

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK  
ISOLAT A3 DAN S3 DARI AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT  
LAPINDO SIDOARJO**

**LAPORAN SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh:

**QORINA ILMANIAR DEWANTISARI  
NIM. 0910830054**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2014**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK  
ISOLAT A3 DAN S3 DARI AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT  
LAPINDO SIDOARJO**

**LAPORAN SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana  
pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya Malang**

Oleh :

**QORINA ILMANIAR DEWANTISARI  
NIM. 0910830054**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2014**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK  
ISOLAT A3 DAN S3 DARI AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT  
LAPINDO SIDOARJO**

Oleh :

**QORINA ILMANIAR DEWANTISARI  
NIM. 0910830054**

Telah dipertahankan di depan penguji  
pada tanggal 05 Februari 2014  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

SK Dekan No. :

Tanggal :

Dosen Penguji I

(Eko Waluyo, S.Pi, M.Sc)  
NIP. 19800424 200501 1 001  
Tanggal : .....

Dosen Penguji II

(Ir. Yahya, MP)  
NIP. 19630706 199003 1 003  
Tanggal : .....

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D)  
NIP. 19640919 098903 1 002  
Tanggal : .....

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MP)  
NIP. 19550503 198503 2 001  
Tanggal : .....

Mengetahui,  
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)  
NIP. 19600322 198601 1 001  
Tanggal: .....

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar - benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Februari 2014  
Mahasiswa,

Qorina Ilmaniar Dewantisari  
0910830054

## RINGKASAN

**Qorina Ilmaniar Dewantisari (0910830054).** Skripsi tentang Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Isolat A3 dan S3 Dari Air Lumpur dan Sedimen Padat Lapindo Sidoarjo, dibawah bimbingan **Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D** dan **Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MP.**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi LSIH (Laboratorium Sentral Ilmu Hayati), Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Pada Bulan Oktober 2012-September 2013. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pendugaan jenis bakteri termofilik yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo dengan melihat sifat morfologi dan fisiologinya dan sebagai informasi awal terhadap penelitian selanjutnya tentang aktivitas enzim termostabil terhadap industri perikanan yang dihasilkan oleh bakteri termofilik.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan utama yang terdiri dari air dan sedimen, media pertumbuhan yang meliputi Nutrient Agar (NA), Mc conkey agar dan Nutrient Broth (NB, media uji biokimia yang meliputi simon sitrat agar, MR-VP broth, Sulfit Indol Motility Agar, tripton sugar iron agar, urea agar, nitrat broth, reagen uji biokimia yang meliputi KOH 3%, *Metyl Red*, kovac, *a*-naftol, mineral oil, TDA, reagen pewarnaan gram yang terdiri dari kristal ungu,iodin, aseton, alkohol 70%, bahan tambahan yang terdiri dari *blue tip* spiritus, kertas whattman no.42, sarung tangan, masker dan kertas saring, serta bahan tambahan yang digunakan untuk uji logam berat yang terdiri dari HCl, HNO<sub>3</sub>, Amonium persulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaIO<sub>4</sub>, diphenyl karbazid, dan dimethyl gliaksim.

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif, yaitu mengumpulkan data dengan melakukan penelitian. Penelitian diawali dengan uji lingkungan lumpur lapindo Sidoarjo yang meliputi suhu, pH, salinitas dan logam berat untuk mengetahui kondisi lingkungan isolat bakteri, kemudian dilakukan tahapan kultur sampai isolasi dan pendugaan identifikasi bakteri melalui karakterisasi morfologi yang meliputi uji morfologi koloni dan pewarnaan gram dan fisiologi isolat bakteri serta uji biokimia yang meliputi uji MR, uji VP, uji SIM, uji nitrat, uji urease, uji simon sitrat, dan uji TSIA kemudian dilanjutkan untuk mengetahui pendugaan species isolat dengan *microbact identification kits*. Serta mengetahui peranan bakteri termofilik dalam industri pengolahan hasil perikanan.

Hasil identifikasi bakteri termofilik yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo menurut hasil uji biokimia didapatkan pendugaan genus *Pseudomonas sp.* Untuk kedua sampel. Untuk hasil uji *microbact identification kits* didapatkan hasil pendugaan spesies untuk kedua sampel adalah *Pseudomonas pseudomallei* dengan persentase ketepatan sebesar 99,48%. Dari hasil diatas dibandingkan dengan hasil identifikasi menggunakan uji DNA 16S-rDNA yang dilakukan oleh Prof.Ir. Sukoso M.Sc Ph.D didapatkan hasil untuk sampel air adalah *Pseudomonas stutzeri* dan untuk sampel sedimen adalah *Bacillus niabensis*. Bakteri tersebut mampu hidup di lingkungan yang kadar salinitas dan logam beratnya cukup tinggi serta mampu menghasilkan enzim kitinase yang berperan dalam proses pengolahan kitin menjadi kitosan yang dapat digunakan dalam industri pangan. Disarankan perlu adanya penelitian lanjutan aktivitas enzim termostabil yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas pseudomallei* yang dapat bermanfaat pada industri pengolahan hasil perikanan..

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK ISOLAT A3 DAN S3 DARI AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT LAPINDO SIDOARJO dapat terselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih kami sampaikan kepada :

1. Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D selaku Dosen Pembimbing I, dan Dr. Ir. Kartini Zaelani M.P selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Laboratorium Sentral Ilmu Dan Hayati Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Orangtua ku tercinta, *my best team* Pina dan Hapiz, teman-teman THP angkatan '09, *my someone* yang selalu mendoakan dan mendukung dalam proses penyelesaian skripsi ini,

Semoga Allah SWT. memberikan balasan yang lebih atas jasa dan kebaikan mereka. Penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan dalam laporan ini, semoga bisa dijadikan maklum. Semoga dapat bermanfaat bagi khususnya bagi penulis dan bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Februari 2014

Qorina Ilmaniar D.

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>RINGKASAN</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	viii
<b>1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Kegunaan Penelitian .....	4
1.5 Tempat dan Waktu .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Bakteri .....	5
2.2 Kultivasi Bakteri .....	7
2.3 Faktor Pertumbuhan Bakteri .....	8
2.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	9
2.5 Bakteri Termofilik .....	12
2.6 Macam-Macam Bakteri Termofilik .....	13
2.7 Siklus Hidup Bakteri Termofilik .....	16
2.8 Habitat Bakteri Termofilik .....	17
2.9 Pengertian Enzim .....	18
2.10 Enzim Termostabil .....	20
2.11 Isolasi dan Inokulasi Bakteri .....	20
2.11.1 Cara Pengenceran ( <i>Dilutions</i> ) .....	21
2.11.2 Cara Penuangan ( <i>Pour Plate</i> ) .....	22
2.11.3 Cara Penggoresan ( <i>Streak Plate</i> ) .....	23
2.11.4 Cara Penyebaran ( <i>Spread Plate</i> ) .....	24
2.11.5 Cara Pengucilan Sel Tunggal ( <i>Single Cell Isolation</i> ) .....	24
2.12 Uji Identifikasi Bakteri .....	25
2.13 Uji Identifikasi Bakteri Dengan 16S-rDNA .....	33
2.14 Parameter Fisik dan Kimia Lingkungan .....	35
2.15 Definisi <i>Mud Volcano</i> .....	38
2.16 Air .....	39
2.17 Sedimen .....	40
2.18 Salinitas Perairan .....	41
2.19 Pengujian Logam Berat .....	42
<b>3. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	45
3.2 Materi Penelitian .....	45
3.2.1 Bahan Penelitian .....	45
3.2.2 Alat Penelitian .....	46
3.3 Metode Penelitian .....	47
3.4 Prosedur Penelitian .....	48

3.4.1 Pengambilan Sampel Air dan Sedimen .....	49
3.4.2 Pengukuran Parameter Fisika .....	49
3.3.3 Parameter Kimia .....	50
3.3.4 Tahap Persiapan Media .....	55
3.3.5 Tahap Persiapan Sampel dan Pengenceran .....	55
3.3.6 Tahap Kultur Bakteri .....	56
3.3.7 Tahap Isolasi Bakteri .....	56
3.3.8 Uji Identifikasi Bakteri .....	56
3.3.9 Uji Biokimia .....	57
3.3.10 Uji <i>Microbact Identification Kits</i> .....	60
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Kondisi Lingkungan Pengambilan Sampel .....	63
4.2 Karakterisasi Bakteri .....	69
4.2.1 Sifat Morfologi .....	70
4.2.2 Sifat Fisiologi .....	72
4.3 Pendugaan Jenis Bakteri .....	80
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan .....	83
5.2 Saran .....	83
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>84</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>90</b>



## DAFTAR TABEL

## Tabel

1. Suhu Pertumbuhan Bakteri.....	8
2. Pewarnaan Gram.....	26
3. Reaksi-Reaksi yang Terjadi Pada Uji Media TSIA .....	27
4. Kelompok Bakteri Berdasarkan Temperatur .....	37
5. Komposisi Bahan Pembuat Media <i>Nutrient Agar</i> .....	55
6. Data Uji Lingkungan Lumpur Lapindo .....	63
7. Data Kadar Logam Berat .....	65
8. Morfologi Koloni Bakteri Yang Terpilih Untuk Isolasi .....	70
9. Hasil Pengamatan Morfologi Sel Bakteri .....	71
10. Hasil Uji Biokimia Bakteri .....	73
11. Hasil Pendugaan Jenis Bakteri .....	81



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	10
2. Cara Pengenceran.....	22
3. Cara Penuangan ( <i>Pour Plate</i> ).....	23
4. Metode Penggoresan ( <i>Streak Plate</i> ).....	24
5. Cara Penyebaran ( <i>Streak Plate</i> ).....	24
6. Reaksi Fermentasi Sitrat Secara Enzimatik.....	38
7. Reaksi Fermentasi Glukosa Pada Media MR.....	29
8. Reaksi Fermentasi Glukosa Dalam Medium VP.....	29
9. Deteksi Senyawa Asetilmetilkarbinol.....	30
10. Reaksi Dalam Biakan Urease.....	31
11. Reaksi Oksidasi Triptofan Oleh Enzim Triptofanase.....	31
12. Reaksi Indol Dengan Pereaksi Kovac.....	32
13. Lokasi Pengambilan Sampel.....	48
14. Pengukuran Suhu Dengan Termometer.....	49
15. Refraktometer.....	50
16. Pengujian Logam Berat Dengan AAS.....	51
17. Pengujian Logam Berat Dengan Spektrofotometer.....	54
18. Koloni Dari Air Yang Telah Diisolasi.....	70
19. Koloni Dari Sedimen Yang Telah Diisolasi.....	70
20. Hasil Pewarnaan Gram Isolat A3.....	72
21. Hasil Pewarnaan Gram Isolat S3.....	72

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian.....	90
2. Pengambilan Sampel.....	91
3. Pengukuran Parameter Fisika dan Kimia.....	92
4. Kultur Bakteri Dominan.....	97
5. Isolasi Bakteri Target.....	99
6. Uji Karakterisasi Bakteri.....	100
7. Pembuatan Blanko (Kontrol Negatif).....	108
8. Hasil Uji Identifikasi Bakteri.....	109
9. Hasil Analisa Logam Berat.....	112
10. Hasil Pengukuran Salinitas Dengan Refraktometer.....	113
11. Data Pengambilan Sampel Air Lumpur dan Sedimen Padat.....	113



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bakteri yang hidup di daerah-daerah geothermal, yang dikenal dengan sebutan bakteri termofilik telah banyak mengundang daya tarik para ilmuwan karena enzim yang dihasilkan bersifat tahan terhadap panas dan mampu mengkatalisis berbagai reaksi dengan cepat pada suhu tinggi (Sugiyono *et al.*, 2013). Di Indonesia, penelitian mengenai bakteri termofilik mulai mendapatkan perhatian. Beberapa bakteri termofilik isolat lokal telah berhasil diisolasi dari sejumlah tempat. Beberapa bakteri termofilik yang berhasil diisolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia antara lain *Geobacillus thermoleovorans* yang tumbuh pada suhu 43 – 75 °C dari sumber air panas kawah Wayang, Pangelangan (Indrajaya *et al.*, 2003). Selain itu bakteri *Geobacillus thermoleovorans* juga ditemukan di sumber air panas Gunung Pancar, Bogor dengan suhu tumbuh antara 42 – 70 °C (Dirnawan *et al.*, 2000). Penelitian mengenai pemetaan bakteri termofilik di Indonesia juga dilakukan oleh Muharni (2010) yang menemukan bakteri *Bacillus* sp dalam sampel air panas Danau Ranau Sumatera Selatan dan dilakukan (Asnawi, 2006) yang menemukan 8 genus bakteri dalam sampel air panas Pacet, yaitu *Bacillus* sp, *Acetogenium* sp, *Thermus* sp, *Pseudomonas* sp, *Thermodesulfobacterium* sp, *Thermotrix* sp, *Sulfobacillus* sp, dan *Thermomicrobium* sp. Biodiversitas ini dipengaruhi oleh perbedaan kondisi seperti pH, temperatur, ketersediaan air, cahaya dan oksigen, serta jenis dan jumlah nutrien dalam suatu habitat (Madigan *et al.*, 1991). Menurut klasifikasi fisiologis yang dibuat Gilter dijelaskan bahwa organisme termofil memiliki suhu minimum untuk hidupnya sebesar 45<sup>o</sup>C, optimum 55<sup>o</sup>C dan maksimum 70<sup>o</sup>C. Bakteri termofilik merupakan bakteri yang terdapat pada sumber air panas ataupun lapisan bagian paling atas permukaan

tanah. Bakteri termofil merupakan kelompok organisme yang dapat ditemukan di lingkungan yang sangat bervariasi kondisinya serta tetap eksis pada suhu tinggi dengan sifat obligat, fakultatif maupun termotoleran. Spesies termofil paling banyak ditemukan pada kelompok bakteri yang dapat tetap hidup pada keadaan aerob, aerob fakultatif, dan anaerob (Sianturi, 2008). Pengisolasian bakteri termofilik dari beberapa habitatnya dengan tujuan penggunaan bakteri dan enzim termostabil yang dihasilkannya untuk diterapkan dalam dunia industri semakin intensif (Madigan *et al.*, 2000)

Enzim termostabil memungkinkan terjadinya proses pada suhu tinggi, yang jelas menguntungkan sebab memiliki reaktifitas, stabilitas, dan hasil yang lebih tinggi. Isolasi enzim termostabil dari organisme termofilik memiliki sejumlah keuntungan secara komersial karena kestabilitasnya. Keuntungan bioproses yang berlangsung pada suhu tinggi adalah kecepatan difusi yang lebih tinggi, menurunkan viskositas substrat, kecepatan reaksi lebih tinggi, meningkatkan kelarutan reaktan, dan mengurangi risiko terjadinya kontaminasi dengan mikroba (Ginting, 2009).

Salah satu lokasi yang dapat dijadikan tempat pengambilan sampel untuk mendapatkan isolat bakteri termofilik adalah Lumpur Lapindo Sidoarjo. Lumpur lapindo yang dianggap merugikan oleh masyarakat sekitar ternyata memiliki manfaat yaitu pemanfaatan bakteri termofilik yang hidup pada lingkungan bersuhu tinggi. Bakteri termofilik mampu menghasilkan enzim termostabil yang diketahui banyak dimanfaatkan pada industri pengolahan perikanan. Selain itu lingkungan hidup bakteri termofilik dilaporkan mengandung kadar logam berat yang cukup tinggi, sehingga hanya bakteri tahan logam berat saja yang mampu hidup di dalamnya jadi dapat diteliti kemampuannya dalam mengadsorpsi kandungan logam berat yang dikenal dengan istilah bioremediasi. Hal ini dapat dikembangkan pada pengendalian kualitas limbah industri yang mengandung

logam berat. Penelitian ini diawali dengan melakukan kultur, isolasi, karakterisasi morfologi dan uji identifikasi bakteri yang meliputi uji biokimia, uji *microbact identification kits* dan dibandingkan dengan hasil uji DNA 16S rDNA yang dilakukan Prof. Ir Sukoso M.Sc Ph.D.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah..

- Bagaimana kondisi lingkungan lokasi lumpur lapindo Sidoarjo?
- Apa pendugaan jenis bakteri termofilik yang hidup dalam lumpur Lapindo Sidoarjo?
- Bagaimana karakteristik morfologi dan fisiologi dari bakteri yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pendugaan jenis bakteri termofilik yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo dengan melihat sifat karakteristik morfologi dan fisiologinya dan sebagai informasi awal terhadap penelitian selanjutnya tentang aktivitas enzim termostabil yang dihasilkan bakteri termofilik terhadap industri perikanan.

## 1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pendugaan spesies bakteri termofilik yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo Sidoarjo serta mengetahui peranannya dalam proses industri pengolahan hasil perikanan dan dapat dijadikan sebagai langkah awal dalam penelitian lanjutan mengenai aktifitas enzim termostabil yang dihasilkan oleh bakteri

thermofilik yang diisolasi serta dapat diaplikasikan pada proses industri pengolahan perikanan.

### 1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel air lumpur dan sedimen padat diambil dari lumpur lapindo Sidoarjo. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi LSIH (Laboratorium Sentral Ilmu Hayati) Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Pada Bulan Oktober 2012-September 2013. Sebagian sampel isolat bakteri diamati di laboratorium Universitas Kagoshima Jepang



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri

Bakteri adalah sel prokariot yang khas, bersifat uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya. Sel bakteri ada yang berbentuk bola, batang atau spiral. Umumnya bakteri memiliki diameter antara 0,5-2,5  $\mu\text{m}$  (Pelczar dan Chan, 2005). Bakteri adalah yang paling berkelebihan dari semua organisme. Bakteri tersebar (berada di mana-mana) di tanah, air, dan sebagai simbiosis dari organisme lain. Banyak patogen merupakan bakteri. Kebanyakan bakteri berukuran kecil, biasanya hanya berukuran 0,5-5  $\mu\text{m}$ , meski ada jenis yang dapat mencapai diameter 0,3 mm contohnya adalah genus *Thiomargarita*. Umumnya bakteri memiliki dinding sel, seperti sel hewan dan jamur, tetapi dengan komposisi yang sangat berbeda. Banyak bakteri yang bergerak menggunakan flagela, yang berbeda dalam strukturnya dari flagela kelompok lain (Pelczar dan Chan, 2005).

Berdasarkan perbedaan komposisi dan dinding sel, bakteri dibedakan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif mempunyai struktur dinding sel yang tebal (15-80  $\mu\text{m}$ ) dan berlapis tunggal, dengan komposisi dinding sel terdiri dari lipid, peptidoglikan, dan asam tekoat. Kandungan lipid pada bakteri gram positif relatif rendah (1-4 %), peptidoglikan sebagai lapisan tunggal memiliki jumlah lebih dari 50 % berat kering sel bakteri. Bakteri gram positif rentan terhadap penisilin, namun lebih resisten gangguan fisik. Persyaratan nutriennya relatif lebih rumit pada banyak spesies (Pelczar dan Chan, 2005).

Pada bakteri gram negatif, struktur dinding sel berlapis tiga dengan ketebalan yang tipis (10-15 nm). Komposisi dinding sel terdiri dari lipid dan peptidoglikan yang berada di dalam lapisan kaku sebelah dalam dengan jumlah sekitar 10 % dari berat kering. Kandungan lipid pada bakteri gram negatif cukup tinggi, yaitu 11-22 %. Bakteri gram negatif ini umumnya kurang rentan terhadap penisilin dan kurang rentan terhadap gangguan fisik. Persyaratan nutrisi bakteri gram negatif relatif lebih sederhana dari bakteri gram positif (Pelczar dan Chan, 2005).

Bakteri yang hidup di laut sebagian besar adalah bakteri laut. Kebanyakan bakteri laut dapat diwarnai dengan pewarnaan gram negatif. Kebanyakan bakteri laut adalah motil dan 75-85% bila dikultur murni memiliki flagela. Kebanyakan bakteri laut bersifat anaerob fakultatif, tetapi dapat tumbuh lebih baik dengan adanya oksigen. Bakteri-bakteri laut relatif sedikit yang bersifat aerob obligat dan lebih sedikit lagi bersifat anaerob obligat. Pertumbuhan bakteri laut umumnya lebih lambat jika dibandingkan dengan tanah. Secara morfologis, bakteri laut tidak terdiri dari satu kelompok bila dibandingkan dengan bakteri akuatik. Mayoritas bentuk sel berhubungan dengan empat dasar bentuk bakteri, yakni kokus, batang, vibrio dan spiral, sebagian besar bakteri laut bersifat gram negatif, berflagela batang tak berspora, bentukan filamen dan bercabang. Pada umumnya bakteri yang berhabitat di laut antara lain pseudomonas, Vibrio, Sirilum, Achromobacter, dan Flavobacterium (Dalam sedimen juga ada Bacillus) (Waluyo, 2007).

## 2.2 Kultivasi Bakteri

Kultivasi adalah usaha menumbuhkan mikroorganisme pada atau dalam medium kultur. Isolasi adalah usaha memisahkan mikroorganisme dari suatu bahan atau medium ke medium lain yang biasanya ditujukan untuk mendapatkan biakan sejenis (biakan murni) tak tercampur oleh mikroorganisme lain. Pekerjaan tersebut harus dipersiapkan dan dilakukan secara teliti, steril, dan aseptik. Aseptik artinya berusaha mencegah atau mengurangi terjadinya kontaminasi (terikutnya mikroorganisme lain yang tidak kita kehendaki ke dalam proses yang kita lakukan). Ruang tempat kultivasi dan isolasi mikroorganisme harus bersih, steril, dan bebas angin. Dinding dan alas yang basah dapat menyebabkan butir-butir debu menempel padanya, oleh karena itu ruang isolasi dapat diberi alas kain basah. Ruang tempat kultivasi dan isolasi ini biasanya berupa entas (ent case) atau laminar air flow yang sudah dilengkapi dengan penyaring udara. Di laboratorium standar biasanya udara yang masuk ke dalam ruangan telah dilewatkan pada ventilasi yang selalu disinari dengan sinar ultraviolet (radiasi). Pemindahan mikroorganisme dari satu medium ke medium lainnya dapat dilakukan menggunakan jarum inokulasi (ose, jarum ent) atau menggunakan pipet. Pemindahan menggunakan jarum inokulasi dilakukan dengan ujung kawat (lebih baik kawat platina) yang sudah disterilkan dengan dibakar sampai pijar. Untuk mikroorganisme unisel atau bentuk cairan dapat menggunakan ujung kawat yang dibulatkan 1-3 mm (jarum ose) dan untuk mikroorganisme multisel menggunakan ujung kawat yang dilebarkan (jarum ent). Pemindahan menggunakan pipet dapat dilakukan jika mikroorganisme berada dalam cairan. Pipet yang digunakan pun harus selalu steril (Purnomo, 2008).

Lingkungan yang sesuai merupakan salah satu faktor penting untuk kultivasi, juga perlu disediakan persyaratan nutrisi yang sesuai untuk memungkinkan pertumbuhan yang optimum. Bakteri tidak hanya menunjukkan respons yang berbeda-beda terhadap kondisi fisik di dalam lingkungannya, tetapi juga amat bervariasi dalam hal persyaratan nutrisinya. Keberhasilan kultivasi berbagai tipe bakteri, dibutuhkan suatu kombinasi lingkungan dan nutrisi yang sesuai. Nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme adalah vitamin, air, karbon dan juga dalam bentuk zat-zat kimiawi, sebagai contoh adalah unsur logam seperti sulfur, mangan, besi, seng, natrium, dan kalium (Afnani, 2010).

Disamping kebutuhan nutrisi yang sesuai untuk kultivasi bakteri, juga diperlukan kondisi fisik yang memungkinkan untuk pertumbuhan optimum bakteri. Keberhasilan kultivasi bakteri tergantung pada kombinasi nutrisi dan lingkungan fisik yang sesuai. Beberapa persyaratan lingkungan fisik yang harus dipenuhi antara lain: suhu, atmosfer gas, derajat keasaman, serta beberapa kondisi khusus (Pelczar dan Chan, 2005).

### 2.3 Faktor Pertumbuhan Bakteri

Pola pertumbuhan, laju pertumbuhan dan jumlah total bakteri dipengaruhi oleh kisaran suhu tertentu

**Tabel 1. Suhu Pertumbuhan Bakteri**

Jenis Bakteri	Suhu Minimum	Suhu Optimum	Suhu Maksimum
Psikrofil	0-5°C	5-15°C	15-20°C
Mesofil	10-20°C	20-40°C	40-45°C
Termofil	25-45°C	45-60°C	60-80°C

Sumber : Lay (1994)

Pertumbuhan bakteri juga dipengaruhi oleh adanya keberadaan gas atmosfer seperti oksigen dan karbondioksida. Terdapat empat kelompok besar bakteri, yaitu aerobik adalah organisme yang membutuhkan oksigen, anaerobik adalah organisme yang tidak memerlukan oksigen dalam hidupnya, anaerobik

fakultatif adalah organisme yang dapat tumbuh dalam lingkungan aerobik maupun anaerobik, mikroaerofilik adalah organisme yang tumbuh dengan baik jika hanya ada sedikit oksigen dalam lingkungannya (Pelczar dan Chan, 2005).

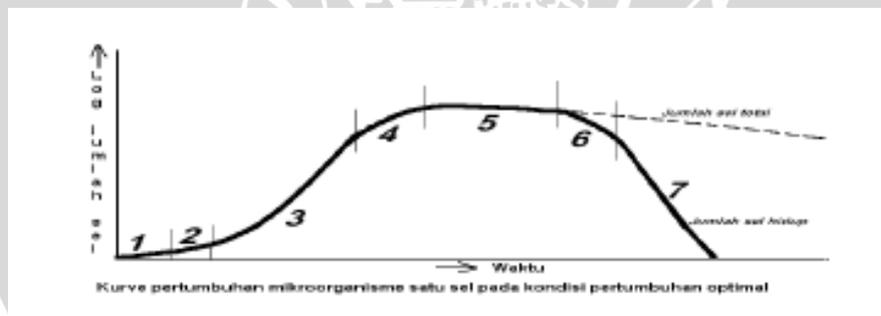
Sebagian besar bakteri tumbuh dengan baik pada pH 6,5-7,5. Namun, terdapat sebagian bakteri yang mampu tumbuh pada lingkungan yang sangat asam maupun sangat basa. Perubahan pH pada medium bakteri ini dapat disebabkan oleh senyawa yang dihasilkan bakteri tersebut selama pertumbuhannya. Untuk menjaga kondisi seperti pH awal, maka ke dalam medium biakan ditambahkan larutan penyangga. Beberapa senyawa yang berfungsi sebagai penyangga adalah pepton maupun kombinasi garam pospat (Pelczar dan Chan, 2005).

#### 2.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan untuk bakteri dan mikroorganisme lain pada umurnya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen sel (pertambahan total massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Selama fase pertumbuhan seimbang (*balanced growth*) pertambahan massa bakteri berbanding lurus dengan pertambahan komponen seluler yang lain seperti DNA, RNA, dan protein. Cara reproduksi sebagian besar bakteri adalah pembelahan biner, satu sel membelah diri menghasilkan dua sel. Selang waktu yang dibutuhkan bagi sel untuk membelah diri dikenal sebagai waktu generasi. Waktu generasi setiap spesies dengan kondisi berbeda mempunyai perbedaan. Waktu generasi tergantung pada jumlah bakteri yang ada pada awalnya, yaitu di dalam inokulum, jumlah bakteri yang ada pada akhir waktu tertentu dan interval waktu. Pola fase pertumbuhan bakteri adalah pola eksponensial atau logaritma (fase log). Pada fase ini, populasi bakteri bertambah secara teratur menjadi dua kali lipat pada interval waktu tertentu selama inkubasi (Pelczar dan Chan, 2005)

pada periode awal tanpa pertumbuhan (fase lagan), diikuti fase kedua adalah periode pertumbuhan cepat (fase log), kemudian mendatar (fase statis), dan akhirnya adalah suatu fase penurunan populasi sel-sel hidup (fase kematian). Fase adaptasi terjadi 1-2 jam paska pemindahan kultur. Bakteri mengalami perbesaran ukuran sel, peningkatan metabolisme, dan mulai menyesuaikan dengan kondisi lingkungan yang baru. Pada fase pertumbuhan terjadi pembelahan yang menyebabkan bertambahnya populasi bakteri hingga mencapai titik stationernya. Pada fase stationer, bakteri sudah tidak mengalami penambahan populasi, dan pada akhirnya karena ketersediaan nutrisi yang terbatas terjadi fase kematian. Pada fase kematian jumlah populasi bakteri semakin berkurang karena persaingan zat makanan antar bakteri (Pelczar dan Chan, 2005)

Menurut Winarsih *et al.*, (2011) kurva pertumbuhan bakteri adalah sebagai berikut :



**Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri**

Pertumbuhan mikroorganisme dimulai dari awal pertumbuhan sampai dengan berakhirnya aktivitas merupakan proses bertahap yang dapat digambarkan sebagai kurve pertumbuhan. Kurve pertumbuhan umumnya terdiri atas 7 fase pertumbuhan, tetapi yang utama hanya 4 fase yaitu : lag, eksponensial, stasioner, dan kematian. Kurve pertumbuhan yang lengkap

merupakan gambaran pertumbuhan secara bertahap (fase) sejak awal pertumbuhan sampai dengan terhenti mengadakan kegiatan. Kurve pertumbuhan biasanya terbagi dalam 5 fase pertumbuhan, tetapi lebih terinci dalam 7 fase yakni sebagai berikut :

1. *Fase lag* disebut juga fase persiapan, fase permulaan, fase adaptasi atau fase penyesuaian yang merupakan fase pengaturan suatu aktivitas dalam lingkungannya. Semakin sesuai maka selang waktu yang dibutuhkan semakin cepat.

2. *Fase akselerasi* merupakan fase setelah adaptasi, sehingga sudah mulai aktivitas perubahan bentuk maupun penambahan jumlah dengan kecepatan yang masih rendah

3. *Fase lingkungannya*. Semakin sesuai maka selang waktu yang dibutuhkan semakin cepat.

2. *Fase akselerasi* merupakan fase setelah adaptasi, sehingga sudah mulai aktivitas perubahan bentuk maupun penambahan jumlah dengan kecepatan yang masih rendah

3. *Fase eksponensial* atau logaritmik merupakan fase peningkatan aktivitas perubahan bentuk maupun penambahan jumlah mencapai kecepatan maksimum sehingga kurvenya dalam bentuk eksponensial. Peningkatan aktivitas ini harus diimbangi oleh banyak faktor, antara lain : *faktor biologis*, misalnya : bentuk dan sifat mikroorganisme terhadap lingkungan yang ada, asosiasi kehidupan diantara organisme yang bersangkutan dan *faktor nonbiologis*, misalnya : kandungan hara di dalam medium kultur, suhu, kadar oksigen, cahaya, bahan kimia dan lain-lain. Jika faktor-faktor di atas optimal, maka peningkatan kurve akan tampak tajam atau semakin membentuk sudut tumpul terhadap garis horizontal (waktu)

4. *Fase retardasi* atau pengurangan merupakan fase dimana penambahan aktivitas sudah mulai berkurang atau menurun yang diakibatkan karena

beberapa faktor, misalnya : berkurangnya sumber hara, terbentuknya senyawa penghambat, dan lain sebagainya.

