

**POTENSI BAKTERI *Bacillus subtilis* DALAM MENDEGRADASI
PROTEIN DARI LIMBAH CAIR TAMBAK UDANG**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh:
SISCA NURCAHYA
NIM. 0910852018



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

2011

**POTENSI BAKTERI *Bacillus subtilis* DALAM MENDEGRADASI PROTEIN
DARI LIMBAH CAIR TAMBAK UDANG**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya**

Oleh:
SISCA NURCAHYA
NIM. 0910852018



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2011

**POTENSI BAKTERI *Bacillus subtilis* DALAM MENDEGRADASI PROTEIN
DARI LIMBAH CAIR TAMBAK UDANG**

Oleh:
SISCA NURCAHYA
NIM. 0910852018

Telah dipertahankan di depan penguji pada tanggal 10 Mei 2010
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I



Dr. Ir. Mohammad Fadjar, M.Sc

Tanggal : 13 JUN 2011

Dosen Penguji I



Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Tanggal : 13 JUN 2011

Dosen Pembimbing II



Ir. Ellana Sanoesi, MP

Tanggal : 13 JUN 2011

Dosen Penguji II



Ating Yuniarti, S.PI, M. Aqua

Tanggal : 13 JUN 2011

Mengetahui,

Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan



Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

Tanggal:

13 JUN 2011

RINGKASAN

SISCA NURCAHYA. Potensi Bakteri *Bacillus subtilis* dalam Mendegradasi Protein dari Limbah Cair Tambak Udang (Di bawah bimbingan **Dr. Ir. Moh. Fadjar, M.Sc** dan **Ir. Ellana Sanoesi, MP**).

Budidaya udang intensif menuntut pemberian pakan yang tinggi. Sebagian pakan yang diberikan tidak dikonsumsi, ditambah dengan buangan metabolisme dan bangkai organisme meningkatkan akumulasi bahan organik di tambak. Penyebab kegagalan budidaya udang di tambak salah satunya adalah tingginya bahan organik dengan derajat degradasi yang lambat. Saat ini sudah dikenal sistem pengolahan limbah organik dengan menggunakan organisme hidup, yang dikenal dengan sistem pengolahan secara biologis.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi dan kepadatan terbaik bakteri *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang. Kegunaan penelitian ini, yaitu diharapkan dapat memberikan informasi tentang potensi dan kepadatan optimum *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, serta Laboratorium Kimia Lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 2-10 Februari 2011.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah kepadatan *B. subtilis* yaitu A (10^4 cfu/ml), B (10^5 cfu/ml), C (10^6 cfu/ml), D (10^7 cfu/ml) dan E (10^8 cfu/ml).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *B. subtilis* mampu mendegradasi protein dalam limbah tambak dan memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata. Berdasarkan hasil uji BNT, urutan perlakuan kepadatan terbaik yaitu D (10^7 cfu/ml) dengan kemampuan mendegradasi protein sebesar 560 ppm; C (10^6 cfu/ml) yang memiliki kemampuan mendegradasi protein sebesar 298,66 ppm; E (10^8 cfu/ml) mampu mendegradasi protein sebesar 387 ppm; B (10^5 cfu/ml) dengan kemampuan mendegradasi protein sebesar 204,33 ppm; dan terakhir perlakuan A (10^4 cfu/ml) mampu mendegradasi protein sebesar 129,66 ppm. Sementara untuk hasil pengukuran kualitas air pada saat penelitian didapatkan nilai suhu antara 25-26°C; oksigen terlarut antara 0,8-1,2 ppm; dan pH antara 7,23-7,42.

Berdasarkan data di atas, penambahan *B. subtilis* mampu menurunkan senyawa protein yang terkandung dalam limbah cair tambak udang. Hal ini dikarenakan *B. subtilis* memiliki enzim ekstraseluler yang dapat mendegradasi senyawa protein. Perlakuan D (10^7 cfu/ml) merupakan kepadatan terbaik *B. subtilis* dalam mendegradasi protein. *B. subtilis* mampu bertahan hidup dan mendegradasi protein dalam lingkungan dengan nilai oksigen terlarut yang rendah.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga laporan skripsi dengan judul "Potensi Bakteri *Bacillus subtilis* dalam Mendegradasi Protein dari Limbah Cair Tambak Udang" dapat terselesaikan.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Mohammad Fadjar, M.Sc selaku Dosen Pembimbing I.
2. Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku Dosen Pembimbing II.
3. Ibu Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku Dosen Penguji I.
4. Ibu Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua selaku Dosen Penguji II.
5. Bapak Drs. Endang R. Burhanudin dan Ibu Iis Nurlela, selaku orangtua yang telah memberikan semangat dan dukungan baik dari segi materil maupun moril sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini.
6. Serta pihak-pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam penyelesaian laporan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih jauh dari sempurna dan banyak kekurangan karena keterbatasan penulis sebagai manusia, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak. Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca.

Malang, Mei 2011

Sisca Nurcahya

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada:

Allah SWT, Atas iman.. Atas islam.. Atas setiap nafas yang berhembus, jantung yang berdetak, darah yang mengalir, semua karunia yang telah Kau berikan.. Alhamdulillah wasyukurillah..

Ibu.. Terima kasih atas cinta yang tak terkira.. Andai kau masih ada.. Ingin ku persembahkan semua ini untukmu.. Betapa aku mencintaimu.. Bahkan dikala kau tiada, sosokmu slalu mengilhamiku.. Ibu, aku sangat merindukanmu.. Semoga kau bahagia di surga..

Bapa.. Kau adalah semangatku, motivasiku.. Petuahmu membuat aku semakin kuat menjalani hidup ini. Di hari senjamu kini, ingin aku membuatmu menangis bahagia..

Papa.. Terima kasih atas perjuanganmu yang telah mengantarkan aku meraih semua ini.. Dimana masih banyak yang tak seberuntung aku dalam menjalani hidup ini. Tanpa usahamu, aku takkan bisa mencapainya.. Meskipun kau harus membayar semua ini dengan kesendirian tanpa kasih sayang, tanpa perhatian. Aku tidak ingin membalas semua ini dengan kekecewaan.. Aku ingin membuatmu bangga.. Papa, aku sangat bersyukur menjadi anakmu.. I LOVE YOU, Papa..

Mama.. I love u n' u love me too.. I LOVE U.. but I dont know how to show u.. We need a long time to life together, to love each other..

Aa.. Thanks for everything.. Thanks for being part of my life.. Hope everything will be better for our future.. Smoga kita tetap dipersatukan cinta yang tak lekang oleh waktu, amiin.. Keep your heart for me.. Just for me.. I'm all yours..

Keluarga Pangandaran : Bapa, Mamah, Enja.. Terima kasih atas doa dan restunya sehingga semua ini terasa lebih mudah dan indah..

Keluarga Paciran.. Dikala aku down, teteh dan om membuat aku bisa bangkit..membuatku be 100% kembali.. Terima kasih atas segalanya, support dan doa, pelajaran tentang hidup yang sangat berharga..

Keluarga besar ALJERS.. Tanpa kalian semua, aku merasa autis.. Bagaimana dilempar ke planet yang asing.. Dont forget every moment that we shared.. Love u all.. Semoga smakin kompak yaaah, Saling mendukung dan saling mengingatkan..

Keluarga besar 215E.. I will never fotget all of u.. thanks for the great experience.. I'll be missing u, guys.. Sedih rasanya harus pisah dengan kalian smuaaa.. Keep in touch ya kawan !!

Temen-temen yang pernah kuliah dan praktikum bareng dan juga team asisten.. Nice to know u..

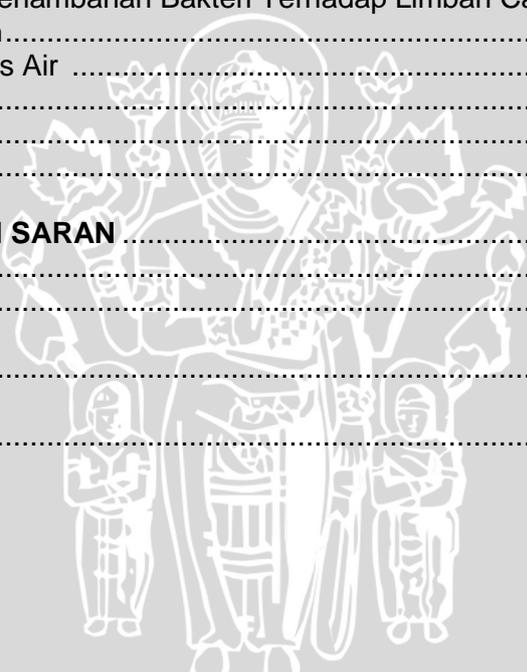
Sisca Nurcahya

Hal yang begitu sulit dilupakan sepanjang hidup kita adalah RASA

DAFTAR ISI

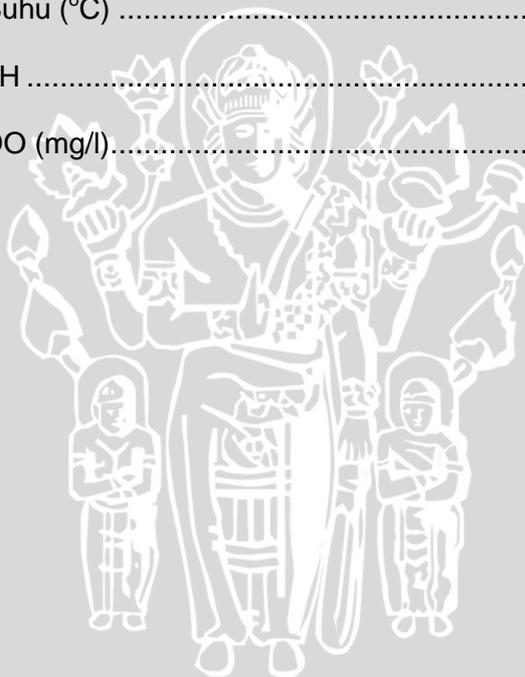
	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	4
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian.....	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Bakteri <i>B. subtilis</i>	5
2.2 Pertumbuhan Bakteri.....	7
2.3 Limbah Organik.....	8
2.4 Parameter Pengolahan Limbah Cair Tambak Udang	11
2.4.1 Protein.....	11
2.4.2 Suhu	11
2.4.3 pH	12
2.4.4 Oksigen Terlarut/ <i>Dissolved Oxygen</i> (DO).....	12
2.5 Bakteri Proteolitik	13
2.6 Bioremediasi	15
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	17
3.1 Materi Penelitian.....	17
3.1.1 Bahan.....	17
3.1.2 Alat	17
3.2 Metode Penelitian.....	18
3.2.1 Metode	18
3.2.2 Rancangan Penelitian	18
3.3 Prosedur Penelitian	19
3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	19
3.3.2 Pembuatan Media	20
3.3.2.1 <i>Nutrient Agar</i> (NA)	20
3.3.2.2 <i>Nutrient Broth</i> (NB)	20
3.3.3 Pembuatan Biakan <i>B. subtilis</i>	21
3.3.4 Pewarnaan Gram	21

3.3.5	Perbanyakkan Bakteri <i>B. subtilis</i>	22
3.3.6	Pengenceran Bakteri.....	22
3.3.7	Penambahan Bakteri <i>B. subtilis</i>	23
3.3.8	Pengambilan Limbah Cair Tambak	23
3.3.9	Uji Beberapa Parameter	24
3.3.9.1	Protein	24
3.3.9.2	Suhu	25
3.3.9.3	pH.....	25
3.3.9.4	DO	25
3.4	Parameter Uji	26
3.4.1	Parameter Utama.....	26
3.4.2	Parameter	26
3.5	Analisa Data.....	26
3.6	Alur Kerangka Operasional Penelitian	27
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1	Hasil Kultur Bakteri <i>B. subtilis</i>	28
4.2	Penentuan Kepadatan Bakteri <i>B. subtilis</i>	30
4.3	Penambahan Penambahan Bakteri Terhadap Limbah Cair Tambak .	30
4.4	Hasil Uji Protein.....	32
4.5	Hasil Uji Kualitas Air	38
4.5.1	Suhu	38
4.5.2	pH.....	39
4.5.3	DO	41
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1	Kesimpulan	43
5.2	Saran	43
	DAFTAR PUSTAKA	44
	LAMPIRAN	49



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pengukuran Kemampuan Degradasi Bakteri <i>B. subtilis</i> terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang (ppm).....	32
2. Analisa Keragaman/Sidik Ragam Kemampuan Degradasi Bakteri <i>B. subtilis</i> terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang	33
3. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Kemampuan Degradasi Bakteri <i>B. subtilis</i> terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang.....	33
4. Analisa Keragaman/Sidik Ragam Regresi Kemampuan Degradasi Bakteri <i>B. subtilis</i> terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang	34
5. Hasil Pengukuran Suhu (°C)	38
6. Hasil Pengukuran pH	39
7. Hasil Pengukuran DO (mg/l).....	41



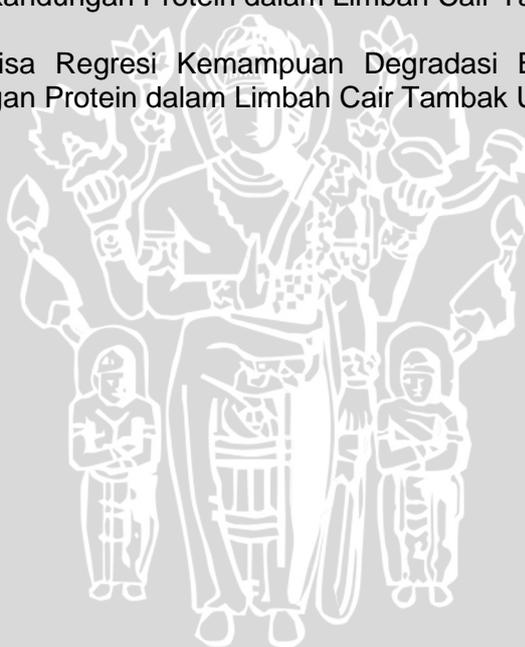
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>B. subtilis</i>	6
2. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	8
3. Denah Rancangan Penelitian	19
4. Alur Kerangka Operasional.....	27
5. Kultur Bakteri <i>B. subtilis</i>	28
6. Pewarnaan Gram bakteri <i>B. subtilis</i>	29
7. Grafik Hubungan Antara Kepadatan Bakteri <i>B. subtilis</i> (X) dengan Penurunan Kadar Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang (Y).....	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan Penelitian.....	49
2. Komposisi <i>Nutrient Agar</i> (NA) dan <i>Nutrient Broth</i> (NB)	52
3. Skema Pembuatan Biakan Bakteri <i>B. subtilis</i>	53
4. Skema Pewarnaan Gram.....	54
5. Skema Perbanyakkan Bakteri <i>B. subtilis</i>	55
6. Pengenceran Bakteri <i>B. subtilis</i>	56
7. Perhitungan Data Pengukuran Kemampuan Degradasi Bakteri <i>B. subtilis</i> terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang	56
8. Perhitungan Analisa Regresi Kemampuan Degradasi Bakteri <i>B. subtilis</i> terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang.....	60



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya perairan sebagai bagian integrasi dari sektor perikanan Indonesia, memiliki prospek yang menjanjikan untuk dikembangkan menjadi suatu kegiatan ekonomi yang tangguh dan berkelanjutan. Hal ini dapat dilihat dari kontribusi usaha budidaya perairan dalam pemulihan perekonomian nasional. Pada saat sektor produksi dan industri lain terpuruk akibat krisis ekonomi, sektor usaha perikanan (termasuk kegiatan usaha budidaya perairan) tidak mengalami guncangan yang berarti bahkan cenderung memperoleh keuntungan dari menurunnya nilai rupiah terhadap US dolar, terutama untuk kegiatan-kegiatan usaha budidaya perairan yang berorientasi ekspor (Hutabarat, 2001). Udang merupakan salah satu komoditi di sub sektor yang diharapkan dapat meningkatkan sumber devisa negara (Harlinah, 2005).

Budidaya udang intensif dengan padat penebaran benur yang tinggi menuntut pemberian pakan yang tinggi. Sebagian pakan yang diberikan tidak dikonsumsi, ditambah dengan buangan metabolisme dan bangkai organisme lain meningkatkan akumulasi bahan organik di tambak (Saprillah, 2000).

