

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



Oleh :

**Istiqomah
20144079 A**

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

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

SKRIPSI

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

Oleh:

**Istiqomah
20144090A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

Dengan Judul :

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

Oleh
Istiqomah
20144079A

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

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan

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

Pembimbing Utama

Dr. Ana Indrayati, M. Si
Pembimbing Pendamping

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

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

1.

2.

3.

2.

4.

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. Ia mendapat pahala (dari kebajikan) yang diusahakannya dan ia mendapat siksa (dari kejahatan) yang dikerjakannya.. (QS. Al-Baqarah:286)”

Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjaklah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap (QS. Al-Insyirah:7-8)

Orang yang pesimis melihat kesulitan dalam setiap kesempatan. Orang yang optimis melihat kesempatan dalam setiap kesulitan (Agus Dhama)

Kupersembahkan Skripsi ini untuk:

- ♥ Allah Yang Maha Kuasa, yang memberikan kekuatan agar terus semangat menyelesaikan skripsi meskipun banyak halangan.
- ♥ Pahlawanku bapak & ibu yang selalu mendukung agar tak mudah menyerah, dan mendukung menjadi orang yang bertanggung jawab.
- ♥ Saudaraku-saudaraku yang selalu membuat aku lupa akan kesedihan.
 - ♥ Dosen pembimbingku Ibu Ana Indrayati dan Pak Andang. Terima kasih sudah bersedia membimbing dan meluangkan waktu untuk membagikan ilmunya padahal diri ini masih penuh kekurangan.
- ♥ Terimakasih untuk Boyfriend yang sudah menemaniku sampai saat ini semoga seterusnya seperti ini.
- ♥ My partner praktikum: Yunda, Dewanty, and Dinny selalu saling mengingatkan, dan membantu.
 - ♥ Ayu, Fero, Widya, Petra, Regina, Iyem dan jeng-jeng yang selalu siap sedia membantu, terimakasih dukungannya.
 - ♥ 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, 30 Mei 2018

Tanda tangan



Istiqomah

KATA PENGANTAR

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

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

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

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

7. Keluargaku tercinta Bebeh, Mamak, Adek, Nenek, Tua, Om, Mbok Hana, Mbok Mini dan Mbok Nur dan lainnya terimakasih telah memberikan semangat dan dorongan materi, moril dan spiritual kepada penulis selama perkuliahan, penyusunan skripsi hingga selesai studi S1 Farmasi.
8. Untukmu A. Reza Basyarahil terimakasih atas kesabaran, bantuan, dukungan, semangat, doa dan kasih sayangnya.
9. Untuk teman seperjuanganku Yunda, Dewanty, Dinny selalu saling membantu dan mengingatkan.
10. Untuk teman-teman tercinta Ayu, Fero, Widya, Petra, Iyem, Jeng-jeng, Regina, dan lainnya yang tidak bisa disebutkan satu persatu terima kasih atas dukungan dan bantuan kalian.

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

Surakarta, Juli 2018

Penulis,

(Istiqomah)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
INTISARI	xii
ABSTRACT	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Masalah	3
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Mikroorganisme	4
B. Pertumbuhan Bakteri	4
C. Isolasi dan Identifikasi Bakteri	5
1. Isolasi bakteri	5
2. Identifikasi bakteri	5
D. Enzim Protease	6
E. Mikroorganisme Penghasil Enzim Protease	7
F. Kegunaan Protease	8
G. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim	9
H. Skim dan Kasein	10
I. Limbah Air Asam Tambang	11
J. Media	12
K. Metode Uji Aktivitas Protease	12
L. Landasan Teori	12
M. Hipotesis	14
BAB III METODE PENELITIAN	15

A.	Populasi dan Sampel	15
1.	Populasi	15
2.	Sampel	15
B.	Variabel Penelitian	15
1.	Identifikasi variabel utama	15
2.	Klasifikasi variabel utama	15
3.	Definisi operasional variabel utama	16
C.	Alat dan Bahan.....	17
1.	Alat	17
2.	Bahan.....	17
D.	Jalan Penelitian	17
1.	Sterilisasi.....	17
2.	Pengambilan sampel air limbah tambang batubara.....	17
3.	Pembuatan medium <i>Skim Milk Agar</i> (SMA)	17
4.	Isolasi mikroorganisme dari air asam tambang	18
5.	Identifikasi mikroorganisme dari air asam tambang	18
5.1.	Identifikasi makroskopis.....	18
5.2.	Identifikasi dengan pewarnaan Gram.....	18
5.3.	Identifikasi dengan pewarnaan kapsul.....	19
5.4.	Identifikasi dengan pewarnaan spora	19
5.5.	Identifikasi secara biokimia	19
6.	Pembuatan suspensi bakteri	20
7.	Uji aktivitas protease secara difusi sumuran.....	20
E.	Analisis Hasil.....	21
F.	Skema Penelitian.....	22
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		23
1.	Pengambilan Sampel.....	23
2.	Isolat Bakteri Air Limbah Tambang Batubara	23
3.	Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Air Limbah Tambang Batubara.....	24
3.1.	Identifikasi bakteri berdasarkan koloni	24
3.2.	Identifikasi bakteri berdasarkan mikroskopis dengan pewarnaan Gram, kapsul dan spora.....	24
3.3.	Identifikasi bakteri berdasarkan biokimia	25
4.	Pembuatan Suspensi Bakteri.....	27
5.	Uji Aktivitas Protease.....	27
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		31
A.	Kesimpulan.....	31
B.	Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA		32

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Skema isolasi bakteri air limbah tambang batubara.....	21
2. Skema identifikasi bakterialimbah tambang batubara	22
3. Skema kerja pengujian aktivitas protease dari isolat bakteri air limbah tambang batubara.....	22
4. Foto isolasi bakteri air limbah tambang batubara	23
5. Diagram rata-rata replikasi indeks proteolitikisolat bakteri	29

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Penghasil protease dari beberapa mikroorganisme.....	7
2. Kegunaan protease	9
3. Hasil pengamatan makroskopis koloni bakteri air limbah tambang	25
4. Hasil identifikasi berdasarkan mikroskopis terhadap isolat bakteri air limbah tambang	25
5. Hasil identifikasi uji biokimia terhadap isolat bakteri air limbah tambang.....	27
6. Indeks proteolitik isolat bakteri penghasil protease dari air limbah Tambang.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Sampel air limbah tambang batubara	36
2. Hasil Pembuatan Suspensi Isolat Bakteri.....	37
3. Karakter Makroskopis Koloni Lima Isolat Bakteri Hasil Isolasi Dari air limbah tambang batubara Tenggaraong	38
4. Hasil identifikasi berdasarkan mikroskopis terhadap isolat Bakteri air limbah tambang	39
5. Hasil identifikasi uji biokimia terhadap isolat bakteri air Limbah tambang	42
6. Hasil uji aktivitas proteolitik	44
7. Hasil perhitungan indeks proteolitik	45
8. Bahan-bahan Penelitian.....	46
9. Komposisi media skim milk Agar (SMA)	47
10. Alat-alat Penelitian.....	48
11. Hasil uji Statistik.....	51
12. Komposisi media	53

INTISARI

ISTIQOMAH, 2018, ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI AIR LIMBAH TAMBANG BATUBARA PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI BAKUNGAN TENGGARONG KALIMANTAN TIMUR, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Mikroorganisme dari air beranekaragam dan memiliki peran penting sebagai dekomposer, penyedia unsur hara bagi makhluk hidup di perairan dan juga sebagai penghasil enzim. Peranan enzim sangat penting bagi industri makanan, obat, pertanian, dan peternakan. Salah satu enzim yang tersebar luas dan peranannya cukup baik dalam industri adalah protease. Protease merupakan enzim yang dapat menguraikan atau memecah protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan identifikasi bakteri yang didapat pada air limbah batubara Tenggarong Kalimantan Timur yang mampu menghasilkan enzim protease.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi identifikasi makroskopis, mikroskopis, uji aktivitas protease secara kualitatif. Uji potensi proteolitik secara kualitatif dengan mengukur diameter zona bening dalam media *Skim Milk Agar*.

Hasil isolasi diambil lima isolat bakteri yang mampu menghasilkan zona bening pada substrat *Skim Milk Agar*. Berdasarkan uji makroskopis semua bakteri memiliki warna, bentuk, tepian dan elevasi yang hampir sama. Pada pewarnaan Gram, pewarnaan kapsul dan pewarnaan spora semua bakteri tergolong Gram negatif, berkapsul dan berspora. Hasil uji aktivitas proteolitik secara rata-rata pada 3 kali sampling dari 5 isolat yang mampu menghasilkan zona bening disekitar koloni yaitu ALT1 (14,53 mm), ALT2 (6,63 mm), ALT3 (7,36), ALT4 (8,3 mm), ALT5 (8,6 mm). Isolat ALT1 memiliki nilai indeks proteolitik yang tertinggi.

Kata kunci : isolasi, identifikasi, bakteri, limbah, batubara, protease

ABSTRACT

ISTIQOMAH, 2018, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF BACTERIA PRODUCING COAL MINE WASTEWATER ENZYME PROTEASE OF BAKUNGAN TENGGARONG EAST KALIMANTAN, SKRIPSI, FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Microorganisms from the water is diverse and has an important role as the provider of this species, nutrient elements for living beings in the water and also as a producer of enzymes. The role of the enzyme is essential for food industry, medicine, agriculture, and livestock. One of the enzymes that are widely dispersed and its role quite well in the industry is a protease. Protease is an enzyme which can decipher or break down protein. This enzyme would catalyze the hydrolysis reactions, reactions involving elements of water on bonding of specific substrates. This research aims to isolate and identify bacteria obtained at sewage water the East Kalimantan coal Tenggarong capable of producing the enzyme protease.

This research is a descriptive qualitative research. The data obtained are presented in descriptive macroscopic, microscopic identification include, qualitative protease activity assay. Test potential proteolytic qualitatively by measuring the diameter of the clear zone in the media *Skim Milk Agar*.

Results isolation taken five bacterial isolates capable of producing clear zone on a substrate of Skim Milk Agar. Based on macroscopic tests all bacteria have the color, shape, margin, and nearly the same elevation. On coloring grams staining capsule and staining spores all bacteria classified as Gram-negative, encapsulated and there are spores. Proteolytic activity of test results on average at 3 times the sampling of 5 isolates that are able to produce a clear zone surrounding the colony namely (14.53 mm) ALT1, ALT2 (6.63 mm), ALT3 (7.36), ALT4 (8.3 mm), ALT5 (8.6 mm). ALT1 isolates have the highest proteolytic index value.

Key words: isolation, identification, bacteria, waste, coal, protease

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Perkembangan enzim sudah semakin pesat dan menempati posisi penting dalam bidang teknologi dan industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya inisiatif dari para ahli menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri, seperti pemanfaatan dalam bidang industri pangan dan di bidang industri non pangan (Agustien, 2010).

Meningkatnya jumlah pemanfaatan enzim untuk berbagai industri, nilai perdagangan enzim di dunia mencapai 3-4 miliar per tahun, sedangkan di Indonesia sampai sekarang hampir seluruh kebutuhan enzim yang digunakan diimpor dari luar negeri, yakni mencapai 2.500 ton dengan nilai impor sekitar 200 miliar pada 2017 dengan laju pertumbuhan volume rata-rata 5 hingga 7 persen per tahun (Zilda *et al.*, 2008; Setyorini, 2017). Produksi dan perdagangan enzim saat ini didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik seperti amilase, protease, katalase dan lipase. Salah satu jenis enzim yang aplikasinya sangat luas adalah enzim protease karena memiliki nilai ekonomis yang tinggi dalam bidang industri, antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, dan pada proses pengolahan limbah industri (Nascimento dan Martin, 2006).

Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein menjadi oligopeptida atau asam-asam amino. Enzim-enzim ini bekerja mengkatalis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan air pada ikatan spesifik dengan substrat (Risnawati, *et al.*, 2013). Protease merupakan salah satu enzim yang paling banyak dibutuhkan di bidang industri, yaitu sekitar 60% di antara semua jenis enzim (Baehaki, 2011). Protease diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Perannya dalam tubuh antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan

kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim, hormon, serta neurotransmitter (Poliana, 2007). Enzim protease di dalam bidang farmasi digunakan untuk membantu penyerapan protein dalam saluran pencernaan, pengobatan luka bakar serta sebagai bahan aktif dalam sediaan kosmetik (Witarto, 2006).

Sumber enzim protease yang telah diketahui berasal dari hewan, tanaman dan mikroorganisme. Tanaman merupakan sumber produksi protease terbesar yaitu 43,85%, kemudian bakteri 18,09%, jamur 15,08%, hewan 11,15%, alga 7,42%, dan virus 4,41% (Poernomo, 2003). Sumber protease yang paling banyak digunakan adalah bakteri dibanding yang lain, karena bakteri lebih dianggap menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang relatif murah, dapat diproduksi dalam skala besar dan mutu yang lebih seragam (Agustien, 2010).

