

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI *Clostridium botulinum* PADA MINYAK JELANTAH

Asti Hanipah<sup>1</sup>, Kartika Manalu<sup>2</sup>, Rizki Amelia Nasution<sup>3</sup>  
Universitas Islam Negeri Sumatera Utara<sup>1,2,3</sup>  
hastihanipah@gmail.com

### ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui adakah bakteri *Clostridium botulinum* yang terdapat pada minyak jelantah, dan untuk melihat karakteristik bakteri *Clostridium botulinum* pada minyak jelantah. Pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri dari minyak jelantah menggunakan media blood agar, identifikasi bakteri menggunakan pewarnaan gram dan uji biokimia seperti uji gelatin, uji triple sugar iron agar (TSIA), uji simon sitrat, dan uji motility. Hasil penelitian diperoleh 2 sampel dari 3 sampel yang terdapat bakteri *Clostridium botulinum*. Bakteri ini lebih banyak terdapat pada minyak jelantah yang warnanya lebih coklat kehitaman, banyak remahan sisa makanan, dan suhu sekitar 30-55°C. Simpulan, terdapat bakteri *Clostridium botulinum* yang terdapat pada minyak jelantah. Koloni bakteri *Clostridium botulinum* berwarna abu-abu, alpha hemolitik, berbentuk melingkar hingga tidak teratur dengan tepi bergigi atau rizoid, dan permukaan datar hingga menonjol.

**Kata kunci:** *Clostridium botulinum*, Isolasi, Identifikasi, dan Minyak Jelantah

### ABSTRACT

*The aims of this study were to determine whether Clostridium botulinum bacteria were present in used cooking oil, and to look at the characteristics of Clostridium botulinum bacteria in used cooking oil. In this study, isolation of bacteria from used cooking oil using blood agar media, identification of bacteria using gram staining and biochemical tests such as gelatin test, triple sugar iron agar (TSIA) test, simon citrate test, and motility test were carried out. The results of the study obtained 2 out of 3 samples containing Clostridium botulinum bacteria. These bacteria are more common in used cooking oil, which has a more blackish brown color, lots of crumbs left over from food, and temperatures around 30-55°C. In conclusion, there is Clostridium botulinum bacteria found in used cooking oil. Clostridium botulinum colonies are grey, alpha hemolytic, circular to irregular in shape with scalloped edges or rhizoids, and flat to raised surfaces.*

**Keywords:** *Clostridium botulinum*, Isolation, Identification, Cooking Oil

## PENDAHULUAN

Makanan gorengan merupakan salah satu jenis makanan yang banyak disukai oleh masyarakat di Indonesia. Walaupun gorengan sering dianggap sebagai makanan yang kurang sehat, penggemar makanan ini tidak berkurang. Makanan yang digoreng lebih gurih dan lezat, tanpa ditambahkan bumbu apapun (Anwar, 2020).

Salah satu media memasak yang terkenal di masyarakat adalah minyak goreng. Menurut Badan Standarisasi Nasional SNI (2016), minyak goreng berasal dari bahan nabati yang mengandung trigliserida dan telah melewati proses pemurnian yang digunakan untuk menggoreng. Ada banyak macam tanaman yang digunakan sebagai sumber pembuatan minyak goreng, salah satunya adalah kelapa sawit.

Produksi minyak goreng di Indonesia mengalami peningkatan hingga 11,6% (sekitar 6,43 juta ton), sedangkan konsumsi per kapita minyak goreng sekitar 16,5 kg/tahun, khusus konsumsi minyak goreng kelapa sawit per kapita sebesar 12,7 kg/tahun. Semakin bertambahnya produksi dan konsumsi minyak goreng, jumlah minyak jelantah juga semakin meningkat (Susilawaty et al., 2017).

Berdasarkan observasi peneliti, banyak pedagang yang menggoreng makanan menggunakan minyak jelantah yang telah mengalami perubahan warna menjadi coklat kehitaman. Ketika minyak jelantah telah digunakan berulang kali untuk penggorengan, dan dikonsumsi secara terus menerus akan menyebabkan berbagai macam penyakit, misalnya infeksi bakteri (Kurniasih, 2020).

