

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Limbah dalam Bak Homogenisasi IPAL LIK Magetan

Bakteri lipolitik pada penelitian ini bersumber dari bak homogenisasi Instalasi Pengolahan Air Limbah LIK Magetan. Bak homogenisasi berfungsi sebagai bak penampungan sementara serta homogenisasi air limbah yang masuk (Gambar 3). Limbah memiliki pH 9 dengan suhu limbah $\pm 30^{\circ}\text{C}$.



Limbah industri kulit memiliki karakteristik fisik berwarna hitam dan mengeluarkan bau tengik yang menyengat akibat adanya lemak yang merupakan kandungan pada limbah (Swandi dkk., 2015). Menurut Nurhasanah dan Dian (2008), sisa lemak pada limbah akan tampak pada permukaan air. Lapisan lemak ini dapat menghambat masuknya cahaya matahari ke dalam air, lingkungan menjadi aerob, dan menghambat proses biologis dalam air.

Kondisi pH limbah bersifat basa. Hal ini disebabkan oleh salah satu tahap proses pengolahan kulit yaitu tahap pengapuran (*limming*). Menurut Clifton dkk

commut to user

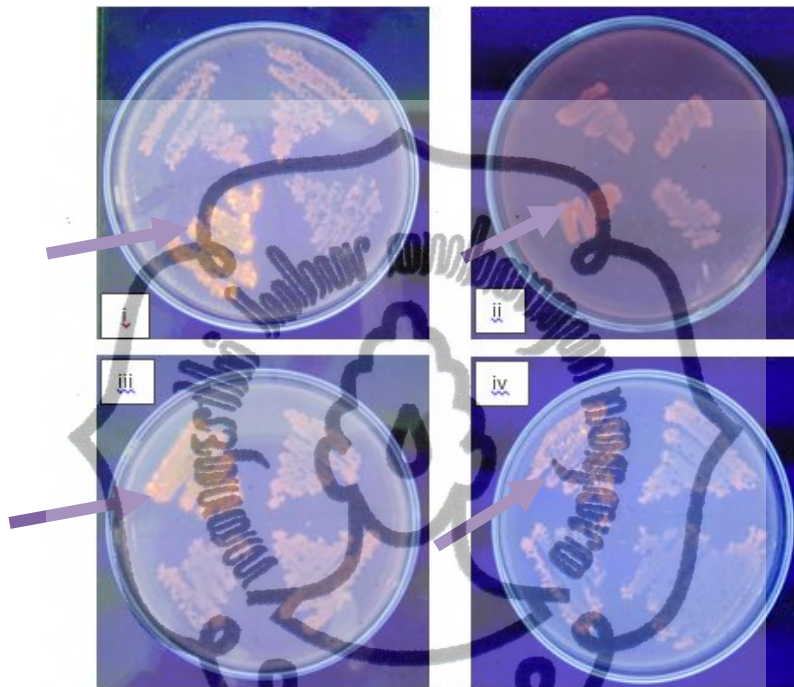
(1994) proses pengapuran bertujuan untuk merontokkan rambut hewan, membengkakkan kulit, dan melarutkan lemak. Bahan kimia yang digunakan dalam proses ini yaitu kapur tohor ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) untuk membengkakkan kulit dan natrium sulfida (Na_2S). Kedua bahan ini merupakan bahan pencemar pada limbah industri kulit. Penambahan kapur dalam jumlah banyak dapat meningkatkan pH limbah menjadi basa. pH adalah faktor esensial bagi kondisi tumbuh bakteri. pH awal limbah diukur untuk mengetahui rentang pH yang baik untuk pertumbuhan isolat bakteri indigen dari IPAL LIK Magetan.

B. Isolat Bakteri Lipolitik

Pada tahap isolasi awal diperoleh 44 isolat bakteri yang tumbuh pada media NA dari hasil pengenceran 10^{-5} . Setelah diinokulasi ke media minimal agar, diperoleh 22 isolat bakteri yang tumbuh. Masing-masing isolat diberi label isolat A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, dan V.

