

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG
BATUBARA LOA TEBU TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR
SEBAGAI PENGHASIL ENZIM AMILASE**



Oleh :

**Dinny Fitriani
20144076A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG
BATUBARA LOA TEBU TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR
SEBAGAI PENGHASIL ENZIM AMILASE**

SKRIPSI



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

Oleh :

**Dinny Fitriani
20144076A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG
BATUBARA LOA TEBU TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR
SEBAGAI PENGHASIL ENZIM AMILASE**

Oleh :

Dinny Fitriani

20144076A

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



Dekan,

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., MSc., Apt.

Pembimbing Utama

Dr. Ana Indrayati, M.Si

Pembimbing Pendamping

D. Andang Arif Wibawa, S.P., M.Si

Penguji:

1. Nony Puspawati, Dra., M.Si

2. Supriyadi, Dr., M.Si

3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si

4. Ana Indrayati, Dr., M.Si

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya hingga terselesaikan skripsi ini, kupersembahkan untuk :

- ❖ Allah SWT yang telah memberi anugrah di hidupku dan senantiasa mencurahkan nikmat serta hidayah-Nya.
- ❖ Rasulullah SAW semoga shalawat dan salam selalu tercurah kepada Beliau Nabi Muhammad SAW, keluarga serta sahabat.
- ❖ Papah dan Mamah tercinta yang telah memberikan semuanya baik materil maupun immateril, doa, kasih sayang, cinta, pengorbanan, dukungan, serta kebahagiaan. Semoga Allah selalu melimpahkan berjuta kenikmatan yang tiada henti kepada Papah dan Mamah.
- ❖ Kakak dan adik-adikku tercinta yang sudah menjadi pendukungku selama ini.
- ❖ Dosen-dosen Universitas Setia Budi yang selalu memberi ilmu yang diajarkan kepada saya dengan ikhlas.
- ❖ Untuk Aldy yang selalu ada untuk mencurahkan isi hati dan kekesalan, menemani saat senang atau susah serta selalu mendukungku untuk menyelesaikan skripsi ini dengan tepat waktu.
- ❖ Teman-teman seperjuanganku Dewanty, Isti, Sintya, yang sudah sangat banyak membantu, serta semua teman dekat yang selalu memberikan dukungan setiap saat yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu.
- ❖ Seluruh teman-teman FKK yang tidak dapat saya sebutkan, terima kasih atas kebersamaan dan solidaritasnya selama masa perkuliahan ini.
- ❖ Teman-teman saya sejak sekolah hingga saat ini. Ferrynda, Juju, Mita, Nuri, Nopenda, Widya, dan semuanya yang selalu mendukung dan memberikan motivasi serta membuat saya terhibur dengan kerecehan mereka dan membuat melupakan beban ini sejenak, kalian luar biasa.
- ❖ Teman-teman alumni SMK F Tenggarong Angkatan 5 yang selalu setia menjadi wadah berbagi dan tukar pikiran .
- ❖ Almamater Universitas Setia Budi tercinta.

MOTTO

“Tidak ada yang dapat membantumu mencapai kemenangan yang indah dan tak terlupakan kecuali kemauan serta usaha dan tekad dari dirimu sendiri”

“Saya penelitian, saya bimbingan, saya ujian, saya revisi, dan saya menang ! ”

*“Pendidikan merupakan perlengkapan paling baik untuk hari tua - **Aristoteles**”*

*“Man Jadda Wa Jadda, Barang siapa yang bersungguh-sungguh akan mendapatkannya – **Pepatah Arab**”*

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 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 Mei 2018



Dinny Fitriani

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, karena atas segala rahmat dan berkatNya, Penulis dapat menyelesaikan Skripsi guna memenuhi persyaratan untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm) di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Syukur kepada Tuhan, akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG BATUBARA LOA TEBU TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR SEBAGAI PENGHASIL ENZIM AMILASE”** diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan dalam bidang mikrobiologi.

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, S.P., M.Si selaku Dosen Pembimbing yang telah banyak memberikan ilmu, masukan, pengarahan dan bimbingan selama penyusunan Skripsi ini.
6. Dosen 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, adekku, semua saudara, keluarga dan teman yang telah membantu, mendukung, dan memberi semangat serta doa.

Tak ada gading yang tak retak, begitu pula dengan penyusunan Skripsi ini. Penulis menyadari ada kekurangan, 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.

Surakarta, 28 Mei 2018



Dinny Fitriani

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERSEMBAHAN	iii
MOTTO... ..	iv
PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian.....	2
D. Kegunaan Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
A. Pertambangan Batu Bara	3
B. Air Limbah Batubara	3
C. Enzim.....	4
D. Enzim Amilase	5
1. α -amilase (1,4- α -D-glukan-glukanohidrolase)	5
2. β -amilase (1,4- α -D-glukan maltohidrolase)	5
3. γ -amilase (Glukoamilase).....	5
E. Amilum.....	6
F. Bakteri Amilolitik.....	7
G. Metode Isolasi dan Identifikasi Bakteri.....	7
1. Isolasi Bakteri.....	7
2. Identifikasi Bakteri	7

H.	Media.....	7
4.1	Media umum	8
4.3	Media pengaya	8
4.3	Media diferensial.....	8
1.	Media penguji.....	9
2.	Media selektif	9
3.	Media perhitungan.....	9
4.	Media minimal	9
I.	Landasan Teori	9
J.	Hipotesis	11
BAB III	METODE PENELITIAN	12
A.	Populasi dan Sampel.....	12
B.	Variabel Penelitian	12
1.	Identifikasi Variabel Utama	12
2.	Klasifikasi Variabel Utama	12
3.	Definisi Operasional Variabel Utama	13
C.	Bahan dan Alat	13
1.	Bahan.....	13
1.1.	Bahan Utama.....	13
1.3.	Media.....	13
2.	Alat	14
D.	Jalannya Penelitian	14
1.	Sterilisasi	14
2.	Teknik sampling air limbah tambang batubara	14
3.	Pembuatan Media Amilum Agar.....	14
4.	Isolasi Bakteri pada Air Limbah Tambang Batubara.....	14
5.	Identifikasi 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.	Pembuatan Media Amilum Agar.....	17
8.	Uji Aktivitas Enzim Amilase dari Bakteri Asal Limbah Air Tambang Batubara	17
E.	Analisis Hasil.....	18
F.	Skema Penelitian	18
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	20
1.	Pengambilan Sampling Air Limbah Tambang Batubara	20
2.	Isolasi dan Identifikasi Bakteri Air Limbah Tambang Batubara.....	20
2.1	Hasil Identifikasi Bakteri secara Makroskopis	20
2.2	Hasil Identifikasi Bakteri secara Mikroskopis	20
2.3	Hasil Identifikasi Fisiologi dengan Uji Biokimia	21

Uji Aktivitas Bakteri Air Limbah Tambang Batubara terhadap Enzim Amilase	23
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	26
A. Kesimpulan.....	26
B. Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN.....	31

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema isolasi bakteri pada air limbah tambang batubara	18
Gambar 2. Skema identifikasi bakteri pada air limbah tambang batubara	19
Gambar 3. Skema uji aktivitas enzim amilase dari bakteri asal limbah air tambang batubara	19

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil Identifikasi Bakteri Penghasil Amilase secara Makroskopis dari Bakteri Air Limbah Tambang Batubara.....	20
Tabel 2. Hasil Identifikasi Bakteri Penghasil Amilase secara Mikroskopis (Pewarnaan Gram, Pewarnaan Kapsul,Pewarnaan Spora) dari Bakteri Air Limbah Tambang Batubara	21
Tabel 3. Hasil Uji Biokimia.....	21
Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Bakteri Air Limbah Tambang Batubara terhadap Enzim Amilase.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Foto Oven, Inkubator, Autoklaf, Vortex	32
Lampiran 2. Foto Hasil Identifikasi Pewarnaan Kapsul	33
Lampiran 3. Foto Hasil Identifikasi Pewarnaan Gram	34
Lampiran 4. Foto hasil pewarnaan spora	35
Lampiran 5. Foto Hasil Identifikasi Bakteri	36
Lampiran 6. Media Amilum Agar Sebelum Diberi Suspensi Bakteri	39
Lampiran 7. Hasil Uji Aktivitas Bakteri Air Limbah Batubara	40
Lampiran 8. Foto Hasil Uji Bakteri Air Limbah Batubara setelah Ditetesi Iodin.....	41
Lampiran 9. Foto Suspensi Bakteri dengan Standart Mc Farland 0,5	42
Lampiran 10. Hasil Analisis Statistik Zona Bening dari Isolat Bakteri Air Tambang Batubara Terhadap Enzim Amilase.....	43
Lampiran 11. Komposisi dan pembuatan Media	46
Lampiran 12. Standart kekeruhan <i>Mc. Farland</i>	49

INTISARI

FITRIANI, D., 2018 ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAL AIR LIMBAH TAMBANG BATUBARA LOA TEBU TENGGARONG KALIMANTAN SEBAGAI PENGHASIL ENZIM AMILASE, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI

Enzim amilase merupakan golongan enzim hidrolase, yaitu enzim yang mampu mempercepat proses hidrolisis pati untuk menghasilkan molekul yang lebih sederhana menjadi disakarida dan monosakarida. Organisme penghasil enzim amilase mulai dari tanaman, hewan, hingga mikroorganisme. Mikroorganisme paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan sebagai sumber enzim. Enzim amilase digunakan antara lain pada industri pangan seperti industri pemanis, roti, jus buah, bir, dan lain-lain serta dalam industri non pangan seperti produksi etanol, tekstil, serta detergen. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri limbah air tambang batubara sebagai penghasil enzim amilase.

Isolasi isolat bakteri air tambang dilakukan dengan metode cawan gores menggunakan media *Nutrien Agar* (NA), dari hasil yang didapat dipilih 5 koloni tunggal lalu dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan Pewarnaan Gram, Pewarnaan Kapsul, Pewarnaan Spora, dan Uji Biokimia. Setelah dilakukan identifikasi dilanjutkan dengan uji aktivitas bakteri limbah air tambang batubara dalam menghasilkan enzim amilase menggunakan metode difusi sumuran yang kemudian dilanjutkan dengan tes iodin .

Hasil penelitian ini menunjukkan kelima isolat bakteri merupakan bakteri Gram positif, yang memiliki kapsul, serta spora. Isolat bakteri LTB2 memiliki diameter zona hambat terbesar yaitu sebesar 15,5 mm, isolat LTB1 sebesar 15,0 mm, isolat LTB4 sebesar 14,7 mm, isolat LTB3 sebesar 14,3 dan isolat LTB5 memiliki diameter zona hambat terkecil yaitu sebesar 13,1 mm. Dimana semakin besar diameter zona hambat maka semakin banyak pula enzim amilase yang dihasilkan.

Kata kunci: bakteri amilolitik, limbah cair batubara.

ABSTRACT

FITRIANI, D., 2018 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA PRODUCED BY COAL MINING WASTEWATER LOA TEBU TENGGARONG EAST KALIMANTAN AS A SOURCE ENZYME AMYLASE, SKRIPSI, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA

Amylase enzyme is a class of hydrolase enzyme, an enzyme capable of accelerating the process of starch hydrolysis to produce simpler molecules into disaccharides and monosaccharides. Amylase enzyme-producing organisms ranging from plants, animals, to microorganisms. Microorganisms are most widely used compared to plants and animals as a source of enzymes. Amylase enzymes are used, among others, in the food industry such as sweetener, bread, fruit juice, beer, etc. and in non-food industries such as ethanol production, textiles and detergents. The purpose of this study was to isolate and characterize the coal mine waste water bacteria as the amylase enzyme producer.

Isolation of mine water bacteria isolate was done by scratch grate method using Nutrient Agar (NA) medium, obtained from 5 single colony then continued with identification using Gram stain, Capsic Dye, Spore Dye, and Biochemical Test. After identification followed by activity test of bacterial waste water of coal mine in yielding enzyme amylase using diffusion method of wells which then continued with iodine test.

The results of this study indicate the five bacterial isolates are Gram positive bacteria, which have a capsule, and spores. Bacterial isolates LTB2 had the largest inhibitory zone diameter of 15.5 mm, isolate LTB1 of 15.0 mm, isolates LTB4 of 14.7 mm, isolates LTB3 of 14.3 and isolates LTB5 had the smallest inhibitory zone diameter of 13.1 mm. Where the greater the diameter of the inhibitory zone the more enzyme amylase produced.

Keywords: Amylolytic bacteria, liquid-waste of coal

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Masyarakat Indonesia sudah sejak lama memanfaatkan mikroorganisme untuk menghasilkan barang yang bernilai ekonomi, misalnya fermentasi tempe, tape, dan ragi untuk minuman beralkohol. Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan (Sarah *et.al* 2009)

Enzim banyak digunakan di berbagai bidang kegiatan industri pangan maupun non pangan, sehingga enzim memiliki posisi penting dalam bidang industri pangan maupun non pangan. Penggunaan enzim saat ini dalam industri makanan, minuman, industri tekstil, industri kulit dan kertas di Indonesia semakin meningkat (Sarah *et.al* 2009).

