

Isolation and Identification of Biosurfactant-producing Bacteria from the Aerobic Pond of Oil Palm Liquid Waste at PT. Aek Loba Plantation

Diah Ayu Andini^{1*}, Rasyidah¹, Ulfayani Mayasari¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara, Sumatera Utara, Indonesia;

Article History

Received : September 28th, 2024

Revised : October 19th, 2024

Accepted : October 20th, 2024

*Corresponding Author: **Diah Ayu Andini**, Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara, Sumatera Utara, Indonesia; Email: ayuandinidiah32@gmail.com

Abstract: Biosurfactants are natural surfactants derived from bacteria which can degrade oil content in soil or water. Most of these biosurfactant-producing bacteria are often found in areas polluted by oil and grease, such as aerobic ponds of palm oil liquid waste. The purpose of this research was to isolate and identify biosurfactant-producing bacteria from aerobic ponds of palm oil wastewater at PT. Aek Loba Plantation. This research was conducted using descriptive and identification methods through emulsification tests, morphological characterization, gram staining, biochemical tests, and PCR (Polymerase Chain Reaction) methods for bacteria that had the highest emulsification index values. Based on the results of the emulsification test, it was found that 8 biosurfactant-producing bacterial isolates consisted of 6 bacterial genera and 1 bacterial species that had different emulsification indexes, namely 1 *Citrobacter* genus isolate (30%), 1 *Enterobacter* genus bacterial isolate (42.2%), 2 isolates from the genus *Escherichia* (35.9% and 36.5%), 1 isolate from the genus *Pseudomonas* (32%), 1 isolate from the genus *Micrococcus* (37.5%), 1 isolate from the genus *Bacillus*, and 1 species of bacteria *Klebsiella variicola* (42.8%) which is a biosurfactant producing bacteria that has the highest emulsification index value.

Keywords: Bacteria, biosurfactant, liquid waste.

Pendahuluan

Kuas perkebunan kelapa sawit tahun 2018, di Indonesia mencapai 6.735.300 Hektar, sehingga membuat jumlah limbah yang dihasilkan selama pengolahan minyak kelapa sawit semakin meningkat (Surbakti *et al.*, 2020). Tiga jenis limbah yang dihasilkan selama produksi minyak kelapa sawit adalah limbah cair, limbah padat, dan limbah gas. Contoh bahan limbah yang terbuat dari minyak kelapa sawit padat meliputi serat, tandan kosong, dan cangkang kelapa sawit. Stasiun kondensat dan pemurnian menghasilkan limbah cair dari proses produksi minyak kelapa sawit. Limbah gas berupa uap air buangan hasil proses pengolahan minyak kelapa sawit (Ngatirah, 2017).

Limbah cair kelapa sawit memiliki kandungan zat organik yang cukup tinggi,

sehingga mengakibatkan pencemaran lingkungan di area pabrik pengolahan kelapa sawit. Metode dalam pengolahan limbah cair kelapa sawit biasanya menggunakan sistem stabil biologis yaitu menggunakan mikroba (Rois dan Haviza, 2017). Dalam metode ini proses pengolahan limbah cair menggunakan kolam yang kedalamannya 3-5 meter. Limbah cair yang memiliki kandungan zat organik yang tinggi dialirkan ke kolam pembuangan dan akan diurai dengan metode anaerob menjadi gas karbon dan metana, yang akan menyebabkan zat organik pada limbah cair menurun (Utamy, 2021).

Limbah cair kelapa sawit terdapat mikroorganisme yang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan. Biosurfaktan adalah senyawa yang biasanya aktif pada permukaan yang diproduksi oleh sel hidup. Sedangkan bagian lain adalah bagian non polar yang

bersifat hidrofobik (tidak bisa bersatu dengan air, tetapi dapat bersatu dengan minyak) yang terdiri dari asam lemak rantai panjang (Yolanda, 2019). Zat-zat ini dapat meningkatkan stabilitas emulsi dengan melarutkan tegangan antarmuka antara dua fase dan tegangan permukaan cairan (Utamy, 2021). Surfaktan alami yang disebut biosurfaktan diproduksi oleh bakteri dan memiliki kemampuan untuk memecah minyak dalam air atau tanah (Reningtyas, 2015 dalam Utamy, 2021). Limbah cair yang berasal dari proses pengolahan kelapa sawit memiliki kandungan minyak sekitar 0,5-1% (Nursanti 2013, dalam Utamy, 2021). Oleh sebab itu, limbah cair kelapa sawit ini berpotensi sebagai sumber bakteri penghasil mikroorganisme.

Biosurfaktan adalah surfaktan yang berasal dari bakteri pendegradasi kandungan minyak yang ada di perairan (Kurniati, 2016). Surfaktan merupakan senyawa amphiphilic yang menandakan bahwa biosurfaktan memiliki kandungan hidrofilik (bagian kepala) bersifat polar dan hidrofobik (bagian ekor) bersifat non polar (Hidayat, 2018). Struktur molekul surfaktan dapat digambarkan seperti berudu terbagi menjadi dua bagian yaitu bagian kepala dan bagian ekor. Karena struktur molekul (susunan kepala-ekor) tidak seimbang, karakteristik kepala dan ekor berbeda. Bagian tengkorak yang bersifat polar dan kompatibel dengan air disebut hidrofilik (menyukai air). Bagian ekor yang non-polar, dan bersifat hidrofobik, tertarik ke minyak ataupun lemak (Syukri & Masyithah, 2018).