Protease mikroba dapat diklasifikasikan sebagai protease serin, protease sulfhydryl, protease asam dan metaloprotease. Mikroorganisme yang diketahui sebagai penghasil protease adalah *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pyrococcus*, *Termonospora Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia* and *Aspergillus*. Enzim protease dapat diproduksi oleh mikroorganisme yang diantaranya adalah bakteri. Bakteri yang dilaporkan mampu menghasilkan protease adalah dari jenis *Bacillus* diantaranya *B. Thermoglucosidasius* AF-01. (Ward *et al.*, 2009; Yusriah dan Kuswyasari, 2013). Sampai saat ini mikroorganisme dari air limbah tambang batubara sebagai sumber enzim protease belum ada yang mengeksplorasi.

Air limbah tambang atau air asam tambang adalah air yang mempunyai sifat asam yang terbentuk di lokasi penambangan dengan pH yang rendah (pH 2-5) sebagai akibat dari dibukanya suatu potensi kemasaman batu di lokasi tambang sehingga menimbulkan permasalahan terhadap kualitas air dan tanah. Air asam tambang merupakan limbah yang berbahaya sebab mengandung logam-logam berat seperti Fe, Al, Mn, Cu, Zn, Cd, Pb, As, dan sulfat yang tinggi (Achterberg *et al.* 2003). Air air asam tambang terbentuk akibat oksidasi mineral sulfida yang terpajan atau terdedah (*exposed*) di udara dengan kehadiran air (Lottermoser, 2010) yang dikatalis oleh bakteri pengoksidasi besi dan sulfur, seperti *Thiobacillus*

ferrooxidans, *Leptospirillum ferrooxidans* dan *Thiobacillus thiooxidans* (Schipper 2004; Cohen 2005; Johnson dan Hallberg 2005).

Bakteri memiliki peran penting sebagai penghasil protease karena memiliki beberapa keunggulan antara lain, bakteri memiliki siklus hidup yang singkat, efisiensi waktu dan tempat produktivitas tinggi. Enzim protease bernilai komersil, maka perlu ditemukan sumber-sumber penghasil enzim protease, salah satunya dari tempat yang ekstrim yaitu air limbah tambang batubara.

Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri sebagai potensi protease ekstraseluler pada air limbah tambang batubara Bakungan Tenggara Kalimantan Timur.

B. Rumusan 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 bisa menjadi sumber yang mampu menghasilkan enzim protease?

C. Tujuan Penelitian

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

Kedua, mengetahui isolat bakteri yang didapat pada air limbah batubara bisa menjadi sumber yang mampu menghasilkan enzim protease.

D. Manfaat Penelitian

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

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Mikroorganisme

Mikroorganisme sangat berperan dalam kehidupan yang terdapat di berbagai habitat. Mikroorganisme diperoleh dari lingkungan air, tanah, udara, substrat yang berupa bahan pangan, tanaman dan hewan (Fardiaz, 1992). Mikroorganisme terdiri dari bakteri, jamur, dan virus. Umumnya tiap mikroorganisme mempunyai morfologi dan struktur anatomi yang berbeda (Waluyo, 2004).

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme penghasil enzim yang paling banyak digunakan sebagai sumber enzim. Bakteri lebih dianggap menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang relatif murah dan mampu menghasilkan enzim (Akhdiya, 2003). Bakteri dikelompokkan atas tiga golongan berdasarkan daerah aktivitas temperatur yaitu bakteri psikrofil, bakteri mesofil dan bakteri termofilik (Waluyo, 2004).

B. Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu suplai nutrisi, suhu, pH, dan ketersediaan oksigen. Unsur-unsur dasar yang dibutuhkan oleh bakteri adalah karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, sulfur, zat besi, fosfor, dan sejumlah kecil logam lainnya. Kekurangan sumber nutrisi dapat menyebabkan kematian pada bakteri. Suhu merupakan salah satu faktor penting bagi pertumbuhan bakteri. Apabila temperatur naik atau turun secara drastis, maka tingkat pertumbuhan bakteri akan terhenti karena komponen sel menjadi tidak aktif dan rusak sehingga sel-sel menjadi mati (Hajoeningtjas, 2012).

Kebutuhan utama bakteri akan oksigen menjadikan bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri anaerob dan aerob. Bakteri anaerob dibagi lagi menjadi anaerob obligat, anaerob fakultatif dan bakteri mikroaerofilik. Bakteri anaerob obligat artinya adalah bakteri tersebut harus dalam kondisi bebas dari oksigen untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri anaerob fakultatif adalah bakteri yang dapat

hidup dengan oksigen maupun tidak. Mikroaerofilik artinya bahwa bakteri bisa tumbuh dengan konsentrasi oksigen yang rendah namun bisa mati jika konsentrasi oksigen tinggi (Fox, 2011). Bakteri aerob hanya tergolong kedalam aerob obligat, yaitu bakteri yang harus membutuhkan oksigen untuk kelangsungan hidupnya (Vasanthakumari, 2007).

C. Isolasi dan Identifikasi Bakteri

1. Isolasi bakteri

Isolasi merupakan kegiatan pemisahan mikroorganisme yang diperlukan untuk mengetahui jenis, morfologi, fisiologi, dan karakteristik mikroorganisme tersebut. Teknik pemisahan tersebut disebut isolasi yang disertai dengan pemurnian. Isolasi merupakan rangkaian proses pemisahan mikroorganisme agar didapatkan kultur murni (isolat). Isolat-isolat tersebut kemudian ditumbuhkan pada medium terpisah agar dapat tumbuh dengan baik (Irianto, 2006).

2. Identifikasi bakteri

Identifikasi merupakan upaya untuk mengetahui nama suatu makhluk hidup dalam suatu kelompok tertentu berdasarkan karakteristik persamaan dan perbedaan yang dimiliki oleh masing-masing makhluk hidup. Identifikasi mikroorganisme yang baru diisolasi memerlukan perincian, deskripsi, dan perbandingan yang cukup dengan deskripsi yang telah dipublikasikan untuk jasad-jasad renik lain yang serupa (Pelczar *et al.*, 1986).

Proses identifikasi dilakukan dengan cara pengamatan terhadap mikroorganisme tersebut secara morfologi maupun fisiologi. Pengamatan morfologi secara makroskopis dapat dilakukan dengan mengamati (warna koloni, bentuk koloni, ukuran, elevasi koloni, permukaan koloni, serta batas koloni), sedangkan pengamatan morfologi secara mikroskop dilakukan dengan pewarnaan Gram untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yaitu Gram positif dan Gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisika dinding sel bakteri. Pengamatan secara fisiologi bakteri dilakukan dengan cara uji biokimia. Uji biokimia yang dilakukan yaitu pengujian fermentasi karbohidrat, pengujian Metyl red, pengujian Vogest Paskauer, pengujian indol, pengujian oksidase,

pengujian H₂S, pengujian amylase, pengujian katalase dan pengujian protease (Cappucino & Sherman, 1987).

D. Enzim Protease

Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran lingkungan dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi, bersifat spesifik dan tidak beracun. Enzim telah dimanfaatkan secara luas pada berbagai industri produk pertanian, kimia dan industri obat-obatan. Tiga sifat utama dari biokatalisator adalah menaikkan kecepatan reaksi, mempunyai kekhususan dalam reaksi dan produk serta kontrol kinetik (Akhdiya, 2003).

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. Peranannya dalam tubuh antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim, hormon, serta neurotransmitter (Poliana, 2007).

Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein menjadi oligopeptida atau asam-asam amino. Enzim-enzim ini bekerja mengkatalisi reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan air pada ikatan spesifik dengan substrat (Risnawati, *et al.*, 2013). Enzim termasuk metabolit primer. Metabolit primer adalah produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba. Metabolit primer dibutuhkan untuk pertumbuhan setiap mikroba (Retno, 2002).

Aktivitas protease dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu suhu, pH, jenis substrat, serta aktivator dan inhibitor enzim. Protease mikroba dapat diklasifikasikan sebagai protease serin, protease sulfydril, protease asam dan metaloprotease (Ward *et al.*, 2009; Yusriah dan Kuswytasari, 2013).

E. Mikroorganisme Penghasil Enzim Protease

Enzim protease dapat dihasilkan dari beberapa sumber, yaitu bakteri, jamur, virus, tumbuhan, hewan dan enzim manusia (Motyan *et al.*, 2013). Protease yang dihasilkan dari berbagai bakteri kebanyakan bersifat basa dan netral, sedangkan protease yang dihasilkan oleh berbagai jamur dapat bersifat asam, netral, dan basa, sedangkan pada virus protease yang dihasilkan adalah protease serin, tiol dan karboksil (Rao *et al.*, 1998).

Berbagai macam jenis bakteri penghasil enzim protease yang cukup potensial seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Protease*, dan *Serratia* (Suhartono 1989). Penelitian yang telah dilakukan oleh Choi dan Kim (2001) tentang identifikasi protease dengan menggunakan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* S-94 yang dapat menghasilkan endopeptidase.

Macam-macam jenis mikroorganisme lain yang dapat menghasilkan enzim protease dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Penghasil protease dari beberapa mikroorganisme

Sumber Protease	pH Optimum	Suhu Optimum (°C)	Sumber Pustaka
<i>Bacillus subtilis</i>	7,5	50	Setyorini, 2006
<i>Bacillus clausii</i>	12,3	60	Saeki, 2007
<i>Curtobacterium luteum</i>	7	50	Kuddus dan Ramteke, 2008
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	7	50	Ren, 2004
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	50	Baehaki, <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus licheniformis</i> Lbb1-11	7	60	Olajuyigbe dan Ajele, 2008
<i>Bacillus sp</i> 31	9	60	Esti, <i>et al.</i> , 2009

F. Kegunaan Protease

Protease adalah salah satu enzim yang memiliki prospek paling baik untuk dikembangkan karena dipandang cukup luas aplikasinya dalam berbagai industri, baik pangan maupun non pangan. Protease menduduki peringkat pertama sebagai enzim yang dipergunakan, serta menyerap sekitar 30-35% dari total enzim yang ada (Rao *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2005).

Protease memiliki kegunaan yang sangat luas baik secara ekonomi maupun dalam dunia medis. Enzim protease yang digunakan dalam industri diantaranya adalah keju, bir, film, deterjen, kulit, tekstil, hidrolisat protein, pengolahan susu, limbah, sedangkan dalam dunia medis enzim protease digunakan sebagai terapi untuk pengobatan tumor, radang, kelainan darah dan pengaturan kekebalan, dalam bidang farmasi protease digunakan untuk membantu penyerapan protein dalam saluran pencernaan, pengobatan luka bakar serta sebagai bahan aktif dalam sediaan kosmetik. Secara spesifik kegunaan protease terlihat pada tabel 2 (Yati *et al.*, 2011).

Tabel 2. Berbagai macam jenis dan fungsi protease serta sumbernya

No	Protease	Fungsi	Sumber Enzim
1.	Fisin	Pengempuk daging dan pengawet bir	Getah pohon ficus
2.	Papain	Pengempuk daging dan pengawet bir	Getah pepaya
3.	Bromelin	Penjernih bir	Nanas
4.	Renin	Proses pembuatan keju dan pudding	Lambung anak sapi, domba atau kambing
5.	Protease dari kapang	Industri keju	<i>Penicillium Roqueforti</i>
6.	Protease bakteri	Menghidrolisis kasein, hemoglobin dan gelatin	Enzim subtilin dari <i>B. Subtilis</i> . Di pasaran dikenal dengan nama <i>Subtilin Carlsberg</i> , <i>subtilin Novo</i> , <i>Subtilin BPN</i>
7.	Tripsin	Hanya memecah ikatan peptida antara lysine dan arginin	Kelenjar pancreas

8.	Kimotripsin	Hanya memecah ikatan peptida antara AA aromatik seperti: tirosin, phenilalanin dan tryptophan	Kelenjar pancreas
9.	Pepsin	Pencernaan protein di <i>lower track</i> (usus)	Mikroba dalam lambung hewan dan manusia
10.	Koagulase	Menghidrolisis kolagen	<i>Clostridium perfringens</i>
11.	Elastase	Menghidrolisis elastin. Elastin memecah ikatan peptide pada AA non-aromatic & tidak bercabang	Pancreas
12.	Keratinase	Memecah ikatan disulfida pada keratin yaitu unsur utama wool, rambut, tanduk, kuku, bulu dan sisik ikan	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Streptomyces microflavus</i>

G. Faktor yang mempengaruhi kerja enzim

Kemampuan protease dalam mempercepat reaksi dipengaruhi oleh beberapa faktor yang menyebabkan enzim dapat bekerja dengan optimal dan efisien. Faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, senyawa inhibitor dan aktivator, pH dan temperatur lingkungan (Noviyanti *et al.*, 2012).

