

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif dengan tiga kali pengulangan. Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian deskriptif karena tidak dilakukan perlakuan terhadap objek yang diuji (Nazir, 2003). Untuk mengidentifikasi bakteri pendegradasi detergen yang diisolasi dari limbah domestik yang ada di kolam maturasi Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Bojongsoang Bandung.

B. Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah limbah domestik pada kolam maturasi di Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Bojongsoang Bandung.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Februari – Mei 2011 bertempat di Laboratorium Perusahaan Daerah Air Minum (PDAM) Antapani, Bandung, sedangkan pengambilan sampel akan dilakukan di kolam Maturasi Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Bojongsoang, Bandung. Serta Lab. Mikrobiologi FPMIPA UPI.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Berikut ini adalah alat-alat dan bahan yang digunakan pada penelitian identifikasi bakteri pendegradasi detergen.

a. **Alat penelitian**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terinci pada Tabel 3.1 yaitu:

Tabel 3.1 Alat-alat Penelitian

No.	Alat-alat Laboratorium	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoklaf	Merek EYELA model HL36AE	1 unit
2.	Mikroskop	22.103 BI.J070	1 unit
3.	Tips 1 ml, 5 ml dan 10 ml	-	Secukupnya
4.	Oven dan Lemari Pendingin	Merek National	1 unit
5.	<i>Resiprocating water bath</i>	Merek EYELA	1 unit
6.	Neraca Timbangan Analitik	Merek AND	1 unit
7.	Vortek	Merek EYELA	1 unit
8.	Mikropipet 1 ml dan 5 ml	Merek Eppendorf	1 unit
9.	Mikropipet 10 ml	Merek Eppendorf	1 buah
10.	botol sampel 100 ml	Merek Pyrex	9 botol
11.	Gelas Kimia	Merek Pyrex	10 buah
12.	Labu Erlenmeyer 100 ml	Merek Pyrex	10 buah
13.	Gelas Ukur 25 ml	Merek Pyrex	1 buah
14.	Gelas Ukur 100 ml	Merek Pyrex	1 buah
15.	Gelas Ukur 500 ml	Merek Pyrex	1 buah
16.	Gelas Ukur 500 ml	Merek Pyrex	1 buah
17.	Cawan Petri	Merek Pyrex	13 buah
18.	Tabung Reaksi	Merek Pyrex	50 buah
19.	Tabung Durham	Merek Pyrex	50 buah
20.	Jarum Inokulasi	Merek Pyrex	1 buah
21.	Lampu Spirtus	Merek Pyrex	2 buah
22.	Mikrometer	-	1 buah

b. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu terinci pada Tabel 3.2

yaitu:

Tabel 3.2 Bahan-bahan Penelitian

No.	Bahan-bahan Kimia	Spesifikasi	Jumlah
1.	Medium <i>Nutrient Agar</i> (NA)	Merek Difco	5 L
2.	Medium DMS dan MS	-	2 L
3.	Larutan logol	-	100 ml
4.	Larutan safranin O	-	100 ml
5.	Larutan <i>crystal violet</i>	-	100 ml
6.	<i>Aluminium foil</i>	Merek Bagus	2 roll
7.	Alkohol	70%	5 L
8.	<i>Reagent</i> reduksi nitrat	-	100 ml
9.	<i>Reagent</i> H ₂ O ₂	-	100 ml
10.	Medium hidrolisis pati	-	150 ml
11.	Medium hidrolisis kasein	-	150 ml
12.	Medium hidrolisis gelatin	-	450 ml
13.	Medium hidrolisis lipid	-	150 ml
14.	Akuades	-	10 liter
15.	Medium BCP laktosa	-	450 ml
16.	Medium BCP sukrosa	-	450 ml
17.	Medium BEC dekstrosa	-	450 ml
18.	Ethanol	-	1 L
19.	Simmons' cintrat	Difco	300 ml
20.	pH indikator	Merek Merck	1 kotak