5. *Fase stasioner* merupakan fase terjadinya keseimbangan penambahan aktivitas dan penurunan aktivitas atau dalam pertumbuhan koloni terjadi keseimbangan antara yang mati dengan penambahan individu. Oleh karena itu fase ini membentuk kurve datar. Fase ini juga diakibatkan karena sumber hara yang semakin berkurang, terbentuknya senyawa penghambat, dan faktor lingkungan yang mulai tidak menguntungkan.

6. *Fase kematian* merupakan fase mulai terhentinya aktivitas atau dalam pertumbuhan koloni terjadi kematian yang mulai melebihi bertambahnya individu.

7. *Fase kematian logaritmik* merupakan fase peningkatan kematian yang semakin meningkat sehingga kurve menunjukkan garis menurun.

## 2.5 Bakteri Termofilik

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhan, mikroorganisme secara umum dibedakan atas mikroorganisme psikrofil, psikotrop, mesofil, termofil, dan hipertermofil. Bakteri psikrofil hidup pada kisaran suhu 0-20°C dan. Bakteri psikotrop dapat tumbuh pada suhu 0-35°C. Bakteri mesofil dapat tumbuh pada suhu 20-45°C dan bakteri termofil tumbuh pada suhu 45-65 0C. Bakteri hipertermofil hidup pada suhu pada suhu di atas 90°C dan maksimal pada suhu 100°C, namun pada beberapa bakteri dapat hidup pada suhu 80-113°C. (Prescott, 2005).

Indonesia sebagai negara tropis mempunyai banyak daerah dengan aktivitas geotermal, seperti daerah pegunungan berapi, sumber air panas dan cadangan minyak bumi dan batubara. Beberapa kondisi lingkungan yang berbeda dalam setiap lokasi memungkinkan adanya heterogenitas bakteri termofil yang tinggi (Indrajaya *et al.*, 2003). Bakteri termofil menghasilkan enzim

termostabil yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi, seperti dalam teknik-teknik biologi molekuler untuk kegunaan penelitian dan diagnostik (enzim yang memproses DNA dan RNA) dan kemampuan enzim untuk mengubah tepung, makanan, pengelolaan sampah, pembuatan kertas dan sintesis zat-zat organik. (Vielle *et al.*, 1998)

Menurut Waluyo (2007), Mikroba termofil (politermik) yaitu golongan mikroba yang tumbuh pada temperatur 40<sup>0</sup>-80<sup>0</sup>C, dan temperatur optimumnya 55<sup>0</sup>-65<sup>0</sup> C. Golongan mikroba ini terutama terdapat di sumber-sumber air panas dan tempat-tempat lain yang bertemperatur tinggi. Dalam prakteknya batas-batas antara golongan-golongan diatas sukar ditentukan, juga diantara beberapa individu di dalam satu golongan pun batas-batas temperatur optimumnya sangat berbeda-beda.

## 2.6 Macam-Macam Bakteri Thermofilik

Bakteri termofilik dikelompokkan ke dalam beberapa genus yang merupakan bakteri aerob dan yang lainnya merupakan bakteri anaerob. Beberapa kelompok yang termasuk ke dalam bakteri termofilik diantaranya menurut Perry (2005):

### a. Aquificae (Aquifx, Hidrogenobakter, dan Desulfobakterium)

Aquificae, bakteri yang termasuk di dalamnya kebanyakan merupakan bakteri termofilik moderat. Suhu maksimum untuk beberapa spesies mendekati 95°C, yang dikelompokkan dalam hipertermofilik. Semua kultur yang telah dibiakkan tidak tumbuh pada bahan organik, karena merupakan bakteri autotrof obligat.

Aquificae merupakan genus yang paling banyak dipelajari, merupakan bakteri hipertermofilik sejati yang dapat hidup pada suhu maksimum 95 °C, mengikat karbondioksida lewat siklus asam sitrat reduktif. Selain menggunakan

H<sub>2</sub> sebagai sumber energi, bakteri ini juga dapat menggunakan tiosulfat dan sulfur, yang kemudian dioksidasi menjadi asam sulfat, juga menggunakan nitrat sebagai aseptor elektron dan menghasilkan nitrit dan gas N<sub>2</sub>. Hidrogenobakter, mempunyai metabolisme yang serupa dengan Aquifex, yaitu dengan siklus *tricarboxylic acid* (TCA) reduktif. Desulfobakterium, tumbuh dengan cara kemoautotrof dengan mengoksidasi hidrogen sebagai sumber energi dan mereduksi tiosulfat, S, atau sulfit menjadi H<sub>2</sub>S, merupakan bakteri anaerob obligat.

b. Thermodesulfobakteria

Bakteri lonjong pereduksi sulfat, merupakan bakteri heterotrof, menggunakan laktat dan piruvat sebagai sumber energi dan sulfat atau tiosulfat sebagai aseptor elektron. Molekul H<sub>2</sub>S dibentuk dari metabolisme reduksi sulfat. Asam-asam organik tidak sepenuhnya dioksidasi menjadi asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Bakteri ini banyak terdapat pada sumber air panas dan ladang minyak.

c. Thermotogae (Thermotogae dan Thermosipho)

Merupakan organisme anaerob yang diisolasi dari lingkungan bersuhu tinggi dasar laut. Thermotogae memfermentasi gula seperti glukosa menjadi laktat, asetat, CO<sub>2</sub>, dan H<sub>2</sub>. Thermosipho tumbuh pada media yang lebih kaya seperti yeast ekstrak.

d. Nitrospirae

Kelompok bakteri ini mencakup berbagai jenis bakteri, kebanyakan diantaranya mesofilik, satu-satunya genus yang merupakan termofilik adalah Thermodesulfovibrio.

e. Thermodesulfovibrio

Thermodesulfovibrio, seperti namanya kelompok bakteri ini merupakan bakteri pereduksi sulfat, yang menggunakan sumber karbon organik sebagai sumber energi dan mereduksi sulfat, tiosulfat, dan sulfit, menjadi H<sub>2</sub>S. Laktat dan

piruvat digunakan sebagai sumber energi. Suhu optimal untuk pertumbuhan adalah 65 °C.

f. Defferibakter (Defferibakter dan Geovibrio)

Kelompok bakteri yang dikenali mempunyai respirasi aerob dengan aseptor elektron ion logam atau nitrat. Genus termofilik moderat mempunyai suhu optimal pertumbuhan 50-65 °C. Geovibrio, merupakan bakteri vibrioid anaerob yang mempunyai metabolisme serupa dengan Defferibakter. Mengoksidasi asetat dengan ion logam sebagai aseptor electron.

g. Thermomicrobium (Thermomicrobium)

Thermomicrobium merupakan bakteri aerob yang tumbuh pada suhu 74°C. Thermomicrobium tumbuh pada media kompleks dengan konsentrasi nutrisi. Genus Diktioglomus merupakan bakteri anaerob, dengan sel berbentuk lonjong, tumbuh pada sumber air panas dengan rentang suhu pertumbuhannya antara 50-80°C. Merupakan bakteri fermentatif yang menggunakan berbagai gula sebagai sumber energi.

h. Deinococcus dan Thermus

Deinococci merupakan bakteri mesofilik, tidak termasuk dalam termofilik karena suhu optimal pertumbuhannya 25-35 °C. Mempunyai permukaan berwarna merah muda sampai merah yang merupakan karotenoid. Deinococci merupakan bakteri yang resistan terhadap radiasi sinar gamma.

Thermus berbeda dengan Deinococci, merupakan bakteri non-motil aerob, koloninya biasa berwarna merah muda, jingga, atau merah, yang merupakan karotenoid. Thermus tersebar luas dan telah diisolasi dari semua kondisi lingkungan panas dari seluruh dunia. Kondisi optimal untuk pertumbuhan Termus adalah 70-75 °C.

Spora bakteri termofilik penyebab kerusakan makanan pada umumnya disebabkan jenis-jenis Bacillus dan Clostridium. Kerusakan bahan makanan

dibagi menjadi tiga golongan yakni : a.) Spora penyebab kebusukkan asam tanpa gas pada makanan pH rendah oleh *Bacillus stearothermophilus* (pH 4,0-4,5), *B.coagulans*, *B.thermoacidurans* (pH kurang dari 4,0); b.) spora bakteri anaerobik yang tidak memproduksi H<sub>2</sub>S misalnya *Clostridium thermosaccharoliticum*, *C.bottulinum* (Termofilik) dan *C.sporogenes* (bersifat mesofilik); c.) spora bakteri anaerobik penyebab kebusukkan sulfida. Misalnya *C.nigrificans*, *B.betanigrificans* (bersifat anaerobik fakultatif) (Waluyo, 2008).

Menurut Waluyo (2007), di Yellowstone park ditemukan bakteri yang hidup di air yang panasnya 93-94°C dan pada tahun 1969 beberapa spesies lagi ditemukan di tempat yang sama yang juga sangat termofil. Spesies-spesies yang ditemukan adalah *Thermus aquaticus*, *Bacillus caldolyticus*, dan *Bacillus caldotenax*.

## 2.7 Siklus Hidup Bakteri Termofilik

Menurut klasifikasi fisiologis yang dibuat Gilter dijelaskan organisme termofil memiliki suhu minimum untuk hidupnya sebesar 45°C, optimum 55°C dan maksimum 70°C. Muis dan Rikhi mendefinisikan bakteri termofil merupakan organisme yang hidup baik pada suhu 60-70°C, sedangkan Hiss dan Zinsser menyatakan bakteri termofilik merupakan bakteri yang didapatkan dari sumber air panas ataupun lapisan bagian paling atas permukaan tanah (Morrison dan Tanner, 1921). Bakteri termofil juga merupakan kelompok organisme yang dapat ditemukan di lingkungan yang sangat bervariasi kondisinya serta tetap eksis pada suhu tinggi dengan sifat obligat, fakultatif maupun termotoleran (Singleton dan Ameluxen, 19673). Spesies termofil paling banyak ditemukan pada kelompok bakteri dan dapat tetap hidup pada keadaan aerob, aerob fakultatif, dan anaerob (Sianturi, 2008).

Menurut Kusnandar *et al.*, (2011), termofilik suhu optimum kebanyakan termofilik adalah 56-60°C. Jika spora bakteri tidak dapat berkembang dan tidak tumbuh dibawah suhu 50°C, bakteri tersebut disebut obligat termofil dapat tumbuh pada suhu 77°C dan bakteri ini sangat resisten terhadap pemanasan (121°C selama 60 menit). Bakteri termofilik tidak memproduksi toksin selama pertumbuhannya pada makanan.

Mikroba thermophiles dapat berkembang biak dengan mudah membelah diri hanya dalam waktu 2 menit saja pada suhu 55°C. Laju pertumbuhan atau pembelahan sel mikroba meningkat dengan meningkatnya suhu. Mikroba tersebut menyebabkan kerusakan dan pembusukan pada makanan kaleng (Sasmito, 2005)

## 2.8 Habitat Bakteri Termofilik

Termofilik adalah mikroba yang tumbuh optimal pada suhu lebih tinggi dari 45 °C. Habitat bakteri termofilik adalah pada tempat-tempat yang mempunyai kondisi lingkungan panas, dapat hidup dan berkembang biak pada lingkungan yang ekstrem. Beberapa habitat ekstrem bagi bakteri termofilik diantaranya adalah sumber air panas, kawah gunung berapi, dan di celah hidrotermal kedalaman air laut. Celah tersebut merupakan rekahan permukaan bumi di bawah laut tempat magma merembes dan memanaskan air. Bakteri termofilik pertama kali ditemukan pada tahun 1960 oleh Thomas Brock di sumber air panas Yellow Stone. Termofilik bervariasi dalam persyaratan panas, dengan kisaran umum pertumbuhan 45-80 °C. Pada sebagian besar eukariotik tidak dapat bertahan di atas suhu 60 °C, tetapi beberapa bakteri termofilik disebut hipertermofil, tumbuh antara kisaran suhu 80 °C dan 110 °C (saat ini suhu dianggap membatasi enzim dan struktur sel) (Kathleen, 2005).

Pada mata air panas, karena air mendidih sehingga meluap dan tepi mata air mengalir jauh dari sumbernya, secara bertahap mendingin, menyiapkan gradien termal. Seiring gradien ini, berbagai mikroorganisme tumbuh, dengan rentang suhu yang berbeda. Dengan mempelajari distribusi spesies di sepanjang gradien termal tersebut dan dengan memeriksa sumber air panas dan habitat termal lainnya di temperatur berbeda di seluruh dunia, memungkinkan untuk menentukan batas suhu atas untuk setiap jenis organisme (Madigan *et al.*, 1991).

Bakteri termofilik pertama kali diisolasi tahun 1879 oleh Miquel, menemukan bakteri yang mampu berkembang pada suhu 72 °C (162 °F). Miquel menemukan bakteri ini pada tanah, debu, kotoran badan, tempat pembuangan limbah, dan lumpur sungai. Tidak lama kemudian, ditemukan varietas bakteri termofilik pada tanah yang tumbuh subur pada temperatur tinggi tetapi tidak dapat tumbuh pada suhu kamar. Bakteri ini ditemukan di gurun pasir Sahara, tetapi tidak ditemukan di tanah pada hutan yang dingin. Pada tanah perkebunan yang mengandung pupuk terdapat 1-10% bakteri termofilik, sementara tanah lapang yang luas biasanya hanya mengandung 0,25% atau kurang. Tanah yang tidak ditumbuhi tanaman kemungkinan sama sekali tidak terdapat bakteri termofilik (Heru, 2006).

## 2.9 Pengertian Enzim

Enzim merupakan protein untuk katalis (percepatan) reaksi kimia. Enzim tersebut akan merubah suatu susunan molekul menjadi susunan lain yang lebih sederhana berupa produk, bereaksi secara spesifik, dan bekerja seperti kunci dan gembok, artinya suatu aktivitas enzim hanya bereaksi terhadap susunan molekul tertentu. Aktivitas kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti inhibitor, aktivator, kofaktor, koenzim, suhu, pH, konsentrasi dari substrat (Ahmad, 2007).

Enzim adalah protein yang diproduksi dari sel hidup dan digunakan oleh sel-sel untuk mengkatalisis reaksi kimia yang spesifik. Enzim memiliki tenaga katalitik yang luar biasa dan biasanya lebih besar dari katalisator sintetik. Spesifitas enzim sangat tinggi terhadap substratnya. Tanpa pembentukan produk samping enzim merupakan unit fungsional untuk metabolisme dalam sel, bekerja menurut urutan yang teratur. Sistem enzim terkoordinasi dengan baik menghasilkan suatu hubungan yang harmonis diantara sejumlah aktivitas metabolic yang berbeda (Shahib, 1992). Enzim dikatakan sebagai suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam aktivitas biologis. Dalam jumlah yang sangat kecil, enzim dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan-penyimpangan hasil akhir reaksinya. Enzim ini akan kehilangan aktivitasnya akibat panas, asam atau basa kuat, pelarut organik, atau pengaruh lain yang bisa menyebabkan denaturasi protein. Enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas, karena hanya bekerja pada substratnya (Girindra, 1990).

Untuk aktivitasnya kadang-kadang enzim membutuhkan kofaktor yang bisa berupa senyawa organik atau logam. Senyawa organik itu terikat pada bagian protein enzim. Bila ikatan itu lemah maka kofaktor tadi disebut co-enzim dan jika terikat erat melalui ikatan kovalen maka dinamakan gugus prostetis. Pada umumnya dua kofaktor itu tidak dibedakan dan disebut co-enzim saja. Apabila enzim itu terdiri dari bagian seperti yang diterangkan diatas maka keseluruhan enzim itu dinamakan holo enzim. Bagian protein dinamakan apo-enzim dan bagian non proteinnya disebut co-enzim. fungsi logam pada umumnya adalah untuk memantapkan ikatan substrat pada enzim atau mentransfer electron yang timbul selama proses katalisis (Soeharsono, 1989).

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama adalah substrat, suhu, keasaman, kofaktor, dan inhibitor. Tiap enzim memerlukan suhu dan pH

optimum yang berbeda beda karena enzim adalah protein, yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan pH berubah. Di luar suhu atau pH yang sesuai, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan mengalami kerusakan. Hal ini akan menyebabkan enzim akan kehilangan fungsinya sama sekali. Kerja enzim juga dipengaruhi oleh kofaktor dan inhibitor (Maton *et al.*, 1993).

### 2.10 Enzim Termostabil

Setiap organisme menghasilkan banyak enzim yang sebagian besar dibuat hanya dalam jumlah kecil dan fungsi dalam sel. Pertumbuhan mikroba pada suhu tinggi dan adanya beberapa prokariota tumbuh optimal pada suhu sangat tinggi disebut hipertermofil. Mikroba yang hipertermofil dapat tumbuh pada suhu tinggi karena kemampuannya menghasilkan enzim stabil. Ekstremozime adalah istilah yang diciptakan untuk menggambarkan enzim yang berfungsi pada beberapa lingkungan ekstrim, seperti suhu tinggi atau rendah dan pH. Organisme yang menghasilkan ekstremozime disebut ekstremofil (Madigan *et al.*, 2009)

Enzim termostabil memungkinkan terjadinya proses pada suhu tinggi, yang jelas menguntungkan sebab memiliki reaktifitas, stabilitas, dan hasil yang lebih tinggi, sedangkan viskositas dan masalah kontaminasi yang lebih rendah. Isolasi enzim termostabil dari organisme termofilik memiliki sejumlah keuntungan secara komersial karena kestabilitasannya. Keuntungan bioproses yang berlangsung pada suhu tinggi adalah kecepatan difusi yang lebih tinggi, menurunkan viskositas substrat, kecepatan reaksi lebih tinggi, meningkatkan kelarutan reaktan, dan mengurangi risiko terjadinya kontaminasi dengan mikroba patogen (Milo *et al.*, 1999).

### 2.11 Isolasi dan Inokulasi Bakteri

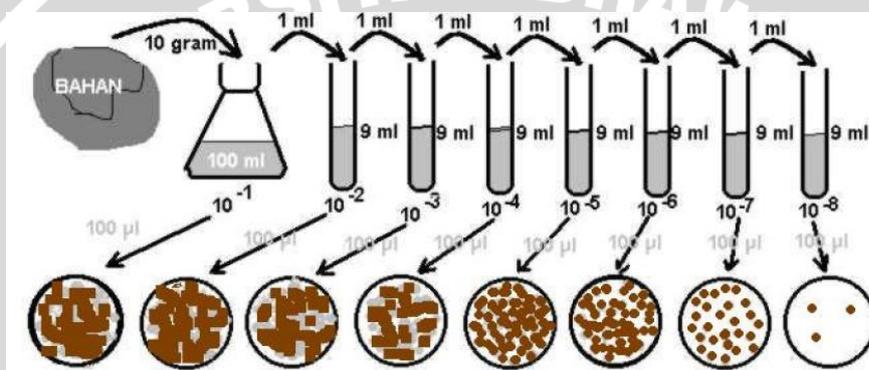
Secara alamiah, mikroba terdapat dalam bentuk campuran dari berbagai jenis. Untuk mempelajari sifat-sifat pertumbuhan, morfologi dan sifat fisiologi mikroba, maka masing-masing mikroba tersebut harus dipisahkan satu dengan yang lainnya, sehingga terbentuk kultur murni, yaitu suatu biakan yang terdiri dari sel-sel satu spesies atau satu galur mikroba. Untuk mendapatkan isolat bakteri dari suatu bahan yang mengandung campuran mikroba dapat dilakukan isolasi dengan beberapa metode, tergantung dari jenis mikroorganismenya (Fardiaz, 1989).

Mikroorganisme yang akan diisolasi dapat berupa biakan murni atau populasi campuran. Bila biakan yang akan diidentifikasi ini tercemar, perlu dilakukan pemurnian terlebih dahulu. Pemurnian dilakukan dengan cara menggores suspensi mikroba yang akan diisolasi pada agar lempengan. Setelah diperoleh koloni terpisah, dibuat pewamaan Gram dari berbagai koloni untuk melihat kemurnian biakan (Lay, 1994).

Menurut Purnomo (2008), di alam bebas tidak ada mikroorganisme yang hidup tersendiri terlepas dari mikroorganisme lain. Sering berbagai jenis maupun kelompok mikroorganisme kedapatan secara bersama-sama di suatu titik, tempat, maupun bahan tertentu. Oleh karena itu, di dalam mempelajari suatu mikroorganisme diperlukan teknik untuk menyendirikan (isolasi) mikroorganisme yang bersangkutan dari mikroorganisme mikroorganisme lainnya, kita sebut dengan teknik biakan murni. Di dalam pelaksanaan teknik biakan murni tidak hanya bagaimana memisahkannya tetapi juga bagaimana memelihara dan mencegah terjadinya kontaminasi (pencemaran) dari mikroorganisme yang tidak kita kehendaki. Ada beberapa cara untuk mendapatkan biakan murni, antara lain:

### 1. Cara Pengenceran (*Dilutions*)

Cara ini pertama kali dilakukan oleh Lister (1865) yang berhasil membiakan secara murni bakteri *Streptococcus lactis* yang diisolasi dari susu asam. Cara mengisolasinya dengan mengencerkan sampel susu sampai beberapa tingkat kemudian susu hasil pengenceran terakhir dipipet 100  $\mu$ l untuk ditanam sebar pada medium kultur padat. Hasil kultivasinya diperoleh beberapa koloni terpisah yang masing-masing dapat dipelihara pada medium lain sebagai biakan murni (Purnomo, 2008)

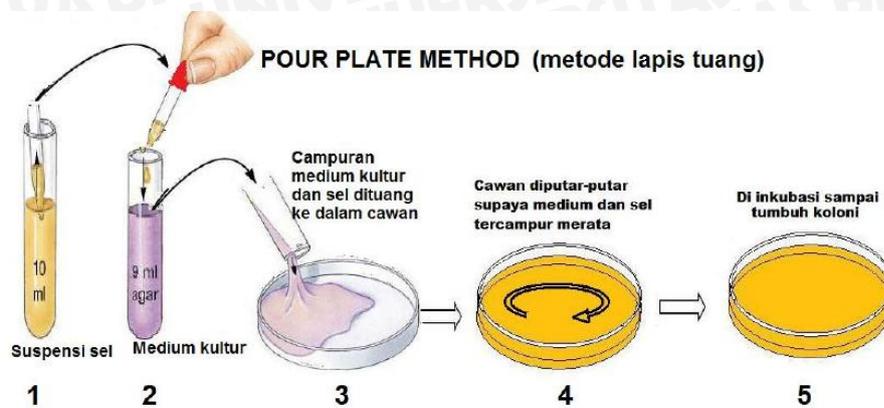


Gambar 2. Cara Pengenceran

### 2. Cara Penuangan (*Pour Plate*)

Cara ini pertama kali dilakukan oleh Robert Koch (1843-1905). Cara ini sebenarnya tidak berbeda dari apa yang dilakukan oleh Lister, hanya saja Koch menggunakan medium kultur semi padat yang sudah dicampur dengan sampel yang diencerkan dituangkan ke dalam cawan, sedangkan Lister menanam sampel yang diencerkan pada permukaan medium kultur yang sudah membeku di dalam cawan. Hasil kultivasinya diperoleh beberapa koloni terpisah yang masing-masing dapat dipelihara pada medium lain sebagai biakan murni. Di cara penuangan ini ada dua orang pembantu Koch yang berjasa menciptakan cawan untuk wadah biakan, yaitu Petri dan seorang lagi yang menemukan agar-agar sebagai pematat medium kultur yang tidak mudah meleleh, yaitu Hesse. Cawan yang diciptakan oleh Petri disebut cawan Petri (*petridish*) dan karena yang

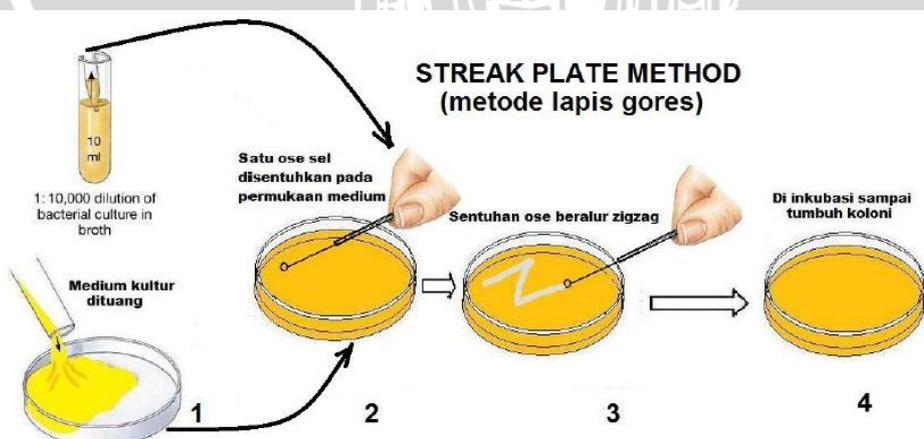
dituang adalah medium kultur yang mengandung agar-agar maka teknik ini disebut *teknik agar tuang* (Purnomo, 2008)



Gambar 3. Cara Penuangan (*Pour Plate*)

### 3. Cara Penggoresan (*Streak Plate*)

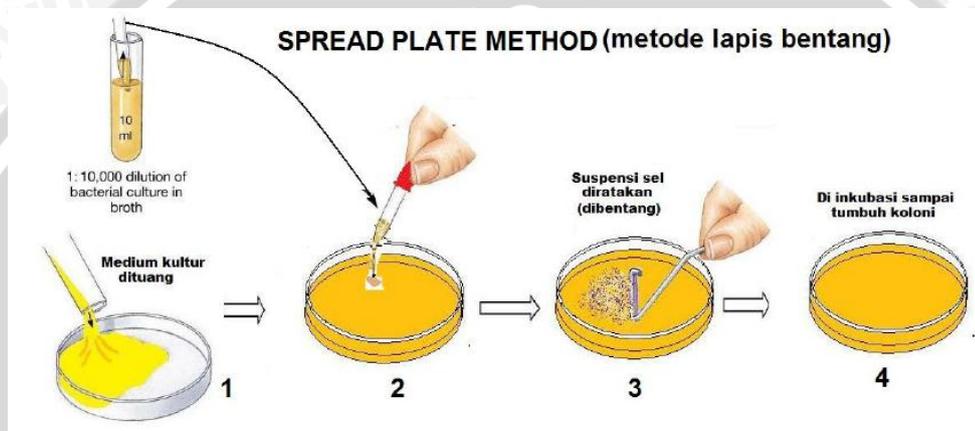
Cara ini juga tidak jauh berbeda dengan cara Lister. Cara penggoresan dilakukan dengan menyiapkan sampel bahan dan medium kultur padat. Sampel bahan diambil menggunakan ose kemudian digoreskan pada permukaan medium kultur yang sudah beku. Hasil kultivasinya diperoleh beberapa koloni terpisah yang masing-masing dapat dipelihara pada medium lain sebagai biakan murni (Purnomo, 2008).



Gambar 4. Metode Penggoresan (*Streak Plate*)

#### 4. Cara penyebaran (*spread plate*)

Cara penyebaran dilakukan dengan menyiapkan sampel bahan dan medium kultur padat. Sampel bahan diambil menggunakan pipet kemudian diteteskan di atas medium kultur yang telah membeku dan tetesan sampel bahan diratakan di permukaan atas medium kultur menggunakan gelas perata. Hasil kultivasinya diperoleh beberapa koloni terpisah yang masing-masing dapat dipelihara pada medium lain sebagai biakan murni (Purnomo, 2008).



Gambar 5. Cara Penyebaran (*Spread Plate*)

#### 5. Cara pengucilan sel tunggal (*single cell isolation*)

Cara pengucilan sel tunggal dilakukan menggunakan alat khusus yang dapat mengambil hanya satu sel mikroorganisme. Alat pengambilnya disebut mikropipet yang ditempatkan pada mikromanipulator. Pengambilan sel diawali dengan membuat tetesan bergantung pada gelas penutup preparat atau dalam gelas preparat cekung. Pengambilan sel menggunakan mikropipet dilakukan menggunakan mikroskop kemudian sel dipindah ke dalam medium kultur. Kultivasi ini akan menghasilkan koloni yang berasal dari keturunan satu sel (Purnomo, 2008).

## 2.12 Uji Identifikasi Bakteri

Karakterisasi merupakan dasar dalam identifikasi mikroba secara sistematis yang terdiri dari tiga tahap penting yaitu (a) klasifikasi: mengelompokkan mikroorganisme ke dalam grup; (b) nomenklatur: menetapkan nama ilmiah internasional yang tepat terhadap organisme; dan (c) identifikasi: penetapan organisme ke dalam klasifikasi yang diberi nama sesuai nomenklatur (Fardiaz, 1989).

Karakterisasi dapat dilakukan berdasarkan sifat sitologi (bentuk sel, gerak, sifat Gram, dan endospora), sifat morfologi koloni, dan sifat fisiologi. Prinsip pewarnaan Gram adalah kemampuan dinding sel mengikat zat warna dasar (kristal violet) setelah pencucian dengan alkohol 96 %. Hal ini berhubungan dengan komposisi senyawa penyusun dinding sel, yaitu pada bakteri Gram positif mengandung peptidoglikan lebih banyak daripada Gram negatif (Prabaningtyas, 2003). Bakteri Gram positif terlihat berwarna ungu karena asam-asam ribonukleat pada sitoplasma sel-sel Gram positif membentuk ikatan lebih kuat dengan kristal violet. Namun, sel-sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipid yang lebih tinggi dan umumnya mudah larut oleh alkohol yang memperbesar pori-pori dinding sel. Dengan demikian pemucatan pada sel-sel gram negatif lebih cepat (Hadioetomo, 1985).

Tabel 2. Pewarnaan Gram

NO.	Larutan dan Urutan Penggunaannya	Reaksi dan Tampang Bakteri	
		Gram Positif	Gram Negatif
1.	Ungu Kristal (UK)	Sel berwarna ungu	Sel berwarna ungu
2.	Larutan Yodium (Y)	Kompleks UK-Y terbentuk didalam sel; sel tetap berwarna ungu.	Kompleks UK-Y terbentuk didalam sel; sel tetap berwarna ungu.
3.	Alkohol	Dinding sel mengalami dehidrasi, pori-pori menciut; daya rembes dinding sel dan membran menurun, UK-Y tak dapat keluar dari sel; sel tetap ungu	Lipid terekstraksi dari dinding sel, pori-pori mengembang, kompleks UK-Y keluar dari sel. Sel menjadi tak berwarna.
4.	Safranin	Sel tak terpengaruh, tetap ungu	Sel menyerap zat pewarna ini, menjadi merah

Sumber: Pelczar (1989)

Uji sifat morfologi koloni sangat penting untuk identifikasi bakteri karena karakterisasi koloni bakteri pada medium lempeng dapat mempunyai nilai identitas. Sifat-sifat koloni, seperti ukuran, bentuk, wama, dan lain-lain memberi nilai diagnostik (Prabaningtyas, 2003).