Temperatur mempengaruhi aktivitas enzim. Temperatur sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalis suatu reaksi. Semua enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Kenaikan temperatur melewati temperatur optimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi dan menurunkan kecepatan reaksi enzimatik, serta lemahnya ikatan di dalam enzim secara struktural (Wuryanti, 2004; Pertiwi, 2008). Produksi protease optimal dari *Penicillium* sp. Dihasilkan pada suhu 40°C (Yusriyah dan Nengah, 2013).

Menurut Lehninger (1998) pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Berdasarkan pada skala deviasi pH yang besar, perubahan pH akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi karena

adanya gangguan terhadap berbagai interaksi ion kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3 dimensi enzim. Berdasarkan pH optimumnya, protease di klasifikasikan pada protease asam, netral dan alkalin (Baehaki & Rinto, 2011).

Ion logam dapat berfungsi sebagai aktivator atau inhibitor. Adanya aktivator yang berikatan dengan enzim dapat menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim sedangkan inhibitor jika berikatan dengan menyebabkan penurunan kecepatan reaksi enzimatik (Whitaker, 1994).

Konsentrasi substrat yang rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin banyaknya substrat terikat dengan enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik-titik jenuh tidak dapat lagi meningkatkan kecepatan laju reaksi (Pratiwi, 2008).

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Berdasarkan konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994).

H. Skim dan Kasein

Susu skim merupakan bagian susu yang telah diambil krim setengah atau seluruhnya. Perbedaan susu skim terdapat pada lemak dan vitamin-vitamin yang larut dalam lemak, sedangkan komponen gizi yang terkandung tidak berbeda dengan yang ada pada susu sebelum dipisahkan. Kandungan nutrisi di dalam susu skim 40% protein, 1% lemak, dan 49,20% laktosa. Susu skim banyak digunakan sebagai media untuk menumbuhkan protease (Vratyasloma, 2006).

Kasein merupakan protein utama susu dengan proporsi sekitar 80% dari protein susu atau sekitar 2,8% dari komposisi susu. Kasein terdapat dalam bentuk kasein kalsium, yaitu senyawa kompleks dari kalsium fosfat dan terdapat dalam bentuk partikel-partikel kompleks koloid yang disebut *micelles* (Buckle *et al.*, 2007). Terdapat empat jenis kasein dalam susu antara lain α_1 -casein, α_2 -casein, β -casein dan κ -casein. Kisaran presentase empat jenis kasein di dalam susu adalah

sebesar 37%, 10%, 35%, dan 12% dari keseluruhan kasein susu (Cheema *et al.*, 2015; Fox dan McSweeney, 1998).

Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsium kalseinat. Molekul ini sangat besar dan tidak larut dalam air serta membentuk koloid. Suspensi ini berwarna putih dan dapat diamati secara langsung pada saat disuspensikan ke dalam kultur media padat (Pakhpahan, 2009).

I. Limbah Air Asam Tambang

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

Air asam tambang adalah air yang mempunyai sifat asam yang terbentuk di lokasi penambangan dengan pH yang rendah (pH 2-5) sebagai akibat dari dibukanya suatu potensi kemasaman batu di lokasi tambang sehingga menimbulkan permasalahan terhadap kualitas air dan tanah, dimana pembentukan air asam tambang tersebut di pengaruhi oleh tiga faktor utama yaitu air, oksigen, dan batuan yang mengandung mineral-mineral sulfida seperti pirit, kalkopirit (CuFeS_2), markasit (FeS_2), dan arsenopirit (FeAsS). Air Asam Tambang (AAT) terbentuk sebagai hasil oksidasi mineral sulfida tertentu yang terkandung dalam batuan oleh oksigen di udara pada lingkungan berair (Gautama, 2012).

Penurunan kemasaman lingkungan merupakan kondisi yang cukup sesuai bagi pertumbuhan bakteri asidofilik pengoksida besi dan sulfur. Bakteri yang ada secara alami dapat mempercepat reaksi yang bisa menyebabkan air asam tambang. Proses oksidasi ion Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} dipercepat dengan adanya mikroba pengoksida besi, seperti *Thiobacillus ferrooxidans*. Aktivitas bakteri pengoksida dapat menyebabkan laju oksidasi meningkat hingga 10^6 kali lipat (Hossner dan Doolittle, 2003).

J. Media

Media adalah suatu bahan yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangkan bakteri. Media yang digunakan harus dalam keadaan steril artinya tidak ditumbuhi oleh mikroba lain yang tidak diharapkan. Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematat seperti agar-agar, gelatin, dan sebagainya, maka bentuk media dikenal ada tiga jenis yaitu padat, cair dan semi cair atau padat. Media padat umumnya diperlukan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang mikro alga. Media cair merupakan media yang tidak ditambahkan zat pematat, biasanya dipergunakan untuk perbakaan mikro alga tetapi juga mikro lain, terutama bakteri dan ragi. Media semi cair atau padat adalah medium yang ditambahi dengan agar solid yang disebut agar, biasanya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Sriyanti dan Wijayani, 2008).

K. Metode Uji Aktivitas Protease

Uji aktivitas protease suatu zat digunakan untuk mengetahui apakah zat tersebut dapat menghasilkan enzim protease. Aktivitas protease dapat dilakukan dengan metode difusi. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Metode dengan sumuran atau silinder, dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Diameter zona hambat sekitar cakram sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor fisika kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al.* 2001).

L. Landasan Teori

Proses penambangan batubara menghasilkan air limbah yang berasal dari air buangan pada kegiatan pengolahan/pencucian batubara. Air limbah pertambangan batubara ini sering disebut dengan air asam tambang. Air asam tambang mempunyai sifat asam yang terbentuk di lokasi penambangan dengan pH yang

rendah (pH 2-5) sebagai akibat dari dibukanya suatu potensi kemasaman batu di lokasi tambang sehingga menimbulkan permasalahan terhadap kualitas air dan tanah. Penurunan kemasaman lingkungan merupakan kondisi yang cukup sesuai bagi pertumbuhan bakteri asidofilik pengoksida besi dan sulfur. Bakteri yang ada secara alami dapat mempercepat reaksi yang bisa menyebabkan air asam tambang.

Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran lingkungan dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi, bersifat spesifik dan tidak beracun. Enzim telah dimanfaatkan secara luas pada berbagai industri produk pertanian, kimia dan industri obat-obatan. Tiga sifat utama dari biokatalisator adalah menaikkan kecepatan reaksi, mempunyai kekhususan dalam reaksi dan produk serta kontrol kinetik (Akhdiya, 2003).

Protease merupakan salah satu enzim dalam bidang industri yang nilai komersialnya mencapai 60% dari total penjualan enzim seluruh dunia. Enzim protease adalah enzim yang dapat menghidrolisi protein menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino. Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan maupun mikroorganisme seperti bakteri (Fatoni dan Puji, 2008). Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme penghasil enzim yang paling banyak digunakan sebagai sumber enzim. Bakteri lebih dianggap menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang relatif murah dan mampu menghasilkan enzim (Akhdiya, 2003).

Bakteri yang terdapat didalam air limbah tambang batubara merupakan bakteri yang bersifat asidofilik. Bakteri asidofilik adalah bakteri yang tumbuh pada kondisi asam pada kisaran pH 2-5, serta pada suhu optimumnya berkisar antara 25-45°C (Pakpahan, 2009). Kebanyakan penghasil enzim protease bersumber dari bakteri termofilik yang suhunya berkisar antara 40-80°C, antara lain bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas Tangkuban Perahu Bandung adalah isolat T8 (Tangkuban Perahu di lokasi 8) yang memiliki aktivitas tertinggi, pada suhu 60°C dan pH 8 (Amelinda, 2010), isolat TPT-20 diisolasi dari sumber air panas Semurup Kabupaten Kerinci, Jambi adalah isolat yang memiliki aktivitas proteolitik tertinggi pada suhu 50°C dan pH 8 (Hafiz, 2011). Selain itu

isolasi dan karakterisasi bakteri termofilik penghasil protease asal mata air laut panas Poso, Sulawesi Tengah diperoleh isolat P7-2 memiliki aktivitas proteolitik terbesar pada pH 6 dan suhu 50°C (Sugiyono, *et al.*, 2003). Protease kebanyakan stabil pada suhu normal (mesofilik). Enzim pada umumnya bersifat amfolitik yaitu enzim yang mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal amino (Winarno, 2002). Enzim protease di dalam bidang farmasi digunakan untuk membantu penyerapan protein dalam saluran pencernaan, pengobatan luka bakar serta sebagai bahan aktif dalam sediaan kosmetik (Witarto, 2006).

M. Hipotesis

Pertama, terdapat bakteri hasil isolasi dari air limbah tambang batubara.

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

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah air limbah batubara yang diperoleh di daerah Bakungan Tenggara, Kalimantan Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri asal air limbah batubara yang diambil dari danau pembuangan limbah batubara, diambil pada satu titik. Sampel air diambil sebanyak 300 ml dan dimasukkan ke dalam botol lalu dimasukkan ke dalam *cool box* yang diberi es dianalisis lebih lanjut. Sampel air berwarna kehitaman dan keruh, pengambilan pada bulan Januari 2018.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

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

Variabel utama kedua adalah masing-masing isolat bakteri asal air limbah tambang batubara penghasil enzim protease.

2. Klasifikasi variabel utama

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

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

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah adanya penghasil enzim protease dari beberapa isolat dari 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.

3. Definisi operasional variabel utama

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

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

Ketiga, uji bakteri penghasil enzim protease adalah uji menggunakan metode difusi sumuran dengan melihat diameter zona bening bakteri 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. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: tabung reaksi, jarum ose, cawan petri, inkas, pipet tetes, mikropipet, pipet volum, lampu spiritus, *autoclave*, inkubator, kaca objek, mikroskop dan jangka sorong.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan adalah air limbah tambang batubara yang diperoleh dari Bakungan, Tenggara, Kalimantan Timur.

2.2 Media. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media NA (Nutrien Agar), BHI (*Brain Heart Infusion*), SMA (*Skim Milk Agar*), media SIM, media KIA (*Kliger Iron Agar*), media LIA (*Lysine Iron Agar*) dan media citrat.

2.3. Pewarnaan. Pewarna yang digunakan dalam penelitian ini adalah Gram A (cat kristal violet), Gram B (lugol iodine), Gram C (alkohol), Gram D (cat safranin), *Malacite green*, cat nigrosin.

D. Jalan Penelitian

1. Sterilisasi

Media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan menggunakan autoklaf dan yang tidak ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria, 1985).

2. Pengambilan sampel

Air limbah tambang batubara diambil di perusahaan batubara. Sampel air diambil sebanyak 300 mL yang dimasukkan ke dalam botol. Sampel limbah cair berasal dari satu kolam penampungan limbah yang diambil dengan kedalaman 1 meter. Air limbah tersebut dibawa menggunakan transportasi udara.

3. Pembuatan Medium *Skim Milk Agar* (SMA)

Komposisi medium padat adalah pepton 0,1%, NaCl 0,5%, Agar 2%, skim milk 10% dilarutkan dalam aquades 100 mL. Selanjutnya dipanaskan sampai larut lalu disterilkan dengan autoclave selama 20 menit, didinginkan kemudian dituang pada cawan petri steril yang besar sekitar 50 mL (Chu, 2006).

4. Isolasi mikroorganisme dari air asam tambang

Sampel air diambil dari sumber air asam tambang Bakungan, Tenggarong, Kalimantan Timur yang bersuhu 25°C – 45°C dengan pH berkisar 3-5. Sampel diinokulasikan pada media BHI diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian sampel yang sudah diinkubasi selama 3 hari, sebanyak 100 µL sampel air diinokulasikan pada medium NA dengan cara digores dengan jarum Ose secara 4 kuadran diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian bakteri yang tumbuh secara tunggal di ambil sebanyak 5 isolat. Masing-masing 5 isolat bakteri di perbanyak kedalam media NA diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

5. Identifikasi mikroorganisme dari air asam tambang

Identifikasi dilakukan pada bakteri aerob yang sudah diisolasi. 5 isolat bakteri masing-masing diidentifikasi dengan cara uji morfologi, pewarnaan Gram, pewarnaan kapsul, pewarnaan spora, dan uji biokimia.

5.1. Uji Morfologi. Morfologi bakteri dilakukan secara makroskopis dengan mengamati bentuk koloni isolat dilihat dari atas, permukaan koloni dilihat dari samping dan tepi koloni dilihat dari atas.

5.2. Pewarnaan Gram. Pewarnaan bertujuan untuk memastikan bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas. Isolat bakteri masing-masing diambil 1-2 Ose kemudian dioleskan pada objek gelas. Smear pada objek gelas kemudian ditetesi dengan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama ± 1 menit kemudian di bilas, ditetesi dengan Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram C (alkohol sebagai peluntur) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram D (cat safranin sebagai cat penutup) diamkan ± 1 menit kemudian dibilas. Objek gelas yang

dilakukan pengecatan di lihat di mikroskop, bakteri dinyatakan Gram negatif apabila bewarna merah dibawah mikroskop dan bakteri dinyatakan Gram positif apabila berwarna ungu dibawah mikroskop (Koneman *et al.*, 1983; Volk dan Wheller, 1988).

