

Penentuan Isolat Bakteri Asetogenik yang Mampu Menghasilkan Total Asam Tertinggi pada Pengolahan Limbah Cair Tahu secara Anaerob

Determination of Isolated Acetogenic Bacteria which Can Produce Highest Total Acid in Tofu's Wastewater by Anaerobic Treatment

Hana Afifah, Nur Hidayat*, Wignyanto

Department of Agro-industrial Technology, Faculty of Agricultural Technology, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran, Malang 65145, Indonesia

*nhidayat@ub.ac.id

Received: 26th September, 2017; 1st Revision: 28th February, 2018; 2nd Revision: 04th March, 2018; Accepted: 06th March, 2018

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh dari persentase inokulum dan waktu inkubasi terhadap kemampuan isolat bakteri asetogenik untuk memproduksi total asam tertinggi serta mengetahui karakteristik dari isolat bakteri tersebut. Rancangan Acak Kelompok (RAK) disusun secara faktorial dengan dua faktor yaitu persentase inokulum (I) (10%, 15%, 20%) serta faktor waktu inkubasi (W) (24 jam, 48 jam, 72 jam). Kombinasi perlakuan terbaik pada isolat bakteri asetogenik dalam menghasilkan asam adalah I₁W₁, yakni persentase inokulum 10% dan waktu inkubasi 24 jam. Pada perlakuan ini kadar asam asetat yang dihasilkan adalah 3,853%, pH 5,544, total bakteri 7,7 x 10⁷ CFU/ml, dengan kadar glukosa 2,5237%. Karakteristik dari isolat bakteri asetogenik terpilih secara morfologi koloni yaitu memiliki kenampakan warna putih, bentuk tidak beraturan, permukaan (elevasi) datar, dan tepi yang bergelombang. Berdasarkan morfologi sel, isolat bakteri merupakan bakteri Gram negatif bentuk batang. Berdasarkan identifikasi secara biokimia, isolat bakteri ini adalah *Acinetobacter* sp dengan probabilitas 51,25%.

Kata kunci: asam asetat, bakteri asetogenik, isolasi, persentase inokulum, waktu inkubasi

Abstract

The purpose of this research was to understand the effect of inoculum percentage and incubation time of acetogenic bacteria to produce total acid and to understand the characteristics of acetogenic bacteria that could produce the highest total acid. The experimental design used was Randomized Block Design that arranged in factorial with two factors: percentage of inoculum (I) (10%, 15%, 20%) and the factor Incubation time (W) (24 hours, 48 hours, 72 hours). The best treatment combination on isolated acetogenic bacteria to produce total acid was I₁W₁ (10% inoculum percentage and 24 hours incubation time). This treatment produced 3.853% acetic acid levels, 5.544 pH, 7.7 x 10⁷ CFU / ml total bacteria and 2.5237% glucose levels. The characteristics of isolated acetogenic bacteria based on colony morphology was white, irregular shape, surface (elevation) flat, and wavy edges. Based on cell morphology, the isolated bacteria were Gram-negative rod shape. Based on the biochemical identification, the isolated bacteria is an *Acinetobacter* sp with 51.25% probability.

Keywords: acetic acid, acetogenic bacteria, incubation time, isolation, percentage of inoculum

PENDAHULUAN

Limbah cair tahu memiliki tingkat pencemaran yang sangat tinggi karena mengandung nutrisi berupa lipid, karbohidrat dan protein (Septyana, Hidayat, & Anggarini, 2014). Berbagai upaya untuk mengolah limbah cair tahu telah dikembangkan. Proses pengolahan limbah secara biologis dibedakan menjadi proses pengolahan secara anaerob dan aerob. Pengolahan limbah secara anaerob untuk degradasi senyawa organik kompleks adalah proses yang terjadi karena aktivitas mikroba yang dilakukan pada saat tidak

terdapat oksigen bebas. Pada proses anaerob, senyawa organik kompleks (karbohidrat, minyak/ lemak dan protein) yang berantai panjang mula-mula didegradasi menjadi asam amino dan asam lemak sederhana berantai pendek, serta gas hidrogen dalam jumlah kecil (Metcalf & Eddy Inc., Tchobanoglous, Burton, & Stensel, 2003).

Pada pengolahan anaerob, bahan organik terdegradasi dan diubah menjadi CH₄ dan karbondioksida (CO₂) oleh serangkaian reaksi biokimia melalui interaksi metabolisme mikroorganisme anaerob (Saady, 2013). Tahapan utama proses anaerob yaitu hidrolisis, asidogenesis, ase-

togenesis, dan metanogenesis (Plaza, Robredo, Pacheco, & Saravia Toledo, 1996). Kelompok bakteri yang berbeda pada setiap tahapan akan saling bekerja secara bersinergi sehingga terbentuk konsorsium bakteri (Griffin, McMahon, Mackie, & Raskin, 1998). Konsorsium bakteri tersebut dapat digolongkan pada bakteri non metanogen dan bakteri metanogen. Bakteri non metanogen terbagi menjadi golongan bakteri asetogenik, asidogenik, dan hidrolitik (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2010). Golongan bakteri asetogenik berperan dalam pembentukan asetat, CO₂, H₂ dari asam-asam organik dan alkohol (Suciati & Muntalif, 2011).