Kolam aerob salah satu kolam pembuangan limbah cair kelapa sawit . Pada kolam aerob, proses penguraian berlangsung secara aerob, dimana proses ini terjadi dan membutuhkan oksigen (O₂) melalui udara. Oksigen sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan maupun untuk respirasi. Kolam aerob di PT. Perkebunan Aek Loba ini memiliki luas 12.306,75 m². Tujuan dari penelitian untuk mengetahui genus-genus bakteri penghasil biosurfaktan dan untuk mengetahui spesies bakteri yang memiliki indeks emulsi tertinggi pada kolam aerob limbah cair kelapa sawit di PT.Perkebunan Aek Loba.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Sampel diambil pada kolam aerob limbah cair kelapa sawit di PT. Perkebunan Aek Loba Kecamatan Aek Kuasan, Kabupaten Asahan, selanjutnya untuk isolasi. Identifikasi sampel bertempat ddi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Sumatera Utara. Penelitian ini dilakukan pada bulan November hingga Desember 2022.

Alat dan bahan

Alat penelitian yaitu tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, labu erlenmeyer, gelas ukur, magnetic stirer, timbangan analitik, bunsen, jarum ose, oven, autoklaf, mikropipet, coolbox, botol sampel, batang pengaduk, bunsen, kaca benda, cover glass, pipet tetes, mikropipet, mikroskop, alat tulis, kain hitam dan kamera Handphone. Selanjutnya bahan-bahan yang digunakan sampel limbah cair kolam aerob, media NA (Natrium Agar), media TSIA (Triple Sugar Iron Agar), media SIM (Sulfid Indol Motility), media MSM (Mineral Salt Medium), Pewarnaan gram (Crystal violet, iodine, Etil Alkohol, Safranin, dan Aquades), reagen H₂O₂ 3%, Alkohol 70%, tisu, kapas, ice pack, cling wrap, dan aluminium foil.

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel

Metode *purposive sampling* digunakan untuk mengambil sampel limbah cair kolam aerob. Titik pengambilan sampel berdasarkan kriteria sesuai dengan tujuan penelitian yaitu ditandai adanya kandungan minyak pada permukaan kolam air kolam aerob. Sampel diambil secara acak di kolam aerob limbah cair kelapa sawit. Sampel diambil dengan menggunakan botol yang telah steril, botol dimasukkan ke dalam limbah cair dan buka tutup botolnya, angkat botol jika botol telah terisi penuh dan tutup botol kemudian bungkus dengan aluminium foil. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam coolbox yang telah diisi dengan ice pack.

Sterilisasi

Alat berbahan kaca disterilisasi dimasukkan ke oven selama 1 jam pada suhu 170° C. Sebelum disterilisasi, alat-alat yang

terbuat kaca dicuci hingga bersih dan kering, selanjutnya alat-alat dibungkus menggunakan kertas bekas, untuk tabung reaksi dan labu erlenmeyer sebelum dibungkus dibagian mulut wadah ditutup dengan kapas. Untuk alat yang tidak terbuat dari kaca, seperti jarum ose dan pinset dimasukkan ke dalam alkohol 70 % dan dipijarkan diatas api bunsen.

Isolasi dan pemurnian bakteri

Sampel yang diambil kemudian diencerkan terlebih dahulu dari pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6} secara steril. Siapkan 6 tabung reaksi dan isi dengan 9 ml larutan NaCl, kemudian ambil sampel sebanyak 1 ml dengan mikropipet dan masukkan ke tabung reaksi pertama 10^{-1} . Setelah itu, tabung reaksi pertama 10^{-1} dilakukan pengenceran dengan cara divortex hingga homogen. Setelah itu, larutan pada tabung reaksi pertama 10^{-1} , diambil sebanyak 1 ml lalu dipindahkan ke tabung reaksi kedua sebagai pengenceran kedua 10^{-2} , dan seterusnya hingga pengenceran 10^{-6} . Pengenceran bertingkat dilakukan untuk mengurangi jumlah bakteri dalam sampel. Sampel yang diambil untuk diisolasi adalah pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} , selanjutnya sampel di masukkan ke media Natrium Agar (NA) menggunakan metode sebar (spread plate). Sampel yang telah disebar ke media, selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam dengan suhu 37° C. Setelah bakteri tumbuh, selanjutnya diinokulasi kembali pada media Natrium Agar (NA) yang baru selama 1x24 jam dengan suhu 37° C, dengan cara digoreskan menggunakan metode streak plate. Lalu dilakukan pengamatan makroskopik, mikroskopik serta uji biokimia (Utari, 2019).

Uji emulsifikasi

Uji emulsifikasi dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat murni kemudian ditumbuhkan dalam 18 ml media MSM (Mineral Salt Medium) kemudian dihomogenkan dan didiamkan di inkubator shaker selama 24 jam. Selanjutnya bakteri yang ditumbuhkan di media MSM dan dipindahkan ke tabung sentrifuge sebanyak 15 ml untuk disentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm dengan suhu 16° C, hal ini berguna untuk memisahkan antara makromolekul dan mikromolekul. Supernatan yang

dihasilkan dari proses sentrifuge diambil 2 ml kemudian dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi minyak makan 2 ml, lalu divortex selama 2 menit dan diamkan selama 24 jam, kemudian ukur tinggi busanya. Indeks emulsifikasi ini dihitung dengan rumus Cooper dan Goldenberg (Utamy, 2021).

Campuran isolat murni dan minyak goreng diukur kestabilan emulsifikasinya. Semakin tinggi busa yang dihasilkan, semakin tinggi juga emulsifikasi yang dihasilkan oleh bakteri dan hal ini berarti semakin bagus bakteri yang mendegradasi limbah cair minyak kelapa sawit (Yolanda, 2019). Tujuan uji emulsifikasi adalah untuk menentukan bakteri yang diisolasi adalah bakteri penghasil biosurfaktan atau tidak. Menurut Purnomohadi (2010) dalam Ainul (2021), bakteri yang dapat menghasilkan indeks emulsifikasi yaitu berkisar antara 30%-80%, yang dapat disebut sebagai bakteri yang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan.

