

## Biodegradasi Residu Wax dari Limbah Industri Batik oleh Bakteri

Daniswara Rindi Citrapancayudha, Endang Sutariningsih Soetarto \*

Program Pascasarjana Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

\*Corresponding Email: annisah-endang@ugm.ac.id

**Abstract:** Limbah cair dan semi padat dihasilkan dari proses produksi batik cap dan tulis didominasi oleh wax; senyawa *insoluble* dan sulit terdegradasi. Hanya beberapa jenis mikrobia khususnya bakteri yang mampu merombak senyawa tersebut. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan bakteri yang mampu mendegradasi wax dan mengetahui peran bakteri tersebut dalam biodegradasi residu wax. Penelitian diawali dengan isolasi dan seleksi bakteri. Seleksi isolat dilakukan berdasarkan kemampuan tumbuh pada *Mineral Salt Medium* (MSM) *Agary* yang dilengkapi dengan berbagai tipe wax (*beeswax*, paraffin, dan malam batik). Potensi degradasi isolat bakteri diukur melalui percobaan kultivasi dalam medium cair yang mengandung 0,5% wax dengan sistem sekali unduh. Aktivitas degradasi diukur berdasarkan pertumbuhan sel secara spektrofotometri ( $\lambda_{600}$  nm) dan konsentrasi gula reduksi dengan metoda DNS ( $\lambda_{540}$  nm). Isolat terpilih diidentifikasi berdasarkan karakter fisiologis dan biokimia. Hasil penelitian menunjukkan 4 bakteri mempunyai potensi sebagai pendegradasi wax. Isolat BERC 3102 memiliki potensi degradasi tertinggi karena mampu tumbuh dan mendegradasi residu malam batik dengan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) tertinggi yaitu sebesar  $0,15 \text{ jam}^{-1}$  dan waktu generasi ( $g$ ) 4,6 jam. Emulsi yang terbentuk menunjukkan aktivitas degradatif isolat BERC 3102 dengan melepaskan gula reduksi terbesar yaitu  $0,34 \text{ mg.mL}^{-1}$  dan mendegradasi residu malam batik (dalam  $5 \text{ g.L}^{-1}$  wax) sebanyak sebesar 13,61% yang didapatkan dari analisis GCMS. Hasil identifikasi dan karakterisasi menunjukkan bahwa strain BERC 3102 berbentuk batang ( $1,9 \times 0,5 \mu\text{m}$ ) bersifat gram negatif, motil, katalase positif, dan tidak dapat memfermentasi glukosa. Karakter tersebut mirip dengan *Pseudomonas*.

**Keywords:** bakteri, batik, biodegradasi, *insoluble*, limbah, *Pseudomonas*, wax

### 1. PENDAHULUAN

Aktivitas industri batik menghasilkan limbah yang mengandung pewarna dan malam (*wax*) memerlukan penanganan khusus sebelum dibuang ke lingkungan. Wax atau yang sering disebut “malam” oleh pengrajin batik terbuat dari campuran lilin parafin dan juga lilin lebah serta beberapa getah tanaman sehingga menghasilkan struktur yang sesuai untuk proses pembatikan. Wax akan dilepaskan setelah proses pembatikan sehingga residunya akan terbuang ke lingkungan sekitar. Kemampuan lingkungan secara alami masih belum mampu untuk mendegradasi limbah tersebut secara optimal karena peningkatan jumlah limbah lebih tinggi dari pada daya degradasi lingkungan yang terkontaminasi limbah tersebut. Wax merupakan penyebab terganggunya penyerapan air dalam tanah (Roper, 2005). Lingkungan yang tercemar limbah wax menyebabkan terbentuknya daerah yang hidrofobik sehingga metabolisme lingkungan terhadap bahan-bahan pencemar menjadi lambat (Franco dkk, 2000). Limbah wax dapat menutup permukaan karena sifatnya yang *insoluble* sehingga menghalangi bidang sentuh dengan air dan menghalangi oksigen untuk dapat terlarut ke dalam air (Roper, 2004). Oleh sebab itu limbah wax juga membutuhkan perhatian khusus dalam penanggulangannya. Penambahan senyawa kimia seperti pelarut dan dispersan cukup baik dalam mengatasi pengendapan wax namun mahal dan daya toksisitas tinggi (Sadeghazed dan Ghaeni, 2003). Salah satu upaya untuk menekan pencemaran oleh limbah wax adalah dengan biodegradasi oleh bakteri.