Menurut Supono (2009), limbah organik terdiri dari sisa pakan, kotoran udang dan organisme yang mati. Menurut Primavera (1994) dalam Supono (2009), dari 100% pakan yang diberikan 15% tidak termakan (*uneaten feed*), sedangkan 85% dikonsumsi oleh udang (*eaten feed*). Dari 85% yang dimakan, 17% diasimilasi menjadi daging bagi biota budidaya (udang), 48% digunakan untuk metabolisme udang termasuk untuk moulting, dan 20% menjadi feces (kotoran udang).

Penyebab kegagalan budidaya udang di tambak salah satunya adalah tingginya bahan organik dengan derajat degradasi yang lambat (Isdarmawan,

2005). Berdasarkan Bratvold and Browdy (2000) dalam Hariani (2009), pada kondisi alamiah proses penguraian oleh mikroorganisme dapat berlangsung seimbang dengan pembentukan bahan organiknya. Berbeda dengan tambak udang intensif yang mempunyai intensitas pembentukan limbah organik relatif lebih cepat dibandingkan proses penguraian oleh mikroorganisme.

Pencemaran di lingkungan lebih besar dibandingkan dengan kecepatan proses degradasi zat pencemar tersebut secara alami. Akibatnya, zat pencemar akan terakumulasi sehingga dibutuhkan campur tangan manusia dengan teknologi yang ada untuk mengatasi pencemaran tersebut (Nugroho, 2006).

Saat ini sudah dikenal sistem pengolahan limbah organik dengan menggunakan organisme hidup, yang dikenal dengan sistem pengolahan secara biologis (Suryadipura, 2001 dalam Darmayasa, 2008). Proses pengolahan biologi merupakan proses pengolahan air limbah dengan memanfaatkan aktivitas pertumbuhan mikroorganisme yang berkontak dengan air limbah, sehingga mikroorganisme tersebut dapat menggunakan bahan organik pencemar yang ada sebagai bahan makanan dalam kondisi lingkungan tertentu dan mendegradasinya menjadi bentuk yang lebih sederhana (Metcalf dan Eddy, 2004 dalam Griswidia, 2008). Mikroorganisme mempunyai kemampuan dalam memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak yang menyusun pakan yang diberikan. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroba untuk memecah ikatan tersebut (Feliatra *et.al.*, 2004).

Menurut Winarno (1993) dalam Pirzada (2009), beberapa contoh bakteri proteolitik (mikroba penghasil enzim protease) adalah dari *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cerus*, *Clostridium*, *Botulinum*, *Clostridium nigrificans*.

Menurut Alexander (1977) dalam Anonymous (1997) *B. subtilis* menghasilkan protease dan berbagai enzim lain yang memungkinkan untuk menurunkan berbagai substrat alam dan berkontribusi pada siklus nutrisi. Oleh karena itu, untuk mengatasi permasalahan limbah organik berupa protein yang terkandung dalam tambak udang dilakukan penelitian tentang potensi bakteri *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang.

1.2 Perumusan Masalah

Saat ini kegiatan budidaya intensif digalakkan untuk memenuhi permintaan pasar yang tinggi. Penerapan teknologi budidaya secara intensif ini menyebabkan permasalahan diantaranya menurunnya kualitas air karena adanya limbah organik yang terakumulasi dalam perairan yang berasal dari sisa pakan, hasil metabolisme dan bangkai organisme.

Menurut Garno (2004) dalam Badjoeri dan Tri (2008), sekitar 90% protein yang terdapat pada tambak berasal dari pelet, hanya 22% yang dikonversi menjadi biomassa udang dan 7% dimanfaatkan oleh aktivitas mikroorganisme, sedangkan 14% terakumulasi dalam sedimen dan 57% tersuspensi pada air tambak.

B. subtilis merupakan bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler yang dapat mendegradasi senyawa protein ke dalam bentuk yang lebih sederhana. Bakteri ini diharapkan dapat mendegradasi protein yang terkandung dalam limbah cair tambak udang. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan percobaan tentang potensi bakteri *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi dan kepadatan terbaik bakteri *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi bakteri *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang sehingga dapat digunakan dalam kegiatan budidaya sebagai salah satu cara untuk mengatasi permasalahan akumulasi limbah organik di tambak.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga bakteri *B. subtilis* tidak mampu mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang.

H_1 : Diduga bakteri *B. subtilis* mampu mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Kimia Lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 2-10 Februari 2011.

2. TINJAUAN PUSTAKA

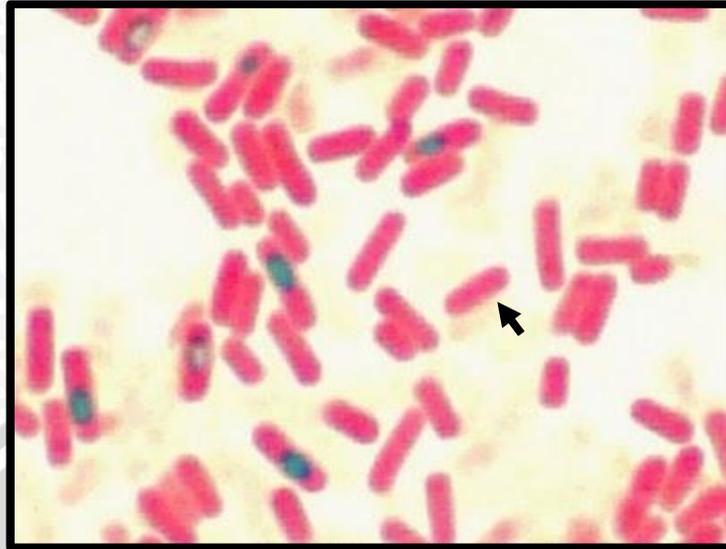
2.1 Bakteri *B. subtilis*

B. subtilis adalah bakteri yang dapat ditemukan di mana-mana, umumnya terdapat di air, tanah, udara, dan pada residu tanaman yang membusuk. Bakteri ini menghasilkan endospora yang memungkinkan untuk bertahan dalam kondisi ekstrim panas dan kering. *B. subtilis* menghasilkan protease dan berbagai enzim lain yang memungkinkan untuk menurunkan berbagai substrat alam dan berkontribusi pada siklus nutrisi (Alexander, 1977 dalam Anonymous, 1997).

Adapun klasifikasi *B. subtilis* (Fajriana, 2008) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Order	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: Bacillus
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>

B. subtilis dicirikan sebagai bakteri gram positif yang berbentuk batang, bersel satu, berukuran $(0,5-2,5) \times (1,0-1,2) \mu\text{m}$, bersifat aerob atau anaerob fakultatif, dan katalase positif. *B. subtilis* bertahan pada suhu $5-75^{\circ}\text{C}$ dengan pH antara 2-8 (Alif, 2010). Menurut Fajriana (2008), *B. subtilis* (Gambar 1) telah berevolusi sehingga dapat hidup walaupun di bawah kondisi keras dan lebih cepat mendapatkan perlindungan terhadap stres situasi seperti kondisi pH rendah (asam) dan panas. *B. subtilis* tumbuh optimum di berbagai mesofilik pada suhu berkisar $25-35^{\circ}\text{C}$.



Gambar 1. Bakteri *B. subtilis* (tanda panah)
(<http://ruthphyn.blogspot.com>)

Banyak dari *Bacillus* dapat menurunkan polimer seperti protein, pati, dan pektin. Spesies *Bacillus* sangat cocok untuk memproduksi enzim, kecuali *B. cereus* dan *B. anthracis*. Mikroba jenis *Bacillus* tidak menghasilkan toksin dan mudah ditumbuhkan (Schaechter, 2006 dalam Fajriana, 2008). Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolisme, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protease membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri (Doi *et. al.*, 1992 dalam Susanti, 2002).

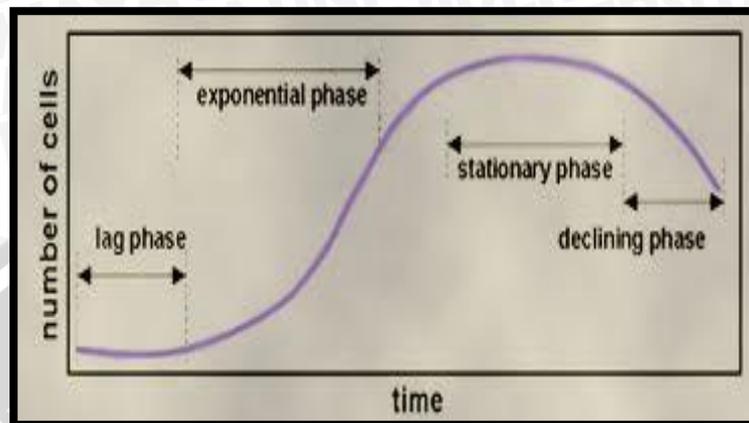
Aplikasi bakteri ini dalam industri cukup banyak. *B. subtilis* merupakan salah satu yang paling banyak digunakan untuk produksi enzim bahan kimia khusus. Aplikasi industri termasuk produksi amilase dan protease. Bakteri ini dapat memainkan peran dalam pengamanan limbah. Kegunaan lain bakteri ini cukup banyak dengan berkembangnya teknologi (Setiyono, 2008).

2.2 Pertumbuhan Bakteri

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain biasanya mengacu pada perubahan total massa sel, bukan perubahan individu organisme (Pelczar dan Chan, 2005). Menurut Volk dan Wheeler (1993) pertumbuhan mikroba dalam suatu medium mengalami fase-fase yang berbeda-beda, berturut-turut (Gambar 2) antara lain sebagai berikut:

- Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya.
- Fase eksponensial merupakan fase dimana sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrisi dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Ketika derajat pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan jumlah sel yang hidup.
- Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan bakteri akan tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel.

- Fase kematian ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri (<http://ruthphyn.blogspot.com>)

Menurut Tarigan (1988) dalam Pirzada (2009) kebutuhan mikroorganisme untuk pertumbuhan dapat dibedakan menjadi dua kategori, yaitu kebutuhan fisik dan kebutuhan kimiawi atau kimia. Aspek-aspek fisik dapat mencakup suhu, pH dan tekanan osmotik. Sedangkan kebutuhan kimia meliputi air, karbon, nitrogen, oksigen dan mineral.

Untuk dapat tumbuh dan berfungsi secara normal diperlukan kondisi lingkungan yang sesuai, seperti keberadaan air, pH, oksigen, dan suhu yang juga mempengaruhi pertumbuhan mikroba. Apabila kondisi lingkungan tidak sesuai, maka mikroba pun tidak dapat hidup (Kusnandar *et. al*, 2008).

2.3 Limbah Organik

Limbah organik memiliki definisi berbeda yang penggunaannya dapat disesuaikan dengan tujuan penggolongannya. Berdasarkan pengertian secara kimiawi limbah organik merupakan segala limbah yang mengandung unsur karbon (C), sehingga meliputi limbah dari makhluk hidup (misalnya kotoran hewan dan manusia, sisa makanan, dan sisa-sisa tumbuhan mati). Namun, secara

teknis sebagian besar orang mendefinisikan limbah organik sebagai limbah yang hanya berasal dari makhluk hidup (alami) dan sifatnya mudah busuk. Limbah organik yang berasal dari makhluk hidup mudah membusuk karena pada makhluk hidup terdapat unsur karbon (C) sehingga dapat dijadikan sumber nutrisi bagi mikroorganisme, seperti bakteri dan jamur (Abidin, 2010).

Pencemaran yang terjadi pada usaha pertambakan (akuakultur) sebenarnya tidak selalu datang dari lingkungan di luar akuakultur tetapi juga dari usaha akuakultur itu sendiri yaitu dari sisa pakan, kotoran biota atau pun pestisida yang biasanya digunakan petani tambak sebelum memulai budidaya (Fahmi, 2005).

Menurut Boyd (1982) dalam Isdarmawan (2005), pada tambak semi-intensif dan tambak intensif sejalan dengan masa pemeliharaan jumlah bahan organik yang berasal dari kotoran sisa pakan dan jasad mati dapat terakumulasi di dasar tambak dari waktu ke waktu. Menumpuknya bahan organik secara berlebihan di dasar tambak (lumpur) akan menurunkan daya dukung lingkungan tambak (*carrying capacity*) dan dapat mengakibatkan terbentuknya kondisi anaerobik pada dasar tambak akibat aktivitas mikroorganisme, sehingga membahayakan kehidupan hewan-hewan makrobenthos dan udang yang hidup di dasar tambak.

Dampak negatif limbah organik menurut Supono (2009) antara lain sebagai berikut:

- Dapat mengotori dasar tambak atau mempersempit *feeding area*
- Proses penguraian limbah organik membutuhkan oksigen
- Bahan organik menghasilkan gas-gas beracun seperti NH_3 , H_2S dan NO_2
- Menyuburkan plankton yang merugikan seperti blue green algae (BGA)

- Merangsang berkembangnya organisme patogen seperti jamur, protozoa dan vibrio

Kualitas air cepat mengalami penurunan bila sisa pakan yang terimbun sangat besar. Bila penimbunan pakan di dasar tambak tidak segera diantisipasi, maka sebagian bahan organik akan terjadi proses dekomposisi. Dalam proses dekomposisi akan membutuhkan sejumlah besar oksigen. Kebutuhan ini semakin besar dengan makin meningkatnya kandungan limbah dari bahan organik tersebut. Kualitas air yang buruk akibat tertimbunnya sisa pakan di dasar tambak merupakan kondisi yang “baik” untuk berkembangnya penyakit. Bila tidak ada upaya untuk mempercepat dekomposisi sisa pakan atau mengeluarkan dari tambak/kolam, maka mudah sekali udang terserang penyakit (Kordi, 2010).

Secara alamiah sistem perairan (tambak udang) mampu melakukan proses *self purification*, namun apabila kandungan senyawa organik sudah melampaui batas kemampuan *self purification*, maka akumulasi bahan organik dan pembentukan senyawa-senyawa toksik di perairan tidak dapat dikendalikan, sehingga menyebabkan menurunnya kondisi kualitas air bahkan kematian udang yang dibudidayakan (Badjoeri *et. al.*, 2006 dalam Badjoeri dan Tri, 2008).

Cara biologi dapat menurunkan kadar zat organik terlarut dengan memanfaatkan mikroorganisme atau tumbuhan air. Pada dasarnya cara biologi adalah pemutusan molekul kompleks menjadi molekul sederhana. Proses ini sangat peka terhadap faktor suhu, pH, oksigen terlarut (DO) dan zat-zat inhibitor (Husin, 2008). Bahan organik terlarut dan tersuspensi terutama mengandung rantai karbon dan tersedia untuk mikroba dan alga. Akan sangat efektif bila mikroba tersebut mempunyai kapabilitas enzim yang baik (Anthony dan Philip, 2006).

2.4 Parameter Pengolahan Limbah Cair Tambak Udang

2.4.1 Protein

Protein merupakan senyawa organik kompleks, tersusun atas banyak asam amino yang mengandung unsur-unsur C (karbon), H (hidrogen), O (oksigen), dan N (nitrogen). Molekul protein juga mengandung sulfur. Protein sangat penting bagi tubuh, karena zat ini mempunyai fungsi sebagai bahan-bahan dalam tubuh serta zat pembangun (Kordi, 2010).

Protein merupakan bagian yang penting dari makhluk hidup, termasuk di dalamnya tanaman, dan hewan bersel satu. Protein mengandung karbon, hidrogen, dan oksigen. Protein merupakan penyebab utama terjadinya bau, sebabnya ialah struktur protein sangat kompleks dan tidak stabil serta mudah terurai menjadi bahan kimia lain oleh proses dekomposisi (Sugiharto, 1985 *dalam* Griswida, 2008).

2.4.2 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor pengendali kecepatan reaksi biokimia karena dapat menentukan laju metabolisme udang dan organisme perairan lainnya (Isdarmawan, 2005). Suhu yang rendah akan mengakibatkan sistem metabolisme menjadi lebih rendah sebaliknya pada suhu tinggi akan memacu metabolisme menjadi lebih cepat (Liu, 1989 *dalam* Isdarmawan, 2005).

Menurut Budiyanto (2010), masing-masing mikroba memerlukan suhu tertentu untuk hidupnya. Suhu pertumbuhan suatu mikroba dapat di bedakan dalam suhu minimum, optimum dan maksimum. Berdasarkan atas perbedaan suhu pertumbuhannya, dapat dibedakan mikroba yang psikrofil (0-30°C), mesofil (25-40°C), dan termofil (50°C atau lebih).

