

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PROTEOLITIK  
DARI LIMBAH TAHU**

Oleh:

**FADLYA**

**H411 03 009**



Tgl. Terbit	31-12-08
Aspek	MIPA
Barang	1 kg
Halaman	Hasan
No. Seri	340

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2008**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PROTEOLITIK  
DARI LIMBAH TAHU**

**OLEH :**

**FADLYA**

**H411 03 009**

*Skripsi ini dibuat untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar sarjana biologi.*

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2008**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PROTEOLITIK  
DARI LIMBAH TAHU**

**Disetujui oleh :**

**Pembimbing Utama**



**Nur Haedar, S.Si., M.Si.**  
Nip. 132 158 486

**Pembimbing Pertama**



**Drs. As'adi Abdullah, M.Si.**  
Nip. 131 846 414

**Makassar, November 2008**

## PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim.

Segala puji dan syukur bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada junjungan dan teladan kita, Rasulullah SAW, keluarga, dan para sahabatnya, yang membawa petunjuk dan agama yang benar.

Atas limpahan nikmat-Nya berupa keimanan, kesehatan dan ilmu-Nya, serta bantuan, bimbingan, dan dorongan dari berbagai pihak sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Untuk itu, ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang tinggi, dengan tulus penulis tujukan kepada Ibu **Nur Haedar, S.Si, M.Si.**, selaku pembimbing utama, dan Bapak **Drs. As'adi Abdullah, M.Si.**, selaku pembimbing pertama, yang senantiasa sabar dan ikhlas dalam memberikan bimbingan, waktu, tenaga, perhatian, semangat, dan ilmu serta dukungan materil dari awal penelitian hingga penyusunan skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang tulus, yaitu kepada:

- Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, beserta staf pegawainya.
- Bapak **Drs. Karunia Alie, M.Si.**, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, beserta staf dosen dan pegawainya.

- Ibu **Dra, Syafaraenan, M.Si.**, selaku Penasehat Akademik, yang telah bertanggungjawab mengarahkan dan memperhatikan kegiatan akademik penulis.
- Sahabat-sahabat BIOTA (Biologi angkatan 2003) yang penulis banggakan, kalian sahabat terbaik yang benar-benar memberikan warna tersendiri dalam perjalanan hidup penulis. Juga alumni X2 SMANSA Makassar dan teman 2003 FMIPA-UH.
- Kakanda Biologi angkatan 2000, 2001, dan 2002 serta adik-adik angkatan 2004, 2005, dan 2006, atas segala kebersamaannya. Dan kepada berbagai pihak yang tidak sempat saya sebutkan namanya satu per satu.

Penulis dengan penuh kasih sayang dan ketulusan mengucapkan terima kasih dan mempersembahkan skripsi ini kepada kedua orangtua, Ibunda tersayang **Rosmini**, dan Ayahanda tercinta **Musa Tjamma**, yang dengan segala keikhlasan selalu memberikan cinta, kasih sayang, dan doa. Kemudian, kepada kedua kakakku yang tercinta **Suharto** dan **Muhammad Yusuf**, kedua adikku tersayang **Azwar** dan **Fadylah**, serta tanteku yang terbaik **Suharti**, atas segala perhatian, semangat, doa, dan dukungan materil yang selalu diberikan kepada penulis dalam penyusunan hingga selesainya skripsi ini. Semoga kebaikan kalian semua dibalas lebih oleh Allah SWT, Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah wawasan dan ilmu pengetahuan demi kepentingan bersama, -

Makassar, November 2008

**Penulis,-**

## ABSTRAK

Isolasi dan identifikasi bakteri proteolitik dari limbah tahu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genus bakteri proteolitik dari limbah tahu. Isolasi dilakukan dengan metode pengenceran desimal lalu ditumbuhkan pada medium Skim Milk Agar. Koloni bakteri proteolitik yang tumbuh dipisahkan, dimurnikan, diuji aktivitas proteolitiknya secara kualitatif, dan diidentifikasi melalui pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik serta serangkaian uji biokimia. Dari hasil penelitian diperoleh 4 genus bakteri proteolitik, yaitu bakteri Gram positif, berbentuk batang, dan menghasilkan spora tergolong genus *Bacillus* dan bakteri Gram negatif, berbentuk batang tergolong genus *Aeromonas*, *Yersinia*, dan *Edwardsiella*.

**Kata kunci: bakteri proteolitik, limbah tahu.**

## ABSTRACT

Isolation and identification of proteolytic bacteria from tofu waste. The aim of this research was to know genus of proteolytic bacteria from tofu waste. The isolation was done with dilution of decimal method, then growth in skim milk agar medium. Colonies of proteolytic bacteria that growth, were then isolated, purified, examined of proteolytic activity, and identified based on observed of macroscopic and microscopic morphology, and also series of biochemistry tests. Based on result of this research were got 4 genus of proteolytic bacteria, there were rod Gram-positive bacteria, and have endospore belonged to genera *Bacillus*, and rod Gram-negatif bacteria belonged to genera *Aeromonas*, *Yersinia*, and *Edwardsiella*.

**Key words:** proteolytic bacteria, tofu waste.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PRAKATA</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
I.1. Latar Belakang .....	1
I.2. Tujuan Penelitian .....	3
I.3. Manfaat Penelitian .....	3
I.4. Waktu dan Tempat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
II.1. Limbah .....	4
II.2. Industri Tahu .....	5
II.3. Limbah Tahu .....	10
II.4. Bakteri Proteolitik .....	13
II.5. Isolasi dan Identifikasi .....	17



<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
III.1. Alat .....	18
III.2. Bahan .....	18
III.3. Metode Kerja .....	19
III.3.1. Sterilisasi Alat .....	19
III.3.2. Pembuatan Media .....	19
III.3.3. Pengambilan Sampel Limbah Tahu .....	20
III.3.4. Isolasi Bakteri Proteolitik .....	20
III.3.5. Pemurnian .....	21
III.3.6. Uji Rasio Aktivitas Proteolitik Secara Kualitatif .....	21
III.3.7. Identifikasi Bakteri Proteolitik .....	21
III.3.7.1. Pengamatan Morfologi .....	21
III.3.7.2. Uji Biokimia .....	23
III.3.8. Analisis Data .....	25
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
IV.1. Isolasi Bakteri Proteolitik .....	26
IV.2. Pengamatan Uji Rasio Aktivitas Proteolitik secara Kualitatif .....	26
IV.3. Identifikasi Bakteri Proteolitik .....	29
IV.3.1. Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri Proteolitik secara Makroskopik.....	29
IV.3.2. Pengamatan Mikroskopik Isolat Bakteri Proteolitik .....	32
IV.3.3. Pengamatan Uji Biokimiawi Isolat Bakteri Proteolitik .....	34

<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>44</b>
V.1. Kesimpulan .....	44
V.2. Saran .....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>49</b>

## DAFTAR TABEL



<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
1.	Komposisi Kandungan Gizi Tahu .....	6
2.	Komposisi Kandungan Ampas Tahu .....	11
3.	Identifikasi hasil fermentasi bakteri pada medium TSIA .....	23
4.	Indeks Proteolitik Isolat Bakteri dari Limbah Tahu .....	27
5.	Karakteristik Koloni Isolat Bakteri Proteolitik pada Medium NA cawan dan NA miring .....	30
6.	Karakteristik Sel Isolat Bakteri Proteolitik secara Mikroskopik .....	32
7.	Hasil Pengamatan Uji Biokimia Isolat Bakteri Proteolitik .....	42

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Tahapan Proses Pembuatan Tahu .....	9
2. Pertumbuhan isolat bakteri proteolitik pada Medium Skim Milk Agar .....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Skema Kerja .....	49
2. Hasil Pengecatan Gram .....	50
3. Hasil Pengecatan Spora .....	50

# BAB I

## PENDAHULUAN

### **1.1. Latar Belakang**

Perkembangan industri dewasa ini sangat pesat, terutama industri rumah tangga yang sangat membantu dalam menunjang kehidupan masyarakat. Salah satunya adalah industri tahu yang memang banyak terdapat di Indonesia. Selain menghasilkan produk makanan berupa tahu, yang banyak diminati oleh masyarakat karena harganya murah dan kandungan proteinnya cukup tinggi, namun di sisi lain industri tahu juga menghasilkan produk sampingan berupa limbah tahu.

Limbah industri tahu berupa limbah padat dan limbah cair. Limbah padat atau ampas tahu umumnya di jual untuk pakan ternak, sedangkan limbah cair ada yang diolah, tetapi sebagian besar dibuang langsung tanpa pengolahan. Limbah tahu banyak mengandung senyawa organik berupa protein, karbohidrat, dan lipid, dan sedikit senyawa anorganik (Bahri, 2006). Kandungan bahan organik yang tinggi menyebabkan limbah tahu sebagai bahan pencemar bagi lingkungan sekitarnya, jika dibuang langsung tanpa pengolahan terlebih dahulu. Hal ini cukup meresahkan masyarakat yang bermukim di sekitar pabrik industri tahu karena limbahnya menimbulkan bau busuk dan mencemari badan air.

Senyawa organik yang terkandung dalam limbah tahu merupakan substansi yang baik bagi pertumbuhan berbagai jenis mikroba. Seperti halnya tahu, maka limbahnya pun diketahui memiliki kandungan senyawa organik yang paling tinggi

yakni protein sehingga memungkinkan kehadiran berbagai jenis bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler (Wikipedia, 2007).

Menurut Moon dan Parulekar (1993), protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan limbah. Ward (1985) menyatakan bahwa protease yang digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia

Bakteri proteolitik memiliki peranan penting dalam penguraian protein dan enzim proteolitiknya yang banyak dimanfaatkan dalam kehidupan masyarakat terutama di bidang industri, mendorong banyak peneliti yang berminat untuk mengisolasi bakteri tersebut. Bakteri proteolitik banyak terdapat di alam, salah satunya pada limbah tahu yang kandungan proteinnya cukup tinggi. Untuk itu, penelitian tentang isolasi dan identifikasi bakteri proteolitik dari limbah tahu perlu dilakukan karena akan sangat bermanfaat dalam bidang mikrobiologi.

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Penelitian bertujuan untuk mengetahui genus bakteri proteolitik dari limbah tahu.

## **1.3. Manfaat Penelitian**

Penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai genus bakteri proteolitik pada limbah tahu yang dimanfaatkan sebagai inokulum dalam pengolahan limbah tahu secara mikrobiologi.

## **1.4. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Juli 2008. Bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar. Sampel limbah tahu diambil dari industri tahu di Jalan Baji Nyawa, Makassar.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1. Limbah

Limbah adalah buangan yang dihasilkan dari suatu proses produksi baik industri maupun domestik (rumah tangga), yang kehadirannya pada suatu saat dan tempat tertentu tidak dikehendaki oleh lingkungan karena tidak memiliki nilai ekonomis. Bila ditinjau dari aspek kimiawi, limbah ini terdiri dari bahan kimia organik dan anorganik. Dengan konsentrasi dan kuantitas tertentu, kehadiran limbah dapat berdampak negatif terhadap lingkungan terutama bagi kesehatan manusia, sehingga perlu dilakukan penanganan terhadap limbah. Tingkat bahaya keracunan yang ditimbulkan oleh limbah tergantung pada jenis dan karakteristik limbah (Wikipedia, 2007).

Menurut bentuknya limbah dibedakan menjadi tiga yaitu limbah padat, cair, dan gas. Menurut sumbernya, limbah dibagi menjadi tiga yaitu: (a) limbah domestik (rumah tangga) yang berasal dari perumahan, perdagangan, dan rekreasi; (b) limbah industri; dan (c) limbah rembesan dan limpasan air hujan. Sesuai dengan sumbernya maka limbah mempunyai komposisi yang sangat bervariasi bergantung kepada bahan dan proses yang dialaminya (Sugiharto, 1987).

Faktor yang mempengaruhi kualitas limbah yaitu volume limbah, kandungan bahan pencemar, dan frekuensi pembuangan limbah. Berdasarkan karakteristiknya, limbah industri dapat digolongkan menjadi 4 bagian yaitu

limbah cair, limbah padat, limbah gas dan partikel, dan limbah B3 (Bahan Berbahaya dan Beracun) (Wikipedia, 2007).

Limbah industri pangan dapat menimbulkan masalah dalam penanganannya karena mengandung sejumlah besar karbohidrat, protein, lemak, garam-garam mineral dan sisa-sisa bahan kimia yang digunakan dalam pengolahan dan pembersihan. Sebagai contoh, limbah dari industri susu, pembekuan dan pengeringan makanan, industri pengolahan daging, unggas, dan hasil laut dapat menimbulkan bau yang tidak diinginkan dan polusi berat pada perairan bila pembuangannya tidak diberi perlakuan yang tepat (Jenie, 1993).

Proses pengolahan limbah cair dilakukan melalui tiga kegiatan yaitu pengolahan secara fisik, kimiawi, dan biologis. Proses pengolahan secara fisik adalah pemisahan berdasarkan ukuran partikel melalui tahapan flokulasi, sedimentasi, dan penyaringan. Pengolahan secara kimiawi dilakukan dengan menambahkan zat kimia ke dalam limbah untuk menyederhanakan senyawa kimia yang berbahaya melalui tahapan pengendapan, penyerapan, dan desinfeksi. Proses pengolahan secara biologis dilakukan dengan cara memanfaatkan mikroorganisme sebagai agen pengurai limbah (Sulistijorini, 2003).