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

Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pengamatan makroskopik, mikroskopik, uji biokimia, dan identifikasi dengan metode PCR untuk bakteri dengan hasil emulsifikasi tertinggi. Dalam penelitian ini uji biokimia yang dilakukan adalah uji katalase, uji oksidase, uji motilitas, dan uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi bakteri

Hasil penelitian dari kedua titik pengambilan sampel yang telah melewati proses isolasi bakteri dan inkubasi selama 24 jam dengan menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) ditemukan isolat bakteri berbeda. Hasil penelitian ini diperoleh 9 isolat bakteri dengan kode sesuai hasil pengenceran. Pada pengenceran 10^{-4} diperoleh 3 isolat bakteri, pengenceran 10^{-5} memperoleh 4 isolat bakteri, dan pengenceran 10^{-6} diperoleh 2 isolat bakteri. Bakteri hasil dari isolasi ini akan dimurnikan dengan menggunakan metode *streak plat*, yang bertujuan untuk memudahkan untuk

mengisolasi setiap koloni bakteri sehingga nantinya didapatkan satu koloni bakteri atau koloni bakteri tunggal.

Pemurnian bakteri

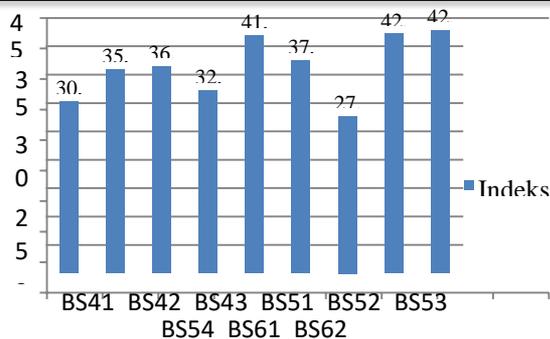
Koloni bakteri yang mempunyai morfologi berbeda dimurnikan kembali, tujuannya untuk memperoleh hasil koloni tunggal. Berdasarkan hasil penelitian ini, hasil pemurnian isolat bakteri pada media NA yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C yaitu memperoleh 9 isolat bakteri dan masing-masing isolat diberi kode dan dapat dilihat pada lampiran 6. Adapun kode isolat bakteri dari hasil pemurnian bakteri pada tabel 1.

Tabel 1. Kode Isolat Pemurniaan

Ulangan Ke-	Kode Isolat
1	BS41
	BS42
	BS43
	BS51
2	BS52
	BS53
	BS54
3	BS61
	BS62

Uji emulsifikasi

Uji emulsifikasi adalah pencampuran dua benda cair yang berbeda dan yang dapat bersatu dengan bantuan agen pengemulsi yang berupa supernatan dari bakteri. Terbetuknya emulsi menunjukkan bahwa adanya kandungan biosurfaktan pada supernatan. Nilai indeks emulsifikasi dari hasil aktivitas biosurfaktan adalah salah satu dalam menentukan pemilihan produsen biosurfaktan yang berpotensi dari bakteri (Rahayu, 2018 dalam Damayanti, 2022). Hasil indeks emulsifikasi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Grafik Indeks Emulsifikasi

Hasil uji emulsifikasi penelitian ini dari 9 isolat bakteri hanya 1 isolat bakteri yang tidak merupakan bakteri penghasil biosurfaktan, yaitu kode isolat BS54 yang memiliki indeks emulsifikasi hanya 27,7%, karena menurut pendapat Purnomohadi (2010) dalam Utamy (2021), bahwa bakteri yang menghasilkan tingkat emulsifikasi 30% sampai 80% adalah bakteri yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan. Nilai indeks emulsifikasi berasal dari hasil pembagian antara persentase tinggi lapisan emulsi dengan tinggi total larutan. Berdasarkan persentase diatas yang memiliki persentase emulsifikasi tertinggi yaitu isolat BS62 dengan presentase 42,8%, sedangkan persentase emulsifikasi terendah yaitu isolat BS41 dengan persentase 30,3%.

Uji emulsifikasi digunakan untuk mengevaluasi kapasitas biosurfaktan dalam mengemulsi cairan dengan polaritas yang bervariasi. Kemampuan molekul untuk mengemulsi minyak berbanding terbalik dengan konsentrasi surfaktan; artinya, semakin rendah konsentrasi biosurfaktan, semakin rendah indeks emulsifikasinya (Ward, 2004 dalam Ainul, 2021). Sifat surfaktan yang terbaik berasal dari indeks emulsifikasi yang tertinggi, semakin tinggi persentase indeks emulsifikasi yang didapatkan, maka semakin besar kemampuan bakteri tersebut d mendegradasi limbah minyak (Gozan, 2014 dalam Utamy, 2021).

Jenis mikroba dan lingkungan tumbuhnya, termasuk suhu, pH, sumber nitrogen dan karbon, serta parameter pertumbuhan, menentukan generasi biosurfaktan atau indeks emulsifikasi mikroba. Minyak goreng dan minyak kelapa adalah dua

contoh minyak nabati yang telah digunakan sebagai sumber karbon tambahan dalam sintesis biosurfaktan (Mahreni, 2021). Variasi kemampuan isolat bakteri individu untuk memecah minyak merupakan penyebab variasi nilai indeks emulsifikasi yang dihasilkan oleh setiap isolat (Utamy *et al.*, 2021). Akibatnya, setiap isolat menghasilkan kuantitas dan kadar biosurfaktan yang unik. Hal ini mendukung pernyataan Kurniati (2016) bahwa variasi komposisi biosurfaktan yang dihasilkan oleh setiap isolat merupakan penyebab variasi kapasitas setiap isolat untuk mendegradasi minyak (Utamy, 2021).

Kemampuan setiap mikroorganisme untuk menyerap nutrisi yang ditambahkan pada proses produksi biosurfaktan menyebabkan kualitas biosurfaktan yang didapatkan berbeda-beda (Praharyawan, 2013) dalam Ilmiati, 2022). Selain itu faktor-faktor seperti suhu dan pH juga berpengaruh pada kemampuan emulsifikasi biosurfaktan yang terbentuk. Terbentuknya emulsifikasi minyak oleh biosurfaktan terjadi disebabkan oleh adanya ikatan antara gugus *hidrofobik* dan tetes minyak seta gugus *hidrofilik* dari biosurfaktan dan membentuk struktur misel yang berukuran mikron sehingga terdispresi dalam larutan sehingga terjadi emulsifikasi minyak-biosurfaktan dan air (Suryatmana, 2006 dalam Ilmiati, 2022).