Media minimal digunakan pada tahap isolasi untuk menyeleksi atau menahan pertumbuhan bakteri tertentu. Minyak zaitun pada media minimal berperan sebagai sumber karbon tunggal sehingga hanya didapati bakteri yang bersifat lipolitik. Minyak zaitun dipilih karena mudah didapat dan merupakan substrat yang mudah dicerna oleh bakteri (Susilowati *et al.*, 2018). Bakteri lipolitik juga memanfaatkan minyak zaitun sebagai sumber karbon dan zat penginduksi sekresi lipase. Menurut Hernawati (2010), lipase merupakan enzim ekstraseluler yang bersifat enzim induktif. Enzim ini akan diproduksi dalam jumlah signifikan apabila terdapat substrat enzim tersebut dalam lingkungan pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan hasil skrining diperoleh 4 isolat bakteri positif lipolitik, yaitu isolat D, isolat H, isolat M, dan isolat Q. Sementara 18 isolat lainnya tidak menunjukkan aktivitas lipolitik (Gambar 4).



Aktivitas positif lipolitik ditandai dengan munculnya isolat yang berpendar terang dan berwarna oranye atau merah muda ketika terpapar lampu UV dengan panjang gelombang 350 nm. *Rhodamine B Agar* dipilih karena merupakan indikator fluoresens yang sensitif dengan asam lemak bebas. Minyak zaitun digunakan sebagai substrat lipase dan *rhodamine B* adalah indikator aktivitas lipase.

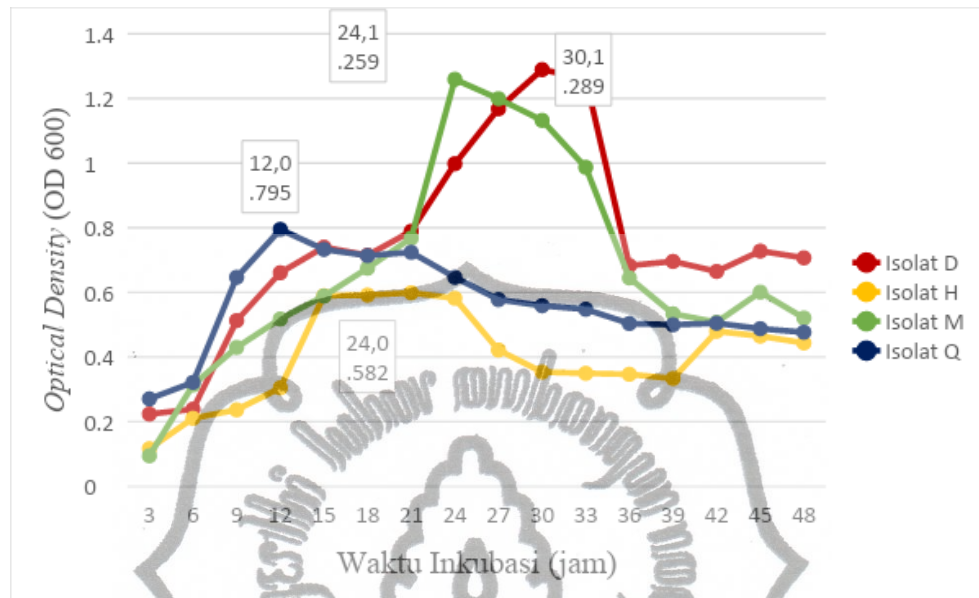
Koloni isolat D, H, M, dan Q terlihat berpendar dan memiliki warna oranye yang menyala, hal ini menandakan bahwa 4 isolat tersebut memiliki aktivitas lipase sedangkan isolat yang negatif tidak memiliki pendaran warna oranye seperti pada gambar yang ditunjuk panah. Menurut Kasipah dkk (2013), hasil reaksi hidrolisis minyak zaitun oleh lipase menghasilkan produk berupa asam lemak bebas. Adanya ikatan kompleks antara *rhodamine* dengan asam lemak bebas tersebut

menghasilkan pendaran warna merah muda saat diiradiasi di bawah sinar UV. Menurut Sugiharni (2010), salah satu penyebab isolate non lipolitik dapat tumbuh pada media *rhodamine* B agar adalah adanya kemungkinan bakteri tersebut menghasilkan esterase. Pendaran oranye tidak akan terbentuk ketika esterase terdeteksi dalam media *rhodamine* B.

C. Kurva Pertumbuhan Sigmoid Bakteri Lipolitik

Optimasi waktu pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui waktu optimal produksi enzim lipase. Berdasarkan hasil optimasi waktu pertumbuhan bakteri, diperoleh data bahwa setiap bakteri memiliki waktu pertumbuhan optimal yang berbeda-beda, seperti yang disajikan pada kurva pertumbuhan bakteri lipolitik (Gambar 5).

