

## Penentuan Isolat Bakteri Asidogenik yang Mampu Menghasilkan Total Asam Tertinggi dari Limbah Cair Tahu

### *Determination of Acidogenic Bacteria Isolate Which Is Able to Produce The Highest Acidity Total from Tofu Wastewater*

Adriani Sukma Witari\*, Irmia Nurika  
Department of Agro-industrial Technology, Faculty of Agricultural Technology  
University of Brawijaya, Malang, Indonesia  
\*adriani.sukma556@gmail.com

Received: 19<sup>th</sup> January, 2016; 1<sup>st</sup> Revision: 15<sup>th</sup> March, 2016; 2<sup>nd</sup> Revision: 28<sup>th</sup> March, 2016; Accepted: 30<sup>th</sup> March, 2016

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri asidogenik yang mampu memproduksi total asam tertinggi dari limbah cair tahu. Uji kemampuan asidogenik menggunakan Rancangan Acak Kelompok pola faktorial dengan menggunakan dua perlakuan yaitu persentase inokulum (5%, 10%, dan 15%) dan lama waktu inkubasi (24 jam, 48 jam, dan 72 jam). Parameter yang diukur meliputi kadar total asam tertitrasi, pH, kadar gula reduksi, dan total bakteri asidogenik. Hasil penelitian menunjukkan karakterisasi morfologi koloni isolat terpilih (isolat 1031) berwarna putih tulang, berbentuk bulat, permukaan timbul, dan tepiannya rata dan karakterisasi morfologi sel isolat 1031 adalah Gram negatif dan berbentuk batang. Berdasarkan hasil karakterisasi biokimia, isolat 1031 memiliki probabilitas kedekatan dengan *Hafnia alvei* biogp 1 sebesar 94,53%. Persentase inokulum dan lama waktu inkubasi berpengaruh terhadap produksi total asam tertitrasi. Perlakuan terbaik adalah kombinasi perlakuan A3B1 (persentase inokulum 15% dan waktu inkubasi 24 jam), dengan nilai total asam tertitrasi 2,70%, nilai pH 6,33, kadar gula reduksi 0,07%, dan jumlah populasi bakteri asidogenik  $1,1 \times 10^8$  CFU/ml.

**Kata kunci:** asidogenesis, bakteri asidogenik, limbah cair tahu, dan total asam teritrasi.

#### Abstract

*This research had an objective to find an acidogenic bacteria which was able to produce the highest organic acid from tofu wastewater. Test of acidogenic capability used Randomized Block Design arranged in factorial by using two treatments, inoculum percentage (5%, 10%, and 15%) and incubation time (24 hours, 48 hours, and 72 hours). Parameters measured were production of titration acidity total, pH, degree of sugar reduction, and acidogenic bacteria total. Result showed identification of colony morphology of selected isolate (isolat 1031) were bone-white, round shape, raised surface (elevation), flat edge and cell morphology were Gram-negative bacillus-shaped. Based on the biochemical identification showed isolate 1031 was *Hafnia alvei* biogp 1 with a probability value of 94.53%. Inoculum percentage and incubation time had significant effect in production of titration acidity total. The best treatment combination was A3B1 (inoculum percentage of 15% and incubation time in 24 hours). A3B1 treatment produced titration acidity total 2,70%, pH 6,33, degree of sugar reduction 0,07%, and acidogenic bacteria total  $1,1 \times 10^8$  CFU/ml.*

**Keywords:** acidogenesis, acidogenic bacteria, titration acidity total, and tofu wastewater.

## PENDAHULUAN

Tahu merupakan salah satu makanan tradisional masyarakat Indonesia. Tahu banyak dikonsumsi karena harganya yang murah dan bergizi. Kandungan unsur gizi dan kalori dalam 100 gram tahu meliputi energi 79 kal, air 84,8 gram, protein 7,8 gram, lemak 4,6 gram, karbohidrat 1,6 gram, mineral 1,2 gram, kalsium 124 mg, fosfor 63 gram, zat besi 0,8 gram, vitamin A 0 mcg, dan vitamin B 0,06 mg (Oey, 1992). Industri tahu dijumpai hampir di tiap kota di Indonesia. Setiap proses industri mayoritas menghasilkan hasil buangan berupa limbah,

termasuk industri tahu. Limbah yang dihasilkan terutama berasal dari cairan kental yang terpisah dari gumpalan tahu yang disebut air dadih (*whey*). Sumber limbah cair lainnya berasal dari pencucian kedelai, pencucian peralatan proses, air bekas pemasakan dan rendaman kedelai.

Limbah industri tahu dapat menimbulkan masalah pencemaran yang cukup berat karena mengandung polutan organik yang cukup tinggi. Sebuah penelitian terdahulu (Tuhu dan Hanry, 2010) menginformasikan bahwa nilai COD limbah cair tahu dari sebuah industri tahu sebesar 6.400 mg/L, TSS 2.800 mg/L, dan pH 4,2. Nilai tersebut masih berada jauh di atas

ambang batas yang diijinkan oleh pemerintah. Berdasarkan Peraturan Gubernur Jawa Timur No. 72 Tahun 2013, nilai baku mutu limbah cair industri tahu yang diijinkan dibuang ke lingkungan adalah nilai BOD<sub>5</sub> maksimal adalah 150 mg/L, COD adalah 300 mg/L, TSS adalah 100 mg/L, dan pH adalah 6,0-9,0. Pengolahan air limbah industri tahu perlu dilakukan guna menurunkan kandungan polutan organik, sehingga nilai yang diijinkan sesuai dengan standar baku mutu yang telah ditetapkan.

Salah satu metode pengolahan limbah cair yang dapat diterapkan pada industri tahu adalah proses biologis secara anaerob, yaitu dengan membuat bak penampungan dengan sistem tertutup. Pada bak penampungan anaerob mikroorganisme bekerja untuk menguraikan material organik di dalam limbah cair tahu. Produk akhir yang penting dari proses penguraian anaerob adalah gas metana yang dapat digunakan untuk biogas, sehingga proses penguraian anaerob juga dapat disebut sebagai proses biogas. Produksi biogas melalui 4 tahapan proses yang meliputi tahap 1: hidrolisis, tahap 2: asidogenesis, tahap 3: asetogenesis, dan tahap 4: metanogenesis (Zieminski dan Frac, 2012). Setiap tahapan tersebut melibatkan kelompok bakteri yang berbeda.

