

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK ISOLAT A2 DAN S2  
DARI AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT SEMBURAN LUMPUR LAPINDO**

**LAPORAN SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

Oleh :  
**MOCH HAFIZH ILMAN**  
NIM. 0910831007



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK ISOLAT A2 DAN S2  
DARI AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT SEMBURAN LUMPUR LAPINDO**

**LAPORAN SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

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

Oleh :  
**MOCH HAFIZH ILMAN**  
NIM. 0910831007



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMOFILIK ISOLAT A2 DAN S2  
DARI AIR LUMPUR DAN SEDIMEN PADAT SEMBURAN LUMPUR LAPINDO**

Oleh :  
**MOCH HAFIZH ILMAN**  
NIM. 0910831007

Telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal : 11 Februari 2014  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes  
NIP. 19611022 198802 2 001  
Tanggal :

Dosen Penguji II

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

Dosen Pembimbing I

Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D  
NIP. 19640919 198903 1 002  
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Kartini Zaelani, MS  
NIP. 19550503 198503 2 001  
Tanggal :

Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP

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

## PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, 11 Februari 2014

Mahasiswa

Moch Hafizh Ilman



## RINGKASAN

**Moch Hafizh Ilman**, Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Isolat A2 dan S2 Dari Air Lumpur dan Sedimen Padat Semburan Lumpur Lapindo. (Di bawah Bimbingan **Prof. Ir. Sukoso M.Sc Ph.D** dan **Dr. Ir. Kartini Zaelani MP**).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri termofilik dari air lumpur dan sedimen padat semburan lumpur Lapindo, penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang dengan melakukan isolasi bakteri termofilik yang tumbuh dominan dari sampel yang di ambil dari pusat semburan lumpur lapindo lalu diamati morfologi koloni dan sel bakteri dan dilakukan pengujian sifat biokimia pada isolat bakteri dengan cara konvensional dan menggunakan *Microbact Identification Kits*, dan hasil dari identifikasi spesies bakteri dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sukoso di Universitas Kagoshima Jepang yang menggunakan 16S rDNA. Untuk kondisi semburan lumpur yaitu kadar logam berat dilakukan pengujian di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri termofilik.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan utama yang terdiri dari air dan sedimen yang didapatkan dari kawasan lumpur lapindo Sidoarjo yang berjarak 200 meter dari pusat semburan, media pertumbuhan yang meliputi Nutrient Agar (NA) dan Nutrient Broth (NB), media uji biokimia yang meliputi simon sitrat agar, MR-VP broth, Sulfit Indol Motility Agar, tripton sugar iron agar, urea agar, nitrat broth, reagen uji biokimia yang meliputi KOH 3%, *Metyl Red*, kovac,  $\alpha$ -naftol, mineral oil, TDA, reagen pewarnaan gram yang terdiri dari kristal ungu, iodin, aseton, akuades, alkohol 70%, bahan tambahan yang terdiri dari *blue tip* spiritus, kertas whattman no.42, sarung tangan, masker dan kertas saring, serta bahan tambahan yang digunakan untuk uji logam berat yang terdiri dari HCl, HNO<sub>3</sub>, Amonium persulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaIO<sub>4</sub>, diphenylkarbazid, dan dimethylgliaksim.

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif, yang digunakan untuk mempelajari gejala-gejala serta studi kasus yang masih perlu diteliti dan masih sangat kurang diketahui oleh masyarakat umum. Metode ini bertujuan untuk memformulasikan pertanyaan penelitian yang lebih tepat, sehingga hasil penelitian nanti dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan selanjutnya di masa mendatang. Peneliti mencoba untuk menggambarkan dan menjelaskan proses isolasi dan pendugaan identifikasi bakteri termofilik pada air dan sedimen di lumpur Lapindo Sidoarjo melalui karakterisasi isolat bakteri.

Hasil identifikasi bakteri termofilik yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo menurut hasil uji biokimia didapatkan pendugaan genus *Enterobacter sp.* Untuk kedua sampel. Untuk hasil uji *microbact identification kits* didapatkan hasil pendugaan spesies untuk kedua sampel adalah *Enterobacter agglomerans* dengan persentase ketepatan sebesar 86,50%. Dari hasil diatas dibandingkan dengan hasil identifikasi menggunakan uji DNA 16S-rDNA yang

dilakukan oleh Sukoso di Universitas Kagoshima didapatkan hasil untuk sampel air adalah *Marinobacter lutaensis* dan untuk sampel sedimen adalah *Halomonas shengliensis*. Bakteri tersebut mampu hidup di lingkungan dengan suhu tinggi yaitu 47°C dan kadar logam berat tinggi. Diharapkan perlu adanya penelitian lanjutan aktivitas enzim termotabil yang dihasilkan oleh bakteri *Enterobacter sp* yang dapat bermanfaat pada industri perikanan.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi yang berjudul Isolasi dan karakterisasi Bakteri Termofilik Isolat A2 dan S2 dari Air Lumpur dan Sedimen Padat Semburan Lumpur Lapindo.

Penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua Orang tua dan segenap keluarga yang banyak memberi dukungan moral.
2. Prof. Ir. Sukoso M.Sc Ph.D selaku dosen pembimbing I dan Ir. Dr. Ir. Kartini Zaelani MP selaku dosen pembimbing II penulis yang telah meluangkan waktunya dan membimbing penulis sehingga dapat menyelesaikan laporan ini secara menyeluruh.
3. Ir Yahya MP dan Dr.Ir. Dwi Setijawati M.Kes selaku dosen penguji yang telah memberi masukan untuk menyempurnakan laporan ini.
4. Staff dan laboran Laboratorium Mikrobiologi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang
5. Bapak Slamet Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
6. Bapak Darwin Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang
7. Semua teman-teman yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan skripsi ini.

Demikian laporan skripsi yang dapat penulis sampaikan, atas kerjasamanya penulis mengucapkan terima kasih.

Malang, Februari 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

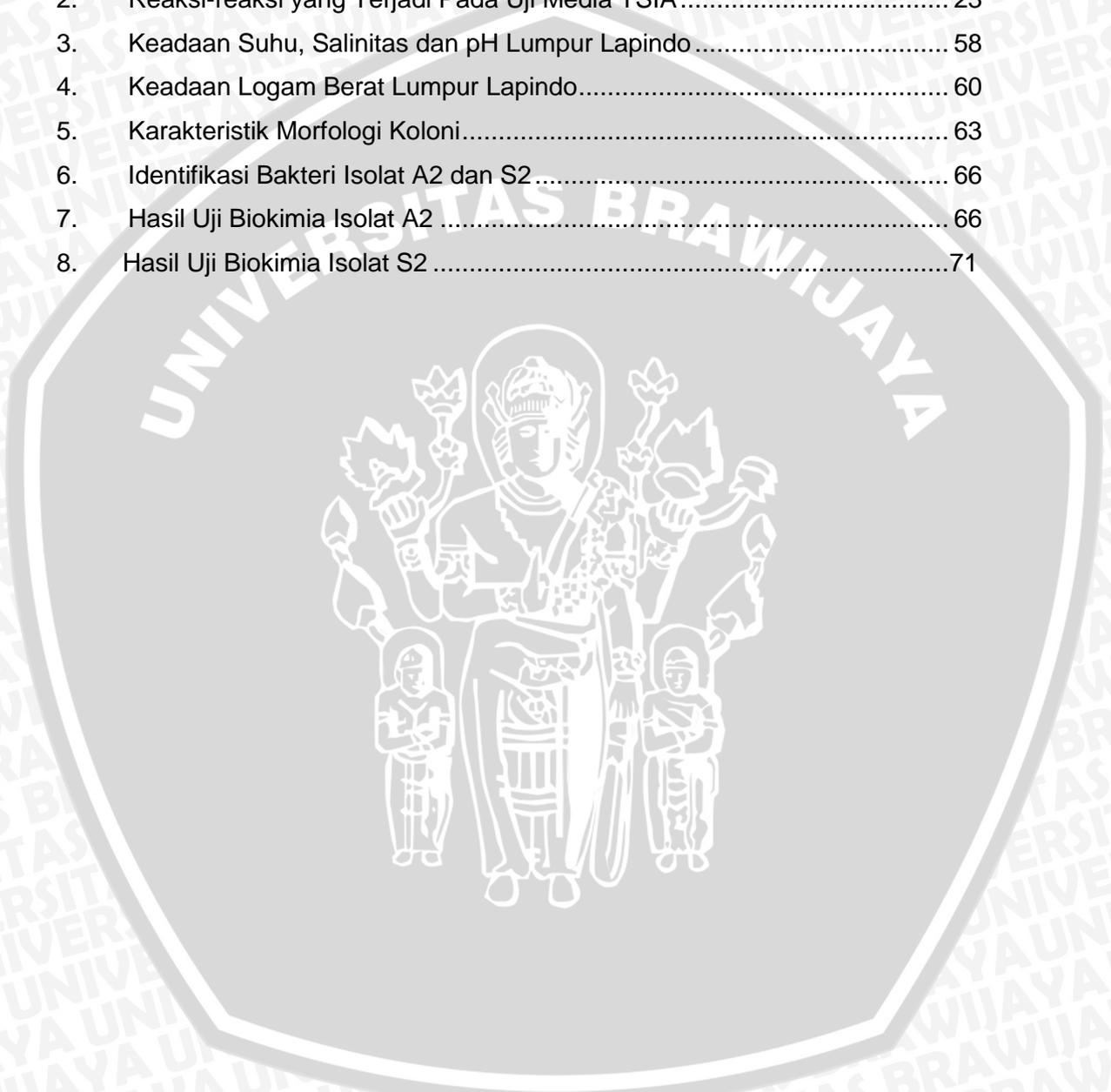
	Halaman
Lembar Judul .....	ii
Lembar Pengesahan .....	iii
Lembar Pernyataan Orisinalitas .....	iv
Ringkasan .....	v
Kata Pengantar .....	vii
Daftar Isi .....	viii
Daftar Tabel .....	x
Daftar Gambar .....	xi
Daftar Lampiran .....	xii
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.4. Kegunaan Penelitian .....	4
1.5. Waktu dan Tempat Penelitian .....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1. Definisi Bakteri .....	6
2.1.1 Morfologi Sel Bakteri .....	7
2.1.2 Struktur Halus Sel Bakteri .....	8
2.1.3 Dinding Sel .....	10
2.2. Faktor Pertumbuhan Bakteri .....	11
2.3. Bakteri Termofilik .....	12
2.4. Enzim Termostabil .....	13
2.5. Kultivasi Bakteri .....	16
2.6. Isolasi Bakteri .....	18
2.7. Identifikasi Bakteri .....	19
2.7.1 Morfologi Bakteri .....	19
2.7.2 Pewarnaan Gram .....	21
2.7.3 Uji Biokimia .....	22
2.7.4 <i>Microbact Identification Kits</i> .....	29
2.8 Uji 16S rDNA .....	30
2.9 Salinitas .....	32
2.10 Logam Berat dan Uji Logam Berat .....	33
2.11 Lumpur Panas Lapindo .....	36
2.12 Air .....	37
2.13 Padatan Lumpur (Sedimen) .....	38
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>40</b>
3.1. Materi Penelitian .....	40
3.1.1 Bahan Penelitian .....	40
3.1.2 Alat Penelitian .....	40
3.2. Metode Penelitian .....	41
3.3. Prosedur Penelitian .....	42

3.3.1 Pengambilan Sampel .....	42
3.3.2 Pengukuran Parameter Fisika Dan Kimia Lingkungan .....	43
3.3.3 Kultur Bakteri .....	50
3.3.4 Isolasi Bakteri Target .....	51
3.3.5 Uji karakteristik Bakteri.....	52
3.3.5.1 Morfologi Koloni .....	52
3.3.5.2 Morfologi Sel Bakteri .....	52
3.3.5.3 Uji Biokimia .....	53
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>58</b>
4.1. Kondisi Lingkungan Lumpur Lapindo .....	58
4.2. Morfologi Koloni bakteri .....	63
4.3. Identifikasi Isolat Bakteri .....	66
4.3.1 Isolat Air.....	66
4.3.2 Isolat Sedimen .....	71
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>77</b>
5.1. Kesimpulan.....	77
5.2. Saran.....	78
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>79</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>86</b>



**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
1. Pewarnaan Gram.....	21
2. Reaksi-reaksi yang Terjadi Pada Uji Media TSIA.....	23
3. Keadaan Suhu, Salinitas dan pH Lumpur Lapindo.....	58
4. Keadaan Logam Berat Lumpur Lapindo.....	60
5. Karakteristik Morfologi Koloni.....	63
6. Identifikasi Bakteri Isolat A2 dan S2.....	66
7. Hasil Uji Biokimia Isolat A2.....	66
8. Hasil Uji Biokimia Isolat S2.....	71



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Flagella Pada Bakteri.....	9
2. Dinding Sel Gram Negatif dan Positif.....	10
3. Reaksi Fermentasi Sitrat Secara Enzimatik.....	25
4. Reaksi Fermentasi Glukosa dalam Media MR Menjadi Asam Campuran	25
5. Reaksi Fermentasi Glukosa Dalam Medium VP Menjadi Senyawa Non-Asam.....	26
6. Deteksi Senyawa Asetilmetilkarbinol Menggunakan Pereaksi $\alpha$ -naftol.....	26
7. Reaksi dalam Biakan Urease.....	27
8. Reaksi Oksidasi Triptofan Oleh Enzim Triptofanase.....	28
9. Reaksi Indol Dengan Komponen Dalam Pereaksi Kovac.....	28
10. Pengambilan Sampel.....	43
11. pH-meter.....	43
12. Pengukuran Suhu.....	44
13. Handrefraktometer.....	45
14. <i>Atomic Absorbtion Spechtrophotometer</i> .....	46
15. Spektrofotometer.....	48
16. Kondisi semburan Lumpur Lapindo.....	60
17. Foto Koloni Air dan sedimen Pengenceran $10^{-5}$ sampai $10^{-7}$ .....	64
18. Foto Sel Isolat Bakteri Air dan Sedimen.....	65
19. Foto Koloni dan Foto Sel <i>Enterobacter agglomerans</i> pada pembesaran 1000x.....	67
20. Foto Koloni dan Foto Sel <i>Enterobacter agglomerans</i> pada pembesaran 1000x.....	72

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian.....	86
2. Pengambilan sampel .....	87
3. Pengukuran Parameter Fisika dan Kimia Lingkungan.....	88
4. Kultur Bakteri Dominan .....	93
5. Isolasi Bakteri Target .....	95
6. Uji karakterisasi Bakteri .....	98
7. Pembuatan Blanko.....	106
8. Gambar Pengujian Biokimia.....	107
9. Pengujian Salinitas .....	110
10. Hasil Pengujian Kadar Logam Berat Air dan Sedimen Lumpur Lapindo.....	111



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bakteri adalah sel prokariot yang khas, bersifat uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya. Sel bakteri ada yang berbentuk bola, batang atau spiral. Umumnya bakteri memiliki diameter antara 0,5-2,5  $\mu\text{m}$  (picometer) (Pelczar dan Chan, 1986). Bakteri adalah yang paling berkelebihan dari semua organisme. Bakteri tersebar (berada di mana-mana) di tanah, air, dan sebagai simbiosis dari organisme lain. Banyak patogen merupakan bakteri. Kebanyakan bakteri berukuran kecil, biasanya hanya berukuran 0,5-5  $\mu\text{m}$ , meski ada jenis yang dapat mencapai diameter 0,3  $\mu\text{m}$  contohnya adalah genus *Thiomargarita*. Umumnya bakteri memiliki dinding sel, seperti sel hewan dan jamur, tetapi dengan komposisi yang sangat berbeda. Banyak bakteri yang bergerak menggunakan flagela, yang berbeda dalam strukturnya dari flagela kelompok lain (Pelczar dan Chan, 1986).

Bakteri dibagi menjadi beberapa kelas berdasarkan suhu dimana mereka dapat tumbuh dengan baik. Bakteri dengan suhu yang rendah adalah psikrofil yang dapat tumbuh baik hingga suhu  $-10^{\circ}\text{C}$  dan suhu optimum  $15^{\circ}\text{C}$  atau lebih rendah. Mesofil dapat tumbuh pada suhu  $20-45^{\circ}\text{C}$ . Termofil tumbuh dengan subur pada suhu di atas  $45^{\circ}\text{C}$ , dan beberapa hidup pada suhu atau di atas titik didih air. Strain bakteri termofilik telah diidentifikasi dengan rentang suhu optimum dari  $55^{\circ}\text{C}$  hingga  $105^{\circ}\text{C}$  (Ginting, 2009).

Mikroorganisme termofil dapat dengan mudah ditemukan pada daerah dengan aktivitas geothermal, seperti daerah pegunungan berapi, sumber air panas, dan juga tempat cadangan minyak bumi atau batubara (Burg, 2003). Mikroorganisme ini sangat menarik untuk dikaji baik dari sudut pandang ilmu

dasar maupun terapan. Bidang penelitian dasar yang berhubungan yaitu biologi molekuler, genetika, biokimia, evolusi, taksonomi, ekologi dan asal usul kehidupan. Dari sudut pandang terapan atau bioteknologi, termofil merupakan sumber enzim-enzim yang unik dengan sifat luar biasa, khususnya yang tahan suhu tinggi (Brock, 1986).

Mikroorganisme, sebagaimana halnya makhluk hidup lainnya menyesuaikan diri dengan lingkungan tempat mereka hidup. Organisme termofilik mengandung protein yang bersifat termostabil dan tahan terhadap denaturasi dan proteolisis (Kumar *et al.*, 2001). Membran sel termofilik dibentuk oleh asam lemak jenuh, asam lemak melengkapinya suatu lingkungan hidrofobik untuk sel dan menjaga kekakuan sel untuk hidup pada suhu yang meningkat (Herbert *et al.*, 1992).

Bakteri termofilik merupakan contoh mikroba yang prospektif dalam aplikasi bidang pangan dan industri. Salah satu penerapannya yang telah dilakukan adalah sebagai agen aktif dalam fermentasi bersuhu tinggi, proses pengolahan limbah dan proses pelarutan mineral (Lestari, 2000).

Bakteri sebagai salah satu mikroorganisme yang berperan sebagai penghasil enzim yang paling banyak digunakan dibanding tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, bakteri dianggap lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang relatif murah, kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik dapat diatur serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim seperti pada suhu tinggi sangat menguntungkan dibidang industri dan penelitian ilmiah (Lestari, 2000).

Mikroorganisme yang hidup di lumpur lapindo juga memiliki kemampuan untuk hidup dalam lingkungan yang terkontaminasi logam berat disebabkan oleh sejumlah mekanisme pertahanan yang dikembangkan mikroorganisme dalam

mengatasi toksisitas logam berat. Menurut Gadd (1990), menyebutkan bahwa mekanisme pertahanan tersebut dapat melalui: Presipitasi atau pembentukan kompleks ekstraseluler, menurunkan permeabilitas logam atau transport logam melewati membran sel, kompartementalisasi intraseluler antara lain melalui penumpukan dalam vakuola dan detoksifikasi melalui sejumlah reaksi kimia dalam sel.

Lokasi semburan lumpur panas lapindo merupakan lingkungan yang memungkinkan untuk dilakukan isolasi bakteri untuk mendapatkan isolat bakteri termofilik, karena semburan lumpur panas lapindo memiliki suhu yang tinggi yaitu di atas 45°C. Menurut Herawati (2007), Banyak para ahli geologi yang menganalogikan semburan lumpur panas Lapindo dengan gejala alam yang disebut gunung lumpur / *mud volcano*. *Mud Volcano* adalah suatu gunung api lumpur yang berbentuk suatu kerucut tanah liat dan lumpur berukuran kecil, yang pada umumnya kurang dari 1-2 m tingginya. Gunung api lumpur kecil ini terbentuk dari campuran air panas dan sedimen halus (tanah liat dan lumpur).

Isolasi bakteri ini dilakukan pada lokasi semburan lumpur panas lapindo yang terletak pada Desa Renokenongo Kecamatan Porong Kabupaten Sidoarjo Jawa Timur, selama ini semburan lumpur lapindo hanya menimbulkan kesan negatif mulai dari keadaan sosial para korbannya sampai ke ancaman pencemaran pada ekosistem lingkungan sungai porong. Tetapi disini lain bencana lumpur lapindo juga mempunyai manfaat yaitu pemanfaatan bakteri termofilik yang tumbuh pada lingkungan suhu tinggi, enzim dari bakteri termofilik diketahui banyak digunakan pada industri pengolahan. Selain itu semburan lumpur lapindo juga dilaporkan mengandung logam berat yang cukup tinggi, sehingga bakteri yang tumbuh juga merupakan bakteri yang tahan logam berat yang banyak diteliti kemampuannya dalam mendegradasi kandungan logam

berat yang dikenal dengan istilah bioremediasi, hal ini dapat dikembangkan dalam pengendalian limbah industri yang mengandung logam berat. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui spesies bakteri apa yang tumbuh pada air lumpur dan padatan lumpur pada kondisi lingkungan semburan lumpur panas lapindo dengan cara isolasi bakteri lalu mengidentifikasi spesies melalui morfologi koloni dan sel bakteri serta identifikasi melalui pengujian *Microbact Identification Kits* yang hasilnya dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Sukoso di Universitas Kagoshima Jepang dengan menggunakan pengujian 16S rDNA.

### 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana kondisi lingkungan semburan lumpur lapindo
2. Spesies bakteri apa yang terdapat pada air lumpur dan padatan lumpur lingkungan semburan lumpur panas lapindo.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui kondisi lingkungan semburan lumpur lapindo
2. Untuk mengetahui spesies bakteri yang hidup pada air lumpur dan padatan lumpur semburan lumpur panas lapindo.

### 1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi lingkungan semburan lumpur panas lapindo serta mengetahui jenis spesies bakteri yang

dapat tumbuh pada air lumpur dan sedimen padat semburan lumpur panas lapindo dan manfaatnya pada industri perikanan.

### 1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Oktober 2012 sampai September 2013. Pengambilan sampel penelitian di lokasi semburan lumpur lapindo yaitu Desa Renokenongo Kecamatan Porong Kabupaten Sidoarjo pada September 2012 dan dilakukan berulang saat dibutuhkan. Penelitian laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang, serta beberapa pengujian pada Universitas Kagoshima Jepang, Toyohashi University of Technology Jepang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Definisi Bakteri

Bakteri adalah sel prokariot yang khas, bersifat uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya. Sel bakteri ada yang berbentuk bola, batang atau spiral. Umumnya bakteri memiliki diameter antara 0,5-2,5  $\mu\text{m}$  (picometer) (Pelczar dan Chan, 1986). Bakteri adalah yang paling berkelebihan dari semua organisme. Bakteri tersebar (berada di mana-mana) di tanah, air, dan sebagai simbiosis dari organisme lain. Banyak patogen merupakan bakteri. Kebanyakan bakteri berukuran kecil, biasanya hanya berukuran 0,5-5  $\mu\text{m}$  (picometer), meski ada jenis yang dapat mencapai diameter 0,3 mm contohnya adalah genus *Thiomargarita*. Umumnya bakteri memiliki dinding sel, seperti sel hewan dan jamur, tetapi dengan komposisi yang sangat berbeda. Banyak bakteri yang bergerak menggunakan flagela, yang berbeda dalam strukturnya dari flagela kelompok lain (Pelczar dan Chan, 1986).

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas; uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran didalam sitoplasmanya. Sel-selnya khas, berbentuk bola, batang, atau spiral. Bakteri rata-rata berdiameter 1,5 sampai 2,5  $\mu\text{m}$ . Cara reproduksi terutama dengan pembelahan biner sederhana, yaitu suatu proses reproduksi aseksual (Waluyo, 2005).

Bakteri adalah makhluk haploid. Kromosomnya tidak memanjang seperti potongan-potongan benang, melainkan melingkar tak berujung-pangkal. Selanjutnya bakteri tidak mempunyai *nukleous*, tidak memiliki RE (*retikulum endoplasma*), tidak memiliki *mitokondria*, dan tidak memiliki *badan golgi*. Pada bakteri gram positif terdapat lipatan-lipatan plasmolema yang disebut dengan

*mesosom* yang diduga dapat berperan sebagai mitokondria (Dwidjoseputro, 2005).

Berdasarkan perbedaan komposisi dan dinding sel, bakteri dibedakan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif mempunyai struktur dinding sel yang tebal (15-80 pm) dan berlapis tunggal, dengan komposisi dinding sel terdiri dari lipid, peptidoglikan, dan asam tekoat. Kandungan lipid pada bakteri gram positif relatif rendah (1-4 %), peptidoglikan sebagai lapisan tunggal memiliki jumlah lebih dari 50 % berat kering sel bakteri. Bakteri gram positif rentan terhadap penisilin, namun lebih resisten gangguan fisik. Persyaratan nutriennya relatif lebih rumit pada banyak spesies (Pelczar dan Chan 1986).

### 2.1.1 Morfologi Sel Bakteri

#### - Ukuran sel bakteri

Satuan ukuran sel bakteri adalah  $\mu\text{m}$  (micrometer),  $1 \mu\text{m} = 10^{-3}$  atau 0,001 mm. kelompok bakteri yang disebut *Mycoplasma* berukuran amat kecil (0,1-0,3  $\mu\text{m}$ ) sehingga tidak dapat dilihat dengan mikroskop cahaya. Bakteri yang umum digunakan di laboratorium berukuran 2,0-5,0x0,5-1,0  $\mu\text{m}$ .

#### - Bentuk Bakteri

Sel – sel individual bakteri dapat berbentuk bulat atau elips, silindris, atau batang, ataupun melengkung atau spiral, masing-masing dengan variasinya. Genus bakteri ada yang dinamakan sesuai dengan bentuknya. Pada beberapa bakteri terdapat bentuk yang tidak biasa, yaitu *spirochete*, bentuk seperti tunas dan *appendages*, serta berbentuk benang/*filamentous*.

Sel bakteri yang berbentuk bola atau elips disebut *coccus* (kokus). Kebanyakan bakteri berbentuk bulat, tertata dalam berbagai variasi yang khas tergantung spersiesnya. *Micrococcus* adalah genus bakteri yang terdiri dari sel

bulat dan tunggal. *Diplococcus* merupakan bakteri bulat sepasang – sepasang. *Tetracoccus* adalah bakteri berbentuk bulat empat – empat. *Staphylococcus* adalah bakteri yang berbentuk bulat bergerombol menyerupai untaian buah anggur. *Streptococcus* adalah bakteri yang berbentuk bulat tersusun dalam rantai. *Sarcina* adalah bakteri berbentuk bulat yang berjumlah 8 yang tersusun sebagai kubus (Madigan, 2006)

### 2.1.2 Struktur Halus Sel Bakteri

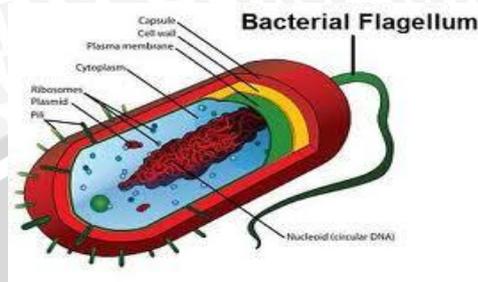
Struktur halus sel bakteri terdiri atas *appendages* (struktur tambahan), dinding sel dan bagian dalam dinding sel. Seiring dengan perkembangan mikroskop elektron, struktur halus sel bakteri sudah diketahui dengan baik. Dinding sel, membrane sel, dan nukleoid terdapat pada seluruh jenis bakteri. Bagian-bagian lain hanya terdapat pada jenis bakteri tertentu. *Appendages* terdapat diluar dinding sel, terdiri atas flagel, pili/fimbriae, kapsul dan selongsong.

#### - Flagel

Flagel merupakan *appendages* seperti rambut. Ujungnya mencuat, pangkalnya menembus dinding sel dan bermula dari badan basal. Flagel menyebabkan motilitas pada bakteri. Flagel terdiri dari badan basal, struktur seperti kait dan filament yang panjang. Panjang flagel beberapa kali panjang selnya. Diameternya 10-20 nm, jauh lebih kecil dari diameter sel bakteri. Flagel disusun oleh protein yang dinamakan flagein.

Jumlah dan letak flagel berbeda untuk jenis bakteri yang berbeda. *Eschericia coli*, bakteri coliform perairan, flagelnya peritrikh yaitu flagelnya terdapat di seluruh permukaan sel. *Pseudomonas aeruginosa* flagelnya bersifat monotrikh, yaitu terdapat satu buah flagel di salah satu ujung permukaan selnya. *Pseudomonas fluorencens* bersifat lofotrikh yaitu terdapat lebih dari satu buah

flagel di salah satu ujung permukaan selnya. Bakteri amfitrikh mempunyai flagel pada kedua ujung permukaan selnya. Namun tidak semua bakteri memiliki flagel, bakteri tak berflagel disebut atrikh (Madigan, 2006)



**Gambar 1. Flagella Pada Bakteri**

- **Pili dan Fimbrae**

Pili dan fimbrae merupakan appendages seperti rambut yang lebih kecil dan lebih pendek dari flagel. Banyak terdapat pada bakteri gram negatif. Pili dijumpai pada bakteri motil (ex: *Shigella flexneri*) maupun non motil (ex: *Salmonella typhi*). Pili mampu mentransfer sejumlah gen kepada bakteri lain. Fimbrae berfungsi sebagai alat untuk melekatkan diri pada sel inang.