Metode ini dianggap efektif karena ramah lingkungan, tidak menimbulkan *secondary pollutant*, dan biaya relatif lebih murah dibandingkan dengan metode fisika, kimia, dan mekanis (Nitu dan Banwari, 2007). Metode konvensional ini sudah diterapkan selama beberapa dekade terakhir. Beberapa studi melaporkan bahwa beberapa strain bakteri yang diisolasi dari lingkungan alami memiliki kemampuan untuk menghasilkan biosurfaktan dalam proses biodegradasi minyak mentah rantai panjang (Etoumi, 2006).

Terdapat 6 isolat murni yang diketahui mampu mendegradasi wax dari hasil samping pengolahan minyak mentah di Libya. Dua diantaranya diketahui sebagai *Pseudomonas* sp dan *Actinomyces* sp (Etoumi, 2006). Spesies *Pseudomonas* dan *Bacilli* dilaporkan memiliki kemampuan paling efektif dalam biodegradasi hidrokarbon rantai panjang dan mencegah pengendapan wax (Lazar dkk, 1999; Pokethitiyook dkk, 2002). Mikroorganisme yang terlibat dalam lingkungan yang terpapar minyak mentah dapat hidup, muncul secara alami, non patogenik, bukan merupakan bakteri pereduksi sulfat, tidak berlendir, dan aman bagi lingkungan. Semua isolat bakteri yang ditemukan menunjukkan hasil positif terhadap uji katalase dan aerob (Lazar dkk, 1999). Membran sitoplasma bakteri biasanya menjadi lebih tebal dan adanya peleukukan ke dalam. Hal ini menunjukkan bahwa membran mengalami perkembangan sistem transport dan proses metabolisme substrat (Fox dkk, 1992).

Wax terdiri dari bermacam-macam komponen kimia yang didominasi oleh hidrokarbon rantai



panjang (Etoumi, 2006). Biodegradasi hidrokarbon biasanya terjadi pada kondisi aerob. Tahap awal degradasi hidrokarbon secara aerob adalah memasukkan molekul oksigen ke dalam hidrokarbon yang dibantu oleh enzim oksigenase. Jalur degradasi alkana yang paling umum adalah oksidasi rantai terminal (Atlas dan Bartha, 1992). Alkana dioksidasi menjadi alkohol dan aldehid, kemudian menjadi asam lemak (Cookson, 1995). Selanjutnya, metabolisme asam lemak dapat melalui jalur lipid seluler,  $\beta$ -oksidasi, dan  $\alpha$ -oksidasi. Melalui jalur  $\beta$ -oksidasi asam lemak akan diubah menjadi asetil ko-A dan masuk ke dalam siklus TCA, diubah menjadi  $\text{CO}_2$  dan energi. Bila melalui jalur  $\alpha$ -oksidasi asam lemak akan diubah langsung menjadi  $\text{CO}_2$  dan turunan lemak.

Mikroorganisme khususnya bakteri yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon yang terdapat pada *wax* disebut bakteri hidrokarbonoklastik (Davids, 1967). Bakteri tersebut mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan memanfaatkan senyawa tersebut sebagai sumber karbon dan energi yang diperlukan untuk pertumbuhan. Penelitian mengenai Biodegradasi *wax* sangat menarik karena dapat mengetahui potensi bakteri sebagai agensia bioderemediasi lingkungan yang tercemar limbah *wax*. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan bakteri yang mampu mendegradasi *wax* dan mengetahui peran bakteri tersebut dalam biodegradasi residu malam.

## 2. METODOLOGI

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah semi padat yang diambil dari bak pembuangan limbah. Mikrobia yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri hasil isolasi dari sampel. Media yang digunakan adalah *Mineral Salt Medium* (MSM) dengan komposisi ( $\text{g.L}^{-1}$ ): 2,75  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2,25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2  $\text{FeCl}_2$ ; 0,1  $\text{NaCl}$ ; 0,002  $\text{NaCl}$ ; 1 *wax*; 1 akuades. *Mineral Salt Medium Agar* dengan komposisi sama dengan MSM dan ditambahkan agar 20 g. Medium *Luria Bertani Agar* dan *Broth*. Media untuk seleksi isolat berupa MSMA tanpa tambahan *wax*, *wax* dilarutkan pada eter sebanyak 10 g/L untuk disempromkan di permukaan media. Bahan lain yang dibutuhkan yaitu alkohol 70%, spiritus, kapas, kertas label, wrapping, aluminium foil, reagen untuk pengecatan gram, eter untuk melarutkan malam, reagen *Dinitro Salisilic Acid* (DNS) untuk analisis gula reduksi. Komposisi reagen DNS ( $\text{g.L}^{-1}$ ) yaitu: 1  $\text{NaOH}$ ; 1,82 Kalium Natrium Tartat; 1 3-5-Dinitro Salisilat Acid; 0,2 fenol; 0,05 Natrium Sulfit; 0,1 Akuades.

