POTENSI BAKTERI AMILOLITIK *INDIGENOUS* MANGROVE TERHADAP DEKOMPOSISI LIMBAH TAMBAK UDANG

SKRIPSI
BUDIDAYA PERAIRAN

OLEH :
GINA DWI HARIANI
NIM. 0410850037

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
MALANG
2009

POTENSI BAKTERI AMILOLITIK *INDIGENOUS* MANGROVE TERHADAP DEKOMPOSISI LIMBAH TAMBAK UDANG

Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mendapatkan Gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

Oleh :
GINA DWI HARIANI
NIM. 0410850037

MENYETUJUI,

DOSEN PENGUJI I	**DOSEN PEMBIMBING I**
(Ir. ARNING WILUJENG E, MS)	**(Prof. Ir. MARSOEDI, PhD.)**
Tanggal:	**Tanggal:**
DOSEN PENGUJI II	**DOSEN PEMBIMBING II**
(Ir. M. RASYID FADHOLI, MSi)	**(Dra. UMI MARWATI, M.Si)**
Tanggal:	**Tanggal:**

MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN

(Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS)
Tanggal:

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulisan laporan skripsi yang berjudul : Potensi Bakteri Amilolitik *indigenous* Mangrove Terhadap Dekomposisi Limbah Tambak Udang ini dapat terselesaikan. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperolah gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari sebagai manusia mempunyai keterbatasan dan kemampuan, maka laporan ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu berbagai saran dan kritik sangat penulis harapkan. Akhir kata penulis berharap semoga karya tulis ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak yang memerlukan.

Malang, Januari 2009

Penulis

RINGKASAN

GINA DWI HARIANI. POTENSI BAKTERI AMILOLITIK *indigenous* MANGROVE TERHADAP KOMPOSISI LIMBAH TAMBAK UDANG **(Dibawah bimbingan Prof. Ir. MARSOEDI, PhD dan Dra. UMI MARWATI, MSi)**

Sejalan dengan perkembangan budidaya udang di Indonesia muncul berbagai masalah dan hambatan yang dapat menyebabkan kegagalan panen sehingga produksi udang menurun. Penurunan produksi udang di tambak khususnya yang dikelola secara intensif disebabkan oleh rusaknya kondisi ekosistem alami tambak. Rusaknya kondisi ekosistem alami tambak tersebut diakibatkan penumpukan limbah bahan organik yang berasal dari sisa pakan, kotoran udang dan bangkai organisme tambak. Tambak udang intensif yang mempunyai intensitas pembentukan limbah bahan organik relatif lebih cepat dibandingkan proses penguraian oleh mikroorganisme.

Usaha untuk mengurangi masalah limbah organik di tambak dilakukan dengan berbagai macam pendekatan meliputi pendekatan fisik, kimia, dan biologis. Pendekatan biologis berpotensi untuk dikembangkan karena lebih ramah lingkungan. Salah satu pendekatan biologis diantaranya adalah mendapatkan inokulum dari kawasan mangrove. Pada kawasan mangrove terdapat diversitas mikroorganisme tinggi yang berfungsi sebagai filter untuk mengolah limbah tambak. Mikroorganisme tersebut mampu mendekomposisi zat yang terkandung dalam limbah. Dalam limbah terdapat kandungan pati dari sisa pakan yang tidak termakan. Pati dapat dihidrolisis oleh bakteri amilolitik. Bakteri amilolitik adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase yang berfungsi menghidrolisis pati menjadi glukosa.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik fisiologi dan morfologi bakteri amilolitik *indigenous* mangrove dan mengetahui isolat terpilih bakteri tersebut dalam mendekomposisi substrat limbah tambak udang. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya, pada bulan Mei 2008-Januari 2009.

Metode yang digunakan adalah deskriptif dan analisis data meliputi pengamatan morfologi koloni, uji biokimia, kurva pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim.

Bakteri amilolitik *indigenous* mangrove yang didapatkan dari hasil isolasi sebanyak 11 isolat. Masing-masing isolat bakteri yang didapatkan memiliki karakter morfologi koloni yang berbeda-beda baik bentuk, tepi, elevasi, dan struktur dalam. Koloni bakteri yang mendominasi kawasan mangrove adalah bakteri yang mempunyai bentuk circular 63,64%, elevasi low convex 63,64%, tepi entire 54,55%, struktur dalam smoath 36,36%, dan berwarna putih 63,64%. Seleksi hasil terbaik dari aktivitas amilolitik ditentukan dengan pengukuran indeks zona bening yang terbentuk paling besar di sekitar koloni. Indeks zona bening yang didapatkan berkisar antara 0,297-5,873. Isolat yang memiliki indeks zona bening paling besar adalah isolat A4 dengan nilai indeks zona bening sebesar 5,873. Hasil karakteristik fisiologi bakteri yaitu pewarnaan gram positif dan pengamatan bentuk sel berbentuk batang. Hasil uji biokimia yang dilakukan adalah uji *Methyl Red* positif, uji *Voges Proskauer* positif, uji katalase positif, uji sitrat simmon negatif, uji motilitas positif, dan uji endospora positif.

Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri pada substrat pati 1% dan substrat limbah diketahui bahwa pada jam ke 0-12 berada pada fase lag. Fase eksponensial pada substrat

pati 1% diketahui pada jam ke 18-24 dan pada substrat limbah pada jam ke 12-24. Fase kematian pada jam ke 48-72 pada substrat pati 1% dan substrat limbah. Jumlah sel tertinggi terdapat pada fase eksponensial yaitu pada jam ke 24 yaitu 18,14 x 10^7 sel/ml pada substrat pati 1% dan 5,27 x 10^7 sel/ml pada substrat limbah. Aktivitas enzim amilase isolat A4 tertinggi pada substrat pati 1% sebesar 0,0544 U/ml didapatkan pada masa inkubasi 24 jam. Aktivitas enzim amilase tertinggi pada substrat limbah sebesar 0,0378 U/ml didapatkan pada masa inkubasi 24 jam. Dari kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim amilase isolat A4 pada substrat pati 1% dan substrat limbah menunjukkan bahwa pada fase eksponensial kurva pertumbuhan bakteri mencapai nilai tertinggi pada aktivitas enzim amilase.

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN ..... **i**

KATA PENGANTAR ..... **iii**

DAFTAR ISI ..... **iv**

DAFTAR TABEL ..... **vi**

DAFTAR GAMBAR ..... **vii**

DAFTAR LAMPIRAN ..... **viii**

DAFTAR ISTILAH ..... **ix**

I. PENDAHULUAN **1**

1.1 Latar Belakang 1
1.2 Perumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.4 Manfaat Penelitian 3
1.5 Hipotesis 4

II. TINJAUAN PUSTAKA **5**

2.1 Limbah Tambak Udang 5
2.2 Kawasan Mangrove 6
2.3 Bakteri Amilolitik 8
2.4 Enzim Amilase 9
2.5 Pati 10

III. MATERI DAN METODE PENELITIAN **12**

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian 12
3.2 Bahan dan Alat 12
3.1.1 Bahan 12
3.1.2 Alat 12
3.3 Prosedur Penelitian 13
3.3.1 Pengambilan Sampel 13
3.3.2 Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Bakteri Amilolitik 13
3.3.3 Screening Bakteri Amilolitik 14
3.3.4 Karakteristik Fisilogi dan Uji Biokimia 15
3.3.5 Kurva Pertumbuhan Isolat A4 Bakteri Amilolitik 18
3.3.6 Aktivitas Enzim Amilase 20
3.4 Metode Penelitian dan Analisis Data 22

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.2. Isolasi, Seleksi, dan Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Amilolitik *indigenous* Mangrove 23
4.2. Seleksi Isolat Amilolitik..... 25
4.3. Karakteristik Fisiologis dan Biokimia 27
4.4. Kurva Pertumbuhan Isolat A4..... 31
4.5. Kurva Aktivitas Enzim Isolat A4..... 33
4.6. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Amilase Isolat A4 34

5. KESIMPULAN DAN SARAN 38

5.1. Kesimpulan 38
5.2. Saran..... 38

DAFTAR PUSTAKA..... 39

LAMPIRAN 45

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan sektor perikanan di Indonesia khususnya usaha di bidang pertambakan udang terus mengalami peningkatan. Peningkatan produksi tersebut dikarenakan tingginya permintaan ekspor udang di pasaran Internasional. Berdasarkan data Dinas Perikanan dan Kelautan Propinsi Jawa Timur, jumlah produksi udang vannamei tahun 2005 sebesar 1.194 ton dengan total nilai produksi sebesar Rp. 33.863.025.000 (Pusdatin, 2006). Pada tahun 2006 produksi udang mengalami peningkatan sebesar 327.260 ton atau mengalami kenaikan sebesar 19,67% dari tahun sebelumnya (Nurdjana, 2007). Salah satu teknologi yang banyak diterapkan oleh pengusaha tambak di Indonesia adalah budidaya udang secara intensif. Menurut Brock and Main (1994) budidaya udang secara intensif adalah budidaya udang yang menerapkan sistem teknologi modern seperti: kincir air, genset, pompa air, dan padat penebaran tinggi dengan dosis pakan yang tinggi pula.

Sejalan dengan perkembangannya muncul berbagai masalah dan hambatan yang dapat menyebabkan kegagalan panen sehingga produksi udang menurun. Penurunan produksi udang di tambak khususnya yang dikelola secara intensif disebabkan oleh rusaknya kondisi ekosistem alami tambak. Rusaknya kondisi ekosistem alami tambak tersebut diakibatkan karena penumpukan limbah bahan organik yang berasal dari sisa pakan, kotoran udang dan bangkai organisme tambak (Syah, Suwoyo, Badu dan Makmur, 2000). Penumpukan limbah bahan organik dalam tambak menyebabkan timbulnya senyawa beracun hasil perombakan bahan organik yang kurang sempurna (Sutanto, 2001; Guntur 1999). Bratvold and Browdy (2000) menyatakan bahwa pada

kondisi alamiah proses penguraian oleh mikroorganisme dapat berlangsung secara seimbang dengan pembentukan bahan organiknya. Berbeda dengan tambak udang intensif yang mempunyai intensitas pembentukan limbah bahan organik relatif lebih cepat dibandingkan proses penguraian oleh mikroorganisme. Ketidakseimbangan antara mikroorganisme dengan limbah organik tambak menyebabkan tertimbunnya bahan organik di dasar tambak. Hal ini dapat menimbulkan pencemaran internal pada lingkungan perairan tambak.

Usaha untuk mengurangi masalah limbah organik di tambak dilakukan dengan berbagai macam pendekatan meliputi pendekatan fisik, kimia, dan biologis. Pendekatan secara fisik dilakukan dengan filtrasi pada air limbah. Pendekatan secara kimia dapat dilakukan dengan menggunakan bahan kimia. Pendekatan biologis biasanya dilakukan dengan mikroorganisme sebagai bioremediator (Osuna, 2007). Pendekatan biologis berpotensi untuk dikembangkan karena lebih ramah lingkungan. Salah satu pendekatan biologis diantaranya adalah mendapatkan inokulum dari kawasan mangrove.

Menurut Holguin *et al*. (2001) pada kawasan mangrove terdapat diversitas mikroorganisme tinggi yang berfungsi sebagai filter untuk mengolah limbah tambak. Mikroorganisme tersebut mampu mendekomposisi zat yang terkandung dalam limbah. Dalam limbah terdapat kandungan pati dari sisa pakan yang tidak termakan. Pati dapat dihidrolisis oleh bakteri amilolitik. Bakteri amilolitik adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase yang berfungsi menghidrolisis pati menjadi glukosa (Ekunsaumi, 2004).

Berdasarkan uraian di atas dilakukan isolasi bakteri amilolitik indigeneous mangrove. Hasil isolasi bakteri amilolitik tersebut diharapkan dapat digunakan sebagai

teknologi alternatif dalam mengurangi tingkat keracunan pada lingkungan internal tambak yang berkelanjutan dan ramah lingkungan.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang dibahas dalam penelitian ini adalah:

1) Bagaimana karakteristik fisiologi dan morfologi bakteri amilolitik *indigenous* mangrove?
2) Bagaimana isolat terpilih bakteri amilolitik *indigenous* mangrove dalam mendekomposisi substrat limbah tambak udang?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk

1) Mengetahui karakteristik fisiologi dan morfologi bakteri amilolitik *indigenous* mangrove.
2) Mengetahui isolat terpilih bakteri amilolitik *indigenous* mangrove dalam mendekomposisi substrat limbah tambak udang.

1.4 Manfaat Penelitian

Isolat dari hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bioagent untuk penanganan limbah tambak udang. Aplikasi lebih lanjut dari isolat tersebut untuk mendekomposisi substrat limbah tambak udang sehingga keseimbangan ekosistem dapat terjaga.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga isolat bakteri amilolitik *indigenous* mangrove tidak mampu menguraikan senyawa-senyawa amilum dalam limbah tambak udang.