- **Kapsul**

Beberapa bakteri selnya dibungkus oleh kapsul atau lapisan lender. Kapsul dapat lebih tebal atau lebih tipis daripada selnya. Bahan pembentuk kapsul diekskresikan dari sel. Komponen kapsul dapat larut dalam media tumbuhnya dan menyebabkan media tersebut berlendir. Bagi sel bakteri, kapsul berfungsi sebagai gudang makanan dan pelindung. Bakteri patogen yang berkapsul bila kehilangan seluruh kapsulnya tidak akan mampu menginfeksi. Disini kapsul melindungi bakteri dari sistem pertahanan tubuh inang.

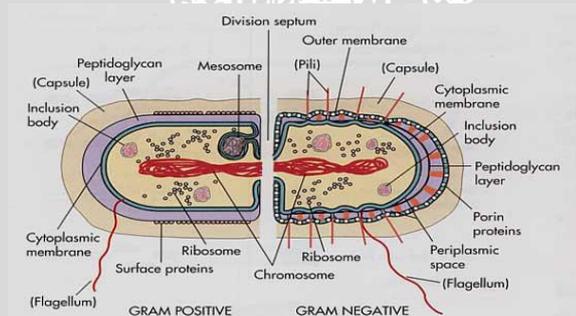
- **Selongsong**

Beberapa jenis bakteri contohnya dari genus *Leptotrix* dan *Crenotrix* yang hidup di badan air (tawar atau asin), terbungkus dalam selongsong. Selongsong terbentuk dari oksida besi dan mangan yang mengendap di sekeliling selnya

sebagai produk kegiatan metabolismenya. Bakteri akan tampak seperti filament dengan adanya selongsong, padahal sel-sel bakteri tinggal di dalam selongsong tersebut. Bakteri sering keluar dari ujung selongsong yang terbuka dan membentuk selongsong baru (Unila, 2010).

### 2.1.3 Dinding sel

Dinding sel merupakan struktur yang amat kaku dan member bentuk pada sel. Dinding sel berfungsi melindungi bagian didalamnya. Tebal dinding sel sekitar 10-35 nm, walaupun ada yang amat tebal. Dinding sel dapat merupakan 10-40% berat kering sel. Kecuali Mycoplasma, seluruh bakteri memiliki dinding sel yang kaku.



**Gambar 2. Dinding Sel Gram Negatif dan Positif**

Menurut Pelczar dan Chan (1986), berdasarkan perbedaan komposisi dan dinding sel, bakteri dibedakan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif mempunyai struktur dinding sel yang tebal (15-80 pm) dan berlapis tunggal, dengan komposisi dinding sel terdiri dari lipid, peptidoglikan, dan asam tekoat. Kandungan lipid pada bakteri gram positif relatif rendah (1-4 %), peptidoglikan sebagai lapisan tunggal memiliki jumlah lebih dari 50 % berat kering sel bakteri. Bakteri gram positif rentan terhadap penisilin, namun lebih resisten gangguan fisik. Persyaratan nutriennya relatif lebih rumit pada banyak spesies.

Menurut Pelczar dan Chan (1986), pada bakteri gram negatif, struktur dinding sel berlapis tiga dengan ketebalan yang tipis (10-15 nm). Komposisi dinding sel terdiri dari lipid dan peptidoglikan yang berada di dalam lapisan kaku sebelah dalam dengan jumlah sekitar 10 % dari berat kering. Kandungan lipid pada bakteri gram negatif cukup tinggi, yaitu 11-22 %. Bakteri gram negatif ini umumnya kurang rentan terhadap penisilin dan kurang rentan terhadap gangguan fisik. Persyaratan nutrisi bakteri gram negatif relatif lebih sederhana dari bakteri gram positif.

## 2.2 Faktor Pertumbuhan Bakteri

Pola pertumbuhan, laju pertumbuhan, dan jumlah total bakteri dipengaruhi oleh suhu, gas oksigen, dan pH. Setiap spesies bakteri tumbuh pada kisaran suhu tertentu. Bakteri psikrofil mampu tumbuh pada suhu minimum 0-5°C, optimum 5-15°C, dan maksimum 15-20°C. Bakteri mesofil dapat tumbuh pada suhu minimum 10-20°C, optimum 20-40°C, dan maksimum 40-45°C. Bakteri yang dapat tumbuh pada suhu minimum 25-45°C, optimum 45-60°C, dan maksimum 60-80 °C disebut dengan bakteri termofil (Lay, 1994).

Pertumbuhan bakteri juga dipengaruhi oleh adanya keberadaan gas atmosfer seperti oksigen dan karbondioksida. Terdapat empat kelompok besar bakteri, yaitu aerobik adalah organisme yang membutuhkan oksigen, anaerobik adalah organisme yang tidak memerlukan oksigen dalam hidupnya, anaerobik fakultatif adalah organisme yang dapat tumbuh dalam lingkungan aerobik maupun anaerobik, mikroaerofilik adalah organisme yang tumbuh dengan baik jika hanya ada sedikit oksigen dalam lingkungannya (Pelczar dan Chan, 1986).

Sebagian besar bakteri tumbuh dengan baik pada pH 6,5-7,5. Namun, terdapat sebagian bakteri yang mampu tumbuh pada lingkungan yang sangat

asam maupun sangat basa. Perubahan pH pada medium bakteri ini dapat disebabkan oleh senyawa yang dihasilkan bakteri tersebut selama pertumbuhannya. Untuk menjaga kondisi seperti pH awal, maka ke dalam medium biakan ditambahkan larutan penyangga. Beberapa senyawa yang berfungsi sebagai penyangga adalah pepton maupun kombinasi garam pospat (Pelczar dan Chan, 1986).

### 2.3 Bakteri Termofilik

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

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

hipertermofil, tumbuh antara kisaran suhu 80 °C dan 110 °C (saat ini suhu dianggap membatasi enzim dan struktur sel) (Kathleen, 2005).

Jenis bakteri *thermofil* tumbuh pada suhu diatas 40°C dengan kecepatan maksimum dan mencapai batas pada waktu 70°C (*Bacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces vulgaris*). Pertumbuhan optimum organisme thermo 1 ekstrim terletak pada suhu diatas 65°C (*Thermus acuaticus*), beberapa diantaranya masih mampu tumbuh pada suhu diatas 70°C (Beberapa jenis dari genus *Bacillus* dan *Clostridium*) diatas 80°C (*Sulfolobus acidocaldarus*) atau bahkan pada 105°C (*Phyrodicium oscultum*, bakteri anaerob sejati dan pereduksi belerang) (Schlegel,1994).

Mikroorganisme termofil dapat dengan mudah ditemukan pada daerah dengan aktivitas geothermal, seperti daerah pegunungan berapi, sumber air panas, dan juga tempat cadangan minyak bumi atau batubara (Burg, 2003). Mikroorganisme ini sangat menarik untuk dikaji baik dari sudut pandang ilmu dasar maupun terapan. Bidang penelitian dasar yang berhubungan yaitu biologi molekuler, genetika, biokimia, evolusi, taksonomi, ekologi dan asal usul kehidupan. Dari sudut pandang terapan atau bioteknologi, termofil merupakan sumber enzim-enzim yang unik dengan sifat luar biasa, khususnya yang tahan suhu tinggi (Brock, 1986).

Termofil sangat menarik untuk dikaji baik dari sudut pandang ilmu dasar maupun terapan. Bidang penelitian dasar yang berkaitan yaitu biologi molekuler, genetika, biokimia, evolusi, taksonomi, ekologi, dan asal usul kehidupan. Berdasarkan sudut pandang terapan atau bioteknologi, termofil merupakan sumber enzim-enzim yang unik dengan sifat spesifik, terutama yang tahan terhadap suhu tinggi. Contoh, penerapan enzim termostabil yang telah dilakukan

dalam bidang industry antara lain sebagai agen aktif dalam fermentasi bersuhu tinggi, proses pengolahan limbah dan proses pelarutan mineral (Lestari, 2000).

#### 2.4 Manfaat Bakteri Termofilik (Enzim Termostabil)

Bakteri termofilik banyak dimanfaatkan dalam bidang industri karena bakteri ini mampu menghasilkan enzim termostabil (stabil pada suhu panas), menurut Moszhaev (1993), enzim termostabil memungkinkan terjadinya proses pada suhu tinggi, yang jelas menguntungkan sebab memiliki reaktifitas yang tinggi, stabilitas yang tinggi, hasil yang lebih tinggi, viskositas yang rendah dan masalah kontaminasi yang lebih rendah. Enzim termostabil dapat diperoleh dari organisme mesofilik dan termofilik, bahkan psikrofil memiliki beberapa enzim termostabil (Adams *et al.*, 1995). Menurut Lestari (2000), contoh penerapan enzim termostabil yang telah dilakukan dalam bidang industri antara lain sebagai agen aktif dalam fermentasi bersuhu tinggi, proses pengolahan limbah dan proses pelarutan mineral.

Beberapa enzim termostabil yang dapat dihasilkan oleh bakteri termofilik adalah enzim protease, enzim lipase, enzim amylase dan enzim kitinase. Enzim merupakan suatu atau beberapa gugus polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi dan dengan demikian mempercepat proses reaksi. Sebagian besar enzim bekerja secara khas, yang artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim yang bersifat tetap. Sebagai contoh enzim  $\alpha$ -amilase hanya dapat digunakan pada proses perombakan pati menjadi glukosa (Maton *et al.*, 1993).

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

Mikroorganisme termofilik dipercaya berpotensi menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil (Stabil suhu tinggi). Bakteri termofilik dapat diisolasi dari lingkungan alam yang bersuhu tinggi yang tersebar di seluruh dunia dan ditemukan di daerah yang memiliki gunung berapi aktif (Brock, 1985).

Enzim termostabil adalah enzim yang memiliki umur setengah (*half life*) lebih besar dari pada enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme mesofilik atau termofilik setelah diperlakukan suhu 50° C dalam waktu yang telah ditentukan. Adanya mikrobia termotoleran dan enzim yang termostabil akan lebih menguntungkan karena dapat mengendalikan kontaminan mikrobia lain, meningkatkan transfer masa, mengurangi viskositas dan lebih murah baik dalam skala produksi enzim maupun produksi sirup fruktosa (Hartiko, 1994).

Enzim termostabil memungkinkan terjadinya proses pada suhu tinggi, yang jelas menguntungkan sebab memiliki reaktifitas yang tinggi, stabilitas yang lebih tinggi, hasil yang lebih tinggi, viskositas yang lebih rendah dan masalah kontaminasi yang lebih rendah (Moszhaev, 1993). Enzim termostabil dapat diperoleh dari organisme mesofilik dan termofilik, bahkan psikrofil memiliki beberapa enzim termostabil (Adams *et al.*, 1995).

Pemakaian enzim termostabil disamping tahan terhadap denaturasi panas juga dapat meminimalkan resiko kontaminan dan dapat menggeser reaksi

kearah pembentukan produk (Rudiger, 1994). Penggunaan enzim termostabil dalam bioteknologi telah dapat menurunkan biaya operasi, disamping dapat meningkatkan reaksi-reaksi biokimianya (Aguilar *et al.*, 1998).

Dibidang industri enzim yang digunakan sebagian besar diisolasi dari mikroorganisme. Pemilihan mikroorganisme sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan yang diisolasi dari tanaman maupun dari hewan. Antara lain adalah sel mikroorganisme relative lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan relative lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki produksi yang lebih besar, biaya produksinya relative lebih rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek (Poernomo, 2003).

## 2.5 Kultivasi Bakteri

Kultivasi adalah usaha menumbuhkan mikroorganisme pada atau dalam medium kultur. Isolasi adalah usaha memisahkan mikroorganisme dari suatu bahan atau medium ke medium lain yang biasanya ditujukan untuk mendapatkan biakan sejenis (biakan murni) tak tercampur oleh mikroorganisme lain. Pekerjaan tersebut harus dipersiapkan dan dilakukan secara teliti, steril, dan aseptik. Aseptik artinya berusaha mencegah atau mengurangi terjadinya kontaminasi (terikutnya mikroorganisme lain yang tidak kita kehendaki ke dalam proses yang kita lakukan). Ruang tempat kultivasi dan isolasi mikroorganisme harus bersih, steril, dan bebas angin. Dinding dan alas yang basah dapat menyebabkan butir-butir debu menempel padanya, oleh karena itu ruang isolasi dapat diberi alas kain basah. Ruang tempat kultivasi dan isolasi ini biasanya berupa entas (ent case) atau laminar air flow yang sudah dilengkapi dengan penyaring udara.

Di laboratorium standar biasanya udara yang masuk ke dalam ruangan telah dilewatkan pada ventilasi yang selalu disinari dengan sinar ultraviolet (radiasi). Pemindahan mikroorganisme dari satu medium ke medium lainnya dapat dilakukan menggunakan jarum inokulasi (ose, jarum ent) atau menggunakan pipet. Pemindahan menggunakan jarum inokulasi dilakukan dengan ujung kawat (lebih baik kawat platina) yang sudah disterilkan dengan dibakar sampai pijar. Untuk mikroorganisme unisel atau bentuk cairan dapat menggunakan ujung kawat yang dibulatkan 1-3 mm (jarum ose) dan untuk mikroorganisme multisel menggunakan ujung kawat yang dilebarkan (jarum net). Pemindahan menggunakan pipet dapat dilakukan jika mikroorganisme berada dalam cairan. Pipet yang digunakan pun harus selalu steril (Purnomo, 2008).

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

Disamping kebutuhan nutrisi yang sesuai untuk kultivasi bakteri, juga diperlukan kondisi fisik yang memungkinkan untuk pertumbuhan optimum bakteri. Keberhasilan kultivasi bakteri tergantung pada kombinasi nutrisi dan lingkungan fisik yang sesuai. Beberapa persyaratan lingkungan fisik yang harus dipenuhi antara lain: suhu, atmosfer gas, derajat keasaman, serta beberapa kondisi khusus (Pelczar dan Chan 1986).

## 2.6 Isolasi Bakteri

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

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

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

## 2.7 Identifikasi Bakteri

Menurut Fardiaz (1988), karakterisasi merupakan dasar dalam identifikasi mikroba secara sistematis yang terdiri dari tiga tahap penting yaitu (a) klasifikasi: mengelompokkan mikroorganisme ke dalam grup; (b) nomenklatur: menetapkan nama ilmiah internasional yang tepat terhadap organisme; dan (c) identifikasi: penetapan organisme ke dalam klasifikasi yang diberi nama sesuai nomenklatur.

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

### 2.7.1 Morfologi Bakteri

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

Menurut Pelczar dan Chan (1986), Sel bakteri amat beragam panjangnya. Beberapa spesies, sel dapat berukuran 100 kali lebih panjang daripada sel

spesies yang lain. Berdasarkan morfologinya uji morfologi sel bakteri terbagi atas tiga kelompok yaitu:

### 1. Ukuran

Satuan ukuran bakteri adalah mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) yang setara dengan 1/1000 mm atau  $10^{-3}$  mm. Walaupun bakteri amat kecil ukurannya namun dapat diukur dengan mikroskop yang memiliki *mikrometer okular*. Misalnya dari segi kuantitatif suatu volume sebanyak 1  $\text{cm}^3$  mengandung sekitar setengah triliyun bakteri berbentuk batang berukuran rata-rata padahal berat bakteri hanya 1 gram.

### 2. Bentuk

Sel-sel bakteri dapat berbentuk seperti elips, bola, batang atau spiral. Masing-masing ciri ini penting dalam mencirikan morfologi suatu spesies. Bentuk sel bakteri yang berbeda-beda dapat disebabkan oleh sifat dari dinding sel nya.

### 3. Penataan

Spesies-spesies bakteri tertentu menunjukkan adanya pola penataan sel, seperti berpasangan, gerombol, rantai, atau filamen. **Kokus** memperlihatkan beberapa penataan yang berbeda-beda. Masing-masing penataan ini merupakan pola khusus bagi spesies kokus tertentu. Penataan sel tersebut jarang sekali terlihat disemua sel suatu spesies. Penataan yang terlihat paling banyak terjadi merupakan ciri yang penting. **Basilus** tidak menata dirinya dalam berbagai pola seperti yang khas dijumpai pada kokus. Basilus yang menyebabkan difteri cenderung untuk membentuk kelompok-kelompok sel yang berdampingan seperti batang korek api. Basilus tuberkulosis dapat dijumpai dalam suatu penataan tiga basilus yang terkesan membentuk huruf Y. Sel-sel

beberapa spesies akuatik menata dirinya dalam bentuk roset. **Spiral** sering dijumpai sebagai sel tunggal.

### 2.7.2 Pewarnaan Gram

Menurut Pelczar dan Chan (1986), pewarnaan gram merupakan salah satu teknik pewarnaan diferensial yang paling penting dan paling luas digunakan untuk bakteri. Dalam proses pewarnaan gram bakteri yang terfiksasi dikenai larutan-larutan secara berurutan yaitu ungu kristal, larutan yodium, alkohol (bahan pemucat), dan safranin. Dalam uji pewarnaan gram bakteri dibagi atas dua kelompok yaitu *bakteri gram positif* yang mampu mempertahankan zat warna ungu kristal sehingga tampak ungu tua dan *bakteri gram negatif* yang tampak berwarna merah karena kehilangan zat warna ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol dan menyerap zat warna merah safranin.

**Tabel 1. Pewarnaan Gram**

No.	LARUTAN DAN URUTAN PENGGUNAANNYA	REAKSI DAN TAMPANG BAKTERI	
		Gram Positif	Gram Negatif
1.	Ungu Kristal (UK)	Sel berwarna ungu	Sel berwarna ungu
2.	Larutan Yodium (Y)	Kompleks UK-Y terbentuk didalam sel; sel tetap berwarna ungu.	Kompleks UK-Y terbentuk didalam sel; sel tetap berwarna ungu.
3.	Alkohol	Dinding sel mengalami dehidrasi, pori-pori menciut; daya rembes dinding sel dan membran menurun, UK-Y tak dapat keluar dari sel; sel tetap ungu	Lipid terekstraksi dari dinding sel, pori-pori mengembang, kompleks UK-Y keluar dari sel. Sel menjadi tak berwarna.
4.	Safranin	Sel tak terpengaruh, tetap ungu	Sel menyerap zat pewarna ini, menjadi merah

Sumber: Pelczar (1986)

Berdasarkan Brown (2001) dan Kamplan M.L & Kaplan L., (1932), Isolat yang tumbuh dari media tersebut, diidentifikasi lanjut yaitu pewarnaan Gram dan uji biokimia. Pewarnaan Gram digunakan untuk menentukan kelompok bakteri

Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pada pewarnaan Gram, bakteri Gram positif akan memberikan warna ungu, hal ini disebabkan karena bakteri Gram positif mengalami denaturasi protein pada dinding selnya akibat pencucian dengan alkohol. Protein menjadi keras dan beku, pori-pori mengecil dan permeabilitas dinding sel berkurang sehingga kompleks kristal violet yang berwarna ungu dipertahankan dan bakteri akan tetap berwarna ungu. Sedangkan bakteri Gram negatif akan memberikan warna merah karena lipid yang terdapat di dalam dinding selnya akan larut pada waktu pencucian dengan alkohol sehingga pori-pori dan dinding sel akan membesar dan menyebabkan terlepasnya kompleks kristal violet yang diserap sebelumnya dan bakteri akan berwarna merah setelah diberikan safranin.

### 2.7.3 Uji Biokimia

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

Bakteri yang dapat menghidrolisis pati mempunyai aktivitas amilolitik, yaitu menghasilkan enzim amilase yang menghidrolisis pati menjadi molekul-molekul maltosa, glukosa, dan dekstrin (Hadioetomo, 1985). Jika bakteri dapat menghidrolisis pati, maka daerah sekeliling koloni akan menjadi bening kekuning-kuningan (Hartono 1995). Selain itu kemampuan bakteri menghasilkan enzim amolitik bertujuan memecah pati menjadi monosakarida yang dibutuhkan untuk metabolisme pada media dengan nitrogen (Buckle *et al.* 1978).

Uji fermentasi karbohidrat digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi dan memfermentasi karbohidrat dengan memproduksi asam atau asam dan gas. Kebanyakan mikroorganisme memperoleh energi melalui reaksi enzimatik yang memacu bioksidasi dari substrat, terutama karbohidrat (Cappuccino dan Sherman 1983).

Media *triple sugar agar* (TSA) merupakan medium yang digunakan untuk mengetahui pembentukan asam dan mengandung tiga macam gula, yaitu galaktosa, laktosa, sukrosa, indikator merah fenol, dan  $\text{FeSO}_4$ . Konsentrasi glukosa adalah 1/10 dari konsentrasi laktosa atau sukrosa agar fermentasi glukosa saja yang dapat terlihat. Jika glukosa dapat difermentasi maka kemungkinan ada fermentasi glukosa lain, seperti monosakarida selain glukosa disakarida (maltosa, laktosa, sukrosa dan lainnya) serta polisakarida (Salle, 1961). Uji  $\text{H}_2\text{S}$  juga digunakan media yang mengandung sulfur dan ion pada saat bakteri ditumbuhkan dalam media yang kaya akan asam amino mengandung sulfur seperti TSA maka terjadi desulfurisasi membentuk  $\text{H}_2\text{S}$   $\text{Fe}^{2+}$  kemudian  $\text{H}_2\text{S}$   $\text{Fe}^{2+}$  bereaksi dengan asam sulfida menghasilkan senyawa  $\text{FeS}$  yang berwarna hitam dan tidak larut dalam air (Lay, 1994).

**Tabel 2. Reaksi-Reaksi yang Terjadi Pada Uji Media TSA**

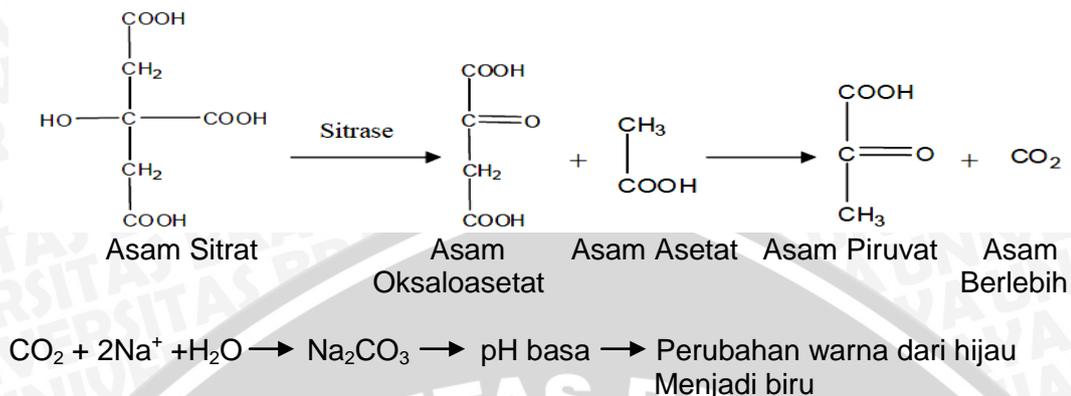
Bagian Bawah Agar		Bagian Atas Agar		Keterangan
Reaksi	Warna	Reaksi	Warna	
Basa	Merah	Basa	Merah	Tidak memfermentasi gula
Asam	Kuning	Basa	Merah	Fermentasi glukosa
Asam	Kuning	Asam	Kuning	Fermentasi laktosa dan atau sukrosa
Bagian bawah		Bagian atas		Keterangan
Agak pecah/terangkat ke atas		-		Produksi Gas
Agak berwarna hitam		-		Produksi $\text{H}_2\text{S}$

Sumber : Fardiaz (1989)

Uji sitrat dapat menggunakan sitrat-Koser berupa medium cair atau medium sitrat-Simon berupa medium padat. *Simon citrate Agar* merupakan

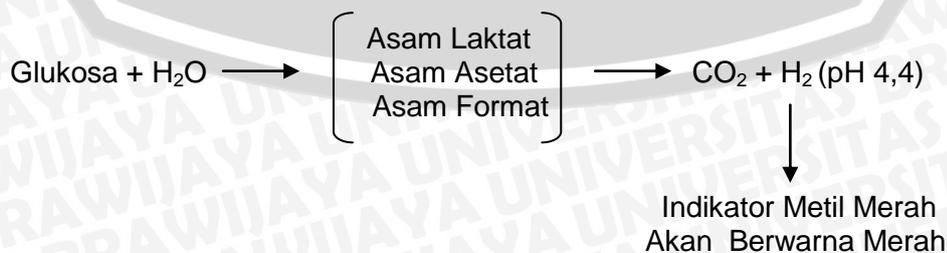
medium sintetik dengan Na-sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon,  $\text{NH}_4^+$  sebagai sumber N dan brom thymol blue sebagai indikator pH, sedangkan medium sitrat- Koser tidak mengandung indikator. Bila mikroorganisme mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Perubahan warna dari hijau menjadi biru menunjukkan bahwa mikroorganisme mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Cappuccino dan Sherman, 1983).

Uji sitrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi sitrat. Media *Simmons-Citrate* mengandung sitrat sebagai sumber karbon, garam amonium sebagai sumber nitrogen, dan indikator biru bromtimol yang berubah warna dari hijau menjadi biru dalam keadaan basa. Sitrat diubah menjadi asam oksaloasetat dan asam asetat oleh enzim sitrase, lalu produk antara tersebut diubah menjadi asam piruvat dan karbondioksida secara enzimatik. Selama reaksi ini berlangsung, keadaan media *Simmons-Citrate* berubah menjadi basa, karena karbondioksida berikatan dengan natrium dan air membentuk natrium karbonat yang bersifat basa (Cappucino dan Sherman, 1987).



**Gambar 3. Reaksi Fermentasi Sitrat Secara Enzimatis (Cappuccino, 1987)**

Uji merah metil (*methyl red test*) bertujuan untuk mengetahui kemampuan dari mikroorganisme untuk mengoksidasi glukosa dengan memproduksi asam dengan konsentrasi tinggi sebagai hasil akhirnya. Heksosa monosakarida glukosa merupakan substrat utama yang dioksidasi oleh semua organisme enteric sebagai sumber energinya. Uji *metil red* dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi glukosa dan menghasilkan campuran asam. Adanya campuran asam dapat menurunkan derajat keasaman media sampai pH 5,0 yang terdeteksi dengan perubahan warna indikator metil merah dari kuning menjadi merah. Pada umumnya, bakteri yang memberikan hasil uji MR positif adalah bakteri penghasil gas, karena bakteri ini menghasilkan enzim format hidrogenliase yang memecahkan asam format menjadi karbondioksida dan air (Cappuccino dan Sherman, 1983).



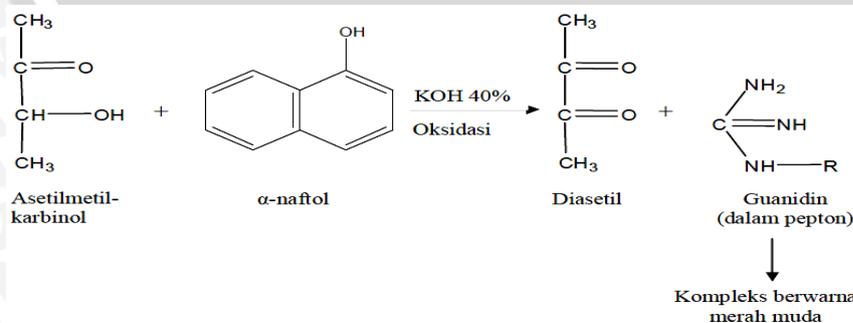
**Gambar 4. Reaksi Fermentasi Glukosa dalam Media MR Menjadi Asam Campuran**

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



**Gambar 5. Reaksi Fermentasi Glukosa Dalam Medium VP menjadi Senyawa Non-Asam**

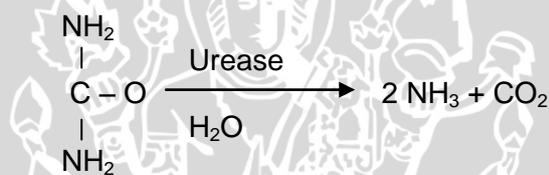
Senyawa 2,3-butandiol dapat dideteksi menggunakan pereaksi Barrit yang mengandung  $\alpha$ -naftol dan kalium hidroksida 40%. Penambahan pereaksi ini mengakibatkan perubahan warna media VP menjadi merah muda atau merah, jika terdapat asetilmetilkarbinol (asetoin).



**Gambar 6. Deteksi Senyawa Asetilmetilkarbinol Menggunakan Pereaksi Alpha-naftol**

Deteksi dilakukan terhadap asetilmetilkarbinol, karena senyawa ini hampir selalu terdapat bersama-sama 2,3-butandiol. Metode deteksi ini sering disebut metode tak langsung *Voges Proskauer* (Cappucino, 1987).