Amilase merupakan enzim yang paling penting dan keberadaanya paling besar, pada bidang bioteknologi, enzim ini diperjual belikan sebanyak 25% dari total enzim yang lainnya. Amilase didapatkan dari berbagai macam sumber, seperti tanaman, hewan dan mikroorganisme. Amilase yang berasal dari mikroorganisme banyak digunakan dalam industri, hal ini dikarenakan mikroorganisme periode pertumbuhanya pendek. Penggunaan enzim dalam industri memberi banyak keuntungan sebagai bahan tambahan yang alami (Nadeem *et.al* 2009).

Amilase yang dihasilkan mikroorganisme mempunyai spektrum yang luas pada aplikasi industri karena lebih stabil daripada amilase yang dihasilkan oleh tumbuhan dan binatang. Keuntungan utama dalam penggunaan mikroorganisme pada produksi amilase adalah kapasitas produksi yang besar dan fakta bahwa mikroba mudah dimanipulasi untuk menghasilkan enzim dengan karakteristik yang di inginkan. Amilase diperoleh dari bermacam-macam jamur, *yeast* dan bakteri. Meskipun demikian, enzim dari sumber jamur dan bakteri mendominasi aplikasi dalam sektor industri. Amilase mempunyai kemampuan aplikasi yang luas dalam proses industri seperti makanan, fermentasi, tekstil, kertas, deterjen, dan industri farmasi. Amilase dari jamur dan bakteri dapat digunakan dalam

industri farmasi dan kimia. Meskipun demikian, dengan perkembangan bioteknologi, aplikasi amilase berkembang di banyak bidang, seperti kesehatan, obat-obatan, dan analisis kimia, seperti aplikasi dalam sakarifikasi pati pada tekstil, makanan, brewing, dan industri distilasi (Wikipedia).

Keragaman hayati yang besar di Indonesia memberikan peluang besar untuk mendapatkan mikroorganisme potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim. Salah satunya adalah bakteri asal air limbah tambang batubara.

B. Rumusan Masalah

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

Pertama, bagaimana karakteristik bakteri yang diisolasi dari air limbah tambang batubara?

Kedua, apakah bakteri yang diisolasi dari air limbah tambang batubara menghasilkan enzim amilase?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, untuk mengetahui karakteristik bakteri yang diisolasi dari air limbah tambang batubara.

Kedua, untuk mengetahui kemampuan bakteri air limbah tambang batubara dalam menghasilkan enzim amilase.

D. Kegunaan Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan memberikan manfaat bagi masyarakat luas terutama masyarakat dilingkungan tambang batubara. Menambah informasi dibidang ilmu kesehatan yang lebih rinci tentang potensi bakteri air limbah tambang batubara dalam menghasilkan enzim amilase.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Pertambangan Batu Bara

Pertambangan batubara adalah pertambangan endapan karbon yang terdapat di dalam bumi. Tujuan pengelolaan batubara adalah menjamin efektivitas pelaksanaan dan pengendalian kegiatan usaha pertambangan secara berdaya guna , menjamin manfaat pertambangan batubara secara berkelanjutan dan berwawasan lingkungan hidup serta menjamin tersedianya batubara sebagai bahan baku atau sumber energi untuk kebutuhan dalam negeri dalam rangka mendukung pembangunan nasional yang berkesinambungan (UU No.4 Tahun 2009).

Bahan galian dari penambangan berupa unsur-unsur kimia, mineral-mineral, dan segala macam batuan termasuk batu-batu mulia, yang merupakan endapan-endapan alam. Wilayah Hukum Pertambangan Indonesia mencakup seluruh kepulauan Indonesia, tanah dibawah perairan Indonesia dan paparan benua kepulauan Indonesia. Wewenang atas kuasa pertambangan diberikan kepada Badan/Perseorangan untuk melaksanakan usaha pertambangan (UU Pokok Pertambangan Tahun 1967).

B. Air Limbah Batubara

Air limbah usaha dan atau kegiatan pertambangan batubara adalah air yang berasal dari kegiatan penambangan batubara yang meliputi penggalan, pengangkutan dan penimbunan baik pada tambang terbuka maupun tambang bawah tanah. Baku mutu air limbah batubara adalah ukuran batas atau kadar unsur pencemar dan atau jumlah unsur pencemaran yang keberadaannya dalam air limbah batubara 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).

C. Enzim

Enzim merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalisis seluruh reaksi kimia dalam sistem biologis. Aktivitas katalitiknya bergantung kepada strukturnya sebagai protein. Enzim dapat mempercepat reaksi biologis, dari reaksi yang sederhana, sampai ke reaksi yang sangat rumit (Lehninger 1995).

Berdasarkan biosintesisnya, enzim dibedakan menjadi enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada dalam jumlah sel yang tidak tetap, tergantung pada adanya induser. Enzim induktif ini jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung substrat yang menginduksi terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon (Lidya dan Djenar 2000).

Berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan dalam 2 golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim disebut juga enzim intraseluler, dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya (Soedigdo 1988).

Produksi dan perdagangan enzim didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik seperti enzim amilase, protease, katalase, dan lipase. Saat ini, enzim banyak diekstraksi dari mikroorganisme karena dapat menghasilkan jenis enzim yang bervariasi dan mudah untuk dikulturkan sehingga dapat diproduksi dalam jumlah yang besar. Enzim juga memegang peranan penting dalam dunia industri seperti industri tekstil, deterjen, bahan pangan dan minuman, bahan kimia, industri kulit, serta obat-obatan (Sianturi 2008).

Mikroorganisme merupakan sumber untuk menghasilkan enzim yang potensial karena mampu berkembang dengan cepat, mempunyai berbagai jenis aktivitas enzim dan hidup pada kondisi-kondisi ekstrim seperti pada sedimen dan perairan laut (Gray dan Elliott, 2009).

D. Enzim Amilase

Enzim amilase merupakan salah satu jenis enzim yang mampu memutuskan ikatan glikosida. Molekul ini meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik, yang tanpa enzim akan berlangsung amat lambat (Lehninger 1982).

Amilase dapat dikelompokkan menjadi 3 golongan enzim (Winarno, 1986):

1. α -amilase (1,4- α -D-glukan-glukanohidrolase)

Alfa-amilase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan 1,4- α -D-glukanohidrolase. Alfa-amilase dibentuk oleh berbagai bakteri dan fungi. Aktifitas 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 pengurangan derajat pewarnaan iodium. Pati yang mengandung amilosa bereaksi dengan iodium menghasilkan warna biru, sedangkan dekstrin bila bereaksi dengan iodium berwarna coklat. Keaktifan α -amilase juga dinyatakan dengan pengukuran viskositas dan jumlah produksi yang terbentuk. Laju hidrolisis akan meningkat bila tingkat polimerisasi menurun dan laju hidrolisis akan lebih cepat pada rantai lurus (Winarno, 1986).

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

Beta-amilase merupakan exoenzim yang memotong amilum menjadi gugus-gugus maltosa. Enzim ini ditemukan pada tanaman tingkat tinggi dan mikroorganisme (Siti, 1995). Enzim 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 (Winarno, 1986).

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 enzim glukoamilase posisi glukosa α dapat diubah menjadi β , pH optimal 4-5 dan suhu optimal 50-60°C (Winarno, 1986). Bakteri penghasil enzim amilase dapat menghidrolisis pati menjadi molekul-molekul maltosa, glukosa, dan dekstrin.

E. Amilum

Pati atau amilum adalah karbohidrat kompleks yang tidak larut dalam air, berwujud bubuk putih, tawar dan tidak berbau. Barangkali tidak ada satu senyawa organik lain yang tersebar begitu luas sebagai kandungan tanaman seperti halnya amilum. Dalam jumlah besar, amilum dihasilkan dari dalam daun-daun hijau sebagai wujud penyimpanan sementara dari produk fotosintesis. Amilum juga tersimpan dalam bahan makanan cadangan permanen untuk tanaman, dalam biji, jari-jari teras, kulit batang, akar tanaman menahun dan umbi (Claus 1970)

Pati atau amilum merupakan polisakarida utama pada berbagai tanaman tingkat tinggi termasuk jagung, gandum dan kentang. Jenis gel yang terbentuk tergantung amilum yang digunakan; amilum jagung gel membentuk gel yang rigid dan *opaque*, sedangkan amilum kentang membentuk gel jernih dan non rigid (Sulaiman 2008).

Amilum adalah polisakarida yang terdapat pada sel tumbuhan dan beberapa mikroorganisme. Amilum umumnya berbentuk granula dengan diameter beberapa mikron. Granula amilum mengandung campuran dari dua polisakarida berbeda, yaitu amilum dan amilopektin. Jumlah kedua polisakarida ini tergantung dari jenis amilum. Pati yang ada dalam kentang, jagung dan tumbuhan lain mengandung amilopektin sekitar 75 – 80% dan amilum sekitar 20- 25%. Komponen amilum merupakan polisakarida rantai lurus tak bercabang (Zulfikar 2008).

Hidrolisis adalah proses dekomposisi kimia dengan menggunakan air untuk memisahkan ikatan kimia dari substansinya. Hidrolisis pati merupakan proses pemecahan molekul amilum menjadi bagian-bagian penyusunnya yang lebih sederhana seperti dekstrin, isomaltosa, maltosa dan glukosa. Proses hidrolisis dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu: Enzim, ukuran partikel, temperatur, pH, waktu hidrolisis, perbandingan cairan terhadap bahan baku (volume substrat), dan pengadukan (Rindit et al, 1998).

F. 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 alaminya. Mikroba yang diperoleh dari hasil isolasi harus memiliki kemampuan untuk melangsungkan reaksi atau menghasilkan produk yang diinginkan (Handayani *et.al* 2002).

Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang memproduksi enzim amilase dan mampu memecah pati. Genus bakteri yang termasuk kelompok bakteri amilolitik yang cukup dikenal luas ialah *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Thermus* dan *Actinomyces* (Reddy *et.al* 2003).

G. Metode Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Menurut Hadioetomo (1985), isolasi yang sering digunakan untuk memperoleh bakteri ataupun biakan murni menggunakan metode sebagai berikut:

1. Isolasi Bakteri

Metode cawan gores memiliki keuntungan menghemat bahan dan waktu tetapi untuk memperoleh hasil yang baik diperlukan ketrampilan dan pengalaman. Teknik menggores yang baik bisa dilakukan pada suatu area tertentu dalam permukaan medium yang telah digores pada media selektif, maka sel-sel bakteri akan terpisah satu dengan yang lainnya (Hadioetomo 1985).

2. Identifikasi Bakteri

Identifikasi dilakukan dengan cara pengamatan bakteri secara morfologi dan fisiologi. Identifikasi morfologi dilakukan dengan mengamati bentuk koloni, warna koloni, serta ukuran koloni. Sedangkan identifikasi fisiologi dilakukan dengan pengamatan secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram untuk mengetahui sifat bakteri dan bentuk sel (Jawetz *et.al* 2012).

H. Media

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari zat-zat kimia organik dan anorganik yang telah melalui proses pengolahan tertentu dapat digunakan untuk

menumbuhkan dan mengembangbiakkan mikroba (Suriawiria 1986). Media ada beberapa macam menurut bentuk, sifat dan susunannya yang ditentukan oleh senyawa penyusun media, presentase campuran dan tujuan penggunaan (Suriawiria 1986). Berdasarkan penambahan atau tidaknya zat pematat seperti agar-agar, gelantin dan sebagainya maka bentuk media dikenal tiga jenis yaitu, media padat, media cair, media semi padat atau semi cair (Suriawiria 1986).

Berdasarkan fungsi fisiologis dari masing-masing komponen (unsur dan hara) yang terdapat di dalam media, maka susunan media pada semua jenis mempunyai kesamaan isi yaitu kandungan air, kandungan nitrogen, baik yang berasal dari protein asam amino dan senyawa lain yang mengandung nitrogen, kandungan sumber energi atau unsur C dan faktor pertumbuhan. Berdasarkan perbedaan fungsi fisiologi tersebut, susunan media dapat berbentuk sebagai media alami, media sintetis, media semi sintesis (Suriawiria 1986).

Berdasarkan sifatnya, media dibedakan menjadi:

4.1 Media umum.

4.2 Media ini dapat dipergunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan satu atau lebih kelompok mikroba secara umum, seperti agar kaldu nutrisi untuk bakteri, agar kentang dekstroza untuk jamur (Suriawiria 1986).

4.3 Media pengaya.

4.4 Media ini dipergunakan dengan maksud untuk tumbuh dan berkembangbiak lebih cepat dari jenis atau kelompok lainnya yang sama-sama berada di dalam satu bahan, misalnya untuk memisahkan bakteri penyebab penyakit tifus (*Salmonella typhi*) dari bahan tinja dengan media selenit brain atau kaldu selenit atau kaldu tetratonat (Suriawiria 1986).

4.3 Media diferensial.

Media yang dipergunakan untuk pertumbuhan mikroba tertentu serta penentuan sifat-sifatnya, misalnya media agar darah yang dipergunakan

penumbuhan bakteri hemolitik sehingga bakteri non hemolitik tidak dapat tumbuh (Suriawiria 1986).