Uji karakterisasi lain yang dapat digunakan untuk identifikasi bakteri adalah uji fisiologi. Uji fisiologi yang dapat dilakukan diantaranya uji hidrolisis pati, uji hidrolisis lemak, uji hidrolisis protein, uji fermentasi karbohidrat (laktosa, dekstrosa, dan sukrosa), uji fermentasi gula dan H<sub>2</sub>S, uji indole, uji *methyl red*, uji Voges-Proskauer, uji sitrat, uji urease, uji reaksi susu litmus, uji katalase, dan uji oksidase (Cappuccino dan Sherman, 1983). Beberapa uji biokimia yang digunakan pada penelitian ini adalah:

#### 1. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Media *triple sugar agar* (TSIA) merupakan medium yang digunakan untuk mengetahui pembentukan asam dan mengandung tiga macam gula, yaitu

galaktosa, laktosa, sukrosa, indikator merah fenol, dan FeS<sub>04</sub>. Konsentrasi glukosa adalah 1/10 dari konsentrasi laktosa atau sukrosa agar fermentasi glukosa saja yang dapat terlihat. Jika glukosa dapat difermentasi maka kemungkinan ada fermentasi glukosa lain, seperti monosakarida selain glukosa disakarida (maltosa, laktosa, sukrosa dan lainnya) serta polisakarida. Uji H<sub>2</sub>S juga digunakan media yang mengandung sulfur dan ion pada saat bakteri ditumbuhkan dalam media yang kaya akan asam amino mengandung sulfur seperti TSIA maka terjadi desulfurase membentuk H<sub>2</sub>S Fe<sup>2+</sup> kemudian H<sub>2</sub>S Fe<sup>2+</sup> bereaksi dengan asam sulfide menghasilkan senyawa FeS yang berwarna hitam dan tidak larut dalam air (Lay, 1994).

**Tabel 3. Reaksi-Reaksi yang Terjadi Pada Uji Media TSIA**

Bagian Bawah Agar		Bagian Atas Agar		Keterangan
Reaksi	Warna	Reaksi	Warna	
Basa	Merah	Basa	Merah	Tidak memfermentasi gula
Asam	Kuning	Basa	Merah	Fermentasi glukosa
Asam	Kuning	Asam	Kuning	Fermentasi laktosa dan atau sukrosa
Bagian bawah		Bagian atas		Keterangan
Agak pecah/terangkat ke atas		-		Produksi Gas
Agak berwarna hitam		-		Produksi H <sub>2</sub> S

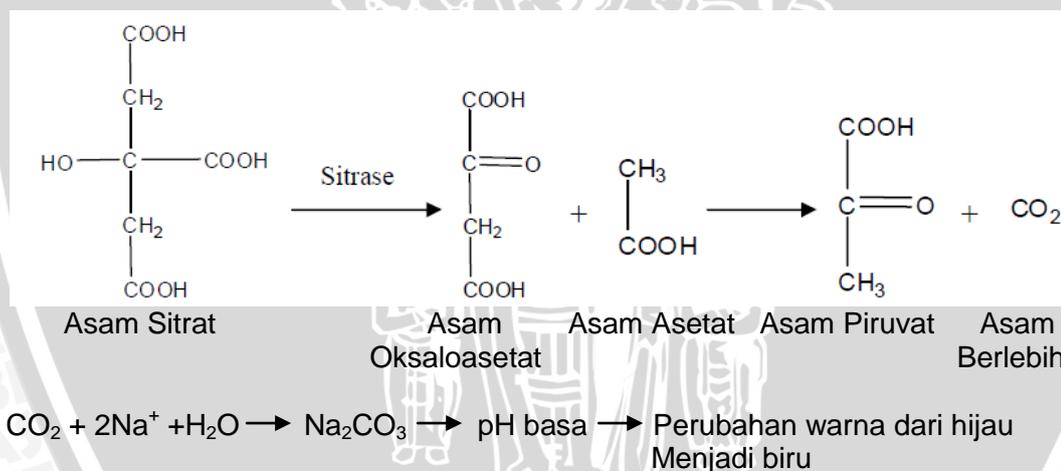
Sumber : Fardiaz (1989)

## 2. Uji Sitrat

Uji sitrat dapat menggunakan sitrat-Koser berupa medium cair atau medium sitrat-Simon berupa medium padat. *Simon citrate Agar* merupakan medium sintetik dengan Na-sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, NH<sup>4+</sup> sebagai sumber N dan brom thymol blue sebagai indikator pH, sedangkan medium sitrat- Koser tidak mengandung indikator. Bila mikroorganisme mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Perubahan warna dari hijau menjadi biru menunjukkan bahwa

mikroorganisme mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Cappuccino dan Sherman, 1983).

Uji sitrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi sitrat. Media *Simmons-Citrate* mengandung sitrat sebagai sumber karbon, garam amonium sebagai sumber nitrogen, dan indikator biru bromtimol yang berubah warna dari hijau menjadi biru dalam keadaan basa. Sitrat diubah menjadi asam oksaloasetat dan asam asetat oleh enzim sitrase, lalu produk antara tersebut diubah menjadi asam piruvat dan karbondioksida secara enzimatik. Selama reaksi ini berlangsung, keadaan media *Simmons-Citrate* berubah menjadi basa, karena karbondioksida berikatan dengan natrium dan air membentuk natrium karbonat yang bersifat basa (Cappucino dan Sherman, 1983).



**Gambar 6. Reaksi Fermentasi Sitrat Secara Enzimatik (Cappucino, 1983)**

### 3. Uji *Metyl Merah*

Uji merah metil (*methyl red test*) bertujuan untuk mengetahui kemampuan dari mikroorganisme untuk mengoksidasi glukosa dengan memproduksi asam dengan konsentrasi tinggi sebagai hasil akhirnya. Heksosa monosakarida glukosa merupakan substrat utama yang dioksidasi oleh semua organisme enteric sebagai sumber energinya. Uji *metil red* dilakukan untuk mengetahui

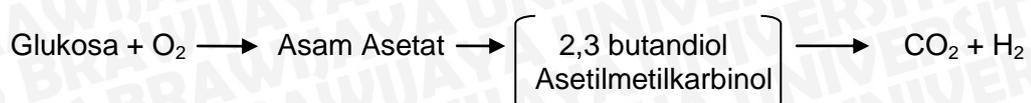
kemampuan bakteri dalam memfermentasi glukosa dan menghasilkan campuran asam. Adanya campuran asam dapat menurunkan derajat keasaman media sampai pH 5,0, yang terdeteksi dengan perubahan warna indikator metil merah dari kuning menjadi merah. Pada umumnya, bakteri yang memberikan hasil uji MR positif adalah bakteri penghasil gas, karena bakteri ini menghasilkan enzim format hidrogenliase yang memecahkan asam format menjadi karbondioksida dan air (Cappuccino dan Sherman, 1983).



**Gambar 7. Reaksi Fermentasi Glukosa dalam Media MR Menjadi Asam Campuran**

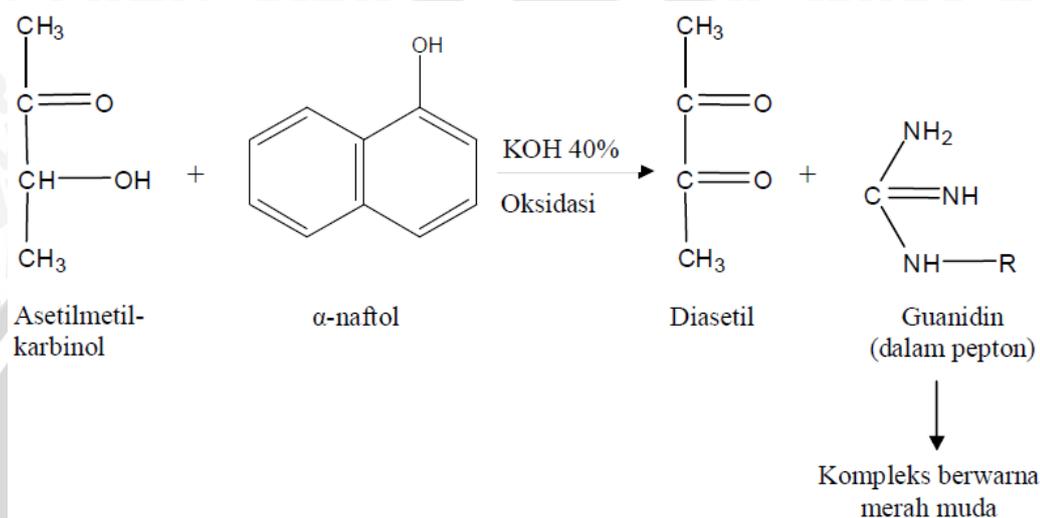
#### 4. Uji *Voges-Proskauer*

Pengujian *Voges-Proskauer* (VP) dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose koloni bakteri pada media MRVP (*Methyl Red-Voges Proskauer*) broth. Media MRVP broth yang keruh (terdapat pertumbuhan bakteri) diambil masing-masing 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi steril. Pada tabung reaksi tersebut ditambahkan 0,6 mL larutan *alpha naphthol* dan 0,2 mL KOH 40% kemudian dikocok. Pada tabung reaksi tersebut ditambahkan sedikit kristal kreatinin untuk mempercepat reaksi kemudian dikocok kembali dan didiamkan ± 2 jam. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda sampai merah delima. Sisa MRVP broth diinkubasi kembali selama 48 jam pada suhu 35°C untuk digunakan dalam uji *methyl red* (Jayanti et al., 2012).



**Gambar 8. Reaksi Fermentasi Glukosa Dalam Medium VP menjadi Senyawa Non-Asam**

Senyawa 2,3-butandiol dapat dideteksi menggunakan pereaksi Barrit yang mengandung  $\alpha$ -naftol dan kalium hidroksida 40%. Penambahan pereaksi ini mengakibatkan perubahan warna media VP menjadi merah muda atau merah, jika terdapat asetilmetilkarbinol (asetoin).



**Gambar 9. Deteksi Senyawa Asetilmetilkarbinol Menggunakan Pereaksi Alpha-naftol**

Deteksi dilakukan terhadap asetilmetilkarbinol, karena senyawa ini hampir selalu terdapat bersama-sama 2,3-butandiol. Metode deteksi ini sering disebut metode tak langsung *Voges Proskauer* (Cappucino dan Sherman, 1983).

## 5. Uji Urease

Uji urease bertujuan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi urea atau menghasilkan enzim urease. Enzim urease merupakan enzim hidrolisis yang memecah ikatan nitrogen dan karbon pada komponen amida seperti urea dan membentuk amonia yang menciptakan suasana basa (Cappuccino dan Sherman, 1983). Bila dalam biakan urease, urea dihidrolisis sehingga terbentuk ammonia yang mengubah warna indikator dari kuning menjadi merah (Irianto, 2007).

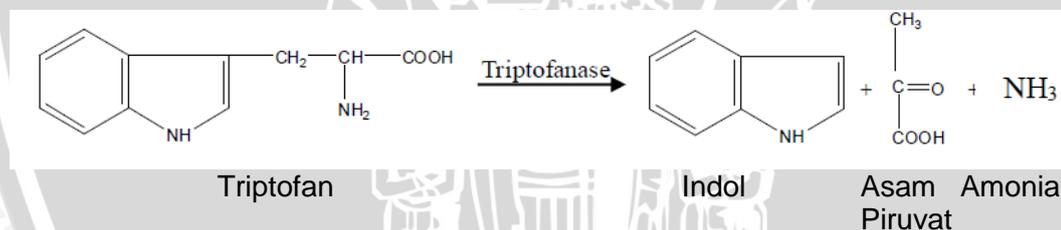


**Gambar 10. Reaksi Dalam Biakan Urease**

## 6. Uji Sulfid Indol Motility

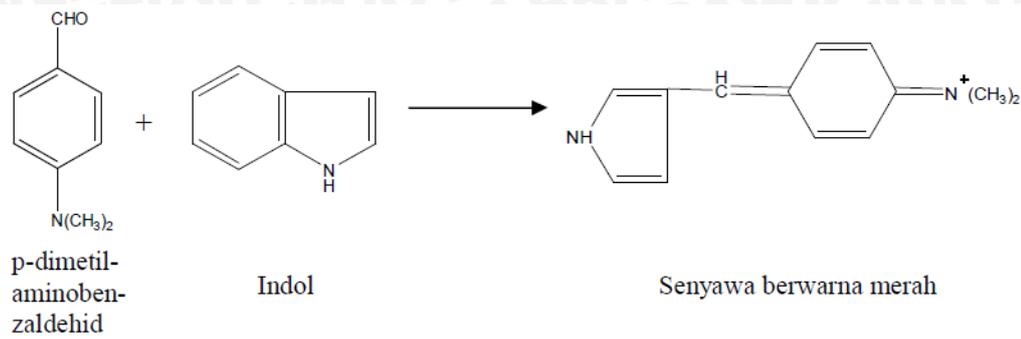
Uji motil digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk bergerak. Hasil uji positif, jika terdapat penyebaran pertumbuhan koloni bakteri di sekitar tempat inokulasi. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki alat gerak, misalnya flagel (Norman, 2005).

Uji indol digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendegradasi asam amino triptofan. Medium uji indol mengandung substrat triptofan, yaitu adalah asam amino esensial yang dapat teroksidasi oleh aktivitas enzimatik bakteri. Triptofan diubah menjadi produk metabolik indol, asam piruvat, dan amonia oleh enzim triptofanase (Cappucino, 1983).



**Gambar 11. Reaksi Oksidasi Triptofan Oleh Enzim Triptofanase**

Keberadaan indol dideteksi dengan penambahan pereaksi Kovac yang mengandung p-dimetilaminobenzaldehid, butanol, dan asam hidroklorat. Indol yang diekstraksi ke lapisan pereaksi tersebut akan mengasamkan komponen butanol dan membentuk kompleks dengan p-dimetilaminobenzaldehid yang menghasilkan warna merah (Cappucino, 1983).



### Gambar 12. Reaksi Indol dengan Komponen Dalam Pereaksi Kovac

Pengujian produksi sulfur dan uji motilitas dilakukan dengan menginokulasikan satu ose koloni bakteri dengan metode tusukan pada media SIM (*Sulfur Indol Motility*). Media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, selanjutnya diamati ada tidaknya pembentukan sulfur dan motilitas koloni bakteri. Hasil sulfur positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada media SIM. Kekeruhan yang menyebar sepanjang bekas tusukan menunjukkan reaksi positif terhadap motilitas bakteri (Jayanti *et al.*, 2012).

### 7. Uji Nitrat

Keberadaan nitrit dalam media diuji dengan penambahan asam sulfanilat dan  $\alpha$ -naftilamin yang akan bereaksi dengan nitrit yang ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah atau merah muda. Pada tabung yang tidak menunjukkan perubahan warna, ditambahkan bubuk Zn untuk melihat reduksi nitrat menjadi nitrit. Bila didapatkan nitrat dalam medium, maka kaldu akan berubah warna menjadi merah muda atau merah karena Zn mereduksi nitrat menjadi nitrit dan nitrit ini bereaksi dengan reagen uji dan terbentuk warna merah (Lay, 2004).

Reduksi nitrat terjadi pada kebanyakan bakteri anaerob fakultatif dengan menggunakan nitrit. Reaksinya :



O<sub>2</sub> dapat menghambat reduksi nitrat sehingga dalam reaksi O<sub>2</sub> dihabiskan kemudian menggunakan nitrat pada bakteri anaerob (Suriawiria, 1985).

#### 8. Uji *Microbact Identification Kits*

Sistem *microbact identification kits* adalah sistem identifikasi komersial untuk *Enterobacteria* dan bakteri gram negatif non-fermentor basil dan yang lainnya. terdiri dari substrat untuk 24 tes biokimia yang berbeda ditempatkan di sumur-sumur nampan *microtitre* (Ling *et al.*, 1988). Di dalam *microbact identification kits*, setiap kit berisi 12 (12A, 12B dan 12E) atau 24E. Identifikasi mikroorganisme didasarkan pada perubahan pH dan pemanfaatan substrat. Untuk penggunaannya: *microbact* 12A gram negatif dan 12E dapat digunakan sendirian untuk identifikasi oksidase-negatif, nitrat-positif fermentor glukosa dan berguna untuk *skinning Enterobacteriaceae* patogen dari enterik dan urin spesimen. *Microbact* 12B gram-negatif dapat digunakan dalam hubungannya dengan 12A untuk identifikasi glukosa oksidase positif, nitrat-negatif dan *Enterobacteriaceae*. *Microbact* 24E adalah kombinasi dari 12A, 12B, dan 12E (Oxoid, 2003)

#### 2.13 Uji Identifikasi Bakteri Dengan 16S rDNA

Identifikasi bakteri dapat dilakukan melalui penentuan 16S rDNA (gen 16S rRNA) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)-sekuensing. Segmen 16S rDNA bakteri di amplifikasi melalui PCR, lalu urutannya ditentukan melalui sekuensing. Urutan basa dari 16S rDNA tersebut dibandingkan dengan berbagai urutan 16S rDNA dari berbagai organisme prokariot pada *gene bank*. Perbandingan urutan 16S rDNA juga merupakan cara untuk mengetahui filogenetik dan evolusi diantara berbagai organisme prokariot, karena gen ini mengandung sejumlah besar urutan (sekuens) yang cenderung tetap (*highly conserved sequence patterns*) (Sulistyaningsih, 2008)..

Identifikasi molekuler digunakan untuk mempelajari kesamaan *deoxyribonucleic acid* (DNA) atau homologi genetik diantara organisme. Kesamaan DNA dapat dipelajari dengan sekuensing terhadap basa DNA atau RNA dan hibridisasi DNA (Malik, 2006). Penggunaan untai gen ribosomal RNA untuk klasifikasi mikroorganisme saat ini merupakan salah satu analisis yang cukup akurat untuk menentukan kekerabatan diantara mikroorganisme. Situs DNA molekul 16S rRNA dikenal mempunyai informasi genetik yang cukup lengkap untuk melihat kekerabatan bakteri (Suryadi, 2002).

Identifikasi 16S rRNA dapat dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan suatu metode untuk membuat salinan segmen spesifik dari suatu DNA. Metode ini jauh lebih cepat daripada pengklon gen dengan DNA plasmid atau DNA faga dan seluruhnya dilakukan *in vitro* (Campbell, 2002).

Gen pengkode 16S rRNA terdapat bagian penyimpan yang berguna untuk mendisain primer universal PCR yang mampu memperbanyak beberapa fragmen 16S rRNA dari semua bakteri patogen dan nonpatogen. Fragmen ini termasuk bagian hipervariable yang tidak mudah termutasi dan mengandung tanda urutan spesifik spesies yang berguna untuk mengidentifikasi bakteri hingga ke level spesies (Israhmadini, 2008).

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, annealing dan ekstensi oleh enzim DNA polymerase. Setiap siklus dikondisikan pada temperature berbeda yang telah diprogram oleh mesin yang disebut *thermal cycler*. Dasar siklus PCR ada 30-35, siklus ini meliputi: denaturasi (95°C) untai ganda DNA dipisahkan, annealing (55-60°C) primer dibiarkan berikatan dengan ujung-ujung urutan target yang spesifik, dan ekstensi (72°C). Taq polimerase menambahkan nukleotida pada ujung 3' primer dengan menggunakan untai DNA yang lebih panjang sebagai cetakannya. Sedangkan

untuk waktu tergantung pada panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi. Campuran reaksi PCR terdiri atas komponen-komponen yaitu template DNA, buffer, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), primer dan unit taq polimerase (Kuchel *et al.* 1998).

## 2.14 Parameter Fisik dan Kimia Lingkungan

Mikroba termasuk kelompok jasad hidup yang sangat peka terhadap perubahan lingkungannya. Adanya perubahan kecil di lingkungan, misalnya suhu atau cahaya, maka dengan cepat akan mempengaruhi dalam aktivitasnya. Tetapi mikroorganisme itu juga dengan cepat dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan (Waluyo, 2007). Cara penyesuaian diri yang cepat ini didukung oleh adanya enzim adaptif yang lebih aktif didalamnya. Sehingga tidak mengherankan kalau dalam waktu yang relatif singkat, mikroba dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya yang baru, walau pada mulanya lingkungan tersebut bersifat meracun terhadapnya. Namun sebaliknya, kehadiran mikroba dalam suatu tempat dapat langsung mempengaruhi lingkungannya. Baik lingkungan fisik, lingkungan kimia, ataupun lingkungan biologisnya (Suriawiria, 2003).

### 1. Suhu

Menurut Radji (2011), sebagian besar bakteri tumbuh optimal pada suhu tubuh manusia. Akan tetapi, beberapa bakteri dapat tumbuh dalam lingkungan ekstrim yang berada diluar batas pertahanan organisme eukariot. Bakteri digolongkan menjadi tiga bagian besar berdasarkan perbedaan suhu tumbuh, yaitu:

#### 1. *Psikrofil* (hidup diudara dingin)

Bakteri yang tumbuh pada suhu 0°C dengan suhu optimum 15 °C dan tidak tumbuh pada suhu kamar (25 °C) bakteri ini sering ditemukan di laut

dalam dan di daerah kutub, serta sering menimbulkan masalah pada pengawetan makanan

2. *Psikrotrof* ( *psikrofil fakultatif*)

Bakteri yang tumbuh pada suhu 0°C dengan suhu optimum 20-30°C dan tidak tumbuh pada suhu lebih dari 40°C bakteri ini sering terdapat pada makanan yang disimpan pada suhu rendah karena dapat tumbuh pada suhu lemari es.

3. *Mesofil* (hidup diudara bersuhu sedang)

Bakteri yang tumbuh optimal pada suhu 25-40°C dan merupakan bakteri yang paling banyak ditemukan. Suhu optimum bakteri patogen yaitu 37°C. Bakteri mesofil termasuk sebagian besar bakteri yang mampu menyebabkan kerusakan dan penyakit.

4. *Termofil* (hidup diudara panas).

Bakteri yang tumbuh pada suhu tinggi. Sebagian besar bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 50-60°C. Suhu seperti ini dapat terjadi di dalam tanah yang disinari matahari dan dalam sumber air panas. Bakteri termofil tidak dapat tumbuh dibawah suhu 45°C.

Hal ini terjadi karena suhu yang lebih tinggi akan menginaktifkan sistem enzimatik di dalam sel bakteri, maka dari itu tiap bakteri tumbuh pada kelompok suhu berikut ini:

- Minimum : suhu terendah bakteri masih dapat tumbuh
- Optimum : suhu bakteri dapat tumbuh subur
- Maksimum: suhu tertinggi bakteri masih dapat tumbuh

Menurut Waluyo (2009), semua mikroorganisme dalam proses kehidupannya dipengaruhi oleh temperatur. Bakteri, Cyanophyta, dan Fungi dapat tumbuh hanya pada suatu batas rentang temperatur -10 sampai dengan +

90°C. Pada rentang tersebut temperatur mempengaruhi laju pertumbuhan, kebutuhan nutrisi, enzimatis, dan komposisi kimiawi dalam sel. Ada tiga kelompok bakteri yang dibedakan berdasarkan temperatur, yakni:

**Tabel 4. Kelompok Bakteri Berdasarkan Temperatur**

	Minimum (°C)	Optimum (°C)	Maksimum (°C)
Psikrofil	-10 s.d +5	+ 10 s.d + 20	+ 20 s.d +30
Mesofil	+10 s.d +15	+ 30 s.d + 40	+ 40 s.d +50
Termofil	+ 25 s.d + 45	+ 50 s.d +75	+ 75 s.d +93

Sumber: Waluyo (2009)

Pembagian temperatur berdasarkan menjadi tiga, yakni temperatur minimum, temperatur optimum, dan temperatur maksimum terlalu kaku. Karena beberapa mikroorganisme dapat mengadaptasikan temperatur, baik adaptasi terhadap temperatur yang lebih tinggi atau temperatur yang lebih rendah.

## 2. pH

pH adalah derajat keasaman suatu larutan. Kebanyakan bakteri tumbuh subur pada pH 6,5 sampai 7,5. Sangat sedikit bakteri yang mampu tumbuh pada pH asam (di bawah pH 4). Ketika dibiakkan di laboratorium, bakteri sering memproduksi asam yang biasanya berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri itu sendiri. Untuk menetralkan dan mempertahankan pH, dengan penambahan pepton dan asam amino atau garam fosfat (Radji, 2011).

Berdasarkan Suriawiria (2003), Batas pH untuk pertumbuhan jasad merupakan suatu gambaran dari batas pH bagi kegiatan enzim. Untuk tiap jasad dikenal nilai pH minimum, optimum, dan maksimum. Bakteri memerlukan pH antara 6,5 sampai 7,5, ragi antara 4,0 sampai 4,5, sedang jamur dan aktinomiset tertentu mempunyai daerah pH yang luas. Atas dasar daerah-daerah pH bagi kehidupan mikroorganisma, dibedakan adanya 3 golongan besar, yaitu:

1. Mikroorganisma asidofilik, yaitu jasad yang dapat tumbuh pada pH antara 2,0-5,0
2. Mikroorganisma mesofilik (neutrofilik), yaitu jasad yang dapat tumbuh pada pH antara 5,5 sampai 8,0
3. Mikroorganisma alkalifilik, yaitu jasad yang dapat tumbuh pada pH 8,4 sampai 9,5

### 2.15 Definisi *Mud Volcano* (Gunung Lumpur)

Isolasi bakteri dilakukan pada daerah semburan lumpur panas lapindo, karena pada semburan lumpur panas lapindo merupakan suatu peristiwa geologi atau geothermal yang diakibatkan oleh kesalahan proses pengeboran oleh PT Lapindo Brantas, sehingga terjadi peristiwa keluarnya lumpur bercampur air panas dan gas dari perut bumi, peristiwa ini menurut para ahli merupakan terbentuknya mud volcano atau gunung lumpur. Banyak para ahli geologi yang menganalogikan semburan lumpur panas Lapindo dengan gejala alam yang disebut gunung lumpur / *mud volcano* yang banyak tersebar di Indonesia (khususnya di Indonesia Timur dikenal dengan istilah poton), bahkan di Jawa Timur Utara pun banyak diketemukan, seperti Bleduk Kuwu dekat Purwodai, Gunung Anyar dekat Surabaya bahkan di selatan Kali Porong, yang di masa lalu menyemburkan lumpur tetapi sekarang sudah mati, Definisi dari *Mud Volcano* adalah suatu gunung api lumpur yang berbentuk suatu kerucut tanah liat dan lumpur berukuran kecil, yang pada umumnya kurang dari 1-2 m tingginya. Gunung api lumpur kecil ini terbentuk dari campuran air panas dan sedimen halus (tanah liat dan lumpur) dimana terdapat (1) aliran perlahan dari suatu lubang seperti suatu arus lahar cair; atau (2) menyembur ke udara seperti suatu air mancur lahar yang melepaskan air mendidih dan gas vulkanis. Tanah liat dan lumpur yang secara khas berasal dari gas batuan vulkanik padat dan panas yang

terlepas dari magma yang dalam di bawah memutar air bawah tanah menjadi suatu campuran panas dan asam yang secara kimiawi merubah batuan vulkanik menjadi fraksi lumpur dan tanah liat (Herawati, 2007).

Hasil analisa mikropaleontologi menunjukkan bahwa lumpur Lapindo mengandung fosil foraminifera (cangkang zat renik bersel satu) yang dahulu hidup di lingkungan laut (Koesoemadinata, R, September 2006). Lumpur vulkanik tersebut merupakan material yang berasal dari formasi berumur Pliosen. Analisis nanofosil di lumpur menunjukkan umur sekitar Pliosen, sama dengan kandungan fosil di kedalaman 2000-6000 ft di sumur tersebut, ppm chloride sekitar 10.000, lumpur mengandung material vulkanik dan di awal-awal semburan lumpur mengeluarkan gas H<sub>2</sub>S dengan temperatur lumpur sekitar 40-50°C (Herawati, 2007).

### 2.16 Air

Air merupakan unsur yang mempunyai peran utama dalam kehidupan di bumi ini. Air dikenal sebagai sumber daya yang terbarukan, namun dari segi kualitas maupun kuantitas membutuhkan upaya dan waktu untuk dapat berlangsung baik. Kriteria dan standar kualitas air didasarkan atas beberapa hal antara lain keberadaan logam dan logam berat, anorganik, tingkat toksisitas, dan teremisinya pencemar ke lingkungan. Air adalah pelarut yang baik, oleh sebab itu di dalamnya paling tidak terlarut sejumlah kecil zat-zat anorganik dan organik. Dengan kata lain, tidak ada air yang benar-benar murni dan hal ini menyebabkan dalam setiap analisis air ditemukan zat-zat terlarut (Wijayanti, 2008).

Beberapa persyaratan yang perlu diketahui mengenai kualitas air tersebut baik secara fisik, kimia dan juga mikrobiologi. Syarat fisik, antara lain: air harus bersih dan tidak keruh, tidak berwarna, tidak berasa, tidak berbau, suhu tidak berbeda lebih dari 3°C dari suhu udara dan tidak meninggalkan endapan. Syarat

kimiawi, antara lain: tidak mengandung bahan kimiawi yang mengandung racun, tidak mengandung zat-zat kimiawi yang berlebihan, cukup yodium, pH air antara 6,5 – 8,5. Syarat mikrobiologi, antara lain: tidak mengandung kuman-kuman penyakit seperti disentri, tipus, kolera, dan bakteri patogen penyebab penyakit (PP Republik Indonesia No 16 Tahun 2005).

### 2.17 Sedimen

Sedimen adalah partikel organik dan anorganik yang terakumulasi secara bebas. Sedimen didefinisikan secara luas sebagai material yang diendapkan di dasar suatu cairan (air dan udara), atau secara sempit sebagai material yang diendapkan oleh air, angin, atau gletser / es. Sedangkan endapan sedimen adalah akumulasi mineral dan fragmen batuan dari daratan yang bercampur dengan tulang-tulang organisme laut dan beberapa partikel yang terbentuk melalui proses kimiawi yang terjadi di dalam laut (Mubarak *et al.*, 2013).

Menurut Ongkosongo (1992) sedimen adalah kerak bumi yang ditranspormasikan dari suatu tempat ke tempat lain baik secara vertikal maupun secara horizontal, proses hidrologi tersebut akan terhenti pada suatu tempat dimana air tidak sanggup lagi membawa kerak bumi yang tersuspensi tersebut. Biasanya suatu kawasan perairan tidak ada sedimen dasar yang hanya terdiri dari satu tipe substrat saja, melainkan terdiri dari kombinasi tiga fraksi yaitu pasir, lumpur dan tanah Hat. Menurut Rifardi (2008) ukuran butir sedimen dapat menjelaskan hal-nal berikut : 1) menggambarkan daerah asal sedimen, 2) perbedaan jenis partikel sedimen, 3) ketahanan partikel dari bermacam-macam komposisi terhadap proses weathering, erosi, abrasi dan transportasi serta 4) jenis proses yang berperan dalam transportasi dan deposisi sedimen.

Menurut asalnya sedimen dibagi menjadi tiga macam yaitu; 1) sedimen *lithogenous* ialah sedimen yang berasal dari sisa pengikisan batu-batuan didarat,

2) sedimen *biogenous* ialah sedimen yang berasal dari sisa rangka organoisme hidup juga akan membentuk endapan-endapan halus yang dinamakan ooze yang mengendap jauh dari pantai ke arah laut dan 3) sedimen *hydrogenous* yakni sedimen yang dibentuk dari hasil reaksi kimia dari air laut (Hutabarat dan Evans, 1985).

