

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG
BATUBARA PENGHASIL ENZIM AMILASE DARI KAMPUNG KAJANG
TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR**



Diajukan oleh :

**Sintya Yunda Amanda
20144080 A**

**Kepada
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
Juli, 2018**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG
BATUBARA PENGHASIL ENZIM AMILASE DARI KAMPUNG KAJANG
TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Diajukan oleh :

**Sintya Yunda Amanda
20144080 A**

**Kepada
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
Juli, 2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

Dengan Judul :

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG
BATUBARA PENGHASIL ENZIM AMILASE DARI KAMPUNG KAJANG
TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR**

Oleh
Sintya Yunda Amanda
20144080A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada Tanggal : 02 Juli 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan

Prof. Dr. R. A. Oetari, S.U., M.M., M.Sc., Apt.

Pembimbing Utama

Dr. Ana Indrayati, M. Si
Pembimbing Pendamping

D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si
Penguji :

1. Dra. Nony Puspawati, M.Si
2. Dr. Supriyadi, M.Si
3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si

1.....

3.....

2.....

4.....

HALAMAN PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”

(Qs. Al- Mujadalah ;11)

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”

(Qs. Al-Insyirah ;5-6)

Dengan Mengucapkan Syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW

Skripsi ini kupersembahkan untuk orang-orang terdekat yang saya sayangi :

Ayahanda **Suriansyah** dan Ibunda tercinta **Supriyanti**.

Sebagai Motivator Terbesar di Dunia Akhiratku

Buat dosen pembimbing ibu Dr. Ana Indrayati, M.Si dan bapak D. Andang Arif

Wibawa, SP., M.Si terima kasi telah bersedia membimbing

skripsi ini dan telah meluangkan waktunya

Buat adikku tercinta **Muhammad Rifaldy** yang telah memberikan semangat

terbesar dalam hidupku. Nenek dan keluarga besarku yang tak

henti-hentinya memberikan dukungan sampai ku

menyelesaikan kuliah

Sahabat-sahabat seperjuanganku di Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, serta

Agama, Almamater, Bangsa dan Negaraku Tercinta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 02 Juli 2018

Tanda tangan



Sintya Yunda Amanda

KATA PENGANTAR

Segala Puji syukur kehadirat Allah SWT atas semua karunia-Nya. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada baginda junjungan kita Nabi Muhammad SAW. Semoga kita semua menjadi manusia yang selalu bersyukur dan menjadi orang yang lebih baik lagi.

Syukur Alhamdulillah tidak henti diucapkan penulis dengan anugrah kesehatan, rizki dari segala arah, kekuatan serta suntikan semangat untuk dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG BATUBARA PENGHASIL ENZIM AMILASE DARI KAMPUNG KAJANG TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Strata 1 pada Program Studi S1 Farmasi Universitas Setia Budi.

Skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari beberapa pihak, baik material maupun spiritual. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, M.BA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, S.U., M.M., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dwi Ningsih, M.Farm., Apt. selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi Universitas Setia Budi.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, petunjuk, motivasi, nasehat dan saran kepada penulis selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
5. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si selaku pembimbing pendamping yang memberikan tuntunan, bimbingan, nasehat, motivasi dan saran kepada penulis selama penelitian ini berlangsung.
6. Segenap dosen pengajar, laboran dan staff Program Studi S1 Farmasi Universitas Setia Budi yang telah banyak memberikan ilmu dan pelajaran berharga

7. Keluargaku tercinta Ayahanda, Ibunda, Adik, Nenek, Tua, Om, Tante, sepupuku tersayang Ica, Akbar, Kayla, Puput, Radit, Kaffi, Ima, Nissa, Winda dan lainnya terimakasih telah memberikan semangat dan dorongan materi, moril dan spiritual kepada penulis selama perkuliahan, penyusunan skripsi hingga selesai studi S1 Farmasi.
8. Untukmu Aditya Pradana terimakasih atas kesabaran, bantuan, dukungan, semangat, doa dan kasih sayangnya.
9. Untuk teman seperjuanganku Isti, Dewanty, Dinny selalu saling membantu dan mengingatkan.
10. Untuk teman-teman tercinta Ayu, Fero, Widya, Petra, Iyem, Jeng-jeng, Regina, dan lainnya yang tidak bisa disebutkan satu persatu terima kasih atas dukungan dan bantuan kalian.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan ini masih banyak terdapat kekurangan, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang sifatnya membangun dari pembaca guna kesempurnaan dalam penulisan dalam penulisan skripsi ini. Harapan penulis, skripsi ini dapat berguna bagi pihak yang terkait.

Surakarta, 02 Juli 2018

Penulis,

(Sintya Yunda Amanda)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Pertambangan Batubara	4
1. Definisi batubara	4
2. Definisi air asam tambang	4
B. Enzim Amilase	5
C. Amilum	7
D. Bakteri Amilolitik	7
E. Metode Uji Enzim Amilase	8
1. Metode difusi	8
F. Isolasi dan Identifikasi Bakteri	8
1. Isolasi bakteri	8
2. Identifikasi bakteri	8
G. Media	9
H. Landasan Teori	10
I. Hipotesis	11
BAB III METODE PENELITIAN	12
A. Populasi dan Sampel	12

1. Populasi.....	12
2. Sampel.....	12
B. Variabel Penelitian.....	12
1. Identifikasi variabel utama	12
2. Klasifikasi variabel utama	12
3. Definisi operasional variabel utama	13
C. Alat dan bahan	14
1. Alat.....	14
2. Bahan.....	14
2.1 Bahan utama.....	14
2.2 Bahan media.....	14
2.3 Bahan kimia	14
D. Jalan Penelitian	14
1. Sterilisasi	14
2. Pengambilan sampel air limbah tambang batubara	14
3. Pembuatan media amilum agar	15
4. Isolasi bakteri pada air limbah tambang batubara	15
5. Identifikais bakteri air limbah tambang batubara	15
5.1 Identifikasi secara makroskopis	15
5.2 Identifikasi secara mikroskopis	15
5.3 Identifikasi bakteri dengan uji biokimia.....	16
6. Pembuatan suspensi bakteri	17
7. Uji aktivitas enzim amilase dari bakteri asal limbah air tambang batu secara difusi sumuran.....	17
E. Analisis Hasil.....	18
F. Skema Penelitian.....	18
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	20
1. Pengambilan sampel air limbah tambang batubara	20
2. Isolasi dan skrining bakteri air limbah tambang batubara.....	20
3. Hasil identifikasi air limbah tambang batubara	20
3.1 Hasil identifikasi bakteri secara makroskopis	20
3.2 Hasil identifikasi secara mikroskopis.....	21
3.2.1 Hasil pewarnaan Gram.....	21
3.2.2 Hasil pewarnaan kapsul	21
3.2.3 Hasil pewarnaan spora	22
3.3 Hasil identifikasi bakteri dengan uji biokimia.....	22
4. Hasil pembuatan suspensi bakteri.....	26
5. Hasil uji aktifitas enzim amilase dari bakteri asal air limbah tambang batubara	26
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
1. Kesimpulan.....	30

2. Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	34

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Gambar 1. Skema isolasi bakteri pada air limbah tambang batubara ...	18
2. Gambar 2. Skema identifikasi bakteri pada air limbah tambang batubara	18
3. Gambar 3. Uji aktivitas enzim amilase dari bakteri asal air limbah Tambang batubara.....	19
4. Gambar 4. Diagram rata-rata replikasi indeks amilolitik	28

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Tabel 3.1. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara secara makroskopis	20
2. Tabel 3.2. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara secara mikroskopis	22
3. Tabel 3.3. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara dengan uji biokimia.....	23
4. Tabel 5. Hasil uji aktivitas enzim amilase dari bakteri asal air limbah tambang batubara.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Sampel air limbah tambang batubara Tenggara Kalimantan Timur	34
2. Isolasi dan skrining bakteri air limbah tambang batubara.....	35
3. Hasil karakter koloni lima isolat bakteri dari air limbah tambang batubara secara makroskopis	36
4. Hasil identifikasi isolat bakteri air limbah tambang batubara secara Mikroskopis	37
5. Hasil uji biokimia.....	40
6. Hasil pembuatan suspensi isolat bakteri.....	43
7. Hasil uji aktivitas amilase.....	44
8. Hasil perhitungan indeks amilolitik	45
9. Hasil perhitungan rata-rata indeks amilolitik	46
10. Bahan penelitian.....	47
11. Alat penelitian.....	50
12. Hasil uji statistik	52
13. Komposisi media	54

INTISARI

AMANDA, S.Y., 2018. ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG BATUBARA PENGHASIL ENZIM AMILASE DARI KAMPUNG KAJANG TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Enzim amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada senyawa polimer karbohidrat, molekul amilum akan dipecah oleh amilase pada ikatan α -1,4-glikosida dan α -1,6-glikosida. Enzim amilase dapat diproduksi oleh bakteri.

Penelitian ini menggunakan air limbah tambang batubara sebagai sumber bakteri penghasil enzim amilase dengan cara mengisolasi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi bakteri amilolitik untuk mengetahui kemampuannya dalam memproduksi enzim amilase dengan mengukur zona bening pada media amilum agar.

Hasil penelitian ini mendapatkan 5 isolat bakteri dengan karakterisasi yang berbeda yaitu isolat bakteri KPJ 1, KPJ 2, KPJ 3 dan KPJ 4 memiliki bentuk bulat dan KPJ 5 memiliki bentuk tidak beraturan, elevasi timbul, tepi licin dan bewarna putih susu. Lima isolat bakteri merupakan Gram positif, memiliki kapsul dan berspora.. Lima isolat bakteri memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim amilase dengan membentuk zona bening pada media amilum agar. Data pengukuran zona bening tertinggi terdapat pada isolat 4 dengan nilai 14,3 mm, kemudian isolat 3 dengan nilai 13,5 mm, isolat 2 dengan nilai 13,4 mm dan pada isolat 5 dengan nilai 12,6 mm dan zona bening terkecil terdapat pada isolat 1 dengan nilai 10,2 mm.

Kata kunci : air, limbah, batubara, isolat, bakteri, enzim, amilase.

ABSTRACT

AMANDA, S.Y., 2018. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ISOLATE OF BACTERIA PRODUCING COAL MINE WASTE WATER ENZYME AMYLASE FROM KAMPUNG KAJANG TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR, SKRIPSI, FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

The enzyme amylase is an enzyme which has the capability of deciding bonds glycosides found in the polymer compounds, carbohydrates, starch molecules will be broken down by amylase on bonds of α - α -glycosides and 1,4-1,6-glycosides. The enzyme amylase can be produced by bacteria.

The research of using waste coal mine water as a source of the enzyme amylase-producing bacteria by how to isolate, identify and characterize bacterial amilolitik for knowing his ability to produce amylase enzyme with clear zone measuring starch agar media.

The results of this research get 5 isolates of bacteria with different characterization of bacterial isolates namely KPJ KPJ 1, 2, 3 and 4 KPJ KPJ has a spherical shape and KPJ 5 has irregular shape, elevation, the edges of the slick and white Lake dairy. Five isolates of bacteria is Gram positive, have a capsule and berspora.. Five isolates of bacteria have the ability to produce amylase enzyme to form clear zones on starch agar media. Clear zone measurement data contained on the highest-value 4 isolate 14,3 mm, then isolate the value 3 with 13,5 mm, with a value of 2 isolate 13,4 mm and on the value of the isolate 12,6 mm and the smallest is found in the clear zone isolate 1 with a value of 10,2 mm.

Keywords: water, waste, coal, isolate, bacteria, enzymes, amylase.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalisator yang bekerja secara efisien dan spesifik. Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah (1) dapat meningkatkan produk beribu kali lebih tinggi; (2) bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah; dan (3) dapat menurunkan energi aktivasi. Enzim telah banyak digunakan dalam bidang farmasi contohnya amilase, lipase dan protease. Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Azmi, 2006). Beberapa enzim memiliki kemampuan mengkatalis pemecahan hidrolitik polimer-polimer biologis seperti protein, karbohidrat dan lemak sehingga dikenal sebagai hidrolase (Singleton dan Sainbury, 2006).

Penggunaan amilase mengalami peningkatan setiap tahunnya. Amilase secara konstitusi merupakan kelompok enzim yang sangat dibutuhkan dalam bidang industry dengan penguasaan pasar mencapai hampir 80% dari pasaran enzim di dunia. Industri enzim telah diproyeksikan mencapai US \$6,2 miliar pada tahun 2020. Alasan utama peningkatan dalam penjualan enzim karena peningkatan permintaan untuk industri makanan dan minuman, industri tekstil adalah enzim α -amilase. Amilase mendegradasi pati dan polimer yang serupa menjadi produk dengan rantai pendek sehingga dikarakteristikan menjadi enzim amioliti. Tiga enzm amiolitik yang paling dikenal yaitu α -amilase (GH13), β -amilase (GH14) dan glukoamilase (GH15) yang memiliki perbedaan pada urutan asam amino, struktur tiga dimensi, mekanisme reaksi katalitiknya (Janecek, 2009).

Indonesia sebagai negara dengan potensi sumber daya hayati yang cukup besar, merupakan sumber isolat potensial bagi kelompok bakteri penghasil amilase, maka perlu dilakukan pencarian sumber baru penghasil amilase salah satunya dengan bakteri yang terdapat pada air limbah tambang batubara. Indonesia merupakan salah satu produsen dan eksportir batubara terbesar didunia,

dimana pada tahun 2013, Indonesia berada diposisi ke empat terbesar produsen batubara didunia setelah Cina, USA dan Australia. Pertambangan adalah suatu bidang usaha yang karena sifat kegiatannya pada dasarnya selalu menimbulkan perubahan pada alam lingkungannya (BPLHD Jabar, 2005). Tambang batubara di Indonesia umumnya dilakukan dengan cara tambang terbuka, walaupun ada beberapa yang menggunakan tambang bawah tanah (*underground mining*), sehingga akan berdampak terhadap perubahan tentang alam, sifat fisik, kimia, dan biologis tanah, serta secara umum menimbulkan kerusakan pada permukaan bumi. Dampak ini secara otomatis akan mengganggu ekosistem, termasuk tata air. Dampak positif yang dihasilkan dari adanya pertambangan batubara adalah terbukanya lapangan kerja baru serta menambah pendapatan daerah tempat dilakukannya penambangan. (Subardja, 2007).