Salah satu bakteri yang terdapat pada minyak jelantah adalah *Clostridium botulinum*, yang menyebabkan penyakit botulisme (Kurniasih, 2020) Bakteri ini memakan remah-remah sisa gorengan yang terdapat pada minyak (Kurniasih, 2020) *Clostridium botulinum* adalah bakteri berbentuk batang gram positif yang motil, anaerob, dan membentuk endospora. Sporanya berbentuk oval, subterminal, dan menggembungkan sel. Bakteri ini biasanya terdapat di tanah, sporanya tersebar di lingkungan, dan terdapat di beberapa makanan kaleng (Leboffe et al., 2011). Dari pemaparan diatas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang isolasi dan identifikasi bakteri *Clostridium botulinum* pada minyak jelantah yang telah digunakan berkali-kali.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi FMIPA USU pada bulan november sampai dengan desember 2021. Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain minyak jelantah, media Blood Agar (Agar darah), media gelatin, Simon Citrat, Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Semi solid, gentian violet, lugol, alkohol, safranin dan minyak imersi.

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain botol steril, ose jarum, ose cincin, lampu bunsen, pipet tetes, objek glass, mikroskop, inkubator, rak

tabung reaksi, tabung reaksi, cawan petri, kertas label, kapas steril, aluminium foil, plastik wrap, alat tulis, dan kamera.

### **Sterilisasi Alat**

Alat-alat laboratorium yang terbuat dari kaca harus dicuci terlebih dahulu, kemudian dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas, serta pada bagian mulut wadah ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoclave untuk di sterilisasi pada suhu 121°C, dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

### **Pengambilan Sampel**

Sampel minyak jelantah diambil dari 3 pedagang gorengan di pinggir jalan. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam botol gelap steril hingga  $\frac{3}{4}$  botol, dan masing-masing botol diberi label.

### **Isolasi Bakteri**

Sampel minyak jelantah diinokulasikan ke dalam media agar darah menggunakan metode spread plate (cawan sebar), yaitu dengan menyebarkan 1 mL sampel pada media agar darah padat dalam cawan petri. Kemudian, media diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24-48 jam.

### **Pengamatan Morfologi**

Pengamatan morfologi dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang tumbuh pada media agar darah setelah diinkubasi. Bagian yang diamati meliputi bentuk koloni, permukaan, tepi, dan warna koloni. Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan mengambil koloni dari media agar darah sebanyak 1 ose, kemudian dilakukan pewarnaan gram.

### **Pemurnian Bakteri**

Koloni yang tumbuh pada media agar darah, masing-masing dilakukan pemurnian ke dalam media nutrient agar menggunakan metode streak kuadran untuk mendapatkan koloni tunggal. Media nutrient agar kemudian diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

### **Uji Biokimia**

#### **Uji Degradasi Gelatin**

Uji degradasi gelatin menggunakan media gelatin pada tabung reaksi. Koloni pada media nutrient agar diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam media gelatin. Kemudian diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya pencairan gelatin.

#### **Uji Citrat**

Koloni pada media nutrient agar diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada permukaan media Simon Citrat. Kemudian diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

### Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Koloni pada media nutrient agar diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada permukaan media TSIA. Diinkubasi kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

### Uji Motilitas

Uji ini digunakan untuk melihat pergerakan bakteri. Koloni pada media nutrient agar diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada media semisolid. Diinkubasi kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

### Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini akan dianalisis secara deskriptif kuantitatif dengan melampirkan tabel, dan gambar. Kemudian membaca jenis bakteri hasil pengujian biokimia dengan berpedoman pada buku Bergey's Determinative Bacteriology Volume 3.

## HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian yang di dapat berupa pengamatan morfologi secara makroskopik pada tabel 1, pengamatan morfologi secara mikroskopik pada tabel 2, dan pengamatan uji biokimia pada tabel 3.