H_1 : Diduga isolat bakteri amilolitik *indigenous* mangrove mampu menguraikan senyawa-senyawa amilum dalam limbah tambak udang.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Limbah Tambak Udang

Usaha pertambakan udang khususnya yang dikelola secara intensif merupakan kegiatan yang potensial menghasilkan limbah organik. Limbah organik tersebut berasal dari pakan yang tidak termakan, feses dan kematian massal plankton (Baliao dan Tookwinas, 2002). Kordi dan Andi (2007) menambahkan bahwa masukan limbah organik terbesar pada budidaya udang yang dikelola secara intensif berupa senyawa nitrogen. Senyawa ini 93% berasal dari pakan, selebihnya dari pupuk 2%, dan bahan lain yang terbawa air dan masuk ke tambak sekitar 5%. Pakan udang biasanya terdiri dari protein, senyawa nitrogen dan lemak. Tingginya kadar protein, senyawa nitrogen lainnya serta lemak dalam pakan udang, menyebabkan kualitas bahan organik yang dihasilkan lebih potensial mencemari lingkungan perairan tambak.

Hasil pembuangan limbah tambak udang yang dikelola secara intensif ke perairan muara cenderung meningkatkan kandungan padatan tersuspensi total (TSS); karbondioksida (CO_2) bebas, kandungan bahan organik (BO), nitrat (NO_2), dan fosfat (PO_4^{3-}); cenderung menurunkan kandungan oksigen (O_2) terlarut (Anggraeni, 2007).

Solusi untuk mengatasi masalah limbah tersebut dapat dilakukan dengan pendekatan secara fisik, kimia, dan biologis.

1. Pendekatan Secara Fisik

Pendekatan fisik adalah pendekatan yang dilakukan dengan menggunakan resirkulasi dan filter pada buangan air tambak. Air dari tambak difilter dan diendapkan di kolam pengendapan. Kolam ini berfungsi untuk mengendapkan air agar zat hara terlarut dan butiran zat padat dapat berkurang. Air dari kolam pengendapan di filter

kembali selanjutnya dibuang atau dialirkan pada petakan budidaya. Pengolahan secara fisik ini mampu mengolah dalam bentuk air dan dalam bentuk substrat belum teratasi (Bahtiar, 2008).

2. Pendekatan Secara Kimia

Pendekatan kimia dapat dilakukan dengan menggunakan bahan kimia seperti kapur. Tambak yang sudah beberapa kali digunakan pada umumnya memiliki pH yang rendah. Hal ini disebabkan terjadinya proses pembusukan bahan organik berupa sisa pakan dan kotoran udang sehingga menghasilkan asam dari proses oksidasi. Penurunan pH dapat diatasi dengan pemberian kapur pada tambak untuk meningkatkan nilai pH (Gumilar, 2008).

3. Pendekatan Secara Biologis

Pendekatan biologis dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme, fungi, dan tanaman hijau yang digunakan untuk mengembalikan kondisi suatu lingkungan yang telah tercemar kepada kondisi semula. Mikroorganisme, fungi, dan tanaman hijau mampu memanfaatkan senyawa-senyawa mineral yang terkandung dalam limbah tambak menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Kelebihan pendekatan biologis ini adalah lebih ramah lingkungan, biaya penanganan relatif lebih murah, dan lebih fleksibel (Venosa *et al*., 1998).

2.2 Kawasan Mangrove

Menurut Romimohtarto dan Juwana (2001) ekosistem mangrove didefinisikan sebagai daerah pasut dari pantai berlumpur dan teluk, goba dan estuari yang didominasi oleh halofita (Halophyta), yakni tumbuh-tumbuhan yang hidup di air asin, berpokok dan

beradaptasi tinggi, yang berkaitan dengan anak sungai, rawa dan banjiran, bersama-sama dengan populasi tumbuh-tumbuhan dan hewan.

Mangrove dapat tumbuh dan berkembang secara maksimum dalam kondisi dimana terjadi penggenangan dan sirkulasi air permukaan yang menyebabkan pertukaran dan pergantian sedimen secara terus-menerus. Sirkulasi yang tetap (terus-menerus) meningkatkan pasokan oksigen dan nutrien untuk keperluan respirasi dan produksi yang dilakukan oleh tumbuhan. Perairan dengan salinitas rendah akan menghilangkan garam-garam dan bahan-bahan alkalin, mengingat air yang mengandung garam dapat menetralisir kemasaman tanah. Mangrove dapat tumbuh pada berbagai macam substrat. Mangrove tumbuh pada berbagai jenis substrat yang bergantung pada proses pertukaran air memelihara pertumbuhan mangrove (Dahuri *et al.*, 1998).

Mangrove memiliki produktivitas primer paling tinggi. Mangrove memberikan kontribusi besar terhadap mikroorganisme sebagai sumber energi bagi biota yang hidup di perairan sekitarnya (Dahuri, 2003). Menurut Feliatra (2001), kawasan mangrove mempunyai diversitas mikroorganisme diantaranya bakteri selulolitik, proteolitik, amilolitik dan masih banyak yang lain. Keragaman mikroorganisme disebabkan pada kawasan mangrove kaya akan bahan-bahan organik yang bersumber dari:

1) Daun-daun mangrove yang gugur. Daun-daun ini mengandung banyak serat yang dapat menjadi substrat untuk tumbuhnya bakteri selulolitik;
2) Organisme yang telah mati. Organisme ini mengandung banyak protein yang dapat menjadi substrat untuk tumbuhnya bakteri proteolitik;
3) Bahan-bahan organik dari buangan limbah tambak yang sebagian besar berasal dari pakan. Bahan-bahan ini banyak mengandung protein dan karbohidrat yang dapat menjadi substrat untuk tumbuhnya bakteri proteolitik dan bakteri amilolitik.

Hasil isolasi bakteri pada kawasan mangrove di Bhitarkanika Malaysia didapatkan sebanyak 567 isolat. Sumber isolat yang diisolasi berasal dari berbagai area di kawasan mangrove tersebut. Hasil isolasi tersebut adalah dari udara sebanyak 110 isolat, air 162 isolat, tanah 53 isolat dan tanaman mangrove 242 isolat (Gupta and Basak, 2007). Hal ini membuktikan bahwa pada daerah mangrove terdapat berbagai macam mikroba.

2.3 Bakteri Amilolitik

Bakteri amilolitik adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase yang berfungsi memecah pati atau glikogen menjadi glukosa atau maltosa (Winarno, 2002). Amilase diproduksi oleh banyak mikroba, akan tetapi mikroba yang sering digunakan dalam skala industri adalah *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens,* dan *Aspergillus niger* (Pen *et al.*, 1998).

Bacillus subtilis merupakan bakteri gram positif, katalase positif yang secara umum ditemukan di tanah. Enzim yang dihasilkan bakteri ini berfungsi sebagai zat aditif yang ditambahkan diterjen. *Bacillus licheniformis* merupakan bakteri yang umumnya ditemukan pada tanah. Bakteri ini termasuk golongan gram positif yang bersifat termofilik. Suhu optimal yang dibutuhkan untuk sekresi enzim oleh bakteri ini adalah sekitar 37^{o}C. Bakteri ini mempunyai kemampuan yang sama dengan bakteri *Bacillus subtilis* (Pen *et al.*, 1998).

Bacillus amyloliquefaciens merupakan bakteri gram positif, katalase positif, aerobik, berbentuk batang dan motil. Bakteri ini merupakan organisme yang sebagian besar ditemukan di sampel tanah di alam dan dikenal sebagai golongan bakteri yang mempunyai kemampuan untuk mendegradasi protein ekstraseluler. Selain itu, bakteri ini mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim *alpha*-amilase dan serin protease.

Apun *et al.* (2000) menyatakan bahwa bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* mampu menghasilkan enzim selulase dan amilase yang mampu mendegradasi limbah sagu. *Aspergillus niger* sering ditemukan di tanah, enzim bernilai tinggi yang dihasilkannya digunakan dalam industri fermentasi, seperti glukoamilase yang digunakan pada produksi sirup jagung dengan kandungan fruktosa yang tinggi (Black, 2005).

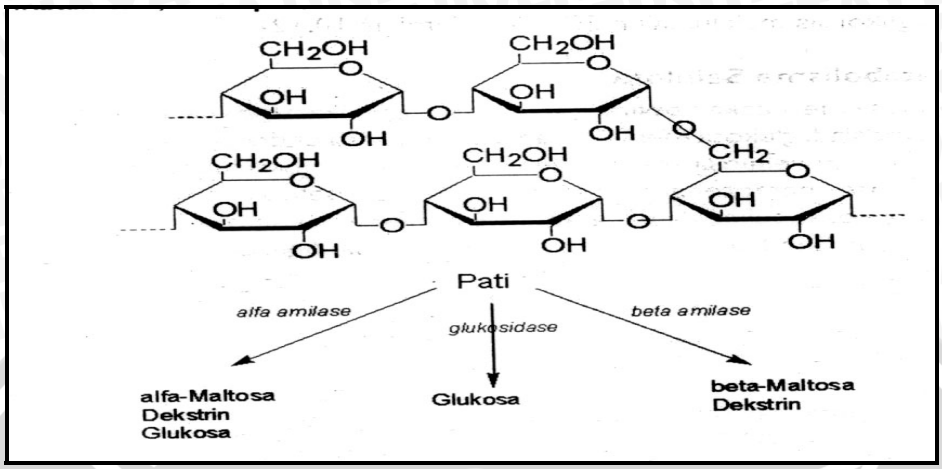
2.4 Enzim Amilase

Enzim merupakan protein yang esensial dalam proses metabolisme dari semua makhluk hidup dan memiliki peran penting pada proses degradasi material organik, mengatur alur katabolisme dan anabolisme serta mengontrol proses biokimia pada makhluk hidup. Enzim yang sering digunakan dalam skala industri adalah enzim amilase (Alves *et al.*, 2002).

Enzim amilase merupakan enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel tetapi di keluarkan ke medium fermentasi untuk kelangsungan hidupnya. Untuk mengisolasi bakteri yang memproduksi enzim tertentu, diperlukan substrat yang dapat menginduksi produksi enzim tersebut oleh sel bakteri (Fardiaz, 2000). Pati dapat menjadi sumber substrat untuk memproduksi enzim amilase (Ajayi and Fagade, 2003; Oliveira *et al.*, 2007; Calik and Ozdamar, 2001).

Amilase adalah enzim yang berfungsi pemecah pati menjadi glukosa. Pemecah pati menjadi glukosa sedikitnya memerlukan 3 enzim, yaitu α-amilase, β-amilase, dan β-glukosidase. α-Amilase yang memecah ikatan α-1,4 menghasilkan glukosa, maltose, dan dekstrin. β-Amilase memecah pati dari ujung nonreduksi menjadi β-Maltosa dan dekstrin. β-Glukosidase memecah ikatan β-1,6 pada rantai cabang dekstrin menjadi glukosa. Pada bakteri tertentu peran β-glukosidase digantikan oleh glukoamilase yang

mampu memecah ikatan α-1,4 dan β-1,6 (Purwoko, 2007; Horvathova *et al.*, 2000). Degradasi pati menjadi glukosa dapat dilihat pada Gambar 1.



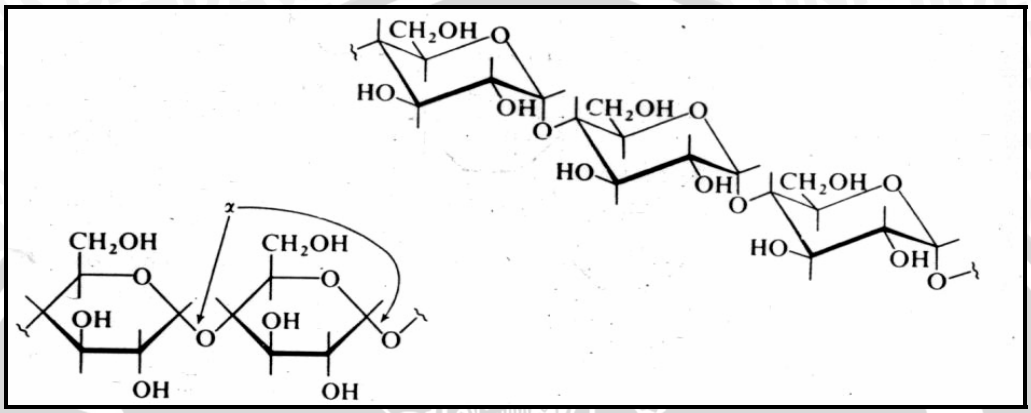
Gambar 1. Degradasi Pati menjadi Glukosa

2.5 Pati

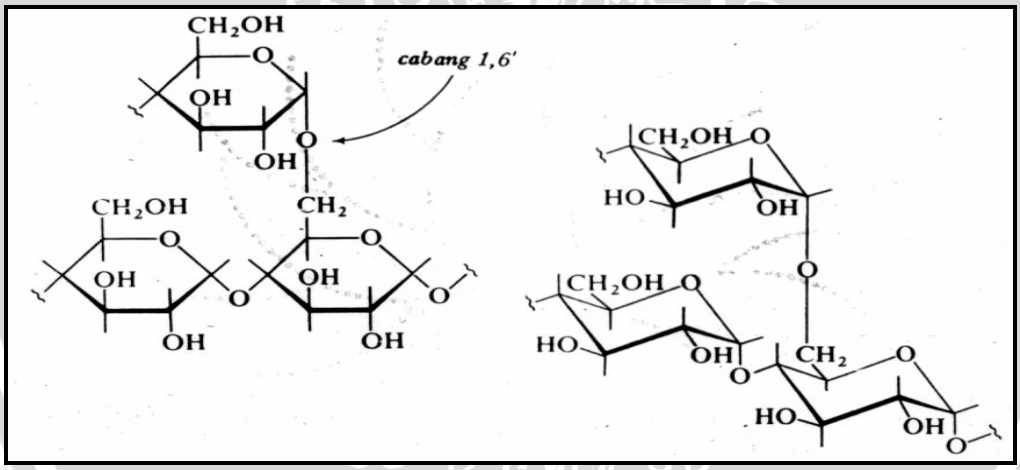
Pati merupakan cadangan gizi pada tumbuhan. Pati terjadi secara alami dalam granul-granul kecil di dalam akar, biji dan batang berbagai tumbuhan, termasuk jagung, padi, jawawut, barley dan kentang. Pati berfungsi sebagai bahan makanan sehingga sering dipakai dalam industri makanan dan fermentasi. Pati kadang-kadang juga dipakai dalam formulasi-formulasi bahan perekat (lem kanji), bahan pengental (*sizing agent*) dalam industri-industri kertas dan tekstil (Stevens, 2001).