Setiap isolat bakteri yang diinokulasi ke dalam media produksi enzim mencapai titik puncak pertumbuhan pada waktu yang berbeda. Bakteri lipolitik mengalami fase-fase seperti yang dijelaskan Brock *et al.* (2003), yaitu fase lag, fase log, fase penurunan populasi dan fase kematian mengikuti suatu pola pertumbuhan berupa kurva pertumbuhan sigmoid. Puncak pertumbuhan bakteri atau fase eksponensial adalah saat yang baik untuk melakukan produksi enzim karena bakteri dalam fase pembelahan biner yang cepat sehingga jumlah sel bakteri berlimpah. Media produksi enzim lipase memanfaatkan minyak zaitun sebagai sumber karbon. Menurut Anderson dan Jayaraman (2003), bakteri lipolitik menghidrolisis sumber karbon utama yaitu minyak dengan menghasilkan enzim lipase ekstraseluler pada fase eksponensial untuk memenuhi kebutuhan nutrisi selama proses kultivasi.



Tingkat kekeruhan media produksi enzim semakin meningkat seiring masa inkubasi. Kekeruhan medium selama pertumbuhan bakteri lipolitik menunjukkan tingkat kepadatan sel selama pertumbuhan sehingga nilai absorbansi OD meningkat. Bakteri dapat tumbuh hingga nutrient yang tersedia pada medium telah habis terpakai. Kurva pertumbuhan sigmoid (Gambar 5) menggambarkan pertambahan jumlah sel bakteri lipolitik mulai dari fase adaptasi, pertumbuhan cepat di fase logaritmik (eksponensial), fase stasioner dan fase kematian sel.

Isolat Q adalah isolat yang memasuki fase eksponensial paling cepat, yakni 12 jam. Sedangkan isolat D membutuhkan waktu 30 jam inkubasi untuk mencapai fase eksponensialnya. Jika dilihat dari kurva, pertumbuhan isolat D cukup lambat jika dibandingkan dengan isolat lainnya karena tidak terjadi pertambahan nilai absorbansi yang signifikan hingga jam ke-6. Hal ini menunjukkan bahwa isolat D membutuhkan waktu yang lebih lama untuk tumbuh, fase adaptasi ini disebut fase

lag. Setelah mencapai puncak eksponensial, media produksi enzim disentrifugasi, supernatan digunakan sebagai sumber enzim lipase ekstraseluler. Enzim lipase ekstraseluler diukur aktivitas enzimnya dan dilanjutkan dengan tahap pengendapan enzim.

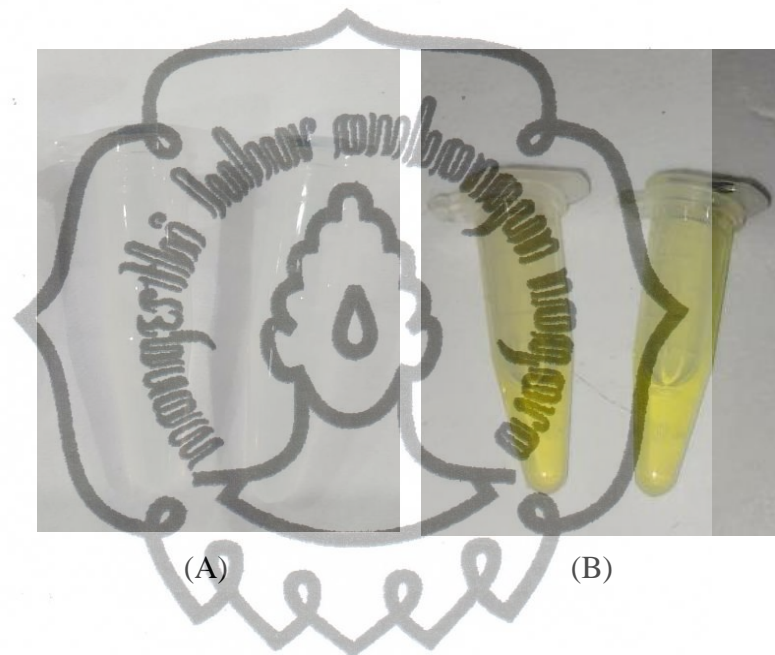
Waktu yang diperlukan untuk membelah diri dari satu sel menjadi dua sel sempurna disebut waktu generasi. Kemampuan setiap bakteri untuk memperbanyak diri berbeda-beda antara bakteri satu dengan bakteri lainnya. Walaupun berada pada kondisi perlakuan yang sama, perbedaan waktu generasi terjadi karena faktor genetik pada masing-masing bakteri. Genetik merupakan faktor intrinsik dalam suatu mikroorganisme yang tidak dapat dirubah (Sariadji dkk., 2015).