Cara kerja biosurfaktan melarutkan atau mengemulsi minyak atau hidrokarbon lainnya dengan cara mengikat bagian air dan minyak sekaligus. Gugus *hidrofilik* biosurfaktan berupa peptide yang terdiri atas tujuh macam asam amino akan mengikat air, sedangkan gugus *hidrofobik* biosurfaktan berupa lipid

yang terdiri atas 13 atom karbon akan mengikat hidrokarbon atau minyak. Akibat pengikatan dua bagian sekaligus maka air dan minyak atau hidrokarbon dapat bersatu dan membentuk misel atau emulsi yang lebih mudah larut (Reningtyas, 2015).

Manfaat biosurfaktan terhadap lingkungan yaitu, bioremediasi, menguraikan kontaminasi tumpahan minyak. Selain itu biosurfaktan juga diaplikasikan pada bidang seperti industri kosmetik, makanan, kesehatan, serta pertanian. Biosurfaktan dihasilkan dari mikroorganisme yaitu bakteri, jamur, serta ragi yang memiliki sifat dan komposisi kimia yang beragam. Sebagian besar mikroorganisme penghasil biosurfaktan terdapat pada limbah padat, cair, serta tanah yang telah terkontaminasi, sehingga substrat tersebut tidak dapat digunakan mikroorganisme lainnya. Hal tersebut membuat mikroorganisme atau bakteri penghasil biosurfaktan dapat digunakan pada pengolahan limbah industri seperti limbah cair industri kelapa sawit (Sipahutar & Mayasari, 2024).

Identifikasi Bakteri

Bakteri diidentifikasi dengan menggunakan referensi buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Edition* dan jurnal-jurnal ilmiah dengan memperhatikan karakteristik morfologi koloni bakteri, pewarnaan gram dan uji biokimia. Selain itu identifikasi bakteri pada penelitian ini juga menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk bakteri penghasil biosurfaktan yang memiliki nilai indeks emulsifikasi tertinggi.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Makroskopik dan Mikroskopik

Kode Isolat	Bentuk Koloni	Tepi Koloni	Elavasi Koloni	Warna Koloni	Bentuk Sel
BS41	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	<i>Cream</i>	<i>Basil</i>
BS42	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Cream</i>	<i>Basil</i>
BS43	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Cream</i>	<i>Basil</i>
BS51	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Cream</i>	<i>Basil</i>
BS52	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	<i>Cream</i>	<i>Basil</i>
BS53	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Cream</i>	<i>Coccus</i>
BS61	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Cream</i>	<i>Basil</i>
BS62	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Cream</i>	<i>Basil</i>

Uji biokimia

Uji biokimia yang dilakukan adalah uji

katalase, uji oksidase, uji motilitas, dan uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Identifikasi

biokimia salah satu cara untuk mengidentifikasi bakteri yang dapat dilihat dari sifat-sifat fisiologinya. Hasil pengamatan karakteristik morfologi bakteri, pewarnaan gram, dan uji biokimia diperoleh 1 isolat bakteri dari genus *Citrobacter*, 1 isolat bakteri dari genus *Enterobacter*, 2 isolat bakteri dari

genus *Escherichia*, 1 isolat bakteri dari genus *Pseudomonas*, 1 isolat bakteri dari genus *Micrococcus*, 1 isolat bakteri dari genus *Bacillus*, dan 1 isolat bakteri dengan menggunakan metode PCR merupakan spesies bakteri *Klebsiella variicola*.

Tabel 3. Hasil Uji Biokimia

Kode Isolat	Genus Bakteri/Spesies Bakteri	Uji Biokimia				
		Gram	Katalase	TSIA	SCA	Mobilitas
BS41	<i>Citrobacter</i>	Merah muda	+	+/+Gas	+	+
BS42	<i>Escherichia</i>	Merah muda	+	+/+ Gas	-	-
BS43	<i>Escherichia</i>	Merah muda	+	+/+ Gas	-	-
BS51	<i>Pseudomonas</i>	Merah muda	+	-/-	+	+
BS52	<i>Bacillus</i>	Ungu	+	+/+ Gas	+	+
BS53	<i>Micrococcus</i>	Ungu	+	+/+	+	-
BS61	<i>Enterobacter</i>	Merah muda	+	-/+	+	+
BS62	<i>Klebsiella variicola</i>	Merah muda	+	+/+ Gas	+	-

Genus *Citrobacter*

Bakteri genus *Citrobacter* berbentuk batang negatif dan koloni bulat dengan tepi rata atau flat, permukaan koloni cembung, dan warna koloni bakteri putih kekuning-kuningan. Hal ini sama dengan hasil penelitian Butar-Butar *et al.*, (2016) bakteri genus *Citrobacter* mempunyai karakteristik koloni bakteri yang berbentuk bulat dan berwarna kuning atau putih, tepian koloni bakteri rata, dan permukaan *convex*. Sel bakteri pada genus *Citrobacter* berbentuk batang gram negatif Butar-Butar *et al.*, (2016). Bakteri dari genus ini dapat memfermentasi gula, menghasilkan enzim katalase, menghasilkan gas, uji sitrat positif dan indol positif (Nur *et al.*, 2016). Hasil penelitian Fitrialia (2015), ditemukan bakteri dari genus *Citrobacter* pada limbah minyak kelapa sawit di PT. SA Wilmar Sumatera Selatan. Pada penelitian ini memperoleh 1 isolat bakteri genus *Citrobacter* dengan indeks emulsifikasi sebesar 30%.