Pati terdiri dari 2 polisakarida yakni pati yang tidak bercabang disebut amilosa, dan pati yang bercabang yang disebut amilopektin. Amilosa dan amilopektin dapat dibedakan berdasarkan kelarutannya. Amilosa berstruktur linier dengan berat molekul berkisar antara 30 ribu-1 juta. Amilopektin sangat bercabang melalui karbon 6 dan memiliki berat molekul di atas 1 juta. Baik amilopektin maupun amilosa dengan cepat dihidrolisis oleh α-amilase, yang biasanya dihasilkan oleh kelenjar air liur dan pankreas.

Amilase bekerja dengan memecah ikatan α-1,4 bagian dalam molekul menghasilkan maltotriosa, maltosa, α dekstrin (Stryer, 2000; Biogen, 2007; Riaz *et al.*, 2003). Fessenden dan Fessenden (1999) menambahkan perbedaan antara amilosa (Gambar 2) dan amilopektin (Gambar 3) dapat dilihat dari struktur molekulnya:



Gambar 2. Amilosa



Gambar 3. Amilopektin

Menurut Fessenden dan Fessenden (1998) perbedaan antara amilosa dan amilopektin lainnya adalah bila dilarutkan dalam air, amilosa membentuk micelles. Amilosa dalam micelles ada dalam konformasi helisal, yang dapat menangkap iodium dan memberikan warna biru yang khas. Amilopektin bila dilarutkan dalam air jika berinteraksi dengan iodium akan memberikan warna merah ungu, bukan warna biru tua seperti pada amilosa.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya, pada bulan Mei 2008-Januari 2009.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel (air) dari mangrove, limbah tambak, kapas, tisu, akuades, spirtus, plastik wrapper, plastik tahan panas, kertas label, kertas saring, glukosa, alkohol 70%, larutan garam fisiologis (0,85% NaCl), glukosa, NB (*Nutrien Broth*), pewarna malikat hijau, pewarna safranin, media MIO (*Motility Indole Ornithine*), media sitrat simon, larutan formalin 4% dan phosphat buffer (pH 7).

Bahan-bahan yang terdapat pada komposisi dan reagen yang terlampir pada Lampiran 1 adalah media selektif, gram iodine solution, media Luria Bertani Agar (*LA*), media produksi pati 1%, larutan DNS 1%, larutan Na-K-Tartarate 40%, media MR/VP, reagen uji MR, reagen Barrit A dan B, larutan pewarnaan gram, larutan H_2O_2 3% dan ekstrak limbah tambak.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: botol aqua, beaker glass, tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, jarum ose, bunsen, korek api, penggaris, kain lap, shaker, sentrifuge, oven, jarum enten, objek glass, cover glass, pipet, mikropipet,

autoklaf, inkubator, karet, kulkas, kompor, rak, botol semprot, hemocytometer, vortex, spektrofotometer.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel

a. Sampel Kawasan Mangrove

Sumber isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah air kawasan mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo. Pengambilan sampel air mangrove dilakukan pada bulan Juni tahun 2008. Sampel tersebut merupakan pencampuran dari lima titik yang diambil secara acak kemudian dihomogenkan menjadi satu sampel.

b. Sampel Limbah Tambak Udang

Limbah tambak udang (substrat) yang digunakan untuk pengujian kemampuan isolat A4 dalam mendekomposisi limbah tambak udang. Pengambilan substrat berasal dari tambak udang pasca produksi yang terletak di Kecamatan Tongas, Kabupaten Probolinggo. Substrat tersebut diambil pada kedalaman 1-5 cm dan diuji komposisi limbah tambak (Lampiran 4) untuk mengetahui besarnya unsur yang terbentuk.

3.3.2 Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Bakteri Amilolitik

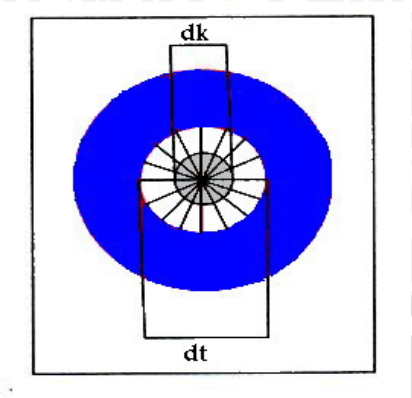
Sampel air mangrove sebanyak 5 ml dicampur ke dalam 45 ml garam fisiologis (*garfis*) 0,85% untuk dilakukan pengenceran. Suspensi diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan garfis untuk pengenceran berseri hingga didapatkan pengenceran 10^{-8}. Kemudian dari tiap seri pengenceran diambil sebanyak 1 ml untuk diinokulasikan ke dalam media selektif (Lampiran 1) dengan metode cawan tuang

(*pour plate*). Selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam atau sampai koloni terbentuk pada suhu ruang. Isolat yang tumbuh selanjutnya diamati morfologi koloninya yang meliputi bentuk, tepi, elevasi, struktur dalam dan warna koloni.

Koloni-koloni tersebut selanjutnya dimurnikan secara *kuadran streak* pada media LA (*Luria Bertani Agar*), kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Koloni tunggal yang terbentuk selanjutnya diinokulasikan pada media miring NA (*Nutrient Agar*) sebagai stok kultur murni.

3.3.3 Screening Bakteri Amilolitik

Stok kultur murni pada media miring diinokulasikan pada cawan yang berisi media selektif. Inokulasi pada cawan yang berisi media selektif dilakukan dengan metode totol. Selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam atau sampai koloni terbentuk dalam suhu ruang. Media selektif yang telah tumbuh koloninya ditetesi dengan iodin hingga seluruh media tergenangi. Diamati perubahan warna di sekitar koloni yang tumbuh setelah digenangi oleh iodin. Koloni yang dapat menghidrolisis pati akan membentuk zona bening di sekitar koloni. Zona bening di sekitar koloni terbentuk akibat bakteri amilolitik tersebut menunjukkan aktivitasnya. Jika pati tidak dihidrolisis, medium akan berwarna coklat atau biru/hitam. Dari beberapa koloni akan dipilih yang paling kuat menghidrolisis pati tersebut. Hal ini dapat diketahui dari koloni-koloni yang membentuk zona bening kemudian dipilih yang memiliki indeks zona bening paling besar. Perhitungan indeks zona bening dapat dilihat pada Gambar 4 (Marwati, 2007). Selanjutnya isolat dari koloni tersebut akan digunakan untuk pengujian selanjutnya. Pengujian selanjutnya meliputi karakteristik fisiologi, uji biokimia, kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim.



Gambar 4. Perhitungan Zona Bening

Keterangan gambar:

dt : diameter total (jumlah keseluruhan diameter total dibagi jumlah diameter total yang dihitung)

dk : diameter koloni (jumlah keseluruhan diameter koloni dibagi jumlah diameter koloni yang dihitung)

Perhitungan:

Luas total (Lt) $= \pi rt^2$

Luas koloni (Lk) $= \pi rk^2$

Luas zona (Lz) = Lt - Lk

Indeks : Lz / Lk

3.3.4 Karakteristik Fisilogi dan Uji Biokimia

Isolat hasil seleksi kemudian di karakteristik fisiologinya dan dilakukan uji biokimia. Karakterisasi fisiologi meliputi pewarnaan gram dan bentuk sel. Uji biokimia yang dilakukan antara lain *Methyl Red*, uji *Voges Proskauer*, uji Sitrat Simmon, uji Motilitas dan uji Endospora. Pengujian karakteristik fisiologi dan uji biokimia secara lengkap adalah sebagai berikut:

A. Pengujian Fisiologi

1. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan dengan membuat preparat apusan bakteri. Langkah awal yang dilakukan ialah menetesi gelas objek dengan akuades steril. Kemudian diambil biakan bakteri yang telah berumur 24 jam dan diratakan pada gelas objek lalu difiksasi di atas api bunsen hingga kering. Selanjutnya preparat ditetesi larutan gram A selama 1-3 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Setelah itu ditetesi dengan larutan gram B selama 0,5-1 menit dicuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Langkah yang sama juga dilakukan pada saat menetesi preparat dengan larutan gram C selama 30 detik dan larutan gram D selama 1-2 menit. Preparat yang telah dilakukan pewarnaan gram kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 1.000x dengan ditetesi minyak emersi. Hasil pengamatan diambil gambarnya dengan menggunakan kamera digital.

2. Karakterisasi Morfologi

Karakterisasi morfologi koloni dilakukan dengan penglihatan visual meliputi: bentuk, elevasi, tepi, struktur dalam dan warna koloni setelah koloni terbentuk. Pengujian karakteristik tersebut digunakan untuk mengetahui ciri khas spesies tertentu.

B. Pengujian Biokimiawi

1. Pengujian MR/VP (*Metil Red Voges-Proskauer*)

Langkah pertama yang dilakukan untuk pengujian MRVP ialah menginokulasi 1 ose isolat bakteri yang berumur 24 jam. Setelah itu diinokulasikan ke dalam media *Metil Red Voges-Proskauer* (MR/VP) (Lampiran 1) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Uji MR/VP dilakukan dengan menggunakan 2 tabung, tabung pertama

untuk uji MR dan tabung kedua untuk uji VP. Tabung pertama ditetesi dengan 3-4 tetes reagen uji Methyl Red (Lampiran 1). Uji dikatakan positif bila kultur berubah warna menjadi merah dan uji dikatakan negatif bila kultur berubah warna menjadi kuning. Tabung kedua ditetesi dengan 10 tetes reagen barrit A dan reagen barrit B (Lampiran 1) kemudian larutan dikocok selama 20-30 menit. Uji dikatakan positif bila kultur berubah warna menjadi merah muda.

2. Pengujian Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menetesi gelas objek dengan akuades steril. Kemudian pindahkan 1 ose biakan bakteri yang telah berumur 24 jam dan diratakan di atas gelas objek. Setelah itu tetesi biakan dengan larutan 3% H_2O_2 (Lampiran 1). Uji katalase dikatakan positif bila terbentuk gelembung.

3. Pengujian Sitrat Simmons

Uji sitrat simmons dilakukan dengan menginokulasikan isolat ke dalam media miring agar sitrat simmons. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Diamati perubahan warnanya dan uji dikatakan positif bila media sitrat simmons yang semula berwarna hijau berubah warna menjadi biru.

4. Pengujian Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan cara menusukkan jarum enten yang telah disentuhkan koloni bakteri ke dalam media MIO hingga ke dasar tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Uji dikatakan positif bila pertumbuhan bakteri tersebar sepanjang garis tusukan jarum enten.

5. Pengujian Endospora

Pada uji endospora langkah pertama yang harus dilakukan ialah membuat preparat apusan bakteri yang akan diuji. Kemudian preparat digenangi dengan pewarna malakit hijau. Pewarna ini agar dapat masuk ke dalam endospora dibantu dengan cara memanaskan preparat apusan ini selama 10 menit dengan meletakkan pada ram kawat di atas penangas air mendidih sampai timbul uap air. Selama pemanasan dapat ditambahkan beberapa tetes larutan pewarna untuk menjaga dari kekeringan. Setelah itu kelebihan pewarna dicuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Tiriskan kaca objek dan serap sisa air dari preparat dengan kertas hisap. Amati struktur spora dalam sel menggunakan mikroskop perbesaran 1.000x dengan minyak emersi. Uji ini dikatakan positif bila endospora berwarna hijau.

3.3.5 Kurva Pertumbuhan Isolat A4 Bakteri Amilolitik

► ***Pembuatan Starter***

Sebanyak 1 ose isolat A4 yang telah diremajakan pada media miring NA diinokulasikan ke dalam 50 ml media NB dan dihomogenkan. Biakan starter kemudian dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Biakan tersebut digunakan sebagai stok kultur.

► ***Pembuatan Stok Inokulum***

Stok kultur yang diperoleh diinokulasikan sebanyak 10% dari volume media produksi ke dalam dua jenis substrat. Sebanyak 20 ml stok kultur diinokulasikan ke dalam 180 ml media produksi pati 1% (Lampiran 1) dan ekstrak limbah (Lampiran 1) sebagai stok inokulum. Kultur tersebut dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm.