Salah satu tahapan dalam aktivitas penambangan adalah pengupasan tanah penutup. Secara kimia apabila tanah penutup yang dikupas mengandung material mineral sulfida kemudian terpapar oleh udara dan air hujan, maka akan terjadi proses pembentukan Air Asam Tambang (AAT / *Acid Mine Drainage* / AMD). Permasalahan lingkungan dalam aktivitas pertambangan batubara umumnya terkait dengan AAT. Air tersebut terbentuk sebagai hasil oksidasi mineral sulfida yang dikatalis oleh bakteri pengoksidasi besi dan sulfur seperti *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* dan *Thiobacillus thiooxidans*. (Johnson dan Hallberg 2005). Mengingat bahwa bakteri penghasil amilase sangat berpotensi dalam bidang industri, maka perlu dilakukan penelitian dalam upaya mencari sumber daya alam yang potensial. Berdasarkan permasalahan yang ada, maka penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat potensial amilolitik dan mengetahui aktivitas enzim amilase dengan cara mengisolasi bakteri yang berasal dari air limbah tambang batubara di Tenggarong Kalimantan Timur.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

Pertama, bagaimana karakter dari isolat bakteri yang ditemukan pada air limbah tambang batubara Tenggarong Kalimantan Timur ?

Kedua, apakah isolat bakteri yang didapat pada air limbah tambang batubara Tenggarong Kalimantan Timur mampu menghasilkan enzim amilase ?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, mengetahui karakter dari isolat bakteri dari air limbah tambang batubara Tenggarong Kalimantan Timur.

Kedua, mengisolasi isolat bakteri yang menghasilkan enzim amilase yang berasal dari air limbah tambang batubara Tenggarong Kalimantan Timur.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dibidang ilmu kesehatan, farmasi, dan MIPA terutama tentang enzim amilase yang bersumber dari bakteri asal air limbah tambang batubara diharapkan dapat menjadi referensi tambahan dan dapat memberikan landasan ilmiah bagi penelitian selanjutnya.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Pertambangan Batubara

1. Definisi

Batubara adalah termasuk salah satu bahan bakar fosil, terbentuk dari endapan organik, utamanya adalah sisa-sisa tumbuhan. Pembentukan batubara dimulai dengan proses timbunan tanaman dalam tanah dan membentuk lapisan gambut kadar karbon tinggi. Pembentukan batubara dari gambut (*coalification*) dipengaruhi oleh faktor material pembentuk, temperatur, tekanan, waktu proses, dan berbagai kondisi lokal seperti kandungan O₂, tingkat keasaman dan kehadiran mikroba. Proses *coalification* pada gambut terbagi menjadi 3 tahapan yaitu: pembusukan aerobik, pembusukan anaerobik, dan bituminisasi (perubahan lignit menjadi bituminus) (Sudibyo, 2008).

2. Air Asam Tambang

Air Asam Tambang (AAT) atau *acid mine drainage* (AMD) terbentuk karena adanya mineral sulfida (pirit) yang terekspos oleh oksigen dan air, dapat terbentuk dalam air tanah pada sebuah tambang yang masih aktif memproduksi. Senyawa-senyawa sulfur yang sering terdapat dalam air asam tambang adalah pyrite (FeS₂), marcasite (FeS₂), Pyrrhotite (Fe_xS_x), chalcocite (CuS₂), covelite (CuS), chalcopyrite (CuFeS₂), molybdenite (MoS₂), milerite (NiS), galena (PbS), sphalerite (ZnS), dan arsenopyrite (FeAsS) . Air tersebut terbentuk sebagai hasil oksidasi mineral sulfida yang di katalis oleh bakteri pengoksida besi dan sulfur *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* dan *Thiobacillus thiooxidans*. Thiobacillus berukuran kecil, bakteri Gram negatif, selnya berbentuk batang dengan beberapa spesies, bersifat motil dengan flagel polar. Energi didapatkan dari oksidasi satu atau lebih reduksi senyawa sulfur, termasuk sulfida, sulfur, thiosulfat, polithionat, dan thiosionat (Johnson dan Hallberg, 2005).

Sulfat merupakan produk akhir dari oksidasi senyawa sulfur, tetapi sulfur, sulfit, atau plithionat mungkin terakumulasi oleh kebanyakan spesies. Spesies tertentu juga mendapatkan energi dari mengoksidasi besi ferro menjadi besi ferri.

Seluruh spesies dapat mengikat karbon dioksida lewat lingkaran Benson Calvin dan mampu tumbuh secara autotropik beberapa spesies adalah obligat khemolitotropik. Bakteri ini hidup pada pH optimal 2-8 dan suhu optimal 20-43⁰C. Genus Thiobacillus juga dikenal dengan nama Acidithiobacillus. Genus ini bersifat termofilik, hidup pada suhu 45-50⁰C. genus ini juga termasuk dalam genus asidofil, yang hidup pada pH 1,5-2,5. *Leptospirillum ferrooxidans* merupakan bakteri yang dapat memanfaatkan pirit dengan mengoksidasi Fe (II) menjadi Fe (III), akan tetapi tidak mampu mengoksidasi sulfur secara langsung. *Thiobacillus ferrooxidans* mampu mengoksidasi Fe (II) menjadi Fe (III) dan mengoksidasi senyawa-senyawa belerang tereduksi serta memanfaatkan oksidasi ini sebagai sumber energinya. Thiobacillus kebanyakan hidup secara aerob obligat yang memerlukan keberadaan oksigen untuk kehidupannya. Pada Thiobacillus sumber energi berasal dari oksidasi sulfur elemental, sulfit, thiosulfate, poliyhionat dan thiosionat yang dijadikan sebagai donor elektron (Robertson and Kuenen, 2005).

B. Enzim Amilase

Amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada senyawa polimer karbohidrat, molekul amilum akan dipecah oleh amilase pada ikatan α -1,4-glikosida dan α -1,6-glikosida. Hidrolisa amilum dapat dilakukan secara kimia, atau dengan enzim amilase sebagai katalis. Amilase menghidrolisis substrat yang berupa amilum sehingga dihasilkan siklodekstrin dan campuran karbohidrat sederhana. Amilase dapat dikelompokkan menjadi 3 golongan enzim yaitu (Syowiecki, 2007).

1. α -amilase (α -D-1,4-glukan-glukano-hidrolase)

Merupakan endo-acting enzim yang bekerja dengan memutuskan ikatan α -1,4-glikosidik secara acak dibagian dalam molekul baik amilosa maupun amilopektin yang mengandung lebih dari 15 unit glukosa. Aktivitas α -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati yang larut atau kadar dekstrinnya dengan menggunakan substrat jenuh. Hilangnya substrat dapat diukur dengan pengukuran drajat iodium

terhadap substrat. Enzim ini ditemukan pada hewan, tanaman dan mikroorganisme, seperti *Bacillus licheniformis*. Hasil aktivitas enzim ini adalah D-glukosa, maltose, maltotriosa dan sejumlah dekstrin.

2. β -amilase (α -D-1,4-glukan-malto-hidrolase)

β -amilase merupakan eksoenzim yang memotong amilum menjadi gugus-gugus maltose. Enzim ini ditemukan pada tanaman tingkat tinggi dan mikroorganisme. β -amilase memecah ikatan glukosida α -1,4 pada pati dan glikogen yang terjadi secara bertahap dari arah luar atau ujung rantai gula yang bukan pereduksi, karena pemotongannya dari arah luar maka enzim ini disebut eksoamilase.

3. γ -amilase (Glukoamilase)

Glukoamilase merupakan enzim yang memotong rantai pati secara acak menjadi molekul-molekul glukosa. Hasil reaksinya hanya glukosa, sehingga dapat dibedakan dengan α dan β amilase. Dengan pengaruh glukoamilase posisi glukosa α dapat diubah menjadi β , pH optimal 4-5 dan suhu optimal 50-60° C. Glukosa ditemukan pada tanaman, hewan dan mikroorganisme seperti, *Saccharomyces*, *Endomycopsis*, *Aspergillus*, *Penicillum*, *Mucor* dan *Clostridium*.

Enzim amilase mendegradasi pati dan polimer yang serupa menjadi produk hasil sehingga dikarakteristikan menjadi enzim amilolitik. Keuntungan utama penggunaan mikroorganisme untuk produksi amilase adalah kapasitas produksi massal yang ekonomis serta stabilitasnya terhadap pH dan suhu. (Aiyer, 2005). Penelitian mengenai karakteristik enzim amilase dan sumbernya telah dilakukan sejak lama. Perbedaan sumber atau asal enzim mempengaruhi perbedaan karakteristik enzimnya. Aktivitas amilase dipengaruhi oleh temperature, pH dan kehadiran bahan-bahan kimia (Swain dan Ray, 2007).

C. Amilum

Karbohidrat yang tersusun lebih dari delapan satuan monosakarida disebut polisakarida. Amilum atau pati merupakan polisakarida yang banyak ditemukan pada tanaman. Senyawa ini disimpan dalam bentuk granula dengan ukuran dan karakteristik yang spesifik untuk setiap spesies tanaman. Beberapa contoh tanaman yang memiliki kandungan pati dengan konsentrasi tinggi yaitu jagung, sorghum, beras dan singkong, masing-masing sebesar 72,4%; 73%; 78,9% dan 34,7% (Van Der Maarel *et al.*, 2002).

Amilum disebut amylo dalam bahasa Yunani memiliki struktur yang berbeda-beda tergantung dari tumbuhan yang menghasilkannya. Pati merupakan polimer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α glukosidik dan granulanya terdiri dari dua jenis molekul α -D-glukosa yaitu amilosa yang mempunyai sifat tidak larut air, tetapi larut dalam air panas yang membentuk suatu larutan koloid yang kental dan amilopektin yang bersifat tidak larut baik dalam air panas maupun air dingin, namun dapat dihidrolisis sempurna dengan menggunakan asam sehingga menghasilkan glukosa (Nelson dan Cox, 2004).

D. Bakteri Amilolitik

Bakteri amilolitik merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang menghasilkan enzim amilase. Pada tahap awal untuk mendapatkan mikroba yang berpotensi sebagai penghasil enzim ialah dengan mengisolasi dan seleksi mikroba tersebut dari habitat alamnya. Mikroba yang diperoleh dari hasil isolasi harus memiliki kemampuan untuk melangsungkan reaksi atau menghasilkan produk yang diinginkan. Produksi amilase dari bakteri tergantung pada jenis strain, komposisi media, metode perbanyakan, pertumbuhan sel, kebutuhan nutrisi, massa inkubasi, pH, suhu, ion logam dan termostabilitasnya (Handayani *et al.*, 2002).

Menurut poernomo dan Purwanto (2003), pemilihan bakteri sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan enzim yang diisolasi dari tanaman, hewan, maupun fungi sebab sel bakteri relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan tumbuh relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih

mudah ditingkatkan bila dikehendaki, produksi yang lebih besar, biaya produksi relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek.

E. Metode Uji Enzim Amilase

1. Metode Difusi

Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi sumuran. Metode sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah zona bening disekeliling lubang (Ratnasari, 2009). Metode difusi dipengaruhi banyak faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antara obat dan organisme (misal, sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekuler dan stabilitas obat) (Jawetz *et al.*, 2007). Dalam penelitian ini zona bening menunjukkan aktivitas enzim amilase dalam menghidrolisis pati menjadi glukosa.

F. Isolasi dan Identifikasi Bakteri

1. Isolasi bakteri

Isolasi adalah salah satu cara untuk memisahkan mikroorganisme tertentu dari lingkungan dengan menggunakan media selektif, sehingga diperoleh biakan yang tidak tercampur dengan jenis yang lain atau biakan murni (Gandjar *et al.*, 1992). Biakan murni diperlukan untuk mempelajari sifat-sifat biokimia dan morfologi biakan tersebut. Isolasi dapat dilakukan dengan cara sebar (*spread-plate*), tuang (*pour-plate*), atau gores (*streak-plate*) (Capuccino & Sherman 2002).

2. Identifikasi bakteri

Proses identifikasi dilakukan dengan cara pengamatan terhadap bakteri secara morfologi dan fisiologi. Identifikasi morfologi secara makroskopis yang dilihat adalah warna koloni (pigmentasi: hijau, kuning, atau lainnya), bentuk koloni (seperti titik, melingkar, berfilamen, atau tidak beraturan), ukuran (diameter koloni: kecil, menengah, besar), elevasi koloni (sisi tampilan dari sebuah koloni:

cembung, cekung, datar), permukaan (permukaan koloni muncul: bergelombang, halus, granular, kasar, berpapila atau berkilau), serta batas koloni (halus atau tidak beraturan) (Jawetz *et al.*, 2012).

Identifikasi fisiologi secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram untuk mengetahui bentuk sel dan sifat bakteri terhadap warna. Bentuk yang paling umum dari bakteri cocci (bulat), bacilli (batang) dan spirilli (spiral). Pewarnaan Gram merupakan hasil dari wawasan kreatif Hans Christian Joachim Gram (1850-1938) untuk mengklasifikasikan bakteri berdasarkan sifat struktural dari dinding sel bakteri. Hal ini didasarkan pada pewarnaan Gram bahwa bakteri dapat berbeda-beda diklasifikasikan sebagai Gram positif atau Gram negatif. Pada prosedur pewarnaan gram, semua bakteri bewarna ungu oleh kristal violet sebagai zat warna primer. Sel bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal mempertahankan Kristal violet, bakteri tersebut dengan mikroskopis akan terlihat berwarna ungu dan disebut sebagai Gram positif. Sel bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis dan dilengkapi dengan membran luar lipopolisakarida, Kristal ungu akan hilang pada tahap pelunturan dan akan menyerap zat warna safranin sebagai counterstain. Bakteri tersebut dengan mikroskopis terlihat berwarna merah dan disebut sebagai Gram negatif (Jawetz *et al.*, 2012).

G. Media

Pembiakan mikroba dalam laboratorium memerlukan medium yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai dengan mikroorganisme. Zat hara yang digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan. Lazimnya medium biakan berisi air, sumber energi, zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen dan hidrogen. Faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleotida dapat pula ditambahkan ke dalam bahan dasar medium (Waluyo 2008).

Konsistensi media dapat dibuat bermacam-macam berdasarkan pada keperluannya. Bentuk media ada 3 yaitu media cair, padat dan setengah padat. Media cair (*liquid media*) dapat digunakan untuk pemberian organisme dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media padat (*solid media*) digunakan

untuk mengamati bentuk dan morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni. Media setengah padat (*semisolid media*) digunakan untuk menguji ada atau tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Sriyanti & Wijayani 2008).