Tahap asidogenesis memegang peranan penting pada proses penguraian limbah cair tahu secara anaerob. Hal ini dikarenakan produk hasil tahap asidogenesis berupa asam asetat yang merupakan substrat utama bagi bakteri metanogenesis untuk memproduksi gas metana pada tahap selanjutnya. Bakteri asidogenik (penghasil asam) merubah monomer-monomer hasil tahap hidrolisis seperti gula, asam amino, dan asam lemak menjadi asam-asam organik (asam asetat, propionat, butirrat, laktat, format) alkohol dan keton (etanol, methanol, gliserol dan aseton), CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>. Bakteri asidogenik tumbuh cepat (waktu regenerasi 30 menit) pada temperatur 35°C. Contoh bakteri asidogenik meliputi *Clostridium*, *Bacteroides*, *Rumino-coccus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Mikrococcus*, *Bacillus* dan *Escherichia* (Mara dan Nigel, 2003).

Berdasarkan uraian di atas, tahap asidogenesis dilakukan oleh berbagai kelompok bakteri, mayoritas adalah bakteri obligat anaerob dan sebagian lainnya bakteri anaerob fakultatif dan belum diketahui jenis bakteri yang bekerja dominan pada tahap asidogenesis. Oleh karena

itu, dalam penelitian ini dilakukan proses isolasi dan seleksi untuk mendapatkan bakteri asidogenik yang mampu menghasilkan asam organik dari fermentasi glukosa, di mana asam organik berupa asam asetat merupakan produk tahap asidogenesis yang paling penting untuk memproduksi gas metan. Produksi asam organik dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya mikroorganisme yang berperan dan lama waktu inkubasi. Hasil dari penelitian ini, berupa informasi isolat bakteri asidogenik terpilih pada tahap asidogenesis limbah cair tahu, diharapkan dapat memberikan alternatif bagi industri tahu untuk pengolahan limbah cairnya.

## METODE PENELITIAN

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel limbah cair tahu yang diperoleh dari Pabrik Tahu "ADMA" Tunggulwulung Malang, agar *bacteriological*, glukosa, ekstrak ampas tahu, peptone, aquadest (RRT), dan serbuk media TSIA. Bahan yang digunakan untuk analisis pewarnaan Gram meliputi kristal violet (Mediss), iodin, alkohol 95%, dan safranin.

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2015 hingga Juni 2015 di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Analisis dilakukan di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya.

### Pelaksanaan Penelitian

#### Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian berasal dari pabrik tahu "ADMA". Pabrik tahu "ADMA" merupakan salah satu industri tahu yang berada di kota Malang, tepatnya di daerah Tunggulwulung. Kapasitas produksi adalah 900 kwintal sampai 1 ton per hari. Pada proses produksinya, pabrik tahu "ADMA" rata-rata menggunakan air sebanyak 36.000 liter/hari. Sampel limbah yang digunakan adalah limbah cair tahu. Pengambilan sampel dilakukan dari satu titik yaitu titik dimana limbah cair tahu jatuh ke badan sungai. Metode pengambilan sampel yaitu botol aqua 1,5 liter ke dalam sungai untuk mengambil lumpur serta limbah cair tahu. Botol aqua yang sudah penuh kemudian ditutup dan dikeluarkan dari badan sungai untuk selanjutnya

dilakukan pengujian di laboratorium.

#### Pembuatan Sistem Anaerob Secara In Vitro

Pembuatan sistem anaerob secara in vitro diawali dengan pengambilan sampel limbah cair tahu sebanyak 250 ml dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml. Erlenmeyer dikondisikan sebagai sistem anaerob dengan cara bagian leher Erlenmeyer disumbat dengan kapas, kemudian dilapisi malam dan parafin cair. Selanjutnya Erlenmeyer dihubungkan dengan selang ke *beaker glass* yang sudah diisi air. *Beaker glass* yang telah diisi air kemudian ditambahkan desinfektan sebanyak delapan tetes. Air di dalam *beaker glass* berfungsi sebagai tempat penampung gas yang dihasilkan pada proses anaerob di dalam Erlenmeyer. Secara berkala diambil sampel dari sistem anaerob untuk dilakukan pengujian pH. Proses asidogenesis ditandai dengan adanya penurunan pH. Pada tahap asidogenesis, pH medium akan mengalami penurunan, dari yang pH awalnya 6,8 menjadi kira-kira pH 5 (Schaechter, 2009).

#### Isolasi dan Purifikasi Bakteri Asidogenik

Proses isolasi bakteri asidogenik diawali dengan pengenceran sampel dengan menggunakan *bacteriological peptone* sampai 10-5. Setelah dilakukan pengenceran kemudian diambil 1 ml pada tiap faktor pengenceran dan kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media ekstrak ampas tahu diperkaya (EATD) dengan glukosa. Pada umumnya isolat selalu diperoleh dari lingkungan yang mendekati atau pada substrat tempat tumbuhnya (Hidayat dkk, 2006). Oleh karena itu digunakan media ekstrak ampas tahu sebagai media isolasi. Media tersebut terdiri dari agar *bacteriological* 3,75 gram, ekstrak ampas tahu 250 ml, dan glukosa 7,5 gram. Selanjutnya diratakan agar sampel dapat tercampur dengan media. Sampel yang berada dalam cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam masa inkubasi akan terbentuk koloni campuran. Koloni campuran yang tumbuh selanjutnya diamati. Koloni yang memiliki karakteristik berbeda selanjutnya dipurifikasi dengan cara *streak plate* (Modifikasi Cappuccino dan Natalie (2013) dan Modifikasi Waluyo 2010). Isolat murni yang sudah didapat selanjutnya ditanam pada agar miring sebagai stok kultur murni.

#### Seleksi Isolat dengan Uji TSIA

Proses seleksi dilakukan dengan menumbuhkan kultur murni pada media TSIA

(*Triple Sugar Iron Agar*). Tahap seleksi isolat diawali dengan pembuatan media TSIA. Sebanyak 65 gram serbuk media TSIA dilarutkan dalam 1 liter air suling dan dipanaskan hingga mendidih. Media yang sudah mendidih selanjutnya dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Tabung reaksi selanjutnya dibiarkan membeku pada posisi miring. Isolat yang akan diseleksi selanjutnya dipindahkan ke agar miring TSIA dengan cara menggores bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya. Kemudian dilakukan proses inkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam. Diamati perubahan warna media (Zimbrow et al., 2009). Pemilihan isolat dilakukan pada isolat yang mampu merubah warna medium menjadi merah pada bagian *slant* dan warna kuning pada bagian *butt*.