Asam asetat merupakan substrat yang diperlukan oleh bakteri metanogen dalam memproduksi metan. Pada sistem biogas 55-70% terdiri dari gas metan (CH₄) (Deublein & Steinhauser, 2008), sehingga produksi asam asetat pada proses biogas merupakan hal yang sangat penting. Selain itu asam asetat merupakan bahan baku industri yang sangat penting (Spath & Dayton, 2003). Pada tahun 2003, permintaan asam asetat di seluruh dunia diperkirakan lebih dari 15 miliar pound (Johnson, 2000). Kombinasi produksi asam asetat dengan pengolahan limbah dapat secara bersamaan meningkatkan perekonomian dan bermanfaat bagi lingkungan (Nie, Liu, Du, & Chen, 2008). Proses pembentukan asam asetat melalui proses biologis ini memiliki beberapa keuntungan diantaranya lebih ekonomis dan ketersediaan biomassa yang terdapat pada limbah organik sangat melimpah (Sim, Kamaruddin, & Long, 2008).

Produksi asam asetat dengan bantuan mikroorganisme ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, suhu dan inokulum (Zhang, He, Ye, & Shao, 2008). Selain itu menurut penelitian yang dilakukan oleh Romero-Cortes, Robles-Olvera, Rodriguez-Jimenes, dan Ramirez-Lepe (2012), pertumbuhan bakteri penghasil asam asetat juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hafid, Rahman, Abd-Aziz, dan Hassan (2011) tentang produksi asam organik dari limbah dapur melalui digester anaerob, level tertinggi dari asam organik yang dihasilkan berada pada pH optimum 6,02, suhu 35,37°C, dan 20% inokulum. Asam organik yang dihasilkan salah satunya adalah asam asetat sebesar 10 g/L. Hasil menunjukkan bahwa parameter yang paling signifikan mempengaruhi biokonversi limbah untuk asam organik adalah suhu dan inokulum. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fontaine, Peterson, McCoy, Johnson, & Ritter (1942) fermentasi

glukosa oleh bakteri asam menjadi asam asetat terjadi setelah diinkubasi selama 72 jam. Faktor waktu inkubasi merupakan faktor yang penting untuk menghasilkan asam asetat karena semakin lama inkubasi, mikroorganisme yang digunakan dalam suatu proses fermentasi semakin aktif, kemampuan untuk memecah substrat meningkat dan menghasilkan asam organik semakin banyak (Sreeramulu, Zhu, & Knol, 2000). Proses fermentasi dipengaruhi faktor lain diantaranya persentase inokulum. Inokulum merupakan mikroorganisme yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi. Keberhasilan proses fermentasi sangat dipengaruhi oleh inokulum (Mushlihah & Herumurti, 2011).

Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian ini adalah memperoleh isolat bakteri asetogenik dari pengolahan limbah cair tahu secara anaerob pada tahap asetogenesis. Isolat bakteri yang diperoleh kemudian akan diseleksi dan diuji kemampuan dalam menghasilkan asam asetat. Uji kemampuan tersebut dipengaruhi oleh faktor persentase inokulum dan waktu inkubasi. Isolat bakteri asetogenik yang memiliki kemampuan menghasilkan total asam tertinggi (pada penelitian ini dinyatakan sebagai asam asetat), selanjutnya diidentifikasi secara biokimia. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan lebih lanjut dalam proses pembentukan asam asetat untuk industri serta dapat digunakan dalam pengolahan limbah cair tahu dengan memanfaatkan isolat bakteri asetogenik yang diisolasi dari limbah cair industri tahu.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah sampel air limbah yang diperoleh dari pabrik tahu ADMA, ampas tahu, agar bakteriologi, pepton bakteriologi, glukosa, alkohol 70%, akuades, *yeast extract*, kalsium karbonat. Bahan yang digunakan untuk analisis yaitu kristal violet, lugol program, alkohol aseton, safranin, indikator phenolptalin, NaOH 0,1N, *microbact reagent indole-kovacs*, *microbact reagent VP I*, *microbact reagent VP II*, *microbact reagent TDA*, *microbact reagent nitrate A*, *microbact reagent nitrate B*, dan *microbact reagent mineral oil*.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – Juli 2015 di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya. Analisis dan uji

dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Pelaksanaan Penelitian

Pengambilan Sampel Limbah Cair Tahu

Sampel yang digunakan adalah limbah cair yang dihasilkan oleh pabrik tahu. Pengambilan sampel dilakukan di saluran pembuangan air limbah. Pengambilan limbah cair dilakukan sekaligus dengan kerikil – kerikil dan lumpur yang berada di saluran pembuangan tersebut.