### Pengambilan sampel malam batik (*wax*).

Pengambilan sampel dilakukan di rumah industri batik Wijirejo, Pandak, Bantul. Lokasi pengambilan sampel dilakukan di 3 rumah industri, yaitu Rumah industri TN, ER, dan TG. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah semi padat yang

berada di bak pembuangan limbah yang diduga mengandung residu malam batik (*wax*).

**Isolasi bakteri.** Sampel padat (5 g) dimasukkan ke dalam 100 mL medium MSM modifikasi malam 1% (w/v) diinkubasi secara aerobik dengan menggunakan *shaker* yang berkecepatan 180 rpm (*rotary per minute*) pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 7 hari. Pada akhir masa inkubasi, sebanyak 5 mL sampel diambil dan dimasukkan ke dalam 95 mL medium MSM modifikasi malam 1% (w/v) dan diinkubasi kembali dalam waktu yang sama. Selanjutnya pada akhir masa inkubasi, sebanyak 5 mL sampel diambil dan dimasukkan ke dalam 95 mL medium MSM modifikasi malam 1% (w/v) kemudian diinkubasi kembali selama 7 hari. Pada setiap akhir masa inkubasi pada setiap tahapan *enrichment* dibuat seri pengenceran tertentu. Sebanyak 1 mL sampel diencerkan dengan 9 mL akuades hingga pengenceran  $10^{-4}$ . Isolasi bakteri dilakukan dengan metode *spread plate* yaitu dengan menuangkan 1  $\mu\text{L}$  sampel dari pengenceran  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  ke dalam *mineral salt medium agar* (MSA) modifikasi 0,1% (w/v) *wax* dengan pengulangan dua kali. Isolat bakteri yang telah tumbuh pada koloni campuran kemudian dimurnikan. Pemurnian dilakukan dengan mengambil satu dua ose koloni terpisah kemudian diinokulasikan pada medium yang sama secara *streak plate*. Koloni bakteri yang akan tumbuh merupakan koloni murni. Kontrol yang digunakan dalam isolasi dan pemurnian adalah media yang sama yang tidak ditambahkan isolat (Benson, 2002).

### Seleksi isolat bakteri pendegradasi malam batik

- a. **Pembuatan kurva pertumbuhan isolat bakteri.** Sebanyak 1 ose isolat bakteri terpilih diinokulasikan ke dalam media Luria Bertani Broth dan diinkubasi selama 24 jam dengan asumsi jumlah sel bakteri sudah mencapai  $10^8$  CFU/mL. Pengukuran kuantitatif jumlah sel dilakukan dengan metode hitungan mikroskopik langsung menggunakan haemositometer. Setelah itu sebanyak 5% dari volume awal diambil dan dimasukkan ke dalam 95 mL MSM yang telah ditambahkan 0,5% (w/v) malam batik (*wax*). Setiap 4 jam, diambil 1 mL untuk diukur nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 600 nm hingga mencapai fase statis atau menuju kematian. Perhitungan jumlah sel dilakukan pada awal fase log dan di akhir fase log. Blanko yang digunakan adalah MSM tanpa penambahan inokulum bakteri.
- b. **Pengukuran aktivitas degradasi malam batik dengan analisis gula reduksi.** Analisis gula reduksi digunakan untuk mengukur hasil emulsifikasi malam batik yang terdegradasi. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan Erlenmeyer ukuran 250 mL yang berisi 100 mL MSM dengan 0,5% (w/v) malam sebagai satu-satunya sumber karbon. Inokulum yang sudah dipersiapkan sebelumnya diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam 95 mL MSM yang diberi tambahan malam sebanyak 0,5% (w/v).



Kontrol berupa medium yang sama yang tidak diberi inokulum. Masing-masing perlakuan diinkubasi pada *rotary shaker* (180 rpm) pada suhu 37°C. Pengukuran daya degradasi dilakukan dengan analisis gula reduksi (Miller, 1959). Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL akuades dan 3 mL reagen DNS. Larutan kemudian digojog dan dipanaskan di *waterbath* dengan suhu 100°C selama 15 menit. Setelah dingin, larutan diambil sebanyak 1 mL untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Pengukuran gula reduksi dilakukan setiap 24 jam selama 7 hari. Hasil absorbansi dibandingkan dengan kurva standar glukosa.

