

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH
TAMBANG BATUBARA PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI
LOA JANAN SAMARINDA KALIMANTAN TIMUR**



Diajukan oleh :

**Dewanty Malasari Pertiwi
20144092 A**

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

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH
TAMBANG BATUBARA PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI
LOA JANAN SAMARINDA 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*

Oleh:

**Dewanty Malasari Pertiwi
20144092 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

Dengan Judul :

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG
BATUBARA PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI LOA JANAN
TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR**

Oleh
Dewanty Malasari Pertiwi
20144092A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada Tanggal : 28 Juni 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi


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

Pembimbing Utama

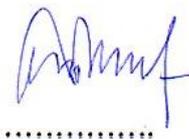


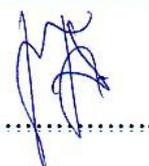
Dr. Ana Indrayati, M. Si
Pembimbing Pendamping



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

1. Drs. Edy Prasetya, M.Si
2. Dr. Supriyadi, M.Si
3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si


1.....


3.....


2.....

4.....

PERSEMBAHAN



Bacalah dengan menyebut nama Tuhanmu

Dia telah menciptakan manusia dari segumpal darah Bacalah, dan Tuhanmulah yang maha mulia

Yang mengajar manusia dengan pena,

Dia mengajarkan manusia apa yang tidak diketahuinya (QS: Al-'Alaq 1-5)

Maka nikmat Tuhanmu yang manakah yang kamu dustakan ? (QS: Ar-Rahman 13)

"Sesuatu yang belum dikerjakan, seringkali tampak mustahil;
kita baru yakin kalau kita telah berhasil melakukannya dengan baik."

Bukanlah suatu aib jika kamu gagal dalam suatu usaha, yang merupakan aib adalah jika kamu tidak bangkit dari kegagalan itu

Kupersembahkan Skripsi ini untuk :

- ◆ *Allah Yang Maha Kuasa, yang memberikan kekuatan agar terus semangat menyelesaikan skripsi meskipun banyak halangan.*
- ◆ *Keluarga ku (Bapak, mama dan adik-adikku) yang selalu mendukung agar tak mudah menyerah, dan mendukung menjadi orang yang bertanggung jawab. Sebagai tanda bakti, hormat, dan rasa terima kasih yang tiada terhingga kupersembahkan karya kecil ini kepada mama dan bapak yang telah memberikan kasih sayang, segala dukungan, dan cinta kasih yang tiada terhingga. Terima Kasih mama.... Terima Kasih bapak.*
- ◆ *Dosen pembimbingku Ibu Dr. Ana Indrayati, M.Si dan Bapak D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si selaku dosen pembimbing tugas akhir saya, terima kasih banyak sudah mau membimbing dan meluangkan waktu untuk membagikan ilmunya padahal diri ini masih penuh kekurangan.*
 - ◆ *Terimakasih untuk rekan tim yang telah berjuang bersama-sama dalam suka duka "Yunda, Isti, Dini"*
 - ◆ *Sahabat-sahabatku tercinta dan tersayang satu perjuangan Ayu, Widiya, Regina, Fero, Petra, Iyem, terima kasih telah memberikan dukungan dalam susah maupun senang, bantuan selama skripsi, dan atas segala waktunya.*
 - ◆ *Teman-temanku yang tidak bisa disebutkan satu persatu terima kasih banyak atas segala bantuan selama proses pengerjaan skripsi ini*
- ◆ *Almamater Kebanggaanku Fakultas Farmasi USB 2014.*
 - ◆ *Agama, Bangsa dan Negara ku Indonesia.*

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, 28 Juni 2018



Dewanty Malasari Pertiwi

KATA PENGANTAR

Assalammu'alaikum Wr.Wb

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena atas segala rahmat dan hidayahNya, Penulis dapat menyelesaikan Skripsi guna memenuhi persyaratan untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm) di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Alhamdulillahirobbil'alamin, akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG BATUBARA PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI LOA JANAN SAMARINDA KALIMANTAN TIMUR”** diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan dalam bidang teknologi farmasi.

Penyusunan Skripsi ini tidak bisa lepas dari bantuan banyak pihak baik secara langsung maupun tidak langsung, oleh karena itu Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan anugerah, nikmat serta petunjuk disetiap langkah hidupku.
2. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah banyak memberikan ilmu, masukan, pengarahan dan bimbingan selama penyusunan Skripsi ini.

5. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah banyak memberikan ilmu, masukan, pengarahan dan bimbingan selama penyusunan Skripsi ini.
6. Tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
7. Segenap dosen, instruktur laboratorium yang banyak memberikan bantuan dan kerjasama selama penyusunan penelitian Skripsi ini.
8. Orang tuaku tercinta, kakakku, keponakanku, semua saudara dan teman yang telah membantu, mendukung, dan memberi semangat serta doa.
9. Sahabat serta rekan-rekan seperjuangan yang tak henti memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis.

Penulis menyadari banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu Penulis mengharap segala saran dan kritik dari pembaca untuk menyempurnakan Skripsi ini. Semoga Skripsi ini bisa berguna bagi siapa saja yang membacanya.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb

Surakarta, 28 Juni 2018

Dewanty Malasari Pertiwi

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	xii
ABSTRACT	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Masalah.....	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Pertambangan Batubara.....	5
B. Enzim Protease.....	6
C. Aktivitas Enzimatik.....	7
D. Bakteri penghasil Enzim Protease.....	7
E. Metode Uji Protease	8
F. Metode Isolasi dan Identifikasi bakteri.....	8
1. Isolasi Bakteri	8
2. Identifikasi bakteri.....	9
G. Media.....	9
H. Landasan Teori.....	10
I. Hipotesis	11

BAB III	METODE PENELITIAN	12
	A. Populasi dan sampel	12
	B. Variabel penelitian	12
	1. Identifikasi variabel utama	12
	2. Definisi operasional variabel utama	13
	C. Bahan dan alat	13
	1. Bahan	13
	1.1 Bahan Sampel	13
	1.2 Bahan Kimia	14
	1.4 Media	14
	2. Alat	14
	D. Jalan penelitian	14
	1. Sterilisasi	14
	2. Isolasi dan skrining bakteri air limbah tambang batubara	14
	3. Identifikasi bakteri dari air limbah tambang batubara	15
	4. Pembuatan suspensi bakteri	17
	5. Uji aktivitas Protease secara difusi sumuran	17
	E. Analisis Hasil	17
	F. Skema penelitian	18
BAB IV	ASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	20
	A. Isolasi dan Skrining Bakteri Air Limbah Tambang Batubara	20
	B. Pembuatan Suspensi Bakteri	20
	C. Hasil Identifikasi Bakteri Air Limbah Tambang Batubara	20
	D. Hasil Pengujian Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri Air Limbah Tambang Batubaara	25
BAB V	KESIMPULAN DN SARAN	29
	A. Kesimpulan	29
	B. Saran	29
	DAFTAR PUSTAKA	30
	LAMPIRAN	34

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema isolasi bakteri air limbah tambang batubara	18
Gambar 2. Skema identifikasi bakteri air limbah tambang batubara.....	18
Gambar 3. Skema kerja pengujian aktivitas protease dari bakteri asal air limbah tambang batubara	19

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil Identifikasi secara mikroskopis bakteri dari air limbah tambang batubara	21
Tabel 2. Hasil pewarnaan Gram bakteri dari air limbah tambang batubara	21
Tabel 3. Hasil identifikasi uji biokimia bakteri dari air limbah tambang batubara	23
Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas enzim protease dari bakteri air limbah tambang batubara	26

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sampel air limbah tambang batubara.....	34
Lampiran 2. Hasil isolasi dan skrining bakteri air limbah tambang batubara	34
Lampiran 3. Suspensi bakteri asal air limbah tambang batubara	35
Lampiran 4. Hasil identifikasi bakteri asal air limbah tambang batubara secara makroskopis	36
Lampiran 5. Hasil identifikasi isolate bakteri airt limbnah tambang batubara secara mikroskopis	37
Lampiran 6. Hasil uji biokimia.....	40
Lampiran 7. Hasil uji aktivitas proteolitik	42
Lampiran 8. Hasil perhitungan indeks proteolitik	43
Lampiran 9. Hasil perhitungan rata rata indeks proteolitik.....	44
Lampiran 10. Bahan bahan penelitian	44
Lampiran 11. Komposisi media Skim Milk Agar (SMA)	45
Lampiran 12. Alat alat penelitian	46
Lampiran 13. Hasil uji statistik	49
Lampiran 14. Komposisi media.....	51

INTISARI

PERTIWI, D.M., 2018, ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG BATUBARA PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI LOA JANAN SAMARINDA KALIMANTAN TIMUR, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIABUDI SURAKARTA

Isolat Bakteri air limbah tambang batubara dapat menghasilkan enzim protease, karena terdapat zona bening disekitar koloni bakteri. Hal ini berkaitan dengan kemampuan enzim protease bakteri dalam menghidrolisis protein. Semakin banyak protein yang terhidrolisis maka luas zona bening yang terbentuk akan semakin besar dan menandakan aktivitas enzim yang dihasilkan juga besar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas proteolitik dari isolat bakteri air limbah tambang batubara.

Bakteri air limbah tambang batubara diisolasi dan diidentifikasi, kemudian hasil isolat bakteri air limbah tambang batubara dilakukan uji aktifitas proteolitik dengan metode difusi sumuran menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA) dengan mengukur zona bening yang ada disekitar koloni, untuk mendapatkan hasil aktivitas proteolitik, maka diameter zona bening dikurang diameter koloni bakteri dibagi dengan diameter koloni bakteri. Data yang diperoleh diolah dengan statistik *Analysis of Variance* metode satu jalan

Isolat bakteri air limbah tambang batubara kelimanya memiliki aktivitas proteolitik, diantara kelima isolat tersebut SMD3 yang merupakan gram negatif dan memiliki bentuk batang memiliki aktivitas proteolitik yang paling tinggi berdasarkan zona bening yang ada disekitar koloni bakteri, pada SMD3 Indeks proteolitiknya yaitu 27,24 mm.

Kata kunci : Protease, air limbah batubara, Isolat, Identifikasi

ABSTRACT

PERTIWI, D.M., 2018, ISOLATION AND CHARACTERIZATION ISOLATE BACTERIA PRODUCING COAL MINE WASTE WATER FROM ENZYME PROSTHETIC LOA JANAN SAMARINDA, EAST KALIMANTAN, Skripsi, FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITY SETIABUDI SURAKARTA

Bacterial isolates coal mine waste water can produce a protease enzyme, because there is a clear zone around bacterial colonies. This relates to the ability of the bacteria in the protease enzymes to hydrolyze proteins. The more extensive the hydrolyzed protein formed a clear zone will be greater and indicates activity occurring enzyme is also great. This study aims to determine the proteolytic activity of bacterial isolates coal mine waste water.

Bacteria wastewater coal mine isolated and be identified, then the result of bacterial isolates wastewater coal mines to test the activity of proteolytic with diffusion method pitting using the media *Skim Milk Agar* (SMA) by measuring the clear zone around the existing colonies, to get the proteolytic activity, the diameter minus the clear zone diameter divided by the diameter of bacterial colonies bacterial colonies. The data obtained were processed with statistical Analysis of Variance method of the road

Bacterial isolates coal mine waste water has proteolytic activity, among the five isolates were SMD3 which is gram negative and has a rod shape has the highest proteolytic activity by a clear zone around the existing bacterial colonies, in SMD3 proteolitiknya Index is 27,24 mm.

Keywords: Protease, waste water, coal, Isolate, Identification

BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Dewasa ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya tekanan dari para ahli dan pecinta lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industry (Akhdiya 2003). Enzim untuk kebutuhan industri umumnya diisolasi dari berbagai jenis mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dalam jumlah dan jenis yang bervariasi, waktu produksinya lebih cepat serta mudah dikontrol. Produksi dan perdagangan enzim saat ini didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik seperti amilase, protease, katalase dan lipase (Poernomo 2003).