1. Media penguji

Media yang dipergunakan untuk pengujian senyawa atau benda tertentu dengan bantuan mikroba, misalnya media penguji vitamin, asam amino, antibiotik, residu pestisida (Suriawiria 1986).

2. Media selektif

Media yang hanya dapat ditumbuhi oleh satu atau lebih jenis mikroba tertentu akan menghambat atau mematikan untuk jenis lainnya (Suriawiria 1986).

3. Media perhitungan

Media yang dipergunakan untuk menghitung jumlah mikroba pada suatu bahan. Media ini dapat berbentuk media umum, media selektif maupun media diferensial, dan media penguji (Suriawiria 1986).

4. Media minimal

Media yang mengandung senyawa mineral tertentu dan digunakan untuk menumbuhkan golongan bakteri tertentu, biasanya bakteri tanah, contoh media M9 (Agnes 2015).

I. Landasan Teori

Enzim merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalisis seluruh reaksi kimia dalam system biologis. Aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim dapat mempercepat reaksi biologis, dari reaksi yang sederhana, sampai ke reaksi yang sangat rumit (Lehninger 1995). Produksi dan perdagangan enzim didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik seperti enzim amilase, protease, katalase, dan lipase. Saat ini, enzim banyak diekstraksi dari mikroorganisme karena dapat menghasilkan jenis enzim yang bervariasi dan mudah untuk dikulturkan sehingga dapat diproduksi dalam jumlah yang besar. Enzim juga memegang peranan penting dalam dunia industri seperti industri tekstil, deterjen, bahan pangan dan minuman, bahan kimia, industri kulit, serta obat-obatan (Sianturi 2008).

Enzim amilase merupakan salah satu jenis enzim yang mampu memutuskan ikatan glikosida. Molekul ini meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik, yang tanpa enzim akan berlangsung amat lambat (Lehninger 1982). Amilase merupakan enzim yang paling penting dan keberadaannya paling besar, pada bidang bioteknologi, enzim ini diperjual belikan sebanyak 25% dari total enzim yang lainnya. Enzim amilase memiliki kira-kira 25% dari seluruh pasar enzim, hampir menggantikan hidrolisis kimia pati pada industri pengolahan pati (Pandey *et.al* 2000). Enzim ini memiliki nilai komersial sehingga perlu dicari sumber lain sebagai penghasil enzim amilase sesuai dengan karakteristik yang dibutuhkan (Carvalho 2008). Amilase didapatkan dari berbagai macam sumber, seperti tanaman, hewan dan mikroorganismenya. Mikroorganismenya merupakan sumber untuk menghasilkan enzim yang potensial karena mampu berkembang dengan cepat, mempunyai berbagai jenis aktivitas enzim dan hidup pada kondisi-kondisi ekstrim seperti pada sedimen dan perairan laut (Gray dan Elliott, 2009).

Pati atau amilum adalah karbohidrat kompleks yang tidak larut dalam air, berwujud bubuk putih, tawar dan tidak berbau. Pati berbentuk granul atau butir-butir kecil dengan lapisan-lapisan yang karakteristik. Tanaman yang mengandung pati digunakan dalam farmasi seperti *Zea mays* (jagung), *Oryza sativa* (beras), *Solanum tuberosum* (kentang), *Manihot utilissima* (ketela pohon) (Claus *et.al* 1970).

Bakteri amilolitik merupakan mikroorganismenya yang mampu memecah pati menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan enzim amilase yang dihasilkan. Enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik mampu memecah pati menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu menjadi disakarida atau monosakarida (Lee *et.al* 1992). Kebanyakan bakteri amilolitik tumbuh subur pada bahan pangan yang banyak mengandung pati atau karbohidrat, seperti pada berbagai jenis tepung. Kebanyakan jenis bakteri amilolitik adalah kapang, tetapi beberapa jenis bakteri juga ada, jenis yang mempunyai spesies bersifat amilolitik misalnya *Clostridium butyricum* dan *Bacillus subtilis* (Fardiaz 1992).

Hasil penelitian Hartuti (2006) berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofil penghasil amilase yang bersumber dari pemandian Air panas Pawan, Riau. Didapatkan 24 isolat yang bersifat amilolitik. Diantara isolat tersebut 15 isolat berbentuk basil Gram negatif, 8 isolat berbentuk basil Gram positif sedangkan satu berbentuk kokus Gram negatif, yang seluruhnya memiliki suhu inkubasi optimum 50°C.

Hasil penelitian Anna R dan Evy Y (2013) berhasil mengisolasi bakteri termofilik pasca erupsi Merapi. Bakteri termofilik yang diseleksi sebanyak 348 isolat yang telah diisolasi dari Kali Gendol Atas pasca erupsi Merapi. Didapatkan 15 isolat yang bersifat amilolitik, yang memiliki suhu inkubasi optimum 55°C. Isolat D79 mempunyai indeks amilolitik tertinggi yaitu 5,00.

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofilik yang bersifat amilolitik yang berpotensi sebagai penghasil enzim amilase yang berasal dari air limbah tambang batubara. Penelitian ini menggunakan 5 isolat bakteri terpilih dari hasil isolasi bakteri. Suhu inkubasi optimum pada seluruh isolat adalah 37°C.

J. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada dapat disusun hipotesis sebagai berikut:

Pertama, bakteri yang diisolasi dari air limbah tambang batubara Loa Tebu Tenggara Kalimantan Timur memiliki karakteristik.

Kedua, bakteri yang berasal dari air limbah tambang batubara Loa Tebu Tenggara, Kalimantan Timur berpotensi menghasilkan enzim amilase.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah air limbah tambang batubara di Tenggarong, Kalimantan Timur.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri yang berasal dari air limbah batubara yang diambil dari saluran pipa, berwarna keruh. Sampel diambil sebanyak 100 mL, pengambilan pada bulan Desember 2017.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah bakteri yang didapat dari air limbah tambang batubara

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

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah pH dan suhu optimum.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah air limbah, laboratorium, peneliti, sterilitas, media, peralatan, bakteri, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminasi pada saat penelitian.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah adanya enzim amilase yang dihasilkan oleh isolat dari bakteri asal air limbah tambang batubara.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, air limbah adalah air yang berasal dari kegiatan penambangan batubara yang meliputi penggalian, pengangkutan dan penimbunan baik pada tambang terbuka maupun tambang bawah tanah yang diperoleh dari Tenggarong, Kalimantan Timur pada Desember 2017.

Kedua, isolat bakteri adalah bakteri yang diperoleh dari air limbah tambang batubara dari Tenggarong, Kalimantan Timur

Ketiga, uji bakteri penghasil enzim amilase adalah uji menggunakan difusi sumuran dengan melihat zona hambat pertumbuhan bakteri dalam media uji

Keempat, diameter zona hambat adalah garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi sumuran yang berisi sampel uji dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri penghasil enzim.

Kelima, isolasi bakteri adalah bakteri yang tumbuh dan diperoleh dari media uji.

Keenam, identifikasi bakteri adalah pengamatan secara makroskopis maupun mikroskopis terhadap isolat bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi pada media uji.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan Utama. Bahan utama yang digunakan adalah air limbah tambang batubara dari Tenggarong, Kalimantan Timur

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah Pewarnaan Gram A (kristal violet), Gram B (lugol iodine), Gram C (alkohol), Gram D (safranin), Malasit Hijau.

1.3. Media. Media yang digunakan adalah *Nutrient agar* (Na), *Brain Heart infusion* (BHI), Amilum (pati), Agar-agar.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan Petri steril, Ose platina, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkas, lampu spiritus, kapas lidi steril, botol penampung steril, objek glass, mikroskop binokuler, pipet volume, penggaris, spidol, mikropipet, gelas ukur, beker glass, kertas perkamen, inkubator, *autoclave*, pH meter, batang pengaduk.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi

Alat dan bahan yang digunakan harus dalam keadaan steril, untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Alat-alat kaca seperti cawan petri, pipet tetes, tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur disterilkan menggunakan oven pada suhu 150-170°C selama 60-120 menit. Ose platina disterilkan dengan cara pembakaran diatas lampu spiritus. Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 60-120 menit.

2. Teknik sampling air limbah tambang batubara

Air limbah tambang batubara yang diambil dari kolam yang berada dilingkungan perusahaan tambang batubara dimasukkan kedalam botol. Air limbah tambang batubara kemudian dibawa menggunakan transportasi udara.

3. Pembuatan Media Amilum Agar

Komposisi media padat adalah 2:1 agar dan amilum, 2 Gram agar-agar Satelit dan 1 gram amilum yang dilarutkan dalam 100 mL akua destilata, kemudian dipanaskan sampai semua bahan larut lalu disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri berukuran besar steril kurang lebih 50 mL, diamkan hingga mengeras.

4. Isolasi Bakteri pada Air Limbah Tambang Batubara

Sampel air limbah tambang batubara diinokulasikan pada media BHI sebanyak 2-3 Ose, diinkubasi selama 18-24 jam hari pada suhu 37°C. Sampel yang telah diinkubasi selama 18-24 jam hari diinokulasikan pada media NA dengan metode cawan gores yang dibagi sebanyak 4 kuadran menggunakan jarum

Ose, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang tumbuh secara tunggal diambil sebanyak 5 isolat. Masing-masing 5 isolat bakteri diperbanyak kedalam media NA dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

5. Identifikasi Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

5.1 Identifikasi secara Makroskopis. Identifikasi dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi meliputi bentuk koloni, susunan, tepi, elevasi koloni, dan warna koloni.

5.2 Identifikasi secara Mikroskopis. Identifikasi dilakukan pada 5 isolat bakteri terpilih, dilakukan dengan Pewarnaan Gram, Pewarnaan Kapsul, Pewarnaan Spora, dan Uji Biokimia.

5.2.1 Pewarnaan Gram. Tujuan dilakukan pewarnaan Gram untuk memastikan dan mengetahui bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas (smear). Pewarnaan gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulas yang difiksasi lalu tetes Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan aquadest mengalir kemudian tetesi mordant (lugol iodine / Gram B) sebagai penguat warna dan diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, setelah itu preparat dilunturkan dengan alkohol (Gram C) dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian dikeringkan. Larutan safranin (Gram D) diberikan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan keringkan. Minyak imersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop perbesaran 10x/100x. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bakteri merupakan Gram positif apabila berwarna ungu, dan Gram negatif bila berwarna merah.

5.2.2 Pewarnaan Kapsul. Tujuan pewarnaan kapsul untuk mengamati letak kapsul pada bakteri. Pewarnaan dilakukan dengan diambil 1 Ose isolat bakteri, diletakkan dikaca objek lalu ditambahkan 1 tetes cat nigrosin dibuat ulas smear lalu keringkan. Setelah kering, ditetesi dengan safranin dan diamkan selama

± 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir, keringkan lalu tetesi minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop. Hasil pewarnaan kapsul bakteri berwarna merah dan kapsul berwarna transparan.

5.2.3 Pewarnaan Spora. Tujuan pewarnaan spora untuk mengamati letak spora bakteri. Dilakukan dengan cara akua destillata diteteskan diatas kaca objek kemudian ditambahkan 1 Ose isolat bakteri, kemudian difiksasi diatas nyala api. Ditetesi *Malachite Green* 2-3 tetes, kemudian dipanas uapkan lalu dibilas dengan air mengalir, keringkan kemudian ditetesi safranin diamkan ±1 menit lalu cuci dengan air mengalir, keringkan preparat lalu ditetesi minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop. Hasil pewarnaan spora adalah bakteri bewarna hijau dan spora berwarna merah.

5.3 Identifikasi Bakteri dengan Uji Biokimia. Identifikasi bakteri. media yang digunakan yaitu SIM, KIA, LIA, SITRAT

5.3.1 Uji *Sulfide Indol Motility* (SIM). Biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich A dan B. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

5.3.2 Uji *Kliger Iron Agar* (KIA). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, adanya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila lereng berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya media (ditulis G), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

5.3.3 Uji *Lysine Iron Agar* (LIA). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya lisin deaminasi dan dekarboksilase. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta

terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna merah (ditulis R). Berwarna kuning berarti suasananya asam (ditulis A), bila berwarna ungu berarti tetap karena bakteri tidak dapat memecah lisin (ditulis K). Terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+).

5.3.4 Uji *Simmon Citrate Agar* (SCA). Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji ini positif bila media yang awalnya berwarna hijau berubah menjadi berwarna biru.

6. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil isolat kurang lebih 2-3 Ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 10 ml media BHI, kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standard Mc Farland 0,5 serta dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Tujuan disesuaikan suspensi bakteri dengan standard Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

7. Pembuatan Media Amilum Agar

Ditimbang agar-agar sebanyak 2 gram, ditambahkan amilum 1 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL akua destillata, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tuangkan ke dalam cawan petri.