**Tabel 1. Pengamatan morfologi secara makroskopik**

No.	Sumber isolat	Kode isolat	Ukuran	Bentuk	Permukaan	Warna	Tepi
1	Sampel 1 (S1)	S1 SP1	Sedang	Irregular	Datar	Abu-abu	Rhizoid
2	Sampel 1 (S1)	S1 SP2	Sedang	Irregular	Datar	Abu-abu	Rhizoid
3	Sampel 1 (S1)	S1 SP3	Kecil	Irregular	Datar	Abu-abu	Rhizoid
4	Sampel 2 (S2)	S2 SP1	Besar	Irregular	Datar	Abu-abu	Rhizoid

**Tabel 2. Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik**

No.	Kode isolat	Bentuk sel	Sifat gram	Spora
1	S1 SP1	Basil	Positif	-
2	S1 SP2	Basil	Positif	-
3	S1 SP3	Basil	Positif	+
4	S2 SP1	Basil	Positif	+

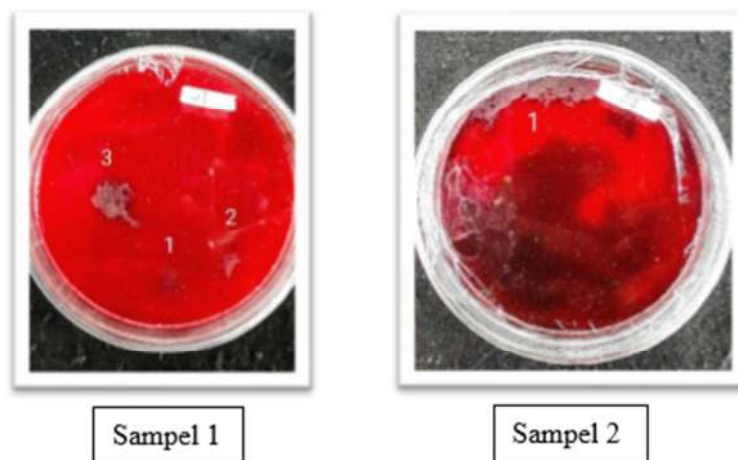
**Tabel 3. Pengamatan Uji Biokimia**

No	Jenis uji biokimia	Kode isolat			
		S1 SP1	S1 SP2	S1 SP3	S2 SP1
1	Gelatin	-	-	+	+
2	TSIA	K/A H <sub>2</sub> S -	A/K H <sub>2</sub> S -	K/A H <sub>2</sub> S +	K/A H <sub>2</sub> S +
3	Simon Citrat	-	-	-	-
4	SIM	+	-	-	-
	Jenis bakteri	-	-	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>

**Keterangan reaksi biokimia:** 1. Uji gelatin: (+) Mencair, (-) Beku 2. Uji TSIA: (A) Kuning, (K) Merah, (H<sub>2</sub>S+) Endapan hitam, (H<sub>2</sub>S-) Tidak terbentuk endapan hitam 3. Uji Sitrat: (+) Warna biru, (-) Selain warna biru 4. Uji Motility: (+) Menyebar, (-) Tidak menyebar.

## PEMBAHASAN

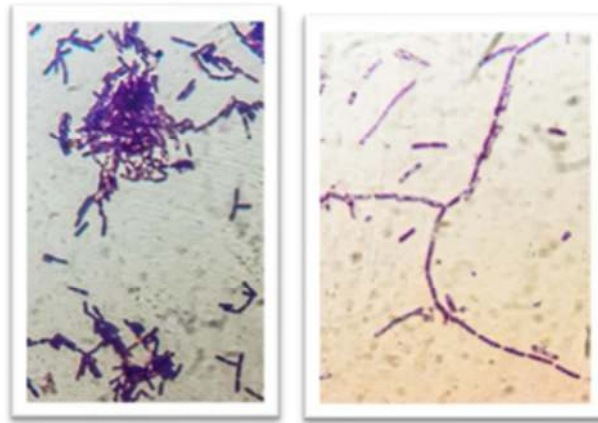
Berdasarkan tabel 1, koloni yang tumbuh pada media agar darah setelah diinkubasi selama 24 jam terdapat empat jenis koloni pada dua sampel minyak jelantah yang di ambil dari pedagang gorengan. Untuk dua sampel lainnya tidak ada koloni yang tumbuh. Koloni pada sampel 1, isolat (S1 SP1) memiliki ciri-ciri makroskopik yaitu ukuran sedang, bentuk irreguler (tidak beraturan), permukaan datar, warna abu-abu dan tepi rhizoid (tepi bergerigi). Koloni pada sampel 1, isolat (S1 SP2) mempunyai ciri-ciri makroskopik dengan ukuran sedang, bentuk irreguler (tidak beraturan), permukaan datar, warna abu-abu dan tepi rhizoid (tepi bergerigi). Koloni sampel 1, pada isolat (S1 SP3) dengan ciri-ciri makroskopik yaitu ukuran yang kecil, bentuk irreguler (tidak beraturan), permukaan datar, warna abu-abu dan tepi rhizoid (tepi bergerigi). Sedangkan pada koloni sampel 2, isolat (S2 SP1) memiliki ciri-ciri makroskopik dengan ukuran besar, bentuk irreguler (tidak beraturan), permukaan datar, warna abu-abu dan tepi rhizoid (tepi bergerigi). Untuk gambar pengamatan morfologi secara makroskopik dapat dilihat pada gambar 1.