5.3. Pewarnaan kapsul. Pewarnaan bertujuan untuk melihat apakah bakteri tersebut memiliki kapsul atau tidak. Pewarnaan kapsul dilakukan dengan cara diambil satu 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. Kapsul tidak menyerap warna sehingga terlihat lapisan terang yang tembus dengan latar belakang yang berwarna (Waluyo, 2007).

5.4. Pewarnaan Spora. Pewarnaan bertujuan untuk melihat apakah bakteri tersebut memiliki spora atau tidak. Pewarnaan spora dilakukan dengan membuat preparat bakteri dengan mengambil satu sampai dua Ose isolat bakteri dan satu tetes aquadest steril, difiksasi pada kaca objek, lalu diberikan 2-3 tetes *Malachite green*, lalu dipanas uapkan (sampai uap terlihat) didiamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir, kemudian di teteskan safranin dan dibiarkan selama 30 detik tanpa pemanasan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu diamati dengan mikroskop, spora berwarna hijau sedangkan bagian sel lainnya berwarna merah (Cappucinno, 1983).

5.5. Uji secara Biokimia. Identifikasi berdasarkan uji biokimia dilakukan dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, dan *Citrat*

Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan cara ditusukkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif jika media berwarna hitam, uji indol positif jika terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif jika terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan murni bakteri diinokulasi pada media dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C

selama 18-24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

Media LIA (*Lysine Iron Agar*). Biakan murni bakteri diinokulasi dengan cara tusuk dan gores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Tujuan dari identifikasi ini yaitu untuk menguji lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+).

Media Sitrat. Biakan murni bakteri diinokulasi dengan cara digoreskan kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 18-24 jam. Tujuan dari identifikasi yaitu untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber Karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru.

6. 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.

7. Uji aktivitas protease secara difusi sumuran

Isolat yang sudah diisolasi dan diidentifikasi dilakukan uji aktivitas protease dengan cara pada media *Skim Milk Agar* 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 tersebut dibuat sebanyak 3 ulangan kali untuk melihat perbedaan aktivitas protease pada masing-masing bakteri.

Uji aktivitas protease dilakukan dengan menghitung Indeks Proteolitik pada media *Skim Milk Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil uji

positif dapat dilihat dari adanya zona bening disekitar koloni. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan diameter koloni bakteri (Baehaki dan Rinto, 2011).

$$IP = \frac{\text{Diameter Zona Bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter Koloni}}$$

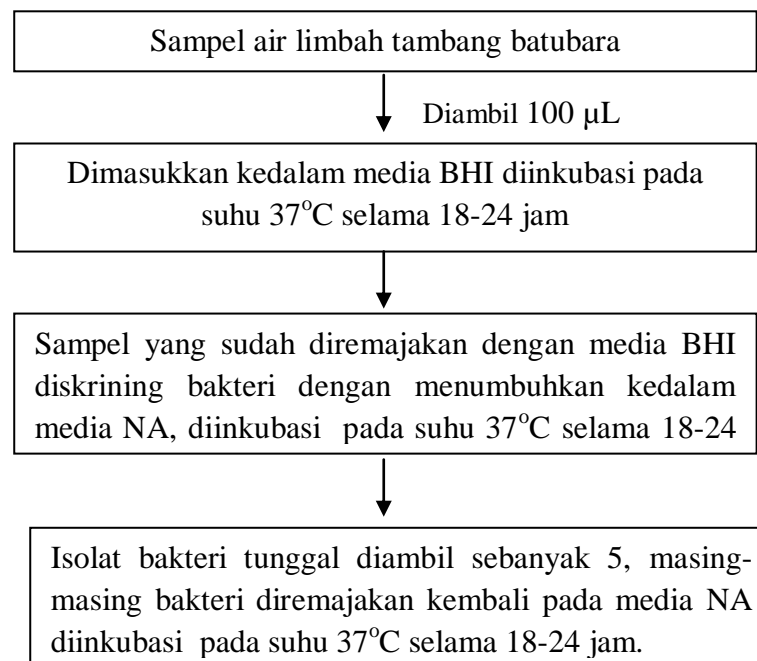
Zona bening kemudian diukur diameter di sekitar sumuran dengan menggunakan jangka sorong.

E. Analisis Hasil

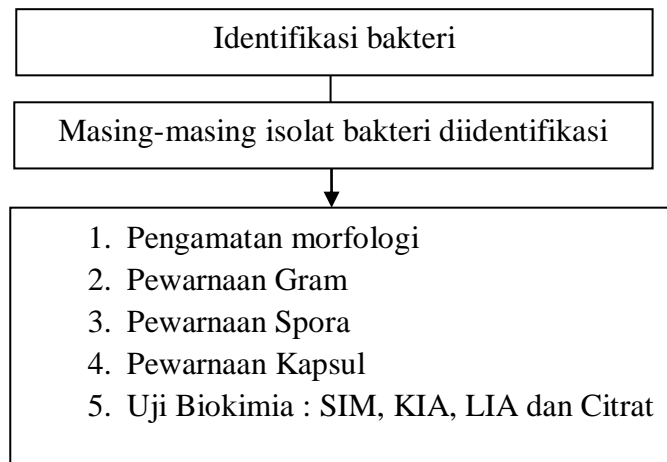
Data hasil penelitian diperoleh dengan mengukur daerah hambatan pertumbuhan bakteri uji yang ditunjukkan dengan adanya zona bening, kemudian diukur diameter hambatan pertumbuhan bakterinya dari masing-masing lingkaran.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* dan dilanjutkan dengan uji *ANOVA*, untuk melihat perbedaan pada kelima isolat menggunakan uji *Student Newman Keuls* (SNK).

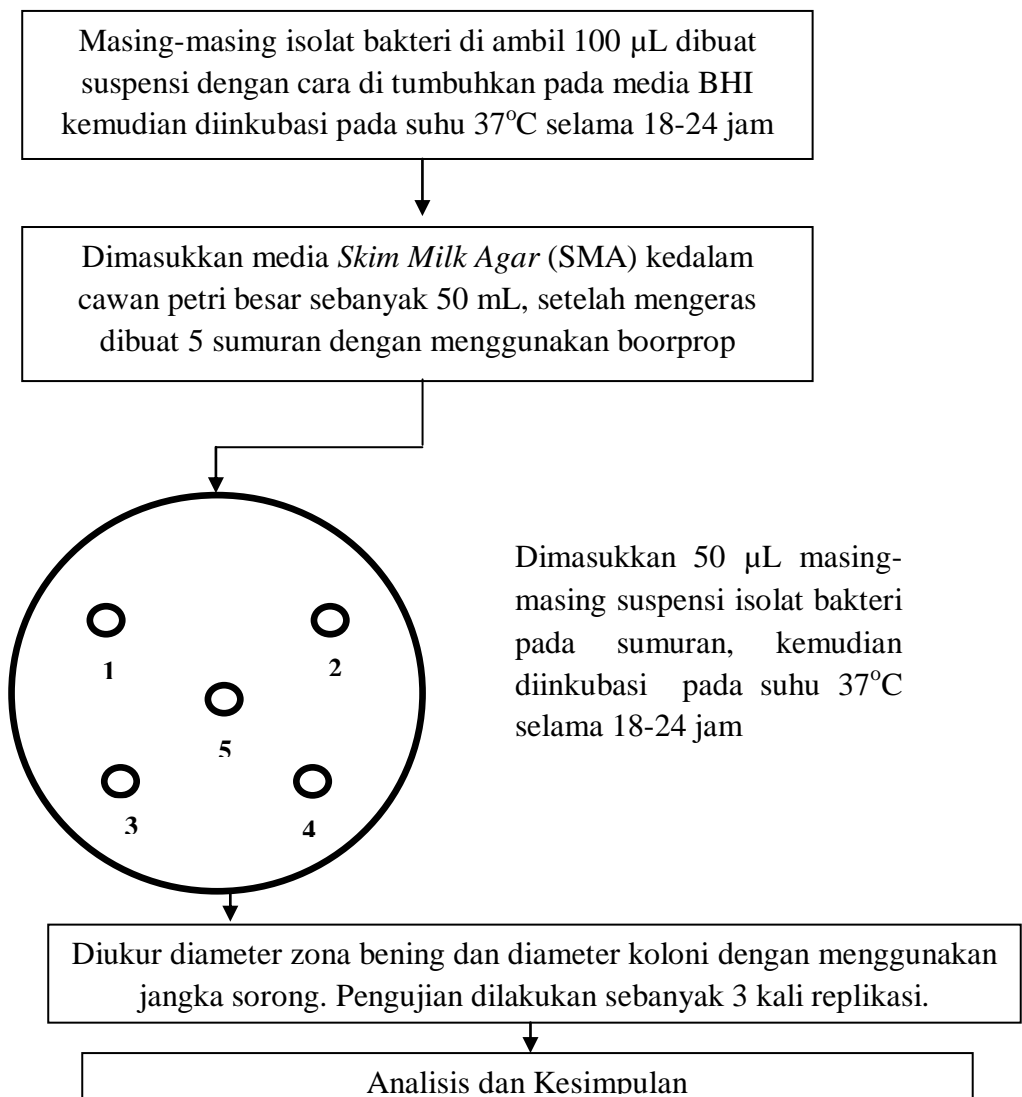
F. Skema penelitian



Gambar 1. Skema isolasi bakteri air limbah tambang batubara



Gambar 2. Skema identifikasi bakteri air limbah tambang batubara



Gambar 3. Skema kerja pengujian aktivitas protease dari isolat bakteri air limbah tambang batubar

BAB IV

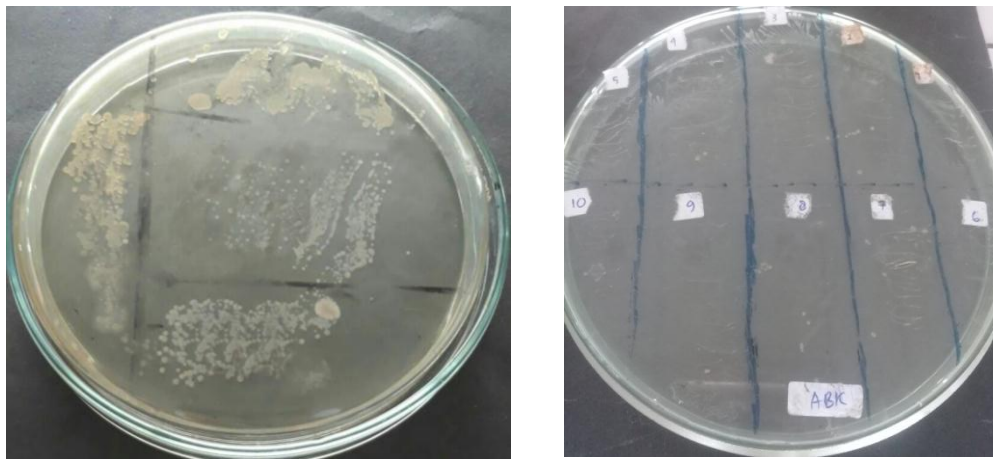
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengambilan sampel

Sampel air limbah tambang batubara yang digunakan dalam penelitian ini di peroleh dari satu lokasi yang ada di kota tenggarong, Provinsi Kalimantan Timur. Air limbah tambang batubara diambil di perusahaan batubara, sampel air diambil sebanyak 300 mL yang dimasukkan ke dalam botol. Sampel limbah cair berasal dari satu kolam penampungan limbah yang diambil dengan kedalaman 1 meter. Air limbah tersebut dibawa menggunakan transportasi udara. Hasil pengambilan sampel bisa dilihat pada lampiran 1.