## **II.2. Industri Tahu**

Tahu merupakan salah satu makanan tradisional yang populer. Selain rasanya enak, harganya murah dan nilai gizinya pun tinggi. Bahan makanan ini diolah dari kacang kedelai. Meskipun berharga murah dan bentuknya sederhana, ternyata tahu mempunyai mutu yang istimewa dilihat dari segi gizi. Hasil-hasil

studi menunjukkan bahwa tahu kaya protein bermutu tinggi, tinggi sifat komplementasi proteinnya, ideal untuk makanan diet, rendah kandungan lemak jenuh dan bebas kolesterol, kaya mineral dan vitamin, makanan alami yang sehat dan bebas dari senyawa kimia yang beracun (Koswara, 2008).

Tabel 1. Komposisi Kandungan Gizi Tahu (Koswara, 2008)

Komponen	Kadar (%)
Air	86
Protein	8 – 12
Lemak	4,8
Karbohidrat	1,6

Pada garis besarnya bahan-bahan yang diperlukan untuk membuat tahu dapat digolongkan menjadi dua bagian yaitu bahan baku dan bahan tambahan. Bahan baku adalah kacang kedelai. Bahan baku berikutnya adalah asam cuka dengan kadar 90%. Fungsi dari asam cuka ini adalah untuk menggumpalkan agar menjadi tahu, jika tidak ada asam cuka, dapat juga dipakai “ batu tahu “ (  $\text{CaSO}_4$  ) yaitu batu gips atau sulfat kapur yang dibakar kemudian ditumbuk sampai menjadi tepung yang halus (Depkes, 2007).

Bahan tambahan adalah air bersih yang digunakan untuk mencuci dan merendam kedelai serta untuk membuat sari kedelai. Air bersih ini diperlukan agar tahu yang dihasilkan tidak terkontaminasi oleh mikroba, serta warna tahu yang dihasilkan menjadi lebih menarik (berwarna putih) (Depkes, 2007).

Alat-alat yang digunakan dalam proses pembuatan tahu adalah sebagai berikut: bak air, batu penggiling atau mesin pres, tong atau ember, wajan, tungku pembakaran atau kompor, alat penyaring, sangkar bambu, kotak cetakan, dan meja pengempa (Depkes, 2007).

Proses pembuatan tahu meliputi beberapa tahapan, yaitu (Depkes, 2007):

a. Perendaman

Sebelum direndam, pertama-tama kedelai dibersihkan dengan diayak untuk memisahkan sisa-sisa kulit, kotoran maupun batu. Perendaman kacang kedelai dilakukan dengan menggunakan *heater* (pemanas) selama 10 jam dengan suhu 60°C. Perendaman bertujuan untuk melunakkan struktur seluler kacang kedelai, sehingga mempermudah pengelupasan kulit keledai dan mempercepat penggilingan serta menghasilkan ekstrak yang optimum. Selanjutnya kulit kedelai dipisahkan dengan menggunakan alat mekanis agar lebih higienis.

b. Penggilingan

Setelah proses perendaman selesai, kemudian kedelai dicuci. Lalu dilakukan penggilingan dengan menambahkan air panas sebanyak 8-10 kali berat kedelai.

c. Pemanasan dan Penyaringan

Selanjutnya dilakukan pemanasan pada suhu 100° C selama 30 menit dengan pemanasan uap. Kemudian dilakukan penyaringan untuk mendapatkan *filtrat* kedelai dan ampas tahu.

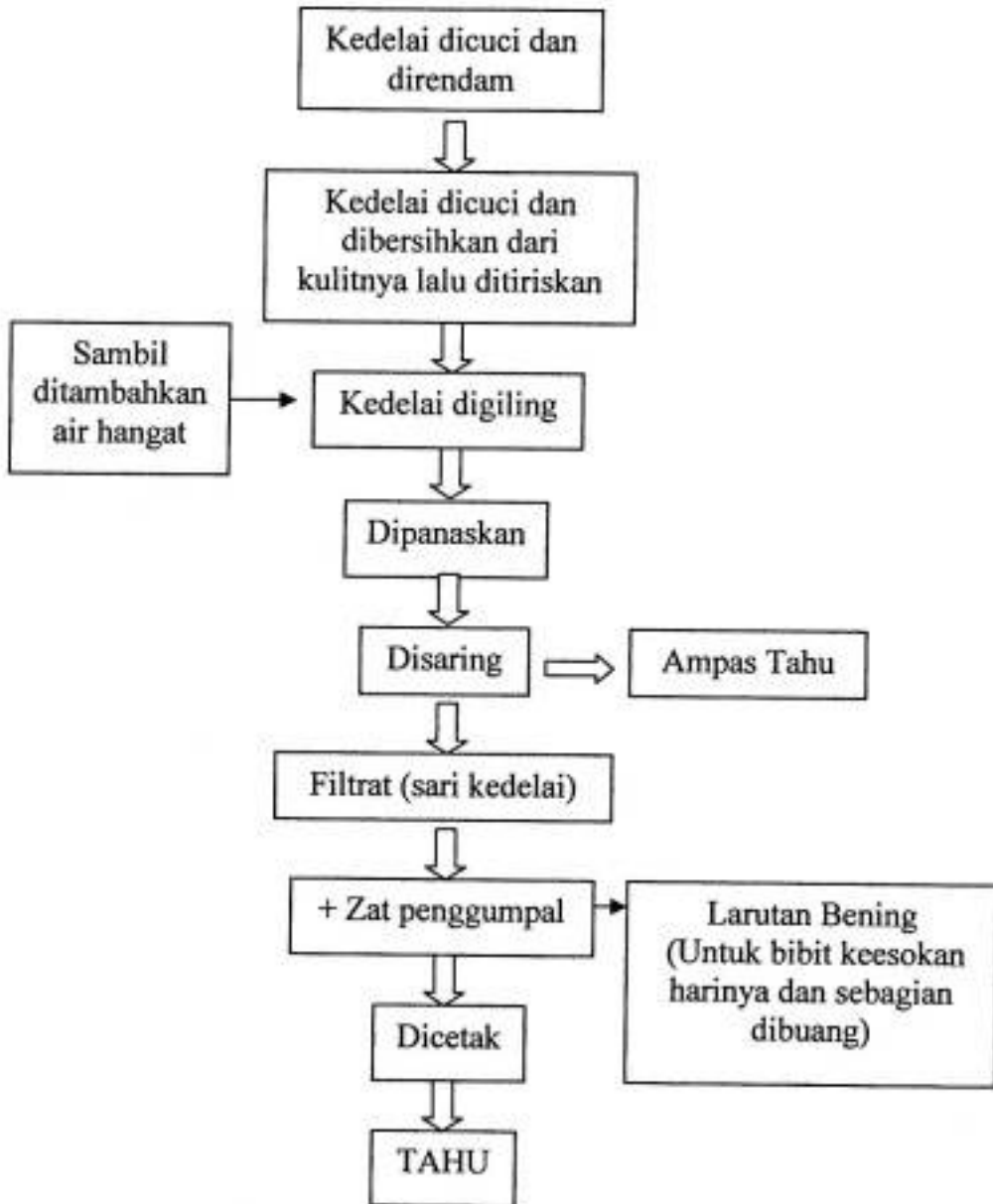
#### d. Penggumpalan

*Filtrat* kedelai selanjutnya digumpalkan dengan penambahan koagulan garam kalsium. Faktor yang berpengaruh terhadap penggumpalan adalah pH, suhu, waktu penggumpalan, dan jenis serta konsentrasi zat penggumpal. Derajat keasaman (pH) isoelektrik berkisar antara 4,0-4,4. Ada beberapa zat penggumpal yaitu kalsium sulfat, kalsium khlorida, magnesium sulfat, larutan asam asetat, dan biakan bakteri asam laktat. Di kalangan pembuat tahu yang lazim digunakan adalah biakan bakteri asam laktat yang didapat dari filtrasi cairan setelah proses penggumpalan yang telah didiamkan sehari semalam. Disamping berfungsi untuk menggumpalkan, zat-zat penggumpal tersebut juga berperan sebagai pengawet dengan menurunkan pH bahan pangan sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan menyebabkan denaturasi protein bakteri. Selain itu, juga dapat berfungsi untuk menambah cita rasa, mengurangi rasa manis dan dapat pula memperbaiki tekstur. Setelah semua protein menggumpal, cairan jernih dipisahkan dan gumpalan protein yang diperoleh sudah siap untuk dicetak.

#### e. Pencetakan

Gumpalan sari kedelai kemudian dimasukkan ke dalam cetakan dan ditekan selama 10-30 menit bergantung pada tekstur tahu yang diinginkan. Selanjutnya tahu dipotong-potong menurut ukuran yang dikehendaki dan direndam di dalam air agar tidak lengket satu sama lain, lalu direbus dan disimpan untuk dijual keesokan harinya. Pada perebusan, dapat ditambahkan kunyit bila dikehendaki, agar warna tahu menjadi kuning.

Secara singkat proses pembuatan tahu dapat digambarkan secara skematis sebagai berikut (Depkes, 2007):



Gambar 1. Tahapan Proses Pembuatan Tahu

### II.3. Limbah Tahu

Limbah tahu adalah limbah yang dihasilkan dalam proses pembuatan tahu maupun pada saat pencucian kedelai. Limbah yang dihasilkan berupa limbah padat dan cair. Setiap kuintal kedelai akan menghasilkan limbah 1,5-2 m<sup>3</sup> air limbah (Nurhasan, 1991).

Sebagian besar limbah cair yang dihasilkan oleh industri pembuatan tahu adalah cairan yang dipisahkan saat penggumpalan tahu. Cairan ini mengandung kadar protein yang tinggi (EMDI & BAPEDAL, 1994).

Karakteristik limbah cair tahu dikelompokkan menjadi tiga macam. (1) Sifat fisika: temperatur (25°-35° C); (2) Sifat kimia: bergantung pada zat organik (karbohidrat, protein, lemak) dalam kedelai sedangkan zat anorganik bergantung pada kualitas air yang digunakan. Umumnya zat anorganik cukup rendah dan tak ada logam berat. Kisaran pH-nya 4-7, ada gas CO<sub>2</sub> dan CH<sub>4</sub>/metana. (3) Sifat biologi meliputi semua mikroba (Cahyana, 2006).

Sumber limbah padat berasal dari penyaringan bubur kedelai berupa ampas tahu yang sudah melalui pemerasan berkali-kali dengan menyiram air panas sampai tidak mengandung sari lagi (Damayanti, 2004).

Ampas Tahu merupakan limbah dari proses pembuatan tahu yang diperoleh dari hasil pemisahan bubur kedelai. Ampas tahu mengandung protein cukup tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pakan ternak dan ikan. Untuk menjadi bahan baku pakan, ampas tahu bisa langsung diberikan pada ikan dengan tambahan sedikit ikan asin, atau dapat diolah lebih dulu menjadi tepung dengan mengeringkannya dalam oven/dijemur lalu digiling (Digilib, 2005).



Tabel 2. Komposisi Kandungan Ampas tahu (Digilib, 2005)

Komponen	Kadar (%)
Protein	8,66
Lemak	3,79
Air	51,63
Abu	1,21

Kandungan air ampas tahu masih tinggi, hal ini merupakan penghambat digunakannya ampas tahu sebagai makanan ternak. Pengeringan merupakan salah satu jalan untuk mengatasinya. Pengeringan juga mengakibatkan berkurangnya asam lemak bebas dan ketengikan ampas tahu serta dapat memperpanjang umur simpan (Menlh, 2008).

### **Bahaya Limbah Tahu**

Limbah cair yang dihasilkan mengandung padatan tersuspensi maupun terlarut, akan mengalami perubahan fisika, kimia, dan hayati yang akan menghasilkan zat beracun atau menciptakan media untuk tumbuhnya mikroba dimana mikroba ini dapat berupa mikroba penyebab penyakit atau mikroba lainnya yang merugikan baik pada tahu sendiri maupun pada manusia. Bila dibiarkan dalam air, limbah akan berubah warnanya menjadi coklat kehitaman dan berbau busuk. Bau busuk ini dapat mengakibatkan sakit pernapasan (ISPA). Apabila air limbah ini merembes ke dalam tanah yang dekat dengan sumur maka air sumur itu tidak dapat dimanfaatkan lagi. Apabila limbah ini dialirkan ke sungai



maka akan mencemari sungai dan bila masih digunakan maka akan menimbulkan penyakit gatal, diare, dan penyakit lainnya (Nurhasan, 1991).