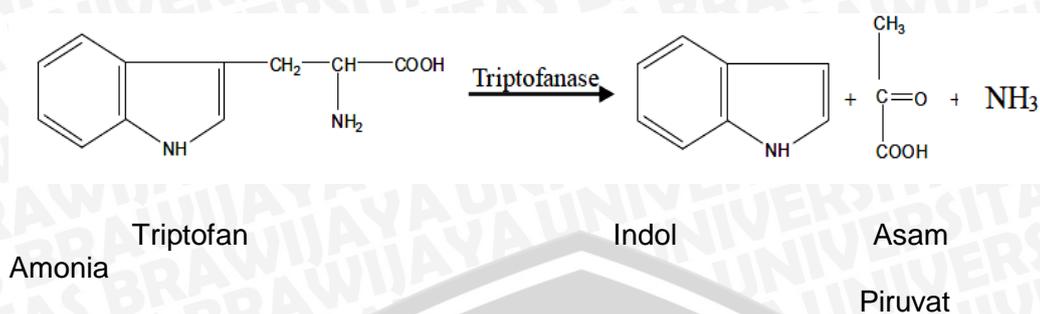
Uji urease bertujuan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi urea atau menghasilkan enzim urease. Enzim urease merupakan enzim hidrolisis yang memecah ikatan nitrogen dan karbon pada komponen amida seperti urea dan membentuk amonia yang menciptakan suasana basa (Cappuccino dan Sherman,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



**Gambar 7. Reaksi Dalam Biakan Urease**

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

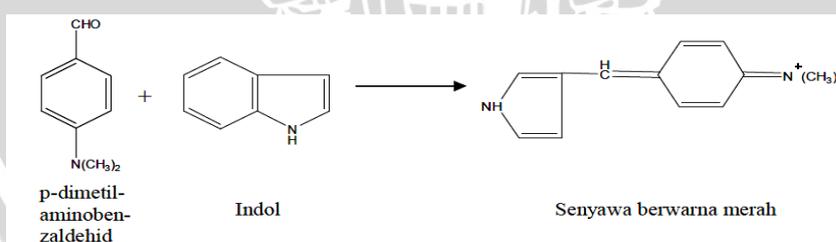
Uji motil digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk bergerak. Hasil uji positif, jika terdapat penyebaran pertumbuhan koloni bakteri di sekitar tempat inokulasi. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki alat gerak, misalnya flagel (Norman, 2005).



**Gambar 8. Reaksi Oksidasi Tryptofan Oleh Enzim Tryptofanase**

Uji indol digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendegradasi asam amino triptofan. Medium uji indol mengandung substrat triptofan, yaitu adalah asam amino esensial yang dapat teroksidasi oleh aktivitas enzimatik bakteri. Tryptofan diubah menjadi produk metabolik indol, asam piruvat, dan amonia oleh enzim triptofanase (Cappucino, 1987).

Keberadaan indol dideteksi dengan penambahan pereaksi Kovac yang mengandung p-dimetilaminobenzaldehid, butanol, dan asam hidroklorat. Indol yang diekstraksi ke lapisan pereaksi tersebut akan mengasamkan komponen butanol dan membentuk kompleks dengan p-dimetilaminobenzaldehid yang menghasilkan warna merah (Cappucino, 1987).



**Gambar 9. Reaksi Indol dengan Komponen Dalam Pereaksi Kovac**

Uji reduksi nitrat untuk menentukan kemampuan beberapa organisme dalam mereduksi nitrat menjadi nitrit atau diluar bentuk nitrit (Cahyadi,2007). Uji reduksi nitrat ditujukan untuk mengetahui keberadaan nitrit dalam media diuji dengan penambahan asam sulfanilat dan  $\alpha$ -naftilamin yang akan bereaksi dengan nitrit yang ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah

atau merah muda. Pada tabung yang tidak menunjukkan perubahan warna, ditambahkan bubuk Zn untuk melihat reduksi nitrat menjadi nitrit. Bila didapatkan nitrat dalam medium, maka kaldu berubah warna menjadi merah muda atau merah karena Zn mereduksi nitrat menjadi nitrit dan nitrit ini bereaksi dengan reagen uji dan terbentuk warna merah (Lay, 2004).

Menurut Suriawiria (1985), reduksi nitrat terjadi pada kebanyakan bakteri anaerob fakultatif dengan menggunakan nitrit. Reaksinya:



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

Dalam identifikasi dan determinasi suatu jenis bakteri yang belum diketahui dari suatu isolasi, tidak cukup berdasarkan sifat morfologinya saja. Perlu diteliti juga sifat fisiologi dan kimianya. Pengujian biokimia dari suatu mikroba meliputi semua aktifitas yang dapat menyebabkan antara lain : perubahan-perubahan karbohidrat, hidrolisis lemak, peruraian protein, reduksi bermacam-macam unsure, pembentukan pigmen, dan pengujian sifat biokimia khusus lainnya (Soetarto *et al.*, 2008).

#### 2.7.4 *Microbact Identification Kit*

Sistem *Microbact Identification Kit* Gram negatif digunakan untuk mengidentifikasi bakteri aerob dan fakultatif anaerob (*Enterobacteriaceae* dan bermacam-macam bakteri gram negatif). Prinsipnya setiap set terdiri dari 12 (12A, 12B, dan 12E) atau 24 (24E) uji biokimia. Secara klinis hanya menggunakan *Microbact*<sup>TM</sup> 12A Gram-negatif (jalur format) dan 12E (lempeng format) yang dapat digunakan sendiri untuk identifikasi apabila oksidase negatif dan nitrat positif. *Microbact*<sup>TM</sup> 12B Gram-negatif dapat digunakan bersama

dengan 12A untuk identifikasi oksidase positif, nitrat negatif, non fermentor glukosa (aneka bakteri gram negatif) dan *Enterobacteriaceae*. *Microbacti*™ 24E Gram negatif adalah kombinasi dari tes 12A (or12E) dan 12B dalam format lempeng. Adapun prosedurnya adalah dilakukan kultur murni pada isolat yang tumbuh selama 18-24 jam, melakukan tes oksidase untuk menentukan kits yang akan digunakan, tambahkan 4 tetes suspensi bakteri untuk setiap sumur, tambahkan 2 tetes *mineral oil* (MB1093A) ke sumur hitam, lalu inkubasi pada suhu  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam, setelah itu tambahkan reagen sesuai dengan jenis uji biokimianya (Oxoid, 2003).

## 2.8 Uji 16S rDNA

Identifikasi bakteri dapat dilakukan melalui penentuan 16S rDNA (gen 16S rRNA) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)-sekuensing. Segmen 16S rDNA bakteri diamplifikasi melalui PCR, lalu urutannya ditentukan melalui sekuensing. Urutan basa dari 16S rDNA tersebut dibandingkan dengan berbagai urutan 16S rDNA dari berbagai organisme prokariot pada *gene bank*. Perbandingan urutan 16S rDNA juga merupakan cara untuk mengetahui filogenetik dan evolusi diantara berbagai organisme prokariot, karena gen ini mengandung sejumlah besar urutan (sekuens) yang cenderung tetap (*highly conserved sequence patterns*) (Innis *et al.*, 1990).

Prosedur 16S rDNA PCR assay adalah DNA diekstrak dari sampel klinis menggunakan kit tersedia secara komersial dengan prosedur standar proteinase K. Sampel kemudian disimpan di suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  sampai assay dapat dilakukan. Masing-masing assay terdiri dari empat reaksi. Reaksi pertama adalah kontrol positif terdiri dari DNA pasien dari sampel klinis, primers untuk gen GP3DH, dan reagen PCR. GP3DH adalah gen u201D% dan u201Chousekeeping % untuk

memverifikasi bahwa DNA dari pasien u2019s % sampel dapat diperkuat. Reaksi kedua adalah sampel pasien, universal 16S rDNA primer dan reagen PCR. Reaksi ketiga adalah kontrol negatif yang terdiri dari reagen PCR dan 16S rDNA primer dengan tidak mentarget DNA. Reaksi akhir adalah kontrol positif yang terdiri dari DNA spesies bakteri yang diketahui (*E.coli* atau *salmonella typhimurium*), 16S rDNA primer dan reagen PCR. Produk PCR dilihat dengan menggunakan *eithidium bromida* pada 1% gel agarosa. Seluruh produk PCR gel dimurnikan dan diajukan untuk *sequencing*. *Sequencing* Nukleotida dilakukan menggunakan *sequencing* langsung (*Universal Bacterial PCR Fact Sheet*, 2004).

Berdasarkan Widayati *et al* (2007), Akhir-akhir ini banyak metode biomolekular yang memungkinkan untuk memonitor komunitas bakteri di alam tanpa diperlukan tahap isolasi dan kultivasi, yaitu dengan membuat sidik jari komunitas DNA (Ranjard *et al.* 2000). Sekuen DNA yang saat ini sering digunakan untuk memantau komunitas bakteri di alam adalah gen yang berhubungan dengan operon ribosomal (Ranjard *et al.* 2000). Sekuen gen 16S rRNA saat ini banyak digunakan untuk mempelajari keanekaragaman mikroba di alam (Griffiths *et al.* 2000). Jumlah spesies di dalam suatu komunitas (*species richness*) dan ukuran populasi spesies di dalam suatu komunitas (*species evenness*) merupakan dua parameter penting dalam menentukan struktur dan keanekaragaman dalam suatu komunitas (Liu *et al.* 1997). Penggunaan teknik *Amplified rDNA Restriction Analysis* (ARDRA) mempunyai keterbatasan yaitu tidak dapat menunjukkan kekerabatan dan juga tidak dapat untuk memperkirakan jumlah spesies di dalam suatu komunitas dan ukuran populasi spesies di dalam suatu komunitas (Liu *et al.*, 1997).

Penggunaan sekuen 16S rRNA memiliki kelemahan karena kadang-kadang kurang dapat membedakan dengan jelas suatu spesies dalam level

genus. Beberapa bakteri memiliki sifat fisiologis yang berbeda tetapi memiliki sekuen 16S rRNA yang sama. Berbeda dengan sekuen 16S rRNA, sekuen di antara 16S-23S rDNA yang dikenal dengan *ribosomal intergenic spacer* (RIS) memiliki panjang sekuen yang berbeda untuk masing-masing spesies, sehingga sekuen RIS dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan spesies dan strain dalam suatu spesies (Yu & Mohn 2001). Sekuen RIS juga dapat digunakan untuk mengungkap struktur komunitas bakteri di alam dengan cara membandingkan secara kualitatif pola pita yang dihasilkan dari pemisahan amplikon RIS pada agarose atau poliakrilamid. Pada akhirnya, analisis sekuen 16S rDNA yang merupakan bagian sekuen RIS dapat digunakan untuk mengetahui identitas bakteri dalam komunitas tersebut (Yu & Mohn 2001).

## 2.9 Salinitas

Salinitas adalah kadar garam terlarut dalam air. Satuan salinitas adalah per mil (‰), yaitu jumlah berat total (gr) material padat seperti NaCl yang terkandung dalam 1000 gram air laut (Wibisono, 2004). Menurut Nybakken (1992), salinitas merupakan bagian dari sifat fisikkimia suatu perairan, selain suhu, pH, substrat dan lain-lain. Salinitas dipengaruhi oleh pasang surut, curah hujan, penguapan, presipitasi dan topografi suatu perairan. Akibatnya, salinitas suatu perairan dapat sama atau berbeda dengan perairan lainnya, misalnya perairan darat, laut dan payau. Kisaran salinitas air laut adalah 30-35‰, estuari 5-35‰ dan air tawar 0,5-5‰

Salah satu besaran dasar dalam bidang ilmu kelautan adalah salinitas air laut. Salinitas seringkali diartikan sebagai kadar garam dari air laut, walaupun hal tersebut tidak tepat karena sebenarnya ada perbedaan antara keduanya. Definisi tentang salinitas pertama kali dikemukakan oleh C. FORCH; M.

KNUDSEN dan S.PX. SOREN-SEN tahun 1902. Salinitas didefinisikan sebagai berat dalam gram dari semua zat padat yang terlarut dalam 1 kilo gram air laut jikalau semua brom dan yodium digantikan dengan khlor dalam jumlah yang setara; semua karbonat diubah menjadi oksidanya dan semua zat organik dioksidakan. Nilai salinitas dinyatakan dalam g/kg yang umumnya dituliskan dalam ‰ atau ppt yaitu singkatan dari part-per-thousand (Arief, 1984).

Perbandingan salinitas menentukan sebagian besar komunitas kehidupan di air. Konsentrasi relatif tinggi NaCl pada air laut. Hanya sedikit kehidupan yang dapat hidup baik di air tawar dan air laut. Sebagai contoh bakteri dan jamur lebih memenuhi persyaratan tersebut di atas dibandingkan dengan tumbuhan hijau dan binatang. Salinitas dapat memperpanjang waktu generasi bakteri dan jamur. Seringkali salinitas juga menyebabkan perubahan morfologis dan fisiologis. Beberapa bakteri laut yang semula mempunyai bentuk batang atau bentuk koma pada keadaan salinitas optimal menjadi lebih panjang pada konsentrasi garam lebih dari 5% dan akhirnya menjadi bentukan filamen. Misalnya bakteri *luminous* yang diisolasi dari laut arab tumbuh optimal pada kadar garam lebih kurang 3% berbentuk batang, panjang 1-2 mm, pada kadar garam 1% berbentuk kokus, pada kadar garam 7,5% berbentuk filamen dengan panjang lebih dari 100 mm. Perubahan salinitas, misalnya karena tekanan menyebabkan perubahan mekanisme reproduktif. Sel-selnya masih dapat tumbuh walaupun tidak dapat membelah (Waluyo, 2009).

## 2.10 Logam Berat dan Uji Logam Berat

Istilah logam berat merujuk pada elemen/unsur logam atau metaloid yang memiliki massa jenis atau densitas yang tinggi dan biasanya bersifat sangat toksik meski pada konsentrasi sangat rendah. Namun karakteristik yang

sesungguhnya membedakan logam berat dengan kelompok unsur lainnya adalah sifat kimianya, termasuk aktivitasnya di dalam tubuh manusia. Meskipun beberapa logam berat dibutuhkan oleh tubuh manusia sebagai mikronutrien, pada kadar lebih tinggi dapat menyebabkan efek biotoksik pada manusia. Logam berat meliputi tembaga (*cuprum/Cu*), timbal (*plumbum/Pb*), kadmium (Cd), seng (*zinc/Zn*), raksa (*hydragyrum/Hg*), arsenik (As), perak (*argentum/Ag*), kromium (Cr), besi (*ferrum/Fe*), dan kelompok logam platina (Pt) (Ghifari, 2011).

Logam berat dapat menyebabkan dampak biotoksik seperti penyakit akut maupun kronis. Paparan kadmium misalnya, dapat menyebabkan kerusakan ginjal, tulang, serta sendi. Logam berat yang berdampak serupa adalah timbal dan arsenik. Keracunan timbal akut biasa disebut *plumbism* dengan gejala utama meliputi kram perut, gagal ginjal, kemandulan, hingga kerusakan otak permanen. Selain itu timbal juga merupakan faktor utama terjadinya gejala hiperaktif, penyimpangan tingkah laku, dan kesulitan belajar pada anak-anak. Sementara itu arsenik, pada tingkatan kronis dapat menyebabkan kehilangan nafsu makan, berlanjut pada pengurangan berat badan, serta gangguan gastrointestinal dan infeksi saluran cerna (Sofia, 2005).

Keberadaan logam berat di lingkungan perairan sangat berbahaya bagi kelangsungan makhluk hidup di dalamnya maupun bagi manusia. Logam berat dapat terakumulasi pada ikan, tumbuhan air, maupun organisme air lainnya. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya bioakumulasi logam berat pada manusia apabila manusia mengonsumsi organisme air maupun air yang tercemar logam berat tersebut (Ghifari, 2011).

Pengujian logam berat di laboratorium biasa menggunakan alat spektrofotometer ataupun AAS (*Atomic Adsorption Spectrophotometer*). Prinsip kerja Spektrofotometer (AAS) pada dasarnya merupakan penyerapan sinar

dengan panjang gelombang tertentu oleh atom-atom yang di bebaskan oleh nyala. Secara rinci prosesnya dimulai dari sampel yang akan dianalisis berupa cairan, sampel kemudian dihisap ke dalam ruang pengkabutan (nebulizer) untuk diubah menjadi partikel-partikel kecil (aerosol) dengan menggunakan udara bertekanan yang dialirkan dari kompresor. Partikel kemudian dipecah lagi menggunakan baling-baling (flow spoiler) untuk menghasilkan partikel yang lebih kecil dan halus, sedangkan partikel yang ukurannya besar akan dikeluarkan melalui pembuangan (drain). Partikel yang dilewatkan akan dicampur dengan gas pengoksida (udara) dan bahan bakar (gas asetiln). Partikel yang telah bercampur dengan gas pengoksida dan bahan bakar kemudian dilewatkan melalui kapiler menuju nyala. Begitu sampai di nyala partikel tersebut akan dibakar pada tungku pembakaran, dengan tujuan untuk memecah partikel menjadi atom-atom bebentuk gas. Partikel yang telah di jadikan atom tersebut kemudian akan disinari dengan panjang gelombang tertentu sesuai dengan unsur yang berasal dari lampu katoda berongga. Saat atom-atom tersebut disinari, sebagian sinar akan ditrasnmisikan dan sebagian lagi akan diserap oleh atom, atom yang menyerap sinar tersebut elektronnya akan tereksitasi untuk beberapa saat, setelah itu elektron tersebut akan kembali ke tingkat energi dasar (Ground State) sambil melepaskan energi. Sinar yang diteruskan setelah melewati nyala akan dilewatkan pada celah (slit) untuk meluruskan sinar yang datang menuju monokromator. Monokromator disini berfungsi sebagai isolasi untuk panjang gelombang yang tidak sesuai dengan panjang gelombang unsur pada sampel. Sinar yang keluar dari monokromator lalu ditangkap oleh detektor, setelah itu sinar dengan panjang gelombang sesuai unsur di ubah menjadi signal listrik yang akan di baca oleh perangkat komputer. Perangkat komputer

membaca signal listrik bukan sebagai sinar yang teruskan (ditransmisikan) melainkan sebagai nilai absorbansi dari atom (Salam *et al.*, 2013)

Dasar analisis menggunakan teknik AAS adalah bahwa dengan mengukur besarnya absorpsi oleh atom analit, maka konsentrasi analit itu dapat di tentukan. Penentuan konsentrasi analit diperoleh melalui perbandingan dengan standar. Cara kerja dari metode ini adalah dengan membandingkan antara absorban larutan sampel dengan larutan standar pembanding untuk memperoleh konsentrasi larutan contoh tersebut. Jadi skala absorban dari AAS dikalibrasi dengan suatu deret standar yang diketahui konsentrasinya. Hasil dari analisis dengan AAS adalah kurva kalibrasi. Dari kurva kalibrasi ini konsentrasi analit dari larutan sampel dapat dicari setelah mengukur absorbannya. Proses kalibrasi AAS sangat krusial karena dapat secara langsung mempengaruhi hasil analisis. Faktor yang dapat mempengaruhi proses kalibrasi AAS adalah larutan standard dan instrument AAS (Handayani *et al.*, 2013).

### 2.11 Lumpur Panas Lapindo

Isolasi bakteri dilakukan pada daerah semburan lumpur panas lapindo, karena pada semburan lumpur panas lapindo merupakan suatu peristiwa geologi atau geothermal yang diakibatkan oleh kesalahan proses pengeboran oleh PT Lapindo Brantas, sehingga terjadi peristiwa keluarnya lumpur bercampur air panas dan gas dari perut bumi, peristiwa ini menurut para ahli merupakan terbentuknya mud volcano atau gunung lumpur. Banyak para ahli geologi yang menganalogikan semburan lumpur panas Lapindo dengan gejala alam yang disebut gunung lumpur / *mud volcano* yang banyak tersebar di Indonesia (khususnya di Indonesia Timur dikenal dengan istilah poton), bahkan di Jawa Timur Utara pun banyak diketemukan, seperti Bleduk Kuwu dekat Purwodadi,

Gunung Anyar dekat Surabaya bahkan di selatan Kali Porong, yang di masa lalu menyemburkan lumpur tetapi sekarang sudah mati (Koesoemadinata, 2006).

Definisi dari *Mud Volcano* adalah suatu gunung api lumpur yang berbentuk suatu kerucut tanah liat dan lumpur berukuran kecil, yang pada umumnya kurang dari 1-2 m tingginya. Gunung api lumpur kecil ini terbentuk dari campuran air panas dan sedimen halus (tanah liat dan lumpur) dimana terdapat (1) aliran perlahan dari suatu lubang seperti suatu arus lahar cair; atau (2) menyembur ke udara seperti suatu air mancur lahar yang melepaskan air mendidih dan gas vulkanis. Tanah liat dan lumpur yang secara khas berasal dari gas batuan vulkanik padat dan panas yang terlepas dari magma yang dalam di bawah memutar air bawah tanah menjadi suatu campuran panas dan asam yang secara kimiawi merubah batuan vulkanik menjadi fraksi lumpur dan tanah liat (Herawati, 2007).

## 2.12 Air

Air merupakan materi yang sangat menentukan di dalam kehidupan dan lingkungan, tetapi di dalam air terkandung suatu kehidupan yang mempunyai bentuk dan sifat berbeda dengan kehidupan ditempat lain. Khususnya untuk kehidupan dari sekelompok jasad-hidup yang termasuk mikroba (jasad-renik, mikroorganisme) seperti bakteri, fungi, mikroalga. Kehadiran jasad tersebut di dalam air banyak mendatangkan kerugian, tetapi juga banyak mendatangkan keuntungan dan manfaat (Suriawiria, 2003).

Air merupakan unsur yang mempunyai peran utama dalam kehidupan di bumi ini. Air dikenal sebagai sumber daya yang terbarukan, namun dari segi kualitas maupun kuantitas membutuhkan upaya dan waktu untuk dapat berlangsung baik. Kriteria dan standar kualitas air didasarkan atas beberapa hal

antara lain keberadaan logam dan logam berat, anorganik, tingkat toksisitas, dan teremisinya pencemar ke lingkungan. Air adalah pelarut yang baik, oleh sebab itu di dalamnya paling tidak terlarut sejumlah kecil zat-zat anorganik dan organik. Dengan kata lain, tidak ada air yang benar-benar murni dan hal ini menyebabkan dalam setiap analisis air ditemukan zat-zat terlarut (Setiadi, 1993).

Beberapa persyaratan yang perlu diketahui mengenai kualitas air tersebut baik secara fisik, kimia dan juga mikrobiologi. Syarat fisik, antara lain: air harus bersih dan tidak keruh, tidak berwarna, tidak berasa, tidak berbau, suhu tidak berbeda lebih dari 3° C dari suhu udara dan tidak meninggalkan endapan. Syarat kimiawi, antara lain: tidak mengandung bahan kimiawi yang mengandung racun, tidak mengandung zat-zat kimiawi yang berlebihan, cukup yodium, pH air antara 6,5 – 8,5. Syarat mikrobiologi, antara lain: tidak mengandung kuman-kuman penyakit seperti disentri, tipus, kolera, dan bakteri patogen penyebab penyakit (Depkes RI, 2003).

### **2.13 Padatan Lumpur (Sedimen)**

Sedimen adalah partikel organik dan anorganik yang terakumulasi secara bebas. Sedimen didefinisikan secara luas sebagai material yang diendapkan di dasar suatu cairan (air dan udara), atau secara sempit sebagai material yang diendapkan oleh air, angin, atau gletser / es. Sedangkan endapan sedimen adalah akumulasi mineral dan fragmen batuan dari daratan yang bercampur dengan tulang-tulang organisme laut dan beberapa partikel yang terbentuk melalui proses kimiawi yang terjadi di dalam laut (Gross, 1993).

Friedman (1978) memberikan pengertian sedimen adalah kerak bumi yang ditranspormasikan dari suatu tempat ke tempat lain baik secara vertikal maupun secara horizontal. Selanjutnya Ongkosongo (1992), menambahkan

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

Sedimen terutama terdiri partikel-partikel yang berasal dari hasil pembongkaran batu-batuan dan potongan-potongan kulit serta sisa rangka-rangka dari organisme laut. Menurut asalnya sedimen dibagi menjadi tiga macam yaitu; 1) sedimen *lithogenous* ialah sedimen yang berasal dari sisa pengikisan batu-batuan didarat, 2) sedimen *biogenous* ialah sedimen yang berasal dari sisa rangka organisme hidup juga akan membentuk endapan-endapan halus yang dinamakan *ooze* yang mengendap jauh dari pantai kearah laut dan 3) sedimen *hydrogenous* yakni sedimen yang dibentuk dari hasil reaksi kimia dari air laut (Hutabarat dan Evans, 1985).

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam isolasi bakteri lumpur lapindo ini terdiri dari sampel air dan sedimen lumpur lapindo yang didapatkan dari semburan lumpur lapindo sekitar 200 meter dari pusat semburan. NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*), aquadest, kertas Whattman no. 42, kertas saring, alkohol 70%, spirtus, masker, sarung tangan didapatkan dari CV. Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha Blok I no. 238 Malang. TSIA (*Triple Sugar iron Agar*), MRVP (*Metil Red Voges-Proskaver*), Nitrat Agar, Urea broth, Simmons Sitrat, SIM (*Sulfide Indol Motillility*) Agar, KOH 40%,  $\alpha$ -naftol, Methyl Red, kovac didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang. Kristal ungu, aseton, iodin, safranin didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya Malang. Aquaregian (HCl + HNO<sub>3</sub>), HNO<sub>3</sub> encer (2,5 N), Amonium persulfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>], NaIO<sub>4</sub> (*Sodium periodate*), [(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)NHNH]<sub>2</sub>CO (*Diphenylcarbazine*), (CH<sub>3</sub>CNOH)<sub>2</sub> (*Dimethylglyoxime*) yang didapatkan dari Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam isolasi bakteri lumpur lapindo ini terdiri dari *laminar air flow* merk *Naire*, lemari pendingin merk *Toshiba*, cawan petri merk *Pyrex*, tabung reaksi merk *Pyrex*, rak tabung reaksi, pipet volume 10 mL merk *Pyrex*, botol scoot 1 L merk *Pyrex*, erlenmeyer 250 mL, 500 mL, dan 1 L merk *Pyrex*, gelas ukur 100 mL merk *Pyrex*, *beaker glass* 500 mL dan 1000 mL

merk *Pyrex*, corong, spatula, sendok bahan, jarum loop, jarum ose, cover glass, cover glass, obyek glass, bunsen, bola hisap, autoklaf merk *Sanyo*, timbangan digital merk *Mettler Toledo*, pH-meter merk *Lutron YK-2001PH*, nampan, *shaker incubator* merk *SI-600R*, kompor, *sprayer*, mikro pipet merk *Avi-Teck*, panci, bunsen, inkubator merk *Memmert*, *crushable tang*, *washing bottle*, mikroskop merk *Olympus*, camera merk *Olympus*, *microbact Identification kit* merk *Oxoid*, *Handrefraktometer* merk *Atago*, AAS (*Atomic Absorbtion Spectrophotometer*) merk *Shimadzu*, serta Spektrofotometri merk *Thermo Spectronic*.

### 3.2 Metode Penelitian

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

Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam (Efendi, 1989).

Penelitian eksploratif bersifat menjelajah, artinya penelitian yang dilakukan apabila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang

atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus dari suatu kelompok atau golongan tertentu yang masih kurang diketahui oleh banyak orang (Yulia, 2009).

Peneliti mencoba untuk menggambarkan dan menjelaskan tentang isolasi bakteri termofilik pada sedimen dan air semburan lumpur lapindo Desa Renokenongo, Kecamatan Porong Kabupaten Sidoarjo untuk mengetahui bakteri yang dapat tumbuh pada lingkungan semburan lumpur lapindo dan menduga spesies bakteri dominan yang tumbuh dengan karakterisasi isolat bakteri yaitu dengan pengamatan morfologi koloni dan sel isolat bakteri dan pengujian biokimia dengan menggunakan uji biokimia konvensional yang dilengkapi dengan pengujian biokimia *Microbact Identification Kits* untuk mengetahui spesies isolat bakteri dominan. Skema kerja penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1 Pengambilan Sampel**

Sampel diambil sekitar 200 meter dari pusat semburan lumpur lapindo. Terdapat dua macam sampel yang diambil yaitu berupa lumpur padat dan lumpur bercampur air, pengambilan sampel dilakukan sebanyak 3 kali pada 5 titik pengambilan di satu lokasi untuk didapatkan sampel yang dianggap telah mewakili keseluruhan pengambilan sampel dan dianggap representatif. Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam botol *scoot* steril kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil untuk mencegah adanya kontaminasi. Pengambilan sampel terbagi atas 2 macam, yaitu botol *scoot* steril dipersiapkan khusus untuk sampel dalam kultur, sedangkan botol *scoot* non steril untuk mengambil air lapindo yang akan dipergunakan sebagai bahan dalam pembuatan larutan

isotonis (pengganti Nafis) dalam pengenceran bertingkat dan sebagai pengganti aquadest pada pembuatan media. Setelah sampel diambil dari sekitar pusat semburan lumpur, sampel diletakkan di dalam coolbox dan dibawa menuju laboratorium dan disimpan pada lemari pendingin dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  untuk mempertahankan kualitas sampel sampai digunakan. Skema pengambilan sampel dapat dilihat pada lampiran 2.



