

**ISOLASI BAKTERI PENDEGRADASI HIDROKARBON SEBAGAI
PENGHASIL ENZIM LIPASE DAN PROTEASE DARI TANAH
TERCEMAR MINYAK BUMI DI KECAMATAN WONOCOLO
KABUPATEN BOJONEGORO**

SKRIPSI

**Oleh:
OKTAFIA LAILUL KUSNAA
NIM. 15620029**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**ISOLASI BAKTERI PENDEGRADASI HIDROKARBON SEBAGAI
PENGHASIL ENZIM LIPASE DAN PROTEASE DARI TANAH
TERCEMAR MINYAK BUMI DI KECAMATAN WONOCOLO
KABUPATEN BOJONEGORO**

SKRIPSI

**Oleh:
OKTAFIA LAILUL KUSNAA
NIM. 15620029**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**ISOLASI BAKTERI PENDEGRADASI HIDROKARBON
SEBAGAI PENGHASIL ENZIM LIPASE DAN PROTEASE DARI
TANAH TERCEMAR MINYAK BUMI DI KECAMATAN
WONOCOLO KABUPATEN BOJONEGORO**

SKRIPSI

Oleh:
OKTAFIA LAILUL KUSNAA
NIM. 15620029

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal : 16 Juni 2022

Pemimbing I,



Prilya Dewi Fitriyasari, M.Sc
NIDT. 19900428201608012062

Pembimbing II,



Oky Bagas Prasetya.M.Pd.I
NIDT.19890113201802011244

Mengetahui
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

**ISOLASI BAKTERI PENDEGRADASI HIDROKARBON
SEBAGAI PENGHASIL ENZIM LIPASE DAN PROTEASE DARI
TANAH TERCEMAR MINYAK BUMI DI KECAMATAN
WONOCOLO KABUPATEN BOJONEGORO**

SKRIPSI





Oleh:

OKTAFIA LAILUL KUSNAA

NIM. 15620029

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

Tanggal: 16 Juni 2022

Penguji Utama	<u>Prof. Dr. Hj. Ulfah Utami</u> NIP.19650509 199903 2 002	
Ketua Penguji	<u>Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc</u> NIP. 19741018 200312 2 002	
Sekretaris Penguji	<u>Prilya Dewi Fitriarsari, M.Sc</u> NIDT. 19900428 2016080 1 2062	
Anggota Penguji	<u>Okny Bagas Prasetyo, M.Pd.I</u> NIDT. 19890113201802011244	

Mengesahkan,

Ketua Program Studi Biologi


Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya yang sederhana ini penulis persembahkan kepada :
Beliau kedua orang tua yang penuh kesabaran dan semangat luar biasa dalam mendampingi dan memberikan semangat kepada saya selama ini adalah Ayah saya tercinta (Sugianto) dan bidadari surga saya (Aspiyah) yang selalu memanjatkan doa dalam setiap derai nafas hanya untuk putra-putrinya.

Kepada adikku tercinta (Mohammad Fajar Fauzi Dwianto) semoga bisa mengambil yang baik dari apa yang Allah titipkan kepada saya dan juga terimakasih telah memberikan support dan inspirasi bagi kehidupan saya selama hampir 25 tahun ini. Tak lupa karya ini juga saya persembahkan untuk calon imam dan anak-anak ku kelak semoga apa yang sekarang ibu perjuangkan dapat menjadi inspirasi bagi keluarga kita.

Aamiinn.

MOTTO

خير الناس أنفعهم للناس

“Khairunnas anfa’uhum linnas”

Sebaik baik manusia adalah yang bermanfaat
bagi manusia lainnya

Jadikan Kesalahanmu sebagai Guru Kehidupan
untuk Menjadi yang Lebih Baik Lagi

Buatlah dirimu serendah mungkin
hingga tidak ada yang bisa merendahkanmu
Buatlah dirimu serendah mungkin sekali lagi
Hingga tidak ada lagi kesombongan di hatimu

(Sh, 2022)

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:
Nama : Oktafia Lailul Kusnaa
NIM : 15620029
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Pendegradasi
Hidrokarbon sebagai Penghasil Enzim
Lipase dan Protease dari Tanah
Tercemar Minyak Bumi di Kecamatan
Wonocolo Kabupaten Bojonegoro

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 24 Juni 2022

Yang membuat pernyataan,



Oktafia Lailul Kusnaa
NIM. 15620029

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon sebagai Penghasil Enzim Lipase dan Protease dari Tanah Tercemar Minyak Bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro

Oktafia Lailul Kusnaa, Prilya Dewi Fitriasari, Oky Bagas Prasetyo

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan sumber daya alam baik di darat maupun di laut. Salah satu contoh sumber daya alam yang terdapat di Indonesia adalah pertambangan minyak bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro. Adanya aktivitas pengeboran mengakibatkan tanah dilokasi pertambangan tercemar, sehingga menimbulkan kerusakan ekosistem dan mikroorganisme yang terdapat pada tanah tersebut. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mendapatkan bakteri yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim lipase dan protease. Metode penelitian yang digunakan yaitu jenis penelitian deskriptif eksploratif untuk memberi gambaran mengenai bakteri yang berasal dari tanah tercemar minyak bumi di Kecamatan Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro. Jenis deskriptif eksploratif ini meliputi keberadaan bakteri pendegradasi hidrokarbon yang terdapat pada tanah tercemar minyak bumi yang meliputi karakteristik makroskopik, mikroskopis analisis uji biokimia, potensi bakteri penghasil enzim lipase dan protease. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 5 isolat bakteri dengan kemampuan 1 isolat terpilih yaitu TPY 1 yang diduga sebagai bakteri pendegradasi hidrokarbon penghasil enzim lipase dan protease.

Kata kunci : Bakteri pendegradasi hidrokarbon, enzim lipase, enzim protease.

Isolation of Hydrocarbon Degrading Bacteria as Producers of Lipase and Protease Enzymes from Petroleum Polluted Soil in Wonocolo District, Bojonegoro Regency

Oktafia Lailul Kusnaa, Prilya Dewi Fitriasari, Oky Bagus Prasetyo

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang

ABSTRACT

Indonesia is a country rich in natural resources both on land and at sea. One example of natural resources found in Indonesia is petroleum mining in Wonocolo District, Bojonegoro Regency. The existence of drilling activities resulted in polluted soil at the mining location, causing damage to the ecosystem and microorganisms contained in the soil. The purpose of this study was to obtain bacteria that have the potential to degrade hydrocarbons as a producer of lipase and protease enzymes. The research method used is descriptive exploratory research to provide an overview of bacteria originating from oil-contaminated soil in Wonocolo District, Bojonegoro Regency. This exploratory descriptive type includes the presence of hydrocarbon-degrading bacteria found in oil-contaminated soil which includes macroscopic characteristics, microscopic analysis of biochemical tests, the potential of bacteria producing lipase and protease enzymes. The results showed that there were 5 bacterial isolates with the ability of 1 selected isolate, namely TPY 1 which was suspected as a hydrocarbon-degrading bacteria producing lipase and protease enzymes.

Keywords: Hydrocarbon degrading bacteria, lipase enzymes, protease enzymes

المخلص

عزل البكتيريا المهينة للهيدروكربون كمنتجين للليباز وإنزيمات البروتياز من التربة الملوثة بالبترول في منطقة ونوكولو ، بوجونيغورو ريجنسي

اكتا فياليل الحسني، فريليا دوي فتريا سري، اوكي بكوس فرستيو

برنامج دراسة الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ، مولانا مالك إبراهيم الدولة الإسلامية جامعة مالانج

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المهينة للهيدروكربون ، إنزيمات الليباز ، إنزيمات البروتياز

إندونيسيا بلد غني بالموارد الطبيعية في البر والبحر. أحد الأمثلة على الموارد الطبيعية الموجودة في إندونيسيا هو تعدين البترول في مقاطعة ونوكولو ، بوجونيغورو ريجنسي. أدى وجود أنشطة الحفر إلى تلوث التربة في موقع التعدين ، مما تسبب في تلف النظام البيئي والكانتات الحية الدقيقة الموجودة في التربة. كان الغرض من هذه الدراسة هو الحصول على البكتيريا التي لديها القدرة على تحلل الهيدروكربونات كمنتج للليباز وإنزيمات البروتياز. طريقة البحث المستخدمة هي البحث الاستكشافي الوصفي لتقديم لمحة عامة عن البكتيريا التي تنشأ من التربة الملوثة بالزيت في منطقة ونوكولو ، بوجونيغورو ريجنسي. يشتمل هذا النوع الوصفي الاستكشافي على وجود بكتيريا مهينة للهيدروكربون الموجودة في التربة الملوثة بالزيت والتي تشمل الخصائص العيانية والتحليل المجهرى للاختبارات الكيميائية الحيوية وإمكانية إنتاج البكتيريا للليباز وإنزيمات البروتياز. أظهرت النتائج وجود ٥ عزلات بكتيرية ذات قدرة عزلة واحدة مختارة وهي ١TPY والتي تم الاشتباه في أنها بكتريا مهينة للهيدروكربونات منتجة للليباز وإنزيمات البروتياز.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan pada kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Berkah, Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan Skripsi ini dengan baik. Selanjutnya penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini kepada:

1. Bapak Prof. Dr. M. Zainuddin, M.A selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Evika Sandi Savitri selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Prilya Dewi Fitriyani M.Sc selaku dosen pembimbing yang penuh kesabaran membimbing penulis sampai terselesainya skripsi ini.
5. Bapak Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I, selaku dosen pembimbing integrasi sains dan agama yang telah memberikan waktu, arahan dan pandangan tentang sains dari perspektif Islam.
6. Ibu Prof. Dr. Hj. Ulfah Utami dan Ibu Nyonita Tyas Punjungsari M.Sc, selaku dosen penguji yang memberikan kritik dan saran dalam pengerjaan dan penyusunan hingga terselesaikannya skripsi ini.
7. Ibu Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si selaku dosen wali yang telah banyak memberikan saran dan motivasi selama perkuliahan.
8. Bapak/Ibu dosen, laboran dan staff administrasi Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmunya selama studi.
9. Kedua orang tua penulis, serta keluarga yang selalu memberikan doa dan restunya, semangat serta nasihat kepada penulis dalam menuntut ilmu.
10. Sahabat- sahabatku tercinta (dek Ria, Ivada, mbak Ila, Nova, Chusnul, Sakho, Miftah) dan teman-teman kamar 25 yang selama ini telah setia menjadi orang-orang yang selalu saya repotkan selama hidup di Malang.

11. Teman-teman seperjuangan Biologi GENETIST 2015, yang telah menemani perjuangan selama saya mengemban ilmu di sini.
12. Teman-teman Pondok Pesantren Sabilurrosyad.
13. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi.

Amin Ya Rabbal Alamin.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb

Malang, 26 Juni 2022

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
المخلص.....	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Batasan Masalah.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Tanah.....	8
2.2 Minyak Bumi.....	8
2.3 Pencemaran Tanah oleh Minyak Bumi.....	9
2.4 Bakteri.....	11
2.5 Morfologi Bakteri.....	13
2.5.1 Ukuran Bakteri	13
2.5.2 Bentuk Bakteri.....	13
2.6 Isolasi Bakteri.....	15
2.7 Karakterisasi Bakteri.....	19
2.7.1 Pewarnaan Bakteri	20

2.7.2 Uji Biokimia	24
2.8 Enzim	26
2.8.1 Enzim sebagai biokatalis	27
2.8.2 Enzim Lipase	28
2.8.3 Enzim Protease	30
2.9 Pertambangan Minyak Bumi Wonocolo, Bojonegoro.....	31
BAB III METODE PENELITIAN	33
3.1 Rancangan Penelitian.....	33
3.2 Variabel Penelitian.....	33
3.3 Waktu dan Tempat	33
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	33
3.4.1 Alat.....	33
3.4.2 Bahan	34
3.5 Cara Kerja.....	34
3.5.1 Pengambilan Sampel.....	34
3.5.2 Pembuatan Medium	34
3.5.3 Isolasi Bakteri.....	35
3.5.4 Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon	36
3.5.5 Karakterisasi Bakteri.....	36
3.5.6 Uji Aktivitas Biokimia.....	38
3.5.7 Bakteri Penghasil Enzim.....	38
3.6 Analisa Data	39
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Tanah Tercemar Minyak Bumi Wonocolo	40
4.2 Seleksi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon	42

4.3	Karakteristik Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon	44
4.3.1	Karakteristik Morfologi secara Makroskopik	44
4.3.2	Karakteristik Morfologi Bakteri secara Mikroskopik.....	45
4.3.3	Karakteristik Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon secara Biokimia	47
4.4	Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon sebagai Penghasil Enzim	49
4.4.1	Potensi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Penghasil Enzim Lipase ...	49
4.4.2	Potensi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Penghasil Enzim Protease	51
BAB V PENUTUP		55
5.1	Kesimpulan.....	55
5.2	Saran	55
DAFTAR PUSTAKA		56
LAMPIRAN.....		64

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tipe Morfologi Bakteri.....	14
Gambar 2.2 Bentuk pertumbuhan bakteri pada agar miring	19
Gambar 2.3 Bentuk morfologi koloni bakteri	20
Gambar 2.4 Prosedur pewarnaan Gram	23
Gambar 2.5 Proses Sporulasi.....	24
Gambar 4.1 Isolat bakteri pendegrasi hidrokarbon TPY 1	42
Gambar 4.2 Karakterisasi makroskopik TPY 1.....	44
Gambar 4.3 Pewarnaan Gram dan endospora TPY 1	45
Gambar 4.4 Bakteri TPY 1 penghasil enzim Lipase	50
Gambar 4.5 Bakteri TPY 1 penghasil enzim protease	52

DAFTAR TABEL

Table 4.1. Hasil isolasi bakteri dari medai BHMS	41
Table 4.2. Hasil uji biokimia isolat TPY 1.....	47

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan sumber daya alam baik di darat maupun di laut. Salah satu contoh sumber daya alam yang terdapat di Indonesia adalah minyak bumi. Hal ini dibuktikan dengan banyaknya perusahaan yang berasal dari dalam negeri maupun luar negeri untuk melakukan penambangan minyak bumi. Negara-negara produsen minyak bumi terbesar bila dikombinasikan hampir memenuhi 45% dari total produksi minyak mentah dunia adalah Amerika Serikat, Arab Saudi, Russia, Kanada, dan China. Indonesia berada pada peringkat ke-24 sebagai produsen minyak bumi dunia dengan produksi minyak bumi 824.000 barrel per hari (BP Statistical Review of World Energy, 2016). Minyak bumi terdiri dari beberapa unsur C, N, S, serta unsur logam seperti Zn, Cu, Ni, Hg, Al, Cd, Pb, Cr, dan lain sebagainya (Rahayu *et al.* 2019). Umumnya minyak bumi terdiri dari beberapa senyawa diantaranya adalah hidrokarbon sikloalkana, alifatik, senyawa aromatic, dan hidrokarbon poli aromatic, dimana senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa organik dengan susunan rantai karbon. Kompleksnya susunan rantai karbon senyawa mengakibatkan sulit untuk terurai didalam tanah sehingga mengakibatkan perubahan pada tanah dan memicu terjadinya pencemaran (Munawar, 2012).

Minyak bumi dihasilkan dari aktivitas pengeboran baik dari daratan maupun laut. Aktivitas pengeboran menimbulkan permasalahan baru terhadap lingkungan baik tanah, udara, maupun air. Kontaminasi hidrokarbon pada tanah disekitar lokasi penambangan mengakibatkan kandungan senyawa hidrokarbon sangat tinggi, sehingga kesuburan tanah semakin berkurang (Jain *et al.* 2011). Menurut Alkatiri (2017), bahwa pencemaran minyak bumi dapat berasal dari tumpahan selama kegiatan pengeboran, kebocoran sistem penyimpanan, produksi, pembuangan limbah dari kegiatan industri, rembesan dari sumbernya, pengilangan dan transportasi. Hal ini menyebabkan ekosistem yang terdapat pada lingkungan sekitar eksplorasi minyak menjadi terancam bahaya, karena minyak bumi mengandung salah satu kontaminan yang sulit diurai yaitu senyawa hidrokarbon.

Tumpahan hidrokarbon ke tanah dan air dapat meracuni flora dan fauna yang hidup di sekitar. Ketika senyawa tersebut mencemari permukaan tanah kemudian terendap menjadi zat beracun yang menyebabkan keracunan pada makhluk hidup, termasuk mikroorganisme yang terdapat pada tanah tersebut. Menurut (Barakwan, 2017) Adanya aktivitas pengeboran minyak bumi mengakibatkan tanah yang berada disekitar lokasi pertambangan memiliki kadar hidrokarbon sebesar 4,35% hingga 12,31. Kadar tersebut melebihi baku mutu (1%) sebagaimana yang terlampir dalam kepmen lingkungan hidup No. 128 Tahun 2003.

Sesungguhnya kerusakan-kerusakan lingkungan yang telah terjadi di muka bumi ini tidak lain telah disebabkan oleh perbuatan tangan-tangan manusia sendiri. Seringkali mereka lebih mementingkan urusan pribadi daripada kemaslahatan umat atau kepedulian terhadap lingkungan. Seperti yang telah dijelaskan dalam QS. Ar-Rum: 41 Allah SWT berfirman :

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ ﴿٤١﴾

Artinya : *Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)* (QS. Ar-Rum : 41)

Berdasarkan ayat di atas, menunjukkan bahwa setiap insan manusia di muka bumi dianjurkan untuk berbuat baik dalam setiap perbuatan yang dilakukan, terutama dalam hal menjaga bumi dan dapat melestarikan alam yang ada di muka bumi ini, di mana manusia dapat mengendalikan dirinya untuk tidak melakukan kerusakan di darat maupun di laut, serta senantiasa menjaga dengan sebaik-baiknya. Menurut Quraish Shihab (2002) dalam tafsir Al Misbah mengartikan ayat ini bahwa kerusakan-kerusakan yang terjadi baik di darat maupun di laut disebabkan karena perbuatan manusia itu sendiri. Allah SWT menghendaki kerusakan-kerusakan tersebut supaya mereka bertaubat dari perbuatan tersebut karena telah mengalami dan merasakan atas apa yang telah mereka perbuat. Allah SWT dapat memberikan bencana kerusakan atau penyakit dari limbah minyak tersebut, khususnya pada pencemaran tanah yang disebabkan oleh tumpahan minyak bumi kepada masyarakat agar mereka taubat dan ingat kembali kepada Allah SWT.

Salah satu sumber mikroba penghasil enzim adalah dari tanah tercemar. Tanah merupakan bagian terluar dari kerak bumi yang terdiri dari tiga fase, yaitu fase padatan, cairan, dan gas. Tanah yang tercemar dapat mengubah tatanan tanah alami dengan berubahnya sifat dasar tanah. Hal ini disebabkan oleh tumpahan atau cecceran dari berbagai kegiatan, seperti kegiatan industri perminyakan, tumpahan solar pada proses pengisian bahan bakar transportasi, dan lain-lain. bakteri tanah yang tercemar dapat mendegradasi hidrokarbon karena kemampuannya yang dapat mengurai dan mengoksidasi hidrokarbon serta menjadikan hidrokarbon sebagai salah satu donor elektronnya (Batubara, 2015).