#### Karakterisasi Morfologi (koloni dan sel)

Karakterisasi morfologi koloni dilakukan secara langsung. Isolat terpilih yang sudah didapat diamati warna koloni, bentuk koloni, permukaan (elevasi) koloni, dan tepian koloni. Isolat terpilih juga dilakukan karakterisasi morfologi sel dengan menggunakan bantuan mikroskop. Morfologi sel yang diamati meliputi pengecatan Gram dan bentuk sel. Pengecatan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

#### Karakterisasi Biokimia

Karakterisasi biokimia isolat terpilih menggunakan *Microbact Identification System*. Uji biokimia dimaksudkan untuk mengetahui aktivitas biokimia atau metabolisme bakteri untuk menguraikan molekul kompleks (karbohidrat, lemak, protein dan asam nukleat) dan molekul-molekul sederhana (asam amino dan monosakarida) untuk menghasilkan produk, selanjutnya dapat digunakan untuk karakterisasi bakteri pada tingkatan genus dan spesies. Adapun produk utama hasil biokimia yang diamati adalah produksi asam organik dari fermentasi glukosa. Pembacaan hasil uji *Microbact Identification System* menggunakan *software Microbact 2000*.

#### Pembuatan Inokulum

Tahap selanjutnya adalah pembuatan inokulum. Isolat hasil seleksi dengan menggunakan media TSIA disuspensi terlebih dahulu dengan menggunakan pepton cair. Selanjutnya diinokulasi sebanyak 5% (v/v) ke dalam 300 ml media ekstrak ampas tahu diperkaya dengan

glukosa (EATD) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam inkubasi, dilakukan perhitungan jumlah bakteri untuk mengetahui jumlah bakteri awal. Syarat jumlah populasi bakteri yang dapat digunakan sebagai inokulum adalah  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  CFU/ml. Adapun jumlah populasi bakteri awal pada inokulum adalah  $1,3 \times 10^7$  CFU/ml. Sehingga jumlah populasi bakteri yang digunakan untuk rancob berkisar antara  $6,5 \times 10^5$  CFU/ml (pada presentase inokulum 5%) –  $1,9 \times 10^6$  CFU/ml (pada presentase inokulum 15%).

### Uji Kemampuan Asidogenik

Uji kemampuan bakteri asidogenik dilakukan untuk mengetahui pengaruh persentase inokulum dan lama waktu inkubasi terhadap produksi total asam. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial dengan menggunakan 3 faktor dan 3 ulangan.

1. Faktor I : Persentase inokulum (A) dengan 3 taraf yaitu :
  - A1 = 5%
  - A2 = 10%
  - A3 = 15%
2. Faktor II : Lama waktu inkubasi (B) dengan 3 taraf yaitu :
  - B1 = 24 jam
  - B2 = 48 jam
  - B3 = 72 jam

Parameter yang diamati pada uji kemampuan bakteri asidogenik meliputi pH, kadar gula reduksi, kadar total asam, dan total bakteri asidogenik.

#### a. Pengukuran Total Asam Titrasi (Ranggana, 1997)

Nilai total asam dihitung dengan menggunakan metode titrasi. Sebanyak 10 ml sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Ditambahkan aquades sampai tanda batas lalu dihomogenkan dan kemudian disaring. Filtrat diambil 10 ml dan kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Indikator PP ditambahkan sebanyak 2-3 tetes. Selanjutnya dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda. Pembacaan skala dilakukan pada saat warna merah muda yang terbentuk pertama kali dan bertahan sampai beberapa saat. Adapun rumus perhitungan kadar total asam adalah sebagai berikut (Aneja, 2003):

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{\text{Volume NaOH} \times \text{H NaOH} \times 6,0}{\text{Volume bahan (ml)}} \times 100\%$$

#### b. Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Pengukuran pH diawali dengan persiapan bahan penunjang analisa (aquades, *buffer* 4, *buffer* 7, dan *buffer* 10). Selanjutnya disiapkan alat pH meter dan dikalibrasi dengan menggunakan *buffer* yang tersedia. Sampel kemudian disiapkan. Sampel selanjutnya diukur pHnya menggunakan pH meter. Hasil uji dicatat.

#### c. Pengukuran Kadar Gula Reduksi (Sudarmadji, 1997)

Pengukuran kadar gula reduksi menggunakan metode Nelson-Samogyi. Sebanyak 5 ml sampel ditambahkan 95 ml aquades dan dihomogenkan. Larutan sampel kemudian diambil 1 ml, ditambahkan 1 ml larutan Nelson C (campuran dari larutan Nelson A dan larutan Nelson B; 25:1 v/v). Sampel selanjutnya dipanaskan pada hot plate pada suhu 100°C selama 20 menit. Larutan sampel kemudian didinginkan sampai mencapai suhu kamar, kemudian ditambahkan 1 ml arsenomolybdat, dihomogenkan dengan vortex dan ditambahkan 7 ml aquades kemudian dihomogenkan lagi. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dan kemudian dikonversi ke mmol/l gula reduksi berdasarkan persamaan segresi senyawa standar glukosa monohidrat. Adapun rumus menghitung kadar gula reduksi adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar gula reduksi} = \frac{\text{Absorbansi} \times \text{Pengenceran}}{\text{slop} \times \text{Berat sampel} \times 10^6} \times 100\%$$

#### d. Perhitungan Jumlah Total Bakteri Asidogenik (Cappuccino dan Natalie, 2008)

Metode yang digunakan untuk perhitungan jumlah bakteri adalah metode hitungan cawan yang didasarkan pada anggapan bahwa setiap sel yang dapat hidup akan berkembang menjadi satu koloni. Untuk memenuhi persyaratan statistik, cawan yang dipilih untuk perhitungan koloni yang mengandung 25-250 atau 30-300 koloni. Adapun untuk menghitung jumlah bakteri yang terdapat pada cawan, digunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Jumlah Koloni Bakteri} \times \frac{1}{\text{Pengenceran}}$$

### Analisis Data

Data pengamatan yang didapat selanjutnya dianalisa menggunakan Analisis Varian (ANOVA) untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh atau beda nyata antar perlakuan.

Apabila pada masing-masing faktor menunjukkan pengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNT taraf 5%. Apabila interaksi kedua faktor terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% (Steel and Torrie, 1993).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakterisasi Limbah Cair Industri Tahu

Hasil analisa limbah cair tahu (*whey*) dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil uji pada Tabel 1, kandungan air adalah 99,05%, karbohidrat 0,41%, abu 0,26%, protein 0,20%, lemak 0,08%, dan pH 3,60. Kandungan tertinggi dalam *whey* adalah air.