Gambar 10. Pengambilan Sampel

### 3.3.2 Pengukuran Parameter Fisika dan Kimia Lingkungan

#### a. Pengukuran pH

Pengukuran pH air lumpur lapindo dilakukan di Laboratorium dengan menggunakan alat pH meter. Pengukuran pH dilakukan sebanyak 3 kali dari 5 titik pengambilan sampel agar didapatkan data yang representatif dengan cara mengambil sedikit air lumpur lapindo lalu di letakkan pada beaker glass 50 mL lalu diukur pH sampel dengan menggunakan pHmeter, pengukuran pH ini dilakukan untuk mengetahui pH dari sampel lumpur lapindo. Skema pengukuran pH dapat dilihat pada lampiran 3.



Gambar 11. pH-Meter

### b. Pengukuran Suhu

Pengukuran suhu dilakukan langsung di tempat pengambilan sampel dilakukan 3 kali di 5 titik tempat pengambilan sampel agar didapatkan hasil yang representatif dengan cara thermometer dicelupkan pada air lumpur lapindo yang mengalir sedangkan untuk sedimen thermometer ditancapkan pada sedimen lumpur lapindo. Pengukuran suhu ini dilakukan untuk mengetahui suhu lingkungan lumpur lapindo untuk menentukan suhu inkubasi pada saat kultur bakteri. Skema pengukuran suhu dapat dilihat pada lampiran 3.



Gambar 12. Pengukuran Suhu

### c. Pengukuran Salinitas

Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat *handrefraktometer*. Sampel air lapindo diteteskan pada alat *handrefraktometer* lalu diarahkan pada sumber cahaya, setelah itu di amati batas akhir pada skala pengamatan alat *handrefraktometer* lalu dicatat kadar salinitasnya. setelah selesai digunakan alat *handrefraktometer* dibersihkan menggunakan aquades lalu di lap menggunakan tissue agar skala pengukuran alat kembali normal atau netral. Skema pengukuran salinitas dapat dilihat pada lampiran 3



Gambar 13. *Handrefraktometer*

#### d. Pengukuran Logam Berat

Pengukuran kadar logam berat dilakukan dengan menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)* dan spektrofotometer. Penentuan kadar logam berat Pb, Hg, Cu, Fe, Zn, Cd, dan Au menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)* dengan cara diambil sampel air sebanyak 100 ml dan sampel sedimen sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselen lalu ditambahkan larutan Aquaregian (HCl + HNO<sub>3</sub>) sebanyak 5 ml berfungsi untuk melarutkan logam-logam pada sampel, menurut Kristinaningrum (2012), aqua regia yaitu campuran asam klorida pekat dan asam nitrat pekat dengan perbandingan volume 3:1 mampu melarutkan logam-logam mulia seperti emas dan platina yang tidak larut dalam HCl pekat dan HNO<sub>3</sub> pekat. Reaksi yang terjadi jika 3 volume HCl pekat dicampur dengan 1 volume HNO<sub>3</sub> pekat:



Gas klor (Cl<sub>2</sub>) dan gas nitrosil klorida (NOCl) inilah yang mengubah logam menjadi senyawa logam klorida dan selanjutnya diubah menjadi kompleks anion yang stabil yang selanjutnya bereaksi lebih lanjut dengan Cl<sup>-</sup>. Lalu ditambahkan HNO<sub>3</sub> encer (2,5 N) sebanyak 10 ml, untuk sampel air dipanaskan selama kurang lebih 5 menit, sedangkan pada sampel sedimen dididihkan sampai asat (kadar air hilang), setelah itu didinginkan dan disaring pada labu 25 ml, untuk sampel sedimen yang telah asat ditambah aquades

hingga batas (25 ml) dan dikocok sampai homogen maka didapatkan filtrat. Sampel dibaca dengan AAS dengan memakai katoda (lampu yang sesuai) dan dicatat absorbansinya.



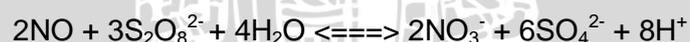
**Gambar 14. Atomic Absorption Spectrophotometer**

Untuk penentuan kadar logam berat Mn, Cr dan Ni menggunakan Spektrofotometer. Pada penentuan kadar logam berat Mn untuk sampel air dengan cara sampel diambil 100 ml dan ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$  dan dipanaskan sampai mendidih kurang lebih 10 menit, untuk sampel sedimen dengan cara diambil 2 gram ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$  lalu dididihkan hingga asat (kadar air hilang), fungsi  $\text{HNO}_3$  adalah untuk malarutkan logam (mengestraksi logam dalam sampel), Berdasarkan Ward *et al.*, (1969), asam nitrat yang mendidih digunakan untuk menghancurkan sampel, sehingga logam tersebut mudah dilarutkan dengan rebusan asam nitrat, penggunaan asam nitrat ini dikarenakan lebih aman jika dibandingkan asam peklorat panas. Setelah itu didinginkan dan ditambahkan 0,5 gr *Amonium persulfat*  $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$  yang berfungsi sebagai pengikat ion logam Mn dan 10 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (*asam fosfor*) yang berfungsi sebagai larutan buffer. Lalu dididihkan dan didinginkan kemudian ditambahkan  $\text{NaIO}_4$  (*Sodium periodate*) 0,1 gram dan dipanaskan  $\pm 70^\circ \text{C}$  sampai terbentuk warna merah lembayung lalu diukur kadar dengan spektrofotometer dan dicatat absorbansinya, fungsi dari  $\text{NaIO}_4$  adalah sebagai pengikat logam Mn dengan memutus ikatan sebelumnya dan

untuk merubah warna larutan sampel menjadi merah violet atau merah lembayung, Berdasarkan DR 2800 Spectrophotometer (2007), mangan (Mn) dalam sampel dioksidasi menjadi warna ungu dengan *Natrium Periodate*, warna ungu berbanding lurus dengan konsentrasi mangan, yang hasilnya telah diukur pada panjang gelombang 525 nm. Untuk fungsi *Amonium persulfat*  $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$  menurut Ulrich dan Oliver (2013), sebagian besar mangan mengandung sedikit baja. Sebuah metode kolorimetrik berdasarkan warna ungu yang digunakan untuk karakteristik dari ion  $\text{MnO}_4^-$ . Metode ini didasarkan pada pembubaran baja dalam asam nitrat yang juga mengoksidasi Mn ke  $\text{Mn}^{2+}$ . Reaksi yang terjadi adalah:



Oksida nitrat yang dihasilkan harus dihilangkan karena akan bereaksi dengan periodat dan dengan demikian akan menghambat oksidasi ion  $\text{Mn}^{2+}$ . Penghapusan NO dicapai melalui pemanasan hingga mendidih dan penambahan *Amonium Peroxydisulfate*  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Senyawa yang juga dikenal sebagai *Amonium Persulfat*. Reaksi yang terjadi adalah:



*Peroxydisulfate* juga mengoksidasi dan menghilangkan karbon atau bahan organik lainnya.  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  adalah agen pengoksidasi kuat. Ini mungkin akan mengoksidasi beberapa ion manganous ke  $\text{MnO}_2$  yang akan membentuk endapan coklat. Penambahan sejumlah kecil *Natrium Bisulfit*  $\text{NaHSO}_3$ , akan mengurangi  $\text{MnO}_2$  kembali ke  $\text{Mn}^{2+}$ . Asam fosfat ditambahkan ke larutan untuk mencegah gangguan apapun dari ion besi yang dapat membentuk kompleks warna, sehingga akan menimbulkan masalah karena mengalami oksidasi antara cerium (III) dan kromium (III) dengan adanya

periodat dan dapat menunjukkan penyerapan yang signifikan dari cahaya pada panjang gelombang yang sama untuk mengukur absorbansinya

Untuk logam berat Cr sampel air diambil 100 ml ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$  (asam nitrat) lalu dipanaskan sampai mendidih kurang lebih 10 menit, setelah itu disaring ke labu 100 ml ditambahkan aquades sampai tanda batas (100ml) dan didapatkan filtrate. Pada sampel sedimen diambil 2 gram ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$  (asam nitrat) lalu dididihkan hingga asat (kadar air hilang) dan didinginkan, setelah itu ditambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat 10 ml dipanaskan  $\pm$  10 menit lalu disaring ke labu 100 ml dan didapatkan filtrate. Setelah itu diambil 10 ml filtrate air maupun sedimen dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan  $[(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NHNH}]_2\text{CO}$  (*Diphenylcarbazine*) sebanyak 2 ml lalu dikocok dan dibaca di spektrofotometer dicatat absorbansinya, fungsi *Diphenylcarbazine*  $[(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NHNH}]_2\text{CO}$  adalah sebagai pengikat logam Cr dengan memutus ikatan sebelumnya dan untuk merubah warna larutan sampel menjadi merah violet atau merah lembayung, menurut Sandell (1959), *diphenylcarbazine* adalah suatu reagen yang sangat baik untuk penentuan kromium (VI), dalam suasana asam memberikan larutan berwarna merah violet. *Diphenylcarbazine* akan membentuk diphenylcarbazon sebagai akibat reduksi dari Cr+6 menjadi Cr+2 dan selanjutnya akan memberikan warna merah violet. Reagen ini kurang baik untuk penentuan logam lain seperti merkuri kecuali kromium sebagai kromat .



Gambar 15. Spektrofotometer

Untuk logam berat Ni, diambil sampel air sebanyak 100 ml dan sampel sedimen sebanyak 2 gram lalu ditambahkan aquaregian (HCl + HNO<sub>3</sub>) sebanyak 5 ml, setelah itu ditambahkan HNO<sub>3</sub> encer (2,5N) sebanyak 10 ml, untuk sampel air dipanaskan selama ± 5 menit sedangkan untuk sampel sedimen dididihkan sampai asat (kadar air hilang). Setelah itu didinginkan disaring pada labu 100 ml dan didapatkan filtrat, untuk sampel sedimen ditambah aquades hingga batas (100 ml) dan didapatkan filtrat. Untuk filtrat sampel air apabila filtrat 50 ml maka tidak perlu diencerkan, sedangkan apabila filtrat kurang dari 50 ml maka perlu diencerkan hingga 100 ml. Setelah itu baik filtrat air maupun filtrat sedimen diambil 50 ml lalu ditambahkan 10 ml ammonium sitrat yang berfungsi mengikat logam Ni dan 5 ml larutan iodine berfungsi sebagai larutan buffer, setelah itu ditambahkan 20 ml (CH<sub>3</sub>CNOH)<sub>2</sub> (*Dimethylglyoxime*) sampai berwarna merah lembayung ditambahkan aquades sampai 100 ml didiamkan selama 10 menit, lalu dibaca kadarnya dan dicatat absorbansinya dengan spektrofotometer, penambahan (CH<sub>3</sub>CNOH)<sub>2</sub> (*Dimethylglyoxime*) berfungsi sebagai pengikat logam Ni dengan memutus ikatan sebelumnya sehingga didapatkan logam spesifik Ni yang akan diukur kadarnya dan untuk merubah warna larutan sampel menjadi merah violet atau merah lembayung Berdasarkan Zajac *et al.*, (2010), Nikel mempunyai sifat umum yang *hypersensitif*. Sebuah gangguan utama dalam estimasi nikel adalah kobalt, besi atau tembaga. Sehingga reaksi *complexometric* antara nikel dengan *dimethylglyoxime* merupakan salah satu metode yang telah dikembangkan untuk mengatasi masalah ini. Pengujian kadar logam berat ini bertujuan untuk mengetahui kadar logam berat yang terkandung pada semburan lumpur lapindo dan mengetahui bahwa bakteri yang di isolasi dapat tumbuh pada kondisi kadar logam berat

tersebut. Skema pengukuran logam berat menggunakan AAS dan Spektrofotometer dapat dilihat pada lampiran 3.

### 3.3.3 Kultur Bakteri

Kultur bakteri secara acak dilakukan pertama kali terhadap sampel air dan sedimen lapindo. Pertama-tama dilakukan sterilisasi terhadap semua alat dan bahan yang akan digunakan. Kemudian sampel air lapindo diambil dari kulkas lalu disaring dengan menggunakan kertas whattman no. 42 Sebanyak 10 ml dan diambil sampel sedimen sebanyak 10 gram, penyaringan sampel air dan pengambilan sampel sedimen dilakukan didalam LAF (*Laminer Air Flow*) untuk mencegah terjadinya kontaminasi dari bakteri lain. Kemudian disiapkan larutan pengencer, larutan pengencer ini digunakan air lapindo yang disterilisasi dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml.

Kultur bakteri dilakukan dengan cara metode tuang yang mengacu pada buku Dasar-Dasar Mikrobiologi yang di tulis oleh Peldzar (2008), yang telah dimodifikasi yaitu mengganti aquades dengan air lapindo sebagai bahan pembuatan media kultur hal ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri spesifik yang tumbuh pada lingkungan semburan lumpur lapindo. Prosedur pertama yaitu menyiapkan media NA *Merck* sebanyak 8,4 gram dengan air lapindo sebanyak 420 ml, karena kultur dilakukan dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-10}$  secara duplo dengan metode tuang dan 1 cawan petri berisi blanko atau kontrol (-) sebagai standar apakah terjadi kontaminasi selama penanaman. Kemudian diinkubasi di dalam inkubator selama 72 jam dengan suhu yang diatur kurang lebih sama dengan dengan suhu lumpur lapindo atau suhu lngkungan yaitu  $47^{\circ}\text{C}$  agar didapatkan pertumbuhan bakteri yang optimal lalu diamati pertumbuhan bakteri setiap 24 jam sekali dan dicatat hasilnya setelah itu ditentukan bakteri dominan sebagai isolat bakteri target. Setelah didapatkan isolat bakteri target

dilakukan stock bakteri pada media NA miring agar bakteri dapat disimpan sampai digunakan kembali, penyimpanan stock NA miring pada lemari pendingin dengan suhu 4° C. Semua perlakuan diatas dilakukan didalam LAF (*Laminer Air flow*) untuk menghindari adanya kontaminasi dan menjaga agar keadaan tetap aseptis. Skema kultur bakteri dapat dilihat pada lampiran 4.

#### 3.3.4 Isolasi Bakteri target

Isolasi atau pemurnian bakteri target dari hasil kultur bakteri awal bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang benar-benar murni dan dapat dilakukan uji karakteristik bakteri untuk menduga spesies isolat bakteri yang dapat tumbuh pada semburan lumpur lapindo. Isolasi bakteri target ini dilakukan dengan menggunakan metode tuang, dengan menggunakan 2 macam media, yaitu media NB dan media NA, metode ini didapatkan dari buku Dasar-Dasar Mikrobiologi yang ditulis oleh Pelczar (2008). Sama seperti pada proses kultur bakteri, dalam pembuatan media dilakukan modifikasi yaitu mengganti aquades dengan air lapindo sebagai bahan pembuatan media NA (*Nutrient Agar*) dan media NB (*Nutrien Broth*) untuk mendapatkan bakteri spesifik yang hanya tumbuh pada lingkungan semburan lumpur panas lapindo.

Pertama-tama isolat bakteri target pada masing-masing sampel air dan sedimen dari stock NA miring diambil dan dikultur dengan media NB masing-masing 1 jarum loop pada 7 mL media NB secara duplo dan 1 tabung reaksi berisi blanko atau kontrol (-) sebagai standar apakah terjadi kontaminasi selama penanaman. Kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 80 rpm suhu 47°C selama 3 hari, hingga terjadi perubahan kepekatan atau kekeruhan pada media NB. Setelah itu dipindahkan dengan cara dikultur pada media NA untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri yang diinginkan. Kultur dilakukan dengan cara mengencerkan isolat pada media NB dengan air lapindo

steril dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-7}$  dan dilakukan penanaman media NA pada pengenceran  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  dan ditambah 1 cawan petri berisi blanko atau kontrol (-) sebagai standar apakah terjadi kontaminasi selama penanaman. Kemudian diinkubasi dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 5 hari. Lalu didapatkan isolat bakteri target murni. Semua perlakuan diatas dilakukan didalam LAF (*Laminer Air flow*) untuk menghindari adanya kontaminasi dan menjaga agar keadaan tetap aseptis. Skema isolasi bakteri target dapat dilihat pada lampiran 5.

### 3.3.5 Uji Karakteristik Bakteri

Uji karakterisasi bakteri dilakukan untuk mengetahui karakter dari sel bakteri yang tumbuh di sekitar pusat semburan lumpur lapindo, karakterisasi bakteri mengacu pada pedoman identifikasi buku *Bergeys Manual of Determination Bacteriology* meliputi pengamatan morfologi koloni bakteri yaitu bentuk koloni, warna koloni dan bentuk tepi koloni, pengamatan morfologi sel bakteri yaitu melalui pewarnaan gram dan bentuk sel bakteri serta pengujian sifat biokimia melalui uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar), MR (Methyl Red), VP (Voges Proskauer), SIM (Sulfide Indol Motility), Urease, Nitrat dan Simmon sitrat. Skema uji karakteristik bakteri dapat dilihat pada lampiran 6.

#### 3.3.5.1 Morfologi Koloni

Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan untuk mengetahui bentuk koloni, warna koloni dan bentuk tepi koloni. pengamatan dilakukan pada isolat yang telah murni yang diambil dari stok bakteri murni yang ditumbuhkan pada cawan petri dengan media NA. Pengamatan dilakukan dengan cara visual dan dicatat hasil pengamatan dari setiap isolat murni bakteri.

#### 3.3.5.2 Morfologi sel Bakteri

Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan pada isolat bakteri yang telah murni dengan menggunakan metode pewarnaan gram dilakukan untuk

mengetahui bentuk sel bakteri serta membedakan gram positif dan gram negatif. Prosedur pewarnaan gram adalah : diambil sedikit isolat bakteri kemudian ambil 1 ose Nafis steril 0,9% dan dihomogenkan diatas objek glass dan difiksasi sampai kering. Kemudian ditetesi kristal violet dan didiamkan selama 30 detik kemudian dibilas dengan akuades, kemudian ditetesi iodin didiamkan selama 30 detik dan dibilas dengan akuades, selanjutnya ditetesi dengan aseton alkohol dan didiamkan tidak boleh lebih dari 7 detik kemudian dibilas dengan akuades dan terakhir ditetesi safranin dan didiamkan 30 detik kemudian dibilas dengan akuades selanjutnya gram yang telah terwarnai diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk mengetahui bentuk sel isolat bakteri apakah berbentuk batang (Bacil), bulat (Coccus) atau bentuk spiral. Skema pewarnaan gram untuk mengetahui morfologi sel bakteri dapat dilihat pada lampiran 6 poin 6.1.

### 3.3.5.3 Uji Biokimia

Pengujian biokimia dilakukan mengacu metode pada buku panduan identifikasi *Bergeys Manuaf of Determination Bacteriology* dan prosedur yang dituliskan oleh Cappucino dan Sherman dalam bukunya *Microbiology a Laboratory Manual* bertujuan untuk menduga jenis spesies isolat bakteri murni, pengujian biokimia meliputi uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar), MR (Methyl Red), VP (Voges Proskauer), SIM (Sulfide Indol Motillity), Urease, Nitrat dan Simmon sitrat. Skema pengujian biokimia dapat dilihat pada lampiran 6 poin 6.2.

#### a. **TSIA (Triple Sugar Iron Agar)**

Uji Triple Sugar Iron Agar digunakan untuk membedakan mikroorganisme enterik berdasarkan kemampuannya memfermentasikan glukosa, sukrosa dan laktosa pada media. Pengujian TSIA dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil dengan menggunakan jarum ose kemudian

dipindahkan pada agar miring TSIA dengan cara menggores bagian miringnya secara zig-zag dan menusuk bagian tegaknya. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Menurut Raihana (2011), Pada bagian tegak, jika bakteri dapat memfermentasikan glukosa, warna media berubah dari orange menjadi kuning, jika tidak memfermentasi sakarosa media tetap merah. Jika dapat membentuk gas H<sub>2</sub>S, warna media berubah dari orange menjadi hitam, karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan metion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S, dan H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan Fe<sup>+2</sup> yang terdapat pada media yang menghasilkan endapan hitam. Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sakarosa, warna media berubah jadi kuning, dan jika tidak dapat memfermentasi laktosa atau sakarosa, warna media tetap orange atau tidak berubah.

**b. MR (Methyl Red)**

Pengujian *Methyl Red* dilakukan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Pengujian *Methyl Red* dilakukan dengan cara 1 ose bakteri diinokulasikan kedalam media MR-VP kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian media yang telah ditumbuhi bakteri ditetesi dengan reagen *methyl red*. Jika terbentuk cincin merah menunjukkan reaksi positif.

**c. VP (Voges Proskauer)**

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

**d. SIM (Sulfide Indol Motility)**

Uji *Sulfite Indol Motility* (SIM) digunakan untuk melihat pergerakan dari bakteri yang diuji. Uji ini dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil satu ose kemudian diinokulasikan kedalam media SIM (*Sulfite Indol Motility*) dengan cara ditanam secara tegak lurus di tengah-tengah media, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam kemudian media SIM ditetesi oleh pereaksi indol (kovac). Bila di media timbul kekeruhan seperti kabut berarti menandakan bakteri tersebut bergerak sedangkan apabila dipermukaan media terbentuk cincin merah hal tersebut menandakan bahwa terbentuk indol pada media.

**e. Urease**

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

**f. Nitrat**

Uji nitrat dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat. Uji ini dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil satu ose kemudian dicelupkan pada media nitrat broth, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Apabila timbul perubahan warna keruh berarti menandakan positif apabila tidak ada perubahan warna berarti menandakan negatif. Perubahan warna keruh menunjukkan bahwa bakteri mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit.

**g. Simmon Sitrat**

Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Uji sitrat dilakukan dengan cara bakteri yang diuji diambil satu ose bakteri dan diinokulasikan ke dalam media *simmon citrate agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, apabila ada perubahan warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif.

Identifikasi bakteri dengan pengujian biokimia juga dilakukan dengan menggunakan *Microbact Identification Kits*. Untuk pengujian bakteri gram positif bisa digunakan GNB 12B saja, sedangkan GNB 12A diabaikan. Uji bakteri gram negative menggunakan 1 set yaitu GNB 12A/B/E 24E. Cara penggunaannya yang pertama dilakukan adalah melakukan uji oksidasi untuk menentukan jenis *Microbact Identification Kits* yang digunakan. Kultur isolate bakteri yang akan diidentifikasi diambil sedikit dengan jarum ose, kemudian ditempatkan pada kertas oksidase (*Bactident Oxidase Kit*), diamati perubahan warnanya selama 60 detik, apabila timbul warna ungu menunjukkan oksidase positif, maka harus memakai *microbact MB-12A + MB-12B* atau *microbact 24E*. namun apabila tidak berwarna menunjukkan oksidasi negative, maka bisa memakai *microbact MB-12A* saja atau bisa juga *MB 12A + MB 12B* atau *MB 24E*. Skema pengujian biokimia dengan *Microbact Identification Kits* dapat dilihat pada lampiran 6 poin 6.2.2.

**- Pengujian Sifat Biokimia Dengan Microbact**

Uji biokimia dengan MB-12A/E meliputi uji lysine, uji ornithin, uji H<sub>2</sub>S, uji glukosa, uji manitol, uji xylose, uji ONPG, uji indol, uji urease, uji VP, uji Citrate dan uji TDA. Uji biokimia dengan MB-12B meliputi uji gelatin, uji malonat, uji

inositol, uji sorbitol, uji ramnosha, uji sucrose, uji lactose, uji arabinosa, uji adanitol, uji rafinosa, uji salisin, dan uji arginin.

- Pengisian Microbact

Microbact yang telah disiapkan kemudian ditarik seal penutupnya dan larutan bakteri sebanyak 4 tetes diteteskan pada setiap sumur microbact.

Pada sumur lysine, omithin, H<sub>2</sub>S pada MB 12A dan sumur arginin pada MB-12B ditetesi dengan mineral oil sebanyak 1-2 tetes, setelah itu seal ditutup kembali dan microbact diinkubasi selama 12-18 jam pada suhu 37°C di dalam incubator.

- Pembacaan Microbact

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

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

- Evaluasi Hasil

Dari sumur-sumur microbact dilihat apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna kunci. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal). Spesies bakteri dapat dilihat pada program komputer berdasarkan angka-angka oktal. Sebagai perbandingan dicocokkan sifat-sifatnya berdasarkan *Bergeys manual of determinative bacteriology*.

#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Kondisi Lingkungan Lumpur Lapindo

Kondisi lingkungan pada air dan sedimen semburan lumpur lapindo diukur dari suhu, pH, salinitas, dan kadar logam berat dapat dilihat pada tabel berikut.

**Tabel 3. Keadaan Suhu, Salinitas dan pH Lumpur Lapindo**

No	Parameter	Hasil	
		Air	Sedimen
1	Suhu	$45^{\circ}\text{C} \pm 0,28$	$48^{\circ}\text{C} \pm 0,09$
2	pH	$7,8 \pm 0,12$	$7,5 \pm 0,09$
3	Salinitas	30 ppt	-

Kondisi lumpur lapindo memiliki pH air  $7,8 \pm 0,11$  dan sedimen  $7,5 \pm 0,08$  yang didapatkan dari rata-rata 3 kali pengujian dari 5 titik pengambilan sampel dengan pH meter yaitu rata-rata pH air masing-masing titik pengambilan sampel pH 7,8; 7,6; 7,7; 7,8; 7,8 dan sedimen 7,6; 7,4; 7,4; 7,6; 7,6 yang menunjukkan pH lumpur lapindo netral dan cenderung basa, hal ini dimungkinkan karena semburan lumpur lapindo memiliki salinitas yang cukup tinggi, menurut Baird dan Cann (2005), semakin ke arah laut salinitas semakin tinggi maka pH semakin basa. Berdasarkan Brotowidjoyo *et al.*, (1995), pH air laut umumnya berkisar antara 7.6 – 8.3, dan ditambahkan oleh Rindayani (2013), pH air payau yang berkisar antara 6,5 hingga 8.

Suhu air dan sedimen pada semburan lumpur lapindo berkisar antara  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,28$  dan  $48^{\circ}\text{C} \pm 0,31$  yang didapatkan dari 3 kali pengukuran suhu di 5 titik pengambilan sampel yaitu suhu air masing-masing dari suhu  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ ;  $45,1^{\circ}\text{C}$ ;  $45,6^{\circ}\text{C}$ ;  $45^{\circ}\text{C}$  dan sedimen  $48,3^{\circ}\text{C}$ ;  $48^{\circ}\text{C}$ ;  $47,8^{\circ}\text{C}$ ;  $48^{\circ}\text{C}$ ;  $47,8^{\circ}\text{C}$  yang menunjukkan bahwa suhu semburan lumpur lapindo cukup tinggi dan hanya organisme atau makhluk hidup tertentu yang dapat hidup pada lingkungan

seperti ini, semburan lumpur lapindo memiliki suhu yang tinggi dimungkinkan karena bencana semburan lumpur lapindo ini merupakan sebuah peristiwa geologi yaitu karena kesalahan pada saat pengeboran yang mengakibatkan terbukanya alur vulkanis karena tertekan oleh gas bumi yang terdapat dibawah lokasi pengeboran, menurut dosen Geologi Fakultas Teknologi Kebumihan dan Energi Universitas Trisakti Dr Guntoro (2008), semburan lumpur lapindo merupakan *Mud Volcano* (gunung lumpur), fakta-fakta geologi di permukaan di sekitar Jawa Timur dan Sidoarjo menunjukkan adanya *mud volcano*, baik yang masih aktif maupun tidak aktif. Berdasarkan Koesoemadinata (2006), Banyak para ahli geologi yang menganalogikan semburan lumpur panas Lapindo dengan gejala alam yang disebut gunung lumpur / *mud volcano* yang banyak tersebar di Indonesia (khususnya di Indonesia Timur dikenal dengan istilah poton), bahkan di Jawa Timur Utara pun banyak diketemukan, seperti Bleduk Kuwu dekat Purwodadi, Gunung Anyar dekat Surabaya bahkan di selatan Kali Porong, yang di masa lalu menyemburkan lumpur tetapi sekarang sudah mati.

Menurut Herawati (2007), definisi dari *Mud Volcano* adalah suatu gunung api lumpur yang berbentuk suatu kerucut tanah liat dan lumpur berukuran kecil, yang pada umumnya kurang dari 1-2 m tingginya. Gunung api lumpur kecil ini terbentuk dari campuran air panas dan sedimen halus (tanah liat dan lumpur) dimana terdapat (1) aliran perlahan dari suatu lubang seperti suatu arus lahar cair; atau (2) menyembur ke udara seperti suatu air mancur lahar yang melepaskan air mendidih dan gas vulkanis. Tanah liat dan lumpur yang secara khas berasal dari gas batuan vulkanik padat dan panas yang terlepas dari magma yang dalam di bawah memutar air bawah tanah menjadi suatu campuran panas dan asam yang secara kimiawi merubah batuan vulkanik menjadi fraksi lumpur dan tanah liat. *Mud volcano* adalah suatu gunung api lumpur yang

berbentuk suatu kerucut tanah klat dan lumpur, gunung api lumpur ini terbentuk dari campuran air panas dan sedimen halus.