### 2.18 Salinitas Perairan

Salinitas didefinisikan sebagai jumlah total garam yang dinyatakan dalam gram yang terdapat dalam satu kilogram air laut, dengan anggapan bahwa seluruh karbonat telah teroksidasi, brom dan iod dihitung dalam klor dan semua zat organik telah teroksidasi sempurna. Nilai besaran salinitas dilihat dari definisinya dinyatakan dalam gram per kilogram air laut atau satu per seribu sehingga mempunyai besaran permil (‰) (Rahmawati, 2004).

Salinitas perairan menggambarkan kandungan garam dalam suatu perairan. Garam yang dimaksud adalah berbagai ion yang terlarut dalam air termasuk garam dapur (NaCl). Pada umumnya salinitas disebabkan oleh 7 ion utama yaitu : natrium (Na), kalium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg), klorit (Cl), sulfat (SO<sub>4</sub>) dan bikarbonat (HCO<sub>3</sub>). Salinitas dinyatakan dalam satuan gram/kg atau promil (‰) (Effendi, 2003).

Salinitas adalah merupakan salah satu faktor abiotik yang sangat menentukan penyebaran biota laut. Perairan dengan salinitas lebih rendah atau lebih tinggi daripada pergoyangan normal air laut merupakan faktor penghambat (*limiting factor*) untuk penyebaran biota laut tertentu (Aziz, 1994). Menurut Kinne (1964) perairan muara sungai dan estuaria biasanya mempunyai salinitas lebih rendah dari air laut normal dan disebut sebagai perairan payau (*brackish water*). Batas pergoyangan air payau ini berkisar 0,5‰ sampai dengan 30‰.

Salinitas adalah tingkat keasinan atau kadar garam terlarut dalam air. Salinitas air payau menggambarkan kandungan garam dalam suatu air payau. Garam yang dimaksud adalah berbagai ion yang terlarut dalam air termasuk garam dapur (NaCl). Pada umumnya salinitas disebabkan oleh 7 ion utama yaitu: natrium ( $\text{Na}^+$ ), kalium ( $\text{K}^+$ ), kalsium ( $\text{Ca}^{++}$ ), magnesium ( $\text{Mg}^{++}$ ), Klorida ( $\text{Cl}^-$ ), sulfat ( $\text{SO}_4^-$ ) dan bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ). Salinitas dinyatakan dalam satuan gram/kg atau promil (‰). Air di kategorikan sebagai air payau bila konsentrasi garamnya 0,05 sampai 3‰ atau menjadi *saline* bila konsentrasinya 3 sampai 5‰. Lebih dari 5‰ disebut *brine*. Air payau adalah air yang salinitasnya lebih rendah dari pada salinitas rata-rata air laut normal (<35 permil) dan lebih tinggi dari pada 0,5 permil yang terjadi karena pencampuran antara air laut dengan air tawar baik secara alamiah maupun buatan. Banyak sumur-sumur yang airnya masih mengandung ion-ion besi ( $\text{Fe}^{++}$ ), natrium ( $\text{Na}^+$ ), zink ( $\text{Zn}^{++}$ ), sulfat ( $\text{SO}_4^-$ ), dan clorida ( $\text{Cl}^-$ ) yang cukup tinggi (Apriani *et al.*, 2012)

### 2.19 Pengujian Logam Berat

Prinsip kerja Spektrofotometer (AAS) pada dasarnya merupakan penyerapan sinar dengan panjang gelombang tertentu oleh atom-atom yang di bebaskan oleh nyala. Secara rinci prosesnya dimulai dari sampel yang akan dianalisis berupa cairan, sampel kemudian dihisap ke dalam ruang pengkabutan (nebulizer) untuk diubah menjadi partikel-partikel kecil (aerosol) dengan menggunakan udara bertekanan yang dialirkan dari kompresor. Partikel kemudian dipecah lagi menggunakan baling-baling (flow spoiler) untuk menghasilkan partikel yang lebih kecil dan halus, sedangkan partikel yang ukurannya besar akan dikeluarkan melalui pembuangan (drain). Partikel yang dilewatkan akan dicampur dengan gas pengoksida (udara) dan bahan bakar (gas

asetiln). Partikel yang telah bercampur dengan gas pengoksida dan bahan bakar kemudian dilewatkan melalui kapiler menuju nyala. Begitu sampai di nyala partikel tersebut akan dibakar pada tungku pembakaran, dengan tujuan untuk memecah partikel menjadi atom-atom berbentuk gas. Partikel yang telah di jadikan atom tersebut kemudian akan disinari dengan panjang gelombang tertentu sesuai dengan unsur yang berasal dari lampu katoda berongga. Saat atom-atom tersebut disinari, sebagian sinar akan ditransmisikan dan sebagian lagi akan diserap oleh atom, atom yang menyerap sinar tersebut elektronnya akan tereksitasi untuk beberapa saat, setelah itu elektron tersebut akan kembali ke tingkat energi dasar (Ground State) sambil melepaskan energi. Sinar yang diteruskan setelah melewati nyala akan dilewatkan pada celah (slit) untuk meluruskan sinar yang datang menuju monokromator. Monokromator disini berfungsi sebagai isolasi untuk panjang gelombang yang tidak sesuai dengan panjang gelombang unsur pada sampel. Sinar yang keluar dari monokromator lalu ditangkap oleh detektor, setelah itu sinar dengan panjang gelombang sesuai unsur di ubah menjadi signal listrik yang akan di baca oleh perangkat komputer. Perangkat komputer membaca signal listrik bukan sebagai sinar yang teruskan (ditransmisikan) melainkan sebagai nilai absorbansi dari atom (Salam *et al*, 2013)

Dasar analisis menggunakan teknik AAS adalah bahwa dengan mengukur besarnya absorpsi oleh atom analit, maka konsentrasi analit itu dapat di tentukan. Penentuan konsentrasi analit diperoleh melalui perbandingan dengan standar. Cara kerja dari metode ini adalah dengan membandingkan antara absorban larutan sampel dengan larutan standar pembanding untuk memperoleh konsentrasi larutan contoh tersebut. Jadi skala absorban dari AAS dikalibrasi dengan suatu deret standar yang diketahui konsentrasinya. Hasil dari analisis dengan AAS adalah kurva kalibrasi. Dari kurva kalibrasi ini konsentrasi analit dari larutan sampel dapat dicari setelah mengukur absorbannya. Proses kalibrasi

AAS sangat krusial karena dapat secara langsung mempengaruhi hasil analisis. Faktor yang dapat mempengaruhi proses kalibrasi AAS adalah larutan standard dan instrument AAS (Handayani *et al*, 2013).



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2012-September 2013. Sampel air dan sedimen diperoleh dari kawasan Lumpur Lapindo di desa Renokenongo, Kecamatan Porong, Kabupaten Sidoarjo. Proses Kultur sampai uji identifikasi bakteri dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu dan Hayati serta Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Proses pengujian logam berat dan salinitas dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

#### 3.2 Materi Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan utama yang terdiri dari air dan sedimen yang didapatkan dari kawasan lumpur lapindo Sidoarjo yang berjarak 200 meter dari pusat semburan, media pertumbuhan yang meliputi Nutrient Agar (NA), *mc conkey* agar dan Nutrient Broth (NB), yang didapatkan dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, media uji biokimia yang meliputi simon sitrat agar, MR-VP broth, Sulfit Indol Motility Agar, tripton sugar iron agar, urea agar, nitrat broth, reagen uji biokimia yang meliputi KOH 3%, *Metyl Red*, kovac, *a*-naftol, mineral oil, TDA, yang didapatkan dari laboratorium mikrobiologi kedokteran Universitas Brawijaya, reagen pewarnaan gram yang terdiri dari kristal ungu,iodin, aseton, akuades yang did apatkan dari Laboratorium Sentral Ilmu dan Hayati Universitas Brawijaya Malang, alkohol 70%, bahan tambahan yang terdiri dari *blue tip* spiritus, kertas whattman no.42, sarung tangan, masker dan kertas

saring yang didapatkan dari CV. Makmur Sejati Perumahan Griya Santha Blok I no. 238 Malang, serta bahan tambahan yang digunakan untuk uji logam berat yang terdiri dari HCl, HNO<sub>3</sub>, Amonium persulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaIO<sub>4</sub>, diphenyl karbazid, dan dimethyl gliakxim yang didapat dari laboratorium kimia fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

### 3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari *Laminer Air Flow* (LAF), tabung reaksi merk Pyrex, kulkas untuk penyimpanan stok bakteri, rak tabung reaksi, pipet volume 10 mL merk Pyrex, erlenmeyer 1000 ml, cawan petri, 500 ml dan 250 ml merk *pyrex*, gelas ukur 100 mL merk *Pyrex*, botol scott 1000 ml, *beaker glass* 1000 mL 500 mL dan 250 mL merk *Pyrex*, spatula, corong kaca, *cover glass*, *object glass*, autoklaf, nampan, *shaker incubator* merk *SI-600R*, jarum loop, jarum ose, kompor, *sprayer*, pipet volume, bola hisap, sendok bahan mikropipet merk *Avi-Teck*, panci, bunsen, inkubator merk *Memmert*, *crushable tang*, refrakometer, termometer, pH meter, timbangan digital, *washing bottle*, mikroskop merk *Olympus*, *microbact identification kits*, kaca porselen, kompor listrik, labu erlenmeyer, refraktometer merk Atago, AAS (*Atomic Adsorbansion Spectrofotometer*) merk shimadzu, dan spektrofotometer.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif, dimana metode ini digunakan untuk mempelajari gejala-gejala serta studi kasus yang masih perlu diteliti dan masih sangat kurang diketahui oleh masyarakat umum. Penelitian jenis ini bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai suatu gejala tertentu, atau mendapatkan ide-ide baru dengan maksud untuk merumuskan masalahnya secara lebih terperinci atau untuk mengembangkan hipotesa. Metode ini bertujuan untuk memformulasikan pertanyaan penelitian yang lebih tepat, sehingga hasil penelitian nanti dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan selanjutnya di masa mendatang. (Yumei dan Yulia, 2008). Penelitian eksploratif bertujuan untuk menyelidiki suatu masalah atau situasi untuk mendapatkan pengetahuan dan pemahaman yang baik dan mendalam tentang masalah atau situasi yang dijadikan objek penelitian.

Metode eksploratif pada penelitian ini yaitu mengumpulkan data dengan melakukan penelitian. Penelitian diawali dengan uji lingkungan lumpur lapindo Sidoarjo yang meliputi suhu, pH, salinitas dan logam berat untuk mengetahui kondisi lingkungan isolat bakteri, kemudian dilakukan tahapan kultur sampai isolasi dan pendugaan identifikasi bakteri melalui karakterisasi morfologi yang meliputi uji morfologi koloni dan pewarnaan gram dan fisiologi isolat bakteri serta uji biokimia yang meliputi uji MR, uji VP, uji SIM, uji nitrat, uji urease, uji simon sitrat, dan uji TSIA kemudian dilanjutkan untuk mengetahui pendugaan species isolat dengan *microbact identification kits*. Serta mengetahui peranan bakteri termofilik dalam industri pengolahan hasil perikanan.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Pengambilan Sampel Air dan Sedimen

Air dan sedimen yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Lumpur Lapindo Sidoarjo. Sampel langsung diambil berjarak sekitar 200 meter dari dekat pusat semburan lumpur. Sampel diambil dari lima titik yang berbeda kemudian dicampur jadi satu, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan botol *scott* yang telah disterilisasi berukuran 1 Liter dengan bantuan corong dan gayung air yang telah disemprot alkohol 70%.

Sampel yang sudah dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan botol *scott* dibawa menuju laboratorium dengan menggunakan *coolbox*. Fungsi *coolbox* yaitu untuk mempermudah dalam pengangkutan sampel. Setelah itu, sampel dibiarkan sampai dingin dan dimasukkan ke dalam ruangan pendingin atau kulkas yang bersuhu  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan. Untuk lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada gambar 13. Dan langkah-langkah pengambilan sampel dapat dilihat pada Lampiran 2.



Gambar 13. Lokasi Pengambilan Sampel

### 3.4.2 Pengukuran Parameter Fisika

#### 1. Suhu

Pengukuran suhu di lokasi pengambilan sampel dilakukan untuk menentukan suhu inkubasi pada saat penginkubasian bakteri. Pengukuran suhu dilakukan di 5 titik yang masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali ulangan di tempat pengambilan sampel dengan menggunakan termometer yang ditancapkan langsung pada air dan sedimen. Pengukuran suhu dapat dilihat pada Gambar 14. Dan langkah-langkah pengukuran suhu dapat dilihat pada Lampiran 3.



**Gambar 14. Pengukuran Suhu Dengan Termometer**

#### 2. pH

Pengukuran pH dilakukan untuk mengetahui pH dari sampel air dan sedimen. Pengukuran pH dilakukan dengan cara kedua sampel masing-masing diletakkan di dalam beaker glass 250 ml kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan pH meter dilakukan di 5 titik yang masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Pengukuran pH dilakukan di LSIH Universitas Brawijaya Malang. Langkah-langkah pengukuran pH dapat dilihat pada Lampiran 3.

### 3. Pengukuran Salinitas

Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan Refraktometer. Cara menggunakannya yaitu tutup kaca prisma dibuka kemudian satu tetes sampel diteteskan di kaca prisma dan ditutup kemudian dilihat kadar salinitasnya dengan mengarahkan refraktometer ke sumber cahaya yang terang agar terlihat.. Pengukuran salinitas dilakukan di 5 titik yang masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Setelah digunakan refraktometer dibilas dengan menggunakan akuades dan dikeringkan. Gambar refraktometer dapat dilihat pada Gambar 15. Dan langkah langkah pengukuran salinitas dengan menggunakan refraktometer dapat dilihat pada Lampiran 3.



Gambar 15. Refraktometer

#### 3.4.3 Parameter Kimia

##### 1. Pengukuran Kadar Logam Berat

Pengukuran kadar logam berat dilakukan dengan menggunakan metode *Atomic Adsorption Spectrophotometer (AAS)* dan spektrofotometer. Untuk metode AAS sampel ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke cawan porselen dan ditambahkan aquaregia yang terdiri dari HCl dan HNO<sub>3</sub> sebanyak 5 ml yang berfungsi untuk melarutkan logam dalam sampel. Berdasarkan Kristianingrum (2013), Aqua regia yaitu campuran asam klorida pekat dan asam nitrat pekat dengan perbandingan volume 3:1 mampu melarutkan logam-logam mulia seperti emas dan platina yang tidak larut dalam HCl pekat dan HNO<sub>3</sub> pekat.

Reaksi yang terjadi jika 3 volume HCl pekat dicampur dengan 1 volume HNO<sub>3</sub> pekat:



Gas klor (Cl<sub>2</sub>) dan gas nitrosil klorida (NOCl) inilah yang mengubah logam menjadi senyawa logam klorida dan selanjutnya diubah menjadi kompleks anion yang stabil yang selanjutnya bereaksi lebih lanjut dengan Cl<sup>-</sup> dan dipanaskan diatas kompor listrik sampai asat dan didinginkan, kemudian ditambahkan HNO<sub>3</sub> 2,5 N encer sebanyak 10 ml dan dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring ke labu 25 ml dan ditambahkan aquades sampai tanda batas labu dan dikocok sampai homogen kemudian sampel dibaca dengan AAS dengan memakai katoda dan dicatat absorbansinya. Untuk Gambar AAS dapat dilihat pada Gambar 16.



**Gambar 16. Pengujian Logam Berat Dengan AAS**

Untuk logam berat Mn, Cr dan Ni digunakan metode spektrofotometer. Untuk penentuan kadar logam Mn, untuk sampel air diambil sebanyak 100 ml, kemudian ditambahkan 10 cc HNO<sub>3</sub> yang berfungsi untuk melarutkan logam Mn dalam sampel dengan cara mengoksidasi dari ion Mn ke Mn<sup>2+</sup> lalu dipanaskan sampai mendidih selama ± 10 menit. Berdasarkan Ward *et al.*, (1969), asam nitrat yang mendidih digunakan untuk menghancurkan sampel, sehingga logam tersebut mudah dilarutkan dengan rebusan asam nitrat, penggunaan asam nitrat ini dikarenakan lebih aman jika dibandingkan asam peklorat panas. Untuk sampel sedimen diambil sebanyak 2 gram, kemudian ditambahkan 10 cc HNO<sub>3</sub>

lalu dididihkan sampai sampel asat. Kemudian masing-masing sampel didinginkan dan ditambahkan 0,5 gr Amonium persulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) yang berfungsi sebagai pengikat ion logam  $\text{Mn}^{2+}$  dengan cara menghilangkan senyawa oksida nitrat (NO), 10 cc  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (asam fosfor) yang berfungsi sebagai larutan buffer, sehingga pada pH tersebut terjadi proses pengkompleksasian yang lebih sempurna tanpa gangguan dari ion-ion yang lain. kemudian dididihkan dan didinginkan dan ditambahkan  $\text{NaIO}_4$  (Natrium Periodate) sebanyak 0,1 gr yang berfungsi sebagai pengkompleks logam Mn yang nantinya akan membentuk warna ungu violet. Berdasarkan DR 2800 Spectrophotometer (2007), mangan (Mn) dalam sampel dioksidasi menjadi warna ungu dengan *Natrium Periodate*, warna ungu berbanding lurus dengan konsentrasi mangan, yang hasilnya telah diukur pada panjang gelombang 525 nm. dan dicatat absorbansinya.

Untuk penentuan kadar logam Cr, untuk sampel air diambil sebanyak 100 ml kemudian ditambahkan 10 ml asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) yang berfungsi untuk melarutkan logam dalam sampel. Lalu dipanaskan sampai mendidih selama  $\pm 10$  menit, kemudian disaring ke labu 100 ml lalu ditambahkan akuades sampai 100 ml dan didapatkan filtrat. untuk sampel sedimen diambil sebanyak 2 gr dan ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$ , lalu dipanaskan sampai asat (kadar air hilang) dan didinginkan, kemudian ditambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sebanyak 10 ml lalu dipanaskan selama  $\pm 10$  menit. Berdasarkan Ward *et al.*, (1969), asam nitrat yang mendidih digunakan untuk menghancurkan sampel, sehingga logam tersebut mudah dilarutkan dengan rebusan asam nitrat, penggunaan asam nitrat ini dikarenakan lebih aman jika dibandingkan asam peklorat panas. Kemudian ditambahkan  $\text{HNO}_3$  encer (2,5 N) sebanyak 10 ml lalu dipanaskan kembali selama  $\pm 10$  menit agar logam dalam sampel terekstraksi (larut) lebih sempurna dan disaring ke labu 100 ml dan didapatkan filtrat. Filtrat dari masing-masing sampel diambil 10

ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan *Diphenylcarbazide*  $[(C_6H_6)NHNH]_2CO$  2 ml lalu dikocok yang berfungsi sebagai pengkompleks logam Cr pada pH asam sehingga akan terbentuk warna ungu violet. Menurut (Clesceri *et al.*, 1998). Penentuan Cr dalam air dengan APHA 3500-Cr, digunakan *Diphenylcarbazide* sebagai pengkompleks. Prinsip dari metode ini dapat dijelaskan sebagai berikut: penentuan Cr dapat dilakukan dengan menambahkan pengkompleks *Diphenylcarbazide* pada pH asam sehingga nanti akan memberikan warna ungu violet. Kemudian dikocok dan dibaca di spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm untuk dicatat absorbansinya. kemudian diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm dan dicatat absorbansinya.

Untuk penentuan kadar logam Ni. Untuk preparasi sampel air diambil sebanyak 100 ml, kemudian ditambahkan aquaregia ( $HCl+HNO_3$ ) sebanyak 5 ml. Menurut Kristianingrum (2013), Aqua regia yaitu campuran asam klorida pekat dan asam nitrat pekat dengan perbandingan volume 3:1 mampu melarutkan logam-logam mulia seperti emas dan platina yang tidak larut dalam HCl pekat dan  $HNO_3$  pekat. Reaksi yang terjadi jika 3 volume HCl pekat dicampur dengan 1 volume  $HNO_3$  pekat:



Gas klor ( $Cl_2$ ) dan gas nitrosil klorida ( $NOCl$ ) inilah yang mengubah logam menjadi senyawa logam klorida dan selanjutnya diubah menjadi kompleks anion yang stabil yang selanjutnya bereaksi lebih lanjut dengan  $Cl^-$ , setelah itu ditambahkan  $HNO_3$  encer (2,5 N) sebanyak 10 ml agar logam terlarut lebih sempurna dan dipanaskan diatas kompor listrik selama  $\pm 5$  menit untuk mempercepat reaksi pelarutan logam dalam sampel kemudian didinginkan dan disaring ke labu 100 ml dan didapatkan filtrat, apabila filtrat yang dihasilkan sebanyak 50 ml maka tidak perlu diencerkan, dan apabila filtrat kurang dari 50 ml

maka perlu dincerkan hingga 100 ml. Untuk preparasi sampel sedimen diambil sebanyak 2 gr, kemudian ditambahkan aquaregian (HCL+HNO<sub>3</sub>) sebanyak 5 ml, setelah itu ditambahkan HNO<sub>3</sub> encer (2,5 N) sebanyak 10 ml dan dididihkan hingga asat diatas kompor listrik selama  $\pm$  5 menit kemudian didinginkan dan disaring ke labu 100 ml dan didapatkan filtrat, filtrat yang didapat ditambah akuades hingga 100 ml. Selanjutnya untuk filtrat masing-masing sampel diambil sebanyak 50 ml kemudian ditambahkan ammonium sitrat sebanyak 10 untuk mengikat logam Ni, larutan iodium sebanyak 5 ml sebagai larutan buffer dan ditambahkan 20 ml *Dimethyl glyaxim* (CH<sub>3</sub>CNOH)<sub>2</sub> yang berfungsi sebagai pengkompleks logam Ni. Berdasarkan Zajac *et al.*, (2010), Nikel mempunyai sifat umum yang *hypersensitif*. Sebuah gangguan utama dalam estimasi nikel adalah kobalt, besi atau tembaga. Sehingga reaksi *complexometric* antara nikel dengan *dimethylglyoxime* merupakan salah satu metode yang telah dikembangkan untuk mengatasi masalah ini. penambahan ini sampai terbentuk warna merah lembayung dan ditambah akuades sampai 100 ml kemudian didiamkan selama 10 menit dan dibaca absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 530 nm. Untuk gambar spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 17.



**Gambar 17. Pengujian Logam Berat Dengan Spektrofotometer**

### 3.4.4 Tahap Persiapan Media (Modifikasi Dari Pelczar dan Chan, 2005)

Media yang digunakan pada kultur massal adalah Nutrient Agar (NA), media ditimbang dan dilarutkan di dalam erlenmeyer dengan menggunakan air lumpur yang sudah disaring hal ini bertujuan untuk mengkondisikan lingkungan yang sama dengan lingkungan asalnya selama pemeliharaan bakteri setelah itu erlenmeyer yang berisi media ditutup dengan kapas untuk mencegah media kontak dengan lingkungan dan direbus selama 15-20 menit agar homogen, kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 0,15 Mpa untuk mematikan semua bakteri yang tidak dikehendaki pada media.

Untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri, medium yang digunakan harus mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan oleh bakteri tersebut. Kebutuhan baktri termasuk air, karbon, energi, nitrogen, mineral, dan faktor pertumbuhan seperti vitamin dan beberapa asam amino (Srikandi, 1992).

**Tabel 5. Komposisi Bahan Pembuat Media *Nutrient Agar* (NA)**

Bahan Kimia	Komposisi Media
<i>Yeast Extract</i>	3,0 gr/l
Pepton	5.0 gr/l
Agar	15.0 gr/l
Akuades	1 Liter
Lab Lamco Powder	0,5 gr/l
Sodium Klorida	0,5 gr/l

Sumber : Nutrient Agar Merk “Merck” (2013)

### 3.4.5 Tahap Persiapan Sampel dan Pengenceran (Modifikasi Dari Pelczar dan Chan, 2005)

Sampel air disaring dengan kertas whatmann no.42 untuk memisahkan air dan sedimennya. kemudian Sampel air dan sedimen masing-masing sebanyak 10 ml dan 10 gram dimasukkan ke dalam 90 ml air *sample* setelah itu dilakukan pengenceran sampai dengan  $10^{-10}$  ke dalam 10 ml air *sample* steril dengan

menggunakan mikropipet. Pengenceran bertujuan untuk mengurangi kepadatan mikroba.

#### **3.4.6 Tahap Kultur Bakteri (Modifikasi Dari Pelczar dan Chan, 2005)**

Pada proses kultur bakteri menggunakan metode tuang dengan cara duplo, sampel yang telah diencerkan ke dalam air *sample* steril diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet kemudian dipindahkan ke cawan petri dan dituangkan media NA steril sebanyak 15-20 ml. Setelah beku cawan dibalik dan diinkubasi dengan suhu  $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 72 jam. Penentuan suhu inkubasi didapatkan dari pengukuran suhu di lokasi pengambilan sampel.

#### **3.4.7 Tahap Isolasi Bakteri (Pelczar dan Chan, 2005)**

Setelah diinkubasi selama  $\pm 3$  hari, bakteri yang telah tumbuh dilakukan tahap identifikasi awal meliputi bentuk dan warna koloni dan dipilih 1 jenis bakteri dominan dari masing-masing sampel kemudian dilakukan isolasi bakteri dengan cara metode 4 goresan kuadran beberapa tahap pada media Nutrient Agar dan Mc conkey agar. Isolasi bakteri bertujuan untuk mendapatkan koloni murni sehingga memudahkan untuk tahap identifikasi selanjutnya setelah itu diinkubasi dengan suhu  $47^{\circ}\text{C}$  sehingga diperoleh satu biakan murni.

#### **3.4.8 Uji Identifikasi Bakteri**

Untuk mengetahui jenis bakteri yang terdapat pada sampel dilakukan uji identifikasi bakteri yang meliputi :

##### **1. Uji Morfologi Bakteri dan Uji Pewarnaan Gram (Lay, 1994)**

Uji morfologi dilakukan untuk mengetahui karakter koloni berdasarkan bentuk fisiknya, dilihat dari warna, permukaan dan bentuk tepi koloni. Uji pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui bentuk sel bakteri serta membedakan gram positif dan gram negatif. Prosedur pewarnaan gram adalah : diambil sedikit isolat bakteri kemudian ambil 1 ose Nafis steril 0,9% dan dihomogenkan diatas objek glass yang bertujuan untuk menguraikan koloni agar

tidak terlalu padat dan terlihat bentuk selnya setelah dilakukan pewarnaan gram, kemudian difiksasi sampai kering yang bertujuan untuk menguapkan nafis pada *object glass*. Kemudian ditetesi kristal violet yang berfungsi sebagai pewarna primer dan didiamkan selama 30 detik kemudian dibilas dengan akuades yang bertujuan untuk membilas sisa kristal violet yang tidak menempel pada bakteri, kemudian ditetesi iodin didiamkan selama 30 detik yang bertujuan untuk memperkuat warna ungu yang berasal dari kristal violet dan dibilas dengan akuades yang bertujuan untuk membersihkan sisa iodin yang tidak menempel, selanjutnya ditetesi dengan aseton alkohol yang berfungsi untuk pemucat warna dan didiamkan tidak boleh lebih dari 7 detik kemudian dibilas dengan akuades dan terakhir ditetesi safranin sebagai pewarna sekunder, ketika ditetesi aseton alkohol, bakteri gram negatif akan melunturkan kristal violet dan mengikat safranin dan didiamkan 30 detik kemudian dibilas dengan akuades selanjutnya gram yang telah terwarnai diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

## 2. Pengamatan Karakter Sel Bakteri

Sel Bakteri yang telah terwarnai diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x dan dilihat bentuk dinding selnya serta warna gramnya. Dilihat bentuk selnya Apakah berbentuk basil, spiral atau coccus. Untuk pewarnaan gram bakteri dinyatakan gram positif apabila berwarna ungu dan dikatakan gram negatif apabila berwarna merah.

### 3.4.9 Uji Biokimia

Uji biokimia yang dilakukan meliputi :

#### 1. Uji Metyl Red (MR) (Cappucino dan Sherman, 1983)

Pengujian *Methyl Red* dilakukan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Pengujian *Methyl Red* dilakukan dengan cara 1 ose bakteri diinokulasikan kedalam media MR-VP kemudian diinkubasi pada suhu 37°C

selama 24-48 jam, kemudian media yang telah ditumbuhi bakteri ditetesi dengan 5 tetes reagen *methil red*. Jika terbentuk cincin merah menunjukkan reaksi positif dan apabila tidak ada perubahan warna menunjukkan reaksi negatif

## 2. Uji Voges Proskauer (VP) (Cappucino dan Sherman, 1983)

Uji *Voges Proskauer* digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri tersebut menghasilkan produk akhir yang netral (asetil metil karbinol) dari fermentasi glukosa. Uji *Voges proskauer* dilakukan dengan cara: satu ose bakteri diinokulasikan ke dalam media MR-VP. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24-48 jam. Media yang telah ditumbuhi oleh bakteri kemudian ditetesi reagen alphanaptol sebanyak  $\pm 0,6$  ml dan Kalium Hidroksida (KOH) sebanyak  $\pm 0,2$  ml', apabila terbentuk cincin merah menunjukkan reaksi positif.

## 3. Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA) (Cappucino dan Sherman, 1983)

Uji Triple Sugar Iron Agar digunakan untuk membedakan mikroorganisme enterik berdasarkan kemampuannya memfermentasikan glukosa, sukrosa dan laktosa pada media. Pengujian TSIA dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil dengan menggunakan jarum ose kemudian dipindahkan ke agar miring TSIA dengan cara menggores bagian miringnya secara zig-zag dan menusuk bagian tegaknya. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Menurut Raihana (2011), Pada bagian tegak, jika bakteri dapat memfermentasikan glukosa, warna media berubah dari orange menjadi kuning. Tidak memfermentasi sakarosa, media tetap merah. Dapat membentuk gas H<sub>2</sub>S, warna media berubah dari orange menjadi hitam, karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan metion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S, dan H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan Fe<sup>+2</sup> yang terdapat pada media yang menghasilkan endapan hitam. Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sakarosa, warna media berubah jadi kuning, tidak dapat memfermentasi laktosa atau sakarosa, warna media tetap orange atau tidak berubah.

#### 4. Uji Sulfit Indol Motility (SIM) (Cappucino dan Sherman, 1983)

Uji *Sulfit Indol Motility* (SIM) digunakan untuk melihat pergerakan dari bakteri yang diuji dan melihat kemampuan bakteri tersebut dalam memproduksi  $H_2S$ . Uji ini dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil satu ose kemudian diinokulasikan kedalam media SIM (*Sulfit Indol Motility*) dengan cara ditanam secara tegak lurus di tengah-tengah media, kemudian diinkubasi dengan suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Bila di media timbul kekeruhan seperti kabut berarti menandakan bakteri tersebut bergerak. Apabila terdapat cincin merah menandakan bakteri tersebut membentuk indol, apabila warna media menghitam menandakan bakteri tersebut menghasilkan gas  $H_2S$ .

#### 5. Uji Urease (Cappucino dan Sherman, 1983)

Uji Urease dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim urease. Uji ini dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil satu ose kemudian digoreskan pada permukaan urea agar miring, lalu diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Timbulnya warna merah muda berarti menunjukkan reaksi positif dan apabila tidak ada perubahan warna menunjukkan reaksi negatif.