2.4.3 pH

Kebanyakan mikroorganisme tumbuh baik pada pH sekitar 7 (6,6-7,5), dan hanya beberapa yang dapat tumbuh di bawah pH 4. Bakteri mempunyai kisaran pH pertumbuhan yang sempit dibandingkan dengan kapang dan khamir. Sebagai contoh, kebanyakan bakteri tidak dapat tumbuh pada pH dibawah 4 dan di atas 8, sedangkan kapang mempunyai kisaran pH pertumbuhan 1,5 sampai 8-8,5 (Fardiaz, 1992).

Menurut Budiyanto (2010), berdasarkan atas perbedaan daerah pH untuk pertumbuhannya, dapat dibedakan mikroba yang asidofil, mesofil (neutrofil) dan alkalofil. pH optimum pertumbuhan bagi kebanyakan bakteri antara 6,5 dan 7,5, namun beberapa spesies dapat tumbuh dalam keadaan sangat masam atau sangat alkali. Bila bakteri dikultivasi di dalam suatu medium yang mula-mula disesuaikan pHnya misal 7, maka mungkin pH ini akan berubah sebagai akibat adanya senyawa-senyawa asam atau basa yang dihasilkan selama pertumbuhannya. Pergeseran pH ini dapat sedemikian besar sehingga menghambat pertumbuhan seterusnya organisme itu.

2.4.4 Oksigen Terlarut/Dissolved Oxygen (DO)

Menurut Kordi (2010), dilihat dari jumlahnya, oksigen terlarut adalah satu jenis gas terlarut dalam air dengan jumlah yang sangat banyak, yaitu menempati urutan kedua setelah nitrogen. Namun dilihat dari segi kepentingan untuk budidaya perairan, termasuk udang, oksigen menempati urutan teratas. Rendahnya kadar oksigen dapat berpengaruh terhadap fungsi biologis dan lambatnya pertumbuhan, bahkan dapat mengakibatkan kematian. Di tambak, oksigen juga berfungsi sebagai pengoksidasi bahan organik yang ada di dasar tambak. Jumlah oksigen yang dibutuhkan untuk pernafasan udang tergantung

ukuran, suhu dan tingkat aktivitasnya dan batas minimumnya adalah 3 ppm atau 3 mg/l.

Penurunan kualitas air akibat pencemaran dapat dilihat dengan mengamati beberapa parameter kimia, seperti oksigen terlarut. Kadar oksigen terlarut dalam suatu perairan diperlukan oleh organisme untuk pernafasan dan oksidasi bahan-bahan organik. Sumber utama oksigen dalam suatu perairan berasal dari suatu difusi udara dan hasil fotosintesis organisme yang hidup di dalam perairan tersebut (Nybakken, 1988).

Oksigen sangat diperlukan oleh bakteri untuk dapat menguraikan buangan sisa pakan dan nitrogen menjadi senyawa yang bermanfaat. Namun pada kondisi oksigen yang terbatas, bakteri pengurai akan menghasilkan senyawa pengurai seperti amonia dan nitrit yang bersifat racun buat ikan dan udang (Hakim, 2008).

2.5 Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler. Mikroorganisme melalui suatu sistem enzim, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Pirzada, 2009).

Bakteri proteolitik kebanyakan memecah protein menjadi peptida dan asam-asam amino, dan menggunakannya untuk sumber energi atau untuk sintesis protein kembali (Fardiaz, 2000). Penguraian protein dengan mikroorganisme dimulai dengan hidrolisis protein secara enzimatik menjadi asam amino (Volk dan Wheeler, 1993).

Menurut Fardiaz (2000) reaksi penguraian protein dapat dibuat ikhtisar sebagai berikut:



Menurut Stryer (1995) dalam Kadarwati (2008), klasifikasi asam amino standar adalah menurut polaritas samping (gugus R), karena bentuk protein melipat pada konformasi alam, sebagian besar cenderung merespon pergerakan sisi rantai-rantai hidrofobiknya kontak dengan air dan untuk melompat rantai samping hidrofilik. Berdasarkan hal tersebut, asam amino dikelompokkan dalam gugus R non polar, R rantai samping tidak bermuatan dan rantai samping bermuatan.

Menurut Rao *et. al.* (1998) dalam Pakpahan (2009), berdasarkan sistem klasifikasi IUBMB (*Nomenclature Commite of International Union of Biochemistry and Moleculer Biology*), enzim-enzim proteolitik mikroba dapat dibedakan atas 2 kelompok besar, yaitu:

- a. Golongan endopeptidase
- b. Golongan eksopeptidase

Menurut Ward (1989) dalam Pirzada (2009), eksopeptidase memotong ikatan peptida mulai dari terminal atau karboksi bebas pada ikatan peptida substrat dan dibagi dalam beberapa subklas, bergantung pada bagian yang dipotong pada substrat polipeptida dan terminal enzim bekerja. Eksopeptidase menghidrolisis protein dari ujung N terminal (aminopeptidase), C terminal (karboksipeptidase), ataupun spesifik pada dipeptida (hidrolase dipeptidase).

Protease diklasifikasikan ke dalam 3 kategori, yaitu protease asam, netral dan alkalin (serin). Protease asam memiliki pH optimum berkisar 2-5 (Mukhtar dan Ikram, 2007). Protease netral dihasilkan bakteri pada kondisi pH netral, yaitu 7. Beberapa tanaman dan bakteri menghasilkan protease jenis ini. Protease yang optimum dihasilkan pada pH 8-11 dikelompokkan ke dalam protease alkalin.

Berdasarkan kebutuhannya terhadap oksigen, bakteri proteolitik dapat dibedakan atas beberapa kelompok yaitu bakteri aerob atau anaerob fakultatif yang tidak membentuk spora misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*. Bakteri aerob atau anaerob fakultatif yang membentuk spora misalnya *Bacillus*, sedangkan bakteri anaerob pembentuk spora misalnya *Clostridium* (Prayogo, 2009).

2.6 Bioremediasi

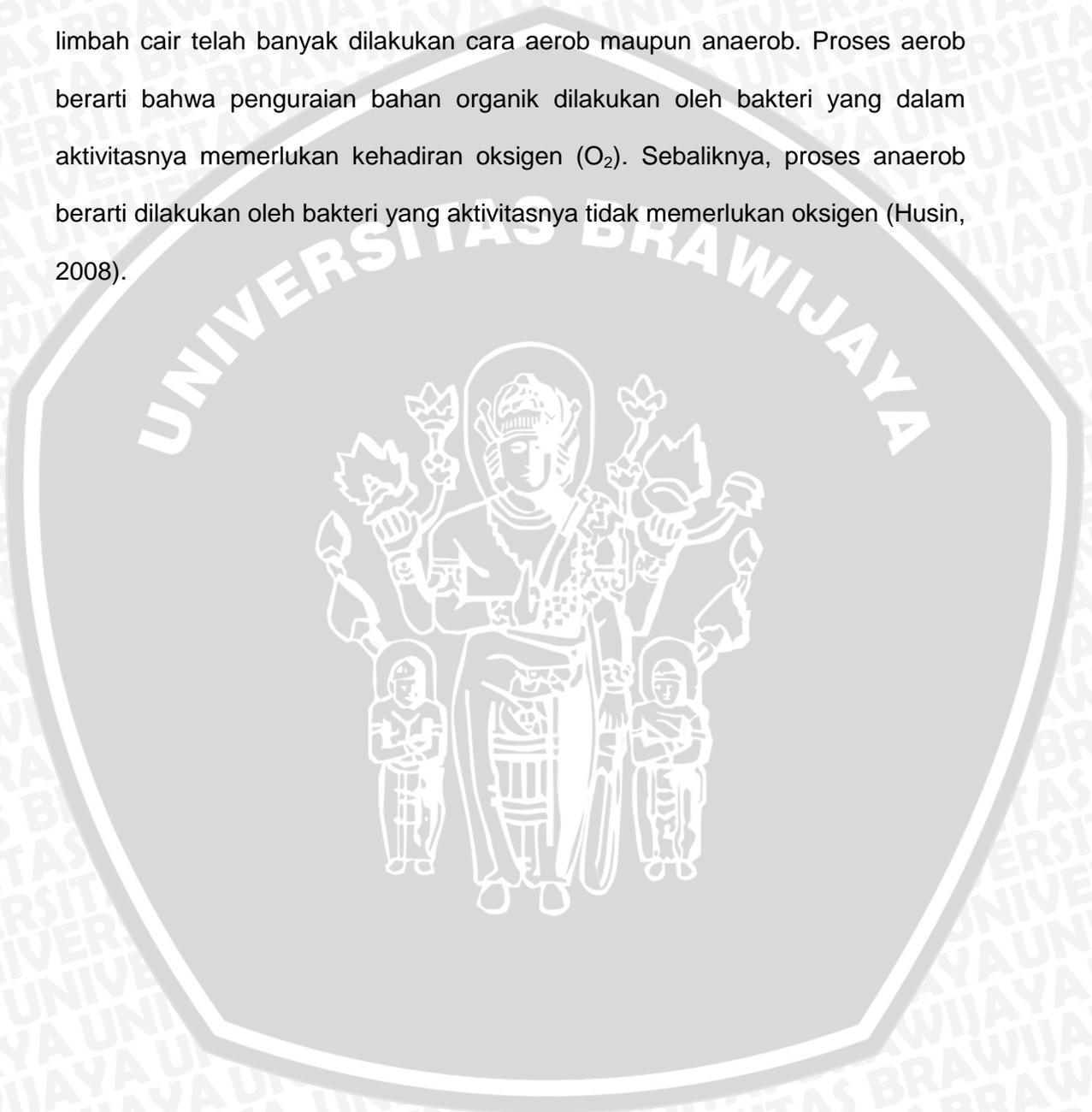
Bioremediasi merupakan bagian dari bioteknologi lingkungan yang memanfaatkan proses alami biodegradasi dengan menggunakan aktivitas mikroorganisme yang dapat memulihkan tanah, air dan sedimen dari kontaminasi terutama senyawa organik. Ide yang mendasari bioremediasi adalah semua mikroorganisme mampu mengonsumsi substrat dari alam untuk pertumbuhan dan metabolismenya. Bakteri, protista dan jamur sangat baik digunakan untuk mendegradasi molekul kompleks dengan memasukkan bahan tersebut ke dalam metabolismenya. Kemampuan untuk mendegradasi tergantung pada enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme (Yani, *et. al.*, 2003 dalam Herdiyantoro, 2005).

Bioremediator yang baik harus mengandung mikroba yang mampu membersihkan limbah berkarbon secara efektif dari air. Anggota genus *Bacillus*, seperti *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. Coagulans* dan dari genus *Phenibacillus*, seperti *P. polymyxa* merupakan contoh untuk bioremediasi detritus organik. Jika strain *Bacillus* tertentu ditambahkan ke air dalam jumlah yang cukup maka dapat berpengaruh. Bakteri ini akan bersaing dengan bakteri flora jika tersedia bahan organik, seperti sisa pakan dan feces udang (Sharma, 1999 dalam Anthony dan Philip, 2006).

Menurut Supono (2009), pengolahan limbah secara biodegradasi merupakan penguraian/perombakan secara biologis limbah dalam tambak menjadi senyawa-senyawa yang tidak berbahaya bagi udang dan tidak

menyebabkan turunnya kualitas air. Biodegradasi ini ditentukan oleh faktor biotik (komposisi dan sifat bakteri) dan faktor abiotik (fisika dan kimia air, serta bahan/komposisi limbah).

Upaya untuk menurunkan kandungan bahan organik kompleks dalam limbah cair telah banyak dilakukan cara aerob maupun anaerob. Proses aerob berarti bahwa penguraian bahan organik dilakukan oleh bakteri yang dalam aktivitasnya memerlukan kehadiran oksigen (O_2). Sebaliknya, proses anaerob berarti dilakukan oleh bakteri yang aktivitasnya tidak memerlukan oksigen (Husin, 2008).



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- Limbah cair tambak udang
- Biakan bakteri *B. subtilis*
- Media padat NA (*Nutrient Agar*)
- Media cair NB (*Nutrient Broth*)
- Ungu kristal
- Lugol
- Safranin
- Akuades
- Tablet Kjeldahl
- H₂SO₄
- Batu didih
- Larutan standar McFarland 10 (BrCl₂ + H₂SO₄)
- Spiritus
- Kertas koran
- Tisu
- Air
- Benang
- NaCl
- NaOH 30%
- KNa tartrat
- Kertas saring
- Gelas wool
- Larutan Nessler
- Alkohol 96%

3.1.2 Alat

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain toples plastik ukuran 5 liter, toples plastik ukuran 300 ml, botol plastik ukuran 600 ml, botol sampel 300 ml, *cool box*, falcon, termometer, pH meter, DO meter, pipet volume, bola hisap, autoklaf, kompor listrik, nampan, *shaker waterbath*, sentrifugal dingin, vorteks, bola hisap, inkubator, cawan petri, kaca objek, jarum ose, mikroskop, bunsen, labu kjeldahl, tabung reaksi, erlenmeyer, timbangan analitik, labu ukur, spatula, kuvet spektro, corong, spektrofotometer, lemari asam dan kompor gas.

Adapun gambar peralatan umum laboratorium dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan di Lampiran 1.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen yaitu suatu metode yang mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan klausul antara variabel yang diselediki. Tujuan eksperimen ini adalah untuk menemukan hubungan sebab akibat antar variabel. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian dan selalu menggunakan kontrol (Nazir, 1983).

Ada dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas ialah variabel yang diperkirakan menjadi penyebab munculnya atau berubahnya variabel terikat. Sedangkan variabel terikat ialah variabel yang terjadi atau berubah karena mendapat pengaruh atau disebabkan oleh variabel bebas (Kartika, 2008). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penambahan bakteri *B. subtilis* dengan kepadatan yang berbeda, sedangkan variabel terikat adalah jumlah penurunan kandungan protein yang dapat didegradasi oleh bakteri *B. subtilis*.

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Gasperz (1991) dalam Mariyanti (2009), RAL yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium.

Adapun dalam penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan.

Dalam penelitian ini, sebagai perlakuan adalah konsentrasi bakteri *B. subtilis* sebagai berikut:

Perlakuan A : Pemberian bakteri *B. subtilis* dengan kepadatan 10^4 cfu/ml.

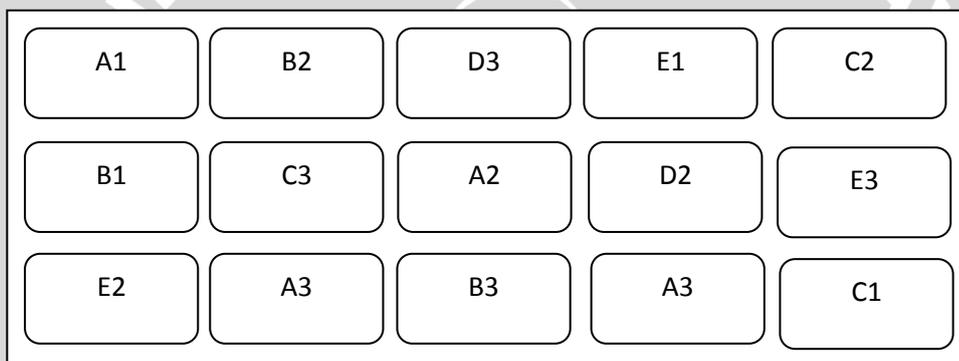
Perlakuan B : Pemberian bakteri *B. subtilis* dengan kepadatan 10^5 cfu/ml.

Perlakuan C : Pemberian bakteri *B. subtilis* dengan kepadatan 10^6 cfu/ml.

Perlakuan D : Pemberian bakteri *B. subtilis* dengan kepadatan 10^7 cfu/ml.

Perlakuan E : Pemberian bakteri *B. subtilis* dengan kepadatan 10^8 cfu/ml.

Masing-masing perlakuan di ulang sebanyak 3 kali dan ditempatkan secara acak. Denah percobaan dapat dilihat pada Gambar 3 berikut:



Gambar 3. Denah Rancangan Penelitian

Keterangan :

A, B, C, D, E
1, 2, 3

= Perlakuan
= Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau kertas koran, kemudian dibungkus dengan menggunakan benang, tuangkan secukupnya air ke dalam autoklaf. Kemudian alat yang telah dibungkus kertas perkamen dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang. Kompor pemanas dinyalakan,

setelah beberapa saat monometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan kran udara dibuka hingga monometer menunjukkan angka 1 atm kembali. Ketika sampai suhu 121° C dan monometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit. Kompor dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan. Ditunggu beberapa saat sampai termometer dan monometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu penutup autoklaf dibuka secara silang. Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil. Alat yang telah disterilkan disimpan dalam inkubator, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin (Dwijoseputro, 1989).