H. Landasan Teori

Permasalahan lingkungan dalam aktivitas pertambangan batubara khususnya industri pertambangan batubara sangatlah perlu diperhatikan karena dampak yang akan ditimbulkannya dan erat hubungannya dengan jalannya proses pada suatu industri kemudian akan menjadi dasar dalam pengambilan kebijakan pada perusahaan, seperti pengelolaan limbah akibat kegiatan penambangan dan upaya pencegahan maupun pengendalian serta perbaikan terhadap kerusakan lingkungan yang mungkin ditimbulkan industri tersebut. Adapun dampak negatif terhadap lingkungan akibat dari kegiatan penambangan umumnya terkait dengan Air Asam Tambang (AAT) atau *Acid Mine Drainage* (AMD). Air tersebut terbentuk sebagai hasil oksidasi mineral sulfida yang dikatalis oleh bakteri pengoksidasi besi dan sulfur seperti *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* dan *Thiobacillus thiooxidans*. *Thiobacillus* berukuran kecil, bakteri Gram negatif, *Leptospirillum ferrooxidans* merupakan bakteri yang dapat memanfaatkan pirit dengan mengoksidasi Fe(II) menjadi Fe(III), akan tetapi tidak mampu mengoksidasi sulfur secara langsung (Johnson dan Hallberg 2005).

Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang memproduksi enzim amilase dan mampu memecah pati. Amilase adalah salah satu enzim karbohidrat yang menguraikan amilum menjadi maltosa. Amilase dapat memecah ikatan pada amilum hingga terbentuk maltose. Ada tiga macam enzim amilase, yaitu α amilase, β amilase dan γ amilase. Enzim ini memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum. Sedikitnya 50% dari produksi amilase. Enzim yang digunakan untuk keperluan industri sebagian besar diisolasi dari mikroba. Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan enzim yang diisolasi dari tumbuhan maupun hewan. Keuntungan itu

antara lain sel mikroba lebih mudah untuk ditumbuhkan dan kecepatan pertumbuhannya relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan apabila dikehendaki produksi yang lebih besar, biaya produksinya relatif lebih murah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya perubahan musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih singkat. Bakteri menghasilkan enzim ekstraseluler di dalam sel dan menggunakannya diluar sel, yaitu untuk menghidrolisis sumber makanan yang mengandung amilum yang terdapat di lingkungannya. Molekul amilum tidak dapat masuk ke dalam sel bakteri karena ukurannya sangat besar, karena itu molekul amilum dihidrolisis terlebih dahulu oleh enzim amilase ekstraselular menjadi molekul karbohidrat yang lebih sederhana dan kecil ukuran molekulnya. Molekul hasil hidrolisis amilum oleh enzim amilase tersebut selanjutnya akan diangkut masuk ke dalam sel bakteri dan digunakan sebagai sumber karbon bagi aktivitas pertumbuhan dan kehidupannya (Poernomo, 2003).

I. Hipotesis

Pertama, terdapat karakter tertentu dari isolat bakteri yang berasal dari air limbah tambang batubara Tenggarong Kalimantan Timur.

Kedua, terdapat isolat bakteri yang menghasilkan enzim amilase yang berasal dari air limbah tambang batubara Tenggarong Kalimantan Timur.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah air limbah batubara yang diperoleh di daerah Kampung Kajang, Tenggarong, Kalimantan Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri asal air limbah tambang batubara yang diambil dari saluran pipa, berwarna keruh dari tambang batubara Tenggarong Kalimantan Timur. Sampel air diambil sebanyak 300 ml dimasukkan kedalam botol, dan dikirimkan ke Surakarta. Pengambilan sampel air pada bulan Januari 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah bakteri asal air limbah yang diperoleh dari tambang batubara.

Variabel utama kedua adalah masing-masing isolat bakteri asal air limbah tambang batubara menghasilkan enzim amilase.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah isolat bakteri air limbah tambang batubara.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah adanya penghasil enzim amilase dari beberapa isolat bakteri air limbah tambang batubara.

Variabel kendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah air limbah, bakteri, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat, serta bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian dan metode difusi sumuran.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, air limbah batubara adalah air yang berasal dari kegiatan penambangan batubara yang didapat dari daerah Tenggarong, Kalimantan Timur pada bulan Januari 2018.

Kedua, isolat bakteri adalah bakteri yang diperoleh dari air limbah batubara yang berasal dari daerah Tenggarong, Kalimantan Timur.

Ketiga, uji bakteri penghasil enzim amilase adalah uji menggunakan metode difusi sumuran dengan melihat terbentuknya diameter zona bening dalam media uji.

Keempat, isolasi bakteri adalah bakteri yang diperoleh dari air dengan melihat adanya pertumbuhan dalam media uji.

Kelima, identifikasi bakteri adalah bakteri yang diperoleh dari air dengan metode pewarnaan Gram negatif dan Gram positif, pewarnaan kapsul, pewarnaan endospora dan uji Biokimia.

Keenam, karakterisasi isolat bakteri air limbah batubara adalah dengan melihat bentuk, warna, tepi dan permukaan koloni.

Ketujuh, diameter zona bening adalah garis tengah daerah zona bening yang mengelilingi sumuran yang berisi sampel uji dianggap sebagai ukuran bakteri penghasil enzim amilase dan setelah ditetesi iodine berwarna bening kekuningan.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, Ose platina, kapas lidi, cawan petri, inkas, pipet tetes, pipet mikro pipet, lampu spiritus, autoklaf, inkubator, kaca objek, mikroskop, jangka sorong dan penggaris.

2. Bahan

2.1 Bahan Utama. Bahan utama yang digunakan adalah air limbah tambang batubara yang diperoleh dari Tenggarong, Kaltim.

2.2 Bahan Media. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Nutrien Agar* (NA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Amilum Agar*, media SIM (*Sulfida Indol Motility*), media KIA (*Kliger Iron Agar*), media LIA (*Lysin Iron Agar*) dan media Sitrat.

2.3 Bahan Kimia. Pewarnaan Gram menggunakan Gram A (cat kristal violet), Gram B (lugol iodin), Gram C (alcohol), Gram D (cat safranin), cat nigrosin dan *Malachite green*.

D. Jalan Penelitian

1. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan harus dalam keadaan steril. Cawan petri, pipet tetes, tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur disterilkan menggunakan oven pada suhu 150-170°C selama 30-60 menit. Ose platina disterilkan dengan pembakaran yaitu dengan membakarnya sampai pijar dengan lampu spiritus. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Pengambilan Sampel Air Limbah Tambang Batubara

Air limbah tambang batubara diambil di perusahaan batubara yang kemudian dimasukkan kedalam botol. Air limbah tersebut dibawa menggunakan transportasi udara. Bakteri yang ditargetkan dalam penelitian ini yaitu bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase.

3. Pembuatan Media Amilum Agar

Komposisi media padat adalah Agar 2 gram dan Amilum 1 gram dilarutkan dalam 100 ml aquadest, dipanaskan sampai larut sempurna kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri steril yang besar sekitar 50 ml (Laloknam, 2009).

4. Isolasi Bakteri Pada Air Limbah Tambang Batubara

Sampel air limbah tambang batubara diinokulasikan pada media BHI, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sampel yang sudah diinkubasi, diinokulasikan pada media NA dengan cara digores dengan jarum Ose secara 4 kuadran diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Bakteri yang tumbuh secara tunggal diambil sebanyak 5 isolat. Masing-masing 5 isolat bakteri di perbanyak kedalam media NA diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

5. Identifikasi Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

5.1 Identifikasi secara makroskopis

Identifikasi dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi meliputi bentuk koloni, permukaan koloni dan tepi koloni.

5.2 Identifikasi secara mikroskopis

Identifikasi dilakukan pada bakteri yang terpilih. Identifikasi dilakukan dengan uji pewarnaan Gram, pewarnaan kapsul, dan pewarnaan endospora.

Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk memastikan bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas. Smear pada objek gelas kemudian ditetesi dengan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama \pm 1 menit kemudian di bilas, ditetesi dengan Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna) \pm 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram C (alkohol sebagai peluntur) \pm 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram D (cat safranin sebagai cat penutup) di amkan \pm 1 menit kemudian dibilas. Objek gelas yang dilakukan pengecatan dilihat dimikroskop, bakteri dinyatakan Gram positif apabila berwarna ungu dibawah mikroskop dan bakteri dinyatakan Gram negatif apabila berwarna merah dibawah mikroskop (Volk dan Wheller 1988).

Pewarnaan kapsul. Pewarnaan kapsul bertujuan untuk mengamati kapsul bakteri. Pewarnaan dilakukan dengan cara diambil 1 Ose isolat bakteri diletakkan dikaca objek ditambahkan 1 tetes cat nigrosin dibuat smear lalu dikeringkan. Kemudian ditetesi kristal violet kemudian didiamkan selama 1 menit dicuci dengan air mengalir. Keringkan dan tambahkan minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop. Kapsul tidak menyerap warna sehingga terlihat lapisan terang yang tembus dengan latar belakang yang berwarna (Cappucino dan Sherman, 2005).

Pewarnaan spora. Pewarnaan spora bertujuan untuk mengamati spora bakteri. Pewarnaan spora dilakukan dengan cara aquadest ditetaskan diatas kaca objek kemudian ditambahkan 1 Ose isolat bakteri, lalu difiksasi diatas api. Tetesi Malachite green 2-3 tetes kemudian dipanas uapkan hingga uap terlihat lalu dibilas dengan air mengalir, kemudian ditetesi sapranin didiamkan selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir. Keringkan dan tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop. Spora berwarna hijau sedangkan sel lain berwarna merah (Cappucino dan Sherman, 2005).

5.3 Identifikasi bakteri dengan uji biokimia.

Identifikasi bakteri, medium yang digunakan yaitu SIM, KIA, LIA dan Sitrat.

Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni bakteri diinokulasikan pada permukaan media dengan cara ditusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif jika terdapat warna hitam pada media, uji indol positif jika terbentuk cincin merah setelah ditetesi Erlich A dan Erlich B, uji motilitas positif jika pertumbuhan bakteri menyebar.

Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasikan secara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa), ada tidaknya gas dan sulfida.

Media LIA (*Lysine Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasikan secara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji diaminasi lisin dan sulfida.

Media Sitrat. Biakan bakteri diinokulasikan secara tusukan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal.

6. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri diambil dari biakan murni diambil kurang lebih 2 Ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media BHI kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Tujuan disesuaikan suspensi bakteri dengan standard Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian.

7. Uji Aktivitas Enzim Amilase Dari Bakteri Asal Limbah Air Tambang Batubara

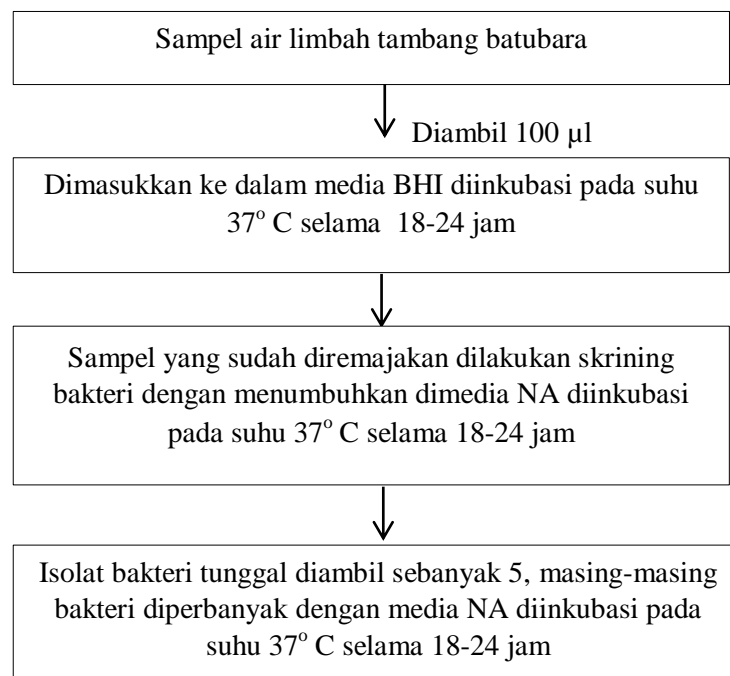
Uji aktivitas enzim amilase dilakukan dengan cara cawan petri diisi media amilum agar, setelah mengeras dibuat 5 sumuran menggunakan boor prop, diambil masing-masing 50 µl suspensi bakteri penghasil enzim amilase dimasukkan kedalam sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam setelah itu ditetesi iodin secara merata di sekitar sumuran. Diameter zona bening yang terbentuk selanjutnya diukur dan dibandingkan dengan diameter koloni untuk dihitung indeks amilolitiknya (Hanzen *et al.*, 2017).

$$\text{Indeks amilolitik} = \frac{\text{rerata } \theta \text{ zona bening} - \text{rerata } \theta \text{ koloni}}{\text{rerata } \theta \text{ koloni}}$$

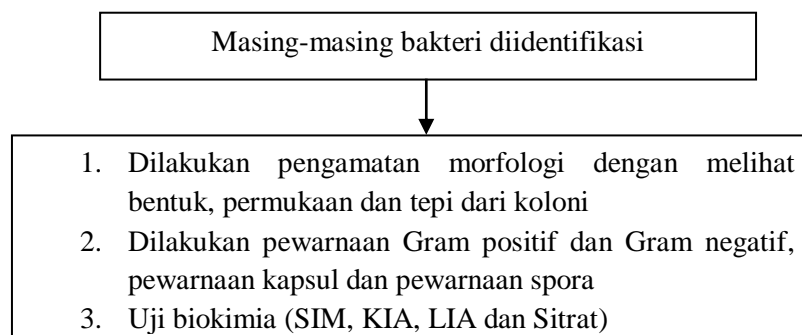
E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian diperoleh dengan mengukur daerah aktivitas enzim amilase dengan adanya zona bening, kemudian diukur diameter zona bening dari masing-masing lingkaran dengan menggunakan jangka sorong. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *One-sample Kolmogrov-Sminov* dan dilanjutkan dengan uji *ANOVA*, untuk melihat perbedaan pada kelima isolat menggunakan uji *Student Newman Keuls* (SNK).