Bakteri menjalankan fungsi penting di dalam tanah sebagai dekomposer residu organik dari enzim yang disekresikan ke tanah. Setidaknya terdapat empat fungsi utama bakteri di dalam tanah yaitu sebagai dekomposer, bersimbiosis mutualisme dengan tanaman dalam memfiksasi nitrogen, bakteri litotrof dan kemoautotrof dalam tanah berperan penting dalam daur nitrogen dan degradasi polutan, namun bakteri juga bisa bertindak sebagai patogen pada tanaman. Bakteri tanah mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi. Menurut Ariai (2000), bahwa bakteri berpotensi yang memiliki hubungan dengan kemampuan yang dimilikinya seperti amilolitik, proteolitik, lipolitik, antibiosis, selulolitik, dan sebagainya. Potensi ini dapat dimanfaatkan untuk industri pangan, minuman, obat-obatan dan penanganan limbah. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian-penelitian dan pengembangan untuk menemukan dan mengembangkan potensi-potensi bakteri tanah.

Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran lingkungan dan pemborosan energy karena reaksinya tidak membutuhkan energy, bersifat spesifik dan tidak beracun. Enzim telah dimanfaatkan secara luas pada berbagai industri produk pertanian, kimia, industri obat-obatan. Tiga sifat utama dari biokatalisator adalah menaikkan kecepatan reaksi, mempunyai kekukhusan dalam reaksi dan produk serta kontrol kinetik (Akhdia, 2003). Enzim lipase merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan secara alami dapat mengkatalisis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut air. Lipid merupakan senyawa organik hasil dari dehidrogenasi endotermal rangkaian hidrokarbon. Adapun senyawa-senyawa yang termasuk

golongan lipid, diantaranya lemak, fosfolipid, steroid, asam lemak dan turunannya seperti triasilgliserol. Aktifitas dehidrogenase dapat dijadikan parameter untuk mengetahui aktivitas mikroba tanah secara umum. Aktivitas enzim ini sangat peka terhadap lingkungan (Millier *et al.*, 2010).

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Berdasarkan cara hidrolisisnya, protease dibedakan menjadi proteinase dan peptisidase. Proteinase menghidrolisis molekul protein menjadi polipeptida, sedangkan peptidase menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Enzim protease juga digunakan sebagai proses bioremediasi dimana pada saat ini proses bioremediasi telah berkembang pada proses recovery limbah buangan yang berbahaya, yaitu senyawa-senyawa kimia yang sulit untuk didegradasi seperti logam berat, dan petroleum hidrokarbon (Akhdiya, 2003).

Bakteri tanah tidak hanya digunakan dalam bidang pertanian, namun juga telah dieksplorasi potensi-potensi lainnya seperti kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antimikroba. Beberapa penelitian menunjukkan hal tersebut diantaranya isolat bakteri tanah yang dapat menghasilkan antibiotik dan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan spesies *Pseudomonas* (Abdulkadir *et al.*, 2012). Menurut Haripriyatna (2016), dalam penelitiannya melaporkan bahwa dua isolat bakteri indigen hidrokarbon yang didapatkan dari tanah yang tercemar minyak bumi. Kedua bakteri tersebut mampu bertahan pada tanah yang tercemar oleh minyak bumi sehingga dapat digunakan sebagai pendegradasi hidrokarbon minyak bumi. Sama halnya pada penelitian Rahayu *et al.* (2019), dalam jurnalnya menyatakan bahwa didapatkan empat jenis bakteri yang berasal dari tanah tercemar minyak bumi antara lain *Pseudomonas fluorescens-25*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Flavobacterium odoratum* dan *Enterococcus sp.* Isolat tersebut didapatkan dari sampel tanah disekitar lokasi pengeboran minyak bumi di Wonocolo, Bojonegoro. Menurut Sopiah *et al.* (2011), dalam penelitiannya dari hasil identifikasi morfologi dan biokimia bahwa isolat atau konsorsium yang didapatkan dari sampel tanah yang tercemar limbah minyak bumi didapatkan bakteri *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus insolitus* dan *Bacillus marinus*. Keempat bakteri tersebut dapat digunakan sebagai

pendegradasi senyawa hidrokarbon, penghasil enzim lipase, protease dan berpotensi untuk dikembangkan dan diterapkan dalam bioremediasi lahan tercemar minyak bumi. Penelitian Sudrajat (2015), juga mendapatkan hasil penelitian dalam jurnalnya bahwa bakteri yang paling banyak terdapat dalam tanah tercemar minyak bumi yaitu *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.* dan *Pseudomonas sp.* Bakteri tersebut juga menghasilkan enzim lipase yang digunakan sebagai katalisis menghidrolisis senyawa hidrokarbon yang ada pada tanah tercemar minyak bumi.

Mikroorganisme pada suatu lingkungan alami merupakan populasi campuran dari berbagai jenis, baik mikroorganisme pada tanah, air, udara, makanan, maupun yang terdapat pada tubuh hewan maupun tumbuhan (Soeroso, 1999). Hal ini diperlukan dalam pemisahan bakteri guna untuk mengetahui jenis, mempelajari kultural, morfologi, fisiologi, dan karakteristik. Teknik pemisahan inilah yang dinamakan sebagai isolasi. Menurut Singleton dan Sainsbury (2006), menyatakan isolasi bakteri merupakan proses pengambilan bakteri dari medium atau lingkungan asalnya, dan menumbuhkan pada medium buatan sehingga diperoleh biakan atau kultur murni hasil isolate tersebut. Populasi bakteri dapat diisolasi menjadi biakan atau kultur murni, terdiri dari satu jenis bakteri yang dapat dipelajari morfologi, sifat, kemampuan biokimianya. Maka dari itu dalam penelitian ini penting dilakukannya isolasi dan juga karakterisasi bakteri sehingga didapatkan hasil bakteri yang diinginkan oleh peneliti.

Berdasarkan latar belakang di atas maka penulis melakukan penelitian yang berjudul “ Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon sebagai Penghasil Enzim Lipase dan Protease dari Tanah Tercemar Minyak Bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro”. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri pendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim lipase dan protease pada tanah yang tercemar minyak bumi serta sebagai sumber rujukan atau acuan bagi peneliti selanjutnya untuk mengeksplorasi dan menguji potensi bakteri tanah yang tercemar minyak bumi tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana hasil isolasi dan karakterisasi bakteri yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon ?
2. Bagaimana potensi bakteri pendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim lipase dan protease ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mendapatkan isolat dan karakteristik bakteri yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon.
2. Untuk mengetahui potensi bakteri pendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim lipase dan protease.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk menambah data ilmiah mikroorganisme yang berasal dari tanah tercemar minyak bumi di Desa Wonocolo Kabupaten Bojonegoro Jawa Timur.
2. Mendapatkan isolat bakteri yang terdapat pada tanah tercemar minyak bumi di wonocolo.
3. Sebagai sumber rujukan atau acuan bagi peneliti selanjutnya untuk mengeksplorasi potensi bakteri tanah yang tercemar minyak bumi tersebut.

1.5 Batasan Masalah

1. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
2. Sampel yang digunakan berasal dari tanah di area pengangkutan dan pengeboran pada lokasi tambang minyak di Ds, Wonocolo Kec, Wonocolo Kab, Bojonegoro.
3. Karakteristik morfologi secara mikroskopis meliputi:
 - a) Bentuk koloni (dilihat dari bagian atas). Meliput : berbentuk bulat (*circular*), tidak beraturan (*irregular*), berbentuk seperti akar dan menyebar (*rhizoid*).

- b) Warna koloni meliputi : putih, putih kekuningan, kekuningan, kelabu, hampir bening.
 - c) Tepi koloni (dilihat dari bagian atas), meliputi : tepian rata (*entive*), berombak/berlekuk (*lobate*), bergerigi (*serrate*), benang (*flamentous*), keriting (*undulate*).
 - d) Permukaan koloni/elevasi (dilihat dari samping). Meliputi: permukaan koloni datar (*flat*), timbul melengkung (*convex*), timbul datar (*raised*), membukit (*umbonate*).
4. Pengamatan morfologi bakteri secara mikroskopis dilihat dari pewarnaan endospora dan pewarnaan gram.
 5. Analisis biokimia meliputi: Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), uji Katalase dan Uji SIM (*Sulfide Indole Motility*),
 6. Pengamatan potensi bakteri pendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim lipase dan protease.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanah

Tanah merupakan tempat hidup yang paling ideal bagi bakteri, hal ini dikarenakan bakteri telah mengandung bahan organik, anorganik dan mineral yang berlimpah. Setiap elemen tanah memiliki jenis, populasi dan sifat genetik yang berbeda. Keanekaragaman mikroorganisme pada tanah : Bakteri, Algae, Protozoa, Amoeba, Actinomycetes, Flagellata, Ciliata. Tanah subur mengandung lebih dari 100 juta mikroba per gram tanah. Produktivitas dan daya dukung tanah tergantung pada aktivitas mikroba tersebut. Sebagian besar mikroba memiliki peranan yang menguntungkan bagi pertanian, yaitu berperan dalam menghancurkan limbah organik, recycling hara tanaman, fiksasi biologis nitrogen, pelarutan fosfat, merangsang pertumbuhan, biokontrol patogen dan membantu penyerapan unsur hara. Bioteknologi berbasis mikroba dikembangkan dengan memanfaatkan peran-peran penting mikroba tersebut (Waluyo, 2008).

Menurut Batubara (2015), dalam jurnalnya mengatakan, tanah merupakan suatu ekosistem yang memiliki kelimpahan mikroorganisme yang bervariasi. Tanah yang melimpah di alam merupakan media yang baik untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme. Tanah memiliki kandungan C-organik dalam jumlah yang besar pada tanah berperan sebagai penyokong segala bentuk kehidupan di dalam tanah. Keberadaan mikroorganisme di dalam tanah dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti temperatur, kelembapan, tekanan osmotik, pH, kebutuhan O₂ dan sumber energi. Alexander (dalam Batubara, 2015) menjelaskan bahwa mikroorganisme banyak ditemukan pada permukaan tanah karena bahan organik tersedia dalam jumlah yang besar. Oleh karena itu, mikroorganisme lebih banyak yang berada pada lapisan tanah yang paling atas. Beberapa penelitian lainnya Rahayu, (dalam Batubara, 2015), melaporkan bahwa bakteri merupakan mikroorganisme yang paling banyak ditemukan di dalam tanah jika dibandingkan dengan mikroorganisme lain seperti pada fungi dan protozoa. Kelimpahan bakteri di alam dikarenakan kemampuannya untuk bertahan hidup pada seluruh lapisan tanah dan pada kondisi tanah yang berbeda. Menurut Subandi

(2010), dalam bukunya mengatakan bahwa kehidupan di alam ini mungkin tidak akan berlanjut jika mikroorganisme yang hidup di dalam tanah musnah. Mikroorganisme sangat berperan dalam mendekomposisi dan mengurai bahan-bahan organik berupa sisa tumbuhan, bangkai hewan, sampah buangan manusia yang tertumpah dan terkumpul di permukaan bumi. Berbagai jenis dan spesies mikroorganisme berperan penting dalam memutar siklus unsur seperti karbon, nitrogen, fosfor dan belerang. Siklus niktrogen melibatkan proses enzimatik dalam perubahan senyawa-senyawa kimiawi yang terdapat di dalam tanah dan gas nitrogen yang terdapat di atmosfer menjadi senyawa nitrogen anorganik yang diperlukan oleh tumbuhan untuk menyintesis makromolekul esensial seperti asam nukleat dan protein.

Minyak bumi merupakan kompleks senyawa organik yang terdiri atas senyawa hidrokarbon dan nonhidrokarbon yang berasal dari sisa-sisa mikroorganisme, tumbuhan, dan binatang yang tertimbun selama berjuta-juta tahun. Kandungan senyawa hidrokarbon dalam minyak bumi lebih dari 90% dan sisanya merupakan senyawa nonhidrokarbon seperti sulfur, nitrogen, oksigen dalam kadar yang bervariasi, volatilitas, *specific gravity*, dan viskositas yang beragam (Speight, 1991).

Pencemaran minyak bumi yang terjadi pada tanah merupakan ancaman yang sangat serius bagi kesehatan manusia, dan juga makhluk hidup yang hidup di dalam tanah tersebut (Hadrianto, 2018). Minyak bumi yang mencemari tanah dapat mencapai lokasi air tanah, sumber air yang menyediakan air bagi kebutuhan domestik maupun industri sehingga akan menjadi masalah yang sangat serius bagi daerah yang mengandalkan air tanah sebagai sumber utama kebutuhan air bersih atau air minum (Alatas dan Bartha 1997 dalam Nugroho, 2006).

2.2 Pencemaran Tanah oleh Minyak Bumi

Pencemaran merupakan suatu kondisi yang telah berubah dari kondisi asal menuju kondisi yang lebih buruk sebagai akibat masukan dari bahan-bahan pencemar atau polutan. Suatu lingkungan dikatakan tercemar apabila telah terjadi perubahan-perubahan dalam tatanan lingkungan sehingga tidak sama lagi dengan bentuk asalnya, sebagai akibat masuknya suatu benda maupun benda asing ke

dalam tatanan lingkungan. Sehingga perubahan ini memberi dampak buruk terhadap organisme yang hidup dalam tatanan tersebut. Pada tingkat lanjut, perubahan ini juga dapat membunuh bahkan menghapus satu atau lebih organisme (Palar, 2008) *dalam* (Vyatrawan, 2015).

Pencemaran bisa terjadi pada tanah, air tanah, sungai, udara, bahkan bisa terjadi karena terputusnya rantai dari suatu tatanan lingkungan hidup atau penghancuran suatu jenis organisme yang pada akhirnya akan menghancurkan ekosistem pencemaran ini akan mengakibatkan terjadinya degradasi terhadap tanah (Soemarwoto, 1991), *dalam* (Riskawati, 2016). Pencemaran tanah terjadi apabila terdapat bahan kimia alami maupun buatan manusia yang masuk ke dalam tanah dan mengubah tatanan tanah pada sifat dasar tanah yang melampaui kriteria baku kerusakan tanah. Suatu zat yang berbahaya atau beracun yang telah mencemari lingkungan permukaan tanah, maka zat tersebut akan menguap, tersapu oleh air hujan atau masuk ke dalam tanah. Pencemaran yang masuk ke dalam tanah tersebut akan terjadi pengendapan sebagai zat yang beracun di tanah, maka akan berdampak langsung kepada manusia dan juga makhluk hidup lainnya ketika bersentuhan atau dapat mencemari air tanah dan udara di atasnya. Menurut Manik (2003), pencemaran tanah merupakan masuknya bahan atau zat atau unsur lain ke dalam tanah sehingga konsentrasi suatu zat atau unsur lain ke dalam tanah sehingga konsentrasi suatu zat atau unsur hara tersebut menjadi racun bagi tanaman serta mengganggu ekosistem biota tanah.

Pencemaran tanah adalah keadaan di mana bahan kimia buatan manusia masuk dan merubah lingkungan tanah alami. Pencemaran ini biasanya terjadi karena kebocoran limbah cair atau bahan kimia industri atau fasilitas komersial, penggunaan pestisida, masuknya air permukaan tanah tercemar ke dalam lapisan sub-permukaan, kecelakaan kendaraan pengangkut minyak, zat kimia, atau limbah, air limbah dari tempat penimbunan sampah serta limbah industri yang langsung dibuang ke tanah secara tidak memenuhi syarat (*illegal dumping*) (Muslimah, 2015). Limbah minyak bumi dapat terjadi di semua ini aktivitas perminyakan mulai dari eksplorasi sampai ke proses pengilangan dan sangat berpotensi menghasilkan limbah berupa lumpur limbah minyak bumi (*oil sludge*), tumpahan tersebut merupakan polutan yang dapat mengganggu ekosistem pada

wilayah yang terkontaminasi. Tanah yang tercemar oleh minyak bumi tersebut akan membahayakan organisme-organisme yang terdapat di lingkungan tanah tersebut, hal ini dikarenakan limbah minyak bumi yang mengandung senyawa hidrokarbon akan bersifat toksik dan karsinogenik terhadap tanah yang tercemar.

Menurut Yulaikah (2007), dalam Khafidloh (2020), menyatakan bahwa kegiatan eksplorasi dan eksploitasi minyak bumi yang meliputi (pengeboran, produksi, pengilangan, dan transportasi). Kebocoran pipa transmisi minyak, kebocoran tanki bawah tanah, pengolahan pembuangan limbah pengeboran minyak bumi yang kurang baik, tumpahan minyak pada industri, pembuangan bengkel kendaraan, semburan minyak liar, ceceran minyak di pangkalan minyak tanah, dan lain sebagainya berpotensi menyebabkan terjadinya pencemaran tanah oleh hidrokarbon. Menurut Ripani (2015), tumpahan minyak di tanah akan menyebabkan dampak yang cukup serius karena difusi oksigen dalam tanah terganggu, sehingga dapat menyebabkan beberapa hal seperti mikroorganisme tanah akan mati, merusak perakaran tumbuhan, dan mencemari air tanah, populasi organisme yang hidup dalam tanah menjadi berkurang sehingga secara langsung maupun tidak langsung berdampak pada kesuburan tanah.

Dampak pencemaran tanah merupakan perubahan kimiawi pada tanah yang radikal dapat muncul dari adanya bahan kimia beracun atau berbahaya bahkan pada dosis yang rendah sekalipun. Perubahan tersebut dapat menyebabkan perubahan metabolisme dan mikroorganisme endemik dan antropoda yang hidup di lingkungan tanah tersebut, sehingga dapat memusnahkan beberapa spesies primer dari rantai makanan, yang dapat memberi akibat yang besar terhadap predator atau tingkatan lain dan rantai makanan tersebut. Efek kimia pada bentuk kehidupan terbawah tersebut rendah, bagian bawah piramida makanan dapat menelan bahan kimia asing, sehingga akan terkonsentrasi pada makhluk-makhluk penghuni piramida atas (Notodarmojo, 2005).

2.3 Bakteri

Bakteri merupakan mikroba prokariotik yang uniseluler dan berkembangbiak dengan cara aseksual dengan pembelahan sel. Bakteri tidak berklorofil namun sebagian ada yang bersifat fotosintetik. Bakteri hidup secara bebas, parasit,

saprofit, sebagai patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Habitatnya terdapat dimana-mana, misalnya di alam, tanah, laut, atmosfer dan di dalam lumpur. Bakteri juga memiliki berbagai bentuk, diantaranya ada yang bulat, spiral dan batang. Bakteri juga memiliki struktur sel yang tidak mempunyai membran inti, sedangkan komponen genetiknya terdapat di dalam molekul DNA tunggal yang terdapat di dalam sitoplasma. Ukuran sel-sel bakteri sangat bervariasi tergantung masing-masing spesiesnya, namun pada umumnya $0,5-1,0 \times 2,05 \mu\text{m}$, sama halnya dengan 10.000 bakteri yang panjang selnya $1 \mu\text{m}$ dari satu ujung ke ujung lainnya (Alimuddin, 2005).