► ***Pembuatan Kurva Standar Isolat A4 Bakteri Amilolitik***

Untuk mengetahui jumlah mikroorganisme dalam suspensi yang diukur diperlukan kurva standar dengan dibuat perbandingan antara kultur bakteri dari stok inokulum dengan larutan pengencer (media steril). Perbandingan antara media steril dan stok inokulum adalah 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 dan 1:7. Setiap perbandingan dimasukkan ke dalam botol film dan ditambahkan 3 tetes formalin. Diukur OD dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 672 nm (media produksi pati 1%) dan 400 nm (ekstrak limbah). Kurva standar menyatakan korelasi antara kekeruhan suspensi biakan sebagai sumbu y (hasil pengukuran OD dengan spektofotometer) dengan jumlah sel per ml biakan sebagai sumbu x (hasil perhitungan langsung dengan menggunakan haemocytometer/TPC). Kurva standar diperoleh dengan memasukkan data jumlah sel mikroorganisme dan kekeruhan (OD). Dibuatlah regresi linier antara jumlah sel dengan absorbansi. Selanjutnya ditentukan nilai regresi linier (r) dan persamaan regresinya ($y = ax + b$). Nilai persamaan ini dapat digunakan untuk menentukan jumlah sel pada langkah ”pembuatan kurva pertumbuhan” setelah nilai absorbansi dapat diketahui.

►***Kurva Pertumbuhan***

Stok inokulum diinokulasikan ke dalam 10% media produksi. Sebanyak 10 ml stok inokulum diinokulasikan ke dalam 90 ml media produksi pati 1% dan substrat ekstrak limbah. Kultur dishaker selama pengamatan kurva pertumbuhan (1-3 hari) dengan kecepatan 120 rpm. Pertumbuhan sel diamati dengan mengukur kekeruhan (OD) pada panjang gelombang 672 nm (media produksi pati 1%) dan 400 nm (ekstrak limbah) menggunakan spektrofotometer pada masa inkubasi 0, 6, 12, 18, 24, 48, dan 72 jam. Jumlah sel dapat diketahui dengan mengkonversikan nilai absorbansi dengan kurva

standar bakteri. Data yang diperoleh dibuat grafik hubungan antara waktu pengamatan (1-3 hari) sebagai sumbu x dan jumlah sel bakteri sebagai sumbu y.

3.3.6 Aktivitas Enzim Amilase

► ***Kurva Standar Glukosa***

Kurva standar glukosa (Lampiran 3) dibuat dengan membuat larutan stok glukosa (D-*glucose*) konsentrasi 1000 µg/ml. Selanjutnya dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 dan 200 µg/ml dari larutan stok. Pengukuran absorbansi dari masing-masing larutan glukosa melalui langkah berikut. Sebanyak 1 ml dari masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1,5 ml larutan DNS (Lampiran 1). Larutan tersebut kemudian dipanaskan selama 5 menit dan ditambahkan dengan 0,5 ml larutan *Na-K-Tartarte* (Lampiran 1) dan didinginkan. Ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 540 nm. Pembuatan kurva standar glukosa dilakukan dengan membuat kurva linier antara konsentrasi glukosa (sumbu x) dan nilai absorbansi (sumbu y).

► **Aktivitas Enzim**

Pengukuran aktivitas enzim diperlukan kultur yang sama dengan yang digunakan untuk kurva pertumbuhan. Sebanyak 1,5 ml kultur dari substrat pati 1% dan substrat ekstrak limbah tambak pada masa inkubasi 0, 6, 12, 18, 24, 48 dan 72 jam diletakkan di ependof. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4^{o}C hingga diperoleh supernatan dan pellet. Supernatan yang didapatkan merupakan *crude enzyme.* Bagian *crude enzyme* dipisahkan dan akan di uji aktivitas enzimnya dengan metode DNS.

Sebanyak 1 ml *crude enzyme* dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 1 ml substrat (1% pati dalam Phosphate Buffer pH 7) dan diinkubasi pada suhu 50^{o}C selama 10 menit. Selanjutnya larutan tersebut ditambahkan dengan 1,5 ml larutan DNS yang berfungsi untuk menghentikan aktivitas enzim dan mereduksi gula reduksi sehingga menghasilkan larutan berwarna yang bisa diukur absorbansinya. Kemudian dipanaskan selama 5 menit untuk mengoptimalkan kerja DNS dan mempercepat reaksi dari DNS. Langkah berikutnya larutan ditambahkan dengan 0,5 ml Na-K-Tartrate (40%) yang berfungsi untuk mempertahankan warna dan didinginkan selama 15 menit. Larutan yang telah dingin diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Perhitungan nilai aktivitas amilase dapat diketahui dengan mengkonversi nilai absorbansi dengan kurva standar glukosa.

Menurut Haq *et al.* (2002) aktivitas enzim amilase dapat diketahui dari rumus di bawah ini:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{C \times H \times fp}{BM\,\text{Glukosa} \times t \times E}$$

Dimana:

C : konsentrasi produk hidrolisis glukosa (µg/ml)

H : volume total produk hidrolisis (ml)

fp : faktor pengenceran

t : waktu inkubasi (menit)

E : volume enzim (ml)

BM : berat molekul glukosa 180 µg/µmol

3.4. Metode Penelitian dan Analisis Data

Metode yang digunakan adalah deskriptif. Menurut Nazir (2005), secara harfiah penelitian deskriptif adalah penelitian yang bermaksud untuk membuat pencandraan mengenai situasi-situasi atau kejadian-kejadian. Dalam arti ini penelitian deskriptif adalah akumulasi data dasar dalam cara deskriptif semata-mata tidak perlu mencari atau menerangkan saling hubungan, membuat ramalan, atau mendapatkan makna dan implikasi.

Metode deskriptif yang digunakan disini adalah metode deskriptif studi komparatif. Penyelidikan deskriptif yang berusaha mencari pemecahan melalui analisis tentang perhubungan-perhubungan sebab akibat, yakni yang meneliti faktor-faktor tertentu yang berhubungan dengan situasi atau fenomena yang diselidiki dan membandingkan satu faktor dengan yang lain, adalah penyelidikan yang bersifat komparatif (Surakhmad, 1998). Analisis data secara deskriptif yaitu meliputi pengamatan morfologi koloni, uji biokimia, kurva pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi, Seleksi, dan Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Amilolitik *indigenous* Mangrove

Bakteri amilolitik *indigenous* mangrove yang didapatkan dari hasil isolasi sebanyak 11 isolat. Mahasneh (2001) dalam penelitiannya didapatkan berbagai kelompok bakteri yang berhasil diisolasi dari mangrove. Persentase dari beberapa kelompok bakteri hasil isolasi tersebut adalah bakteri amilolitik 30,32%, bakteri proteolitik 21,86%, bakteri selulolitik 20,70%, dan bakteri lipolitik 3,45%. Oleh karena itu terdapat berbagai kelompok bakteri termasuk bakteri amilolitik yang ada pada kawasan mangrove.

Masing-masing isolat bakteri yang didapatkan memiliki karakter morfologi koloni yang berbeda-beda baik bentuk, tepi, elevasi, dan struktur dalam. Hasil dari pengamatan karakteristik morfologi koloni dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Koloni Isolat-isolat Bakteri Amilolitik *indigenous* Mangrove

No	Kode Isolat	Karakteristik Morfologi Koloni				
		Bentuk	Elevasi	Tepi	Struktur Dalam	Warna
1	A1	Circular	Low convex	Entire	Finely granular	White
2	A2	Circular	Low convex	Entire	Transparent	White
3	A3	Irregulair	Low convex	Undulate	Smoath	White
4	A4	Irregulair	Low convex	Crenate	Smoath	White
5	A5	Rhizoid	Effuse	Undulate	Smoath	White
6	A6	Circular	Low convex	Undulate	Finely granular	Light-Yellow
7	A7	Circular	Low convex	Entire	Smoath	White
8	A8	Irregulair	Low convex	Undulate	Finely granular	Light-Yellow
9	A9	Circular	Convex	Entire	Opaque	Light-Yellow
10	A10	Circular	Convex	Entire	Translucent	White
11	A11	Circular	Convex	Entire	Opaque	Light-Yellow

Berdasarkan data pada Tabel 1 diperoleh karakteristik morfologi koloni yang berbeda-beda antara isolat satu dengan yang lainnya. Irianto (2007) menyatakan bahwa perbedaan karakteristik morfologi koloni bakteri merupakan ciri khas dari suatu jenis bakteri tertentu. Perbedaan karakterisasi morfologi koloni tersebut menunjukkan bahwa masing-masing isolat diduga berbeda jenisnya. Tabel 2 menunjukkan nilai persentase jumlah karakteristik morfologi koloni isolat bakteri amilolitik *indigenous* mangrove yang diperoleh dari data pada Tabel 1.

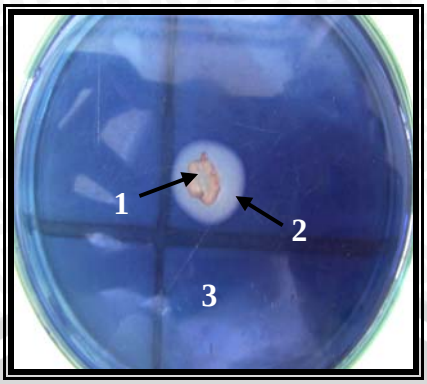
Tabel 2. Persentase Jumlah Karakteristik Morfologi Koloni Isolat-isolat Bakteri Amilolitik *indigenous* Mangrove

No	Karakteristik Morfologi Koloni	Persentase
1	Bentuk ➢ Circular ➢ Irregulair ➢ Rhizoid	 63,64% 27,27% 9,09%
2	Elevasi ➢ Low convex ➢ Convex ➢ Effuse	 63,64% 27,27% 9,09%
3	Tepi ➢ Entire ➢ Undulate ➢ Crenate	 54,55% 36,36% 9,09%
4	Struktur Dalam ➢ Smoath ➢ Finely granular ➢ Opaque ➢ Transparent ➢ Translucent	 36,36% 27,27% 18,18% 9,09% 9,09%
5	Warna ➢ White ➢ Light Yellow	 63,64% 36,36%

Data Tabel 2 menunjukkan koloni bakteri yang mendominasi kawasan mangrove adalah bakteri yang mempunyai bentuk circular 63,64%, elevasi low convex 63,64%, tepi entire 54,55%, struktur dalam smoath 36,36%, dan berwarna putih 63,64%.

4.2 Seleksi Isolat Amilolitik

Isolat-isolat yang didapatkan kemudian diseleksi kemampuan amilolitiknya. Seleksi kemampuan amilolitik dapat dilihat dari terbentuknya zona bening yang telah diinokulasikan pada media selektif amilolitik dan digenangi dengan iodin. Zona bening disekitar koloni pada media terbentuk akibat bakteri amilolitik tersebut menunjukkan aktivitasnya. Day (2001) menyatakan bahwa setelah isolat yang ditanam pada media nutrient agar + pati tumbuh dan dituangi iodin, maka akan tampak daerah yang berwarna biru dan daerah yang bening disekitar koloni. Pada daerah bening disekitar koloni berarti pati telah didegradasi menjadi dekstrin, glukosa dan maltosa. Daerah bening terbentuk disebabkan tidak terbentuk ikatan antara iod dan pati. Warna biru tersebut disebabkan adanya reaksi kompleks antara pati-iod. Lay dan Sugyo (1999) menambahkan pembentukan kompleks iod dan pati disebabkan adanya molekul iod masuk dalam bagian yang kosong dari molekul pati (amilosa) yang membentuk spiral, sehingga menghasilkan molekul yang mengabsorbansi semua cahaya kecuali warna biru. Bila zat pati telah terurai maka warna biru ini tidak terjadi karena tidak adanya bentuk spiral. Gambar zona bening yang terbentuk pada isolat A4 setelah digenangi iodin tersaji dalam Gambar 5.



Gambar 5. Zona Bening Isolat A4
Keterangan :1. Isolat A4; 2. Zona Bening; 3. Media Selektif

Seleksi hasil terbaik dari aktivitas amilolitik ditentukan dengan pengukuran indeks zona bening yang terbentuk paling besar di sekitar koloni. Indeks zona bening isolat-isolat bakteri amilolitik *indigenous* mangrove secara urut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Indeks Zona Bening Isolat-isolat Bakteri Amilolitik *indigenous* Mangrove

No	Kode Isolat	Indeks Zona Bening
1	A4	5,873
2	A1	5,231
3	A3	3,695
4	A8	1,298
5	A6	1,252
6	A10	0,887
7	A9	0,847
8	A11	0,824
9	A7	0,811
10	A5	0,614
11	A2	0,297

Indeks zona bening yang didapatkan berkisar antara 0,297-5,873. Isolat yang memiliki indeks zona bening paling besar adalah isolat A4 dengan nilai indeks zona bening sebesar 5,873. Isolat A4 diduga memiliki aktivitas enzim tertinggi dibandingkan dengan isolat yang lain. Hal ini sesuai dengan hasil penilitian yang dilakukan Fadel and

Batal (2000) ; Mohamed *et al.* (2007) bahwa isolat yang memiliki indeks zona bening tertinggi mempunyai aktivitas amilase yang tinggi pula. Isolat yang paling besar indeks zona beningnya akan dipilih dan digunakan untuk perlakuan selanjutnya.