**Gambar 16. Kondisi Semburan Lumpur Lapindo**

Salinitas pada air lumpur pada semburan lumpur lapindo yaitu 30 ppt yang menunjukkan salinitas semburan lumpur lapindo cukup tinggi, hal ini dimungkinkan karena air lumpur yang keluar pada semburan lumpur lapindo merupakan campuran antara sedimen tanah, air tanah, dan air laut yang berasal dari aliran air bawah tanah di bawah lokasi pengeboran lapindo mengingat lokasi semburan lumpur lapindo dekat dengan laut dan peristiwa semburan lumpur lapindo ini merupakan peristiwa geologis, menurut Satrio *et al.*, (2012), yang menyatakan bahwa adanya kontribusi dari air tanah atau air laut terhadap air yang keluar dari pusat semburan lumpur lapindo

**Tabel 4. Keadaan Kadar Logam Berat Lumpur Lapindo**

No	Parameter Logam Berat	Hasil Analisa Logam Berat			Baku Mutu Kep. Men LH no 51 tahun 2004	W.HO
		Air	Sedimen	Air Lumpur*		
1	Pb	0,69 ppm	2,69 ppm	0,04 ppm	0,008 mg/L	0,1 ppm
2	Hg	0,23 ppm	0,59 ppm	-	0,001 mg/L	-
3	Cu	0,07 ppm	0,27 ppm	-	0,008 mg/L	1,5 ppm
4	Fe	0,76 ppm	6,48 ppm	0,52 ppm	-	1,0 ppm
5	Zn	0,03 ppm	0,49 ppm	0,36 ppm	0,05 mg/L	15 ppm
6	Cd	-	0,03 ppm	0,01 ppm	0,001 mg/L	-
7	Au	0,42 ppm	2,12 ppm	-	-	-
8	Cr	0,02 ppm	0,06 ppm	0,03 ppm	0,005 mg/L	0,05 ppm
9	Mn	39,16 ppm	528 ppm	0,56 ppm	-	0,5 ppm
10	Ni	1,02 ppm	3,39 ppm	0,02 ppm	0,05 mg/L	-

Ket (\*) : Berdasarkan Penelitian Inoue M dan Matsumoto Y, Toyohasi University of Technology, 2012.

Berdasarkan pengujian logam berat pada lumpur lapindo sampel air dan sedimen didapatkan hasil Pb pada air 0,69 ppm dan sedimen 2,29 ppm, Hg pada air 0,23 ppm dan sedimen 0,59 ppm, Cu pada air 0,07 ppm an sedimen 0,27 ppm, Fe pada air 0,76 ppm dan sedimen 6,48 ppm, Zn pada air 0,03 ppm dan sedimen 0,49 ppm, Cd pada air tidak teridentifikasi dan sedimen 0,03 ppm, Au pada air 0,42 dan sedimen 2,12 ppm, Cr pada air 0,02 dan sedimen 0,06 ppm, Mn pada air 39,16 dan sedimen 528 ppm, Ni pada air 1,02 dan sedimen 3,39 ppm, sedangkan pada pengujian yang dilakukan oleh Inoue M dan Matsumoto Y, Toyohasi University of Technology, didapatkan hasil kadar logam berat pada air lumpur lapindo logam Pb 0,04 ppm, logam Fe 0,52 ppm, logam Zn 0,36 ppm, logam Cd 0,01 ppm, logam Cr 0,03 ppm, logam Mn 0,56 ppm dan logam Ni 0,02 ppm.

Sehingga diperoleh hasil bahwa kandungan logam berat yang terkandung di sampel air dan sedimen rata-rata paling banyak dikandung oleh sampel sedimen Lapindo. Hal tersebut dikarenakan logam berat terakumulasi di sedimen lumpur Lapindo yang memadat, sedangkan pada sampel air lumpur Lapindo logam berat tersuspensi atau terlarut diseluruh aliran air lumpur Lapindo sehingga logam berat tersebut menyebar ke seluruh wilayah aliran lumpur. Selain itu kandungan logam berat yang tinggi pada sampel sedimen dikarenakan tingginya pH yang dapat menyebabkan logam berat tersebut mengendap. Berdasarkan Sutamihardja *et al.*, (1982), Hal ini berkaitan dengan sifat – sifat logam berat yaitu :

1. Sulit didegradasi, sehingga mudah terakumulasi dalam lingkungan perairan dan keberadaannya secara alami sulit terurai (dihilangkan).
2. Dapat terakumulasi dalam organisme termasuk kerang dan ikan, dan akan membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsi organisme tersebut.

3. Mudah terakumulasi di sedimen, sehingga konsentrasinya selalu lebih tinggi dari konsentrasi logam dalam air. Di samping itu sedimen mudah tersuspensi karena pergerakan masa air yang akan melarutkan kembali logam yang dikandungnya ke dalam air, sehingga sedimen menjadi sumber pencemar potensial dalam skala waktu tertentu.

Menurut Verioo (1993), pH larutan tanah akan berpengaruh langsung terhadap kelarutan unsur logam berat walaupun peningkatan pH tanah akan mengakibatkan logam berat mengendap tetapi yang lebih penting yaitu pengaruh secara tidak langsung melalui pengaruhnya dalam kapasitas pertukaran kation.

Sedangkan secara keseluruhan kadar logam berat tertinggi adalah logam Mn dengan hasil 39,16 ppm pada sampel air Lapindo dan 528 ppm pada sampel sedimen Lapindo. Kemudian kadar logam berat terendah adalah logam Cd dengan hasil “-” pada sampel air Lapindo dan 0,03 ppm pada sampel sedimen Lapindo. Rendahnya kadar logam Cd dikarenakan sifat dari logam Cd (Cadmium) yang tidak larut dalam basa sehingga logam Cd tidak dapat larut pada sampel air maupun sedimen lumpur Lapindo. Berdasarkan Awaludin *et al.*, (2010), sifat logam Cadmium (Cd) terdiri atas sifat fisik dan sifat kimia. Adapun sifat-sifat fisiknya adalah logam berwarna putih keperakan, mengkilat, lunak/mudah ditempa dan ditarik, dan titik lebur rendah, sedangkan sifat kimianya adalah Cd tidak larut dalam basa, larut dalam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> encer dan HCl encer  $Cd + H_2SO_4 \longrightarrow CdSO_4 + H_2$ , Cd tidak menunjukkan sifat amfoter, Bereaksi dengan halogen dan nonlogam seperti S, Se, P, Cd adalah logam yang cukup aktif, Dalam udara terbuka, jika dipanaskan akan membentuk asap coklat CdO, memiliki ketahanan korosi yang tinggi, CdI<sub>2</sub> larut dalam alcohol.

Sedangkan tingginya kandungan Mangan (Mn) dikarenakan logam Mangan merupakan kandungan yang paling banyak terdapat di laut, selain itu

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

#### 4.2 Morfologi Koloni Bakteri

Jenis bakteri yang berhasil di isolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo dapat dilihat pada tabel berikut,

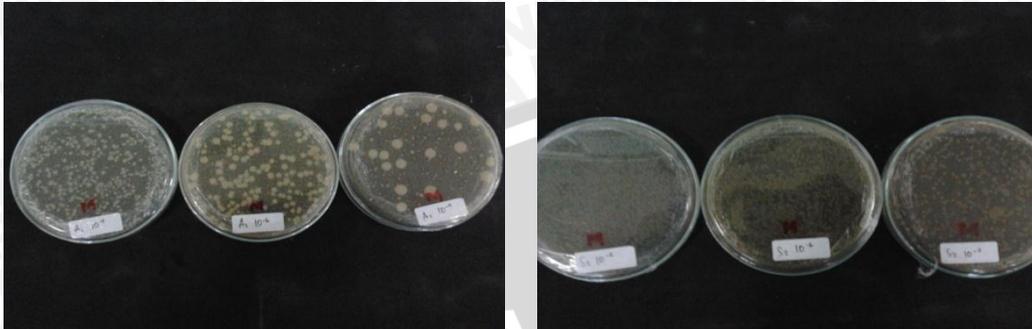
**Tabel 5. Karakteristik Morfologi Koloni**

No	Isolat	Kode	KARAKTERISTIK MORFOLOGI KOLONI					
			Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna	Gram	Bentuk Sel
1	A2	Air	Bulat	Rata	Cembung	Putih	(-)	Basil
2	S2	Sedimen	Bulat	Rata	Datar	orange	(-)	Basil

Hasil isolasi bakteri dari lumpur lapindo diperoleh 1 isolat bakteri dominan dari air dan 1 isolat bakteri dominan dari sedimen lumpur lapindo. Isolat yang diperoleh diberi kode isolat air dan isolat sedimen. Pengamatan morfologi bakteri dilakukan berdasarkan bentuk koloni, tepi, elevasi dan warna. Sedangkan pengamatan morfologi sel dilakukan pada bentuk sel dan Gramnya.

Dari 2 isolat bakteri dominan yang didapatkan masing-masing dari sampel air dan sedimen, bakteri dominan air memiliki bentuk bulat dengan tepian yang rata, elevasi cembung dan berwarna putih pucat, isolat bakteri dominan air merupakan bakteri gram negatif dengan bentuk sel basil (batang). Bakteri dominan sedimen memiliki bentuk bulat dengan tepian rata, elevasi datar dan berwarna orange kemerahan, isolat bakteri dominan sedimen merupakan bakteri

gram negatif dengan bentuk sel basil (batang). Pengamatan morfologi koloni dan sel bakteri sangat diperlukan dalam menentukan jenis suatu bakteri.

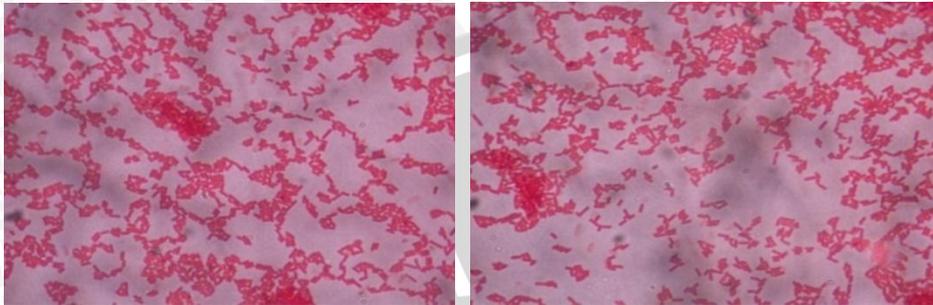


**Gambar 17. Foto koloni air dan sedimen pengenceran  $10^{-5}$  sampai  $10^{-7}$**

Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan gram yang ditentukan oleh komposisi dari dinding sel. Pewarnaan gram bertujuan untuk mengelompokkan bakteri menjadi dua, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif berdasarkan reaksi atau sifat bakteri terhadap cat tersebut. Pewarnaan gram merupakan penentuan karakter melalui prinsip perbedaan struktur dinding sel bakteri gram negatif dan bakteri gram positif, pewarnaan sering dilakukan merupakan metode untuk mencirikan bakteri berdasarkan perbedaan struktur kimia permukaannya yaitu dengan memberikan reagen warna pada bakteri (Peldzar, 2006).

Prinsip dasar pewarnaan gram ini adalah mewarnai bakteri dengan pewarnaan dasar, yaitu kristal ungu; menguatkan pelekatan zat warna dengan garam iodine; melunturkan warna dasar dengan alkohol; pewarnaan kembali dengan pewarna pembanding (*counter stain*) yaitu safranin. Menurut Lay (1994), karakteristik bakteri gram positif sebagian besar dinding sel bakterinya terdiri dari peptidoglikan yang terdiri dari 30 lapisan. Permeabilitas dinding sel kurang dan kompleks kristal yodium tidak dapat keluar dan bakteri akan tetap berwarna ungu, sedangkan bakteri gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis, hanya 1-2 lapisan dan susunan dinding selnya tidak kompak. Permeabilitas

dinding sel lebih besar sehingga memungkinkan terlepasnya kompleks kristal iodium setelah dibilas dengan alkohol, bakteri akan berwarna merah oleh pewarna pembanding (safranin).



**Gambar 18. Foto sel isolat bakteri air dan sedimen**

Sifat gram terutama ditentukan oleh sifat-sifat fisik dan kimia dinding sel dan membran sitoplasmanya. Dinding sel dan membran sitoplasma bakteri-bakteri gram positif mempunyai afinitas yang besar terhadap kompleks cat kristal violet dan iodium, sedang pada bakteri gram negatif afinitasnya sangat kecil. Perbedaan sifat fisik dan kimia dinding sel dan membran sitoplasma ini memegang peranan penting dalam menentukan sifat gram, tetapi sampai berapa jauh pengaruh tersebut belum diketahui dengan jelas. Pada waktu pengecatan, larutan kristal violet dan iodium menembus sel-sel bakteri gram positif maupun sel bakteri gram negatif. Pada sel bakteri gram positif zat-zat ini membentuk suatu senyawa yang sukar larut, juga tidak larut dalam pelarut (alkohol). Hal ini tidak terjadi pada sel bakteri gram negatif, akibatnya cat dapat dilunturkan. Pada pemberian cat penutup (cat lawan) sel bakteri gram positif tidak diwarnai, sedangkan gram negatif diwarnai, sehingga warnanya kontras terhadap cat utama (Jutono, 1980).

### 4.3 Identifikasi Isolat Bakteri

Identifikasi spesies isolat bakteri menggunakan pengujian biokimia manual yang mengacu pada metode buku *Bergey's Manual Of Determination Bacteriology* dengan didukung pengujian menggunakan *Microbact Identification Kits* dan pengujian 16S rDNA (dilakukan oleh Sukoso, Universitas Kagoshima Jepang). uji biokimia dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat berdasarkan komponen kimiawi di dalam sel bakteri (Benson, 2003).

**Tabel 6. Identifikasi Bakteri Isolat A2 dan S2**

No	Isolat	Kode	IDENTIFIKASI BAKTERI	
			Microbact	Uji DNA 16S rDNA *
1	A2	Air	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Marinobacter lutaoensis</i>
2	S2	Sedimen	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Halomonas shengliensis</i>

Ket (\*) : Berdasarkan Penelitian Sukoso, Universitas Kagoshima Jepang

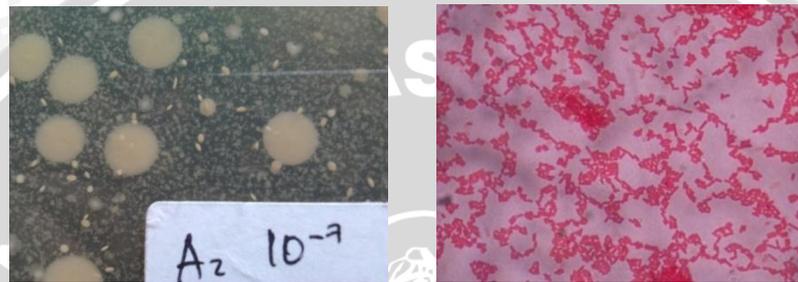
#### 4.3.1 Isolat Air

**Tabel 7. Hasil Uji Biokimia Isolat A2**

Hasil Uji Biokimia Isolat dominan air (A2)	
TSI	A/A, G(+), H <sub>2</sub> S(-)
SIM (Sulfide Indole Motility)	Negatif/Negatif/Positif
Lysine	Negative
Ornithine	Negative
H <sub>2</sub> S	Negative
Glucose	Positif
Manitol	Positif
Xylose	Positif
ONPG	Positif
Indole	Negative
Urease	Positif
V-P	Positif
MR	Negatif
Citrate	Positif
Nitrat	Positif
TDA	Negative

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni bakteri dan uji biokimia pada isolat air mempunyai ciri-ciri sebagai berikut: warna koloni putih pucat, sel berbentuk batang (basil), reaksi gram negative, TSI Asam/Asam Gas(+) H<sub>2</sub>S(-), SIM (*Sulfide Indole Motility*) Negatif/Negatif/Positif, lysine negatif, ornithine

negatif, H<sub>2</sub>S negatif, Glucose positif, mannitol positif, xylose positif, ONPG positif, indole negatif, urease positif, MR negative, V-P positif, citrate positif, TDA negative, Nitrat positif. Berdasarkan serangkaian uji tersebut dan setelah dibandingkan dengan ciri yang dijelaskan pada buku pedoman identifikasi *Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology* maka bakteri tersebut dapat diidentifikasi sebagai *Enterobacter agglomerans*.



**Gambar 19.** Foto koloni dan foto sel *Enterobacter agglomerans* pada perbesaran 1000x

Hasil uji biokimia di atas merupakan hasil dari uji biokimia konvensional atau manual yaitu dengan penanaman bakteri pada media pengujian dalam tabung reaksi dan dilengkapi dengan uji biokimia dengan menggunakan *Microbact Identification Kits* bertujuan untuk saling melengkapi hasil uji identifikasi. Berdasarkan hasil pengujian biokimia isolat A2 mempunyai sifat biokimia sebagai berikut, pada uji TSI didapatkan isolat A2 mampu memfermentasi glukosa, laktosa atau sakarosa dengan asam dengan terbentuknya gas yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning di dasar atau di lereng media TSIA, tetapi bakteri ini tidak membentuk gas sulfur atau H<sub>2</sub>S yang dihidrolisis dari asam amino karena tidak terbentuk warna hitam pada media TSIA. Pada uji SIM isolat A2 tidak dapat memecah asam amino triptofan karena pada permukaan media SIM tidak terbentuk cicin merah, isolat A2 juga tidak mampu membentuk senyawa sulfur karena tidak terbentuk perubahan warna hitam pada media SIM, tetapi terjadi motilitas atau pergerakan pada isolat

hal ini ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi keruh pada bekas tusukan pada media SIM. Pada pengujian Urease didapatkan hasil isolat A2 mampu menghasilkan enzim urease sehingga terbentuk senyawa ammonia yang ditandai adanya perubahan warna pada media urease menjadi merah muda. Pada pengujian citrate, isolat A2 mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon yang ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi gelap kebiruan. Pada uji nitrat, isolat A2 mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit yang ditandai dengan perubahan kekeruhan pada media *nitrat broth*. Pada uji MR, isolat A2 tidak mampu mengoksidasi glukosa dengan memproduksi asam dengan konsentrasi yang tinggi, ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media MRVP. Pada pengujian VP didapatkan hasil isolat A2 mampu membentuk asetilkarbinol sebagai hasil dari proses metabolisme karbohidrat yang ditandai dengan adanya warna merah pada media MRVP. Gambar hasil pengujian biokimia dengan manual maupun dengan *Microbact Identification Kits* dapat dilihat pada lampiran 8.

Isolat bakteri A2 *Enterobacter agglomerans* merupakan bakteri gram negative, merupakan bakteri termofilik karena dapat hidup pada suhu tinggi pada lingkungan semburan lumpur lapindo (tempat isolat bakteri ini di isolasi) dan termasuk ke dalam bakteri koliform, bakteri koliform merupakan bakteri pencemar yaitu bakteri yang dapat mencemari baik itu pada lingkungan maupun pada makanan. *Enterobacter agglomerans* disebut juga *Pantoea agglomerans* atau *Erwinia herbicola*. *Enterobacter agglomerans* banyak terdapat pada air, tanah, tanaman, bahkan pada feses manusia, menurut Alexis (2009), *Pantoea agglomerans* dan spesies lainnya *Pantoea* menyebabkan infeksi pada manusia dan juga patogen pada tanaman. Genus *Pantoea* termasuk beberapa spesies yang umumnya terkait dengan tanaman, baik sebagai epifit atau sebagai

patogen dan beberapa spesies dapat menyebabkan penyakit pada manusia. *Pantoea agglomerans*, spesies *Pantoea* paling sering terisolasi dari manusia, tersebar luas di alam dan telah diisolasi dari berbagai ekosistem, termasuk tumbuhan, air, tanah, manusia, dan hewan. Hal ini sering dikaitkan dengan tanaman sebagai epifit atau endofit dan beberapa isolat telah dilaporkan menjadi patogen. Menurut Jallal (2013), *Pantoea agglomerans* (sebelumnya *Enterobacter agglomerans*) adalah bakteri basil aerobik, tidak membentuk spora, motil dan termasuk gram negative yang masuk dalam family *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini umumnya ditemukan ekologi ceruk, seperti air, tanah, limbah, bijian, sayuran, bahan keruh, dan bahan makanan, bakteri ini juga dilaporkan sebagai pathogen oportunist maupun komersial pada hewan dan manusia. Pathogen oportunist terisolasi dari spesimen klinis termasuk darah, luka, urin, tenggorokan dan organ-organ internal.

Isolat bakteri A2 *Enterobacter agglomerans* merupakan bakteri yang hidup pada suhu tinggi pada lingkungan semburan lumpur panas lapindo sehingga termasuk dalam bakteri termofilik karena tumbuh pada suhu 47°C, oleh karena itu bakteri ini mampu menghasilkan enzim termostabil yaitu enzim yang stabil pada suhu tinggi yang banyak dimanfaatkan di dalam industri pengolahan, berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya mengenai enzim termostabil, isolat bakteri yang telah diisolasi dan diidentifikasi dari semburan lumpur lapindo yaitu dari genus *Enterobacter sp* mampu menghasilkan salah satu enzim termostabil yaitu enzim kitinase. Menurut Winda (2012), peranan kitinase yang sangat prospektif terhadap kehidupan masyarakat banyak mendorong ilmuwan dan peneliti melakukan eksplorasi mikroorganisme kitinolitik, yaitu mikroorganisme yang dapat mendegradasi kitin dengan menggunakan enzim kitinase. Genus bakteri yang sudah banyak dilaporkan

memiliki kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* (Gooday, 1994), *Bacillus*, dan *Pyrococcus* (Harman *et al.*,1993). Menurut Tsujibo *et al.*,(1998), kitinase adalah enzim yang aktif mengkatalisis konversi kitin menjadi kitosan, kitinase ditemukan secara luas pada berbagai organisme seperti bakteri, kapang, insect, tanaman dan hewan. Senyawa kitosan dibuat secara komersial dari kitin dengan bantuan kitinase melalui proses deasetilase secara termokimia. Dibandingkan kitin, aplikasi kitosan lebih luas dan dapat ditemukan pada berbagai bidang seperti industry pangan, pengolahan limbah, kesehatan, bioteknologi, pertanian, kosmetik dan industri kertas.

Isolat bakteri pada air A2 yaitu *Enterobacter agglomerans* dapat tumbuh pada keadaan lingkungan tercemar logam berat, hal ini terjadi karena pada saat isolasi bakteri pada lumpur lapindo, didapatkan hasil bahwa pada lumpur lapindo terdapat berbagai jenis logam berat dengan kadar yang cukup tinggi, selain itu pada saat proses isolasi bakteri pada penelitian ini menggunakan air lumpur lapindo sebagai pengganti aquades pada saat pembuatan media NA (*Nutrient agar*) untuk media pertumbuhan isolat bakteri. Hal ini dilakukan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa bakteri-bakteri yang terisolasi merupakan bakteri spesifik yang dapat tumbuh pada lingkungan tercemar logam berat. Menurut Kurniasari (2008), Isolat *Pseudomonas pseudomallei* dan *Enterobacter agglomerans* mempunyai toleransi terhadap keberadaan logam berat, khususnya Zn, Pb, Fe dan Hg. Pada penambahan logam Zn hingga konsentrasi 2000 ppm, Pb 3000 ppm, Fe 4000 ppm dan Hg 50 ppm isolat masih mampu tumbuh sebesar  $10^6$  -  $10^7$  cfu/ml. isolat masih mampu tumbuh hingga konsentrasi 8000 ppm Zn, Pb dan Fe, serta pada konsentrasi Hg 150 ppm.

Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan oleh Sukoso di Universitas Kagoshima Jepang, dengan isolat yang sama tetapi dengan uji identifikasi yang berbeda yaitu dengan identifikasi 16S rDNA didapatkan hasil spesies isolat bakteri A2 yaitu *Marinobacter lutaoensis*. Bakteri ini baru ditemukan pada November 2003 di sumber air panas di pantai Lutao Taiwan oleh Shieh W.Y. Menurut Shieh (2003), bakteri *Marinobacter lutaoensis* merupakan bakteri laut heterotrof dan thermotolerant, menunjukkan strain T5054 yang diisolasi dari sumber air panas di pantai Lutao Taiwan. Bakteri ini merupakan bakteri gram negative, berbentuk basil, aerobik, sel-sel yang tumbuh pada kultur media membentuk spora dan motil dengan menggunakan satu atau beberapa flagel. Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu 45°C. pH 7 dan kandungan NaCl 3-5%. Strain bakteri ini tidak memerlukan vitamin atau faktor pertumbuhan organik lainnya dan bakteri ini tumbuh pada glukosa, manitol dan berbagai asam organik dan asam amino berbagai sumber karbon tunggal.

#### 4.3.2 Isolat Sedimen

**Tabel 8. Hasil Uji Biokimia Isolat S2**

Hasil Uji Biokimia Isolat dominan Sedimen (S2)	
TSI	A/A, G(+), H <sub>2</sub> S(-)
SIM (Sulfide Indole Motility)	Negatif/Negatif/Positif
Lysine	Negative
Ornithine	Negative
H <sub>2</sub> S	Negative
Glucose	Positif
Manitol	Positif
Xylose	Positif
ONPG	Positif
Indole	Negative
Urease	Positif
V-P	Positif
MR	Negatif
Citrate	Positif
Nitrat	Positif
TDA	Negative

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni bakteri dan uji biokimia pada isolat sedimen mempunyai ciri-ciri sebagai berikut: warna koloni orange, sel berbentuk batang (basil), reaksi gram negative, TSI Asam/Asam Gas(+) H<sub>2</sub>S(-), SIM (Sulfide Indole Motility) Negatif/Negatif/Positif, lysine negatif, ornithine negatif, H<sub>2</sub>S negatif, Glucose positif, mannitol positif, xylose positif, ONPG positif, indole negatif, urease positif, MR negative, V-P positif, citrate positif, TDA negative, Nitrat positif. Berdasarkan serangkaian uji tersebut dan setelah dibandingkan dengan ciri yang dijelaskan pada buku pedoman identifikasi *Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology* maka bakteri tersebut dapat diidentifikasi sebagai *Enterobacter agglomerans*.



**Gambar 20. Foto koloni dan foto sel *Enterobacter agglomerans* pada perbesaran 1000x**

Hasil uji biokimia di atas merupakan hasil dari uji biokimia konvensional atau manual yaitu dengan penanaman bakteri pada media pengujian dalam tabung reaksi dan dilengkapi dengan uji biokimia dengan menggunakan *Microbact Identification Kits* bertujuan untuk saling melengkapi hasil uji identifikasi. Berdasarkan hasil pengujian biokimia isolate S2 mempunyai sifat biokimia sebagai berikut, pada uji TSI didapatkan isolat S2 mampu memfermentasi glukosa, laktosa atau sakarosa dengan asam dengan terbentuknya gas yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning di dasar atau di lereng media TSIA, tetapi bakteri ini tidak membentuk gas sulfur atau H<sub>2</sub>S yang dihidrolisis dari asam amino karena tidak terbentuk warna hitam pada

media TSIA. Pada uji SIM isolat S2 tidak dapat memecah asam amino triptofan karena pada permukaan media SIM tidak terbentuk cicin merah, isolat S2 juga tidak mampu membentuk senyawa sulfur karena tidak terbentuk perubahan warna hitam pada media SIM, tetapi terjadi motilitas atau pergerakan pada isolat hal ini ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi keruh pada bekas tusukan pada media SIM. Pada pengujian Urease didapatkan hasil isolat S2 mampu menghasilkan enzim urease sehingga terbentuk senyawa ammonia yang ditandai adanya perubahan warna pada media urease menjadi merah muda. Pada pengujian citrate, isolat S2 mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon yang ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi gelap kebiruan. Pada uji nitrat, isolat S2 mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit yang ditandai dengan perubahan kekeruhan pada media *nitrat broth*. Pada uji MR, isolat S2 tidak mampu mengoksidasi glukosa dengan memproduksi asam dengan konsentrasi yang tinggi, ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media MRVP. Pada pengujian VP didapatkan hasil isolat S2 mampu membentuk asetilkarbinol sebagai hasil dari proses metabolisme karbohidrat yang ditandai dengan adanya warna kemerahan pada media MRVP. Gambar hasil pengujian biokimia dengan manual maupun dengan *Microbact Identification Kits* dapat dilihat pada lampiran 8.

Isolat bakteri pada sampel sedimen S2 yaitu *Enterobacter agglomerans* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil dan koloninya berwarna orange kemerahan. Menurut buku *Bergeys Manual of Determinative bacteriology-9*, *Enterobacter agglomerans* sama dengan *Pantoea agglomerans* dan *Erwinia herbicola*, bakteri ini merupakan gram negative, motil dengan flagella, kebanyakan strain ini memiliki pigmen kuning, tumbuh pada suhu di atas 30°C. *Enterobacter agglomerans* merupakan bakteri koliform dan

cenderung bersifat pathogen. Bakteri jenis ini banyak ditemukan pada lingkungan baik pada air maupun tanah dan ditemukan juga pada feses manusia. Menurut Andrea (2007), *Pantoea agglomerans* (sebelumnya *Enterobacter agglomerans*) adalah gram negative aerobik terdapat dalam family *Enterobacteriaceae*. Semua spesies *Pantoea* dapat diisolasi dari tanaman, tanah maupun air, dimana mereka dapat berupa pathogen. Dalam genus ini *P. agglomerans* paling sering terdapat atau terisolasi di manusia, mengakibatkan infeksi jaringan lunak atau tulang sendi setelah trauma tertembus oleh sesuatu yang terkontaminasi.