Bakteri merupakan mikroorganisme yang memiliki sel tunggal panjangnya beberapa mikrometer dan juga memiliki morfologi yang berupa tongkat (basil), kokus sampai bentuk spiral. Bakteri sendiri dapat hidup di dalam permukaan tanah bumi, di perairan air panas, air laut, di bawah permukaan tanah dan ada yang dapat berkembang pada sampah zat radioaktif. Populasi bakteri dalam 1 gram tanah mencapai 40 juta sel bakteri. Keberadaan bakteri sangat penting dalam kehidupan mulai dari pembentukan zat atau substansi seperti peran dalam fiksasi dan siklus nutrisi, sampai penguraian serta dekomposisi atau pembusukan dan penghancurannya. Hidup bakteri berinteraksi dengan lingkungan dan makhluk hidup lainnya dapat bersifat simbiosis mutualistik dapat juga bersifat parasitik sebagai patogen (Subandi, 2010).

Bakteri merupakan organisme yang memiliki ukuran sangat kecil, dan tak kasat mata sehingga diperlukan alat bantu mikroskop untuk melihatnya. Bakteri adalah organisme yang paling besar jumlahnya di dalam tanah, sehingga dalam satu gram saja dapat ditemukan kurang lebih 10^9 bakteri. Dalam keadaan yang baik bakteri dapat melakukan pertumbuhan yang sangat cepat, akan tetapi keadaan yang seperti ini biasanya tidak bertahan lama. Hal ini dikarenakan lama kelamaan nutrisi yang berada di lingkungan sekitar juga berkurang jumlahnya (Yulipriyanto, 2010). Semua bakteri memiliki sel tunggal, meskipun sering juga dijumpai dalam beberapa keadaan terdapat bakteri yang memiliki sel banyak. Bakteri juga memiliki ukuran yang sangat kecil (Volk dan Wheeler, 1984).

2.4 Morfologi Bakteri

2.5.1 Ukuran Bakteri

Bakteri memiliki ukuran tubuh yang sangat kecil, sehingga diperlukan alat bantu berupa mikroskop untuk dapat mengamatinya. Ada beberapa bakteri yang memiliki ukuran tubuh agak besar yang dapat dilihat tanpa menggunakan mikroskop. Akan tetapi untuk mengamati sifat morfologi bakteri tersebut agar lebih teliti maka tetap menggunakan mikroskop (Dwijoseputro, 2009). Bakteri rata-rata berukuran lebar 0,5-1 mikron dan Panjang hingga 10 mikron (1 mikron = 10^{-3} mm) (Irianto, 2006). Menurut Subandi (2010), mengatakan bahwa sel tunggal mikroorganisme mikroskopis (terkecuali ada dua yang ditemukan dengan ukuran yang hampir dapat dilihat dengan mata telanjang, yaitu *Epulopiscium fishelsoni* suatu bakteri berbentuk batang dengan diameter 80 μ m dan panjang 200-600 μ m dan *Thiomargarita namibiensis* suatu bakteri berbentuk sferik (lensa) dengan diameter 100 – 750 μ m.

Satuan ukuran tubuh bakteri adalah mikron atau mikrometer. Satu mikron (μ) sama dengan 1/1000 milimeter (mm) atau 10^{-3} mm. Panjang tubuh bakteri sekitar 1-2 μ , sedangkan lebarnya 25 μ (Pelczar & Chan, 2008). Bakteri yang berbentuk kokus memiliki diameter 0,5 μ , dan ada yang memiliki diameter 2,5 μ . Bakteri yang berbentuk basil (batang) memiliki diameter antara 0,2-2,0 μ . Apabila terdapat ukuran yang tidak sesuai dengan ketentuan tersebut, maka pengukuran pada besar kecilnya bakteri tersebut perlu didasarkan atas standar yang sama (Dwijoseputro, 2009).

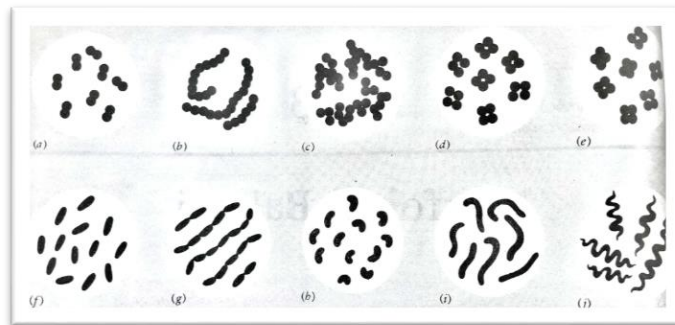
2.5.2 Bentuk Bakteri

2.5.1.1 Bakteri Berbentuk Bulat (Bola)

Bakteri sel yang berbentuk bulat seperti bola-bola kecil. Sel bakteri yang berbentuk kokus ini muncul dalam beberapa penataan yang khas bergantung pada spesiesnya (Pelczar & Chan, 2008). Bakteri berbentuk bulat atau bola dinamakan kokus (*Coccus*), dan dapat dibedakan atas (Irianto, 2000) :

1. *Monokokus*, yaitu bakteri berbentuk bola tunggal, misalnya *Neisseria gonorrhoeae*, penyebab penyakit kencing nanah.

2. *Diplokokus*, yaitu bakteri berbentuk bola yang bergandengan dua-dua, misalnya *Diplococcus pneumoniae*, penyebab penyakit pneumonia atau radang paru-paru.
3. *Sarkina*, yaitu bakteri berbentuk bola yang berkelompok empat-empat, sehingga bentuknya mirip kubus.
4. *Streptokokus*, yaitu bakteri berbentuk bola yang berkelompok memanjang berbentuk rantai.
5. *Stafilokokus*, yaitu bakteri berbentuk bola yang berkoloni membentuk sekelompok sel tidak teratur, sehingga bentuknya mirip dompolan buah anggur.



Gambar 2.1 Tipe morfologi bakteri (Sumber: Irianto, 2006)

2.1.1.1 Bakteri Berbentuk Batang

Sel bakteri yang berbentuk seperti batang dinamakan *Bacillus*. Ujung beberapa *Bacillus* ada yang tampak persegi, ada yang bundar, dan ada yang berbentuk meruncing, atau lancip seperti cerutu. *Bacillus* juga ada yang saling melekat satu dengan lainnya, ujung dengan ujung, sehingga memberikan penampilan rantai (Pelczar & Chan, 2008).

Bakteri berbentuk batang dinamakan basilus (*bacillus* yang berarti batang). Bentuk *bacillus* dapat dibedakan atas (Irianto, 2006) :

1. *Basil* tunggal, yaitu bakteri yang hanya berbentuk satu batang tunggal misalnya *Salmonella typhi*, penyebab penyakit tifus.
2. *Diplobasil*, yaitu bakteri berbentuk batang yang bergandengan dua-dua.

3. *Streptobasil*, yaitu bakteri berbentuk batang yang bergandengan memanjang membentuk rantai misalnya *Bacillus anthracis* penyebab penyakit antraks.

2.1.1.2 Bakteri Berbentuk Melilit (Spiral)

Bakteri berbentuk melilit, yang dinamakan *spirillum* atau *spiral*. Ada tiga macam bentuk spiral, yaitu sebagai berikut (Irianto, 2006) :

1. *Spiral*, yaitu golongan bakteri yang bentuknya seperti spiral, misalnya *Spirillum*. Sel tubuhnya umumnya kaku.
2. *Vibrio* atau bentuk koma yang dianggap sebagai bentuk spiral tak sempurna, misalnya *Vibrio cholerae* penyebab penyakit kolera.
3. *Spirochaeta* (baca : spiroseta), yaitu golongan bakteri berbentuk spiral yang bersifat lentur. Pada saat bergerak, tubuhnya dapat memanjang dan mengerut.

2.5 Isolasi Bakteri

Secara alami, mikroorganisme di alam ditemukan dalam populasi campuran. Hanya dalam keadaan tertentu saja populasi ini ditemukan dalam keadaan murni. Untuk dapat mempelajari sifat biakan, morfologi, dan sifat aslinya, maka mikroorganisme yang akan diteliti harus dapat dipisahkan. Hal ini berarti bahwa harus diperoleh biakan murni yang hanya mengandung satu macam mikroorganisme. Untuk memperoleh biakan murni dapat menggunakan bahan cair atau bahan padat. Pada mulanya digunakan gelatin sebagai bahan pematat. Gelatin terdiri dari protein sehingga dapat dicerna atau dicairkan oleh mikroorganisme. Bahan pematat yang kemudian ditemukan adalah agar, yang merupakan polisakarida dari rumput laut. Agar dapat mencair pada suhu 100°C, sedangkan pada suhu 44 °C masih dalam bentuk cair. Suhu ini masih memungkinkan mikroorganisme dapat tumbuh, sehingga prinsip ini dipakai untuk mengisolasi bakteri dengan agar tuang. Pada umumnya mikroorganisme tidak dapat mencerna atau mencairkan agar (Waluyo, 2010).

Isolasi mikroba adalah memisahkan mikroba satu dengan mikroba lain yang berasal dari campuran berbagai mikroba. Mengisolasi mikroba dengan cara menumbuhkan (menanam) dalam medium padat. Hal ini karena dalam medium

padat, sel-sel mikroba akan membentuk koloni yang tetap pada tempatnya. Sel mikroba yang tertangkap pada medium padat pada beberapa tempat yang terpisah, maka sel atau kumpulan sel mikroba yang hidup akan berkembang menjadi suatu koloni yang terpisah (Waluyo, 2010). Isolasi bakteri merupakan proses pengambilan bakteri dan medium atau lingkungan asalnya, dan menumbuhkan pada medium buatan sehingga diperoleh biakan atau kultur murni hasil isolasi tersebut. Populasi bakteri dapat diisolasi menjadi biakan atau kultur murni, terdiri dari satu jenis bakteri yang dapat dipelajari morfologi, sifat, dan kemampuan biokimiannya (Singleton & Sainsbury, 2006).

Mikroorganisme dalam suatu lingkungan alami merupakan populasi campuran dari berbagai mikroorganisme baik dari tanah, air, makanan, serta hewan maupun tumbuhan. Pemisahan mikroorganisme perlu dilakukan untuk mengetahui jenis, karakteristik, morfologi fisiologi, kultural mikroorganisme tersebut, yang kemudian dikenal dengan Teknik pemisahan mikroorganisme yang disebut dengan isolasi (Irianto, 2006). Tujuan mengisolasi bakteri adalah untuk mendapatkan bakteri yang diinginkan dengan cara mengambil sampel mikroba dari lingkungan yang ingin diteliti. Dari sampel tersebut kemudian dikultur / dibiakkan dengan menggunakan media universal atau media selektif, tergantung tujuan yang ingin dicapai (Tortora, 2010) *dalam* (Priadie 2012, 41-42).

Proses pemindahan bakteri dari satu tempat ke tempat lainnya harus menggunakan prosedur aseptik. Aseptik berarti bebas dari sepsis, yaitu kondisi terkontaminasi karena mikroorganisme lain. Teknik aseptik ini sangat penting bila bekerja dengan bakteri. Beberapa alat yang digunakan untuk menjalankan prosedur ini adalah Bunsen dan *Laminar Air Flow*, dan jika tidak dijalankan dengan tepat, ada kemungkinan kontaminasi oleh mikroorganisme lain sehingga akan mengganggu hasil yang diharapkan. Teknik aseptik juga melindungi laboran dari kontaminasi bakteri (Hifizah, 2012).

Berbagai macam cara isolasi mikroba, sebelum melakukan isolasi ada beberapa hal penting yang harus diperhatikan diantaranya, (1) sifat spesies mikroba yang akan diisolasi, (2) tempat hidup atau asal mikroba, (3) medium untuk pertumbuhan yang sesuai, (4) cara menanam mikroba tersebut, (5) cara inkubasi mikroba, (6) cara menguji bahwa mikroba yang diisolasi telah berupa

biakan murni dan sesuai dengan yang dimaksud, dan (7) cara memelihara agar mikroba yang telah diisolasi tetap merupakan biakan murni (Waluyo, 2008).

Teknik kultur untuk mendapatkan biakan murni terbagi menjadi tiga macam Teknik, diantaranya yaitu (Waluyo, 2010) :

1. Cara penuangan (*pour plate*)

Isolasi bakteri dengan cara tuang ini umumnya dilakukan untuk menentukan perkiraan jumlah bakteri hidup dalam suatu cairan, misalnya air, susu, kemih atau biakan bulyon. Hasilnya dinyatakan dalam jumlah koloni, yang berarti jumlah koloni, yang berarti jumlah bakteri dalam tiap milliliter cairan yang diperiksa (Irianto, 2006).

Metode ini pertama kali dilakukan oleh Robert Koch (1843-1905). Caranya adalah dengan mengambil sedikit sampel campuran bakteri yang sudah diencenrkan, dan sampel itu kemudian disebarkan dari suatu medium dari kaldu dan gelatin encer. Setelah medium mengental, maka selang beberapa jam kemudian nampaklah koloni yang masing-masing dapat dianggap murni. Dengan mengulang pekerjaan seperti di atas, akhirnya akan diperoleh biakan murni yang lebih terjamin. Dalam penemuan metode penuangan ini terdapat dua orang pembantu Koch yang sangat berjasa, yaitu petri yang menciptakan cawan dengan tutup, yang sekarang dikenal dengan cawan petri (*petri dish*). Orang kedua adalah Hesse yang menemukan agar-agar memiliki sifat yang lebih baik daripada gelatin untuk bahan pengental suatu medium. Agar-agar tidak lekas mencair, karena titik cairnya 95°C. Sehingga teknik ini sekarang sering disebut dengan teknik agar tuang (Waluyo, 2010).

2. Cara Penggoresan (*streak plate*).

Teknik gores merupakan sebuah metode isolasi kualitatif yang cepat. Metode ini pada dasarnya adalah metode pengenceran yang melibatkan penyebaran dengan putaran penuh dari kultur di atas permukaan pirigan agar (Cappuccino & Sherman, 2014). Isolasi dengan cara penggoresan bertujuan membuat garis sebanyak mungkin pada permukaan medium pembiakan, dengan jarum ose yang terlepas pada garis terakhir koloni yang terbentuk akan terpisah agak jauh (Irianto, 2006).

Cara penggoresan dilakukan dengan menuangkan terlebih dahulu medium agar pada cawan petri steril. Jarum ose yang digunakan dipanaskan dahulu sehingga memijar, setelah itu disentuh pada koloni bakteri yang diisolasi, kemudian digoreskan pada medium yang tersedia. Menginkubasi selama 2x24 jam pada suhu ruang, setelah itu dilakukan pengamatan (Barrow & Feltham, 1993). Terdapat beberapa teknik *streak plate* yaitu goresan T, goresan kuadran, goresan kuadran, dan goresan sinambung (Waluyo, 2010).

Ada beberapa metode *streak plate* yang berbeda, akan tetapi memiliki tujuan yang sama yaitu untuk meletakkan sebagian besar organisme pada beberapa goresan pertama. Apabila sebaran dilakukan dengan menggerakkan kawat gelang kian kemari dari satu bagian ke bagian lain cawan petri, bakteri yang tertinggal pada kawat geang semakin berkurang. Jika dilakukan dengan sempurna, goresan akhir akan akan meninggalkan bakteri individual cukup terpisah satu sama lain, sehingga setelah mengalami pertumbuhan, koloni yang berasal dari bakteri individual akan benar-benar terpisah satu sama lain. Kemudian, koloni tunggal dapat dipindahkan ke medium steril, dan akan tumbuhlah biakan murni (Volk & Wheeler, 1984).

3. Cara Penyebaran (*spread plate*)

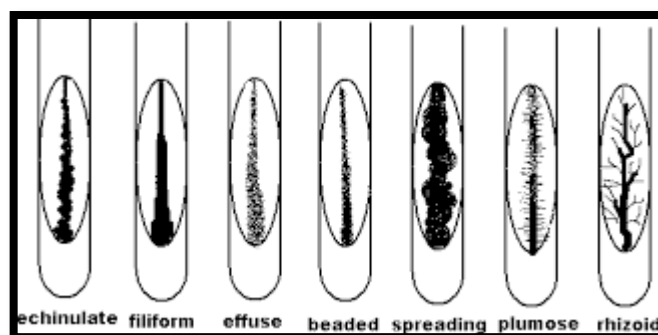
Isolasi bakteri dengan penyebaran serupa dengan isolasi bakteri pada penuangan. Hal ini yang membedakan kedua teknik tersebut adalah teknik penuangan suspensi sampel medium. Isolasi penyebaran diawali dengan pengenceran sampel. Pengenceran sampel dilakukan seperti pada penuangan. Medium yang telah dipersiapkan dituangkan kedalam cawan petri steril tunggu hingga memadat, setelah itu suspensi sampel dituangkan di atas permukaan agar. Penyebaran suspensi sampel dilakukan dengan menyebarkan suspense dengan batang *Drugalskhy* yang telah dipanaskan terlebih dahulu (Waluyo, 2008).

Teknik penyebaran (*spread plate*) mensyaratkan bahwa sebelumnya mengencerkan mikroorganisme yang digunakan. Selama inokulasi, sel-selnya disebarkan di atas permukaan media agar padat dengan batang kaca bengkok berbentuk L yang steril, sementara itu cawan petri di putar di atas sebuah “*lazy Susan*” (Cappuccino & Sherman, 2014) dalam skripsi (Rizqi, 2018).

2.6 Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi morfologi bakteri dapat berupa pengamatan makroskopis dan pengamatan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dapat dilakukan pada medium NA miring dan medium NA dalam cawan petri berupa bentuk morfologinya. Bentuk pertumbuhan goresan garis tunggal di atas permukaan agar dikelompokkan menjadi *echinulate* (bersambungan, seperti benang, dengan tepian tidak beraturan), *filiform* (bersambungan, seperti benang, dengan tepian halus), *effuse* (pertumbuhan tipis dan menyebar), *beaded* (pertumbuhan koloni terpisah), *spreading* (pertumbuhan tebal dan menyebar), *plumose* (pertumbuhan seperti pohon), dan *rhizoid* (pertumbuhan seperti akar) (Cappucino & Sherman, 2002) dalam (Sari, 2014).

Capuccino dan Sherman (1992) menyebutkan bahwa karakterisasi morfologi bertujuan untuk mengamati baik morfologi koloni maupun morfologi sel bakteri pada isolat yang telah berhasil diseleksi. Mikroorganisme yang tumbuh pada media yang bervariasi akan menunjukkan penampakan makroskopik yang berbeda-beda pada pertumbuhannya. Perbedaan ini disebut dengan karakteristik kultur, yang digunakan sebagai dasar untuk memisahkan mikroorganisme dalam kelompok taksonomik. Isolate bakteri ini diamati morfologi koloni dengan melihat bentuk koloni, warna, tepian dan elevasi.