Pembuatan Sistem Anaerob dan Penentuan Tahap Asetogenesis

Sampel limbah cair tahu sebanyak 250 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Kemudian erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dilapisi dengan malam. Selanjutnya erlenmeyer dihubungkan dengan selang ke *beaker glass* yang sudah diisi dengan air dan ditambahkan desinfektan. Air di dalam *beaker glass* berfungsi untuk menampung gas yang dihasilkan pada proses anaerob. Keluarnya gas juga merupakan indikator aktivitas mikroorganisme pada limbah cair tahu tersebut. Identifikasi tahap asetogenesis dilakukan dengan cara analisa pH menggunakan pH meter. Sebelum dikondisikan secara anaerob, pH sampel limbah cair tahu diukur terlebih dahulu untuk mengetahui nilai pH awal. Pada tahap asetogenesis bakteri asam memproduksi asetat pada pH antara 5,5 – 6,5 (Hafid *et al.*, 2011).

Isolasi dan Seleksi Bakteri Asetogenik

Isolasi bakteri dilakukan pada media ekstrak ampas tahu. Langkah pembuatan media ekstrak ampas tahu yaitu sebanyak 100 gram ampas tahu dimasukkan ke dalam *beaker glass* 1000 ml dan dicampur dengan akuades sebanyak 1000 ml. Kemudian direbus hingga mendidih selama 2 jam. Selama proses perebusan, akuades terus ditambahkan agar ukuran ekstrak ampas tahu selalu 1000 ml. Setelah 2 jam, ekstrak ampas tahu didinginkan, kemudian disaring menggunakan kain saring. Hasil saringan ditambahkan akuades hingga volume 1000 ml.

Isolasi Bakteri Asetogenik:

Sampel air limbah cair tahu pada tahapan asetogenesis sebanyak 1 ml diencerkan hingga konsentrasi 10^{-5} menggunakan larutan pepton, kemudian masing–masing hasil pengenceran air

limbah tersebut diinokulasikan ke dalam cawan Petri berisi media ekstrak ampas tahu agar yang diperkaya dengan glukosa dan pepton dengan metode *pour plate*. Media disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit, kemudian media yang telah diinokulasikan dengan bakteri diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dan diamati koloninya yang tumbuh (Cappuccino & Sherman, 2011).

Koloni yang tumbuh dipurifikasi sampai diperoleh kultur murni. Tiap koloni isolat bakteri diambil secara aseptis dengan jarum ose dan diinokulasikan ke permukaan padat media agar dengan metode *streak-plate* (Cappuccino & Sherman, 2011) untuk tiap koloni dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika semua koloni tunggal menampakkan ukuran dan penampakan yang serupa, kultur dapat dianggap murni. Jika belum didapatkan kultur murni, teknik purifikasi dilakukan secara berulang hingga didapatkan isolat murni. Isolat murni yang diperoleh kemudian disimpan pada media agar miring (Hidayat, Padaga, & Suhartini, 2006; Rao, 2006).

Seleksi Bakteri Asetogenik:

Sebanyak 100 µl inokulum diinokulasi pada medium (GYC) (10% glukosa, 1,0% *yeast extract*, 2,0% kalsium karbonat, 1,5% agar). Selanjutnya media yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 30°C selama 3–4 hari. Koloni yang dapat memproduksi asam ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening (Sharafi, Rasooli, & Beheshti-Maal, 2010). Penggunaan kalsium karbonat berfungsi sebagai media seleksi pada bakteri penghasil asam. Kalsium karbonat akan dilarutkan oleh asam sehingga menimbulkan zona jernih di sekeliling koloni. Hal ini dapat digunakan sebagai penanda koloni bakteri asam (Seeley, Vandermark, & Lee, 2001).

Rancangan Percobaan

Rancangan Acak Kelompok (RAK) digunakan dengan disusun secara faktorial. Pengelompokan dilakukan pada ulangan dikarenakan jumlah digester anaerob yang terbatas. Pada rancangan ini digunakan 2 faktor yaitu persentase inokulum dan waktu inkubasi.

Faktor I : Persentase Inokulum (I)

I₁ : 10% (v/v)

I₂ : 15% (v/v)

I₃ : 20% (v/v)

Faktor II : Waktu Inkubasi (W)

W₁ : 24 jam

W₂ : 48 jam

W₃ : 72 jam

Berdasarkan 2 faktor di atas diperoleh 9 kombinasi perlakuan. Pada masing-masing kombinasi perlakuan, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, sehingga secara total terdapat 27 kombinasi perlakuan. Parameter yang diamati meliputi pengukuran total asam dengan metode titrasi (Aneja, 2003), pengukuran pH dengan pH meter (SNI 06-6989.11-2004), perhitungan total bakteri (Waluyo, 2010), dan pengukuran kadar glukosa dengan metode *Nelson Somogyi* (Sudarmadji, Haryono, & Suhardi, 1997).

Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*). Dilanjutkan dengan uji BNT atau DMRT. Selang kepercayaan yang digunakan adalah 5%.