2. Isolasi Bakteri Air Limbah Tambang Batubara

Hasil isolasi bakteri pada air limbah tambang batubara pada media *Nutrien Agar* yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, didapatkan banyak bakteri yang tumbuh kemudian di seleksi dan diambil sebanyak lima isolat bakteri tunggal. Isolat yang didapat bisa dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Foto isolasi bakteri air limbah tambang batubara

3. Hasil Identifikasi Isolat bakteri air limbah tambang batubara

3.1. Identifikasi bakteri berdasarkan koloni. Identifikasi masing-masing isolat bakteri berdasarkan koloni dilakukan dengan cara inokulasi suspensi bakteri pada media *Nutrien Agar* (NA) dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil pengamatan karakteristik makroskopis terhadap 5 jenis isolat yang memiliki karakteristik yang berbeda. Masing-masing jenis isolat diberi kode nama ALT 1, ALT 2, ALT 3, ALT 4 dan ALT 5 seperti terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengamatan makroskopis koloni bakteri air limbah tambang

No	Kode Isolat	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Tepian Koloni	Elevasi Koloni	Susunan
1	ALT 1	Putih	Bulat	Licin	Timbul	Tunggal
2	ALT 2	Putih	Berbenang-benang	Siliat	Datar	Menyebar
3	ALT 3	Putih	Bulat	Licin	Timbul	Tunggal
4	ALT 4	Putih	Bulat	Licin	Timbul	Tunggal
5	ALT 5	Putih	Bulat	Licin	Timbul	Tunggal

Keterangan : ALT = air limbah tambang

Hasil pengamatan diperoleh 4 bentuk koloni yang sama dan 1 koloni berbeda, yaitu bentuk bulat dan berbenang-benang, warna koloni putih, tepian licin dan siliat, elevasi timbul dan datar. Semua isolat memiliki bentuk, warna, tepian dan elevasi yang sama. Masing-masing bentuk koloni pada isolat yang tumbuh pada cawan petri bisa dilihat pada lampiran 3.

3.2. Identifikasi bakteri berdasarkan mikroskopis dengan pewarnaan Gram, kapsul dan endospora. Hasil identifikasi secara mikroskopis pada isolat bakteri berdasarkan tabel 4 dan gambar identifikasi bisa dilihat pada lampiran 4.

Tabel 4. Hasil identifikasi berdasarkan mikroskopis terhadap isolat bakteri limbah air tambang

No	Isolat bakteri	Bentuk sel	Gram	Kapsul	Endospora
1	ALT 1	Basil	Negatif	+	+
2	ALT 2	Basil	Negatif	+	+
3	ALT 3	Basil	Negatif	+	+
4	ALT 4	Basil	Negatif	+	+
5	ALT 5	Basil	Negatif	+	+

Keterangan : ALT: air limbah tambang (+) = Hasil uji positif

Pewarnaan Gram bertujuan untuk memastikan isolat bakteri yang digunakan termasuk golongan Gram negatif atau Gram positif. Hasil pengamatan pada kelima isolat bakteri semua termasuk golongan Gram negatif yang berbentuk bacilli. Gram negatif yaitu apabila sel bakteri berwarna merah. Penetasan kristal violet (Gram A) akan menyebabkan kristal ungu mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram negatif. Penetasan mordant (*lugol iodine* / Gram B) adanya ikatan kristal violet dengan *iodine* yang akan meningkatkan afinitas pengikat zat warna oleh bakteri. Penetasan Gram C (Alkohol 96%) akan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak sehingga kompleks kristal violet dan *iodine* tidak menempel di dinding sel yang menyebabkan sel Gram negatif menjadi bening. Penetasan counterstain (safranin / Gram D), akan mewarnai sel Gram negatif menjadi warna merah (Volk & Wheller 1988)

Pewarnaan kapsul bertujuan untuk melihat adanya kapsul pada bakteri. Pewarnaan kapsul dilakukan tanpa pemanasan dimana yang diwarnai adalah latar belakang, sedangkan bakterinya sendiri tidak mengalami pewarnaan. Zat warna yang digunakan adalah cat nigrosin dan kristal violet. Hasil pengamatan pada mikroskop kelima isolat bakteri memiliki kapsul dimana bakteri kelihatan transparan (tembus pandang). Kapsul tidak menyerap warna sehingga terlihat lapisan terang yang tembus dengan latar belakang yang berwarna (Waluyo, 2007).

Pewarnaan spora bertujuan untuk melihat adanya spora didalam sel bakteri. Hasil pengamatan pada mikroskop didapatkan spora pada semua isolat bakteri air limbah tambang. Pewarnaan spora menggunakan prosedur pewarnaan *Klein*. Teknik pewarnaan spora dengan menggunakan larutan *malachite green* dipanas uapkan agar zat warna mudah meresap kedalam dinding pelindung spora dan untuk memperjelas pengamatan di warnai dengan safranin (Gram D) sehingga sel berwarna merah (Volk & Wheeler, 1988).

3.3. Identifikasi bakteri berdasarkan biokimia. Hasil identifikasi uji biokimia pada kelima isolat bakteri berdasarkan tabel 5 dan gambar identifikasi biokimia dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 5. Hasil identifikasi berdasarkan uji biokimia terhadap isolat bakteri air limbah tambang

Uji	ALT 1	ALT 2	ALT 3	ALT 4	ALT 5
SIM	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -
KIA	K/AGS(-)	K/AGS(-)	K/AG(+S(-)	K/AG(+S(-)	K/A G S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)	K/K S(-)	K/K S(-)	K/K S(-)
Citrat	+	+	+	+	+

Keterangan :

ALT	= Air limbah tambang	A	= Acid (kuning)
SIM	= <i>Sulfide Indol Motility</i>	K	= Alkali (merah atau ungu)
KIA	= <i>Kliger Iron Agar</i>	S	= Sulfida (hitam)
LIA	= <i>Lisin Iron Agar</i>	G	= Gas
+	= Reaksi positif	N	= Netral
-	= Reaksi negatif		

Hasil uji pada medium SIM (*Sulfida Indol Motility*) bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Pengujian dengan media SIM setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam menunjukkan hasil (- + -) pada semua isolat bakteri. Hasil (-) artinya pada uji sulfida bakteri tidak bisa mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfide yang ditandai dengan media tidak berwarna hitam. Uji indol (+) artinya pada uji indol terbentuk cincin indol warna merah muda pada permukaan media setelah di tambah dengan 3 tetes Erlich A dan B yang artinya bakteri membentuk indol. Uji motilitas (-) ditunjukkan dengan bakteri tidak ada penyebaran pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*).

Hasil uji pada media KIA (*Kliger Iron Agar*) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Uji dengan media KIA setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam menunjukkan hasil K/AGS(-) isolat bakteri ALT(1,2,5) dan isolat bakteri ALT (3 dan 4) K/AS(+S(-). K/A Artinya pada lereng berwarna merah dan dasar media berwarna kuning hal ini menunjukkan bahwa bakteri fermentasi karbohidrat (glukosa dan laktosa), G artinya terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya atau

terangkat media ke atas, S artinya uji sulfida (H_2S) negatif ditandai dengan media tidak berwarna hitam.

Hasil uji pada media LIA (*Lysine Iron Agar*) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Uji dengan media LIA setelah diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 18-24 jam menunjukkan hasil K/KS(-) pada semua isolat bakteri. Hasil K/K Artinya pada bagian lereng dan dasar media akan berwarna ungu hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi medekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media, hasil S(-) artinya media tidak berwarna hitam pada media LIA (*Lysine Iron Agar*) (Volk & Wheller 1988).

Hasil uji pada media citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber carbon tunggal. Uji dengan media citrat setelah diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 18-24 jam menunjukkan hasil (+) pada semua isolat bakteri yang menunjukkan perubahan warna biru pada media citrat. Media citrat terdapat indikator BTB (*Bromo Thymol Blue*) yang merupakan indikator pH jika bakteri mampu menggunakan citrat menyebabkan suasana basa sehingga terjadi peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru (Koneman *et al.*, 1983).

4. Pembuatan suspensi bakteri

Hasil pembuatan suspensi isolat bakteri di standarkan kekeruhannya menggunakan BHI sehingga sama dengan Mc Farland 0,5 dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Foto hasil suspensi bisa dilihat pada lampiran 2.

5. Uji aktivitas protease

Hasil uji aktivitas protease pada kelima isolat bakteri air limbah tambang memiliki aktivitas protease dengan terbentuknya zona bening pada media *skim milk agar* yang setelah diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dikarenakan enzim protease yang dihasilkan dari bakteri proteolitik tersebut telah mampu mendegradasi substrat yang mengandung kasein yang terdapat pada media *skim milk*. Kasein terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino yang larut. Susu skim mengandung kasein yang disertakan ke dalam medium pertumbuhan bakteri yang berfungsi sebagai substrat enzim

(Muharni *et al.*, 2013). Data hasil pengukuran zona bening dari kelima isolat dengan tiga kali sampling dapat dilihat pada tabel 6 dan gambar hasil uji bisa dilihat pada lampiran 6.

Tabel 6. Indeks proteolitik isolat bakteri penghasil protease dari air limbah tambang

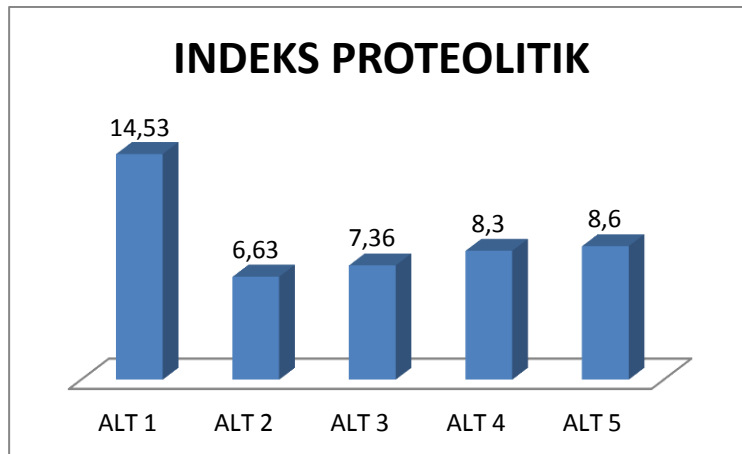
No	Isolat	Diameter Zona bening (mm)			Diameter Koloni (mm)			Indeks Proteolitik (mm)			Rata-rata IP (mm)	SD
		Replikasi			Replikasi			Replikasi				
		I	II	III	I	II	III	I	II	III		
1	ALT 1	18,70	20,60	24,72	7,40	8,40	10,40	15,3	14,5	13,8	14,53	0,75
2	ALT 2	19,00	20,00	25,10	12,40	12,50	13,50	5,3	6	8,6	6,63	1,74
3	ALT 3	20,00	20,10	27,65	12,60	11,70	14,55	5,9	7,2	9	7,36	1,56
4	ALT 4	22,40	23,50	27,86	12,80	13,10	14,34	7,5	8	9,4	8,3	0,98
5	ALT 5	16,10	18,62	20,52	9,4	10,00	10,40	7,1	9	9,7	8,6	1,34

Hasil data pengukuran yang dilakukan tiga kali replikasi dari lima isolat bakteri yang berbeda didapatkan, koloni bakteri terluas yang ditemukan pada air limbah tambang batubara terdapat pada isolat ALT yaitu pada replikasi I sebesar 12,80 mm, replikasi II sebesar 13,10 mm, dan replikasi III sebesar 14,34 mm. Zona bening terluas juga terdapat pada isolat ALT 4 yaitu pada replikasi I sebesar 22,40 mm, replikasi II sebesar 23,50 mm, dan replikasi III sebesar 27,86 mm, sedangkan rata-rata pada indeks proteolitik terluas terdapat pada isolat ALT 1 yaitu sebesar 14,53 mm.

Bakteri proteolitik mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan adanya aktivitas hidrolitik enzim protease dan peptidase. Enzim protease dan peptidase, berperan dalam proses hidrolisis kasein menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut. Kasein di dalam media SMA terhidrolisis ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Abraham *et al.*, 1993).

Aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona bening tersebut. Hasil perombakan polimer protein hanya ditunjukkan dengan adanya

zona jernih yang menandakan protein telah dirombak menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam medium (Irena, 2010).



ALT: isolat bakteri air limbah tambang

Gambar 5. Diagram rata-rata replikasi indeks proteolitik isolat bakteri

Gambar 5 menunjukkan pada isolat bakteri ALT 1 memiliki rata-rata replikasi indeks proteolitik lebih besar dibandingkan dengan ALT 2, ALT 3, ALT 4 dan ALT 5. ALT 4 dan ALT 5 memiliki rata-rata replikasi indeks proteolitik lebih besar dibanding ALT 2 dan ALT 3. Hasil diduga isolat ALT 1 lebih potensial dalam menghasilkan protease. Hasil indeks proteolitik yang berbeda pada masing-masing isolat kemungkinan dipengaruhi oleh spesies bakteri proteolitik karna setiap mikroba menghasilkan enzim yang berbeda sehingga aktivitas yang dihasilkan juga berbeda.

Aktivitas enzim protease terhadap substrat yang baik ditunjukkan dengan nilai indeks proteolitik (IP) yaitu lebih dari tiga (Situmorang, 2014). Berdasarkan rata-rata indeks proteolitik (IP) pada ke 5 isolat bakteri, maka tergolong sebagai bakteri dengan aktivitas protease terhadap substrat baik, yang berarti proses aktivitas enzim protease dalam mengubah protein menjadi asam amino tinggi, nilai indeks proteolitik > 3 yang berkisar antara 6,63- 14,5 mm.

Hasil penelitian (Sirvia *et al.*, 2017), tentang isolasi bakteri penghasil protease dari limbah cair tahu di kota padang, dari 6 pabrik tahu di peroleh 8 isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease, indeks proteolitik yang diperoleh dari masing-masing isolat berkisar antara (1,27-3,48 mm), sedangkan pada hasil

penelitian (Hermiati, 2015), bakteri alkalifilik penghasil protease pada sumber air panas nagari pariangan kabupaten tanah datar, dari 3 sumur air panas yang berbeda di peroleh 8 isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease, indeks proteolitik yang diperoleh dari masing-masing isolat berkisar antara (0,24-1,13 mm), sedangkan pada air limbah tambang batubara dari satu kolam penampungan didapatkan indeks proteolitik dari 5 isolat berkisar antara (6,63-14,53 mm) dimana air limbah tambang batubara lebih baik dalam menghasilkan enzim protease dibandingkan dengan limbah cair tahu dan sumber air panas.

Tingkat aktivitas proteolitik dapat dilihat dari keaktifan enzim dalam menghidrolisis protein. Menurut Yunita (2012), bakteri memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi pada fase logaritmik karena sel berada dalam kondisi optimum untuk metabolisme dan berkembangbiak. Penelitian lain pada produksi protease didapatkan bakteri dengan waktu produksi protease optimum 48 jam adalah *Bacillus subtilis* PE-11 dan *Bacillus licheniformis* Lbb1-11 (Adinarayana et al., 2003; Olajuyigbe dan Ajele, 2008).

Protease merupakan enzim yang berfungsi untuk menguraikan protein di dalam tubuh dan merupakan enzim proteolitik, yang berperan penting dalam struktur dan fungsi semua sel dari makhluk hidup. Penggunaan protease tidak hanya dimanfaatkan dalam tubuh makhluk hidup saja, tetapi juga dimanfaatkan untuk keperluan di berbagai bidang di luar kehidupan makhluk hidup. Protease dalam bidang farmasi digunakan dalam proses deproteinasi yaitu proses menghilangkan protein. Proses deproteinasi ini misalnya digunakan dalam proses pembuatan chitosan, di mana chitosan ini adalah bahan alami yang direkomendasikan untuk digunakan sebagai pengawet makanan karena tidak beracun dan aman bagi kesehatan. Enzim protease juga digunakan untuk membantu penyerapan protein dalam saluran pencernaan, pengobatan luka bakar serta sebagai bahan aktif dalam sediaan kosmetik (Betha, 2009; Witarto, 2006).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Didapatkan hasil isolat bakteri sebanyak 5 isolat dari air limbah tambang batubara di Kota Tenggara. Bentuk morfologi koloni dari 5 isolat bakteri dari air limbah tambang memiliki bentuk yang hampir sama, memiliki warna koloni yang sama yaitu putih, bentuk koloni berbenang-benang dan bulat, tepian yang licin dan siliat, serta elevasi timbul dan datar.
2. Kelima isolat penghasil enzim protease dengan indeks proteolitik berkisar antara 6,63-14,53 mm dimana indeks proteolitik ini lebih baik dalam mengubah protein menjadi asam amino.

B. Saran

Pada penelitian ini merupakan tahap awal dalam isolasi bakteri air limbah tambang diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai klasifikasi isolat bakteri hingga tingkat spesies serta diharapkan dapat melakukan uji proteolitik pada pH yang bervariasi sehingga dapat menghasilkan bakteri yang berbeda dan mampu menghasilkan enzim-enzim yang dapat diaplikasikan dalam industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham A, G., G, Antoni L., & Anon A, C. 1993. Proteolytic Activity of *Lactobacillus bulgaricus* Grown in Milk. *Journal of Dairy Science*. 1498-1505.
- Achterberg EP, VMC Herzl, CB Braungardt, GE Millward. 2003. Metal behaviour in an estuary polluted by acid mine drainage: the role of particulate matter. *Environ. Poll.*121, 283–292
- Adinarayana, K, Sllaiah, P, Prasad, D.S. 2003. Production and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*. 4:E56-64.
- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil. *Jurnal Buletin Plasma Nutfah* Vol. 9 No. 2 Th 2003.
- Amelinda, I. 2010. Isolasi Dan Optimasi Protease Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung [Skripsi]. Departemen Biokimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Baehaki, A. & Rinto. 2011. Karakteristik Protease Dari Isolat Bakteri Asal Tumbuhan Rawa Dari Indralaya. *Jurnal*. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Pertanian. Universitas Sriwijaya.
- Buckle, K.A., Edward, R. A., Fleet, G. H., dan Wootton. 2007. *Ilmu Pangan*. Edisi ke-4. Terjemahan: Hari Purnomo dan Adiono. UI-Press. Jakarta.
- Choi, N.S., and Kim, S.H. 2001. The Effect of Sodium Chloride on The Serinetype Fibrinolytic Enzymes and the Thermostability of Extracellular Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ4. *Journal of Biochemistry and Moleccular Biology*: 34(2).
- Chu, W.H. 2006. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 34:241-245.
- Cohen RRH. 2005. Use microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. *J. Cleaner Prod*. 5:1-2.
- Cappuccino, J.G. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Addison-Wesley: USA.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Clifornia.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- Fatoni, A. Z. & Puji. L. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu. *Jurnal Natur Indonesia* 10 (2), April 2008:83-88.
- Fox, Alvin. 2011. *Enterobacteriaceae, Virbio, Campylobacter, and Helicobacter*. View 29 januari 2018.
- Fox, P. F. Dan McSweeney, P. L. P. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Department of Food Chemistry. University College Cork. Ireland.
- Gautama, R. S. 2012. Pengelolaan Air Asam Tambang. Bimbingan Teknis, Reklamasi dan Pascatambang Pada Kegiatan Pertambangan Mineral dan Batubara. DITJEN MINERAL DAN BATUBARA, KESDM 2012.
- Hafiz, M. K. 2011. Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Kabupaten Kerinci [Tesis]. Pasca Sarjana Universitas Andalas. Sumatera Barat.
- Hajoeningtjas, O.D. 2012. *Mikrobiologi Pertanian*. Graha Ilmu. Yogyakarta. Hal 197.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, USA: Williams and Wilkins.
- Hossner, L.R. and J.J. Doolittle. 2003. Iron sulfide oxidation as influenced by calcium carbonate application. *J. Envi. Qual.* 32:773-780.
- Irena, A. 2010. Isolasi dan Optimasi Protease Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung. Unpublished Thesis. Departemen Biokimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi*. Bandung: Yrama Widya.
- Jawetz E, Melnick, J, Adelberg EA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga*. Surabaya: Penebar Swadaya.
- Jhonson DB, Hallberg KB. 2005. Acid Mine Drainage Remediation Option : Paper Review. *Sci of The Total Environ J.* 338: 3-14.
- Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup Nomor 113 Tahun 2003 tentang Baku Mutu Air Limbah bagi Usaha dan atau Kegiatan Pertambangan Batu Bara.
- Koneman, E.W, Allen, S.D, Dowell, V.R, Sommers, H.M. 1983. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology 2nd ed.* Philadelphia: JB Lippincott Company hlm: 264-284.

- Kuddus, M. dan Ramteke, P.W. 2008. A Cold-Active Extracelullar Metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme Production and Characterization. *J Gen Appl. Microbiol.* 54:385-392
- Lottermoser BG. 2010. *Mine Wastes, Characterization, Treatment and Environmrntal Impacts*. 3rd edition. London (GB) : Springer.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Ninth Edition. Prentice-Hall. London.
- Motyán, J.A., Toth, F., and Tozser, J., 2013. Research Applications of Proteolytic Enzyme in Molecular Biology. *Biomolecules review* 3 (1): 925-931.
- Muchtadi, S. Nurleni & Made. 1992. Enzim dalam Industri Pangan [Skripsi]. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Muharni, Juswardi, Istantina, P. 2013. *Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Protease Dari Sumber Air Panas Tanjung Sakti Lahat Sumatera Selatan*. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung.
- Nascimento, W.C.A dan Martins M.L.L. 2006. Studies on Stability of Protease From *Bacillus sp.* and its Compatibility with Commercial Detergent. Brazilia. *Microbiol*, 37: 307-311
- Olajuyigbe, F.M, Ajele, J.O. 2008. Some properties of extracelullar protease from *Bacillus licheniformis* Lbb1-1 isolated from 'iru', a traditionally fermented African locust bean condiment. *Glob. J. Biotechnol. Biochem.* 3 (1): 42-46.
- Pakpahan, 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara* [Tesis]. Universitas Sumatera Barat: Medan
- Pelczar, M dan Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Cetakan I. Jakarta: UI-Press. Hal. 101
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Penerbit UI-Press: Jakarta.
- Poernomo, A.T. dan Purwanto, D. A. 2003. *Uji Aktifitas crude enzim proteolitik Bacillus subtilis FNCC 0059 hasil fermentasi curah*. *Majalah Farmasi Airlangga*. 3:103-107.
- Poliana J dan Mac CAP. 2007. *Industrial enzymes: structure, function, and applications*. *Dordrecht*: Springer Hal:24.

- Rao, M.B., Tanksale, M.A., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V., 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 599-601, 606-607.
- Ren, S. 2004. Isolation of a Cadmium-Releasing Bacterium and Characterization of Its Novel Protease. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 68(8):1627-1633
- Retno, S. S. 2002. *Metabolit Sekunder. Manfaat dan Perkembangannya dalam Dunia Farmasi*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar UGM. Yogyakarta.
- Risnawati, M dan Cahyaningrum, S.E. 2013. Pengaruh Penambahan Ion Logam Ca Terhadap Aktivitas Enzim Papain. *UNESA Journal of Chemistry*. Volume 2(1): 76-83.
- Saeki. 2007. Detergent Alkali Proteases: Enzymatic Properties, Genes, and Crystal Structures, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(6):501-508.
- Schipper A. 2004. Biogeochemistry of metal sulfide oxidation in mining environments, sediment and soils. Di dalam: Amend JP, Edwards KJ, Lyons TW, editor. *Sulfur Biogeochemistry – Past and Present*. Amerika (USA): Geological Soc. of America. 379:49-62.
- Setyorini, V.P. 2017. *Menristekdikti Resmikan Unit Produksi Enzim Pertama Indonesia*. ANTARANEWS.COM. Diakses 25 Mei 2018.
- Setyorini. 2006. Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular Proteases from *Bacillus subtilis* Strain FP-133, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(2):433-440.
- Sriyanti dan Wijayani. 2008. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia.
- Sugiyono, A. J., Lintang, R. A., Sabe. 2003. Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Suriawiria, U. 1985. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Penerbit Angkasa. Bandung. 60-61:57-58.
- Vasanthakumari, R. 2007. *Textbook of Microbiology*. New Delhi: BI Publications.
- Volk dan Wheeler. 1998. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi kelima. Jilid I. Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Vratyastoma, A. K. 2006. *Optimasi Produksi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Bacillus natto* [Skripsi]. Program Studi Biokimia. Fakultas MIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang: Universitas Muhammadiyah.
- Waluyo, L. 2007. *Mikrobiologi Umum*. Edisi Revisi. Malang: UMM Press; Hal 319 dan 330.
- Wang. 1979. *Fermentation and Enzym Technology*. Mc Graw Hil Book Company. New York.
- Wardani, A. K. dan Nindita, L. O. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Hasil Isolasi dari Whey Tahu. *Jurnal teknologi pertanian* Vol. 13 No. 3: 149-156.
- Whitaker, J. R. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science*. Second Edition. New York: Marcel Decker.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia. Jakarta
- Witarto, A.B. 2006. *Protein Pencerna di Kantong Semar*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. <http://www.lipi.go.id>. Diakses 25 Maret 2013
- Wuryanti. 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivasi Spesisifik Enzim Bromelin dari Buah Nanaa (*Ananas comosus L.*). Artikel: *JKSA*, 7(3):83-87.
- Yati, S.S, Sri, H, R, Ninu, S, dan Elidar, N. 2011. Kemampuan *Bacillus Licheniformis* Dalam Memproduksi Enzim Protease Yang Bersifat Alkalin Dan Termofilik. *Media Litbang Kesehatan*: 21(2):89-95.
- Yusriah dan Kuswytasari, N.D. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium sp.* *Jurnal Sains dan Seni POMITS* Volume 2. No. 1.
- Yusriah dan Nengah, D.K. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium sp.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Badung.

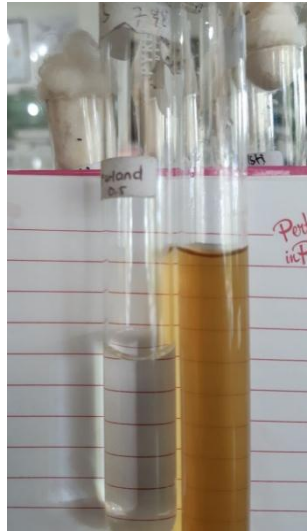
LAMPRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Sampel air limbah tambang batubara



Lampiran 2. Hasil Pembuatan Suspensi Isolat Bakteri

ALT 1



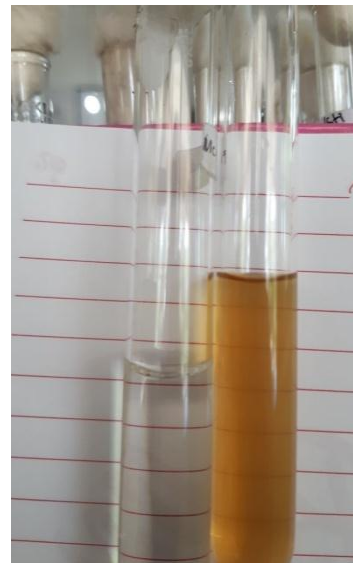
ALT 2



ALT 3



ALT 4



ALT 5

Lampiran 3. Karakter Makroskopis Koloni Lima Isolat Bakteri Hasil Isolasi Dari Air Limbah Tambang Batubara Tenggara



ALT 1



ALT 2



ALT 3



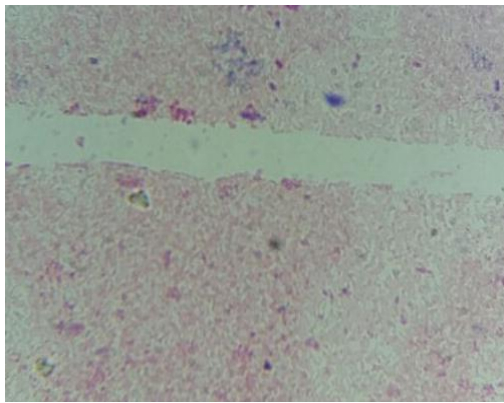
ALT 4



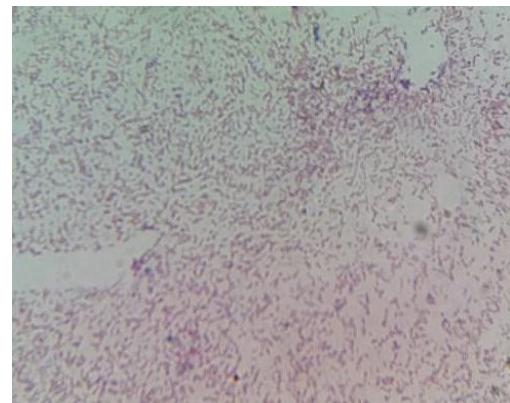
ALT 5

Lampiran 4. Hasil identifikasi berdasarkan mikroskopis terhadap isolat bakteri limbah air tambang