#### **Penanganan Limbah Tahu (Nurhasan, 1991)**

- Menggunakan alat yang dapat menghasilkan tahu yang lebih baik dan sedikit menghasilkan limbah.
- Dengan penerapan Produksi Bersih (*Cleaner Production*). Penataan proses produksi yang baik dari mulai tempat proses pencucian, penempatan peralatan yang tepat, penggunaan air yang bersih sehingga limbah padat maupun limbah cair berkurang.
- Salah satu metode yang dapat diaplikasikan untuk penanganan limbah yang tepat, terarah dan berkelanjutan. adalah dengan cara bio-proses, yaitu mengolah limbah organik menjadi biogas dan produk alternatif lainnya seperti sumber etanol dan methanol. Dengan metode ini, pengelolaan limbah tidak hanya bersifat "penanganan" namun juga memiliki nilai guna/manfaat.

#### **Pemanfaatan Limbah Tahu**

Limbah tahu memiliki banyak manfaat, yaitu (Nurhasan, 1991):

- Untuk makanan ternak
- Dibuat makanan nata de soya
- Dibuat makanan kecil contohnya stick tahu

- Sumber energi alternatif (biogas). Energi biogas adalah gas hasil pembusukan bahan organik oleh bakteri pada kondisi anaerob atau hampa udara, yang dihasilkan dari limbah tahu (Sulistyawaty, 2005)
- Limbah tahu dalam bentuk cair dan padat mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan penyubur tanah (pupuk organik) karena mengandung protein lemak yang cukup tinggi (Nuraini, 2003).
- Ampas tahu dapat dijadikan tepung, semacam alternatif pengganti tepung terigu

#### **II.4. Bakteri Proteolitik**

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler (Wikipedia, 2007).

Dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks daripada pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi. Hal ini disebabkan struktur protein yang lebih kompleks. Mikroorganisme melalui suatu sistem enzim yang kompleks, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Senyawa-senyawa intermediat dan produk akhir hasil pemecahan asam amino sangat bervariasi (Wikipedia, 2007).

Penelitian yang mengarah pada produksi enzim proteolitik (protease) dan karakterisasinya telah banyak dilakukan, terutama yang dihasilkan oleh mikrobia,

- Sumber energi alternatif (biogas). Energi biogas adalah gas hasil pembusukan bahan organik oleh bakteri pada kondisi anaerob atau hampa udara, yang dihasilkan dari limbah tahu (Sulistyawaty, 2005)
- Limbah tahu dalam bentuk cair dan padat mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan penyubur tanah (pupuk organik) karena mengandung protein lemak yang cukup tinggi (Nuraini, 2003).
- Ampas tahu dapat dijadikan tepung, semacam alternatif pengganti tepung terigu

#### **II.4. Bakteri Proteolitik**

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler (Wikipedia, 2007).

Dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks daripada pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi. Hal ini disebabkan struktur protein yang lebih kompleks. Mikroorganisme melalui suatu sistem enzim yang kompleks, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Senyawa-senyawa intermediet dan produk akhir hasil pemecahan asam amino sangat bervariasi (Wikipedia, 2007).

Penelitian yang mengarah pada produksi enzim proteolitik (protease) dan karakterisasinya telah banyak dilakukan, terutama yang dihasilkan oleh mikrobia,

baik dari golongan jamur, *yeast* maupun bakteri. Untuk mengetahui bahwa mikrobia tersebut menghasilkan enzim, maka perlu diketahui aktivitas enzim yang dikandungnya. Enzim dikatakan aktif apabila zat tersebut mempunyai kemampuan untuk melaksanakan aktivitas katalitiknya (Poernomo, 2003).

Fogarty dan Kelly (1979) melaporkan bahwa enzim proteolitik bakteri, *yeast* ataupun fungi mempunyai karakter dan spesifisitas yang berbeda. Karakter enzim proteolitik tersebut ditunjukkan dengan pH dan suhu optimum enzim tersebut dalam menghidrolisis substratnya. Selain itu adanya ion logam, asam amino tertentu dan inhibitor enzim akan mempengaruhi aktivitas enzim tersebut (Poernomo, 2003).

Aktivitas enzim proteolitik dapat diamati pada media agar susu skim yaitu akan terbentuk zona jernih di sekeliling koloni bakteri proteolitik. Zona jernih terbentuk karena pada media susu skim yaitu mengandung protein yang terdiri dari asam amino, yang terikat satu dengan lainnya melalui ikatan peptida mempunyai molekul besar. Molekul yang besar tersebut tidak dapat digunakan secara langsung oleh mikrobia sebagai sumber nutrien, karena tidak dapat ditransport ke dalam sel bakteri tersebut. Molekul yang besar ini dapat digunakan oleh bakteri proteolitik sebagai sumber karbon atau energi untuk sintesa protein hanya apabila terlebih dahulu didegradasi menjadi molekul yang lebih kecil di luar sel. Maka mikrobia tersebut mensintesa dan mengeluarkan enzim ekstraseluler yang disebut enzim proteolitik atau protease yang dapat memecah protein dengan molekul besar yang berada di luar sel. Enzim tersebut akan memecah ikatan peptida protein menjadi asam-asam amino. Semakin besar

aktivitas enzim proteolitik ini ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona jernih (Poernomo, 2003).

Bakteri Proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok (Wikipedia, 2007):

1. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora, misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*.
2. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora, misalnya *Bacillus*.
3. Bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya sebagian spesies *Clostridium*.

Jenis-jenis bakteri proteolitik adalah sebagai berikut (Pelczar, 1988):

*a. Bacillus*

Sel berbentuk batang, sebagian besar motil, flagellum khas lateral, membentuk endospora; tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangium, Gram positif, kemoorganotrof, metabolisme dengan respirasi sejati, fermentasi sejati atau kedua-duanya yaitu respirasi dan fermentasi, aerobik sejati atau anaerobik fakultatif..

*b. Pseudomonas*

Sel tunggal, batang lurus atau melengkung, namun tidak berbentuk heliks, motil dengan flagellum polar, monotrikus atau multitrikus, Gram negatif, kemoorganotrof, metabolisme dengan respirasi, tidak pernah fermentatif, beberapa kemolitotrof fakultatif, penerima elektron universal, katalase positif.

aktivitas enzim proteolitik ini ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona jernih (Poernomo, 2003).

Bakteri Proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok (Wikipedia, 2007):

1. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora, misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*.
2. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora, misalnya *Bacillus*.
3. Bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya sebagian spesies *Clostridium*.

Jenis-jenis bakteri proteolitik adalah sebagai berikut (Pelczar, 1988):

*a. Bacillus*

Sel berbentuk batang, sebagian besar motil, flagellum khas lateral, membentuk endospora; tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangium, Gram positif, kemoorganotrof, metabolisme dengan respirasi sejati, fermentasi sejati atau kedua-duanya yaitu respirasi dan fermentasi, aerobik sejati atau anaerobik fakultatif..

*b. Pseudomonas*

Sel tunggal, batang lurus atau melengkung, namun tidak berbentuk heliks, motil dengan flagellum polar, monotrikus atau multitrikus, Gram negatif, kemoorganotrof, metabolisme dengan respirasi, tidak pernah fermentatif, beberapa kemolitotrof fakultatif, penerima elektron universal, katalase positif.

c. *Proteus*

Sel berbentuk batang lurus, berbentuk kokoid dan bentuk-bentuk involusi tak beraturan, serta filamen dan sferoplas seringkali dijumpai pada keadaan tertentu, dapat dijumpai berpasangan atau dalam rantai, tidak membentuk kapsul, motil dengan flagellum peritrikus, Gram negatif, tidak berpigmen.

d. *Clostridium*

Sel berbentuk batang, biasanya motil dengan bantuan flagellum peritrikus, kadang-kadang nonmotil, biasanya Gram positif, kemoorganotrof, bersifat anaerobik sejati, umumnya dijumpai di dalam tanah, sedimen air laut dan air tawar, membentuk endospora lonjong sampai bulat yang biasanya menggelembungkan sel.

e. *Yersinia*

Sel berbentuk batang, Gram negatif, bersifat fakultatif anaerobik, tidak membentuk kapsul. Nonmotil pada 37°C; pada suhu di bawah 37°C, dua spesies motil dengan flagelum peritrikus.

f. *Aeromonas*

Sel berbentuk batang, Gram negatif, motil dengan panjang 1-4 µm, bersifat fakultatif anaerobik, tergolong familia Enterobacteriaceae (Wikipedia, 2008).

g. *Edwardsiella*

Sel berbentuk batang, Gram negatif, tidak berkapsul, bersifat anaerobik fakultatif, tergolong familia Enterobacteriaceae. *Edwardsiella hoshinae*, bersifat



c. *Proteus*

Sel berbentuk batang lurus, berbentuk kokoid dan bentuk-bentuk involusi tak beraturan, serta filamen dan sferoplas seringkali dijumpai pada keadaan tertentu, dapat dijumpai berpasangan atau dalam rantai, tidak membentuk kapsul, motil dengan flagellum peritrikus, Gram negatif, tidak berpigmen.

d. *Clostridium*

Sel berbentuk batang, biasanya motil dengan bantuan flagellum peritrikus, kadang-kadang nonmotil, biasanya Gram positif, kemoorganotrof, bersifat anaerobik sejati, umumnya dijumpai di dalam tanah, sedimen air laut dan air tawar, membentuk endospora lonjong sampai bulat yang biasanya menggelembungkan sel.

e. *Yersinia*

Sel berbentuk batang, Gram negatif, bersifat fakultatif anaerobik, tidak membentuk kapsul. Nonmotil pada 37°C; pada suhu di bawah 37°C, dua spesies motil dengan flagelum peritrikus.

f. *Aeromonas*

Sel berbentuk batang, Gram negatif, motil dengan panjang 1-4 µm, bersifat fakultatif anaerobik, tergolong familia Enterobacteriaceae (Wikipedia, 2008).

g. *Edwardsiella*

Sel ber... negatif, tidak berkapsul, bersifat anaerobik fakultatif... bacteriaceae. *Edwardsiella hoshinae*, bersifat



motil, tidak menghasilkan indol. *Edwardsiella ictaluri*, nonmotil, tidak menghasilkan indol, dan pathogen pada ikan (Edwards, 2008).

## **II.5. Isolasi dan Identifikasi**

Ada beberapa aspek praktis dari pengambilan sampel, yaitu harus menggunakan teknik aseptis selama pengambilan sampel, dan membebaskan mikroorganisme dari sampel. Mikroorganisme dapat tersuspensi secara bebas dalam hampir semua larutan (Buckle, 1985).

Biakan murni yang telah diisolasi kemudian diidentifikasi melalui serangkaian uji untuk memperoleh ciri morfologi berdasarkan bentuk, ukuran dan penataan, serta melalui uji biokimia untuk mengetahui sifat biokimianya yang didasarkan pada berbagai hasil metabolisme yang disebabkan oleh daya kerja enzim. Identifikasi bakteri juga didasarkan pada sifat biakan, sifat pewarnaan, pola pertumbuhan koloni, reaksi pertumbuhan pada karbohidrat, dan penggunaan asam amino (Lay, 1994).

Identifikasi untuk uji adanya bakteri proteolitik dilakukan dengan menggunakan media susu skim. Pertumbuhan bakteri proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona jernih di sekeliling koloni bakteri (Poernomo, 2003).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **III.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri (Pyrex), botol pengenceran, neraca Ohaus, Erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), gelas piala, inkubator (Heraeus), ose lurus, ose bulat, sendok tanduk, pipet tetes, autoklaf (All American), tabung reaksi (Pyrex), oven (Heraeus), Laminary air flow, lemari pendingin (Electrolux), mikroskop (Nikon), object glass, deck glass, bunsen.

#### **III.2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel limbah cair tahu, sampel limbah padat tahu (ampas tahu), alkohol 70%, aquadest, deterjen, HCl 1%, kapas, aluminium foil, kertas saring, susu skim, larutan alfa-naphthol 5%, larutan kristal violet, larutan mordan, alkohol asam, larutan safranin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, larutan Malachite Green 5%, KOH 40%, larutan tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride 1%, larutan indikator phenol red, chloroform, reagen kovacs, medium uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa), medium Nutrient Agar (NA), medium Nutrient Gelatin, medium Urea Broth, media Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP), indikator Methyl Red, medium Simmons Citrate Agar (SCA), medium Sulfite Indole Motility Agar (SIMA), medium Triple Sugar Iron Agar (TSIA).

dalam aquadest. Medium NA dipanaskan hingga homogen lalu ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

Susu skim ditimbang sebanyak yang dibutuhkan lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam aquadest steril, kemudian dipasteurisasi. Medium NA yang telah disterilkan dicampur dengan susu skim pada suhu 50°C.

### **III.3.3. Pengambilan Sampel Limbah Tahu**

Sampel limbah cair tahu dan limbah padat (ampas) tahu diambil dari industri tahu di Jalan Baji Nyawa, Makassar. Sampel diambil dengan menggunakan botol kaca steril.

### **III.3.4. Isolasi Bakteri Proteolitik**

Secara aseptis sampel limbah cair tahu diencerkan dengan menggunakan aquadest steril dengan perbandingan 1:9. Pengenceran dilakukan secara desimal yaitu  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , dan  $10^{-4}$  (tergantung derajat kontaminasi bahan). Tiap hasil pengenceran dipipet 1 ml ke cawan petri steril, kemudian ditambahkan 15-20 ml medium Skim Milk Agar, lalu dihomogenkan dengan cara menggoyangkan cawan petri, setelah medium membeku diinkubasikan pada suhu 37°C selama 72 jam dengan posisi terbalik. Koloni bakteri proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni dan untuk lebih memastikan ditetesi HCl 1% selama 1 menit di atas medium (Fardiaz, 1993 dan Zerdani, 2004).