E. Pembuatan Media Bakteri

Pembuatan media dan larutan yang diperlukan dalam proses identifikasi yang berhubungan dengan uji aktivitas biokimia sebaiknya mengikuti acuan yang diambil dari beberapa pedoman, yaitu Cappucino (1983) dan Syulasmi *et al.*, (2009). Medium yang diperlukan dalam penelitian ini, meliputi *Nutrient agar*, yaitu medium ini digunakan dalam pembiakan bakteri, DMS (Detergen Minimal Salts) dimana medium

ini untuk menumbuhkan bakteri-bakteri yang dapat mendegradasi detergen. Medium untuk aktivitas biokimia antara lain medium laktosa, sukrosa, dan dekrosa digunakan untuk uji fermentasi karbohidrat, medium pati, lipid, kasein, dan gelatin digunakan untuk uji hidrolisis, kemudian untuk uji reduksi nitrat digunakan medium *trypticase nitrate broth*, medium *litmus milk broth* digunakan untuk uji susu litmus, kemudian medium urease broth untuk uji urease, medium SIM agar digunakan untuk uji H₂S, kemudian masuk ke tes IMVIC yang terdiri dari beberapa uji yaitu Indol digunakan medium *Tryptophan broth*, medium MR-VP broth digunakan untuk uji *Methyl-Red* dan *Voges-prokauer*, medium *Simmons' citrate* agar digunakan untuk uji citrat. Selanjutnya semua medium di sterilisasi untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi terutama medium yang bersifat broth. Lamanya sterilisasi berkisar antara 15 – 30 menit dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C pada tekan 1,5 atm. Adapun cara pembuatan dan bahan-bahan medium yang digunakan akan dijabarkan berikut ini yaitu:

1. Medium Selektif Detergen Minimal Salt (DMS) dan MS (Minimal Salt)

Komposisi dari medium DMS ini yaitu NaCl 5 gram, KCl 0,6 gram, MgSO₄·7H₂O 7 gram, NH₄NO₃ 1,0 gram, Bactoagar 20 gram, dan detergen 1 ppm yaitu 0,05 mg/L, semua bahan tersebut di larutkan di dalam akuades dalam *beacker glass* sambil diaduk, volume digenapkan menjadi 1000 ml. pH medium diatur yaitu berkisar antara 6,8-7,2 dan dibiarkan hingga mendidih. Sedangkan medium MS tidak ditambahkan detergen digunakan sebagai kontrol.

2. Medium Nutrient Agar (NA)

Pada penelitian ini digunakan medium *Nutrient agar* (NA) yang siap pakai, komposisi medium NA ini yaitu terdiri dari agar bakteriologi 15 gram, pepton 10 gram, NaCl 5 gram, dan *beef extract* 3 gram. Kemudian semua bahan tersebut dilarutkan dengan akuades dalam *beacker glass* sambil diaduk, dan volume digenapkan menjadi 1000 ml. pH medium diatur yaitu berkisar antara 6,8-7,2 dan dibiarkan hingga mendidih serta homogen.

3. Medium Kaldu Laktosa

Komposisi medium kaldu laktosa terdiri dari pepton 10 gram, NaCl 5 gram, dan *beef extract* 3 gram, laktosa 5 gram, dan *Brom cresol purple* (BCP) 0,01 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,2.

4. Medium Kaldu Sukrosa

Komposisi medium kaldu sukrosa terdiri dari pepton 10 gram, NaCl 5 gram, dan *beef extract* 3 gram, sukrosa 5 gram, dan *Brom cresol purple* (BCP) 0,01 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,2.

5. Medium Kaldu Dekstrosa

Komposisi medium kaldu laktosa terdiri dari pepton 10 gram, NaCl 5 gram, dan *beef extract* 3 gram, dekstrosa 5 gram, dan *Brom cresol purple* (BCP) 0,01 Gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades

sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,2.

6. Medium Pati (Amilum)

Komposisi medium pati yaitu terdiri dari pepton 5 gram, *beef extract* 3 gram, amilum 2 gram, baktoagar 15 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,2.