**Tabel 1.** Hasil pengujian kandungan limbah cair *whey* industri tahu ADMA Malang

Parameter	Hasil Analisa
Air (%)	99,05
Karbohidrat (%)	0,41
Abu (%)	0,26
Protein (%)	0,20
Lemak (%)	0,08
pH	3,60

Pada Tabel 1, tingginya kadar air pada *whey* disebabkan pada proses pembuatan tahu menggunakan pelarut berupa air. Air tersebut sebagian besar tidak ikut menggumpal menjadi tahu dan selanjutnya menjadi produk samping berupa limbah *whey*. Kandungan protein dalam *whey* lebih rendah jika dibandingkan karbohidrat. Hal ini dikarenakan sebagian besar protein mengalami penggumpalan menjadi tahu, sedangkan karbohidrat tidak dapat menggumpal. Hal ini sesuai dengan penelitian Ratnani (2011), dimana kandungan tertinggi pada limbah cair tahu adalah air dengan nilai 99,162%. Kandungan karbohidratnya juga lebih tinggi dibandingkan proteinnya, yaitu karbohidrat 0,294% dan protein 0,155%.

Pada parameter pH, nilai pH *whey* tahu adalah 3,60. Nilai tersebut berada jauh di bawah nilai baku mutu yang telah ditetapkan oleh pemerintah. Berdasarkan Peraturan Gubernur Jawa Timur No.72 Tahun 2013, nilai pH limbah cair tahu yang diijinkan dibuang ke lingkungan adalah 6-9. Nilai pH limbah cair tahu (*whey*) hasil penelitian masih tergolong sangat rendah. Nilai pH yang rendah dapat mengakibatkan masalah pencemaran yang serius. Nilai pH < 4 akan mengakibatkan sebagian besar tumbuhan

air mati karena tidak toleran terhadap pH rendah (Effendi, 2003).

### Isolasi Bakteri Asidogenik

Hasil seleksi isolat dengan menggunakan uji TSIA dapat dilihat pada Tabel 2. Isolat dengan kode 1022, 1023, 1024, dan 1021, warna media TSIA bagian *slant* dan *butt* berubah merah. Isolat dengan kode 1031, warna media TSIA bagian *slant* berubah merah dan bagian *butt* berubah kuning. Isolat dengan kode 1020 dan 1032, warna media TSIA bagian *slant* dan *butt* tetap berwarna orange.

**Tabel 2.** Hasil seleksi dengan menggunakan uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Kode Isolat	Keterangan			
	Warna <i>Slant</i>	Warna <i>Butt</i>	H <sub>2</sub> S	Gas H <sub>2</sub> S
1022	Merah	Merah	-	-
1023	Merah	Merah	-	-
1020	Orange	Orange	-	-
1031	Merah	Kuning	-	-
1032	Orange	Orange	-	-
1024	Merah	Merah	-	-
1021	Merah	Merah	-	-

Berdasarkan Tabel 2, isolat dengan kode 1022, 1023, 1024, dan 1021 merupakan bakteri non fermenter. Hal ini ditunjukkan dengan kemampuan isolat yang mampu merubah warna media menjadi merah pada bagian *slant* dan *buttnya*. Isolat dengan kode 1031 merupakan bakteri fermenter glukosa, ditunjukkan dengan kemampuan isolat yang mampu merubah warna media menjadi merah pada bagian *slant* dan kuning pada bagian *butt*. Isolat dengan kode 1022 dan 1032 menunjukkan hasil uji TSIA negatif, ditunjukkan dengan warna media yang tetap berwarna orange. Pada uji TSIA juga menunjukkan bahwa ketujuh isolat tidak mampu menghasilkan H<sub>2</sub>S, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya endapan hitam pada dasar media.

Produksi gas H<sub>2</sub> pada ketujuh isolat juga menunjukkan hasil negatif. Menurut Raihana (2011), proses fermentasi pada medium TSIA akan menghasilkan asam format yang kemudian dioksidasi sempurna menjadi gas hidrogen (H<sub>2</sub>) dan karbondioksida (CO<sub>2</sub>). Gas H<sub>2</sub> bersifat tidak mudah larut dalam media sehingga akan terakumulasi dalam bentuk gelembung udara di sepanjang jalur inokulasi dan menyebabkan media agar menjadi terangkat atau pecah. Berbeda dengan gas CO<sub>2</sub> yang bersifat lebih mudah larut dalam media sehingga tidak terbentuk gelembung udara di jalur inokulasi.

Berdasarkan hasil uji TSIA tidak ditemukan medium yang terangkat atau pecah. Hal ini menunjukkan bahwa pada proses fermentasi isolat diduga hanya menghasilkan gas CO<sub>2</sub> yang menyebabkan medium tidak terangkat atau pecah.

Isolat yang dipilih berdasarkan seleksi dengan menggunakan uji TSIA adalah isolat 1031. Hal ini didasarkan kemampuannya pada fermentasi glukosa. Berdasarkan hasil pewarnaan Gram, isolat 1031 merupakan bakteri Gram negatif. Pengamatan pertumbuhan pada media cair menunjukkan bahwa isolat 1031 bersifat anaerob fakultatif, ditunjukkan dengan adanya warna keruh pada bagian tengah media cair ampas tahu. Contoh bakteri Gram negatif yang mampu memfermentasikan glukosa, tidak membentuk H<sub>2</sub>S dan bersifat anaerob fakultatif adalah *Shigella spp.* (kecuali *S. flexneri*, *S. boydii*, dan *S. dysenteriae*) (Dworkin et al, 2006; Greenwood et al, 2012).