Genus *Escherichia*

Bakteri genus *Escherichia* berbentuk batang gram negatif dan memiliki karakteristik koloni bulat berwarna putih kekuningan. Menurut Robert *et al.*, (1957), bakteri dari genus *Escherichia* mempunyai karakteristik koloni bulat berwarna putih hingga kekuningan, sel berbentuk batang gram negatif, bersifat motil atau non-motil, dapat

memfermentasi glukosa dan laktosa, serta tidak menggunakan sitrat sebagai salah satu sumber karbon dan energinya. Pada pewarnaan gram bakteri genus *Escherichia* merupakan bakteri gram negatif, bakteri gram negatif adalah bakteri dimana pada dinding selnya banyak mengandung lipopolisakarida (Firmansyah *et al.*, 2021).

Hasil penelitian Susi *et al.*, (2019) dalam Gultom (2019) memperoleh bakteri genus *Escherichia* hanya memiliki indeks emulsifikasi sebesar 18%. Pada penelitian Nadia *et al.* (2019) dalam Yolanda (2019) memperoleh bakteri genus *Escherichia* pada air limbah kolam *Anaerob* IPAL industri kelapa sawit dan memiliki nilai indeks emulsifikasi 10%. Pada penelitian ini diperoleh 2 isolat bakteri genus *Escherichia* yang memiliki nilai indeks emulsifikasi yaitu 36,5% dan 37,5%.

Genus *Pseudomonas*

Bakteri genus *Pseudomonas* berbentuk batang gram negatif dan mempunyai bentuk koloni bulat, dengan tepi koloni bakteri rata, permukaan koloni datar, dan warna koloni putih kekuning-kuningan. Hal ini sama dengan penelitian Utari (2019) bakteri genus *Pseudomonas* merupakan bakteri berbentuk bulat, tepi koloni bakteri rata, dan warna koloni putih kekuning-kuningan. Pada pewarnaan gram bakteri dari genus *Pseudomonas* merupakan bakteri gram negatif. Bakteri gram

negatif merupakan bakteri dimana pada bagian dinding selnya banyak mengandung lipopolisakarida (Firmansyah *et al.*, 2021).

Bakteri genus *Pseudomonas* dengan uji katalase positif ditandai adanya gelembung udara pada isolat bakteri, setelah diberi larutan H₂O₂ 3 %. Uji SCA bakteri *Pseudomonas* menunjukkan positif ditandai adanya perubahan warna media SCA dari hijau menjadi biru. Bakteri ini bersifat motil ditandai karena bakteri menyebar pada bekas tusukan dimedia SIM. Bakteri genus *Pseudomonas* tidak dapat memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa, hal ini dapat dilihat dari uji TSIA dimana warna pada media TSIA tidak berubah setelah diinkubasi selama 1x24 jam tetap berwarna merah.

Sejalan dengan penelitian Marta *et al.*, (2019), hasil uji biokimia yang telah dilakukan menunjukkan bakteri genus *Pseudomonas* ini mempunyai bentuk sel batang gram negatif, uji katalase positif, uji TSIA menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak dapat memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa. Pada penelitian Utari (2019) bakteri ini berbentuk *basil* atau batang gram negatif, bersifat aerob obligat, bakteri motil, hasil uji katalase positif dan tumbuh pada suhu 4°C atau dibawah suhu 43°C. Penelitian Kristina (2019) bakteri genus *Pseudomonas* ada pada sedimen perairan desa memiliki indeks emulsifikasi yang tinggi yaitu sebesar 53%. Sedangkan pada penelitian Gultom *et al.*, (2019) memperoleh bakteri genus *Pseudomonas* pada kolam tanah *gathering stasiun-eor plant* dengan nilai indeks emulsifikasi sebesar 50%. Bakteri genus *Pseudomonas* memiliki indeks sebesar 32,5%. Hal ini menunjukkan bakteri genus *Pseudomonas* penghasil biosurfaktan dan memproduksi biosurfaktan jenis *ramnolipid* (Gultom, 2019).

Genus *Bacillus*

Bakteri genus *Bacillus* berbentuk batang gram negatif dan berbentuk koloni bulat, dengan tepi rata, elevasi cembung, dan berwarna putih kekuning-kuningan. Hal ini sama dengan penelitian Utari (2019), bakteri ini memiliki karakteristik sel berbentuk batang gram positif, bentuk koloni bulat berwarna putih susu, tepian koloni rata dan bergerigi.

Bakteri yang tergolong gram positif

memiliki kandungan peptidoglikan yang tinggi pada dinding selnya (Firmansyah *et al.*, 2021). Gelembung udara pada bakteri setelah terpapar larutan H₂O₂ 3% menunjukkan hasil uji biokimia pada bakteri *Bacillus* yang menunjukkan uji katalase positif. Satu-satunya sumber karbon dan energi yang digunakan oleh bakteri dalam genus *Bacillus* adalah sitrat, seperti yang terlihat dari perubahan warna media SCA dari hijau menjadi biru. Proliferasi bakteri pada bekas tusukan di media SIM menunjukkan bahwa bakteri yang termasuk dalam spesies *Bacillus* bersifat motil. Kemampuan bakteri yang termasuk dalam genus *Bacillus* untuk memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa dalam media TSIA ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media, yang awalnya merah berubah menjadi kuning pada bagian lereng (*slant*) dan dasar (*butt*) media setelah diinkubasi selama 1x24 jam.

Bakteri dari genus *Bacillus* adalah batang gram positif, warna koloni bakteri putih susu, uji katalase dan oksidasi positif, bersifat aerobik, dapat memfermentasi glukosa, laktosa serta sukrosa, dan bakteri ini hidup pada suhu 28°C-35 °C (Holt *et al.*, 1994) dalam Martha, (2019). Bakteri ini juga menghasilkan gas dan menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi dan bersifat motil (Utari, 2019). Pada penelitian Martha *et al.*, (2019), memperoleh bakteri genus *Bacillus* pada sedimen perairan desa dengan nilai indeks emulsifikasi 42,85%. Pada penelitian Susi *et al.*, (2019), mendapatkan bakteri genus *Bacillus* pada kolam tanah *gathering stasiun-eor plant* dan memiliki nilai indeks emulsifikasi 50%. Penelitian Ainul *et al.*, (2021), menemukan bakteri genus *Bacillus* pada limbah cair perbengkelan dengan nilai indeks emulsifikasi sebesar 52,10%. Penelitian ini ditemukan 1 isolat bakteri genus *Bacillus* memiliki nilai indeks emulsifikasi sebesar 41,9%. Hal ini berarti bakteri genus *Bacillus* merupakan bakteri penghasil biosurfaktan yang terdapat di tanah maupun di perairan.