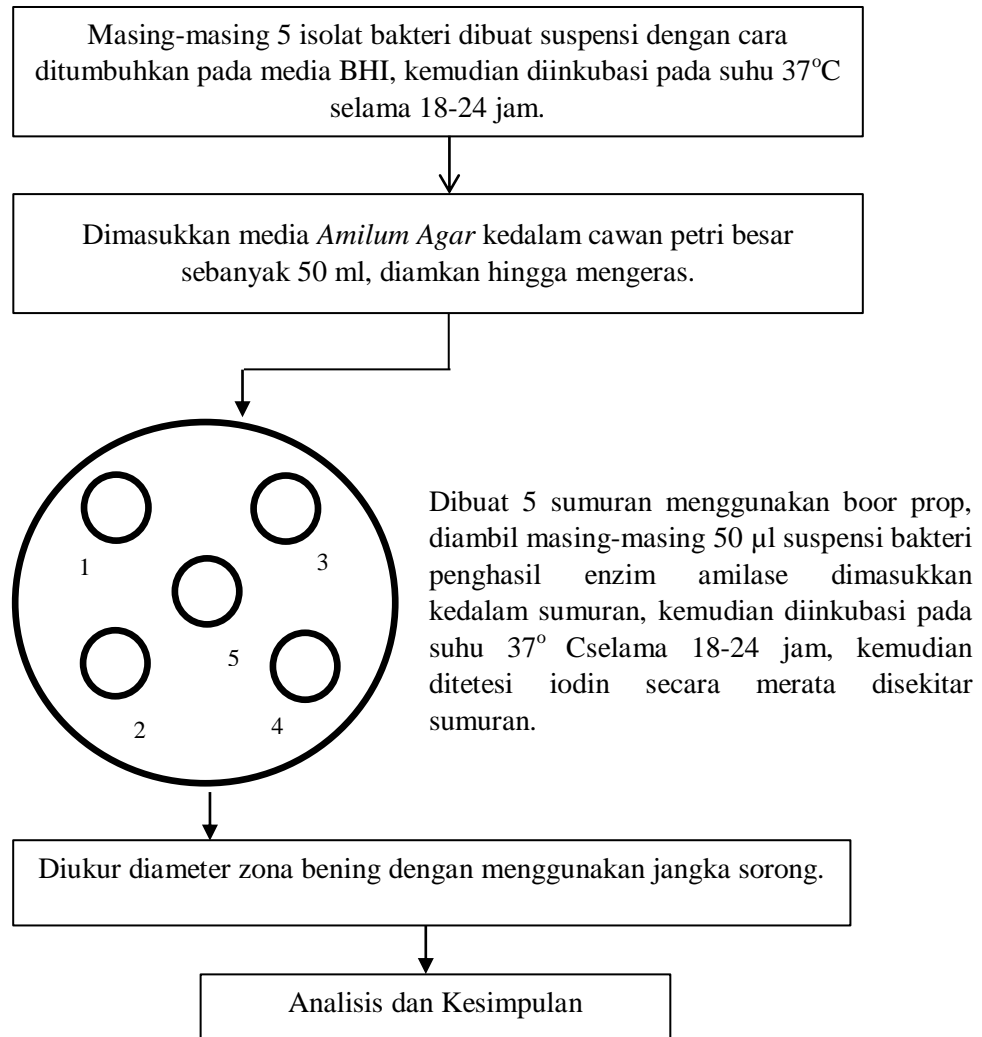
F. Skema Penelitian



Gambar 1. Skema isolasi bakteri pada air limbah tambang batubara



Gambar 2. Skema identifikasi bakteri pada air limbah tambang batubara



Gambar 3. Skema uji aktivitas enzim amilase dari bakteri asal limbah air tambang batubara

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengambilan Sampel Air Limbah Tambang Batubara

Sampel air limbah tambang batubara yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari salah satu perusahaan tambang batubara yang ada di daerah Tenggarong Kalimantan Timur. Sampel tersebut diambil dari penampungan limbah cair tambang batubara berupa kolam dengan kedalaman 1 meter, sampel diambil sebanyak 300 mL. Sampel air limbah tambang batubara dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Isolasi dan Skrining Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

Hasil isolasi dari air limbah tambang batubara didapatkan bakteri yang mampu tumbuh pada media NA (*Nutrien Agar*) kemudian di ambil sebanyak 5 isolat bakteri dengan bentuk yang berbeda-beda dan tunggal. Hasil isolasi dan skrining bakteri air limbah tambang batubara dapat dilihat pada Lampiran 2.

3. Hasil Identifikasi Air Limbah Tambang Batubara

3.1 Hasil identifikasi bakteri secara makroskopis

Hasil isolat dari air limbah tambang batubara diperoleh sebanyak 5 isolat yang mampu tumbuh pada media NA dengan karakter morfologi koloni seperti ditunjukkan pada Tabel 3.1. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara secara makroskopis dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 3.1. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara secara makroskopis.

Isolat	Bentuk	Tepi	Permukaan	Warna
KPJ 1	Bulat	Licin	Timbul	Putih susu
KPJ 2	Bulat	Licin	Timbul	Putih susu
KPJ 3	Bulat	Licin	Timbul	Putih susu
KPJ 4	Bulat	Licin	Timbul	Putih susu
KPJ 5	Tak beraturan dan menyebarkan	Berlekuk	Timbul	Putih susu

Keterangan :

KPJ = Kode isolat bakteri yang berasal dari perusahaan batubara

3.2 Hasil indentifikasi bakteri secara mikroskopis

3.2.1 Hasil pewarnaan Gram.

Pengujian pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan karakter isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Lapisan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram positif lebih tebal dibandingkan dengan gram negatif.

Hasil pengujian pewarnaan Gram menunjukkan Gram positif (warna biru) pada isolat bakteri KPJ 1, KPJ 2, KPJ 3, KPJ 4 dan KPJ 5. Sifat Gram positif dengan warna biru pada sel bakteri karena memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal. (Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.2.2 Hasil pewarnaan kapsul

Pewarnaan kapsul dilakukan untuk menentukan kapsul dari sel bakteri. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan nigrosin atau tinta cina. Pewarnaan dimaksudkan untuk mewarnai latar belakangnya, apabila bakteri mempunyai kapsul, maka dalam pengamatan sel bakteri akan tampak transparan dengan latar belakang berwarna hitam. Kapsul merupakan polimer yang terletak berlekatan dengan dinding sel maka lapisan ini disebut kapsul, jika polimer atau polisakarida ini tidak berlekatan dengan dinding sel maka lapisan ini disebut lender. Fungsi kapsul pada bakteri untuk mencegah mekanisme pertahanan inang seperti fagositosis yang dapat merusakkan bakteri. Kapsul melindungi bakteri dari tindakan fagositik leukosit dan memungkinkan patogen untuk menyerang tubuh. Jika patogen kehilangan kemampuannya untuk membentuk kapsul, dapat menjadi avirulent atau kurang memiliki kemampuan untuk menyebabkan penyakit dan menyebabkan bakteri lebih mudah rusak (Darkuni, 2001).

Hasil pengujian pewarnaan kapsul menunjukkan 5 isolat bakteri mempunyai kapsul, dalam pengamatan sel bakteri tampak transparan dengan latar belakang berwarna hitam. Terbentuknya warna transparan dikarenakan sel bakteri tidak mampu menyerap warna (Waluyo, 2008). Hasil pewarnaan kapsul dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.2.3 Hasil pewarnaan spora

Pewarnaan spora dilakukan untuk mengetahui letak spora didalam sel bakteri. Fungsi spora pada bakteri untuk mempertahankan diri dari pengaruh lingkungan luar. Spora akan lebih tahan lama dalam keadaan kering, panas atau adanya bahan kimia yang beracun (Sunatmo, 2007). Hasil pengujian pewarnaan endospora pada 5 isolat bakteri positif (warna merah pada sel vegetatif dan warna hijau pada endospora). Menurut Lay (1994) uji pewarnaan endospora positif jika sel vegetatif bakteri berwarna merah dan terdapat spora didalam sel yang berwarna hijau, sedangkan jika hanya ada sel vegetatif saja berwarna merah tidak ada spora hasilnya negatif. Hasil pewarnaan spora dapat dilihat pada Lampiran 4.

Hasil pewarnaan Gram, kapsul dan spora pada 5 isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara secara mikroskopis.

Isolat	Bentuk	Susunan	Warna	Kapsul	Spora
KPJ 1	Batang	Tunggal	Biru	Berkapsul	Berspora
KPJ 2	Batang	Tunggal	Biru	Berkapsul	Berspora
KPJ 3	Batang	Tunggal	Biru	Berkapsul	Berspora
KPJ 4	Batang	Tunggal	Biru	Berkapsul	Berspora
KPJ 5	Batang	Tunggal	Biru	Berkapsul	Berspora

Keterangan :

KPJ = Kode isolat bakteri yang berasal dari perusahaan batubara

3.3 Hasil identifikasi bakteri dengan uji biokimia

Uji biokimia dilakukan untuk mengidentifikasi suatu bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Uji pada media SIM bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Uji pada media KIA untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa), ada tidaknya gas dan sulfida. Uji pada media LIA untuk menguji diaminasi lisin dan sulfida. Uji pada media Sitrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji biokimia yang dilakukan pada 5 isolat bakteri masing-masing memiliki hasil yang berbeda yang dapat dilihat pada tabel 3.3. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara dengan uji biokimia dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 3.3. Hasil identifikasi isolat bakteri dari air limbah tambang batubara dengan uji biokimia.

Pengujian	KPJ 1	KPJ 2	KPJ 3	KPJ 4	KPJ 5
SIM	- + -	- - -	- - -	- + -	- - -
KIA	K/A S (-)	K/A S (-)	K/AG S (-)	K/AG S (-)	K/AG S (-)
LIA	K/k S (-)	K/k S (-)	K/k S (-)	K/k S (-)	K/k S (-)
Sitrat	+	+	+	+	+

Keterangan:

KPJ	: Kode isolat bakteri yang berasal dari perusahaan batubara	A	: Kuning
SIM	: Sulfida Indol Motility	K	: Merah atau Ungu
KIA	: Kliger Iron Agar	S	: Sulfida
LIA	: Lysin Iron Agar	G	: Gas
(+)	: Reaksi positif		
(-)	: Reaksi negatif		

Hasil karakterisasi pada isolat bakteri KPJ 1, pada media SIM menunjukkan (- + -) yaitu isolat bakteri tidak dapat memproduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida sehingga tidak munculnya berwarna hitam. Indol positif menghasilkan enzim tripanase yang mengubah triptopan menjadi indol ditambah asam piruvat NH₃. Indol bereaksi dengan reagen Erlich membentuk warna merah dan motilitas negatif yang berarti tidak ada penyebaran pertumbuhan bakteri. Pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses oksidasi dekarboksilasi protein membentuk amina yang bersifat alkali dengan adanya *fenol red*. Bagian dasar berwarna kuning (A) karena isolat bakteri memfermentasi karbohidrat yaitu menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang dikarenakan tidak memproduksi hidrogen sulfida. Pengujian pada media LIA memberikan hasil warna ungu pada lereng media atas dan bawah yang menandakan isolat bakteri tidak terjadi proses deaminasi lisin namun dapat terjadi proses dekarboksilasi lisin dan tidak membentuk warna hitam S (-) karena tidak memproduksi hidrogen sulfida. Pengujian pada media sitrat menunjukkan hasil positif berwarna biru, yang berarti isolat bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal.

Isolat bakteri KPJ 2, pada media SIM menunjukkan (- - -) yaitu isolat bakteri tidak dapat memproduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida sehingga tidak berwarna hitam. Indol negatif tidak menghasilkan enzim

triptanase yang mengubah triptopan menjadi indol ditambah asam piruvat NH_3 . Indol bereaksi dengan reagen Erlich tidak membentuk warna merah dan motilitas negatif yang berarti tidak ada penyebaran pertumbuhan bakteri. Pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses oksidasi dekarboksilasi protein membentuk amina yang bersifat alkali dengan adanya *fenol red*. Bagian dasar berwarna kuning (A) karena isolat bakteri memfermentasi karbohidrat yaitu menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang dikarenakan tidak memproduksi hidrogen sulfida. Pengujian pada media LIA memberikan hasil warna ungu pada lereng media atas dan bawah yang menandakan isolat bakteri tidak terjadi proses deaminasi lisin namun dapat terjadi proses dekarboksilasi lisin dan tidak membentuk warna hitam S (-) karena tidak memproduksi hidrogen sulfida. Pengujian pada media sitrat menunjukkan hasil positif berwarna biru, yang berarti isolat bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal.

Isolat bakteri KPJ 3, pada media SIM menunjukkan (- - -) yaitu isolat bakteri tidak dapat memproduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida sehingga tidak berwarna hitam. Indol negatif tidak menghasilkan enzim tripanase yang mengubah triptopan menjadi indol ditambah asam piruvat NH_3 . Indol bereaksi dengan reagen Erlich tidak membentuk warna merah dan motilitas negatif yang berarti tidak ada penyebaran pertumbuhan bakteri. Pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses oksidasi dekarboksilasi protein membentuk amina yang bersifat alkali dengan adanya *fenol red*. Bagian dasar berwarna kuning (A) karena isolat bakteri memfermentasi karbohidrat yaitu menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang dikarenakan tidak memproduksi hidrogen sulfida dan adanya gas pada dasar media. Pengujian pada media LIA memberikan hasil warna ungu pada lereng media atas dan bawah yang menandakan isolat bakteri tidak terjadi proses deaminasi lisin namun dapat terjadi proses dekarboksilasi lisin dan tidak membentuk warna hitam S (-) karena tidak memproduksi hidrogen sulfida.

Pengujian pada media sitrat menunjukkan hasil positif berwarna biru, yang berarti isolat bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal.

Isolat bakteri KPJ 4, pada media SIM menunjukkan (- + -) yaitu isolat bakteri tidak dapat memproduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfida sehingga tidak berwarna hitam. Indol positif menghasilkan enzim tripanase yang mengubah triptopan menjadi indol ditambah asam piruvat NH_3 . Indol bereaksi dengan reagen Erlich membentuk warna merah dan motilitas negatif yang berarti tidak ada penyebaran pertumbuhan bakteri. Pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses oksidasi dekarboksilasi protein membentuk amina yang bersifat alkali dengan adanya *fenol red*. Bagian dasar berwarna kuning (A) karena isolat bakteri memfermentasi karbohidrat yaitu menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang dikarenakan tidak memproduksi hydrogen sulfida dan adanya gas pada dasar media. Pengujian pada media LIA memberikan hasil warna ungu pada lereng media atas dan bawah yang menandakan isolat bakteri tidak terjadi proses deaminasi lisin namun dapat terjadi proses dekarboksilasi lisin dan tidak membentuk warna hitam S (-) karena tidak memproduksi hydrogen sulfida. Pengujian pada media sitrat menunjukkan hasil positif berwarna biru, yang berarti isolat bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal.