3.3.2 Pembuatan Media

3.3.2.1 Media *Nutrient Agar* (NA)

Media padat yang digunakan dalam penelitian ini adalah NA dengan komposisi nutrien yang dapat dilihat pada Lampiran 2. Media NA ditimbang sebanyak 2,8 gram dilarutkan dengan 100 ml akuades dalam erlenmeyer. Untuk menghomogenkan larutan dilakukan pemanasan dan pengadukan di atas kompor listrik hingga mendidih. NA dituang ke dalam cawan petri sebanyak 15-25 ml secara aseptik, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah agar mengeras dilakukan uji sterilisasi dengan menginkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian media siap digunakan (Pirzada, 2009).

3.3.2.2 Media *Nutrient Broth* (NB)

Media NB digunakan dalam perbanyakan bakteri *B. subtilis*. Adapun komposisi media NB dapat dilihat pada Lampiran 2. Dalam pembuatan media NB mula-mula diambil sebanyak 50 ml media NB dengan menggunakan pipet secara aseptik, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya media

disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, dilakukan uji sterilisasi dengan menginkubasi media pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian media siap digunakan (Pirzada, 2009).

3.3.3 Pembuatan Biakan Bakteri *B. subtilis*

Cawan petri yang berisi media NA yang telah disterilkan disiapkan terlebih dahulu. Selanjutnya, isolat bakteri yang diambil dari biakan murni *B. subtilis* digoreskan pada cawan petri menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipanaskan (hingga berpijar) di atas api bunsen. Setelah itu cawan petri ditutup rapat dan dipanaskan di atas bunsen pada bagian tepinya. Media yang telah terisi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Pirzada, 2009). Skema pembuatan biakan bakteri *B. subtilis* dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.3.4 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi, karena merupakan tahapan penting dalam identifikasi. Bakteri yang sudah ditumbuhkan pada media padat, selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Tahapan pewarnaan gram diawali dengan menyemprot kaca objek dengan alkohol, kemudian lap dengan tisu dan dibakar pada api bunsen untuk menghilangkan sisa alkohol. Jarum ose dibakar sampai berpijar dan didiamkan sebentar sampai dingin. Biakan bakteri yang berasal dari cawan petri diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek. Selanjutnya dilakukan fiksasi sampel bakteri pada api bunsen dengan jarak 20 cm dari api supaya tidak terlalu panas sehingga tidak merusak bentuk sel bakteri. Tambahkan setetes pewarnaan kristal violet dan diamkan selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Tetesi kembali dengan lugol dan diamkan selama 1 menit. Bilas dengan alkohol selama 30 detik,

kemudian dibilas dengan air mengalir. Warnai dengan safranin selama 15 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir. Diamkan dan keringkan untuk selanjutnya dapat diamati pada mikroskop (Viramedika, 2008). Skema pewarnaan gram dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.3.5 Perbanyakkan Bakteri *B. subtilis*

Diambil koloni bakteri *B. subtilis* pada media NA secara aseptik menggunakan ose, selanjutnya ditumbuhkan pada media cair NB sebanyak 100 ml yang sudah disterilkan. Setelah itu dilakukan penggoyangan pada shaker waterbath dengan suhu 37°C selama 24 jam (Pirzada, 2009). Skema perbanyakkan bakteri dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.3.6 Pengenceran Bakteri

Hasil perbanyakkan bakteri pada media NB diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam falcon. Selanjutnya, bakteri dalam falcon dimasukkan ke dalam sentrifugal dingin dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Bagian supernatan dibuang dan disisakan bagian peletnya. Pelet ditambahkan dengan larutan fisiologis (NaCl) sedikit demi sedikit, kemudian divorteks. Penentuan kepadatan bakteri dilakukan dengan metode McFarland, yaitu membandingkan kekeruhan antara suspensi bakteri dengan standar McFarland. Standar McFarland yang digunakan dalam penelitian ini adalah McFarland 10 yang terdiri dari 1 ml barium klorida (BaCl_2) dan 9 ml asam sulfat (H_2SO_4). Jika warna suspensi bakteri pada NaCl sama dengan larutan standar McFarland 10, maka kepadatan bakteri setara dengan 30×10^8 cfu/ml atau $3,0 \times 10^9$ cfu/ml. Untuk mendapatkan *B. subtilis* dengan kepadatan 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, dan 10^8 cfu/ml, maka dilakukan pengenceran berseri (Lampiran 6).

3.3.7 Penambahan Bakteri *B. subtilis*

Jumlah sampel limbah tambak udang untuk setiap perlakuan sebanyak 200 ml yang ditempatkan dalam toples. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan (2010), jumlah penambahan bakteri untuk mendegradasi limbah organik yaitu sebanyak 6 ml per 1.000 ml sampel limbah cair. Oleh karena itu, pada penelitian ini bakteri yang ditambahkan sebanyak 1,2 ml ke dalam 200 ml sampel. Penambahan ini dilakukan dengan menggunakan pipet volume dan bola hisap, kemudian toples ditutup. Setelah 48 jam dilakukan uji protein terhadap limbah cair. Suhartono (1992) dalam Anggraini (2003) menyebutkan bahwa sintesis protease ekstraseluler biasanya terjadi pada fase stasioner. Menurut Gusmawati *et. al.* (2010), *B. subtilis* sudah memasuki fase stasioner pada jam ke-48.

3.3.8 Pengambilan Limbah Cair Tambak

Limbah cair yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari tambak pembesaran udang vaname (*Liptonemus vannamei*) secara intensif di UD. King's Prawn, Tuban, Propinsi Jawa Timur. Sampel yang diambil berasal dari 5 titik, antara lain dari tiap sudut tambak (4 titik) dan 1 sampel diambil dari bagian tengah tambak sehingga diharapkan dapat mewakili kondisi perairan (Prayogo, 2009). Sampel diambil dari dekat dasar perairan (substrat) dengan menggunakan botol plastik steril ukuran 600 ml untuk masing-masing titik, kemudian botol ditutup di dalam perairan. Selama perjalanan, sampel dalam botol dimasukkan ke dalam *cool box* untuk menekan aktivitas biologi dalam sampel. Kelima sampel tersebut kemudian disatukan dalam toples ukuran 5 liter dan dihomogenkan.

3.3.9 Uji Beberapa Parameter

3.3.9.1 Protein

Protein diukur menggunakan metode Gravimetri (Kurniawan, 2010) dengan prosedur kerja sebagai berikut:

- Dipipet sampel ± 5 ml dimasukkan ke dalam labu kjeldahl.
- Ditambahkan:
 - 1 gr garam campuran (tablet kjeldahl)
 - 10 ml H_2SO_4 pekat
 - 2 butir batu didih
- Didestruksikan sampai hijau jernih (± 1 jam) lalu didinginkan.
- Dinetralkan dengan NaOH 30% hingga terbentuk endapan.
- Disaring dan ditambahkan akuades hingga mencapai 250 ml pada erlenmeyer.
- Diambil 5 ml larutan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi + 0,5 ml larutan KNa tartrat (dikocok) + 0,5 ml larutan Nessler (dikocok) + 0,5 ml akuades (dikocok), biarkan selama ± 10 menit.
- Dibaca dengan spektrometri pada panjang gelombang 490 nm catat absorbansinya.

Cara pembuatan reagen:

1. Larutan KNa tartrat

- KNa tartrat 500 gr (CaH_4O_6 , KNa 4 H_2O) + akuades yang dipanaskan (1 : 1) lalu didinginkan.
- Ditambah 50 ml larutan Nessler.
- Dibiarkan selama 2 hari dan sesudah itu disaring.

2. Larutan Nessler

- 5 gr KI dalam air + $HgCl_2$ dalam air (1 : 20) sampai terjadi endapan merah.

- Disaring dengan gelas wol + 15 gr NaOH dalam 30 ml air.
- Ditambahkan air sampai 100 ml biarkan mengendap.

$$\text{Protein} = \frac{(\text{absorbansi N} \times 50) \times 6,25}{0,0586}$$

3.3.9.2 Suhu

Suhu diukur dengan menggunakan termometer. Adapun cara pengukurannya adalah sebagai berikut:

- Termometer dicelupkan ke dalam sampel dengan memegang bagian tali pada termometer (agar tidak terjadi kontaminasi dari suhu tubuh).
- Setelah ± 5 menit dilakukan pembacaan pada termometer yang ditunjukkan oleh air raksa.
- Diperoleh nilai suhu sampel dalam satuan $^{\circ}\text{C}$.

3.3.9.3 pH

Menurut Kurniawan (2010), pH diukur menggunakan pH meter dengan prosedur pengukuran sebagai berikut:

- *Probe* disambungkan terlebih dahulu sebelum digunakan.
- *Probe* dimasukkan kedalam air sampel yang diukur.
- Tombol *on* ditekan, ditunggu sampai muncul angka pada layar pH meter.
- Angka yang muncul ditunggu sampai posisi stabil.
- Setelah selesai, tombol *off* ditekan untuk mematikan alat.
- *Probe* dicuci dengan akuades dan ditutup.

3.3.9.4 DO

Menurut Kurniawan (2010) DO diukur dengan metode elektrometrik menggunakan DO meter dengan prosedur pengukuran sebagai berikut:

- *Probe* disambungkan sebelum mengoperasikan DO meter.

- *Probe* dimasukkan ke akuades untuk kalibrasi.
- *Probe* dimasukkan ke media uji.
- Tombol *on* ditekan pada layar akan muncul *cond* ditunggu beberapa detik, maka pada layar akan muncul angka-angka.
- *cal* ditekan 2 kali, ditekan *range* maka alat akan mengukur kadar DO terlarut serta dicatat hasilnya.
- Setelah selesai, tombol *off* ditekan untuk mematikan alat.
- *Probe* dicuci dengan akuades, ditutup.

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

Parameter uji utama dalam penelitian ini menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran protein pada limbah cair tambak udang yang telah diberi perlakuan penambahan *B. subtilis* dengan kepadatan yang berbeda.

3.4.2 Parameter Penunjang

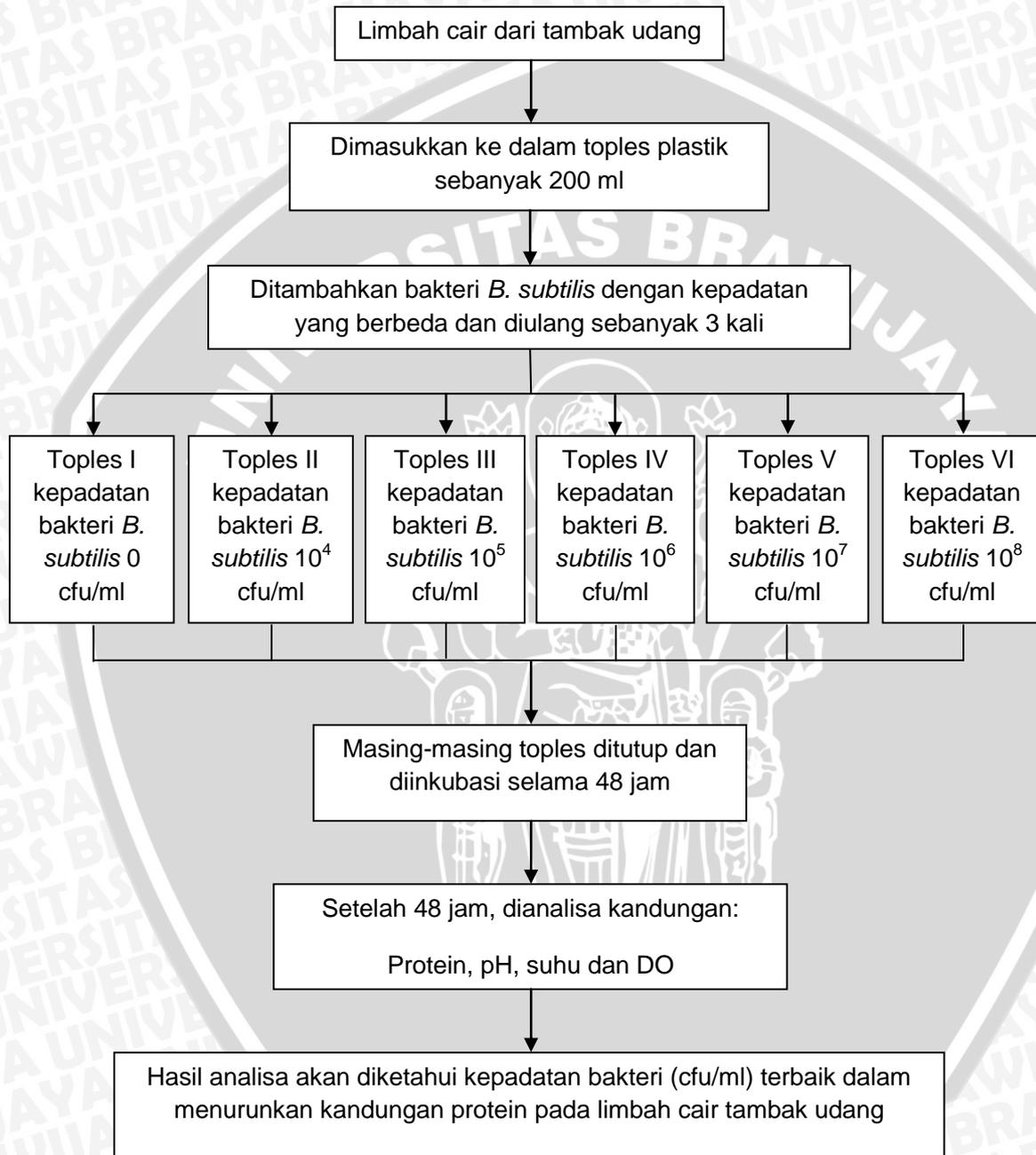
Parameter uji penunjang dalam penelitian ini adalah nilai pH, suhu dan DO pada limbah organik yang diberi perlakuan, dimana pH dan suhu merupakan faktor lingkungan yang mempengaruhi kehidupan bakteri.

3.5 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu analisa keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%).

3.6 Alur Kerangka Operasional Penelitian

Adapun alur kerangka operasional penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.

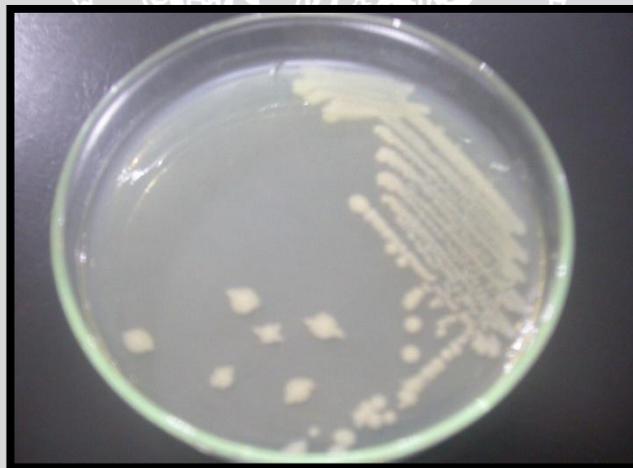


Gambar 4. Alur Kerangka Operasional

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Kultur *B. subtilis*

Dalam penelitian ini bakteri *B. subtilis* yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri murni dikultur dengan menggunakan media padat *Nutrient Agar* (NA) yang telah disterilisasi (Gambar 5). Menurut Codemo (2011), NA digunakan untuk pertumbuhan mayoritas dari mikroorganisme yang tidak selektif. NA juga merupakan salah satu media yang umum digunakan dalam prosedur bakteriologi seperti uji bakteri dari air, produk pangan, untuk membawa stok kultur, untuk pertumbuhan sampel pada uji bakteri, dan untuk mengisolasi organisme dalam kultur murni. Ekstrak daging sapi dan pepton yang terkandung dalam media NA baik untuk pertumbuhan *B. subtilis*.