Protease adalah satu diantara tiga kelompok enzim komersial yang diperdagangkan dengan nilai mencapai total 60% penjualan enzim yang aplikasinya sebagai katalisator hayati digunakan dalam industri pangan, detergen dan kulit (Suhartono 2000). Protease merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease berperan penting bagi semua makhluk hidup karena esensial dalam proses metabolisme protein, antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan dan menggunakan kembali protein intraseluler sebagai enzim, hormon, serta neurotransmitter. Protease banyak dimanfaatkan untuk kepentingan komersial pada berbagai industry seperti industri detergen, produk-produk kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, bir, film dan limbah (Nascimento dan Martins 2006).

Protease ekstraselular adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino. Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim protease dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase terdiri dari

karboksiekso-peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino-ekso-peptidase dari gugus amino terminal, sedang endopeptidase memecah ikatan peptida dari dalam (Mubarik *et al.* 2000) Dalam dasa warsa terakhir ini terjadi peningkatan lebih pesat dalam pemakaian enzim karena sifatnya yang efisien, selektif, mengkatalisis reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan. Salah satu sumber protease adalah mikroba. Protease mikroba dapat diklasifikasikan sebagai protease serin (E.C. 3.4.21), protease sulfhydryl (E.C.3.4.22), protease asam (E.C.3.4.23) dan metaloprotease (E.C.3.4.24). Beberapa mikroorganisme yang telah diketahui sebagai penghasil protease untuk aplikasi komersial adalah *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pyrococcus*, *Termonospora Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia* and *Aspergillus* (Ward *et al.* 2009). Enzim protease dapat diproduksi oleh mikroba proteolitik baik dari kapang maupun bakteri. Bakteri yang mampu menghasilkan enzim protease adalah dari genus *Bacillus* antara lain *B. licheniformis*, *B. amylolique*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. Thermoproteolyticus* (Nascimento dan Martins 2006).

Bakteri proteolitik untuk penanganan limbah dapat ditemukan di berbagai sumber di antaranya lumpur aktif penanganan limbah makanan, limbah cair dan lumpur aktif penanganan limbah cair industri ternak, aerobic lagoon dari penanganan limbah cair industri ternak, penanganan limbah cair pengolahan ayam, dan saluran pembuangan limbah pengalengan ikan (Fong dan Tan 2000; Loperena *et al.* 2007; Loperena *et al.* 2009; Tarntip dan Sirichom 2011; Urano *et al.* 2002).

Pertambangan merupakan suatu bidang usaha yang karena sifat kegiatannya pada dasarnya selalu menimbulkan perubahan pada alam lingkungannya (BPLHD Jabar 2005). Aktivitas pertambangan selalu membawa dua sisi. Sisi pertama adalah memacu kemakmuran ekonomi. Sisi yang lainnya adalah timbulnya dampak lingkungan yang memerlukan tenaga, pikiran, dan biaya yang cukup signifikan untuk proses pemulihannya. Pertambangan di Indonesia berkembang pada awal tahun 1970-an yang disebabkan oleh masuknya investor pertambangan dunia dan berkembangnya tenaga ahli pertambangan di Indonesia

(Standar Nasional Indonesia. Metode pengambilan air limbah, SNI 6989.59. 2008).

Salah satu komoditi tambang yang banyak diusahakan saat ini, untuk memenuhi kebutuhan energi di Indonesia adalah batubara. Pada saat ini Indonesia memiliki potensi sumber daya batubara sekitar 60 miliar ton dengan cadangan 7 miliar ton (Witoto 2007). Tambang batubara di Indonesia umumnya dilakukan dengan cara tambang terbuka, walaupun ada beberapa yang menggunakan tambang bawah tanah, sehingga akan berdampak terhadap perubahan bentang alam, sifat fisik, kimia, dan biologis tanah, serta secara umum menimbulkan kerusakan pada permukaan bumi. Dampak ini secara otomatis akan mengganggu ekosistem di atasnya, termasuk tata air (Subardja 2007).

Kegiatan penambangan dan pemanfaatannya mempunyai dampak terhadap lingkungan yang bersifat menguntungkan antara lain tersedianya berbagai kebutuhan manusia yang berasal dari sumber daya mineral dan meningkatnya pendapatan negara. Meskipun penambangan mampu memberikan pendapatan yang sangat besar namun sektor ini juga menimbulkan masalah lingkungan udara, air dan tanah. Dampak yang timbul tidak hanya terjadi pada lokasi penambangan itu sendiri tetapi juga berdampak pada daerah sekitarnya. Tanah bekas penambangan yang seharusnya merupakan tubuh alam, matriks dimana tanaman dapat tumbuh, sumber unsur hara bagi produsen primer itu telah kehilangan fungsinya. Horison-horisonnya sudah bercampur antara yang satu dengan yang lain, top soil sudah tidak ada dan yang tersisa hanya batuan induk sehingga kandungan C-organik sangat rendah. Kondisi lainnya adalah keasaman tanah dengan $\text{pH} < 3$ karena bahan galian mengandung senyawa S yang mencapai 6 % (Widyati *et al.* 2005).

Permasalahan lingkungan dalam aktivitas pertambangan batubara 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* (Johnson dan Hallberg 2005).

Begitu pentingnya enzim ini sehingga perlu mencari enzim dari mikroba dengan habitat yang berbeda sehingga diharapkan enzim yang dihasilkan memiliki karakter yang unik untuk memenuhi kebutuhan industri baik industri produk pertanian, kimia dan medis. Salah satu sumber enzim ini adalah mikroba dari air limbah tambang batubara, Kalimantan timur yang memungkinkan terdapatnya beranekaragam mikroba yang berpotensi menghasilkan enzim.

B. Perumusan Masalah

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

Pertama, bagaimana hasil karakterisasi dari isolat bakteri air limbah tambang batubara?

Kedua, apakah isolat bakteri yang didapat pada air limbah tambang batubara mampu menghasilkan enzim protease?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

Pertama, mengetahui hasil karakterisasi dari isolat bakteri air limbah tambang batubara.

Kedua, mengetahui isolat bakteri yang didapat pada air limbah tambang batubara mampu menghasilkan enzim protease?

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat bagi bidang ilmu farmasi dan bidang ilmu kesehatan lainnya mengenai enzim protease yang bersumber dari mikroorganisme khususnya yang diisolasi dari air limbah tambang batubara dan diharapkan dapat menjadi referensi tambahan dan dapat memberikan landasan ilmiah bagi penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Pertambangan batu bara

Batubara adalah batuan sedimen (padatan) yang dapat terbakar, terbentuk dari sisa-sisa tumbuhan purba, berwarna coklat sampai hitam, yang sejak pengendapannya mengalami proses fisika dan kimia yang mengakibatkan pengayaan pada kandungan karbonnya (Anggayana 2002).

Menurut Kepmen LH No. 113 Tahun 2003, air limbah yang dihasilkan dari kegiatan penambangan batubara berasal dari kegiatan penambangan batubara dan air buangan yang berasal dari kegiatan pengolahan atau pencucian batubara. Air limbah pertambangan batubara ini sering disebut dengan air asam tambang.

Air limbah kegiatan pertambangan batu bara atau air asam tambang (AAT) adalah air yang berasal dari kegiatan penambangan batu bara yang meliputi penggalian, pengangkutan dan penimbunan baik pada tambang terbuka maupun tambang bawah tanah. Baku mutu air limbah batu bara adalah ukuran batas atau kadar unsur pencemar dan atau jumlah unsur pencemaran yang ditenggang keberadaannya dalam air limbah batu bara yang akan dibuang atau dilepas ke air permukaan. Parameter yang dimonitoring pada air limbah kegiatan penambangan batubara adalah TSS, total Fe dan total Mn (KepMenLH no.113/2003).

Menurut Gautama (2012) terdapat empat komponen pembentuk AAT yaitu, mineral sulfida, oksigen, air dan bakteri. Air Asam Tambang terbentuk melalui suatu seri reaksi geokimia dan mikrobial yang kompleks yang terjadi ketika air kontak dengan mineral pirit (besi disulfida). Air tersebut umumnya memiliki tingkat keasaman dan kandungan logam terlarut yang tinggi. Logam akan tetap terlarut sampai pH meningkat sampai pada suatu tingkat logam tersebut mengalami presipitasi. Air Asam Tambang umumnya diasosiasikan dengan kandungan sulfat, logam berat (Fe, Cu, Pb, Zn, Cd, Co, Cr, Ni, Hg), metalloid (As, Sb), dan unsur lain seperti Al, Mn, Si, Ca, Na, Mg, Ba dan F yang tinggi.

Air Asam Tambang (AAT) atau Acid Mine Drainage (AMD). Air tersebut terbentuk sebagai hasil oksidasi dari mineral sulfida tertentu yang terkandung

dalam batuan, yang bereaksi dengan oksigen di udara pada lingkungan berair (Sayoga 2007). Mineral sulfida tersebut di antaranya pirit dan markasit (FeS_2), kalkopirit (CuFeS_2), dan arsenopirit (FeAsS) (Skousen *et al.* 1998).

Watzlaf *et al.* (2004) menyatakan bahwa oksidasi pirit (FeS_2) akan membentuk ion ferro (Fe^{2+}), sulfat, dan beberapa proton pembentuk keasaman, sehingga kondisi lingkungan menjadi asam

Bakteri pengoksidasi Fe, yaitu *Thiobacillus*, mempercepat reaksi oksidasi Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} pada reaksi kedua. Logam besi (Fe) akan terakumulasi baik pada tanah maupun air. Selain logam Fe, pada air asam tambang juga dijumpai logam-logam berat lain seperti Mn, Zn, Cu, Ni, Pb, Cd, dan lain-lain karena mineral umum yang terdapat pada lahan bekas tambang batubara selain Pyrite (FeS) antara lain Marcasite (FeS_2), Galena (PbS), Chalcocite (Cu_2S), Chalcopyrite (CuFeS), Covellit (CuS), Sphalerite (ZnS), dan lain-lain (Stumm dan Morgan 1981)

B. Enzim Protease

Enzim merupakan molekul biopolimer polipeptid dengan susunan monomer asam amino yang teratur dan berperan dalam mengkatalisis suatu reaksi (Mittal 2007). Fungsi katalitik berlangsung dalam berbagai reaksi seperti oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer gugus, pemutusan rantai karbon, dan hidrolisis (Sumardjo 2006).

Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi. Dalam suatu reaksi, enzim akan mengikat molekul substrat menjadi kompleks enzim-substrat kemudian kompleks tersebut terurai membentuk enzim bebas dan produk (Campbell *et al.* 2008).

Protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptide. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Protein ini memiliki banyak struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* yang sangat pendek (Poliana 2007).

Protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan molekul protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme karena memiliki beberapa keunggulan. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim (Poedjiadi 2006).

Enzim dapat diperoleh dari makhluk hidup seperti hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Beberapa contoh enzim protease yang bersumber dari tumbuhan yaitu bromelin dari nanas, papain dari pepaya, lisozim dari putih telur. Meskipun banyak sumber dapat menghasilkan enzim yang berasal dari hewan dan tumbuhan, namun pemanfaatan mikroorganisme sebagai sumber enzim lebih banyak diminati, karena enzim dari mikroorganisme dapat dihasilkan dalam waktu yang sangat singkat, mudah diproduksi dalam skala besar, proses produksi bisa dikontrol, kemungkinan terkontaminasi oleh senyawa-senyawa lain lebih kecil, dan dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relative rendah (Thomas 1989).

C. Aktifitas enzimatik

Enzim sebagai biokatalisator berstruktur protein, dalam mekanisme kerja aktivitasnya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, pH, suhu, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, kehadiran aktivator atau inhibitor. Mekanisme enzim dalam suatu reaksi ialah melalui pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Oleh karena itu hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan. Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor (Poedjiadi 1994).