4.3 Karakteristik Fisiologis dan Biokimia

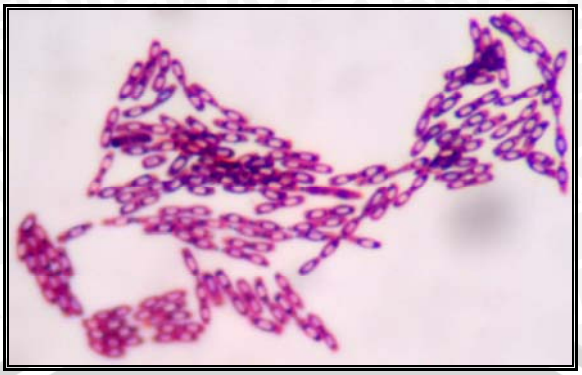
Karakteristik fisiologi bakteri meliputi pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel. Uji biokimia yang dilakukan adalah uji *Methyl Red*, uji *Voges Proskauer*, uji katalase, uji sitrat simmon, uji motilitas, dan uji endospora. Karakter fisiologi dan biokimia isolat A4 tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakter Fisiologi dan Biokimia Isolat A4

No	Karakteristik	Hasil Uji
1	Pewarnaan Gram	+
2	Bentuk Sel	Batang
3	Reaksi *Methyl Red*	+
4	Reaksi *Voges Proskauer*	+
5	Katalase	+
6	Sitrat Simmon	-
7	Motilitas	+
8	Endospora	+

Keterangan:
(+) = Reaksi Positif
(-) = Reaksi Negatif

Isolat A4 merupakan bakteri gram positif berbentuk batang (Gambar 6). Gram positif merupakan bakteri yang berwarna ungu. Hal tersebut dikarenakan bakteri gram positif mengalami denaturasi protein pada dinding selnya akibat pencucian dengan alkohol. Protein menjadi keras dan beku, pori-pori mengecil sehingga kompleks kristal yodium yang berwarna ungu dipertahankan dan bakteri akan tetap berwarna ungu (Lay, 1998).



Gambar 6. Hasil Pewarnaan Gram Isolat A4 Bakteri Amilolitik

Isolat A4 menunjukkan hasil positif pada uji *Methyl Red*, ditunjukkan dengan perubahan warna merah pada kultur. Menurut Benson (2002) uji *Methyl Red* digunakan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Beberapa bakteri seperti *Escherichia, Salmonella, Proteus,* dan *Aeromonas* memfermentasi glukosa dan menghasilkan banyak sekali asam laktat, asetat, suksinat, dan format di samping CO_2, H_2, dan Etanol. Akumulasi asam-asam ini menurunkan pH sampai 5,0 atau kurang. Bila indikator *Methyl Red* ditambahkan pada biakan tersebut dengan pH serendah itu maka indikator tersebut menjadi merah. Hal ini menandakan bahwa organisme yang bersangkutan adalah peragi asam campuran. Organisme-organisme ini pada umumnya adalah penghasil gas yang istimewa karena menghasilkan enzim *formic hidrogenilase* yang memecahkan asam formic menjadi CO_2 dan H_2 dalam jumlah sebanding:

$$HCOOH \xrightarrow{\textit{formic hidrogenilase}} CO_2 + H_2$$

Uji *Voges Proskauer* juga menunjukkan hasil yang positif, ditunjukkan dengan berubahan warna kultur menjadi merah muda. Uji ini digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melaksanakan fermentasi 2,3-*butanadiol*. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3-*butanadiol* sebagai produk utama, akan terjadi penumpukan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. Penambahan reagen

barrit a dan barrit b (Lampiran 1) dapat menentukan adanya *asetoin (asetilmetilkarbinol)*, suatu senyawa pemuka dalam sintesis 2,3-butanadiol. Pada penambahan KOH, adanya asetoin ditunjukkan oleh perubahan warna menjadi merah muda. Perubahan warna ini diperjelas dengan penambahan larutan alpha-naphtol. Perubahan warna biakan lebih jelas pada bagian yang berhubungan dengan udara, karena sebagian 2,3-butanadiol dioksidasikan kembali menjadi asetoin sehingga memperjelas hasil reaksi (Speckmant and Collins, 1998)

Hasil uji katalase menunjukkan hasil yang positif, dapat dilihat dengan adanya gelembung udara seperti busa pada sekitar koloni setelah ditetesi H_2O_2. Hasil uji positif menunjukkan adanya dugaan bakteri memiliki karakter aerob atau anaerob fakultatif. Kebanyakan bakteri aerob atau anaerob fakultatif yang menggunakan oksigen menghasilkan Hidrogen Perokside yang sesungguhnya bersifat racun bagi sistem-sistem enzimnya sendiri. Namun bakteri tersebut dapat tetap hidup dengan adanya antimetabolit tersebut karena dihasilkannya enzim katalase yang dapat mengubah Hidrogen Perokside menjadi air dan oksigen.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalase}} 2H_2O + O_2$$

Matinya bakteri-bakteri anaerobik obligat bila ada oksigen disebabkan tidak adanya pembentukan enzim katalase sehingga H_2O_2 meracuni bakteri itu sendiri (Benson, 2002).

Hasil uji sitrat simmon menunjukkan reaksi negatif, karena warna medium sitrat simmon tetap berwarna hijau dan koloni tidak dapat tumbuh. Brook *et al.* (2005) menjelaskan medium agar sitrat simmon adalah medium sintetik yang mengandung sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya, sedangkan sebagai sumber nitrogennya digunakan garam amonium dan bukan asam amino. Agar sitrat simmon juga

mengandung indikator biru bromtimol yang dapat berubah warna dari hijau menjadi biru bila keadaan menjadi alkalin. Jadi bila organisme dapat tumbuh dengan menggunakan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya maka akan terlihat tumbuh pada permukaan agar miring yang digoreskan di atasnya di samping terjadi perubahan warna medium menjadi biru.

Isolat A4 merupakan bakteri yang bersifat motil. Uji motilitas bertujuan untuk mengetahui suatu bakteri memiliki flagella atau tidak (Eisenbach, 2000). Jadi bakteri yang dalam media MIO mengalami pergerakan maka akan terlihat pertumbuhan bakteri yang tersebar sepanjang garis tusukan jarum enten.

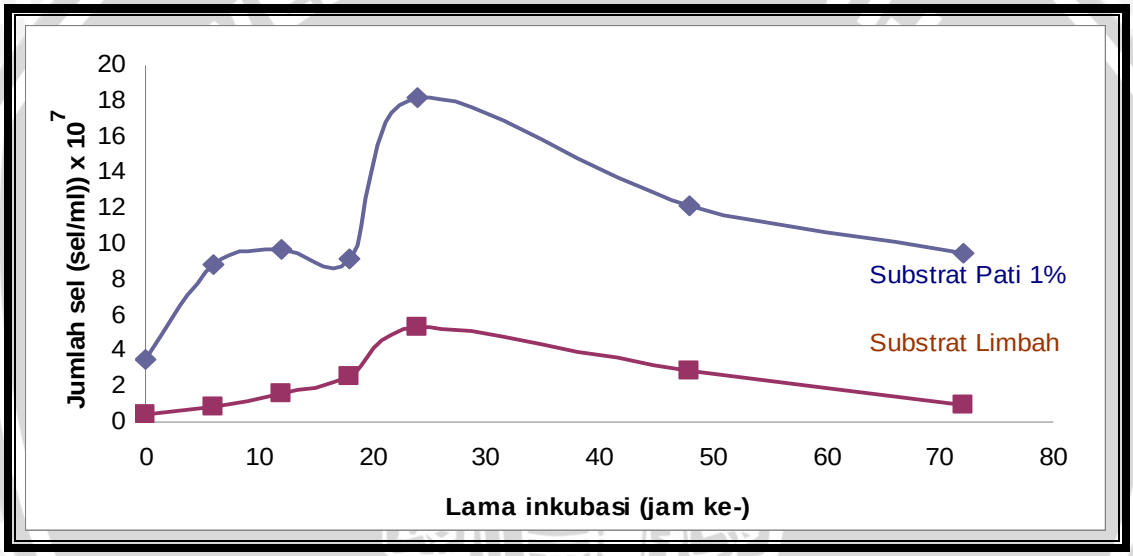
Uji Endospora menunjukkan hasil yang positif, terlihat pada pengamatan mikroskop terdapat spora yang berwarna hijau di sekitar koloni. Menurut Campbell *et al.* (2008) endospora adalah sel resisten berlapis tebal yang dihasilkan di dalam sel bakteri yang terpapar ke lingkungan yang ganas**.** Allwin *et al.* (2007) menambahkan Endospora mengandung sedikit sitoplasma, materi genetik, dan ribosom. Dinding endospora yang tebal tersusun atas protein dan menyebabkan endospora tahan terhadap kekeringan, radiasi cahaya, suhu tinggi dan zat kimia. Jika kondisi lingkungan menguntungkan endospora akan tumbuh menjadi sel bakteri baru.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Apun *et al*. (2000) menunjukkan bahwa bakteri amilolitik dengan aktivitas enzim tertinggi adalah *Bacillus amyloliquefaciens* yang termasuk bakteri gram positif berbentuk batang dengan karakter uji katalase, oksidase, dan *Voges-Proskauer* positif. Hal ini didukung oleh penelitian Feliatra *et al.* (2004) bahwa bakteri yang mendekati genus Bacillus mempunyai ciri-ciri morfologi sebagai berikut: warna koloni putih susu atau agak krem. Sel adalah bentuk

batang dan lurus dan sering tersusun dalam bentuk sepasang atau rantai, dengan ujung bundar atau empat persegi. Pewarnaan sel gram positif, motil, dan katalase positif.

4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat A4

Kurva pertumbuhan bakteri didapatkan dari hasil pengukuran dua absorbansi yang dikonversikan dengan kurva standar pertumbuhan bakteri. Hasil dari perhitungan tersebut kemudian dibuat kurva pertumbuhan isolat A4 (Gambar 7). Kurva standar pertumbuhan bakteri disajikan pada Lampiran 2.



Gambar 7. Kurva Pertumbuhan Isolat A4

Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri (Gambar 7) pada substrat pati 1% dan substrat limbah diketahui bahwa pada jam ke 0-12 isolat A4 berada pada fase lag. Fase ini merupakan masa penyesuaian diri bagi mikroba terhadap media biakan. Menurut Dwijosepotro (1998) pada fase lag sel tidak ada pertumbuhan populasi karena sel mengalami perubahan komposisi kimiawi dan ukuran serta bertambahnya substansi intraseluler sehingga siap untuk membelah diri.

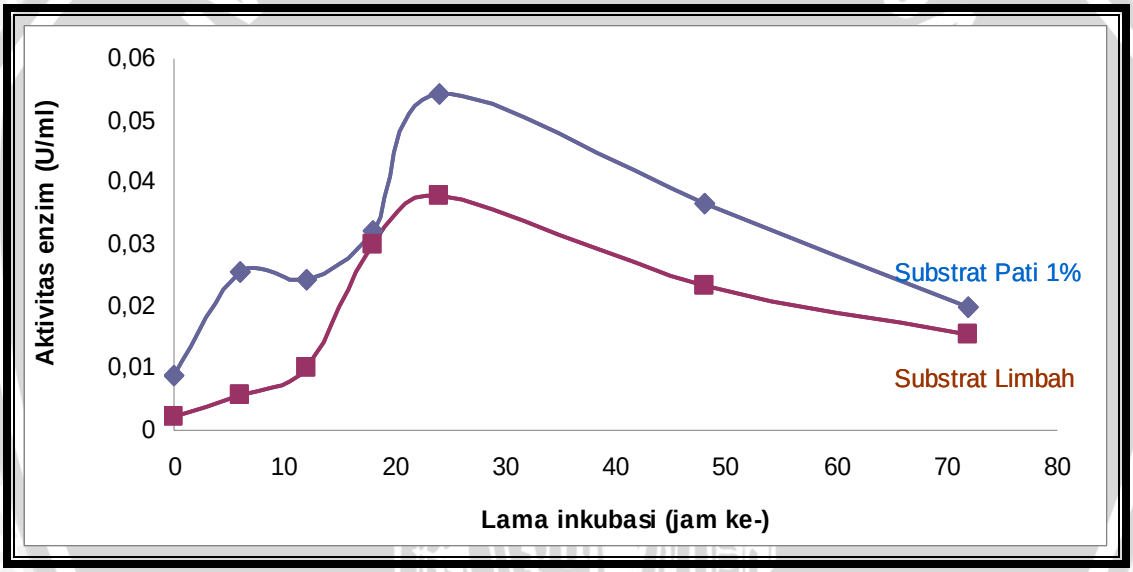
Setelah fase lag berakhir akan dimulai proses reproduksi sel yang ditandai dengan peningkatan jumlah biomassa. Fase ini disebut dengan fase eksponensial. Isolat A4 pada substrat pati 1% mengalami fase eksponensial pada jam ke 18-24 dan pada substrat limbah pada jam ke 12-24. Pada fase ini jumlah sel meningkat sehingga jumlah sel bakteri pada substrat pati 1% mencapai puncaknya pada jam ke 24 dengan jumlah sel 18,14 x 10^7 sel/ml. Jumlah bakteri pada substrat limbah juga mencapai puncaknya pada jam ke 24 dengan jumlah sel 5,27 x 10^7 sel/ml. Menurut Madigan *et al.* (2003) pada fase eksponensial sel membelah dengan laju yang konstan, massa menjadi dua kali lipat dengan laju sama, aktivitas metabolik konstan dan keadaan pertumbuhan seimbang.