7. Medium Kasein

Komposisi medium kasein yaitu terdiri dari pepton 5 gram, baktoagar 15 gram, dan susu skim 50 gram. Dalam membuat medium ini kita harus berhati-hati karena sifat susu yang cepat mengumpal atau tidak dapat bercampur dengan agarnya, jadi pertama kita membuat peton dan agarnya sampai 1000 ml, kemudian kita membuat susunya, caranya susu skimnya sebanyak 50 gram dicairkan pada akuades sebanyak 500 ml, susunya tidak disterilisasi tapi hanya pepton agarnya yang disterilisasi. Kemudian susu dan pepton agarnya dicampurkan ke dalam cawan petri, sebanyak 9 ml pepton agar dan 1 ml susu yang telah dicairkan.

8. Medium Lipid

Komposisi medium lipid yaitu terdiri dari pepton 5 gram, *beef extract* 3 gram, baktoagar 15 gram, lipid 10 gram, dan neutral red 0,02 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,2.

9. Medium Gelatin

Komposisi medium lipid yaitu terdiri dari pepton 5 gram, *beef extract* 3 gram, gelatin 120 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,2.

10. Medium Uji Reduksi Nitrat

Komposisi medium reduksi nitrat yaitu terdiri dari fosfat 2 gram, tripton 20 gram, dekstrosa 1 gram, pottasium nitrat 1 gram, baktoagar 1 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,2.

11. Medium Uji H₂S

Medium yang digunakan dalam uji H₂S yaitu SIM broth yang komposisinya adalah pepton 30 gram, *beef extract* 3 gram, agar 3 gram, *ferrous ammonium sulfat* 0,2 gram, sodium thiosulfat 0,025 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 7-7,3.

12. Medium Tryptone Broth

Medium yang digunakan dalam uji indol yaitu *Tryptone broth* yang komposisinya adalah tryptone 10 gram, kalsium klorida (*reagent*) 0,03 M, sodium klorida 5 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan

ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih.

13. Medium *Methyl-Red* Dan *Voges-Proskauer*

Medium yang digunakan dalam uji *Methyl-Red* dan *Voges-proskeuer* yaitu MR-VP *broth* yang komposisinya adalah pepton 7 gram, dekstrosa 5 gram, potassium phosphat 5 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 6,9.

14. Medium *Simmons' Citrate*

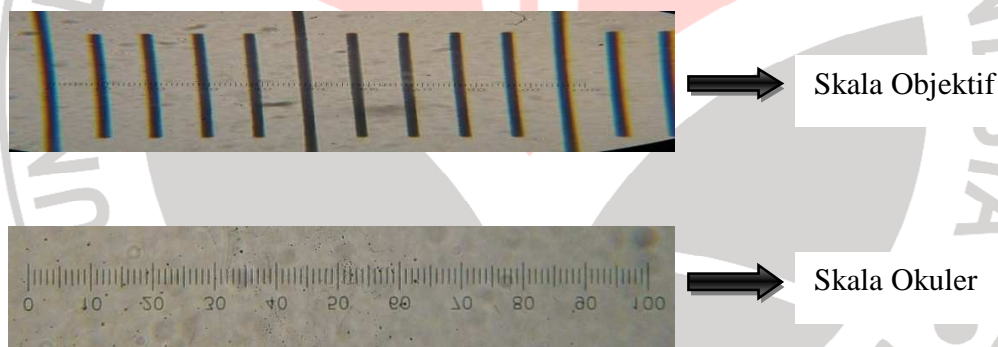
Medium yang digunakan dalam citrat yaitu *simmons' citrat* yang komposisinya adalah Ammonium dihidrogen phosphat 1 gram, dipotasium phosphat 1 gram, Sodium klorida 5 gram, sodium citrat 2 gram, magnesium sulfat 0,2 gram, agar 15 gram, brom thymol blue 0,08 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 6,9.

15. Medium Susu Litmus

Medium susu litmus memiliki komposisi yaitu *skim milk powder* 100 gram, dan litmus 0,75 gram, selanjutnya semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya pH diatur yaitu berkisar antara 6,8.

F. Cara Pengukuran Sel Bakteri

Menurut Caprette (2000) bahwa untuk mengkalibrasi skala pengukuran pada mikroskop terdapat 2 skala yang digunakan, yaitu skala okuler (yang diletakkan di lensa okuler) dan skala objektif (yang diletakkan dimeja objek). Pada prinsip skala okuler adalah skala yang terdiri 1-100 dimana jarak antara garis sama tetapi tidak diketahui nilainya. Sedangkan pada skala objektif adalah skala yang terdiri dari 1-100 dimana jarak antara garis memiliki nilai 0,01 mm, skala objektif akan berubah ukurannya apabila perbesaran diubah. Oleh karena itu, kalibrasi dilakukan agar skala okuler memiliki nilai dari perbandingan skala objektif dengan skala okuler disetiap pembesarannya.