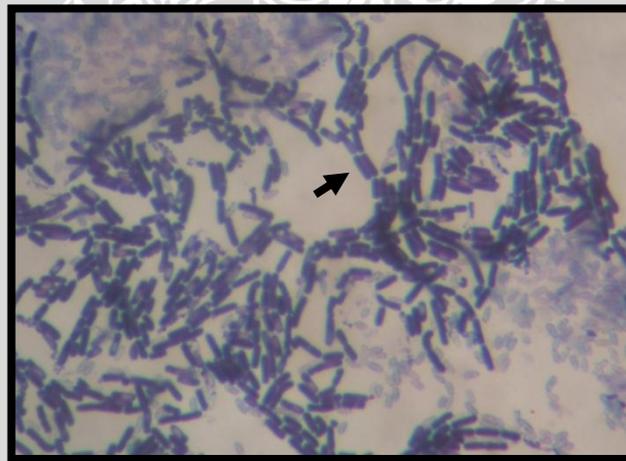


Gambar 5. Kultur Bakteri *B. subtilis*

Setelah didapat isolat pada media NA, diketahui bahwa *B. subtilis* memiliki permukaan koloni dimana pada bagian tepinya tidak rata. Warna dari koloni *B. subtilis* adalah putih susu atau krem. Koloni *B. subtilis* memiliki bentuk oval yang berukuran 8-15 mm dengan elevansi agak cembung. Koloni pada *B. subtilis*

secara visual dapat dilihat dengan jelas. Menurut Feliatra *et. al.* (2004), *Bacillus* mempunyai ciri-ciri morfologi diantaranya warna koloni putih susu atau agak krem, bentuk koloni bulat dengan tepian keriput.

Selanjutnya, dilakukan pewarnaan gram pada *B. subtilis*. Mikroorganisme sulit dilihat dengan mikroskop cahaya. Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai mikroorganisme. Penggunaan zat warna memungkinkan pengamatan struktur sel seperti spora (Lay, 1994). Pada saat pewarnaan gram, morfologi bakteri diamati menggunakan mikroskop perbesaran 1.000 x dengan minyak emersi. Dari hasil pengamatan dapat dilihat bahwa bakteri *B. subtilis* berbentuk batang. Hasil pewarnaan gram menunjukkan *B. subtilis* berwarna keungu-unguan (Gambar 6), yang berarti termasuk ke dalam bakteri gram positif.



Gambar 6. Pewarnaan Gram Bakteri *B. subtilis* (tanda panah)

Menurut Pelczar dan Chan (2005), kandungan lipid bakteri gram positif lebih rendah daripada gram negatif sehingga dinding selnya menjadi terdehidrasi selama perlakuan alkohol. Ukuran pori-pori mengecil, permeabilitasnya berkurang dan pewarna ungu kristal tidak dapat terekstraksi. Setelah perlakuan alkohol, kompleks ungu kristal terperangkap di dalam dinding, yang tampaknya

mengurangi diameter pori-pori pada peptidoglikan dinding sel. Bakteri gram positif tidak mudah dipucatkan oleh alkohol. Semua ini merupakan bukti bahwa dinding sel pada bakteri gram positif merupakan situs tempat zat warna kristal ungu tertahan.

Adapun hasil uji biokimia *B. subtilis* dapat dilihat pada Lampiran 7. Langkah selanjutnya adalah perbanyakkan *B. subtilis* dengan menggunakan media *Nutrient Broth* (NB). Hasil kultur bakteri ini kemudian digunakan untuk penelitian.

4.2 Penentuan Kepadatan Bakteri *B. subtilis*

Penentuan kepadatan bakteri yang digunakan untuk mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang didapatkan dari penelitian pendahuluan. Pada penelitian pendahuluan digunakan bakteri *B. subtilis* dengan beberapa kepadatan antara lain kontrol (tanpa penambahan bakteri *B. subtilis*), kepadatan 10^2 cfu/ml, 10^4 cfu/ml, 10^6 cfu/ml dan 10^8 cfu/ml. Berdasarkan penelitian pendahuluan tersebut, penambahan bakteri dengan kepadatan 10^6 cfu/ml memiliki kemampuan degradasi yang paling tinggi. Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, *B. subtilis* yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kepadatan 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, dan 10^8 cfu/ml. Jumlah bakteri yang digunakan adalah 1,2 ml dan ditambahkan ke dalam 200 ml sampel limbah cair tambak.

4.3 Penambahan Bakteri Terhadap Limbah Cair Tambak

Kegiatan penambahan dan penginkubasian *B. subtilis* dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Banyaknya bakteri yang ditambahkan ke dalam limbah cair 200 ml adalah 1,2 ml dengan masa inkubasi 48 jam. Selama proses inkubasi toples ditutup dengan tujuan pengkondisian dasar tambak yang rendah

kandungan oksigennya. Selain itu, *B. subtilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu hidup pada daerah rendah oksigen. Tujuan lainnya adalah untuk menghindari kontaminan selama masa inkubasi.

Menurut Gusmawati *et. al.* (2010), *B. subtilis* mencapai fase lag di bawah jam ke-12, dan mencapai fase log dengan cepat sampai jam ke 12 dan mulai melambat sampai jam ke-36, selanjutnya *B. subtilis* sudah memasuki fase stasioner pada jam ke-48. Suhartono (1992) dalam Anggraini (2003) menyebutkan bahwa sintesis protease ekstraseluler biasanya terjadi pada fase stasioner. Hal ini berkaitan dengan mekanisme represi kataboliknya. Selama fase pertumbuhan eksponensial, sel akan mengalami hambatan represi katabolit sehingga sintesis enzim terhambat. Memasuki fase stasioner, represi katabolit menurun sehingga mengaktifkan biosintesis enzim.

Dalam penelitian ini limbah cair yang diambil berasal dari tambak pembesaran udang vaname secara intensif dengan padat penebaran 125 ekor/m² pada masa pemeliharaan 98 hari. Menurut Banun *et. al.* (2007), berdasarkan jenis teknologi yang diterapkan budidaya udang vaname di tambak dapat digolongkan menjadi 4, antara lain:

- a. Tradisional, dengan padat penebaran <10 ekor/m², tanpa menggunakan kincir.
- b. Semi intensif, dengan padat penebaran 30-80 ekor/m², menggunakan kincir 3 unit/125.000 ekor.
- c. Intensif, dengan padat penebaran 80-125 ekor/m², menggunakan kincir 3 unit/125.000 ekor.
- d. Super intensif, dengan padat penebaran 500 ekor/m², menggunakan kincir *super case*.

Dalam kegiatan budidaya, sebagian besar pakan yang diberikan tidak dikonsumsi oleh udang di tambak. Akumulasi sisa pakan akan meningkatkan jumlah bahan organik dalam ekosistem perairan seperti karbohidrat, protein dan lemak (Sutimin, 2010).

4.4 Hasil Uji Protein

Analisa Protein dilakukan di Laboratorium Kimia Lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Berdasarkan uji protein pada masing-masing perlakuan, diketahui bahwa *B. subtilis* memiliki kemampuan dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang. Besarnya kemampuan *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang (ppm)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata \pm SD
	1	2	3		
A = 10 ⁴	113,33	124,33	151,33	388,99	129,66 \pm 19,55
B = 10 ⁵	183,33	209,33	220,33	612,99	204,33 \pm 19
C = 10 ⁶	364,33	417,33	330,33	1.161,99	387,33 \pm 27,18
D = 10 ⁷	524,33	604,33	551,33	1.679,99	560 \pm 40,69
E = 10 ⁸	331,33	284,33	300,33	895,99	298,66 \pm 13,57
	Jumlah			4.739,95	-

Berdasarkan analisa sidik ragam potensi bakteri *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang menunjukkan adanya pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) antar perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Analisa Keragaman/Sidik Ragam Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	336.343,33	84.085,83	126,52**	3,48	5,99
Acak	10	6.646	664,6	-	-	-
Total	14	342.989,33	-	-	-	-

Keterangan : ** = Berbeda Sangat Nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian bakteri *B. subtilis* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata (*highly significant*) terhadap nilai protein pada limbah cair tambak udang. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 1% dan F 5% yang berarti kepadatan *B. subtilis* sangat berpengaruh terhadap penurunan protein pada limbah cair tambak udang atau H_1 diterima (H_0 ditolak). Untuk mengetahui tingkat perbedaan dari masing-masing perlakuan maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 0,05 dan 0,01 yang dapat dilihat pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang

Rata-rata	A =	B =	E =	C =	D =	Notasi
Perlakuan	129,66	204,33	298,66	387,33	560	
A = 129,66	-	-	-	-	-	a
B = 204,33	74,66**	-	-	-	-	b
E = 298,66	169**	94,33**	-	-	-	c
C = 387,33	256,67**	183**	88,67**	-	-	d
D = 560	430,34**	355,67**	261,34**	172,67**	-	e

Urutan Perlakuan Terbaik : D – C – E – B – A

BNT 5% = 46,89

BNT 1% = 66,70

SED = 21,04

Berdasarkan hasil uji BNT, kemampuan tertinggi *B. subtilis* dalam mendegradasi protein adalah pada perlakuan D (10^7 cfu/ml), yaitu 560 ppm. Selanjutnya, perlakuan C (10^6 cfu/ml) memiliki kemampuan mendegradasi protein sebesar 387,33 ppm. Perlakuan E (10^8 cfu/ml) mampu mendegradasi protein dalam limbah cair tambak sebesar 298,66 ppm, sedangkan perlakuan B (10^5 cfu/ml) mendegradasi protein sebesar 204,33 ppm. Perlakuan A (10^4 cfu/ml) memiliki kemampuan degradasi protein yang paling rendah, yaitu 129,66 ppm. Perhitungan data pengukuran kemampuan degradasi bakteri *B. subtilis* dapat dilihat pada Lampiran 8.

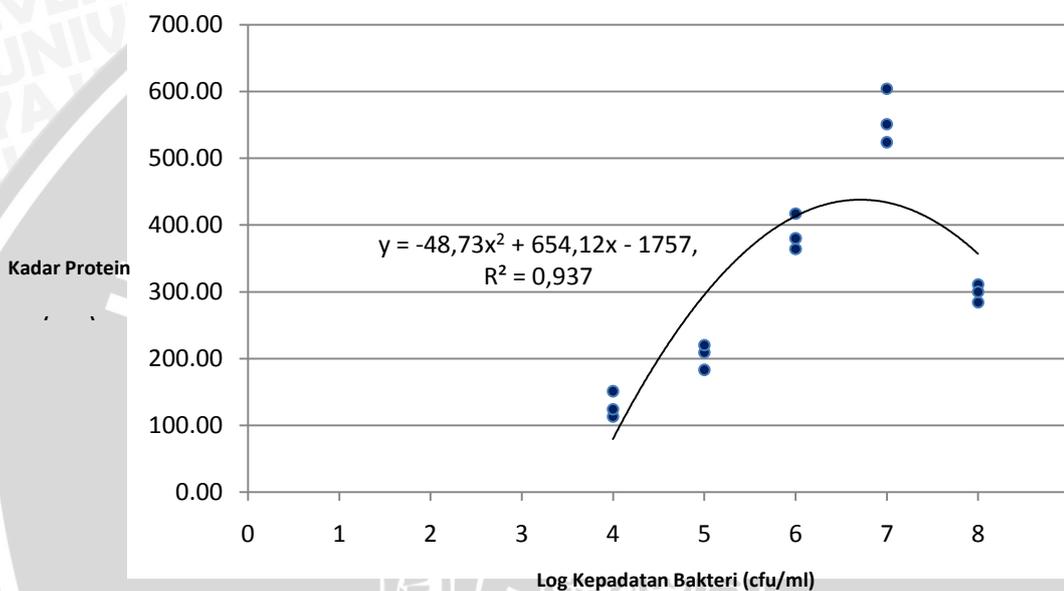
Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan kepadatan bakteri *B. subtilis* dengan nilai degradasi protein yang terkandung dalam limbah cair tambak udang maka digunakan analisa regresi. Hasil analisa sidik ragam regresi dapat dilihat pada Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Analisa Keragaman/Sidik Ragam Regresi Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	336.343,333	-	-	-	-
Linier	1	144.352,033	144.352,033	217,201**	4,96	10,04
Kuadratik	1	99.766,880	99.766,880	150,115**		
Kubik	1	88.237,633	88.237,633	132,768**		
Kuartik	1	3.986,785	3.986,785	5,998*		
Acak	10	6.646	664,6			
Total	14	679.332,666				

Hasil sidik ragam regresi pada Tabel 4 menunjukkan bahwa nilai F hitung kuadratik lebih besar daripada F tabel 1% (berbeda sangat nyata), yang artinya kepadatan *B. subtilis* berpengaruh sangat nyata terhadap penurunan protein

dalam limbah cair tambak udang. Bentuk regresi yang digunakan adalah bentuk kuadratik dan didapatkan persamaan $Y = -48,7x^2 + 654,12x - 1757$. Perhitungan analisa regresi hubungan antara kepadatan *B. subtilis* dengan penurunan protein pada limbah cair tambak udang dapat dilihat pada Lampiran 9. Adapun grafik hubungan antara kepadatan *B. subtilis* dengan penurunan protein dalam limbah cair tambak udang disajikan pada Gambar 7 berikut.



Gambar 7. Grafik Hubungan Antara Kepadatan Bakteri *B. subtilis* (X) dengan Penurunan Kadar Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang (Y)

Dalam analisa regresi, terdapat dua koefisien yang biasa digunakan yaitu determinasi (R^2) dan korelasi (r). Pada penelitian ini, koefisien determinasi yang didapatkan yaitu (R^2) = 0,937 artinya 93,7% penurunan kadar protein yang dalam limbah cair tambak udang dipengaruhi oleh kepadatan bakteri *B. subtilis* yang diberikan. Koefisien korelasi yang mendekati angka +1 berarti terjadi hubungan positif yang erat, bila mendekati angka -1 berarti terjadi hubungan negatif yang erat. Sedangkan koefisien korelasi mendekati angka 0 (no) berarti hubungan antara kedua variabel adalah lemah atau tidak erat (Santoso, 2008). Pada

penelitian ini, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0,967 (mendekati 1) yang artinya kepadatan bakteri *B. subtilis* dan nilai protein yang dihasilkan memiliki korelasi yang sangat tinggi.

Titik puncak grafik di atas terdapat pada $[(X = 6,71);(Y = 438,12)]$ yang menunjukkan bahwa penambahan *B. subtilis* dengan kepadatan 6,71 (antilog = 5×10^6 cfu/ml) memiliki kemampuan tertinggi dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang, yaitu 438,12 ppm.

Menurut Susanto *et al.* (2005) dalam Juwana *et. al.* (2010), penambahan bakteri yang menguntungkan pada media pemeliharaan dapat meningkatkan kualitas dari media dan biota yang dibudidayakan. Hal ini dikarenakan bakteri ini dapat mengurangi senyawa-senyawa seperti ammonia dan nitrogen, juga menekan pertumbuhan bakteri patogen. Penambahan bakteri probiotik ke dalam media pemeliharaan adalah kepadatan 10^6 cfu/ml.

Kepadatan bakteri komersil yang ditambahkan pada air dan dasar tambak berkisar antara 10^4 cfu/ml sampai dengan 10^7 cfu/ml (Gunarto *et. al.*, 2006). Menurut Wang *et. al.* (1999) dalam Muliani *et. al.* (2008), fungsi paling penting penggunaan bakteri probiotik pada media pemeliharaan adalah mempertahankan kestabilan parameter kualitas air tambak dengan menurunkan bahan organik, ammonia, gas hidrogen sulfida dan gas-gas beracun lainnya. Selain itu juga mengontrol terjadinya blooming alga sehingga dapat menjaga kestabilan nilai pH dalam tambak, menurunkan kadar BOD dan menjaga ketersediaan oksigen bagi pertumbuhan udang.

Hasil yang didapat dalam penelitian ini menunjukkan adanya penurunan kemampuan degradasi protein pada penambahan *B. subtilis* dengan kepadatan tertinggi. Penurunan ini dapat disebabkan karena jumlah bakteri terlalu padat sehingga persaingan bakteri dalam mendapatkan nutrisi pun semakin tinggi. Menurut Volk dan Wheeler (1993), istilah pertumbuhan yang umum digunakan

untuk bakteri dan mikroorganisme lain mengacu pada penambahan total massa sel. Derajat pertumbuhan dipengaruhi oleh kadar nutrisi dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Kematian bakteri menurut Habibie (2010) disebabkan karena zat makanan yang diperlukannya itu menjadi berkurang dan menumpuknya hasil ekskresi bakteri itu sendiri sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan.