Isolat bakteri KPJ 5, pada media SIM menunjukkan (- - -) yaitu isolat bakteri tidak dapat memproduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfida sehingga tidak berwarna hitam. Indol negatif tidak menghasilkan enzim tripanase yang mengubah triptopan menjadi indol ditambah asam piruvat NH_3 . Indol bereaksi dengan reagen Erlich membentuk warna merah dan motilitas negatif yang berarti tidak ada penyebaran pertumbuhan bakteri. Pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses oksidasi dekarboksilasi protein membentuk amina yang bersifat alkali dengan adanya *fenol red*. Bagian dasar berwarna kuning (A) karena isolat bakteri memfermentasi karbohidrat yaitu menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang

dikarenakan tidak memproduksi hidrogen sulfida dan adanya gas pada dasar media. Pengujian pada media LIA memberikan hasil warna ungu pada lereng media atas dan bawah yang menandakan isolat bakteri tidak terjadi proses deaminasi lisin namun dapat terjadi proses dekarboksilasi lisin dan tidak membentuk warna hitam S (-) karena tidak memproduksi hidrogen sulfida. Pengujian pada media sitrat menunjukkan hasil positif berwarna biru, yang berarti isolat bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal.

4. Hasil Pembuatan Suspensi Bakteri

Hasil kekeruhan suspensi bakteri sesuai dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^8$ cfu/mL dengan penambahan media BHI sampai standar kekeruhan sama. Hasil pembuatan suspensi dapat dilihat pada Lampiran 6.

5. Hasil Uji Aktivitas Enzim Amilase Dari Bakteri Asal Limbah Air Tambang Batubara

Amilase merupakan enzim yang mampu mengkatalisis pemecahan ikatan glikosida dari pati menjadi gula sederhana. Amilase dapat mengubah karbohidrat yang merupakan polisakarida menjadi molekul yang lebih sederhana seperti dekstrin, maltosa maupun glukosa.

Uji aktivitas enzim amilase dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui kemampuan 5 isolat bakteri menghasilkan enzim amilase. Aktivitas amilase secara kualitatif dapat dilakukan dengan pengujian menggunakan iodium, dengan cara menambahkan iodium pada media amilum yang telah ditumbuhi koloni. Isolat yang menghasilkan amilase akan membentuk zona bening disekitar koloni. Terbentuknya zona bening karena pati sudah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida. Daerah di luar zona bening akan berwarna biru karena larutan iodium bereaksi dengan pati yang tidak dihidrolisis (Cruger & Annelias 1982). Data hasil pengukuran zona bening dari 5 isolat bakteri dengan tiga kali sampling dapat dilihat pada tabel 5.

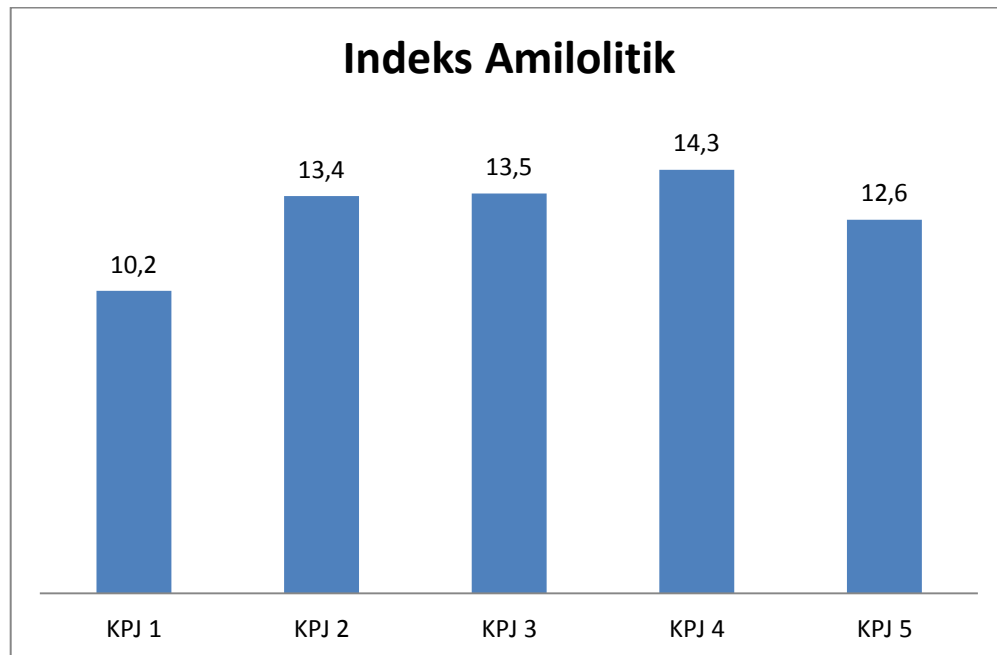
Tabel 5. Hasil uji aktivitas enzim amilase dari bakteri asal limbah air tambang batubara.

No	Isolat	Diameter zona bening (mm)			Diameter koloni (mm)			Indeks Amilolitik (mm)			Rata-rata Indeks Amilolitik (mm)	SD
		Sampling			Sampling			Sampling				
		I	II	III	I	II	III	I	II	III		
1	KPJ 1	18,5	22,2	18,6	9,3	10,3	9,7	9,9	11,6	9,2	10,2	1,23
2	KPJ 2	23	20,5	17,9	9,0	8,5	8,7	15,6	14,1	10,6	13,4	2,56
3	KPJ 3	20,1	21,2	24,8	9,1	8,6	10,4	12,0	14,7	13,9	13,5	1,38
4	KPJ 4	23,6	21,4	19,5	9,5	8,7	8,3	14,8	14,6	13,5	14,3	0,7
5	KPJ 5	24	19,3	20,1	9,5	10,3	8,5	15,3	8,7	13,7	12,6	3,44

Keterangan :

KPJ = Kode isolat bakteri yang berasal dari perusahaan batubara

Hasil pengujian pada 5 isolat bakteri mempunyai aktivitas amilolitik berupa visualisasi zona bening disekitar koloni. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa pati yang terdapat di dalam media dihidrolisis oleh amilase menjadi senyawa yang sederhana seperti maltosa, dekstrin, dan glukosa. Untuk memperjelas adanya zona bening, medium pati padat yang telah ditumbuhi bakteri ditetesi larutan *lugol's iodine*. Daerah di luar zona bening akan berwarna biru keunguan setelah diberi larutan tersebut, karena larutan iodin akan bereaksi dengan pati yang tidak dihidrolisis. Zona bening tidak ikut terwarnai karena pati yang terdapat pada zona tersebut sudah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida. Amilase ekstraseluler yaitu enzim yang dikeluarkan dan menghidrolisis pati 1% yang ada di lingkungan luar sel, dan kemudian hasil hidrolisis diserap kembali ke dalam sel bakteri untuk tumbuh, berkembang biak, sumber energi, dan cadangan makanan (Kaneko *et al.*, 2005). Data pengukuran zona bening tertinggi terdapat pada isolat 4 dengan nilai 14,3 mm, kemudian isolat 3 dengan nilai 13,5 mm, isolat 2 dengan nilai 13,4 mm, dan pada isolat 5 dengan nilai 12,6 mm dan zona bening terkecil terdapat pada isolat 1 dengan nilai 10,2 mm.



Keterangan :

KPJ = Kode isolat bakteri yang berasal dari perusahaan batubara

Gambar 4. Diagram rata-rata replikasi indeks amilolitik.

Diagram diatas menunjukkan potensi isolat bakteri dalam membentuk zona bening dengan indeks amilolitik tertinggi terdapat pada isolat bakteri KPJ 4, kemudian isolat bakteri KPJ 3, KPJ 2 dan KPJ 5, indeks amilolitik dengan potensi yang terendah terdapat pada isolat bakteri KPJ 1.

Hasil uji statistik dengan Kolmogorov-Smirnov signifikansinya (Sig) menunjukkan angka $0,479 > 0,05$ data tersebut terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji ANOVA signifikansinya (Sig) menunjukkan angka $0,685 > 0,05$ satu jalan dilanjutkan dengan uji *Student Newman Keuls* signifikansinya (Sig) menunjukkan angka $0,663 > 0,05$. Isolat KPJ 1, KPJ 2 KPJ 3, KPJ 4 dan KPJ 5 berada dalam satu subsets artinya tidak menunjukkan adanya perbedaan dari masing-masing isolat bakteri.

Arifin (2011) mengisolasi 4 bakteri amilolitik dari limbah cair tapioka PT. Florindo Makmur Desa Bangun Rejo Kabupaten Lampung Selatan dengan diameter zona bening masing-masing isolat berkisar 8,96 mm sampai 17,83 mm. Potensi dalam menghasilkan enzim amilolitik pada penelitian sebelumnya lebih tinggi dengan nilai tertinggi 17,83 mm dibandingkan dengan isolat bakteri air

limbah tambang batubara yang menghasilkan indeks amilolitik tertinggi dengan nilai 14,3 mm. Pengukuran aktivitas enzim amilase menunjukkan bahwa aktivitas enzim setiap isolat berbeda-beda, pada saat proses pengukuran aktivitas enzim amilase ada beberapa faktor yang mempengaruhi kerja enzim yang tidak sesuai dengan optimasi enzim yang dihasilkan masing-masing isolat, misalnya pH dan suhu. Menurut pH dari suatu larutan enzim dapat mempengaruhi keseluruhan aktivitas katalitik dengan berbagai cara dan sebagian besar enzim paling stabil pada pH fisiologi (7,4) (Handayani *et al* 2002).

Jenis *Bacillus sp* dan *Actinomycetes*, termasuk *Termomonospora* dan *Thermoactinomycetes* merupakan kelompok yang memiliki kemampuan besar dalam memproduksi enzim amilase (Reddy *et al.*, 2003). Enzim amilase sebagai katalis, seperti pada industri farmasi berfungsi sebagai pencernaan, industri pangan berperan dalam pembuatan makanan, minuman, ataupun gula cair. Pada industri non pangan amilase digunakan pada industri tekstil, kertas dan deterjen (Tresnawati *et al*, 2004; Naiola, 2008). Hasil pengukuran zona bening dari 5 isolat bakteri dengan tiga kali sampling dapat dilihat pada Lampiran 7.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil :

Pertama, didapatkan 5 isolat bakteri berbeda yang mempunyai bentuk bulat dan bentuk tidak beraturan, elevasi timbul, tepi licin dan bewarna putih susu. Lima isolat bakteri merupakan Gram positif, memiliki kapsul dan berspora.

Kedua, produksi enzim menggunakan media amilum 5 isolat bakteri didapatkan hasil zona bening tertinggi pada isolat 4 dengan nilai 14,3 mm, kemudian isolat 3 dengan nilai 13,5 mm, isolat 2 dengan nilai 13,4 mm, dan pada isolat 5 dengan nilai 12,6 mm dan zona bening terkecil terdapat pada isolat 1 dengan nilai 10,2 mm.

2. Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui genus isolat yang didapat dari air limbah tambang batubara dan perlu dilakukan pemurnian enzim amilase untuk mendapatkan hasil yang maksimal dan dapat mengetahui golongan enzim amilase tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P. V. 2005. Amilases and their application. *African Jurnal of Biotechnology*, 4: 1525-1529.
- Apun, K., Jong, B. C. dan Salleh, M. A. 2000. Screening and Isolation of a Cellulolytic and Amylolytic Bacillus Form Sagu Pith Waste. *General Application Microbial* 46: 263-267.
- Arifin, M. Z. 2011. Isolasi Bakteri Amilolitik Anaerob dari Limbah Cair Tapioka PT. Florindo Makmur Desa Bangun Rejo Kabupaten Lampung Selatan.
- Azmi, J. 2006. Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi *Aspergillus oryzae* untuk Isolasi Enzim Amilase pada Medium Pati Biji Nangka (*Arthocarpus heteropilus* Lmk). *Jurnal Biogenesis*. Vol. 2 (2): hal 55-58.
- Badan Pengendalian Lingkungan Hidup Daerah (BPLHD) Provinsi Jawa Barat. 2005. *Status Lingkungan Hidup Provisi Jawa Barat*. Badan Pengendalian Lingkungan Hidup Daerah (BPLHD) Provinsi Jawa Barat. 2005. *Status Lingkungan Hidup Provisi Jawa Barat*.
- Cappuccino, J. G and N. Sherman, 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 7th ed. Pearson Education Inc. USA.
- Cruger W and Annelieses C. 1984. *Biotechnology : A Text Book of Industrial Microbiology*. editor of the English Edition by Thoms D. Brock. Science Tech Inc. Madison. New York.
- Darkuni, M. N., 2001. Mikrobiologi (Bakteriologi, Virologi dan Mikologi), Universitas Negeri Malang, Malang.
- Gandjar, I., I. R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Dasar*. UI-Press, Depk: viii+87 hlm.
- Handayani D., Mubarik NR., dan Listiyawati S. 2002. *Islolasi dan Karakterisasi Amilasw Ekstra Seluler dari Kapang Asal Limbah Cair Tapioka*.
- Hanzen W. F. E., Hastuti U. S., Makkadafi A. P., Asna P. M. Al., dan Nugraheni F. S . A, 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Amilolitik dari Tanah yang Tercmpur Limbah Kulit Kayu di Bondowoso, Jawa Timur. *Jurnal Biologi-FKIP*.
- Ika O. S, Umami M. B dan Hesti R. 2015 Analisis Aktivitas Enzim Amilase yang Berasal dari Bakteri Tanah di Kawasan Universitas Jambi, Jambi.
- Janecek, S. 2009. Amylolytic enzymes-focus on the alpha-amilases from archaca and plants. *Nova Biotechnologica*, 9: 5-24.
- Jawetz, E., Melnick.,J.L., Adelberg, E.A., 2007, *Mikrobiologi Kedokteran*, 23th ed. Jakarta: ISBN978-979-448-859-1.