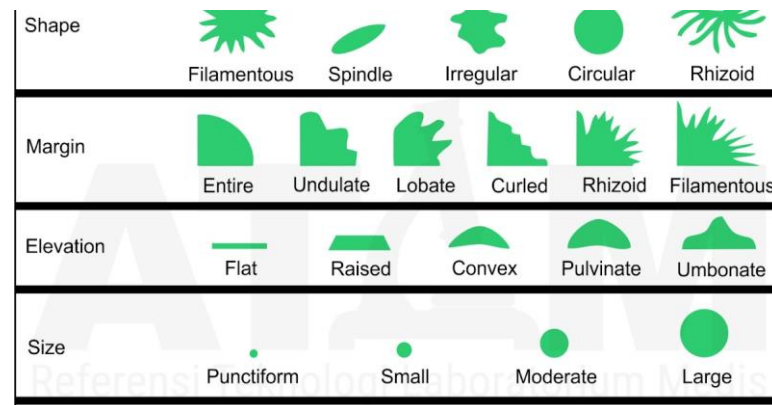


Gambar 2.1. Bentuk pertumbuhan bakteri pada agar miring (Sumber : detik biologi.blogspot.com)

Karakteristik makroskopik yang dapat diamati meliputi bentuk koloni yaitu berbentuk titik, bulat, tidak teratur, seperti akar, dan berfilamen atau berbenang, serta kumbaran. Tepi koloni dapat berbentuk utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, dan keriting. Warna koloni terdiri dari keputihan, kekuningan,

kemerahan, cokelat, jingga, orange, pink, hijau, dan ungu. Elevasi koloni meliputi rata, timbul datar, melengkung, dan cembung. Struktur koloninya halus mengkilat, kasar, berkerut, atau kering seperti bubuk. Selain itu, ukurannya pun beragam dapat dilakukan dengan mengukur diameter dari koloni bakteri yang tumbuh (Irianto, 2012).

Karakteristik mikroskopis yang diamati meliputi bentuk sel, ukuran sel, dan pewarnaan. Bentuk sel bakteri seperti berbentuk batang (basil), bulat (kokus), dan spiral dengan masing-masing kombinasinya. Pengukuran sel bakteri secara mikroskopis dapat dilakukan dengan micrometer sedangkan pewarnaan yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora (Cappuccino & Sherman, 1987).



Gambar 2.3 Bentuk morfologi koloni bakteri (Sumber : (Dachniar, 2012) dalam (Cappuccino dan Sherman, 2002, 22)).

2.7.1 Pewarnaan Bakteri

Bakteri bersifat tidak berwarna atau transparan, hal ini tidak hanya ukurannya sangat kecil akan tetapi dikarenakan warna dari sel bakteri yang transparan sehingga pada saat berada pada medium berair sangat sulit dilihat, dan ketika dalam kondisi hidup. Untuk mengamati bakteri yang kecil dan sulit dilihat pada kondisi aslinya, maka dilakukan upaya untuk mewarnai atau memasukkan zat warna yang dapat mengotori (*staining*) atau mengubah penampakan dari keadaan transparan menjadi berwarna kontras. Metode pewarnaan dengan warna biologi menjadi prosedur yang penting dalam hubungannya dengan pengamatan mikrobiologi menggunakan mikroskop cahaya (Subandi, 2010).

Mikroorganisme yang tidak diwarnai umumnya tampak transparan (tembus pandang) bila diamati dengan mikroskop cahaya biasa. Hal ini karena sitoplasma sel mikroba memiliki indeks bias yang hampir sama dengan indeks bias lingkungannya yang bersifat cair dan mikroba tidak mengadsorpsi atau membiaskan cahaya. Kontras antara sel dan latar belakangnya (medium) dapat diperjelas dengan cara mewarnai sel-sel mikroba tersebut dengan zat-zat warna (Waluyo, 2010). Pewarnaan mikroorganisme pada dasarnya adalah prosedur mewarnai mikroorganisme menggunakan zat warna yang dapat menonjolkan struktur tertentu dari mikroorganisme dapat diwarnai, mikroorganisme tersebut harus terlebih dahulu difiksasi agar terikat pada kaca objek. Tanpa adanya fiksasi, maka pemberian zat warna pada mikroorganisme yang dilanjutkan dengan prosedur pencucian zat warna dengan air mengalir dapat menyebabkan mikroorganisme ikut tercuci (Brown, 2005).

Pewarna yang digunakan dalam bakteri merupakan garam-garam yang tersusun atas ion positif dan ion negative, yang salah satunya berwarna dan disebut kromofor. Jika kromofor berada pada ion positif, disebut sebagai pewarna basa dan jika kromofor berada pada ion negatif disebut dengan pewarna asam. Bakteri akan bermuatan negatif pada pH 7, sehingga pewarnaan basa akan terikat pada muatan negative sel bakteri. Yang termasuk pewarna basa adalah kristal violet, *methylene blue*, *methylene green* dan safranin. Pewarna asam seperti eosin dan fuchsin acid, tidak terikat sel bakteri karena muatan keduanya saling bertolak belakang, sehingga pewarna asam ini hanya mewarnai bagian latar belakang pewarna negatif disebut pewarna negatif. Pewarna negatif ini umumnya digunakan untuk mengamati kapsul bakteri. Kapsul bakteri tidak menyerap zat warna sehingga dalam pewarnaan negatif akan terlihat sebagai daerah jernih disekeliling sel bakteri dengan latar belakang gelap (Gillespie & Bamford, 2008).

Tujuan dari pewarnaan adalah memudahkan melihat mikroba dengan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk mikroba, melihat struktur luar dan struktur dalam bakteri, seperti dinding sel dan vakuola, dan menghasilkan sifat-sifat fisik dan kimia khas dari bakteri dengan zat warna. Pewarnaan yang digunakan untuk melihat salah satu struktur sel dinamakan pewarnaan khusus, sedangkan pewarnaan yang digunakan untuk memilahkan mikroorganisme

dinamakan pewarnaan diferensial. Pewarnaan Gram merupakan contoh pewarnaan dari Gram negatif. Pewarnaan diferensial yang lain adalah pewarnaan Ziehl-Neelsen yang memilahkan bakteri menjadi kelompok tahan asam dan kelompok tidak tahan asam (Waluyo, 2010).

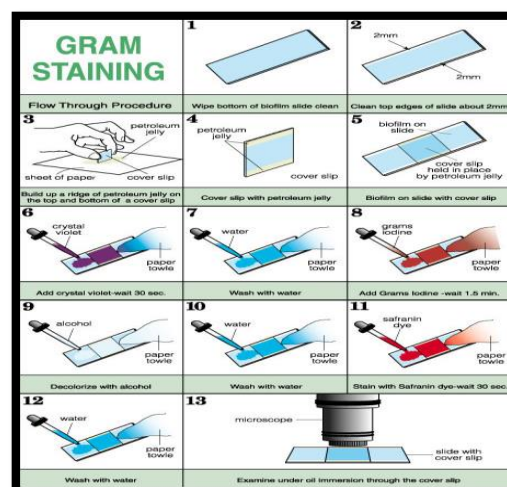
2.7.1.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan ini pertama kali ditemukan oleh Christian Gram (1884). Pewarnaan Gram menggunakan lebih dari satu pewarna dan memiliki reaksi yang berbeda untuk setiap bakteri, sehingga digunakan untuk membedakan bakteri. Pewarnaan Gram di bagi menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu yang disebabkan oleh kompleks warna kristal violet-iodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat. Sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena kompleks tersebut larut sewaktu pemberian larutan pemucat dan kemudian mengambil zat warna kedua yang berwarna merah. Perbedaan hasil dalam pewarnaan tersebut disebabkan perbedaan struktur, terutama dinding sel kedua kelompok bakteri-bakteri tertentu dengan kelompok lainnya. Pewarnaan Gram juga disebut pewarnaan diferensial (Waluyo, 2010). Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi (Rahayu, 2017).

Bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam presentase lebih tinggi daripada yang dikandung bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram negatif juga lebih tipis daripada dinding sel bakteri Gram positif sehingga pewarna kristal violet tidak dapat bertahan pada dinding selnya setelah dicuci dengan alkohol, sehingga sel bakteri ini menyerap warna merah safranin. Hal ini menyebabkan bakteri Gram negatif terlihat berwarna merah (Pelczar dan Chan, 1986). Bakteri Gram memiliki tiga lapisan dinding sel. Lapisan terluar yaitu lipopolisakarida (lipid) kemungkinan tercuci oleh alkohol, sehingga pada saat diwarnai dengan safranin akan berwarna merah. Bakteri Gram positif memiliki selapis dinding sel berupa peptidoglikan yang tebal. Setelah pewarnaan dengan kristal violet, pori-pori dinding sel menyempit

akibat dekolonisasi oleh alcohol sehingga dinding sel tetap menahan warna ungu (Hidayat *et al*, 2006).

Pewarna Gram bakteri yang telah difiksasi dengan panas dapat membentuk noda pada kaca objek diwarnai dengan pewarna basa yaitu kristal ungu. Karena warna ungu memenuhi semua sel, maka pewarnaan ini disebut dengan pewarnaan primer. Selanjutnya pewarna dicuci dan pada noda spesimen ditetesi iodine yang merupakan mordant (penajam). Setelah iodine dicuci, baik bakteri Gram positif maupun Gram negatif tampak berwarna ungu. Selanjutnya noda spesimen dicuci dengan alcohol yang merupakan senyawa peluntur warna yang pada spesies bakteri tertentu dapat menghilangkan warna ungu dari sel. Setelah alcohol dicuci, noda spesimen diwarnai kembali dengan safranin yang merupakan pewarna basa berwarna merah. Bakteri yang tetap berwarna ungu digolongkan ke dalam Gram positif, sedangkan bakteri yang berwarna merah digolongkan ke dalam Gram negatif. Perbedaan warna bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif disebabkan adanya perbedaan struktur pada dinding selnya. Dinding bakteri Gram positif banyak mengandung liposakarida, kompleks kristal ungu-iodine yang masuk ke dalam sel bakteri Gram positif tidak dapat tercuci oleh alcohol karena adanya lapisan peptidoglikan yang kokoh pada dinding sel, sedangkan pada bakteri Gram negatif alcohol akan merusak lapisan lipopolisakarida. Kompleks kristal ungu-iodine pada bakteri Gram negatif dapat tercuci dan menyebabkan sel bakteri tampak transparan yang akan berwarna merah setelah diberi oleh safranin (Pratiwi, 2008).

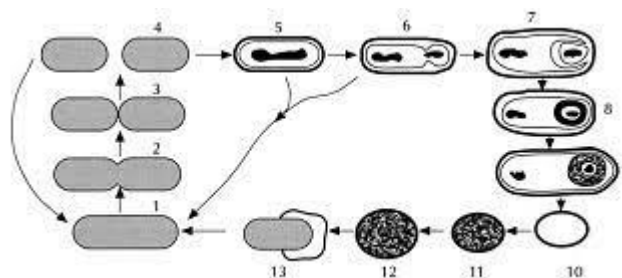


Gambar 2.4 Prosedur pewarnaan Gram (James *et al*. 2002)

2.7.1.2 Pewarnaan Endospora

Endospora tidak mudah diwarnai dengan zat pewarna pada umumnya, tetapi sekali diwarnai, zat warna tersebut akan sulit hilang. Hal inilah yang menjadi dasar dari metode pengecatan spora secara umum. Pada metode Schaeffer-Fulton yang banyak dipakai dalam pengecatan endospore, endospore diwarnai pertama dengan malachite green dengan proses pemanasan. Larutan ini merupakan pewarna yang kuat yang dapat berpenetrasi ke dalam endospora. Setelah perlakuan *malachite green* biakan sel dicuci dengan air kemudian ditutup dengan pewarna safranin. Teknik ini akan menghasilkan warna hijau pada endospora dan warna merah muda pada sel vegetatifnya (Bunchanan, 2003).

Ray (2004), menjelaskan proses sporulasi melalui 7 tahapan. Tahapan yang pertama yaitu penghentian replikasi DNA yang diikuti dengan pengembangan kromosom di dalam filament aksial. Kemudian tahap yang kedua adalah pembentukan mesosoma. Tahap ketiga adalah pembentukan septum. Kemudian pembentukan *praspora* atau *prespora* dan selanjutnya adalah pembentukan dinding sel germinal dan korteks. Keenam adalah deposisi spora dan pematangan spora. Tahap terakhir adalah terjadinya lisis enzimatik pada dinding sel yang menyebabkan spora terbebas. Siklus sporulasi ada pada Gambar



Gambar 2.5 Proses Sporulasi (Ray, 2004).

2.7.2 Uji Biokimia

Uji biokimia merupakan suatu perlakuan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Proses biokimia erat kaitannya dengan metabolisme sel, yakni selama reaksi kimia yang dilakukan oleh sel yang dapat menghasilkan suatu energi

maupun yang menggunakan energi untuk mensintesis komponen-komponen sel juga untuk kegiatan seluler, seperti pergerakan. Bakteri tidak akan bisa dideterminasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, sehingga perlu dilakukan penelitian sifat-sifat biokimia dan factor-faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhannya (Cowan, 2004).

Hasil metabolisme pada uji biokimia yang disebabkan oleh daya kerja enzim. Untuk menentukan suatu genus bakteri tidak cukup jika hanya melakukan penelitian berdasarkan sifat morfologi atau biakan saja, hal ini menunjukkan bahwa penentuan spesies bakteri memerlukan kumpulan berbagai sifat biokimia dari suatu mikroorganisme. Sifat biokimia yang dipelajari di laboratorium hanyalah ciri yang penting untuk diidentifikasi. Uji biokimia memerlukan berbagai media, sehingga dari koloni yang terpisah perlu dibuat dahulu biakan harian (*working culture*) dari koloni terpisah tersebut (Bibiana, 1994).

Metabolism bakteri memiliki sifat di dalam uji biokimiannya yang dapat dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia. Uji lain juga dapat dilakukan dengan cara melihat kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi. Uji-uji biokimia ditujukan untuk memastikan bakteri yang dianalisa benar-benar bakteri yang diharapkan. Hal ini dikarenakan uji biokimia memiliki tujuan untuk memperkecil kesalahan, karena beberapa spesies memiliki sifat-sifat yang hampir sama (Macfaddin, 1980). Beberapa jenis uji biokimia antara lain:

1. Uji TSIA

Uji TSIA bertujuan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme untuk memfermentasi karbohidrat. Media TSIA terdapat tiga macam karbohidrat antara lain glukosa, laktosa dan sukrosa, dengan menggunakan indicator phenol red yang menyebabkan perubahan warna dari merah orange menjadi kuning yang menandakan reaksi asam. Glukosa terdapat di dasar media sedangkan laktosa dan sukrosa berada di bagian bawah. Uji TSIA juga disertai dengan pembentukan gas CO₂ yang dapat dilihat dari pecahnya dan terangkatnya media agar. Uji TSIA juga dapat digunakan untuk mengetahui pembentukan H₂S yang bertujuan untuk melihat kemampuan mikroorganisme dalam memferentasi metionin dan sistein

(Asam amino yang memiliki gugus S), dengan uji TSIA yang didalamnya terdapat asam amino dan sistein. Jika mikroorganisme memfermentasi kedua asam amino ini, maka gugus S akan keluar dan gugus S akan bergabung dengan H₂O sehingga dapat membentuk H₂S, kemudian H₂S bergabung dengan Fe²⁺ membentuk FeS berwarna hitam dan mengendap (Buchanan, 2003).

2. Uji SIM (*Sulfide Indole Motility*)

Uji SIM (*Sulfide Indole Motility*) mengandung *pepton* dan *natrium tiosulfat* sebagai substrat sulfur, fero sulfat yang berperan sebagai indikator H₂S dan agar secukupnya untuk menghasilkan media yang semisolid sehingga menghasilkan respirasi anaerob (Cappuccino & Sherman, 2014). Keberadaan indol dapat dideteksi dengan penambahan reagen *kovac* yang akan menghasilkan suatu lapisan pereaksi berwarna merah ceri. SIM (*Sulfide Indole Motility*) bertujuan untuk mengetahui pergerakan bakteri. Hasil positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut dinyatakan bergerak (motil), dan bila pertumbuhan tidak menyebar, hanya didapatkan berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak (non motil) (Sudarsono, 2008 dalam Amiruddin, Darniati dkk, 2017).

3. Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui sifat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan hydrogen peroksida (H₂O₂). Biakan mikroorganisme dioleskan pada objek gelas yang sudah bersih dan steril dan sudah ditetesi H₂O₂ dengan ose. Suspense dicampur dengan perlahan menggunakan ose. Hasil positif ditunjukkan dengan hasil terbentuknya gelembung-gelembung udara (Hadioetomo, 1993).

2.7 Enzim

Enzim adalah protein yang memiliki fungsi spesifik sebagai katalis yang efektif, memiliki spesifisitas terhadap substrat, dan hanya akan mengkatalis reaksi tertentu (Sumarsih, 2002). Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul-molekul zat-zat yang bereaksi untuk kemudian mempercepat proses reaksi. Secara lebih jelas, enzim bekerja dengan cara menurunkan energi aktivasi

yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi sehingga akan mempercepat jalannya reaksi.

Enzim adalah katalis hayati sehingga walaupun dalam jumlah sedikit mempunyai kemampuan unik untuk mempercepat berlangsungnya reaksi kimiawi. Enzim adalah senyawa organik yang dihasilkan oleh sel-sel hidup yang menampakkan spesifisitas pada suatu jenis reaksi tertentu saja (Pelczar and Chan, 2005).

Enzim bekerja secara spesifik, yaitu setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu jenis senyawa atau reaksi kimia, hal ini disebabkan karena struktur kimia tiap enzim berbeda dan bersifat tetap. Sebagai contoh adalah enzim alpha amilase hanya dapat digunakan pada proses perombakan pati menjadi glukosa. Sistem kerja enzim adalah dengan cara menempel pada substrat dan menurunkan energi aktivasi yang dengan sendirinya mempercepat proses reaksi. Satu molekul enzim dapat mengkatalis 10 sampai 1000 molekul substrat per detik (Pelczar and Chan, 2005).

Berdasarkan tempat bekerjanya enzim, dikenal dua tipe enzim: enzim ekstraselular atau eksoenzim (berfungsi di luar sel) dan enzim intraselular atau endoenzim (bekerja di dalam sel). Fungsi utama eksoenzim adalah melakukan perubahan-perubahan nutrien di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel. Sedangkan enzim intraselular berfungsi untuk mensintesis bahan selular dan menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel (Pelczar and Chan, 2005).

Berdasarkan sumbernya enzim dibagi menjadi dua tipe enzim, yaitu: enzim induktif dan konstitutif. Enzim induktif memerlukan penambahan substrat sebagai penginduksi untuk memproduksi enzim, sedangkan enzim konstitutif tidak memerlukan penambahan substrat guna menginduksi enzim karena enzim terkoordinasi langsung dalam sel untuk memproduksi enzim (Pelczar and Chan, 2005).