Isolat A4 pada substrat pati 1% dan substrat limbah mengalami fase kematian pada jam ke 48-72. Hal ini ditunjukkan dengan menurunnya jumlah sel dari 12,1 x 10^7 sel/ml menjadi 9,46 x 10^7 sel/ml untuk substrat pati 1% dan 2,91 x 10^7 sel/ml menjadi 1 x 10^7 sel/ml untuk substrat limbah. Menurut Pelezar (2006) pada fase kematian sel menjadi mati akibat penumpukan racun dan habisnya nutrisi, menyebabkan jumlah sel yang mati lebih banyak sehingga mengalami penurunan jumlah sel.

Pertumbuhan bakteri pada substrat pati 1% lebih tinggi dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri pada substrat limbah diakibatkan kandungan pati pada substrat ini adalah sebesar 1% sedangkan pada substrat limbah kandungan patinya hanya sebesar 0,3%. Menurut Mishra and Behera (2008) banyaknya jumlah sel bakteri amilolitik dipengaruhi dengan komposisi dan konsentrasi media pati yang tersedia. Semakin tinggi konsentrasi pati maka jumlah bakteri yang tumbuh semakin tinggi. Pengujian kandungan pati di dalam limbah tersaji pada Lampiran 3.

4.5 Kurva Aktivitas Enzim Isolat A4

Hasil hidrolisis amilase oleh enzim amilase adalah gula reduksi yang dapat diukur dengan menggunakan metode DNS. Hasil hidrolisis amilase ini didapatkan dari hasil pengukuran absorbansi dikonversikan dengan kurva standar glukosa (Lampiran 2) dengan beberapa tingkat konsentrasi yang berbeda dan dihitung aktivitas enzimnya. Pengujian aktivitas amilase dilakukan pada substrat limbah dan sebagai pembanding digunakan substrat pati 1% sebagai acuan skala laboratorium. Hasil pengujian aktivitas enzim amilase dari isolat A4 ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Aktivitas Enzim Isolat A4

Aktivitas enzim amilase tertinggi pada substrat pati 1% sebesar 0,0544 U/ml didapatkan pada masa inkubasi 24 jam. Hasil ini didukung dengan hasil penelitian yang dilakukan Richana *et al.* (2008) ; Stredansky *et al.* (1998) ; Qader *et al.* (2006) menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi enzim amilase dicapai pada jam ke 24 masa inkubasi. Setelah 24 jam produksi enzim amilasenya mengalami penurunan.

Grafik aktivitas amilase pada substrat pati 1% mengalami ketidakstabilan pada awal masa inkubasi dan selanjutnya mulai stabil mengalami kenaikan pada jam ke 18.

Hal ini dikarenakan bakteri masih mengalami adaptasi terhadap kondisi media yang baru. Aktivitas amilase yang meningkat setelah inkubasi selama 6 jam sebesar 0,0256 U/ml, kemudian menurun menjadi 0,0244 U/ml setelah inkubasi jam ke 12 dan mulai meningkat kembali aktivitasnya pada jam ke 18 menjadi 0,0322 U/ml. Pada masa inkubasi ke 48 jam mulai menurun sebesar 0,0367 U/ml.

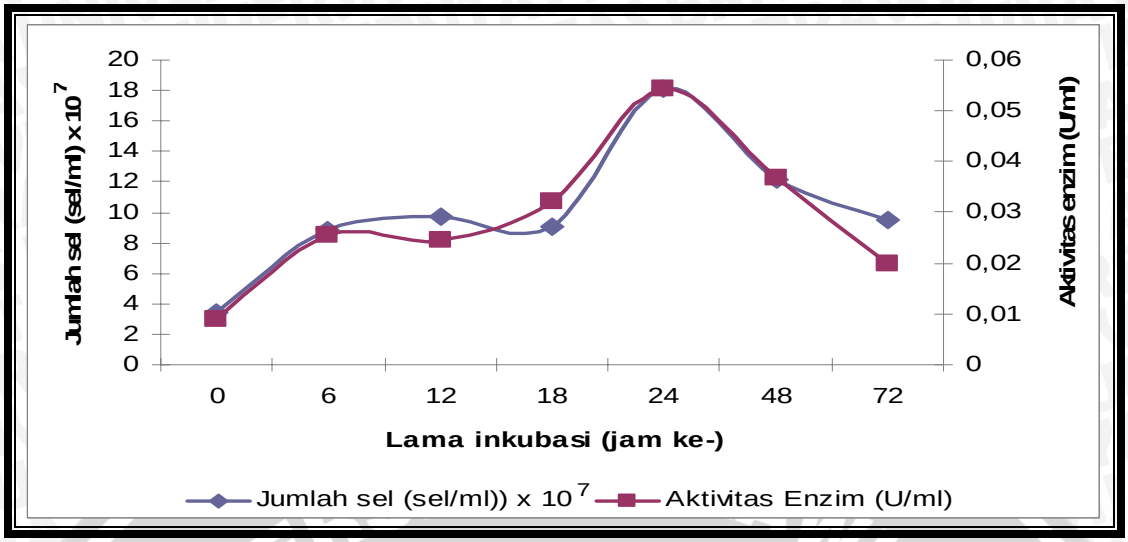
Aktivitas enzim pada substrat limbah yang tertinggi adalah pada masa inkubasi 24 jam yaitu sebesar 0,0378 U/ml dan setelah jam ke 24 aktivitas enzimnya mengalami penurunan. Grafik aktivitas enzim pada substrat limbah mengalami kestabilan mulai awal masa inkubasi dan kemudian menurun menjadi 0,0233 U/ml pada inkubasi ke 48 jam.

Grafik pada Gambar 8 menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi didapatkan pada perlakuan substrat pati 1% dengan konsentrasi pati sebesar 1%. Sedangkan pada substrat limbah konsentrasi pati sebesar 0,3% berada pada aktivitas dibawah konsentrasi pati 1%. Perbedaan tersebut disebabkan substrat pati 1% lebih spesifik sehingga dapat dimanfaatkan oleh bakteri amilolitik lebih baik daripada substrat limbah tambak. Menurut Nguyen (2000); Reyed (2007); Srivastava and Baruah (2008) komposisi dan konsentrasi substrat sangat mempengaruhi produksi dari enzim amilase ekstraseluler bakteri.

4.6 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Amilase Isolat A4

4.6.1 Amilum (Pati 1%)

Kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim amilase isolat A4 pada substrat pati 1% ditunjukkan pada Gambar 9. Pada gambar tersebut dapat diketahui bahwa aktivitas enzim tertinggi dan pertumbuhan bakteri tertingginya adalah pada masa inkubasi 24 jam.



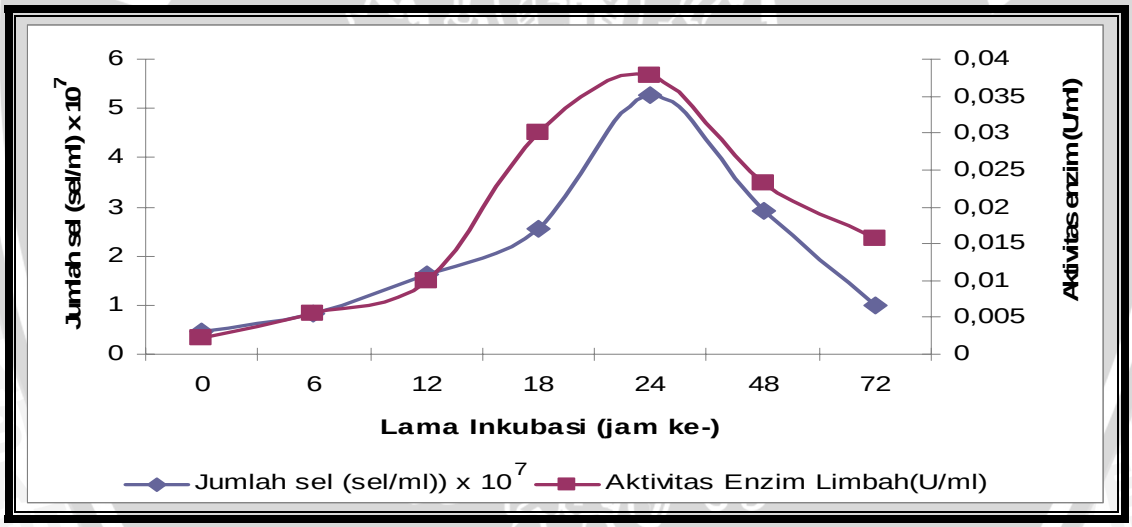
Gambar 9. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Amilase Isolat A4 Pada Media Pati 1%

Pada Gambar di atas terlihat bahwa aktivitas enzim amilase mencapai nilai tertinggi yaitu sebesar 0,0544 U/ml pada waktu masa inkubasi 24 jam terdapat pada fase eksponensial kurva pertumbuhan bakteri. Judoamidjojo dan Aziz (1998) menyatakan bahwa fase eksponensial adalah fase pembiakan cepat dan bisa diamati ciri khas sel yang aktif. Sel membelah diri dengan laju yang konstan, massa menjadi dua kali lipat, dan keadaan pertumbuhan seimbang. Fase eksponensial pada kurva pertumbuhan bakteri pada substrat pati 1% terjadi pada waktu inkubasi 18-24 jam. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan Azmi (2006); Alazard and Raimbault (1998) menyatakan pada waktu kurva pertumbuhan memasuki fase eksponensial jumlah mikroorganisme yang dihasilkan meningkat sangat banyak dan aktivitas amilase yang dihasilkan juga meningkat. Namun setelah melewati waktu itu jumlah mikroorganisme menurun. Hal ini disebabkan pertumbuhan telah memasuki fase stationer dan fase kematian, karena media yang digunakan sudah habis sehingga aktivitas enzim menurun dengan drastis.

Dari jumlah sel dan aktivitas enzim pada substrat pati 1% ini dapat diketahui aktivitas terbaik dari semua masa inkubasi pada setiap selnya. Aktivitas enzim terbaik

yaitu pada masa inkubasi ke 18 jam yaitu sebesar 0,036 U/sel. Aktivitas enzim tersebut merupakan aktivitas enzim terbesar dikarenakan dengan jumlah sel sebesar 9.1 x 10^7 sel/ml dapat dihasilkan enzim amilase sebesar 0.0322 U/ml dibandingkan pada masa inkubasi yang lainnya. Aktivitas enzim setiap selnya mengalami ketidakstabilan pada awal masa inkubasi. Pada inkubasi ke 0-6 jam mengalami peningkatan, dari 0,026 U/sel meningkat menjadi 0,029 U/sel, kemudian menurun menjadi 0,025 U/sel pada masa inkubasi jam ke 12. Aktivitas enzim setiap sel mengalami peningkatan kembali pada masa inkubasi 12-18 jam dan setelah masa inkubasi ke jam 18 aktivitas enzim setiap selnya menurun.

4.6.2 Limbah



Gambar 10. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Amilase Isolat A4 Substrat Limbah

Aktivitas enzim amilase pada substrat limbah (Gambar 10) diketahui nilai tertinggi sebesar 0,0378 U/ml dengan lama inkubasi 24 jam. Aktivitas enzim amilase tertinggi pada substrat limbah terdapat pada fase eksponensial kurva pertumbuhan bakteri. Aktivitas enzim tertinggi pada fasa eksponensial kurva pertumbuhan bakteri pada substrat limbah sama dengan pada substrat pati 1%. Persamaan tersebut dikarenakan

bakteri tersebut sama-sama memanfaatkan pati untuk media tumbuhnya dan menjadi sumber substrat untuk memproduksi enzim amilase (Pujoyuwono dan Richana, 1997).

Dari jumlah sel dan aktivitas enzim pada substrat limbah ini dapat diketahui aktivitas terbaik dari semua masa inkubasi. Aktivitas enzim terbaik yaitu pada masa inkubasi ke 72 jam yaitu sebesar 0,156 U/sel. Aktivitas enzim tersebut merupakan aktivitas enzim terbesar dikarenakan dengan jumlah sel sebesar 1 x 10^7 sel/ml dapat dihasilkan enzim amilase tertinggi sebesar 0.0156 U/ml dibandingkan dengan masa inkubasi yang lain. Aktivitas enzim setiap selnya mengalami ketidakstabilan pada awal masa inkubasi. Pada inkubasi ke 0-6 jam mengalami peningkatan, dari 0,048 U/sel meningkat menjadi 0,068 U/sel, kemudian menurun menjadi 0,061 U/sel pada masa inkubasi jam ke 12. Aktivitas enzim setiap sel mengalami peningkatan kembali pada masa inkubasi ke 18-72 jam dan jam ke 72 merupakan aktivitas enzim setiap sel yang paling tinggi.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil isolasi bakteri amilolitik *indigenous* mangrove didapatkan sebanyak 11 isolat. Sebagian besar isolat memiliki karakter morfologi antara lain: bentuk circulair, elevasi low convex, tepi entire, struktur dalam smoath dan berwarna putih. Isolat A4 merupakan isolat yang mempunyai kemampuan amilolitik tertinggi dengan nilai indeks zona bening sebesar 5,873. Isolat A4 termasuk bakteri gram positif yang berbentuk batang, *Methyl Red* positif, *Voges Proskauer* positif, katalase positif, motilitas positif, endospora positif dan sitrat simmon negatif.

