydroxybutyric Acid (PHB) as Raw Material for Degradable Bioplastic by *Alcaligenes sp.* Grown in Amylum Substrate Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- Yanti, N. A., S. Margino dan L. Sembiring, 2010. Optimasi Produksi Poli- β -Hidroksibutirat (PHB) oleh *Bacillus sp.* PSA10, *Biota.* 15 (3) : 331-339.
- Young, F. K., J. R. Kastner dan S. W. May, 1994. Microbial Production of Poly- β -Hydroxybutyric Acid from D-Xylose and Lactose by *Pseudomonas cepacea* : *Appl. Environ. Microbiol.* (60) : 4195-4198.