2.8.1 Enzim sebagai biokatalis

Enzim adalah katalisator organik (biokatalisator) yang dihasilkan oleh sel. Enzim berfungsi seperti katalisator anorganik, yaitu untuk mempercepat reaksi kimia. Setelah reaksi berlangsung, enzim tidak mengalami perubahan jumlah

sehingga jumlah enzim sebelum dan setelah reaksi adalah tetap (Pelczar and Chan, 2005). Enzim mempunyai selektivitas dan spesifitas yang tinggi terhadap reaktan yang direaksikan dan jenis reaksi yang dikatalisasi. Enzim telah diproduksi secara komersial dari sumber tanaman, hewan, dan mikroorganisme. Enzim mikroba mempunyai keuntungan yang sangat besar karena dapat diproduksi dalam jumlah besar dengan teknik fermentasi dibandingkan enzim dari tanaman (Sumarsih, 2002).

Enzim dari mikroba telah banyak dimanfaatkan sebagai katalis pada biotransformasi senyawa menjadi senyawa yang lebih bernilai, misalnya produksi steroid, antibiotik, dan prostaglandin. Reaksi yang dikatalis enzim meliputi: reaksi dehidrogenasi, oksidasi, hidrosilasi, dehidrasi dan kondensasi, dekarboksilasi, aminasi, deaminasi, dan isomerisasi.

2.8.2 Enzim Lipase

Lipase merupakan kelompok paling penting dari biocatalysts untuk aplikasi bioteknologi. Lipase telah diisolasi dari banyak spesies tanaman, hewan, bakteri, jamur dan ragi. Enzim dari mikroorganisme ini digunakan dalam berbagai industri seperti sebagai susu, makanan, deterjen, tekstil, farmasi, kosmetik dan biodiesel industri, dan dalam sintesis bahan kimia, bahan kimia pertanian dan bahan polimer baru (Saxena et al., 2003).

Penelitian Hasan et al. (2010) tentang mikroba lipase potensial yang ditambahkan dalam penggunaan deterjen, fungsinya telah meningkat karena kebutuhan komersial besar yang potensial. Lipase ditambahkan ke dalam deterjen untuk rumah tangga dan industri laundry, dimana mikroba penghasil enzim lipase berfungsi dalam penghapusan residu lemak dan membersihkan saluran. Daya pembersih dari penambahan lipase mampu meningkatkan kemampuan tajam. Enzim protease, amilase, selulase dan lipase yang ditambahkan ke dalam deterjen mampu meningkatkan efisiensi pencucian lemak.

Bioteknologi agen pembersih berbasis seperti enzymebased agen banyak digunakan dalam industri. Bioteknologi bahan pembersih berbasis lebih murah dan kurang berbahaya bagi lingkungan. Enzim memiliki spesifikasi membersihkan dan juga dapat digunakan pada suhu yang lebih rendah. Enzim

menghasilkan limbah dengan COD rendah dan noncorrosive pada alam (Hasan et al., 2010).

Enzim berbasis pembersih menjadi semakin populer di industri makanan dibandingkan dengan kosmetik atau asam pembersihan rezim. Deterjen berbasis enzim mampu membersihkan lebih baik dibandingkan dengan deterjen sintetis. Deterjen berbasis enzim aktif pada pencucian suhu rendah dan bersifat ramah lingkungan. Enzim dalam deterjen tidak kehilangan aktivitas setelah proses penghapusan noda (Hasan et al., 2010).

Lipase merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan secara alami mengkatalis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut air (Miller et al., 2010). Lipid merupakan senyawa organik hasil dari dehidrogenasi endotermal rangkaian hidrokarbon. Adapun senyawa-senyawa yang termasuk golongan lipid, di antaranya lemak, fosfolipid, steroid, asam lemak dan turunannya seperti triasilgliserol.

Penambahan enzim lipase dapat membantu menghidrolisis ikatan ester menjadi molekul yang lebih sederhana sehingga lebih mudah larut dalam air. Lipid merupakan senyawa organik hasil dari dehidrogenasi endotermal rangkaian hidrokarbon (Campbell et al., 1998; Oxtoby, 2003).

Enzim lipase termostabil atau asilgliserol hidrolase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis rantai panjang trigliserida. Enzim ini memiliki potensi untuk digunakan memproduksi asam lemak, yang merupakan prekursor berbagai industri kimia. Produksi asam lemak secara industri menggunakan katalis kimia menghasilkan efek samping bagi lingkungan. Oleh karena itu, dibutuhkan enzim lipase yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang lebih ramah lingkungan dan dengan sendirinya dapat hilang seiring berkurangnya jumlah substrat di alam (Sihotang dan Ginting, 2006).

Lipase juga memiliki peran penting dalam bidang bioteknologi karena kestabilannya yang tinggi pada media organik dan pada temperatur tinggi, serta mampu mengkatalis reaksi hidrolisis dan sintesis dengan berbagai substrat sintetis. Oleh karena itu, lipase banyak digunakan sebagai katalis untuk memperoleh senyawa monogliserida dan digliserida (Sihotang dan Ginting, 2006).

Berdasarkan penelitian Renjana (2011) pembentukan globul-globul minyak goreng terjadi akibat terhidrolisisnya hidrokarbon minyak goreng oleh enzim lipase. Hidrolisis hidrokarbon minyak goreng terjadi pada ikatan ester trigliserida yang diputus oleh enzim lipase sehingga menjadi asam lemak dan gliserol. Produk yang terbentuk selanjutnya digunakan oleh bakteri untuk kebutuhan metabolisme selnya.

2.8.3 Enzim Protease

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Berdasarkan cara hidrolisisnya, protease dibedakan menjadi proteinase dan peptidase. Proteinase menghidrolisis molekul protein menjadi polipeptida, sedangkan peptidase menghidrolisis fragmen menjadi asam amino. Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri detergen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, bir, dan limbah (Campbell et al., 1998; Oxtoby, 2003).

Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan dan mikroorganisme. Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme. Enzim yang bekerja sebagai katalisis dalam reaksi hidrolisis protein disebut enzim proteolitik atau protease. Oleh karena yang dipecah adalah ikatan pada rantai peptida, maka disebut juga peptidase. Ada dua macam peptidase yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Dalam industri detergen, penggunaan protease dapat mengurangi konsentrasi fosfat dalam detergen dan menurunkan suhu air untuk mencuci pakaian, sehingga dapat menghemat energi dan mengurangi pencemaran lingkungan. Beberapa keuntungan dari pengguna enzim sebagai *cleaning agen*, yaitu (Saxena et al., 2003) :

1. Meningkatkan kerja detergen terutama dengan suhu rendah dan pH hampir netral
2. Enzim merupakan bahan yang bersifat *bodegradable* dan tidak membahayakan ekosistem akuatik

3. Enzim dapat bereaksi spesifik terhadap bermacam-macam pengotor seperti darah dan lemak yang sulit dibersihkan

Aplikasi yang terkait dengan pengolahan limbah industri adalah proses bioremediasi. Dimana pada saat ini proses bioremediasi telah berkembang pada proses *recovery* limbah buangan yang berbahaya, yaitu senyawa-senyawa kimia yang sulit didegradasi, seperti logam-logam berat, petroleum hidrokarbon, dan senyawa-senyawa yang terhalogenasi, seperti peptisida, dan herbisida. Bioremediasi merupakan penggunaan mikroorganisme untuk mengurangi polutan di lingkungan. Saat bioeremediasi terjadi, enzim-enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme memodifikasi polutan beracun dengan mengubah struktur kimia polutan tersebut, reaksi ini disebut biotransformasi. Proses biotransformasi tersebut berujung pada proses biodegradasi, dimana polutan beracun terdegradasi, strukturnya menjadi tidak kompleks, dan menjadi metabolit yang tidak berbahaya dan tidak beracun (Saxena et al., 2003).

2.8 Pertambangan Minyak Bumi Wonocolo, Bojonegoro

Pertambangan minyak bumi yang terdapat di Wonocolo merupakan salah satu pertambangan minyak bumi yang telah dikelola oleh rakyat yang ada di Kabupaten Bojonegoro. Pertambangan minyak bumi ini terletak di Desa wonocolo Kecamatan Kedawean, Kabupaten Bojonegoro. Menurut Khafidhloh (2020), dalam penelitiannya jika dilihat dari geografis lokasi pertambangan minyak tersebut terletak di perbatasan antara provinsi Jawa Timur dan Jawa Tengah. Desa Wonocolo didominasi oleh wilayah perbukitan. Desa Wonocolo memiliki suhu udara yang rendah dan dikelilingi area hutan yang dikelilinginya sudah hampir gundul, ada beberapa pepohonan kecil yang belum lama direboisasi. Sebelah timur Desa Wonocolo berbatasan dengan Desa Bayu Urip, sebelah Selatan berbatasan dengan Desa Ngantru, sebelah Barat berbatasan dengan Desa Kedewan, dan Sebelah Utara berbatasan dengan Desa Kali Gede. Luas Wilayah Wonocolo \pm 140 km. Dihuni oleh \pm 516 kepala keluarga atau \pm 1943 jiwa.

Tambang minyak bumi wonocolo ini terdapat sejumlah 74 uni sumur. Ada 44 sumur dengan kapasitas produksi 25.771 L/hari terletak di Desa Wonocolo, 18 sumur dengan kapasitas produksi 12.771 L/hari di Desa Hargomulyo, dan 12 sumur dengan kapasitas produksi 8.249 L/hari di Desa Beji. Sumur-sumur

tersebut telah dikelola oleh warga secara berkelompok dengan menggunakan peralatan tambang yang masih sangat sederhana. Kelompok warga tersebut menambang menggunakan alat-alat sederhana seperti kayu, timba, katrol, diesel dan lain-lain. Bentuk dari penambangan yang sangat sederhana ini menjadi ciri khas dengan adanya kayu membentuk segi tiga yang tengahnya terdapat tali untuk menarik timba. Kemudian timba ditarik menggunakan diesel mobil yang telah dimodifikasi untuk mempermudah pengambilan minyak tersebut (Yudhanto, 2011).

Pertambangan minyak bumi secara tradisional yang dilakukan oleh warga Desa Wonocolo, Kecamatan Kedewan, Kabupaten Bojonegoro tidak bias lepas dari sejarah pertambangan Block Cepu, sejak zaman Belanda, sumur-sumur yang terdapat di Desa Wonocolo memiliki kedalaman yang sangat dangkal, kedalaman sumur galian minyak hanya mencapai 200-400 meter. Pemerintahan Kolonial Belanda memulai penambangan minyak tradisional di Desa Wonocolo banyak menggunakan kerja penduduk local dengan memanfaatkan warga setempat untuk menjadi pekerja suruhan pada proyek penambangan mereka, sehingga warga setempatpun dapat menguasai cara-cara penambangan. Secara turun temurun warga setempat menguasai cara menambang minyak tradisional bahkan sampai penyulingan (Kholis, 2010). Belanda membuka tempat penambangan baru di daerah Kawengan yang memiliki tempat lebih luas, kemudian setelah ditinggalkan oleh Belanda karena pindah ke Desa Kawengan, sumur-sumur yang terdapat di Desa Wonocolo diteruskan oleh warga setempat, dengan modal keahlian yang mereka warisi dari Belanda (Naumi & Laksana, 2015)

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif eksploratif untuk memberi gambaran mengenai bakteri yang berasal dari tanah tercemar minyak bumi yang terdapat di Kecamatan Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro. Jenis deskriptif eksploratif ini meliputi keberadaan bakteri yang terdapat pada tanah tercemar minyak bumi yang meliputi karakteristik makroskopik, mikroskopis dan analisis uji biokimia.

3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini memiliki variabel tunggal yaitu bakteri tanah yang berasal dari tanah tercemar minyak bumi di Ds wonocolo, Kec Kedewan, Kab. Bojonegoro.

3.3 Waktu dan Tempat

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan di sekitar lokasi tambang minyak bumi di Desa Wonocolo, Bojonegoro. Sampel tanah diambil dengan metode *purposive sampling* pada dua titik lokasi yaitu area pengangkutan dan area pengeboran. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi UIN Malang.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah GPS, kamera, botol sampel, incubator, hot plate, plastic wrap, aluminium foil, spatula kaca, spreader, oven, autoklaf, lemari es, sendok, botol pengenceran, cawan petri, incubator, labu Erlenmeyer, gelas piala, laminar air flow, gelas ukur, pipet tetes, jarum ose (ose bulat, dan ose lurus), Bunsen, gelas objek, deck glass, korek api, mikropipet dan tip, vortex, mikroskop, neraca analitik, spatula, gelas objek, tabung reaksi, kertas label, dan spoit.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain air suling, tanah yang tercemar minyak bumi, medium pertumbuhan, Nutrient Agar (NA), medium *Bushnell Haas Mineral Salt* (BHMS) cair yang terdiri dari (0,02g CaCl₂, 0,2g MgSO₄·7H₂O, 1g K₂HPO₄, 1g NH₄NO₃, 2 tetes 60% FeCl₃ dan Akuades 1000 ml) Larutan fisiologis (NaCl 0,9%), medium pewarnaan Gram (Alkohol 96%, kristal violet Iodium, dan Safranin), Nutrient Broth (NB), medium TSIA, aquadest, pepton, K₂HPO₄, glukosa, Simmon Citrate Agar (SCA), bromtinol biru, larutan H₂O₂, karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa), tripton, NaCl, *phenol red*, *Malachite green*, larutan karbon fuksin, NaCl 0,85%, media SMA (Skim Milk Agar), Media SBA (Spirit Blue Agar) yang mengandung Trybutirin, dan oli bekas.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan di sekitar lokasi pengeboran minyak bumi di Desa Wonocolo, Bojonegoro. Sampel tanah diambil dengan metode *purposive sampling*. Sampel tanah diambil dari dua titik yang berbeda yaitu area pengangkutan dan area pengeboran / sumur. Sampel tanah diambil pada kedalaman kurang lebih 10 cm dari permukaan tanah sebanyak 100 gram. Kemudian masing-masing sampel dimasukkan ke dalam botol steril. Selanjutnya sampel dibawa ke laboratorium untuk dilakukan penelitian.

3.5.2 Pembuatan Medium

1. Media NA (*nutrient agar*)

Pembuatan media NA (*nutrient agar*) yaitu ditimbang media sebanyak 7 gram untuk membuat 250 ml media NA. *Nutrient agar* (NA) yang sudah ditimbang dicampurkan dengan 250 ml aquades, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml, kemudian Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil dan diikat menggunakan karet gelang, kemudian di autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 1-2 jam. Langkah selanjutnya yaitu penuangan media NA yang sudah di sterilisasi ke dalam cawan petri yang sudah steril dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* dan didekatkan dengan api

bunsen. Sebelum dituangkan ke dalam cawan petri, mulut Erlenmeyer dan cawan petri di putar-putarkan pada terlebih dahulu untuk mengurangi kontaminasi terhadap media.

2. Media NB (*nutrient broth*)

Pembuatan media NB yaitu ditimbang *nutrient broth* sebanyak 2 gram untuk membuat 250 ml media. Diambil aquades sebanyak 250 ml kemudian dituangkan ke dalam gelas beaker 500 ml kemudian ditambahkan *nutrient broth* sebanyak 2 gram. Dihomogenkan menggunakan magnet pengaduk (*stirrer*). Kemudian NB dituang ke dalam tabung ulir sebanyak yang dibutuhkan masing-masing 10 ml. tabung ulir yang sudah berisi media NB (*nutrient broth*) dibungkus menggunakan plastik diikat dengan karet gelang, kemudian di autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 1-2 jam.

3.5.3 Isolasi Bakteri

Metode pengenceran (*Plating Method*) menurut penelitian Haripriyatna (2016), yaitu sampel tanah ditimbang sebanyak 4,5 gram dan dimasukkan kedalam erlenmeyer yang berisi 45 mL medium *Bushnell Haas Mineral Salt* (BHMS) cair yang telah disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 45 menit. Kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* kurang lebih lima hari pada suhu 30°C dengan laju 100 rpm.

Kemudian tahap isolasi bakteri mengacu pada penelitian Haripriyatna (2016), yaitu sampel tanah yang telah mengalami proses pengkayaan akan dilakukan pengenceran dengan cara diambil 1 mL larutan sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-1} yang berisi 9 mL larutan NaCl steril. Diambil lagi 1 mL larutan dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} yang berisi 9 mL larutan NaCl steril. Begitu seterusnya hingga diperoleh pengenceran 10^{-6} .

Diambil masing-masing 1 mL dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} , kemudian ditumbuhkan pada medium *Bushnell Haas Mineral Salt* (BHMS) padat menggunakan metode *pour plate*, dimana 1 mL sampel yang dituang diatas permukaan medium BHMS padat selanjutnya diratakan menggunakan *spreader* kaca dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30°C. Adapun komposisi bahan medium BHMS padat yaitu sama dengan saat tahap pengenceran (pengkayaan)

sampel tanah, akan tetapi dalam tahap ini ditambahkan dengan 15 gram agar dalam komposisinya.

Setelah diinkubasi, koloni bakteri diinokulasikan ke medium *Nutrient Agar* (NA) padat pada cawan petri. Masing-masing koloni bakteri yang tumbuh dan memiliki karakteristik yang berbeda akan dinokulasikan menggunakan *streak plate* dengan jarum ose diatas permukaan medium NA. selanjutnya diinkubasi Kembali pada lima hari pada suhu 30°C.

3.5.4 Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Isolasi bakteri pendegradasi hidrokarbon menggunakan media NA (*nutrient agar*). Media NA (*nutrient agar*) yang sudah disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dituangkan pada cawan petri, kemudian dituangkan isolat bakteri yang sudah ditumbuhkan pada media NB (*nutrient broth*) sebanyak 1 ml, dan ditambahkan oli bekas pada media tersebut, selanjutnya isolat bakteri yang sudah ditumbuhkan pada media NA yang dimodifikasi penambahan oli bekas diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Diamati keberadaan bakteri yang membentuk daerah halo / zona halo.

3.5.5 Karakterisasi Bakteri

3.5.5.1 Karakterisasi Morfologi Secara Makroskopis

Koloni bakteri diinokulasikan dengan cara menggoreskan garis lurus tunggal diatas permukaan medium NA (Natrium Agar) miring dan metode quadran pada NA dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu sekitar 28°C selama 24-48 jam. Pengamatan makroskopik pada medium NA (Nutrient Agar) dalam cawan petri meliputi bentuk koloni, pigmentasi, elevasi, permukaan koloni, tepi koloni, dan warna koloni.

Identifikasi isolate bakteri secara makroskopik dilakukan dengan pengamatan karakteristik koloni bakteri, meliputi (Dwijoseputro, 1989):

- a. Bentuk koloni (dilihat dari bagian atas). Meliput : berbentuk bulat (*circular*), tidak beraturan (*irregular*), berbentuk seperti akar dan menyebar (*rhizoid*).
- b. Warna koloni meliputi : putih, putih kekuningan, kekuningan, kelabu, hampir bening.

- c. Tepi koloni (dilihat dari bagian atas), meliputi : tepian rata (*entive*), berombak/berlekuk (*lobate*), bergerigi (*serrate*), benang (*flamentous*), keriting (*undulate*).
- d. Permukaan koloni/elevasi (dilihat dari samping). Meliputi: permukaan koloni datar (*flat*), timbul melengkung (*convex*), timbul datar (*raised*), membukit (*umbonate*).