D. Bakteri penghasil enzim protease

Beberapa mikroorganisme yang telah diketahui sebagai penghasil protease untuk aplikasi komersial adalah *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pyrococcus*, *Termonospora Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia* and *Aspergillus* (Ward *et al.* 2009). Enzim protease dapat diproduksi oleh mikroba proteolitik baik dari kapang

maupun bakteri. Bakteri yang mampu menghasilkan enzim protease adalah dari genus *Bacillus* antara lain *B. licheniformis*, *B. amylolique*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. Thermoproteolyticus* (Nascimento dan Martins 2006).

E. Metode uji protease

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode lubang/sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini 2007).

F. Metode Isolasi dan Identifikasi Bakteri

1. Isolasi Bakteri

Isolasi merupakan kegiatan pemisahan mikroorganisme yang akan diuji dari mikroorganisme lain dengan menggunakan media selektif, sehingga diharapkan akan diperoleh biakan atau kultur murni. Media selektif adalah media khusus untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu yang mengandung nutrient-nutrien yang khusus dimanfaatkan oleh mikroorganisme tertentu yang tumbuh pada media selektif. Identifikasi merupakan kegiatan yang dilakukan untuk mengetahui jenis organisme tertentu dengan tahap pengamatan, pengujian, pencatatan, dan identifikasi berdasarkan hasil pengujian (Susatyo 2006)

Untuk identifikasi dan determinasi suatu biakan murni suatu mikrobial hasil isolasi perlu ditentukan morfologi sel individu, morfologi koloni, dan sifat – sifat biokimiannya (fisiologi), patogenisitas dan serologinya (Jutono, Soedarsono, Hartadi, Kabirun, Suhadi & Soesanto 1980)

2. Identifikasi Bakteri

Pada pewarnaan sederhana hanya digunakan satu macam zat warna untuk meningkatkan kontras antara mikroorganisme dan sekelilingnya. Lazim, prosedur pewarnaan ini menggunakan zat warna basa seperti seperti crystal violet, biru metilen, karbol fuchsin basa, safranin atau hijau malakit. Kadang kala digunakan zat warna negatif untuk pewarnaan sederhana : zat warna asam yang sering digunakan adalah nigrosin dan merah kongo. Prosedur Pewarnaan sederhana mudah dan cepat, sehingga pewarnaan ini sering digunakan untuk melihat bentuk ukuran dan penataan pada mikroorganisme bakteri pada bakteri dikenal bentuk yang bulat (*coccus*), batang (*basil*), dan spiral. Dengan pewarnaan sederhana dapat juga terlihat penataan bakteri. Pada coccus dapat terlihat pewarnaan seperti rantai (*stertococcus*), buah anggur (*staphylococcus*), pasangan (*diplococcus*), bentuk kubus yang terdiri dari 4 atau 8 (*saranae*) (Lay 1994).

G. Media

Dalam bidang mikrobiologi untuk menumbuhkan dan mempelajari sifat-sifat mikroorganisme diperlukan suatu media sebagai tempat pertumbuhan mikroorganisme. Media pertumbuhan harus memenuhi persyaratan nutrisi yang dibutuhkan oleh suatu mikroorganisme (Atlas 2004). Nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk pertumbuhannya meliputi karbon, nitrogen, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, unsur logam seperti Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, dan Fe, vitamin, air, dan energi (Cappucino 2014).

Bahan yang digunakan harus mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri seperti dari bahan-bahan yang kaya akan karbohidrat dan protein. Beberapa peneliti berhasil menemukan media alternatif untuk pertumbuhan mikroorganisme dari bahan-bahan yang mudah ditemukan di alam. Seperti dari sumber protein yaitu kacang tunggak, kacang hijau, kacang kedelai hitam (Arulananthan 2012; Ravimannan 2014).

Uji kualitatif aktivitas enzim protease dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri pada media *Skim Milk Agar* (SMA). Media SMA mengandung pepton (0,1% w/v), NaCl (0,5% w/v), agar (2,0% w/v) dan susu

skim (10% v/v) Uji positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri pada permukaan media SMA (Chu 2006).

H. Landasan teori

Air limbah kegiatan pertambangan batu bara atau air asam tambang adalah air yang berasal air kegiatan penambangan batu bara yang meliputi penggalian, pengangkutan dan penimbunan baik pada tambang terbuka maupun tambang bawah tanah. Baku mutu air limbah batu bara adalah ukuran batas atau kadar unsur pencemar dan atau jumlah unsur pencemaran yang ditenggang keberadaannya dalam air limbah batu bara yang akan dibuang atau dilepas ke air permukaan. Parameter yang dimonitoring pada air limbah kegiatan penambangan batubara adalah TSS, total Fe dan total Mn (KepMenLH no.113/2003).

Menurut Gautama (2012) terdapat empat komponen pembentuk AAT yaitu, mineral sulfida, oksigen, air dan bakteri. Air Asam Tambang terbentuk melalui suatu seri reaksi geokimia dan mikrobial yang kompleks yang terjadi ketika air kontak dengan mineral pirit (besi disulfida). Air tersebut umumnya memiliki tingkat keasaman dan kandungan logam terlarut yang tinggi. Logam akan tetap terlarut sampai pH meningkat sampai pada suatu tingkat logam tersebut mengalami presipitasi. Air Asam Tambang umumnya diasosiasikan dengan kandungan sulfat, logam berat (Fe, Cu, Pb, Zn, Cd, Co, Cr, Ni, Hg), metalloid (As, Sb), dan unsur lain seperti Al, Mn, Si, Ca, Na, Mg, Ba dan F yang tinggi.

Air tersebut terbentuk sebagai hasil oksidasi mineral sulfida yang dikatalis oleh bakteri pengoksida 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 SO secara langsung (Johnson dan Hallberg 2005).

Protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan molekul protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme karena memiliki

beberapa keunggulan. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim (Poedjiadi 2006).

I. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori maka hipotesis yang dapat disusun dalam penelitian ini adalah :

Pertama, hasil karakterisasi dari isolat bakteri air limbah tambang batubara.

Kedua, bakteri yang didapat pada air limbah tambang batubara mampu menghasilkan enzim protease.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah air limbah batubara yang diperoleh di daerah Loa Janan Samarinda, Kalimantan Timur.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri yang berasal dari air limbah batubara yang diambil dari saluran pipa, berwarna keruh, Sampel air diambil sebanyak 100 ml dan dimasukkan kedalam botol steril berwarna coklat lalu dimasukkan ke dalam cool box yang diberi es dianalisis lebih lanjut, pengambilan pada bulan Januari 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

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

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

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah endapan dan supernatan dari air limbah 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, metode sentrifugasi dan metode difusi sumuran.

2. Definisi operasional variabel utama

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

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

Ketiga, uji bakteri penghasil enzim protease adalah uji menggunakan metode difusi sumuran dengan melihat terbentuknya diameter zona hambat 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 hambat adalah garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi sumuran yang berisi sampel uji dianggap sebagai ukuran hambatan bakteri penghasil enzim protease.

C. Bahan dan alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah air limbah tambang batubara yang diperoleh dari Samarinda, Kalimantan timur

1.2. Bahan kimia. Perwarnaan Gram menggunakan Gram A (cat Kristal violet), Gram B (Lyugol iodine), Gram C (etanol : aseton = 1:1), Gram D (cat safranin). Malachite Green

1.3. Media. Media yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA), *Skim Milk Agar* (SMA), *Brain Heart Infusion* (BHI),

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, kapas lidi steril, jarum Ose, lampu Spiritus, pipet volume, autoklaf, inkubator, gelas ukur, batang pengaduk, Erlenmeyer, beaker glass, mikroskop, obyek glass, pH meter, dan kaca bulat.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi

Alat-alat yang digunakan dan terbuat dari gelas harus disterilkan terlebih dahulu. Alat dicuci dan dikeringkan dalam oven pada suhu 170-180⁰ C selama 2 jam. Alat – alat kering tersebut dibungkus dengan kertas, lalu disterilisasi dalam autoklaf selama 15-30 menit pada suhu 121⁰C.

Media yang digunakan untuk penelitian ini harus disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15-30 menit. Sedangkan untuk alat alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung menggunakan lampu spiritus didalam inkas yang sudah disterilkan dengan formalin (Suriawira 1986).

2. Isolasi mikroorganisme dari sumber air asam tambang

Sampel diambil dari limbah air asam tambang batu bara Samarinda Kalimantan Timur yang bersuhu 25⁰C – 45⁰C dengan pH berkisar 3-5. Sampel di inokulasikan pada media BHI diinkubasi pada suhu 37⁰C selama ± 3 hari. Kemudian sampel yang sudah di inkubasi selama 3 hari, sebanyak 100 µL sampel air di inokulasikan pada medium NA dengan cara digores dengan jarum ose secara 4 kuadran, kemudian di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Bakteri

yang tumbuh secara tunggal diambil sebanyak 5 isolat. Masing-masing 5 isolat bakteri di perbanyak kedalam media BHI diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. Identifikasi bakteri dari air limbah tambang batubara

Masing-masing dari 5 isolat bakteri tadi diidentifikasi dengan cara ditumbuhkan pada media NA, kemudian dilakukan pengamatan isolate koloni, pewarnaan Gram positif dan negatif, pewarnaan spora, pewarnaan nigrosin, kemudian dikarakterisasi dan dilakukan uji biokimia.

Pengamatan Isolat Koloni Bakteri, Pengamatan koloni bakteri ini dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang terbentuk dalam media NA saat pengisolasian. Indikator dalam pengamatan koloni bakteri ini yaitu mengamati bentuk, warna, tepi dan permukaan dari koloni bakteri.

Pewarnaan Gram dilakukan bertujuan untuk mengetahui bakteri yang terdapat dalam air limbah tambang batubara bakteri gram positif atau bakteri gram negatif. Pewarnaan positif dan negatif dilakukan dengan cara dilakukan dengan preparat ulas yang telah difiksasi. Ditetesi Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), didiamkan selama ± 3 menit, dibilas dengan air mengalir, kemudian ditetesi Gram B (lugol iodine), didiamkan ± 1 menit, dibilas dengan air mengalir, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol) didiamkan ± 45 detik, dibilas dengan air mengalir. Di keringkan preparat dengan tisu yang ditempelkan di sisi ulas lalu diamkan sampai mengering di udara. Bakteri dinyatakan Gram positif apabila berwarna ungu dibawah mikroskop (Volk dan Wheller 1988). Bakteri dinyatakan Gram negatif apabila berwarna merah dibawah mikroskop (Koneman *et al.* 1983).

Pewarnaan spora, bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri tersebut memiliki spora. Pewarnaan ini dibuat dengan mengambil koloni pada setiap isolat dengan membuat preparat ulas dan dibiarkan mengering dengan melakukan fiksasi panas, lalu digenangi apusan dengan Malachite Green dan fiksasi selama 2-3 menit, lalu dipreparat didinginkan dan dibilas dengan akuades, diberikan pewarna tandingan safranin selama 30 detik, dibilas dengan akuades. Setelah itu

dikeringkan menggunakan dan diamati dengan mikroskop, spora berwarna hijau sedangkan bagian sel lainnya berwarna merah (Cappucino dan Sherman 2014).

Pewarnaan Kapsul, bertujuan untuk melihat apakah bakteri tersebut memiliki kapsul atau tidak. Pewarnaan kapsul dilakukan dengan cara diambil 1 ose isolat bakteri diletakkan di kaca objek ditambahkan 1 tetes cat nigrosin, dicampur dibuat smear lalu dikeringkan. Kemudian ditetesi kristal violet didiamkan selama 1 menit dicuci dengan air mengalir. Setelah itu diamati dengan mikroskop. Kapsula tidak menyerap warna sehingga terlihat lapisan terang yang tembus dengan latar belakang yang berwarna (Waluyo 2007).

Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Identifikasi berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, dan Citrat

Media SIM (Sulfida Indol Motility). Biakan murni diinokulasikan pada permukaan media dengan cara diinokulasi tusukkan kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri.

Media KIA (Kliger Iron Agar). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukkan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 18-24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfid.

Media LIA (Lysin Iron Agar). Bakteri uji dinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukkan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfid.

Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal.

4. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri diambil dari biakan murni diambil kurang lebih 2 ose dan ditanam pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian diencerkan dengan NaCl fisiologis sampai didapat kekeruhan yang disamakan dengan Mc Farland 0,5 dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

5. Uji aktivitas protease secara difusi sumuran

Isolat yang sudah diisolasi dan diidentifikasi dilakukan uji aktivitas protease pada media *Skim Milk Agar* (SMA) dibuat 5 sumuran dengan menggunakan boorprop masing-masing isolat bakteri dimasukkan kedalam sumuran sebanyak 50 µL diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Uji dilakukan sebanyak 3 kali sampling untuk melihat perbedaan aktivitas protease pada masing-masing bakteri.

Uji aktivitas protease dilakukan dengan menghitung Indeks Proteolitik (IP) pada media *Skim Milk Agar* (SMA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil uji positif dapat dilihat dari adanya zona bening disekitar koloni Hal ini berkaitan dengan kemampuan enzim protease bakteri dalam menghidrolisis protein. Semakin banyak protein yang terhidrolisis maka luas zona bening yang terbentuk akan semakin besar dan menandakan aktivitas enzim yang terjadi juga besar.

$$IP = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

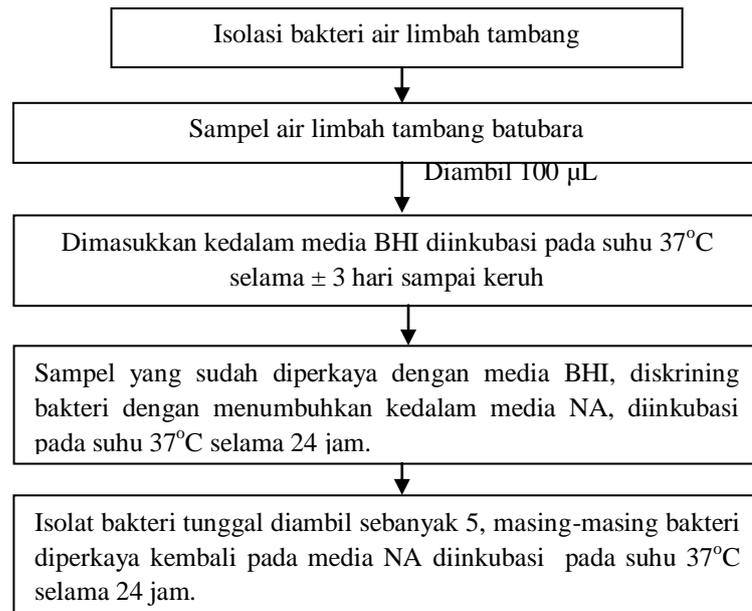
Dicatat isolat yang mempunyai IP yang paling tinggi (Agustien 2010). Diameter zona bening sumuran dan diameter koloni diukur dengan menggunakan jangka sorong.

E. Analisis Hasil

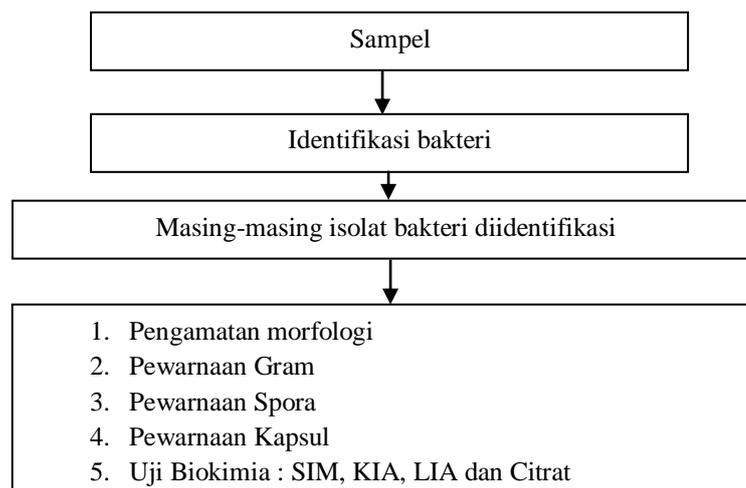
Data hasil penelitian diperoleh dengan mengukur zonaambat pertumbuhan bakteri uji yang ditunjukkan dengan adanya zona bening, kemudian diukur diameter hambatan pertumbuhan bakterinya dari masing-masing lingkaran.

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Kolmogrof-Sminov*, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan *analysis of varian* (ANOVA) untuk melihat perbedaan secara keseluruhan kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*.

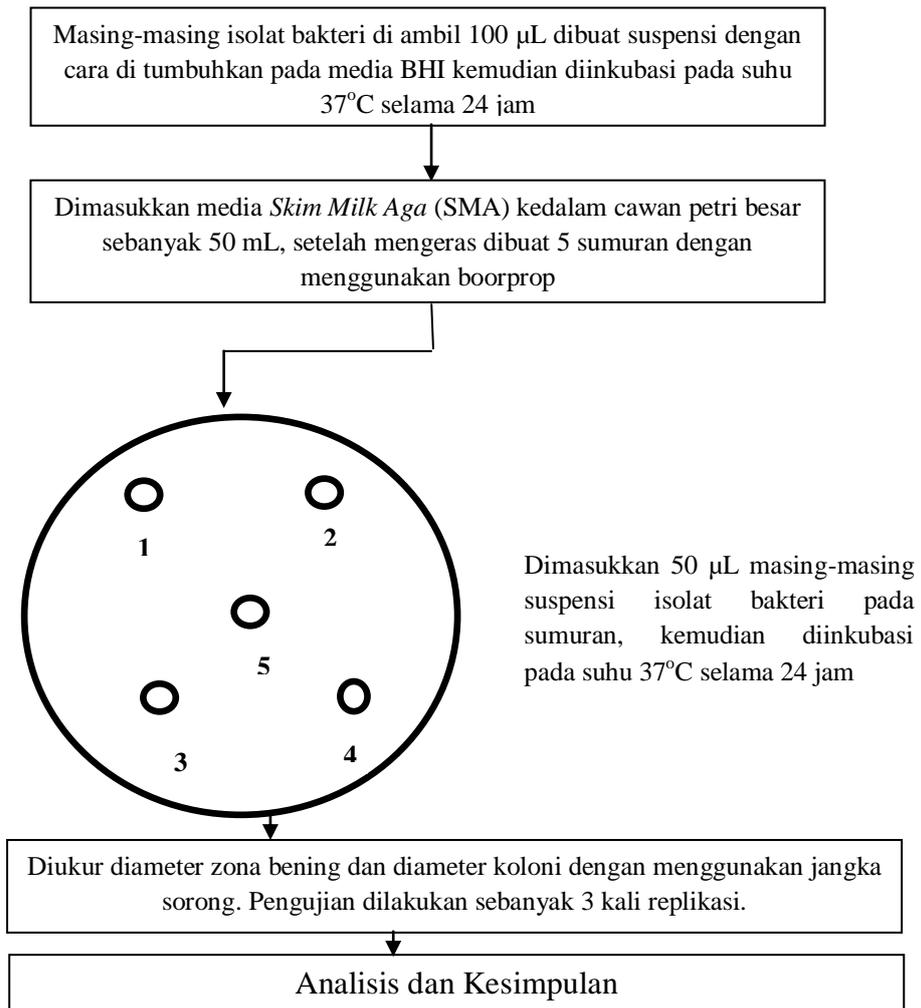
F. Skema penelitian



Gambar 1. Skema isolasi bakteri air limbah tambang batubara



Gambar 2. Skema identifikasi bakteri air limbah tambang batubara



Gambar 3. Skema kerja pengujian aktivitas protease dari bakteri asal limbah air tambang batubara

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi dan Skrining Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

Hasil dari isolasi dan skrining bakteri asal limbah air asam tambang batubara menunjukkan adanya kekeruhan pada media BHI, tingkat kekeruhan tersebut berhubungan dengan fase pertumbuhan isolat bakteri. Saat terjadi tingkat kekeruhan suspensi yang konstan saat dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5. Setelah itu bakteri ditumbuhkan pada media NA, media NA digunakan karena *Nutrient Agar* (NA) merupakan suatu media yang berbentuk padat, yang merupakan perpaduan antara bahan alamiah dan senyawa-senyawa kimia. *Nutrient Agar* (NA) merupakan suatu media yang mengandung sumber nitrogen dalam jumlah cukup yang dapat digunakan untuk budidaya bakteri dan untuk penghitungan mikroorganisme dalam air, limbah, kotoran dan bahan lainnya (Pelczar dan Chan 2008). Hasil isolasi dan skrining bisa dilihat pada Lampiran 2.

B. Pembuatan suspensi isolat

Bakteri yang tumbuh sebanyak 5 isolat dibuat suspensi bakteri pada media *Brain Heart Infusion* (BHI), diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam kemudian dibandingkan dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5 dengan jumlah bakteri 1,5x10⁸ cfu/ml yang bertujuan menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan. *Brain Heart Infusion* (BHI) adalah media penyubur yang berguna untuk pertumbuhan berbagai macam bakteri baik bentuk cair maupun agar (Murray *et al*, 2007). Hasil pembuatan suspensi bisa dilihat pada Lampiran 3.

C. Hasil Identifikasi Bakteri asal air limbah tambang batubara

Identifikasi bakteri dengan melakukan pengamatan pada morfologi koloni meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni dan warna koloni bakteri. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 1. Hasil identifikasi secara makroskopis bakteri dari air limbah tambang batubara.

ISOLAT	BENTUK	PERMUKAAN	TEPI	WARNA
SMD1	BULAT	TIMBUL	LICIN	PUTIH SUSU
SMD2	BULAT	TIMBUL	LICIN	PUTIH SUSU
SMD3	BULAT	TIMBUL	LICIN	PUTIH SUSU
SMD4	BULAT	TIMBUL	LICIN	PUTIH SUSU
SMD5	BULAT	TIMBUL	LICIN	PUTIH SUSU

keterangan : SMD (SAMARINDA)

Pewarnaan Gram, dilakukan untuk menentukan karakter isolat berdasarkan 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, sehingga pada Gram positif akan bewarna ungu jika dilihat dibawah mikroskop, sedangkan Gram negatif akan bewarna merah jika dilihat menggunakan mikroskop (Cappuccino 1983).

Identifikasi lima isolat yang berbeda didapat hasil pengujian pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif (warna merah) pada isolat bakteri SMD 1, SMD 2, SMD 3, SMD 4 dan SMD 5. Hal ini dikarenakan Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dibanding bakteri Gram positif. Hasil dapat dilihat pada Tabel 2. Gambar pewarnaan dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 2. Hasil Pewarnaan Gram bakteri dari air limbah tambang batubara.

ISOLAT	BENTUK	SUSUNAN	WARNA	GRAM
SMD1	BATANG	TUNGGAL	MERAH	NEGATIF
SMD2	BATANG	TUNGGAL	MERAH	NEGATIF
SMD3	BATANG	TUNGGAL	MERAH	NEGATIF
SMD4	BATANG	TUNGGAL	MERAH	NEGATIF
SMD5	BATANG	TUNGGAL	MERAH	NEGATIF

keterangan : SMD (SAMARINDA)

Pewarnaan kapsul untuk menentukan ada atau tidaknya kapsul dari sel bakteri, bakteri yang menghasilkan kapsul bersifat paling virulen karena kapsul melindungi fagositosis dari inangnya (Clifton 1958). Pewarnaan ini menggunakan nigrosin atau tinta cina. Untuk Kapsula tidak menyerap warna sehingga terlihat

lapisan terang yang tembus dengan latar belakang yang berwarna (Waluyo, 2007). Pada lima isolat bakteri ini setelah dilakukan pewarnaan kapsul SMD1, SMD2, SMD3, SMD4, SMD5 semua sel bakteri transparan dan dikelilingi oleh kapsul yang berwarna hitam, terbentuknya warna transparan dikarenakan sel bakteri tidak mampu menyerap warna (Waluyo 2008). Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 5. Kapsul berisi campuran polisakarida dan polipeptida. Kapsul merupakan polimer yang berlekatan dengan dinding sel maka lapisan ini disebut kapsul (Darkuni 2001).