Baik skala objektif dan skala okuler diletakkan saling berhimpit, setelah itu dilihat garis mana yang paling berhimpit dari kiri sampai kanan. Setelah itu dihitung berapa skala okuler dan berapa skala objektifnya dengan rumus

$$\frac{\text{Skala Objektif}}{\text{Skala Okuler}}$$

Kalibrasi yang dilakukan dengan menggunakan perbesaran 10 x 100 sehingga skala yang dihipit yaitu untuk skala objektif 9 dan skala okuler 77, jika di masukkan ke rumus yang ada maka

$$\frac{\text{Skala Objektif}}{\text{Skala Okuler}} = \frac{9}{77} = 0,11 \text{ mm} \times 0,01 \text{ mm} = 0,0011 \text{ mm}$$

Apabila diubah dalam mikron meter maka $0,0011 \text{ mm} \times 1000 = 1,1 \mu\text{m}$.

Jadi pada saat menggunakan perbesaran 10 x 100, nilai atau jarak antara garis pada skala okuler adalah sebesar $1,1 \mu\text{m}$ atau $0,0011 \text{ mm}$.

G. Rancangan Penelitian

Penelitian yang digunakan adalah penelitian deskripsi eksploratif untuk mengidentifikasi bakteri pendegradasi detergen yang diisolasi dari limbah domestik yang ada di kolam maturasi Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Bojongsong Bandung.

H. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang akan dilakukan pada penelitian ini yaitu terdiri atas 3 yaitu, tahap persiapan, uji pendahuluan dan selanjutnya ke tahap uji biokimia. Adapun tahap-tahap pada penelitian ini adalah:

a) Tahap Persiapan

Dalam tahap ini dilakukan pengecekan alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian. Setelah lengkap maka dilakukan sterilisasi botol sampel, gelas kimia, cawan petri, gelas ukur, dan tabung reaksi serta peralatan lainnya yang harus disterilisasi sehingga tidak mudah terkontaminasi. Setelah sterilisasi, maka dilakukan

pembuatan medium selektif karena bakteri yang akan ditumbuhkan mempunyai sifat spesifik yang tidak sama dengan bakteri lain, maka pembiakannya membutuhkan media yang berbeda pula. Dalam penelitian ini digunakan medium DMS atau *Detergent Minimal Salts* dan medium MS atau *Minimal Salt*, di mana medium DMS merupakan medium selektif untuk menumbuhkan bakteri-bakteri yang dapat mendegradasi detergen sedangkan MS merupakan medium yang tidak menggunakan detergen yang dijadikan kontrol. Kemudian membuat medium untuk uji biokimia dan semua medium disterilkan.

b) **Uji pendahuluan**

Pada penelitian identifikasi ini khususnya yang dilakukan di Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) belum pernah dilakukan, untuk itu kami melakukan uji pendahuluan untuk menentukan tingkat pengenceran sampel air limbah yang baik dalam menumbuhkan bakteri di medium selektif yaitu DMS (*Detergen Minimal Salts*) dan MS (*Minimal salt*). Pada pengambilan sampel pertama kita melakukan pengenceran mulai dari 10^0 sampai dengan 10^4 , karena pada kolam maturasi kadar konsentrasi limbah sudah semakin rendah jadi pengenceran yang dilakukan juga hanya sampai sebatas 10^4 . Setelah dilakukan pengenceran tersebut ternyata bakteri yang tumbuh sangat minim seperti yang terlihat pada Tabel 4.1 sehingga untuk kolam maturasi tidak dilakukan pengenceran karena bakteri yang tumbuh pada medium tanpa pengenceran memperlihatkan hasil yang baik.

c) Pengambilan Sampel Bakteri dari Limbah Cair yang Terkontaminasi Detergen di Kolam Maturasi dan Inokulasi pada Medium Selektif