Sama seperti isolat A2 isolat bakteri S2 yaitu *Enterobacter agglomerans* merupakan bakteri yang hidup pada suhu tinggi pada lingkungan semburan lumpur panas lapindo sehingga termasuk dalam bakteri termofilik karena tumbuh pada suhu 47°C, oleh karena itu bakteri ini mampu menghasilkan enzim termostabil, di beberapa penelitian sebelumnya genus *Enterobacter sp* mampu menghasilkan salah satu enzim termostabil yaitu enzim kitinase. Genus bakteri yang sudah banyak dilaporkan memiliki kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* (Gooday, 1994), *Bacillus*, dan *Pyrococcus* (Harman *et al.*,1993). Menurut Tsujibo *et al.*,(1998), kitinase adalah enzim yang aktif mengkatalisis konversi kitin menjadi kitosan, kitinase ditemukan secara luas pada berbagai organisme seperti bakteri, kapang, insect, tanaman dan hewan. Senyawa kitosan dibuat secara komersial dari kitin dengan bantuan kitinase melalui proses deasetilase secara termokimia. Dibandingkan kitin, aplikasi kitosan lebih luas dan dapat ditemukan pada berbagai bidang seperti industry pangan, pengolahan limbah, kesehatan, bioteknologi, pertanian, kosmetik dan industri kertas.

Sama seperti pada isolat bakteri A2, isolat bakteri pada S2 yaitu *Enterobacter agglomerans* juga dapat tumbuh pada keadaan lingkungan tercemar logam berat, hal ini terjadi karena pada saat isolasi bakteri pada lumpur lapindo, didapatkan hasil bahwa pada lumpur lapindo terdapat berbagai jenis logam berat dengan kadar yang cukup tinggi, selain itu pada saat proses isolasi bakteri pada penelitian ini menggunakan air lumpur lapindo sebagai pengganti aquades pada saat pembuatan media NA (*Nutrient agar*) untuk media pertumbuhan isolat bakteri. Hal ini dilakukan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa bakteri-bakteri yang terisolasi merupakan bakteri spesifik yang dapat tumbuh pada lingkungan tercemar logam berat. Menurut Kurniasari (2008), Isolat *Pseudomonas pseudomallei* dan *Enterobacter agglomerans* mempunyai toleransi terhadap keberadaan logam berat, khususnya Zn, Pb, Fe dan Hg. Pada penambahan logam Zn hingga konsentrasi 2000 ppm, Pb 3000 ppm, Fe 4000 ppm dan Hg 50 ppm isolat masih mampu tumbuh sebesar  $10^6 - 10^7$  cfu/ml. isolat masih mampu tumbuh hingga konsentrasi 8000 ppm Zn, Pb dan Fe, serta pada konsentrasi Hg 150 ppm. Pengaruh konsentrasi dua logam, yaitu Zn dan Pb terhadap pertumbuhan isolat menunjukkan bahwa isolat PPEA (Isolat *Pseudomonas pseudomallei* dan *Enterobacter agglomerans*) mampu tumbuh hingga  $10^8$  cfu/ml pada konsentrasi Zn 2000 ppm + Pb 3000 ppm. Kombinasi isolat PPEA (Isolat *Pseudomonas pseudomallei* dan *Enterobacter agglomerans*) mampu menurunkan konsentrasi logam Zn dalam media sebesar 92.1% dan menurunkan konsentrasi logam Pb sebesar 71.32%, pada konsentrasi awal 100 ppm Zn dan Pb.

Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan oleh Sukoso di Universitas Kagoshima Jepang, dengan isolat yang sama tetapi dengan uji identifikasi yang berbeda yaitu dengan identifikasi 16S rDNA didapatkan hasil spesies isolat

bakteri S2 yaitu *Halomonas shengliensis*. Bakteri baru ditemukan pada tahun 2007 oleh Wang YN yang diisolasi dari tanah terkontaminasi minyak mentah asin dari ladang minyak Shengli, Provinsi Shandong, China. Menurut Wang YN (2007), bakteri *Halomonas shengliensis* merupakan sebuah bakteri yang cukup halophilik yaitu bakteri yang mampu hidup dalam kondisi kadar garam tinggi, dengan strain SL014B-85(T) yang diisolasi dari tanah terkontaminasi minyak mentah asin dari ladang minyak Shengli, Provinsi Shandong, China. *Halomonas shengliensis* memiliki sel-sel berbentuk batang dengan flagel lateral, merupakan gram negative dan aerobik. Pertumbuhan isolate bakteri ini terjadi pada konsentrasi NaCl 0-15% (optimal 5-15%), dengan suhu 10-42°C (optimal 30°C) dan pH 8,0-9,0 (optimal pH 8,5°C).



## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian isolasi dan karakterisasi bakteri termofilik isolat A2 dan S2 air lumpur dan sedimen padat lumpur lapindo yang terletak di Desa Renokenongo Kecamatan Porong Kabupaten Sidoarjo Jawa Timur didapat kesimpulan sebagai berikut,

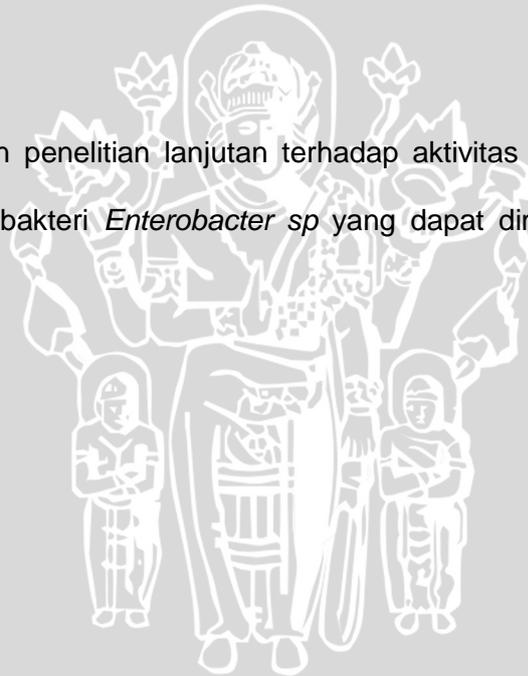
- Dari hasil pengamatan dan pengujian kondisi lingkungan semburan lumpur panas lapindo didapatkan hasil, suhu yang cukup tinggi yaitu 45°C pada air lumpur dan 48°C pada sedimen, pH 7,8 pada air lumpur dan 7,5 pada sedimen, serta kadar salinitas yang tinggi yaitu 30 ppt. pada pengujian logam berat didapatkan hasil logam Pb pada air lumpur 0,69 ppm dan sedimen 2,69, logam Hg pada air lumpur 0,23 ppm dan sedimen 0,59 ppm, logam Cu pada air lumpur 0,07 ppm dan sedimen 0,27 ppm, logam Fe pada air lumpur 0,76 ppm dan sedimen 6,48 ppm, logam Zn pada air lumpur 0,03 ppm dan sedimen 0,49 ppm, logam Cd pada air lumpur tidak ditemukan dan sedimen 0,03 ppm, logam Au pada air lumpur 0,42 ppm dan sedimen 2,12 ppm, logam Cr pada air lumpur 0,02 ppm dan sedimen 0,06 ppm, logam Mn pada air lumpur 39,18 ppm dan sedimen 528 ppm, serta logam Ni air lumpur 1,02 ppm dan sedimen 3,39 ppm.
- Hasil identifikasi bakteri yang diisolasi dari air dan sedimen lumpur lapindo menurut hasil pengamatan morfologi koloni dan sel serta pengujian biokimia didapatkan pendugaan berasal dari genus *Enterobacter sp.* pada kedua sampel. Sedangkan menurut hasil pengujian biokimia menggunakan *Microbact Identification Kits* didapatkan

hasil pendugaan spesies pada kedua sampel adalah *Enterobacter agglomerans* dengan persentase ketepatan sebesar 86,50 %. Sedangkan dari penelitian yang dilakukan oleh Sukoso di Universitas Kagoshima Jepang dengan identifikasi menggunakan pengujian 16S-rDNA didapatkan hasil untuk sampel air adalah spesies *Marinobacter lutaoensis* dan untuk sampel sedimen adalah spesies *Halomonas shengliensis*.

- Bakteri yang diisolasi tersebut mampu hidup di lingkungan yang bersuhu tinggi dan kadar logam beratnya cukup tinggi sehingga diharapkan dapat dimanfaatkan dalam industri perikanan.

## 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap aktivitas enzim termostabil yang dihasilkan oleh bakteri *Enterobacter sp* yang dapat dimanfaatkan dalam industri perikanan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Adams MWW. 1999. *The Biochemical Diversity of Life Near and Above 100 Degrees C in Marine Environment*. Appl. Microbiol. 85: 108s-117s.
- Aguilar, C F I. Sanderson, M. Moracci, M. Clamella, R. Nucci, M Rossi. 1998. *Crystal Structure Hyperthermophili Archeon Sulfolobus solfatoricus as a Key Factor in Thermostability*. Mol. Biol. 271: 789-802.
- Alexis, Deletoile. 2008. *Phylogeny and Identification of Pantoea Species and Typing of Pantoea Agglomerans Strain by Multilocus Gene Sequencing*. J Clin Microbiol 47(2): 300-310.
- Andrea, Cruz. 2007. *Pantoea agglomerans, A Plant Patoghen Causing Human Disease*. Texas Children's Hospital, 6621 Fannin Street, MC 1-1481, Houston, TX 77030.
- Apriani, R.S., P. Wesen. 2013. *Penurunan Salinitas Air Payau Dengan Menggunakan Resin Penukar Ion*. Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jawa Timur.
- Arief, Dharma. 1984. *Pengukuran Salinitas Air laut Dan peranannya Dalam Ilmu Kelautan*. Oseana, vol IX, no 1 : 3-10, LIPI.
- Badan Lingkungan Hidup Daerah. 2007. *Dampak Buangan Lumpur Sidoarjo*. (<http://journal Dampak Buangan Lumpur Lapindo.ac.id>. diakses 18 Maret 2008 13:35).
- Brotowijoyo, M. D., Dj. Tribawono., E. Mulbyantoro. 1995. *Pengantar Lingkungan Perairan dan Budidaya Air*. Penerbit Liberty. Yogyakarta.
- Brown, A. 2001. *Benson: Microbiological Application Lab Manual 8<sup>th</sup> Edition*. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Brock T. D. 1986. *Thermophiles: General Molecular and Applied Microbiology*. Departement of Bacteriology 1550 Linden Drive University of Wonconsin-Madison. Winconsin 53705 USA. John Willey & Son.
- Buckle, et al. 1987. *Ilmu Pangan (terjemahan)*. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta.
- Candra Ji. 2006. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Produk Bekasam Ikan Bandeng (Channos channos). Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan*, Institut Pertanian Bogor.

- Cappuccino JG, Sherman N. 1983. **Microbiology A Laboratory Manual**. New York: State University of New York, Rockland Community Collage.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, dan L. G. Mitchell. 2000. **Biologi Edisi ke 5 Jilid 2. (diterjemahkan dari : Biology Fifth Edition, penerjemah : W. Manalu)**. Penerbit Erlangga. Jakarta. 404 hal.
- Chapelle, FH 1993. **Tanah Air Mikrobiologi dan Geokimia**. Jihn Wiley and Sons, New York.
- Chernin, L. S. Michael. Shosan, H. Barrie, W. B. 1998. **Chitinolytic Activity in *Chronobacterium violaceum***. J Bacteriol. 18: 435-441.
- Darwis A.A & Sukara. 1990. **Teknologi Mikrobial**. Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi pusat antar Universitas Bioteknologi. IPB.
- DR 2800 Spectrophotometer. 2007. **Procedure Manual June 2007 Edition 2**. Hach Company. Germany
- Effendi, Hefni. 2003. **Telaah Kualitas Air**. Yogyakarta : Kanisius
- Fardiaz S. 1989. **Petunjuk Laboratorium. Analisis Mikrobiologi Pangan. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi**. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Institut Pertanian Bogor.
- Friedman GM, dan JE Sanders, (1978), **Principle of Sedimentology**, New York: John Wyley & Sons Ltd
- Gadd, G.M., 1990b, **Metal Tolerance in Microbiology of Extreme Environments, Edwards, C., ed**, Open University Press, Milton Keynes, 178-210.
- Ginting, Jusuf. 2009. **Isolasi Bakteri dan Uji Efektifitas Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Kabupaten karo, Sumatra Utara**. Tesis Magister Biologi Universitas Sumatra Utara.
- Gomes J& Stelner W. 2004. **The Biologycaltic Potential of Extremthermophilies**. Food Technol. Biotechnol. 42: 223-235
- Gooday GW. 1994. **Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. In Ratledge C, editor. Biochemistry of Microbial Degradation**. Netherlands: Kluwer Academic Publ. p: 279-312.
- Grffiths RI, Whiteley AS, Bailey MJ. 2000. **Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA and rRNA-based Nicrobial Community Composition**. Appl Environ Microbiol 66:5488-5491.

- Gross, M.G. 1993. ***Oceanography***. a View of Earth, 6th Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- Hadioetomo RS. 1985. ***Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium***. Jakarta: Penerbit Gramedia.
- Handayani, E.H., K. Oginawati, dan M. Santoso. 2013. ***Analisa Logam Cu Dan Zn Pada Jajanan Anak Sekolah Dasar Di Bandung Dengan Metode Spektrofotometri Serapas Atom (SSA)***. Institut Teknologi Bandung.
- Harman G. E. 1993. ***Detection & Quantification of N-acetyl-Beta-D-Glucosaminidase, Chitobiosidase & Endochitinase in Solution & On Gels***. Anal Biochem. 208: 74-78.
- Herawati, N. 2007. ***Analisis Resiko Lingkungan Aliran Air Lumpur Lapindo ke Badan Air***. Tesis Program Studi Ilmu Lingkungan Univ. Diponegoro. Semarang.
- Herbert, R. and Sharp R. 1992. ***Molecular Biology and Biomolecular of Extremophiles***. Chapman and Hall, New York.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, William ST. 1994. ***Bergey's Manual of Determinative Bacteriology***. Edisi ke-9. Lippicolt Williams and Wilkins. New York
- Hutabarat S dan SM Evans. 1985. ***Pengantar oseanografi***. UI-Press. Jakarta. 1x+159 hlm.
- Jallal, Mardaneh. 2013. ***Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility of Pantoea (Enterobacter) Agglomerans Isolated From Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in NICU Ward: First Report From Iran***. Department. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- Jayanti, M.W., B. Oktavia, dan M.Yazid. 2012. ***Karakterisasi Bakteri Toleran Uranium Dalam Limbah Uranium Fase Organik TBP-Kerosin***. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pengelolaan Limbah IX. Hal. 197-210.
- Keputusan Menteri Negara Kependudukan Dan Lingkungan Hidup. 1988. ***Keputusan Menteri Negara Kependudukan dan Lingkungan Hidup No: Kep-02/MENKLH/I/1988***. Tentang Pedoman Penetapan Baku mutu Air Laut: 57 hal.
- Keputusan Gubernur Jawa Timur No.45. 2002. ***Baku Mutu Limbah Cair Bagi Industri Atau Kegiatan Usaha Lainnya Di Jawa Timur***. 14 hal.
- Kinne, O. 1964. ***The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II Salinity and tem-perature salinity combination***. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 2 : 281-339.

- Kuchel. Philip W. Gregory B. Ralston. 1998. **Biochemistry second edition**. The McGraw-Hill Companies. United States of America: 595 hlm.
- Kumar, H.D. and Swati, S. 2001. **Modern Concepts of Microbiology**. Second revised ed. Vicas Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi.
- Kurniasari, Ratna. 2008. **Pengembangan Logam Berat Terhadap Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Minyak Diesel**. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. Bogor.
- Koesoemadinata, R, 2006, **Masalah Pembuangan Lumpur Lapindo Brantas ke Laut, Dongeng Geologi**, www.rovicky.wordpress.com, akses tanggal 20 Desember 2013.
- Lay BW. 1994. **Analisis Mikroba di Laboratorium**. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Lestari, P. 2000. **Eksplorasi Enzim termostabil dari Mikroba Termofil**. Fakultas Biologi Universitas Jendral Sudirman, Purwokerto. J. Hayati, 17:21-25.
- Ling, J.M., Y.W, Hui, dan G.L, French. 1988. **Evaluation of the Microbact-24E Bacterial Identification System**. J Clin Pathol. 41:910-914.
- Liu, Wen-Tso, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. 1997. **Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism of Genes Encoding 16s rDNA**. Appl Environ Microbiol 63:4516-4522.
- Madigan et al., 1995. **Biology of Microorganism**. Pentice Hall, Inc. New Jersey
- Maton, A, Jean, H, Wiliam, L, Susan, J and Maryanna, QW. 1993. **Human Biology and Health**. Engelwood Cliffs, New Jersey, USA.
- Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2002. **Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor:907/Menkes/SKVII/2002**, tentang Syarat-syarat Kualitas Air Minum, Jakarta.
- Moriarty. D.J.W. dan R.S.V. Pullin. 1987. **Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture**. International Center For Living Aquatic Resources Management. Manila.
- Muharni. 2010. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri penghasil Kitinase dari sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan**. Jurusan FMIPA Biologi Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan.
- Nybekken, W James. 1992. **Marine Biology: An Ecological Approach**. PT Gramedia. Jakarta.
- Ongkosongo, O. S. R. 1992. **Keadaan Lingkungan Fisik Pantai Jakarta**. LON-LIPI.Jakarta. 15 hal.

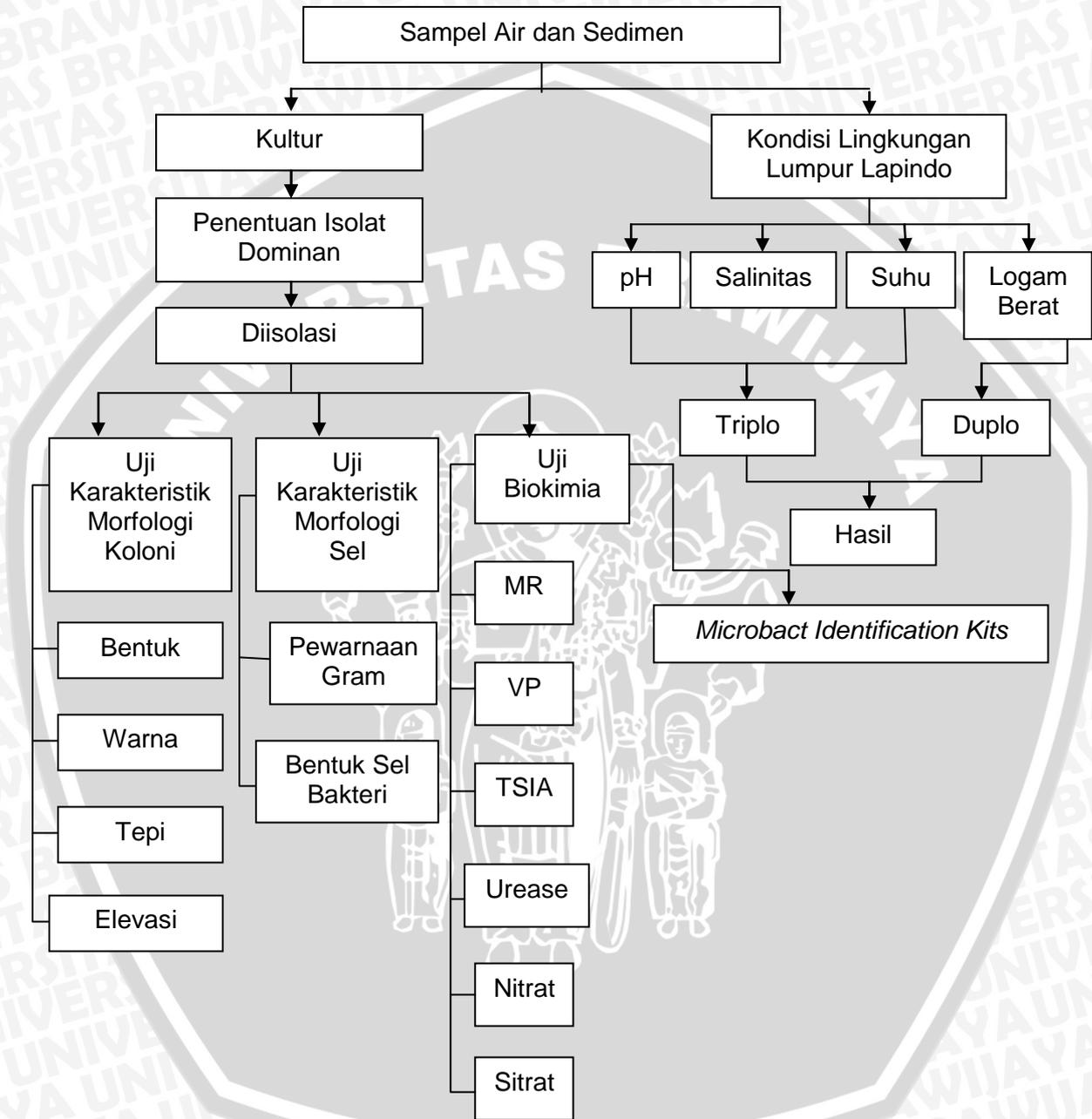
- Oxoid. 2003. **Manual Identification System Microbact Gram Negative 12A, 12B, 12E & 24E.** www.oxoid.com/pdf/uk/M-bact-Gram-Neg.pdf. Diakses Pada Tanggal 20 November 2013 Pukul 18.15.
- Palar, H. 1994. **Pencemaran Dan Toksikologi Logam Berat.** Rineka Cipta. Jakarta.
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan, 1986, **Penterjemah , Ratna Siri Hadioetomo et al. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1,** Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Prabaningtyas S. 2003. **Karakteristik Bakteri Koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Malang. Malang:** Chimera Vol: VIII. No.2..
- Purnomo, Bambang. 2008. **Materi Kuliah Mikrobiologi.** Faperta Unib. Bengkulu
- Poernomo, A. T. Purwanto, D. A. 2003. **Enzim Kitinase.** Majalah Farmasi Airlangga. Jakarta. 3(3): 31-32.
- Rahayu S, Fredy T, Maggy TS, Hwang JK, Pyun YR.1999. **Eksplorasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Kitinase Asal Indonesia.** Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati IPB, Bogor..
- Rifardi. 2008. **Tekstur Sedimen; Sampling dan Analisis.** Unri Press. Pekanbaru,101 Hal.
- Rindayani, Nadia. 2013. **Uji Kemampuan Pipa Aluminium dan Tembaga Pada Reaktor Desalinasi Elektrogravitasi Menurunkan Klorida.** Jurusan Teknik Lingkungan. ITS. Surabaya.
- Rudiger, A. 1994. **Enzymes from Extremethermophili & Hyperthermophili Archea & Bacteria.** VCH Verlagsgesellschaft mbH 946-941.
- Salam, A.H., Sugianto, dan T. Emrinaldi. 2013. **Menentukan Pola Penyebaran Logam Berat (Cu, Fe, Zn) Di Sungai Siak Dengan Menggunakan Spektrofotometer (AAS).** Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau. Pekanbaru.
- Salle AJ. 1961. **Fundamental Principles of Bacteriology.** New York: Mc Graw Hill Book Company Inc.
- Samsundari, S., I.Y. Perwira. 2011. **Kajian Dampak Pencemaran Logam Berat Di Daerah Sekitar Luapan Lumpur Sidoarjo Terhadap Kualitas Air Dan Budidaya Perikanan.** Gamma. Volume 6, No.2. 129-136.
- Sandell, E.B., 1959. **Colorimetric determination of traces of metals. 3rd Edition.** Interscience Publishers. New York.

- Satrio, B. Pratikno dan P. Sidauruk. 2012. **Studi Asal-Usul Air Lumpur Lapindo Periode 2007-2012 Menggunakan Isotop Alam**. Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi. Vol. 8 No. 2 Desember 2012. Hal 89-99
- Sasongko, L.A. 2006, **Kontribusi Air Limbah Penduduk di Sekitar Sungai TUK terhadap Kualitas Air Sungai Kaligarang Serta Upaya Penanganannya**. Tesis Program Magister Ilmu Lingkungan. Program Pascasarejana Universitas Diponegoro Semarang.
- Shieh WY. 2003. **Marinobacter lutaoensis sp. Nov., A Thermotolerant Marine Bacterium Isolated From a Coastal Hot Spring In Lutao, Taiwan**. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China.
- Sudarsono, Ahmad. 2008. **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pada Ikan Laut Dalam Spesies Ikan Gindara (*Lepidocibium flavobronneum*)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Suriawiria, Unus, 1985. **Pengantar Mikrobiologi Umum**. Penerbit Angkasa Bandung.
- Suryadi Y, Machmud M. 2002. **Keragaman Genetik Strain *Ralstonia solanacearum* berdasarkan karakterisasi menggunakan teknik berbasis asam nukleat**. Buletin AgroBio. 5 (2): 59-66.
- Sutamihardja, R.t.m, Adnan K . 1982. **Perairan Teluk Jakarta Ditinjau dari Tingkat Pencemaran**. Fakultas Pascasarjana. Jurusan PSL- IPB. Bogor
- Sofia. 2005. **Metal Contamination in Commercially Important Fish and Shrimp Species Collected from Aceh (Indonesia), Penang, and Perak (Malaysia)**. Master of Science Degree Thesis, Universiti Sains Malaysia.
- SK Gubernur Jawa Timur No. 45 Tahun 2002. **Tentang Baku Mutu Limbah Cair Bagi Industri Atau Kegiatan Usaha Lainnya di Jawa Timur**. Jawa Timur
- Tsujibo, I-I., Orikoshi H., Shiotani K., Hayashi M., Urneda J., Miyamoto K., Inada C., Okarni Y., Inamor: U.1998. **Characterization of Chitinase L" from Marine Bacterium Alteromonas sp. Strain 0-7 and Its Corresponding Gene and Domain Structure**. . Appl. and Environmental Microbiology Vol.64 No.2
- Ulrich de la Camp and Oliver Seely. 2013. **Determination of The Content of Steel**. Diakses Pada Tanggal 2 Desember 2013 Pada Pukul 22.00
- Universal Bacterial PCR Fact Sheet. 2004. 16S rDNA Assay.**
- Usman, E., Salahuddin, M., Ranawijaya DAS., dan Hutagaol, J. P., 2006, **Paper Pendukung, Simposium Nasional: Pembuangan Lumpur Porong-Sidoarjo ke Laut?** Surabaya.