### Karakterisasi Morfologi Koloni dan Sel

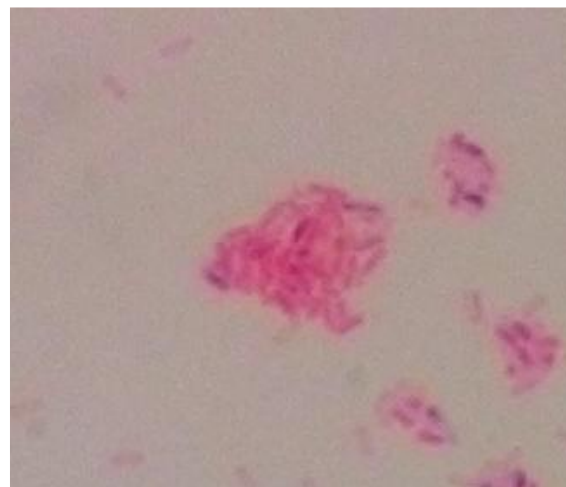
Isolat yang dilakukan karakterisasi morfologi koloni dan sel adalah isolat yang terpilih berdasarkan seleksi dengan menggunakan media TSIA, yaitu isolat 1031. Pengamatan morfologi koloni meliputi warna, bentuk, permukaan, dan tepi. Pengamatan morfologi sel meliputi pengecatan Gram dan bentuk sel. Hasil dari karakterisasi morfologi koloni dan sel dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Karakterisasi morfologi koloni dan sel

Parameter	Hasil Pengamatan
Morfologi koloni	
- Warna koloni	Putih tulang
- Bentuk koloni	Bulat
- Permukaan koloni	Timbul
- Tepi koloni	Rata
Morfologi sel	
- Pengecatan Gram	Negatif
- Bentuk sel	Batang

Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi koloni dan sel pada Tabel 3, isolat 1031 koloninya berwarna putih tulang, bentuk koloninya bulat, permukaan koloninya timbul, tepian koloninya rata. Pengamatan hasil pengecatan Gram dengan menggunakan mikroskop, menunjukkan bahwa isolat bakteri 1031 berwarna merah muda. Warna merah muda mengindikasikan bahwa isolat bakteri 1031 termasuk bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif mengalami kehilangan warna saat diberikan pewarna peluntur berupa iodine Gram,

sehingga akan menyerap warna merah muda dari pewarna tandingan safranin (Cappuccino dan Natalie, 2013). Adapun pengamatan bentuk sel dari isolat 1031 dengan menggunakan mikroskop adalah berbentuk batang.



**Gambar 1.** Hasil pengecatan Gram (perbesaran 1000x)

### Karakterisasi Biokimia

Hasil uji biokimia menunjukkan oksidase, ornithine, H<sub>2</sub>S, glukosa, manitol, xilosa, indol, urease, sitrat, TDA, gelatin, malonat, inositol, sorbitol, rhamnosa, sukrosa, laktosa, arbinosa, adonitol, salisin, dan arginin, bernilai negatif. Adapun hasil uji yang bernilai positif meliputi lysin, ONPG, dan V-P. Berdasarkan pembacaan hasil uji dengan menggunakan software Microbact 2000, isolat 1031 adalah *Hafnia alvei* biogp 1 dengan nilai probabilitas sebesar 94,53% (percent probability).

Hasil uji lysin positif menunjukkan isolat 1031 mampu melakukan dekarboksilasi lysin dengan produk akhir berupa diamina (kadaverin) ditambah karbon dioksida (Cappuccino dan Natalie, 2013). Hasil dari dekarboksilasi lysin berupa amin (bersifat basa) akan menetralkan suasana asam, akibatnya jumlah total asam organik berkurang. Hasil uji ONPG (o-Nitrophenyl-β D-galactoside) positif menunjukkan isolat 1031 mampu memproduksi enzim β-galaktosidase yang dapat menghidrolisis substrat ONPG yang mengandung laktosa dan bersifat kromogenik (Priliani, 2008). Hasil uji VP (Voges Proskauer) positif menunjukkan isolat 1031 mampu membentuk produk akhir non-asam atau netral, seperti asetilmetilkarbinol, dari asam-asam organik yang dihasilkan dari metabolisme glukosa (Cappuccino dan Natalie, 2013).

*Hafnia alvei* termasuk dalam genus *Enterobacter* dan hanya terdiri dari satu spesies (Greenwood, 2012). *Hafnia alvei* dapat ditemukan di dalam tanah, produk susu, sewage, dan feses manusia dan hewan. Bakteri ini merupakan bakteri anaerob fakultatif, katalase positif, oksidase negatif, dan Gram negatif berbentuk batang (McMillan et al., 2006). Menurut Rodriguez et al. (1998), *Hafnia alvei* dianggap sebagai bakteri patogen oportunistik yang secara alami terdapat pada saluran pencernaan.

**Tabel 4.** Hasil uji biokimia menggunakan *Microbac-ter kit 24E*

Test	Isolat 1031
Oksidase	-
Lysin	+
Ornithine	-
H <sub>2</sub> S	-
Glukosa	-
Manitol	-
Xilosa	-
ONPG	+
Indol	-
Urease	-
V-P (Voges Proskauer)	+
Sitrat	-
TDA (Tryptophan Deaminase)	-
Gelatin	-
Malonat	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnosa	-
Sukrosa	-
Laktosa	-
Arbinosa	-
Adonitol	-
Rafinosa	-
Salisin	-
Arginin	-

#### Uji Kemampuan Asidogenik Kadar Total Asam Titrasi (TAT)

Berdasarkan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa persentase inokulum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar total asam titrasi, waktu inkubasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar total asam titrasi, dan interaksi antara persentase inokulum dan waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar total asam titrasi. Rerata kadar total asam titrasi pada berbagai persentase inokulum dapat dilihat pada Tabel 5 dan rerata kadar total asam titrasi

pada berbagai waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 5.** Rerata persentase total asam tertitrasi pada berbagai persentase inokulum

Persentase Inokulum (%)	Perlakuan	Persentase Total Asam Tertitrasi (%)	Notasi
5	A1	1,90	b
10	A2	2,35	a
15	A3	2,28	a

Keterangan: Angka yang mempunyai notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 5, produksi total asam tertitrasi berada pada rentang 1,90 - 2,35%. Perlakuan A1 berbeda nyata terhadap A2 dan A3, sedangkan perlakuan A2 dan A3 tidak berbeda nyata satu sama lain. Perlakuan terbaik adalah perlakuan yang menghasilkan produksi total asam tertitrasi tertinggi, yaitu pada perlakuan A2 dan A3. Pada persentase inokulum 5% nilai total asam tertitrasinya adalah 1,90%, pada persentase inokulum 10% nilai total asam tertitrasinya adalah 2,35%, dan pada persentasenya adalah 2,28%. Perlakuan terbaik adalah pada penambahan persentase inokulum 10% dan 15%, dengan nilai total asam tertitrasinya 2,35% dan 2,28%. Produksi total asam tertitrasi mengalami peningkatan seiring dengan bertambah banyaknya persentase inokulum yang ditambahkan. Peningkatan total asam tertitrasi diduga dikarenakan semakin banyaknya sel yang berperan dalam perombakan substrat untuk menghasilkan produk fermentasi berupa asam organik. Hal ini sesuai dengan pendapat Legowo dkk (2009) yang menyatakan bahwa semakin banyak bakteri yang memproduksi asam organik, maka semakin tinggi asam yang terbentuk.