Pengambilan sampel akan dilakukan di tiga titik pada kolam maturasi IPAL Bojongsoang. Sebelum melakukan sampling air akan diamati terlebih dahulu faktor aquatik, yaitu suhu, pH, turbiditas dan DO. Sampel air limbah yang akan diambil sebanyak 100 ml menggunakan botol sampel 250 ml yang sudah steril. Kemudian, sampel akan dibawa ke laboratorium untuk diinokulasikan pada medium selektif untuk melihat jenis koloni bakteri yang ada pada limbah tersebut. Dari hasil uji pendahuluan ternyata pada sampel air kolam maturasi tidak dilakukan pengenceran karena tingkat jumlah koloni yang tumbuh jika sampel air diencerkan sangat sedikit bahkan tidak ada, jadi dalam proses inokulasi sampel ke medium DMS dan MS langsung pada sampel yang diambil pada kolam maturasi. Kemudian cawan petri hasil inokulasi diinkubator pada suhu 37 °C selama 24-48 jam dan diamati koloni yang terbentuk dalam setiap cawan petri dengan menggunakan *Colony counter*.

d) Pembuatan Biakan Murni dan Awetan Biakan Bakteri

Sebelum kita lanjut ke identifikasi kita melakukan pembuatan biakan murni agar dalam prosesnya kita selalu menggunakan bakteri murni yang segar, dan kita juga mengawetkan biakan murni dengan menggunakan larutan *crayo buffer*, di mana dengan menggunakan *crayo buffer* awetan biakan murni akan bertahan lama.

e) Identifikasi atau Karakterisasi Bakteri

Ini merupakan tahap akhir dalam langkah penelitian ini, yaitu melakukan identifikasi dan karakterisasi. Identifikasi ini dilakukan dengan berbagai macam

metode, yaitu membuat preparat dengan metode pewarnaan Gram dan melakukan uji aktivitas biokimia terhadap bakteri hasil isolasi limbah (Syulasmi *et al.*, 2009). Tahap identifikasi atau karakterisasi dalam penelitian ini meliputi:

a. Pembuatan Preparat dengan Metode Pewarnaan Gram

Pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram dilakukan melalui 2 tahap yaitu membuat olesan bakteri dan melakukan pewarnaan Gram pada olesan bakteri. Untuk membuat olesan bakteri, kita membutuhkan objek gelas dan 1 ose biakan murni bakteri yang telah ditumbuhkan di medium selektif dari limbah detergen, di mana 1 ose biakan murni bakteri tersebut disuspensikan dengan 1 tetes akuades di atas objek gelas tersebut dan difiksasi di atas api sebanyak 3 kali. Kemudian kita melakukan pewarnaan Gram yang bertujuan untuk menentukan apakah bakteri yang kita dapat itu bakteri Gram positif atau Gram negatif, dalam proses pewarnaan Gram ini kita menggunakan pewarna karbol kristal violet, larutan alkohol 96 %, larutan lugol, safranin O, akuades dan minyak imersi.

b. Uji Aktivitas Biokimia Bakteri Limbah Detergen pada Kolam Maturasi

Pengujian aktivitas biokimia dilakukan terhadap kultur murni bakteri yang terbagi menjadi 2 tahap yaitu tes primer dan tes sekunder. Tes primer meliputi reaksi Gram, spora, motilitas, kondisi aerob, anaerob, katalase, oksidasi, fermentasi dan tes glukosa. Sedangkan tes sekunder meliputi tes karbohidrat, urease, indol, dan reduksi nitrat (Cowan & Stell, 1974). Adapun tahap-tahap menurut Cowan dan Steel, 1974 uji biokimia dalam penelitian ini yaitu:

1) Uji Motilitas

Menginokulasi bakteri pada medium NA dengan cara stab kemudian melihat pertumbuhannya, jika bakteri tersebut bersifat motil maka terdapat pertumbuhan disekitar strip bakteri yang diinokulasi, sedangkan apabila bakteri tidak bersifat motil maka tidak terlihat pertumbuhan sama sekali di sekitar strip dari inokulasi bakteri tersebut.