- Van der Burg B. 2003. **Extremophiles as a source for Novel Enzymes**. Curr Opin in Microbiol. 6: 213-318.
- Verloo, M.1993. **Chemical Aspects of Soil Pollution**. In ITC-Gen Publications Series 4:17-46
- Wang, Y.N. 2007. **Halomonas shengliensis sp. Nov., A Moderately Halophilic, Denitrifying, Crude-oil-utilizing Bacterium**. Departement of Enviromental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing China.
- Wang, S. Wu, J. Rao, P.Ng. 2005. **A Chitinase With Antifungal Activity From the Mung Bean**. Protein Expr Pufif 40: 230-236.
- Ward, F.N; H.M Nakagawa; T.F Harms and G.H. VanSickle 1969. **Atomic-Absorption Methods of Analysis Useful in Geochemical Exploration**. United States Government Printing Office. Washington
- Waluyo. L, 2007. **Mikrobiologi Umum. Edisi Revisi**. Balai Pustaka : Jakarta
- Widayati, Widada, Soedarsono. 2007. **Deteksi Molekular Bakteri Endofit pada Jaringan Planlet Tebu Molecular Detection of Endophytic Bacteria on Planted Tissue of Sugarcane**. Hayati jurnal of Biosciences, Desember 2007, page 145-149 Vol 14 No 4 ISSN: 1978-3019.
- Wijayanti, Fitria Kusuma, 2008. **Profil Pencemaran Logam Berat Di Air Dan Sedimen Sungai Citarum Segmen Dayeuh Kolot Sampai Nanjung**. Tugas Akhir S1. Program Studi teknik Lingkungan, FTSL, ITB : Bandung.
- Winarsih, S., T. Nusan, dan Y.W.Citerawati SY. 2011. **Reproduksi dan Pertumbuhan Mikroorganisme**. Universitas Palangkaraya.
- Winda, H. Maggy, T. Suhartono. 2012. **Karakterisasi Kitinase dari Mikroba**. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor. IPB. Bogor.
- Yu Z, Mohn WW. 2001. **Bacterial Diversity and Community Structure in an Aerated Lagoon Revealed by Ribosom DNA Sequencing**. Appl Environ Microbial. 674:1565-1574
- Yumei dan Yulia. 2008. **Metode Penelitian Sosial (Resume)**. Diakses 2 Oktober 2013. Pukul 16.00 WIB
- Zajac, Anna Sykula; Monika Turek; Mohit Philip Mathew; Ferenc Patai; Martina Horvat; Joanna ablonska. 2010. **Determination of Nickel in Tea by Using Dimethylglyoxime Method**. No.1081 Food Chemistry and Biotechnology, Vol. 74 2010. Scientific Bulletin of The Technical University of Lodz

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian

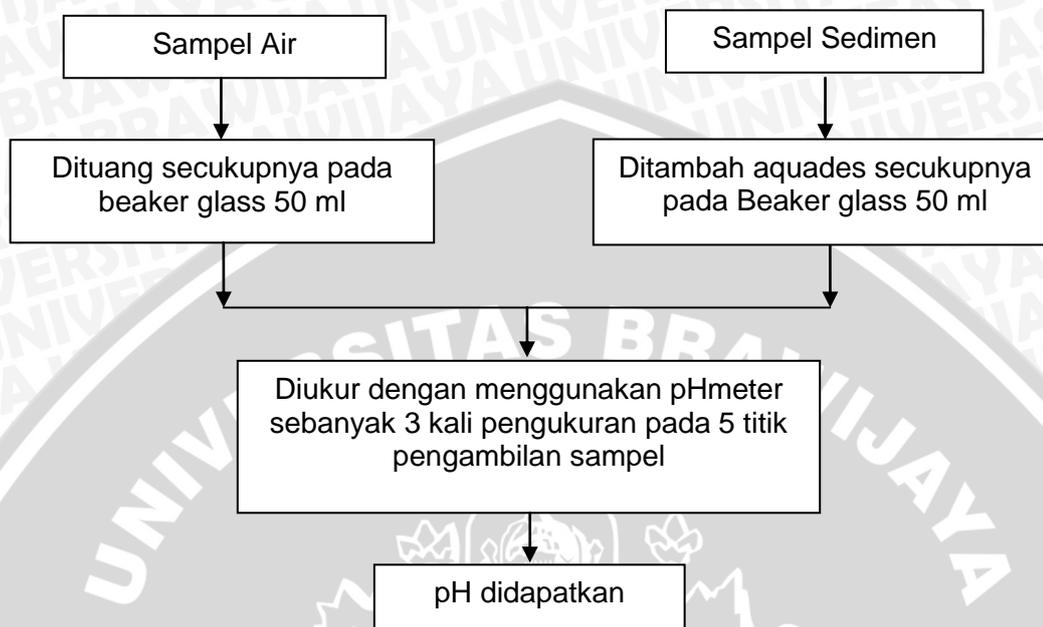


## Lampiran 2. Pengambilan Sampel

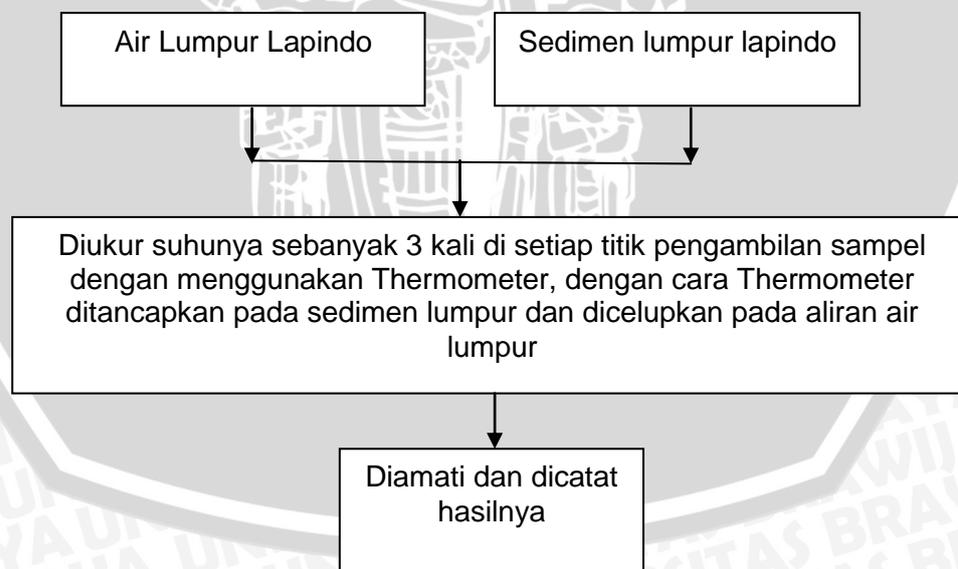


### Lampiran 3. Pengukuran Parameter Fisika dan Kimia Lingkungan

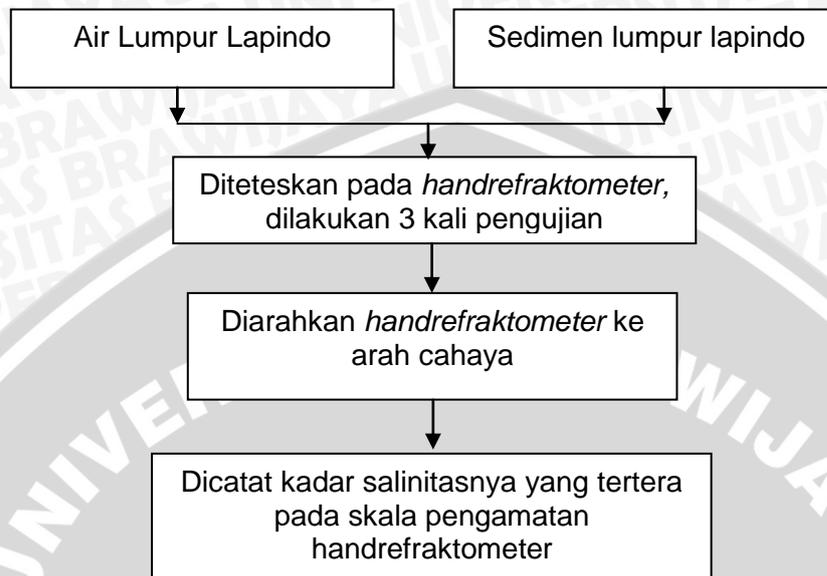
#### 3.1 Pengukuran pH



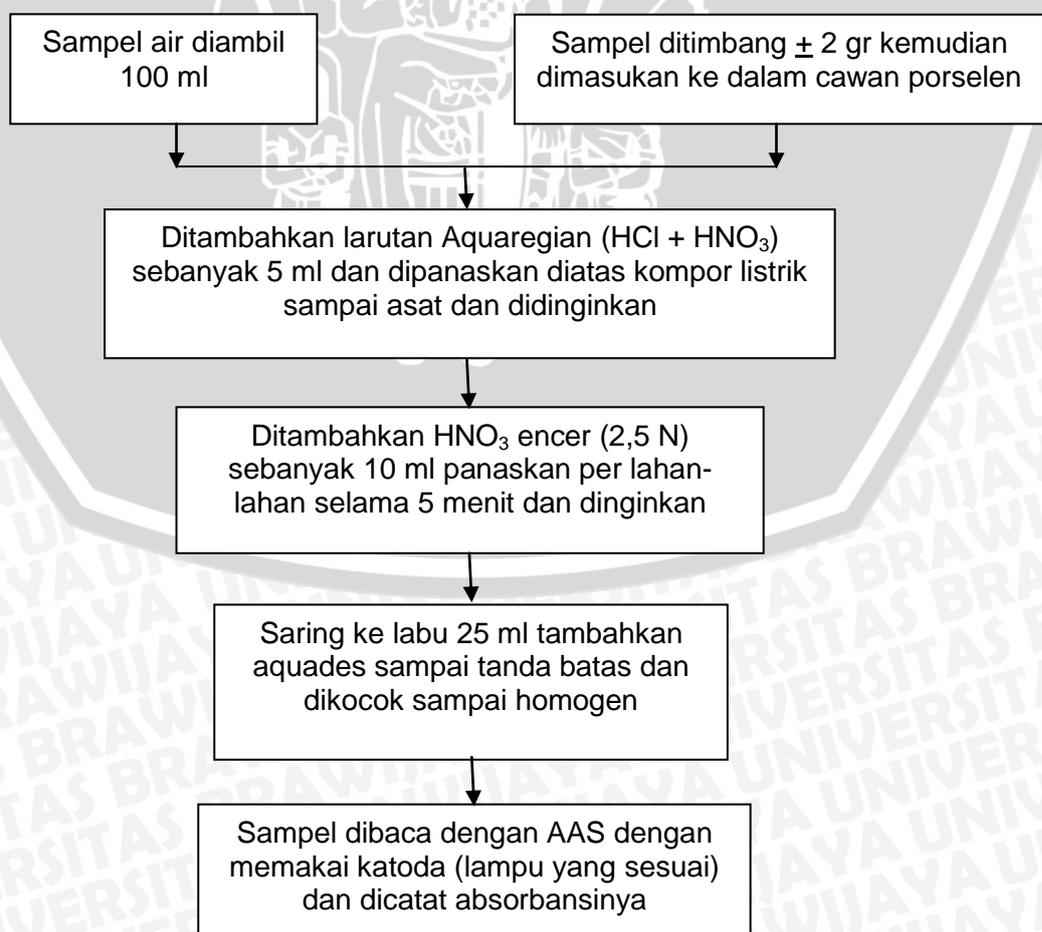
#### 3.2. Pengukuran Suhu



### 3.3 Salinitas



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



### 3.5 Pengukuran Logam Berat dengan Spektrofotometer

#### - Logam Mn (panjang gelombang 525 nm)

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

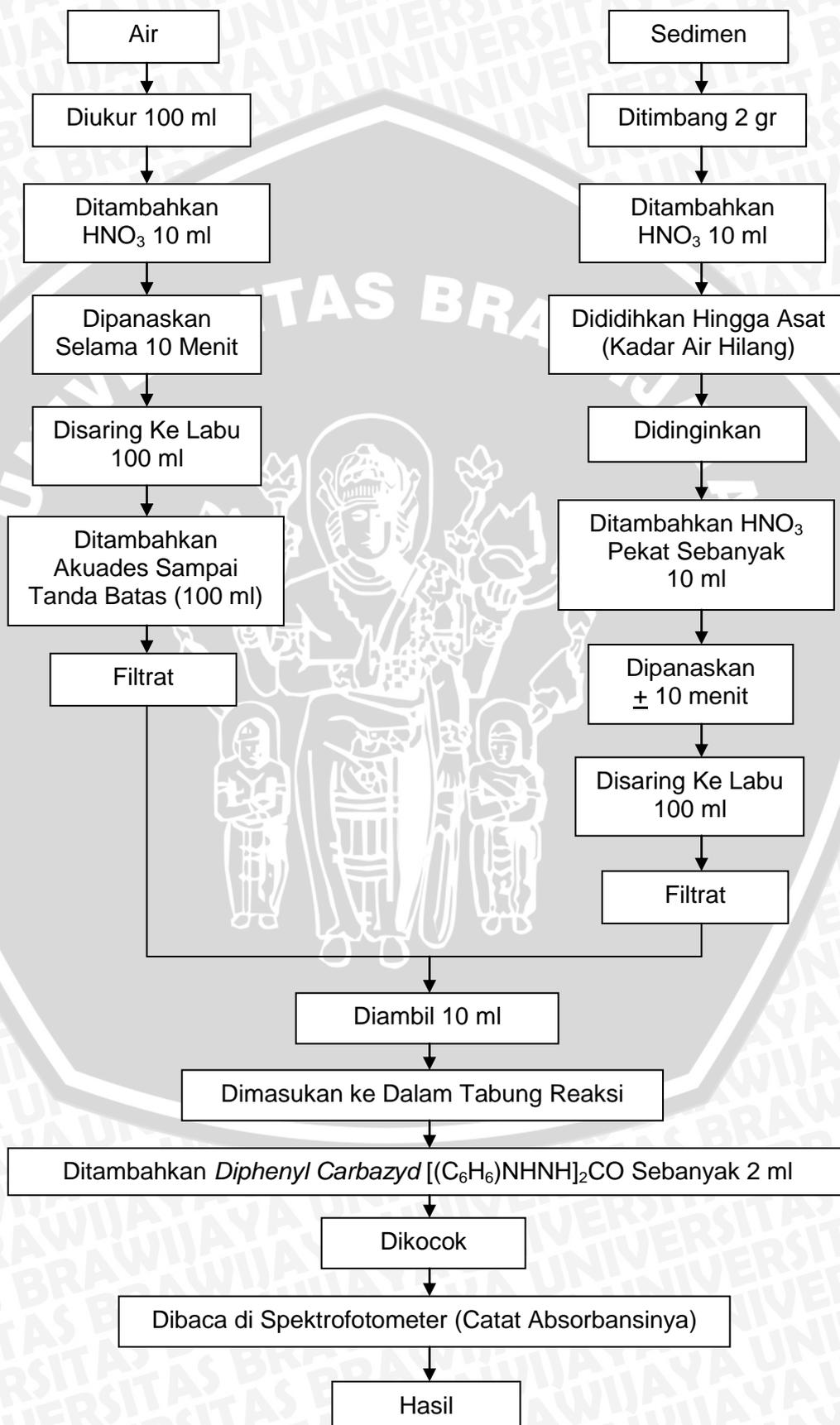
Sampel sedimen diambil 2 gram dan ditambahkan 10 ml  $\text{HNO}_3$  lalu dididihkan hingga asat (kadar air

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

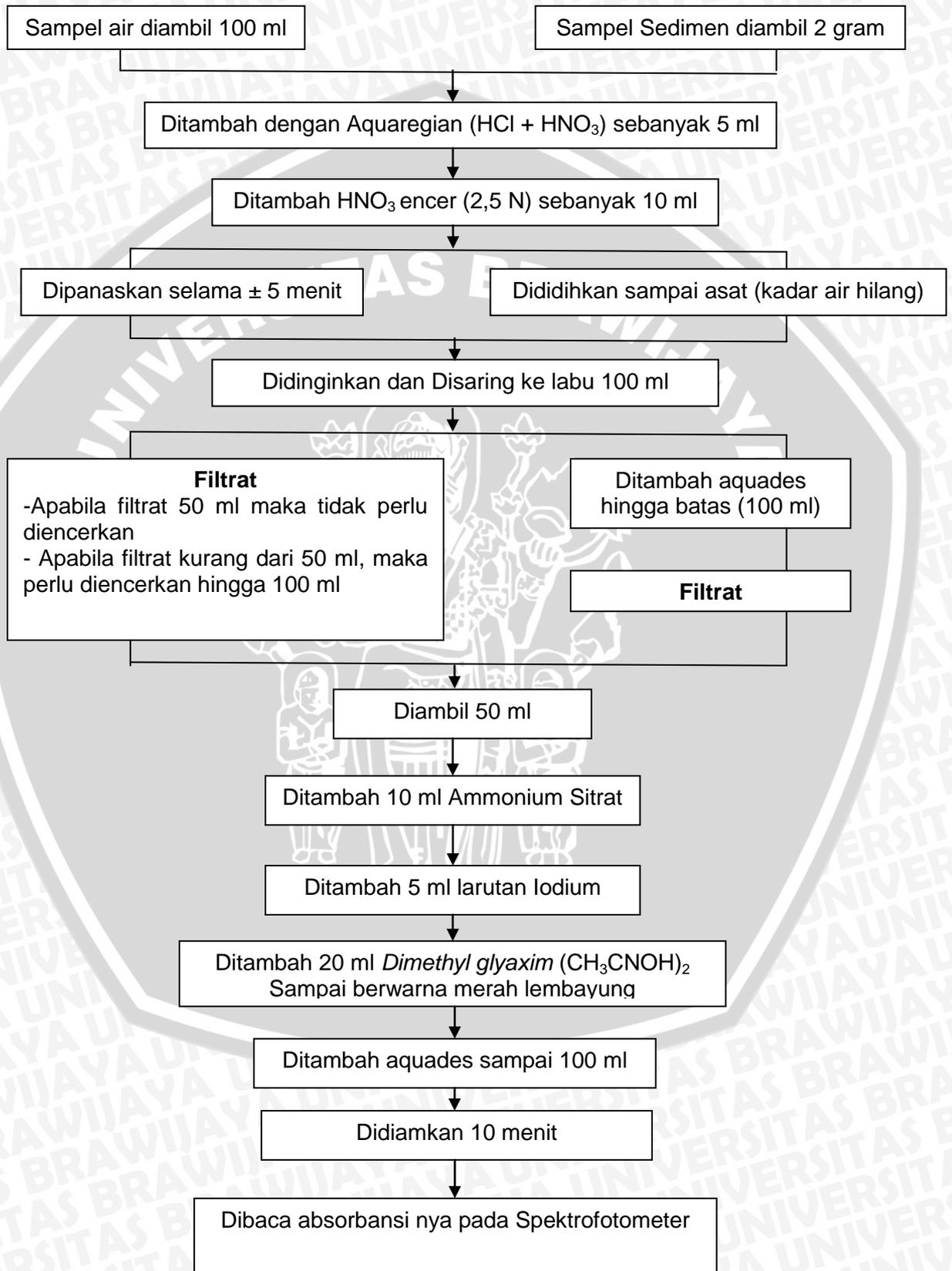
Didihkan dan didinginkan kemudian ditambahkan  $\text{NaIO}_4$  (Natrium Periodate) 0,1 gram dan dipanaskan  $\pm 70^\circ\text{C}$  sampai terbentuk warna merah lembayung

Diukur dengan spektrofotometer dan dicatat

- Logam Cr (panjang gelombang 540 nm)

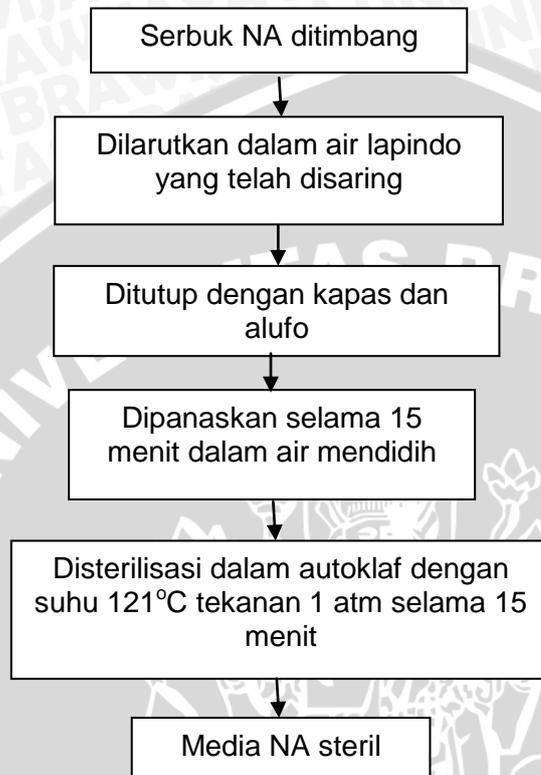


- Logam Ni (panjang gelombang 530 nm)



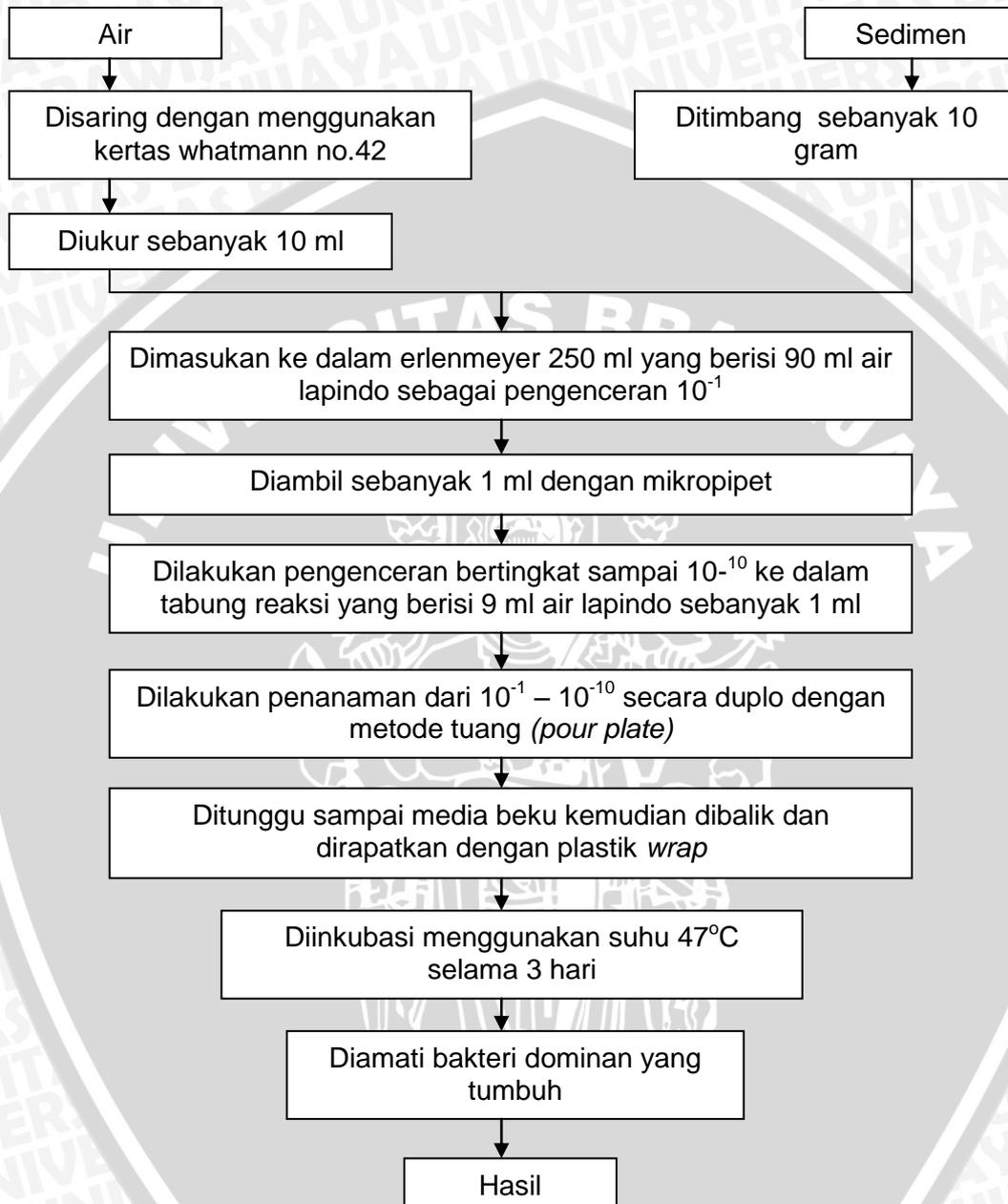
## Lampiran 4. Kultur Bakteri Dominan

### 4.1 Persiapan Media NA (Nutrient Agar)



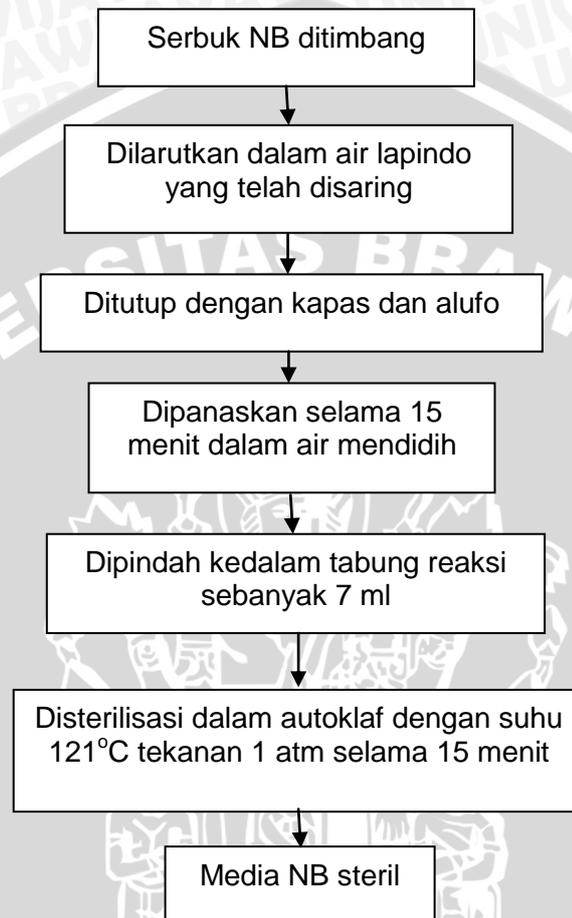
$$\text{Rumus : NA} = \frac{20}{1000} \times \sum \text{cawan} \times 20 \text{ ml}$$

#### 4.2 Kultur Bakteri Massal



## Lampiran 5. Isolasi Bakteri Target

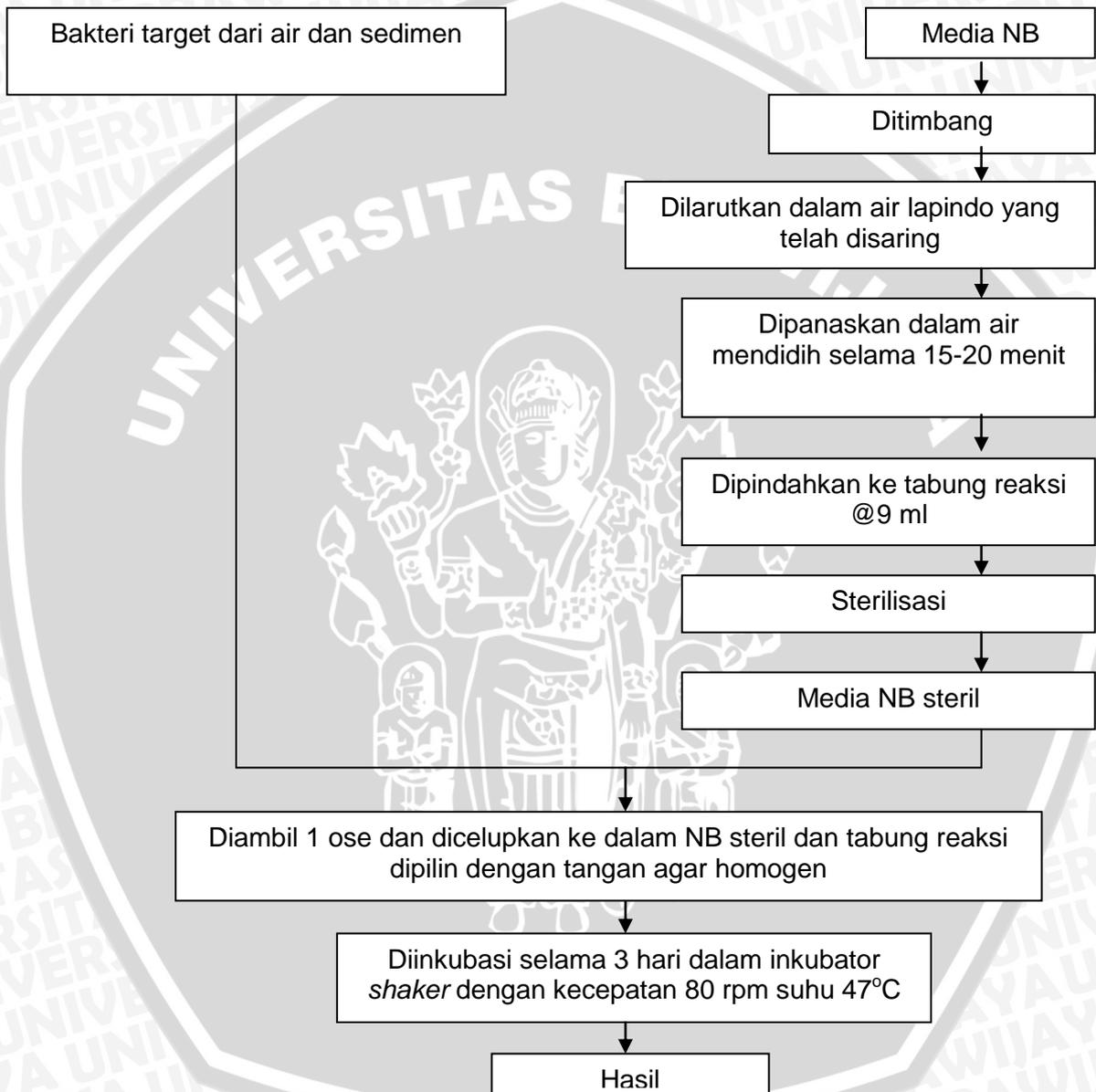
### 5.1 Pembuatan Media NB (Nutrient Broth)