Identifikasi Isolat Bakteri Asetogenik

Identifikasi isolat bakteri asetogenik dilakukan berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel, dan secara biokimia. Berdasarkan morfologi koloni, bakteri diamati warna, bentuk, elevasi, dan tepi koloni dari pertumbuhan pada cawan Petri. Berdasarkan morfologi sel, diamati reaksi mikroorganisme terhadap pewarnaan (Waluyo, 2010). Identifikasi bakteri secara biokimia dilakukan dengan menggunakan *microbact kit 24E*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Seleksi Bakteri Asetogenik

Berdasarkan hasil isolasi bakteri, diperoleh 9 isolat bakteri asetogenik dari limbah cair tahu. 9 isolat tersebut diberi kode dengan kose isolat A2-48, B2-48, A2-96, B2-96, A3-48, A3-96, B3-48, A2-24, dan B2-24. Huruf pertama pada kode tersebut menunjukkan pada tahap purifikasi terdapat isolat dengan karakteristik yang berbeda dalam satu cawan, kemudian dipurifikasi kembali dan dikodekan dengan huruf yang berbeda. Angka kedua pada kode menunjukkan tingkat pengenceran. Angka 2 menunjukkan tingkat pengenceran 10^{-2} , angka 3 menunjukkan tingkat pengenceran 10^{-3} . Dua angka terakhir menunjukkan lama inkubasi cawan Petri dalam inkubator. Angka 48 menunjukkan lama inkubasi cawan Petri dalam inkubator adalah 48 jam.

Sembilan isolat tersebut kemudian diseleksi untuk mendapatkan isolat yang dapat memproduksi asam. Kemampuan isolat dalam memproduksi asam ditandai dengan terbentuknya zona bening. Berdasarkan hasil seleksi, isolat yang menunjukkan terbentuknya zona bening adalah

isolat A3-48, dan B3-48. Data hasil pengukuran zona bening disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data hasil pengukuran zona bening

Kode isolat	Luas koloni (cm ²)	Luas zona bening (cm ²)	Nisbah
A3-48	0,358	0,865	2,420
B3-48	0,636	1,130	1,778

Uji Kemampuan Isolat Bakteri Asetogenik

Parameter yang diamati pada uji kemampuan ini adalah total asam, pH, jumlah bakteri, dan kadar glukosa.

Total Asam

Berdasarkan analisis ragam dan tabel ANOVA ($\alpha = 5\%$), faktor persentase inokulum, waktu inkubasi, dan interaksi persentase inokulum dengan waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Rata-rata total asam pada berbagai persentase dan waktu inkubasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata total asam pada berbagai persentase inokulum dan waktu inkubasi

Simbol	Persentase Inokulum (%)	Waktu Inkubasi (jam)	Total Asam (%)
I ₁ W ₁		24	3,853
I ₁ W ₂	10	48	3,603
I ₁ W ₃		72	3,498
I ₂ W ₁		24	3,003
I ₂ W ₂	15	48	3,503
I ₂ W ₃		72	3,203
I ₃ W ₁		24	3,153
I ₃ W ₂	20	48	3,453
I ₃ W ₃		72	3,653

Perhitungan total asam pada penelitian ini dinyatakan sebagai asam asetat. Nilai total asam tanpa ditambahkan inokulum adalah 2,402%. Jika dibandingkan dengan nilai total asam tanpa penambahan inokulum, maka nilai total asam setelah dilakukan perlakuan mengalami peningkatan. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri asetogenik mampu menghasilkan asam. Faktor persentase inokulum, waktu inkubasi, dan interaksi persentase inokulum dan waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap total asam. Hal ini diduga karena selama waktu inkubasi, kemampuan bakteri asetogenik dalam menghasilkan asam asetat mulai berkurang, karena faktor nutrisi yang semakin berkurang selama inkubasi. Menurut Fardiaz (1988) faktor yaitu nutrisi yang mulai berkurang serta terbentuknya hasil-hasil metabolisme (metabolit sekunder) kemungkinan menghambat pertumbuhan bakteri.

Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan analisis ragam dan tabel ANOVA ($\alpha = 5\%$), faktor waktu inkubasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai pH. Faktor persentase inokulum dan interaksi persentase inokulum dengan waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Rata-rata pH pada berbagai waktu inkubasi disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata pH pada waktu inkubasi

Waktu Inkubasi (jam)	pH	Notasi
24	5,544	a
48	5,777	b
72	5,725	b

Keterangan: Angka dalam tabel diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%

Waktu inkubasi memberikan pengaruh nyata terhadap perubahan pH. Dapat dilihat bahwa nilai pH paling rendah terdapat pada waktu inkubasi 24 jam. pH awal sampel adalah 6 dan setelah diinkubasi 24 jam nilai pH semakin turun. Adanya pengaruh waktu inkubasi terhadap perubahan pH, dapat disebabkan karena selama waktu inkubasi mikroorganisme yang digunakan dalam suatu proses fermentasi semakin aktif, kemampuan untuk memecah substrat meningkat dan menghasilkan asam organik semakin banyak (Sreeramulu *et al.*, 2000). Peningkatan jumlah asam menyebabkan penurunan pH. Penurunan pH menunjukkan adanya proses fermentasi selama waktu inkubasi (Saccaro, Hirota, Tamime, & Nogueira De Oliveira, 2011; Shafiee *et al.*, 2010).