Genus *Micrococcus*

Bakteri genus *Micrococcus* berbentuk batang gram negatif mempunyai bentuk koloni bulat, dengan tepi rata, permukaan koloni datar, dan warna koloni putih kekuning-

kuningan. Bakteri genus *Micrococcus* berbentuk kokus-kokus kecil gram positif meskipun beberapa spesies tidak dapat mempertahankan pewarnaan gram sehingga ada juga genus *Micrococcus* ini merupakan gram negatif (Robert *et al.*, 1957). Bakteri ini bersifat motil dan uji katalase positif. Bagian dinding sel Bakteri gram positif banyak mengandung peptidoglikan (Firmansyah *et al.*, 2021). Hasil uji biokimia bakteri genus *Micrococcus* dengan uji katalase positif ditandai adanya gelembung udara pada isolat bakteri setelah diberi larutan H₂O₂ 3 %.

Uji SCA bakteri genus *Micrococcus* menandakan hasil positif, ditandai dengan perubahan warna media SCA, dari hijau menjadi biru. Bakteri ini bersifat non motil, hal ini ditandai tidak ada penyebaran bakteri pada bagian bekas tusukan dimedia SIM. Bakteri ini mampu memfermentasi glukosa dan laktosa, hal ini dapat dilihat dari uji TSIA dimana warna pada media TSIA berubah setelah diinkubasi selama 1x24 jam menjadi warna kuning. Hal ini sesuai dengan hasil pewarnaan gram dan uji biokimia dari Sofie (2014), bahwa bakteri genus *Micrococcus* berbentuk kokus dan gram positif, dan hasil uji TSIA bakteri genus *Micrococcus* dapat merfermentasi glukosa dan laktosa. Hasil penelitian Kurniati *et al.*, (2016) menemukan bakteri *Micrococcus* sebagai penghasil biosurfaktan pada lingkungan tercemar limbah minyak. Pada penelitian ini bakteri genus *Micrococcus* memiliki indeks emulsifikasi sebesar 36,5%. Hal ini berarti menunjukkan bahwa bakteri genus *Micrococcus* merupakan bakteri penghasil biosurfaktan.

Genus *Enterobacter*

Bakteri dari genus *Enterobacter* mempunyai karakteristik koloni bakteri yang berbentuk bulat dan berwarna kuning ataupun putih, dengan tepian rata, dan permukaan rata. Hal ini sama dengan Utari (2019) dimana bakteri *Enterobacter* mempunyai karakteristik koloni bakteri yang berbentuk bulat dan berwarna kuning atau putih, dengan tepian rata, dan permukaan rata.

Pewarnaan gram bakteri genus *Enterobacter* merupakan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif merupakan bakteri dimana pada dinding selnya banyak

mengandung lipopolisakarida (Firmansyah *et al.*, 2021). Hasil uji biokimia pada bakteri genus *Enterobacter* dengan uji katalase positif ditandai adanya gelembung udara pada bakteri setelah diberi larutan H₂O₂ 3 %. Bakteri genus *Enterobacter* merupakan bakteri yang menggunakan sitrat sebagai satu- satunya sumber karbon dan energi, dapat dilihat adanya perubahan warna pada media SCA hijau menjadi biru. Bakteri ini bersifat motil, menunjukkan hasil positif dapat dilihat dari adanya penyebaran bakteri disekitar bekas tusukan dimedia SIM (*sulfid indole motility*). Bakteri genus *Enterobacter* hanya mampu memfermentasi glukosa, ditandai dengan adanya perubahan warna media TSIA pada bagian atas (*slant*) berwarna merah dan bagian bawah (*butt*) warna kuning, setelah diinkubasi selama 1x24 jam.

Bakteri *Enterobacter* berbentuk batang, gram negatif, katalase positif, tidak menghasilkan gas, motil, dan hanya mengandalkan sitrat sebagai sumber energi dan karbon (Butar-Butar *et al.*, 2016). Bakteri genus ini hidup dengan baik pada suhu sekitar 30-37°C, dan pada pH 7-8. Pada penelitian Nurjannah (2017), memperoleh bakteri genus *Enterobacter* sebagai pendegradasi minyak solar yang didapatkan pada perairan pelabuhan Tanjung Perak dan mempunyai nilai indeks emulsifikasi 66,17%. Penelitian Gustamy *et al.*, (2021) memperoleh bakteri genus *Enterobacter* pada kolam Anaerob IPAL Industri Kelapa Sawit dan memiliki nilai indeks emulsifikasi 30% dengan nilai indeks emulsifikasi sebesar 42,2% (Gustamy, 2021).