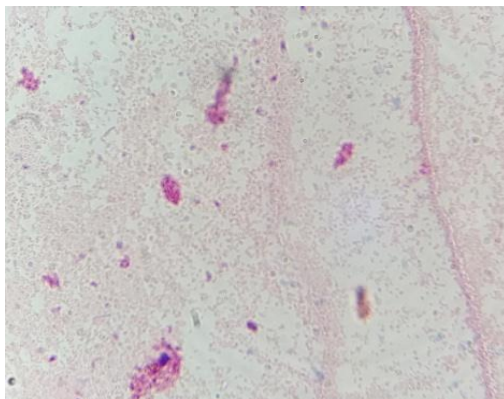
Pewarnaan Gram



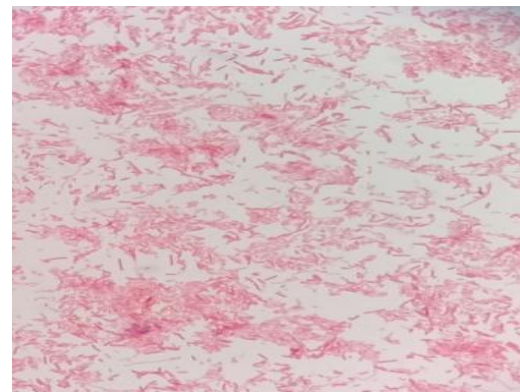
ALT 1



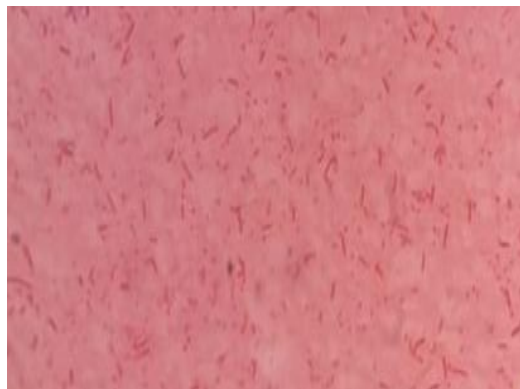
ALT 2



ALT 3

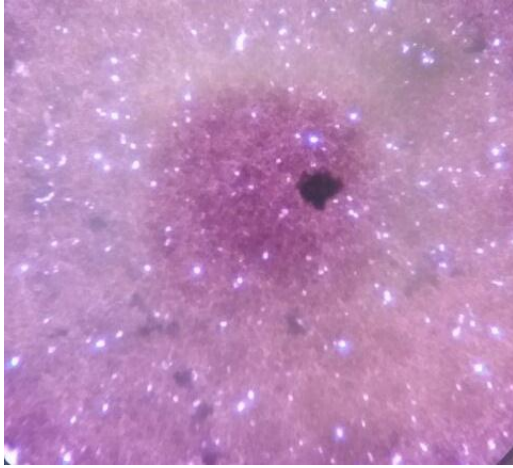


ALT 4

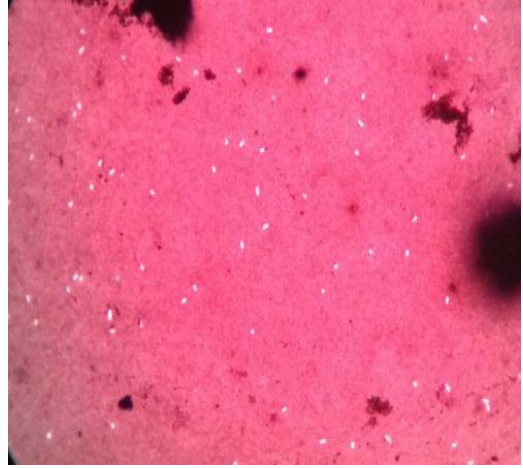


ALT 5

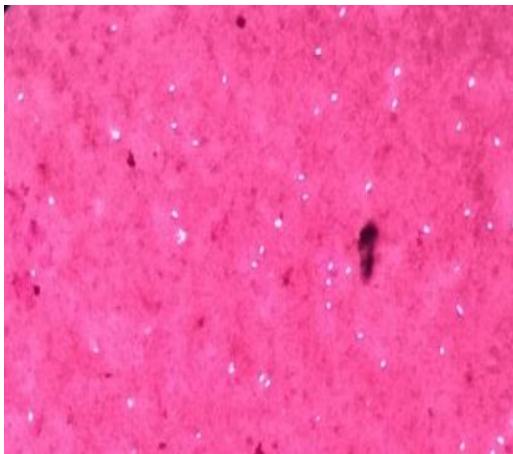
Pewarnaan Kapsul



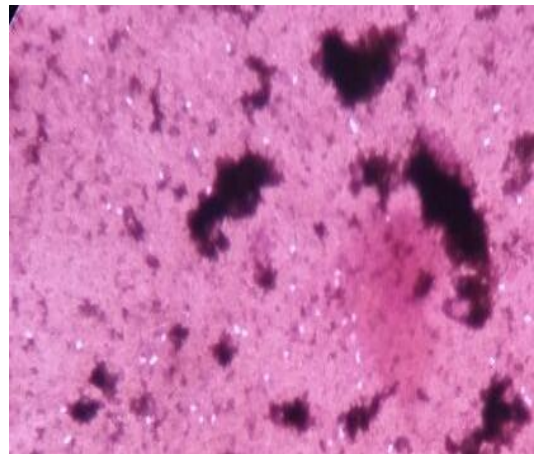
ALT 1



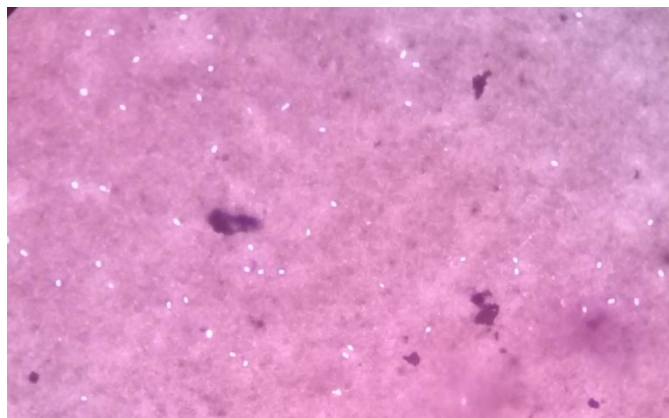
ALT 2



ALT 3

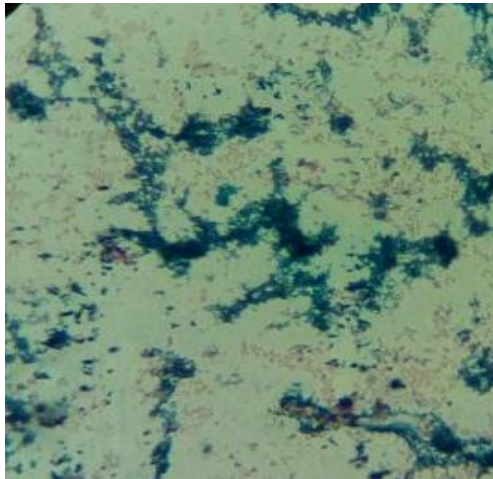


ALT 4

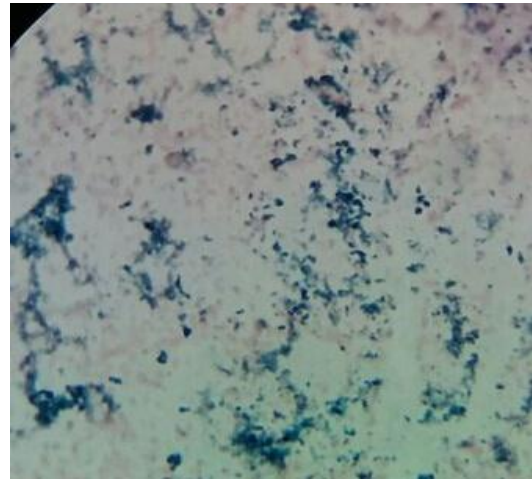


ALT 5

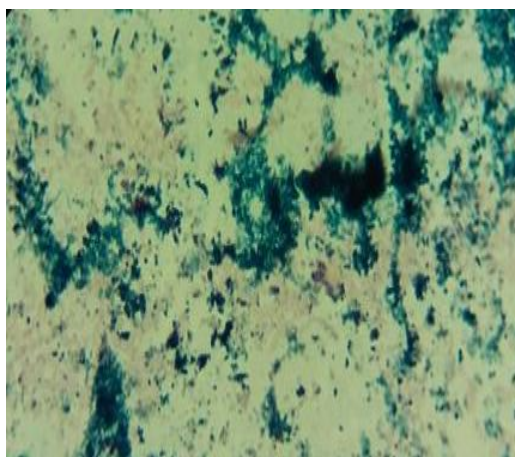
Pewarnaan Endospora



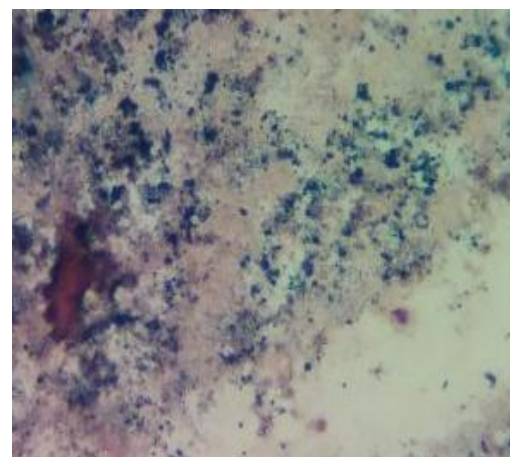
ALT 1



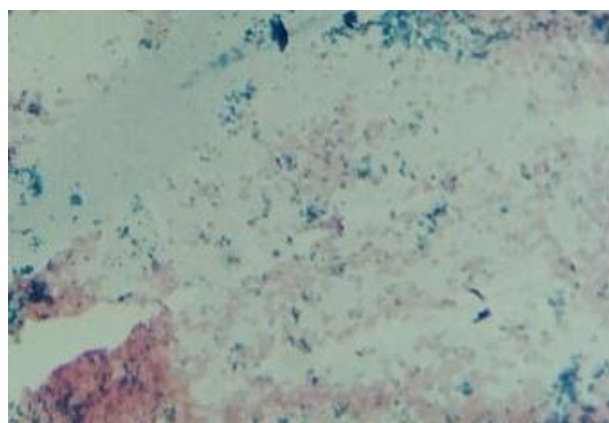
ALT 2



ALT 3

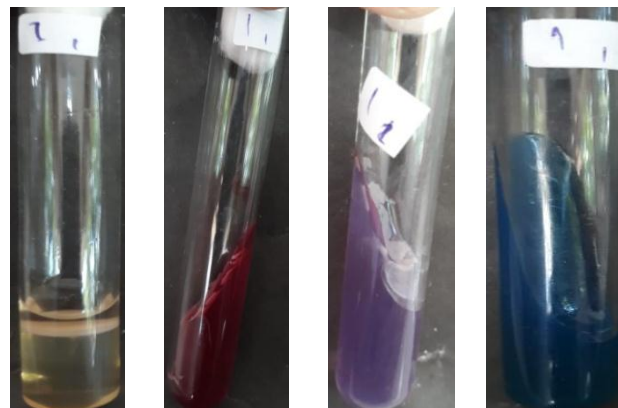
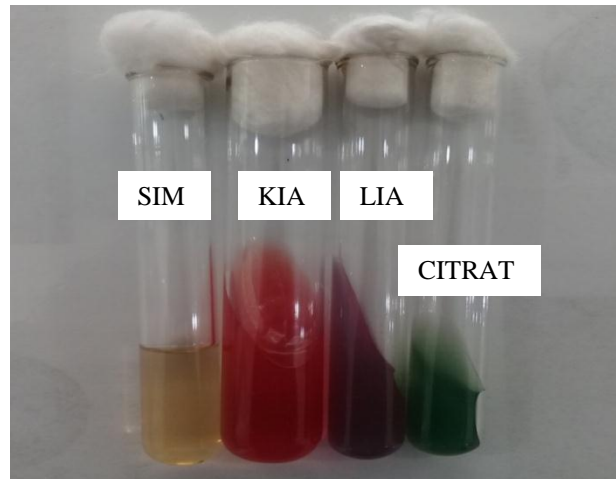


ALT 4



ALT 5

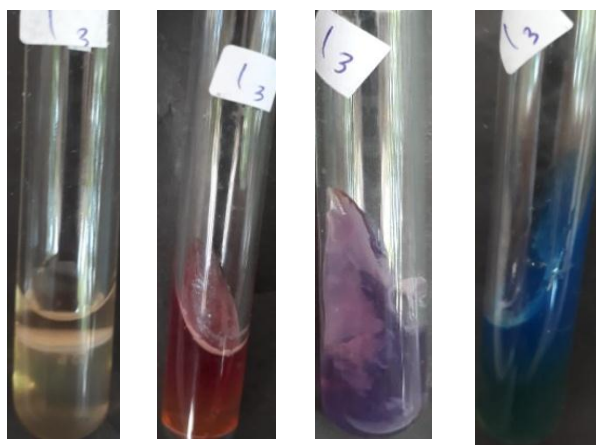
Lampira 5. Hasil identifikasi berdasarkan uji biokimia terhadap isolat bakteri limbah air tambang



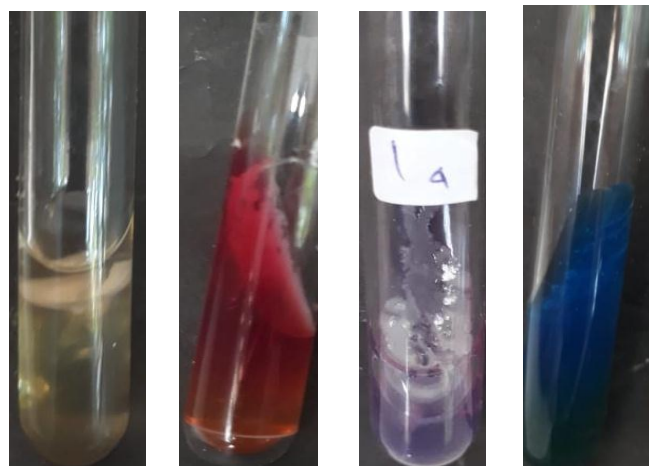
ALT 1



ALT 2



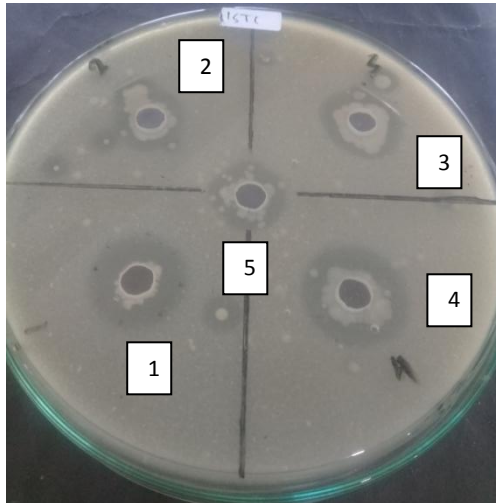
ALT 3



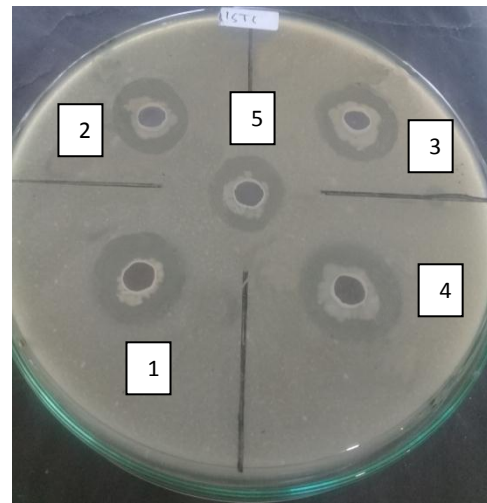
ALT 4



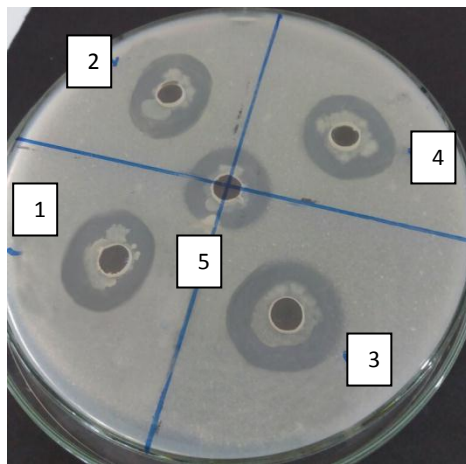
ALT 5

Lampiran 6. Hasil uji aktivitas proteolitik

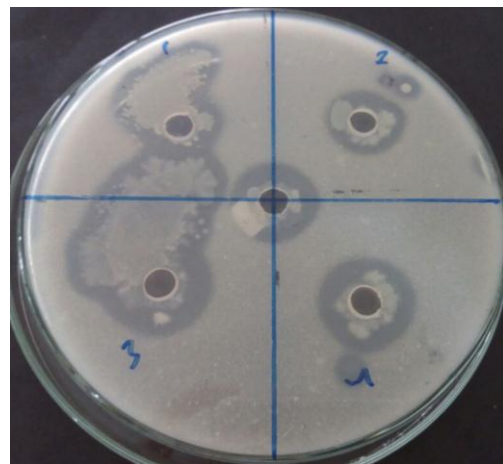
Replikasi I



Replikasi II



Replikasi III



Hasil orientasi

Lampiran 7. Hasil perhitungan indeks proteolitik

$$\text{Indeks Proteolitik} = \frac{\text{Diameter Zona Bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter Koloni}}$$

1. Replikasi I

$$\text{Isolat ALT 1} = \frac{1,870 - 0,740}{0,740} = 1,53 \text{ cm} = 15,3 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 2} = \frac{1,90 - 1,240}{1,240} = 0,53 \text{ cm} = 5,3 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 3} = \frac{2,0 - 1,260}{1,260} = 0,59 \text{ cm} = 5,9 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 4} = \frac{2,240 - 1,280}{1,280} = 0,75 \text{ cm} = 7,5 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 5} = \frac{1,610 - 0,94}{0,94} = 0,71 \text{ cm} = 7,1 \text{ mm}$$

2. Replikasi II

$$\text{Isolat ALT 1} = \frac{2,06 - 0,840}{0,840} = 1,45 \text{ cm} = 14,5 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 2} = \frac{2,0 - 1,250}{1,250} = 0,6 \text{ cm} = 6 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 3} = \frac{2,010 - 1,170}{1,170} = 0,72 \text{ cm} = 7,2 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 4} = \frac{2,350 - 1,310}{1,310} = 0,8 \text{ cm} = 8 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 5} = \frac{1,862 - 1,0}{1,0} = 0,9 \text{ cm} = 9 \text{ mm}$$

3. Replikasi III

$$\text{Isolat ALT 1} = \frac{2,472 - 1,04}{1,04} = 1,38 \text{ cm} = 13,8 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 2} = \frac{2,510 - 1,310}{1,310} = 0,86 \text{ cm} = 8,6 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 3} = \frac{2,765 - 1,455}{1,455} = 0,9 \text{ cm} = 9 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 4} = \frac{2,786 - 1,434}{1,434} = 0,94 \text{ cm} = 9,4 \text{ mm}$$

$$\text{Isolat ALT 5} = \frac{2,052 - 1,04}{1,04} = 0,97 \text{ cm} = 9,7 \text{ mm}$$

Lampiran 8. Bahan-bahan Penelitian

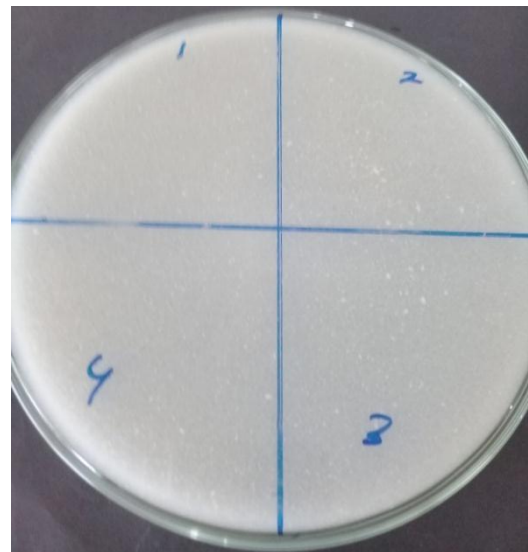
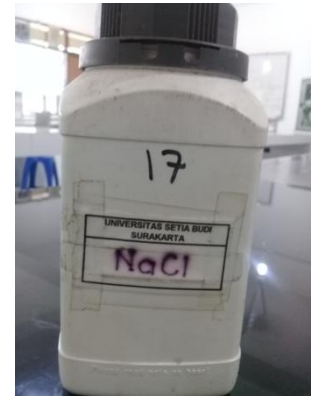
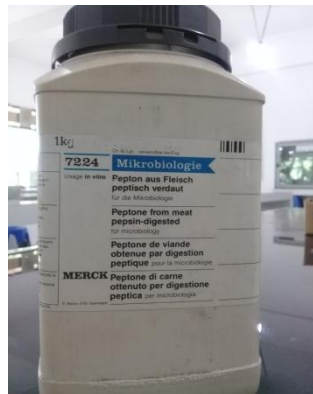


Minyak imersi



Xylol

Lampiran 9. Komposisi Media Skim Milk Agar (SMA)



Lampiran 10. Alat-alat Penelitian

Ose bulat dan Jarum



Vortex



Bunsen



Boor prop



Inkubator



Oven



Inkas



Autoclave



Mikroskop



Mikro pipet



Neraca elektrik



Jangka sorong

Lampiran 11. Hasil uji Statistik

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
indeks proteolitik	15	9.0867	3.11766	5.30	15.30

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		indeks proteolitik
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9.0867
	Std. Deviation	3.11766
Most Extreme Differences	Absolute	.222
	Positive	.222
	Negative	-.135
Kolmogorov-Smirnov Z		.860
Asymp. Sig. (2-tailed)		.450

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

indeks proteolitik

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
I	5	8.2200	4.05611	1.81395	3.1837	13.2563	5.30	15.30
II	5	8.9400	3.29666	1.47431	4.8466	13.0334	6.00	14.50
III	5	10.1000	2.10950	.94340	7.4807	12.7193	8.60	13.80
Total	15	9.0867	3.11766	.80498	7.3602	10.8132	5.30	15.30

Test of Homogeneity of Variances

indeks proteolitik

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.544	2	12	.594

ANOVA

indeks proteolitik

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.997	2	4.499	.425	.663
Within Groups	127.080	12	10.590		
Total	136.077	14			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

indeks proteolitik

Student-Newman-Keuls^a

replikasi isolat	N	Subset for alpha = 0.05	
			1
I	5		8.2200
II	5		8.9400
III	5		10.1000
Sig.			.642

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 12. 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.