Total Bakteri

Berdasarkan analisis ragam dan tabel ANOVA ($\alpha = 5\%$), faktor persentase inokulum, waktu inkubasi, dan interaksi persentase inokulum dengan waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Rata-rata log total

bakteri pada berbagai persentase inokulum dan waktu inkubasi tampak pada Tabel 4. Total Bakteri sebelum sampel diinkubasi pada persentase inokulum 10% adalah $1,49 \times 10^7$ CFU/ml, total bakteri pada persentase inokulum 15% adalah $2,235 \times 10^7$ CFU/ml, dan total bakteri pada persentase inokulum 20% adalah $2,98 \times 10^7$ CFU/ml. Berdasarkan grafik pertumbuhan bakteri dari sebelum diinkubasi hingga diinkubasi pada 24, 48, dan 72 jam pertumbuhan bakteri cenderung konstan. Hal ini diduga disebabkan oleh nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri asetonik mulai berkurang. Berdasarkan penelitian dari Ruggeri, Tommasi, dan Sassi (2009), pada fase eksponensial glukosa sebagai sumber gula paling banyak dikonsumsi oleh bakteri. Sumber gula yang sedikit diduga mengakibatkan fase eksponensial berlangsung singkat.

Kadar Glukosa

Berdasarkan analisis ragam dan tabel ANOVA ($\alpha = 5\%$), faktor waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai kadar glukosa. Faktor persentase inokulum dan interaksi waktu inkubasi dengan persentase inokulum memberikan pengaruh yang signifikan. Rata-rata kadar glukosa pada berbagai persentase inokulum dan waktu inkubasi disajikan pada Tabel 5.

Berdasarkan pengukuran kadar glukosa pada Tabel 5, kadar glukosa terendah terdapat pada kombinasi perlakuan I₂W₁ (persentase inokulum 10% dan waktu inkubasi 48 jam). Kadar glukosa pada saat tidak ditambahkan inokulum adalah 4,9%. Berdasarkan waktu inkubasi, maka bakteri asetonik dapat memfermentasi glukosa menjadi asam asetat adalah pada saat waktu inkubasi 24-48 jam. Semakin lama waktu inkubasi pada jumlah inokulum yang semakin tinggi, kemampuan bakteri asetonik dalam memfermentasi glukosa menjadi asam semakin berkurang. Hal ini diduga disebabkan karena pada saat waktu

Tabel 4. Rata-rata log total bakteri pada berbagai persentase inokulum dan waktu inkubasi

Simbol	Persentase inokulum (%)	Waktu inkubasi (jam)	Total bakteri (CFU/ml)	Log
I ₁ W ₁		24	$7,7 \times 10^7$	7,888
I ₁ W ₂	10	48	$12,0 \times 10^7$	8,063
I ₁ W ₃		72	$7,9 \times 10^7$	7,896
I ₂ W ₁		24	$8,2 \times 10^8$	8,914
I ₂ W ₂	15	48	$9,6 \times 10^7$	7,984
I ₂ W ₃		72	$9,7 \times 10^7$	7,985
I ₃ W ₁		24	$1,4 \times 10^8$	8,150
I ₃ W ₂	20	48	$1,8 \times 10^8$	8,250
I ₃ W ₃		72	13×10^8	9,118

Tabel 5. Rata – rata kadar glukosa pada berbagai persentase inokulum dan waktu inkubasi

Simbol	Persentase inokulum (%)	Waktu inkubasi (jam)	Kadar glukosa (%)	Notasi
I ₁ W ₁		24	2,5237	a
I ₁ W ₂	10	48	3,6770	b
I ₁ W ₃		72	4,8677	c
I ₂ W ₁		24	1,4680	a
I ₂ W ₂	15	48	4,6457	bc
I ₂ W ₃		72	6,2857	de
I ₃ W ₁		24	2,5483	ab
I ₃ W ₂	20	48	4,3333	bc
I ₃ W ₃		72	5,7670	cd

Keterangan: Angka dalam tabel diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%

lebih dari 48 jam, nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri asetonik dalam kemampuan merombak substrat mulai berkurang. Menurut Kunaepah (2008), pada saat substrat mulai habis, mikroba menghasilkan aktivitas antibakteri untuk mempertahankan kondisi fisiologis. Sehingga kemampuan fermentasi bakteri asetonik berkurang.

Berdasarkan pengukuran kadar glukosa pada Tabel 5, kadar glukosa terendah terdapat pada kombinasi perlakuan I₂W₁ (persentase inokulum 10% dan waktu inkubasi 48 jam). Kadar glukosa pada saat tidak ditambahkan inokulum adalah 4,9%. Berdasarkan waktu inkubasi, maka bakteri asetonik dapat memfermentasi glukosa menjadi asam asetat adalah pada saat waktu inkubasi 24-48 jam. Semakin lama waktu inkubasi pada jumlah inokulum yang semakin tinggi, kemampuan bakteri asetonik dalam memfermentasi glukosa menjadi asam semakin berkurang. Hal ini diduga disebabkan karena pada saat waktu lebih dari 48 jam, nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri asetonik dalam kemampuan merombak substrat mulai berkurang. Menurut Kunaepah (2008), pada saat substrat mulai habis, mikroba menghasilkan aktivitas antibakteri untuk mempertahankan kondisi fisiologis. Sehingga kemampuan fermentasi bakteri asetonik berkurang.

