

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang limbah cair

Menurut Rustama *et al.* (1998), limbah cair merupakan sisa buangan hasil suatu proses yang sudah tidak dipergunakan lagi, baik berupa sisa industri, rumah tangga, peternakan, pertanian, dan sebagainya. Komponen utama limbah cair adalah air, sedangkan komponen lainnya adalah bahan padat yang bergantung asal buangan tersebut. Sesuai dengan sumbernya maka limbah cair memiliki komposisi yang sangat bervariasi dari setiap tempat dan proses. Menurut Sirait *et al.* (2008), secara garis besar zat-zat yang terkandung dalam limbah cair dapat dikelompokkan menjadi organik dan anorganik. Bahan organik yang terdapat dalam limbah cair adalah protein, karbohidrat, lemak, amoniak, senyawa nitrit dan nitrat, dan asam-asam organik. Sedangkan, bahan anorganiknya adalah butiran-butiran, garam-garam, dan logam-logam. Karena kontaminan utama limbah cair rumah makan seluruhnya berasal dari bahan makanan, proses memasak, dan tahap pembersihan peralatan, dan dari toilet, maka komponen limbah rumah makan terutama berupa bahan-bahan organik dan bahan pencuci, yaitu sabun/deterjen.

Karakteristik limbah cair diketahui dari berbagai parameter kualitas limbah cair tersebut. Menurut Sirait *et al.* (2008), parameter kualitas limbah cair yang penting diketahui adalah:

1. Bahan padat tersuspensi

Bahan padat tersuspensi adalah bahan padat yang dapat dihilangkan pada penyaringan (*filtration*) melalui media standar halus dengan diameter 1 mikron. Bahan padat tersuspensi dikelompokkan lagi menjadi bahan padat yang tetap (*fixed solids*) dan yang menguap (*volatile solids*). Bahan padat yang menguap merupakan bahan yang bersifat organik yang diharapkan dapat dihilangkan melalui penguraian biologis atau pembakaran. Bahan padat tetap merupakan bahan padat yang sifatnya tetap. Bahan padat tersuspensi juga dapat dikelompokkan menjadi bahan padat yang dapat diendapkan (*settleable solids*) dan bahan padat yang tidak dapat diendapkan (*nonsettleable solids*) secara normal.

2. Bahan padat terlarut

Bahan padat terlarut adalah bahan padat yang terdapat dalam filtrat yang diperoleh setelah penghilangan bahan padat tersuspensi. Bahan ini mewakili garam-garam dalam larutan, termasuk garam-garam mineral dari penyediaan bagian air. Bahan padat terlarut penting terutama apabila limbah cair akan digunakan kembali setelah pengolahan. Bahan padat terlarut tidak dapat dihilangkan melalui pengolahan konvensional.

3. BOD (*Biochemical Oxygen Demand*)

BOD (kebutuhan oksigen biokimia) adalah ukuran kandungan bahan organik dalam limbah cair. BOD ditentukan dengan mengukur jumlah oksigen yang diserap oleh sampel limbah cair akibat adanya mikroorganisme selama satu periode waktu tertentu, biasanya lima hari, pada satu temperatur tertentu, umumnya 20°C. BOD merupakan ukuran utama kekuatan suatu limbah. BOD

juga merupakan petunjuk dari pengaruh yang diperkirakan terjadi pada badan air penerima berkaitan dengan pengurangan kandungan oksigennya. Secara umum, derajat pengolahan yang dicapai oleh bangunan pengolahan harus dipilih sedemikian rupa sehingga BOD efluent tidak akan menurunkan derajat kandungan oksigen sampai tingkat tertentu pada badan air penerima agar badan air dapat tetap berfungsi sesuai peruntukannya.

4. COD (*Chemical Oxygen Demand*)

Kebutuhan oksigen kimiawi (COD) merupakan ukuran persyaratan kebutuhan oksidasi sampel yang berada pada kondisi tertentu, yang ditentukan dengan menggunakan suatu oksidan kimiawi. Pada suatu sistem tertentu terdapat hubungan COD dengan BOD, tetapi bervariasi antara yang satu dengan yang lain.

5. TOC (*Total Organic Carbon*)

Karbon organik total (TOC) mengukur semua bahan yang bersifat organik. TOC diukur dengan konversi karbon organik dalam air limbah secara oksidasi, katalitik, pada suhu 900°C, menjadi karbondioksida.

6. TOD (*Total Oxygen Demand*)

Kebutuhan oksigen total (TOD) dari suatu bahan, didefinisikan sebagai jumlah oksigen yang dibutuhkan untuk pembakaran semua bahan pada suhu 900°C menggunakan katalis Platinum.