- c. **Analisis profil fraksi malam batik (wax).** Isolat bakteri dipilih dari isolat yang memiliki kemampuan tumbuh dan memiliki daya emulsifikasi tertinggi. Analisis dilakukan dengan menggunakan Erlenmeyer ukuran 250 mL yang berisi 100 mL MSM dengan 0,1% (w/v) malam sebagai satu-satunya sumber karbon. Starter dibuat dengan menginkubasi isolat bakteri terpilih pada medium *Luria Bertani* cair selama 24 jam dengan asumsi jumlah sel bakteri sudah mencapai  $10^8$  CFU/mL. Setelah itu sebanyak 5% dari volume awal diambil dan dimasukkan ke dalam 100 mL MSM yang telah ditambahkan 0,1% (w/v) malam batik. Kontrol berupa medium yang sama yang tidak diinokulasi dengan isolat bakteri. Masing-masing perlakuan diinkubasi pada *rotary shaker* (180 rpm) pada suhu 55°C selama 7 hari.

Sisa malam yang tidak terdegradasi diekstrak tiga kali dengan heksan pada volum yang sama. Untuk analisa kuantitatif, sebanyak 1  $\mu$ L malam (dalam 10 mL heksan) dianalisis dengan menggunakan GCMS. Profil dari fraksi malam sisa degradasi dibandingkan dengan fraksi malam yang tidak diberi inokulan bakteri.

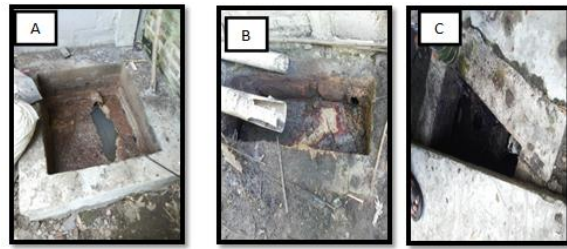
**Identifikasi dan karakterisasi.** Identifikasi dan karakterisasi isolat terpilih ditentukan dengan pengamatan makroskopis, pengamatan mikroskopis, uji motilitas, pengujian sifat biokimiawi, dan pengujian sifat fisiologis. Penentuan genus bakteri dilakukan dengan membandingkan hasil karakterisasi dengan *Bergeys's Manual of Determinative Bacteria* 9<sup>th</sup>.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Karakter limbah industri batik

Kondisi fisik pada masing-masing lokasi pengambilan sampel berbeda. Pada sampel yang diambil di rumah industri TN memiliki suhu 26°C, pH 7, BOD sebesar 359,63 mg.L<sup>-1</sup> dan COD sebesar 465,76 mg.L<sup>-1</sup>. Limbah terdiri dari limbah cair dan limbah padat. Warna limbah cair abu-abu dan warna limbah padat coklat kehitaman. Pada sampel yang diambil di rumah industri ER memiliki suhu 26°C,

pH 7, BOD sebesar 1911,52 mg.L<sup>-1</sup> dan COD sebesar 2011,45 mg.L<sup>-1</sup>. Limbah terdiri dari limbah cair dan padat namun tidak terpisah karena sangat pekat. Limbah pada rumah industri ER berwarna abu-abu kecoklatan.



Gambar 1. Lokasi sampling pada tempat pembuangan limbah industri batik: A. Rumah Industri TN, B. Rumah Industri ER, C. Rumah Industri TG

Pada sampel yang diambil di rumah industri TG memiliki suhu 28°C, pH 7, BOD sebesar 777, 86 mg.L<sup>-1</sup>, dan COD sebesar 876,25 mg.L<sup>-1</sup>. Limbah terdiri dari limbah cair dan padat. Limbah padat berwarna coklat kehitaman dan limbah cair berwarna hijau. Data kondisi fisik menunjukkan bahwa limbah seharusnya diolah terlebih dahulu sebelum dibuang ke lingkungan karena nilai BOD dan COD yang sangat tinggi. Padahal menurut Keputusan Menteri Negara kependudukan dan Lingkungan Hidup No 51/MENKLH/10/1995 tentang Baku Mutu Limbah bagi kegiatan industri, nilai standar BOD bagi industri batik di Yogyakarta maksimal berkisar 60 mg.L<sup>-1</sup> dan nilai standar COD maksimal berkisar 150 mg.L<sup>-1</sup> sehingga Limbah yang dibuang di lingkungan oleh ketiga industri batik ini dapat dikatakan telah melebihi ambang batas dari standar yang ditetapkan.