Berdasarkan persentase inokulum, maka bakteri asetonik dapat memfermentasi glukosa menjadi asam asetat secara optimal pada saat pemberian inokulum 10%. Jika dibandingkan dengan kadar glukosa tanpa ditambahkan inokulum yakni 4,9%, kadar glukosa saat ditambahkan inokulum 10% menurun. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan bakteri merombak glukosa menjadi asam asetat pada persentase inokulum 10% adalah optimal, sedangkan saat pemberian inokulum 15% dan 20%, kadar glukosa meningkat dan proses fermentasi glukosa menjadi asam asetat kurang optimal. Hal ini menunjukkan

semakin banyak inokulum kemampuan fermentasi glukosa menjadi asam semakin menurun. Menurut Gibbons dan Westby (1986), penggunaan konsentrasi inokulum yang terlalu tinggi dengan kondisi lingkungan yang tidak sesuai dengan habitat bakteri dapat menyebabkan pengurangan kemampuan fermentasi bakteri.

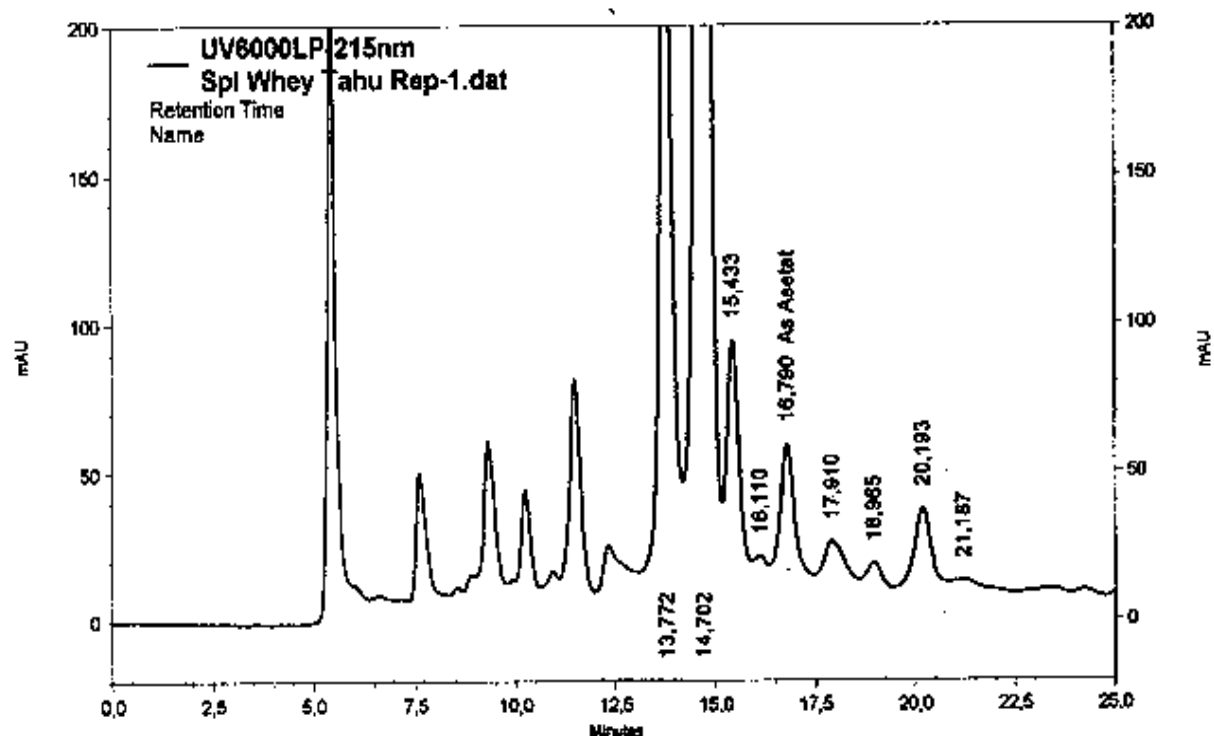
Pengukuran Kadar Asam Organik

Kadar dan jenis asam organik yang terbentuk selama fermentasi diukur dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Sampel yang dianalisis HPLC adalah sampel yang terpilih sebagai perlakuan terbaik yaitu I₁W₁ (waktu inkubasi 24 jam dan persentase inokulum 10%). Kadar asam organik yang analisis adalah kadar asam organik asam asetat. Kromatogram analisis kadar asam organik dapat dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil analisis dengan HPLC, kadar asam asetat yang dihasilkan adalah 221,86 ppm (µL/mL). Jika dilihat pada Gambar 1, terdapat beberapa puncak yang menunjukkan keberadaan asam organik yang dilihat berdasarkan waktu retensi. Kromatogram sampel I₁W₁ menunjukkan keberadaan asam asetat pada waktu retensi 16,790. Pada gambar juga dapat dilihat jika asam organik yang terbentuk beragam. Hal ini dapat dilihat dari banyaknya puncak yang menunjukkan keberadaan asam organik lain pada. Jika dilihat dari luas daerah puncaknya, terdapat asam organik lain yang lebih tinggi dibandingkan dengan asam asetat. Hal ini menunjukkan asam asetat bukan merupakan asam organik yang dominan pada sampel tersebut.