Untuk sampel limbah padat (ampas) tahu, secara aseptis sampel ditimbang sebanyak 10 g lalu disuspensikan ke dalam 100 ml aquadest steril, kemudian

dalam aquadest. Medium NA dipanaskan hingga homogen lalu ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

Susu skim ditimbang sebanyak yang dibutuhkan lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam aquadest steril, kemudian dipasteurisasi. Medium NA yang telah disterilkan dicampur dengan susu skim pada suhu 50°C.

### **III.3.3. Pengambilan Sampel Limbah Tahu**

Sampel limbah cair tahu dan limbah padat (ampas) tahu diambil dari industri tahu di Jalan Baji Nyawa, Makassar. Sampel diambil dengan menggunakan botol kaca steril.

### **III.3.4. Isolasi Bakteri Proteolitik**

Secara aseptis sampel limbah cair tahu diencerkan dengan menggunakan aquadest steril dengan perbandingan 1:9. Pengenceran dilakukan secara desimal yaitu  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , dan  $10^{-4}$  (tergantung derajat kontaminasi bahan). Tiap hasil pengenceran dipipet 1 ml ke cawan petri steril, kemudian ditambahkan 15-20 ml medium Skim Milk Agar, lalu dihomogenkan dengan cara menggoyangkan cawan petri, setelah medium membeku diinkubasikan pada suhu 37°C selama 72 jam dengan posisi terbalik. Koloni bakteri proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni dan untuk lebih memastikan ditetesi HCl 1% selama 1 menit di atas medium (Fardiaz, 1993 dan Zerdani, 2004).

Untuk sampel limbah padat (ampas) tahu, secara aseptis sampel ditimbang sebanyak 10 g lalu disuspensikan ke dalam 100 ml aquadest steril, kemudian

dilakukan pengenceran secara desimal dengan cara yang sama seperti di atas (Fardiaz, 1993)

### **III.3.5. Pemurnian**

Koloni yang membentuk zona bening di sekeliling medium agar susu skim, selanjutnya secara aseptis diambil 1 ose kemudian digores ke medium Nutrient Agar dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 -2 x 24 jam. Selanjutnya dilakukan beberapa kali penanaman pada medium yang sama sampai mendapatkan isolat murni. Kemudian isolat bakteri murni tadi secara aseptis diinokulasikan ke dalam medium Nutrient Agar miring dan diinkubasi selama 1 – 2 x 24 pada suhu 37°C, kemudian disimpan dalam lemari pendingin sebagai isolat bakteri uji (Fardiaz, 1993).

### **III.3.6. Uji Rasio Aktivitas Proteolitik Secara Kualitatif (Durham *et al.*, 1987)**

Isolat murni selanjutnya masing-masing ditotol ulang pada medium Skim Milk Agar untuk kemudian diukur diameter koloni dan zona jernihnya. Nisbah antara diameter zona jernih terhadap diameter koloni (Indeks Proteolitik = IP). Isolat bakteri yang nilai IP-nya >1, yang akan diuji selanjutnya (diidentifikasi).

### **III.3.7. Identifikasi Bakteri Proteolitik**

#### **III.3.7.1. Pengamatan Morfologi (Lay, 1994)**

##### **A. Secara Makroskopik**

Pengamatan secara makroskopik dilakukan dengan mengamati pertumbuhan bakteri pada NA cawan dengan melihat bentuk koloni, warna, tepi koloni, elevasi, dan struktur dalam, serta bentuk pertumbuhan bakteri pada medium NA miring.

## **B. Secara Mikroskopik**

### **a. Pewarnaan Gram**

Sebanyak 1 ose kultur isolat yang berumur 24 jam dibuat preparat olesan (pada objek gelas) dengan menggunakan NaCl fisiologis dan dikeringkan di udara. Lalu difiksasi di atas api bunsen. Preparat ditetesi larutan Gram A (kristal violet) dan dibiarkan selama 3 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya ditetesi dengan larutan Gram B (lugol) selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Kemudian ditetesi dengan Gram C (alkohol asam) sampai sisa zat warna hilang atau selama 30 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir. Pada tahap akhir, preparat ditetesi dengan larutan Gram D (safranin) dan dibiarkan selama 2 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan hingga mengering. Selanjutnya ditetaskan dengan minyak imersi untuk diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Pengamatan dilakukan dengan melihat morfologi sel dan warna. Bakteri Gram-positif akan berwarna biru keunguan, sedangkan bakteri Gram-negatif akan berwarna merah.

### **b. Pewarnaan spora**

Isolat bakteri dari kultur murni yang berumur 24 jam diambil 1 ose kemudian dibuat preparat olesan (di atas objek glass) menggunakan NaCl fisiologis dan dikeringkan di udara, lalu difiksasi di atas api bunsen. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan malachite green dan dipanaskan di atas air mendidih. Kemudian dibilas dengan air mengalir. Preparat lalu ditetesi dengan larutan safranin dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dibilas kembali dengan air mengalir dan dibiarkan hingga mengering. Selanjutnya ditetaskan dengan minyak

imersi untuk diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya spora yang berwarna hijau dan sel vegetatifnya akan berwarna merah.

### III.3.7.2. Uji Biokimia

Isolat bakteri selanjutnya diuji dengan serangkaian uji biokimia :

#### a. Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA) (Lay, 1994)

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium TSIA secara tusukan pada agar tegak dan secara goresan pada agar miring. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 x 24 jam.

Tabel 3. Identifikasi hasil fermentasi bakteri pada medium TSIA

Agar Miring (slant)	Agar Tegak (butt)	Keterangan
Merah (basa)	Kuning (asam)	Hanya glukosa yang difermentasi
Kuning (asam)	Kuning (asam)	Glukosa, Laktosa, dan/atau Sukrosa difermentasi
Kuning (asam)	Merah (basa)	Laktosa dan sukrosa difermentasi
Merah (basa)	Merah (basa)	Ketiga gula tidak difermentasi

Pembentukan H<sub>2</sub>S dapat diamati dengan terbentuknya warna kehitaman pada bekas goresan, dan pembentukan gas dapat dilihat dengan terbentuknya rongga pada bagian bawah agar.

#### b. Uji Sulfite Indole Motility Agar (SIMA) (Lay, 1994)

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium SIM secara tusukan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Selanjutnya ditetesi dengan chloroform ke dalam tabung SIM yang telah



diinokulasikan bakteri, kemudian ditambahkan 4 tetes reagen kovacs, dan didiamkan selama 20-60 menit. Hasil positif ditandai dengan terjadinya warna merah pada lapisan reagen (indol). Pembentukan H<sub>2</sub>S ditandai dengan terbentuk warna kehitaman pada medium. Motilitas ditandai dengan terjadinya penyebaran pada bekas tusukan.

**c. Uji Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP)**

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian diinokulasikan pada media MR-VP. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Kemudian untuk uji VP, 1/3 medium dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril yang kosong, dan 2/3 bagian untuk uji MR. Pada media untuk uji VP ditambahkan 10 tetes larutan alfa-naphthol 5%, dan 10 tetes larutan KOH 40%. Hasil positif bila terlihat warna merah. Sedangkan pada media untuk uji MR, ditambahkan 10 tetes larutan methyl red. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah dan negatif terbentuk warna kuning (Lay, 1994).

**d. Uji Simmons Citrate Agar (SCA)**

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium SCA. Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Uji sitrat positif bila warna media berubah dari hijau menjadi biru (Lay, 1994).

**e. Uji Urease**

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium Urea Broth, pada suhu 37°C diinkubasi selama 1 x 24 jam. Hasil positif yaitu terjadinya perubahan medium menjadi merah sampai ungu (Reynolds, 2004).



#### **f. Uji Katalase**

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian dioleskan di atas gelas benda steril yang telah ditetaskan dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara (Reynolds, 2004).

#### **g. Uji Oksidase**

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian di oleskan pada kertas saring steril, selanjutnya ditetaskan reagen oksidase (larutan tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride 1%). Reaksi positif ditandai oleh timbulnya warna biru/ungu kehitaman pada kertas saring (Reynolds, 2004).

#### **h. Uji Gelatinase**

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium Nutrient Gelatin. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam, kemudian ditempatkan dalam lemari pendingin selama 60 menit lalu diamati. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya pencairan gelatin (Reynolds, 2004).

#### **i. Uji Fermentasi Karbohidrat**

Isolat bakteri dari kultur murni diambil 1 ose kemudian diinokulasikan ke dalam medium glukosa, laktosa, sukrosa dan maltosa. Reaksi positif diamati dengan terjadinya perubahan warna dari merah menjadi kuning (Lay, 1994).

### **III.3.8. Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif yang disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Identifikasi bakteri berpedoman pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt, G., 1994).

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **IV.1. Isolasi 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 (Wikipedia, 2007). Bakteri ini banyak terdapat di alam, terutama pada substrat dengan kandungan protein yang tinggi, salah satunya pada limbah tahu

Isolasi bakteri proteolitik dari limbah tahu dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran kemudian ditumbuhkan pada medium Skim Milk Agar, suatu medium yang mengandung kasein, yang merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease (Ward, 1985). Bakteri proteolitik yang tumbuh akan membentuk zona bening di sekeliling koloninya, sebagai hasil dari degradasi protein pada media.

#### **IV.2. Pengamatan Uji Rasio Aktivitas Proteolitik secara Kualitatif**

Isolat murni yang telah diisolasi dari limbah tahu diinokulasikan kembali pada medium Skim Milk Agar dengan tujuan untuk melihat kemampuannya dalam mendegradasi protein dan mengetahui aktivitas proteolitiknya, yakni dengan indikasi terbentuknya zona bening di sekeliling koloninya (Gambar 2). Secara kualitatif, aktivitas proteolitik dari tiap isolat bakteri tersebut dapat diketahui dengan menghitung indeks proteolitik (IP), yaitu nisbah antara diameter zona bening terhadap diameter koloni.

Dari hasil isolasi diperoleh 38 isolat, dan setelah dilakukan uji aktivitas proteolitik secara kualitatif maka didapatkan 18 isolat bakteri proteolitik dengan IP-nya >1 (Tabel 4). Ke 20 isolat lainnya tidak membentuk zona bening, sehingga tidak dilakukan pengujian selanjutnya. Ke 18 isolat yang terpilih, kemudian diamati morfologinya, diuji sifat biokimianya dan diidentifikasi.

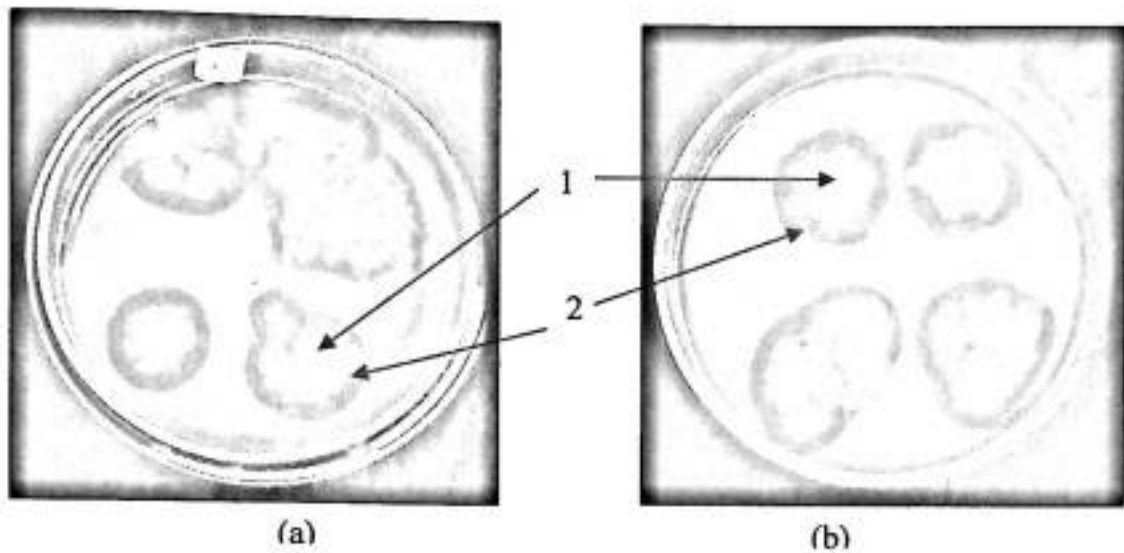
Tabel 4. Indeks Proteolitik Isolat Bakteri dari Limbah Tahu

No.	Kode Isolat	Indeks Proteolitik (IP)
1.	P1	2,60
2.	P2a	1,15
3.	P2b	1,09
4.	P3	1,31
5.	P5	1,09
6.	P6	1,67
7.	P7a	1,46
8.	P10	1,625
9.	C1a	1,92
10.	C1b	1,10
11.	C5	1,22
12.	C6a	1,33
13.	C7	1,10
14.	C8	1,18
15.	C11	1,18
16.	C12a	1,69
17.	C12b	136
18.	C14	1,33