*Biological oxygen demand* (BOD) adalah jumlah oksigen yang diperlukan mikroorganisme untuk melakukan proses biorespirasi. Semakin tinggi nilai BOD maka senyawa organik yang berada di lingkungan juga semakin tinggi. Pemeriksaan tersebut didasarkan atas reaksi oksidasi (biorespirasi) senyawa organik di dalam air dan proses tersebut berlangsung karena adanya mikroorganisme. *Chemical oxygen demand* (COD) memiliki prinsip yang sama dengan BOD. Nilai COD lebih tinggi daripada nilai BOD karena uji BOD meliputi semua bahan organik, baik yang dapat diuraikan dengan mikroorganisme maupun yang tidak dapat diuraikan. Nilai COD diperlukan untuk mengetahui perbandingan jumlah limbah yang persisten dengan limbah yang *biodegradable*.

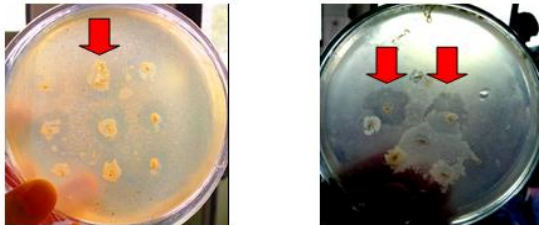
Tabel 1. Kondisi lingkungan pada lokasi pengambilan sampel wax

No.	Kode lokasi	Masa produksi (tahun)	Jumlah total limbah/hari (m <sup>3</sup> )	Kandungan wax dalam limbah (%)	Suhu (°C)	Paparan sinar matahari
1	TN	3	20-25	5-7	26	ternaungi
2	ER	8	35-40	5-7	26	ternaungi
3	TG	8	30-35	5-7	28	ternaungi

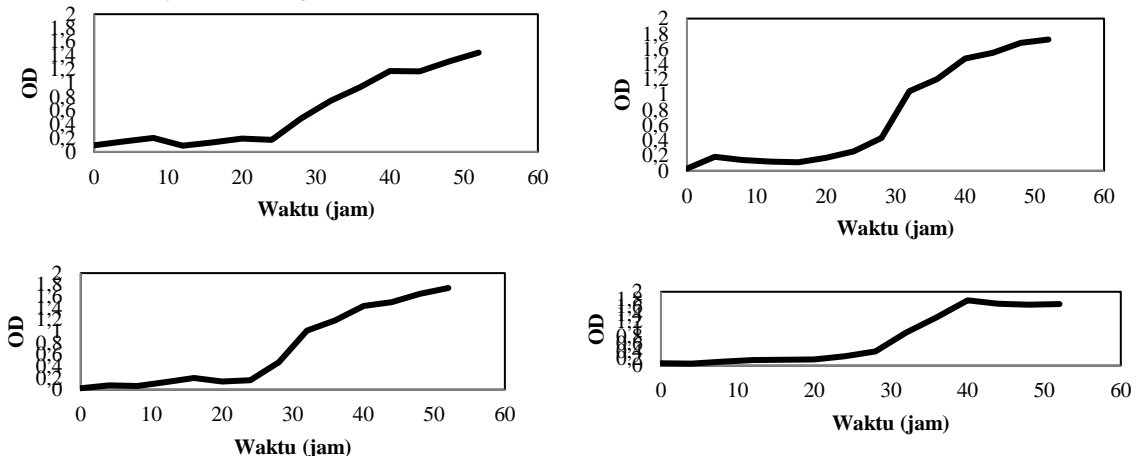
Tabel 2 Analisis fisik dan kimia limbah batik

No.	Lokasi sampling	Analisis fisik			Analisis kimia		pH
		Bentuk	Bau	Warna	BOD (mg.L <sup>-1</sup> )	COD (mg.L <sup>-1</sup> )	
1	TN	Cair dan padat	Bau malam	Abu-abu dan coklat kehitaman	359,63	465,76	7
2	ER	Lumpur	Bau busuk	Abu-abu kecoklatan	1911,52	2011,45	7
3	TG	Cair dan padat	Bau busuk	Coklat kehitaman dan hijau	777,86	876,25	7

**Seleksi isolat bakteri pendegradasi malam batik (wax).** Enam puluh tiga isolat yang telah berhasil diisolasi kemudian diseleksi secara bertahap. Seleksi dengan media yang mengandung beeswax menghasilkan 22 isolat yang mampu tumbuh. Isolat ini kemudian ditanam kembali pada media yang mengandung paraffin dan menghasilkan 13 isolat yang mampu tumbuh. Tiga belas isolat kemudian diujikan pada media yang mengandung malam batik dan didapatkan 4 isolat dengan kemampuan degradasi terbaik berdasarkan kemampuannya dalam menghasilkan zona bening.