2) Uji Kebutuhan Oksigen (Aerob Atau Anaerob)

Menginokulasi bakteri pada tabung yang berisi medium kaldu nutrisi agar dan diberi label tabung berisi agar diri NA dengan nama bakteri. Medium NA dicairkan, kemudian menurunkan suhu hingga 47°C dengan tehnik sterilisasi, lalu dilakukan inokulasi bakteri. Kemudian kultur dikocok dengan hati-hati menggunakan telapak tangan, hindari jangan sampai terbentuk gelembung udara. Kemudian mendinginkan kultur dengan cepat dalam *waterbath* dengan posisi tegak dan sumbat kapas ditekan sampai jarak 2 cm dari mulut tabung dan dituangkan sedikit parafin cair di atas sumbat kapas. Inkubasi pada suhu $22-37^{\circ}\text{C}$ selama 1 x 24 jam dan diamati distribusi pertumbuhan bakteri dalam kultur apakah di dasar atau di atas permukaan kultur.

3) Uji Tes Katalase

Menginokulasi bakteri pada tabung reaksi yang berisi 7 ml medium NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , kemudian ditetesi H_2O_2 3%, kemudian mengamati perubahan yang terjadi yaitu ada atau tidaknya gelembung udara di atas permukaan kultur bakteri. Kemampuan menghasilkan katalase dapat dideteksi dengan menambahkan H_2O_2 3% di atas agar miring yang telah ditumbuhi bakteri. Uji positif

ditandai dengan oleh terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase, begitupun sebaliknya.

4) Uji Fermentasi Karbohidrat

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari kolam maturasi IPAL Bojongsong pada 1 tabung reaksi yang berisi medium *Brom cresol purple* laktosa dan tabung Durham, 1 tabung reaksi yang berisi medium *Brom cresol purple* sukrosa dan tabung Durham, dan 1 tabung reaksi yang berisi medium *Brom cresol purple* dekstrosa dan tabung Durham. Semuanya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C, kemudian melihat perubahan yang terjadi, yaitu ada tidaknya gelembung udara pada tabung Durham.

5) Uji Hidrolisis yaitu pati, lipid, gelatin dan kasein

a) Hidrolisis Pati

Pati dapat dihidrolisis oleh bakteri tertentu dengan hasil akhir dekstrin. Hidrolisis ini terjadi karena adanya amilase yang dihasilkan oleh bakteri tertentu yang dapat digunakan dalam penentuan jenis. Kemampuan bakteri untuk menghidrolisis pati dapat diuji dengan meneteskan larutan iodium di atas koloni pada medium agar pati. Jika terbentuk daerah bening di sekitar koloni menandakan terjadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase.

b) Hidrolisis Lipid

Kemampuan bakteri untuk menghidrolisis lipid dengan bantuan enzim lipase dapat digunakan medium lipid agar. Bakteri yang mampu menghasilkan lipase akan memperlihatkan zona lipolisis, ditunjukkan dengan adanya daerah terang disekitar

pertumbuhan koloni. Pada medium lipid agar ditambahkan indikator *Neutral red*, pertumbuhan koloni pemecah lipid pada medium lipid *Neutral red* akan berwarna merah pada bagian bawahnya. Hal ini disebabkan terbentuknya asam lemak mengakibatkan pH medium menurun.

c) Hidrolisis Gelatin

Pada medium *nutrient* gelatin bakteri diisolasi kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu dibawah 25°C selama 30 menit. Beberapa bakteri mampu menghidrolisis gelatin karena dapat menghasilkan eksoenzim proteolitik yang disebut gelatinase. Gelatin yang telah dihidrolisis akan tetap cair meskipun disimpan pada suhu dibawah 25°C, begitupun sebaliknya.

d) Hidrolisis Kasein

Pada medium agar kasein bakteri diinokulasi kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemampuan bakteri untuk menghidrolisis dapat dibuktikan dengan menginokulasi bakteri pada medium susu skim agar. Pertumbuhan koloni bakteri pemecah protein pada medium susu skim agar akan dikelilingi oleh daerah bening.