Pada tabel 4 terlihat bahwa indeks proteolitik yang paling tinggi terdapat pada isolat dengan kode P1 dengan IP = 2,6. Hal ini dapat berarti bahwa isolat tersebut memiliki kemampuan yang lebih besar dalam mendegradasi protein atau aktivitas dari enzim proteolitik yang dihasilkannya sangat baik dibandingkan beberapa isolat lainnya. Sedangkan indeks proteolitik terendah yaitu 1,09 oleh isolat dengan kode P2b dan P5

Zona bening yang terbentuk pada media susu skim merupakan indikasi dari hasil degradasi protein oleh pertumbuhan bakteri proteolitik. Menurut Poernomo (2003), susu skim merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrisi, yakni mengandung protein susu berupa kasein. Kasein terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium, disebut kalsium kaseinat. Molekul ini sangat besar dan tidak larut dalam air serta membentuk koloid. Suspensi ini berwarna putih dan dapat diamati secara langsung pada saat disuspensikan ke dalam media kultur padat. Makromolekul ini tidak dapat digunakan secara langsung oleh bakteri sebagai sumber nutrisi karena tidak dapat ditransport ke dalam sel. Makromolekul ini akan dapat digunakan sebagai sumber karbon atau energi untuk sintesis protein hanya apabila terlebih dahulu didegradasi menjadi molekul yang lebih kecil di luar sel. Untuk tujuan tersebut, bakteri proteolitik mensintesa dan mengeluarkan enzim ekstraseluler yang disebut enzim proteolitik atau protease yang dapat memecah protein yang berada diluar sel. Dengan adanya enzim proteolitik ekstraseluler, kasein ini akan terhidrolisis menjadi peptida peptida dan asam-asam amino yang larut. Keadaan ini bisa langsung diamati dengan hilangnya partikel kasein di dalam media. Sehingga terlihat zona bening di medium di sekitar pertumbuhan bakteri proteolitik yang menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler.

Semakin besar aktivitas proteolitik dari suatu bakteri proteolitik ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona bening yang terbentuk pada media agar susu skim.



Gambar 2. Pertumbuhan isolat bakteri proteolitik pada Medium Skim Milk Agar; (a) Isolat C1a, (b) Isolat C12a; 1. koloni bakteri, 2. zona bening.

### IV.3. Identifikasi Bakteri Proteolitik

Delapan belas isolat bakteri proteolitik diidentifikasi dengan sistem *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Identifikasi dilakukan dengan uji morfologi secara makroskopik (melihat bentuk pertumbuhan koloni bakteri) dan secara mikroskopik, serta uji aktivitas biokimia.

#### IV.3.1 Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri Proteolitik secara Makroskopik

Menurut Volk (1984) bahwa perbedaan bentuk pertumbuhan koloni dapat dijadikan sebagai dasar dalam identifikasi bakteri. Ke 18 isolat yang terpilih, secara makroskopis memiliki karakteristik koloni yang beragam pada medium Nutrient Agar (NA) cawan. Hal ini dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Karakteristik Koloni Isolat Bakteri Proteolitik pada Medium NA cawan dan NA miring

Kode Isolat	Ciri Pertumbuhan					
	Medium NA Cawan					Medium NA miring
	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi	Struktur dalam	
P1	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
P2a	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
P2b	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
P3	<i>Irregular</i>	Putih kekuningan	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
P5	<i>Circular</i>	Putih	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
P6	<i>Irregular</i>	Putih kekuningan	<i>Lobate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
P7a	<i>Irregular</i>	Putih kekuningan	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
P10	<i>Irregular</i>	Putih	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C1a	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C1b	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Lobate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C5	<i>Irregular</i>	Putih	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C6a	<i>Irregular</i>	Putih kekuningan	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C7	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C8	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C11	<i>Circular</i>	Putih	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C12a	<i>Irregular</i>	Putih kekuningan	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C12b	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>
C14	<i>Circular</i>	Putih kekuningan	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	<i>Opaque</i>	<i>Filiform</i>

Keterangan: *Circular*= bulat, *Irregular*= tidak beraturan, *Entire*= rata, *Undulate*= bergelombang, *Lobate*= bentuk seperti telinga, *Opaque*=tidak dapat ditembus cahaya, *Filiform*= pertumbuhan mengikuti bekas goresan



Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel 5 diperoleh 18 isolat bakteri proteolitik yang secara makroskopis berbeda bentuk pertumbuhan koloninya pada medium NA cawan, baik dari bentuk, warna, dan tepi koloni. Ke 18 isolat mempunyai elevasi yang sama yaitu *flat* (rata) dan bentuk struktur dalam yang sama, yaitu *opaque*. Pada sampel yang diisolasi dari limbah padat tahu, terdapat 4 isolat dengan kode P1, P2a, P2b, dan P5 yang bentuk koloninya *circular*, dan terdapat 4 isolat dengan kode P3, P6, P7a, dan P10 yang berbentuk *irregular*. Pada sampel yang diisolasi dari limbah cair tahu terdapat 7 isolat dengan kode C1a, C1b, C7, C8, C11, C12b, dan C14 yang berbentuk *circular*, dan 3 isolat dengan kode C5, C6a, dan C12a yang berbentuk *irregular*.

Warna koloni dari 18 isolat menunjukkan warna putih kekuningan yang terlihat pada sebagian besar isolat dengan kode P1, P2a, P2b, P3, P6, P7a, C1a, C1b, C6a, C7, C8, C12a, C12b, dan C14. Sedangkan warna putih terdapat pada koloni isolat dengan kode P5, P10, C5, dan C11. Bentuk tepi koloni dari setiap isolat yang diperoleh cukup beragam. Isolat dengan kode P1, P2a, P2b, P5, P10, C1a, C7, dan C12b memiliki tepi koloni *entire*. Terdapat 8 isolat dengan tepi *undulate* yakni pada isolat dengan kode P3, P7a, C5, C6a, C8, C11, C12a, dan C14. Tepi dengan bentuk *lobate* terdapat pada isolat dengan kode P6 dan C1b.

Bentuk pertumbuhan isolat bakteri proteolitik pada medium Nutrient Agar miring umumnya yaitu pertumbuhannya merata mengikuti bekas goresan (*filiform*).

#### IV.3.2. Pengamatan Mikroskopik Isolat Bakteri Proteolitik

Morfologi bakteri secara mikroskopik dapat dilihat dengan pewarnaan Gram dan spora.

Tabel 6. Karakteristik Sel Isolat Bakteri Proteolitik secara Mikroskopik

Kode Isolat	Bentuk	Pewarnaan	
		Gram	spora
P1	Batang	Positif	Ada
P2a	Batang	Negatif	Tidak ada
P2b	Batang	Negatif	Tidak ada
P3	Batang	Positif	Ada
P5	Batang	Negatif	Tidak ada
P6	Batang	Positif	Ada
P7a	Batang	Positif	Ada
P10	Batang	Positif	Ada
C1a	Batang	Negatif	Tidak ada
C1b	Batang	Negatif	Tidak ada
C5	Batang	Negatif	Tidak ada
C6a	Batang	Positif	Ada
C7	Batang	Negatif	Ada
C8	Batang	Positif	Ada
C11	Batang	Positif	Ada
C12a	Batang	Negatif	Tidak ada
C12b	Batang	Positif	Ada
C14	Batang	Positif	Ada

##### a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan bakteri berdasarkan perbedaan dalam struktur dan komposisi kimiawi di dalam sel bakteri, sehingga akan terbagi ke dalam 2 kelompok bakteri yaitu Gram positif and Gram negatif. Bakteri Gram positif ditunjukkan dengan warna ungu/violet, dan Gram negatif terlihat berwarna merah. Dari tabel 6, hasil pengamatan secara mikroskopik dapat



dilihat bahwa isolat dengan kode P1, P3, P6, P7a, P10, C6a, C8, C11, C12b, dan C14 bersifat Gram positif. Sedangkan bakteri Gram negatif ditunjukkan pada isolat dengan kode P2a, P2b, P5, C1a, C1b, C5, C7, dan C12a. Bentuk sel dari keseluruhan isolat bakteri proteolitik adalah berbentuk batang.

Menurut Pelczar dan Chan (1986) bahwa dinding sel bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipid dalam persentase yang lebih banyak daripada bakteri Gram positif. Pada saat pewarnaan bakteri diberi cat kristal violet yodium (Uk-Y) tetap dipertahankan setelah proses pewarnaan tersebut dilakukan dengan pemberian etanol (alkohol) terhadap sel bakteri yang menyebabkan terekstraksinya lemak sehingga memperbesar permeabilitas dinding sel bakteri. Jadi kompleks warna kristal violet-yodium yang telah memasuki dinding sel selama langkah awal pewarnaan dapat diekstraksi karena bakteri Gram negatif kehilangan warna tersebut, sehingga saat sel bakteri diberi cat lawan yaitu safranin, maka sel akan menyerap cat tersebut yang menyebabkan sel bakteri Gram negatif berwarna merah. Karena kandungan lipidnya lebih rendah sehingga dinding sel Gram positif menjadi terdehidrasi selama perlakuan dengan etanol. Ukuran pori-pori mengecil, permeabilitasnya berkurang dan kompleks UK-Y tidak dapat terekstraksi akibatnya warna sel tampak ungu.

#### **b. Pewarnaan Spora**

Berdasarkan tabel 6, seluruh isolat yang bersifat bakteri Gram positif mampu membentuk spora, sedangkan isolat bakteri Gram negatif tidak mengandung spora. Spora dibentuk oleh bakteri sebagai usaha untuk mempertahankan hidup bila keadaan lingkungan tidak cocok atau tidak

menguntungkan, seperti kekurangan sumber karbon, energi atau fosfat; adanya bahan bersifat toksik, temperatur yang tidak sesuai atau kondisi kekeringan yang dapat menginduksi terbentuknya spora. Lapisan luar dari spora dapat tahan dari kondisi fisik dan bahan kimia sehingga spora sukar diwarnai, tidak seperti sel vegetatif yang tidak tahan dengan kondisi tersebut. Menurut Lay (1994), pewarnaan untuk spora dilakukan dengan cara pemanasan untuk membuat lapisan luar spora mengembang sehingga zat warna dapat masuk. Jenis bakteri yang dapat membentuk spora adalah dari genus *Bacillus* dan *Clostridium*, yang juga merupakan kelompok bakteri proteolitik.

#### **IV.3.3. Pengamatan Uji Biokimiawi Isolat Bakteri Proteolitik**

Identifikasi bakteri berdasarkan uji aktivitas biokimia dilakukan dengan cara membandingkan aktivitas biokimia setiap bakteri. Aktivitas biokimia setiap jenis bakteri berbeda. Hal ini disebabkan karena setiap bakteri mempunyai aktivitas enzimatik yang berbeda (Cappucino & Sherman, 1983). Hasil pengujian sifat biokimia ke 18 isolat tersebut dapat dilihat pada tabel 7.

##### **A. Uji TSIA**

Uji TSIA digunakan terutama untuk mengidentifikasi bakteri Gram negatif. Dalam Medium TSIA mengandung 3 macam gula (glukosa, laktosa, dan sukrosa), indikator merah fenol dan ferosulfat (Lay, 1994). Pada uji TSIA dapat diketahui terjadinya fermentasi glukosa, laktosa, dan/atau sukrosa, produksi gas dari glukosa, dan produksi hydrogen sulfide ( $H_2S$ ). Warna merah menunjukkan basa, sedangkan warna kuning menunjukkan reaksi asam. Pembentukan  $H_2S$  ditandai dengan timbulnya warna hitam, sedangkan pembentukan gas dari glukosa ditandai

menguntungkan, seperti kekurangan sumber karbon, energi atau fosfat; adanya bahan bersifat toksik, temperatur yang tidak sesuai atau kondisi kekeringan yang dapat menginduksi terbentuknya spora. Lapisan luar dari spora dapat tahan dari kondisi fisik dan bahan kimia sehingga spora sukar diwarnai, tidak seperti sel vegetatif yang tidak tahan dengan kondisi tersebut. Menurut Lay (1994), pewarnaan untuk spora dilakukan dengan cara pemanasan untuk membuat lapisan luar spora mengembang sehingga zat warna dapat masuk. Jenis bakteri yang dapat membentuk spora adalah dari genus *Bacillus* dan *Clostridium*, yang juga merupakan kelompok bakteri proteolitik.

#### **IV.3.3. Pengamatan Uji Biokimiawi Isolat Bakteri Proteolitik**

Identifikasi bakteri berdasarkan uji aktivitas biokimia dilakukan dengan cara membandingkan aktivitas biokimia setiap bakteri. Aktivitas biokimia setiap jenis bakteri berbeda. Hal ini disebabkan karena setiap bakteri mempunyai aktivitas enzimatik yang berbeda (Cappucino & Sherman, 1983). Hasil pengujian sifat biokimia ke 18 isolat tersebut dapat dilihat pada tabel 7.