Produksi total asam tertitrasi dapat dikaitkan dengan kadar gula reduksi yang merupakan substrat bagi bakteri asidogenik untuk menghasilkan asam organik. Semakin rendah kadar gula reduksi yang tersisa, mengindikasikan semakin tingginya asam organik yang dihasilkan. Pada parameter kadar gula reduksi, perlakuan terbaik adalah perlakuan yang menghasilkan kadar gula reduksi terendah yaitu pada penambahan inokulum 15% yang juga merupakan perlakuan terbaik pada produksi total asam tertitrasi. Hal ini membuktikan bahwa

semakin tinggi kadar total asam tertitrasi maka semakin rendah kadar gula reduksi sisa.

Nilai total asam tertitrasi juga dapat dikaitkan dengan nilai pH. Semakin tinggi produksi asam organik maka pH media akan semakin rendah. Pada parameter pH, perlakuan terbaik adalah perlakuan yang menghasilkan nilai pH terendah, yaitu pada penambahan persentase inokulum 15% yang juga merupakan perlakuan terbaik pada parameter total asam tertitrasi. Hal ini membuktikan bahwa semakin tinggi total asam tertitrasi maka semakin rendah nilai pH medianya. Penurunan nilai pH berkaitan dengan nilai pKa atau derajat kelarutan asam. Nilai pKa menunjukkan kemampuan asam organik untuk berionisasi menghasilkan (H<sup>+</sup>), semakin besar kemampuan ionisasinya maka semakin besar pula pengaruhnya terhadap pH, yaitu nilai pH menjadi semakin turun (McDonald, 1991).

**Tabel 6.** Rerata persentase total asam tertitrasi pada berbagai waktu inkubasi

Waktu Inkubasi (24 jam)	Perlakuan	Persentase Total Asam Tertitrasi (%)	Notasi
24	B1	2,65	a
48	B2	1,87	b
72	B3	2,02	b

Keterangan: Angka yang mempunyai notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 6, produksi total asam tertitrasi berada pada rentang 1,87 – 2,65%. Perlakuan B1 berbeda nyata terhadap B2 dan B3, sedangkan perlakuan B2 dan B3 tidak berbeda nyata satu sama lain. Perlakuan terbaik adalah perlakuan yang menghasilkan produksi total asam tertitrasi tertinggi, yaitu pada perlakuan B1. Nilai total asam tertitrasi pada waktu inkubasi 24 jam adalah 2,65%, nilai total asam tertitrasi pada 48 jam adalah 1,87%, dan nilai total asam tertitrasi pada waktu inkubasi 72 jam adalah 2,02%. Perlakuan terbaik adalah pada waktu inkubasi 24 jam dengan nilai total asam tertitrasi 2,65%. Pada waktu inkubasi 48 dan 72 jam terjadi penurunan produksi asam. Hal ini diduga dikarenakan substrat yang tersedia sudah semakin berkurang. Bakteri asidogenik memerlukan waktu tertentu untuk mencapai pertumbuhan optimal dan diduga dicapai pada waktu inkubasi kurang dari 24 jam. Jumlah total asam organik yang berkurang juga dapat disebabkan aktivitas biokimia berupa dekarbok-

silasi lisin. Dekarboksilasi lisin akan menghasilkan amin (bersifat basa) yang dapat menetralisasi asam.

Produksi total asam tertitrasi juga berkaitan dengan jumlah bakteri asidogenik yang ada di dalam *whey* tahu. Pada waktu inkubasi 24 jam terjadi peningkatan jumlah bakteri asidogenik, selanjutnya pada waktu inkubasi 48 dan 72 jam jumlah bakteri asidogenik cenderung mengalami penurunan. Hal ini diduga dikarenakan lebih dari 24 jam bakteri asidogenik telah melewati fase logaritmiknya. Produksi asam organik akan meningkat pada fase logaritmik dan akan mulai mengalami penurunan pada fase stasioner. Pada fase logaritmik terjadi penggandaan jumlah sel yang lebih cepat dari fase sebelumnya dan konsentrasi nutrisi pada media fermentasi juga semakin berkurang (Yuwono, 2007). Pertumbuhan dan perbanyakan sel bakteri juga diiringi dengan pembentukan metabolitnya (Nisa dkk, 2008). Metabolit primer yang dihasilkan oleh bakteri asidogenik adalah asam organik.

#### Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa persentase inokulum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pH, waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai pH, dan interaksi antara persentase inokulum dan waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pH. Rerata nilai pH pada berbagai persentase inokulum dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Rerata nilai derajat keasaman (pH) pada berbagai persentase inokulum

Persentase Inokulum (%)	Perlakuan	Derajat Keasaman (pH)	Notasi
5	A1	6,87	c
10	A2	6,51	b
15	A3	6,30	a

Keterangan: Angka yang mempunyai notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 7, rentang nilai pH adalah 6,30 – 6,87. Perlakuan A1 berbeda nyata terhadap A2 dan A3. Perlakuan B2 berbeda nyata terhadap A1 dan A3. Perlakuan A3 berbeda nyata terhadap A1 dan A2. Perlakuan terbaik adalah perlakuan dengan nilai derajat keasaman (pH) terendah, yaitu pada perlakuan A3. Pada persentase inokulum 5% pH media adalah 6,78, pada persentase inokulum 10% pH media adalah 6,51, dan pada persentase



inokulum 15%, pH media adalah 6,30. Perlakuan terbaik adalah pada penambahan inokulum 15% dengan nilai pH media 6,30. Semakin tinggi persentase inokulum menyebabkan semakin rendahnya pH media. Hal ini diduga dikarenakan semakin banyaknya jumlah bakteri yang melepaskan ion H<sup>+</sup> sebagai akibat perombakan zat organik menjadi produk asam. Pembentukan asam sebagai hasil dari fermentasi akan menurunkan pH media biakan (Pastra dkk, 2012).

### Kadar Gula Reduksi

Berdasarkan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa persentase inokulum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar gula reduksi, waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar gula reduksi, dan interaksi antara persentase inokulum dan waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar gula reduksi. Rerata kadar gula reduksi pada berbagai persentase inokulum dapat dilihat pada Tabel 8.