3.5.5.2 Karakterisasi Morfologi Secara Mikroskopis dengan :

1. Pewarnaan Endospora

Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 96%, kemudian aquadest diletakkan diatas kaca preparat 1-2 tetes, selanjutnya isolate aktif diambil secara aseptik dan diletakkan di atas gelas objek lalu diratakan setelah itu difiksasi di atas lampu spiritus. Setelah dingin ditetaskan dengan *Malachite green* 2-3 tetes selama 5 menit sambil difiksasi di atas lampu spiritus. Setelah dingin, membilas gelas objek dengan aquadest mengalir dan dikeringkan di udara. Setelah itu ditetesi dengan safranin selama 30 detik lalu dicuci dengan air mengalir dan kelebihan air dihilangkan dengan kertas serap. Pengamatan ini dilakukan dengan melihat bentuk sel dan endospore di bawah mikroskop dengan pembesaran tertentu.

2. Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan alcohol 96% kemudian difiksasi di atas lampu spiritus, selanjutnya isolat aktif diambil secara aseptik dan diletakkan di atas gelas objek lalu diratakan. Difiksasi kembali di atas lampu spiritus. Setelah dingin ditetaskan cat Gram A (Kristal violet) 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Setelah itu ditetesi dengan Gram B (Iodium) selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Kemudian ditetesi dengan Gram C (Alkohol 96%) selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Terakhir ditetesi dengan Gram D (Safranin) selama 5 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan kelebihan air dihilangkan dengan kertas serap. Pengamatan ini dilakukan dengan melihat bentuk dan warna sel di bawah mikroskop dengan pembesaran tertentu.

3. Bentuk Sel Bakteri.

Pengamatan bentuk sel bakteri dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran kuat. Dimana nantinya akan diketahui bentuk sel bakteri pada isolate, apakah memiliki bentuk bulat (*coccus*), batang (*basil*), ataupun spiral (*spirilia*).

3.5.6 Uji Aktivitas Biokimia

Uji aktivitas biokimia diantaranya (Cowan, 2004):

1. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Isolat Murni sebanyak satu ose digoreskan pada permukaan agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Diamati perubahan-perubahan sebagai berikut pada bagian tegak. Jika bakteri dapat memfermentasikan glukosa, warna media berubah dari orange menjadi kuning. Koloni bakteri yang tidak memfermentasikan sukrosa media tetap berwarna merah. Koloni yang dapat membentuk gas H₂S warna media berubah dari orange menjadi hitam.

Pada bagian miring jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sakrosa maka warna media berubah warna menjadi kuning, dan jika tidak dapat memfermentasi laktosa atau sakrosa, warna media tetap orange atau tidak berubah.

2. Uji SIM (*Sulfida indol motility*)

Uji motilitas dilakukan dengan menginokulasikan satu koloni isolate bakteri ke dalam *Sulfida indol motility* (SIM) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan bakteri di sekitar tusukan menunjukkan hasil uji negatif. Pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media menunjukkan hasil uji positif (Cappuccino and Sherman, 2014).

3. Uji Katalase

Isolat murni diletakkan di atas gelas objek kemudian ditetesi dengan H₂O₂, lalu diamati ada tidaknya gelembung gas yang dihasilkan.

3.5.7 Bakteri Penghasil Enzim

3.5.7.1 Enzim Lipase

Media SBA (Spirit Blue Agar) ditimbang sebanyak 8,0375 gram, kemudian dihomogenkan kedalam 240 ml aquades dan ditambahkan media trybutirin sebanyak 1 ml. Media tersebut diautoklaf pada suhu 121°C selama 15

menit. Kemudian media dituangkan kedalam cawan petri, diinokulasikan isolat bakteri menggunakan ose sebanyak 1 ose pada permukaan media. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Diamati zona bening yang terdapat pada sekita isolat bakteri yang tumbuh (Himedia, 2019).

3.5.7.2 Enzim Protease

Pengamatan bakteri penghasil enzim protease menggunakan media SMA (Skim Milk Agar) yang ditimbang sebanyak 12,875 gram untuk dihomogenkan kedalam 250 ml aquadest. Kemudian media di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dituangkan kedalam cawan petri steril dan diinokulasikan isolat bakteri menggunakan jarum ose steril sebanyak satu ose. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam, dan diamati zona bening yang terdapat pada sekitar isolat bakteri (Himedia, 2019).

3.6 Analisi Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan deskriptif kualitatif terhadap hasil pengamatan isolat bakteri yang diduga bakteri pendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim lipase dan protease. Data yang diperoleh dari penelitian ini ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

BAB IV






HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Tanah Tercemar Minyak Bumi Wonocolo

Bakteri dari tanah tercemar minyak bumi Wonocolo ditemukan dalam bentuk populasi mikroba campuran. Bakteri indigen pendegradasi hidrokarbon dapat ditumbuhkan dengan menggunakan media selektif, penggunaan media tersebut digunakan untuk menumbuhkan bakteri tertentu yang dikehendaki serta dapat menghambat bakteri non target. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri campuran yaitu menggunakan media *Bushnell Mineral Salt* (BHMS). Media ini merupakan media dengan jumlah nutrisi yang sedikit. Komponen penyusun BHMS yang tidak dilengkapi dengan glukosa sebagai sumber karbon, hal ini menjadikan bakteri tidak mendapatkan cukup energi untuk berkembang pada media ini, sehingga pertumbuhan bakteri dalam media ini cenderung sedikit dan memerlukan waktu inkubasi yang cukup lama (Waluyo, 2005).

Berdasarkan pengamatan pada isolasi dan pemurnian ditemukan 5 isolat bakteri hasil isolasi pada medium BHMS. 5 isolat tersebut didapatkan dari dua sampel pada lokasi yang berbeda. Untuk mendapatkan biakan murni bakteri, maka dilakukan pemurnian bakteri. Pemurnian pada penelitian ini dilakukan sebanyak 7 kali hingga didapatkan biakan yang murni. Kemudian biakan bakteri yang telah murni dilakukan seleksi untuk mendapatkan isolat bakteri pendegradasi hidrokarbnoklastik menggunakan media NA yang dimodifikasi penambahan oli bekas atau limbah minyak bumi. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 hasil isolasi bakteri menggunakan media BHMS

Sampel	Isolasi Pengambilan	Isolat Bakteri	
		Kode	Gambar
1	Lokasi tanah penyuluhan (TPY)	TPY 1	
		TPY 2	
		TPY 3	
2	Lokasi tanah pengeboran (TPG)	TPG 1	
		TPG 2	

Berdasarkan tabel 4.1 menunjukkan bahwa terdapat lima isolat bakteri hasil isolasi menggunakan media BHMS. Lima isolat tersebut apabila diamati secara visual memiliki perbedaan dari segi morfologi koloninya. Kedua sampel tersebut berasal dari lokasi pertambangan minyak bumi Wonocolo. Sampel 1 berasal dari tanah pada area penyuluhan / pengangkutan, sedangkan sampel 2 berasal dari tanah area pengeboran. Menurut Barakwan (2017), menyatakan pada lokasi tambang minyak Wonocolodi area pengangkutan, presentase kadar hidrokarbon pada tanah tersebut sebesar 4,35%, sedangkan kadar hidrokarbon pada tanah di area pengeboran sebesar 8,34%. Tingginya kadar hidrokarbon pada tanah tersebut memiliki tingkat pencemaran yang lebih tinggi daripada tanah di area pengangkutan. Hal ini mengakibatkan populasi jenis bakteri yang mampu hidup pada tanah di area pengangkutan lebih banyak daripada jumlah populasi bakteri pada tanah pengeboran.

4.2 Seleksi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Keberadaan bakteri pendegradasi hidrokarbon yang ditemukan pada tanah tercemar minyak bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro dapat dilihat dari kemampuan koloni bakteri tumbuh baik pada medium NA (*nutrient agar*) yang dimodifikasi penambahan oli. Menurut Darmawan (2008), bahwa untuk mendapatkan bakteri yang mempunyai kemampuan lebih cepat dalam mendegradasi hidrokarbon pada limbah minyak bumi maka dalam media perlu ditambahkan pencemar (lemak atau minyak), urea, sebagai sumber N dan gula untuk membantu pertumbuhan mikroba sehingga jumlahnya cukup untuk mendegradasi hidrokarbon. Hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 isolat bakteri TPY 1 yang berpotensi sebagai pendegradasi hidrokarbon

Berdasarkan uji potensi bakteri yang diduga sebagai pendegradasi hidrokarbon yaitu bakteri dengan kode isolat TPY 1. Koloni bakteri yang diisolasi pada penelitian ini dapat membentuk daerah halo yang tumbuh disekitar oli bekas yang berwarna hitam. Koloni bakteri yang membentuk daerah halo merupakan koloni bakteri yang diduga mampu mendegradasi hidrokarbon pada tanah tercemar minyak bumi (Yolantika, 2015). Menurut Nababan (2008), daerah halo yang terbentuk mengindikasikan adanya aktivitas surfaktan. Surfaktan terdiri atas molekul yang mempunyai bagian hidrofilik dan hidrofobik yang mampu menurunkan tegangan permukaan air dan minyak melalui pengikatan bagian hidrofilik surfaktan dengan air dan bagian hidrofobik dengan minyak. Surfaktan melalui proses disperse dapat meningkatkan kelarutan minyak, hal ini menyebabkan terbentuknya daerah halo di sekitar koloni bakteri yang menjadi indikasi adanya aktivitas degradasi hidrokarbon oleh bakteri.

Zona halo atau daerah halo yang terbentuk dapat mengindikasikan aktivitas enzim lipase. Turunnya kadar lemak disebabkan karena hidrolisis menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Asam yang terbentuk dapat memecah komponen minyak kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana. Asam lemak bebas ini mudah mengalami kerusakan sehingga menurunkan kadar lemak (Irene, 2020). Hal yang sama juga terdapat pada penelitian Yolantika, (2015) yang menyatakan bahwa bakteri yang dapat membentuk daerah halo merupakan koloni bakteri yang diduga mampu mendegradasikan hidrokarbon pada tanah tercemar minyak bumi. Semakin besar daerah halo yang dihasilkan oleh suatu kultur, maka semakin besar pula dugaan bahwa kultur tersebut adalah mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon. Koloni bakteri yang membentuk daerah halo merupakan koloni bakteri yang toleran pada lingkungan yang tercemar. Koloni bakteri ini berkemungkinan bisa mendegradasi hidrokarbon pada tanah tercemar minyak bumi.

Bakteri pendegradasi hidrokarbon tersebut ditemukan pada tanah tercemar minyak bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro. Hal ini sesuai dengan literatur Irene (2020), dalam jurnalnya yang menyatakan bahwa tanah liat mampu mendukung pertumbuhan bakteri pendegradasi hidrokarbon serta diketahui dapat meningkatkan aktivitas degradasi hidrokarbon karena kemampuannya dalam mengikat oksigen. Oksigen (O_2) merupakan reseptor elektron yang paling banyak digunakan dalam mendegradasi hidrokarbon. Hidrokarbon dipecah lebih cepat di bawah kondisi aerobik karena membantu meningkatkan kinerja bakteri pendegradasi. Yolantika (2015), menyatakan bahwa bakteri pendegradasi hidrokarbon terdistribusi secara luas dilaut, perairan tawar dan tanah sebagai tempat hidupnya. Jumlah bakteri pemecah hidrokarbon mempunyai korelasi positif dengan kandungan hidrokarbon dari lingkungan hidupnya. Bakteri pemecah minyak mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan jumlah sel banyak pada tanah terkontaminasi minyak daripada tanah yang tidak terkontaminasi minyak.

Biodegradasi oleh bakteri dapat terjadi karena adanya aktivitas enzim yang dimiliki oleh masing-masing bakteri. Melalui proses enzimatik bakteri dapat melakukan transformasi substansi hidrokarbon menjadi bentuk yang lebih

sederhana yang dapat diserap oleh bakteri sebagai nutrisi bagi pertumbuhannya. Menurut Sugoro (2002), bakteri pendegradasi hidrokarbon terdistribusi secara luas dilaut, perairan tawar dan tanah sebagai hidupnya. Jumlah bakteri pemecah hidrokarbon mempunyai korelasi positif dengan kandungan hidrokarbon dari lingkungan hidupnya. Bakteri pemecah minyak mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan jumlah sel banyak pada tanah terkontaminasi minyak daripada tanah yang tidak terkontaminasi minyak.

4.3 Karakteristik Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon

Hasil pengamatan karakterisasi terhadap bakteri yang diduga berpotensi sebagai pendegradasi hidrokarbon yang diamati meliputi morfologi makroskopis, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora dan biokimia.

4.3.1 Karakteristik Morfologi secara Makroskopik

Berdasarkan hasil pengamatan dari lima isolat yang diduga mampu mendegradasi hidrokarbon yaitu isolat bakteri TPY 1 memiliki karakteristik secara makroskopik dengan ciri-ciri berbentuk bulat (*around*), elevasi rata (*flat*), permukaan mengkilat, tepi rata (*entire*) dan berwarna putih susu, seperti pada gambar 4.2.



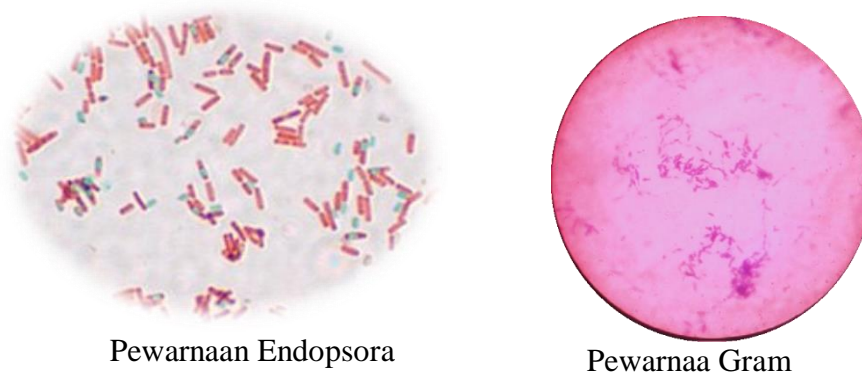
Gambar 4.2 Karakteristik makroskopik isolat bakteri TPY 1 yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon

Pengamatan tersebut sesuai dengan Abna (2020), yang menyatakan bahwa koloni bakteri memiliki berbagai macam bentuk pada medium padat diantaranya, bundar, bundar dengan tepian kerang, bundar dengan tepian timbul, keriput, konsentris, tak beraturan, menyebar, berbenang-bennag, bentuk L. Selain itu,

Dwijoseputro (2005), menyatakan bahwa koloni bakteri mempunyai sifat-sifat spesifik pada media padat. Pada media NA, bentuk koloni dilukiskan menjadi titik-titik, bulat, berbenang, tidak beraturan, seperti akar dan kumparan. tepian koloni bakteri juga ada yang licin, bembak, berlekuk, tak beraturan, sikat bercabang, seperti wol, seperti benang, dan seperti ikat rambut. Pada permukaan koloni bakteri karakter yang diperoleh yaitu permukaan koloni yang rata, timbul, melengkung, cembung, membukit, dan ada yang serupa dengan kawah. Pada warna, koloni bakteri sebagian besar berwarna keputihan atau kekuningan, namun bisa juga berwarna yang lainnya, seperti kemerahan, coklat, jingga, biru, hijau dan ungu.

4.3.2 Karakteristik Morfologi Bakteri secara Mikroskopik

Berdasarkan hasil pengamatan karakteristik morfologi secara mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan Gram dan Endospora. Hasil pewarnaan Gram pada isolat bakteri TPY 1 menunjukkan warna merah pada sel bakteri. Hal ini menandakan bahwa isolat bakteri pendegradasi hidrokarbon yang diperoleh dari tanah tercemar minyak bumi Wonocolo bersifat Gram negatif dan bentuk sel yaitu basil (batang), sedangkan pada pewarnaan endosporan menunjukkan hasil positif (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Pewarnaan Gram dan endspora pada isolat bakteri TPY 1

Tivani, (2019), menyatakan bahwa bakteri yang memiliki sifat Gram negatif akan kehilangan zat pewarna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol, dan setelah pemberian zat pewarna safranin maka akan berubah menjadi warna merah. Hal ini terjadi dikarenakan struktur kimiawi pada dinding sel masing-

masing isolat bakteri. Dinding sel bakteri yang bersifat Gram negatif mengandung satu atau beberapa lapis peptidoglikan terikat pada lipoprotein pada membran luar. Terdapat daerah periplasma yaitu daerah yang terdapat diantara membran plasma dan membran luar. Periplasma berisi enzim degradasi konsentrasi tinggi serta protein-protein transpor. Dinding sel bakteri yang bersifat Gram negatif tidak mengandung asam yang terikat, karena hanya mengandung sedikit peptidoglikan, maka dinding sel bakteri tersebut lebih rentan terhadap kerusakan mekanis. Hal ini yang menyebabkan ketika pemberian alkohol pada pengecatan Gram dinding sel bakteri negatif akan kehilangan warna, sehingga ketika pemberian warna safranin akan tampak ketika diamati pada mikroskop.

Pengamatan pewarnaan endospora bertujuan untuk melihat kemampuan isolate bakteri dalam menghasilkan spora. Spora yang dihasilkan akan menunjukkan warna hijau ketika diamati menggunakan mikroskop, sedangkan sel vegetatif akan menunjukkan warna merah. Pada pewarnaan endospora menggunakan reagen malachite green yang digunakan khusus untuk pewarnaan endospora dan inokulum isolat diambil adalah isolat bakteri yang telah berumur 3 hari. Hal ini sesuai dengan Volk and Wheele (1998), yang menjelaskan dalam bukunya bahwa endospora terbentuk ketika terjadi fase stasioner, oleh sebab itu pengamatan pewarnaan endospora pada isolat bakteri tanah yang tercemar minyak bumi Wonocolo dilakukan setelah isolat dilakukan peremajaan selama 3 hari.




Isolat yang positif memiliki spora di tandai warna hijau ketika diamati pada mikroskop. Endospora merupakan struktur yang tahan terhadap keadaan lingkungan ekstrim seperti kering, pemanasan dan keadaan asam. Endospora berbentuk sangat padat dan refraktil karena memiliki kandungan air yang sangat rendah. bakteri yang memiliki endospora sangat sulit diwarnai sehingga dibutuhkan pewarna spesifik, yaitu malachite green. Bakteri yang menghasilkan spora akan mengikat kuat senyawa pewarna malachite green dan ketika dilakukan pewarnaan selanjutnya menggunakan safranin, sel spora tidak dapat berikatan dengan pewarna lain karena sudah berikatan dengan malachite green. Oleh karena itu warna bakteri spora adalah hijau. Sedangkan bakteri yang tidak memiliki spora cenderung tidak tahan terhadap pewarnaan, karena hanya memiliki sel vegetative, ketika terjadi pewarnaan dengan malachite green, sel vegetatif akan mampu

berikatan dengan pewarna tersebut tetapi dapat dilunturkan setelah dilakukan pewarnaan menggunakan safranin, kemudian sel vegetatif akan berikatan dengan pewarna safranin sehingga warna yang dihasilkan ketika diamati oleh mikroskop akan menunjukkan warna merah muda (Pratita dan Putra, 2012).