##### **A. Uji TSIA**

Uji TSIA digunakan terutama untuk mengidentifikasi bakteri Gram negatif. Dalam Medium TSIA mengandung 3 macam gula (glukosa, laktosa, dan sukrosa), indikator merah fenol dan ferosulfat (Lay, 1994). Pada uji TSIA dapat diketahui terjadinya fermentasi glukosa, laktosa, dan/atau sukrosa, produksi gas dari glukosa, dan produksi hydrogen sulfide ( $H_2S$ ). Warna merah menunjukkan basa, sedangkan warna kuning menunjukkan reaksi asam. Pembentukan  $H_2S$  ditandai dengan timbulnya warna hitam, sedangkan pembentukan gas dari glukosa ditandai

dengan terbentuknya rongga di bagian bawah agar. Warna merah pada permukaan (slant) dan kuning pada bagian bawah (butt) tabung, yaitu menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa tetapi tidak laktosa dan sukrosa. Warna kuning pada slant dan butt, yaitu menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa, laktosa, dan/atau sukrosa (Fardiaz, 1993).

Pembentukan  $H_2S$  oleh mikroorganisme menunjukkan adanya penguraian asam amino yang mengandung sulphur. Penguraian asam amino tersebut karena kemampuan mikroorganisme menghasilkan desulfurase.  $Fe^{2+}$  yang terdapat pada medium biakan bereaksi dengan  $H_2S$  dan menghasilkan senyawa  $FeS$  yang berwarna hitam dan tidak larut dalam air (Lay, 1994). Senyawa ferosulfat digunakan untuk mendeteksi adanya gas  $H_2S$  yang tidak berwarna sebagai hasil metabolisme sel, yang diamati dengan terangkatnya medium atau terbentuk rongga pada agar.

Hasil pengamatan uji TSIA berdasarkan tabel 7 yaitu terdapat 15 isolat yang menunjukkan sifat asam pada slant dan butt dari medium, yang berarti terjadi perubahan pH dan warna medium berubah menjadi kuning. Hal ini menandakan isolat tersebut mampu memfermentasi glukosa, laktosa dan/atau sukrosa. Isolat dengan kode C7, C11, dan C14 juga menunjukkan sifat asam pada butt, tetapi pada slant bersifat basa, yakni medium berubah warna menjadi merah. Hal ini berarti bahwa isolat tersebut hanya mampu memfermentasi glukosa, tapi tidak untuk laktosa dan sukrosa.

## **B. Uji pada Medium SIM Agar**

Medium SIM Agar digunakan untuk mengetahui adanya pembentukan indol oleh bakteri dan motilitas (pergerakan) bakteri tersebut. Pembentukan indol dapat dilihat dengan terbentuknya warna merah jika ditambah pereaksi Kovacs pada medium tersebut. Indol dibentuk dari asam triptofan sebagai hasil aktivitas hidrolisis beberapa spesies bakteri untuk digunakan sebagai sumber karbon. Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme akibat penguraian protein. Penggunaan eter atau xylol dimaksudkan untuk mengekstraksi indol dari medium, karena indol dapat larut dalam eter atau xylol, sehingga bila jumlah indol sedikit dapat dikumpulkan ke permukaan medium dan bereaksi dengan reagens di permukaan medium berupa cincin merah. Sifat motilitas bakteri dapat dilihat dengan pertumbuhan yang menyebar di sekeliling tempat penusukan kultur atau adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar di sekitar inokulasi, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella (Fardiaz, 1993 dan Umar 2007).

Hasil pengamatan pada tabel 7 menunjukkan ada 14 isolat yang bersifat motil yakni bakteri tersebut memiliki flagel untuk bergerak sehingga pertumbuhannya pada medium SIM Agar terlihat menyebar, dan 4 isolat (C1a, C6a, C7, dan C12b) bersifat nonmotil.

## **C. Uji MR (Methyl Red)**

Uji methyl red digunakan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran (metilen glikon). Beberapa bakteri memfermentasikan glukosa dan

menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam sehingga akan menurunkan pH media pertumbuhannya menjadi 5,0 atau lebih rendah. Penambahan indikator pH "methyl red" dapat menunjukkan adanya perubahan pH menjadi asam. Methyl red berwarna merah pada lingkungan dengan pH 4,4 dan berwarna kuning dalam lingkungan dengan pH 6,2. Bila tidak terjadi fermentasi asam campuran maka media biakan berubah menjadi kuning setelah penambahan reagens methyl red. Hasilnya positif bila terjadi perubahan warna menjadi merah setelah ditambahkan methyl red dan menandakan bahwa bakteri ini peragi asam campuran (Lay, 1994).

Hasil pengamatan pada tabel 7 yaitu terdapat 10 isolat yang memperlihatkan hasil positif terhadap uji ini, yang diamati dengan terbentuknya warna merah pada medium biakan setelah penambahan reagen. Hal ini berarti bahwa isolat tersebut mampu memfermentasi asam campuran. Ke 8 isolat dengan kode P1, P2b, P5, P10, C7, C8, C12a, dan C14, menunjukkan warna kuning pada medium setelah ditambahkan metil red, yang berarti tidak terjadi fermentasi.

#### **D. Uji VP (Voges Proskauer)**

Uji Voges-Proskauer digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang dalam proses pertumbuhannya terbentuk asetilmetilkarbinol sebagai produk antara (intermediate product) dari proses metabolisme karbohidrat atau yang melakukan fermentasi 2,3-butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 butanadiol sebagai produk utama, akan terjadi penumpukan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. Penambahan 40% KOH dan 5% alphanaphtol dalam ethanol dapat menentukan adanya asetoin (asetilmetilkarbinol), suatu senyawa pemuka dalam sintesis 2,3-butanadiol. Asetilmetilkarbinol dalam



lingkungan yang mengandung potasium hidroksida dan udara, teroksidasi menjadi senyawa diasetil. Senyawa ini dengan alfa-naftol dan inti guanidin dari asam-aminoorganina (dari pepton) menghasilkan warna merah (Lay, 1994).

Hasil pengamatan uji VP pada tabel 7 terlihat 15 isolat yang memberikan hasil positif dengan terbentuknya warna merah pada medium setelah ditambahkan alfa-naphthol dan KOH, artinya hasil akhir fermentasi bakteri adalah asetilmetilkarbinol (asetolin). Dan isolat dengan kode P2b, P7a, C1a, C1b, dan C12a menunjukkan hasil negatif.

#### **E. Uji Sitrat**

Uji sitrat dilakukan dengan menginokulasi biakan ke dalam medium Simmons Citrate Agar, tujuannya untuk mengetahui adanya senyawa sitrat yang dapat dipakai sebagai satu-satunya sumber karbon bagi mikroorganisme. Dalam medium ini digunakan natriumsitrat sebagai sumber karbon. Bila natriumsitrat ini dapat diuraikan maka amonium hidrogenfosfat turut teruraikan dan akan melepaskan  $\text{NH}_3$  sehingga menyebabkan medium menjadi alkalis, dan indikator bromtimolbiru berubah dari hijau menjadi biru, juga berarti mikroorganisme tersebut mempunyai enzim sitrat permiase yaitu enzim spesifik yang membawa sitrat ke dalam sel (Umar, 2007).

Hasil pengamatan uji sitrat berdasarkan tabel 7 yaitu keseluruhan isolat bakteri proteolitik tidak menghasilkan enzim sitrat permiase sehingga senyawa sitrat pada medium tidak dapat digunakan, ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna medium.

## **F. Uji Hidrolisis Urea**

Uji hidrolisis urea bertujuan untuk mengetahui adanya bakteri yang mampu menghasilkan enzim urease. Urease adalah enzim yang dapat memecah ikatan karbon-nitrogen dari urea menjadi bentuk karbondioksida, amonia, dan air. Bila dalam biakan terdapat urease, urea dihidrolisis, sehingga terbentuk amonia yang mengubah warna indikator dari kuning menjadi merah (Reynolds, 2004).

Hasil pengamatan pada tabel 7 terlihat bahwa tidak satu pun isolat bakteri proteolitik dari limbah tahu, yang menghasilkan enzim urease sehingga tidak mampu menghidrolisis urea dan tidak terjadi perubahan warna medium.

## **G. Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui adanya enzim katalase yang dihasilkan oleh bakteri. Katalase adalah enzim yang dapat mendegradasi  $H_2O_2$  menjadi oksigen dan air. Uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas (Reynolds, 2004).

Hasil pengamatan untuk uji ini sesuai pada tabel 7 yaitu terdapat 14 isolat yang mampu membentuk gelembung gas setelah direaksikan dengan  $H_2O_2$  3%, yang berarti dapat mendegradasi  $H_2O_2$ .

## **H. Uji Oksidase**

Uji oksidase bertujuan untuk mendeteksi bakteri yang mampu menghasilkan enzim oksidase sitokrom C yang terlibat dalam reduksi oksigen pada akhir rantai transport elektron. Tes oksidase positif menghasilkan warna biru atau ungu dalam waktu 10 detik pada kertas saring yang telah dioles dengan



biakan dan ditambah larutan tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorida 1% (atau kosalat) (Reynolds, 2004).

Hasil pengamatan uji oksidase berdasrakan tabel 7 memperlihatkan bahwa 13 isolat menghasilkan enzim oksidase dengan terjadinya perubahan warna kertas saring menjadi biru tua. Dan 5 isolat menunjukkan hasil negatif yaitu P7a, P10, C1a, C6a, dan C12a.

### **I. Uji Gelatinase**

Uji gelatinase digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim gelatinase. Gelatin adalah protein yang berasal dari kolagen. Molekul gelatin berukuran besar sehingga diperlukan eksoenzim gelatinase yang akan mengubah gelatin menjadi polipeptida dan kemudian mendegradasinya sebagai asam amino yang dapat digunakan oleh sel. Medium gelatin biasanya akan memadat pada suhu dibawah suhu kamar (di bawah 25°C), sehingga bakteri yang mampu menghasilkan enzim gelatinase akan membuat medium gelatin menjadi cair pada suhu tersebut (Reynolds, 2004).

Hasil pengamatan pada tabel 7 menunjukkan bahwa ada 14 isolat yang positif terhadap uji gelatin, berarti mampu mencairkan gelatin, dan 4 isolat lainnya terlihat negatif, yaitu medium gelatin tetap memadat pada suhu di bawah 25°C.

### **J. Uji Fermentasi Karbohidrat**

Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu memfermentasikan karbohidrat. Pada uji ini digunakan 4 macam gula yaitu glukosa, laktosa, sukrosa, dan maltosa. Hasil positif diamati dengan terjadinya

perubahan warna pada media tersebut yakni berubah menjadi warna kuning, artinya bakteri membentuk asam dari fermentasi gula tersebut (Lay, 1994).

Hasil pengamatan pada tabel 7 diperoleh bahwa semua isolat mampu memfermentasi glukosa dan maltosa, ditandai dengan warna medium yang berubah menjadi kuning. Hanya isolat dengan kode C6a yang mampu memfermentasi laktosa. 3 isolat tidak mampu memfermentasi sukrosa yaitu C7, C11, dan C14.

Identifikasi dari 18 bakteri proteolitik dilakukan dengan cara mencocokkan hasil uji morfologi dan uji aktivitas biokimia 18 bakteri proteolitik dengan tabel uji morfologi dan uji aktivitas biokimia bakteri yang terdapat pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Dari hasil identifikasi ke 18 isolat bakteri proteolitik (tabel 5, 6, dan 7) diperoleh bahwa 10 isolat dengan kode P1, P3, P6, P7a, P10, C6a, C8, C11, C12b, dan C14 dapat digolongkan ke dalam genus *Bacillus*, karena memiliki karakter yang sama yaitu termasuk Gram positif, sel berbentuk batang, menghasilkan spora, bersifat motil, menunjukkan hasil positif terhadap uji fermentasi asam, katalase, serta hasil negatif terhadap uji sitrat, urea, gas, H<sub>2</sub>S, dan indol (Holt, J.G., et al, 1994). Selanjutnya 6 isolat dengan kode P2a, P2b, P5, C1b, C5, dan C7 digolongkan ke dalam genus *Aeromonas*, karena memiliki kesamaan karakter yaitu merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, menunjukkan hasil positif terhadap fermentasi asam dan oksidase, hasil negatif terhadap indol, gas, H<sub>2</sub>S, urea, dan sitrat (Holt, J.G., et al, 1994).