8. Uji Aktivitas Enzim Amilase dari Bakteri Asal Limbah Air Tambang Batubara

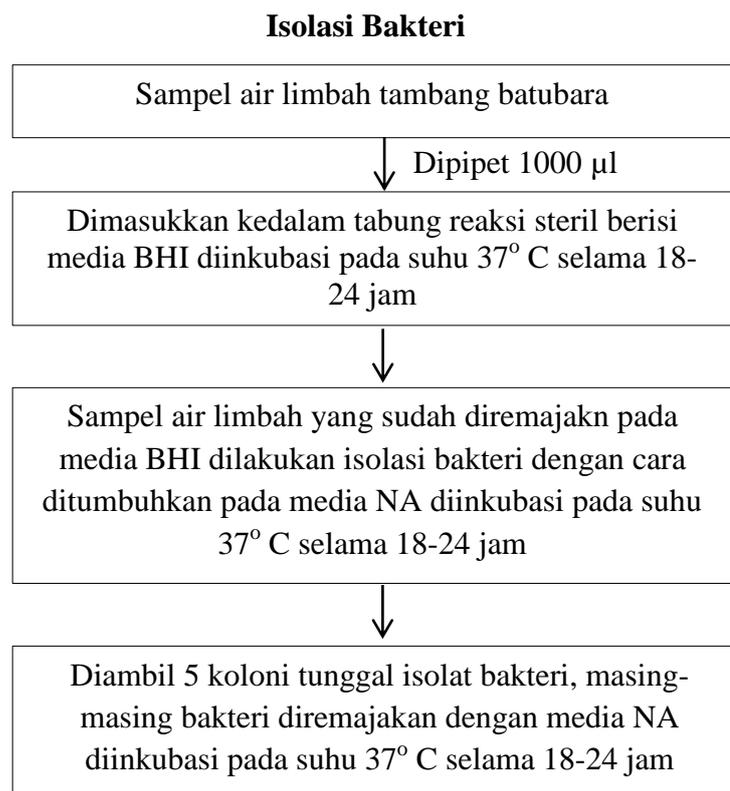
Cawan petri diisi media amilum agar, didiamkan hingga mengeras, setelah mengeras dibuat sumuran menggunakan *boor prop*. Diambil masing-masing 50 µL suspensi bakteri penghasil enzim amilase dimasukkan kedalam sumuran, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Keesokan harinya tetesi iodine secara merata, kemudian amati zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran lalu diukur diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian diperoleh dengan mengukur daerah hambatan pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar sumuran, kemudian diukur diameter hambatan dari masing-masing lingkaran.

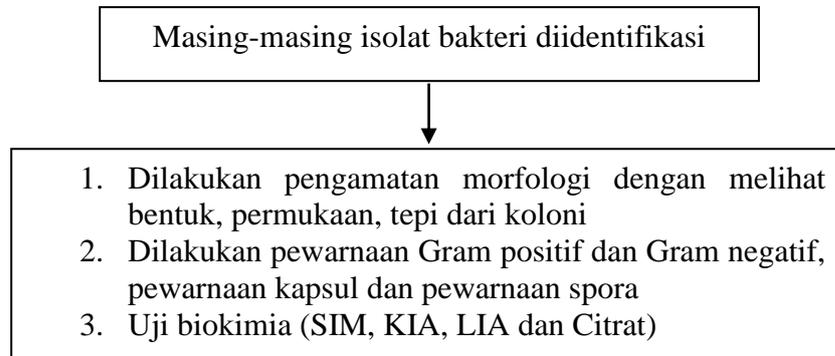
Dari data yang diperoleh dilakukan analisa dengan menggunakan *Kolmogrof-Sminov*, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan *Analysis Of Varian* (ANOVA) untuk melihat perbedaan secara keseluruhan kemudian dilanjutkan dengan LSD (*Least Significant Difference*) untuk melihat adanya zona hambat.

F. Skema Penelitian



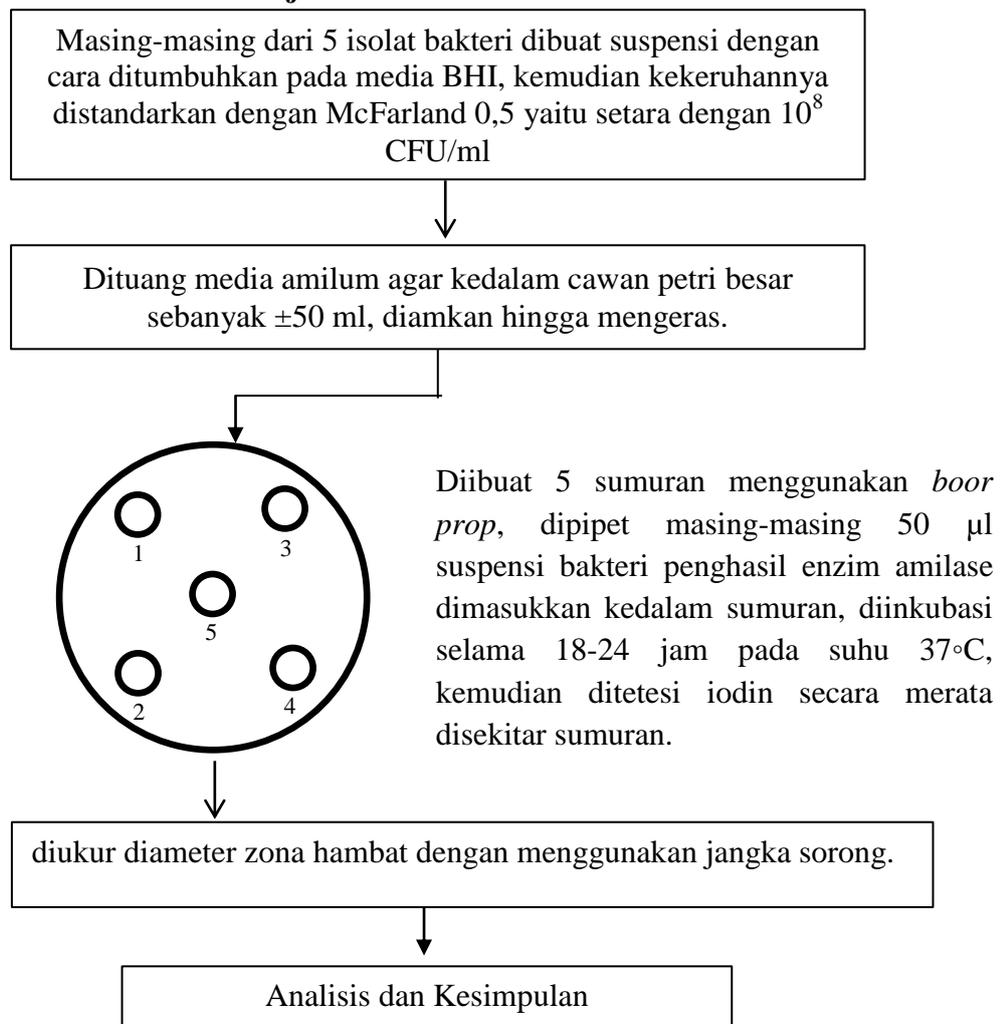
Gambar 1. Skema isolasi bakteri pada air limbah tambang batubara

Identifikasi Bakteri



Gambar 2. Skema identifikasi bakteri pada air limbah tambang batubara

Uji Aktivitas Enzim Amilase



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

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengambilan Sampling Air Limbah Tambang Batubara

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, sampel air limbah tambang batubara mempunyai isolat bakteri yang memiliki aktivitas amilolitik.

2. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

Dari hasil isolasi bakteri pada media BHI, kemudian dilanjutkan dengan ditanamkan pada media NA dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, setelah didapatkan hasil beberapa koloni, dipilih 5 koloni tunggal kemudian tiap koloni tunggal diisolasi menggunakan media NA, dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Lima koloni tunggal yang sudah diisolasi dilakukan identifikasi bakteri sehingga didapatkan hasil bakteri memiliki warna putih susu dengan bentuk tidak beraturan (ireguler), elevasi timbul, dan tepi bergerigi.

2.1 Hasil Identifikasi Bakteri secara Makroskopis. Berdasarkan hasil 5 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada media NA dengan karakter morfologi seperti yang ditunjukkan pada tabel 3.1. Hasil isolat yang dihasilkan dilakukan pengamatan terhadap morfologi koloni yang meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni, serta warna koloni bakteri

Tabel 1. Hasil Identifikasi Bakteri Penghasil Amilase secara Makroskopis dari Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

Isolat	Bentuk	Elevasi	Warna	Tepi
LTB1	Kokus	Timbul	Putih susu	Bergerigi
LTB2	Kokus	Timbul	Putih susu	Bergerigi
LTB3	Kokus	Timbul	Putih susu	Bergerigi
LTB4	Kokus	Timbul	Putih susu	Bergerigi
LTB5	Kokus	Timbul	Putih susu	Bergerigi

Keterangan:

LTB : Loa Tebu

2.2 Hasil Identifikasi Bakteri secara Mikroskopis.

2.2.1 Pewarnaan Gram. Tujuan dilakukan identifikasi dengan pewarnaan Gram untuk menentukan isolat bakteri merupakan Gram positif atau Gram negatif.

Hasil identifikasi pewarnaan Gram menunjukkan hasil Gram positif pada semua isolat bakteri. Prinsip dari pewarnaan Gram khususnya pada bakteri Gram positif adalah bakteri tersebut akan berikatan dengan pewarna utama yaitu kristal violet yang diberikan pada pengujian

2.2.2 Pewarnaan Kapsul. Tujuan dilakukan pewarnaan kapsul untuk mengetahui dan menentukan kapsul dari sel bakteri.

Hasil identifikasi dengan pewarnaan kapsul menunjukkan hasil 5 isolat bakteri memiliki kapsul yang transparan menyelubungi sel bakteri yang berwarna merah.

2.2.3 Pewarnaan Endospora. Tujuan dilakukan pewarnaan spora untuk mengetahui letak spora pada sel bakteri. Hasil identifikasi pewarnaan endospora pada 5 isolat bakteri adalah positif memiliki spora, yaitu adanya warna merah pada sel vegetatif dan warna hijau pada sel spora.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Bakteri Penghasil Amilase secara Mikroskopis (Pewarnaan Gram, Pewarnaan Kapsul, Pewarnaan Spora) dari Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

Isolat	Bentuk	Susunan	Warna	Gram	Kapsul	Spora
LTB1	Basil	Berantai	Ungu	Positif	Transparan	Membentuk spora
LTB2	Basil	Berantai	Ungu	Positif	Transparan	Membentuk spora
LTB3	Basil	Berantai	Ungu	Positif	Transparan	Membentuk spora
LTB4	Basil	Berantai	Ungu	Positif	Transparan	Membentuk spora
LTB5	Basil	Berantai	Ungu	Positif	Transparan	Membentuk spora

Keterangan:

LTB : Loa Tebu

2.3 Hasil Identifikasi Fisiologi dengan Uji Biokimia. Bakteri ditanam dalam media *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), Simmon Sitrat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Tabel 3. Hasil Uji Biokimia

Isolat	SIM	KIA	LIA	SITRAT
LTB1	++	A/KS (-)	A/KS (-)	+
LTB2	++	A/KS (-)	A/KS (-)	+
LTB3	++	A/KS (-)	A/KS (-)	+
LTB4	++	A/KS (-)	A/KS (-)	+
LTB5	++	A/KS (-)	A/KS (-)	+

SIM : *Sulfide Indol Motility*

KIA : *Kliger Iron Agar*

LIA : *Lysine Iron Agar*

(+) : Reaksi positif

(-) : Reaksi negatif

A : Acid (kuning)

K : Alkali (merah atau ungu)

S : Sulfida (hitam)

G : Gas

Identifikasi pada media SIM (*Sulfide Indol Motility*) pada 5 isolat bakteri dilakukan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian bakteri pada media SIM menunjukkan hasil (-+-) pada seluruh isolat bakteri. Sulfida negatif artinya bakteri tersebut tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga menghasilkan hidrogen sulfida yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media. Indol positif, setelah dilakukan penambahan reagen Erlich A dan B terbentuknya cincin merah pada permukaan yang artinya bakteri membentuk indol dari tryptophan sebagai sumber karbon. Tryptophan merupakan suatu asam amino esensial yang dapat mengalami reaksi oksidasi dalam kegiatan enzimatik bakteri. Uji motilitas negatif menunjukkan tidak ada pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, artinya bakteri tersebut tidak memiliki flagel yang ditunjukkan dengan tidak adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi pada media SIM.

Identifikasi pada medium KIA (*Kliger Iron Agar*) dilakukan untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Medium KIA mengandung laktosa 1% dan glukosa 1% dan fenol merah sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Medium KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu substrat untuk menghasilkan H₂S. Pengujian bakteri pada media KIA menunjukkan hasil K/AS (-) pada seluruh isolat. A/K pada lereng berwarna kuning dan dasar berwarna merah artinya bakteri tersebut memfermentasi glukosa dan laktosa karena asam yang cukup diproduksi dikemiringan untuk mempertahankan pH pada kondisi aerobik. Sulfida negatif artinya bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media (Volk dan Wheeler 1988).