6) Uji Reduksi Nitrat

Menginokulasi bakteri hasil kultivasi pada medium kaldu nitrat kemudian di beri label pada tabung nama bakteri tersebut. Dengan tehnik sterilisasi, dilakukan inokulasi bakteri pada tabung medium nitrat, lalu diinkubasi pada suhu 22-37°C selama 1 x 24 jam. Kemudian medium ditetesi 3-4 tetes larutan nitrat A dan larutan B

di atas permukaan kultur, didiamkan beberapa menit kemudian lihat perubahan yang terjadi. Perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah bata menunjukkan reaksi positif uji reduksi nitrat. Untuk medium yang tidak mengalami perubahan warna, selanjutnya ditambahkan *zinc powder* secukupnya, dan diamati perubahan yang terjadi. Jika terjadi perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah bata, maka reaksi menunjukkan negatif dan bila tidak menunjukkan perubahan warna, maka reaksi menunjukkan positif dalam uji reduksi nitrat.

7) Uji Susu Litmus

Bakteri dinokulasikan pada medium susu litmus yang telah diberi label pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dan diamati perubahan yang terjadi, meliputi :

a) Fermentasi Laktosa

Hasil dari fermentasi laktosa ini akan membentuk asam laktat. Adanya asam laktat sangat mudah diamati, litmus yang berwarna ungu pada pH netral berubah menjadi merah muda ketika medium menjadi asam (pemdekat pH 4).

b) Produksi Gas

Fermentasi laktosa selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan gas CO₂ dan H₂. Adanya gas terlihat dari terpisahnya dadih (curd) atau terpecah-pecah.

c) Reduksi Litmus

Fermentasi laktosa merupakan reaksi anaerob, jadi tidak ada oksigen sebagai akseptor electron. Artinya H₂ tidak berikatan dengan O₂. Dalam reaksi susu litmus, litmus sebagai akseptor electron. Dalam kondisi teroksidasi litmus berwarna ungu,

ketika menerima hydrogen dari substrat akan tereduksi dan berubah warna menjadi putih susu.

d) Pembentukan Curd (Dadih)

Adanya aktivitas biokimia oleh mikroorganisme yang berbeda terhadap susu litmus dapat menghasilkan dadih yang berbeda. Dadih dapat berupa *dadih asam* dan *dadih rennet (keju)*. *Dadi asam* akan tetap menempel (tidak lepas) bila tabung dibalikkan, sedangkan *dadih rennet (keju)* akan terlepas (tumpah) bila tabung dibalikkan.

e) Proteolisis

Reaksi ini dapat dilihat dengan terkumpulnya litmus di permukaan berwarna ungu tua sedangkan medium akan terlihat sebagai cairan yang kecoklatan dan transusen karena merupakan larutan asam amino.

f) Reaksi Alkalis

Reaksi ini tidak menunjukkan adanya perubahan medium (medium tetap berwarna ungu seperti tidak terjadi perubahan apa-apa).

8) Uji H₂S

Bakteri diinokulasikan ke dalam medium SIM agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Hasil positif (terbentuknya H₂S) ditandai dengan perubahan warna medium menjadi hitam.

9) Uji Tes Urease

Bakteri diinokulasikan ke dalam medium Urea kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari kuning menjadi *pink* yang sangat pekat.

10) Uji IMVIC

a) *Indole*

Bakteri diinokulasikan ke dalam medium Tryptone agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya lapisan cincin berwarna ungu pada permukaan kultur setelah ditesti dengan reagen *Kovac's*.

b) *Methyl Red*

Bakteri diinokulasikan ke dalam medium MR-VP broth kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah setelah ditesti indikator *Methyl red*.