**Gambar 1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni secara Makroskopik pada Media Blood Agar**

Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik sesuai dengan buku Bergey's Manual of Systematic Bacteriology edisi kedua volume ketiga tahun 2009, yaitu koloni berwarna abu-abu, berbentuk melingkar hingga tidak teratur dengan tepi bergigi atau rizoid, permukaan koloni datar hingga menonjol, dan koloni bersifat hemolitik. Pada penelitian Toelle et al. (2015), koloni pada media blood agar menghasilkan alpha hemolitik.

Berdasarkan tabel 2, setelah dilakukan pewarnaan gram untuk melihat bentuk dan sifat gram pada bakteri diperoleh isolat S1 SP1 dan S1 SP2 memiliki bentuk basil gram negatif, dan tidak memiliki spora pada ujungnya, isolat ini tidak termasuk bakteri *Clostridium botulinum*. Isolat S1 SP3 dan S2 SP1 berbentuk basil gram positif, dan terdapat spora pada salah satu ujungnya, isolat ini termasuk bakteri *Clostridium botulinum*. Berikut ini adalah pengamatan bakteri *Clostridium botulinum* secara mikroskopik setelah dilakukan pewarnaan gram. Untuk gambar hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik dapat dilihat pada gambar 2.



**Gambar 2. Pengamatan Morfologi Bakteri *Clostridium Botulinum* secara Mikroskopik**

Hasil pengamatan mikroskopik sesuai dengan buku Bergey's Manual of Systematic Bacteriology edisi kedua volume ketiga tahun 2009, yaitu bakteri berbentuk batang (basil) gram positif, dan membentuk endospora oval atau bulat yang biasanya menggembungkan sel. Pada penelitian Toelle et al. (2015), bakteri *Clostridium botulinum* berbentuk batang berspora dan gram positif.

Berdasarkan tabel 3, setelah dilakukan penanaman pada media uji biokimia yaitu gelatin, triple sugar iron agar (TSIA), simon sitrat, dan sulfie indol motility (SIM), diperoleh hasil pada isolat S1 SP1: uji gelatin negatif yang ditandai dengan tidak mencairnya gelatin, uji simon sitrat negatif yang ditandai dengan warna hijau, uji TSIA K/A H<sub>2</sub>S (-) yang berarti bakteri hanya memfermentasikan glukosa dan tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S, uji motility positif yang ditandai dengan menyebarnya bakteri pada media SIM. Berdasarkan pengamatan uji biokimia ini, bakteri yang diidentifikasi dari isolat S1 SP1 bukan *Clostridium botulinum*. Pada isolat S1 SP2: uji gelatin negatif karena media tetap beku, uji simon sitrat negatif yang ditandai dengan warna hijau, uji TSIA A/K H<sub>2</sub>S (-) artinya bakteri bersifat basa dan tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S, uji motility positif yang

ditandai dengan menyebarnya bakteri pada media. Berdasarkan hasil pengamatan uji biokimia ini, bakteri yang diidentifikasi dari isolat S1 SP2 bukan bakteri *Clostridium botulinum*.