Identifikasi pada media LIA (*Lysine Iron Agar*) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian bakteri pada media LIA menunjukkan hasil A/KS (-), artinya pada lereng berwarna kuning dan dasar media berwarna ungu yang menunjukkan bahwa pada lereng yang berwarna kuning mengindikasikan dekstrosa dan dasar berwarna ungu mengindikasikan bakteri tidak mendeamilasi lisin tetapi mendeakarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu).

S negatif artinya uji H₂S negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media (Volk dan Wheeler 1988).

Identifikasi pada medium *Simmons Citrate* untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian bakteri pada media Simmons Sitrat menunjukkan hasil positif. Warna media berubah menjadi warna biru, menunjukkan bahwa bakteri tersebut menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Medium Simmons Citrate terdapat indikator BTB (*bromo thymol blue*) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan sitrat menyebabkan suasana basa dan asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. (Volk dan Wheeler 1988).

Berdasarkan dari hasil identifikasi biokimia yang dilakukan, bakteri yang diduga terkandung dalam air limbah tambang batubara adalah *Bacillus sp.* Hasil seluruh identifikasi dengan uji biokimia KIA, LIA, Sitrat, mengacu pada *Bacillus sp.*

Uji Aktivitas Bakteri Air Limbah Tambang Batubara terhadap Enzim Amilase. Uji aktivitas bakteri yang dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui kemampuan 5 isolat bakteri dalam menghasilkan enzim amilase. Uji aktivitas dilakukan dengan iodine, dengan cara menambahkan iodine pada seluruh permukaan media amilum yang sebelumnya sudah diinkubasi selama 18-24 jam. Isolat bakteri yang menghasilkan enzim amilase akan membentuk zona hambat disekitar koloni yang ditandai dengan zona bening. Zona bening terbentuk disebabkan oleh enzim amilase memecah amilum menjadi lebih sederhana yaitu menjadi monosakarida atau disakarida.

Hasil pengujian aktivitas pada 5 isolat bakteri yang memiliki aktivitas amilolitik yaitu terdapat bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase. Aktivitas amilolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Aktivitas amilolitik terjadi karena kemampuan isolat bakteri dalam menghidrolisis amilum dengan cara menghasilkan enzim amilase.

Zona bening tertinggi terdapat pada isolat 2 dan zona bening terkecil terdapat pada isolat 5.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Bakteri Air Limbah Tambang Batubara terhadap Enzim Amilase

Isolat	Replikasi 1 (mm)	Replikasi 2 (mm)	Replikasi 3 (mm)	Rata-Rata (mm)
LTB1	13,1	15,9	16,0	15,0
LTB2	15,5	16,0	15,0	15,5
LTB3	15,2	15,8	11,9	14,3
LTB4	14,1	13,8	16,2	14,7
LTB5	12,1	13,4	14,0	13,1

Keterangan:

LTB : Loa Tebu

Igarashi *et.al* (1998) berhasil mengisolasi bakteri termofilik penghasil enzim amilase dengan aktifitas hidrolitik yang termasuk kriteria memiliki potensi tinggi adalah yang zona beningnya >26 mm, potensi sedang bila diameter zona beningnya berkisar 14–26 mm dan potensi rendah bila diameter zona beningnya <14 mm. Zona bening yang terbentuk di sekeliling isolat setelah ditetesi larutan iodine menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut telah menghidrolisis pati dibagian media pati tersebut (Cappuccino 1983). Dengan demikian berdasarkan kriteria potensi yang dibuat oleh Igarashi *et.al* (1998) dari 5 isolat bakteri tersebut 1 isolat berpotensi rendah, yaitu LTB 5. Potensi sedang dimiliki oleh 4 isolat, yaitu LTB 1, LTB2, LTB3, LTB4. Berdasarkan hasil penelitian Sianturi (2008) dimana didapatkan hasil 16 isolat bakteri termofil amilolitik Penen tersebut 6 isolat berpotensi rendah yaitu PN10, PN13, PN16, PN8, PN5 dan PN7. Potensi sedang dimiliki oleh 7 isolat yaitu PN2, PN12, PN11, PN6, PN14, PN15, PN3 sedangkan yang berpotensi tinggi ada 3 isolat yaitu PN4, PN1 dan PN9. Potensi aktivitas amilolitik ditunjukkan pada suhu inkubasi optimum sekitar 50-70°C, sehingga bila hasil penelitian ini dibandingkan dengan hasil penelitian Sianturi (2008) potensi amilolitik penelitian ini masih dibawah dari potensi penelitian sebelumnya, hal ini dapat disebabkan karena perbedaan jenis bakteri yang terkandung dalam sampel penelitian ini dengan sampel penelitian sebelumnya, sehingga terdapat perbedaan aktivitas amilolitik, namun hasil yang didapat dari

penelitian masih mumpuni karena rata-ratanya memiliki aktivitas amilolitik sedang.

Peran enzim amilase sendiri dalam dunia farmasi dan ilmu kesehatan cukup penting, enzim amilase digunakan sebagai suplemen makanan yang digunakan untuk pasien dengan keluhan gangguan pencernaan. Enzim amilase juga digunakan dalam bahan tambahan pembuatan tablet, karena mampu mengubah karbohidrat menjadi molekul gula yang lebih sederhana sehingga obat mudah diserap oleh tubuh, sehingga memberikan efek yang lebih cepat. Peran enzim amilase dalam ilmu kesehatan, profesional medis dan laboratorium dapat menggunakan amilase sebagai alat untuk mendeteksi gangguan pankreas melalui tes darah dan urin. Berbagai tingkat enzim dalam aliran darah dapat menunjukkan apakah seseorang menderita gangguan yang terkait pankreas, seperti kanker atau serangan kandung empedu pankreas. Tingkat dalam urin juga dapat membantu mendeteksi masalah dengan fungsi ginjal.

Setelah dilakukan analisa data statistik yaitu dengan dilakukan uji Kolmogorov Smirnov dengan tujuan untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA, pada uji Kolmogorov Smirnov didapatkan hasil seluruh data terdistribusi normal. Uji Levene dilakukan setelah uji Kolmogorov Smirnov tujuan dilakukan uji ini adalah untuk mengetahui homogenitas data, dimana didapatkan hasil seluruh data homogen. Uji One Way ANOVA adalah uji yang selanjutnya dilakukan tujuannya untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari diameter zona hambat (luas) dari setiap suspensi bakteri, pada uji ANOVA didapatkan hasil tidak terdapat perbedaan berarti pada diameter zona hambat (luas) antar suspensi bakteri. Uji Post Hoc adalah uji yang terakhir dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pada suspensi bakteri mana terdapat perbedaan diameter daerah zona hambat (luas) yang bermakna, hasil yang didapatkan pada uji ini menunjukkan bahwa semua suspensi bakteri setara dengan suspensi bakteri lainnya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Air limbah tambang batubara Loa Tebu Tenggara Kalimantan Timur memiliki karakter isolat bakteri pada morfologi demikian juga biokimianya. Berdasarkan identifikasi yang dilakukan bakteri yang terkandung dalam air limbah tambang batubara berbentuk basil berantai dan merupakan Gram positif yang diduga *Bacillus sp.*
2. Aktivitas amilolitik isolat bakteri air limbah tambang batubara dalam menghidrolisis amilum pada media amilum agar terdapat sedikit perbedaan. Terdapat 4 isolat yang memiliki aktivitas amilolitik sedang, yaitu LTB2 sebesar 15,5 mm; LTB1 sebesar 15,0 mm; LTB4 sebesar 14,7 mm; LTB3 sebesar 14,3 mm. Aktivitas amilolitik rendah terdapat pada isolat bakteri LTB5 sebesar 13,1 mm.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui golongan enzim amilase yang terbentuk dengan cara pemurnian enzim amilase, serta penelitian lebih lanjut untuk mengetahui golongan dan sifat isolat bakteri secara spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anna Poedjiadi, 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Penerbit UI-Press: Jakarta.
- Anna R dan Evy Y. 2013. *Seleksi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi sebagai Penghasil Enzim Amilase dan Protease*. Universitas Negeri Yogyakarta
- Banks W dan Greenwood CT. 1975. *Starch and Its Components*. Helsted Press, John Willey and Sons, New York.
- Badan Pengendalian Lingkungan Hidup Daerah (BPLHD) Provinsi Jawa Barat. 2005. *Status Lingkungan Hidup Provinsi Jawa Barat*. Badan Pengendalian Lingkungan Hidup Daerah (BPLHD) Provinsi Jawa Barat. 2005. *Status Lingkungan Hidup Provinsi Jawa Barat*.
- Bridson E. Y. 1998. *The Oxoid Manual 8th Edition*. Oxoid Limited Hampsire: England
- Carvalo, R.V, Coreat and J.da Silva. 2008. *Properties of an amilase from thermophilic Bacillus sp.* Brazil J. Microbial.
- Claus, E. P., Tyler V. E., Bradley I. R., 1970, *Pharmacognosy, 6th*, editor Lea and Febringer, Philadelphia
- Dessy C. S. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase kasar Termofilik dari Sumber Air Panas Panen Sibirubiru Sumatera Utara*. USU Repository. Sumatera Utara.
- Dirnawan, H., Suwanto, A., & Purwanaria,T. 2000.*Eksplorasi bakteri termofil penghasil enzim amilase hidrolitik ekstraseluler dari sumber air panas gunung pancar*. Hayati.
- Fardiaz, S., 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Ginting,Y., 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air Panas*. Skripsi: Universitas Sumatera Utara.
- Gray JS. dan Elliot, Michael. 2009. *Ecology of Marine Sediments*. From Science to Management.Second Edition. Oxford University Press.
- Hadioetomo, R.S. 1985. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*, Jakarta: PT. Gramedia
- Handayani D., Mubarik NR., dan Listiyawati S. 2002. *Isolasi dan Karakterisasi Amilase Ekstra Seluler dari Kapang Asal Limbah Cair Tapioka*

- Hartuti MS. 2006. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Amilase dari kawasan wisata Pemandian Air Panas Pawan-Roka Hulu*. Skripsi. Universitas Riau.
- Igarshi YH, Hiroshi H, Katsuhisha S & Mikio S. 1998. *Enzymatic properties of a novel liquefying-amylase from an alkaliphilic Bacillus Isolate and entire nucleotida and amino acid sequences*. Appl Environ Microbiol
- Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup No113 Tahun 2003, *Tentang Baku Mutu Air Limbah Bagi Usaha dan atau Kegiatan Pertambangan Batubara*
- Lee JM. 1992. *Biochemical Engineering*. New Jersey: Prentice Hall.
- Lehninger A.L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Lidya, B. dan N. S. Djenar. 2000. *Dasar Bioproses*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi DEPDIKNAS. Jakarta.
- Nadeem MT, Butt MS, Anjum FM and Asgher M. 2009. *Improving Bread Quality by Carboxymethyl Cellulase Application*. Int. Journal. Agric. Biol. Department of Biochemistry, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan
- Pandey, A., P.Nigam and C.R.Soccol 2000. *Advance in microbial amilases*. Biotechnol. Appl. Biochem.
- Pertiwi, Hardiyanti Dharma., 2011. *Dampak Keberadaan Perusahaan Pertambangan Batubara Terhadap Aspek Ekologi, Sosial dan Ekonomi Masyarakat di Era Otonomi Daerah (Kasus: Kelurahan Sempaja Utara, Kecamatan Samarinda Utara, Kota Samarinda)*. Skripsi. Bogor: IPB.
- Purwandani, L. P., Drajat, P. & Anna, R. 2012. *Isolasi dan uji aktivitas enzim amilase dari isolat bakteri termofilik amilolitik pasca erupsi merapi pada berbagai variasi suhu dan pH*. Skripsi: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Radji M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Ratnasari. 2009. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Diklorometan dan Etil Asetat Daun Mimba (Azadiracnta indica A. Juss) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli* [Skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A., dan Rao, K.R.S.S. 2003, *An Overview of The Microbial α -Amylase Family*, African J. of Biotechnology. Vol 2

- Rindit, Pambaylun, dkk. 1998. *Laporan Penelitian : Mempelajari Hidrolisis Pati Gadung (Dioscoreahispida Dernst) dengan Enzim α -amilase dan Glukoamilase untuk Pembuatan Sirup Glukosa*. Fakultas Pertanian UNSRI. Palembang.
- Sarah, Putra SR., Putro HS. 2009. *Isolasi α -Amilase Termotabil dari Bakteri Termofilik*. Prosiding Kimia FMIPA. Institut Teknologi Sepuluh Nopember
- Sianturi, D.C. 2008. *Isolasi bakteri dan uji aktivitas amilase termofil kasar dari sumber air panas Penen sibirubiru Sumatra Utara*. Tesis. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR, Pandey A. 2006. *α -Amylases from microbial sources-An overview on recent developments. Food Technol Biotechnol*
- Soedigdo. 1988. *Metode Penelitian Biokimia*. PAU Bioteknologi Institut Teknologi Bandung. Bandung
- Sukandarrumidi. 2014. *Batu Bara dan Gambut*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Suriawiria U. 1985. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Bandung: Angkasa.
- Souza PM and Magalhães PO. 2010. *Application Of Microbial α -Amylase In Industry . A Review*. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.Submitted
- Undang-Undang Pokok Pertambangan Tahun 1967
- Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 4 Tahun 2009 Tentang Pertambangan Mineral dan Batubara.
- 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.
- Wang. D.I.C, C.L. Conney. A.L. Demain, P. Dunhill, A.E, Humprey and M.D. Lily, 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Willey and Sons, New York.
- Winarno FG. 1986. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.