Pewarnaan Spora, digunakan untuk mengamati Endospora bakteri, jika bakteri memiliki Endospora maka bakteri tersebut dapat bertahan pada lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti kekurangan nutrisi. Setelah dilakukan pewarnaan spora dan dilihat dibawah mikroskop kelima isolat bakteri memiliki Endospora, yang berarti kelima isolat bakteri tersebut dapat bertahan pada lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti kekurangan nutrisi. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 6. Bentuk ini tahan terhadap pemanasan dan unsur-unsur fisik lain, seperti pembekuan, kekeringan, dan radiasi ultra violet serta bahan kimia yang dapat menghancurkan sel bakteri. Bila keadaan lingkungan menjadi baik, maka dinding Endospora akan pecah dan bakteri akan membentuk sel vegetatif kembali (Cappucino 1987).

Identifikasi dengan uji biokimia. Uji sulfur bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menguraikan asam amino menjadi sulfur, hasil positif apabila ditandai dengan terbentuknya logam sulfid yang berwarna hitam (Holt 2000). Uji indol bertujuan untuk menentukan kemampuan bakteri dalam memecah asam amino triptofan dan untuk menentukan mikroorganisme yang mampu mengoksidasi glukosa dengan menghasilkan asam berkonsentrasi tinggi, hasil positif ditandai dengan adanya cincin merah pada media setelah ditambah ehrlich A dan B. Motilitas bakteri terlihat ketika adanya pertumbuhan pada medium yang tidak terbatas pada stab line inokulasi, sedangkan pertumbuhan bakteri nonmotil terbatas pada garis inokulasi. Pergerakan bakteri ini terlihat dengan adanya pemisahan agar yang ditandai dengan adanya warna hitam. Lysine Iron Agar (LIA) mengandung glukosa, asam amino lisin, dan brom kresol ungu

sebagai pH indikator, serta natrium tiosulfat. Lysin Iron Agar (LIA) dapat digunakan untuk identifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendekarboksilasi asam amino lisin dan memproduksi gas H₂S (Haryani 2012). Media Kliger Iron Agar (KIA) merupakan media diferensial untuk bakteri Gram negatif. Kemampuan bakteri mengubah dekstrosa dan laktosa serta kemampuan memproduksi hidrogen sulfida adalah merupakan dasar untuk mengetahui jenis bakteri tertentu dari pertumbuhannya dalam media ini (Suyati 2010). Uji sitrat positif ditunjukkan oleh perubahan warna biakan dari hijau menjadi biru karena terbentuknya natrium karbonat hasil reaksi enzimatis yang mengubah indikator bromtimol biru pada media. Setelah dilakukan uji biokimia yaitu uji SIM, LIA, KIA, Citrat, maka hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 3

Tabel 3. Hasil identifikasi uji biokimia bakteri dari air limbah tambang batubara.

Isolat	SMD 1	SMD 2	SMD 3	SMD 4	SMD 5
Uji Biokimia					
Sulfida					
Indol	- - -	- + -	- - -	- - -	- - -
Motil (SIM)					
Uji KIA	K/K s-	K/A s-	K/AG s-	K/A s-	K/AG s-
Uji LIA	K/k s-	K/k s-	K/k s-	K/k s-	K/k s-
Uji Citrat	+	+	+	+	+
Keterangan = SIM (- - -)	Tidak adanya warna hitam, tidak ada lingkaran merah, dan tidak adanya pertumbuhan				
(- + -)	Tidak adanya warna hitam, ada lingkaran merah, dan tidak adanya pertumbuhan				
KIA (K/K S-)	Media berwarna merah, tidak ada warna hitam				
(K/A S-)	Lereng media merah, dasar media kuning , tidak ada warna hitam				
(K/AGS-)	Lereng media merah, dasar media kuning , terdapat gas, dan tidak ada warna hitam				
LIA (K/k S-)	Media berwarna ungu, tidak ada warna hitam				
Sitrat (+)	Adanya warna biru pada media				

Isolat bakteri SMD1 pada media SIM tidak memproduksi H₂S, pada indol SMD1 tidak dapat memecah asam amino dan tidak mampu mengoksidasi glukosa, serta untuk motilitas bakteri tidak adanya pertumbuhan pada media. Pada media KIA media tetap berwarna merah yang berarti SMD1 tidak mampu mengubah

dekstrosa dan laktosa serta tidak mampu memproduksi H_2S . Pada media LIA media tetap berwarna ungu yang berarti SMD1 tidak dapat menghasilkan asam amino dan glukosa serta tidak mampu memproduksi H_2S . Pada media sitrat, media berubah dari hijau menjadi biru yang berarti isolat bakteri SMD1 menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 6.

Isolat bakteri SMD2 pada media SIM tidak memproduksi H_2S , sedangkan pada indol SMD2 dapat memecah asam amino mampu mengoksidasi glukosa sehingga terbentuk cincin indol. Untuk motilitas, tidak terdapat pertumbuhan pada media. Pada media KIA lereng media berwarna merah dan dasar media berwarna kuning yang berarti SMD2 mampu mengubah dekstrosa dan laktosa serta tetapi tidak mampu memproduksi H_2S karena tidak adanya warna hitam pada media. Pada media LIA media tetap berwarna ungu yang berarti SMD2 tidak dapat menghasilkan asam amino dan glukosa serta tidak mampu memproduksi H_2S . Untuk media Sitrat, media berubah dari hijau menjadi biru yang berarti isolat bakteri SMD2 menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 6.

Isolat bakteri SMD3 pada media SIM tidak memproduksi H_2S , pada indol SMD3 tidak dapat memecah asam amino dan tidak mampu mengoksidasi glukosa. Untuk motilitas, tidak terdapat pertumbuhan pada media. Pada media KIA lereng media berwarna merah dan dasar media berwarna kuning yang berarti SMD3 mampu mengubah dekstrosa dan laktosa serta tidak mampu memproduksi H_2S karena tidak adanya warna hitam pada media, tetapi terdapat gas pada dasar media. Pada media LIA media tetap berwarna ungu yang berarti SMD3 tidak dapat menghasilkan asam amino dan glukosa serta tidak mampu memproduksi H_2S . Untuk media Sitrat, media berubah dari hijau menjadi biru yang berarti isolat bakteri SMD3 menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 6.

Isolat bakteri SMD4 pada media SIM tidak memproduksi H_2S , pada indol SMD4 tidak dapat memecah asam amino dan tidak mampu mengoksidasi glukosa.

Untuk motilitas, tidak terdapat pertumbuhan pada media. Pada media KIA lereng media berwarna merah dan dasar media berwarna kuning yang berarti SMD4 mampu mengubah dekstrosa dan laktosa serta tidak mampu memproduksi H₂S karena tidak adanya warna hitam pada media. Pada media LIA media tetap berwarna ungu yang berarti SMD4 tidak dapat menghasilkan asam amino dan glukosa serta tidak mampu memproduksi H₂S. Untuk media Sitrat, media berubah dari hijau menjadi biru yang berarti isolat bakteri SMD4 menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 6.

Isolat bakteri SMD5 pada media SIM tidak memproduksi H₂S, pada indol SMD5 tidak dapat memecah asam amino dan tidak mampu mengoksidasi glukosa. Untuk motilitas, tidak terdapat pertumbuhan pada media. Pada media KIA lereng media berwarna merah dan dasar media berwarna kuning yang berarti SMD5 mampu mengubah dekstrosa dan laktosa serta tidak mampu memproduksi H₂S karena tidak adanya warna hitam pada media, tetapi terdapat gas pada dasar media. Pada media LIA media tetap berwarna ungu yang berarti SMD5 tidak dapat menghasilkan asam amino dan glukosa serta tidak mampu memproduksi H₂S. Untuk media Sitrat, media berubah dari hijau menjadi biru yang berarti isolat bakteri SMD5 menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 6.

D. Hasil pengujian aktivitas enzim protease dari bakteri air limbah tambang batubara dengan metode difusi

Pengujian aktivitas enzim protease dilakukan dengan metode difusi sumuran. Pengujian ini dilakukan pada lima isolat bakteri (SMD1, SMD2, SMD3, SMD4, SMD5). Isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada media cair yaitu Brain Heart infusion (BHI), dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 50 mikroliter, kemudian dimasukkan kedalam sumuran pada media *Skim Milk Agar* (SMA) media ini adalah media yang digunakan untuk uji aktivitas proteolitik, setelah itu inkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam, adanya aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan adanya area bening yang muncul disekitar koloni. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 7.

. Indeks proteolitik dihitung dengan mengukur diameter area bening dan diameter koloni bakteri, indeks proteolitik adalah hasil dari aktivitas enzim protease yang didapat dengan perhitungan indeks proteolitik yaitu perbandingan antara diameter area bening dikurang diameter koloni bakteri dengan diameter koloni bakteri (Agustien 2010). Hasil uji aktifitas enzim protease dapat dilihat pada Tabel 4.

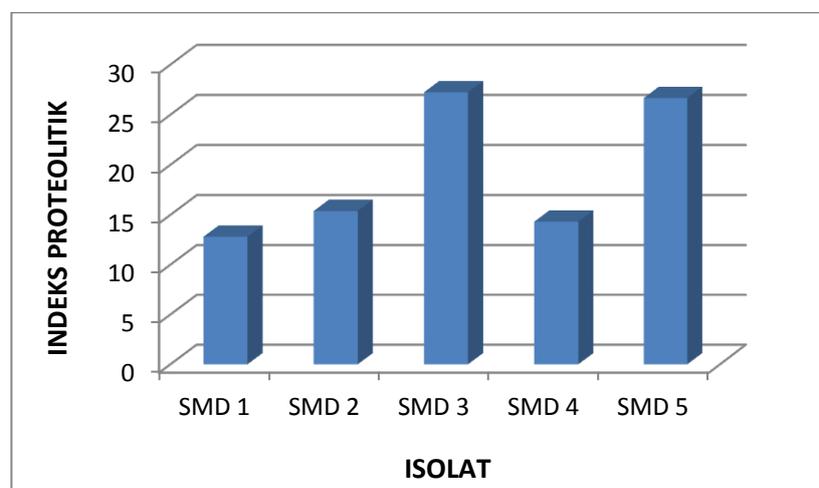
Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas enzim protease dari bakteri asal limbah air tambang batubara

ISOLAT	DIAMETER ZONA			DIAMETER KOLONI			INDEKS PROTEOLITIK			RATA-RATA
	BENING (mm) REPLIKASI			BAKTERI (mm) REPLIKASI						
SMD1	12,23	12,33	12,36	5,40	5,47	5,32	12,64	12,54	13,23	12,80±0,37
SMD2	13,87	13,82	13,82	5,72	5,27	5,37	14,24	16,22	15,73	15,39±1,03
SMD3	19,08	19,89	19,08	5,17	5,30	5,10	26,90	27,42	27,41	27,24±0,29
SMD4	12,95	13,05	13,08	5,20	5,47	5,40	14,90	13,85	14,22	14,32±0,53
SMD5	18,05	17,85	17,85	5,25	5,52	5,20	24,38	22,33	24,32	23,67±1,16

Data pada tabel 4 menunjukkan adanya perbedaan dari aktivitas proteolitik kelima isolat bakteri tersebut, dari kelima isolat tersebut pada isolat SMD3 memiliki aktivitas proteolitik yang lebih tinggi dibandingkn isloat SMD1, SMD2, SMD4 dan SMD5 yaitu 27,24. Aktivitas proteolitik bakteri asal air limbah tambang batubara pada isolat SMD3 dan SMD4 lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas proteolitik pada isolat *Bacillus* TN69 yang memiliki aktivitas proteolitik sebesar 22,67 mm pada penelitian Dajanta *et al.* (2009) dan pada penelitian Riky *et al.* (2014) yang memiliki aktivitas proteolitik pada isolat limbah cair D61 yaitu 20,5 mm.). Sedangkan pada penelitian Wilis dan Subagiyo (2012) pada sedimen kawasan Mangrove didapat aktivitas diameter proteolitik pada isolat C-01 yaitu 21 mm yang berarti isolat bakteri SMD3 memiliki aktivitas proteolitik lebih tinggi. Hasil penelitian isolat bakteri air limbah tambang batubara lebih berpotensi sebagai enzim proteolitik dibandingkan penelitian sebelumnya. Menurut Muchtadi dan Betty (1983), kemampuan mikroba untuk menguraikan protein berbeda antara satu spesies dengan spesies lainnya.. Setiap mikroba

menghasilkan enzim yang berbeda sehingga aktivitas yang dihasilkan juga berbeda.