Aktivitas lipolitik diduga menjadi bagian dari aktivitas metabolit primer bakteri yang terjadi dengan mengikuti fase pertumbuhan mikroba, yaitu meningkat optimum pada akhir fase log (eksponensial) atau awal fase stasioner kemudian menurun seiring dengan aktivitas mikroba dan penurunan nutrisi substrat (Bestari dan Suharjono, 2015b). Hal ini didukung oleh penelitian Bestari dan Suharjono (2015a), aktivitas lipase tertinggi pada isolat lipolitik terjadi dalam kisaran fase akhir eksponensial atau logaritmik.

D. Aktivitas Enzim Lipase

Pengukuran aktivitas enzim lipase dilakukan setelah setiap isolat mencapai puncak fase eksponensialnya saat ditumbuhkan pada media produksi enzim. Terdapat 4 variasi perlakuan enzim lipase dari setiap isolat, yaitu *crude enzyme*, pengendapan 0-30%, pengendapan 30-45%, dan pengendapan 45-60%. Aktivitas lipase diukur dengan spektrofotometer UV-VIS λ 410 nm dan menggunakan

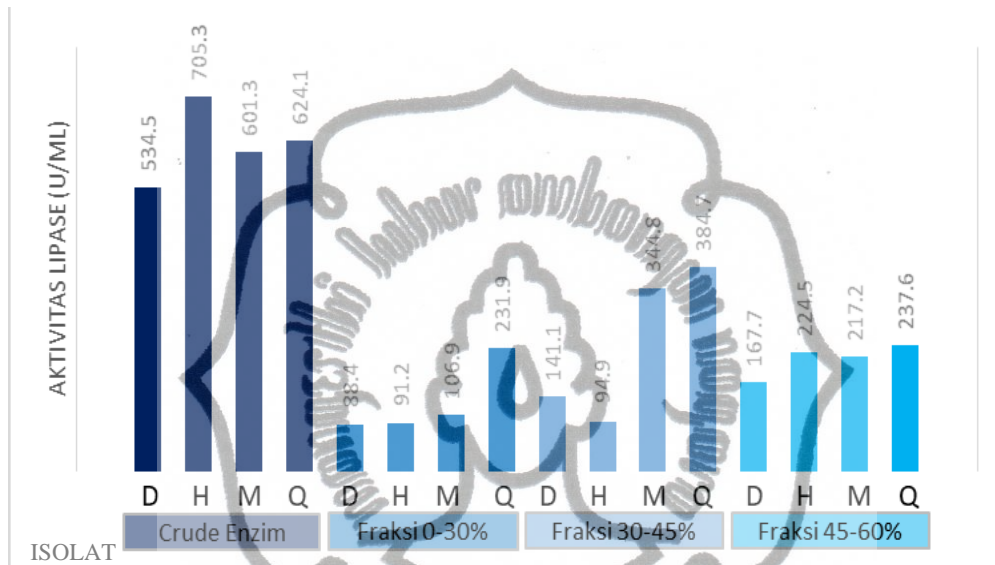
substrat *p*-Nitrophenyl palmitate (pNPP). Lipase menghidrolisis ikatan ester dengan penyisipan molekul H_2O sehingga pNPP terpecah menjadi 4-Nitrophenol (pNP) dan palmitate. Warna kuning tersebut merupakan indikator pNP yang dibebaskan akan memperlihatkan warna kuning (Gambar 6) yang disebabkan oleh pH yang basa (Pencreac'h dan Baratti 1996).