Identifikasi Morfologi Koloni dan Morfologi Sel pada Isolat Bakteri

Setelah didapatkan isolat bakteri yang menghasilkan asam tertinggi, dilakukan identifikasi



Gambar 1. Kromatogram sampel I₁W₁

morfologi koloni dan sel pada isolat bakteri tersebut. Berdasarkan morfologi koloni, memiliki kenampakan warna putih, bentuk tidak beraturan elevasi datar dengan tepi yang bergelombang. Berdasarkan morfologi sel, isolat bakteri merupakan bakteri Gram negatif bentuk batang.

Identifikasi Biokimia

Berdasarkan hasil identifikasi biokimia, nilai positif diperoleh pada *xylose*. Artinya isolat bakteri ini mampu memfermentasi *xylose*. Menurut Mohagheghi, Evans, Chou, dan Zhang (2002) mikroorganisme yang dapat memfermentasi *xylose* sensitif terhadap *glucose catabolite repression*, yaitu represi oleh glukosa dari enzim *katabolic* yang diperlukan untuk katabolisme karbohidrat selain glukosa. Represi katabolit terjadi ketika glukosa (produk awal metabolisme) menekan sintesis berbagai enzim respirasi. Pada karakteristik yang lain yakni *lysine*, *H₂S*, *glucose*, *ornithine*, *mannitol*, *ONPG*, *indole*, *V-P*, *urease*, *gelatin*, *TDA*, *citrate*, *malonate*, *sorbitol*, *inositol*, *lactose*, *rhamnose*, *sucrose*, *adonitol*, *arabinose*, *salicin*, *raffinose*, dan *arginine* diperoleh hasil negatif.

Hasil reaksi pada masing-masing uji dibuat suatu kombinasi angka yang selanjutnya diproses dengan software untuk mengetahui spesies bakteri. Berdasarkan identifikasi menggunakan

software microbact isolat bakteri terpilih memiliki kedekatan dengan spesies *Acinetobacter* sp dengan kemiripan sebesar 51,25%. Koloni muncul di atas permukaan media NA, berwarna putih, dan permukaannya mengkilat. Diameter koloni 0,1 - 0,3 μm . *Acinetobacter* sp berbentuk sel batang. Termasuk ke dalam bakteri gram negatif. Suhu pertumbuhan optimum 33-35°C. Termasuk pada bakteri yang tidak mampu bergerak (Nugroho SP, 2012).

Kelompok *Acinetobacter* dapat diaplikasikan untuk kepentingan lingkungan dan bioteknologi. *Strain Acinetobacter* juga dapat menjadi bakteri fermentasi untuk produksi sejumlah produk ekonomi ekstra dan intraseluler seperti D-galactose, asam propionat, asam amino (Abdel-haleem, 2003). Beberapa spesies *Acinetobacter* sp memiliki kapasitas menghasilkan asam dari *glucose*, *xylose*, *galactose*, *manose*, *rhamnose* dan *lactose*. *Strain Acinetobacter* sp yang lainnya memiliki aktivitas metabolisme yang terbatas. Hasil uji katalase positif dan memiliki reaksi negatif untuk beberapa substrat lain. Klasifikasi spesies dalam kelompok *Acinetobacter* seringkali sulit dilakukan karena diperlukan tes tambahan. Studi tentang *sequencing* (DNA) diperlukan untuk menentukan spesies dan menentukan hubungan antara organisme yang berbeda (Constantiniu, Romaniuc, Lancu, Filimon, & Tarași, 2004).

KESIMPULAN

Kombinasi perlakuan terbaik pada isolat bakteri asetonik dalam menghasilkan total asam adalah I1W1, yakni waktu inkubasi 24 jam dan persentase inokulum 10%. Pada perlakuan ini kadar asam asetat yang dihasilkan adalah 3,853%, pH 5,544, total bakteri $7,7 \times 10^7$ CFU/ml, dengan kadar glukosa 2,5237%. Karakteristik dari isolat bakteri asetonik terpilih secara morfologi koloni yaitu memiliki kenampakan warna putih, bentuk tidak beraturan, permukaan (elevasi) datar, dan tepi yang bergelombang. Berdasarkan morfologi sel, isolat bakteri merupakan bakteri Gram negatif bentuk batang. Berdasarkan identifikasi secara biokimia, isolat bakteri ini adalah *Acinetobacter* sp dengan probabilitas 51,25%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dirjen DIKTI, Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian yang dibiayai melalui Bantuan Operasional PTN (BOPTN) DIKTI 2014.