Menurut Gusmawati *et. al.* (2010), pada fase stasioner, pertumbuhan sel bakteri akan dibatasi oleh nutrisi yang semakin berkurang, akumulasi metabolit inhibitor dari produk dan ketiadaan ruang untuk tumbuh. Meskipun sel berhenti tumbuh berkembang, pada fase ini umumnya sel bakteri membelah dan bertambah besar dengan laju pertumbuhan yang konstan, dan mengeluarkan metabolit sekunder seperti antibiotik, dan bakteri tertentu mulai membentuk spora.

B. subtilis mampu mendegradasi protein karena memiliki enzim protease ekstraseluler. Selama pertumbuhannya, *B. subtilis* memproduksi tiga macam protease, yaitu protease netral, protease serin, dan esterase. Rasio pembentukan protease netral dan protease alkali dari *B. subtilis* berkisar antara 4:1 dan 1:1 (Priest, 1977 dalam Suhartono, 1994). Menurut Susanti (2008), protease dari *B. subtilis* terdiri dari protease serin dan campuran protease serin dan logam dengan perbandingan 1,98:1.

Menurut Pelczar dan Chan (2005), banyak bakteri yang dapat menghancurkan protein di luar tubuhnya dan menggunakan produk-produk hasil proses hidupnya. Karena molekul protein terlalu besar untuk melewati membran, bakteri mengekskresikan eksoenzim yang disebut protease yang menghidrolisis protein tersebut menjadi peptida-peptida. Bakteri menghasilkan peptidase yang menguraikan peptida menjadi asam amino, yang kemudian dikatabolisme bakteri yang menguraikannya.

Ada berbagai jenis asam amino yang dihasilkan *B. subtilis*. Asam amino gugus R non polar yang dihasilkan *B. subtilis* meliputi glisin, prolin dan fenil alanin. Asam amino yang gugus rantai sampingnya tidak bermuatan meliputi serin, treonin, tirosin dan sistin. Asam amino rantai samping bermuatan meliputi lisin, arginin, histidin, asam aspartat dan asam glutamat. Berdasarkan reaktivitas rantai samping dengan air, asam amino dapat bersifat suka air (hidrofilik) atau tidak suka air (hidrofobik). Asam amino dari *B. subtilis* yang bersifat hidrofilik diantaranya serin, treonin, lisin, agrinin dan histidin (Kadarwati, 2008).

4.5 Hasil Uji Kualitas Air

4.5.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi kehidupan bakteri. Di dalam reaksi kimia kenaikan suhu akan menaikkan kecepatan reaksi. Biasanya tiap kenaikan 10°C dapat mempercepat reaksi antara 2-3 kali lipat. Oleh karena itu, kenaikan suhu pada batas tertentu dapat mempercepat proses metabolisme (Suriawiria, 1993).

Hasil pengukuran suhu limbah cair tambak udang yang dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan dapat dilihat pada Tabel 5 berikut.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Suhu ($^{\circ}\text{C}$)

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata \pm SD
	1	2	3	
A = 10^4	25	25	26	25,3 \pm 0,577350269
B = 10^5	26	26	26	26 \pm 0
C = 10^6	25	26	26	25,6 \pm 0,577350269
D = 10^7	26	26	26	26 \pm 0
E = 10^8	26	26	25	25,6 \pm 0,577350269

Berdasarkan data tabel di atas, dapat dilihat bahwa suhu pada media limbah cair berkisar antara 25-26 $^{\circ}\text{C}$ dengan nilai rata-rata 25,3 $^{\circ}\text{C}$, 25,6 $^{\circ}\text{C}$ dan

26°C. Suhu dengan nilai rata-rata tertinggi terdapat pada perlakuan B dan perlakuan D. Menurut Fajriana (2008), *B. subtilis* tumbuh di berbagai mesofilik suhu berkisar 25-35°C. Menurut Liao dan Murai (1986) dalam Isdarmawan (2005), pada banyak kasus, keberhasilan budidaya udang terjadi pada kisaran suhu perairan 20-30°C. Soetrisno (2010) mengemukakan, dalam budidaya udang vaname di tambak pada umumnya, nafsu makan udang normal pada suhu air antara 24-31°C. Dengan demikian, suhu pada media (limbah cair tambak udang) merupakan kisaran suhu yang mampu ditoleransi oleh *B. subtilis* dan sesuai dengan suhu di tambak pada umumnya.

Menurut Wong (1995) dalam Pirzada (2009), pengaruh suhu terhadap enzim agak kompleks, semakin tinggi suhu maka akan semakin mempercepat aktivitas enzim tersebut. Akan tetapi, pada suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat perusakan atau pemecahan enzim.

4.5.2 pH

Pengukuran pH pada sampel limbah cair tambak dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan dengan menggunakan pH meter. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 6 berikut.

Tabel 5. Hasil Pengukuran pH

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata±SD
	1	2	3	
A = 10 ⁴	7,28	7,29	7,33	7,30±0,026457513
B = 10 ⁵	7,37	7,23	7,32	7,30±0,070945989
C = 10 ⁶	7,32	7,29	7,38	7,33±0,045825757
D = 10 ⁷	7,32	7,35	7,42	7,36±0,051316014
E = 10 ⁸	7,33	7,30	7,40	7,34±0,051316014

Berdasarkan data pada tabel di atas menunjukkan bahwa nilai pH pada media limbah cair tambak berkisar antara 7,23-7,42 dengan rata-rata berkisar

antara 7,30-7,36. Nilai rata-rata pH terendah terdapat pada perlakuan A dan B, yaitu 7,30, sedangkan rata-rata tertinggi terdapat pada perlakuan D, yaitu 7,36. Nilai pH optimum bagi pertumbuhan *B. subtilis* pada kisaran netral, yaitu berkisar antara 7-8 (Graumann, 2007 dalam Naibaho, 2011). Pergeseran pH yang besar dapat menghambat pertumbuhan bakteri. pH optimum pertumbuhan bagi kebanyakan bakteri terletak antara 6,5 dan 7,5 (Pelczar dan Chan, 2005). Bila terjadi penyimpangan pH, pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme akan terhenti. Lazimnya, mikroorganisme tumbuh pada pH 7 (Lay, 1994).

B. subtilis menghasilkan enzim protease alkalin dengan aktivitas terbaik pada pH 9,5 (Rochani, 1986). Meskipun demikian, dengan penambahan *B. subtilis* ke dalam limbah cair tambak udang yang mempunyai pH netral menyebabkan menurunkannya nilai protein. Menurut Tang *et. al.* (2004) dalam Mukhtar dan Ikram (2008), protease netral dihasilkan bakteri pada kondisi pH netral, yaitu 7.

pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik. Perairan asam kurang produktif, malah dapat membunuh hewan budidaya. Pada tambak yang sudah beroperasi, umumnya pH air alkalis, dan stabil berkisar antara 7,5-8,5. Produksi udang akan mulai menurun pada pH 8,8-8,7 dan titik mati alkalis pada pH 9,6-11 (Kordi, 2010). Dengan demikian, berdasarkan hasil pengujian pH, media limbah cair tambak udang masih termasuk ke dalam pH optimum untuk pertumbuhan bakteri, termasuk *B. subtilis*.

4.5.3 DO

Pengukuran DO pada media limbah cair tambak udang dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan dengan menggunakan alat DO meter. Hasil pengukuran DO dapat dilihat pada Tabel 7 berikut.

Tabel 6. Hasil Pengukuran DO (mg/l)

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata±SD
	1	2	3	
A = 10 ⁴	0,9	0,9	1,2	1,03±0,173205081
B = 10 ⁵	0,9	1,1	0,8	0,93±0,152752523
C = 10 ⁶	0,8	0,9	0,8	0,83±0,057735027
D = 10 ⁷	0,9	0,9	0,8	0,86±0,057735027
E = 10 ⁸	0,8	0,9	0,8	0,83±0,057735027

Dari hasil pengujian, dapat dilihat nilai DO pada media limbah cair tambak udang yang variatif, yaitu berkisar antara 0,8-1,2 mg/L. Nilai DO dengan rata-rata tertinggi terdapat pada perlakuan A, yaitu 1,2 mg/l. Nilai DO yang sama terdapat pada perlakuan C dan E yaitu 0,83 mg/l, sedangkan nilai DO pada perlakuan D adalah 0,86 mg/l. Menurut Jenie dan Rahayu (1993) dalam Kurniawan (2010), rendahnya kadar oksigen dapat berpengaruh terhadap fungsi biologis dan lambatnya pertumbuhan, bahkan dapat mengakibatkan kematian. Untuk mempertahankan sistem aerobik pada mikroba diperlukan konsentrasi oksigen terlarut minimum antara 0,2 dan 0,6 mg/l. Menurut Kordi (2010), di tambak oksigen juga berfungsi sebagai pengoksidasi bahan organik yang ada di dasar tambak. Jumlah oksigen yang dibutuhkan untuk pernafasan udang tergantung ukuran, suhu dan tingkat aktivitasnya dan batas minimumnya adalah 3 mg/l.

Dalam penelitian ini, tidak ada perbedaan nilai DO yang signifikan pada media untuk setiap perlakuan. Rendahnya nilai DO pada media limbah cair tambak udang menunjukkan bahwa *B. subtilis* mampu bertahan dan mendegradasi protein pada kondisi lingkungan dengan nilai DO yang rendah bahkan mendekati nilai minimum karena memiliki sifat anaerob fakultatif. Menurut Prayogo (2009), berdasarkan kebutuhannya terhadap oksigen, *Bacillus* spp. merupakan jenis aerob atau anaerob fakultatif.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Bakteri *B. subtilis* memiliki potensi mendegradasi protein karena mampu menurunkan kandungan protein pada limbah cair tambak udang.
2. Berdasarkan analisa regresi didapat persamaan $Y = -48,73x^2 + 654,12x - 1757$. Kepadatan terbaik *B. subtilis* dalam mendegradasi protein dari limbah cair tambak udang adalah 5×10^6 cfu/ml dengan kemampuan sebesar 358, 12 ppm.
3. Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air, nilai suhu berkisar antara 25-26°C. Hasil pengukuran pH masih berada dalam kisaran normal untuk pertumbuhan bakteri, yaitu dalam kisaran 7,23-7,42. Nilai DO pada sampel limbah tambak sangat rendah, yaitu berkisar antara 0,8 - 1,2 mg/l.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disarankan bahwa:

1. Perlu diteliti lebih lanjut mengenai kemampuan *B. subtilis* dalam mendegradasi limbah padat (sedimen) tambak udang.
2. Perlu dilakukan pengujian kualitas air yang lebih lengkap seperti ammonia, nitrit dan nitrat.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan bakteri lain untuk mengetahui potensinya dalam mendegradasi limbah organik di tambak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 1997. **Bacillus subtilis Final Risk Assessment**. http://epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm. Diakses 6 November 2010 pukul 14.17 WIB.
- Abidin, M. Z. 2010. **Pengertian dan Pengelompokan Limbah Lingkungan**. <http://meetabied.wordpress.com/2010/01/14/pengertian-dan-pengelompokan-limbah-lingkungan-2/>. Diakses 18 Februari 2011 pukul 10.30 WIB.
- Alif. 2010. **Agen Hayati**. <http://tanimulya.blog.com/2010/06/13/agens-hayati/>. Diakses 12 Januari 2011 pukul 19.30 WIB.
- Anggraini, M. 2003. **Isolasi Bakteri Penghasil Protease Alkalin dan Karakterisasi Enzim**. Artikel Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor. 9 hal. Tidak dipublikasikan.
- Anthony, S. P. dan Philip, R. 2006. **Bioremediation in Shrimp Culture Systems**. NAGA, WorldFishCenter Quarterly Vol. 29 No. 3 & 4 Jul-Dec 63.
- Aycaesariani, E. R. 2010. **Bakteri Bagi Kehidupan Manusia**. <http://ruthphyn.blogspot.com/2010/10/peranan-bakteri-bagi-kehidupan-manusia.html>. Diakses 24 November 2010 pukul 15.02 WIB.
- Badjoeri, M dan Tri Widiyanto. 2008. **Penggunaan Bakteri Nitrifikasi Untuk Bioremediasi dan Pengaruhnya Terhadap Konsentrasi Amonia dan Nitrit di Tambak**. Pusat Penelitian Limnologi-LIPI. Bogor. Oseanologi dan Limnologi di Indonesia. 34 (2): 261-278.
- Banun, S., Wayan A., Wayan S. 2007. **Kajian Ekologis Pengelolaan Tambak Udang di Dusun Daging Marga Desa Delodbrawah Kecamatan Mendoyok Kabupaten Jembrana Bali**. Pusat Penelitian Lingkungan Hidup Universitas Udayana. Denpasar. Jurnal Ecotrophic vol 3 (1): 10-15.
- Budiyanto, A. K. 2010. **Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Mikroba**. <http://zaifbio.wordpress.com/2010/11/08/faktor-lingkungan-yang-mempengaruhi-mikroba/>. Diakses 22 Februari 2011 pukul 15.00 WIB.
- Codemo, Roberta. 2011. **How to Make Bacillus subtilis**. http://www.ehow.com/how_7868284_make-bacillus-subtilis.html#ixzz1ECW7ZFMV. Diakses 21 Februari 2011 pukul 13.00 WIB.
- Darmayasa, I. B. G. 2008. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Lipid (Lemak) Pada Beberapa Tempat Pembuangan Limbah dan Estuari DAM Denpasar**. Program Studi Kimia Universitas Udayana. Denpasar. Jurnal Bumi Lestari vol 8(2):122-127.

- Dwijoseputro, D. 1989. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hal.
- Fahmi, F. 2005. **Integrated Multi-Trophic Aquaculture for Bioremediation of pond waters**. <http://images.notkeju.multiply.com/attachment/0/SHvqAQoKCB8AACZ2Se81/Aplikasi%20Bioremidiasi%20Pada%20Aquaculture.pdf?nmid=105700003>. Diakses 7 November 2010.
- Fajriana, R. 2008. **Mikroum Pewarnaan Gram**. <http://qi206.wordpress.com/2008/10/17/mikroumpewarnaan-gram/>. Diakses 6 November 2010 pukul 16.04 WIB.
- Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. 283 hal.
- Fardiaz, S. 2000. **Mikrobiologi Pangan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 307 hal.
- Ferliatra, I. Efendi, S. Edward. 2004. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Pekanbaru. Jurnal Natur Indonesia vol 6(2): 75-80.
- Griswidia, R. 2008. **Penurunan kadar Minyak Lemak Pada Limbah Cair Laundry dengan Menggunakan Reaktor Biosand Filter dilanjutkan dengan Reaktor Karbon Aktif**. Tugas Akhir. Program Studi Manajemen Lingkungan. Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta. 132 hal. Tidak dipublikasikan.
- Gunarto, A. M. Tangko B. R. T. Mulyani. **Budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon*) di Tambak dengan Penambahan Probiotik Hasil Perbanyakan**. Jurnal Penelitian Perikanan. (In Press). 12 pp.
- Gusmawati, N. F., Savitri C. K., Puspitda L., Fahrulozy. 2010. **Seleksi Urease untuk Teknologi Biogrouting**. Jurnal Kelautan Nasional vol 5(1).
- Habibie, A. M. 2010. **Pembiakan dan pertumbuhan Bakteri**. <http://ajimirzahabibie.blogspot.com/2010/06/pembiakan-dan-pertumbuhan-bakteri.html>. Diakses tanggal 25 Februari 2011 pukul 16.25 WIB.
- Hakim, R. R. 2008. **Saatnya Indonesia Menerapkan Budidaya Ikan Ramah Lingkungan (2)**. <http://zamankim.blogspot.com/2008/05/saatnya-indonesia-menerapkan-budidaya>. Diakses tanggal 24 Februari 2011.
- Harlinah. 2005. **Sistem Induksi Untuk Memproduksi Enzim Proteolitik Ekstraseluler Oleh Sel *E. Coli*, Salah Satu Cara Dalam Penanggulangan Limbah Tambak Udang yang Berupa Protein Sedimen**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara. Medan. Jurnal Sains Kimia vol 9(2): 64-67.