Kadar gula reduksi yang terukur selama proses fermentasi adalah kadar gula reduksi sisa yang tidak dimanfaatkan oleh bakteri asidogenik. Berdasarkan Tabel 8, rentang nilai kadar gula reduksi adalah 0,075 – 0,363%. Perlakuan A1 berbeda nyata terhadap A2 dan A3. Perlakuan A2 berbeda nyata terhadap A1 dan A3. Perlakuan A3 berbeda nyata terhadap A1 dan A2. Perlakuan terbaik adalah perlakuan yang menghasilkan sisa gula reduksi paling sedikit, yaitu perlakuan A3. Pada persentase inokulum 5% kadar gula reduksinya adalah 0,363%, pada persentase inokulum 10% kadar gula reduksinya adalah 0,190% dan pada persentase inokulum 15% kadar gula reduksinya adalah 0,075%. Perlakuan terbaik adalah pada persentase inokulum 15% dengan nilai kadar gula reduksi 0,075%. Kadar gula reduksi semakin menurun dengan semakin tingginya persentase inokulum. Penurunan kadar gula reduksi diduga akibat pemanfaatan gula reduksi untuk pertumbuhan dan perbanyakan sel serta pembentukan metabolit bakteri. Semakin banyak jumlah bakteri maka semakin banyak substrat yang dikonsumsi.

Pada prinsipnya fermentasi adalah menumbuhkan mikroba pembentuk produk fermentasi (misal alkohol dan asam) pada lingkungan yang dikendalikan. Salah satu faktor keberhasilan fermentasi adalah jenis substrat. Mikroba membutuhkan energi yang berasal dari karbohidrat, protein, lemak, mineral, dan zat-zat

lainnya yang ada pada media fermentasi (Afriani, 2010). Pada penelitian ini substrat yang dikonsumsi oleh bakteri pembentuk asam adalah gula reduksi. Bakteri penghasil asam memanfaatkan gula reduksi sebagai sumber energi, pertumbuhan, dan pembentukan metabolit berupa asam organik selama proses fermentasi berlangsung (Nisa dkk, 2008).

Gula reduksi berupa glukosa merupakan sumber karbon utama bagi bakteri asidogenik untuk menghasilkan metabolit primer berupa asam organik. Ketersediaan substrat yang cukup akan menghasilkan produk fermentasi yang optimal. Namun pada penelitian, kadar gula reduksi sebelum ditambahkan inokulum nilainya sangat rendah yaitu 0,059%. Sehingga untuk memenuhi kebutuhan metabolismenya, bakteri asidogenik melakukan perombakan sumber karbon lainnya, yaitu merombak pati menjadi gula reduksi. Akibatnya kadar gula reduksi mengalami peningkatan pada penambahan inokulum 5%, nilainya menjadi 0,363%.

**Tabel 8.** Rerata kadar gula reduksi pada berbagai persentase inokulum

Persentase Inokulum (%)	Perlakuan	Derajat Keasaman (pH)	Notasi
5	A1	0,363	c
10	A2	0,190	b
15	A3	0,075	a

Keterangan: Angka yang mempunyai notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

**Tabel 9.** Rerata jumlah populasi bakteri pada berbagai persentase inokulum dan waktu inkubasi

Persentase Inokulum (A) (%)	Waktu Inkubasi (B)	Perlakuan	Pupulasi Bakteri (CFU/ml)
5	24 jam	A1B1	0,3 x 10 <sup>8</sup>
10		A2B1	0,1 x 10 <sup>8</sup>
15		A3B1	1,1 x 10 <sup>8</sup>
5	48 jam	A1B2	14 x 10 <sup>8</sup>
10		A2B2	0,7 x 10 <sup>8</sup>
15		A3B2	4,4 x 10 <sup>8</sup>
5	72 jam	A1B3	7,4 x 10 <sup>8</sup>
10		A2B3	1,9 x 10 <sup>8</sup>
15		A3B3	0,6 x 10 <sup>8</sup>

### Total Bakteri Asidogenik

Berdasarkan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah populasi bakteri asidogenik, persentase inokulum tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah populasi bakteri asi-

**Tabel 10.** Seleksi data

Persentase Inokulum (%)	Waktu Inkubasi (jam)	Perlakuan	TAT	pH	Gula Reduksi	TPC
5	24	A1B1	2,35	6,64	0,37	$0,3 \times 10^8$
10		A2B1	2,90	6,52	0,19	$0,1 \times 10^8$
15		A3B1	2,70	6,33	0,07	$1,1 \times 10^8$
5	48	A1B2	1,70	6,94	0,36	$14 \times 10^8$
10		A2B2	1,75	6,60	0,19	$0,7 \times 10^8$
15		A3B2	2,15	6,33	0,08	$4,4 \times 10^8$
5	72	A1B3	1,65	7,02	0,36	$7,4 \times 10^8$
10		A2B3	2,40	6,40	0,19	$1,9 \times 10^8$
15		A3B3	2,00	6,24	0,08	$0,6 \times 10^8$

dogenik, dan interaksi antara waktu inkubasi dan persentase inokulum tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah populasi bakteri asidogenik. Rerata jumlah populasi bakteri asidogenik pada berbagai persentase inokulum dan waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 9.

Persentase bakteri asidogenik yang ditambahkan sebelum dilakukan proses inkubasi adalah 5%, 10%, dan 15%. Namun setelah dilakukan inkubasi jumlah bakteri asidogenik tidak berbeda secara signifikan. Hal ini diduga berkaitan dengan kemampuan pertumbuhan bakteri asidogenik. Fase pertumbuhan bakteri terdiri dari fase lag (fase adaptasi), fase logaritmik (fase eksponensial), fase pertumbuhan stasioner, dan fase kematian (Yuwono, 2007). Berdasarkan Tabel 9 rentang populasi bakteri asidogenik adalah  $0,1 - 14 \times 10^8$  CFU/ml. Pada waktu inkubasi 24 jam, jumlah bakteri asidogenik mengalami peningkatan, namun pada waktu inkubasi 48 dan 72 jam jumlah bakteri asidogenik tidak berbeda nyata atau tidak mengalami peningkatan.

### Penentuan Perlakuan Terbaik

Penentuan kombinasi perlakuan terbaik dilakukan berdasarkan uji BNT yang telah dilakukan sebelumnya pada keempat parameter. Adapun keempat parameter tersebut meliputi pH, kadar gula reduksi, kadar total asam tertitrasi, dan total bakteri asidogenik. Perlakuan terbaik adalah perlakuan yang memiliki notasi "a" pada keempat parameternya.