7. pH

pH limbah cair adalah ukuran keasaman (*acidity*) atau kebasaan (*alkalinity*) limbah cair. pH menunjukkan perlu atau tidaknya pengolahan pendahuluan (*pre-treatment*) untuk mencegah terjadinya gangguan pada proses pengolahan limbah

cair secara konvensional. Secara umum dapat dikatakan bahwa pH limbah cair domestik adalah mendekati netral.

8. DO (*Dissolved Oxygen*)

Oksigen terlarut (DO) penting dalam pengoperasian sistem saluran pembuangan maupun bangunan pengolahan limbah cair. Derajat kandungan oksigen pada limbah cair sangat bervariasi dan sama sekali tidak stabil. Tujuan pengelolaan limbah cair sebelum diolah adalah memelihara kandungan oksigen terlarut dan cukup untuk mencegah terjadinya kondisi anaerobik. Pada efluen yang telah diolah, derajat kandungan oksigen 1 atau 2 mg per liter dapat dicapai.

9. Kandungan nitrogen

Dalam bahan limbah nitrogen dapat berada dalam bentuk-bentuk amonia tereduksi sampai senyawa nitrat teroksidasi. Konsentrasi tinggi dari berbagai bentuk nitrogen beracun terhadap fauna dan flora tertentu. Bentuk yang paling umum dari nitrogen yang ditemukan dalam air limbah adalah amoniak, protein, nitrit, dan nitrat. Polutan ini dapat diukur dengan metode nitrogen Kjeldahl total.

2.2 Tinjauan tentang bakteri

2.2.1 Bakteri pada limbah cair

Dalam air dan penanganan air limbah, bakteri mempunyai peranan penting karena kultur bakteri dapat digunakan untuk menghilangkan bahan organik yang tidak diinginkan dari air limbah. Menurut Sirait *et al.* (2008), kebanyakan bakteri adalah kemoheterotrofik yang artinya menggunakan bahan organik sebagai sumber energi dan karbon. Beberapa spesies mengoksidasi senyawa-senyawa

anorganik tereduksi seperti NH_3 untuk energi dan menggunakan CO_2 sebagai sumber karbon. Bakteri kemoheterotrofik merupakan bakteri terpenting dalam pengolahan air limbah karena bakteri ini akan memecah bahan-bahan organik dan mengoksidasi amoniak nitrogen menjadi nitrogen nitrat, terutama oleh bakteri nitrifikasi.

Menurut Sirait *et al.* (2008), bagian reaktif dari sel bakteri adalah membran sitoplasmik. Semua bahan organik atau anorganik yang akan dimetabolisme oleh sel harus melalui membran. Mekanisme transport dari sebagian besar molekul yang melalui membran diduga disebabkan karena reaksi-reaksi dengan sistem enzim spesifik yang disebut permease. Molekul-molekul yang tidak mempunyai sistem permease tidak dapat memasuki sel dan oleh karenanya tidak dimetabolisme. Hal ini menjelaskan bahwa bakteri menggunakan nutrisi secara selektif.

Menurut Sirait *et al.* (2008), jenis-jenis bakteri yang berperan penting dalam penguraian limbah organik antara lain: *Zooglea ramigera*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes sp.*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Rhizobium sp.*, *Acetobacter sp.*, *Actinomycetes sp.*, *Streptomyces sp.*, dan *Nocardia sp.* Termasuk di dalamnya adalah bakteri amilolitik, proteolitik, dan lipolitik.

2.2.2 Bakteri Amilolitik

Bakteri amilolitik adalah bakteri yang dapat memecah amilum menjadi glukosa (Budiyanto, 2002). Bakteri ini menghasilkan enzim amilase, yang merupakan produk metabolisme primer dari bakteri tersebut, yang digunakan

untuk memecah amilum (Sa'id, 1987). Enzim amilase dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri, seperti: industri makanan dan minuman, pembuatan sirup, susu fermentasi, etanol, *food and pit* (makanan ternak), suplemen, alkohol, kertas, dan deterjen (Budiyanto, 2002).

Contoh-contoh bakteri amilolitik adalah *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Arthrobacter sp.*, *Lactobacillus sporogenes*, *Chromobacterium sp.*, *Micrococcus roseus*, dan *Pichia anomala* (Naiola, 2008).

2.2.3 Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Suriawiria, 2008). Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler (Tarlera *et al.*, 1997). Dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks daripada pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi (Thomas, 1989). Hal ini disebabkan struktur protein yang lebih kompleks (Poedjiadi, 2007). Bakteri melalui suatu sistem enzim yang kompleks, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Suriawiria, 2008).

Menurut A. Poedjiadi (2007), protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini diperlukan

oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Peranannya dalam tubuh antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah, dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim, hormon, serta neurotransmitter.

Contoh bakteri yang dapat mendegradasi protein adalah *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Caloramator proteoclasticus*, *Thermobacterioides sp.*, dan *Corynebacterium acne* (Appleby, 1955; Ollivier *et al.*, 1985; dan Tarlera *et al.*, 1997).

2.2.4 Bakteri Lipolitik

Bakteri lipolitik adalah bakteri yang dapat memecah lipid. Menurut Jaeger *et al.* (1994), bakteri ini menghasilkan enzim lipase, yang merupakan produk metabolisme primer dari bakteri tersebut, yang digunakan untuk memecah lipid. Lipase dari bakteri kebanyakan diproduksi secara ekstraselular. Lipase dari bakteri memainkan peranan yang penting dalam kehidupan manusia seperti dalam pembuatan yoghurt dan keju. Lipase juga digunakan sebagai katalis yang murah dan serbaguna untuk mendegradasi lipid dalam aplikasi modern seperti penggunaan enzim lipase untuk pembuatan deterjen dan biokatalis, serta juga dapat digunakan sebagai energi alternatif untuk mengubah minyak tumbuhan menjadi bahan bakar (Sharma *et al.*, 2001). Dalam hampir semua kasus, bakteri berfungsi dengan baik pada emulsi minyak dalam air, dimana kandungan air

tinggi dan area interfacial untuk degradasi tersedia luas dan substrat trigliserida dapat digunakan (Jaeger *et al.*, 1994).

Bakteri lipolitik yang bersifat halofilik dan halotoleran telah berhasil diisolasi oleh Guzman *et al.* (1979) dari Laguna Verde Bolivia dan diperoleh sebanyak 34 isolat yang menghasilkan lipase ekstraseluler. Salah satu isolat dengan kemampuan tertinggi diidentifikasi sebagai *Bacillus pumilus*.

Selain itu genus *Lysubacter* termasuk dalam bakteri luncur Gram negatif yang mampu menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler yang penting dalam biodegradasi. Sejumlah enzim ekstraseluler yang dihasilkan spesies *Lysubacter* telah dikarakterisasi tetapi enzim-enzim yang responsif untuk aktivitas lipase belum diteliti. Percobaan pendahuluan oleh Von Tigerstrom dan Stelmaschuk (1989) mengindikasikan bahwa *L. enzymogenes* menghasilkan dua enzim, satu berkaitan dengan sel, dan yang lainnya disekresikan ke medium kultur. Meskipun disekresikan enzim dapat digunakan untuk minyak olive sebagai substrat dan disebut sebagai lipase, kedua enzim lebih suka substrat yang larut air sehingga disebut esterase daripada lipase.

Pseudomonas mendocina mampu menghidrolisis minyak pada emulsi substrat. Keberadaan deterjen mampu meningkatkan aktivitas lipase dari *Pseudomonas* (Bendikienė *et al.*, 2008). Lipase dari *Pseudomonas mendocina* mampu menghidrolisis pada konsentrasi 0,8–20% dan enzim ini memiliki efektivitas lipolitik yang tinggi terhadap triasilgliserol rantai panjang terutama triolein. Namun demikian, aktivitas lipase ini dinaktivasi oleh SDS (Bendikienė *et al.*, 2008).

Jenis lain yang memiliki kemampuan memecah lipid adalah *Moraxella catarrhalis*, *Methanospirillum hungatei*, *Themosyntropha lipolytica*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Roy *et al.*, 1985; Ogino *et al.*, 1994; Svetlitsshnyl *et al.*, 1986; dan Timpe *et al.*, 2003).

2.3 Tinjauan tentang reaktor pengolahan limbah cair

Menurut Hammer (1975), pengolahan limbah cair adalah sebuah kombinasi proses fisik dan biologis yang dirancang untuk menghilangkan bahan organik dari cairan. Proses-proses yang terjadi antara lain adalah proses pemompaan, penyaringan, penghilangan partikel-partikel, proses sedimentasi untuk memisahkan partikel-partikel solid dari suspensi, penghilangan material-material yang mengapung atau tenggelam, *biological treatment*, dan penambahan disinfektan untuk melindungi kesehatan masyarakat dengan menginaktivasi organisme-organisme patogen, termasuk bakteri-bakteri enterik, virus, dan protozoa.

Seperti yang telah disebutkan di atas proses pengolahan limbah cair yang terjadi pada reaktor tidak hanya terjadi secara fisika, tetapi juga secara biologi, yaitu dengan memanfaatkan bantuan mikroba. Pada proses *biological treatment* ini terjadi metabolisme dan koagulasi bahan organik dalam bentuk koloid dan bahan organik tersuspensi oleh mikroorganisme. Proses ini terdiri dari dua bagian, yaitu *biological filtration* (filtrasi biologis) dan *biological aeration* (aerasi biologis). Pada bagian filtrasi biologis terjadi kontak antara air limbah dengan mikroorganisme yang menempel pada permukaan media pendukung, seperti batu-

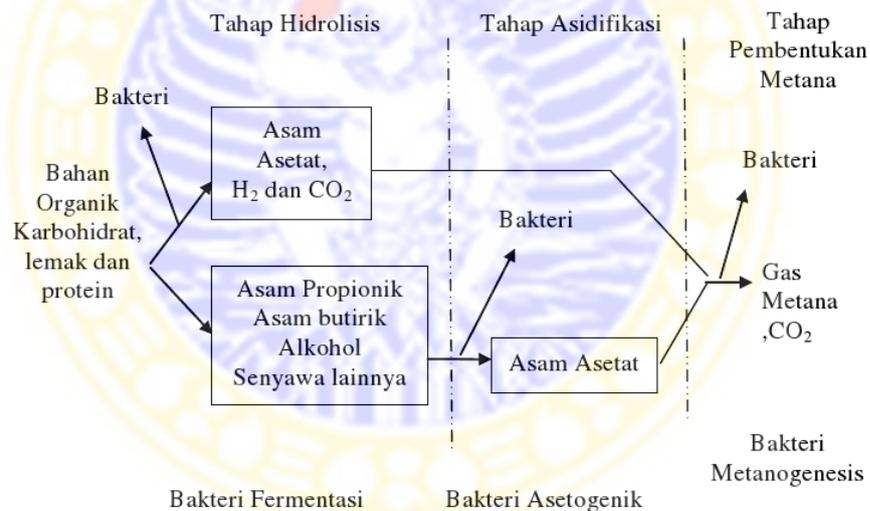
batuan atau sekat. Mikroorganisme yang menempel pada permukaan media pendukung memanfaatkan bahan-bahan organik pada limbah cair sebagai nutrisi untuk pertumbuhan mereka. Pada bagian aerasi biologis mikroorganisme, khususnya bakteri, memetabolisme limbah padat, menghasilkan pertumbuhan baru saat mengambil oksigen terlarut dan melepaskan karbon dioksida, kemudian limbah cair diaerasi selama beberapa jam untuk menghilangkan bahan-bahan organik dari larutan dengan proses sintesis dalam sel mikroorganisme.

Pada bagian terakhir bahan-bahan organik yang masih tersisa pada limbah didekomposisi oleh mikroorganisme dengan melepaskan nitrogen dan unsur hara fosfor, dan karbon dioksida, sedangkan materi-materi anorganik digunakan oleh alga untuk pertumbuhannya. Padatan yang masih tersisa didekomposisi dalam kondisi anaerob. Proses *biological treatment* ini dapat menurunkan nilai BOD hingga 85% dan menurunkan nilai padatan terlarut hingga 50%, yang merupakan cara paling efektif untuk menghilangkan bahan organik dari limbah cair.

Pada reaktor pembentukan metana dari bahan-bahan organik, gas metana dapat dihasilkan salah satunya dengan bantuan bakteri (Price dan Cheremisinoff, 1981). Pada reaktor penghasil gas metana proses-proses yang terjadi adalah proses hidrolisis, proses asidifikasi, dan proses metanogenik. Pada proses hidrolisis inilah terjadi dekomposisi bahan organik polimer menjadi monomer yang mudah larut yang dilakukan oleh sekelompok bakteri anaerob fakultatif. Pada proses hidrolisis, lemak diuraikan oleh enzim lipase yang diproduksi oleh bakteri lipolitik. Sementara karbohidrat diuraikan oleh enzim amilase yang diproduksi bakteri

amilolitik dan protein diuraikan oleh enzim protease yang diproduksi oleh bakteri proteolitik, menjadi monomer yang mudah larut.

Pada proses asidifikasi senyawa rantai pendek hasil proses hidrolisis diubah menjadi asam asetat, hidrogen, dan karbon dioksida. Proses asidifikasi ini juga melibatkan peran bakteri, khususnya bakteri penghasil asam. Asam asetat dari proses asidifikasi kemudian digunakan pada tahap metanogenesis untuk membentuk gas metana. Proses ini pun memerlukan peran bakteri, khususnya bakteri metanogenik. Berikut ini adalah gambar proses terbentuknya gas metana dari bahan organik secara sederhana.



Gambar 2.1 Proses pembentukan gas metana secara sederhana (Sufyandi, 2001)

Reaktor pengolahan limbah cair terdiri dari beberapa bagian dan pada setiap bagian terjadi proses dekomposisi bahan organik secara biologis (Hammer, 1975). Mikroba yang berperan dalam proses mendegradasi bahan-bahan organik dalam limbah cair adalah mikroba-mikroba yang bersifat amilolitik, proteolitik, dan lipolitik. Dalam pengolahan limbah secara biologis, hal-hal yang paling

mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme adalah suhu, ketersediaan nutrient dan oksigen, dan adanya bahan toksik.

2.4 Tinjauan tentang TPC (*Total Plate Count*)

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan penambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai penambahan jumlah sel (Hadioetomo, 1993). Ada dua cara perhitungan jumlah mikrobia yaitu perhitungan secara langsung dan perhitungan secara tidak langsung (Soetarto *et al.*, 2008).

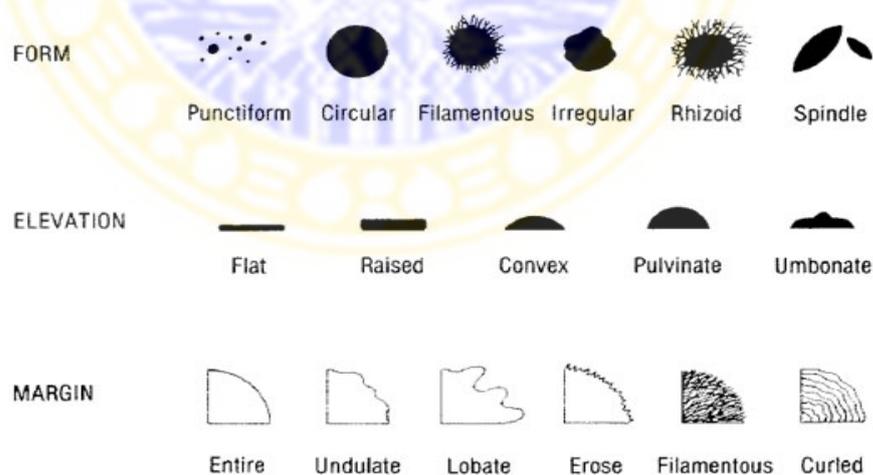
Menurut Soetarto *et al.* (2008), cara perhitungan tidak langsung dilakukan untuk mengetahui jumlah mikroorganisme pada suatu bahan yang masih hidup saja (*viabel count*). Dalam pelaksanaannya, ada beberapa cara perhitungan tidak langsung. Salah satunya adalah perhitungan pada cawan petri (*total plate count / TPC*).

Cara ini adalah cara yang paling umum digunakan untuk menentukan jumlah mikroba yang masih hidup berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh. Menurut Soetarto *et al.* (2008), teknik ini diawali dengan pengenceran sampel secara seri, dengan kelipatan 1:10. Masing-masing suspensi pengenceran ditanam dengan metode tuang (*pour plate*) atau sebar (*spread plate*). Bakteri akan bereproduksi pada medium agar dan membentuk koloni setelah 18-24 jam inkubasi. Untuk menghitung jumlah koloni dalam cawan petri dapat digunakan alat *colony counter* yang biasanya dilengkapi dengan pencatat elektronik.

2.5 Tinjauan tentang identifikasi bakteri

2.5.1 Identifikasi Makroskopik

Populasi bakteri tumbuh sangat cepat ketika nutrisi untuk pertumbuhan dan kondisi lingkungan memungkinkan mereka untuk berkembang (Pelczar dan Chan, 2008). Melalui pertumbuhan ini, berbagai jenis bakteri akan menghasilkan koloni yang khas dalam penampilan (Alcarno, 2001). Perbedaan ini disebut dengan karakteristik kultur, yang digunakan sebagai dasar untuk memisahkan mikroorganisme dalam kelompok taksonomik. Karakteristik koloni (bentuk, ukuran, warna, dll) diistilahkan sebagai morfologi koloni. Mengidentifikasi morfologi koloni adalah salah satu cara untuk mengidentifikasi bakteri. Morfologi koloni dapat ditinjau dari berbagai aspek, yaitu bentuk, tepi atau pinggir, ketinggian, ukuran, permukaan, kekentalan atau kepadatan, bau, transparansi, dan pigmentasi koloni (Alcarno, 2001).



Gambar 2.2 Tipe-tipe bentuk, tepi, dan elevasi koloni bakteri (Pelczar, 1957)

2.5.2 Identifikasi Mikroskopik

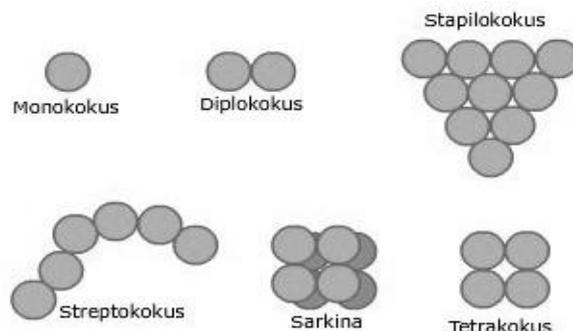
Menurut Pelczar dan Chan (2008), morfologi sel ditentukan dengan melihat olesan biakan yang sudah diwarnai dibawah mikroskop dan melihat bagaimana bentuk sel, sifat Gram, dan kemampuan membentuk spora dari bakteri tersebut. Berikut adalah tinjauan tentang ke-tiga hal tersebut:

1. Morfologi bakteri

Bakteri yang nampak dapat memiliki morfologi yang sama, namun keperluan nutrisi dan persyaratan ekologiannya berbeda (Soetarto *et al.*, 2008). Bentuk tubuh atau morfologi bakteri dipengaruhi oleh keadaan lingkungan, medium, dan usia (Alcama, 2001).

Menurut Alcama (2001), berdasarkan bentuknya, bakteri dibagi menjadi tiga golongan besar, yaitu:

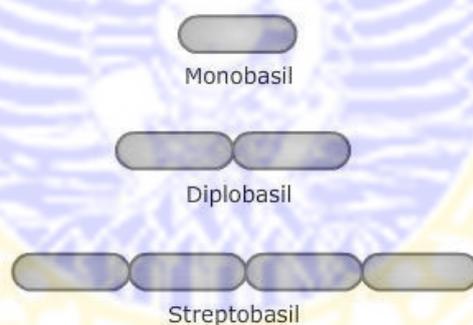
- a. Kokus (*Coccus*) dalah bakteri yang berbentuk bulat seperti bola, dan mempunyai beberapa variasi sebagai berikut:
 - o *Micrococcus*, jika kecil dan tunggal
 - o *Diplococcus*, jika bergandanya dua-dua
 - o *Tetracoccus*, jika bergandengan empat dan membentuk bujursangkar
 - o *Sarcina*, jika bergerombol membentuk kubus
 - o *Staphylococcus*, jika bergerombol
 - o *Streptococcus*, jika bergandengan membentuk rantai



Gambar 2.3 Bentuk-bentuk bakteri kokus (Wellmeyer, 2009)

b. Basil (*Bacillus*) adalah kelompok bakteri yang berbentuk batang atau silinder, dan mempunyai variasi sebagai berikut:

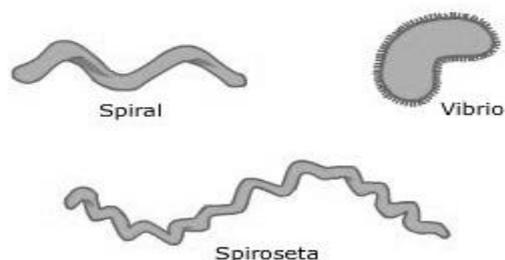
- *Diplobacillus*, jika bergandengan dua-dua
- *Streptobacillus*, jika bergandengan membentuk rantai



Gambar 2.4 Bentuk-bentuk bakteri basil (Wellmeyer, 2009)

c. Spiril (*Spirillum*) adalah bakteri yang berbentuk lengkung dan mempunyai variasi sebagai berikut:

- *Vibrio* (bentuk koma), jika lengkung kurang dari setengah lingkaran
- *Spiral*, jika lengkung lebih dari setengah lingkaran



Gambar 2.5 Bentuk-bentuk bakteri spiral (Wellmeyer, 2009)

2. Pewarnaan Gram

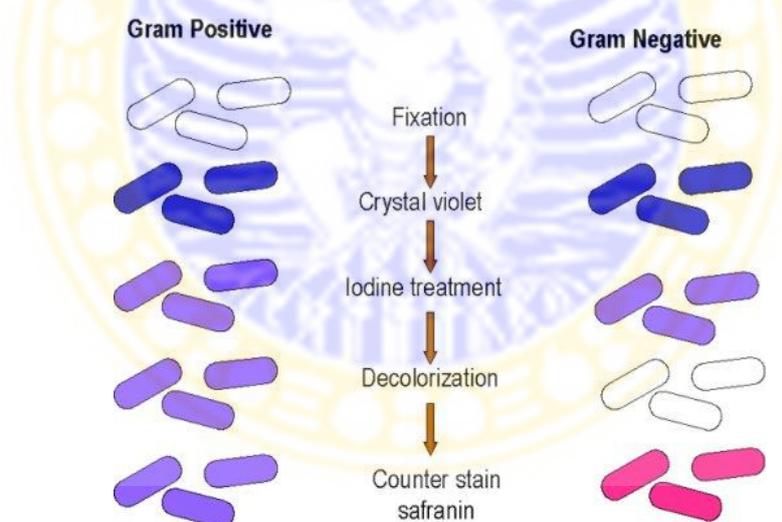
Bakteri memiliki morfologi yang beragam, warna yang transparan, ditambah ukurannya yang mikroskopis yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang, maka diperlukan adanya pewarnaan yang mana dapat memudahkan dalam pengamatan morfologi bakteri. Salah satu pewarnaan yang paling penting adalah pewarnaan Gram. Dari pewarnaan ini dapat bakteri dapat digolongkan ke dalam dua golongan, yaitu golongan bakteri Gram positif dan golongan bakteri Gram negatif (Pelczar dan Chan, 2008).

Teknik pewarnaan ini dilakukan dalam bentuk smear. Menurut Pelczar dan Chan (2008), tahapan dari pewarnaan Gram adalah sebagai berikut :

1. Mengambil biakan bakteri dengan menggunakan jarum ose pada objek glas yang sudah disterilkan dengan menggunakan alkohol 70 %;
2. Memfiksasi usapan bakteri tersebut, dengan cara melewatkannya di atas api Bunsen;
3. Usapan tersebut di tetesi pewarna utama yaitu cristal violet, kemudian ditunggu selama 1 menit;
4. Membilas smear dengan air mengalir;

5. Smear ditetesi dengan iodine yang berfungsi sebagai mordant, kemudian ditunggu selama 1 menit;
6. Membilas smear dengan air mengalir;
7. Menetesi smear dengan alkohol 95 % yang berfungsi sebagai dekolorisasi, kemudian ditunggu selama 30 detik;
8. Membilas smear dengan air mengalir;
9. Smear di tetesi safranin yang berfungsi sebagai pewarna tandingan.

Pada pewarnaan ini akan didapatkan perbedaan warna antara bakteri Gram positif yang akan berwarna biru keunguan dengan bakteri Gram negatif yang berwarna merah (Pelczar dan Chan, 2008).



Gambar 2.6 Proses staining Gram pada bakteri Gram (+) dan bakteri Gram (-) (Madigan, 2004)

3. Pewarnaan endospora

Endospora adalah struktur spesifik yang ditemukan pada beberapa jenis bakteri. Karena kandungan air endospora sangat rendah bila dibandingkan dengan sel vegetatifnya, maka endospora berbentuk sangat padat dan sangat refraktil bila

dilihat di bawah mikroskop. Endospora sangat sukar diwarnai dengan pewarna biasa, sehingga harus digunakan pewarna spesifik dan yang biasa digunakan adalah malachite green (Fardiaz, 1992).

Pertama-tama yang harus dilakukan adalah isolat bakteri diambil secara aseptik dengan menggunakan jarum ose kemudian bakteri dioleskan secara menyebar merata pada gelas objek yang terlebih dahulu disterilkan dengan alkohol 70% dan diberi aquades. Isolat bakteri lalu difiksasi di atas nyala bunsen sampai kering dan preparat ditutup dengan kertas yang mudah menyerap air, kemudian diletakkan di atas air mendidih selanjutnya ditetesi larutan larutan pewarna *malachite green* berlebihan selama lebih kurang 10 menit. Setelah itu dicuci dengan air mengalir selama 30 detik dan kemudian dikering anginkan. Selanjutnya ditetesi larutan safranin selama 1 menit lalu dibilas dengan air dan dikering anginkan. Kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat. Sebagai indikasi terdapatnya endospora akan berwarna hijau, dan bagian sel yang tidak mengandung endospora akan berwarna merah terang (Madigan *et al.*, 1995).

2.5.3 Uji Fisiologis

Untuk mengetahui genus dari suatu bakteri tidak cukup hanya dengan mengetahui karakteristik makroskopik dan mikroskopiknya saja, namun harus dilakukan uji fisiologis. Berikut adalah beberapa uji fisiologis menurut Hadioetomo (1993):

1. Uji motilitas

Uji ini digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang diuji bersifat motil atau tidak. Pertama-tama isolat bakteri diinokulasi pada medium SIM (*Sulfide Indol Motility*) pada tabung reaksi secara aseptik dan ditusukkan pada agar tegak, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Uji bernilai positif ditunjukkan dengan melebarnya koloni pada bekas tusukan pada media yang merupakan indikasi bakteri tersebut bersifat motil.

2. Uji MR – VP

Uji MR bertujuan untuk menentukan kemampuan mikroorganisme untuk mengoksidasi glukosa dan menstabilkan konsentrasi asam yang tinggi sebagai produk akhir. Sedangkan uji VP untuk membedakan kemampuan mikroorganisme untuk menghasilkan produk akhir non-asam atau netral seperti asetilmetilkarbonil dari asam organik yang dihasilkan dari metabolisme glukosa.

Untuk uji *methyl red* isolat bakteri diinokulasi pada medium MR-VP, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, pada tabung ditambahkan 3-4 tetes indikator metil merah. Bila warna medium berubah menjadi merah, artinya terbentuk asam.