- Hariani, G.D. 2009. **Potensi Bakteri Amilolitik Indigenous Mangrove Terhadap Dekomposisi Limbah Tambak Udang**. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang. 50 hal. Tidak dipublikasikan.
- Herdiantoro, D. 2005. **Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi Oleh *Bacillus* sp. Galur ICBB 7859 dan ICBB 7865 dari Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah dengan Penambahan Surfaktan**. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 87 hal. Tidak dipublikasikan.
- Husin, A. 2008. **Pengolahan Limbah Cair Tahu Dengan Biofiltrasi Anaerob Dalam Reaktor *Fixed-Bed***. Tesis. Teknik Kimia. Universitas Sumatera Utara. Medan. 115 hal. Tidak dipublikasikan.
- Hutabarat, J. 2001. **Peran Iptek Budidaya Perairan Dalam Pengembangan Pemanfaatan Sumberdaya Perikanan**. http://eprints.undip.ac.id/284/1/Johanes_Hutabarat.pdf. Diakses 1 November 2010 pukul 07.29 WIB.
- Isdarmawan, N. 2005. **Kajian Tentang Luas dan Waktu Bagi Degradasi Limbah Tambak Dalam Upaya Pengembangan Tambak Berwawasan Lingkungan di Kecamatan Wonokerto Kabupaten Pekalongan**. Tesis. Program Manajemen Sumberdaya Pantai Program Pascasarjana. Universitas Diponegoro. Semarang. 95 hal. Tidak dipublikasikan.
- Juwana, S. Yustian R. A. Sujono. 2010. **Utilization of *Artemia* Nauplii, Supplemented Diet and Commercial Probiotic, for Production of Crab Seed**. Research Centre for Oceanography Indonesian Institute of Science Jakarta. Jakarta. Jurnal Oseanografi dan Limnologi Indonesia vol 36(3): 259-279.
- Kadarwati, S. 2008. **Karakterisasi Biosurfaktan yang Dihasilkan Bakteri *Providencia rettgeri* dan *Bacillus subtilis* dari Reservoir Minyak di Indonesia**. Lembar Publikasi Lemigas vol 42 (3): 18-26.
- Kartika, H. 2008. **Variabel Penelitian**. <http://hennykartika.wordpress.com/2008/01/27/variabel-penelitian/>. Diakses 4 Desember 2010 pukul 07.39 WIB.
- Kordi, K. M. G. H. 2010. **Pakan Udang**. Akademika. Jakarta. 223 hal
- Kurniawan, R. 2010. **Pengaruh Penambahan Bakteri *Pseudomonas putida* Secara Aerob Terhadap Kadar Lemak Dalam Limbah Cair Pembekuan Ikan**. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. 74 hal. Tidak dipublikasikan.
- Kusnandar, F. Hariyadi, P. dan Wulandari, N. 2008. **Aspek Biologi Makanan Kaleng**. <http://www.unhas.ac.id/gdln/dirpan/pengalengan/Topik6/Modul/Sub-topik%206-1%20Karakteristik%20mikroba.pdf>. Diakses 19 Februari 2011 pukul 21.00 WIB.
- Lay, B. W. 1994. **Analisis Mikroba di Laboratorium**. PT RajaGrafindo Persada. Jakarta. 167 hal.

- Mariyanti, L. 2010. **Potensi Antagonistik *Extracellular Product (ECP) Vibrio alginolyticus* Terhadap *Vibrio harveyi* Secara *In Vitro***. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. 50 hal. Tidak dipublikasikan.
- Muliani, Nurbaya, Bunga R. T. 2008. **Pengaruh Rasio Bakteri Probiotik Terhadap Perubahan Kualitas Air dan Sintasan Udang Windu, *Penaeus monodon* dalam Akuarium**. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau Maros. Jurnal Riset Akuakultur vol 3(1): 33-42.
- Nazir, M. 2005. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia Cetakan 6. Bogor. 544 hal.
- Naibaho, P. 2011. ***Bacillus subtilis***. <http://pobersonaibaho.wordpress.com/2011/03/08/daphnia-sp-klasifikasi-morfologi-reproduksi-bacillus-subtilis-bakteri-nitrifikasi-sistem-kultur-zooplankton-parameter-kualitas-air/>. Diakses 9 April 2010 pukul 13.00 WIB.
- Nugroho, A. 2006. **Biodegradasi Sludge Minyak Bumi dalam Skala Mikrokosmos: Simulasi Sederhana Sebagai Kajian Awal Bioremediasi *Land Treatment***. Fakultas Arsitektur Lansekap dan Teknologi Lingkungan Universitas Trisakti. Jakarta. Jurnal Makara Teknologi vol 10(2): 82-89.
- Nybakken, J.W. 1988. **Biologi Laut, Suatu Pendekatan Ekologi**. Alih Bahasa Oleh M. Eidman; Koesoebiono; D.G Bergen; M. Hutomo; dan S. Sukarjo. Penerbit Gramedia. Jakarta. 207 hal.
- Pakpahan, R. 2009. **Isolasi Bakteri Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara**. Tesis. Universitas Sumatera Utara. Medan. 112 hal. Tidak dipublikasikan.
- Pelczar, M. J and Chan, E. C. S. 2005. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Alih Bahasa: Hadioetomo, R. S. Imas, T. Dan Tjitrosomo, S. S. UI Press. Jakarta. 443 hal.
- Pirzada, H. A. 2009. **Kajian Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Protease Bakteri *Micrococcus sp.* yang Diisolasi Dari Larva Ikan Patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*)**. Tesis. Program Studi Budidaya Perairan. Universitas Brawijaya. Malang. 94 hal. Tidak dipublikasikan.
- Prayogo. 2009. **Eksplorasi Bakteri Pendegradasi Bahan Organik Pada Pembenihan Ikan Lele Dumbo (*Clarias sp.*) Sistem Resirkulasi Tertutup**. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. hal. Tidak dipublikasikan.
- Rochani, R. 1986. **Aktivitas Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* pada Media Limbah Cair Tahu**. Ringkasan Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor. 2 hal. Tidak dipublikasikan.
- Santoso, S. 2008. **Analisa Regresi dan Korelasi**. <http://ssantoso.blogspot.com/2008/08/analisis-regresi-dan-korelasi-materi.html>. Diakses 25 Februari 2011 pukul 11.30 WIB.

- Saprillah. 2000. **Keberhasilan Budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.) Dalam Tambak Intensif yang Menggunakan Teknik Petak Perlakuan Air**. Ringkasan Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 2 hal. Tidak dipublikasikan.
- Soetrisno, F. R. 2010. **Kualitas Air Tambak**. <http://fadlysutrisno.wordpress.com/2010/07/20/kualitas-air-tambak/>. Diakses 24 Februari 2011 pukul 19.20 WIB.
- Suhartono, M. T., Nuri A., Ika M., Mariani. 1994. **Daya Tahan Simpan Protease *Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis* dan *B. liceniformis***. Buletin Teknik dan Industri Pangan vol 5 (3).
- Supono. 2009. **Limbah Organik Aquaculture**. <http://blog.unila.ac.id/supono/files/2009/09/aquaculture-waste.pdf>. Diakses 19 Februari 2011 pukul 15.20 WIB.
- Suriawiria, U. 1993. **Mikrobiologi Air dan Dasar-Dasar Pengolahan Buangan Secara Biologis**. Penerbit Alumni. Bandung
- Susanti, E. V. H. 2002. **Isolasi dan Kaurakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15**. Fakultas Keguruan Ilmu Pengetahuan Universitas Sebelas Maret. Surakarta. Jurnal Biodiversitas vol 4(10): 12-17.
- Sutimin. 2010. **Model Ekosistem**. <http://staff.undip.ac.id/matematika/sutimin/2010/07/21/model-ekosistem/>. Diakses 28 Februari 2011 pukul 20.15 WIB.
- Viramedika. 2008. **Membedakan Bakteri Gram Positif dan Negatif**. <http://scrib.com/doc/25146430>. Diakses 7 November 2010.
- Volk, W.A. dan Wheeler, M.F. 1993. **Mikrobiologi Dasar Jilid 1**. Edisi 4. Alih Bahasa: Markham. Erlangga. Jakarta. 396 hal.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian



Nutrient Broth



Kompor Listrik



Nutrient Agar



Sentrifuse dingin



Shaking waterbath



Vortex

Lampiran 1 (Lanjutan)



Inkubator



Spektrofotometer



Autoklaf



Timbangan Analitik

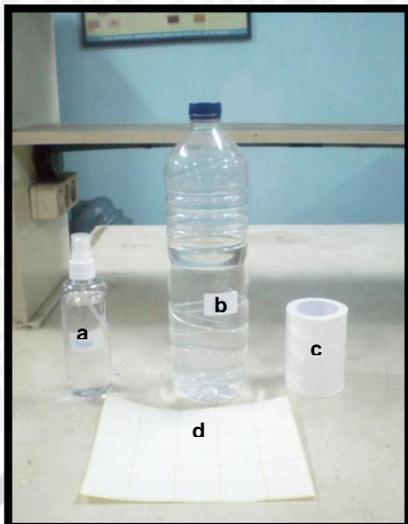


Peralatan pengukuran kadar protein



Ruang asam

Lampiran 1 (Lanjutan)



- a. Alkohol
- b. Akuades
- c. Tissue
- d. Kertas label



Limbah Cair



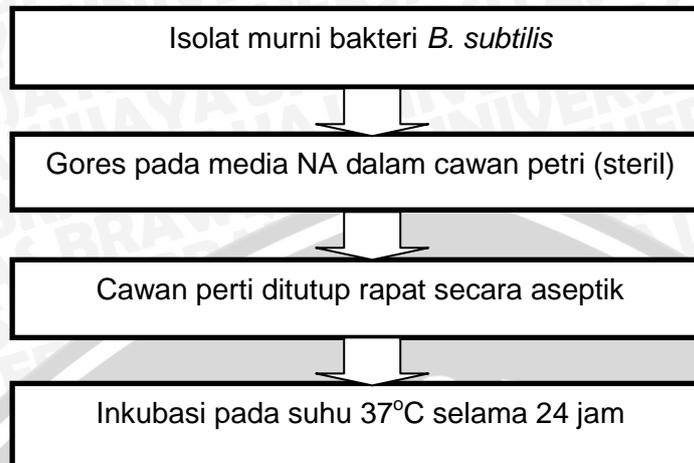
Lampiran 2. Komposisi NA (Nutrient Agar) dan NB (Nutrient Broth)**NA**

- Ekstrak daging sapi (3 g)
- Pepton (5 g)
- Agar (15 g)
- Air (1.000 ml)

NB

- Ekstrak daging sapi (3 g)
- Pepton (5 g)
- Air (1.000 ml)

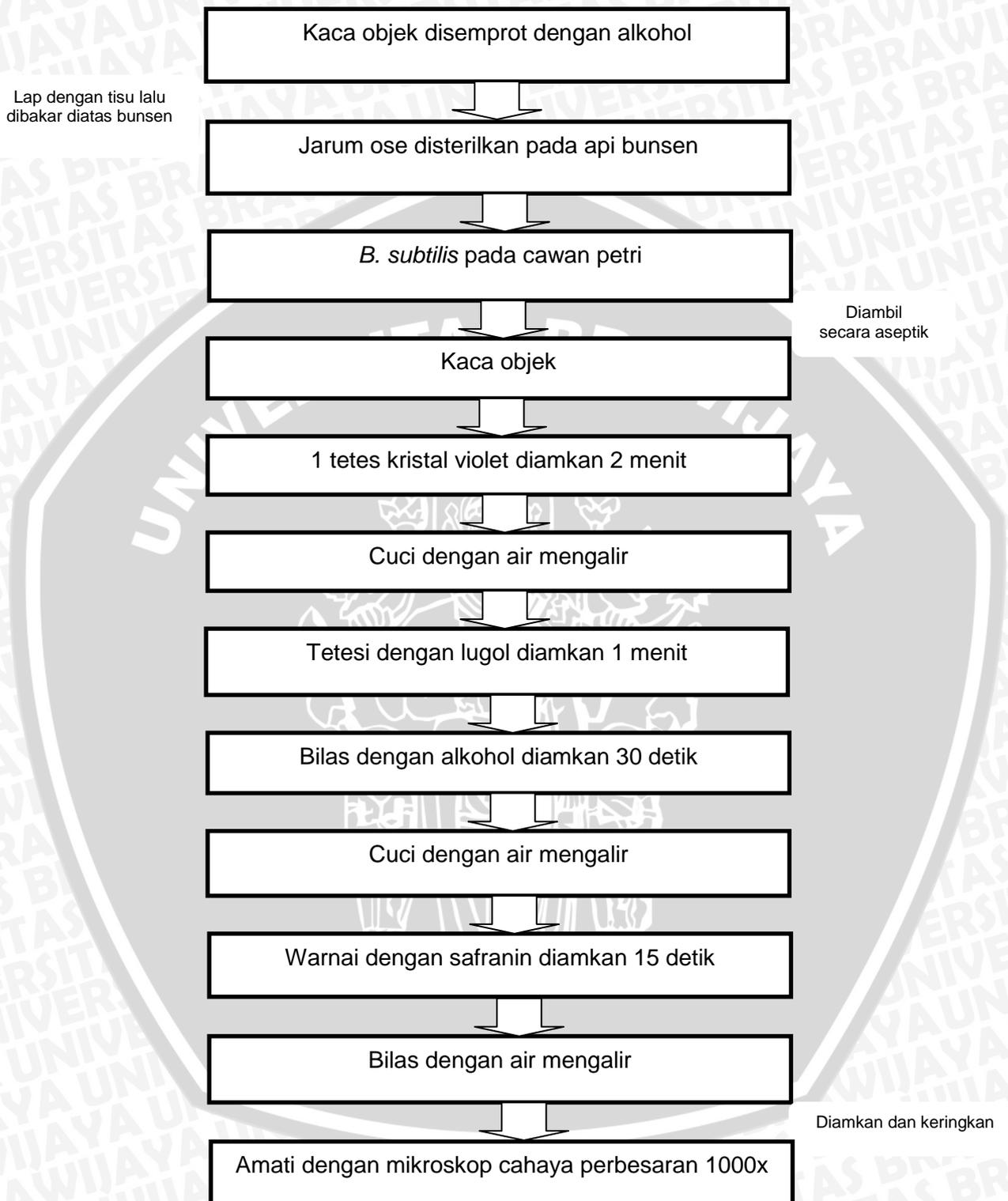


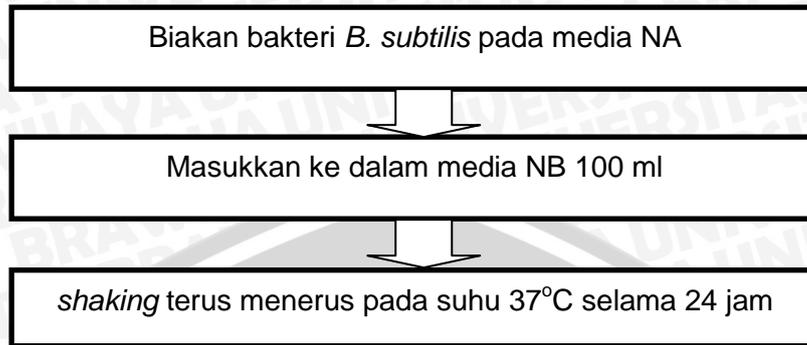
Lampiran 3. Skema Pembuatan Biakan Bakteri *B. subtilis*

Diambil sebanyak 1 ose
secara aseptik



Lampiran 4. Pewarnaan Gram

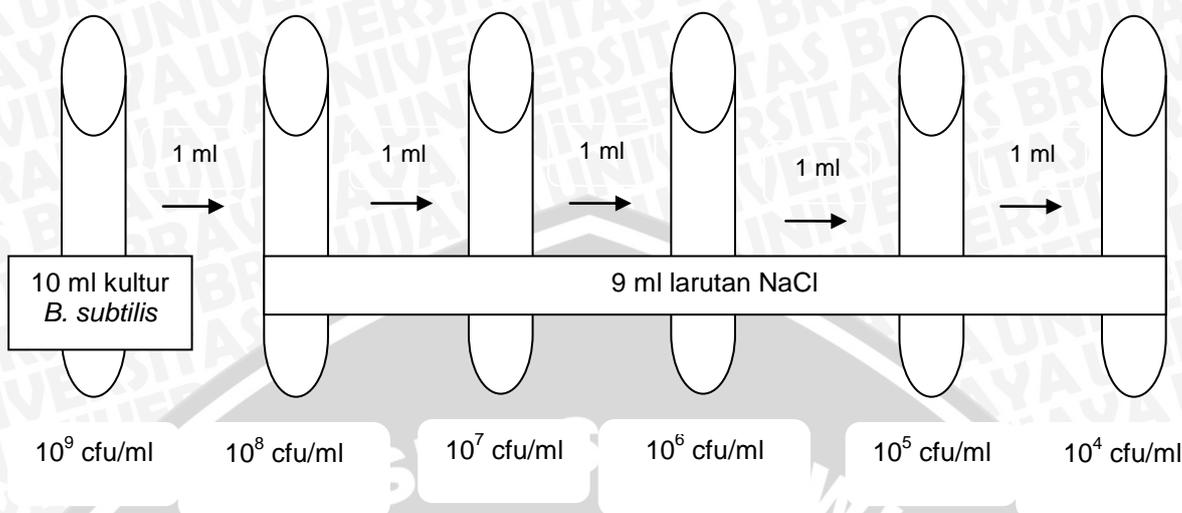


Lampiran 5. Skema Perbanyakan Bakteri *B. subtilis*

koloni murni
diambil secara
aseptis



Lampiran 6. Pengenceran Bakteri *B. subtilis*



Lampiran 7. Hasil Uji Biokimia Bakteri *B. Subtilis*

Laboratorium Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran universitas Brawijaya
PAMKI CABANG MALANG
Jl.veteran Malang - 65145,Telp. (0341)5418266, 569117- ext.111