Protease banyak dimanfaatkan untuk kepentingan komersial pada berbagai industri seperti industri detergen, produk-produk kulit, tekstil, makanan, hidrolisis protein, pengolahan susu, farmasi, bir, dan limbah (Nascimento dan Martins 2006). Aplikasi protease juga bermanfaat untuk bahan aditif pada industri pangan, dan zat terapeutik pada bidang farmasi (Gupta *et al.* 2002)



Gambar 4. Diagram rata-rata indeks proteolitik dari isolate air limbah tambang batubar

Gambar 4 menunjukkan isolat SMD3 memiliki indeks proteolitik paling tinggi yaitu 27,24 mm dibandingkan isolat SMD1, SMD2, SMD4, dan SMD5. Pada isolat SMD5 memiliki indeks proteolitik yang cukup besar dengan rata-rata 23,67 mm. Isolat SMD2 dan SMD4 memiliki indeks proteolitik yang tidak jauh berbeda yaitu 15,39 mm dan 14,32 mm, sedangkan isolat SMD1 memiliki indeks proteolitik paling kecil dibandingkan isolat lainnya yaitu 12,80 mm.

Hasil uji statistik dengan Kolmogrov-Smirnov terdistribusi normal dilanjutkan dengan ANOVA satu jalan dan dilanjutkan *post hoc test*. Isolat SMD2 dan SMD4 berada dalam satu subsets artinya tidak memiliki perbedaan yang bermakna antara SMD2 dan SMD4, tetapi pada isolat SMD1, SMD3, dan SMD5 tidak berada dalam satu subsets artinya memiliki perbedaan yang bermakna antara SMD1, SMD3, dan SMD5, dimana isolat SMD3 memiliki aktivitas proteolitik

lebih tinggi dibandingkan SMD1, SMD2, SMD4 dan SMD5. Hasil gambar aktivitas proteolitik dengan metode difusi sumuran dapat dilihat pada Lampiran 12.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

Pertama, uji secara mikroskopis SMD1, SMD2, SMD3, SMD4, dan SMD5, kelima isolat tersebut merupakan gram negatif dengan bentuk batang. Uji biokimia SMD1, SMD2, dan SMD4 memiliki persamaan, tetapi pada SMD3 dan SMD5 memiliki perbedaan pada saat uji biokimia

Kedua, bakteri asal air limbah tambang batubara dapat menghasilkan enzim protease dan memiliki indeks proteolitik yang tinggi pada isolat SMD3 yaitu 27,24 mm.

B. Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan, disarankan pada penelitian selanjutnya agar didapatkan hasil yang maksimal sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan uji kuantitatif yaitu dengan penentuan aktivitas enzim dengan spektrofotometer
2. Perlu dilakukan uji enzim lainnya seperti uji amilase, lipase, dan selulose
3. Perlu dilakukan identifikasi bakteri lebih mendalam pada masing-masing isolat untuk mengetahui bakteri apa yang terdapat dalam isolat air limbah tambang batubara

DAFTAR PUSTAKA

- Agustien A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung.
- Akhdiya A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil. *Buletin Plasma Nutfah* 9(2): 38 - 44.
- Anggayana K. 2002, *Genesa Batubara*, Departemen Teknik Pertambangan, FIKTM, Institut Teknologi Bandung Badan Pengendalian Lingkungan Hidup Daerah (BPLHD) Provinsi Jawa Barat. 2005. *Status Lingkungan Hidup Provisi Jawa Barat*
- Arulanantham R, Pathmanathan S, Ravimannan N, Niranjan K. 2012. Alternative Culture Media for Bacterial Growth Using Different Formulation of Protein Sources. *Journal of Natural Product and Plant Resource*, 2 (6):697-700.
- Atlas, Ronald M. 2004. *Handbook of Microbiological Media Third Edition Volume 1*. United States Of America: CRC Press.
- Cappucino JG, Sherman N. (2014). *Manual Laboratorium Mikrobiologi*, Edisi 8. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Chu WH. 2006. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 34:241-245.
- Darkuni N. 2001. *Mikrobiologi*. Malang: JICA
- Fong KPY, Tan HM. 2000. Isolation of a Microbial Consortium from Activated Sludge for the Biological Treatment of Food Waste. *World J. Microb. & Biotechnol*. 16:441-443.
- Gautama RS. (2012). *Pengelolaan Air Asam Tambang*. Bandung.
- Gupta R, Beg QK, dan Lorenz P. 2002. *Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Application*, Appl Microbiol Biotechnol.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, William ST. 2000, *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition, William and Wilkin, USA.
- Johnson DB, Hallberg BK. (2005). Acid Mine Drainage Remediation Options : A Review. *Science of the Total Environment*, 338(1-2), 3–14. Loperena, L., Ferrari, M.D., Saravia, V., Murro, D., Lima, C., Ferrando, L., Fernández,

- A., dan Lareo, C., 2007. Performance of a Commercial Inoculum for the Aerobic Biodegradation of a High Fat Content Dairy Wastewater. *Biores. Technol.* 98:1045–1051.
- Jutono J, Soedarsono S, Hartadi S, Kabirun S, Suhadi D, dan Soesanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup No113 Tahun 2003, *Tentang Baku Mutu Air Limbah Bagi Usaha dan atau Kegiatan Pertambangan Batubara*.
- Koneman EW. 1983. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5 th Ed. Philadelphia, Lippincott.
- Kusmayati, Agustini NWR, 2007. *Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari mikroalga (Porphyridium cruentum)*. Biodiversitas 8 : 48-53.
- Lay WB. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium*. Edisi I. Jakarta : PT.Raja Grafindo Persada
- Loperena L, Ferrari MD, Diaz AL, Ingold G, Perez LV, Carvallo F, Travers D, Menes RJ, dan Lareo C. 2009. Isolation and Selection of Native Microorganisms for the Aerobic Treatment of Simulated Dairy Wastewater. *Biores. Technol.* 100:1762-1766.
- Mittal A. 2007. *Microbial Physiology and Biochemistry*. Department of Biochemical Engineering & Biotechnology. Indian Institute of Technology. India.
- Mubarik NR, A. Suwanto dan MT Suhartono, 2000. Isolasi dan karakterisasi protease ekstraseluler dari isolat bakteri termofilik ekstrim. Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II. Mikrobiologi, Enzim dan Bioteknologi Dalam Perspektif Ekonomi dan Industri. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta, Him 151-158
- Murray PR, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller. 2007. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Nascimento WCA, Martins MLL. 2006, Studies on stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent, *Brazilia, Microbiol*, 37: 307-311.

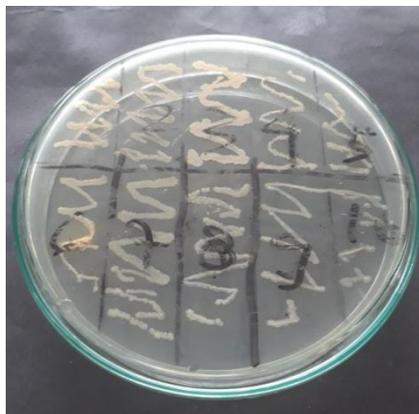
- Pelczar, Michael J. ECS Chan. 2008. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Jakarta. UI Press
- Poedjiadi A. 2006. *Dasar – Dasar Biokimia*. Edisi Revisi. Jakarta: UI – Press.
- Poernomo AT, Purwanto DA. 2003, Uji aktifitas crude enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 hasil fermentasi curah, *Majalah Farmasi Airlangga*, 3: 103–107.
- Poliana J, Mac CAP. 2007. *Industrial enzymes: structure, function, and applications*. Dordrecht: Springer Hal: 24.
- Ravimannan N, Arulanantham R, Pathmanathan S, Niranjani, Kularajani. 2014. Alternative Culture Media For Fungal Growth Using Different Formulation Of Protein Sources. *Annals of Biological Research*, 5 (1):36-
- Sayoga RG. 2007. *Pengelolaan Air Tambang: Aspek Penting dalam Pertambangan yang Berwawasan Lingkungan*. Pidato Ilmiah, majelis Guru Besar ITB. Jurusan Teknik Pertambangan ITB. Standar Nasional Indonesia. Metode pengambilan air limbah, SNI 6989.59. 2008.
- Skousen J. 1998. *Handbook of Technologies for Avoidance and Remediation of Acid Mine Drainage*, The National Mine Land Reclamation Centre, Morgantown, West Virginia.
- Stumm, W. and Morgan, J.J. (1981) *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd., New York.
- 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.
- Suhartono MT. 2000, Eksplorasi Protease Bakteri Asal Indonesia untuk Aplikasi Industri dan Riset Bioteknologi, *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*. Hlm 125-133.
- Sumardjo D. 2006. *Pengantar Kimia*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Susatyo ID. 2006. *Isolasi dan Identifikasi Bakeri Gelatinolitik Asal Tambak Daerah Gresik dan Lamongan*. Skripsi. Program S1 Budidaya Perairan. Universitas Airlangga. Surabaya. hal:6-7.

- Suyati. 2010, Identifikasi dan Uji Antibiotik Bakteri Gram Negatif pada Sampel Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK), *Skripsi*, Universitas Negeri Papua Manokwari.
- Tarntip R, Sirichom T. 2011. Isolation of Proteolytic, Lipolytic, and Bioemulsifying Bacteria for Improvement of the Aerobic Treatment of Poultry Processing Wastewater. *Afr. J. Microb. Res.* 5(30):5493-5497.
- Thomas DB. 1989, A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition, Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Urano N, Sasaki E, Ueno R, Namba H, Shida Y, 2002. Bioremediation of Fish Cannery Wastewater with Yeast Isolated from a Drainage Canal. *Marine Biotechnol.* 4:559-564.
- Volk WA, Wheeler M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid II. Terjemahan Soenartomo Adisoemarto. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Waluyo L. 2008. *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Ward OP, Rao MB, Kulkarni A. 2009. Protease Production Appli. *Microbiol. Industrial.* 495-511
- Watzlaf GR, Schroeder KT, Kleinmann RLP, Kairies CL, Nairn RW. 2004. *The Passive Treatment of Coal Mine Drainage*, DOE/NETL-2004/1202, U.S. Department of Energy, National Energy Technology Laboratory Pittsburgh, PA.
- Widyati E, M Irdika M, K Cecep, A Iswandi, S Erdy. 2005. *Biodiversity and effec Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from ex-coal mining area*. *Journal of Forest and Nature Conservation Research* II(3), 295-302.
- Witoro SS. 1997. *Pengelolaan Lingkungan Pertambangan*. Disampaikan pada seminar LINGKUNGAN: Peran Pendidikan Teknik Lingkungan dalam Pembangunan Bangsa, Lustrum IX Pendiidikan Teknik Lingkungan ITB, 15 Desember 2007, Dirjen Mineral, Batubara dan Panas Bumi, Departemen ESDM.