Tabel 7. Hasil Pengamatan Uji Biokimia Isolat Bakteri Proteolitik

Kode Isolat	UJI BIOKIMIA														Keterangan (Genus Bakteri)		
	TSIA				SIM Agar		MR	VP	Sitrat	Urea	Kat	Oks	Gel	Fermentasi Karbohidrat			
	Slant	Butt	Gas	H <sub>2</sub> S	Indol	Motil								Glu		Lak	Suk
P1	Asam	Asam	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	Bacillus	
P2a	Asam	Asam	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Aeromonas	
P2b	Asam	Asam	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	Aeromonas	
P3	Asam	Asam	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	
P5	Asam	Asam	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	Aeromonas	
P6	Asam	Asam	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	
P7a	Asam	Asam	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	Bacillus	
P10	Asam	Asam	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	
C1a	Asam	Asam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	Yersinia	
C1b	Asam	Asam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Aeromonas	
C5	Asam	Asam	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Aeromonas	
C6a	Asam	Asam	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	
C7	Basa	Asam	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	Aeromonas	
C8	Asam	Asam	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	
C11	Basa	Asam	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	
C12a	Asam	Asam	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Edwardsiella	
C12b	Asam	Asam	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	
C14	Basa	Asam	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	Bacillus	

Keterangan: TSIA = Triple Iron Sugar Agar, SIM Agar = Sulfite Indol Motility Agar, MR = Methyl Red, VP = Voges Proskauer, Kat = Katalase, Oks = Oksidase, Gel = Gelatinase, Glu = Glukosa, Lak = Laktosa, Suk = Sukrosa, Mal = Maltosa.

+ = hasil uji positif; - = hasil uji negatif; Identifikasi bakteri dilakukan dengan berpedoman pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al, 1994).

Isolat dengan kode C1a digolongkan ke dalam genus *Yersinia* yaitu merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, bersifat non motil, memfermentasi asam, hasil negatif terhadap uji sitrat, urea, indol, gas, H<sub>2</sub>S, katalase dan oksidase (Holt, J.G., et al, 1994). Dan isolat dengan kode C12a tergolong ke dalam genus *Edwardsiella* yaitu bakteri Gram negatif berbentuk batang, bersifat motil, menunjukkan hasil positif terhadap fermentasi karbohidrat (kecuali laktosa), katalase, dan gelatin, hasil negatif terhadap uji MR-VP, gas, H<sub>2</sub>S, sitrat, urea, indol, dan oksidase (Holt, J.G., et al, 1994).

Hasil penelitian diperoleh 4 genus bakteri proteolitik yang diisolasi dari limbah tahu, yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi protein, yaitu bakteri Gram positif berbentuk batang yang tergolong genus *Bacillus* (isolat dengan kode P1, P3, P6, P7a, P10, C6a, C8, C11, C12b, dan C14); bakteri Gram negatif berbentuk batang yang tergolong genus *Aeromonas* (isolat dengan kode P2a, P2b, P5, C1b, C5, dan C7), genus *Yersinia* (isolat dengan kode C1a), dan genus *Edwardsiella* (isolat dengan kode C12a).

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Hasil isolasi bakteri proteolitik dari limbah tahu diperoleh 18 isolat yang memiliki kemampuan mendegradasi protein
- Hasil identifikasi dari 18 bakteri proteolitik diperoleh empat genus bakteri, yaitu genus *Bacillus* (isolat dengan kode P1, P3, P6, P7a, P10, C6a, C8, C11, C12b, dan C14), genus *Aeromonas* (isolat dengan kode P2a, P2b, P5, C1b, C5, dan C7), genus *Yersinia* (isolat dengan kode C1a) dan genus *Edwardsiella* (isolat dengan kode C12a).

#### V.2. Saran

Diharapkan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui spesies dari genus bakteri yang diperoleh.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bahri, S., 2006. **Pemanfaatan Tumbuhan Air (Azolla) Untuk Pengolahan Limbah Cair Industri Tahu Di Desa Bandarjaya Kecamatan Terbanggi Besar Lampung Tengah**. LAPTUNILAPP.  
<http://www.library.gunadarma.ac.id> (diakses 03 Januari 2008)
- Bennet, J.W. dan M.A Klick. 1992. **Aspergillus (Biology and Industrial Application)**. Amerika: USA Inc  
<http://www.unej.ac.id/fakultas/mipa/skripsi/biologi/mu'jizah97.pdf>  
(diakses 05 Februari 2008)
- Buckle, K.A.,1985. **Ilmu Pangan**. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Cahyana, G.H., 2006. **Bahan Bakar Minyak Susut, Bahan Bakar Tahu**.  
<http://gedehace.blogspot.com/2006/05/bbm-susut-bb-tahu.html> (diakses 20 Februari 2008)
- Cappucino, J.G., Sherman, N. 1983. **Microbiology: A Laboratory Manual**. New York: Addison-Wesley Publishing company.
- Damayanti, A., Joni H., Ali M., 2004. **Analisis Resiko Lingkungan Dari Pengolahan Limbah Pabrik Tahu Dengan Kayu Apu (*Pistia stratiotes L.*)** Jurnal Purifikasi, Vol.5, No.4: 151-156. Surabaya.  
[http://www.geocities.com/masduqi5/publikasi/ar1\\_limbah\\_tahu.pdf](http://www.geocities.com/masduqi5/publikasi/ar1_limbah_tahu.pdf)  
(diakses 05 Februari 2008)
- Depkes, 2007. **Upaya Kesehatan Kerja Bagi Perajin (Kulit, Mebel, Aki Bekas, Tahu & Tempe, Batik** <http://www.depkes.go.id> (diakses 03 Januari 2008)
- Dewanto, E., 2007. **Pengolahan Limbah Tapioka Menjadi Biogas (Energi Alternatif) Melalui Penerapan Teknologi Bioproses**. Purwokerto.  
<http://akademik.unsoed.ac.id/cmsfak/UserFiles/File/Proposal%20pengolahan%20limbah%20lemlit.doc> (diakses 05 Februari 2008)
- Digilib, 2005. **Bahan Alternatif Pakan Dari Hasil Samping Industri Pangan**. Departemen Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia.  
<http://digilib.ampl.or.id/detail/detail.php> (diakses 03 Januari 2008)
- Durham, D.R., D.B. Stewart, and E.J. Stellwag. 1987. **Novel alkaline and heat stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain GX6638**. *J. Bacterial*.169(6):2762- 2768.



- Edwards, P.R., 2008. **Edwardsiella**. <http://www.whonamedit.com> (diakses 25 September 2008)
- EMDI dan BAPEDAL. 1994. **Limbah Cair Berbagai Industri Di Indonesia**:. Project of the Ministry for the Environment, Republic of Indonesia and Dalhousie University, Canada. <http://akademik.unsoed.ac.id> (diakses 05 Februari 2008)
- Fardiaz, Srikandi. 1993. **Analisis Mikrobiologi Pangan**. PT RajaGrafindo Persada. Jakarta.
- Holt, J. G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. & Williams, S.T. 1994. **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology**. The William and Wilkins Co. Baltimore.
- Jenie, B.S.L., dan Winiati P.R. 1993. **Penanganan Limbah industri Pangan**. Kanisius. Bandung. [http://tumoutou.net/702\\_07134/sulistijorini.html](http://tumoutou.net/702_07134/sulistijorini.html) (diakses 05 Februari 2008)
- Koswara, S., 2008. **Nilai Gizi, Pengawetan Dan Pengolahan Tahu**. <http://Ebookpangan.com> (diakses 19 Oktober 2008)
- Lay, B.W., 1994. **Analisis Mikroba Di Laboratorium**. PT RajaGrafindo Persada. Jakarta.
- Menlh, 2008. **Hasil Samping Tahu Tempe**. Kementerian Lingkungan Hidup. <http://www.menlh.go.id/usaha-kecil> (diakses 05 Februari 2008)
- Moon, S.H. dan S.J. Parulekar. 1993. **Some observation on protease producing in continuous suspension cultures of Bacillus firmus**. Biotech. Bioeng. 41:43-54.
- Nuraini, Y., Melati, P., 2003. **Pengaruh Pemberian Kombinasi Limbah Tahu, Pupuk Kandang Dan Pupuk Hijau Dalam Peningkatan Hara N, P, K Dan Pertumbuhan Jagung (Zea Mays L.) Pada Entisol Di Kecamatan Wajak Kabupaten Malang**. <http://fp.brawijaya.ac.id> (diakses 20 Februari 2008)
- Nurhasan, P., 1991. **Penanganan air Limbah Pabrik Tahu**. Yayasan Bina Karya Lestari (Bintari). <http://www.menlh.go.id> (diakses 03 September 2007)
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi 2**. UI Press. Jakarta.



Poernomo, A. T., Djoko A.P., 2003. Uji aktivitas "crude" enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 hasil fermentasi curah. Majalah Farmasi Airlangga, Vol.3 No.3. Surabaya.  
<http://www.journal.unair.ac.id/login/jurnal/filer/MFA-3-3-07.pdf>  
(diakses 05 Februari 2008)

Reynolds, Jackie. 2004. **Urea Hydrolysis**. Richland College.  
[http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/lab\\_manual/TOC.html](http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/lab_manual/TOC.html)  
(diakses 25 September 2008)

Sugiharto. 1987. **Dasar-dasar Pengelolaan Air Limbah**. UI Press. Jakarta.

Sulistijorini, 2003. **Pemanfaatan "Sludge" Industri Pangan sebagai Upaya Pengelolaan Lingkungan**. Makalah Falsafah Sains (PPS 702). Program Pasca Sarjana / S3 Institut Pertanian Bogor.  
[http://tumoutou.net/702\\_07134/sulistijorini.html](http://tumoutou.net/702_07134/sulistijorini.html)  
(diakses 05 Januari 2008)

Sulistyawaty, A.R., Irma, T., 2005. **Mereka yang Menikmati Energi Alternatif**.  
<http://www.mail-archive.com/dharmajala.html> (diakses 05 Januari 2008)

Umar, H., 2007. **Laporan Ko-Asistensi Mikrobiologi *Salmonella sp* dan *Candida sp*** Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala.

Volk, W.A., Wheeler, M.F. 1984. **Mikrobiologi Dasar. I**. Terjemahan oleh Soenarto Adisoemarto (Ed.). 1993. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Ward, O.P. 1985. **Proteolytic enzymes**. In Young, M.M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology: The principles, Applications, and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**. Vol. 3. Pergamon Press. Oxford.

Wikipedia, 2007. **Bakteri Proteolitik**. <http://id.wikipedia.org> (diakses 03 Januari 2008)

\_\_\_\_\_, 2007. **Limbah**. <http://id.wikipedia.org> (diakses 03 Januari 2008)

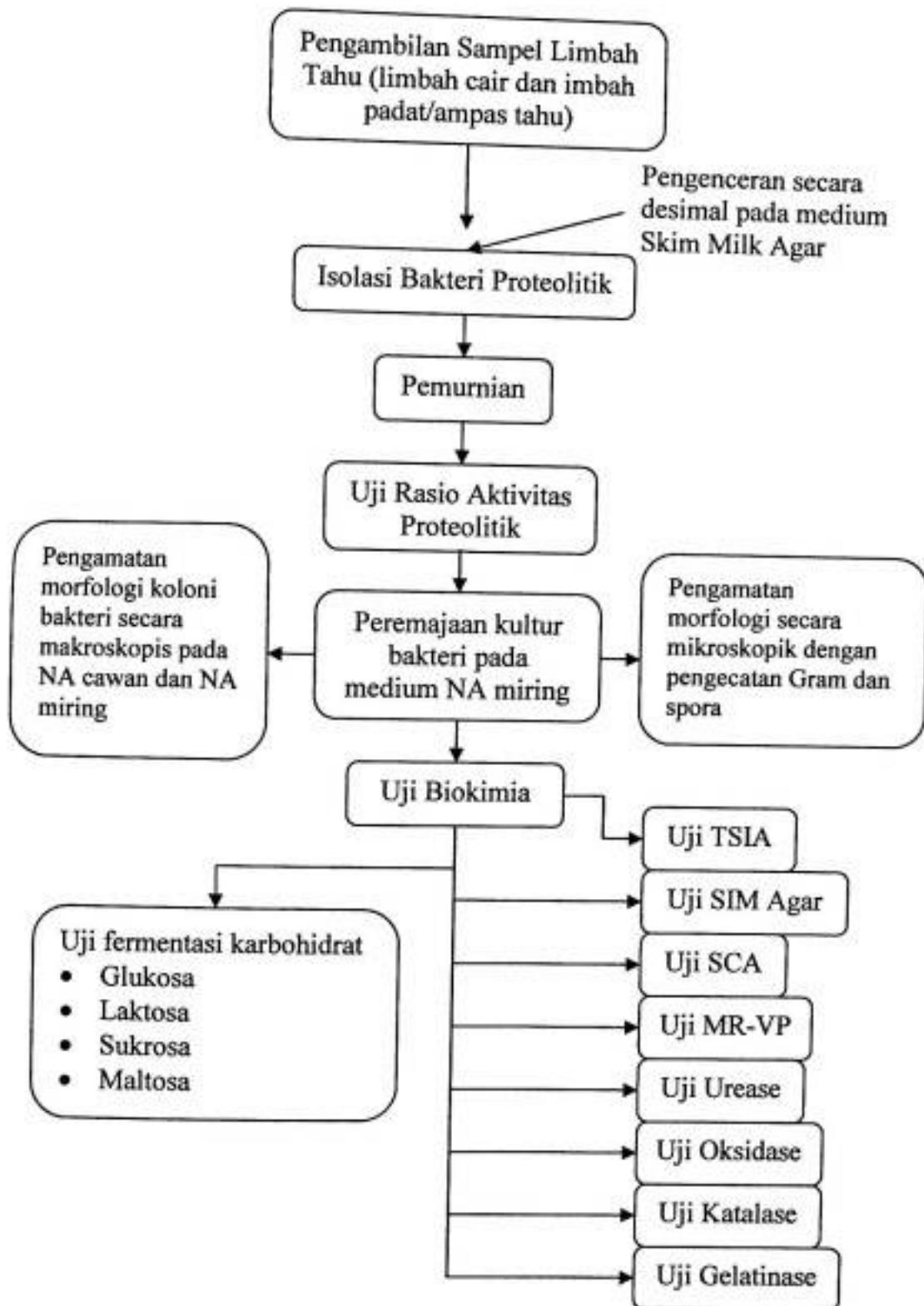
\_\_\_\_\_, 2008. **Aeromonas**. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aeromonas> (diakses 25 September 2008)

Zerdani, I., M. Faid and A. Malki, 2004. **Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus sp***. In Morocco. Afr. J. Biotechnol., 3: 67-70.