c) *Voges-Proskauer*

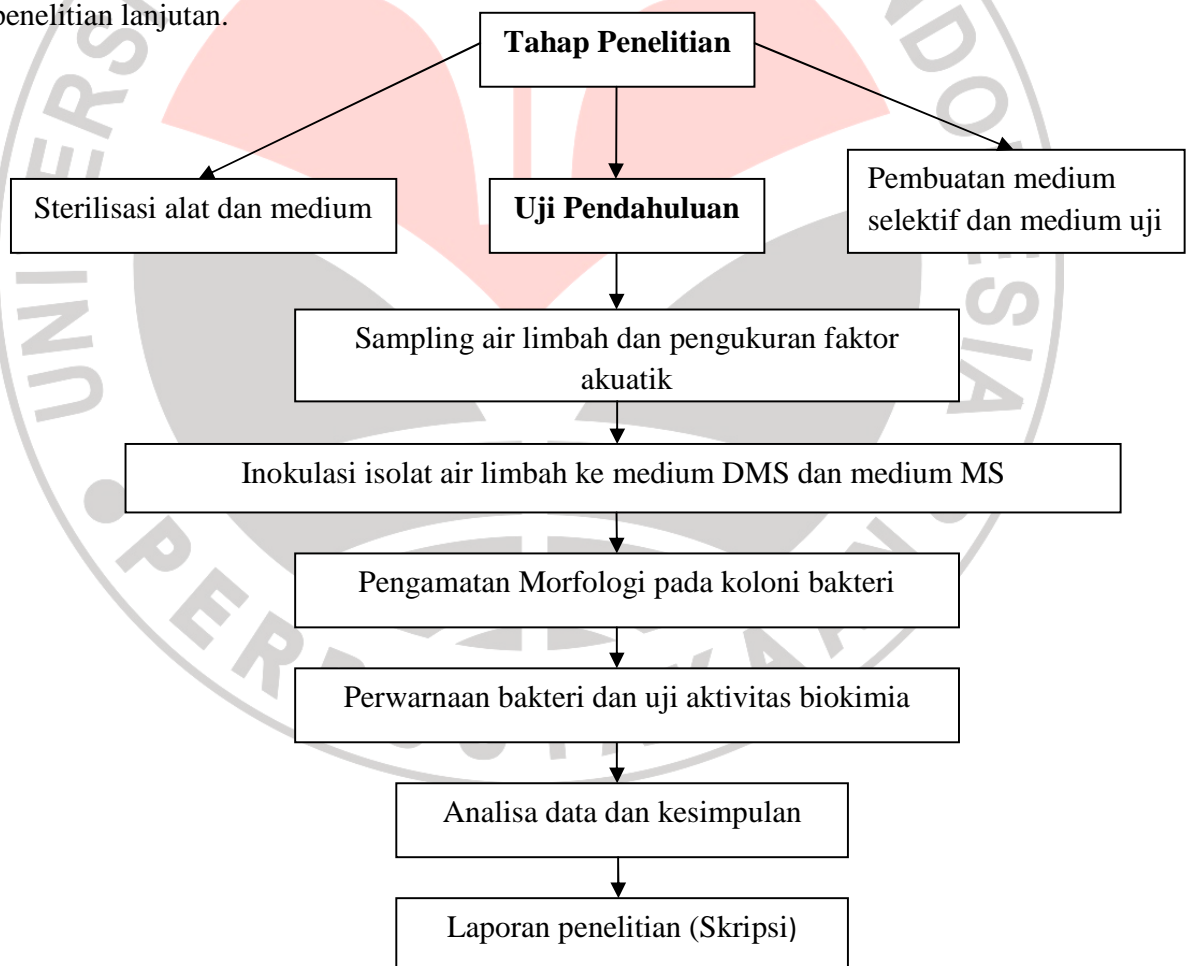
Bakteri diinokulasikan ke dalam medium MR-VP broth kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Kultur kemudian ditesti dengan *Barrit A* dan *Barrit B* dengan perbandingan 1:1, setelah itu dibirkan selama 15-20 menit. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah mawar.

d) *Citrate*

Bakteri diinokulasi ke medium Simmon Citrate dengan cara distreak. kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna medium dari hijau menjadi biru tua.

I. Analisis Data

Setelah sampling air limbah selesai dilakukan dan dihasilkan kultur bakteri biakan murni pada medium agar miring, maka kultur bakteri dari air limbah detergen akan diidentifikasi melalui reaksi pewarnaan Gram dan uji biokimia agar diketahui karakteristik bakteri limbah detergen pada kolam maturasi sebagai tahap identifikasi yang diharapkan. Kemudian hasil identifikasi bakteri akan dicocokkan dengan *Bergey's manual determinative bacteriology edition ninth*. Dapat dijadikan bahan penelitian lanjutan.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian