

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengambilan Sampel Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *galamai* sisa yang didapatkan dari salah satu toko oleh-oleh yang berada di kota Padang. *Galamai* sisa adalah *galamai* yang sudah mengalami perubahan rasa, teksturnya keras, terdapat mikroorganisme yang tumbuh dan berbau tengik. Bau tengik yang terdapat pada *galamai* sisa dikarenakan kandungan lemak yang tinggi. Kadar lemak yang tinggi berasal dari penggunaan santan kelapa yang cukup banyak pada saat pemasakan *galamai*.

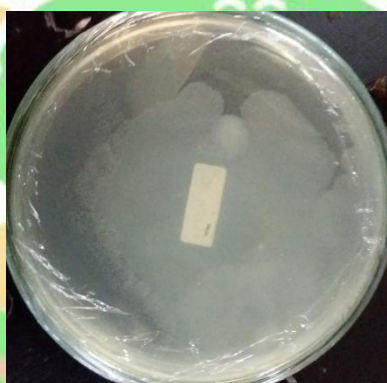
Menurut Muchtadi (2010), kerusakan bahan pangan dapat disebabkan oleh pertumbuhan dan aktivitas mikroba terutama bakteri, kapang, khamir dan aktivitas enzim – enzim di dalam bahan pangan. Kandungan lemak pada *galamai* sisa menyebabkan *galamai* sisa tersebut menjadi medium yang cocok bagi pertumbuhan mikroorganisme lipolitik yang berpotensi menghasilkan enzim lipase. Menurut Ketaren (2005), ketengikan merupakan kerusakan atau perubahan bau atau flavor dalam lemak atau pada bahan pangan yang mengandung lemak. Ketengikan dapat disebabkan oleh proses oksidasi, oleh enzim dan proses hidrolisa. Fardiaz (1992) mengatakan bahwa bahan pangan yang mengandung lemak tinggi adalah medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri lipolitik.

4.2 Isolasi Bakteri dari *Galamai*

Menurut Lim (1990), isolasi bakteri merupakan suatu cara untuk memisahkan atau memindahkan bakteri tertentu dari lingkungannya sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni. Proses isolasi yang dilakukan dimulai dengan cara menimbang *galamai* sisa (BS) sebanyak 5 gram dan diencerkan hingga mencapai pengenceran 10^{-6} . Kemudian dilanjutkan dengan inokulasi pada media. Media tersebut kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Murtius, Rahmi, dan Neswati (2015), dari hasil isolasi *galamai* sisa (BS) yang diinkubasi selama 72 jam, mikroorganisme yang tumbuh terlebih dahulu adalah bakteri. Sedangkan kapang tumbuh setelah proses inkubasi

yang berlangsung selama 72 jam. Pada *Galamai* sisa (BS) tersebut bakteri yang tumbuh adalah bakteri yang tergolong pada bakteri gram negatif.

Menurut Sumarsih (2003), bakteri lebih cepat berkembang dari pada jamur, karena bakteri memperbanyak diri dengan cara membelah diri, pembelahan terjadi setiap 15-20 menit. Sehingga dalam waktu kurang lebih 7-8 jam bakteri sudah menjadi jutaan, sedangkan jamur berkembang biak dengan spora, sehingga jamur membutuhkan waktu yang lebih lama untuk membentuk spora $\pm$ 48 jam sampai spora pecah membentuk hifa. Perkembangbiakan bakteri dipengaruhi beberapa faktor, yaitu suhu, cahaya, pengeringan (kelembaban), keasaman (pH), pengaruh O₂ dari udara, pengaruh tekanan osmotik, pengaruh mikroorganisme di sekitarnya, dan pengaruh zat kimia (desintektan) terhadap mikroba. Hasil isolasi bakteri dari *galamai* BS dengan menggunakan media *Nutrient Agar* dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil Isolasi Bakteri pada Media NA

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa isolat yang tumbuh pada media masih bergerombol dan menyebar penuh pada media. Dari hasil isolasi diatas kemudian dilakukan pengenceran kembali dengan cara mengambil satu ose koloni dari isolat sebelumnya kemudian diencerkan dengan menggunakan garam fisiologis hingga pengenceran 10^{-7} agar dapat terlihat bentuk koloni yang lebih kecil. Menurut Nurohaianah (2007), pengenceran merupakan proses yang dilakukan untuk menurunkan atau memperkecil konsentrasi larutan dengan menambah zat pelarut ke dalam larutan sehingga volume larutan menjadi berubah.

Proses selanjutnya yaitu seleksi biakan untuk mendapatkan isolat yang bersifat lipolitik dengan menggunakan media selektif. Media selektif yang digunakan adalah *nutrient agar* dengan penambahan *tween* 20 sebanyak 1% pada masing masing media. Penambahan *tween* 20 yaitu sebagai sumber lemak untuk menyeleksi mikroba yang

tumbuh sehingga yang tumbuh pada media selektif hanya mikroorganisme yang bersifat lipolitik. Menurut Dahliaty (2012) isolasi bakteri lipolitik dapat dilakukan dengan menambahkan sumber lemak pada media tumbuh. Sumber lemak yang biasa digunakan untuk isolasi mikroorganisme adalah minyak zaitun, *tween* 20 dan *tween* 80.

Penambahan *tween* 20 yaitu sebagai sumber lemak untuk menyeleksi mikroba yang tumbuh sehingga yang tumbuh pada media selektif hanya mikroorganisme yang bersifat lipolitik. Menurut Bendikiene, Surinenaite dan Joudka (2007) penambahan *tween* 20 pada media tumbuh dapat menjadi substrat yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme lipolitik karena dapat mempercepat proses hidrolisis lemak.

Ketaren (2005) menyatakan, santan kelapa mengandung asam lemak laurat sebanyak 44 - 52 % , begitu pula dengan *tween* 20 yang terdiri dari asam lemak laurat. Sehingga penambahan *tween* 20 pada media tumbuh dapat menjadi media selektif yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme lipolitik yang berasal dari *galamai* sisa. Hal tersebut dikarenakan santan kelapa adalah salah satu bahan baku yang digunakan untuk pembuatan *galamai*.

Pelczar, Michael dan Chan (2006), mengatakan bahwa penambahan lemak juga untuk menetralisasi atau mengurangi karbohidrat yang mungkin terdapat pada komponen NA. Hal ini untuk mencegah terjadinya fermentasi pada karbohidrat yang menghambat pertumbuhan mikroba lipolitik, sehingga bakteri lipolitik dapat tumbuh lebih optimal. Pemurnian ini dilakukan agar didapatkan biakan murni yang digunakan sebagai bahan untuk pengujian bakteri lipolitik. Hasil pemurnian dengan cara pengenceran bertingkat pada media NA + *tween* 20 1% dapat dilihat pada Gambar 4.2.

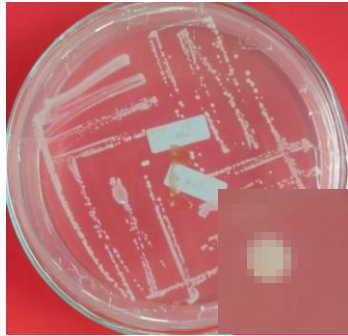


Gambar 4.2 Isolasi pada Media NA+*Tween* 20 1% pada Pengenceran 10^{-6}

Gambar 4.2 dapat dilihat mikroorganisme yang tumbuh pada media NA + *tween* 20 1% terdapat koloni yang dominan tumbuh adalah dengan ciri-ciri berwarna putih, berbentuk bulat, memiliki permukaan yang licin, basah dan agak kental. Terlihat pula bahwa koloni yang tumbuh tidak hanya satu jenis saja tetapi ada beberapa macam. Hasil isolasi *galamai* sisa dengan ciri ciri lain yaitu bentuk koloni tidak teratur, bergerigi, dan memiliki kenampakan warna yang agak keruh. Menurut Suriawiria, (2005) bentuk koloni dari mikroba berbeda-beda untuk tiap spesies dan bentuk itu merupakan ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Besar kecilnya koloni, mengkilat tidaknya, halus dan kasarnya permukaan serta warna dari koloni merupakan sifat-sifat yang diperlukan untuk identifikasi suatu spesies. Warna dari mikroba, misalnya bakteri yang baru nampak jelas apabila mikroba itu diamati dalam kelompok. Kebanyakan bakteri memiliki warna keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening, tetapi ada beberapa spesies mempunyai pigmen warna yang lebih tegas.

Menurut Gupta *et al* (2003), isolat yang bersifat lipolitik memiliki ciri-ciri koloni berbentuk bulat, permukaan mengkilat, berwarna putih dan membentuk zona jernih disekitar koloni. Dari hasil isolasi mikroorganisme pada *Galamai sisa* didapatkan ciri ciri koloni yang sesuai dengan pernyataan diatas yaitu berbentuk bulat, berwarna putih dan terdapat zona bening di sekitarnya. Sehingga koloni yang memiliki ciri yang sama kemudian diinokulasi pada media yang baru untuk dilakukan pemurnian koloni bakteri.

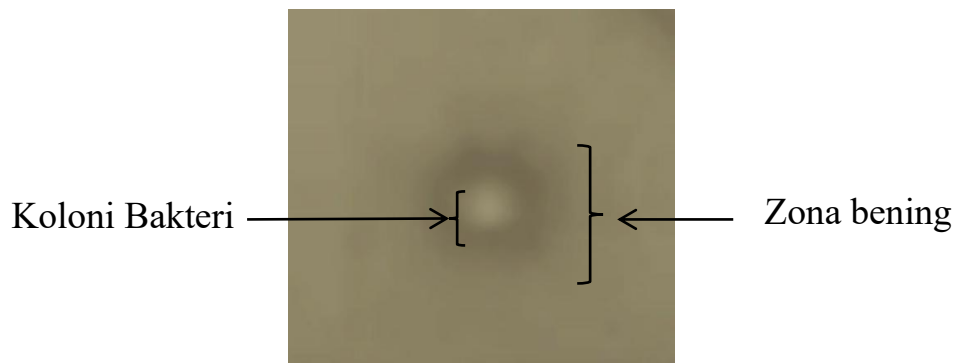
Isolat yang didapat kemudian dilanjutkan dengan teknik *streak plate*. Teknik *streak plate* adalah suatu teknik menumbuhkan mikroorganisme pada media dengan cara menggores permukaan media padat dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilisasi. Dengan teknik ini mikroorganisme yang tumbuh akan tampak dalam goresan inokulum bekas dari *streak* jarum ose. Menurut Gupte (1990), pembiakan dengan cara penggoresan merupakan cara yang sering dipakai untuk memisahkan mikroba agar mendapatkan biakan yang murni. Penggoresan dilakukan dengan teknik goresan kuadran. Hasil pertumbuhan bakteri pada media NA + *tween* 20 metode gores kuadran dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Biakan pada Media NA + *Tween* 1% Metode Gores Kuadran

Gambar 4.3 memperlihatkan bahwa bentuk koloni mengikuti bentuk goresan yaitu bentuk koloni yang bulat dengan ukuran yang kecil bergerombol dan memiliki permukaan yang mengkilat. Dari bentuk koloni yang telah seragam, dan koloni yang tumbuhpun sudah terpisah cukup jauh maka dapat disimpulkan bahwa koloni pada media pertumbuhan tersebut sudah murni sehingga dapat dilanjutkan untuk pengamatan selanjutnya. Menurut Hadioetomo (1993), bila setelah masa inkubasi koloni-koloni tersebut saling terpisahkan cukup jauh sehingga tidak bersentuhan, maka diperoleh kelompok koloni murni. Koloni murni atau biakan murni adalah biakan yang sel-selnya berasal dari pembelahan satu sel tunggal.

Kelompok bakteri lipolitik memproduksi lipase, yaitu enzim yang mengkatalis hidrolisis lemak menjadi asam-asam lemak dan gliserol (Poedjiadi, 2007). Dari hasil isolasi didapatkan beberapa koloni bakteri yang tumbuh. Kemudian dilihat apakah pada koloni tersebut terdapat zona bening atau tidak. Dari beberapa koloni hasil isolasi, didapatkan satu bentuk koloni yang memiliki zona bening di sekitar koloni. Setelah diinokulasikan pada media lipolitik yang baru maka didapatkanlah zona bening dengan diameter sebesar 15,9 mm. Nilai tersebut didapat dari pengukuran dengan menggunakan jangka sorong. Pada penelitian lainnya oleh Setyati dan Subagiyo (2012), diameter zona bening yang terbentuk berkisar antara 6,5 mm - 31,5 mm. Menurut Eliza (2015) diameter zona bening yang luas dapat mengindikasikan bahwa enzim lipase yang dikeluarkan tinggi, sedangkan diameter zona bening yang rendah dapat mengindikasikan bahwa enzim lipase yang dikeluarkan rendah. Koloni bakteri yang memiliki zona bening terdapat pada Gambar 4.4.



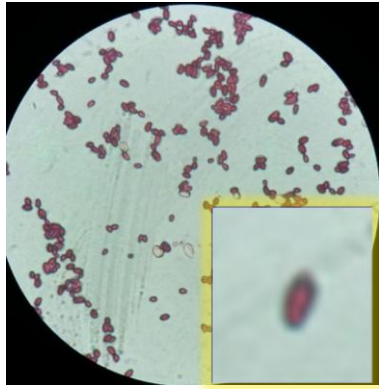
Gambar 4.4 Koloni dengan Zona Bening Disekitarnya.

Terlihat pada Gambar 4.4 bahwa isolat yang diinokulasi pada media lipolitik memiliki zona bening disekitar koloni. Menurut Suhartono (1992), terbentuknya zona bening disekitar koloni disebabkan karena adanya aktivitas mikroba dalam mendegradasi substrat. Menurut Gupta *et al* (2003), bakteri yang memiliki zona bening yang luas adalah bakteri lipolitik yang berpotensi untuk menghasilkan enzim lipase.

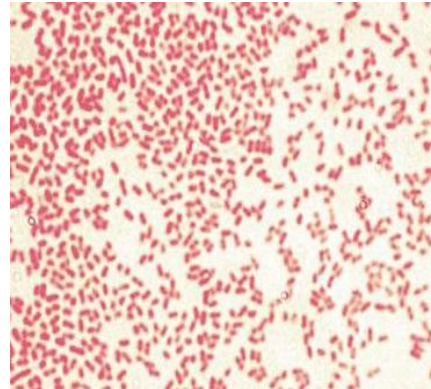
4.3 Karakterisasi

4.3.1 Pewarnaan Gram

Prinsip pewarnaan gram adalah kemampuan dinding sel mengikat zat warna dasar setelah pencucian dengan alkohol. Pada bakteri gram positif mengandung peptidoglikan lebih banyak dan lemak lebih sedikit dibanding dengan gram negatif (Fardiaz, 1992). Pewarnaan dilakukan pada koloni bakteri yang sudah dimurnikan sebelumnya dan memiliki ciri - ciri berwarna putih dan berbentuk bulat-bulat kecil. Pewarnaan yang dilakukan pada isolat bakteri memperlihatkan bahwa bakteri tersebut termasuk pada bakteri gram negatif dan berbentuk basil. Hasil pengujian pewarnaan gram pada isolat bakteri dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Hasil Pewarnaan Bakteri *Galamaisia*



Hasil Pewarnaan *Pseudomonas sp*

Gambar 4.5 Hasil Pewarnaan Bakteri *Galamaisia* Perbesaran 1500× (a), Pewarnaan Gram *Pseudomonas sp* (b)

Terlihat jelas pada Gambar 4.5 bahwa isolat tersebut termasuk pada golongan gram negatif karena hasil pengujian menunjukkan bahwa sel-sel bakteri mengikat warna safranin yaitu warna merah atau merah muda dan melepaskan warna violet yang terlihat dibawah lensa mikroskop dengan perbesaran 1500×. Menurut Pelczar *et al* (2006), bakteri gram negatif terlihat berwarna merah karena bakteri ini kehilangan pewarna kristal violet pada waktu pembilasan dengan alkohol namun mampu menyerap pewarna tandingan yaitu safranin. Bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam persentase lebih tinggi dari pada yang terkandung bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram negatif juga lebih tipis dari pada dinding sel gram positif. Terlihat pada gambar diatas, bentuk isolat pada perbesaran 1500x adalah bentuk bacil.

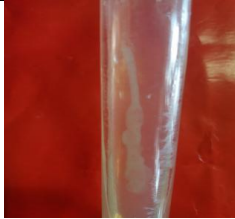
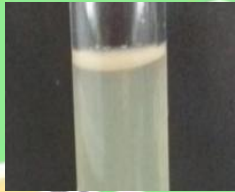
Fardiaz (1992) mengatakan bahwa, pada bakteri gram negatif, hanya 5-20% dari dinding selnya terdiri dari lapisan peptidoglikan sedangkan lapisan lainnya terdiri dari protein yaitu lipopolisakarida dan lipoprotein. Sedangkan pada bakteri gram positif, 90% dari dinding selnya terdiri dari lapisan peptidoglikan, sedangkan lapisan tipis lainnya adalah asam teikoat.

4.3.2 Uji Makroskopis

Uji makroskopis dilakukan pada media tumbuh yang berbeda yaitu pada media agar miring, agar tegak, media cair, dan pada media padat (cawan petri). Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui sifat dan karakteristik dari isolat, misalnya bentuk koloni, permukaan koloni dan kebutuhan koloni akan oksigen. Dari

berbagai macam media tumbuh mikroba didapatkan hasil morfologi yang dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Uji Makroskopis pada Berbagai Media

NO	MEDIA	HASIL	Keterangan (*)
1	Agar Miring		Bentuk : seperti batang (filliform) Elevasi Koloni : rata Warna koloni pada permukaan media NA : Putih Kekuningan
2	Agar Tegak		Bentuk Koloni : Bertonjol-tonjol Ciri - ciri koloni berdasarkan kebutuhan oksigen : Aerob Warna koloni pada permukaan media NA : Putih Kekuningan
3	Media Cair		Kekeruhan : Keruh Endapan : Tidak terdapat endapan Sifat : Berkulit Ciri - ciri koloni berdasarkan kebutuhan oksigen : Aerob
4	Media Padat		Bentuk Koloni : Titik-titik Permukaan : Halus Mengkilat Elevasi Koloni : Melengkung Tepian : Utuh Warna koloni pada permukaan media NA : Putih Kekuningan

*Sumber (Dwidjoseputro, 2003)

Tabel 4 menunjukkan bagaimana pertumbuhan bakteri pada beberapa media yang berbeda. Pada media agar miring dapat terlihat pertumbuhan koloni bakteri menyebar pada permukaan media, koloni tersebut berwarna putih dan memiliki permukaan yang licin.

Pada pertumbuhan agar tegak, bahwa pertumbuhan bakteri tersebut mengikuti bentuk tusukan jarum dan sedikit menyebar pada bagian tengah media padat. Menurut Dwidjoseputro (2003), tujuan isolasi dengan menggunakan media agar tegak adalah untuk melihat kebutuhan oksigen bakteri tersebut tumbuh. Dapat dilihat dari hasil media agar tegak, bahwa koloni bakteri tersebut bersifat aerob. Isolasi yang dilakukan pada media cair bertujuan untuk melihat pola pertumbuhan bakteri tersebut berdasarkan kebutuhan oksigennya. Berdasarkan hasil yang didapatkan, bahwa

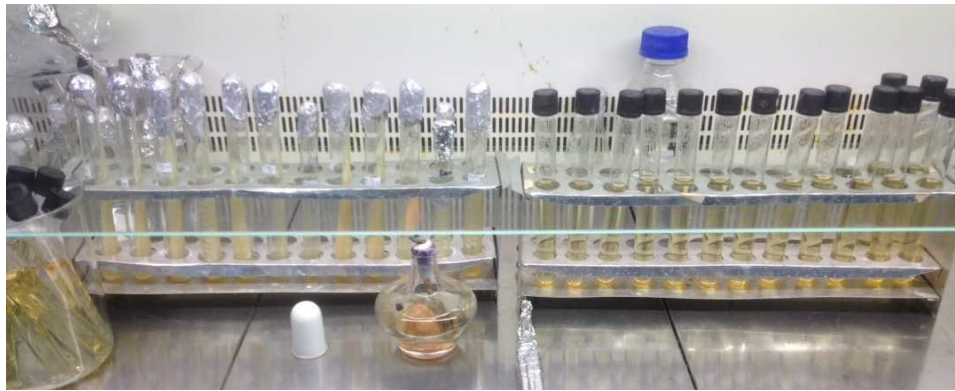
bakteri yang tumbuh pada media tersebut bersifat aerob, karena koloni bakteri tersebut berada pada bagian permukaan media bukan pada bagian dasar media (mengendap).

Pada tahapan selanjutnya bakteri diisolasi pada media padat di atas cawan petri. Tujuan isolasi pada media padat ini adalah untuk melihat bentuk, elevasi dan pertumbuhan bakteri tersebut. Dapat dilihat bahwa koloni yang tumbuh pada media memiliki bentuk yang bulat, permukaannya mengkilat dan permukaan koloni tersebut jika dilihat dari samping membentuk gumpalan seperti menggantung.

Hasil karakterisasi secara morfologi menunjukkan bahwa bakteri yang mencemari *galamai* memiliki ciri-ciri yang sama seperti yang dimiliki oleh bakteri *Pseudomonas sp.* Beberapa hal yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut diduga kuat termasuk kedalam kelompok *Pseudomonas sp* antara lain hasil uji yang dilakukan pada bakteri pencemar *galamai* memiliki ciri-ciri koloni yang tumbuh berwarna putih, berbentuk bulat, tergolong pada gram negatif, berbentuk basil dan bersifat aerob. Ciri-ciri tersebut memiliki hasil yang sama dengan uji yang dilakukan oleh Winarni (2013). Menurut Winarni (2013) Ciri-ciri bakteri *Pseudomonas sp* adalah memiliki sifat aerob, berwarna putih, berbentuk bulat, bersifat motil dan pada hasil pewarnaan gram didapatkan bentuk basil dan tergolong bakteri gram negatif.

4.3.3 Uji Biokimia

Hasil pengamatan mikroskopis dan makroskopis kemudian dilengkapi dengan uji biokimia, hal ini dilakukan untuk meyakinkan dalam proses identifikasi. Beberapa pengamatan biokimia yang dilakukan adalah uji gula-gula, degradasi pati, degradasi lemak dan protein (kasein dan gelatin) dan katalase. Tabel pengamatan uji biokimia pada tabel 5 menunjukkan hasil positif lemah dan kuat serta negatif. Pengujian dikatakan positif apabila menunjukkan ciri-ciri: adanya gelembung udara pada media, adanya kekeruhan atau perubahan warna media sampai dengan adanya sediment. Hal tersebut memperlihatkan bahwa isolat dapat tumbuh pada media yang telah diberi perlakuan sesuai dengan uji yang dilakukan. Artinya isolat mampu tumbuh dengan baik atau memfermentasi gula-gula, pati, dan protein. Gambar 4.6 Uji biokimia dan Tabel pengamatan uji biokimia isolat bakteri ditampilkan pada tabel 4.2



Gambar 4.6 Uji Biokimia Fermentasi Gula-Gula

Tabel 4.2 Pengamatan Uji Biokimia Isolat Bakteri

Kode	Pengamatan Uji Biokimia										
	Glu	Fruk	Lak	Deks	Suk	Arab	Pati	Kas	Gel	T20	Katalase
DSK	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-
DSP	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	-
KB1 X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
KB1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
KB2	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-
KSK1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KSKP2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
KSKP2 X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
KSB 1	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+
KSB 2	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+	-
KSK 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
KSP 1	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-
KSP 2	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+
KSKK 1	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	-

Ket: + = keruh, tidak ada gelembung atau sebaliknya

++ = Keruh dan ada gelembung

- = Negatif

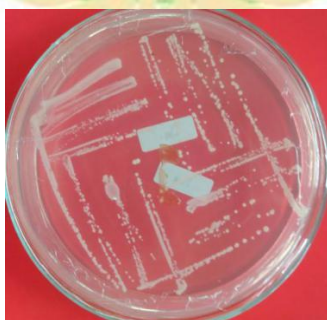
4.4 Pemurnian Isolat

Telah dihasilkan 5 isolat murni yang diduga potensial, pada tahap pertama telah dilakukan isolasi dari *galamai* sisa. Dimana terdapat 17 isolat (14 bakteri dan 3 kapang) dan setelah dilakukan karakterisasi: tipe pertumbuhan, aktivitas amilolitik

dan lipolitik serta uji biokimia. Adapun morfologi koloni bakteri dapat dilihat pada tabel 4.3 berikut. Gambar 4.7 memperlihatkan salah satu pertumbuhan bakteri pada cawan petri

Tabel 4.3 Morfologi Koloni Bakteri pada Beberapa Media

Karakteristik Koloni Bakteri							
Kode Isolat	Agar miring	Media cair	Kebutuhan O ₂	Agar Tegak	Petri		
					Ukuran	Bentuk	Margins
DSK	Echinulate	Uniform turbidity	(Facultative Anaerobe)	Papilliate	Kecil	Circular	Entire
DSP	Echinulate	Sediment	Anaerobe	Papilliate	Kecil	Circular	Entire
KB1 X	Spreading	Fluculent growth	(Facultative Anaerobe)	Papilliate	Kecil	Irregular	Undulate
KB1	Spreading	Fluculent growth	(Facultative Anaerobe)	Papilliate	Kecil	Irregular	Undulate
KB2	Spreading	Fluculent growth	(Facultative Anaerobe)	Papilliate	Moderate (sedang)	Circular	Entire
KSKP1	Echinulate	Uniform turbidity	(Facultative Anaerobe)	Papilliate	Pin Point (titik)	Irregular	Undulate
KSKP2	Echinulate	Fluculent growth	(Facultative Anaerobe)	Papilliate	Kecil	Irregular	Undulate
KSKP2 X	Echinulate	Pellicle	Aerobe	Papilliate	Moderate (sedang)	Circular	Entire
KSB 1	Echinulate	Sediment	Anaerobe	Papilliate	Moderate (sedang)	Circular	Entire
KSB 2	Spreading	Sediment	Anaerobe	Papilliate	Kecil	Circular	Entire
KSK 1	Echinulate	Uniform turbidity	(Facultative Anaerobe)	Papilliate	Kecil	Irregular	Undulate
KSP 1	Echinulate	Sediment	Anaerobe	Papilliate	Moderate (sedang)	Circular	Entire
KSP 2	Plumose	Sediment	Anaerobe	Papilliate	Moderate (sedang)	Circular	Entire
KSKK 1	Echinulate	Uniform turbidity	(Facultative Anaerobe)	Filiform	Kecil	Irregular	Undulate



Gambar 4.7 Koloni Bakteri pada cawan petri

Langkah awal yang dilakukan untuk mengetahui karakteristik koloni bakteri adalah dengan mengisolasi pada media NA terlebih dahulu, kemudian dilakukan

pemisahan koloni berdasarkan perbedaan koloni secara makroskopis. Diantara pengamatan makroskopis adalah bentuk koloni dan warnanya. Pemisahan ini dilakukan sebanyak 3 kali supaya isolat yang diperoleh benar-benar murni. Karakterisasi koloni dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni pada media padat dan media cair, media padat dibagi lagi pada agar tegak, miring dan cawan petri. Karakter pertumbuhan pada berbagai media juga memperlihatkan kebutuhan isolat akan oksigen (tabel 4.3).

Langkah selanjutnya dilakukan pemindahan koloni bakteri pada media selektif (strach agar dan lipid agar) untuk mengetahui apakah isolat mampu mendegradasi lipid dan amilum. Media ini juga digunakan untuk menyeleksi isolat yang potensial penghasil enzim ketraseluler dan yang tidak. Adapun hasil pengamatan menunjukkan semua koloni mampu hidup pada media selektif tersebut akan tetapi zona bening yang dihasilkan bervariasi (dari yang terluas dan yang tidak ada).

Media isolasi dan prosedur merupakan pilihan tersendiri (peneliti), tapi harus memperhatikan faktor pertumbuhan mikroorganisme tersebut, terutama penyebab faktor stres mikroorganisme tersebut. Mikroorganisme akan mudah tumbuh, pada media selektif dan juga dengan waktu dan suhu inkubasi yang tepat (Roberts and Greenwood, 2003). Isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari *galamai* leftover adalah sebanyak 14 isolat dengan variasi morfologi pada tabel 4.4.

Selanjutnya untuk menetapkan isolat potensial pendegradasi lipid dilakukan pemindahan pada media selektif untuk lipolitik (NA + tween 20). Isolasi bakteri lipolitik dapat dilakukan dengan menambahkan sumber lemak pada media tumbuh. Sumber lemak yang biasa digunakan untuk isolasi mikroorganisme adalah minyak zaitun, tween 20 dan tween 80 (Dahliaty., Susanti, dan Haryani. 2012).

Tabel 4.4 Karakteristik Morfology Koloni Bakteri *Galamai*

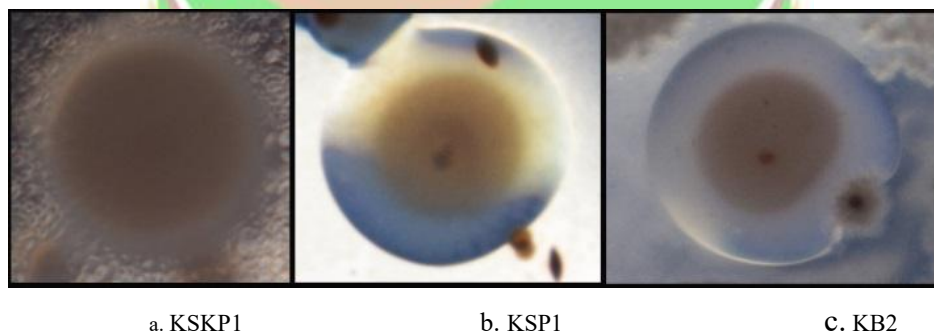
Morfology Koloni Bakteri				
Isolat	Bentuk	Tepian	Ukuran	Warna
KSKK 1	Circular	Entire	Kecil	Putih Kekuningan
KSKK 2	Irregular	Undulate	Kecil	Putih Kekuningan
KSKP1	Circular	Entire	Pin point	Putih
KSKP2	Irregular	Undulate	Pin Point	Putih
KSKP3	Irregular	Undulate	Kecil	Putih
KSKP4	Circular	Entire	Moderate	Putih
KSB 1	Circular	Entire	Besar	Putih
KSB 2	Circular	Entire	Besar	Putih
KSK 1	Irregular	Undulate	Kecil	Putih

KSP 1	Circular	Entire	Moderate	Putih Kekuningan
KSP 2	Circular	Entire	Moderate	Putih
KB1	Irregular	Undulate	Moderate	putih
KB2	Irregular	Undulate	Moderate	Putih
KB3	Circular	Entire	Moderate	Putih

4.5 Kemampuan Bakteri Pendegradasi Lipid

Indikasi tumbuhnya bakteri pendegradasi lemak pada media selektif untuk lipolitik ditandai dengan tumbuhnya koloni berwarna putih mengelompok (pin point) setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C (Januar., Khotimah, and Mulyadi, 2013). Kebanyakan bakteri pendegradasi lipid tidak menghasilkan pigmen, sehingga koloninya adalah putih atau putih kekuningan (Atlas, 2006). Selanjutnya Bakteri yang memiliki zona bening yang luas adalah bakteri lipolitik yang berpotensi untuk menghasilkan enzim lipase (Gupta., Rathi., Gupta., Bradoo, 2003).

Terbentuknya zona bening disekitar koloni disebabkan karena adanya aktivitas mikroba dalam mendegradasi substrat (Suhartono, 1992). Diameter zona bening yang luas dapat mengindikasikan bahwa enzim lipase yang dikeluarkan tinggi, sedangkan diameter zona bening yang rendah dapat mengindikasikan bahwa enzim lipase yang dikeluarkan rendah (Eliza., Gofar and Munawar. 2015). Gambar 4.8 menunjukkan terbentuknya zona bening disekitar koloni.

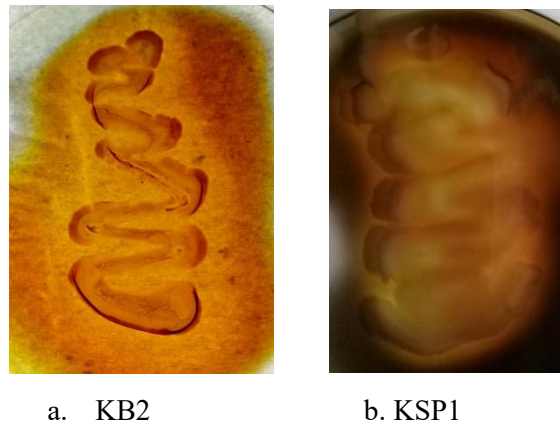


Gambar 4.8 Zona Bening yang Terbentuk Disekitar Koloni

4.6 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Pendegradasi Amilum

Indikasi tumbuhnya bakteri pendegradasi amilum pada media selektif adalah dengan meneteskan koloni yang telah tumbuh menggunakan Iodin 10%. Cara ini memperlihatkan amilum (media) yang telah didegradasi oleh bakteri. Media yang telah terdegradasi akan memperlihatkan adanya zona bening (perpendaran) disekitar koloni, atau sampai sejauh mana bakteri tersebut dapat menguraikan amilum (media)

diketahui dari luas areal bening yang dihasilkan. Adapun gambar 4.9 menyajikan koloni KSP1 dan KB2 memperlihatkan areal beningnya.



Gambar 4.9 Areal Bening yang Dihasilkan KB2 dan KSP1

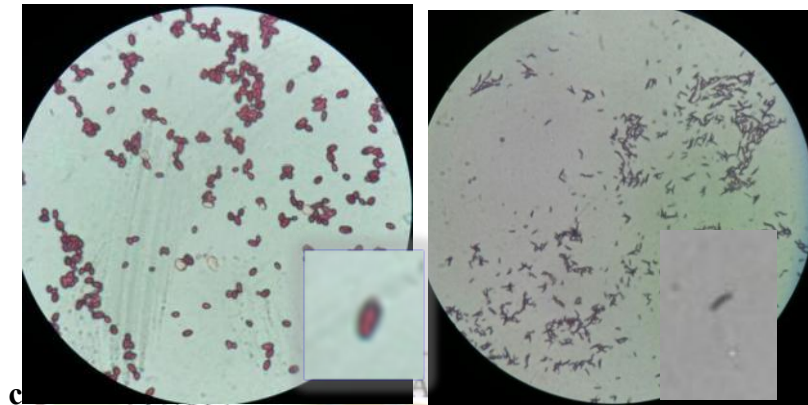
4.7 Identifikasi

Setelah diperoleh hasil pengamatan pada tahap sebelumnya atau berdasarkan tabel 4.3 dan 4.4 selanjutnya dilakukan identifikasi, tahap awal identifikasi adalah pengamatan secara mikroskopis yaitu pewarnaan gram dan pewarnaan spora, sekaligus untuk mengetahui bentuk bakteri yang diamati. Hasil pengamatan pewarnaan dapat dilihat pada tabel 4.5 berikut:

Tabel 4.5 Pengamatan Mikroskopis Isolat Bakteri

Kode Isolat	Bentuk Koloni	Gram	Endospora
DSK	Coccobacili	Negatif	No
DSP	Coccobacili	positif	No
KB1 X	Coccobacili	Negatif	terminal
KB1	Staphylococcus	Negatif	No
KB2	Coccobasil	Positif	Sub terminal, central
KSKP1	Basil	Negatif	No
KSKP2	Coccobacili	Negatif	No
KSKP2 X	Basil	Negatif	No
KSB 1	Diplococcus	Negatif	No
KSB 2	Coccus	Negatif	No
KSK 1	Coccobacili	Negatif	No
KSP 1	Basil	Positif	central
KSP 2	Coccus	Negatif	No
KSKK 1	Coccobacili	Negatif	terminal

Gambar 4.10, menunjukkan hasil pewarnaan gram koloni bakteri menunjukkan adanya gram negatif dan positif pada *galamai* sisa dan Gambar 4.11 menjelaskan hasil pewarnaan endospora serta sporanya.



Gambar 4.10 Pewarnaan Gram Salah Satu Koloni Bakteri



Gambar 4.11 Endosporan Central pada Koloni KSP1

Langkah selanjutnya adalah mencocokkan isolat yang potensial atau tingkat kemiripan dari isolat KSKP1 dengan *Staphylococcus*, sp. dan isolat KSP1 dan isolat KB2 dengan *Bacillus*, sp. Menurut buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Famili *Micrococcaceae* bersifat aerobik dan katalase positif. *Staphylococcus*, sp. termasuk bakteri berbentuk bulat yang terdapat dalam bentuk tunggal, berpasangan, tetrad, atau berkelompok seperti anggur. Beberapa spesies memproduksi pigmen berwarna kuning hingga orange. Bakteri ini membutuhkan nitrogen organik (asam amino) untuk pertumbuhannya, dan bersifat anaerobik fakultatif (Fardiaz, 1992). Morfologi dan uji biokimia bakteri pendegradasi lemak

dan dibandingkan dengan *Bergey's of Manual Determinative Bacteriology* pada tabel 4.6.

Tabel 4.6 Morfology and Biochemical Test Bakteri Pendegradasi Potensial

Karakter	KSKP1	<i>Staphylococcus</i> , sp. Menurut Bargey's of Manual Determinative Bacteriology	KSP1	KB2	<i>Bacillus</i> , sp. Menurut Bargey's of Manual Determinative Bacteriology
Permukaan koloni	Licin Mengkilat	Licin Mengkilat	Licin Mengkilat	Licin Mengkilat	Licin Mengkilat
Bentuk Sel	cocci	Cocci	Bacili	Bacili	Bacili
Gram character	+	+	+	+	+
Spore	No	No	Central	Terminal	Central/ Terminal/Sub-terminal
Glukosa	A	A	A	AG	+
Fruktosa	AG	+	AG	AG	+
Laktosa	A	A	A	A	+
Dektrosa	A	A	A	A	+
Sukrosa	AG	A	A	A	+
Arabinosa	A	A	A	A	+
Catalase	+	+	-	+	+/-
Metabolism	Facultative anaerobe	Aerobik/Facultative anaerobe	Microaerofilik	Aerobik	Aerobik/Microaerofilik/A naerob

Keterangan:
A = Acid
AG = Acid and Gas

Bakteri *Bacillus* terdiri dari 22 spesies, dimana banyak diantaranya ditemukan pada makanan. Bakteri ini bersifat aerobik sampai anaerobik fakultatif, katalase positif dan hanya beberapa yang negatif, dan membentuk spora (central, terminal dan sub-terminal, tergantung spesiesnya. Beberapa spesies *bacillus* juga bersifat lipolitik (memecah lipid) (Fardiaz, 1992). Bakteri pendegradasi lipid yang sering dijumpai diantaranya *Bacillus*, sp, *Klebsiella*, sp. Dan *Staphylococcus*, sp.. Beberapa mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim hidrolisis lipase adalah *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Aspergillus*, *Alcaligenes* (Sopandi and Wardah. 2014). Isolat *Bacillus*, sp. mampu mendegradasi bahan organik (Retnosari and Shovitri, 2013)

Biodegradasi merupakan proses penguraian yang dapat menurunkan kandungan organik dalam suatu bahan dan berlangsung secara biologis atau dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme yang ada (Retnosari dan Shovitri, 2013).

Biodegradasi karbohidrat, lemak dan protein atau bahan organik pada umumnya dilakukan oleh *Bacillus* spp. *Bacillus* spp. Pada umumnya berbentuk batang atau bulat panjang, bersifat motil dan memiliki flagelium khas lateral, membentuk endospora dan termasuk dalam kelompok gram positif (Pelczar dan Chan, 1986).

Darmayasa (2008) dalam Januar, Khotimah dan Mulyadi (2013), jenis bakteri pendegradasi lipid yang banyak dijumpai adalah kelompok *Bacillus*, sp, *Staphylococcus*, sp dan *Klepsiela*, sp. Januar, Khotimah dan Mulyadi (2013), menyatakan kelompok *Bacillus*, sp biasanya mempunyai kemampuan dalam menfermentasi gulagula seperti glukosa, laktosa dan maltosa, bersifat aerobik sejati atau anaerobik fakultatif.

Selanjutnya 3 isolat yang dianggap paling potensial menghasilkan enzim lipase atau yang dominan ada pada *galamai* BS. Isolat tersebut dilakukan identifikasi dengan metode Determinasi gen 16S rRNA. Hasil identifikasi seperti pada tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil Uji Identifikasi Bakteri

No.	Kode sampel	Hasil Uji	Homology (%)	Metode Uji
1.	Isolat A	<i>Staphylococcus cohnii</i>	99	Determinasi gen 16S rRNA
2.	Isolat B	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	Determinasi gen 16S rRNA
3.	Isolat C	<i>Bacillus cereus</i>	99	Determinasi gen 16S rRNA

Isolat A merupakan isolat yang dominan terdapat pada *galamai* sisa di awal kerusakannya, sedangkan isolat B dan C adalah isolat yang dari minggu pertama hingga minggu ke-3 selalu ditemui pada *galamai* BS dengan jumlah yang lebih sedikit dibanding isolat A. Sebagaimana diketahui kelompok basilus merupakan kelompok yang juga ditemui pada limbah rumah tangga, artinya kelompok ini terlibat dalam mendegradasi limbah rumah tangga. Limbah rumah tangga terdiri dari bahan organik seperti lemak, karbohidat dan ataupun protein. Untuk melihat kemampuan strain ini dalam menghasilkan enzim eksraseluler diperlukan penelitian lanjutan.

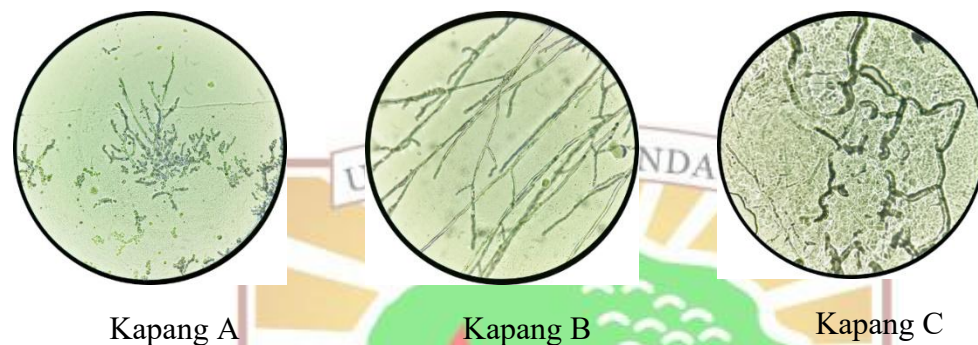
Bacillus cereus pada umumnya ditemukan pada tanah, material tanaman, jerami kering, makanan mentah dan matang serta mampu membentuk enterotoksin kompleks. Spesies ini mampu bertahan terhadap air panas, spora nya mampu melakukan germinasi selama proses penyimpanan (Cicilia, A. P, 2012).

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri gram positif berbentuk batang. Jika nutrient dimana dia hidup sangat kaya, maka bakteri ini hanya tumbuh pada fase

vegetatif, namun jika makanan tempat tumbuhnya menurun maka bakteri ini akan membentuk spora dorman yang mengandung satu atau beberapa jenis kristal protein. Kristal ini mengandung protein yang disebut δ -enterotoksin, yang bersifat lethal jika dimakan oleh serangga yang peka (Bahagiawati, 2002).

4.8 Hasil Pengamatan Kapang

Pengamatan kapang adalah terhadap morfologi koloni kapang, hasil pengamatan disajikan pada gambar 4.12 berikut.



Gambar 4.12 Morfologi Kapang yang Diisolasi dari *Galamai*

Gambar 4.12, menggambarkan morfologi koloni kapang yang diisolasi dari *galamai* BS, dimana terdapat 3 jenis kapang pada *galamai* yang telah mengalami kerusakan. Kapang merupakan mikroba dengan struktur halus berupa benang-benang (*hifa*) yang terjalin seperti jala (*mycelium*). *Hifa* dapat berekat (*septat*) dengan inti tunggal/lebih dan *hifa* tidak bersekat (*aseptat*). Penampakan morfologi koloni pada umumnya seperti benang (*filamentous*) yang pertumbuhannya membentuk lingkaran. Morfologi koloninya dapat dengan mudah dibedakan dengan bakteri, koloni kapang memiliki keragaman warna yang muncul dari sporanya.

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan diperoleh hasil kemampuan masing masing isolat dalam memproduksi enzim ekstraseluler (amilase dan lipase). Dimana seluruh isolat memiliki kemampuan dalam memproduksi, akan tetapi dengan aktivitas yang berbeda. Kegiatan penelitian dimulai dengan mengukur waktu pertumbuhan optimum dari masing masing isolat. Hal ini dilakukan untuk menentukan waktu inkubasi, sehingga diperoleh produksi enzim optimum.

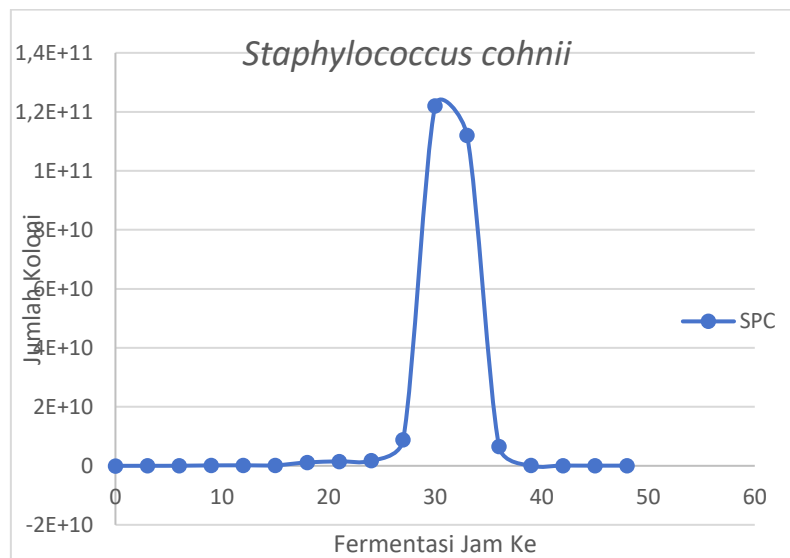
4.9 Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan masing masing isolat diukur sesuai dengan sifat pertumbuhannya. Untuk bakteri dilakukan dengan jangka waktu yang lebih cepat

dibandingkan kapang. Karena pertumbuhan bakteri lebih cepat dibandingkan kapang. Kurva pertumbuhan isolat *Staphylococcus cohnii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Corioloropsis polyzona*, *Cerrena sp.* dan KP C disajikan berturut turut pada grafik berikut.

4.9.1 *Staphylococcus cohnii*

Kurva pertumbuhan bakteri *Staphylococcus cohnii* disajikan pada Gambar 4.13 berikut.



Gambar 4.13 Kurva Pertumbuhan Isolat *Staphylococcus cohnii*

Grafik 4.13 Diatas menggambarkan kurva pertumbuhan bakteri *Staphylococcus cohnii*. Kurva pertumbuhan bakteri terdiri dari beberapa tahapan/fase, yaitu: fase adaptasi (lag phase), fase pertumbuhan dipercepat (log phase), fase tetap (stationary phase) dan fase kematian (death phase). Fase adaptasi berlangsung sekitar 16 jam, hal ini sejalan dengan waktu kerusakan *galamai*. Dimana umur simpan *galamai* dari setelah dimasak adalah kurang lebih 2 hari (24 jam), berarti bakteri sudah mulai tumbuh dari jam ke 16. Setelah 16 jam, terlihat kenaikan jumlah bakteri atau memasuki fase logaritma, hingga puncaknya di jam ke 30. Fardiaz (1992) menjelaskan singkat atau lama nya fase adaptasi dipengaruhi oleh beberapa hal, jumlah inokulum yang ditambahkan, kondisi fisiologi dan morfologis dari isolat yang diinokulasikan (jika isolat berada pada fase kematian atau fase tetap, maka isolat tersebut akan membutuhkan waktu yang lama untuk beradaptasi, dan jika dibutuhkan waktu singkat berarti isolat berada pada fase logaritma). Dan selanjutnya media yang

digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri tersebut. Jika isolat ditumbuhkan pada media yang sama, isolat akan membutuhkan waktu yang singkat untuk beradaptasi.

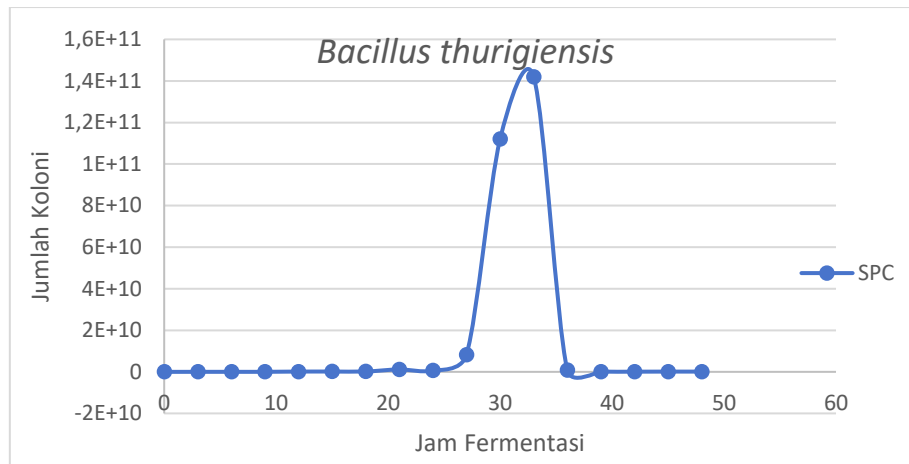
Fase kedua adalah fase logaritma, bakteri *Staphylococcus cohnii* memasuki fase logaritma setelah jam ke 24, dan puncaknya pada jam ke 30. Fase logaritma yang berlangsung kurang lebih 14 jam, menandakan waktu produksi enzim ekstraseluler oleh bakteri tersebut berlangsung cukup lama, dimana sel mengalami pertambahan populasi hingga $1,2 \times 10^{11}$ CFU/ml. Pelczar dan Chan (2005) menjelaskan pada fase logaritma konsentrasi sel atau biomassa meningkat sehingga massa sel menjadi dua kali lipat, dimana sel akan mengalami pembelahan dengan laju sel yang konstan. Seperti halnya menurut Djide dan Sartini (2008), Fase logaritmik biasanya bakteri akan menghasilkan senyawa metabolit primer dan kemudian diikuti dengan metabolit sekunder.

Setelah jam ke 30 atau puncak dari fase logaritma tersebut, jumlah sel cenderung tetap yang dikenal dengan fase stasioner, dimana fase ini berlangsung sangat singkat (sekitar 3 jam). Selanjutnya bakteri memasuki fase kematian, yang ditandai dengan menurunnya jumlah sel hidup. Kedua fase tersebut dipengaruhi oleh nutrisi pada media yang semakin habis serta jumlah metabolit yang dihasilkan semakin menumpuk.

4.9.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri berbentuk batang, gram positif. Bakteri ini memproduksi kristal protein di *inclusion body* nya pada saat ia bersporulasi. Dimana jika bakteri ini tumbuh pada media yang kaya maka ia hanya tumbuh pada fase vegetatif saja, sedangkan jika ia berada pada fase stasioner hingga kematian ia akan membentuk spora dorman yang mengandung satu atau lebih jenis protein. Bakteri ini dikenal sebagai bioinsektisida, namun ada juga yang melaporkan *Bacillus thuringiensis* merupakan salah satu bakteri yang mampu menghasilkan enzim kitinase. Sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan *Bacillus* dalam menghasilkan amilase dan lipase.

Kurva pertumbuhan *Bacillus thuringiensis* disajikan pada Gambar 4.14 berikut



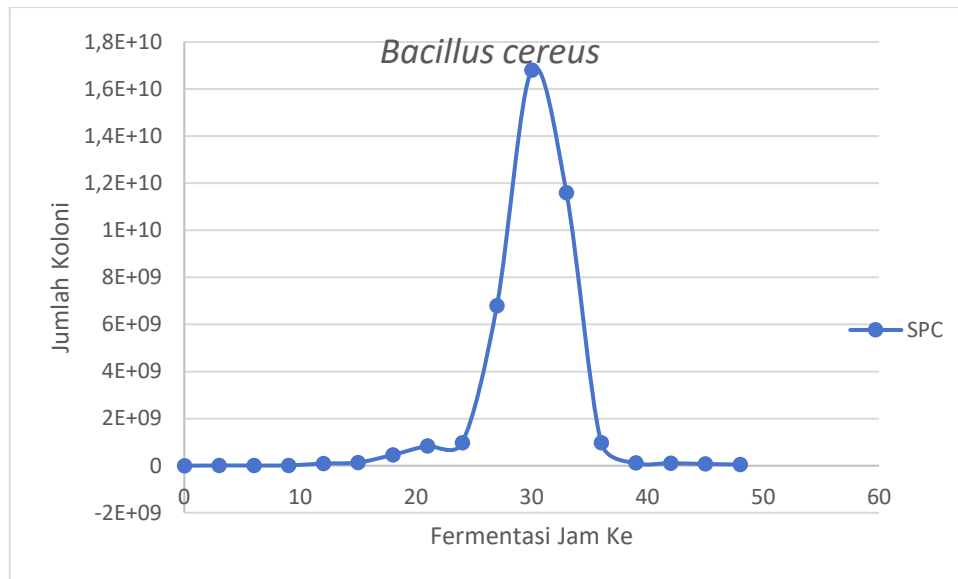
Gambar 4.14 Kurva Pertumbuhan *Bacillus thuringiensis*

Seperti halnya isolat 1 (*Staphylococcus cohnii*), isolat *Bacillus thuringiensis* juga ditentukan waktu produksi optimum, hal ini bertujuan untuk menentukan lama inkubasi. Berbeda dengan *Staphylococcus cohnii*, fase adaptasi isolat ini berlangsung hingga jam 20 dan baru dilanjutkan dengan fase logaritma hingga jam 31. Fase stationer hanya berlangsung kurang lebih 2 jam. Kemudian dijam ke 33 bakteri memasuki fase kematian.

4.9.3 *Bacillus cereus*

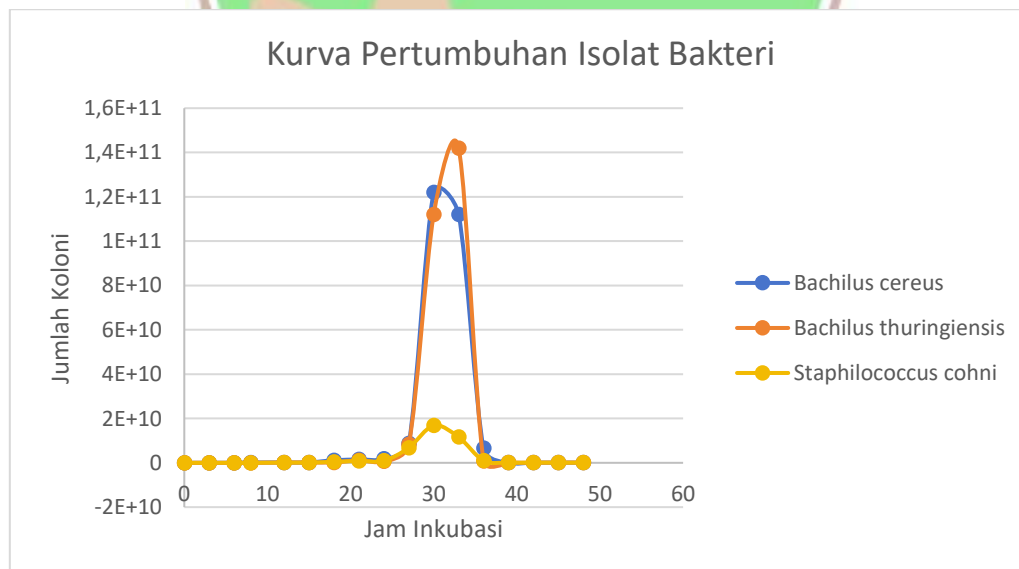
Bacillus sp. merupakan divisi bakteri yang banyak dijumpai atau tersebar di alam. *Bacillus cereus* merupakan spesies yang banyak di jumpai pada tanah dan makanan, dimana bakteri ini memiliki karakteristik sebagai penghasil antibiotik dan enzim (Hatmanti, 2000). Marga *Bacillus* yang merupakan beberapa jenisnya mampu menghasilkan enzim ekstraselluler yang dapat menghidrolisa protein dan polisakarida kompleks. Ardiyanto (2012) melaporkan bahwa *Bacillus cereus* dikenal sebagai salah satu penyebab keracunan makanan sejak tahun 1955. Menurut data yang dilaporkan ke WHO tahun 1990, 5% dari kasus keracunan makanan di Eropa disebabkan oleh akteri ini, dimana jumlah minimal *Bacillus cereus* pada makanan sekitar 10^5 sel/g pangan sudah dapat menyebabkan keracunan.

Kurva pertumbuhan *Bacillus cereus* disajikan pada Gambar 4.15 berikut



Gambar 4.15 Kurva Pertumbuhan *Bacillus cereus*

Waktu adaptasi *Bacillus cereus* berlangsung sekitar 16 jam, kemudian setelah jam ke 16 hingga 30 terjadi pertumbuhan dipercepat (logaritmik phase), kemudian dengan waktu yang sangat singkat (lebih kurang 2 jam) bakteri mengalami fase stasioner dan kemudian memasuki fase kematian. Hingga waktu produksi optimum ditetapkan mulai jam ke 30. Adapun kurva pertumbuhan ke-4 isolat disajikan pada Gambar 4.16



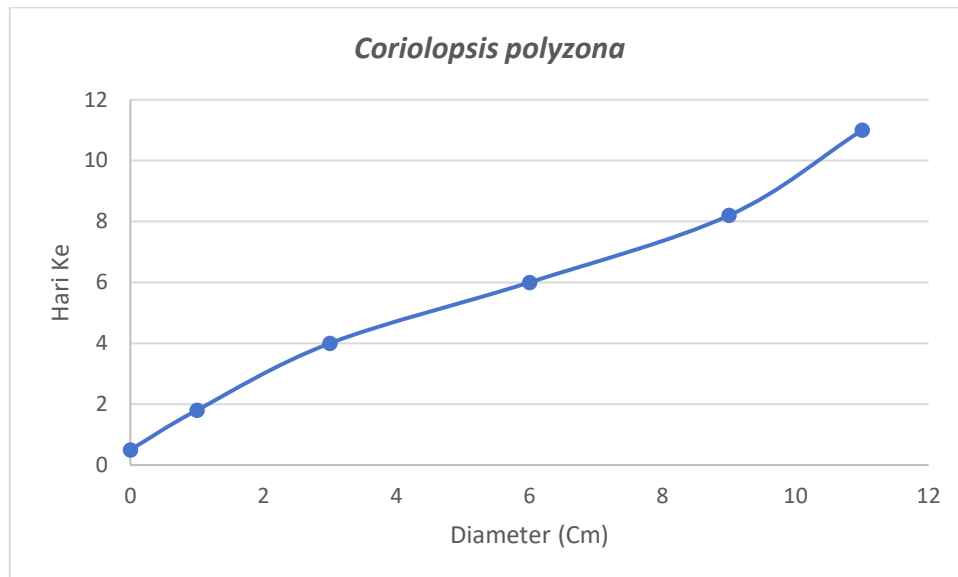
Gambar 4.16 Kurva Pertumbuhan ke Tiga Isolat Bakteri

Perbandingan ke tiga kurva pertumbuhan isolat bakteri yang tumbuh pada *galamai*, terlihat bahwa *Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri yang cepat pertumbuhannya diikuti *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus conii*. Hal ini berarti

yang dominan merusak *galamai* adalah *Bacillus thuringiensis*, karena berkembang sangat cepat.

4.9.4 *Coriopsis polyzona*

Kurva pertumbuhan *Coriopsis polyzona* disajikan pada Gambar 4.17 berikut.

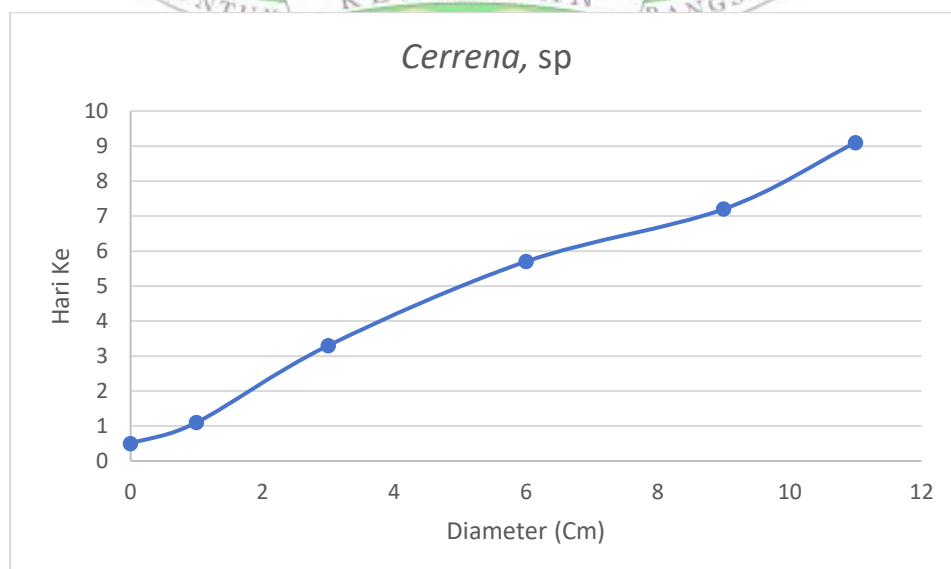


Gambar 4.17 Kurva Pertumbuhan *Cariolopsis polyzona*

Coriopsis polyzona merupakan kapang yang dominan tumbuh pada *galamai*. Kurva pertumbuhan diukur berdasarkan pertumbuhan hifanya atau dengan menghitung panjang hifa. Dimulai dari hari pertama penanaman pada media agar, dihitung setiap hari hingga hari ke 11. Penghentian pengukuran karena hifa yang semakin memanjang, sehingga sudah tidak muat lagi pada petri.

4.9.5 *Cerrena sp.*

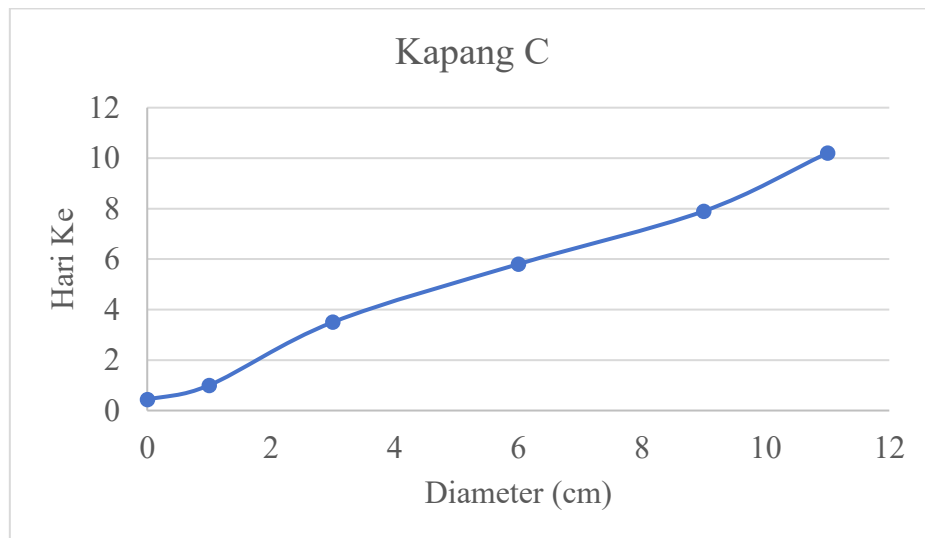
Kurva pertumbuhan *Cerrena sp.* disajikan pada Gambar 4.18 berikut.



Gambar 4.18 Kurva Pertumbuhan *Cerrena*, sp

4.9.6 Kapang C

Isolat ini merupakan salah satu isolat yang pada saat identifikasi PCR terkontaminasi, sehingga tertunda untuk diidentifikasi. Kurva pertumbuhan kapang C disajikan pada Gambar 4.19 berikut.



Gambar 4.19 Kurva Pertumbuhan Kapang C

Adapun kurva pertumbuhan ke 3 isolat kapang disajikan pada gambar 4.20 berikut



Gambar 4.20 Kurva Pertumbuhan Ke Tiga Isolat Kapang

Berdasarkan bentuk kurva pertumbuhan, ketiga jenis isolat kapang tersebut memiliki bentuk yang hampir sama. Penghentian perhitungan sama sama diakhiri

pada hari ke 11, karena petri yang telah penuh ditumbuhi hifa. Kapang berkembang biak dengan perpanjangan ujung hifa (reproduksi vegetatif) atau membentuk spora seksual dan aseksual. Beberapa spesies kapang mengakibatkan kerusakan bahan pangan, dan banyak diantaranya yang juga penyebab penyakit bagi yang mengkonsumsinya karena menghasilkan toksin. Namun banyak diantaranya juga sebagai penghasil enzim yang digunakan dalam pengolahan pangan.

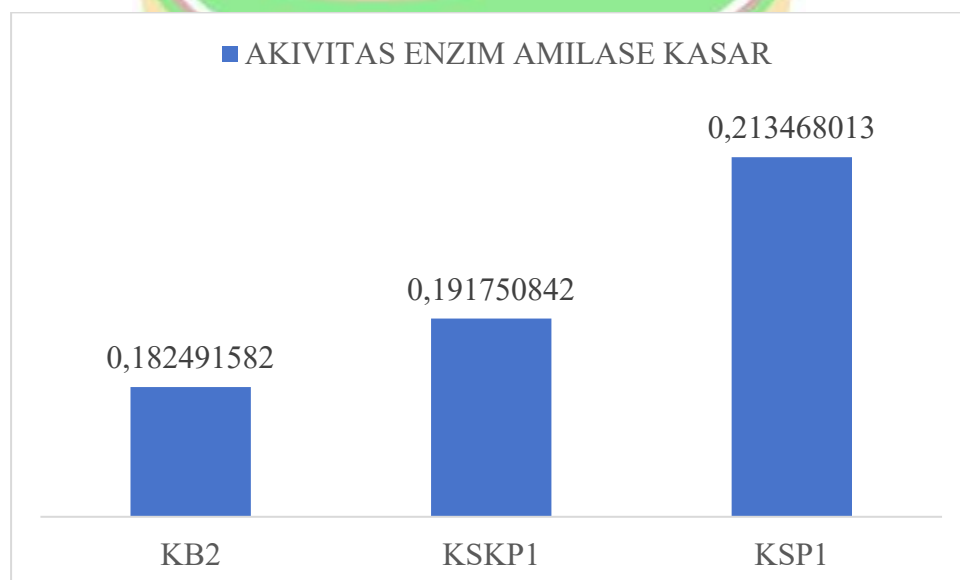
Bentuk grafik pada kurva pertumbuhan mikroba merepresentasikan kondisi sel pada waktu yang berbeda. Jumlah sel cenderung tidak mengalami perubahan di awal kondisi (inkubasi), yang dikenal dengan fase adaptasi. Dimana pada fase awal ini sel menyerap nutrisi untuk kebutuhan hidup dan kemudian melakukan pembesaran terhadap ukuran sel. Sehingga pada waktunya siap untuk melakukan pembelahan atau memperbanyak jumlah sel yang dikenal dengan fase logaritmik.

Berdasarkan grafik yang ada, terlihat perbedaan bentuk kurva bakteri dengan kapang. Bakteri mengalami pertumbuhan dan perbanyakan jumlah sel yang lebih cepat dibandingkan kapang. Perhitungan pertambahan jumlah sel bakteri dengan satuan jam, sedangkan kapang dihitung dengan satuan hari.

4.10 Aktivitas Enzim

4.10.1 Enzim Amilase umol/ml

Aktivitas enzim amilase disajikan pada gambar 4.21 berikut.

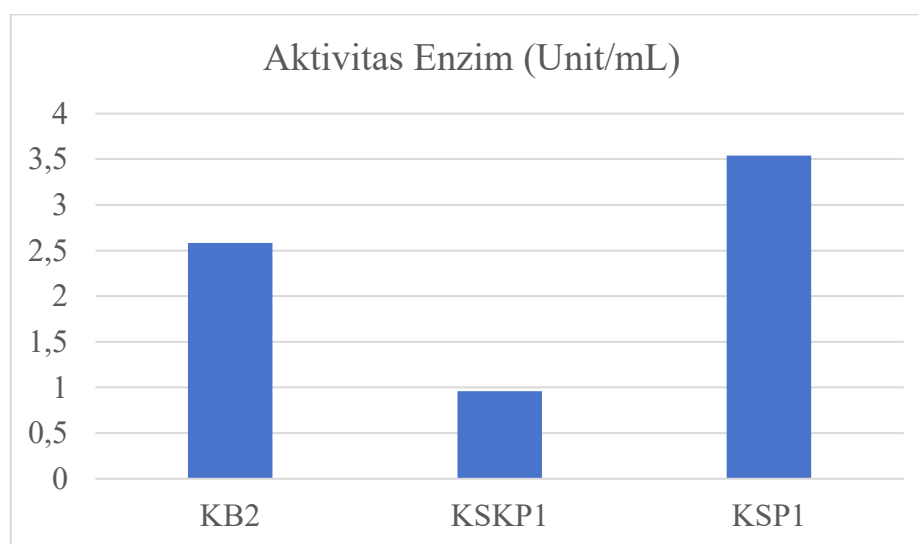


Gambar 4.21 Aktivitas Enzim Amilase dari Tiga Isolat Bakteri

Berdasarkan Gambar 4.21. Terlihat perbedaan aktivitas enzim amilase yang dihasilkan masing masing isolat. Dimana isolat *Bacillus thuringensis* dengan aktivitas tertinggi, diikuti isolat *Staphylococcus cohnii* dan *Bacillus cereus*.