4.3.3 Karakteristik Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon secara Biokimia

Uji aktivitas biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologi dari isolat bakteri yang diperoleh. Fisiologi ini berhubungan dengan proses metabolisme yang terjadi di dalam sel suatu bakteri. Setiap bakteri mempunyai aktivitas biokimia yang berbeda-beda sehingga uji biokimia digunakan juga sebagai alat untuk identifikasi spesies bakteri. Tabel 4.2 merupakan hasil pengamatan uji biokimia isolat bakteri tanah yang tercemar minyak bumi Wonocolo.

Table 4.2. Hasil uji biokimia pada isolat bakteri TPY 1

Kode Isolat	TSIA				SIM	Katalase
	Slant	Butt	H ₂ S	Gas		
TPY 1	Merah	Kuning	-	-	+	+
Gambar			Tidak ada	Tidak ada		

Keterangan :

1. Kode isolate TPY 1 (Tanah Penyuluhan).
2. Uji TSIA Warna merah pada permukaan dan kuning di bagian bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa tetapi tidak laktosa dan sukrosa.
3. Uji SIM hasil positif bersifat motil ditandai dengan adanya pertumbuhan yang menyebar disekeliling tempat tusukan atau adanya penyebaran yang berwarnaputih seperti akar disekitar inokulasi.
4. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa organisme yang bersangkutan menghasilkan enzim katalase yang mengubah hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

Uji pengamatan TSIA pada isolat TPY 1 menunjukkan bagian slant isolat berwarna merah, sedangkan bagian butt isolat berwarna kuning. Hal ini menandakan bahwa isolat tersebut dapat memfermentasikan glukosa, akan tetapi tidak bisa memfermentasikan laktosa dan glukosa. Menurut Kosasi, dkk (2019),

dalam jurnalnya menyatakan bahwa uji TSIA bertujuan untuk mengetahui kemampuan dari suatu bakteri dalam memfermentasikan gula untuk menghasilkan asam atau gas. Warna merah pada agar menunjukkan reaksi basa, sedangkan warna kuning menunjukkan reaksi asam. Warna merah pada permukaan agar menunjukkan bahwa terjadinya fermentasi glukosa, dan warna kuning pada bagian permukaan dan bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi laktosa dan sukrosa.

Hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan bahwa isolasi bakteri pendegradasi hidrokarbon merupakan bakteri bersifat Gram negatif. Menurut Avi (2011), dalam jurnalnya menuliskan bahwa bakteri Gram negatif dapat memfermentasi glukosa mapupun laktosa dan sukrosa. Glukosa pada bakteri hidrokarbor berperan sebagai sumber karbon pada media pertumbuhan mikroba. Sumber karbon yang berperan sebagai nutrisi diperlukan untuk kelangsungan hidup bakteri pendegradasi hidrokarbon.

Hasil pengamatan uji SIM pada isolat (TPY 1), menunjukkan bahwa isolat tersebut bersifat motil, hal ini ditandai dengan adanya penyebaran bakteri pada media. Gultom, dkk (2019), dalam jurnalnya menyatakan bahwa uji positif ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar, yang menandakan isolat bakteri tersebut bergerak (motil), dan jika pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis saja, maka bakteri tersebut tidak bergerak (non motil). Oleh karena itu bakteri pendegradasi hidrokarbon mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang ekstrim. Hal ini disebabkan oleh kemampuan bakteri yang bersifat motil.

Hasil pengamatan uji katalase pada isolat bakteri TPY 1 menunjukkan adanya hasil yang positif. Uji katalase bertujuan untuk menentukan kemampuan bakteri dalam mendegradasi hydrogen peroksida (H_2O_2) melalui produksi enzim. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa organisme yang bersangkutan menghasilkan enzim katalase yang mengubah hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1993). Menurut Irene (2015), dalam jurnalnya menyatakan reaksi positif pada uji katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung. Bakteri yang menghasilkan enzim katalase menguraikan H_2O_2 menjadi $2H_2O$ dan O_2 . Kebanyakan bakteri aerob

dan anaerob fakultatif yang menggunakan O_2 juga menghasilkan H_2O_2 yang bersifat racun bagi sistem enzimnya sendiri, namun bakteri tersebut dapat tetap hidup karena dihasilkannya enzim katalase. O_2 yang terdapat pada bakteri tanah digunakan sebagai reseptor elektron yang paling banyak digunakan dalam mendegradasi hidrokarbon. Hidrokarbon dipecah lebih cepat di bawah kondisi aerobik karena dapat membantu meningkatkan kinerja bakteri pendegradasi.

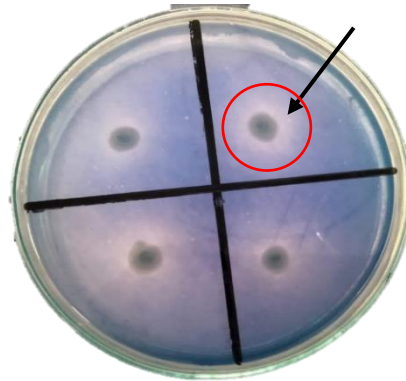
4.4 Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon sebagai Penghasil Enzim

4.4.1 Potensi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Penghasil Enzim Lipase

Berdasarkan hasil penelitian, untuk memperoleh bakteri yang mampu menghidrolisis lipid dilakukan dengan isolasi pada tanah tercemar minyak bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro terlebih dahulu. Penelitian memanfaatkan bakteri yang mengandung enzim lipase dari sampel tanah yang dapat mendegradasi hidrokarbon. Kandungan enzim lipase dapat digunakan bakteri secara langsung dengan substrat yang mengandung lemak dan tergantung dari berbagai faktor. Isolat bakteri tersebut kemudian ditumbuhkan pada media selektif lipolitik yaitu *Spirit Blue Agar* (Himedia). Media ini digunakan untuk mengidentifikasi organisme yang mampu menghasilkan enzim lipase. Enzim ini disekresikan dan menghidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan tiga asam lemak rantai panjang. Media tersebut mengandung emulsi minyak zaitun dan pewarna spirit blue. Bakteri yang menghasilkan lipase akan menghidrolisis minyak zaitun dan menghasilkan lingkaran bening di sekitar pertumbuhan bakteri (Chairunnisa, 2019).

Inokulasi isolat bakteri menggunakan media selektif *Spirit Blue Agar* (Himedia) yang memiliki kandungan trybutirin. Trybutirin merupakan trigliserida paling sederhana yang terjadi dalam lemak dan minyak alami. Media ini dihidrolisis oleh beberapa mikroorganisme yang tidak menghidrolisis trigliserida atau lemak lain yang mengandung asam lemak rantai panjang. Jika hasilnya positif, maka akan terbentuk zona bening di sekitar koloni bakteri pada media tersebut. Jika hasil negatif, tidak terbentuk zona bening di sekitar koloni bakteri pada media selektif tersebut. Medium yang digunakan mengandung banyak nutrisi yang dibutuhkan dalam masa pertumbuhannya, salah satunya yaitu lipid atau lemak sebagai sumber karbon. Nurdini (2010) menambahkan bahwa bakteri

lipolitik dapat ditemukan di banyak tempat yang mengandung lemak. Lingkungan yang mengandung lemak merupakan substrat untuk pertumbuhan bakteri lipolitik. Hasil penelitian dapat dilihat pada gambar 4.2 sebagai berikut :



Gambar 4.4 Bakteri TPY 1 pendegradasi Hidrokarbon sebagai penghasil Enzim Lipase

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang berpotensi mendegradasi hidrokarbon merupakan bakteri yang dapat menghasilkan enzim lipase. Hal ini dapat dilihat bahwa dari adanya zona bening pada sekitar koloni bakteri tersebut. Kemampuan isolat bakteri yang menghasilkan enzim lipase dapat diketahui dari diameter zona bening yang dihasilkan. Semakin besar zona bening maka banyak enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri, sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri tersebut memiliki potensi yang baik untuk memproduksi enzim lipase. Isolat TPY 1 diameter 0,4 cm. Sabrina (2018), juga menyatakan dalam penelitiannya bahwa bakteri yang positif menghasilkan enzim lipase yaitu terdapat zona bening yang terdapat di sekitar pertumbuhan koloni. Menurut Elyza (2015) dalam jurnalnya menyatakan bahwa untuk mendapatkan bakteri dengan kemampuan lebih cepat dalam menghidrolisis minyak pada media perlu ditambahkan bahan pencemar (lemak atau minyak) untuk membantu pertumbuhan mikroba sehingga jumlahnya cukup untuk mendegradasi lemak. Bezarnya zona bening yang terbentuk mengindikasikan bahwa bakteri mempunyai kemampuan tinggi dalam mendegradasi minyak. Turunnya kadar lemak disebabkan oleh lemak terhidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Asam lemak bebas ini akan mudah mengalami kerusakan sehingga menyebabkan kadar lemak menurun. Hal

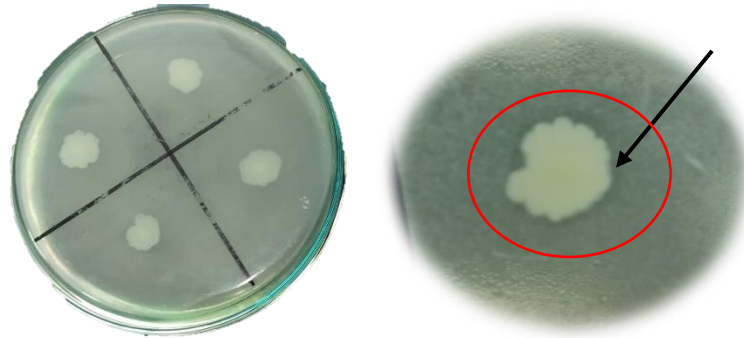
ini disebabkan karena asam yang terbentuk dapat memecah komponen lemak yang kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana sehingga menyebabkan kandungan lemak menurun.

Adanya enzim lipase pada bakteri tanah tercemar merupakan hal penting bagi bakteri dalam melakukan biodegradasi lahan tercemar minyak. Enzim lipase digunakan bakteri supaya dapat kontak langsung dengan substrat yang mengandung lipid, minyak inilah yang akan digunakan bagi bakteri sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Adanya enzim lipase sendiri tergantung dari berbagai faktor, dimana faktor inilah yang menentukan keberadaan enzim lipase untuk bekerja. Menurut Sayiful (2009), aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, temperature, dan pH, kecepatan reaksi enzim dipengaruhi kerja enzim, semakin banyak konsentrasi enzim, maka reaksi akan lebih cepat, sehingga semakin banyak substrat digunakan. Irene (2015), menuliskan dalam jurnalnya bahwa bakteri yang mampu memproduksi enzim lipase diindikasikan dapat mendegradasi minyak sehingga dapat dimanfaatkan pada lingkungan yang tercemar hidrokarbon. Enzim lipase mampu menghidrolisis lemak menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Asam yang terbentuk dapat memecah komponen minyak kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana.

4.4.2 Potensi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Penghasil Enzim Protease

Isolat bakteri yang diduga mampu mendegradasi hidrokarbon, ditumbuhkan pada media SMA (*Skim Milk Agar*) untuk mengetahui bakteri sebagai penghasil enzim protease. *Skim Milk Agar* digunakan untuk demonstrasi koagulasi dan proteolysis kasein. media ini direkomendasi oleh APHA untuk budidaya dan enumerasi mikroorganismenya yang ditemui di industri susu. Penambahan bubuk *Skim Milk* ke semua media kaya nutrisi menciptakan kondisi yang menguntungkan untuk pertumbuhan mikroorganismenya yang ditemui dalam media *Skim Milk* sehingga jumlah bakteri yang diisolasi tumbuh lebih banyak daripada jumlah organismenya yang diisolasi pada media biasa. Bakteri proteolitik terhidrolisis kasein yang membentuk senyawa nitrogen terlarut yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Zona bening akan sangat terlihat jika bakteri menghasilkan asam dari karbohidrat yang dapat difermentasi dalam medium. Tryptone menyediakan asam amino dan zat nitrogen kompleks lainnya.

Ekstrak ragi memasok vitamin B kompleks, dan penambahan *Skim Milk Powder* dalam medium dapat membuat kondisi optimal untuk mikroorganisme yang ditemui dalam susu. Glukosa berfungsi sebagai sumber karbon (Wehr H, 2004). Berdasarkan hasil penelitian isolat yang ditumbuhkan pada media *Skim Milk Agar* dapat dilihat pada gambar 4.3 sebagai berikut :



Gambar 4.5 Bakteri pendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim protease yang menunjukkan zona bening disekitar koloni yang memiliki diameter 0,2 cm.

Hasil uji bakteri penghasil enzim protease pada isolat bakteri yang diduga sebagai pendegradasi pada media *Skim Milk Agar* yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Kemampuan isolat bakteri yang menghasilkan enzim lipase dapat diketahui dari diameter zona bening yang dihasilkan. Semakin besar zona bening maka banyak enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri, sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri tersebut memiliki potensi yang baik untuk memproduksi enzim protease. Isolat TPY 1 diameter 0,2 cm Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa enzim protease yang dihasilkan dari bakteri proteolitik mampu mendegradasi substrat yang mengandung kasein yang terdapat pada media *Skim Milk Agar* secara kualitatif. Menurut Mahdiyah, (2015) dalam penelitiannya juga menemukan 5 isolat bakteri tanah yang menghasilkan enzim protease yang ditandai dengan adanya zona bening pada sekitar koloni bakteri. Adanya protease ekstraseluler bakteri menyebabkan kandungan protein pada media *Skim Milk Agar* terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino. Zona bening merupakan indikator bahwa isolat bakteri mampu memanfaatkan protein pada media sebagai sumber nutrisinya.

Menurut penelitian Soeka (2017), dalam jurnalnya menemukan isolat bakteri *Stenotrophomonas* sp. mampu merombak susu skim membentuk zona bening. Media *Skim Milk Agar* baik digunakan untuk seleksi mikroorganisme yang dapat mensekresikan enzim-enzim proteolitik ekstraseluler menghasilkan enzim protease secara kualitatif sehingga membentuk areal bening di sekitar koloni. Menurut Setyati (2015) bahwa secara umum substrat (susu skim) dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk pembelahan sel, pertumbuhan biomassa, pemeliharaan sel dan menghasilkan produk metabolit. Menurut Vijayaraghavan (2013) apabila zona bening di sekitar koloni kurang jelas seharusnya ditambahkan *Bromocresol greens* sebagai pewarna, agar supaya zona bening di sekitar koloni terlihat jelas.

Penelitian Sabrina (2018), dalam jurnalnya juga meneliti isolat bakteri penghasil enzim protease sebagai agen bioremediasi ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri. Enzim protease merupakan enzim yang bersifat biodegradable dan tidak membahayakan ekosistem akuatik. Enzim ini dapat bereaksi spesifik terhadap bermacam-macam pengotor seperti darah dan lemak yang sulit dibersihkan. Enzim protease digunakan sebagai proses bioremediasi dimana pada saat ini proses bioremediasi telah berkembang pada proses recovery limbah buangan yang berbahaya yaitu senyawa-senyawa kimia yang sulit untuk didegradasi seperti logam berat dan petroleum hidrokarbon.

Pengkajian mengenai bakteri ini terdapat dalam surat Al-Baqarah Ayat 26:

لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا

Artinya : Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih indah dari itu..... (Q.S Al-Baqarah:26).

Ash-Shiddieqi (2000) menyebutkan dalam tafsirnya bahwa lafadz “*innallaha laa yastahyi ay yadhriba ma-tsalam maa ba’udhatan fa maa fauqahaa*” memiliki makna bahwa “Tuhan tidak melihat suatu kekurangan dengan membuat perumpamaan kutu busuk atau perumpamaan makhluk yang derajatnya lebih rendah lagi atau yang lebih tinggi (besar) dari itu. Sebab, dialah yang menjadikan segala sesuatu baik yang mulia maupun yang hina, disini yang perlu digaris bawahi adalah kata “perumpamaan makhluk yang derajatnya lebih “. Adapun

mahluk yang lebih rendah dari kutu busuk ataupun nyamuk yaitu mikroba dalam hal ini bakteri.

Dijelaskan kembali dalam lanjutan ayat tersebut yakni :

فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۗ

Artinya : “..... maka, mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka.....”

Ayat tersebut memiliki makna bahwa mendengar perumpamaan tersebut, para mukmin berkata “tentu ada hikmah dan kemaslahatan yang terkandung di dalamnya dengan perumpamaan yang di buat Allah itu” (Ash-Shiddieqi, 2000). Kata “*Hikmah dan kemaslahatan*” tersebut memiliki makna bahwa bakteri yang merupakan “makhluk yang lebih rendah dari nyamuk dan kutu busuk sebenarnya memiliki hikmah”, dalam hal ini manfaat salah satunya yaitu sebagai bakteri pendegradasi hidrokarbon sebagai penghasil enzim lipase dan protease.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah diuraikan di atas, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Isolate bakteri yang berhasil didapatkan sebanyak lima isolate dengan kemampuan satu isolate terpilih yang diduga mampu mendegradasikan hidrokarbon yaitu isolate bakteri TPY 1 yang memiliki ciri-ciri morfologi makroskopik meliputi bentuk koloni bulat (around), tepi koloni rata (entire), elevasi koloni rata (flat), permukaan koloni mengkilat. Bersifat Gram negatif dengan bentuk sel basil dan memiliki endospora. Uji biokimia menunjukkan uji TSIA bagian slant (merah) dan Butt (kuning), uji SIM (+), dan uji katalase (+).
2. Isolat bakteri pendegradasi hidrokarbon (TPY 1) memiliki potensi untuk menghasilkan enzim lipase dan enzim protease.

5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan yang telah diuraikan diatas, maka saran yang dapat disampaikan untuk penelitian selanjutnya yaitu peneliti dapat melanjutkan identifikasi isolat bakteri sampai pada tahap spesies, dan peneliti dapat memanfaatkan isolat yang telah didapatkan sebagai agen biodegradasi minyak bumi di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Bojonegoro.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, Mujiono. 2001. *Agama Ramah Lingkungan Perspektif Al-Qur'an*. Jakarta: Paramadina.
- Abna, Inherni Marti, Mahayasih, Putu, dan Amir, Mellova. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Tanah di Kelurahan kampung Melayu Jakarta Timur. *Archive Pharmacia*. Vol.2.No.2 Hal. 108.
- Adam, M.R. 2001. *Microbiology of Fermentasi Food*. New York: Elsvier Applied Science Publisher, Ltd.
- Ali, Mohammad Daud. 2008. *Pendidikan Agama Islam*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Alimuddin, Ali. 2005. *Mikrobiologi Dasar Jilid 1 Cet. 1*. Makassar : UNM Press.
- Andina, Fika. 2014. Biodegradasi Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) dengan Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Air Laut dan Sedimen Pantai Karangsong Kabupaten Indramayu Jawa Barat. *Skripsi*. Universitas Padjadjaran Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan ProGram Studi Ilmu Kelautan Jatinangor.
- Barrow, G. I. dan Felthan, R.K.A. 1993. *Cowan and Steel Manual for the Identification of Medical Bacteria*. New York : Cambridge Universitt Press.
- Batubara, Umni Mardhiyah. Susilawati, Ika Oksi, dan Riany, Hesty. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Indigenou Tanah di Kawasan Kampus universitas Jambi.*Universtas Tanjungpura Pontianak*. Hal.243-244.
- Bibiana W, L. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Brown, A.E. 2005. *Microbiological Aplication*. New York : Mc Graww-Hill Companies.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 2003. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA: The William & Wilkins Company Baltimore.
- Buchanan, R.E. dan Gibbons, N.E. 2003. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The William & Wilkins Company Baltimore. USA.