Bakteri Spesies *Klebsiella variicola*

Hasil penelitian menunjukkan kode isolat BS62 adalah kode isolat yang memiliki indeks emulsifikasi tertinggi dan merupakan bakteri spesies *Klebsiella variicola*. Bakteri *Klebsiella variicola* mempunyai bentuk koloni bulat, tepian *entire*, permukaan rata, dan koloni berwarna putih. Hal ini sama dengan penelitian Butar-butar *et al.*, (2016) bakteri ini mempunyai bentuk koloni bulat, dengan tepian rata, permukaan rata, berwarna putih, serta sel bakteri berbentuk batang gram negatif. Bakteri *Klebsiella variicola* merupakan spesies bakteri dari famili *Enterobacteriaceae* dan genus *Klebsiella*, bakteri ini termasuk bakteri basil

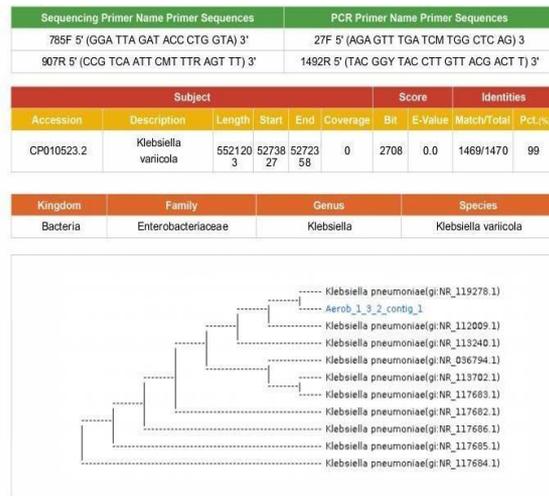
gram negatif, bersifat non-motil, dan oksidasi negatif (Green, 2021). Pewarnaan gram bakteri *Klebsiella variicola* termasuk bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif merupakan bakteri dimana pada dinding selnya banyak mengandung lipopolisakarida (Desai dan Banat, 1997).

Sel bakteri berbentuk batang gram negatif dapat menghasilkan biosurfaktan *rhamnolipid* dan jenis biosurfaktan yang banyak dipelajari (Firmansyah *et al.*, 2021). Uji biokimia bakteri *Klebsiella variicola* memiliki katalase positif, ditandai adanya gelembung udara pada bakteri, setelah diberi larutan H₂O₂ 3%. Bakteri *Klebsiella variicola* merupakan bakteri yang menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi ditandai dengan perubahan warna pada media SCA, awalnya hijau menjadi biru. Bakteri *Klebsiella variicola* bersifat non- motil, hal ini ditandai pertumbuhan bakteri hanya pada bekas tusukan dimedia SIM (*sulfid indole motility*) tidak menyebar disekitar bekas tusukan. Bakteri *Klebsiella variicola* ini dapat memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa pada media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), ditandai adanya perubahan warna dari media TSIA, awalnya warna merah berubah menjadi warna kuning pada bagian lereng (*slant*) dan dasar (*butt*) media setelah diinkubasi selama 1x24 jam.

Sejalan dengan hasil uji biokimia Irda *et al.*, (2016) pada perairan sungai Duku bahwa bakteri dari genus *Klebsiella* bersifat non motil, dapat memfermentasi laktosa dan sukrosa pada media TSIA, dan hasil reaksi uji SCA positif (Butar-Butar *et al.*, 2016). Hidrokarbon minyak bumi dapat dipecah dan dibudidayakan dalam kondisi yang terkontaminasi oleh bakteri yang termasuk dalam genus *Klebsiella*. Hidrokarbon merupakan sumber karbon lain yang dibutuhkan bakteri ini untuk aktivitas metabolismenya (Marsandi & Estungingsih, 2016). Selain itu bakteri dari genus *Klebsiella* juga ditemukan pada instalasi pengolahan limbah cair kelapa sawit pada penelitian Will Fandri (2006) dalam Sayuti (2015).

Hasil penelitian Gultom *et al.*, (2019) memperoleh bakteri dari genus *Klebsiella* pada kolam tanah *Gathering Stasion-Eor* yang menghasilkan surfaktan yang cukup baik

dengan nilai indeks emulsifikasi sebesar 46%. Pada penelitian Widyasari *et al.* (2020) memperoleh bakteri spesies *Klebsiella variicola* pada sungai yang tercemar hidrokarbon dan dapat menghasilkan biosurfaktan dan memiliki indeks emulsifikasi yang tinggi yaitu 66,48% (Widyasari, 2020). Sedangkan, penelitian ini ditemukan juga bakteri spesies *Klebsiella variicola* sebagai penghasil biosurfaktan dengan nilai indeks emulsifikasi 42,8%.



Gambar 2. Hasil Spesies Bakteri *Klebsiella variicola* menggunakan metode PCR 16SrRNA

Hasil analisis sekuen 16SrRNA kode isolat BS62 merupakan bakteri *Klebsiella variicola* yang memiliki identitas *Macth* 1469 dengan identitas total 1470, menunjukkan tingkat homogenitasnya sudah mencapai angka yang maksimum yaitu sama dengan hasil pada *Query Cover* 100% yang berarti diantara *Query* dengan sekuen database tersejajarkan. Menurut Claverie (2003) dalam Utamy (2021) dengan E-value 0,0 menunjukkan bahwa sekuens tersebut identik. Berdasarkan hasil pohon filogenetik bakteri *Klebsiella variicola* ini berkerabat dengan bakteri *Klebsiella pneumonia*, dan bakteri ini terdapat di tanah, air dan tanaman sebagian juga ada pada saluran pencernaan manusia (Green, 2021).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ditemukan 6 genus dan 1 spesies bakteri penghasil biosurfaktan pada

kolam *aerob* limbah cair kelapa sawit di PT. Perkebunan Aek Loba yaitu 1 isolat dari bakteri genus *Citrobacter*, 1 isolat bakteri dari genus bakteri *Enterobacter*, 2 isolat bakteri dari genus *Eschericia*, 1 isolat bakteri dari genus *Pseudomonas*, 1 isolat bakteri dari genus *Micrococcus*, 1 isolat bakteri dari genus *Bacillus* dan 1 spesies bakteri *Klebsiella variicola*. Berdasarkan hasil uji emulsifikasi kode isolat yang memiliki nilai indeks emulsifikasi tertinggi adalah kode isolat BS62 yang mampu mengemulsifikasi minyak sebesar 42,8% merupakan spesies bakteri *Klebsiella variicola*, sedangkan nilai indeks emulsifikasi

Ainul, Asri.,M. Hasbi., & Eko Purwanto. (2021). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Limbah Cair Perbengkelen. *Jurnal Ilmu Perairan (Aquatic Science)*. Vol 9 (1) 31-37.