Aktivitas enzim lipase dapat diamati pada Gambar 7 dan Lampiran 2. Aktivitas enzim tertinggi dihasilkan dari perlakuan *crude enzyme* lipase dengan aktivitas tertinggi dari isolat H yaitu 705,3 Unit/mL. Sedangkan dari hasil pengendapan enzim, isolat D memiliki aktivitas enzim tertinggi sebesar 167,7 Unit/mL pada hasil pengendapan 45-60%. Aktivitas enzim isolat H pada pengendapan 45-60% memiliki nilai tertinggi yaitu 224,5 Unit/mL. Isolat M memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi pada pengendapan 30-45% sebesar 344,8 Unit/mL. Sedangkan isolat Q memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi sebesar 384,7

Unit/mL pada pengendapan 30-45%, selain itu hasil pengendapannasi enzim dari isolat Q selalu memiliki nilai tertinggi disetiap pengendapan jika dibandingkan isolat lainnya.

Crude enzyme memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan enzim



lipase hasil pengendapan. Aktivitas lipase setelah pengendapan menurun drastic dibandingkan dengan ekstrak kasar. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar enzim hilang pada proses pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Oleh karena itu, dalam supernatan aktivitas lipase sangat rendah. Lipase tersebut ikut mengendap, tetapi terdenaturasi atau terinhibisi oleh sedikit garam yang tersisa pada proses pelarutan kembali dan kehilangan ion logamnya. Menurut Fathimah dan Wardani (2014), ion logam dapat memperbesar aktivitas enzim yaitu menjadi bagian integral dari sisi aktif, merubah konstanta kesetimbangan dari reaksi enzimatik, merubah muatan listrik, mengusir ion inhibitor, menukar ion yang kurang efektif pada sisi aktif enzim atau substrat sehingga kehilangan ion logam akan menurunkan aktivitas enzim.

Nilai aktivitas enzim total pada ekstrak kasar lebih tinggi dibanding nilai aktivitas enzim total hasil pengendapan. Aktivitas ekstrak kasar enzim lipase menunjukkan aktivitas lipase secara total, meliputi seluruh pengendapan. Enzim lipase hasil pengendapan dari setiap isolat bakteri memiliki nilai aktivitas enzim yang berbeda-beda di setiap tingkat pengendapan. Enzim lipase isolat D dan H memiliki nilai aktivitas tertinggi pada pengendapan 45-60% sedangkan enzim lipase isolat M dan Q memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi pada pengendapan 30-45%.

Hasil ini sesuai dengan literatur menurut Odunuga dan Shazhko (2013), setiap protein akan mengendap pada konsentrasi garam yang berbeda. Menurut Suprihana (2013), protein yang bersifat hidrofobik akan mengendap pada konsentrasi garam yang rendah. Sedangkan protein yang bersifat hidrofilik memerlukan konsentrasi garam yang tinggi untuk mengendapkannya. Hal ini juga terjadi pada enzim karena enzim tersusun atas protein. Hasil penelitian Dali dkk. (2011) menyatakan bahwa enzim lipase dari bakteri yang diendapkan menggunakan ammonium sulfat 0-30%, 30-80%, 80-100% dan 100% memiliki aktivitas enzim tertinggi pada fraksi 0-30%. Hal ini berarti, enzim lipase tersebut cenderung bersifat hidrofobik sehingga mengendap pada konsentrasi garam yang rendah. Sedangkan enzim lipase bakteri yang menunjukkan aktivitas enzim paling tinggi pada fraksi 60- 80%. Hal ini berarti, enzim lipase tersebut bersifat hidrofilik sehingga memerlukan konsentrasi ammonium sulfat yang tinggi untuk mengendapkannya.

E. Karakteristik Morfologi Bakteri Lipolitik

commit to user

Karakter morfologi dari 4 isolat bakteri yang memiliki aktivitas lipolitik diamati morfologi koloni dan selnya. Karakter koloni meliputi bentuk, warna, elevasi dan tepian. Karakter sel meliputi sifat gram dan bentuk sel.

Bentuk makroskopis dari setiap isolat sangat beragam (Tabel 1 dan Lampiran 4).