Isolat A4 mempunyai jumlah sel tertinggi pada substrat pati 1% dengan jumlah sel 18,14 x 10^7 sel/ml pada masa inkubasi ke 24 jam. Pada substrat limbah jumlah sel tertinggi masa inkubasi ke 24 jam dengan jumlah sel 5,27 x 10^7 sel/ml. Aktivitas enzim amilase tertinggi isolat A4 pada substrat pati 1% sebesar 0,0538 U/ml pada masa inkubasi ke 24 jam. Pada substrat limbah aktivitas enzim amilase tertinggi didapatkan pada masa inkubasi ke 24 jam sebesar 0,0346 U/ml.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian dengan pengambilan sampel untuk isolasi di berbagai kawasan mangrove. Isolat A4 perlu dikarakterisasi dan diuji lebih spesifik sehingga dapat diaplikasikan untuk pengolahan limbah tambak udang secara langsung di lapang.

DAFTAR PUSTAKA

Ajayi, A.O and O. E. Fagade. 2003. **Utilization of Corn Starch as Substrate for β-Amylase by *Bacillus* spp.** African Journal of Biomedical Research, 6(1); 37–42.

Alazard, D and M. Raimbault. 1998. **Comparative Study of Amylolytic Enzymes Production by *Aspergillus niger* in Liquid and Solid-state Cultivation**. European J. Appl. Microbio1. Biotechnol., 12:113-117.

Allwin, L., J. S. Kennedy and V. Radhakrishnan. 2007. **Characterization of Different Geographical Strains of *Bacillus thuringiensis* from Tamil Nadu**. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3(5): 362-366.

Alves, M. H, G. M. Takaki, A. L. F. Porto dan A. I. Milanez. 2002. **Screening of *Mucor* spp. for the Production of Amylase, Lipase, Polygalactronase and Protease**. Brazilian Journal Microbiology, 33:325-330.

Apun, K, B. C. Jong and M. A. Salleh. 2000. **Screening and Isolation Of A Cellulolytic and Amylolytic Bacillus from Sago Pith Waste**. J. Gen. Appl. Microbiology, 46: 263-267.

Anggraeni, R. D. 2007. **Pengaruh Pembuangan Limbah Tambak Udang terhadap Densitas dan Pola Distribusi Larva dan Juvenil Ikan di Muara Sungai Bogowonto Kabupaten Kulon Progo**. http://puspasca.ugm.ac.id/files/Abst. (3527-H-2007)pdf. Tanggal Akses 30 Mei 2008 Pukul 09.00 WIB.

Azmi, J. 2006. **Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi *Aspergillus oryzae* untuk Isolasi Enzim Amilase pada Medium Pati Biji Nangka (*Arthocarphus heterophilus* Lmk).** Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Riau. Jurnal Biogenesis, 2(2):55-58.

Bahtiar, I. 2008. **Sistem Pengolahan Air Limbah Sistem Instalasi Pengolahan Air Limbah pada Industri Pengolahan Ikan Bandeng**. http://thebluegreenalgae.blogspot.com/2008/07/sistem-instalasi-pengolahan-air-limbah.html. Tanggal Akses 4 November pukul 09.00 WIB.

Baliao, D. D, dan S. Tookwinas. 2002. **Manajemen Budidaya Udang yang Baik dan Ramah Lingkungan di Daerah Mangrove.** Petunjuk Pelaksanaan Penyuluhan Akuakultur No.32. November 2002. Jakarta. 25 hal.

Benson, H. 2002. **Microbiological Applications Manual in General Microbiology Eight Edition.** MC Graw Hill. Boston. 478 pp.

Bioagen, 2007. **Amylase Activity**. http://www.indobioagen.or.id/alfabeta.pdf. Tanggal Akses 17 Desember 2008 Pukul 03.00 WIB.

Black, J. G. 2005. **Microbiology Principles and Explorations**. John Wiley and Sons. Inc. United States America. 649 pp.

Bratvold, D and Browdy, C.L. 2000. **Effects of Sand Sediment and Vertical Surfaces on Production, Water Quality, and Microbial Ecology in an Intensive *Litopenaeus vannamei* Culture System.** Journal Elsevier Waddell Mariculture Center, South Carolina Department of Natural Resources. Aquaculture, 3:81-195.

Brock, J. A and K. L. Main. 1994. **A Guide to The Common Problems and Diseases of Cultured Penaeus Vannamei**. The World Aquaculture Society. The Oceanic Institute, 143: 1-257.

Brook, G, S. Janet, A. Stephen. 2005. **Mikrobiologi Kedokteran.** Salemba Medika. Jakarta. 528 hal.

Calik, P. and T. H. Ozdamar, 2001. **Carbon Sources Affect Metabolic Capacities of Bacillus species for the Production of Industrial Enzymes**. Journal England Biochem., 8: 61–81.

Camphell, N, J. Reece, L. Mitchell. 2008. **Biologi.** Edisi Kelima Jilid 1. Erlangga. Jakarta. 438 hal.

Dahuri, R. 2003. **Keanekaragaman Hayati Laut Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia.** PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 412 hal.

_____, J. Rais, S. Putra dan Sitepu. 1998. **Pengelolaan Sumber Daya Wilayah Pesisir dan Lautan Secara Terpadu.** PT Pradya Paramita. Jakarta. 305 hal.

Day, R. A. 2001. **Analisis Kimia Kuantitatif**. Edisi 6. Erlangga. Jakarta. 682 hal.

Dwidjosepoetro, D. 1998. **Dasar-Dasar Mikrobiologi.** Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hal.

Eisenbach, M. 2000. **Functions of the Flagellar Modes of Rotation in Bacterial Motility and Chemotaxis**. Journal Molecular Microbiology, 4(2); 161-167.

Ekunsaumi, T. 2004. **Laboratory Production and Assay of Amylase by Fungi and Bacteria.** http://www.bio-link.org/sharing_day/fungalamylase.pdf. Tanggal Akses tanggal 1 Agustus 2008 Pukul 06.00.

Fadel, M and A. I. Batal. 2000. **Studies on Activation of Amylolytic Enzymes Production by Gamma Irradiated *Aspergillus niger* Using Some Surfactants and Natural Oils Under Solid State Fermentation**. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3(10): 1762-1768.

Fardiaz, S. 2000. **Mikrobiologi Pangan.** Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian. Bogor. 268 hal.

Feliatra. 2001. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotrof yang terdapat pada Daun Mangrove (*Avicenia* sp. dan *Sonneratia* sp.) dari Kawasan Stasiun Kelautan Dumai**. Jurnal Natur Indonesia, 6(2): 75-80.

_____, I. Efendi, dan E. Suryadi. 2004. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan.** Jurnal Natur Indonesia, 6(2): 75-80

Fessenden, R dan J. S. Fessenden. 1998. **Dasar-dasar Kimia Organik**. Binarupa Aksara. Jakarta. 707 hal

_____. 1999. **Kimia Organik Edisi Ketiga.** Erlangga. Jakarta. 525 hal.

Gumilar, 2008. **Pengelolaan Air Limbah pada Kawasan Industri Pengolahan Ikan Bandeng (*Chanos chanos*).** http://spionase.blog.com/. Tanggal Akses 4 November 2008 Pukul 09.00 WIB.

Guntur. 1999. **Pengaruh Limbah Pakan Udang pada Tambak Terhadap Kondisi Mikrozoobenthos di Perairan Teluk Pangpang, Kabupaten Banyuwangi**. Jurnal Universitas Brawijaya, 4(2):39-49.

Gupta, N, S. Das and U. C. Basak. 2007. **Useful Extracellular of Bacteria Isolated from Bhitarkanika Mangrove Ecosystem of Orissa Coast.** Malaysian Journal of Microbiology, 3(2):15-18.

Haq, I, N. Riaz, H. Ashraf, M.A. Qadeer and J. Iqbal, 2002. **Effect of Inorganic Salts on the Biosynthesis of as Alpha Amylase by *Bacillus subtilis***. Industrial Journal Plant Science, 1: 21-115.

Holguin, G, P. Vazquez, and Y. Bashan. 2001. **The Role of Sediment Microorganisms in the Productivity, Conservation, and Rehabilitation of Mangrove Ecosystems**. African Journal of Biology Fertil Soils, 33(1):265–278.

Horvathova, V, S. Janecek and E. Sturdik. 2000. **Amylolytic Enzymes: their Specificities, Origins and Properties.** Journal Biologia Bratislava, 55(6):605-615.

Irianto. 2007. **Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganisme**. Penerbit Yrama Widya. Bandung. 256 hal.

Judoamidjodjo, M dan D. A. Aziz. 1998. **Teknologi Fermentasi.** CV. Rajawali. Jakarta. hal 50-97

Lay B. W dan H. Sugyo. 1999. **Mikrobiologi**. Rajawali Press. Jakarta. 624 hal.

_____. 1998. **Analisis Mikroba di Laboratorium.** Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hal.

Kordi, M dan T. Andi. 2007. **Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan.** Rineka Cipta. Jakarta. 210 hal.

Madigan, M, M. John, J. Parker. 2003. **Brock Biology of Microorganism**. 10^{ed}. Pearson Education Inc. USA. 156-157 pp.

Mahasneh, A. 2001. **Bacterial Decomposition of Avicennia marina Leaf Litter from Al-khor (Qatar-Arabian Gulf)**. Journal of Biological Sciences, 1(8): 717-719.

Marwati, U. 2007. **Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Umum.** Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang. 58 hal.

Mishra, S and N. Behera. 2008. **Amylase Activity of a Starch Degrading Bacteria Isolated from Soil Receiving Kitchen Wastes**. African Journal of Biotechnology, 7(18):3326-3331.

Mohamed, L, M. Zakaria, A. Ali, W. Senhaji, O. Mohamed, E. Mohamed, B. Hassan and J. Mohamed. 2007. **Optimization of Growth and Extracellular Glucoamylase Production by Candida Famata Isolate**. African Journal of Biotechnology, 6(22):2590-2595.

Nazir. 2005. **Metode Penelitian.** Ghalia Indonesia Cetakan 6. Bogor. 544 hal.

Nurdjana, M. 2007. **Potret Akuakultur Indonesia Terkini.** Makalah Disampaikan Pada Konfersi Akuakultur Indonesia 2007 di Surabaya Tanggal 6 Juni. 5 hal.

Nguyen, Q. D. 2000. **Optimisation of Composition of Media for the Production of Amylolytic Enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626**. Journal Biotechnology Food technology, 38(3):229–234.

Oliveira, A. N, L. A. Oliveira, J. S Andrade and A. F. Chagas. 2007. **Rhizobia Amylase Production Using Various Starchy Substances as Carbon Substrates**. Brazilian Journal of Microbiology, 38:208-216.

Osuna, F. P. 2007. **The Environmental Impact of Shrimp Aquaculture: Causes, Effects, and Mitigating Alternatives.** Instituto de Ciencias del Mary Limnology Mexico, 26(1):12-22.

Pelezar, M. J. dan E.C.S. Chan. 2006. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Jilid 2. UI Press. Jakarta. 997 hal.

Pen, J, L. Molendijk, W. J. Quax, P. C. Sijmons, A. J. J. Ooyen, P. J. M. Elzen, K. Rietyeld and A. Hoekema. 1998. **Production of Active *Bacillus licheniformis* Alpha-Amylase in Tobacco and its Aplication in Starch Liquefaction.** Journal Biotecnology, 10:292 – 296.

Purwoko, T. 2007. **Fisiologi Mikroba.** Bumi Aksara. Jakarta. 285 hal.

Pujoyuwono, M, D. Trinovia dan N. Richana. 1997. **Karakterisasi Enzim Amilase dari Beberapa Starin Bakteri Indigenous Indonesia.** Prosiding Seminar Teknologi Pangan. Bioteknologi IPB. Bogor.

Pusdatin. 2006. **View Data Statistik Budidaya Tambak.** http:www.Dkp.Go.id/statistik. Tanggal Akses 4 Februari 2008 Pukul 12.30 WIB.

Qader, S. A., S. Bano, A. Aman, N. Syed, and A. Azhar. 2006. **Enhanced Production and Extracellular Activity of Commercially Important Amylolytic Enzyme by a Newly Isolated Strain of Bacillus. sp. AS-1**. Turkish Journal of Biochemistry, 31(3); 135–140.

Reyed, R. 2007. **Biosynthesis and Properties of Extracellular Amylase by Encapsulation Bifidobatrium bifidum in Batch Culture**. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 1(1):7-14

Riaz, N, I. Haq and M.A. Qadeer. 2003. **Characterization of α-Amylase by *Bacillus subtilis***. International Journal of Agriculture and Biology, 5(3):249–252.

Richana, Nur, A. Thontowi, dan P. Lestina. 2008**. Teknik Produksi Amilase Skala Pilot dari Isolat Rekombinan Pembawa Gen Amilase.** http://biogen.litbang.deptan.go.id/terbitan/prosiding/fulltext_pdf/prosiding2002_365-372_nurrichana.pdf**.** Tanggal Akses 19 September 2008 Pukul 11.53 WIB.