Daftar Pustaka

- Abdel-el-haleem, D. (2003). Minireview *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology*, 2(4), 71–74. <https://doi.org/10.4314/ajb.v2i4.14828>
- Aneja, K. R. (2003). *Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology*. New Delhi: New Age International.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2011). *Microbiology: A Laboratory Manual* (9th editio). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Constantiniu, S., Romaniuc, A., Lancu, L. S., Filimon, R., & Tarași, L. (2004). Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* Spp. strains isolated from hospital units. *The Journal of Preventive Medicine*, 12(3-4), 35–42.
- Deublein, D., & Steinhauser, A. (2008). *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Fardiaz, S. (1988). *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: IPB Press.
- Fontaine, F. E., Peterson, W. H., McCoy, E., Johnson, M. J., & Ritter, G. J. (1942). A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n.sp. *Journal of Bacteriology*, 42(6), 701–715.
- Gibbons, W. R., & Westby, C. A. (1986). Effects of inoculum size on solid-phase fermentation of fodder beets for fuel ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 960–962.
- Griffin, M. E., McMahon, K. D., Mackie, R. I., & Raskin, L. (1998). Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(3), 342–355. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980205\)57:3<342::AID-BIT11>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980205)57:3<342::AID-BIT11>3.0.CO;2-I)
- Hafid, H. S., Rahman, N. 'Aini A., Abd-Aziz, S., & Hassan, M. A. (2011). Enhancement of organic acids production from model kitchen waste via anaerobic digestion. *African Journal of Biotechnology*, 10(65), 14507–14515. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1360>
- Hidayat, N., Padaga, M. C., & Suhartini, S. (2006). *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi Offset.
- Johnson, W. K. (2000). *Chemical Economics Handbook: Marketing Research Report Acetic Acid*. Washington DC: Taylor and Francis.
- Kunaepah, U. (2008). *Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah*. Tesis. Program Magister Gizi Masyarakat. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2010). *Brock Biology of Microorganisms* (13th Ed). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Metcalf & Eddy Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F., & Stensel, H. D. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* (4th Ed). New York: McGraw-Hill Education.
- Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y.-C., & Zhang, M. (2002). Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98(1), 885–898. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:885>
- Mushlihah, S., & Herumurti, W. (2011). *Pengaruh pH dan Konsentrasi Zymomonas mobilis untuk*

- Produksi Etanol dari Sampah Buah Jeruk*. Skripsi. Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan. Institut Teknologi Sepuluh Noverber. Surabaya.
- Nie, Y., Liu, H., Du, G., & Chen, J. (2008). Acetate yield increased by gas circulation and fed-batch fermentation in a novel syntrophic acetogenesis and homoacetogenesis coupling system. *Bioresource Technology*, 99(8), 2989–2995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.018>
- Nugroho SP, R. B. A. (2012). Hubungan faktor risiko terjadinya Acinetobacter sp MDRO terhadap kematian penderita sepsis di PICU Rumah Sakit Dr Kariadi Semarang. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 1(1).
- Plaza, G., Robredo, P., Pacheco, O., & Saravia Toledo, A. (1996). Anaerobic treatment of municipal solid waste. *Water Science and Technology*, 33(3), 169–175. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00310-1](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00310-1)
- Rao, A. S. (2006). *Introduction to Microbiology*. New Delhi: Prentice-Hall of India Private Limited.
- Romero-Cortes, T., Robles-Olvera, V., Rodriguez-Jimenes, G., & Ramirez-Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2), 339–347. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.986>
- Ruggeri, B., Tommasi, T., & Sassi, G. (2009). Experimental kinetics and dynamics of hydrogen production on glucose by hydrogen forming bacteria (HFB) culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.076>
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Saccaro, D. M., Hirota, C. Y., Tamime, A. Y., & Nogueira De Oliveira, M. (2011). Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. *African Journal of Microbiology Research*, 5(23), 3901–3906. <https://doi.org/10.5897/AJMR-11-117>
- Seeley, H. W., Vandermark, P. J., & Lee, J. J. (2001). *Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology* (4th Ed). New York: W. H. Freeman.
- Septyana, S. Y., Hidayat, N., & Anggarini, S. (2014). *Efektivitas Sistem Wastewater Double Treatment dengan Kombinasi Biofilter Anaerob-Aerob pada Proses Pengolahan Limbah Cair Tahu*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Shafiee, G., Mortazavian, A. M., Mohammadifar, M. A., Koushki, M. R., Mohammadi, A., & Mohammadi, R. (2010). Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk. *African Journal of Microbiology Research*, 4(12), 1265–1274.
- Sharafi, S. M., Rasooli, I., & Beheshti-Maal, K. (2010). Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 41–48.
- Sim, J. H., Kamaruddin, A. H., & Long, W. S. (2008). Biocatalytic conversion of CO to acetic acid by *Clostridium aceticum*—Medium optimization using response surface methodology (RSM). *Biochemical Engineering Journal*, 40(2), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.006>
- Spath, P. L., & Dayton, D. C. (2003). *Preliminary Screening -- Technical and Economic Assessment of Synthesis Gas to Fuels and Chemicals with Emphasis on the Potential for Biomass-Derived Syngas*. Golden, Colorado. <https://doi.org/10.2172/15006100>
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., & Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2589–2594. <https://doi.org/10.1021/jf991333m>
- Suciati, A., & Muntalif, B. S. (2011). *Dinamika Pertumbuhan Mikroorganisme yang Berperan pada Degradasi Biowaste dalam Reaktor Anaerob Tercurah*. Skripsi. Fakultas Teknik Sipil dan Lingkungan. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., & Suhardi. (1997). *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Waluyo, L. (2010). *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang: UMM Press.
- Zhang, B., He, P. jing, Ye, N. fang, & Shao, L. ming. (2008). Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. *Bioresource Technology*, 99(4), 855–862.