Pada Tabel 10, kombinasi perlakuan terbaik ditunjukkan dengan adanya tanda blok warna hijau yang ada pada keempat parameter. Tanda blok mengindikasikan bahwa parameter tersebut memiliki notasi "a" pada uji lanjut yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu pada uji BNT. Hasil yang didapatkan, terdapat tiga kombinasi perlakuan yang memiliki tanda blok warna hijau

pada keempat parameternya, yaitu perlakuan A3B1, A3B2, dan A3B3. Pemilihan perlakuan terbaik hanya dilakukan pada satu kombinasi perlakuan, yaitu perlakuan A3B1. Hal ini berkaitan dengan efisiensi waktu inkubasi, dengan waktu inkubasi 24 jam sudah dapat menghasilkan total asam tertitrasi yang tinggi. Adapun perlakuan A3B1 terjadi pada waktu inkubasi 24 jam dengan penambahan inokulum 15%, menghasilkan total asam tertitrasi 2,70%, nilai pH 6,33, kadar gula reduksi 0,07%, dan jumlah populasi bakteri asidogenik  $1,1 \times 10^8$  CFU/ml.

### KESIMPULAN

Berdasarkan analisis dan pembahasan terhadap hasil pengumpulan dan pengolahan data dapat disimpulkan bahwa:

1. Karakterisasi morfologi koloni isolat 1031 adalah berwarna putih tulang, berbentuk bulat, permukaannya timbul, dan tepiannya rata. Karakterisasi morfologi sel isolat 1031 adalah Gram negatif dan berbentuk batang. Berdasarkan hasil karakterisasi biokimia, isolat 1031 memiliki probabilitas kedekatan dengan *Hafnia alvei* biogp 1 sebesar 94,53%.
2. Persentase inokulum dan lama waktu inkubasi berpengaruh terhadap produksi total asam tertitrasi. Perlakuan terbaik adalah kombinasi perlakuan A3B1 (persentase inokulum 15% dan waktu inkubasi 24 jam), dengan nilai total asam tertitrasi 2,70%, nilai pH 6,33, kadar gula reduksi 0,07%, dan jumlah populasi bakteri asidogenik  $1,1 \times 10^8$  CFU/ml.

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya yaitu agar melakukan penambahan substrat gula untuk mendapatkan hasil produksi total asam organik yang optimal. Penambahan berbagai macam substrat gula, seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa juga akan lebih baik, karena dapat digunakan sebagai perbandingan

produksi total asam organik dari substrat gula yang berbeda.

#### Daftar Pustaka

- Afriani. (2010). Pengaruh Penggunaan Starter Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* Terhadap Total Bakteri Asam Laktat, Kadar Asam dan Nilai pH Dadih Susu Sapi. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan*. 8(6): 279-285.
- Aneja, K.R. (2003). *Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology*. New Delhi: New Age International.
- Cappuccino, J.G dan Natalie S. (2013). *Manual Laboratorium Mikrobiologi Edisi 8*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Dworkin, M., Stanley F., Eugene R., Karl H.S., and Erko S. (2006). *The Prokaryotes, Third Edition, A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass*. New York: Springer.
- Effendi, H. (2003). *Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Greenwood, D., Mike B., Richard S., and Will I. (2012). *Medical Microbiology, 18th edition*. British: Churchill Livingstone.
- Hidayat, N., Masdiana C. P., dan Sri S. (2006). *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: ANDI OFFSET.
- Legowo, A.M., Kusrahayu, dan Sri M. (2009). *Ilmu dan Teknologi Susu*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Mara, D. and Nigel H. (2003). *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. California: Academy Press.
- McDonald, P., Nancy H., dan Shirley H. (1991). *The Biochemistry of Silage, 1st Edition*. London: Chalcombe Publications.
- McMillan, J.A., Ralph D.F., Catherine D.D., and M. Douglas Jones. (2006). *Oski's Pediaiatrics, Principle and Practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Nisa, F.C., Joni K., dan Ruth C. (2008). Viabilitas dan Deteksi Subletal Bakteri Probiotik Pada Susu Kedelai Fermentasi Instan Metode Pengeringan Beku (Kajian Jenis Isolat dan Konsentrasi Sukrosa Sebagai Krioprotektan). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 9(1): 40-51.
- Oey, K.N. (1992). *Daftar Analisis Bahan Makanan*. Jakarta: UI Press.
- Pastra, D.A., Melki, dan Heron S. (2011). Penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina* sp. Sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung. *Maspari Journal*. 4(1): 77-82.
- Priyani, A. (2008). Karakterisasi Fisiologi dan Identifikasi Molekuler Isolat-Isolat *Bacillus* sp. Penghasil Bakteriosin Asal Tambak Udang. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Raihana, N. (2011). *Profil Kultur dan Uji Sensitivitas Bakteri Aerob dari Infeksi Luka Operasi Laparatomi di Bangsal Bedah RSUP Dr. M. Djamil Padang*. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Andalas. Padang.
- Ranggana, S. (1997). *Manual of Analysis of Fruit and Vegetables Product*. New Delhi: Tata McGraw Hill.
- Ratnani, R.D. (2011). Kecepatan Penyerapan Zat Organik Pada Limbah Cair Industri Tahu Dengan Lumpur Aktif. *Jurnal Momentum*. 7(2): 18-24.
- Rodriguez, L.A., C.S. Gallardo, F. Acosta, T.P. Nieto, B. Acosta and F. Real. (1998). *Hafnia alvei* as an Opportunistic Pathogen Causing Mortality in Brown Trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Diseases*. 21(5): 365-370.
- Schaechter, Moselio. (2009). *Encyclopedia of Microbiology, Third Edition*. California: Academy Press.
- Steel, R.G. dan J.H. Torrie. (1993). *Prinsip dan Prosedur Statistika (Pendekatan Biometrik)*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Sudarmadji, S. (1997). *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian, Edisi 4*. Yogyakarta: Liberty.
- Tuhu, A.R. dan Hanry S.W. (2010). Pengolahan Air Limbah Tahu dengan Menggunakan Teknologi Plasma. *Jurnal Ilmiah Teknik Lingkungan*. 2(2): 19-28.
- Waluyo, L. (2010). *Teknik dan Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. Malang: UMM Press.
- Yuwono, T. (2007). *Biologi Molekular*. Jakarta: Erlangga.
- Zieminski, K. and Frac, M. (2012). Methane Fermentation Process as Anaerobic Digestion of Biomass: Transformations, Stages and Micro-

Organisms. *African Journal of Biotechnology*.  
11(18): 4127-4139.

Zimbro, M.J., David A.P., Sharon M.M., George E.W.,  
and Julie A.J. (2009). *DifcoTM & BBLTM Manual:  
Manual of Microbiological Culture Media, Second  
Edition*. Maryland: Becton, Dickinson and Company.