Romimohtarto, K dan Juwana. 2001. **Biologi Laut Ilmu Pengetahuan Tentang Biologi Laut**. Djambatan. Yogyakarta. 540 hal.

Speckmant, R. A and E. B. Collins. 1998. **Specificity of the Westerfeld Adaptation of the Voges-Proskauer Test**. Journal Applied and Environmental Microbiology, 67:40-43.

Surakhmad, W. 1998. **Pengantar Penelitian Ilmiah**. Penerbit Tarsito. Bandung. 286 hal.

Srivastava, A. K and J. N. Baruah. 2008. **Culture Conditions for Production of Thermostable Amylase by *Bacillus stearothermophilus.*** Applied and Environmental Microbiology, 23:79-184.

Sutanto. 2001. **Aplikasi Sistem Heterotrof sebagai Upaya dalam Pengendalian Penyakit pada Budidaya Udang Windu dan Vannamei.** Disampaikan Dalam Seminar Sehari Teknologi Alternatif dalam Budidaya Udang di Indonesia.

Stevens, M. P. 2001. **Kimia Polimer**. Pradya Paramita. Jakarta. 669 hal.

Stredansky, M., R. Svore, E. Sturdik, and K. Decrove. 1998. **Repeated Batch α-amylase Production in Aqueous Two Phase System with Bacillus Strain.** Journal Biotechnology, 27:181-190.

Stryer, L. 2000. **Biokimia.** Edisi 4. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 686 hal.

Syah, R, S. S. Suwoyo, C. H. Badu, dan Makmur. 2000. **Pendugaan Nutrient Budget Tambak Intensif Udang *Litopenaeus vannamei***. Jurnal Riset Akuakultur, 1(2):1-7.

Venosa, A. D, J. R. Haines, B. L. Elberhart. 1998. **Screening of Bacterial Products for Their Crude Oil Biodegradation Effectiveness**. Journal Biotechnology, 2:47-58.

Winarno, F.G. 2002. **Kimia Pangan dan Gizi.** PT. Gramedia. Jakarta. 34 hal.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media dan Reagen

A. Media Selektif

1. NA (*Nutrient Agar*) : 23 gram/liter
2. 1% Tepung Kanji : 10 gram/liter

B. Gram Iodine Solution

1. 2% I_2 : 20 gram/liter
2. 0,2% Potassium Iodide : 2 gram/liter

C. Media Produksi Pati 1%

1. Tepung Kanji : 10 gram/liter
2. Yeast extract : 4 gram/liter
3. Bacto peptone : 10 gram/liter
4. $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 gram/liter
5. NaCl : 0,5 gram/liter
6. $CaCl_2$: 0,2 gram/liter

D. Media LA (Luria Bertani Agar)

1. NaCl : 10 gram/liter
2. Yeast extract : 3 gram/liter
3. Tryptone : 10 gram/liter
4. Bacto Agar : 15 gram/liter

E. Larutan DNS 1% (per 1 liter)

1. DNS acid : 10 gram
2. Phenol : 2 gram

Lampiran 1 (lanjutan)

3. Na_2SO_3 : 0,5 gram
4. NaOH : 10 gram

F. Larutan Na-K-Tartarate 40%

1. Na-K-Tartarate : 40 gram
2. Akuades : 100 ml

G. Media MR/VP per 1 liter

1. Glukosa : 5 gram
2. Pepton : 5 gram
3. Phosphate buffer : 5 gram

   pH 7,5 ± 0,2

H. Reagen Uji MR

1. Methyl Red : 0,2 gram
2. Akuades : 500 ml

I. Reagen Barrit A

1. α – naphtol : 6 gram
2. Etanol 95% : 100 ml

J. Reagen Barrit B

1. KOH : 16 gram
2. Akuades : 100 ml

K. Cat Gram A

1. Kristal violet : 2 gram
2. Etil alkohol 95% : 20 ml
3. Ammonium oksalat : 0,8 gram

Lampiran 1 (lanjutan)

4. Akuades : 80 ml

L. Cat Gram B

1. Yodium : 1 gram
2. Kalium yodida : 2 gram
3. Akuades : 300 ml

M. Cat Gram C

1. Aseton : 50 ml
2. Etil alkohol 95% : 50 ml

N. Cat Gram D

1. Safranin : 0,25 gram
2. Etil alkohol : 10 ml
3. Akuades : 90 ml

O. Larutan H_2O_2 3% (1 liter)

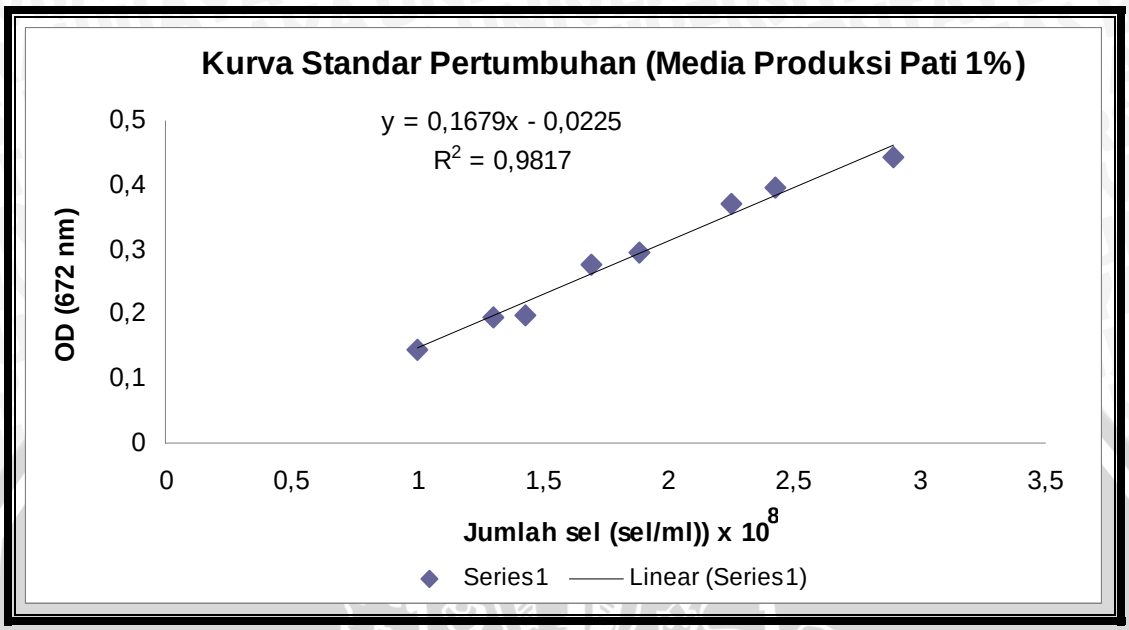
1. H_2O_2 : 30 gram
2. Akuades : 1 liter

P. Ekstrak Limbah

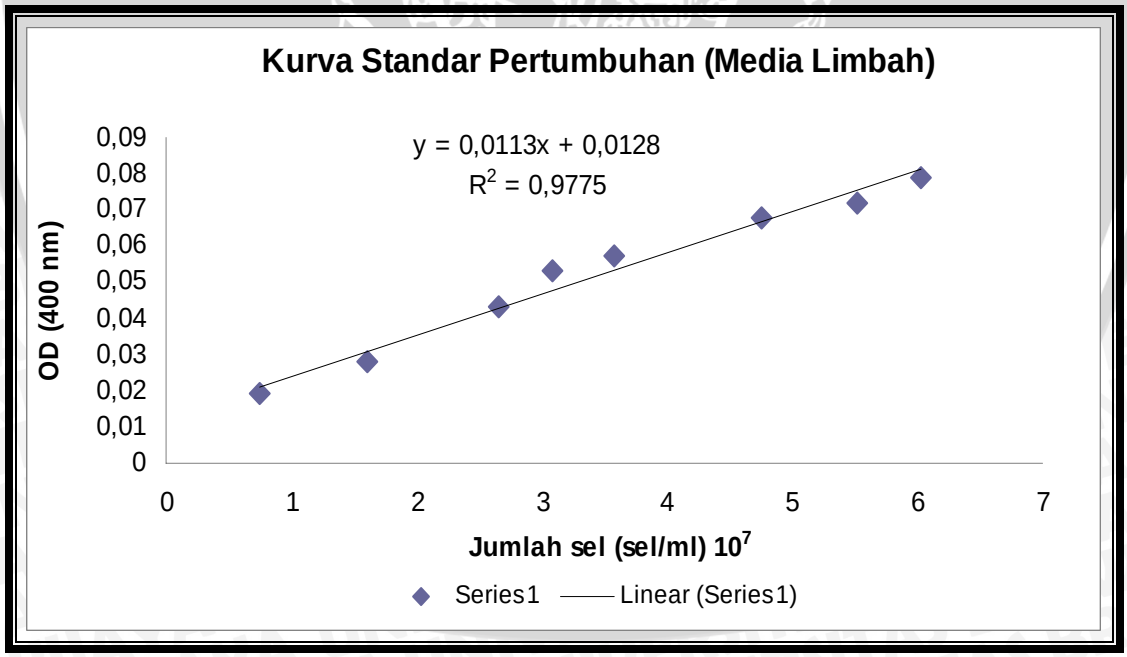
1. Limbah : 100g
2. Aquades : 200 ml

Lampiran 2. Kurva Standar Pertumbuhan Bakteri

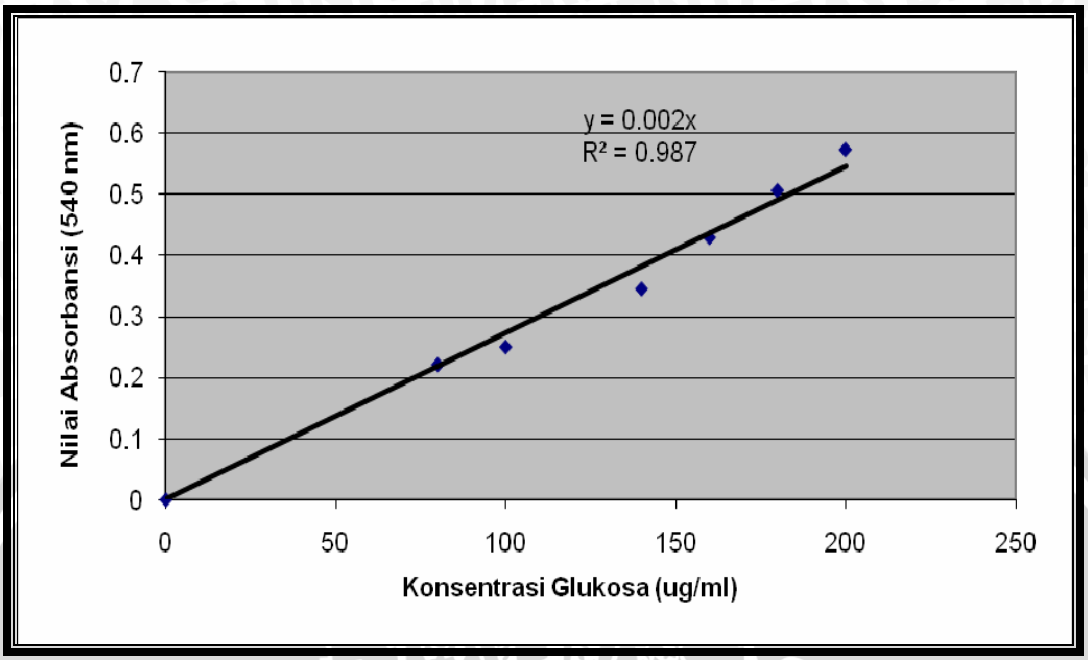
1. Kurva Standar Pertumbuhan (Media Produksi Pati 1%)



2. Kurva Standar Pertumbuhan (Media Limbah)



Lampiran 3. Kurva Standar Glukosa



Lampiran 4. Hasil Pengujian Kandungan Pati di dalam Limbah

LABORATORIUM PENGUJIAN MUTU DAN KEAMANAN PANGAN
(TESTING LABORATORY OF FOOD QUALITY AND FOOD SAFETY)
JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN - UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Jl. Veteran, Malang 65145, Telp./Fax. (0341) 569214
E-mail : lpmkp-thpbrawijaya@yahoo.com

KEPADA : **Devy Dhina**
TO **FPi - UB**
Malang

LAPORAN HASIL UJI
REPORT OF ANALYSIS

Nomor / *Number* : 1662/THP/LAB/2008
Nomor Analisis / *Analysis Number* : 1662
Tanggal penerbitan / *Date of issue* : 08 September 2008

Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian
The undersigned ratifies that examination

Dari contoh / *of the sample (s) of* : Limbah Tambak
Untuk analisis / *For analysis* : Kimia
Keterangan contoh / *Description of sample* :
Diambil dari / *Taken from* : -
Oleh / *By* : -
Tanggal penerimaan contoh / *Received* : 22 Agustus 2008
Tanggal pelaksanaan analisis / *Date of analysis* : 25 Agustus 2008

Hasil adalah sebagai berikut / *Resulted as follows* :

Parameter	Hasil
Serat kasar (%)	5,49
Pati (%)	0,30
Protein (%)	0,52

HASIL PENGUJIAN INI HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH TERSEBUT DI ATAS. PENGAMBIL CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN TANDING BARANG

Ketua,

Dr.Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.Sc.
NIP. 131 794 244