- Cappuccino, J. G., dan Sherman, N. 2014. *Manual Laboratorium Mikrobiologi Edisi 8*. Jakarta : EGC.
- Cappuccino, J.G & Sherman, N. 1987. *Microbiology : A Laboratory Manual*. Clifornia : The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Cappucino, J.G. & Sherman, N. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc*. California USA.
- Cowan, S.T. 2004. *Manual for the Identification of Medical Fungi*. London: Cambridge University Press.
- Departemen Agama RI. 2009. *Al-Qur'an dan Teremahannya*. Jakarta: Yayasan Penyelenggara Penerjemahan/Penafsiran Al-Qur'an.
- Dwidjoseputro. 2009. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Djembatan.
- Dwijoseputro D. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djembatan
- Fardiaz. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: PAU pangan dan Gizi IPB.
- Gillespie & Bamford. 2008. *Mikrobiologi Medis dan Infeksi Edisi Ketiga*. Jakaarta : Erlangga.
- Gultom, Susi Susanti., Hasbi, M., dan Purwanto, Eko. 2019. Isolasi dan Identifikasi Bakteir Penghasil Biosurfaktan pada Kolam Tanah *Gathering Station – Eor Plant* di PT Bumi Siak Pusako Pertamina Hulu Provinsi Riau. *Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau*.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Hadrianto, Prasetyo. 2018. Mikroorganisme Pendegradasi TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) sebagai Agen Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Bumi. *Jurnal Sain Health*. Vol.2.No.1.
- HariPriyatna, Riky. 2016. Isolasi dan Seleksi Bakteri Indigen Pendegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi. *Skripsi*. Unversitas Sriwijaya Indralaya.
- Hatmanti, Arianti. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*. Vol.17.No.1.Hal.34.
- Hemraj, L., Diksha, S., and G. Avenet. 2013. A Review on Commonly Used Biochemical Test for Bacteria. *Innovate Journal of Life Science*. Vol.1.No.1.Hal.10.
- Hidayat, N., Padaga, M.C., dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: ANDI.

- Hifizah, Amriana. 2012. *Mikrobiologi Ternak*. Makassar : Alauddin Univeristas Press.
- Holt, J.N, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determination Bacteriology 9th Edition*. USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Irene, Desi Shintya., Dirgayusa Gusti Ngurah P., dan Pusphita, Ni Luh P.R. 2020. Identifikasi Bakteri yang Berpotensi Mendegradasi Hidrokarbon dari Substrat Mangrove dengan Tekstur Berpasir, Berlumpur, dan Tanah Liat. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*. Vol.6.No.2.Hal.178.
- Irianto, K. 2012. *Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganisme* Jilid I. Bandung : Yrama Widya.
- Irianto, Koes. 2006. *Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganisme Jilid 1*. Bandung : CV. Yrama Widya.:
- Khafidloh, Eli Nur. 2020. *Isolasi dan Seleksi Bakteri Indigen Pendegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi pada Tanah di Lokasi Tambang Minyak Wonocolo, Bojonegoro*. ProGram Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Skripsi.
- Kholis, Nur. 2010. *Pertambangan Minyak Rakyat Perspektif Hukum Ekonomi Islam dan Hukum*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatulloh.
- Kosasi, Cicilia. Lolo, Widia A. dan Sedewi, Sri. 2019. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Alga *Turbinaria ornate* (Turner) J. Argardh serta Identifikasi secara Biokimia. *Pharmacon*. Vol.8.No.2.Hal.358.
- Lay, B. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- MacFaddin, J.F. 1980. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria Second Ed*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Mahdiyah, Dede. 2015. Isolasi Bakteri dari Tanah Gambut Penghasil Enzim Protease. *Jurnal Pharmascience*. Vo.2.No.2.Hal.76.
- Manik, Karden. E. S. 2003. *Pengelolaan Lingkungan Hidup*. Jakarta: Djambatan.
- Moritania, Rizky., Effendi, Irwan., dan Feliatra, F. 2019. Isolation and Antagonism of Bacteria Test of Biota in the Mangrove Ecosystem Kayu

- Ara River Siak Regency. *Asian Journal of Aquatic Sciences*. Vol.2.No.3.Hal.195.
- Mulyo, Mufrod Teguh. 2011. Studi Analisis Tentang Pelaku Pencemaran dan Pengrusakan Lingkungan Menurut Islam dan Undang-Undang No 23 Tahun 1997 dalam Pengelolaan Sumber Daya Alam. *Wahana Akademika*. Vol.1.No.1.Hal 18.
- Muslimah, 2015. Dampak Pencemaran Tanah dan Langkah Pencegahan. *Jurnal Muslimah*. 2015. Dampak Pencemaran Tanah dan Langkah Pencegahan. *Agrisamuda Jurnal Penelitian*. Vol.2.No.1.Hal.12-13.
- Nababan, B. (2008). *Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar dari Laut Belawan*. Tesis. Medan, Indonesia: Sekolah Pascasarjana, Universitas Sumatera Utara.
- Napitupulu, Hatopan G., Rumegan, Inneke F.M., Wullur, Stenlly, dkk. 2019. *Bacillus* sp. sebagai Agensia Pengurai Dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang Menggunakan Ikan Mentah sebagai Sumber Nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*. Vol.7.No.1. Hal. 166.
- Naumi, Rizha dan Trilaksana, Agus. 2015. Pertambangan Minyak Tradisional di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedewean, Kabupaten Bojonegoro Tahun 1970-1987. *Avatara, e Journal Pendidikan Sejarah*. Vol.3.No.1.Hal.136.
- Notodarmojo, S. 2005. *Pencemaran Tanah dan Air Tanah*. Bandung: ITB Press.
- Nugroho, A. 2003. *Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi*. Jakarta : Bumi Aksara.
- Nugroho, Fransiskus Tri. dan Setiawan, Andree Wijaya. 2021. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Tanah Organik dan Anorganik di Kec. Kopeng dan Kec. Magelang. *AgriLand Jurnal Ilmu Pertanian*. Vol.8.No.1. Hal. 23.
- Palar, H. 1994. *Pencemaran & Toksikologi Logam Berat*. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. 1986, Penterjemah, Ratna Siri Hadioetommo dkk. *Dasar Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Pelczar, Michael J. dan Chan, E. C. S. 2008. *Dasar – Dasar Mikroorganisme*. Jakarta: UI Press.
- Penelitian*. Vol.2.No.1.Hal.11.

- Pratita, Maria dan Putra, Surya Rosa. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Mata Air Panas Songgoriti setelah Dua Hari Inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*. Vol.1.No.1. Hal. 4.
- Pratiwi, Aninidita.A, Suprihadi, Agung., dkk. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Pestisida Dicofol dari Tanah Sawah di Kabupaten Karawang. *Jurnal Biologi*. Vol.1.No.1.Hal.23.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi* Edisi 5. Jakarta: Erlangga.
- Priadie, Bambang. 2012. Teknik Bioremediasi sebagai Alternatif dalam Upaya Pengendalian Pencemaran Air. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. Vol.10.Hal. 41-42.
- Rahayu, Afrianti Susi, dan Gumilar, Muhammad Hidayat. 2017. Uji Cemarkan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *IJPST*. Vol.4.No.1.Hal 53.
- Rahayu, Susi afrianti dan Gumilar, Muhammad hidayat. 2017. Uji Cemarkan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *IJPST*. 4(2):51.
- Ratna, Siri. 2012. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prodesur dasar Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia.
- Ripani. Bahtiar, dan Yahdi. 2015. Perbedaan Aktivitas Bakteri Tanah Pendegradasi Minyak Antara yang Dialirkan Udara dan Penambahan Peroksida (H_2O_2) sebagai Sumber Oksigen. *Biota*. Vol.VII.No.2.Hal.175.
- Riskawati. 2016. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Patogen pada Tanah di Lingkungan Tempat Pembuangan Akhir Sampah (TPAS) Kota Makassar*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. Skripsi.
- Rizqy, Dewi Yuliana. 2018. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon dari Oli Bekas*. Jurusan Biologi Fakultas Tarbiyah dan Keguruan Universitas Islam Negeri Mataram. Skripsi.
- Sabrina, Anisa Nurul., Ethica, Stalis Norma. 2018. Potensi Bakteri Indigen Penghasil Enzim Protease dan Lipase sebagai Agen Bioremediasi Limbah Biomedis Puskesmas Tlogosari Kulon. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*. Vol.1.No.1.Hal.28.

- Sarah, M.P. Fatimawali. dan Aaltje, M. 2014. Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri pada Urine Feses dan Kalkulus Gigi pada Individu di Kecamatan Malalayang, Manado, Sulawesi Utara. *Jurnal e-Biomedik*. Vol.2.No.2.Hal.532
- Sari, Dian Purnama., Rahmawati dan P.W, Elvi Rusmiyanto. 2019. Deteksi dan Identifikasi Genera Bakteri *Coliform* Hasil Isolasi dari Minuman Lidah Buaya. *Jurnal Labora Medika*. Vol.3.No.1.Hal 31.
- Sari, Nur Indah. 2014. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Tanah di Kecamatan Pattalassang kabupaten Gowa*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. Skripsi.
- Sayuti, Irda., dan Suratni. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Limbah Cair Minyak Bumi GS Cevron Pasifik Indonesia di Desa Benar Kecamatan Rimba Melintang Rokan Hilir. *Skripsi*. Universitas Tanjungpura Pontianak.
- Setyati, W.A., Martani, E., Triyanto, Subagiyo dan Zainuddin, M., 2015. Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara. *Ilmu Kelautan*. Vol.20.No.3.Hal.163-169.
- Shihab, M. Quraish. Tafsir Al-Mishbah. 2002. *Pesan-Pesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Singleton dan Sainsbury. 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd Edition I*. Sussex, England : John Wiley and Sons.
- Soeka, Yati Sudaryati., Sulistiani. 2017. Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Stenotrophomonas* sp. Asal Gunung Bromo, Jawa Timur. *Jurnal Ilmu-ilmu Hayati*. Vol.16.No.2.Hal.208.
- Subandi. 2010. *Mikrobiologi Perkembangan Kajian dan Pengamatan dalam Perspektif Islam*. Bandung : PT Remaja Rosdakarya.
- Sudrajat, Dadang. Mulyana, Nana dan Retno, Tri. 2015. Isolasi dan Aplikasi Mikroba Indigen Pendegradasi Hidrokarbon dari Tanah Tercemar Minyak Bumi. *Pusat Sains dan Teknologi-Batan*.

- Sugoro, I. 2002. Bioremediasi Sludge Limbah Minyak Bumi Lahan Tercemar dengan Teknik Land Farming dalam Skala Laboratorium. *Tesis*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Suriyani, Irma dan Khotijah, Siti. 2013. Kajian Islam dalam Masalah Lingkungan Hidup di Kota Samarinda. *Risalah Hukum Fakultas Hukum Ummul*. Vol.9.No.1.Hal 71-78.
- Suyono, Yoyon., dan Salahudin, Farid. 2011. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Pseudomonas* pada Tanah yang Terindikasi Terkontaminasi Logam. *Jurnal Biopropal Industri*. Vol.2.No.1.Hal.10.
- Tistama, Radite., Widyastuti, Utut., dan Suharsono. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Gen Sitrat Sintase Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari Filosfer Hevea Brasiliensis Muell. Arg. *Jurnal Penelitian Karet*. Vol.31.No.2.Hal.128.
- Tivani, Innur, Amananti, Wilda, dan Sunardi, Ahmad. Uji Identifikasi *Escherichia coli* Pada Jamu Gendong Kunyit Asem di Kabupaten Tegal. *E-journal poltektegal*. Vol.8.No.1.Hal.34.
- Ulfa, A., Suarsini, E., dan M.H.I. Al Muhdhar. 2016. Isolasi dan Uji Sentivitas Merkuri pada Bakteri dari Limbah Penambangan Emas di Sekotong Barat Kabupaten Lombok Barat : Penelitian Pendahuluan. *Procereding Biology education Conference*. Universitas Negeri Malang.
- Utari, Sang Ayu S.S.L., Darmawangsa, Ida B.G., dan Suyasa, Wayan Budiarsa. 2015. Isolasi Identifikasi dan Uji Potensi Bakteri yang Berperan pada Pengolahan Air Limbah yang Mengandung Rhodamin B dalam Biosistem Tanaman. *Jurnal Simbiosis* .Vol.3.No.1.Hal.307.
- Vijayaraghavan, P. and Vincent, S.G.P., 2013. A Simple Method for The Detection of Protease Activity on Agar Plates using Bromo cresol Green Dye. *Journal of Biochemical Tehnology*. Vol.4.No.3.Hal.628-630.
- Volk, Wesley.A. dan Wheeler, Margaret.F. 1984. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta :Erlangga.
- Vyatrawan, Lukman. 2015. *Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak dengan Metode Soil Washing dan Biostimulasi*. Jurusan Teknik Lingkungan

Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Institut Teknologi Sepuluh
November Surabaya. Skripsi.

Waluyo, L. 2008. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang : Universitas
Muhammadiyah Malang Press.

Waluyo, L. 2010. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang : Universitas
Muhammadiyah Malang Press.

Wehr H. M. and Frank J. H., 2004. *Standart Methods for The Microbiological
Examination of Dairy Products 17th Ed, APHA Inch.*, Whashington, D.C.

Wulansari, D. C. 2011. *Sosiologi : Konsep dan Teori*. Bandung: Refika Aditama.

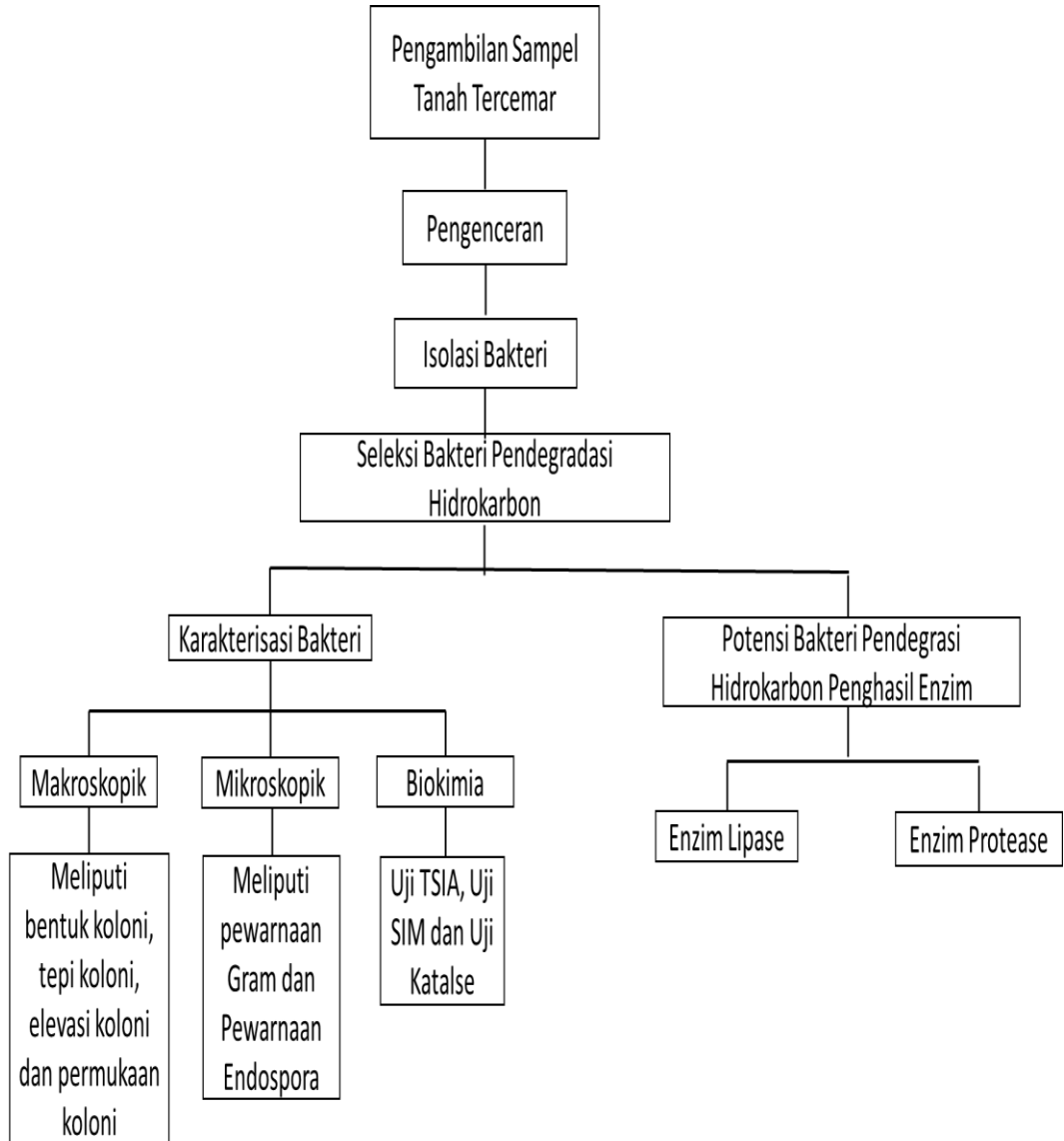
Yolantika, H., Periadnadi dan Nurmiati. 2015. Isolasi Bakteri Pendegradasi
Hidrokarbon di Tanah Tercemar Lokasi Perbengkelan Otomotif. *Jurnal
Biologi Universitas Andalas*. Vol.4.No.3.Hal.153-157.

Yudhanto. 2011. Strategi Perlawanan Petani Tambang Tradisional dalam Menjaga
Kelangsungan Hidup di Tengah Rendahnya Imbal Jasa. *Jurnal Fisip
UMRAH*. Vol.1.No.1 Hal.75-91.

Yulipriyanto, Hieronymus. 2010. *Biologi Tanah dan Strategi Pengolaannya*.
Yogyakarta:GrahaIlmu

LAMPIRAN

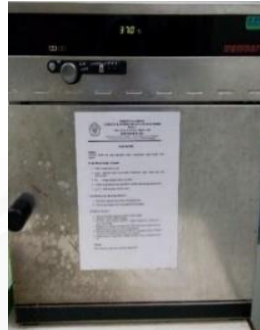
Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 2. Dokumentasi



Laminar air Flow



Inkubator



Autoklaf



Neraca Analitik



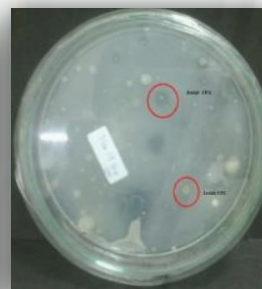
Hotplate



Mikropipet



Mikroskop



Cawan Petri