Windish, W.W. & Mhatre, N.S. 1965. *Microbial Amylases*. New York: Academic Press.

Zulfikar, 2008, *Kimia Kesehatan*, Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan, Jakarta

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Foto Oven, Inkubator, Autoklaf, Vortex

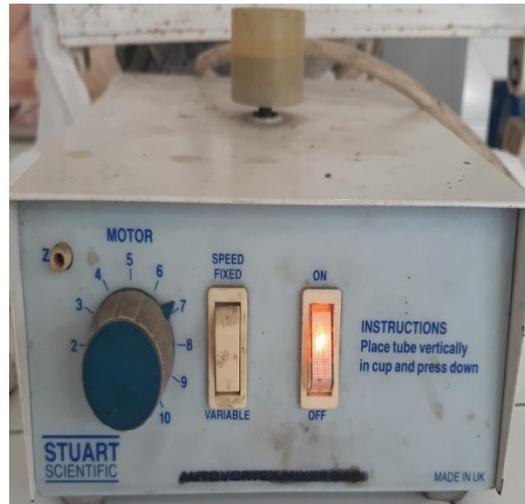
Oven



Inkubator

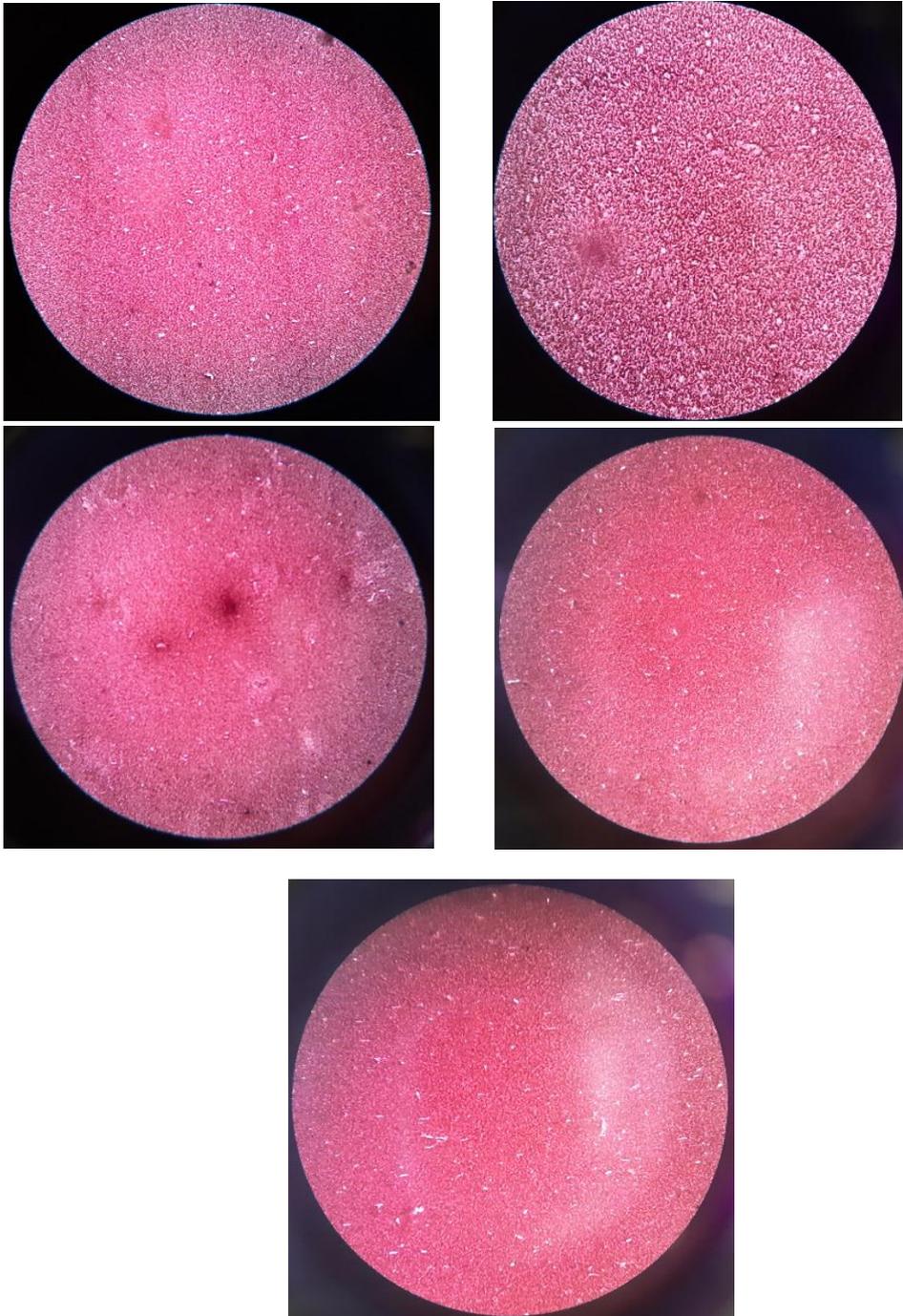


Autoklaf

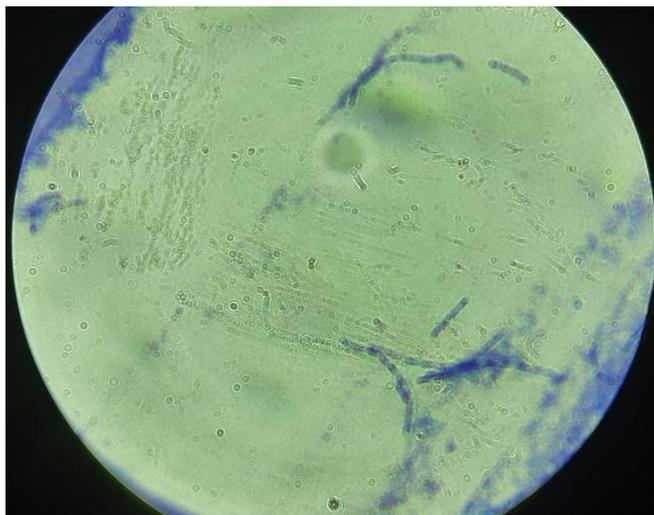
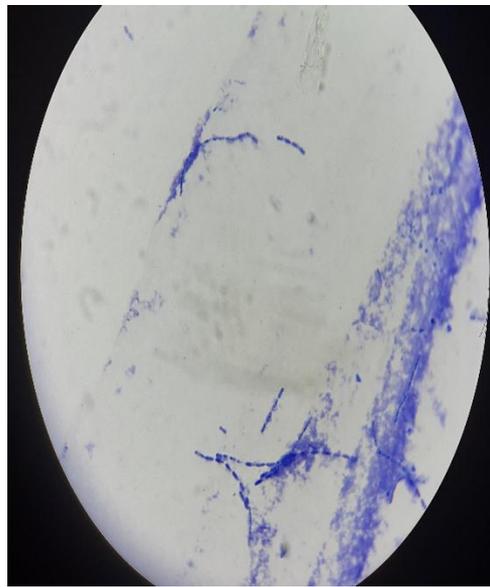
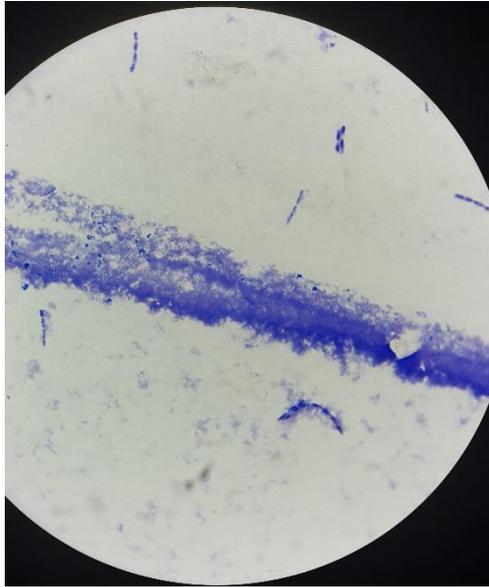


Vortex

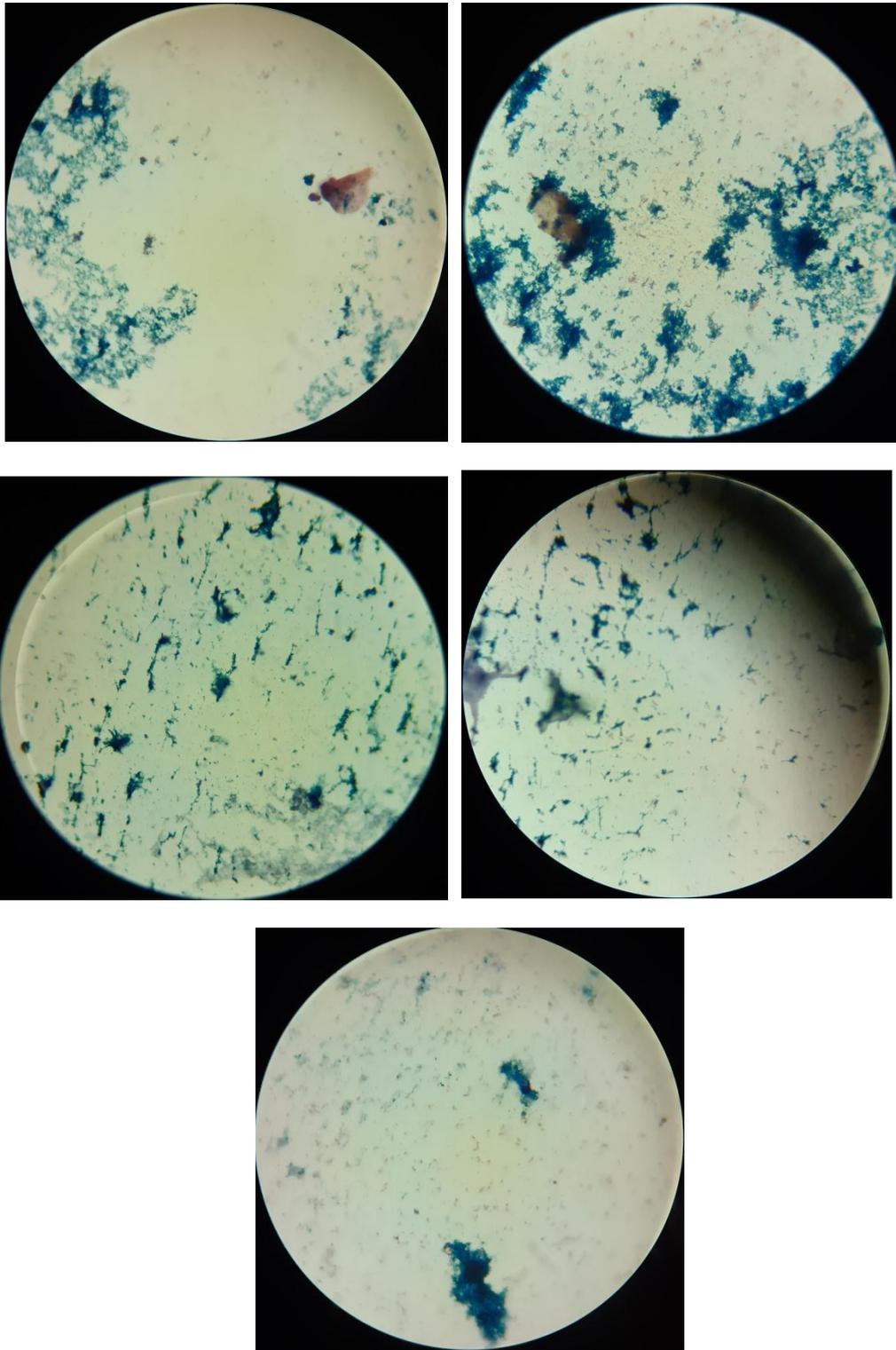
Lampiran 2. Foto Hasil Identifikasi Pewarnaan Kapsul