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri Lipolitik

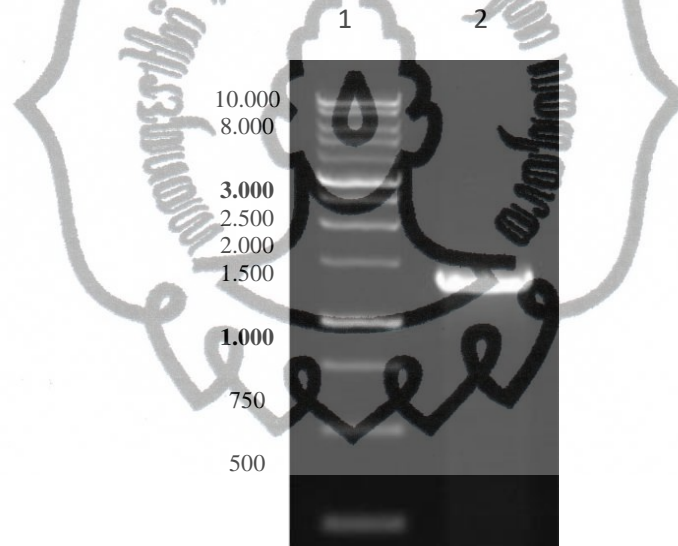
| Isolat | <u>Koloni</u> | | | | Gram | <u>Sel</u> |
|--------|-------------------|-------|-----------------|------------------|------|-----------------|
| | Bentuk | Warna | Elevasi | Tepian | | Bentuk Sel |
| D | <i>Circular</i> | Ungu | <i>Umbonate</i> | <i>Scalloped</i> | + | <i>Bacillus</i> |
| H | <i>Irregular</i> | Putih | <i>Flat</i> | <i>Undulate</i> | + | <i>Coccus</i> |
| M | <i>Circular</i> | Ungu | <i>Raised</i> | <i>Entire</i> | + | <i>Coccus</i> |
| Q | <i>Punctiform</i> | Krem | <i>Convex</i> | <i>Entire</i> | - | <i>Bacillus</i> |

Terdapat kesamaan antara koloni isolat D dan M, keduanya memiliki koloni berwarna ungu dengan bentuk koloni *circular*. Sedangkan dari hasil pengamatan sifat gram, hanya isolat Q yang memiliki gram negatif, sementara 3 isolat bakteri lainnya gram positif. Selain itu, isolat D dan Q yang memiliki bentuk sel *bacillus* sementara isolat lainnya berbentuk *coccus*. Menurut Fitri dan Yasmin (2011), pewarnaan gram menunjukkan adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut.

Pengamatan tentang karakteristik morfologi koloni bakteri perlu dilakukan, agar mempermudah dalam proses identifikasi jenis bakteri. Namun, untuk memperoleh hasil identifikasi yang akurat, perlu dilakukan uji lanjutan yaitu identifikasi secara molekuler. *commit to user*

F. Spesies Bakteri Lipolitik Berdasarkan Identifikasi Molekuler

Pada penelitian ini dipilih satu isolat bakteri lipolitik dengan aktivitas enzim lipase yang stabil, baik dalam bentuk enzim ekstrak kasar maupun setelah melalui tahap pengendapan untuk kemudian diidentifikasi secara molekuler menggunakan metode PCR. Berdasarkan pengamatan, isolat Q memiliki aktivitas enzim yang paling stabil dibandingkan isolat lainnya karena nilai aktivitas enzim total dari hasil pengendapan isolat Q selalu memiliki nilai tertinggi di setiap tingkat pengendapannya. Elektroforegram dari produk PCR dapat dilihat dalam Gambar 8.



Elektroforegram menunjukkan pita DNA berukuran sekitar 1300 bp. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Marchesi *et al.* (1998), pasangan primer 63F dan 1387 dapat mengamplifikasi sekuens gen penyandi 16S rRNA dengan ukuran sekitar 1300 pasang basa.

Urutan basa (765 basa nukleotida) diperoleh dari hasil sekuensing (Lampiran 5). Hasil tersebut dianalisis dengan menggunakan program BLASTN pada situs NCBI, kemudian dicocokkan dengan database *Gene Bank* sehingga akan

diperoleh nama spesies dengan kekerabatan terdekat disertai keterangan presentase kemiripan. Berdasarkan hasil analisis BLASTN, isolat Q memiliki persentase kemiripan sebesar 100% dengan *Stenotrophomonas maltophilia* (Gambar 9 dan Lampiran 6).