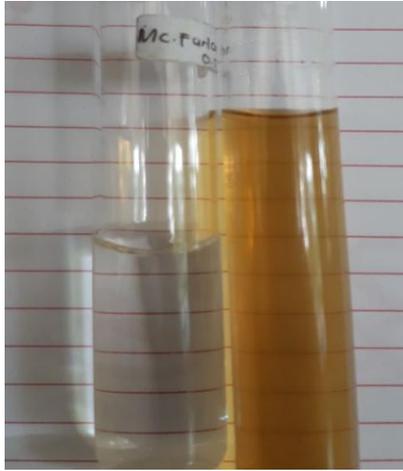
Lampiran 1. Sampel air limbah tambang batubara asal Samarinda Kalimantan timur



Lampiran 2. Hasil Isolasi dan skrining bakteri air limbah tambang batu bara



Lampiran 3. Suspensi bakteri asal air limbah tambang batubara



SMD 1



SMD 2



SMD 3



SMD 4



SMD 5

Lampiran 4. Hasil identifikasi bakteri asal air limbah tambang batubara secara makroskopis

SMD 1



SMD 2



SMD 3



SMD 4

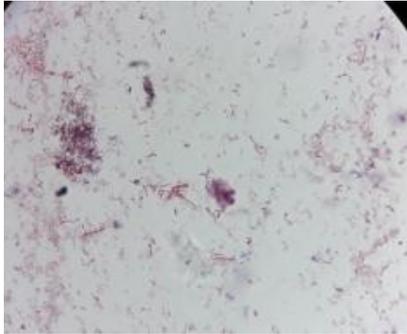


SMD 5

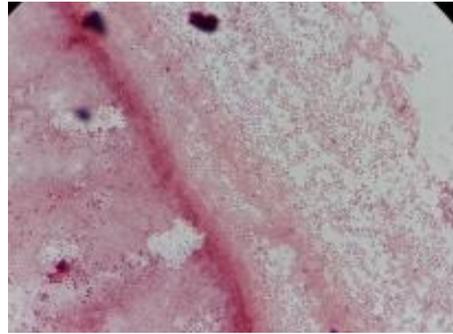


Lampiran 5. Hasil Identifikasi isolat bakteri air limbah tambang batubara secara mikroskopis