4.10.2 Enzim Lipase umol/ml

Aktivitas enzim lipase disajikan pada Gambar 4.22.



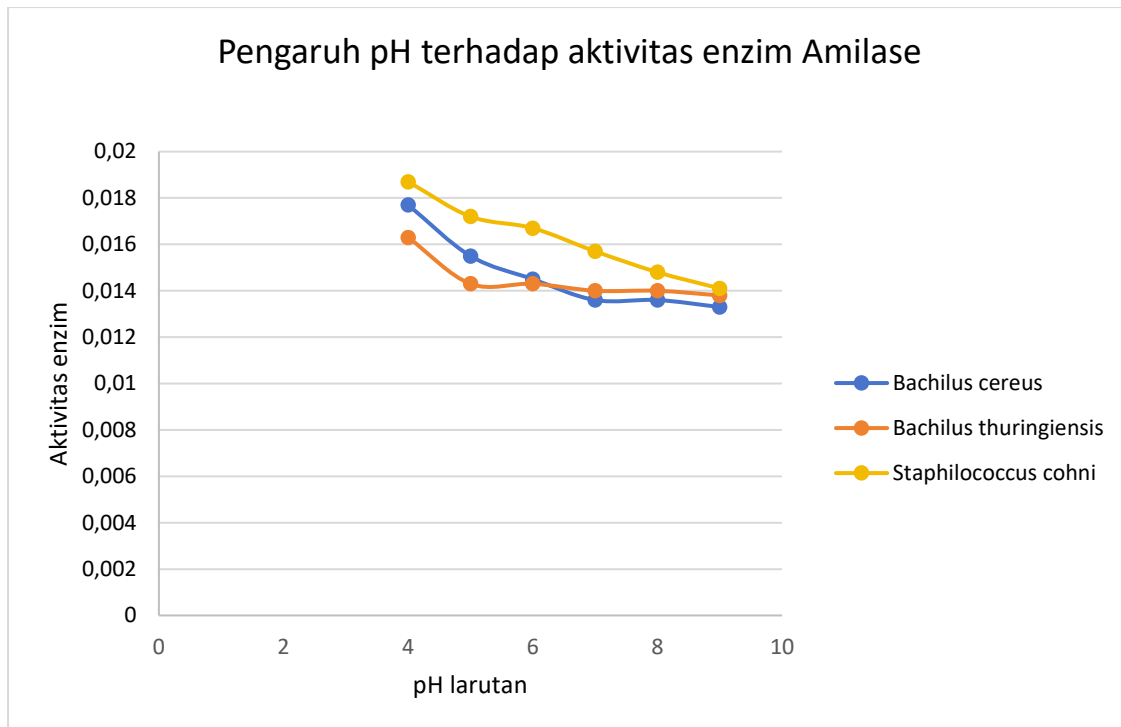
Gambar 4.22 Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim lipase tertinggi dihasilkan oleh isolat bakteri *Bacillus thuringiensis*, diikuti *Bacillus cereus* dan terakhir *Staphylococcus cohnii*. Aktivitas enzim menunjukkan kemampuan enzim yang dihasilkan oleh masing masing isolat untuk mengkatalis substrat tempat hidup bakteri. Berdasarkan Gambar 9 dan 10 isolat *Bacillus thuringiensis* memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim lipase dan amilase tertinggi dari ketiga isolat bakteri.

4.10.3 Karakteristik Enzim

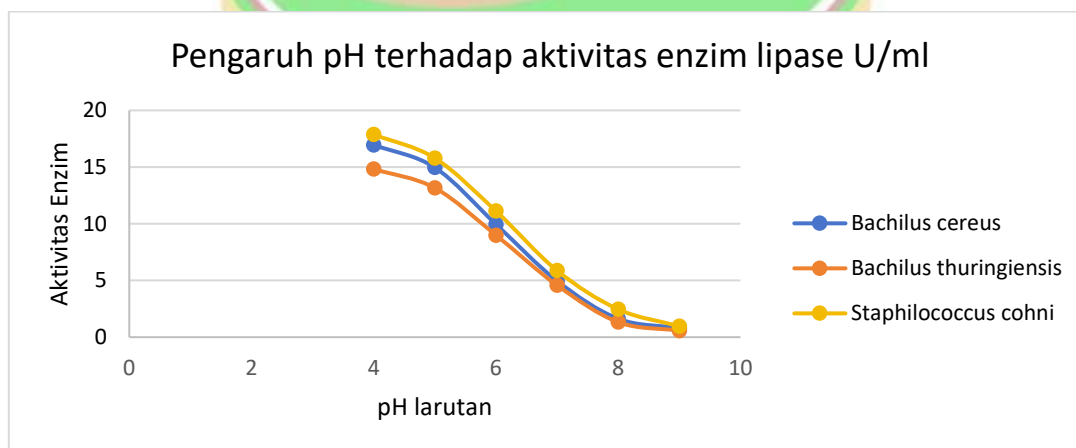
Karakteristik enzim dilihat berdasarkan pH dan suhu optimum pemanfaatan enzim apabila digunakan untuk mengkatalis substrat tempat tumbuhnya. Pengujian pH dilakukan dari pH 4 sampai 9, sedangkan suhu dilakukan pada suhu 40°C, 50°C dan 60°C. Adapun hasil pengujian terhadap pH optimum enzim amilase isolat *Staphylococcus cohnii*, *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus cereus* disajikan pada Gambar 4.23.

Karakterisasi enzim dilakukan untuk mengetahui aktivitas optimal dari enzim yang dihasilkan masing masing isolat dalam bekerja. Sehingga apabila dimanfaatkan suhu dan pH optimum akan dijadikan acuan supaya kerja enzim dapat berlangsung secara optimal.



Gambar 4.23 pH optimum enzim amilase isolat Bakteri

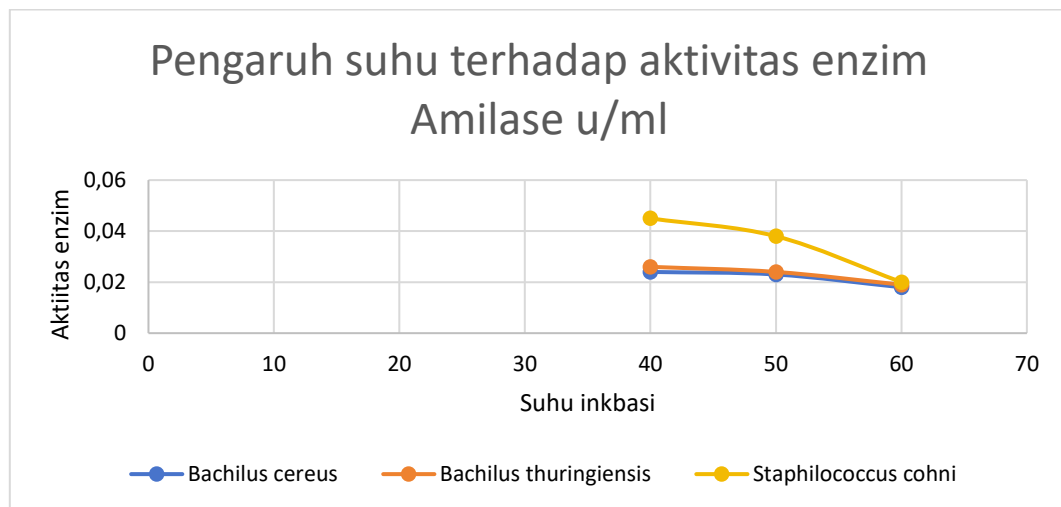
Berdasarkan gambar diatas pH optimum untuk isolat *Staphylococcus cohnii* adalah pH 4, dengan aktivitas tertinggi diikuti *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis* artinya enzim amilase yang dihasilkan isolat ini optimum bekerja pada pH 4. Pada saat pengujian aktivitas enzim, bisa jadi pH yang digunakan tidak sesuai. pH pertumbuhan enzim lipase disajikan pada Gambar 4.24.



Gambar 4.24 pH Optimum Aktivitas Enzim Lipase

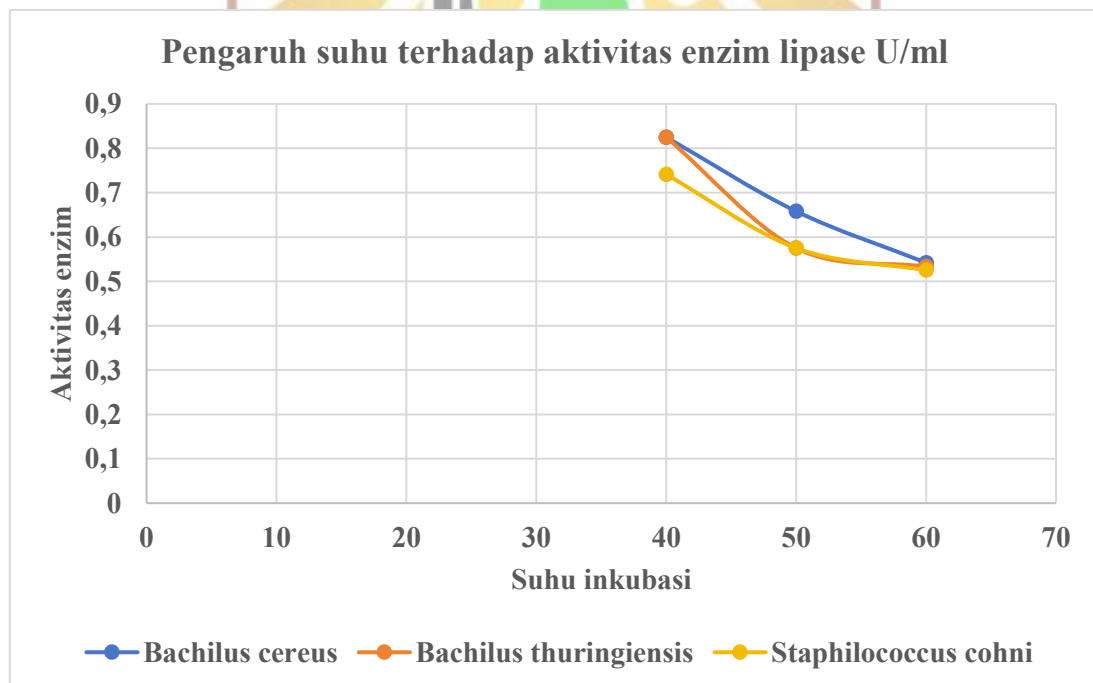
Begitu juga dengan pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase, isolat *Staphylococcus cohnii* merupakan yang memiliki aktivitas tertinggi pada pH 4, diikuti *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

amilase seperti disajikan pada gambar 4.25 memperlihatkan suhu optimum kondisi enzim amilase.