Menurut Sogandi (2019), *query coverage* adalah persentase dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada BLAST dengan nilai tertinggi 100%. Nilai *e-value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi, nilai 0 pada *e-value* menunjukkan bahwa kedua

| Description | Common Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len |
|---|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|
| Stenotrophomonas maltophilia strain JM11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Stenotrophom... | 1411 | 1411 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1438 |
| Stenotrophomonas maltophilia strain JM5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Stenotrophom... | 1411 | 1411 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1442 |
| Stenotrophomonas maltophilia strain JM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Stenotrophom... | 1411 | 1411 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1438 |

sekuens tersebut identik. Hasil alignment isolat Q (Lampiran 6c) menunjukkan 764 basa nukleotida identik dan dapat diidentifikasi sebagai *Stenotrophomonas maltophilia*.

Isolat Q memiliki gram negatif dengan bentuk sel basil, koloni berwarna putih krem dan bentuk koloni kecil bulat. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa *Stenotrophomonas maltophilia* adalah bakteri gram negatif yang bersifat aerobik. Bakteri ini dapat ditemukan secara luas di lingkungan berair, pada tanah, dapat ditemukan pada tanaman dan telah digunakan dalam aplikasi bioteknologi (Berg *et al.*, 1999). Menurut Wardoyo (2016), *Stenotrophomonas maltophilia* adalah bakteri basil *non-fermenter* dan *non-sporulating* yang memiliki flagella polar dan panjang 0.5-1.5 μm . Pertumbuhan bakteri ini pada *agar plate* menunjukkan bentuk koloni halus, mengkilap dan menunjukkan warna putih sampai kuning pucat.

Berdasarkan Thomas *et al.* (2014), aktivitas lipase dideteksi pada media tumbuh *Stenotrophomonas maltophilia*. Lipase ekstraseluler yang diproduksi *S. maltophilia* membantunya berkembang dalam lingkungan dengan jumlah karbohidrat terbatas sehingga lipid menjadi satu-satunya sumber karbon. Penelitian Larik *et al.* (2018), juga menyebutkan bahwa *Stenotrophomonas maltophilia* merupakan bakteri lipolitik yang dapat dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi. Enzim lipase yang dihasilkan bakteri ini berpotensi secara signifikan untuk biodegradasi hidrokarbon petrokimia. Lipase dari *S. maltophilia* dapat menjadi agen biodegradasi hemat biaya dan ramah lingkungan, khususnya untuk limbah industri perminyakan.

Stenotrophomonas mempunyai banyak peranan penting di lingkungan. Jenis-jenis dalam marga *Stenotrophomonas* ini memiliki peran ekologi penting dalam siklus unsur di alam, sebagai agen biokontrol, bioremediasi dan lainnya . Bakteri *S. maltophilia* yang mengeluarkan lipase yang tahan terhadap pelarut dan organik diisolasi dari sampel yang terkontaminasi minyak. Lipase yang dihasilkan *S. maltophilia* menunjukkan stabilitas di lingkungan yang memiliki kandungan pelarut hidrofobik yang tinggi dan pelarut hidrofilik murni selama 7 hari. Aktivitas lipasanya tinggi pada suhu rendah dan pada kisaran pH basa. Ini menjadi karakteristik lipase dari *S. maltophilia* untuk aplikasi industri yang melibatkan pelarut organik seperti sintesis organik (Li *et al.*, 2013).

Lipase masuk ke dalam kelompok enzim hidrolitik bersama amilase, amidase, esterase, dan protease. Enzim ini hanya dapat dihasilkan oleh bakteri dalam kondisi lingkungan dengan emulsi minyak dalam air. Lipase akan memecah

ester yang teremulsi dari gliserin dan rantai panjang asam lemak. Jenis substrat karbon dan induser yang digunakan merupakan faktor-faktor yang berpengaruh besar dalam proses produksi lipase selama pengkulturan (Gayathri *et al.*, 2013).

Enzim lipase merupakan salah satu enzim yang telah diaplikasikan pada proses industri baik industri pangan maupun non pangan. Lipase didefinisikan sebagai hidrolase ester asam lemak berantai panjang. Beberapa peneliti mempelajari aktivitas enzim dalam pengolahan limbah domestik dengan sistem lumpur aktif dan sistem ekstraksi enzim lipase dan protease dalam lumpur aktif dengan tujuan untuk melihat aktivitas enzim lipase dalam hal degradasinya pada senyawa organik dalam air limbah (Kasipah dkk., 2013). Berdasarkan referensi diatas, lipase dari isolat *S. maltophilia* yang sudah diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai agen biodegradasi limbah.