Gambar 2. Munculnya zona bening di sekitar koloni



Gambar 3. Grafik pertumbuhan isolat bakteri dalam media MSM dan malam 0,5% (a) BTNA4102, (b) BERC3102, (c) BTGC4102, dan (d) BTGA4104

**Uji kemampuan tumbuh pada media cair**

Berdasarkan kerapatan masa (OD pada  $\lambda_{600}$  nm) menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri mampu tumbuh pada media MSM yang diberi tambahan malam batik (wax) sebanyak 0,5%. Perhitungan OD juga dapat digunakan untuk melihat pola pertumbuhan bakteri dari kurva pertumbuhannya.

Grafik pertumbuhan bakteri disajikan pada gambar 4-7. Dari grafik pertumbuhan bakteri tersebut dapat dilihat bahwa bakteri memiliki pola pertumbuhan yang berbeda-beda, namun memiliki kesamaan yaitu memasuki fase log setelah jam ke-24. Hal tersebut disebabkan bakteri membutuhkan adaptasi yang lebih lama apabila ditumbuhkan pada media yang mengandung wax.



Hasil penentuan kinetika pertumbuhan bakteri (k) ditunjukkan oleh Tabel 3. Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa isolat bakteri yang memiliki laju pertumbuhan paling tinggi adalah BERC3102 yaitu sebesar  $0,22 \text{ jam}^{-1}$ , kemudian BTGC4102 sebesar  $0,20 \text{ jam}^{-1}$ , BTNA4102 sebesar  $0,16 \text{ jam}^{-1}$ , dan BTGA4104 sebesar  $0,11 \text{ jam}^{-1}$ . Sedangkan untuk waktu generasi (g) paling kecil ditunjukkan oleh isolat BERC3102 yaitu sebesar 4,6 jam, kemudian

BTGC4102 sebesar 4,9 jam, BTNA4102 sebesar 6,2 jam, dan BTGA4104 sebesar 9,0 jam. Hal tersebut mempengaruhi konstanta pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) pada masing-masing isolat. Konstanta pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) paling tinggi adalah isolat BERC3102 yaitu sebesar  $0,15 \text{ jam}^{-1}$ , kemudian BTGC4102 sebesar  $0,14 \text{ jam}^{-1}$ , BTNA4102 sebesar  $0,11 \text{ jam}^{-1}$ , dan BTGA4104 sebesar  $0,08 \text{ jam}^{-1}$ .

Tabel 3. Kinetika pertumbuhan isolat bakteri pada medium MSM dan penambahan wax 5%

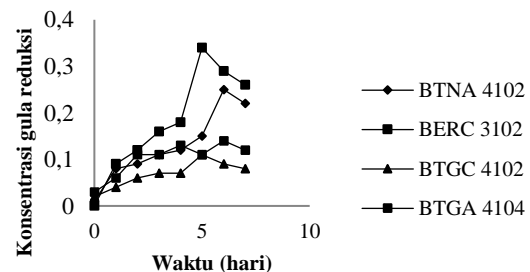
Nama isolat	Jumlah generasi (n)	Konstanta rerata Laju Pertumbuhan (k)	Waktu Generasi (g)	Konstanta pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )
BTNA4102	0,97	0,16	6,2	0,11
BERC3102	2,18	0,22	4,6	0,15
BTGC4102	1,64	0,20	4,9	0,14
BTGA4104	1,33	0,11	9,0	0,08

Isolat bakteri yang memiliki kemampuan tumbuh terbesar ditunjukkan oleh isolat yang memiliki konstanta pertumbuhan terbesar (k), waktu generasi paling cepat (g), dan konstanta pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) paling besar. Tabel 3. menunjukkan bahwa isolat bakteri yang memiliki kriteria tersebut adalah isolat BERC 3102.

### Pengukuran aktivitas degradasi malam batik dengan analisis gula reduksi.

Aktivitas biodegradasi malam batik (*wax*) dapat diukur dengan metode gula reduksi. Emulsi yang terbentuk menunjukkan adanya aktivitas degradatif ditandai dengan dihasilkannya gula reduksi. Metode gula reduksi yang digunakan adalah metoda DNS (Miller, 1959). 3,5-asam dinitrosalisilat (DNS) merupakan senyawa aromatik yang bereaksi dengan gula reduksi sampel yang memiliki gugus aldehid atau keton bebas membentuk kompleks warna 3-amino-5 dinitro asam salisilat yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 540 nm. Pengukuran kadar gula reduksi dilakukan setiap 24 jam selama 7 hari dan hasil disajikan dalam grafik.