Gambar 4.25 Suhu Optimum Aktivis Enzim Amilase dari Tiga Isolat

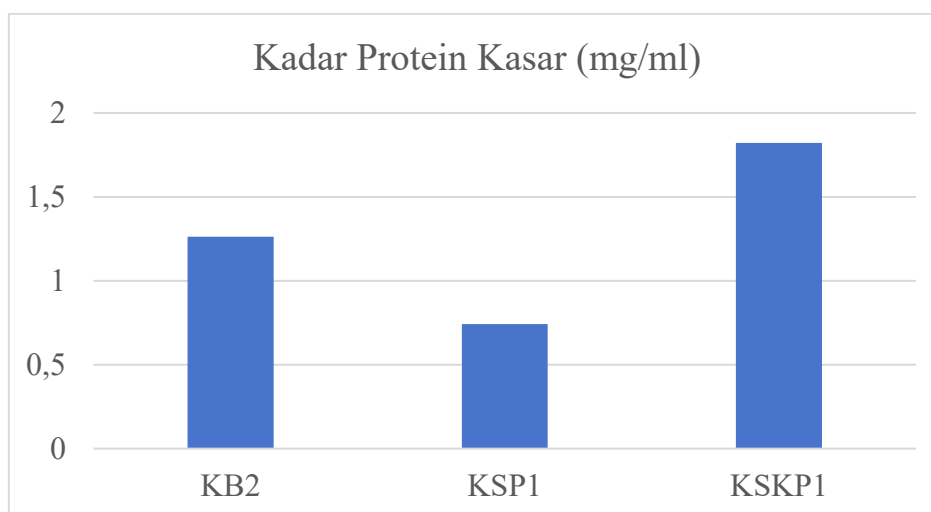
Gambar 4.25 menggambarkan tentang kondisi optimum penggunaan enzim amilase dengan 3 suhu berbeda (40, 50 dan 60 °C). Aktivitas tertinggi terlihat pada suhu 40 °C, sama halnya dengan pH, isolat *Staphylococcus cohnii* merupakan isolat yang memproduksi enzim amilase dengan aktivitas tertinggi, *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus cereus*. Suhu optimum pada enzim lipase disajikan pada Gambar 4.26 berikut



Gambar 4.26 Suhu Optimum Aktivitas Enzim Lipase Tiga Isolat

Sama hal nya dengan enzim amilase, enzim lipase juga bekerja pada suhu optimumnya. Suhu optimum yaitu pada suhu 40°C, dengan aktivitas tertinggi isolat

Bacillus thuringiensis dan *Bacillus cereus* dan terakhir isolat *Staphylococcus cohnii*. Kadar protein enzim kasar dari ketiga isolat diperoleh seperti pada Gambar 4.27 berikut



Gambar 4.27 Kadar Protein Tiga Isolat

Enzim merupakan protein, jadi untuk mengetahui jumlah enzim murni pada suatu enzim kasar dapat didasari dengan jumlah protein yang terdapat dalam enzim kasar tersebut. Jumlah protein terbanyak terdapat pada isolat KSKP1 atau *Staphylococcus cohnii*. Seperti halnya karakterisasi enzim, enzim kasar dengan aktivitas tertinggi adalah *Staphylococcus cohnii*.

4.11 Produksi Enzim Lipase pada Substrat Ampas Kelapa

4.11.1 Analisis Bahan Baku

Analisis yang dilakukan terhadap ampas kelapa setelah dikeringkan dan dilakukan pengecilan ukuran yaitu aktivitas air (aw), kadar air, kadar protein, kadar lemak, dan kadar abu. Hasil analisis ampas kelapa dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Hasil Rata- rata Analisis Ampas Kelapa

Analisis	Satuan	Rata-rata ± Standar Deviasi
A. Fisik		
- Aktivitas Air (aw)	-	0.613 ± 0.003
B. Kimia		
- Kadar Air	(%)	9.74 ± 0.188
- Kadar Protein	(%)	1.29 ± 0.014
- Kadar Lemak	(%)	18.48 ± 0.039
- Kadar Abu	(%)	0.14 ± 0.032

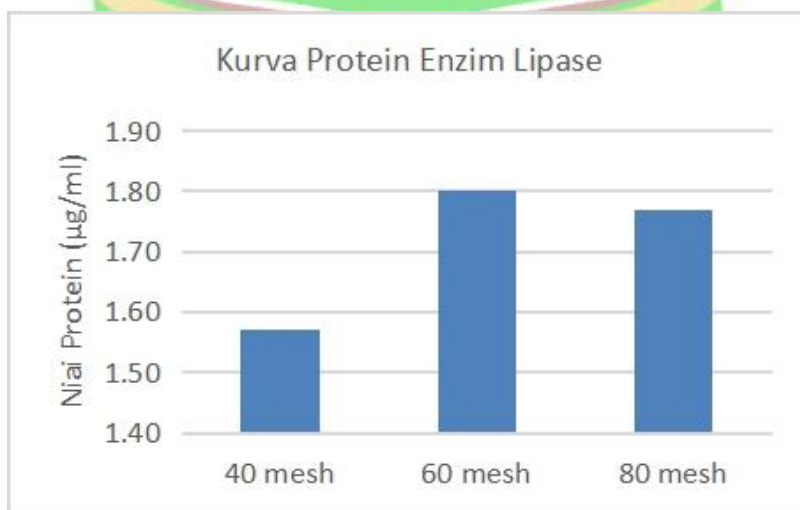
Berdasarkan Tabel 4.8 diperoleh diperoleh nilai Aw ampas kelapa yaitu 0.613. Pada nilai aw tersebut dapat tumbuh kapang. Nilai aw berhubungan dengan kadar air pada suatu bahan. Semakin tinggi kadar air pada suatu bahan, maka nilai aktivitas air (aw) juga semakin tinggi sehingga bahan tersebut lebih mudah rusak. Menurut Belitz (2009), aktivitas air (aw) menggambarkan derajat aktivitas air dalam bahan pangan, baik kimia dan biologis. Aktivitas air sangat erat kaitannya dengan kadar air dalam bahan terhadap daya simpan. Semakin tinggi nilai aktivitas air maka semakin rendah daya tahan bahan makanan begitu pula sebaliknya semakin rendah nilai aktivitas air maka semakin lama daya simpan bahan makanan tersebut.

Kandungan air dalam bahan makanan mempengaruhi daya tahan bahan makanan terhadap serangan mikroba yang dapat digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme mempunyai aw minimum agar dapat tumbuh dengan baik, seperti bakteri pada aw 0,90; khamir aw 0,8–0,9; kapang aw 0,6–0,7. Untuk memperpanjang daya tahan suatu bahan sebagian air dalam bahan harus dihilangkan dengan beberapa cara seperti pengeringan (Winarno, 2004).

4.11.2 Analisis Enzim Lipase

4.11.2.1 Kadar Protein

Berdasarkan hasil penelitian, nilai kadar protein enzim lipase dengan variasi ukuran substrat dapat dilihat pada Gambar 4.28.



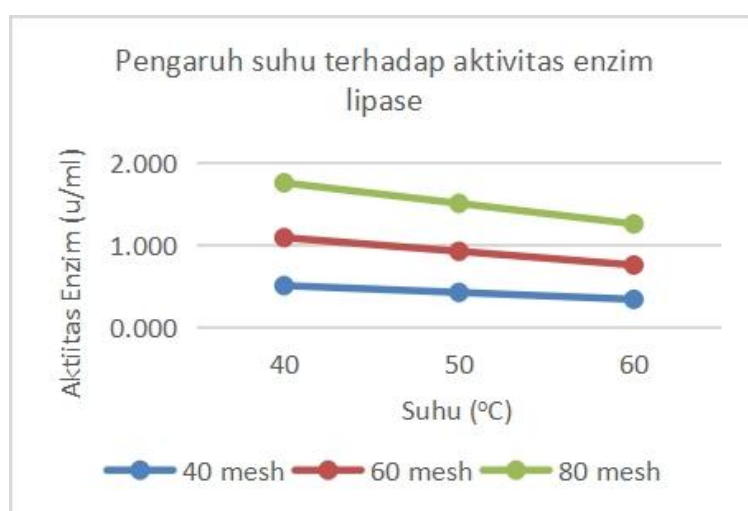
Gambar 4.28 Kurva Protein Enzim Lipase

Berdasarkan kurva pada Gambar 4.28, dapat dilihat ukuran substrat 60 mesh memiliki nilai kadar protein yang lebih tinggi diikuti oleh substrat berukuran 80 dan 40 mesh.

4.11.3 Aktivitas Enzim

4.11.3.1 Suhu

Berdasarkan hasil penelitian, nilai pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 4.29.

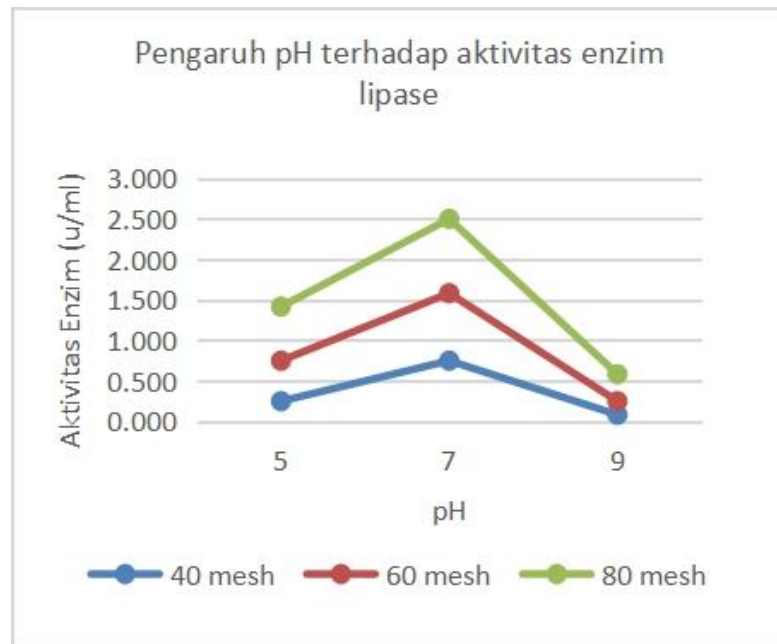


Gambar 4.29 Kurva Pengaruh Suhu terhadap Enzim Lipase

Untuk menentukan suhu optimum enzim, digunakan variasi suhu diantaranya 40, 50 dan 60 °C. Hasil pengujian yang telah dilakukan diperoleh suhu optimum enzim lipase yaitu 40 °C dari masing-masing ukuran substrat. Pada suhu 50 °C dan 60 °C aktivitas enzim lipase terjadi penurunan. Hal ini terjadi karena semakin tinggi suhu, energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi bertambah sehingga molekul yang bereaksi semakin banyak dan produk yang dihasilkan semakin besar. Menurut Nasution, Bondang dan Sebayang (2013) Diatas suhu 40 °C, aktivitas enzim menurun karena enzim mengalami denaturasi protein yang dapat merubah kon formasi struktur molekul sehingga enzim kehilangan sifat katalitiknya.

4.11.2.2 pH

Berdasarkan hasil penelitian, nilai pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 4.30.



Gambar 4.30 Kurva Pengaruh pH terhadap Enzim Lipase

pH optimum enzim lipase kasar yang dihasilkan diuji dengan menggunakan variasi pH diantaranya 5, 7 dan 9. Hasil pengujian yang telah dilakukan diperoleh pH optimum enzim lipase yaitu 7 dari masing-masing ukuran substrat, ini perlu ditindaklanjuti dengan variasi pH asam sesuai hasil sebelumnya, yaitu pada pH 4. Berdasarkan Gambar 30 diperoleh aktivitas enzim bervariasi dengan adanya perubahan pH. Hal ini dikarenakan adanya perubahan struktur sekunder dan tersier enzim. Menurut Nasution, Bondang dan Sebayang (2013) pada pH optimum muatan gugus samping asam amino berada pada keadaan yang sesuai sehingga enzim sangat efisien dalam mempercepat reaksi yang sangat spesifik.