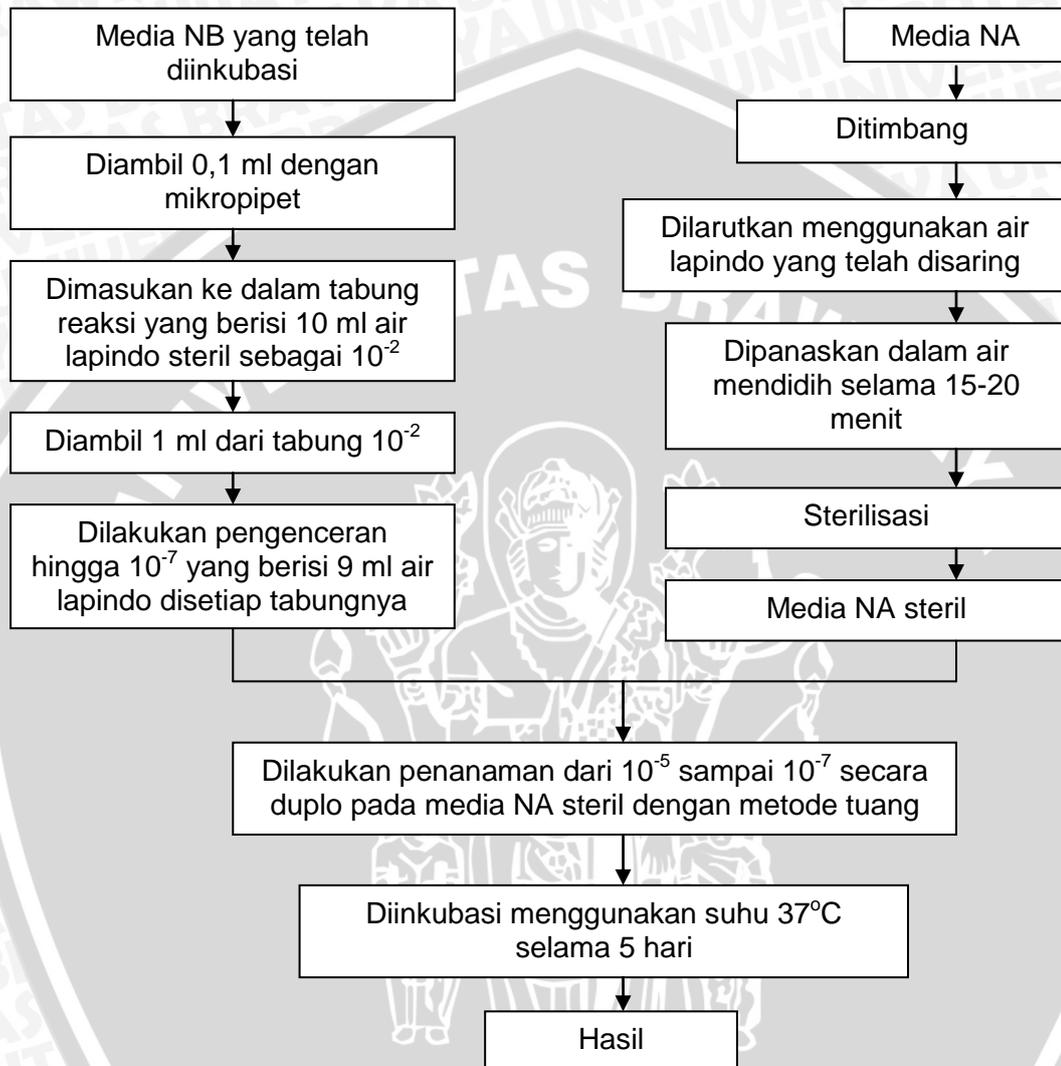
$$\text{Rumus : NB} = \frac{13}{1000} \times \sum \text{tabung} \times 7 \text{ ml}$$

## 5.2 Isolasi Bakteri Target

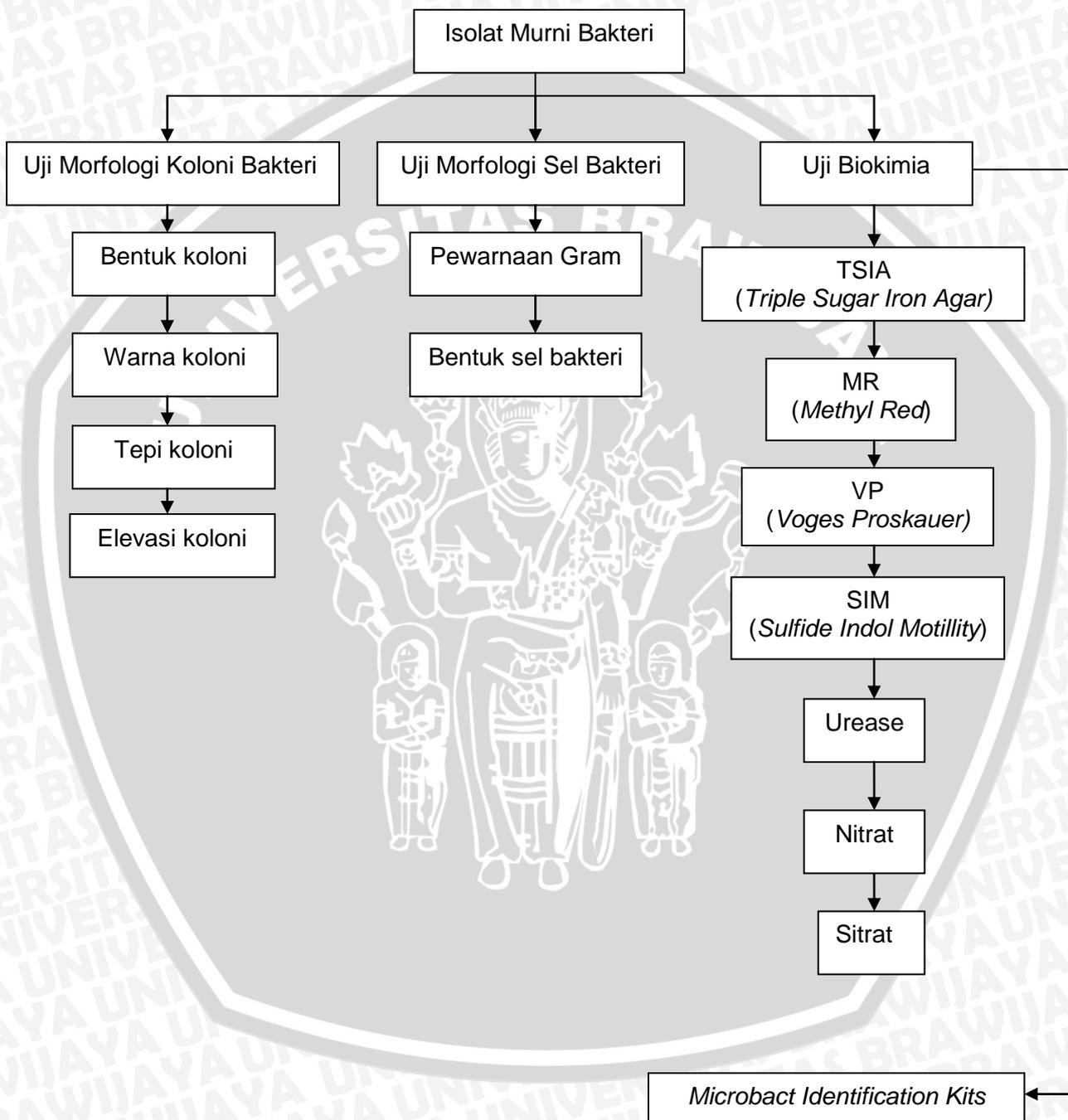
### Tahap 1.



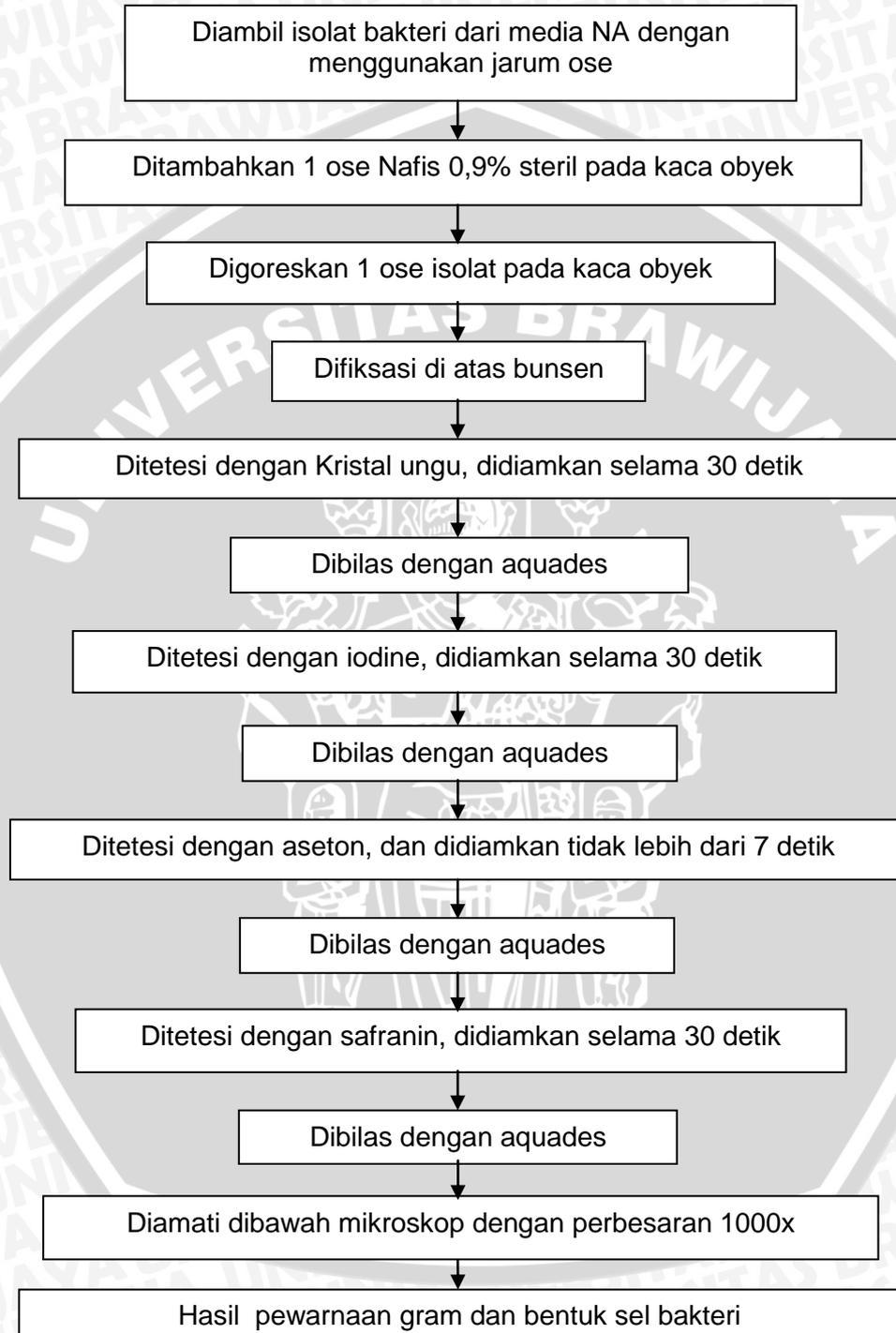
Tahap 2.



Lampiran 6. Uji Karakterisasi Bakteri



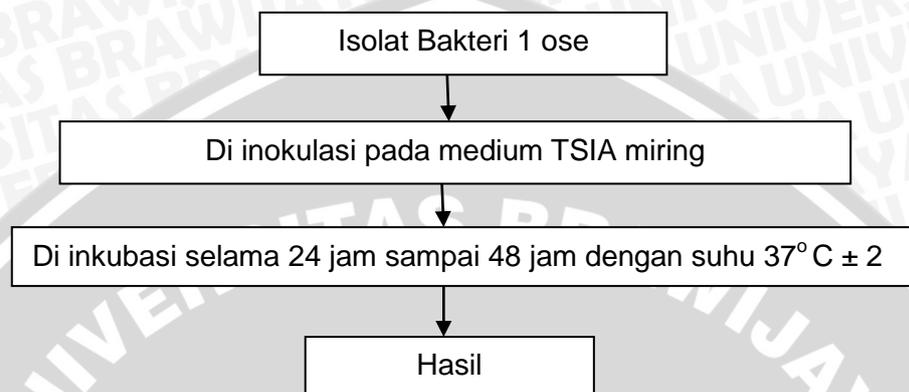
## 6.1 Pewarnaan Gram dan Bentuk Sel Bakteri



## 6.2 Uji Biokimia

### 6.2.1 Uji Biokimia Manual

#### - Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)



#### Keterangan:

Asam/Asam = Kuning/Kuning

Alkali/Alkali = Pink/Pink

Asam/Alkali = Kuning/ Pink

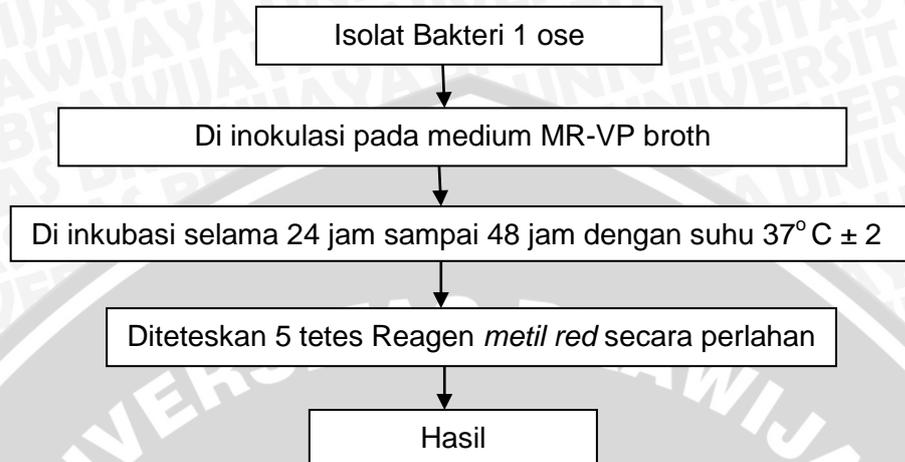
Alkali/Asam = Pink/Kuning

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

Adanya Gas = Gelembung/retakan pada media



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

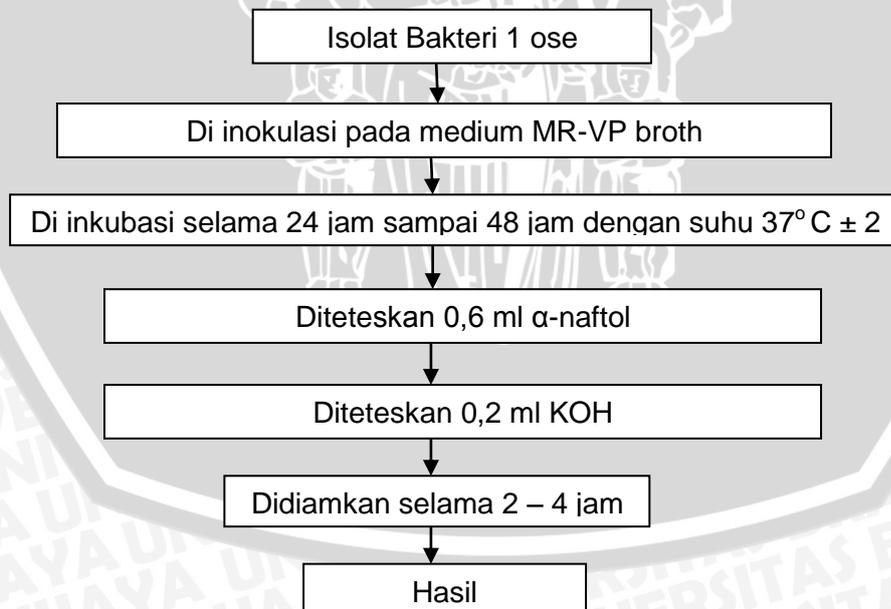


#### Keterangan:

(+) = Apabila medium berubah warna menjadi merah

(-) = Apabila medium berubah warna menjadi kuning

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

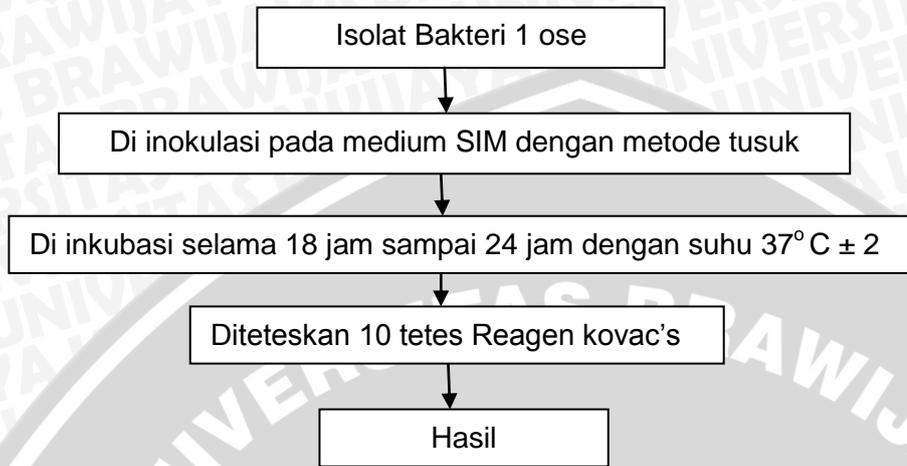


#### Keterangan:

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

(-) = Apabila tidak ada perubahan warna

- Uji SIM ( *Sulfide Indol Motility* )



Keterangan:

**Indol:**

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

(-) = Apabila medium berubah warna menjadi kuning

**Motil:**

(+) = Adanya kekeruhan pada bekas tusukan

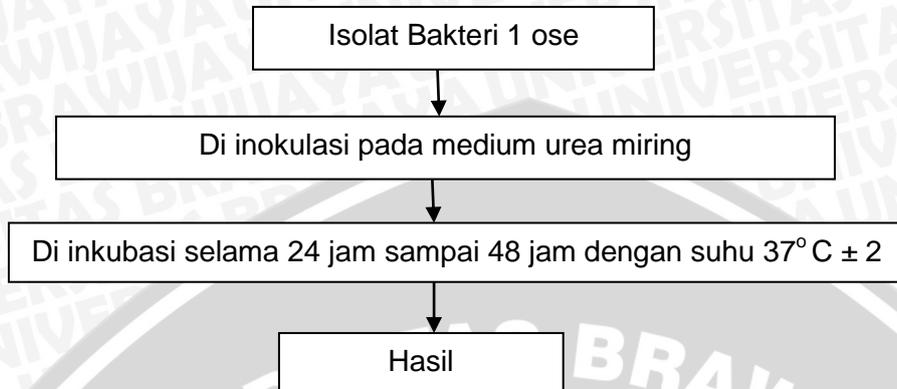
(-) = Tidak ada kekeruhan pada bekas tusukan

**Sulfur:**

(+) = Terbentuk warna hitam

(-) = Tidak berubah warna

### - Uji Urease

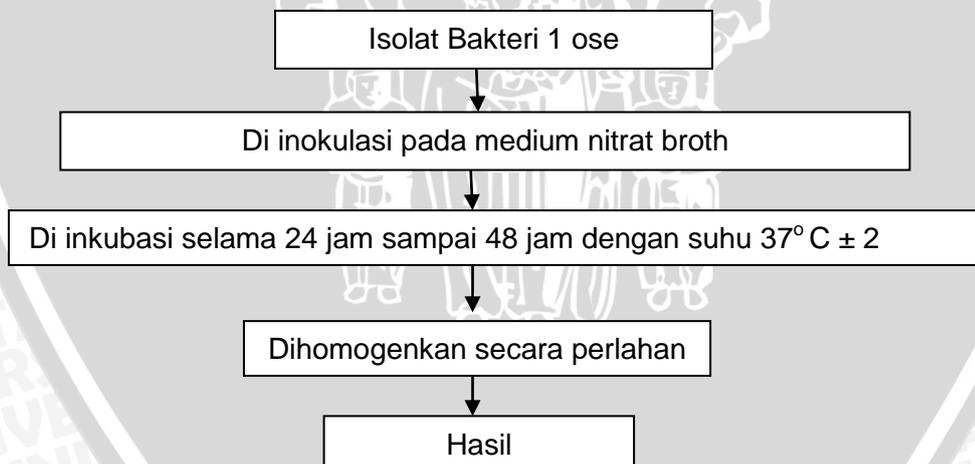


#### Keterangan:

(+) = Apabila medium berubah warna menjadi pink

(-) = Apabila tidak ada perubahan warna

### - Uji Nitrat

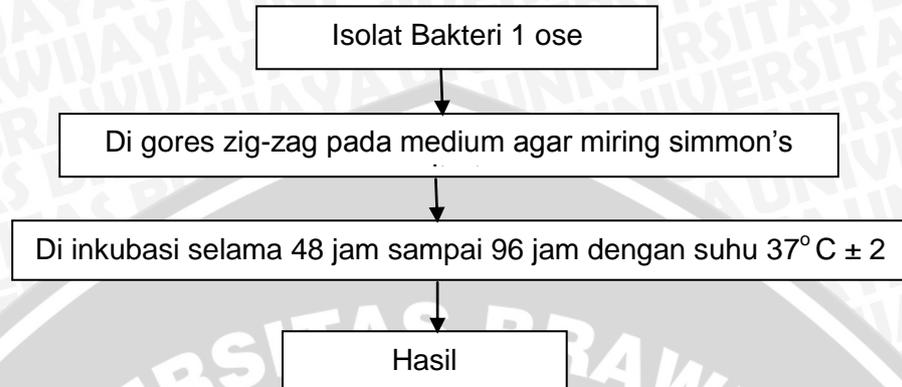


#### Keterangan:

(+) = Apabila medium berubah menjadi keruh

(-) = Apabila tidak ada perubahan kekeruhan

- Uji Sitrat



**Keterangan:**

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

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



### 6.2.2 Uji Biokimia *Microbact Identification Kits*

Isolat bakteri murni air dan sedimen pada media NA usia 72 jam dimasukkan 5 ml Nafis 0,9%

Dimasukkan 10  $\mu$ l (4 tetes) larutan bakteri kesetiap sumur microbact kits

Sumur lysine, ornithin, H<sub>2</sub>S dan arginin ditambah 1-2 tetes mineral oil

Sumur nomor 8 dengan indol kovact 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing 1 tetes, sumur nomor 12 dengan TDA 1 tetes

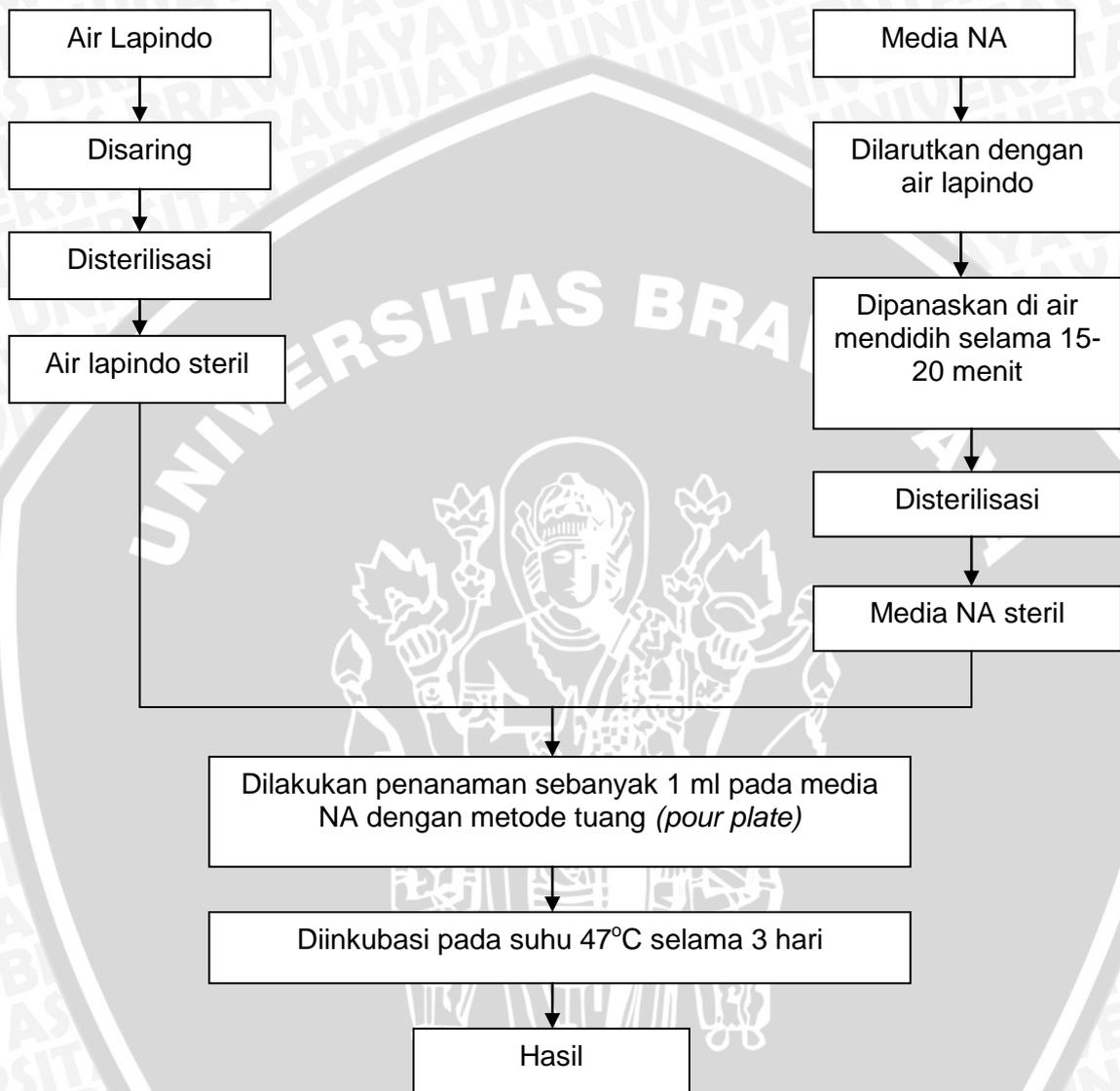
Hasil dibandingkan dengan table warna dan ditulis pada formulir yang tersedia

Sumur 7 ONPG ditambahkan nitrat A dan nitrat B masing-masing 1 tetes

Dihitung angka oktal dan dimasukkan dalam program komputer

Hasil

## Lampiran 7. Pembuatan Blanko ( kontrol negatif )



### Lampiran 8. Gambar Pengujian Biokimia

- Uji biokimia Konvensional/manual

Isolat A2



Isolat S2



BRAWIJAYA



- Uji Biokimia dengan *Microbact Identification Kits*

Isolat A2



Hasil identifikasi isolat A2

**OXOID**  
**MICROBACT™**  
IDENTIFICATION KITS

**MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E**

A<sub>2</sub>

		GNB 24E																										
		GNB 12A / 12E										GNB 12B																
		Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result / Resultado / Ergebnis / Resultat / Risultato / Resultat / Resultat / Αποτέλεσμα					-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-												
		4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum / Suma / Somme / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Αθροισμα					0			7				5		6														

Enterobacter agglomerans 86.58

Identification / Identificación / Identifikation / Identifikation / Identificazione / Identification / Identifizierung / Identificação / Ταυτοποίηση



Isolat S2



Hasil Identifikasi isolat S2

**OXOID MICROBACT™ IDENTIFICATION KITS**

**MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E**

S<sub>2</sub>

		GNB 24E																										
		GNB 12A / 12E										GNB 12B																
		Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result / Resultado / Ergebnis / Resultat / Risultato / Resultat / Resultat / Resultado / Αποτέλεσμα					+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-												
		4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum / Suma / Somme / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Αθροισμα					0			7			5			6														

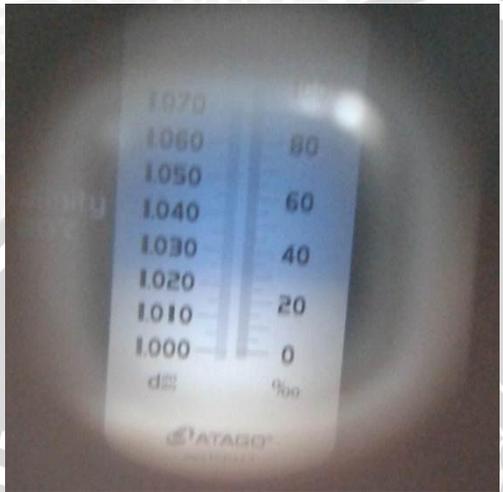
*Enterobacter agglomerans, 86,50%*

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

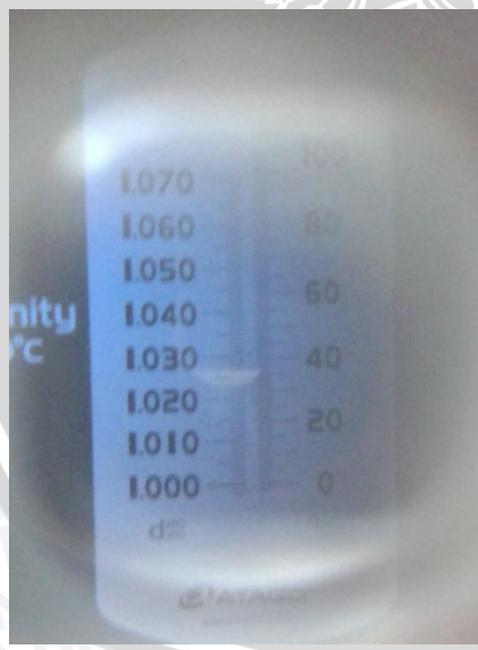


### Lampiran 9. Pengujian Salinitas

- Salinitas Air



- Salinitas Sedimen



## Lampiran 10. Hasil Pengujian Kadar Logam Berat Air dan Sedimen Lumpur Lapindo



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**FAKULTAS MIPA JURUSAN KIMIA**  
 Jl. Veteran – Malang 65145, Telp. (0341) 575838, 551611 – 551615, Pes.311, Fx (0341) 575839  
 Email : kimia\_ub@ub.ac.id, Website : http://kimia.ub.ac.id

### LAPORAN HASIL ANALISA

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

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

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

#### Catatan :

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



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

Dra. Sri Wardani, MS.i

NIP. 196006011986031003