Degradasi *wax* dimulai dengan memasukan molekul oksigen ke dalam hidrokarbon oleh enzim oksigenase. Melalui oksidasi rantai terminal alkana dioksidasi menjadi alkohol kemudian dioksidasi lagi menjadi aldehid selanjutnya menjadi asam lemak sedangkan oksidasi rantai subterminal oksigen masuk ke dalam rantai karbon membentuk alkohol sekunder yang selanjutnya menjadi keton dan akhirnya ester (Baker dan Herson, 1994).



Gambar 4. Grafik absorbansi gula reduksi asilbiodegradasi *wax*

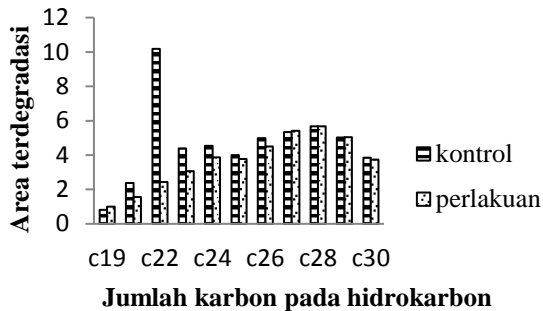
Adanya senyawa antara yaitu aldehid pada oksidasi terminal dan keton pada oksidasi subterminal menyebabkan peningkatan kadar gula reduksi dalam sampel. Kadar gula reduksi yang paling tinggi dihasilkan oleh isolat BERC3102 pada hari ke-5 (Gambar 4). Pada hari ke-6 dan ke-7 kadar gula reduksi mengalami penurunan. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa antara berupa aldehid dan keton dalam sampel sudah mengalami oksidasi dan berubah menjadi asam lemak dan ester sehingga kadar gula reduksinya menurun.

### Analisis profil fraksi.

Residu malam batik (*wax*) dengan menggunakan GCMS menunjukkan adanya perubahan fraksi *wax* yang tidak diberi inokulan dengan yang diberi inokulan bakteri sebanyak 5%. Profil fraksi malam yang muncul dari kromatogram di atas dimulai dari jumlah  $C_{19}$ - $C_{30}$ . Dari kromatogram tersebut tampak adanya penurunan jumlah hidrokarbon (Gambar 5 dan 6). Terdapat perubahan jumlah atom C pada hidrokarbon yang terdapat pada residu malam. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi biodegradasi *wax* oleh isolat BERC 3102.

Penurunan karbon pada hidrokarbon dihitung secara semi kuantitatif yaitu sebesar 13,61%. Penurunan paling drastis ditunjukkan oleh hidrokarbon

C<sub>22</sub> yaitu sebesar 76,13%. Walaupun demikian terdapat hidrokarbon yang kadarnya mengalami peningkatan yaitu C<sub>19</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, dan C<sub>29</sub>. Hal ini disebabkan karena dalam proses degradasi terdapat senyawa yang mengalami pemendekan jumlah karbon sehingga hidrokarbon dengan rantai yang lebih panjang dapat terpotong sehingga menambah jumlah karbon pada hidrokarbon yang rantainya lebih pendek. Hidrokarbon lain (C<sub>20</sub>, C<sub>21</sub>, C<sub>23</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub>, dan C<sub>26</sub>) mengalami penurunan setelah diberi inokulan.



Gambar 10. Analisis GC dari 5% w/v wax oleh isolat BERC 3102

### Karakterisasi dan Identifikasi

Identifikasi isolat yang memiliki potensi tertinggi dilakukan dengan karakterisasi sifat fisiologis dan biokimia.

Tabel 4. Uji fenotipik isolat BERC 3102

Karakter yang diamati	Isolat BERC 3102	Genus <i>Pseudomonas</i>
Morfologi koloni	Circular	Circular
Bentuk	Krem	Putih, putih
Warna koloni	Undulate	tulang, krem,
Margin		kehijauan, kecoklatan
Elevasi	Raised	Raised
Morfologi sel		
Bentuk	Batang	Batang
Reaksi gram	Negatif	Negatif
Motilitas	Motil	Motil
Penataan sel	Tunggal	Tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai yang pendek
Ukuran sel	1,9x0,5 µm	0,6 x 2 µm
Karakter biokimia	+	+
Reaksi katalase	+	+
Reaksi oksidase	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-
Indol	-	-
Fermentasi	-	-

Karakter yang diamati	Isolat BERC 3102	Genus <i>Pseudomonas</i>
karbohidrat	-	-
Glukosa	-	-
Laktosa	-	-
Manitol	-	-
Maltosa	+	+
Sukrosa	+	+/-
Simonsitrat		
Centrimide		
Agar		

Hasil karakterisasi dibandingkan dengan karakter genus dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteria 9<sup>th</sup>* (Holt et al, 1994). Dari hasil karakterisasi dan identifikasi diketahui bahwa isolat BERC termasuk ke dalam anggota genus *Pseudomonas*.

### 4. KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian adalah ditemukan empat bakteri yang mampu mendegradasi residu wax pada industri batik. Bakteri berperan dalam biodegradasi limbah wax dengan mengubah wax menjadi bentuk emulsi gula reduksi sehingga mudah terdegradasi. Hasil Identifikasi bakteri menunjukkan bahwa bakteri yang memiliki potensi biodegradasi wax terbesar merupakan anggota genus *Pseudomonas*.

### 5. DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, RM dan Bartha. 1992. *Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation*. Microbial Ecology. Vol 12. Edited by K. C. Marshall. Plenum Press, New York.
- Baker, K.H., dan Herson, DS., 1994. *Bioremediation*. McGraw-Hill. New York
- Benson, H.J., 2002. *Microbial Applications 8<sup>th</sup> Edition*. McGraw Hill. New York
- Cookson, J.T., 1995. *Biomediation Engineering: Design and Application*. Mc. Graw Hill. Inc.
- Davids, J.B., 1967. *Petroleum Microbiology*. Elsevier Publishing Co., Amsterdam
- Etoumi, A., 2006. Microbial treatment of waxy crude oil for mitigation of wax precipitation. *J. Petrol. Sci. Eng.* 55, 111-121
- Holt, et al. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup> Edition*. USA: Williams and Wilkins Baltimore.
- Fox, M.G.A., Dickinson, F.M. dan Rattedge C., 1992. Long-chain Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase Activities in *Acinetobacter calcoaceticus* HO1-N. *J. Gen Microbial.* 138, 1963-1972
- Franco, CMM., Clarke, PJ., Tate, ME., dan Oades, JM. 2000. Hydrophobic properties and chemical characterisation of natural water repellent materials in Australian sands. *J. Hydrol.* 231-232: 47-58.

- Kiyohara, H., Nagao, K dan Yana, K. 1982. *Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbon on Agar Plate*. Appl. Environ. Microbial, 43(2), 454-457
- Lazar, I., Voicu, A. Nicolescu, C., Mucenica, D., Doborata, S., Petrisor, I.G., Stefanscu, M., dan Sandulascu, L., 1999. *The Use of Naturally Occurring Selectively Isolated Bacteria for Inhibiting Paraffin Deposition*. J. Petrol. Sci. Eng. 22: 161-169
- Marino, F., 1998. *Biodegradation of Wax*. Thesis. Faculty of Graduate Studies and Research. Montreal : Department of Chemical Engineering McGill University
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Nitu S., dan Banwari L. 2007. Isolation and Characterization of a Potential Paraffin-Wax Degrading Thermophilic Bacterial strain *Geobacillus kaustophilus* TERI NSM for Application in Oil Wells with Paraffin Deposition Problems. *Chemosphere* 70: 1445-1451
- Pokethitiyook, P., Acharaporn, S., Suchart, U., dan Maleeya, K., 2002. Enhancement of *Acinetobacter calcoaceticus* in Biodegradation of Tapis crude oil. 17<sup>th</sup> WCSS. 14-21 August, Bangkok
- Roper, M.M. 2004. The isolation and characterisation of bacteria with the potential to degrade waxes that cause water repellency in sandy soils. *Aust. J. Soil Res.* 42: 427-434.
- \_\_\_\_\_. 2005. Managing soils to enhance the potential for bioremediation of water repellency. *Aust. J. Soil Res.* 43: 803-810.
- Sadeghazad, A., Ghaemi, N., 2003. *Microbial prevention of wax precipitation in crude oil by biodegradation mechanism*. Soc. Pet. Eng. SPE 80529: 1-11 National Institute of Mental Health. (1990). *Clinical training in serious mental illness* (DHHS Publication No. ADM 90-1679). Washington, DC: U.S. Government Printing Office.

**Penanya:**

Atiqa, S. Pd. (Universitas Negeri Malang)

**Pertanyaan:**

- Apakah dilakukan Aklimasi sebelum pengukuran kurva pertumbuhan?
- Apakah fase death serentak pada hari ke-8?

**Jawaban:**

- Ya, dilakukan aklimasi dalam medium LB selama 24 jam sebelum dilakukan pengukuran pertumbuhan.
- Tidak, apabila dilanjutkan masih berada dalam fase lag tapi pengukuran sudah dihentikan.