Untuk uji Voges Proskauer biakan ditanam pada medium MR-VP, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, dan pada tabung ditambahkan 10 tetes α -naftol dan KOH. Tabung dikocok selama 20-30 detik. Uji akan bernilai positif jika terbantu warna merah muda yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu memfermentasikan glukosa dan membentuk asam hingga

pH media menjadi 5 atau lebih rendah. Jika selama 20-30 detik medium belum berubah warna, maka hasil pengamatan dilakukan selama 15 menit.

3. Uji indol

Uji indol digunakan untuk mengetahui apakah dalam proses pertumbuhannya bakteri dapat membentuk indol dari asam amino esensial triptofan. Pertama-tama isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium SIM (*Sulfide Indol Motility*) pada tabung reaksi secara aseptik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah diinkubasi ditetesi dengan 10 tetes reagen *Kovac's*. Uji akan bernilai positif dengan pembentukan warna merah pada permukaan medium yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu memecah asam amino triptofan.

4. Uji sitrat

Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Pertama-tama isolat diinokulasikan pada medium *Simmon's Citrate agar* dalam tabung reaksi secara vertikal, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Uji bernilai positif bila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi biru yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber energi.

5. Uji katalase

Uji katalase ini dilakukan untuk membedakan mikroorganisme yang memiliki enzim katalase yang digunakan untuk mendegradasi hidrogen peroksida yang bersifat toksik. Pertama-tama biakan murni diinokulasikan ke dalam tabung medium NA miring dan satu tabung untuk kontrol. Kemudian diinkubasi selama

48 jam. Setelah diinkubasi pada tabung ditambahkan 2-3 tetes larutan H_2O_2 3% pada permukaan media, jika terjadi reduksi H_2O_2 akan terlihat adanya gelembung O_2 di sekeliling pertumbuhan bakteri.

6. Uji oksidase

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang diuji memiliki enzim sitokrom oksidase. Enzim oksidase memegang peranan penting dalam transport elektron selama respirasi aerob. Sitokrom oksidase mengkatalisis oksidasi dan reduksi sitokrom oleh molekul oksigen. Enzim oksidase dihasilkan baik oleh bakteri aerob, fakultatif anaerob, maupun mikroaerofilik. Bakteri menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron terakhir selama penguraian karbohidrat untuk menghasilkan energi. Kemampuan bakteri memproduksi sitokrom oksidase dapat diketahui dari reaksi yang ditimbulkan setelah pemberian reagen oksidase pada koloni bakteri. Enzim ini merupakan bagian dari kompleks enzim yang berperan dalam proses fosforilasi oksidatif. Reagen yang digunakan adalah larutan dimetil-p-fenildiamina hidroklorida 1%. Reagen ini diteteskan pada cawan petri hingga menggenangi koloni bakteri. Uji positif ditandai dengan berubahnya koloni bakteri menjadi merah muda, lalu merah tua, merah gelap, dan akhirnya hitam. Tidak adanya perubahan warna mengindikasikan bahwa uji yang dilakukan negatif.

7. Uji fermentasi karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolisis karbohidrat dengan menggunakan tiga jenis gula, yaitu glukosa, laktosa dan sukrosa. Pertama-tama media LB (*Lactose Broth*) yang

ditambah dengan *fenol red* sebagai indikator dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian tabung durham dimasukkan ke dalam tabung reaksi tersebut, dan disterilkan. Setelah steril isolat bakteri diinokulasikan kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Indikator pembentukan asam laktat apabila terjadi perubahan warna medium dari merah menjadi kuning tanpa pembentukan gas pada tabung durham. Uji akan bersifat fermentasi asam campuran apabila warna medium berubah dan diikuti pembentukan gas pada tabung durham dan uji akan bersifat fermentasi alkohol apabila terbentuk gas pada tabung durham tanpa diikuti perubahan warna medium.

8. Uji TSIA

Uji ini menggunakan medium TSIA yang mengandung glukosa, laktosa, dan ferrosulfat. Pertama-tama isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium TSIA dalam tabung reaksi secara vertikal pada bagian *butt* dan secara *streak* pada bagian *slant*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati perubahan yang terjadi pada medium. Uji glukosa positif jika fenol merah menjadi kuning pada bagian bawah tabung reaksi (*butt*), sedangkan pada bagian atas permukaan miring media (*slant*) berwarna merah. Uji laktosa atau sukrosa positif jika terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning pada permukaan miring media dan pada bagian bawah medium juga berwarna kuning. Indikator terbentuknya H₂S dengan adanya warna hitam pada medium dan terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya medium di bagian ujung bawah tabung reaksi.