#### 6. Uji Nitrat

Uji nitrat dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat. Uji ini dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil satu ose kemudian dicelupkan pada media nitrat broth, lalu diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Apabila timbul kekeruhan sebagai tanda pertumbuhan bakteri berarti menandakan positif apabila tidak ada perubahan warna berarti menandakan negatif.

## 7. Uji Sitrat (Cappucino dan Sherman, 1983)

Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Bila mikroorganisme mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna media dari hijau menjadi biru. Uji sitrat dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil satu ose bakteri dan diinokulasikan ke dalam media *simmon citrate agar* yang merupakan medium sintetik dengan Na-sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon,  $\text{NH}_4^+$  sebagai sumber N dan *brom thymol blue* sebagai indikator pH, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24-48 jam, apabila ada perubahan warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif.

### 3.4.10 Uji *Microbact Identification Kits* (Oxoid, 2013)

Identifikasi bakteri juga dapat dilakukan dengan menggunakan *Microbact identification kits*. Untuk pengujian bakteri gram positif bisa digunakan GNB 12B, sedangkan GNB 12A diabaikan. Untuk uji bakteri gram negatif menggunakan 1 set yaitu GNB 12A/B/E 24E. Cara menggunakan *microbact identification kits* yang pertama dilakukan adalah melakukan uji oksidasi untuk menentukan jenis *Microbact Identification Kits* yang digunakan. isolat bakteri yang akan diidentifikasi diambil sedikit dengan menggunakan jarum oose, kemudian ditempatkan pada kertas oksidase (*Bactident Oxidase Kit*), dan diamati perubahan warnanya selama 60 detik, apabila timbul warna ungu menunjukkan oksidase positif, maka harus memakai microbact MB-12A + MB-12B atau microbact 24E. Apabila tidak berwarna menunjukkan oksidasi negatif, maka bisa memakai microbact MB-12A saja atau bias juga MB 12A + MB 12B atau MB 24E

- **Pengujian Sifat Biokimia Dengan Microbact**

Uji biokimia dengan MB-12A/E meliputi uji lysine, uji omithin, uji H<sub>2</sub>S, uji glukosa, uji manitol, uji xylose, uji ONPG, uji indol, uji urease, uji VP, uji Citrate dan uji TDA. Uji biokimia dengan MB-12B meliputi uji gelatin, uji malonat, uji inositol, uji sorbitol, uji ramnosha, uji sucrose, uji lactose, uji arabinosa, uji adanitol, uji rafinosa, uji salisin, dan uji arginin.

1. **Pengisian Microbact**

*Microbact identification kits* yang telah disiapkan kemudian ditarik seal penutupnya dan larutan bakteri sebanyak 4 tetes diteteskan pada setiap sumur *microbact*. Pada sumur lysine, omithin, H<sub>2</sub>S pada MB 12A dan sumur arginin pada MB-12B ditetesi dengan mineral oil sebanyak 1-2 tetes, setelah itu seal ditutup kembali dan *microbact* diinkubasi selama 12-18 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator.

2. **Pembacaan *Microbact Identification Kits***

*Microbact* diambil dari incubator kemudian ditarik seal penutupnya dan ditambahkan dengan reagent pada:

- Sumur nomor 8 dengan indol kovact, 2 tetes
- Sumur nomor 10 dengan VP 1 (larutan 40% KOH) dan VP II (larutan 40% Alpha;Naphthol) masing-masing 1 tetes.
- Sumur nomor 12 dengan TDA 1 tetes.
- Evaluasi Hasil

Dari sumur-sumur *microbact* dilihat apakah hasilnya positif atau negatif dengan cara membandingkannya dengan tabel warna kunci. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal). Spesies bakteri dapat dilihat pada program computer

berdasarkan angka-angka oktal. Sebagai perbandingan dicocokkan sifat-sifatnya berdasarkan *Bergeys manual of determinative bacteriology*.



#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Kondisi Lingkungan Pengambilan Sampel

Dari parameter uji lingkungan didapatkan data sebagai berikut.

**Tabel 6. Data Uji Lingkungan Lumpur Lapindo**

JENIS SAMPEL	PARAMETER UJI LINGKUNGAN		
	Suhu	pH	Salinitas
Air Lumpur	45°C $\pm$ 0,288675135	7,8 $\pm$ 0,125830574	30 ppt
Sedimen Padat	48°C $\pm$ 0,204124145	7,5 $\pm$ 0,090061707	-

Berdasarkan hasil pengujian kondisi lingkungan dengan parameter yang digunakan adalah Suhu, pH, dan Salinitas. Didapatkan hasil sampel air lapindo memiliki suhu 45°C  $\pm$  0,288675135 yang didapatkan dari data suhu 45°C, 45°C, 45,2°C, 45,7°C, dan 45°C. Untuk pH 7,8  $\pm$  0,125830574 yang didapatkan dari data pH 7,8; 7,6; 7,8; 7,9 dan 7,9 serta kadar salinitas 30 ppt. Sedangkan untuk sedimen lapindo memiliki suhu 48°C  $\pm$  0,204124145 yang didapatkan dari data suhu 48,3°C, 48°C, 47,8°C, 48°C dan 47,8°C. Untuk pH 7,5  $\pm$  0,090061707 yang didapatkan dari data pH 7,6; 7,4; 7,5; 7,6 dan 7,6.

Semburan lumpur lapindo memiliki suhu yang cukup tinggi karena semburan lumpur lapindo merupakan salah satu bencana geologi karena kesalahan pada saat pengeboran yang mengakibatkan terbukanya alur vulkanis karena tertekan oleh gas bumi yang terdapat di bawah lokasi pengeboran. Menurut dosen Geologi Fakultas Teknologi Kebumihan dan Energi Universitas Trisakti Dr. Guntoro (2008) yang menyatakan bahwa semburan lumpur lapindo merupakan Mud Volcano (Gunung Lumpur), fakta-fakta geologi di permukaan di sekitar Jawa Timur dan Sidoarjo menunjukkan adanya Mud Volcano, baik yang masih aktif maupun tidak aktif, di tambahkan oleh Herawati (2007), mud volcano adalah suatu gunung api lumpur yang terbentuk suatu kerucut tanah kilat dan

lumpur, gunung api lumpur ini terbentuk dari campuran air panas dan sedimen halus.

Untuk parameter pH, air dan sedimen lapindo dapat dikategorikan basa karena memiliki pH lebih dari 7 hal ini dikarenakan karena kadar salinitas yang cukup tinggi. Menurut Effendie (2003), Nilai pH berkisar antara 0 yang berarti sangat asam, dengan konsentrasi ion hidrogen positif ( $H^+$ ) tinggi, hingga 14 yang artinya sangat basa, dengan konsentrasi ion hidroksil negatif ( $OH^-$ ) tinggi. Klasifikasi pH terbagi menjadi tiga bagian, netral dengan  $pH=7$ , asam dengan pH kurang dari 7 hingga 0 dan basa atau alkalis dengan pH lebih dari 7 hingga 14. pH air payau yang berkisar antara 6,5 hingga 8 (Ridayani, 2013). Dan ditambahkan oleh Brotowidjoyo *et al.*, (1995), bahwa pH air laut berkisar antara 7,6-8,3.

Hasil pengukuran kadar salinitas pada air lumpur lapindo adalah sebesar 30 ppt. Pada perhitungan dengan ppt (*part per thousand*) =  $1/1000 = 10^{-3}$  sedangkan untuk ppm (*part per million*) =  $1/1.000.000 = 10^{-6}$ . Sehingga dapat disimpulkan bahwa 1 ppm = 0,001 ppt. Jadi berdasarkan hasil penelitian salinitas air lapindo sebesar 30 ppt atau 30.000 ppm. Sehingga air lapindo dikategorikan air payau dengan tingkat keasinan tinggi. Hal ini diduga semburan lumpur lapindo berasal dari air laut. Hal ini diperkuat oleh Satrio *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa adanya kontribusi dari air tanah atau air laut terhadap air yang keluar dari pusat semburan Lumpur Lapindo. Sedangkan pada sampel sedimen tidak terdeteksi adanya salinitas karena sampelnya berbentuk padatan.

Berdasarkan SIEJ (2013), Keasinan atau salinitas sumber air berdasarkan kandungan garam yang dihitung dengan ppm atau part per million. Berdasarkan parameter tersebut maka air tawar memiliki kurang dari 1.000 ppm, air tawar sedikit payau antara 1.000 ppm hingga 3.000 ppm. Air payau biasa 3.000 ppm hingga 10.000 ppm. Air payau dengan keasinan tinggi mempunyai kadar garam

10.000 ppm hingga 35.000 ppm. Sedangkan salinitas air laut diatas 35.000 ppm. Dan berdasarkan SNI tahun 2002, tentang penyusunan neraca sumberdaya, Bagian 1: Sumber daya air spasial menjelaskan bahwa salinitas air laut berkisar antara 35 ppt.

Berdasarkan hasil pengujian kadar logam berat di air lumpur dan sedimen padat lumpur lapindo dengan menggunakan metode AAS dan spektrofotometer didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel 7. Data Kadar Logam Berat**

Jenis Logam Berat	Jenis Sampel (ppm)		SK Gubernur Jawa Timur NO.45 Tahun 2002	INDONESIA* (ppm)	W.H.O* (ppm)	TUT* (2012)
	Air Lapindo	Sedimen Lapindo	ppm (mg/L)	Maks. Diperbolehkan	Maks. Diperbolehkan	ppm (mg/L)
Pb	0,69	2,69	3	0,01	0,1	0,04
Hg	0,23	0,59	0,01	0,001	-	-
Cu	0,07	0,27	5	1,0	1,5	0,00
Fe	0,76	6,48	20	1,0	1,0	0,52
Zn	0,03	0,49	20	15	15	0,36
Cr	0,02	0,06	2	0,05	0,05	0,03
Cd	-	0,03	1	0,01	-	0,01
Ni	1,02	3,39	1	Tidak ada	Tidak ada	0,02
Mn	39,16	528	10	0,5	0,5	0,56
Au	0,42	2,12	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada

Sumber: Suriawiria (2003) dengan Judul Kandungan Kimia Dalam Air yang Diperkenankan

\*berdasarkan penelitian di Toyohashi University of Technology

Uji logam berat diatas dilakukan untuk mengetahui ketahanan bakteri terhadap lingkungan yang tercemar logam berat sebagai informasi awal untuk langkah bioremediasi logam berat, bioremediasi di perairan menjadi penting karena dapat memperbaiki kualitas hasil perikanan. Apabila biota laut berada di

perairan yang tercemar tentu akan mengakibatkan terakumulasinya logam berat pada hasil laut.

Berdasarkan hasil pengujian kadar logam berat di air dan sedimen lumpur lapindo tidaklah sama, hal ini berdasarkan hasil pengujian kadar logam berat dengan menggunakan AAS dan spektrofotometer. Pada uji logam berat ini menggunakan 10 uji logam berat yang umum terdapat di lingkungan. Untuk sampel air logam Pb yang terkandung sebesar 0,69 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 2,69 ppm. Pada sampel air logam Hg yang terkandung sebesar 0,23 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 0,59 ppm. Pada sampel air logam Cu yang terkandung sebesar 0,07 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 0,27 ppm. Pada sampel air logam Fe yang terkandung sebesar 0,76 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 6,48 ppm. Pada sampel air logam Zn yang terkandung sebesar 0,03 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 0,49 ppm. Pada sampel air lapindo Cr yang terkandung sebesar 0,02 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 0,06 ppm. Pada sampel air logam Cd yang terkandung sebesar 0 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 0,03 ppm. Pada sampel air logam Ni yang terkandung sebesar 1,02 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 3,39 ppm. Pada sampel air logam Mn yang terkandung sebesar 39,16 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 528 ppm. Pada sampel air logam Au yang terkandung sebesar 0,42 ppm sedangkan pada sampel sedimen sebesar 2,12 ppm.

Untuk sampel air kadar logam berat yang tertinggi adalah Mn dengan kadar 39,16 ppm dan yang terendah adalah Cd dengan kadar 0 ppm. Dan untuk sampel sedimen kadar logam berat yang tertinggi adalah Mn dengan kadar 528 ppm dan yang terendah adalah Cd dengan kadar 0,03 ppm. Sehingga diperoleh hasil bahwa kadar logam berat tertinggi terdapat pada sedimen. Hal tersebut

dikarenakan logam berat terakumulasi di sedimen lumpur lapindo yang memadat pH larutan tanah akan berpengaruh langsung terhadap kelarutan unsur logam berat, walaupun peningkatan pH tanah akan menyebabkan logam berat mengendap tetapi yang lebih penting yaitu pengaruh secara tidak langsung melalui pengaruhnya dalam kapasitas pertukaran kation (Verioo, 1993). sedangkan pada sampel air lumpur Lapindo logam berat tersuspensi atau terlarut diseluruh aliran air lumpur Lapindo sehingga logam berat tersebut menyebar ke seluruh wilayah aliran lumpur. Selain itu kandungan logam berat yang tinggi pada sampel sedimen dikarenakan tingginya pH yang dapat menyebabkan logam berat tersebut mengendap. Berdasarkan Sutamihardja *et al.*, (1982), Hal ini berkaitan dengan sifat – sifat logam berat yaitu :

1. Sulit didegradasi, sehingga mudah terakumulasi dalam lingkungan perairan dan keberadaannya secara alami sulit terurai (dihilangkan);
2. Dapat terakumulasi dalam organisme termasuk kerang dan ikan, dan akan membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsi organisme tersebut;
3. Mudah terakumulasi di sedimen, sehingga konsentrasinya selalu lebih tinggi dari konsentrasi logam dalam air. Di samping itu sedimen mudah tersuspensi karena pergerakan masa air yang akan melarutkan kembali logam yang dikandungnya ke dalam air, sehingga sedimen menjadi sumber pencemar potensial dalam skala waktu tertentu.

Secara keseluruhan kadar logam berat tertinggi adalah Mn dengan hasil 39,16 ppm pada sampel air Lapindo dan 528 ppm pada sampel sedimen Lapindo. Dan kadar logam berat terendah adalah logam Cd dengan hasil 0 ppm pada sampel air Lapindo dan 0,03 ppm pada sampel sedimen Lapindo. Rendahnya kadar logam Cd dikarenakan sifat dari logam Cd (Cadmium) yang tidak larut dalam basa sehingga logam Cd tidak dapat larut pada sampel air

maupun sedimen lumpur Lapindo. Berdasarkan Awaludin *et al.*, (2010), sifat logam Cadmium (Cd) terdiri atas sifat fisik dan sifat kimia. Adapun sifat-sifat fisiknya adalah logam berwarna putih keperakan, mengkilat, lunak/mudah ditempa dan ditarik, dan titik lebur rendah, sedangkan sifat kimianya adalah Cd tidak larut dalam basa, larut dalam  $H_2SO_4$  encer dan HCl encer  $Cd + H_2SO_4 \rightarrow CdSO_4 + H_2$ , Cd tidak menunjukkan sifat amfoter, Bereaksi dengan halogen dan nonlogam seperti S, Se, P, Cd adalah logam yang cukup aktif, Dalam udara terbuka, jika dipanaskan akan membentuk asap coklat CdO, memiliki ketahanan korosi yang tinggi,  $CdI_2$  larut dalam alcohol.

Sedangkan Tingginya kandungan Mangan (Mn) dikarenakan logam Mangan merupakan kandungan yang paling banyak terdapat di laut, selain itu logam Mangan mampu stabil di suhu yang tinggi. Berdasarkan (Redaksi *chemistry.org* tahun 2008), Penemuan sejumlah besar senyawa mangan di dasar lautan merupakan sumber mangan dengan kandungan 24%, bersamaan dengan unsur lainnya dengan kandungan yang lebih sedikit. Logam mangan bersifat ferromagnetik setelah diberi perlakuan. Logam murninya terdapat sebagai bentuk allotropik dengan empat jenis. Salah satunya, jenis alfa, stabil pada suhu luar biasa tinggi; sedangkan mangan jenis gamma, yang berubah menjadi alfa pada suhu tinggi, dikatakan fleksibel, mudah dipotong dan ditempa.

Jika dibandingkan dengan SK Gubernur Jawa Timur No.45 Tahun 2002 Tentang Baku Mutu Limbah Cair Bagi Industri atau Kegiatan Usaha Lainnya di Jawa Timur, kandungan logam berat Fe, Cu, Zn, Cr, dan Cd yang terkandung di air dan sedimen lumpur lapindo yang memenuhi standar aman logam berat di lingkungan. Namun pada logam berat Mn, Hg, Pb dan Ni melampaui batas aman logam berat di lingkungan.

Apabila dibandingkan dengan standar kandungan logam berat di air secara Nasional (Indonesia) dan W.H.O bahwa logam berat Fe, Cu, Zn, Cr, dan Cd yang

terkandung di air lumpur Lapindo yang memenuhi standar aman logam berat di lingkungan air. Namun, pada logam berat Pb, Hg, dan Mn melebihi batas aman kandungan logam berat yang diperbolehkan di air.

Apabila dibandingkan dengan hasil penelitian dari TUT (2012), terdapat perbedaan dalam hasil penentuan kadar logam berat yang dilakukan, untuk logam Pb, Hg, Cu, Fe, Ni, dan Mn berada di bawah dari hasil peneliti, untuk logam Zn, Cr, dan Cd berada di atas dari hasil yang didapat oleh peneliti dengan menggunakan AAS. Perbedaan yang terjadi diakibatkan oleh penggunaan alat yang berbeda sehingga mempengaruhi sensitivitasnya dalam penentuan kadar logam berat.

## 4.2 Karakterisasi Bakteri

Dalam mengkarakterisasi bakteri perlu diketahui ciri-ciri utamanya yang meliputi ciri morfologi, susunan kimiawi dari sel, sifat genetik, metabolisme dan patogenitas. Untuk menentukan ciri tersebut, maka diperlukan beberapa uji morfologi dan fisiologi (Candra, 2006). Di dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, bakteri dikelompokkan berdasarkan grup menurut bentuk, sifat, pewarnaan gram, dan kebutuhan akan oksigen. Berdasarkan sifat-sifat yang ada dengan buku manual ini dapat ditentukan genus bakteri yang berguna dalam identifikasi selanjutnya hingga tingkat spesies (Sudarsono, 2008). Berdasarkan hasil isolasi dari air dan sedimen yang dilakukan, diperoleh masing-masing 1 isolat bakteri dari air dan sedimen yang murni. Isolat bakteri yang didapatkan memiliki sifat bakteri gram negatif dan berbentuk batang. Semua isolat bakteri yang telah murni diuji berdasarkan sifat morfologi dan fisiologinya.

### 4.2.1 Sifat Morfologi

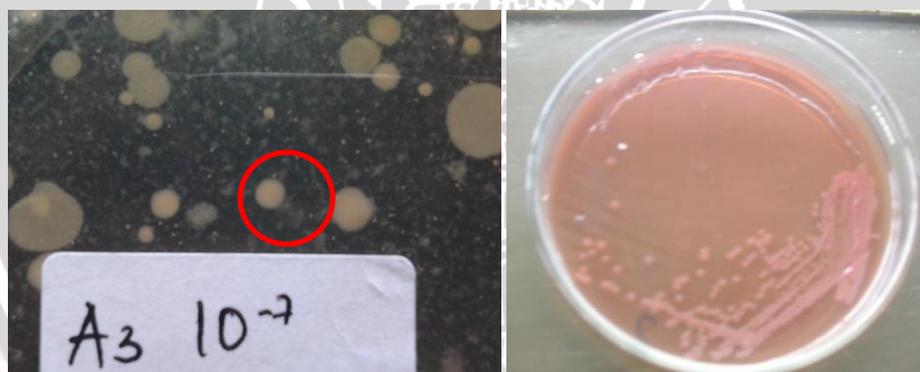
Sifat morfologi bakteri yang diamati pada penelitian ini meliputi morfologi koloni dan morfologi sel. Morfologi sel bakteri yang diamati meliputi pewarnaan

gram, morfologi koloni dan bentuk sel Untuk Morfologi koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 8. Sedangkan untuk morfologi sel bakteri dapat dilihat pada Tabel 9.

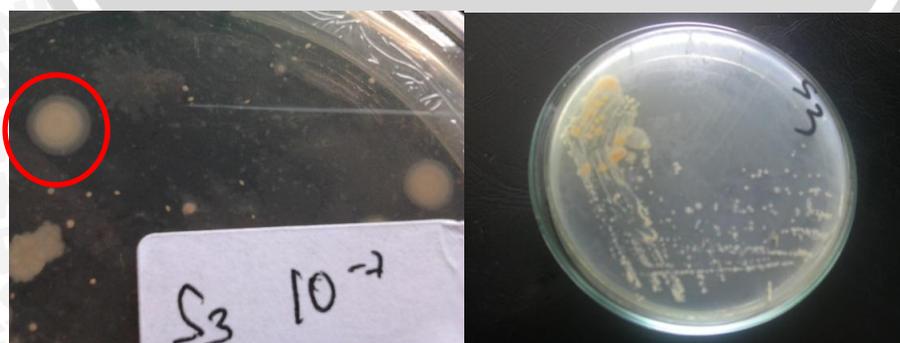
**Tabel 8. Morfologi Koloni Bakteri Yang Terpilih Untuk Isolasi**

Isolat	Bentuk	Bentuk Pinggir	Bentuk Elevasi	Warna Koloni
A3	Bulat	rata	Sedikit Timbul	putih kekuningan
S3	Bulat	rata	Rata	Putih

Berdasarkan Tabel 8. di atas morfologi bakteri yang diisolasi dari air dan sedimen memiliki bentuk atas yang sama yaitu bulat. Koloni bakteri yang diisolasi dari air memiliki bentuk pinggiran halus dan koloni bakteri yang diisolasi dari sedimen memiliki bentuk pinggiran bergelombang. Bentuk elevasinya untuk yang air bentuknya cembung sedangkan untuk yang sedimen bentuknya datar. Koloni bakteri yang terlihat untuk air berwarna putih kekuningan sedangkan koloni sedimen berwarna putih. Koloni bakteri yang akan di isolasi dari air dapat dilihat pada Gambar 18. Dan koloni bakteri yang akan diisolasi dari sedimen dapat dilihat pada Gambar 19.



**Gambar 18. Koloni Dari Air Yang Telah Diisolasi**



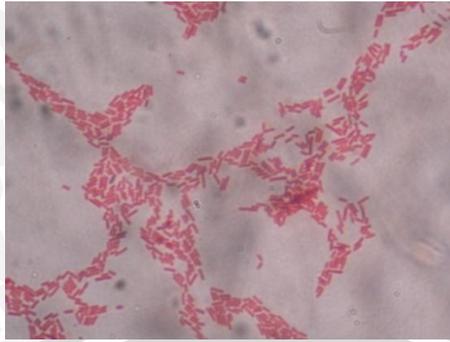
**Gambar 19. Koloni Dari Sedimen Yang Telah Diisolasi**

Untuk mendapatkan isolat bakteri murni dilakukan dengan metode cawan gores (gores zig-zag). Isolasi bakteri dilakukan sebanyak empat kali goresan sampai dihasilkan koloni tunggal yang murni, dan dilakukan pewarnaan gram, kemudian dilakukan pengamatan terhadap morfologi sel. Pengamatan morfologi sel meliputi bentuk sel dan warna gram. Dari data-data yang sudah didapatkan dapat membuktikan isolat bakteri tersebut benar-benar murni. Setiap isolat murni yang didapat, sebaiknya dilakukan kultur bakteri pada media agar miring, bakteri yang tumbuh hendaknya diremajakan kembali setiap 2 minggu sekali untuk menjaga ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan bakteri untuk perkembangannya dalam media. Koloni bakteri yang telah di isolasi dari air dapat dilihat pada Gambar 18. Dan koloni bakteri yang telah diisolasi dari sedimen dapat dilihat pada Gambar 19.

**Tabel 9. Hasil Pengamatan Morfologi Sel Bakteri**

Isolat	Bentuk Sel	Pewarnaan Gram
Air	Batang	Negatif
Sedimen	Batang	Negatif

Pada Tabel 9. diatas setelah diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x dapat diketahui bahwa kedua isolat bersifat gram negatif, bakteri gram negatif terlihat berwarna merah bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi, seperti lemak dalam presentase lebih tinggi daripada yang dikandung bakteri Gram positif, selain itu peptidoglikan bakteri Gram negatif juga lebih tipis daripada peptidoglikan bakteri gram positif (Pelczar dan Chan, 1986). Untuk hasil pewarnaan gram isolat air dapat dilihat pada Gambar 20. Dan hasil pewarnaan gram isolat sedimen dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 20. Hasil Pewarnaan Gram Isolat A3



Gambar 21. Hasil Pewarnaan Gram Isolat S3

#### 4.2.2 Sifat Fisiologi

Pengujian sifat fisiologis bakteri digunakan untuk mengetahui sifat-sifat biokimia bakteri yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo. Uji fisiologis yang digunakan pada penelitian ini yaitu uji biokimia dan uji *microbact identification kits*. Uji biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji fermentasi gula  $H_2S$ , uji *methyl red*, uji *voges-proskauer*, uji sitrat, uji urease, uji *Sulfit Indol Motility* dan uji nitrat. Sedangkan untuk perbandingan dilakukan uji *microbact identification kits* yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji *oxidase*, uji *motility*, uji *nitrate*, uji *lysine*, uji *ornithine*, uji  $H_2S$ , uji *glucose*, uji *mannitol*, uji *xylose*, uji *ONPG*, uji *indole*, uji *urease*, uji *V-P*, uji *citrate*, uji *TDA*, uji *gelatin*, uji *malonate*, uji *inositol*, uji *sorbitol*, uji *rhamnose*, uji *sucrose*, uji *lactose*, uji *arabinose*, uji *adonitol*, uji *raffinose*, uji *salicin*, dan uji *arginine*. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 10. Dan untuk hasil uji *microbact identification kits* dapat dilihat pada Lampiran 7.

Tabel 10. Hasil Uji Biokimia Bakteri

Isolat	Uji TSIA	Uji SIM	Uji Urease	Uji Citrate	Uji MR	Uji VP	Uji Nitrat
Air (A3)	alkali/alkali, G+, H <sub>2</sub> S-	Neg/neg/pos	Negatif	Positif	Negatif	Negatif	Positif
Sedimen (S3)	alkali/alkali, G+, H <sub>2</sub> S-	Neg/neg/pos	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Positif

**Keterangan:**

- Positif (+) : mempunyai aktivitas
- Negatif (-) : tidak mempunyai aktifitas
- G+ : mampu menghasilkan gas

**1. Uji Metyl Red**

Berdasarkan Tabel 10. Hasil pengamatan uji *metyl red* menunjukkan bahwa isolat A3 dan S3 bahwa semua bakteri tidak dapat mengoksidasi glukosa hal ini ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media setelah ditetesi oleh *metyl red*. Hal ini dapat dilihat pada Lampiran 7.

Menurut Sudarsono (2008), Uji merah metil (*metyl red test*) bertujuan untuk mengetahui kemampuan dari mikroorganisme untuk mengoksidasi glukosa dengan memproduksi asam dengan konsentrasi tinggi sebagai hasil akhirnya. Heksosa monosakarida glukosa merupakan substrat utama yang dioksidasi oleh semua organisme enteric sebagai sumber energinya. Hasil akhir dari proses ini akan sangat bervariasi tergantung dari enzim spesifik yang ada pada bakteri.

Bakteri yang dapat mengoksidasi glukosa akan menghasilkan asam organik dengan konsentrasi ion hidrogen yang sangat tinggi. Namun bakteri yang tidak dapat mengoksidasi glukosa akan menghasilkan asam organik dengan konsentrasi ion hidrogen yang rendah, kemudian asam organik tersebut akan diubah menjadi komponen yang bersifat tidak asam (non *acidic*). Dalam uji ini, indikator pH, yaitu merah metil digunakan untuk mendeteksi adanya konsentrasi asam yang cukup tinggi sebagai hasil akhirnya. Jika media MR VP broth dengan

pH 6 akan berubah menjadi merah setelah ditambahkan merah metil maka mengindikasikan hasil uji positif, sedangkan jika media tersebut tetap benwarna kuning maka mengindikasikan hasil uji negatif (Cappucino dan Sherman, 1983)

## 2. Uji *Voges-Proskueur* (VP)

Berdasarkan Tabel 10. Dari hasil pengamatan uji VP ini isolat A3 dan S3 menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak ada perubahan warna pada media. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak memiliki kemampuan dalam melakukan fermentase dengan hasil akhir 2,3 butanadiol untuk pertumbuhannya. Untuk hasil uji VP dapat dilihat pada Lampiran 7.

Uji *Voges-Proskueur* digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melakukan fermentase dengan hasil akhir 2,3 butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 butanadiol sebagai produk utama maka akan terjadi penumpukan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. Pada uji VP ini dilakukan penambahan 40% KOH dan 5% larutan alfa naftol pada saat pengamatan. Hal ini dapat menentukan adanya asetoin (asetil metil karbinol), suatu senyawa pemula dalam sintesis 2,3 butanadiol. Dengan adanya penambahan KOH 40 %, keberadaan setoin ditunjukkan dengan perubahan warna medium menjadi merah, dan perubahan ini makin jelas dengan penambahan alfa naftol beberapa tetes. Uji VP ini sebenarnya merupakan uji tidak langsung untuk mengetahui adanya 2,3 butanadiol. Karena uji ini lebih dulu menentukan asetoin, dan seperti yang kita ketahui bahwa asetoin adalah senyawa pemula dalam sintesis 2,3 butanadiol, sehingga dapat dipastikan bahwa dengan adanya asetoin dalam media berarti menunjukkan adanya produk 2,3 butanadiol sebagai hasil fermentasi (Lay, 1994).

### 3. Uji Fermentasi Gula (TSI) Dan H<sub>2</sub>S

Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 10. Untuk isolat A3 dan S3 menunjukkan hasil yang sama yaitu pada bagian atas media agar membentuk warna merah muda berarti menunjukkan reaksi basa (alkali) dan pada bagian bawah agar membentuk warna merah muda berarti menunjukkan reaksi basa (alkali) dari reaksi diatas berarti isolat A3 tidak memfermentasi gula. Di dalam media TSIA terlihat sedikit pecah, itu menandakan bahwa isolat A3 positif membentuk gas, dan isolat A3 tidak memproduksi H<sub>2</sub>S, hal ini ditandai oleh tidak terbentuknya warna hitam pada media TSIA.

Uji fermentasi gula dan H<sub>2</sub>S merupakan serangkaian uji yang dilakukan dengan menggunakan medium TSIA (*Triple sugar iron agar*). Tujuannya adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi gula untuk menghasilkan asam atau gas. Pada media TSIA mengandung tiga macam gula, yaitu glukosa, laktosa atau sukrosa dan indikator merah fenol serta FeSO<sub>4</sub> (Lay, 1994). Warna merah pada agar menunjukkan reaksi basa, sedangkan warna kuning menunjukkan reaksi asam. Warna merah pada permukaan agar dan kuning di bagian bawah agar menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa. Warna kuning pada bagian permukaan dan bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi laktosa dan sukrosa (Fardiaz, 1989).