Butar-Butar, I. H., Sayuti, I., & Nursal, N. (2016). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Limbah Minyak Bumi dari Perairan Pelabuhan Sungai Duku Kota Pekanbaru sebagai Rancangan Modul Pembelajaran Biologi SMA* (Doctoral dissertation, Riau University).

Damayanti, B., Sumardi, S., Arifiyanto, A., Handayani, K., Kanedi, M., Putri, M. H., & Riyanto, C. L. R. (2022). Pengaruh media pertumbuhan dan ph terhadap aktivitas biosurfaktan dari bakteri *Serratia marcescens* strain MBC 1 pada minyak jelantah. *Indonesian Journal of Chemical Analysis (IJCA)*, 5(1), 01-08.

Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), 47-64.

Firmansyah, A., Hasbi, M., & Harahap, S. (2021). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan pada Kolam Anaerob IPAL Industri Minyak Sawit. *Jurnal Sumberdaya dan Lingkungan Akuatik*, 2(1), 204-214.

Green, Lorrence H., & Emanuel Goldman. (2021). *Practical Handboool of Microbiology Fourth Edition*. U.S.: CRC Press.

Gultom, S., Hasbi, M., & Purwanto, E. (2019). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan pada Kolam Tanah Gathering Station-EOR Plant di PT. Bumi Siak

terendah adalah kode isolat BS41 yaitu genus bakteri *Enterobacter* yang mampu mengemulsifikasi minyak hanya sebesar 30%.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih peneliti ucapkan pada Program Studi Biologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara yang telah membantu peneliti dalam menyelesaikan penelitian ini.

Referensi

Pusako-Pertamina Hulu, Provinsi Riau. *Tugas Akhir. Universitas Airlangga: Surabaya*.

Hidayat, N., Meitiniarti, I., Setyahadi, S., Pato, U., Susanti, E., Padaga, M. C., ... & Purwandari, U. (2018). *Mikrobiologi industri pertanian*. Universitas Brawijaya Press.

Ilmiati, I. (2022). *Analisis Kemampuan Isolat Jamur Aspergillus Niger Dengan Penambahan Sumber Karbon Pada Media Tumbuh Dalam Menghasilkan Biosurfaktan Untuk Alternatif MEOR* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Riau).

Irda Sayuti, S. (2015). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Limbah Cair Minyak Bumi Gs Cevron Pasifik Indonesia di Desa Benar Kecamatan Rimba Melintang Rokan Hilir. SEMIRATA 2015*, 4(1).

Kristina, M. Hasbi dan Eko, P. (2021). RPH, C. R. P. H. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Limbah. *Jurnal Ilmu Perairan (Aquatic Science) ISSN*, 1693, 2862.

Kurniati, T. H. (2016). *Bakteri Penghasil Biosurfaktan Dari Lingkungan Tercemar Limbah Minyak Dan Potensinya Dalam Mendegradasi Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (Hap)* (Doctoral dissertation, IPB (Bogor Agricultural University)).

Kurniati, T. H. (2016). *Bakteri Penghasil Biosurfaktan Dari Lingkungan Tercemar Limbah Minyak Dan Potensinya Dalam Mendegradasi Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (Hap)* (Doctoral dissertation, IPB (Bogor Agricultural University)).

- Mahreni, M., Lucitasari, D. R., & Puspitasari, M. (2021). *Buku Biosurfaktan*.
- Marsandi, F., & Estuningsih, S. P. (2016). Asosiasi konsorsium bakteri *Pseudomonas pseudoalcaligenes* dan *Micrococcus luteus* dengan lamtoro (*Leucaena leucocephala* (Lamk.) De Wit) dalam upaya meningkatkan bioremediasi minyak bumi. In *Proceeding Biology Education Conference* (Vol. 13, No. 1, pp. 807-813).
- Nur, M. I., Sayuti, I., & Mahadi, I. (2016). *Isolasi Bakteri Microbial Fuel Cell Pada Limbah Cair Tahu Sebagai Sumber Energi Listrik Untuk Pengayaan Modul Mikrobiologi Dasar* (Doctoral dissertation, Riau University).
- Nurjanah, I. (2018). Uji Potensi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar Di Perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. *Skripsi. Program Studi Ilmu Kelautan Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya*.
- Reningtyas, R., & Mahreni. (2018). *Biosurfaktan. Eksergi*, Vol XII, No. 2. 2015ISSN: 1410-394X.
- Rois, M., & Fresillia, H. (2017). Strategi Pengolahan Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit di PT. AMP Plantation Jorong Tapian Kandih Nagari Salareh Aia Kecamatan Palembang Kabupaten Agam. *Tunas Geografi*, 6(2), 116-123.
- Sipahutar, L. S. H., & Mayasari, U. (2024). Isolation and Identification of Biosurfactant-Producing Bacteria in Anaerobic Palm Oil Waste Pools at PT. Aek Loba Plantation. *Jurnal Biologi Tropis*, 24(1), 141-153.
- Syukri, M., & Masyithah, Z. (2018). Sintesis Stearamida Dari Asam Stearat Dan Urea Menggunakan Pelarut Campuran: Pengaruh Temperatur Dan Waktu Reaksi. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 7(1), 5-8.
- Utamy, G. (2021). Isolasi dan identifikasi bakteri penghasil biosurfaktan pada air kolam anaerob IPAL Industri Minyak Kelapa Sawit.
- Utamy, G. (2021). Isolasi dan identifikasi bakteri penghasil biosurfaktan pada air kolam anaerob IPAL Industri Minyak Kelapa Sawit.
- Yolanda, N. (2019). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil BiOSURFAKTAN di Air Limbah Kolam Anaerob Pada IPAL Industri Kelapa Sawit. *Jurnal. Fakultas Perikanan Dan Kelautan, Universitas Riau*.
- Yuniarti, Dewi P, Komala, R. (2019). *Pengaruh Proses Aerasi Terhadap Pengolahan. Redoks*, 4, 7–16.