- Jawetz, E., Melnick.,J.L., Adelberg, E.A., 2012, *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, Diterjemahkan Oleh Bonang G., Edisi XXVI, ECG., Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta. Jawetz, E., Melnick.,J.L., E.A., 2012, *Medical Microbiology*, 26th . Ed. Elferia Nr, Penerjemah: Jakarta: UI.
- Johnson, D. B., & Hallberg, B. K. (2005). Acid Mine Drainage Remediation Options : A Review. *Science of the Total Environment*, 338 (1-2), 3-14.
- Kaneko, T., Ohno, T., and Ohisa, A. Purification and Characterization of a Thermostable Raw Starch Digesting Amylase from a *Streptomyces* sp. Isolated In a Milling Factory. *Bioscience Biotechnology. Biochemistry*. 2005; 69 (6): 1073-1081.
- Laloknam. 2009. Detection for amylase activity from fruit and vegetables in an undergraduate classroom. *As. J. food Ag-ind*. 2009, 2 (03), 381-390. ISSN 1906-3040.
- Lay BW. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium Jakarta*: PT. Raja Grafindo Persada.
- Naiola E. 2008. Mikrobia amilolitik pada nira dan laru dari Pulau Timor, Nusa Tenggara Timur. *Biodiversitas* 9 : 165-168.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. New York: W. H. Freeman Publisher.
- Poernomo, A. T dan Purwanto D. A. 2003. *Enzim Kitinase*. Majalah Farmasi Airlangga, Jakarta
- Ratnasari. Uji aktivitas antibakteri ekstrak diklorometan dan etil asetat daun MIMBA (*Azadiracnta indica* A. Juss). Terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Universitas Islam Negeri Syarifihidayatullah: Jakarta 2009.
- Reddy NS, Nimmagadda A & Rao KR. 2003. An overview of themicrobial α -Amylase family. *African Journal of Biotechnology*. 2: 645–648.
- Robertson, L.A and J.G. Kuenen, 2005. Thiobacillus: Description and Significance. (<http://microbewiki.kenyon.edu./index.php/thiobacillus>).
- Singleton and sainbury. 2006. *Dictionary of Microbiology and Moleculer Biology 3rd Edition*. England: John Wileyand Sons.
- Sriyanti DP, Wijayani A. 2008. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kansius.
- Subardja A. 2007. *Pemulihan Kualitas Lingkungan Penambangan Batubara: Karakterisaasi dan Pengendalian air asam Tambang di Berau*. Laporan Teknis, Proyek DIPA Puslit Geoteknologi – LIPI TA 2007.
- Sudibyoy, Bambang. 2008. *Karakteristik abu batubara (fly ash)*. [on line]

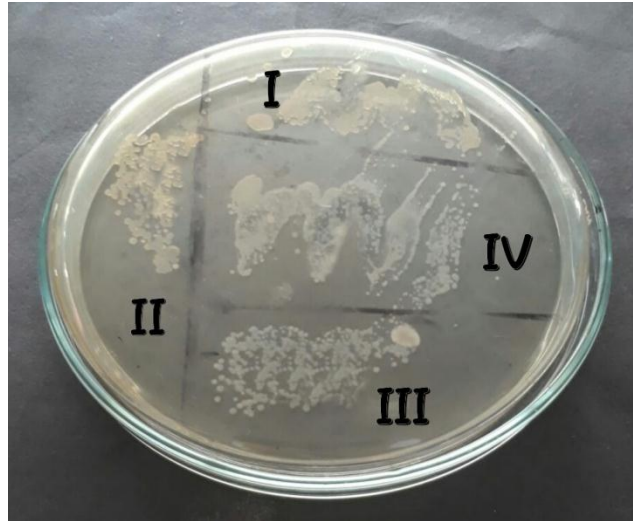
- Sunatmo TI. 2007. *Eksperimen Mikrobiologi Dalam Laboratorium*. Penerbit Ardy Agency, Bogor.
- Swain, M. R. dan R. C. Ray. 2007. Alpha amilase production by *B. subtilis* CM3 in solid state fermentation using cassava fibrous residues. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 417-425.
- Syowiecki, J. 2007. The Use Of Starch Processing Enzymes In The Food Industri. In: J. polaina AND A.P. MacCabe (eds). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer, p: 29-34.
- Tresnawati, Fadhillah, dan Widayani. 2004. Isolasi Bakteri Amilolitik Toleran pH 9 Dari Tanah di Taman Wisata Alam Situ Gunung-Sukabumi. *Jurnal PKMI*. Institut Pertanian Bogor.
- Van der maarel, M. J. E. C., B. van der Veen, J. C. M. Uitdehaag, H. Leemhuis, and L. Dijkhuizen. 2002. Properties and applications of starchconverting enzymes of the α -amilase family. *Journal of Biotechnology*, 94: 137-155.
- Volk dan Wheeler. 1998. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi kelima. Jilid I. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Waluyo L. 2008. *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Malang: Universitas Muhammadiyah Press.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sampel air limbah tambang batubara Tenggara Kalimantan Timur



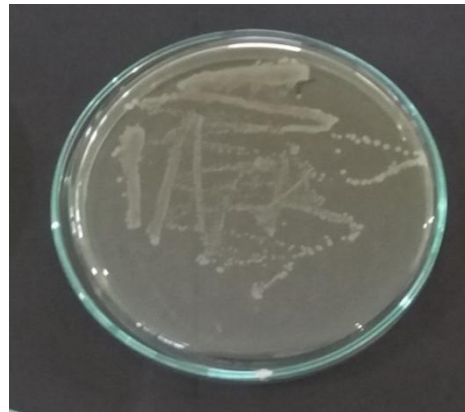
Lampiran 2. Isolasi dan skrining bakteri air limbah tmbang batubara



Lampiran 3. Hasil karakter koloni lima isolat bakteri dari air limbah tambang batubara secara makroskopis



Isolat KPJ 1



Isolat KPJ 2



Isolat KPJ 3



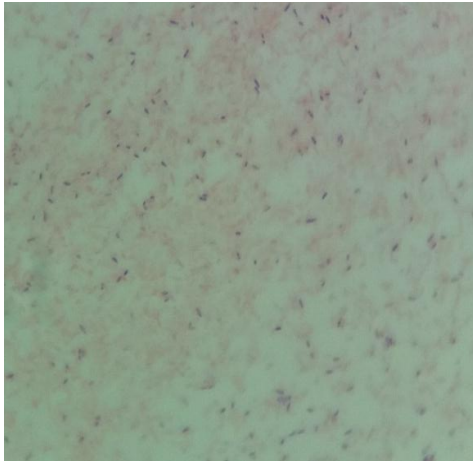
Isolat KPJ 4



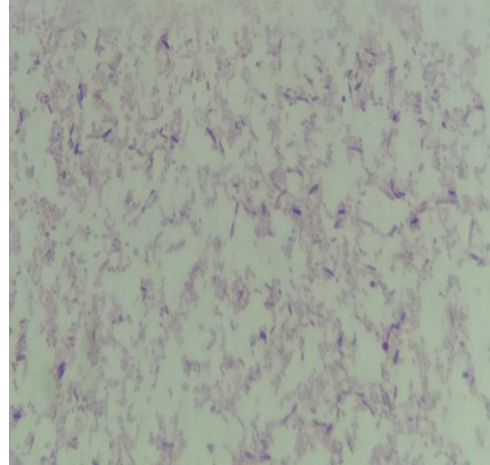
Isolat KPJ 5

Lampiran 4. Hasil Identifikasi isolat bakteri air limbah tambang batubara secara mikroskopis