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan H<sub>2</sub>S pada media TSIA (*triple sugar iron agar*) yang mengandung senyawa FeSO<sub>4</sub>. Pada media ini H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan logam Fe<sup>2+</sup> yang terdapat dalam medium, menjadi FeS (*Ferro Sulfida*) yang berwarna hitam (Lay, 1994) Uji fermentasi glukosa digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi glukosa dengan menghasilkan asam dan gas. Pada media TSIA dapat diketahui terjadinya fermentasi glukosa, laktosa, atau sukrosa dan produksi gas dari glukosa yang ditandai dengan terbentuknya rongga-rongga di bagian bawah

agar. Warna merah pada permukaan dan kuning di bagian bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa tetapi tidak laktosa dan sukrosa. Warna kuning pada bagian permukaan dan bagian bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa (Fardiaz, 1989).

Pada umumnya, jika bakteri dapat memfermentasi karbohidrat maka dapat memfermentasi glukosa (monosakarida). Jika glukosa dapat difermentasi, terdapat kemungkinan adanya fermentasi karbohidrat jenis lain, seperti monosakarida selain glukosa, disakarida (maltosa, laktosa dan sukrosa) dan polisakarida (pati, selulosa, hemiselulosa) (Salle, 1961).

#### 4. Uji Sulfid Indol Motility (SIM)

Berdasarkan Tabel 10. Dari hasil pengamatan uji SIM ini isolat A3 dan S3 menunjukkan hasil negatif untuk produksi sulfur yang ditandai dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media SIM, kedua isolat juga menunjukkan hasil negatif untuk pembentukan indol karena tidak terbentuk cincin merah pada media SIM, dan kedua isolat menunjukkan hasil positif untuk motilitas (pergerakan), hal ini ditandai dengan adanya kabut di media SIM sebagai tanda pergerakan bakteri-bakteri tersebut. Sehingga kedua isolat bakteri tersebut memiliki flagella. Flagella merupakan salah satu struktur utama di luar sel bakteri yang menyebabkan terjadinya pergerakan (motilitas) pada sel bakteri. Flagela dapat dilepaskan dari sel secara fisik. Sel yang sudah tidak memiliki flagela masih tetap hidup dan dapat mensintesis flagela baru (Fardiaz, 1992). Untuk hasil uji SIM (*Sulfid Indol Motility*) dapat dilihat pada Lampiran 7.

Menurut Raihana (2011), uji motilitas digunakan untuk melihat pergerakan bakteri, apabila setelah diinkubasi selama 24 jam timbul kekeruhan seperti kabut berarti menandakan bakteri tersebut bergerak. Uji Indol digunakan untuk melihat pembentukan indol oleh bakteri. Cara pengujian : satu ose bakteri ditanam dalam media SIM, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Lalu ditetaskan reagen

Kovacks (terdiri dari dimetil aminobenzaldehid, n-amyl alkohol & HClp), jika terbentuk cincin merah berarti positif dan jika terbentuk cincin kuning berarti negatif. Terbentuknya cincin merah karena bakteri membentuk indol dari triptopan sebagai sumber karbon.

## 5. Uji Urease

Berdasarkan Tabel 10. Hasil uji urease menunjukkan bahwa isolat A3 dan S3 tidak menghasilkan enzim urease hal ini ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media sehingga bakteri-bakteri tersebut tidak dapat mendegradasi urea dan memanfaatkan urea dalam metabolisme selnya. Hasil uji urease dapat dilihat pada Lampiran 7.

Beberapa bakteri mampu menghasilkan enzim urease yang menguraikan urea menjadi ammonium dan CO<sub>2</sub>. Aktivitas enzim urease ini dapat diamati dengan menumbuhkan bakteri dalam media biakan yang mengandung urea dan indikator pH (biasanya phenol red). Bila urea dihidrolisiskan, NH<sup>4+</sup> terakumulasi dalam media biakan dan menyebabkan pH media menjadi basa. Perubahan warna dari merah-jingga menjadi merah ungu merupakan petunjuk terjadinya hidrolisis urea (Lay, 1994).

Enzim urease merupakan enzim hidrolisis yang memecah ikatan nitrogen dan karbon pada komponen amida seperti urea dan membentuk amonia yang menciptakan suasana basa. Pada uji ini digunakan media urea broth yang mengandung pH indikator phenol red. Jika bakteri tersebut menghasilkan enzim urease maka akan terjadi perubahan warna pada media dari ungu menjadi merah jambu (*pink*) (Cappucino dan Sherman, 1983).

## 6. Uji Nitrat

Berdasarkan Tabel 10. Dari hasil pengamatan uji nitrat ini isolat A3 dan S3 menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan adanya pertumbuhan di dalam media nitrat *broth*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk mereduksi nitrat. Untuk hasil uji Nitrat dapat dilihat pada Lampiran 7.

## 7. Uji Sitrat

Berdasarkan Tabel 10. Dari hasil pengamatan uji sitrat ini isolat A3 dan S3 menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan perubahan warna media menjadi biru. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kemampuan dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon untuk energinya. Untuk hasil uji sitrat dapat dilihat pada Lampiran 7.

Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Untuk uji ini dapat digunakan medium sitrat-koser berupa medium cair atau medium sitrat simmon berupa medium padat (Lay, 1994). Jika bakteri tidak dapat memfermentasi glukosa dan laktosa maka beberapa bakteri dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon untuk energi. Kemampuan bakteri dalam memanfaatkan sitrat tergantung dari adanya enzim sitrat permease yang membantu transportasi sitrat ke dalam sel. Sitrat merupakan hal utama pada siklus Krebs. Sitrat ini &hasilkkan pa& proses kondensasi dari asetil aktif dengan asam oksalasetat. Sitrat bertindak berdasarkan enzim sitrase, yang memproduksi asam oksalasetat dengan asan asetat. Produk ini kemudian diubah secara enzimatis menjadi asam piruvat dan karbondioksida (Cappucino dan Sherman, 1983). Medium yang digunakan pada uji ini adalah *Simmons citrate* yang merupakan medium sintetik dengan Na sitrat sebagai satusatunya sumber karbon,  $\text{NH}_4^+$ se bagai sumber N dan *brom thymol blue* sebagai indikator pH. Bila mikroorganismenya mampu menggunakan sitrat,

maka asam akan dihilangkan dari medium biakan sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru (Lay, 1994)

#### 8. Uji *Microbact Identification Kits*

Berdasarkan hasil dari uji biokimia dengan menggunakan *microbact identification kits* GNB 12A/B/E, 24E dari isolat yang didapatkan dari air dengan kode A3 dan sedimen dengan kode S3, didapatkan genus yang diperoleh dari perhitungan angka octal. Dari hasil yang didapatkan berdasarkan sifat-sifat bakteri dicocokkan dengan mengacu pada *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*.

##### ● Isolat Air Dengan Kode A3

Berdasarkan hasil uji identifikasi dengan menggunakan *microbact identification kits* mempunyai karakteristik sebagai berikut: *oxidase* positif, *motility* positif, *nitrate* positif, *lysine* positif, *ornithine* positif,  $H_2S$  positif, *glucose* positif, *Mannitol* positif, *Xylose* negatif, *ONPG* negatif, *indole* positif, *urease* positif, *V-P* negatif, *citrate* positif, *TDA* positif, *Gelatin* negatif, *malonate* positif, *Inositol* positif, *sorbitol* negatif, *Rhamnose* positif, *sucrose* positif, *lactose* negatif, *arabinose* negatif, *adonitol* negatif, *Raffinose* negatif, *salicin* negatif, *arginine* negatif. Hasil analisa uji biokimia dengan *microbact identification kits* dapat dilihat pada Lampiran 7.

##### ● Isolat Sedimen Dengan Kode S3

Berdasarkan hasil uji identifikasi dengan menggunakan *microbact identification kits* mempunyai karakteristik sebagai berikut: *oxidase* positif, *motility* positif, *nitrate* positif, *lysine* positif, *ornithine* positif,  $H_2S$  positif, *glucose* positif, *Mannitol* positif, *Xylose* negatif, *ONPG* negatif, *indole* positif, *urease* positif, *V-P* negatif, *citrate* positif, *TDA* positif, *Gelatin* negatif, *malonate* positif, *Inositol* positif, *sorbitol* negatif, *Rhamnose* positif, *sucrose* positif, *lactose* negatif, *arabinose* negatif, *adonitol* negatif, *Raffinose* negatif, *salicin* negatif, *arginine* negatif. Hasil

analisa uji biokimia dengan *microbact identification kits* dapat dilihat pada Lampiran 7.

#### 4.3 Pendugaan Jenis Bakteri

Jenis bakteri yang diisolasi dari air dan sedimen dapat diduga berdasarkan karakteristik morfologi maupun fisiologinya. Hasil dari pendugaan jenis bakteri tersebut akan dibandingkan dengan uji DNA 16S-RDNA yang dilakukan oleh Prof. Ir. Sukoso M.Sc.Ph.D.

Menurut Sudarsono (2008) isolat koloni bakteri yang berbentuk batang dengan sifat gram negatif dan motil mendekati genus *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, dan *Aerobacterium*. Menurut Holt *et al.*(1994), bakteri genus *Pseudomonas* memiliki sifat gram negatif, sel berbentuk batang, dapat menggunakan nitrat sebagai elektron aseptor dan motil. Hal ini menunjukkan bahwa isolat air dan sedimen sudah mendekati genus *Pseudomonas* sp. Supaya pasti dalam pendugaan bakteri dilakukan pengujian dengan *microbact identification kits*, dari serangkaian uji didapatkan hasil pendugaan untuk isolat air dan sedimen yaitu jenis bakteri *Pseudomonas pseudomallei* dengan persentase ketepatan sebesar 99,48%. Menurut Dance *et al.* (1989), *Pseudomonas pseudomallei* memiliki karakteristik fisiologi yaitu gram negatif, sel berbentuk batang. Sedangkan untuk karakteristik biokimia yaitu nitrat positif, glukosa positif, arabinose negatif, mannitol positif, *citrate* positif dan *oxidase* positif. Hasil diatas dibandingkan dengan hasil uji DNA 16S-rDNA yang dilakukan oleh Prof. Ir. Sukoso M.SC Ph.D didapatkan hasil untuk isolat A3 adalah bakteri *Pseudomonas stutzeri* dan untuk isolat S3 adalah bakteri *Bacillus niabensis*. Untuk hasil pendugaan genus dan spesies bakteri berdasarkan uji biokimia, uji *microbact identification kits*, dan hasil perbandingan uji DNA 16S-Rdna yang dilakukan oleh dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 11. Hasil Pendugaan Jenis Bakteri

Kode Isolat	Uji Biokimia	Uji <i>Microbact Identification Kits</i>	Uji DNA 16S-Rdna
A3	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
S3	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	<i>Bacillus niabensis</i>

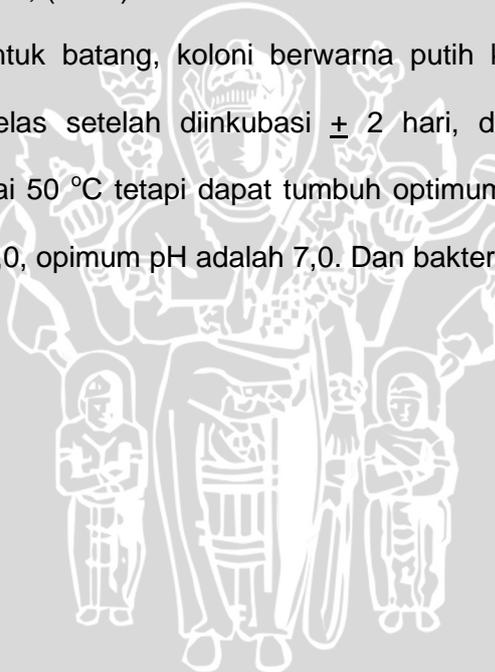
Menurut hasil uji biokimia yang mengacu dengan *Bergeys Manual Determinative Bacteriology* bahwa species *Pseudomonas pseudomallei* memiliki persamaan sifat biokimia tetapi berbeda kode genetik dengan dengan species *Pseudomonas stutzeri* dan *Bacillus niabensis*, karena uji yang peneliti lakukan hanya bisa mengetahui karakteristik biokimia pada bakteri.

Isolat bakteri pada air A3 yaitu *Pseudomonas pseudomallei* dapat tumbuh pada keadaan lingkungan tercemar logam berat dan salinitas yang cukup tinggi, karena isolat tersebut diisolasi dari Lumpur Lapindo, didapatkan hasil bahwa pada lumpur lapindo terdapat berbagai jenis logam berat dan salinitas dengan kadar yang cukup tinggi, selain itu pada saat proses isolasi bakteri pada penelitian ini menggunakan air lumpur lapindo sebagai pengganti aquades pada saat pembuatan media NA (Nutrient Agar) untuk media pertumbuhan isolat bakteri. Hal ini dilakukan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa bakteri-bakteri yang terisolasi merupakan bakteri spesifik yang dapat tumbuh pada lingkungan bersalinitas dan tercemar logam berat. Menurut Yani *et al.*, (2008), Isolat *Pseudomonas pseudomallei* mempunyai toleransi terhadap keberadaan logam berat, khususnya Zn, Pb, Fe dan Hg. Pada penambahan logam Zn hingga konsentrasi 2000 ppm, Pb 3000 ppm, Fe 4000 ppm dan Hg 50 ppm isolat masih mampu tumbuh sebesar  $10^6$  -  $10^7$  cfu/ml. isolat masih mampu tumbuh hingga konsentrasi 8000 ppm Zn, Pb dan Fe, serta pada konsentrasi Hg 150 ppm.

*Pseudomonas stutzeri* adalah bakteri yang sering terisolasi dari tanah dan lingkungan laut dan mungkin berperan penting dalam proses denitrifikasi global. Reduktase nitrit mengkatalisis sebagai kunci utama dalam siklus nitrogen, bahwa reduksi nitrit ( $\text{NO}_2$ )<sub>2</sub> menjadi oksida nitrit (NO) mengkonversi N ke dalam bentuk yang tidak lagi tersedia untuk sebagian besar biota (Gruntzig *et al.*, 2001)

Menurut Hisatzuka dan Sato (1994), *Pseudomonas stutzeri* merupakan gram negatif yang diisolasi dari tanah, perairan tercemar dan lumpur aktif, bakteri ini tumbuh baik secara aerobik dengan menggunakan karbazol sebagai satu-satunya sumber energi, karbon dan nitrogen.

Menurut Kwon *et al.*, (2007) Bakteri *Bacillus niabensis* memiliki karakteristik : bersifat motil, berbentuk batang, koloni berwarna putih kekuningan, bentuk koloni dapat terlihat jelas setelah diinkubasi  $\pm$  2 hari, dapat tumbuh pada temperatur 15°C sampai 50 °C tetapi dapat tumbuh optimum pada suhu 30 °C. Tumbuh pada pH 6,0-8,0, optimum pH adalah 7,0. Dan bakteri ini mampu tumbuh secara anaerobik.



## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Hasil identifikasi bakteri yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo menurut hasil uji biokimia didapatkan pendugaan genus *Pseudomonas sp.* untuk kedua sampel. Sedangkan menurut hasil uji *microbact identification kits* didapatkan hasil pendugaan spesies untuk kedua sampel adalah *Pseudomonas pseudomallei* dengan persentase ketepatan sebesar 99,48%. Dari hasil diatas dibandingkan dengan hasil identifikasi dengan menggunakan uji DNA 16S-rDNA yang dilakukan oleh Prof.Ir. Sukoso M.Sc P.hD didapatkan hasil untuk sampel air adalah spesies *Pseudomonas stutzeri* dan untuk sampel air adalah spesies *Bacillus niabensis*. Bakteri tersebut mampu hidup di lingkungan yang kadar salinitas dan logam beratnya cukup tinggi .

### 5.2 Saran

Sebaiknya perlu adanya penelitian lanjutan terhadap aktivitas enzim termostabil yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas pseudomallei* yang dapat bermanfaat pada industri pengolahan hasil perikanan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad R.Z. 2007. Aktivitas Enzim Kitinase dan Protease Pada Cendawan Nematofagus (*Duddingtonia fragrans* dan *Saccharomyces cerevisiae*). Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. 885-891 hal.
- Apriani, R.S., P. Wesen. 2013. Penurunan Salinitas Air Payau Dengan Menggunakan Resin Penukar Ion. Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jawa Timur.
- Asnawi, Hafid. 2006. Keanekaragaman Bakteri Termofilik yang Terdapat Dalam Sumber Mata Air Panas di Taman Wisata Padusan Pacet, Kabupaten Mojokerto, Jawa Timur. Jurusan Biologi FMIPA, UM Malang.
- Aziz, Aznam. 1994. Pengaruh Salinitas Terhadap Sebaran Fauna Ekhinodermata. Oseana. Volume XIX No.2 : 23-32
- Brock, T.D. 1985. Life at high temperatures. Science 230: 132-138.
- Brotowijoyo, M. D., Dj. Tribawono., E. Mulbyantoro. 1995. *Pengantar Lingkungan Perairan dan Budidaya Air*. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, dan L. G. Mitchell. 2000. Biologi Edisi ke 5 Jilid 2. (diterjemahkan dari : Biology Fifth Edition, penerjemah : W. Manalu). Penerbit Erlangga. Jakarta. 404 hal.
- Cappuccino JG, Sherman N. 1983. Microbiology A Laboratory Manual. NewYork: State University of New York, Rockland Community Collage.
- Candra JI. 2006. isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari produk bekasam ikan bandeng (*Channos channos*). Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Chem-is-try.org. 2008. Mangan. [http://www.chem-is-try.org/tabel\\_periodik/mangan/](http://www.chem-is-try.org/tabel_periodik/mangan/) . Diakses Pada Tanggal 29 Desember 2013 Pada Pukul 18.00.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., and Eaton, A. D., 1998, *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*, 20th Edition, American Public Assosiation, American Water Works Assosiation, Water Enviroment Federation
- Dance, D.A.B., V. Wuthiekanun., P.Naigowit, dan N.j. White. 1989. *Identification of Pseudomonas pseudomallei in Clinical Practice: Use Of Simple Screening Tests And API 20NE*. J Clin Pathol. No.42:645-648
- Dirnawan , H.A, Suwanto., Purwadaria T. 2000. Eksplorasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik-Ekstraseluler dari Sumber Air Panas Gunung Pancar. Hal. 52-57.

DR 2800 Spectrophotometer. 2007. Procedure Manual June 2007 Edition 2. Hach Company. Germany

Effendi, Hefni. 2003. Telaah Kualitas Air. Kanisius. Yogyakarta.

Fardiaz S<sup>a</sup>. 1989. Petunjuk Laboratorium. Analisis Mikrobiologi Pangan. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Institut Pertanian Bogor.

\_\_\_\_\_.<sup>b</sup>. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta

Friedman GM, dan JE Sanders, (1978), Principle of Sedimentology, New York: John Wyley & Sons Ltd

Ginting, Jusuf. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik Dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Kabupaten Karo, Sumatera Utara. Universitas Sumatera Utara. Medan.

Girindra, A. 1990. Biokimia 1. Cetakan ke-2. Jakarta: PT Gramedia.

Gruntzig, V., S.C. Nold., J. Zhou, dan J.M. Tiedje. 2001. *Pseudomonas stutzeri* Nitrite Reductase Gene Abundance in Enviromental Samples Measured by Real-Time PCR. *Applied and Enviromental Microbiology*. Hal. 760-768.

Hadioetomo RS. 1985. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Jakarta: Penerbit Gramedia.

Handayani, E.H., K. Oginawati, dan M. Santoso. 2013. Analisa Logam Cu Dan Zn Pada Jajanan Anak Sekolah Dasar Di Bandung Dengan Metode Spektrofotometri Serapas Atom (SSA). Institut Teknologi Bandung.

Herawati, Niniek. 2007. Analisis Risiko Lingkungan Aliran Air Lumpur Lapindo ke Badan Air (Studi Kasus Sungai Porong dan Sungai Aloo-Kabupaten Sidoarjo). Universitas Diponegoro. Semarang.

Heru, Prasetyo. 2006. Kandungan Selenium Total Dalam Bakteri Termofilik Terseleksi dari Sumber Air Panas. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Hisatsuka, K. and Sato, M. 1994. Microbial Transformation of Carbazole to Anthranilic Acid by *Pseudomonas stutzeri*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Hal 58-213

Hutabarat S dan SM Evans. 1985. Pengantar oseanografi. UI-Press. Jakarta. lx+159 hlm.

Indrajaya, Madayanti F., dan Akhmaloka. 2003. Mikroorganisme Termofil Isolat Kawah Wayang Indonesia.. 8, 67-71.

Irianto, Koes. 2007. Mikrobiologi Menguak Dunia Organisme Jilid 1. Bandung : CV. Yrama Widya.

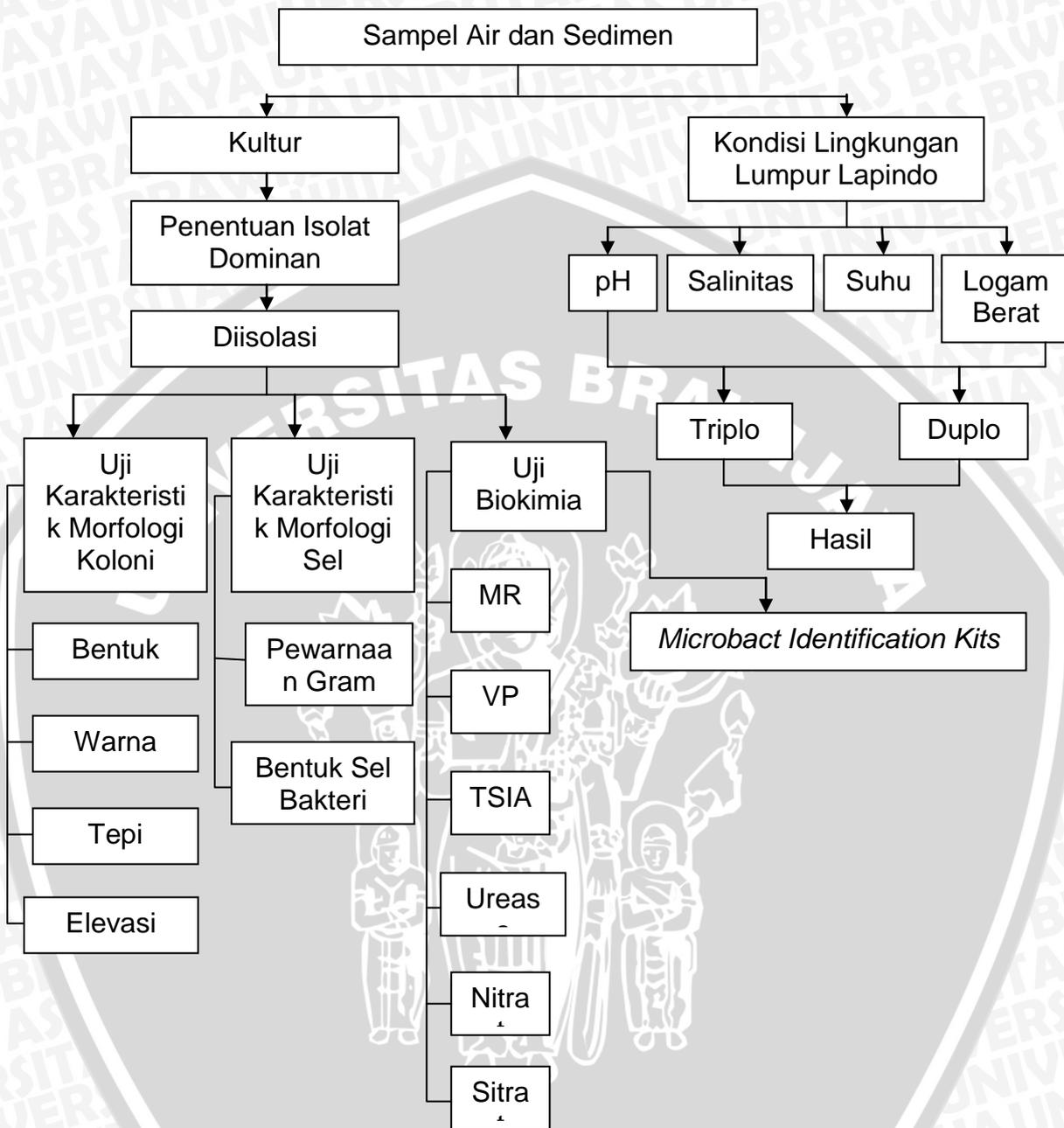
- Israhmadini U. 2008. Identifikasi dan karakterisasi bakteri laut penghasil selulose dengan metode 16S rRNA. [skripsi]. Jurusan Biologi FMIPA-Universitas Negeri Jakarta.
- Jayanti, M.W., B. Oktavia, dan M.Yazid. 2012. Karakterisasi Bakteri Toleran Uranium Dalam Limbah Uranium Fase Organik TBP-Kerosin. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pengelolaan Limbah IX. Hal. 197-210.
- Kathleen. 2005. Foundations in Microbiology. New York: Prentice Hall.
- Keputusan Gubernur Jawa Timur No.45. 2002. Baku Mutu Limbah Cair Bagi Industri Atau Kegiatan Usaha Lainnya Di Jawa Timur. 14 hal.
- Kinne, O. 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II Salinity and temperature salinity combination. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 2 : 281-339.
- Koesoemadinata, R, 2006, *Masalah Pembuangan Lumpur Lapindo Brantas ke Laut*, Dongeng Geologi, [www. rovicky. wordpress.com](http://www.rovicky.wordpress.com), akses tanggal 9 Januari 2013 pukul 09.00 WIB.
- Kristianingrum, Susila. 2013. Kajian Berbagai Proses Destruksi Sampel dan Efeknya. Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA. UNY.
- Kuchel. Philip W. Gregory B. Ralston. 1998. Biochemistry second edition. The McGraw-Hill Companies. United States of America: 595 hlm.
- Kusnandar, F. Haryadi. P. Wulandari N. 2010. Aspek Mikrobiologi Makanan Kaleng. Subtrorik 6-1 karakteristik Mikroba.pdf. Diakses pada tanggal 23 Desember 2013, pukul 19.00 WIB.
- Kwon, S., S. Lee, dan B. Kim. 2007. *Bacillus niabensis sp. Nov., Isolated From Cotton-Waste composts for Mushroom Cultivation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. No.57. Hal 1909-1913.
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Ling, J.M., Y.W, Hui, dan G.L, French. 1988. Evaluation of the Microbact-24E Bacterial Identification System. J Clin Pathol. 41:910-914.
- Madigan, M.T., J. M. Martinko and J. Parker. 2000. *Biology of microorganisms*. 9th Ed. Prentice Hall International, Inc., New Jersey.
- Madigan, Michael T., John M. Martinko, Paul V. Dunlap, and david P. Clark. 2009. Brock Biology of Microorganism. Twelfth Edition. Pearson International Edition : San Fransisco.
- Malik A. 2006. Identifikasi bakteri asam laktat (BAL) penghasil eksopolisakarida (EPS) menggunakan gen penyandi 16S rRNA. Departemen Farmasi-Universitas Indonesia.

- Maton, Anthea, Jean Hopkins, dan Susan Johnson. Chemistry of Matter. New Jersey. Prentice Hall.
- Milo, R.E., Duffner, F.M and Muller,R. 1999. Cathenol 2,3-Dioxygenase from The Thermophilic, Phenol-Degrading Bacillus Thermoleovorans Strain A2 has Unexpected Low Thermal Stability. *Extremophile* 3: 185-190
- Mubarak, Edison, Lamun Bathara. 2013. Karakteristik dan Potensi Sedimen di Muara Sungai Kampar. Universitas Riau.
- Norman, L. 2005. Biochemical Test for Identifying Unknowns. MCB 2010C Course Website. <http://web.fccj.edu/~lnorman/unknowns.htm?index=2#top> diakses pada tanggal 25 Desember 2013.
- Ongkosongo, O. S. R. 1992. Keadaan Lingkungan Fisik Pantai Jakarta. LON-LIPI.Jakarta. 15 hal.
- Oxoid. 2003. Manual Identification System Microbact Gram Negative 12A, 12B, 12E & 24E. [www.oxoid.com/pdf/uk/M-bact-Gram-Neg.pdf](http://www.oxoid.com/pdf/uk/M-bact-Gram-Neg.pdf). Diakses Pada Tanggal 20 November 2013 Pukul 18.15.
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan, 2005, Penerjemah, Ratna Siri Hadioetomo et al. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1, Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia. 2005 No.16 Tahun 2005. Pengembangan Sistem Penyediaan Air Minum. <http://www.presidentri.go.id>. Diakses Pada Tanggal 19 November 2013 Pada Pukul 15.15 WIB.
- Purnomo, Bambang. 2008. Materi Kuliah Mikrobiologi. Faperta Unib. Bengkulu.
- Prabaningtyas S. 2003. Karakteristik Bakteri Koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Malang. Malang: Chimera Vol: VIII. No.2.
- Prescott, S. G and C. G. Dunn. 2005. Industrial Microbiology. McGraw-Hill BookCompany, New York.
- Perry, J.J. and Stanley, J.T., 1997. Microbiology, Dynamics and Diversity. USA : Saunders College Publishing. Halaman : 510.
- Radji, Maksum. 2011. Buku Ajar Mikrobiologi, Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran. EGC. Jakarta
- Rahmawati, Hani. 2004. Studi Karakteristik Massa Air dan Arus Geostrofik di Perairan Selatan Jawa Barat Pada Bulan Desember 2001. Program Studi Ilmu Kelautan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Raihana, Nadia. 2011. Profil Kultur Dan Uji Sensitivitas Bakteri Aerob Dari Infeksi Luka Operasi Laparatomi Di Bangsal Bedah RSUP DR. M. Djamil Padang. Universitas Andalas. Padang.