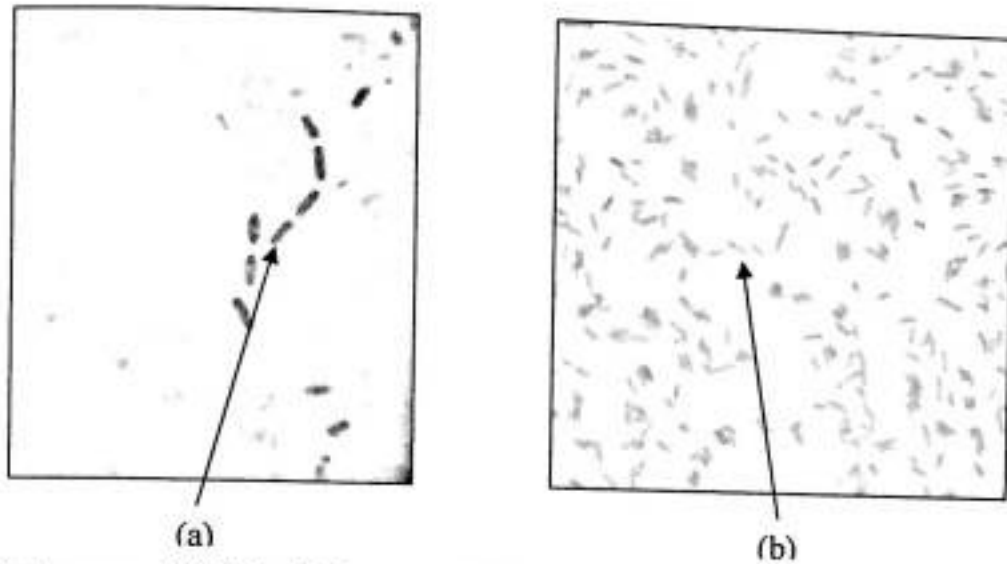


# LAMPIRAN

## LAMPIRAN 1. SKEMA KERJA

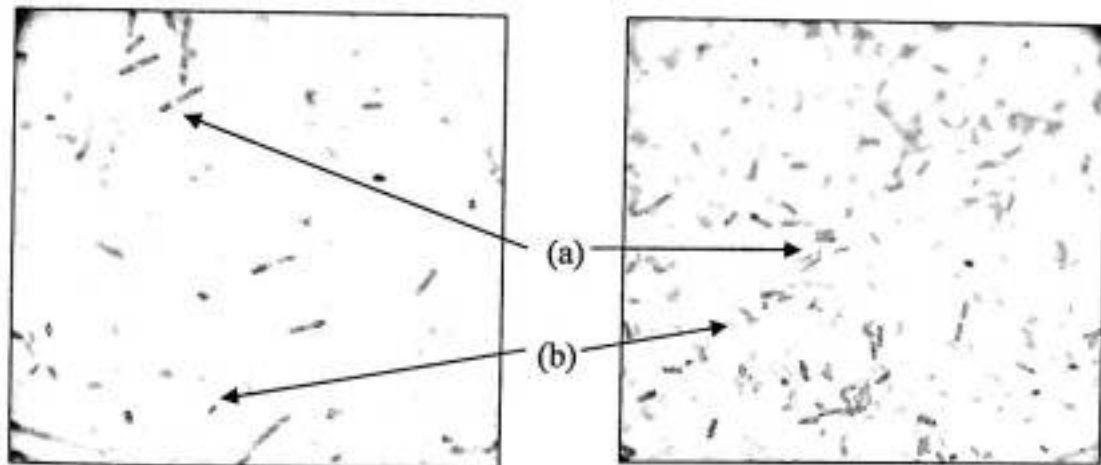


## LAMPIRAN 2. HASIL PENGECATAN GRAM



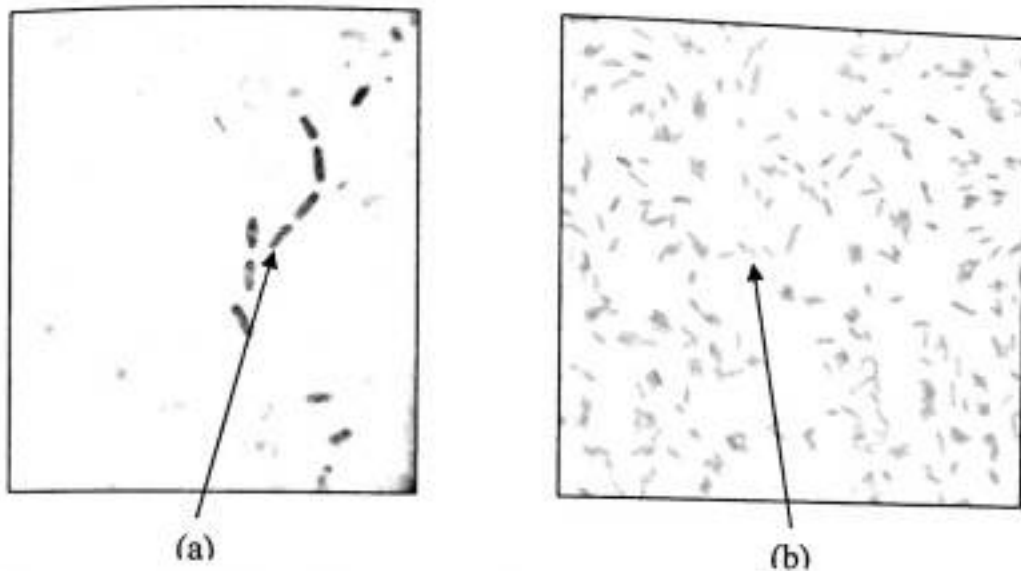
Keterangan: (a) Bakteri Gram positif (*Bacillus sp.*), (b) Bakteri Gram negatif (*Yersinia sp.*) (Pengamatan mikroskopik)

## LAMPIRAN 3. HASIL PENGECATAN SPORA



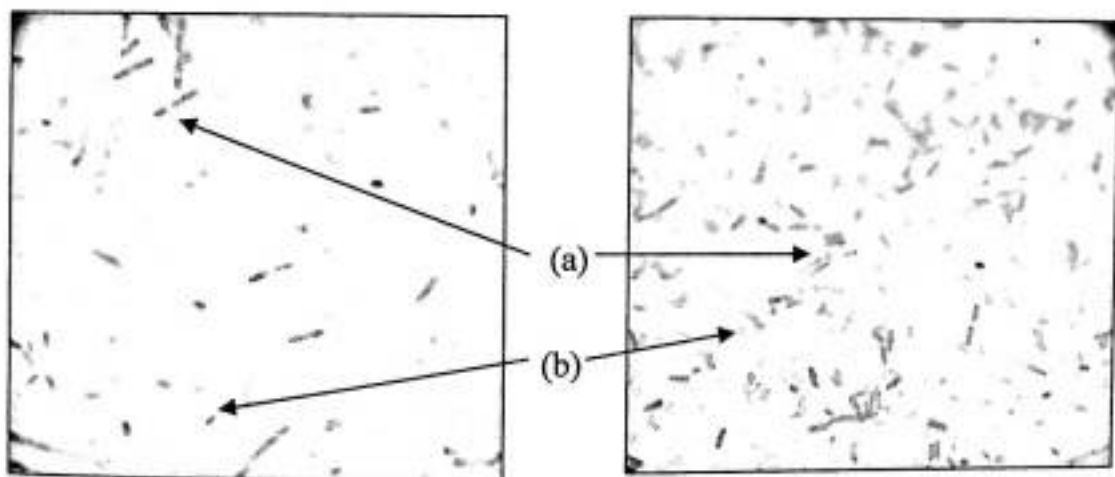
Keterangan: Isolat bakteri dari genus *Bacillus*; (a) sel vegetatif (berwarna merah), (b) spora yang terlepas (berwarna hijau) (Pengamatan mikroskopik)

## LAMPIRAN 2. HASIL PENGECATAN GRAM



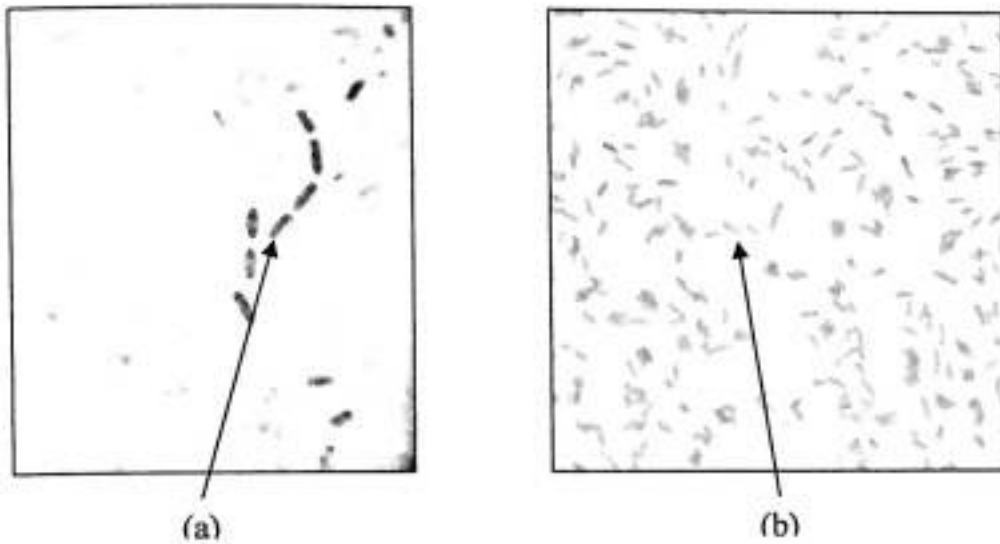
Keterangan: (a) Bakteri Gram positif (*Bacillus sp.*), (b) Bakteri Gram negatif (*Yersinia sp.*) (Pengamatan mikroskopik)

## LAMPIRAN 3. HASIL PENGECATAN SPORA



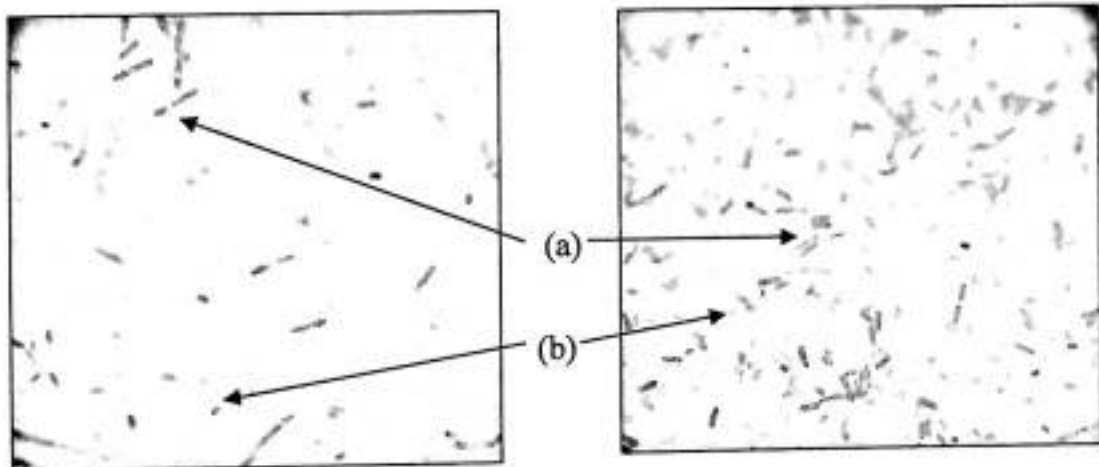
Keterangan: Isolat bakteri dari genus *Bacillus*; (a) sel vegetatif (berwarna merah), (b) spora yang terlepas (berwarna hijau) (Pengamatan mikroskopik)

## LAMPIRAN 2. HASIL PENGECATAN GRAM



Keterangan: (a) Bakteri Gram positif (*Bacillus sp.*), (b) Bakteri Gram negatif (*Yersinia sp.*) (Pengamatan mikroskopik)

## LAMPIRAN 3. HASIL PENGECATAN SPORA



Keterangan: Isolat bakteri dari genus *Bacillus*; (a) sel vegetatif (berwarna merah), (b) spora yang terlepas (berwarna hijau) (Pengamatan mikroskopik)