Pada isolat S1 SP3: uji gelatin positif yang ditandai dengan media yang mencair, uji simon sitrat negatif yang ditandai dengan warna hijau, uji TSIA K/A H<sub>2</sub>S (+) yang artinya bakteri dapat memfermentasikan glukosa saja dan menghasilkan H<sub>2</sub>S, uji motility positif karena bakteri menyebar pada media SIM. Berdasarkan hasil pengamatan uji biokimia ini, bakteri yang diidentifikasi dari isolat S1 SP3 adalah *Clostridium botulinum*. Pada isolat S2 SP1: uji gelatin positif yang ditandai dengan mencairnya media gelatin, uji simon sitrat negatif karena warnanya yang hijau, uji TSIA K/A H<sub>2</sub>S (+) yang berarti bakteri hanya memfermentasikan glukosa dan menghasilkan H<sub>2</sub>S, serta motility positif. Berdasarkan hasil pengamatan uji biokimia ini, bakteri yang diidentifikasi adalah *Clostridium botulinum*. Hasil uji biokimia sesuai dengan buku Bergey's Manual of Systematic Bacteriology edisi kedua volume ketiga tahun 2009, yaitu bakteri *Clostridium botulinum* dapat mencerna gelatin dan menghasilkan H<sub>2</sub>S (endapan hitam pada media triple sugar iron agar). Bakteri ini dapat memfermentasikan glukosa, tidak dapat memfermentasikan laktosa, tidak dapat menghasilkan sitrat, dan bersifat motil atau nonmotil.

*Clostridium botulinum* merupakan bakteri berspora berbentuk batang (basil) dan bakteri gram positif. Bakteri ini termasuk kedalam golongan anaerob obligat, yaitu bakteri yang tidak dapat tumbuh pada kondisi yang terdapat oksigen. Dengan kata lain, bakteri ini dapat tumbuh pada kondisi lingkungan yang tidak ada oksigen. Selama sporulasi, *Clostridium botulinum* menghasilkan neurotoxin yang terjadi pada lingkungan anaerob. Bakteri ini menghasilkan spora ketika berada dalam kondisi yang tidak menguntungkan untuk menjaga kelangsungan hidupnya (Setiarto & Marni, 2021).

Berdasarkan suhu pertumbuhan bakteri dibagi menjadi 3, yaitu bakteri psikotropik (suhu optimum sekitar 14-20°C, dan dapat tumbuh lambat pada suhu 4°C), bakteri mesofilik (suhu optimum sekitar 30-37°C), dan bakteri termofilik (suhu optimum sekitar 45-60°C) (Boing et al., 2019). Bakteri *Clostridium botulinum* tergolong kedalam bakteri termofilik, karena bakteri ini mempunyai spora yang dapat berkembang pada suhu hangat sehingga dapat menyebabkan kebusukan pada makanan (Fatma et al., 2021). Dari ketiga sampel minyak jelantah, memiliki suhu yang berbeda. Pada sampel 1, minyak jelantah memiliki suhu ruangan yaitu sekitar 30-37°C. Pada sampel 2, suhu minyak jelantah sekitar 45-55°C (hangat). Sedangkan pada sampel 3, minyak jelantah memiliki suhu diatas 60°C (masih panas).

Berdasarkan hasil penelitian Derman et al. (2011), bakteri *Clostridium botulinum* dapat hidup pada suhu optimum 10°C dan suhu maksimum 40°C, paling banyak terdapat pada suhu sekitar 36-40° (Derman et al. 2011). Menurut UCBS Science Line dalam buku Gabriela (2018), bakteri *Clostridium botulinum*

tidak mudah dimatikan jika hanya dilakukan proses pemanasan biasa. Efek racun yang ada pada bakteri akan hilang jika dididihkan selama 10 menit, akan tetapi sporanya belum mati. Spora bakteri ini akan mati jika dipanaskan pada suhu diatas 120°C selama 30 menit (Gabriela, 2018).

Spora bakteri *Clostridium botulinum* memiliki daya tahan yang dipengaruhi oleh tingkat keasaman (pH), NaCl, antibiotik, kondisi lembab, dan lingkungan berlemak. Tingkat keasaman minimum sekitar pH 4,9 dan maksimum sekitar pH 6,3-6,9. Penambahan lemak yang terjadi ketika pemanasan, dapat mempengaruhi daya tahan spora dan dapat menurunkan kelembaban. Oleh karena itu, makanan kaleng dengan minyak akan menyebabkan spora bakteri ini tahan lebih lama terhadap pemanasan karena spora akan terselimuti oleh minyak. Minyak jelantah mengandung asam lemak jenuh yang memiliki ikatan rantai panjang yang dapat meningkatkan daya tahan spora bakteri *Clostridium botulinum*. Spora bakteri ini juga memerlukan suhu yang hangat, sumber protein, lingkungan anaerob dan lembab agar spora dapat aktif dan memproduksi toksin. Kondisi seperti ini dapat terbentuk secara alami dengan adanya proses dekomposisi hewan dan tumbuhan (Murwani et al., 2017).

## SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa terdapat bakteri *Clostridium botulinum* yang terdapat pada minyak jelantah. Koloni bakteri *Clostridium botulinum* berwarna abu-abu, alpha hemolitik, berbentuk melingkar hingga tidak teratur dengan tepi bergigi atau rizoid, dan permukaan datar hingga menonjol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, E., N. 2020. "Pemeriksaan Bilangan Peroksida pada Minyak Goreng yang Sudah Dipakai Beberapa Kali oleh Penjual Gorengan di Simpang Empat Pagar Dewa Kota Bengkulu." *Jurnal Ilmiah Pharmacy* 7(1): 45–58.
- Badan Standardisasi Nasional. 2016. Minyak goreng SNI 3741:2013. <http://lib.kemenperin.go.id/neo/detail.php?id=231088>
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology edisi kedua volume ketiga tahun 2009
- Boing, A., Dase, H., Dede, R.A., Eko, H.P., Elvira, S., Feri, K., Nur, W., & Purwiyatno, H. 2019. *Landasan Teknik Pangan*. Bogor: IPB Press.
- Derman, Yagğur, Miia Lindström, Katja Selby, and Hannu Korkeala. 2011. "Growth of Group II *Clostridium Botulinum* Strains at Extreme Temperatures." *Journal of food protection* 74(11): 1797–1804.
- Fatma, F., Indah, N., Umar, H.A.H., Mila, S., Seri, A.M., Niken, B.A., Nila, P.S., dan Ichsan. 2021. *Sanitasi Makanan dan Minuman*. Medan: yayasan kita menulis.
- Gabriela, I. 2018. *100+ MPASI Hits Instagram Pilihan Mommy*. Jakarta Selatan:



Visimedia Pustaka.

- Kurniasih, E. 2020. *Merancang Energi Masa Depan Dengan Biodiesel*. Yogyakarta: ANDI.
- Leboffe, Michael, J., dan Burton, E.P. 2011. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. Amerika: Morton Publishing.
- Murwani, S., Dahliatul, Q., dan Indah, A.A. 2017. *Penyakit Bakterial pada Ternak Hewan Besar dan Unggas*. Malang: UB Press.
- Setiarto, H.B., dan Marni. 2021. *Pengantar Kuliah Mikrobiologi Klinis*. Jawa Barat: Guepedia.
- Susilawaty, Andi, Hasbi, I., & Ugi, N, T. 2017. “Pemanfaatan Minyak Jelantah dengan Tambahan Ekstrak Daun Cengkeh (*Zyzygium Aromaticum*) sebagai Sabun Antiseptik dalam Menurunkan Jumlah Kuman pada Telapak Tangan.” *HIGIENE: Jurnal Kesehatan Lingkungan* 3(1): 15–21.
- Toelle, Neliyani, N., & Rumlaklak, Y, Y. 2015. “Karakteristik Bakteri yang di Isolasi dari Darah Rusa Timor (*Cervus Timorensis*) di Kota Kupang.” *Jurnal Kajian Veteriner* 3(1): 71–75.