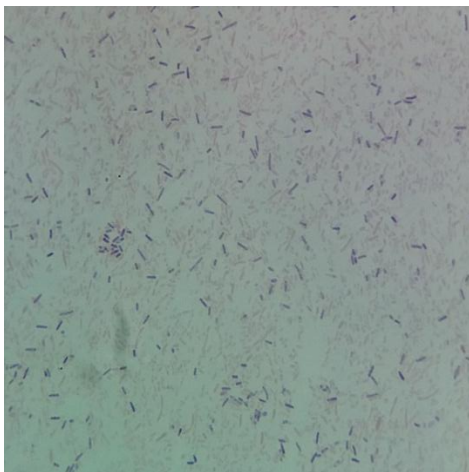
Pewarnaan Gram



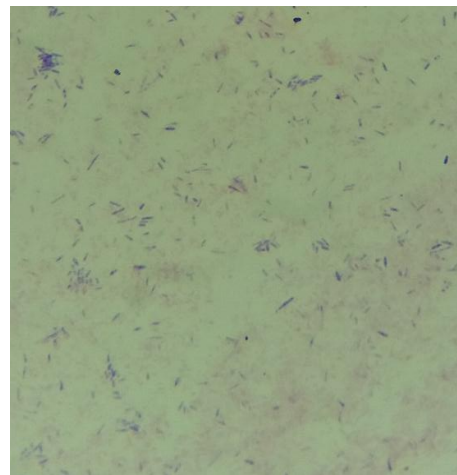
KPJ 1



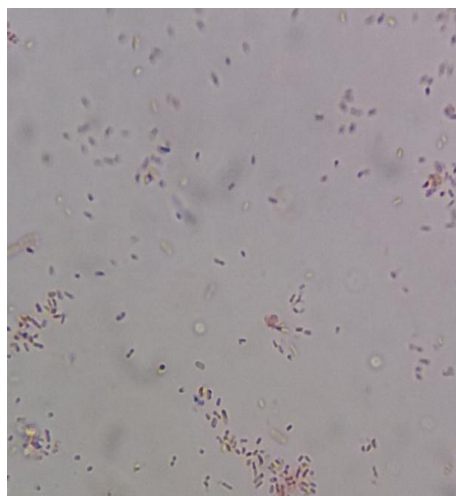
KPJ 2



KPJ 3

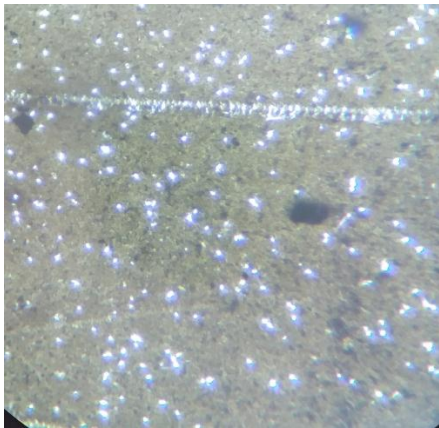


KPJ 4

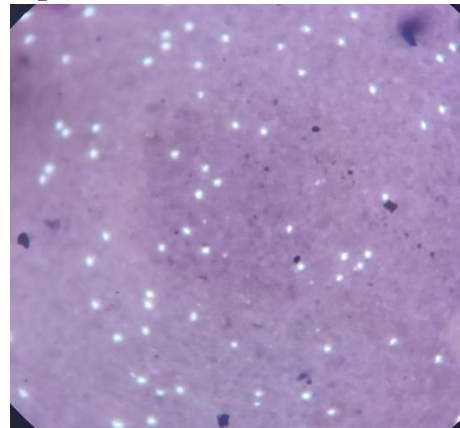


KPJ 5

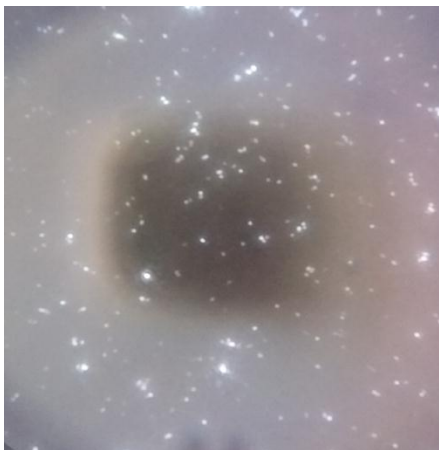
Pewarnaan Kapsul



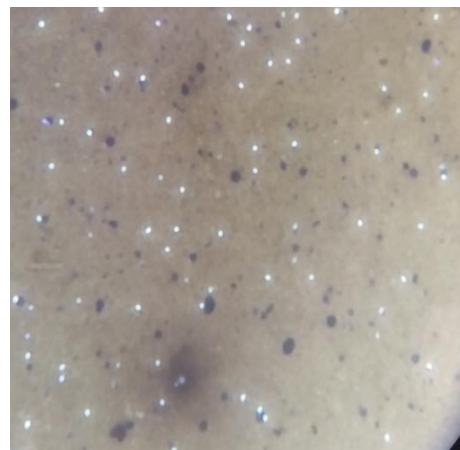
KPJ 1



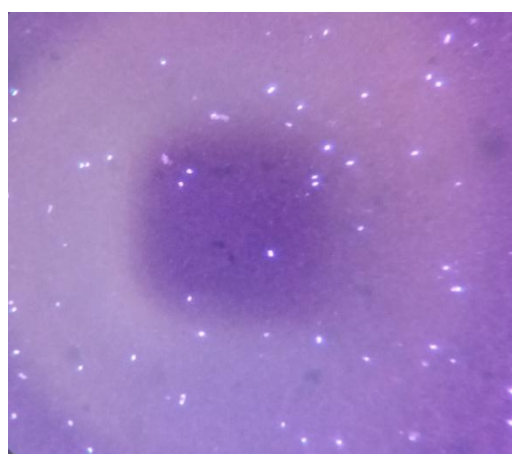
KPJ 2



KPJ 3

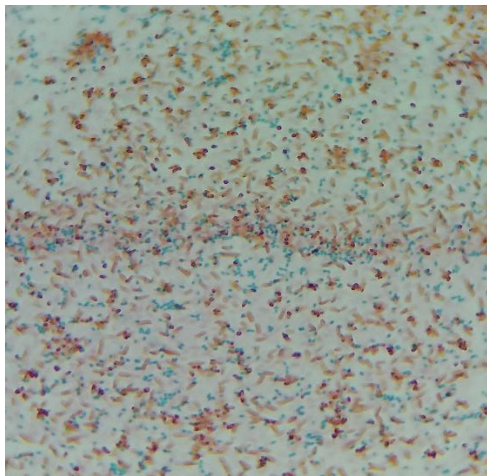


KPJ 4

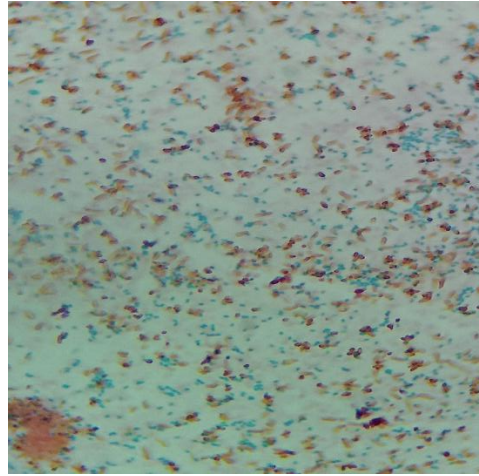


KPJ 5

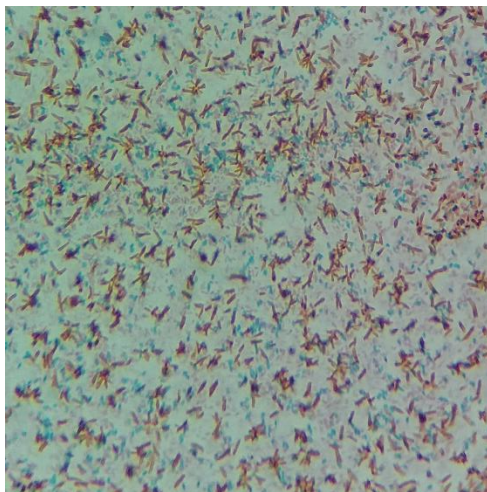
Pewarnaan Endospora



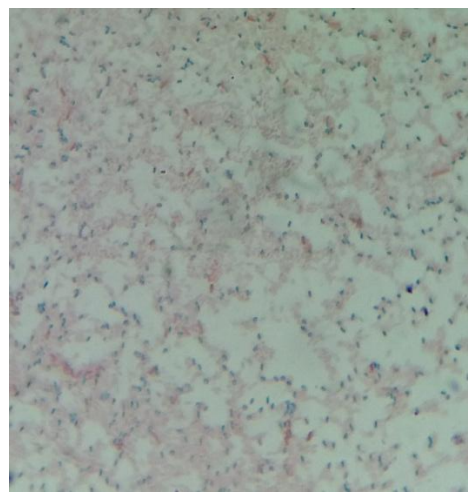
KPJ 1



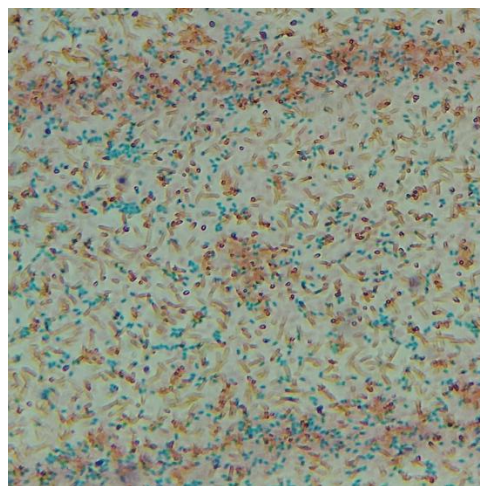
KPJ 2



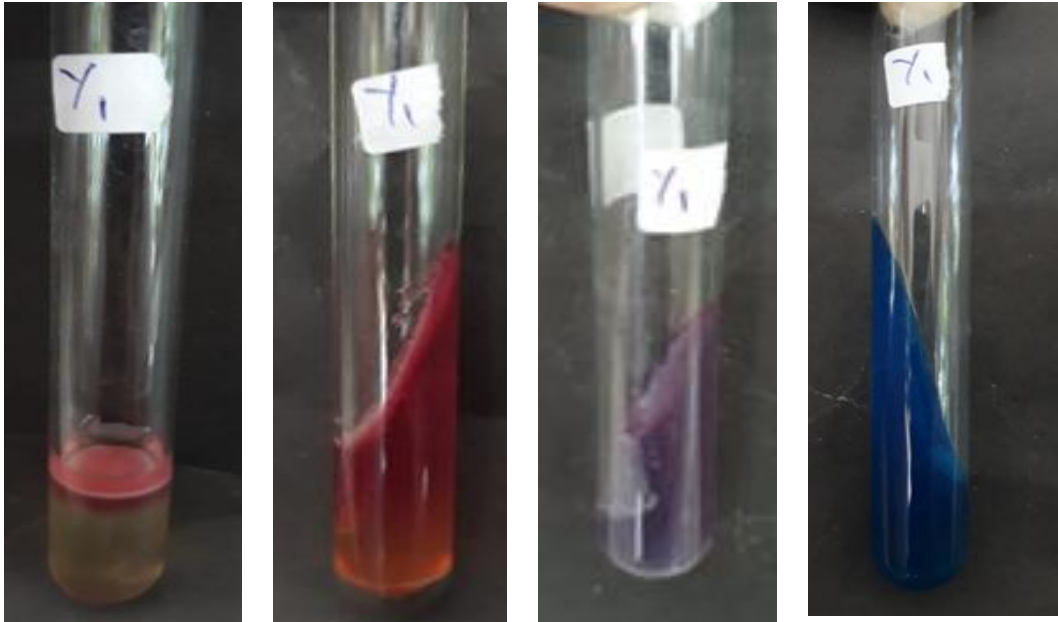
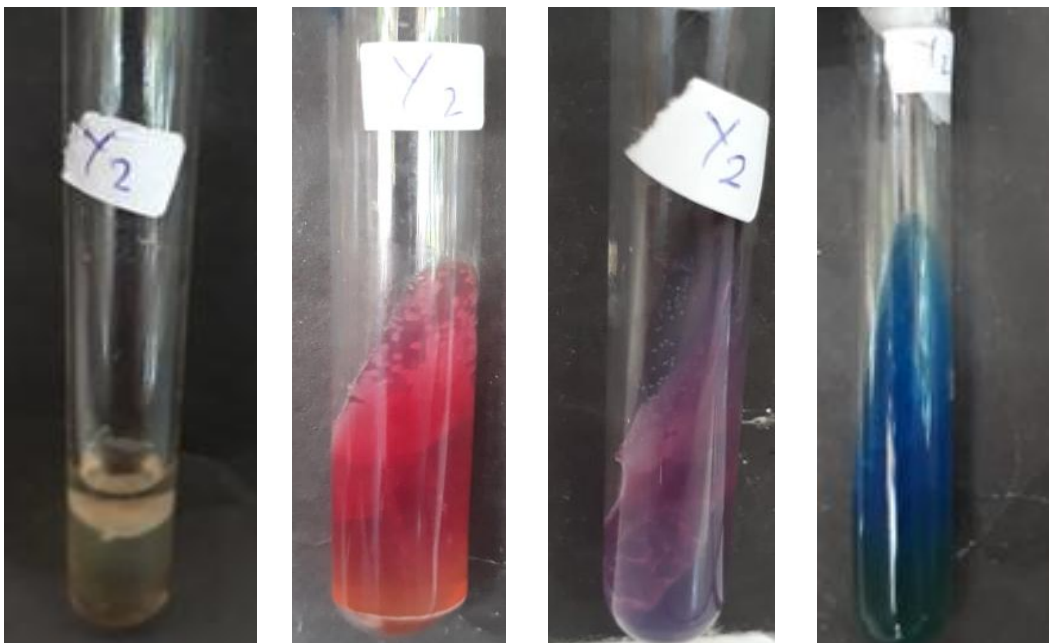
KPJ 3



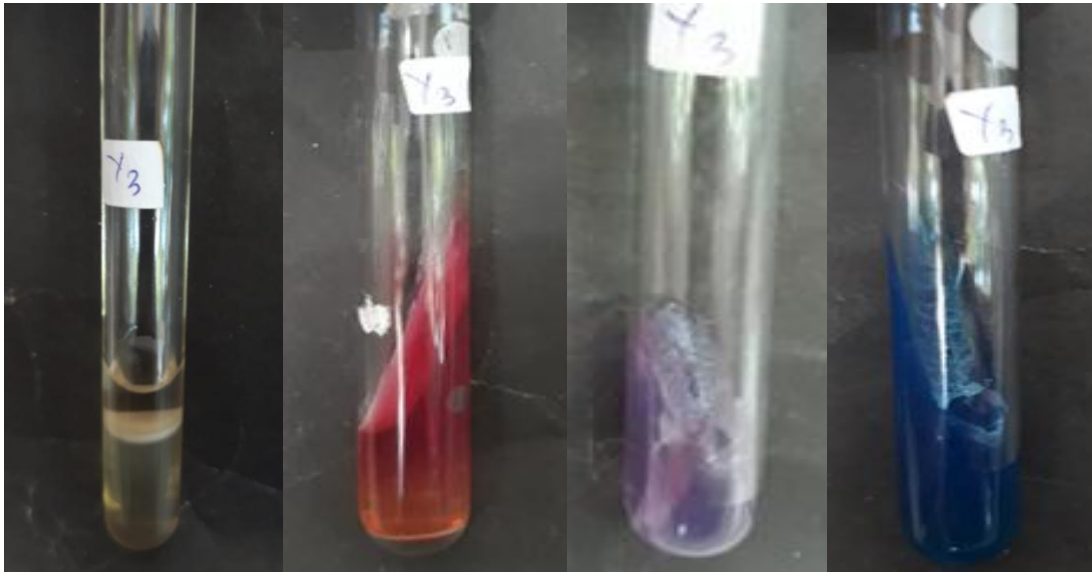
KPJ 4



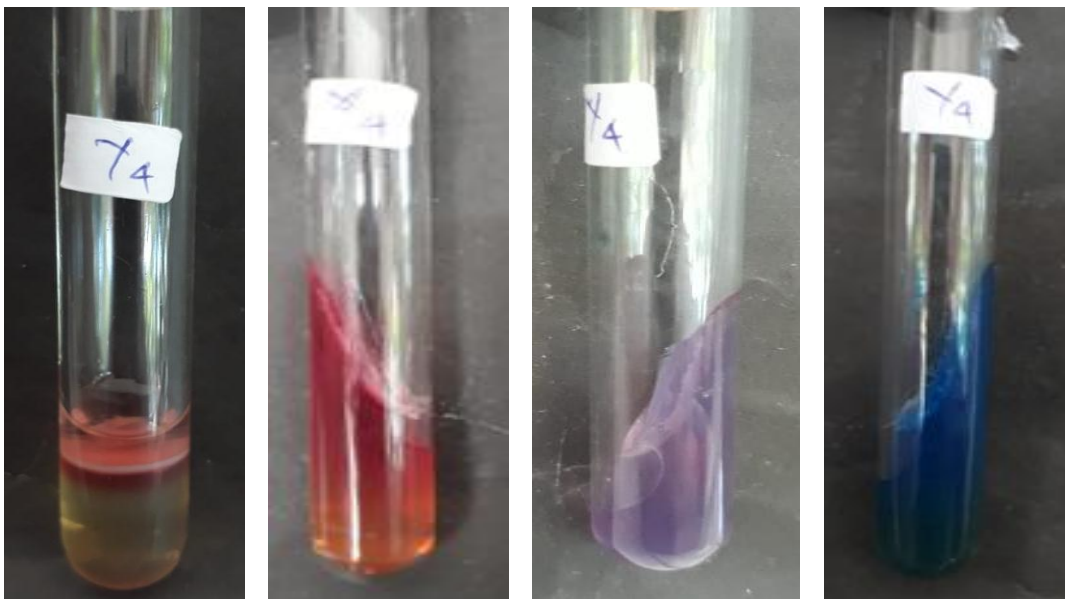
KPJ 5

Lampiran 5. Hasil uji biokimia**Uji Biokimia Isolat Bakteri 1****Uji Biokimia Isolat Bakteri 2**