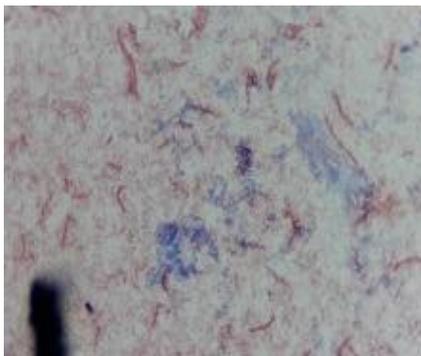
PEWARNAAN GRAM



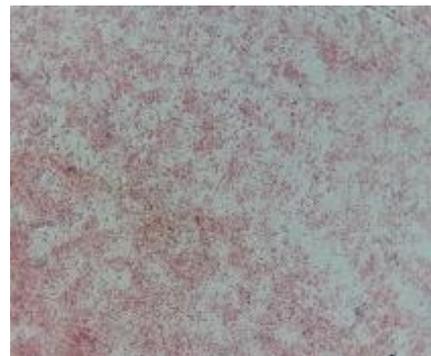
SMD 1



SMD 2



SMD 3

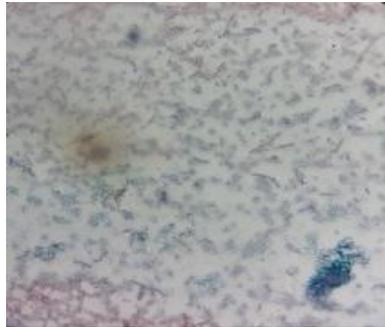


SMD 4

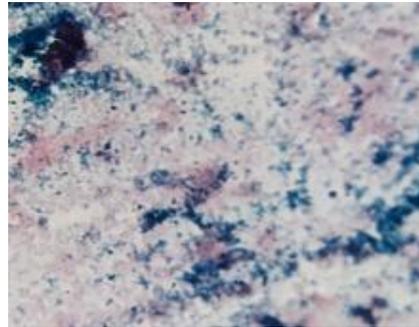


SMD 5

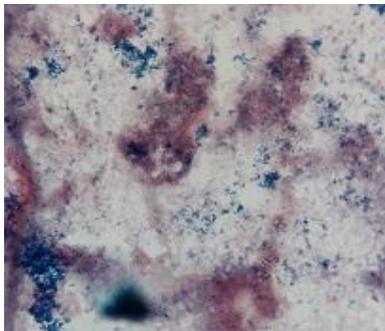
PEWARNAAN SPORA



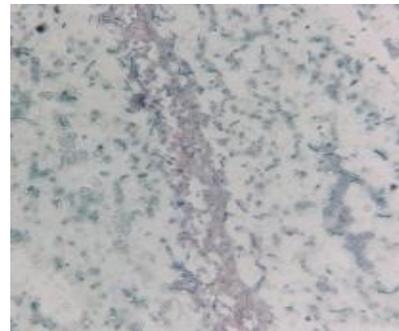
SMD 1



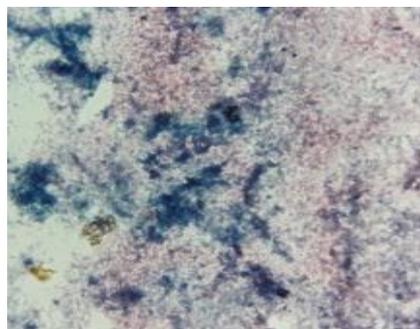
SMD 2



SMD 3

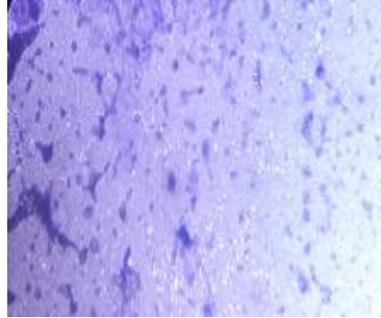


SMD 4



SMD 5

PEWARNAAN KAPSUL



SMD 1



SMD 2



SMD 3



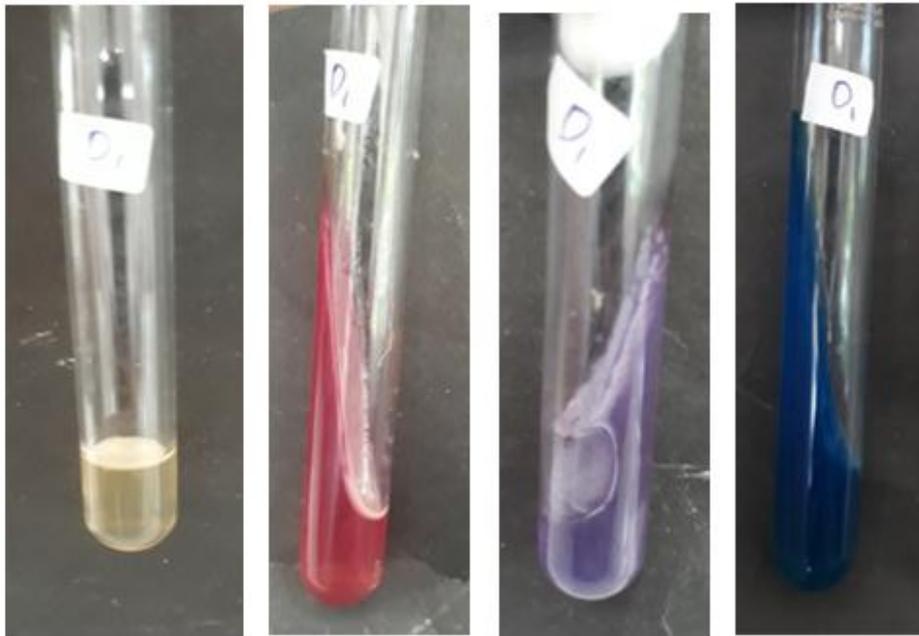
SMD 4



SMD 5

Lampiran 6. Hasil uji biokimia

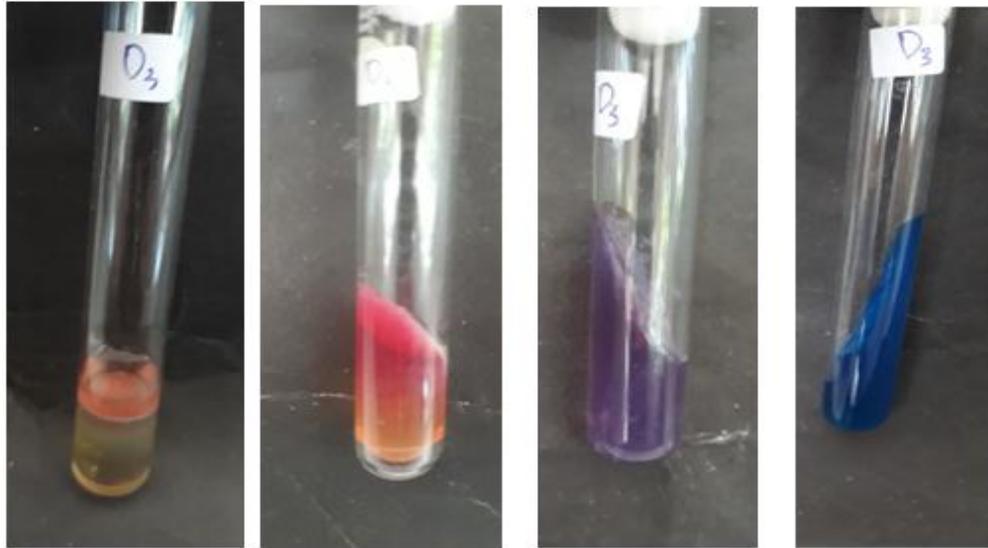
Uji biokimia SMD 1



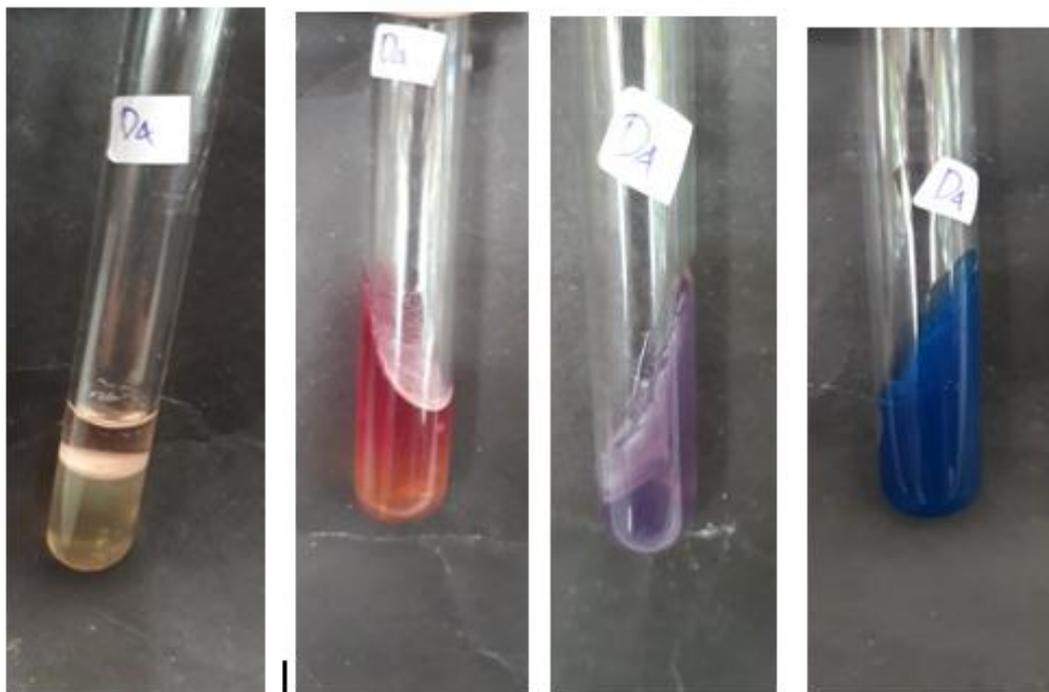
Uji biokimia SMD 2



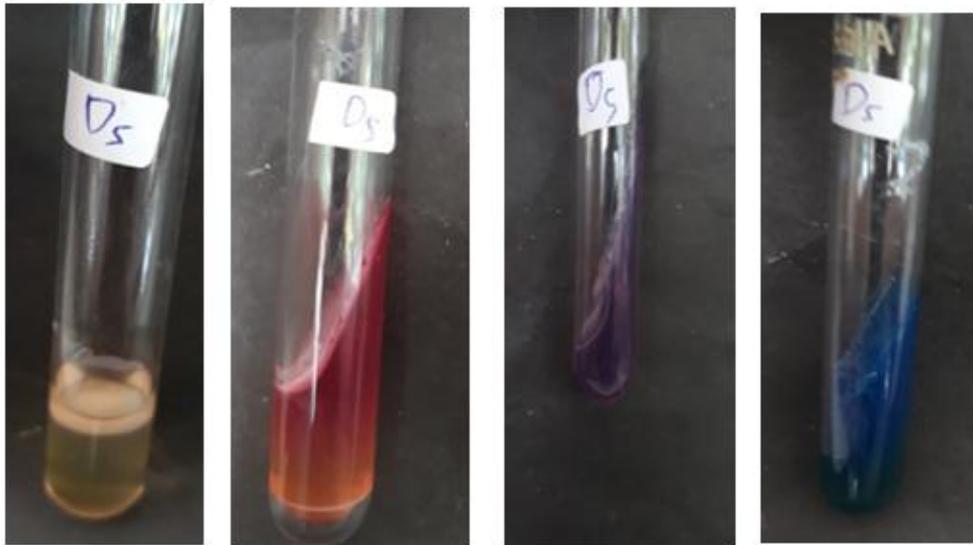
Uji biokimia SMD 3



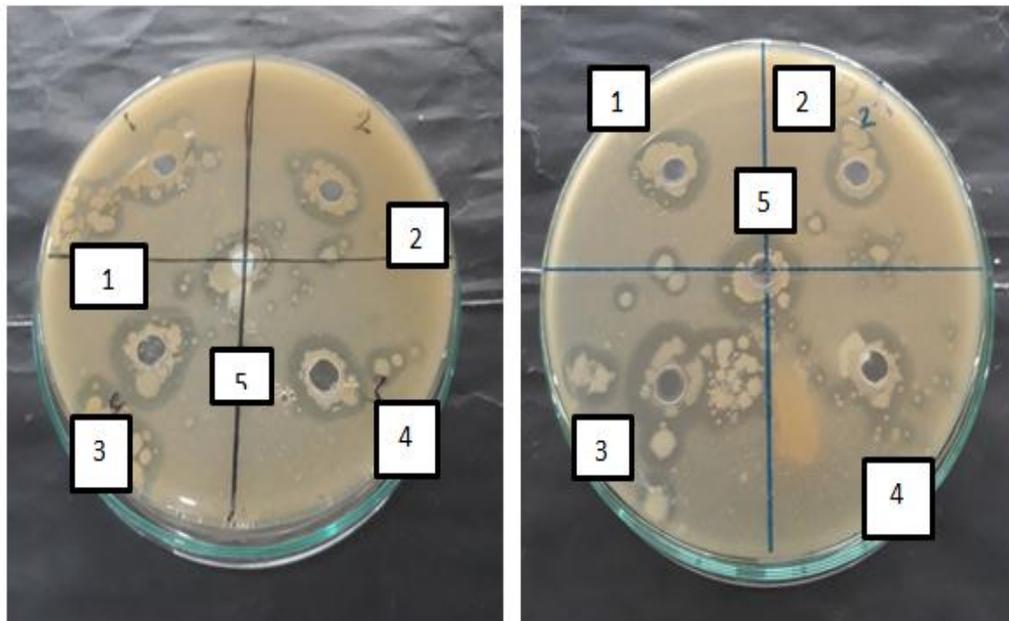
Uji biokimia SMD 4



Uji biokimia SMD 5

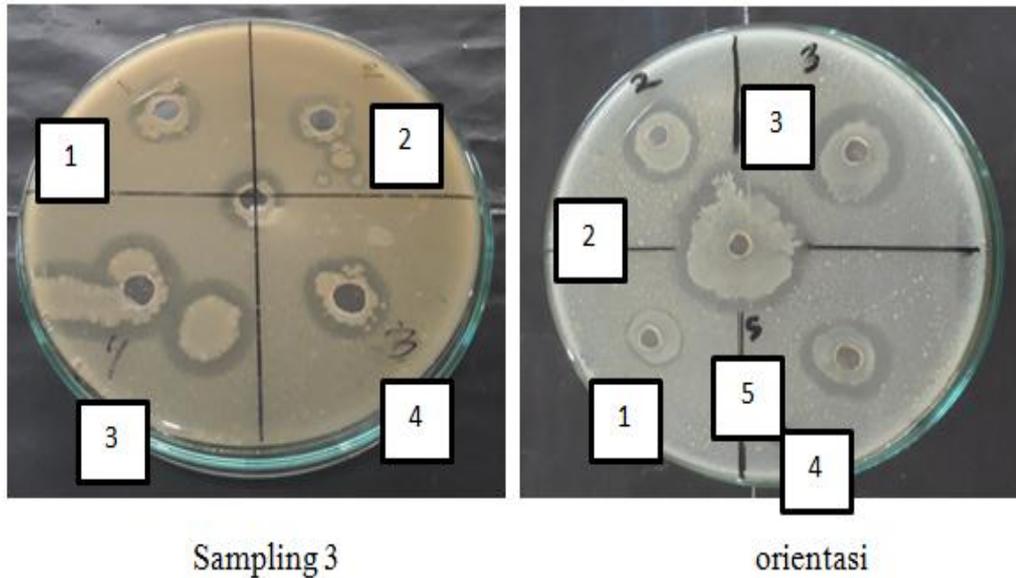


Lampiran 7. Hasil uji aktivitas proteolitik



Sampling 1

sampling 2



Lampiran 8. Hasil perhitungan indeks proteolitik

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

1. Sampling 1

$$\text{Isolat SMD 1} = \frac{12,23 - 5,40}{5,40} = 12,64 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 2} = \frac{13,87 - 5,72}{5,72} = 14,24 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 3} = \frac{19,08 - 5,17}{5,17} = 26,90 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 4} = \frac{12,95 - 5,20}{5,20} = 14,90 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 5} = \frac{18,05 - 5,25}{5,25} = 24,38 \text{ mm}$$

2. Sampling 2

$$\text{Isolat SMD 1} = \frac{12,33 - 5,47}{5,47} = 12,54 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 2} = \frac{13,82 - 5,27}{5,27} = 16,22 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 3} = \frac{19,83 - 5,30}{5,30} = 27,42 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 4} = \frac{13,05 - 5,47}{5,47} = 13,85 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 5} = \frac{17,85 - 5,52}{5,52} = 22,33 \text{ mm}$$

3. Sampling 3

$$\text{Isolat SMD 1} = \frac{12,36 - 5,32}{5,32} = 13,32 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 2} = \frac{13,82 - 5,37}{5,37} = 15,73 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 3} = \frac{19,08 - 5,10}{5,10} = 27,41 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 4} = \frac{13,08 - 5,40}{5,40} = 14,22 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat SMD 5} = \frac{17,85 - 5,20}{5,20} = 24,32 \text{ mm}$$

Lampiran 9. Hasil perhitungan rata-rata indeks proteolitik

$$\text{Isolat 1} = \frac{12,64 + 12,54 + 13,23}{3} = 12,80 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat 2} = \frac{14,24 + 16,22 + 15,73}{3} = 15,39 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat 3} = \frac{26,90 + 27,42 + 27,41}{3} = 27,24 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat 4} = \frac{14,90 + 13,85 + 14,22}{3} = 14,32 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat 5} = \frac{24,38 + 22,33 + 24,32}{3} = 23,67 \text{ mm}$$

Lampiran 10. Bahan-bahan penelitian



Minyak emersi



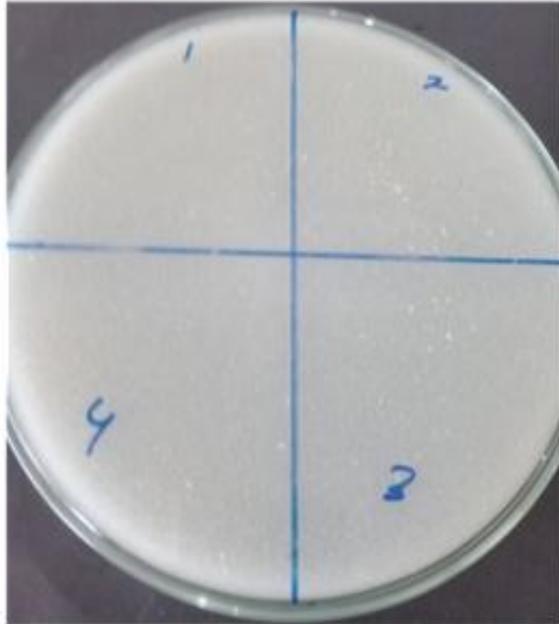


Xylol



Lampiran 11. Komposisi Media Skim Milk Agar (SMA)





Lampiran 12. Alat-alat Penelitian



Boor proop



ose bulat dan jarum



Bunsen



vortex



Autoclav



inkubator



Inkas



oven



Neraca elektrik



mikropipet



Mikroskop



jangka sorong

Lampiran 13. Hasil uji Statistik

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
AKTIVITAS PROTEOLITIK	15	18,6887	5,93807	12,54	27,42

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		AKTIVITAS PROTEOLITIK
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	18,6887
	Std. Deviation	5,93807
	Absolute	,261
Most Extreme Differences	Positive	,261
	Negative	-,162
Kolmogorov-Smirnov Z		1,012
Asymp. Sig. (2-tailed)		,258

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

AKTIVITAS PROTEOLITIK

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
					Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
SMD 1	3	12,8033	,37287	,21528	11,8771	13,7296	12,54	13,23
SMD 2	3	15,3967	1,03123	,59538	12,8350	17,9584	14,24	16,22
SMD 3	3	27,2433	,29738	,17169	26,5046	27,9821	26,90	27,42
SMD4	3	14,3233	,53257	,30748	13,0004	15,6463	13,85	14,90
SMD 5	3	23,6767	1,16663	,67356	20,7786	26,5747	22,33	24,38
Total	15	18,6887	5,93807	1,53320	15,4003	21,9771	12,54	27,42

Test of Homogeneity of Variances

AKTIVITAS PROTEOLITIK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,307	4	10	,057

ANOVA

AKTIVITAS PROTEOLITIK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	487,779	4	121,945	207,702	,000
Within Groups	5,871	10	,587		
Total	493,650	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AKTIVITAS PROTEOLITIK

Student-Newman-Keuls^a

ISOLAT	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
SMD 1	3	12,8033			
SMD4	3		14,3233		
SMD 2	3		15,3967		
SMD 5	3			23,6767	
SMD 3	3				27,2433
Sig.		1,000	,117	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 14. 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. *Media Skim Milk Agar (SMA)*

Pepton	0,2 gram
Nacl	1,0 gram
Agar	4,0 gram
Susu skim	20 mL
Aquadest ad	180 mL

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 180 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 citrat*

Ammonium dihydrogen phosphate	1,0 gram
Di-potasium hydrogen phosphate	1,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram

Sodium citrate	2,0 gram
Magnesium sulfate	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.