Lampiran 3. Foto Hasil Identifikasi Pewarnaan Gram

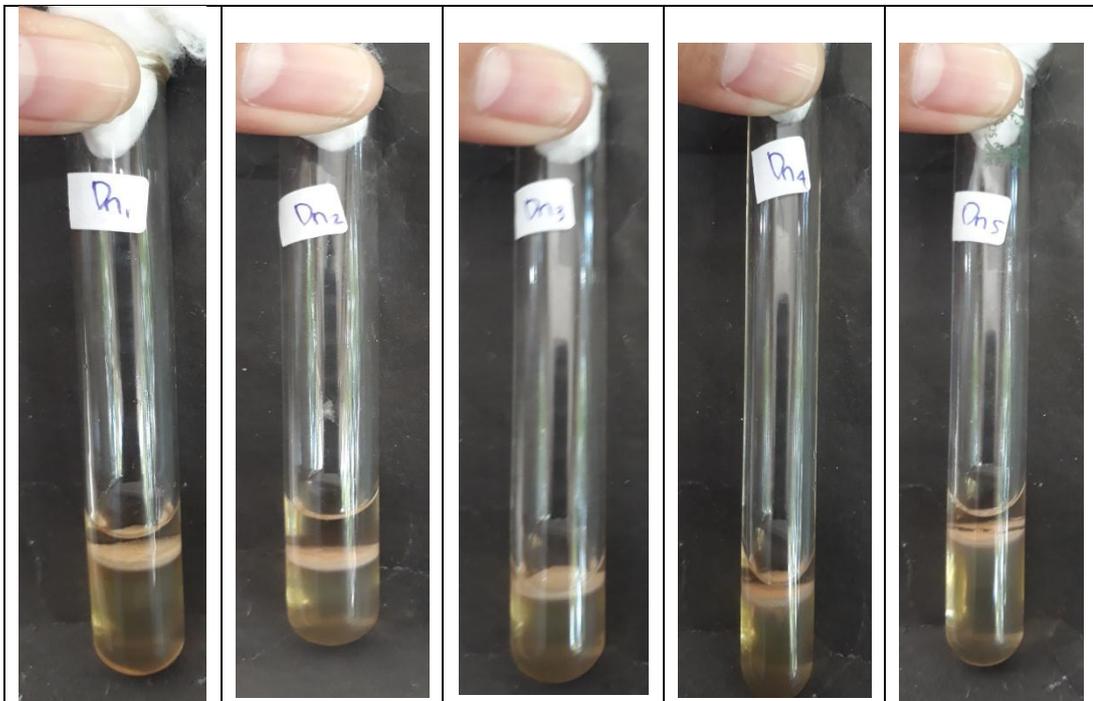


Lampiran 4. Foto hasil pewarnaan spora

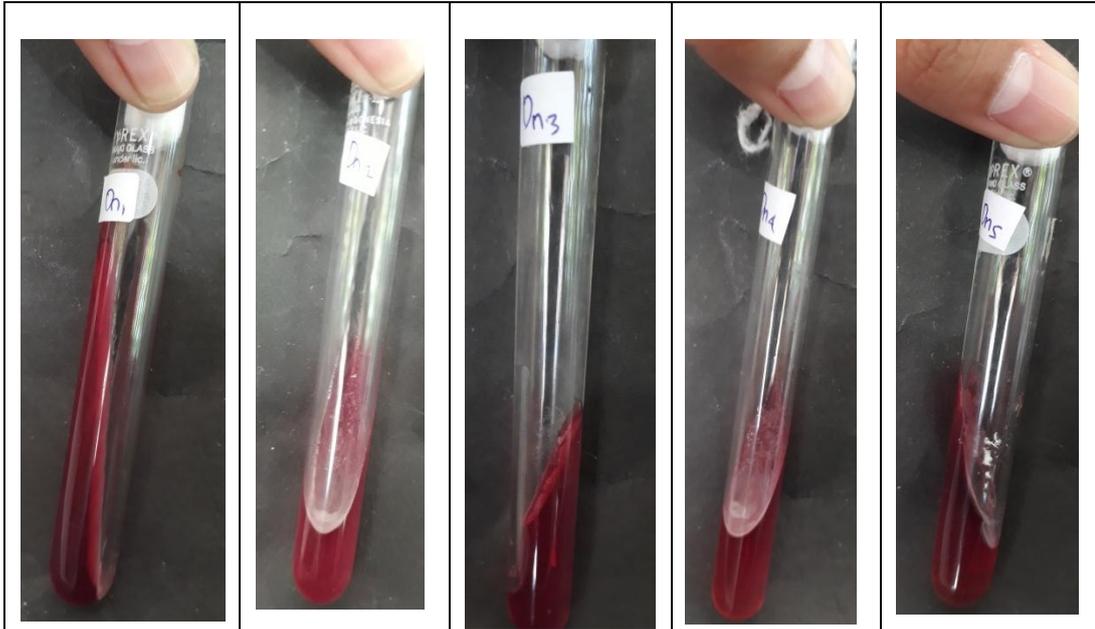


Lampiran 5. Foto Hasil Identifikasi Bakteri

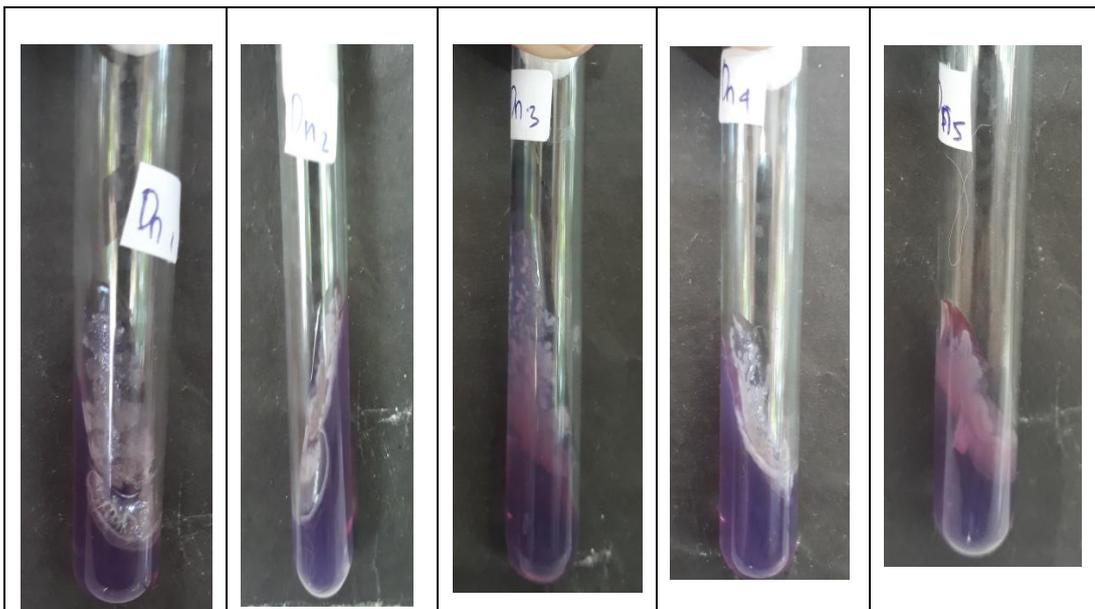
Hasil isolasi bakteri air limbah tambang batubara pada media NA



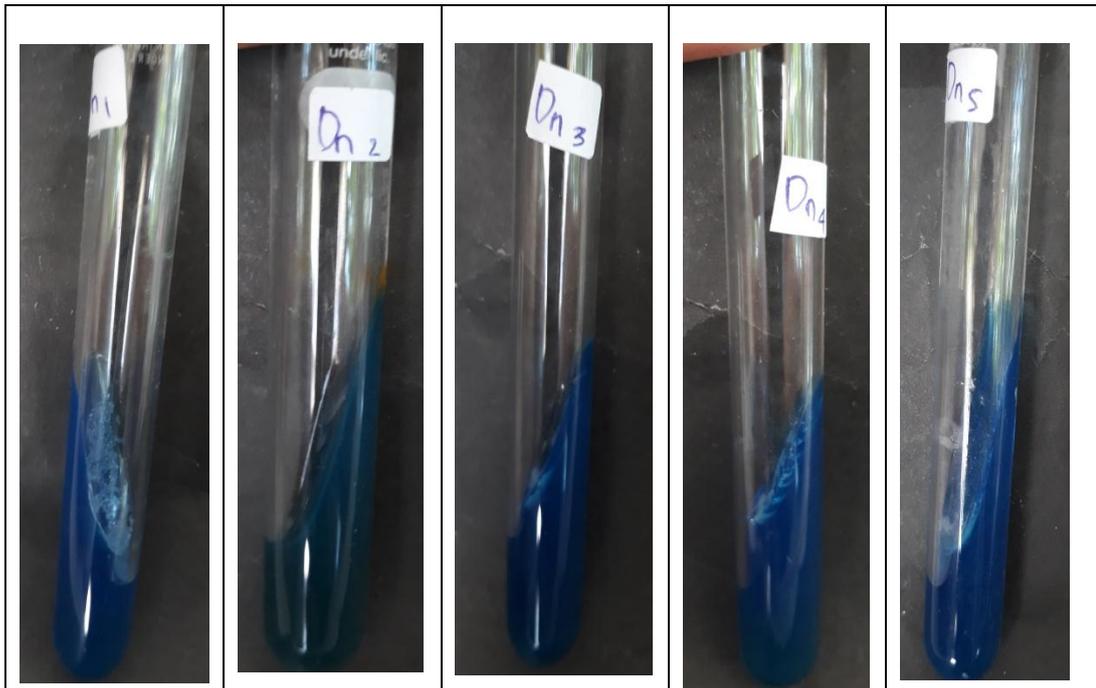
Hasil identifikasi biokimia SIM



Hasil identifikasi biokimia KIA

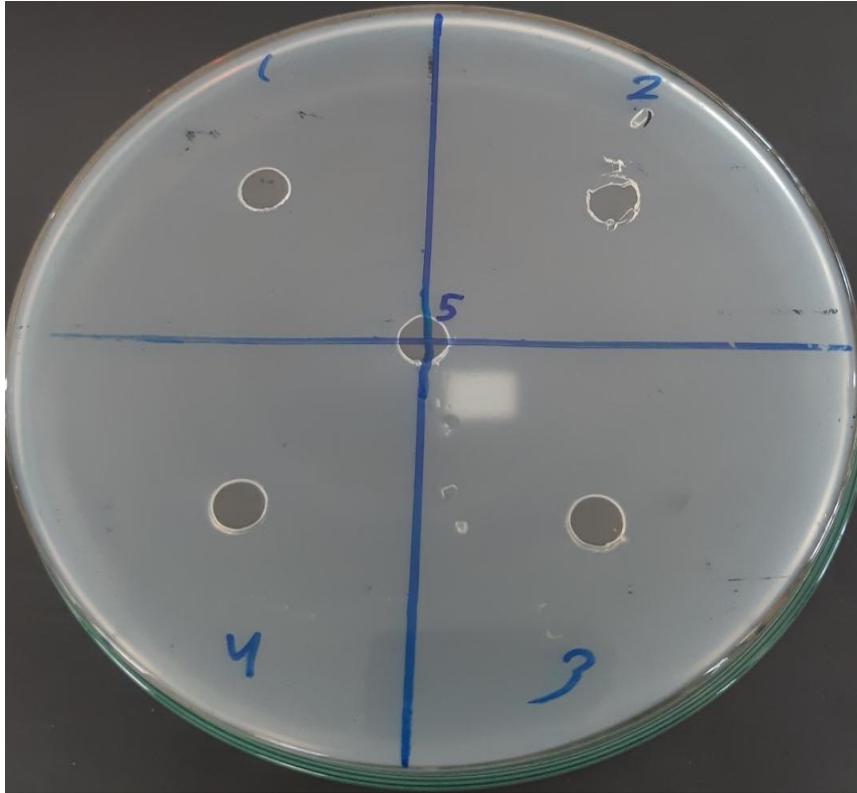


Hasil identifikasi biokimia LIA

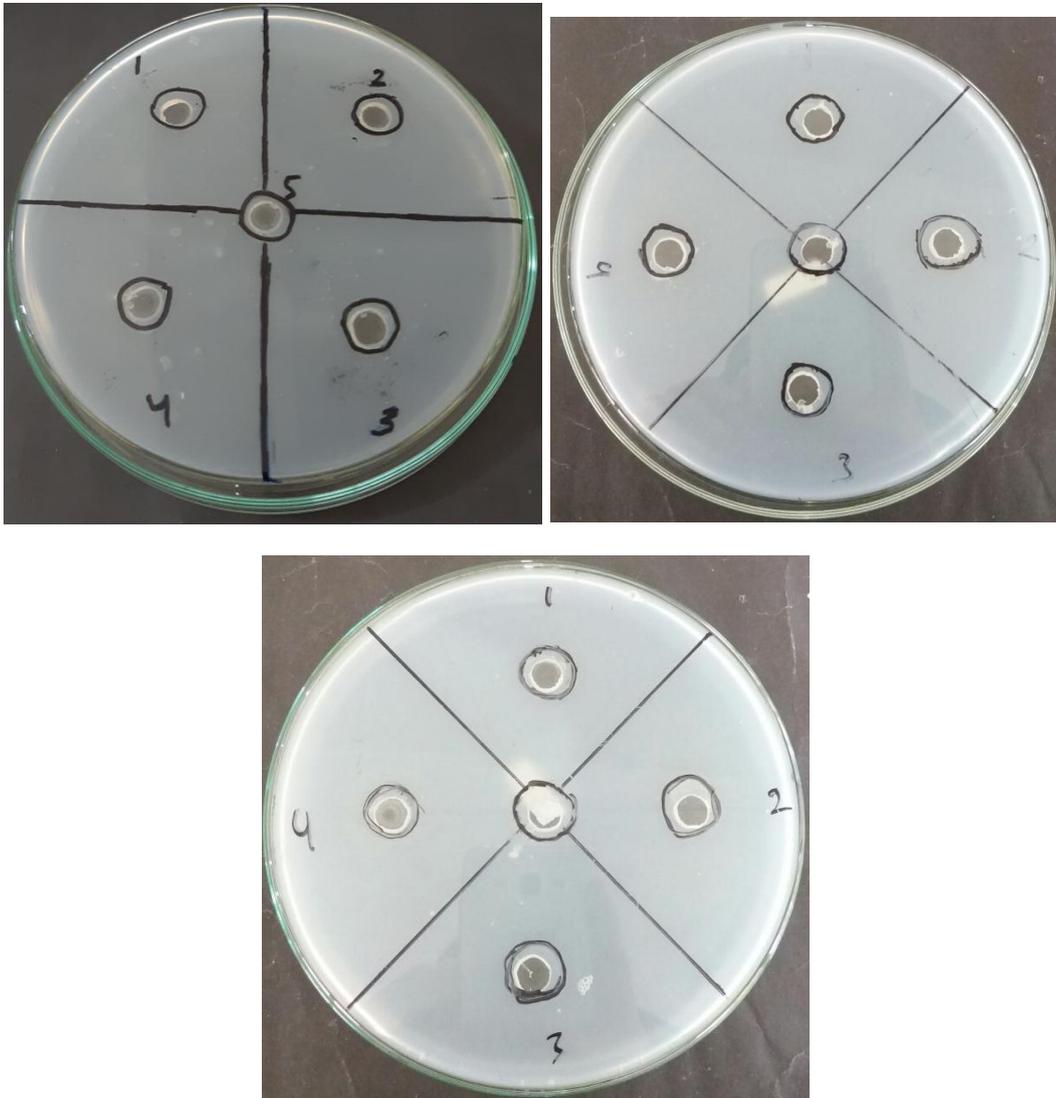


Hasil identifikasi biokimia Sitrat

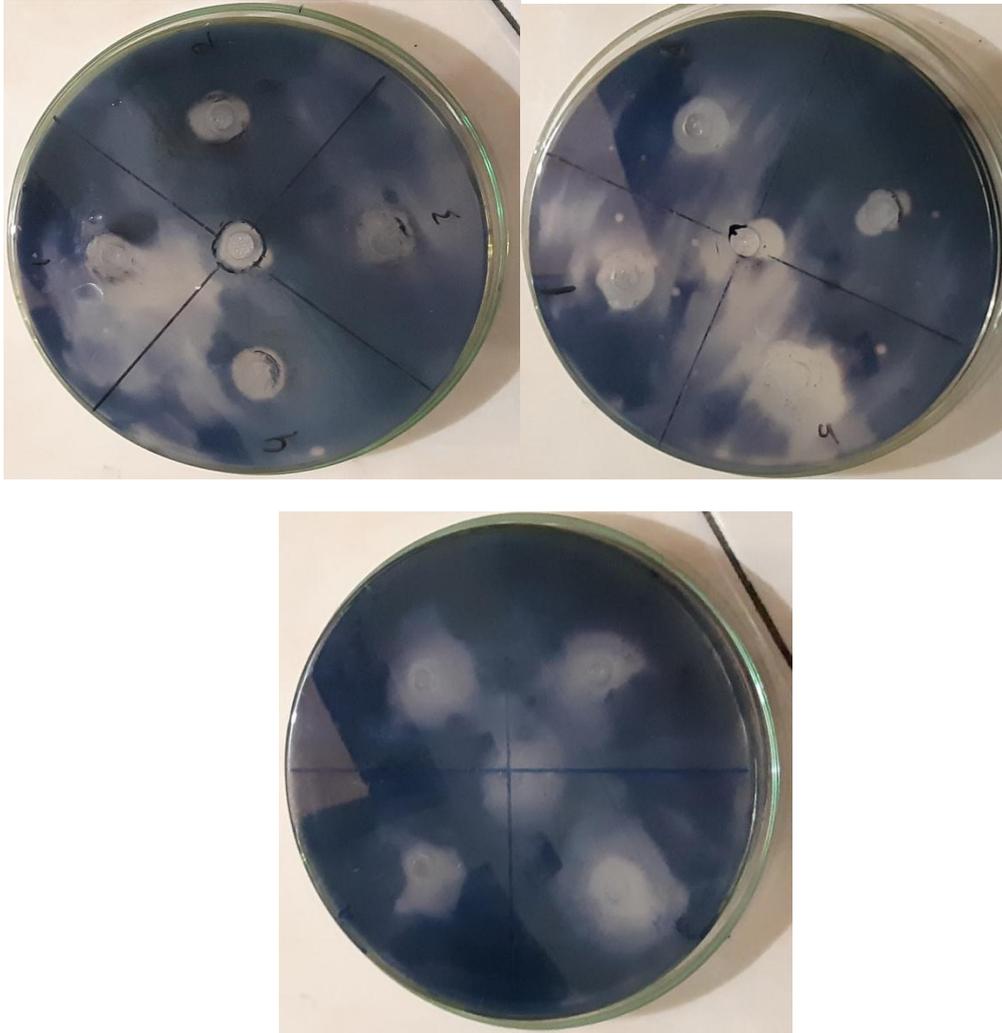
Lampiran 6. Media Amilum Agar Sebelum Diberi Suspensi Bakteri

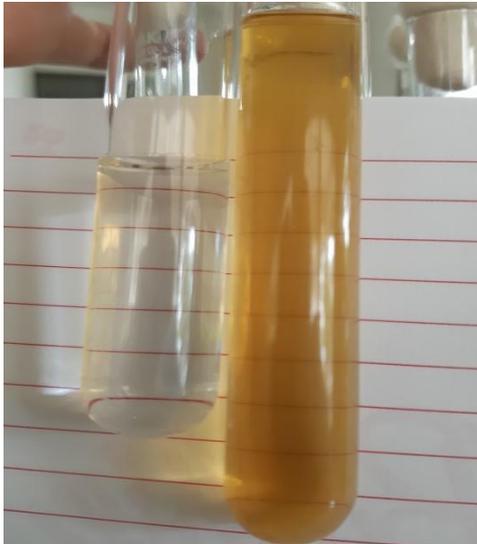


Lampiran 7. Hasil Uji Aktivitas Bakteri Air Limbah Batubara



Lampiran 8. Foto Hasil Uji Bakteri Air Limbah Batubara setelah Ditetesi Iodin



Lampiran 9. Foto Suspensi Bakteri dengan Standart Mc Farland 0,5

**Lampiran 10. Hasil Analisis Statistik Zona Bening dari Isolat Bakteri Air
Tambang Batubara Terhadap Enzim Amilase**

Uji kolmogorov Smirnov

Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA

Kriteria uji : Sig. < 0,05 berarti H0 ditolak Sig. > 0,05 H0 diterima

Hasil:

Npar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
LUAS	15	1,4533	,14480	1,19	1,62

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LUAS
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1,4533
	Std. Deviation	,14480
Most Extreme Differences	Absolute	,160
	Positive	,125
	Negative	-,160
Kolmogorov-Smirnov Z		,619
Asymp. Sig. (2-tailed)		,839

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kesimpulan : sig. > 0,05 (H0 diterima) maka data diameter zona bening (luas) terdistribusi normal.

Uji Levene

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas

Kriteria uji : Sig. < 0,05 berarti H0 ditolak Sig. > 0,05 H0 diterima

Hasil:

Test of Homogeneity of Variances

LUAS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,657	4	10	,096

Kesimpulan : Sig. > 0,05 (H0 diterima) maka data diameter zona bening (luas) homogen.

Uji One Way ANOVA

Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari diameter zona bening (luas) dari setiap suspensi bakteri.

Kriteria uji : Sig. <0,05 (H0 ditolak) Sig. >0,05 (H0 diterima).

Hasil:

ANOVA

LUAS

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,093	4	,023	1,161	,384
Within Groups	,200	10	,020		
Total	,294	14			

Kesimpulan : sig >0,05 (H0 diterima) maka tidak terdapat perbedaan diameter zona bening (luas) antar suspensi bakteri.

Uji Post Hoc (LSD)

Tujuan : untuk mengetahui pada suspensi bakteri mana terdapat perbedaan diameter daerah zona bening (luas) yang bermakna

Hasil :

Multiple Comparisons

LUAS
LSD

(I) ISOLAT	(J) ISOLAT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LTB 1	LTB 2	-,05000	,11560	,675	-,3076	,2076
	LTB 3	,07000	,11560	,558	-,1876	,3276
	LTB 4	,03000	,11560	,801	-,2276	,2876
	LTB 5	,18333	,11560	,144	-,0742	,4409
LTB 2	LTB 1	,05000	,11560	,675	-,2076	,3076
	LTB 3	,12000	,11560	,324	-,1376	,3776
	LTB 4	,08000	,11560	,505	-,1776	,3376
	LTB 5	,23333	,11560	,071	-,0242	,4909
LTB 3	LTB 1	-,07000	,11560	,558	-,3276	,1876
	LTB 2	-,12000	,11560	,324	-,3776	,1376
	LTB 4	-,04000	,11560	,737	-,2976	,2176
	LTB 5	,11333	,11560	,350	-,1442	,3709
LTB 4	LTB 1	-,03000	,11560	,801	-,2876	,2276
	LTB 2	-,08000	,11560	,505	-,3376	,1776
	LTB 3	,04000	,11560	,737	-,2176	,2976
	LTB 5	,15333	,11560	,214	-,1042	,4109
LTB 5	LTB 1	-,18333	,11560	,144	-,4409	,0742
	LTB 2	-,23333	,11560	,071	-,4909	,0242
	LTB 3	-,11333	,11560	,350	-,3709	,1442
	LTB 4	-,15333	,11560	,214	-,4109	,1042

Kesimpulan : dari hasil di atas ada tanda* pada Mean Difference menunjukkan bahwa semua suspensi bakteri setara dengan suspensi bakteri lainnya.

Lampiran 11. Komposisi dan pembuatan Media

1. *Brain Heart Infusion* (BHI)

Komposisi :	Sari otak anak sapi	12	gram
	Sari jantung sapi	5	gram
	Proteose pepton	10	gram
	Bacto dextrose	2	gram
	NaCl	5	gram
	Dinatrium fosfor	2,5	gram
	Bacto agar	15	gram
	Aquadestilata	ad 1 L pH = 7,4	

Cara Pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadestillata sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

2. *Sulfide Indol Motility* (SIM)

Komposisi :	Pepton from casein	20	gram
	Pepton from meat	6	gram
	Ammonium Iron (II) citrate	0,2	gram
	Sodium thiosulfate	0,2	gram
	Agar-agar	0,2	gram
	Aquadestilata	ad 1 L pH=7,4	

Cara pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadestillata sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

3. *Kligler Iron Agar* (KIA)

Komposisi :	Pepton from casein	15	gram
	Pepton from meat	5	gram
	Ammonium Iron (II) citrate	0,5	gram
	Meat extract	3	gram

Yeast extract	3	gram
Sodium chloride	5	gram
Laktosa	10	gram
Glukosa	1	gram
Sodium thiosulfate	0,5	gram
Phenol red	0,024	gram
Agar-agar	12	gram
Aquadestillata	ad 1 L	pH=7,4

Cara Pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadestillata sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tuangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

4. *Lysine Indol Agar (LIA)*

Komposisi :	Pepton from meat	5	gram
	Yeast extract	3	gram
	Glukosa	1	gram
	Lysine monohydrochloride	10	gram
	Sodium thiosulfate	0,04	gram
	Ammonium Iron (II) citrate	0,5	gram
	Bromo cresol purple	0,02	gram
	Agar-agar	12,5	gram
	Aquadestillata	ad 1 L	pH=7,4

Cara Pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadestillata sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tuangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

5. *Citrate Agar*

Komposisi :	Ammonium hydrogen fosfat	1	gram
	DI-Potassium hydrogen fosfat	1	gram

Sodium chloride	5	gram
Magnesium sulfate	0,2	gram
Bromo thymol blue	0,08	gram
Agar-agar	12,5	gram
Aquadestillata	ad 1 L	pH=7,4

Cara Pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadestillata sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tuangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

6. Amilum Agar

Komposisi:	Agar-Agar	2	gram
	Amilum	1	gram
	Aquadetillata	ad 100	mL

Cara Pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadestillata sebanyak 100 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tuangkan dalam cawan petri.

Lampiran 12. Standart kekeruhan *Mc. Farland*

Standard	Volume dalam mL		Number of Bacterial/mL/(10 ⁸) Represented
	1% BaCl ₂	1% H ₂ SO ₄	
0,5	0,5	99,5	1,5
1	1,0	99,0	3
2	2,0	98,0	6
3	3,0	97,0	9
4	4,0	96,0	12
5	5,0	95,0	15
6	6,0	94,0	18
7	7,0	93,0	21
8	8,0	92,0	24
9	9,0	91,0	27
10	10,0	90,0	30