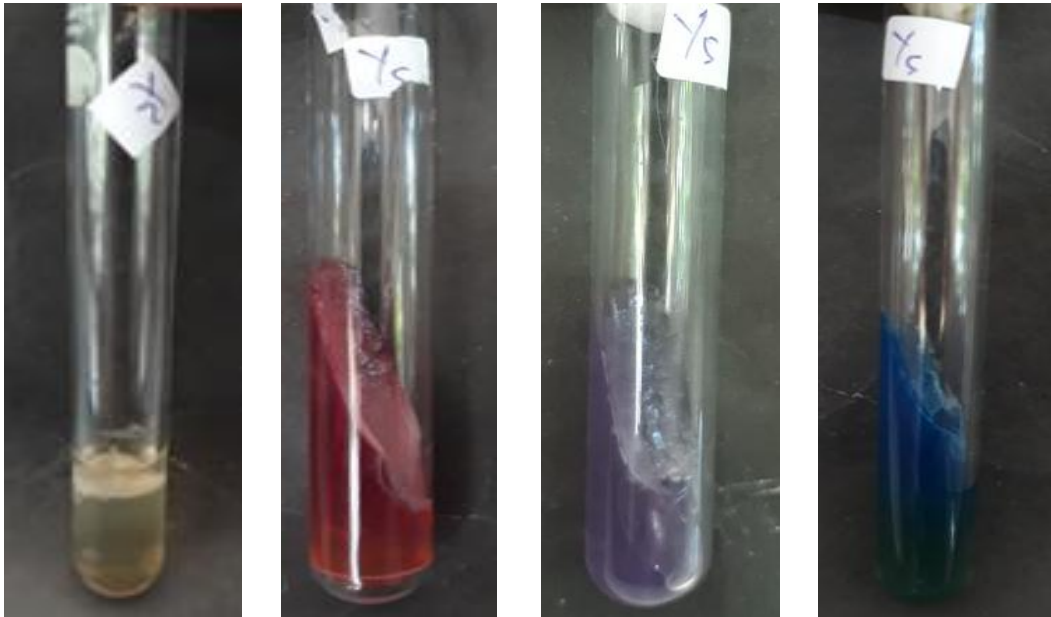
Uji biokimia Isolat Bakteri 3



Uji Biokimia Isolat Bakteri 4



Uji biokimia Isolat Bakteri 5

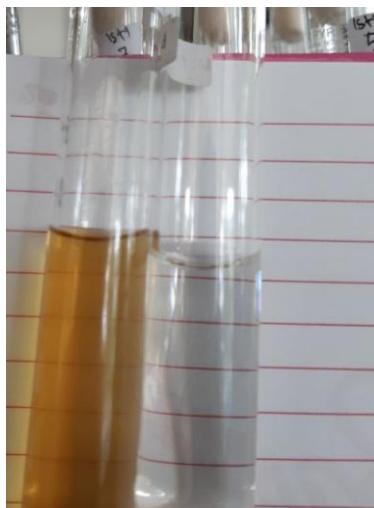


Lampiran 6. Hasil pembuatan suspensi isolat bakteri

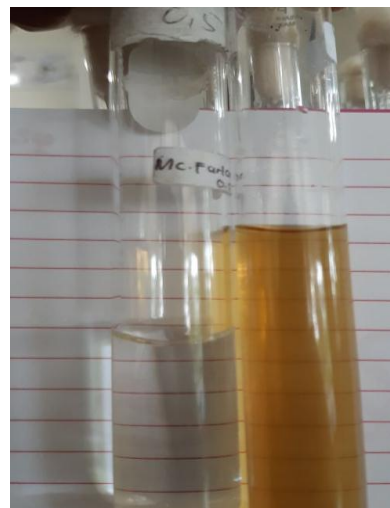
KPI 1

KPI 2

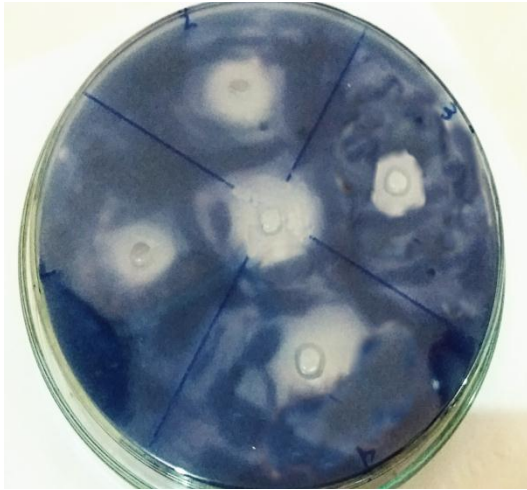
KPI 3



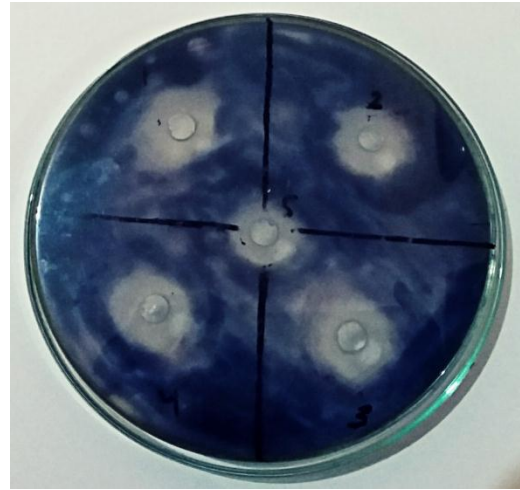
KPI 4



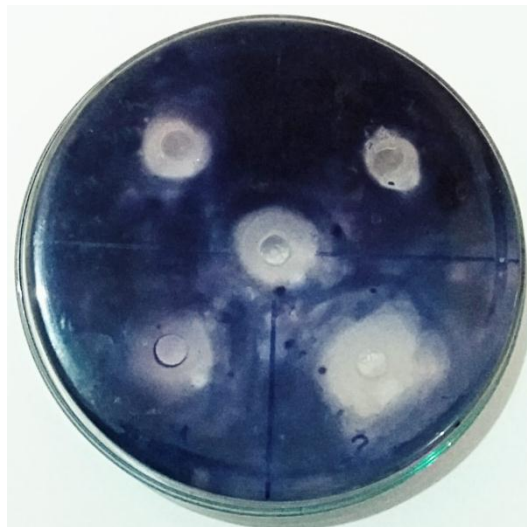
KPI 5

Lampiran 7. Hasil uji aktivitas amilase

Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Lampiran 8. Hasil perhitungan indeks amilolitik

$$\text{Indeks amilolitik} = \frac{\text{rerata } \theta \text{ zona bening} - \text{rerata } \theta \text{ koloni}}{\text{rerata } \theta \text{ koloni}}$$

1. Sampling 1

$$\text{Isolat KPJ 1} = \frac{18,5 - 9,3}{9,3} = 9,9 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 2} = \frac{23 - 9,0}{9,0} = 15,6 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 3} = \frac{20,1 - 9,1}{9,1} = 12,0 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 4} = \frac{23,6 - 9,5}{9,5} = 14,8 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 5} = \frac{24 - 9,5}{9,5} = 15,3 \text{ mm}$$

2. Sampling 2

$$\text{Isolat KPJ 1} = \frac{22,2 - 10,3}{10,3} = 11,6 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 2} = \frac{20,5 - 8,5}{8,5} = 14,1 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 3} = \frac{21,2 - 8,6}{8,6} = 14,7 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 4} = \frac{22,4 - 8,7}{8,7} = 14,6 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 5} = \frac{19,3 - 10,3}{10,3} = 8,7 \text{ mm}$$

3. Sampling 3

$$\text{Isolat KPJ 1} = \frac{18,6 - 9,7}{9,7} = 9,2 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 2} = \frac{17,9 - 8,7}{8,7} = 10,6 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 3} = \frac{24,8 - 10,4}{10,4} = 13,9 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 4} = \frac{19,5 - 8,3}{8,3} = 13,5 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat KPJ 5} = \frac{20,1 - 8,5}{8,5} = 13,7 \text{ mm}$$

Lampiran 9. Hasil perhitungan rata-rata indeks amilolitik

$$\text{Isolat 1} = \frac{9,89+11,56+9,18}{3} = 10,2 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat 2} = \frac{15,56+14,11+10,57}{3} = 13,4 \text{ mm}$$

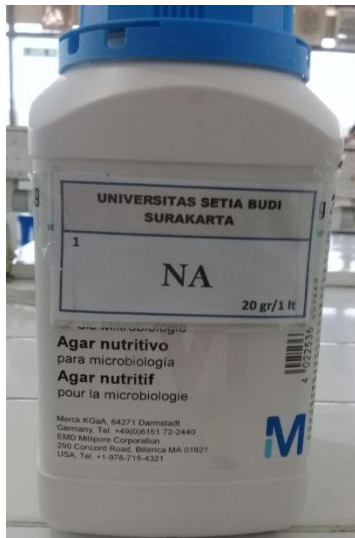
$$\text{Isolat 3} = \frac{12,09+14,66+13,85}{3} = 13,5 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat 4} = \frac{14,84+14,59+13,49}{3} = 14,3 \text{ mm}$$

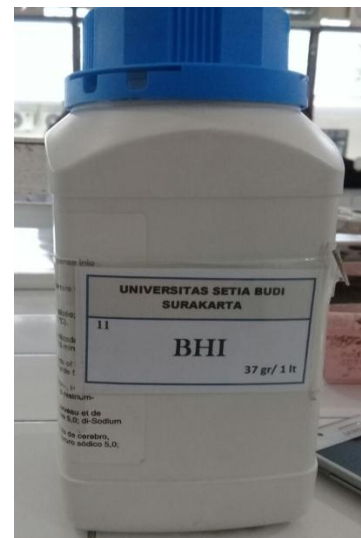
$$\text{Isolat 5} = \frac{15,26+8,74+13,65}{3} = 12,6 \text{ mm}$$

Lampiran 10. Bahan penelitian

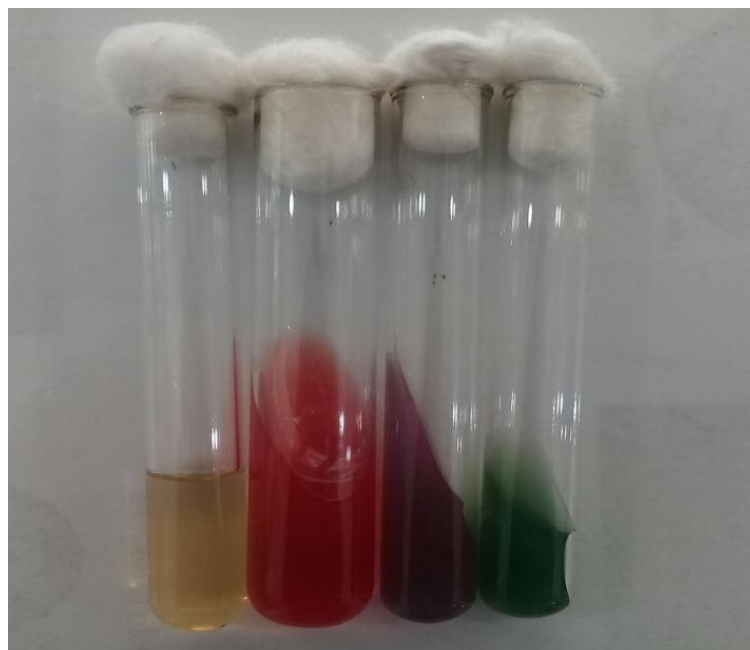
Bahan Media



NA



BHI



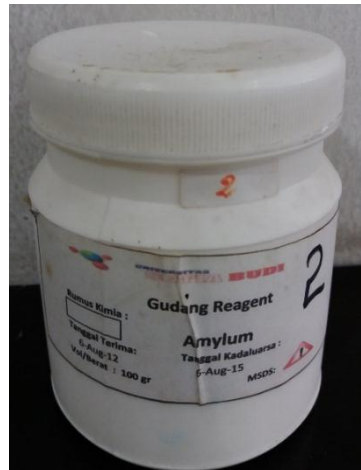
SIM, KIA, LIA dan Sitrato

Komposisi Media Amilum Agar

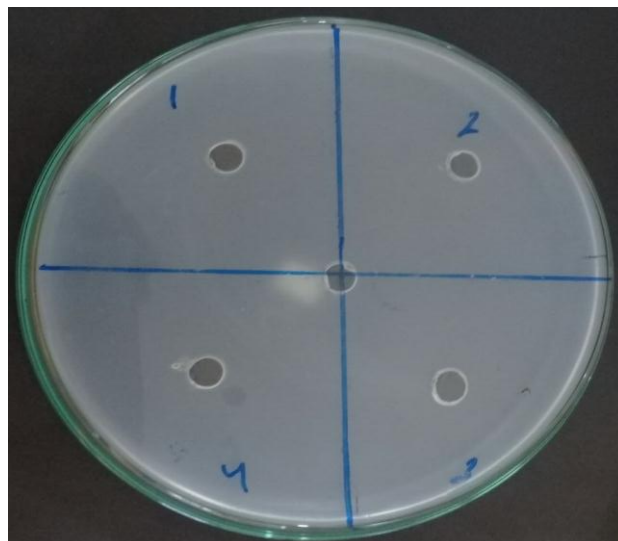
1. Agar 2 g
2. Amilum 1 g
3. Aquadest 100 mL



Agar-agar



Amilum



Amilum Agar

Bahan Pewarnaan



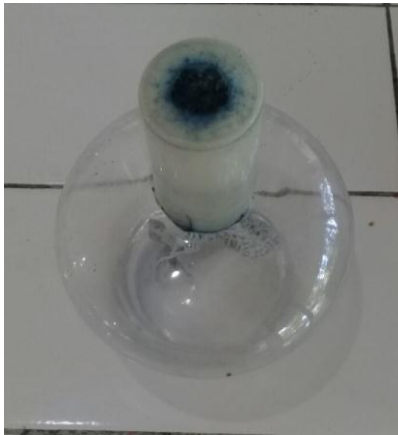
Bahan Pembersih Mikroskop



Xylol



Minyak Imersi

Lampiran 11. Alat Penelitian

Bunsen



Vortex



Jarum Ose



Boor Prop



Mikropipet 50 µl



Autoclav



Oven



Incubator



Mikroskop



Timbangan



Jangka sorong

Lampiran 12. Hasil uji statistik

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
indeks amilolitik	15	12.8133	2.30275	8.70	15.60

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		indeks amilolitik
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	12.8133
	Std. Deviation	2.30275
	Absolute	.217
Most Extreme Differences	Positive	.113
	Negative	-.217
Kolmogorov-Smirnov Z		.841
Asymp. Sig. (2-tailed)		.479

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji kolmogrov uji zona bening amilolitik signifikansinya (Sig) menunjukkan angka $0,479 > 0,05$ sehingga data tersebut terdistribusi normal.

Oneway**Descriptives**

indeks amilolitik

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
I	5	13.5200	2.47730	1.10788	10.4440	16.5960	9.90	15.60
II	5	12.7400	2.58708	1.15698	9.5277	15.9523	8.70	14.70
III	5	12.1800	2.14406	.95885	9.5178	14.8422	9.20	13.90
Total	15	12.8133	2.30275	.59457	11.5381	14.0886	8.70	15.60

Test of Homogeneity of Variances

indeks amilolitik

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.110	2	12	.896

Uji homogenitas uji zona bening amilolitik signifikansinya (Sig.) menunjukkan angka $0,896 > 0,05$ sehingga data tersebut homogen.

ANOVA

indeks amilolitik

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.529	2	2.265	.390	.685
Within Groups	69.708	12	5.809		
Total	74.237	14			

Uji ANOVA uji zona bening amilolitik signifikansinya (Sig.) menunjukkan angka $0,685 > 0,05$ berarti tidak menunjukkan adanya perbedaan dari masing-masing sifat isolat bakteri.

Homogeneous Subsets

indeks amilolitik

Student-Newman-Keuls^a

replikasi isolat	N	Subset for alpha = 0.05
		1
III	5	12.1800
II	5	12.7400
I	5	13.5200
Sig.		.663

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 13. Komposisi Media

a. *Nutrien Agar (NA)*

Pepton from meat	5,0 gram
Meat extract	3,0 gram
Agar	15,0 gram

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. *Brain Heart Infusion (BHI)*

Brain infusion	12,5 gram
Heart Infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. *Amilum Agar*

Agar	2 g
Amilum	1 g
Aquadest	100 mL

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 100 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

d. *Sulfida Indol Motility (SIM)*

Peptone from casein	20 gram
Peptone from meat	6 gram
Ammonium iron (II) citrate	0,2 gram

Sodium thiosulfate	0,2 gram
Agar-agar	0,2 gram
pH	7,3 ± 0,1
aquadest ad	1000 mL

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

e. *Kliger Iron Agar (KIA)*

Meat extract	3,0 gram
Yeast agar	3,0 gram
Peptone from casein	15,0 gram
Peptone from meat	5,0 gram
Lactose	10,0 gram
D (+) glucose	1,0 gram
Ammonium iron (III) citrate	0,5 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Sodium thiosulfate	0,5 gram
Phenol red	0,024 gram
Agar-agar	12,0 gram
pH	7,4 ± 0,1
Aquadest ad	1000 mL

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

f. *Lysin Iron Agar (LIA)*

Peptone from meat	5,0 gram
Yeast meat	3,0 gram
D (+) glucose	1,0 gram
L-Lysin monohydrochloride	10,0 gram

Sodium thiosulfate	0,04 gram
Ammonium iron (III) citrate	0,5 gram
Bromochroosol puple	0,02 gram
pH	6,7 ± 0,1
Aquadest ad	1000 mL

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

g. Media citrate

Ammonium dihydrogen phosphate	1,0 gram
Di-potasium hydrogen phosphate	1,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Sodium citrate	2,0 gram
Magnesium sulfat	0,2 gram
Bromolhymol blue	0,08 gram
Agar-agar	12,0 gram
pH	6,9 ± 0,1
Aquadest ad	1000 mL

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.