LAPORAN HASIL UJI

Report of Analysis

No:078/IB/Lab.PAMKI/2011

KODE SAMPEL : 078/IB
Sample Code
NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat Bakteri/Padatan
Type of Sample
NAMA PELANGGAN : Sisca
Customer
ALAMAT : Mahasiswa S1-Faperik Unibraw Malang
Address
TANGGAL PENERIMAAN : 20/04/2011
Received Date
TANGGAL ANALISA : 22/04/2011
Date of Analysis
PARAMETER ANALISA : Identifikasi Spesies Strain Bakteri ATCC6051
Analysis of Parameters
SPEKIFIKASI METODE : Microbact System 12B
Method Specification

HASIL ANALISA
Test Result

NO	KODE SAMPEL <i>Sample Code</i>	HASIL IDENTIFIKASI <i>Result Identification</i>
1.	78/IB	<i>Bacillus subtilis</i>

CATATAN
Note

Hasil uji ini berlaku untuk sampel yang diuji
These analytical result are only valid for the tested sample
Hasil Microbact System terlampir.
Result of Microbact System enclosed

Malang, 18 Mei 2011

Penanggung Jawab Lab. PAMKI



Prof.Dr.dr.Sanarto Santoso,DTMH&H.SpMK



Laboratorium Mikrobiologi
 Fakultas Kedokteran universitas Brawijaya
 PAMKI CABANG MALANG
 Jl.veteran Malang - 65145,Telp. (0341)5418266, 569117- ext.111

NO SAMPEL : 78
 KODE SAMPEL : IB/78
 JENIS SAMPEL : Padatan
 PENGIRIM : Sdr. Sisca Mahasiswa perikananUB
 TGL ANALISA : 20/04/2011
 PARAMETER : Identifikasi Bakteri
 HASIL : Hasil Identifikasi Bakteri

JENIS TES	HASIL
BGP	POSITIF
SPORA	POSITIF
FERMENT GULA-GULA	
Glukosa	POSITIF
Xylosa	POSITIF
Mannitol	POSITIF
Laktosa	NEGATIF
Sukrosa	NEGATIF
Maltosa	NEGATIF
Arabinosa	POSITIF
SUHU PERTUMBUHAN	
20°C	POSITIF
37°C	POSITIF
40°C	POSITIF
45°C	POSITIF
TUMBUH DI	
Nutrient Broth	POSITIF
SDA	NEGATIF
TSI	A/A H ₂ S-
CITRAT	POSITIF
INDOL	NEGATIF
VI ^P	POSITIF
NaCl 7%	POSITIF
Motilitas	POSITIF
Starch hydrolysis	POSITIF
Casein hydrolysis	POSITIF
PENICILLIN	SENSITIV
BETA-HEMOLISA	POSITIF
Katalase	POSITIF
Oksidase	POSITIF
Reduksi Nitrat	POSITIF
Reduksi Methylene Blue	NEGATIF
DX. LAB.	B. subtilis



Lampiran 8. Perhitungan Data Pengukuran Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang

Perlakuan	Ulangan			Total
	1	2	3	
A = 10 ⁴	113,33	124,33	151,33	388,99
B = 10 ⁵	183,33	209,33	220,33	612,99
C = 10 ⁶	364,33	417,33	330,33	1.161,99
D = 10 ⁷	524,33	604,33	551,33	1.679,99
E = 10 ⁸	331,33	284,33	300,33	895,99
Jumlah				4.739,95

Perhitungan

- $$FK = \frac{G^2}{n}$$

$$= \frac{4.739,95^2}{15}$$

$$= 1.497.808,4$$
- $$JK_{total} = (A1)^2 + (A2)^2 + \dots + (E3)^2 - FK$$

$$= (113,33)^2 + (183,33)^2 + \dots + (417,33)^2 - 1.497,808,4$$

$$= 342.989,33$$
- $$JK_{perlakuan} = \frac{(\Sigma A)^2 + (\Sigma B)^2 + \dots + (\Sigma E)^2}{3} - FK$$

$$= \frac{(388,99)^2 + (612,99)^2 + \dots + (895,99)^2}{3} - 1.497,808,4$$

$$= 336.343,333$$
- $$JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$$

$$= 342.989,33 - 336.343,33$$

$$= 6.646$$

Lampiran 8. (Lanjutan)

Analisa Keragaman/Sidik Ragam Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	336.343,33	84.085,83	126,52**	3,48	5,99
Acak	10	6.646	664,6	-	-	-
Total	14	342.989,33	-	-	-	-

- Karena F hitung > F 1% atau $126,52 > 5,99 \rightarrow **$ atau berbeda sangat nyata (*highly significant*). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

Perhitungan uji BNT :

- SED =
$$\sqrt{\frac{2 \text{ KT acak}}{\mu}}$$

$$= \sqrt{\frac{2 \times 664,6}{3}}$$

$$= 21,04$$

- BNT 5% = T tabel 5 % x SED

$$= 2,228 \times 21,04$$

$$= 46,89$$

- BNT 1% = T tabel 1 % x SED

$$= 3,169 \times 21,04$$

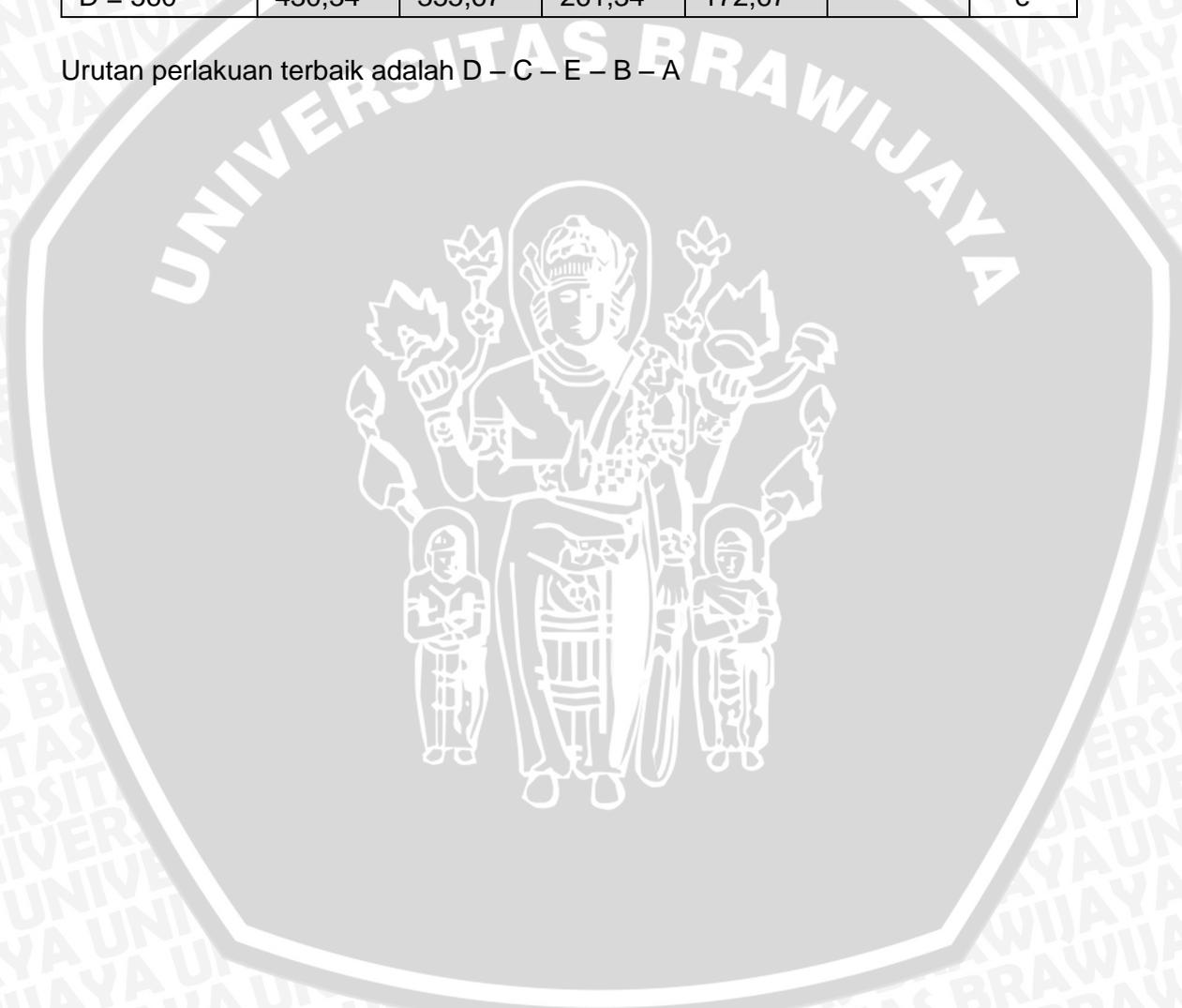
$$= 66,70$$

Lampiran 8. (Lanjutan)

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang

Rata-rata Perlakuan	A = 129,66	B = 204,33	E = 298,66	C = 387,33	D = 560	Notasi
A = 129,66	-	-	-	-	-	a
B = 204,33	74,66**	-	-	-	-	b
E = 298,66	169**	94,33**	-	-	-	c
C = 387,33	256,67**	183**	88,67**	-	-	d
D = 560	430,34**	355,67**	261,34**	172,67**	-	e

Urutan perlakuan terbaik adalah D – C – E – B – A



Lampiran 9. Perhitungan Analisa Regresi Kemampuan Degradasi Bakteri *B. subtilis* terhadap Kandungan Protein dalam Limbah Cair Tambak Udang

POLINOMIAL ORTOGONAL

Perlakuan (n)	Total (Ti)	Bandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	388,99	-2	2	-1	1
B	612,99	-1	-1	2	-4
C	1.161,99	0	-2	0	6
D	1.679,99	1	-1	-2	-4
E	895,99	2	2	1	1
Q = $\sum(CiTi)$		2.081	-2.047	-1.627	-915
Kr = $(\sum Ci^2)r$		30	42	30	210
JK Reg = Q^2/Kr		144.352,033	99.766,88	88.237,633	3.986,785

RAGAM REGRESI

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	336.343,333	-	-	-	-
Linier	1	144.352,033	144.352,033	217,201**	4,96	10,04
Kuadratik	1	99.766,880	99.766,880	150,115**		
Kubik	1	88.237,633	88.237,633	132,768**		
Kuartik	1	3.986,785	3.986,785	5,998*		
Acak	10	6.646	664,6			
Total	14	679.332,666				

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \text{JK Kuadratik} / (\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}) \\
 &= 99.766,880 / (99.766,880 + 6.646) \\
 &= 0,937545
 \end{aligned}$$

Hasil analisa sidik ragam regresi menunjukkan bahwa R^2 Kuadratik berbeda sangat nyata sehingga bentuk regresi yang digunakan adalah bentuk regresi kuadratik dengan persamaan umum : $Y = b_0 + b_2X^2$

Lampiran 9. (Lanjutan)

Untuk mendapatkan bentuk persamaan regresi kuadratik adalah dengan menggunakan transformasi uji sebagai berikut:

$$U_j = \frac{X - x'}{d}$$

Keterangan : X = Taraf perlakuan
 x' = Rata-rata perlakuan
 d = Selisih anta perlakuan

$$\text{sehingga : } x' = \frac{4 + 5 + 6 + 7 + 8}{5} = 6$$

$$U_j = \frac{X - 6}{1}$$

Transformasi U_j :

$$X = 4 \text{ maka, } U_j = -2$$

$$X = 5 \text{ maka, } U_j = -1$$

$$X = 6 \text{ maka, } U_j = 0$$

$$X = 7 \text{ maka, } U_j = 1$$

$$X = 8 \text{ maka, } U_j = 2$$



TABEL PERSAMAAN GARIS KUADRATIK

	A	B	C	D	E	Total
X_j	4	5	6	7	8	30
U_j	-2	-1	0	1	2	0
U_j^2	4	1	0	1	4	10
U_j^4	16	1	0	1	16	34
Y_{ij}	388,99	612,99	1.161,99	1.679,99	895,99	4.739,95
$U_j \cdot Y_{ij}$	-777,98	-612,99	0	1.679,99	1.791,98	2.081
$U_j^2 \cdot Y_{ij}$	1.555,96	612,99	0	1.679,99	3.583,96	7.432,9

Lampiran 9. (Lanjutan)

1. Mencari nilai b1

$$\sum U_j \cdot Y_{ij} = b_1 \cdot r \cdot \sum (U_j^2)$$

$$2.081 = b_1 \cdot 3 \cdot 10$$

$$b_1 = 69,36$$

2. Menentukan persamaan (1)

$$\sum Y_{ij} = b_0 \cdot n + b_2 \cdot r \cdot \sum (U_j^2)$$

$$4.739,95 = b_0 \cdot 15 + b_2 \cdot 3 \cdot 10$$

$$4.739,95 = 15b_0 + 30b_2 \dots \dots \dots (1)$$

3. Menentukan persamaan (2)

$$\sum U_j^2 \cdot Y_{ij} = b_0 \cdot r \cdot \sum (U_j^2) + b_2 \cdot r \cdot \sum (U_j^4)$$

$$7.432,9 = b_0 \cdot 3 \cdot 10 + b_2 \cdot 3 \cdot 34$$

$$7.432,9 = 30b_0 + 102b_2 \dots \dots \dots (2)$$

4. Substitusikan persamaan (1) dan (2)

$$2 \times \dots \dots 9.479,9 = 30b_0 + 60b_2 \dots \dots \dots (1)$$

$$1 \times \dots \dots 7.432,9 = 30b_0 + 102b_2 \dots \dots \dots (2) -$$

$$\hline 2.047 = -42 b_2$$

$$b_2 = -48,73$$

5. Distribusikan nilai b0

$$7.432,9 = 30b_0 + 102 (-48,73)$$

$$7.432,9 + 4970,46 = 30b_0$$

$$b_0 = 413,44$$



Lampiran 9. (Lanjutan)

Nilai b_0 , b_1 dan b_2 dimasukkan ke dalam rumus umum:

$$Y = b_0 + b_1x_j + b_2x_j^2$$

$$Y = b_0 + b_1U_j + b_2(U_j)^2$$

$$Y = 413,44 + \frac{69,36}{1}(x - 6) + \frac{(-48,73)}{1}(x^2 - 12x + 36)$$

$$Y = 413,44 + (69,36x - 416,16) + (-48,73x^2 + 584,76x - 1.754,28)$$

Menghasilkan persamaan :

$$Y = -48,73x^2 + 654,12x - 1757$$

Sehingga :

$$X = 4 \quad Y = 79,8$$

$$X = 5 \quad Y = 295,35$$

$$X = 6 \quad Y = 413,44$$

$$X = 7 \quad Y = 434,07$$

$$X = 8 \quad Y = 357,24$$

Mencari titik puncak persamaan

Turunan pertama dari persamaan $Y = 0$ atau $Y' = 0$

$$Y = -48,73x^2 + 654,12x - 1924,49$$

$$Y' = -97,46x + 654,12$$

$$0 = -97,46x + 654,12$$

$$97,46x = 654,12$$

$$X = 6,71$$



Lampiran 9. (Lanjutan)

$$\text{Maka : } Y = -48,73x^2 + 654,12x - 1757$$

$$Y = -48,73 (6,71)^2 + 654,12 (6,71) - 1757$$

$$Y = 438,12$$

Diperoleh titik puncak : $(X, Y) = [(6,71);(438,12)]$