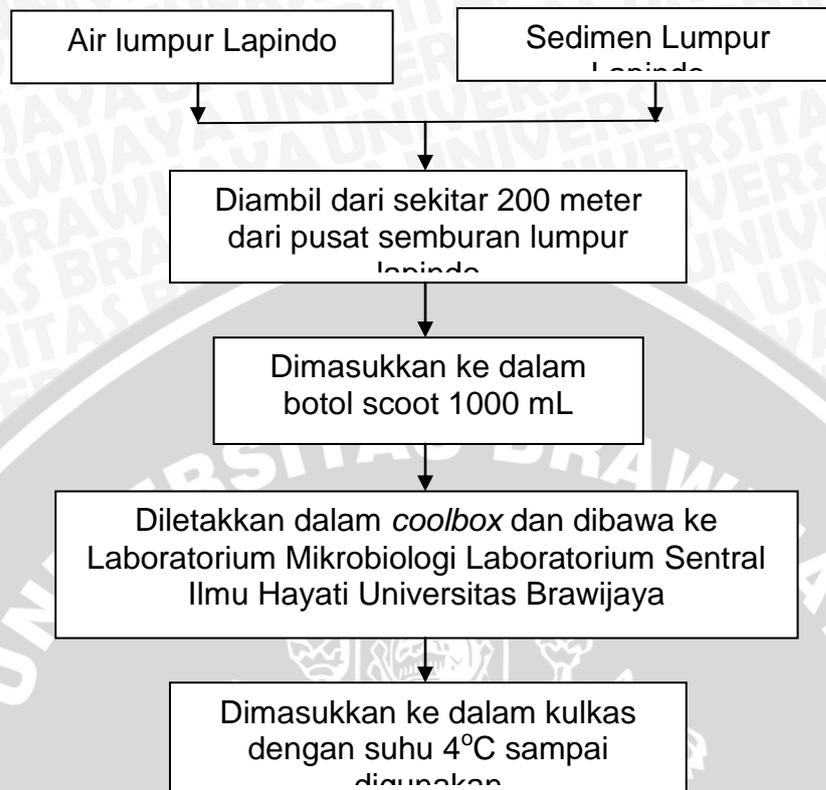
- Rifardi. 2008. *Tekstur Sedimen; Sampling dan Analisis*. Unri Press. Pekanbaru, 101 Hal.
- Ridayani, Nadia. 2013. *Uji Kemampuan Pipa Aluminium dan Tembaga Pada Reaktor Desalinasi Elektrogravitasi Menurunkan Klorida*. Jurusan Teknik Lingkungan. ITS. Surabaya.
- Salam, A.H., Sugianto, dan T. Emrinaldi. 2013. *Menentukan Pola Penyebaran Logam Berat (Cu, Fe, Zn) Di Sungai Siak Dengan Menggunakan Spektrofotometer (AAS)*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau. Pekanbaru.
- Salle AJ. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. New York: Mc Graw Hill Book Company Inc.
- Sasmito, Bambang Budi 2005. *Dasar-Dasar Pengawetan Bahan Pangan*. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang
- Satrio., B. Pratikno dan P. Sidauruk. 2012. *Studi Asal-Usul Air Lumpur Lapindo Periode 2007-2012 Menggunakan Isotop Alam*. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*. Vol.8 No.2 Desember 2012. Hal. 89-99.
- Sianturi, D.C. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatra Utara*. Tesis. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- SIEJ. 2013. *Air Suling Tidak Murah Khas Negeri Arab*. <http://www.siej.or.id/?w=glossary>. Diakses Pada Tanggal 15 November 2013 Pada Pukul 17.00.
- Soeharsono, M.T. 1989. *Biokimia*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sudarsono, Ahmad. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pada Ikan Laut Dalam Spesies Ikan Gindara (*Lepidocibium flavobronneum*)*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Sugiyono, R.AJ. Lintang, dan R.A, Sabe. 2013. *Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah*. Universitas Sam Ratulangi. Manado. 49-55 hal.
- Sulistiyarningsih. 2008. *Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Zat Antibakteri Dari Cairan Kantung Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes ampullaria* jack)*. Fakultas Farmasi. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Suriawiria, Unus, 1985. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Penerbit Angkasa Bandung.
- \_\_\_\_\_ <sup>b</sup> 2003. *Mikrobiologi Air dan Dasar-Dasar Pengolahan Buangan Secara Biologis*. PT. Alumni. Bandung.
- Suryadi Y, Machmud M. 2002. *Keragaman Genetik Strain Ralstonia solanacearum berdasarkan karakterisasi menggunakan teknik berbasis asam nukleat*. *Buletin AgroBio*. 5 (2): 59-66.

- Sutamihardja, R.T.M., Adnan, K. dan Sanusi. 1982. Perairan Teluk Jakarta Ditinjau dari Tingkat Pencemarannya. *Tugas Akhir*. Tidak Diterbitkan. Bogor: Program Pasca Sarjana Jurusan PSL. IPB
- Verioo, M. 1993. Chemical Aspects of Soil Pollution. In ITC-Gen Publication Series 4: 17-46.
- Vieille, C and Zeikus JG. (1998). Thermozyymes: Biotechnology and structurefunction relationships. USA: Extremophiles.
- Waluyo. L. 2007. Mikrobiologi Umum. Edisi Revisi. Balai Pustaka : Jakarta
- \_\_\_\_\_.<sup>b</sup>. 2008. Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Wijayanti, Fitria Kusuma, 2008. Profil Pencemaran Logam Berat Di Air Dan Sedimen Sungai Citarum Segmen Dayeuh Kolot Sampai Nanjung. Tugas Akhir S1. Program Studi teknik Lingkungan, FTSL, ITB : Bandung
- Winarsih, S., T. Nusan, dan Y.W.Citerawati SY. 2011. Reproduksi dan Pertumbuhan Mikroorganisme. Universitas Palangkaraya.
- Ward, F.N; H.M Nakagawa; T.F Harms and G.H. VanSickle 1969. Atomic-Absorption Methods of Analysis Useful in Geochemical Exploration. United States Government Printing Office. Washington
- Yani, M., dan R.M, Kurniasari. 2008. Pengaruh Logam Berat Terhadap Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Minyak Diesel. Seminar Nasional Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. Purwokerto. Tanggal 22-23 Agustus 2008.
- Yumei dan Yulia. 2008. Metode Penelitian Sosial (Resume). Diakses 2 Oktober 2013. Pukul 16.00 WIB.
- Zajac, Anna Sykula; Monika Turek; Mohit Philip Mathew; Ferenc Patai; Martina Horvat; Joanna ablonska. 2010. Determination of Nickel in Tea by Using Dimethylglyoxime Method. No.1081 Food Chemistry and Biotechnology, Vol. 74 2010. Scientific Bulletin of The Technical University of Lodz

LAMPIRAN 1. SKEMA KERJA PENELITIAN

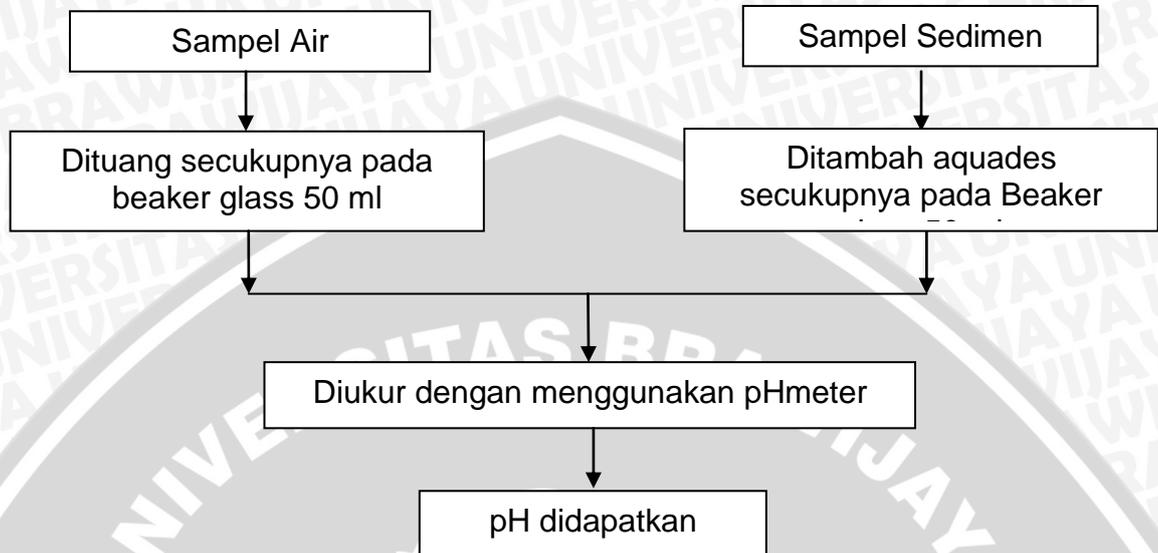


## LAMPIRAN 2. Pengambilan Sampel

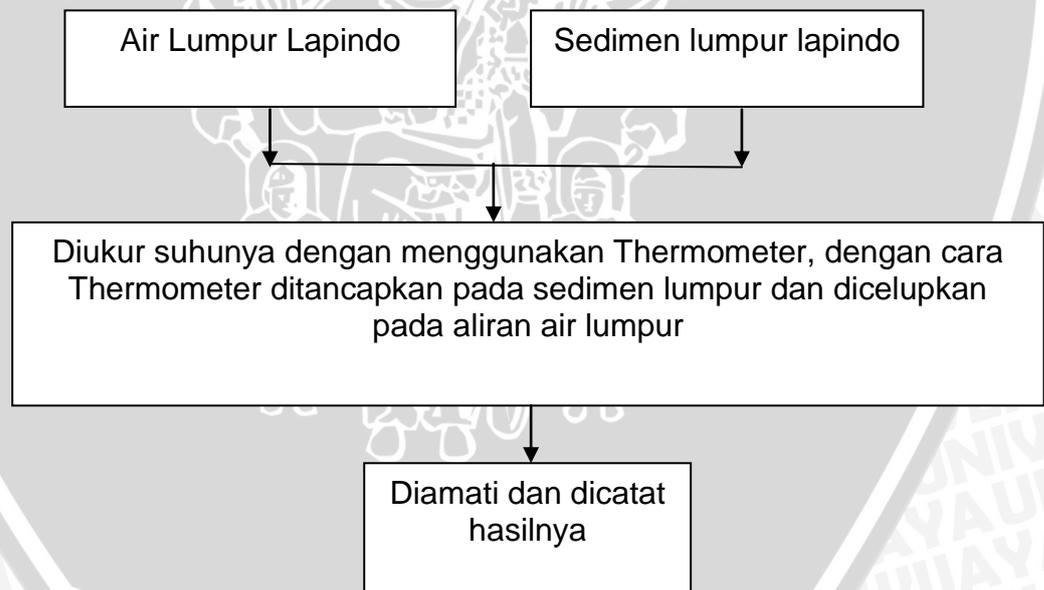


### LAMPIRAN 3. Pengukuran Parameter Fisika dan Kimia Lingkungan

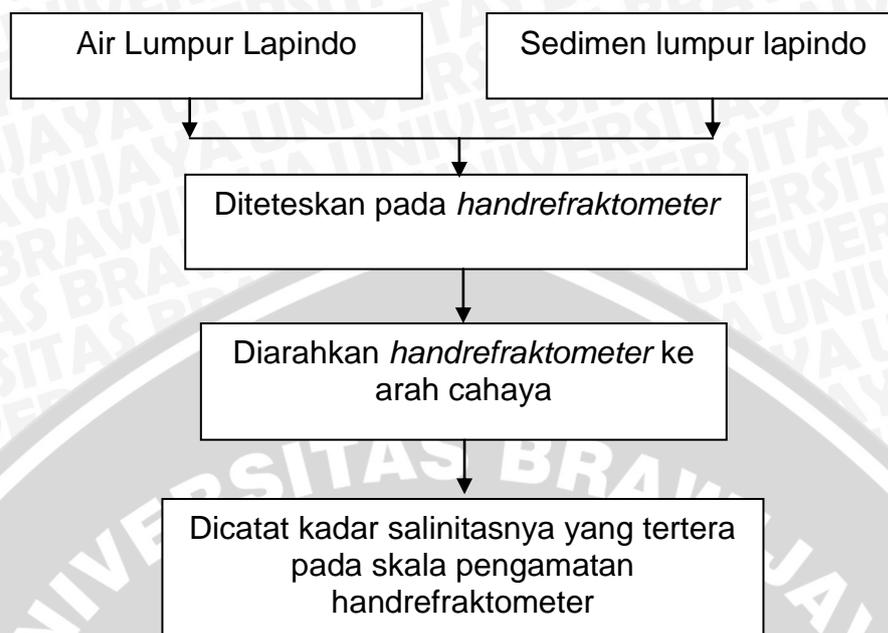
#### 3.1 Pengukuran pH



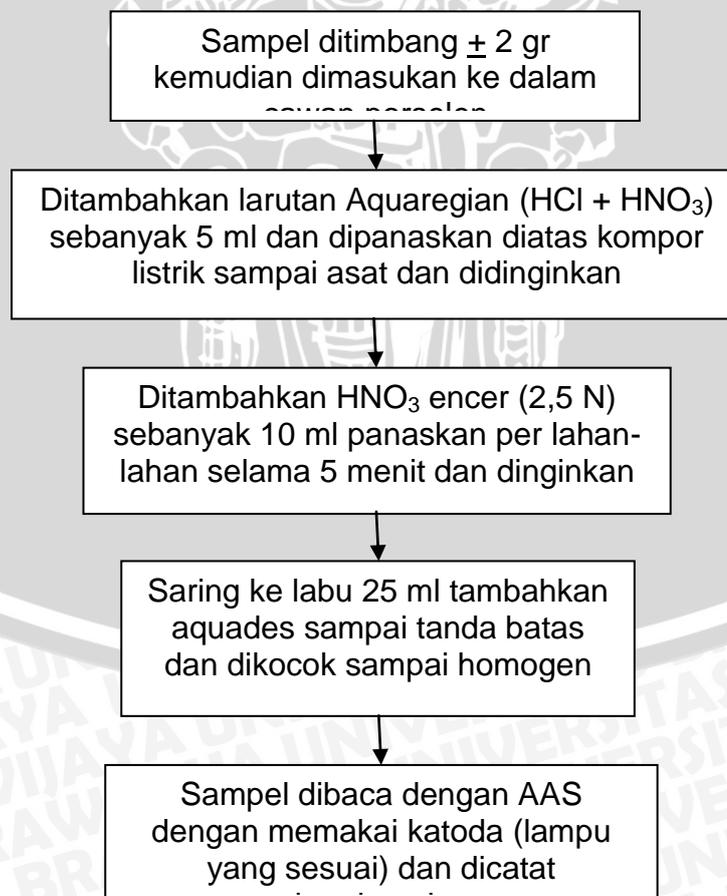
#### 3.2. Pengukuran Suhu



### 3.3 Salinitas



### 3.4 Pengukuran Logam Berat dengan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*)



### 3.5 Pengukuran Logam Berat dengan Spektrofotometer - Logam Mn

Sampel air diambil 100 ml air dan ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$  lalu dipanaskan sampai mendidih  $\pm 10$  menit

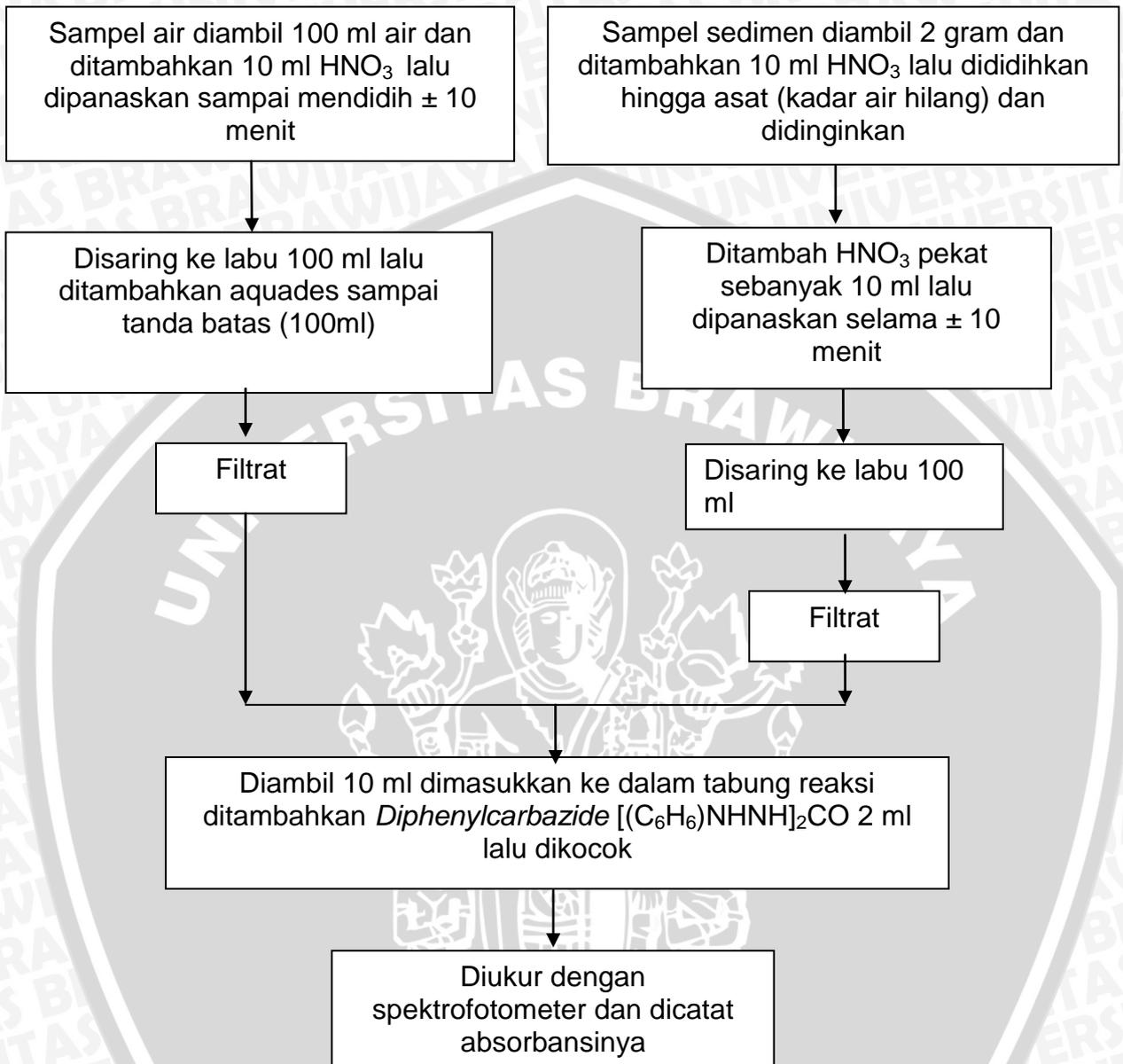
Sampel sedimen diambil 2 gram dan ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$  lalu dididihkan hingga asat (kadar air hilang)

Didinginkan dan ditambahkan 0,5 gr Amonium persulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) dan 10 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Asam Fosfor)

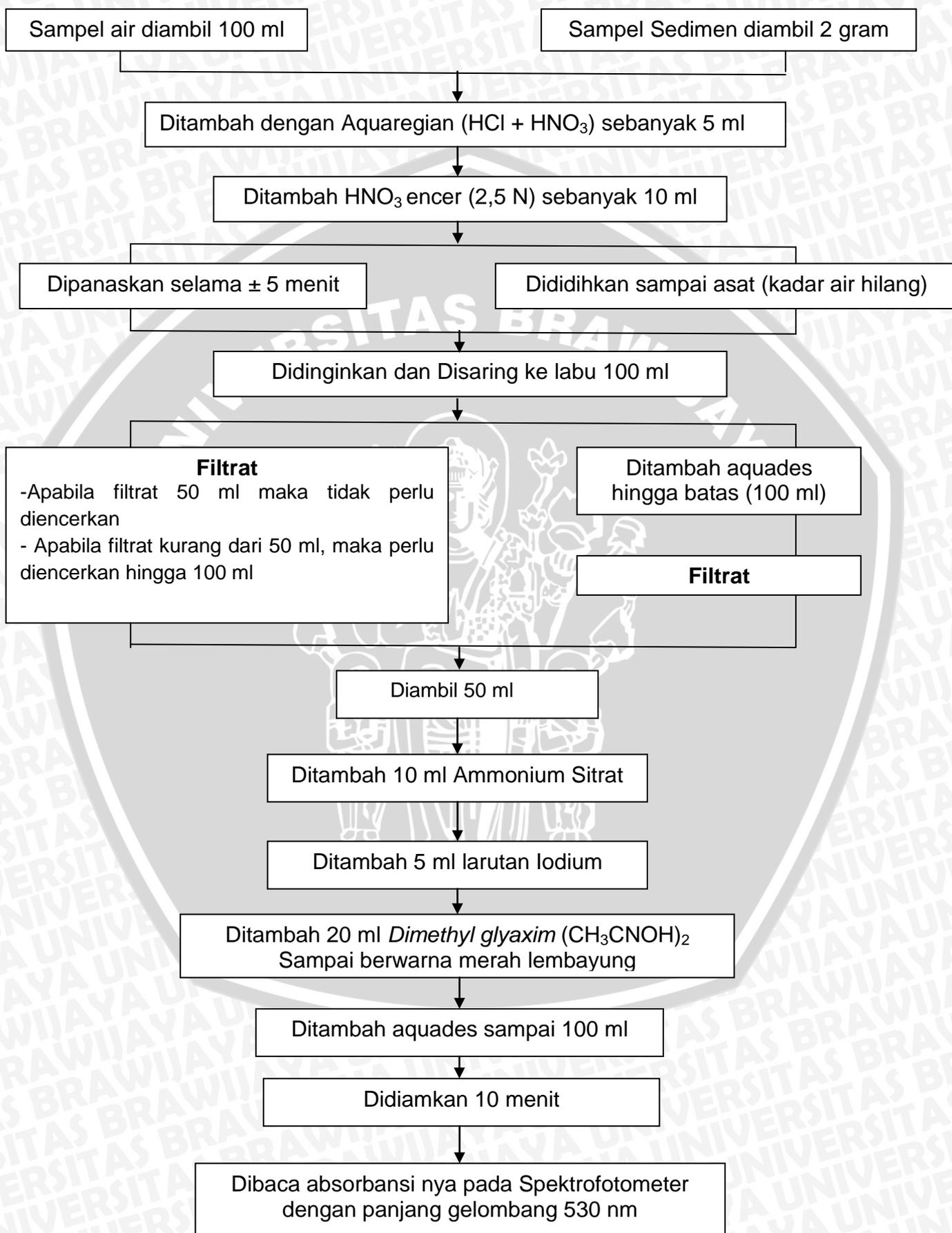
Didihkan dan didinginkan kemudian ditambahkan  $\text{NaIO}_4$  (Natrium Periodate) 0,1 gram dan dipanaskan  $\pm 70^\circ\text{C}$  sampai terbentuk warna merah lembayung

Diukur dengan spektrofotometer dan dicatat absorbansinya

- Logam Cr

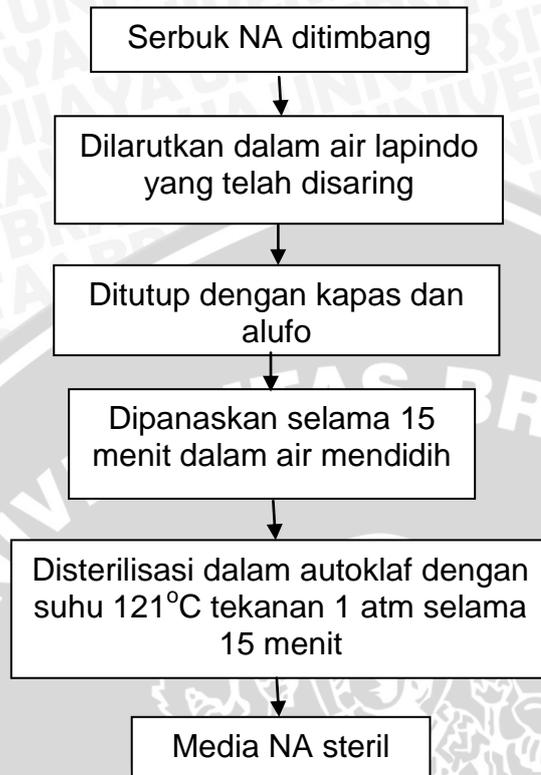


## - Logam Ni



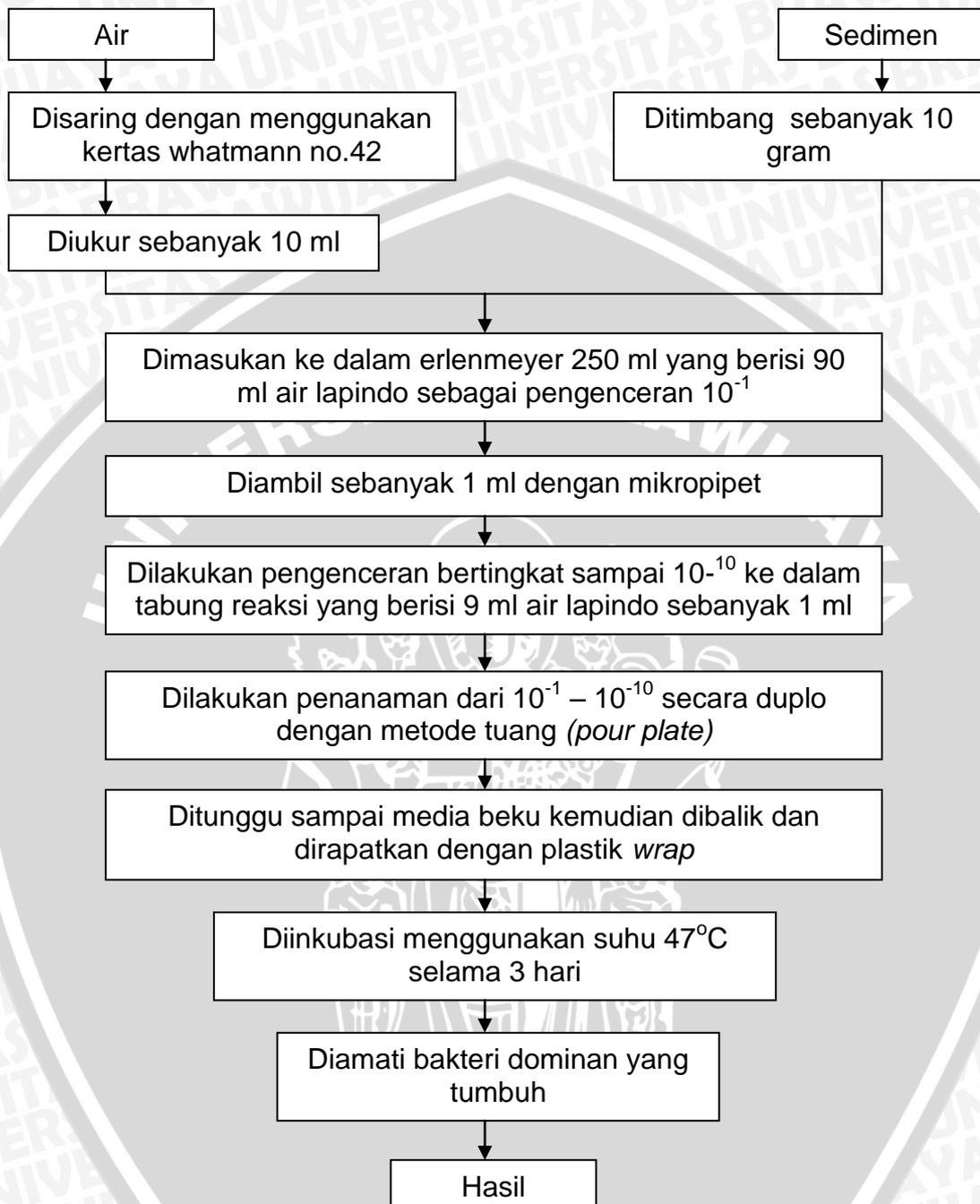
## LAMPIRAN 4. Kultur Bakteri Dominan

### 4.1 Persiapan Media NA



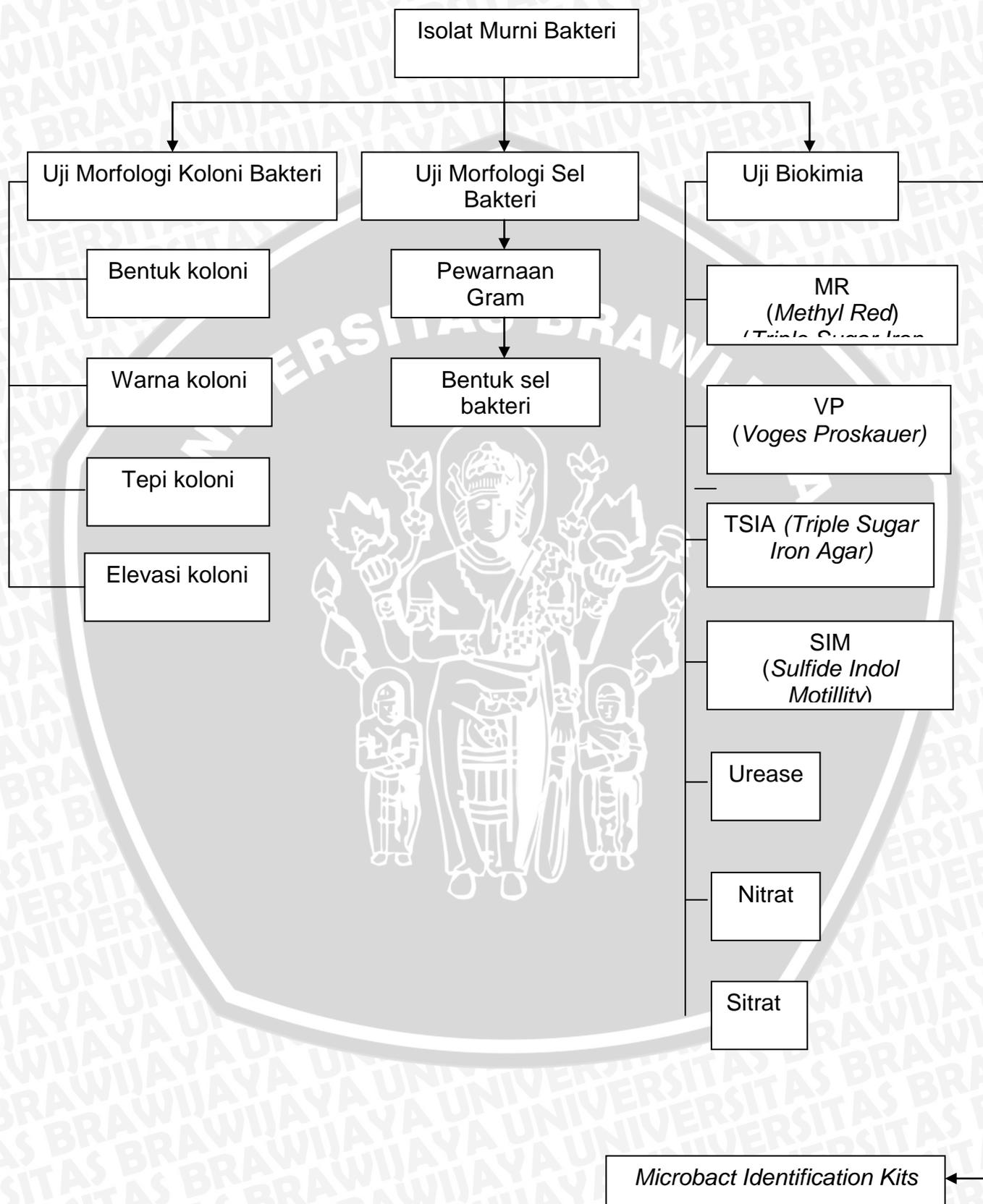
$$\text{Rumus : NA} = \frac{20}{1000} \times \sum \text{cawan} \times 20 \text{ ml}$$

#### 4.2 Kultur Bakteri Massal

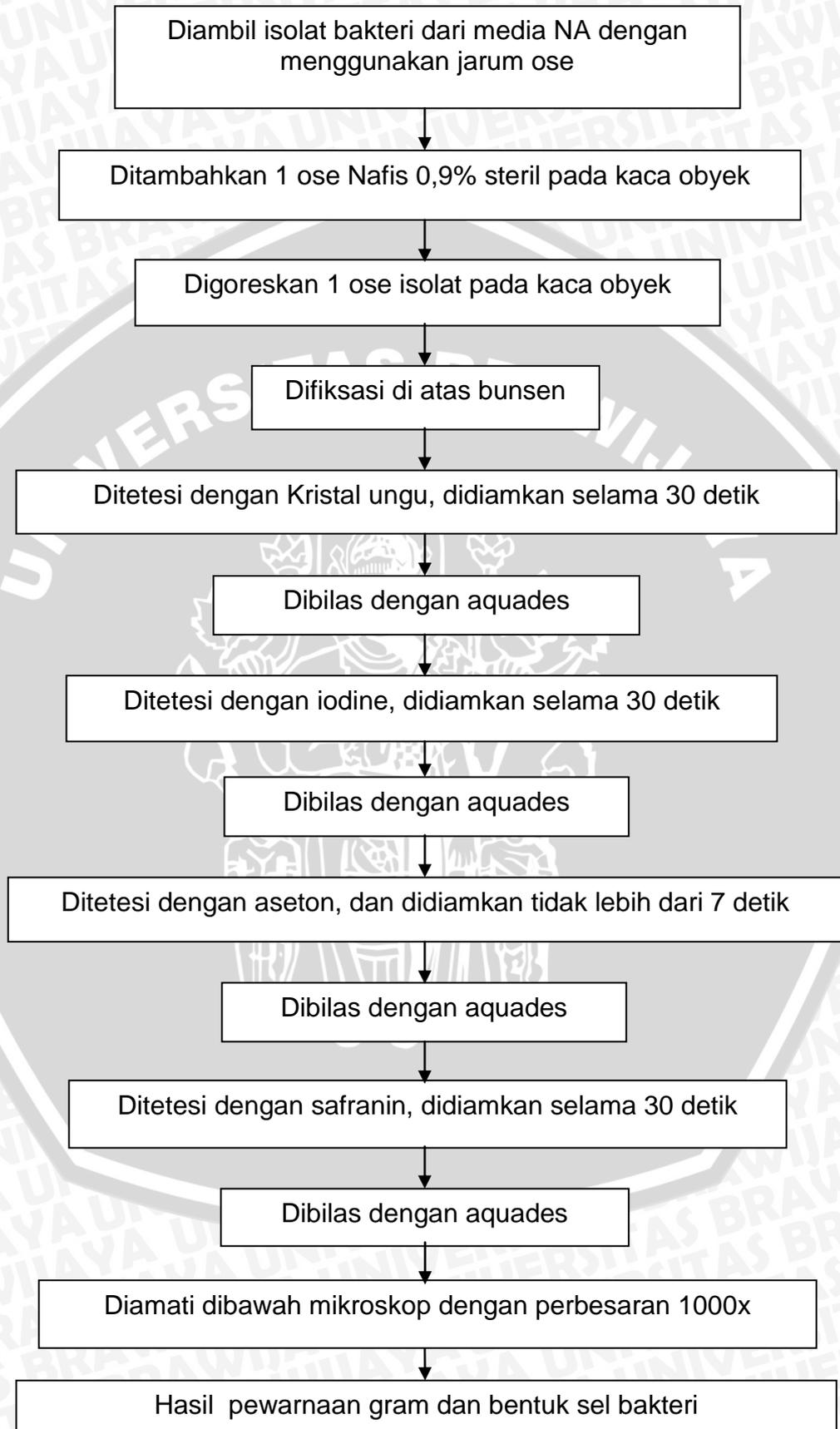




LAMPIRAN 6. Uji Karakterisasi Bakteri



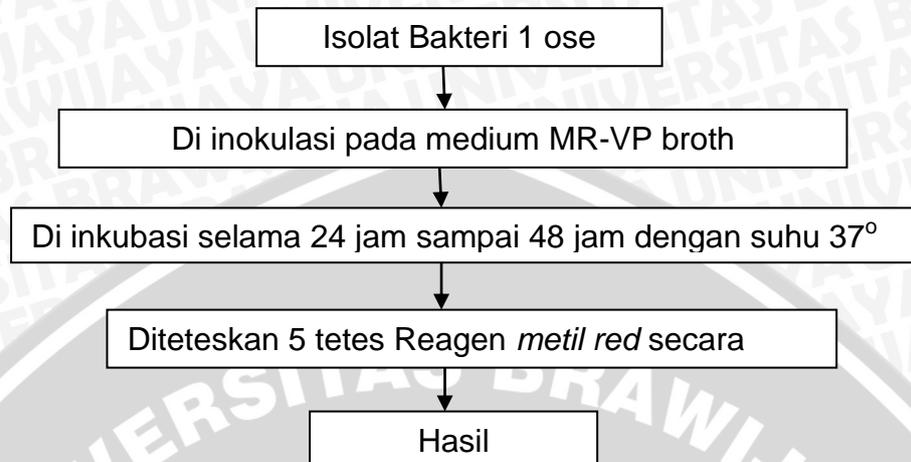
### 6.1 Pewarnaan Gram dan Bentuk Sel Bakteri



## 6.2 Uji Biokimia

### 6.2.1 Uji Biokimia Manual

#### - Uji MR (*Methyl Red*)

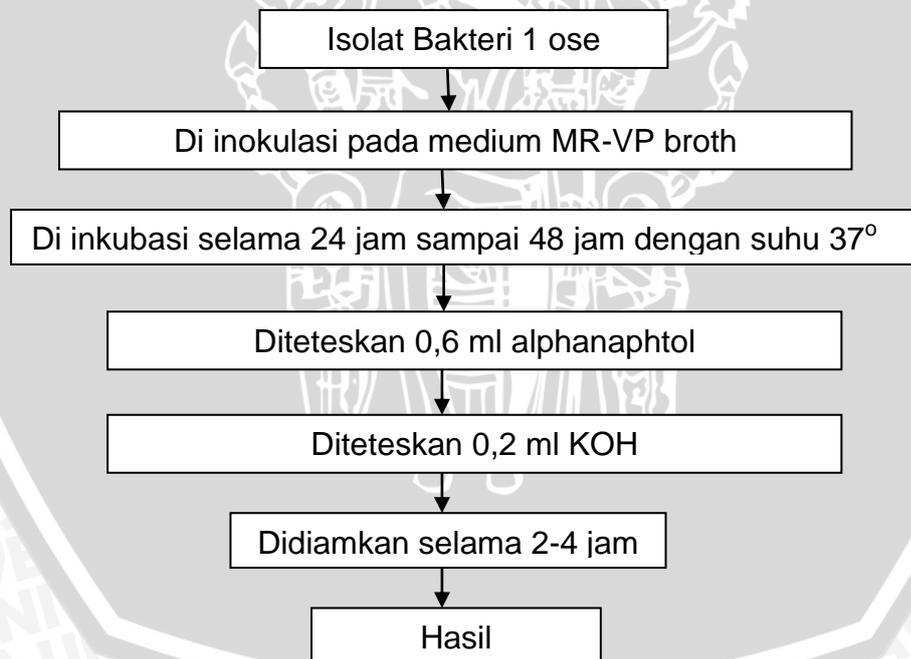


#### Keterangan:

(+) = Apabila medium berubah warna menjadi merah

(-) = Apabila medium berubah warna menjadi kuning

#### - Uji VP (*Voges Proskaver*)

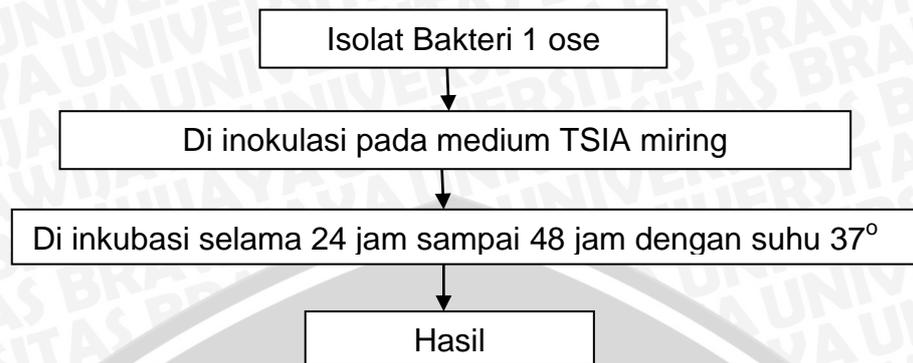


#### Keterangan:

(+) = Apabila medium berubah warna menjadi pink hingga merah

(-) = Apabila tidak ada perubahan warna

- Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)



**Keterangan:**

Asam/Asam = Kuning/Kuning

Alkali/Alkali = Pink/Pink

Asam/Alkali = Kuning/ Pink

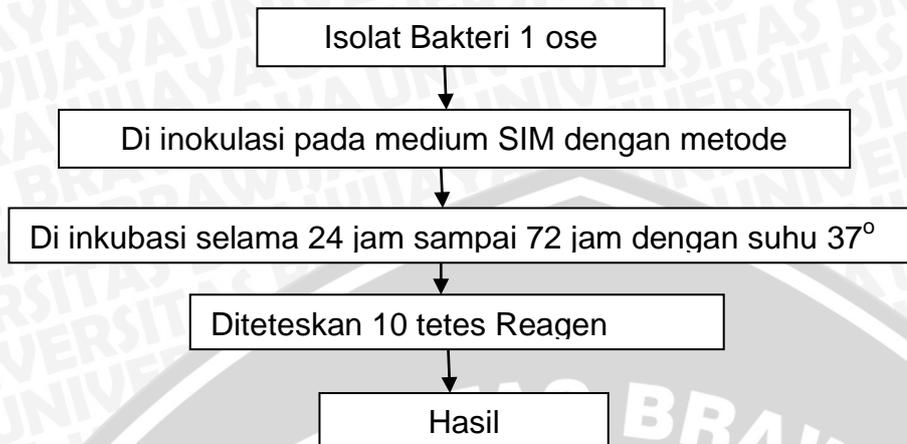
Alkali/Asam = Pink/Kuning

Adanya H<sub>2</sub>S = Warna hitam

Adanya Gas = Gelembung/retakan pada media



- Uji SIM ( *Sulfide Indol Motility* )



Keterangan:

**Indol:**

(+) = Apabila medium berubah warna menjadi merah (cincin merah)

(-) = Apabila medium berubah warna menjadi kuning

**Motil:**

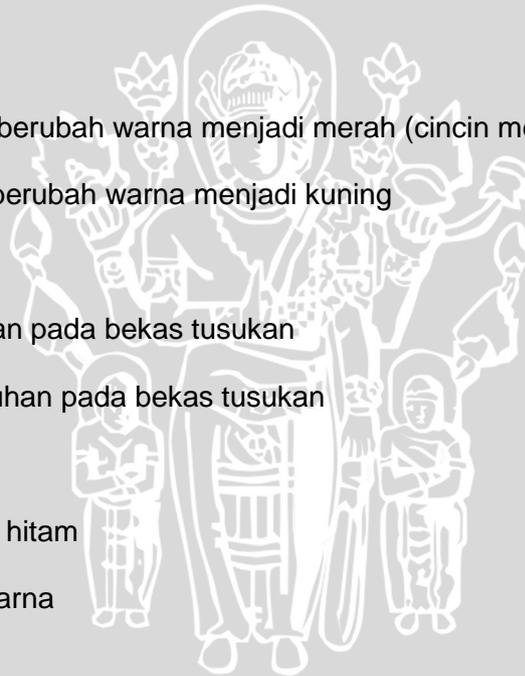
(+) = Adanya kekeruhan pada bekas tusukan

(-) = Tidak ada kekeruhan pada bekas tusukan

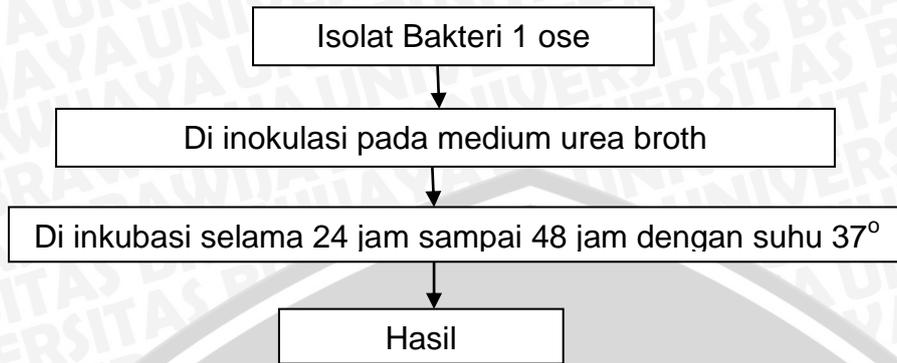
**Sulfur:**

(+) = Terbentuk warna hitam

(-) = Tidak berubah warna



### - Uji Urease

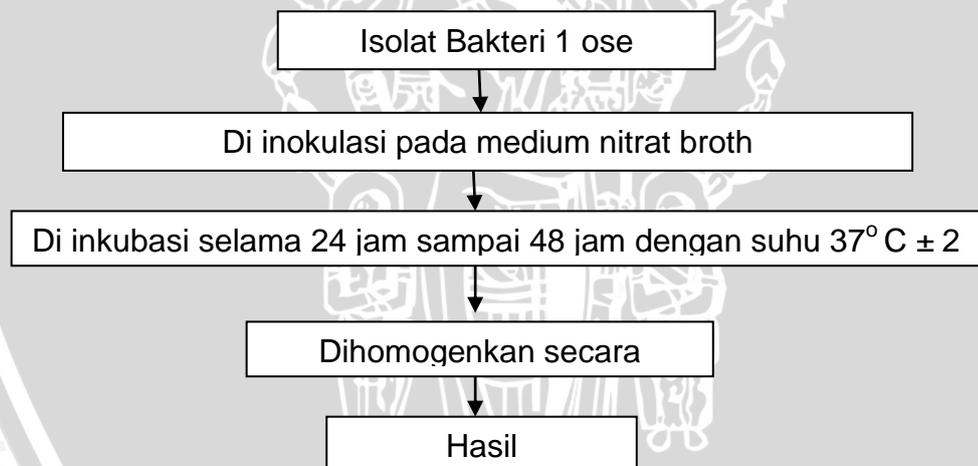


#### Keterangan:

(+) = Apabila medium berubah warna menjadi pink

(-) = Apabila tidak ada perubahan warna

### - Uji Nitrat

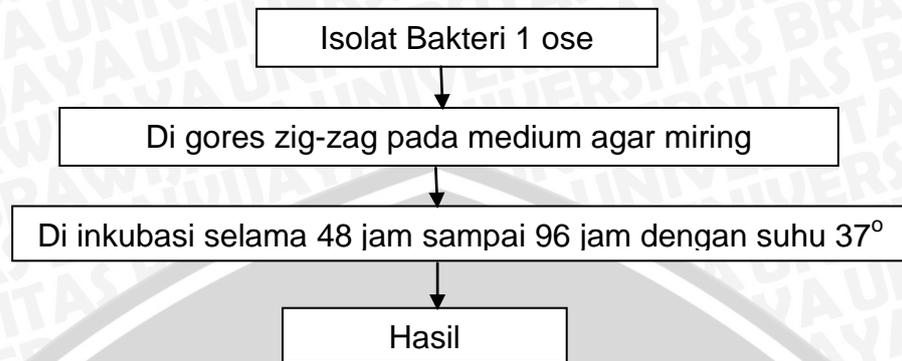


#### Keterangan:

(+) = Apabila medium berubah menjadi keruh

(-) = Apabila tidak ada perubahan kekeruhan

- Uji Sitrat



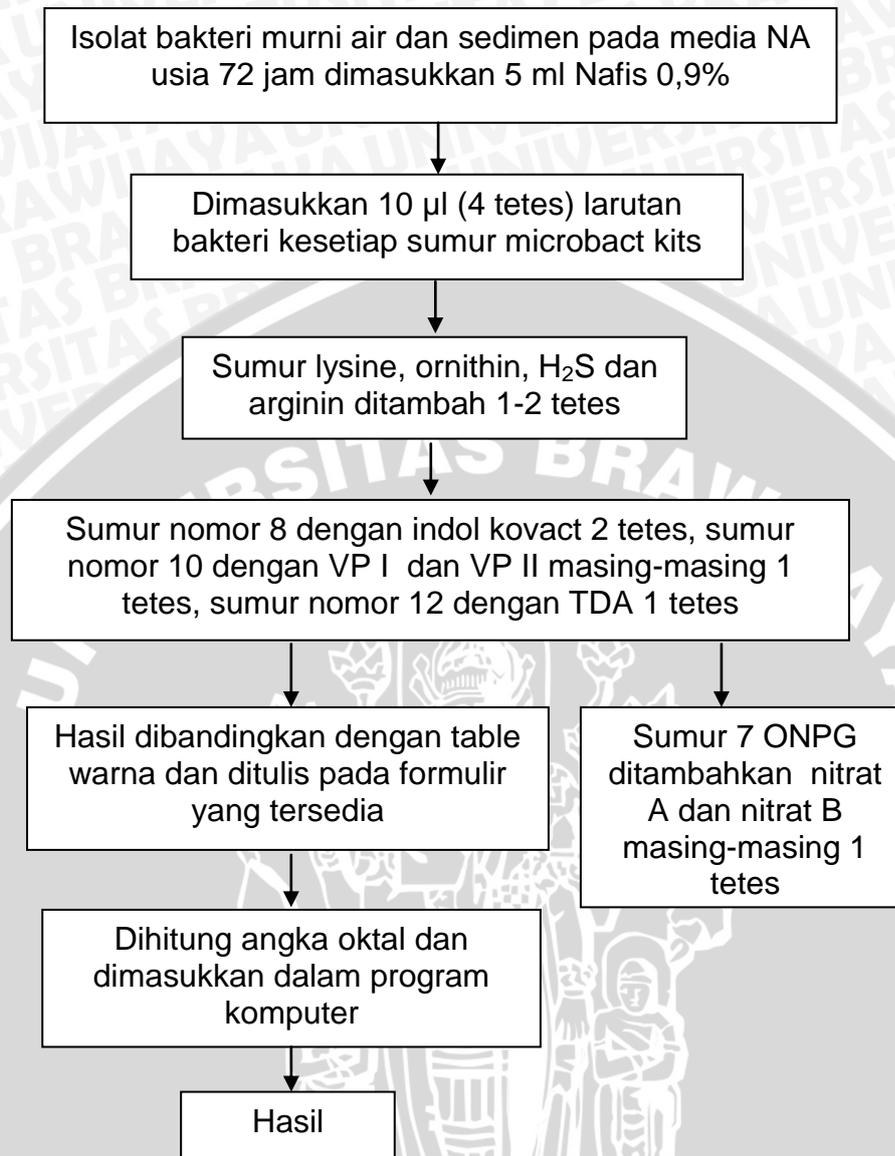
**Keterangan:**

(+) = Apabila medium berubah warna menjadi biru dan disertai pertumbuhan isolat bakteri

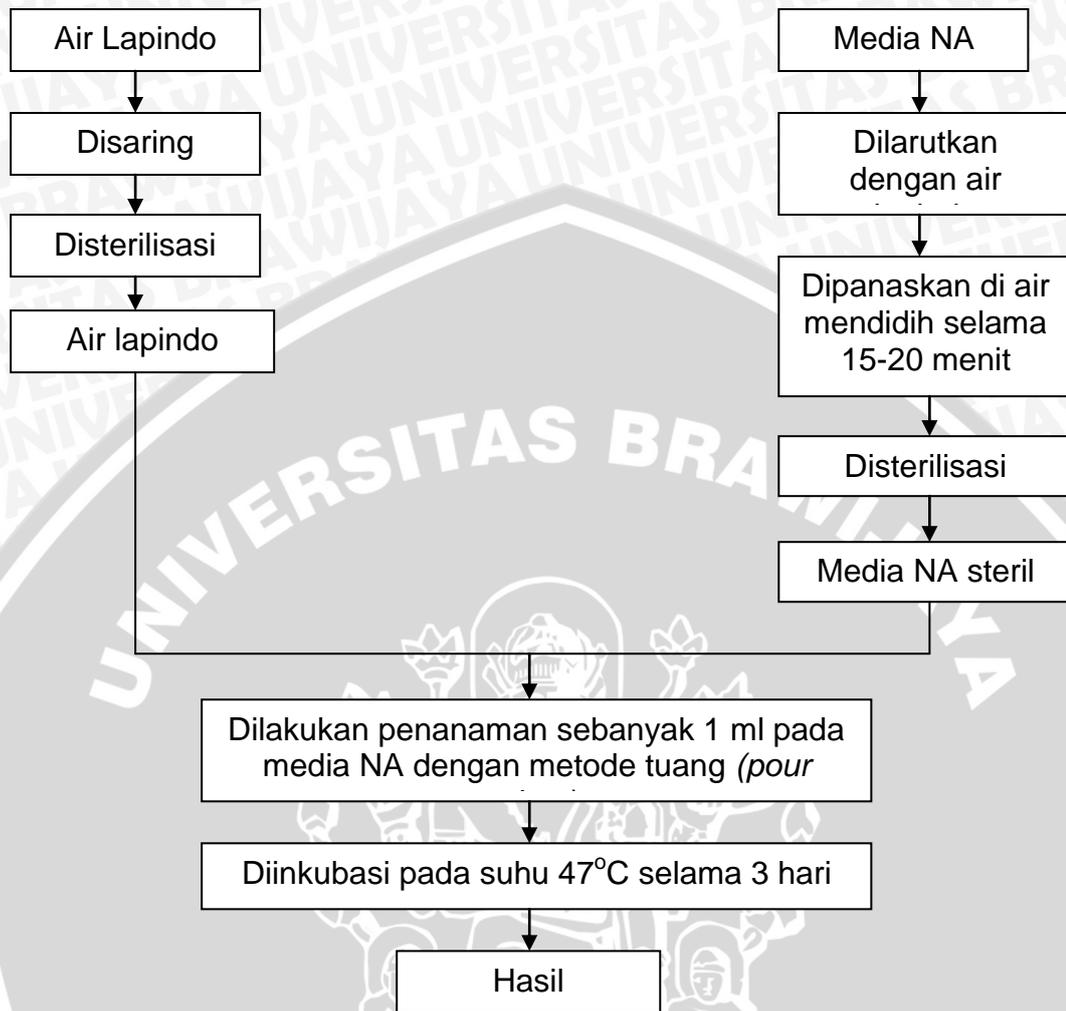
(-) = Apabila tidak ada perubahan warna (tetap hijau)



### 6.2.2 Uji Biokimia *Microbact Identification Kits*



LAMPIRAN 7. Pembuatan Blanko ( kontrol negatif )



**LAMPIRAN 8. HASIL UJI IDENTIFIKASI BAKTERI**

**8.1 Isolat A3**

**8.1.1 Hasil Uji Biokimia Manual**



**8.1.2 Hasil Uji *Microbact Identification Kits***

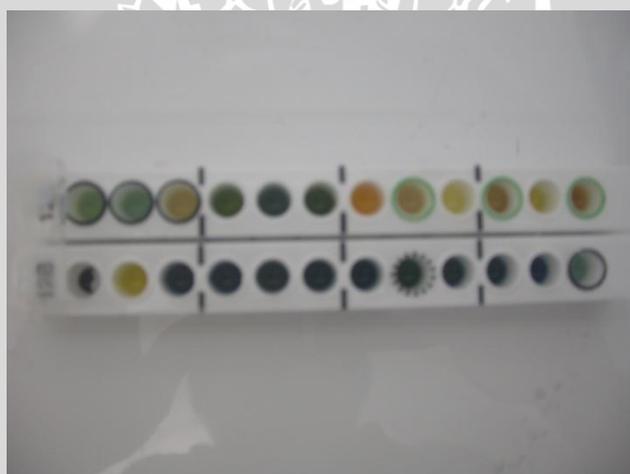


## 8.2 Isolat S3

### 8.2.1 Hasil Uji Biokimia Manual



### 8.2.2 Hasil Uji *Microbact Identification Kits*



8.3 Hasil Analisa Uji Microbact Identification Kits

**OXOID**  
MICROBACT™  
IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

A<sub>3</sub>

	GNB 24E											GNB 12B															
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result / Resultado / Ergebnis / Résultat / Risultato / Resultat / Resultat / Resultado / Αποτέλεσμα	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Sum / Suma / Summe / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Αθροισμα	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
	7			7			6			3			3			3			3			0			0		

Identification / Identificación / Identifikation / Identifikation / Identificazione / Identifikation / Identifying / Identificação / Ταυτοποίηση

*Pseudomonas pseudomallei* 99.489

**OXOID**  
MICROBACT™  
IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

S<sub>3</sub>

	GNB 24E											GNB 12B															
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result / Resultado / Ergebnis / Résultat / Risultato / Resultat / Resultat / Resultado / Αποτέλεσμα	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Sum / Suma / Summe / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Αθροισμα	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
	7			7			6			3			3			3			3			0			0		

Identification / Identificación / Identifikation / Identifikation / Identificazione / Identifikation / Identifying / Identificação / Ταυτοποίηση

*Pseudomonas pseudomallei* 99.488



## LAMPIRAN 9. HASIL ANALISA LOGAM BERAT


**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**FAKULTAS MIPA JURUSAN KIMIA**

 Jl. Veteran – Malang 65145, Telp. (0341) 575838, 551611 – 551615, Pes.311, Fx (0341) 575839  
 Email : kimia\_UB@ub.ac.id, Website : http://kimia.ub.ac.id

**LAPORAN HASIL ANALISA**

Nomor: TN.21 / RT.5 / T.1 / R.0 / TT.150803 / 2013

1. Data konsumen :
  - Nama konsumen : Qorina Ilmaniar
  - Instansi : Fak. Perikanan UB
  - Alamat : Watu Gong 44B
  - Telepon : -
  - Status : Mahasiswa
  - Keperluan Analisis : Uji Kualitas
2. Sampling dilakukan oleh : Konsumen
3. Identifikasi sampel
  - Nama sampel : Air dan Sedimen
  - Asal sampel : Jawa Timur
  - Wujud : Padatan dan Cairan
  - Warna : Abu-abu
  - Bau : Menyengat
4. Prosedur Analisa : Laboratorium Lingkungan Jurusan Kimia FMIPA UB Malang
5. Penyampaian Laporan hasil analisis : Diambil langsung
6. Tanggal terima sampel : 7 Oktober 2013
7. Data hasil analisa :

NO	Parameter	Kode	Hasil Analisa		Metode Analisis	
			Kadar	Satuan	Pereaksi	Metode
1.	Pb	A	0,69±0,03	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
2.	Pb	S	2,69±0,07	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
3.	Hg	A	0,23 ±0,04	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
4.	Hg	S	0,59±0,06	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
5.	Cu	A	0,07±0,03	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
6.	Cu	S	0,27±0,05	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
7.	Fe	A	0,76±0,05	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
8.	Fe	S	6,48±0,04	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
9.	Zn	A	0,03±0,01	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
10.	Zn	S	0,49±0,02	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
11.	Cd	A	-	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
12.	Cd	S	0,03±0,06	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
13.	Au	A	0,42±0,05	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
14.	Au	S	2,12±0,08	ppm	HNO <sub>3</sub>	AAS
15.	Cr	A	0,02±0,09	ppm	[(C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )NHNH] <sub>2</sub> CO	Spektrofotometri
16.	Cr	S	0,06±0,10	ppm	[(C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )NHNH] <sub>2</sub> CO	Spektrofotometri
17.	Mn	A	39,16±0,02	ppm	NaIO <sub>4</sub>	Spektrofotometri
18.	Mn	S	528±0,04	ppm	NaIO <sub>4</sub>	Spektrofotometri
19.	Ni	A	1,02±0,04	ppm	(CH <sub>3</sub> CNOH) <sub>2</sub>	Spektrofotometri
20.	Ni	S	3,39±0,06	ppm	(CH <sub>3</sub> CNOH) <sub>2</sub>	Spektrofotometri

## Catatan :

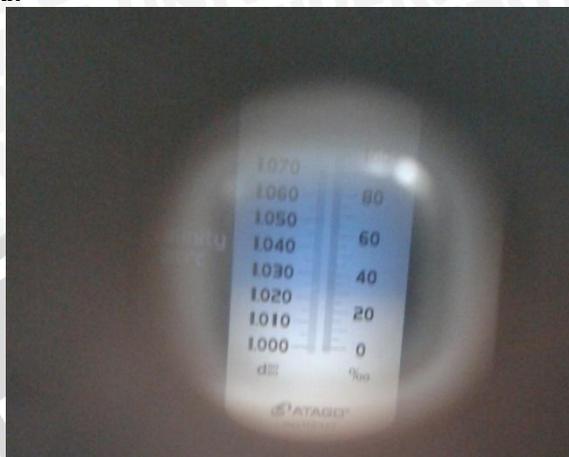
1. Hasil analisa ini adalah rata-rata pengerjaan analisis secara duplo
2. Hasil analisa ini hanya berlaku untuk sampel yang kami terima dengan kondisi sampel saat itu


 Malang, 24 Oktober 2013  
 Kepala UPT. Layanan Analisa & Pengukuran

  
 Dra. Sri Wardani, MS.i


### LAMPIRAN 10. HASIL PENGUKURAN SALINITAS DENGAN REFRAKTOMETER

#### 10.1 Salinitas Air



#### 10.2 Salinitas Sedimen



**LAMPIRAN 11. DATA PENGAMBILAN SAMPEL AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT**

**11.1 Suhu**

**1. Air Lumpur**

Titik Pengambilan Sampel	Ulangan			Rata-Rata	Standar Deviasi
	1	2	3		
A	43	45	47	45	2
B	44	45	46	45	1
C	44.5	45	46	45.16666667	0.763762616
D	44	45	48	45.66666667	2.081665999
E	44	45	46	45	1
				45.16666667	0.288675135

**2. Sedimen Padat**

Titik Pengambilan Sampel	Ulangan			Rata-Rata	Standar Deviasi
	1	2	3		
A	47	49	49	48.33333333	1.154700538
B	47	48	49	48	1
C	46	48.5	49	47.83333333	1.607275127
D	47	49	48	48	1
E	47	48	48.5	47.83333333	0.763762616
				48	0.204124145

**11.2 pH (Derajat Keasaman)**

**1. Air Lumpur**

Titik Pengambilan Sampel	Ulangan			Rata-Rata	Standar Deviasi
	1	2	3		
A	8	7.7	7.8	7.833333333	0.152752523
B	8	7	7.8	7.6	0.529150262
C	7.4	7.9	8	7.766666667	0.321455025
D	7.8	7.8	8	7.866666667	0.115470054
E	8	7.7	7.9	7.866666667	0.152752523
				7.786666667	0.125830574

## 2. Sedimen Padat

Titik Pengambilan Sampel	Ulangan			Rata-Rata	Standar Deviasi
	1	2	3		
A	7.7	7.5	7.6	7.6	0.1
B	7.8	7.5	7	7.433333333	0.404145188
C	7.5	7.2	7.7	7.466666667	0.251661148
D	7.5	7.6	7.8	7.633333333	0.152752523
E	7.8	7.5	7.5	7.6	0.173205081
				7.546666667	0.090061707

## 11.3 Salinitas

### 1. Air Lumpur

Titik Pengambilan Sampel	Ulangan			Rata-Rata	Standar Deviasi
	1	2	3		
A	30	30	30	30	0
B	30	30	30	30	0
C	30	30	30	30	0
D	30	30	30	30	0
E	30	30	30	30	0
				30	0