

**ISOLASI BAKTERI YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGEN
BIOREMEDIASI TIMBAL (Pb) DARI LAHAN TAMBANG EMAS
POBOYA PALU SULAWESI TENGAH**



SKRIPSI

OLEH:

RABIYAH AL ADAWIAH
NIM: H411 16 010

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Skripsi

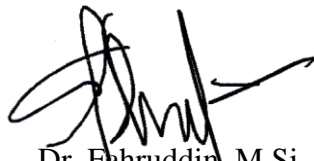
**ISOLASI BAKTERI YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGEN
BIOREMEDIASI TIMBAL (Pb) DARI LAHAN TAMBANG EMAS
POBOYA PALU SULAWESI TENGAH**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains pada Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Alam
Universitas Hasanuddin*

Oleh :

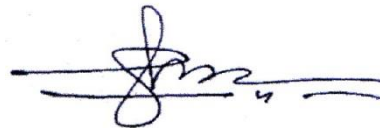
**RABIYAH AL ADAWIAH
H411 16 010**

Pembimbing I,



Dr. Fahrudin, M.Si
NIP. 196509151991031002

Pembimbing II,



Dr. Syahrudin Kasim, M.Si
NIP. 196907051997031001

LEMBAR PENGESAHAN KOMISI PENGUJI

Judul Skripsi

**ISOLASI BAKTERI YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGEN
BIOREMEDIASI TIMBAL (Pb) DARI LAHAN TAMBANG EMAS
POBOYA PALU SULAWESI TENGAH**

Oleh :

RABIYAH AL ADAWIAH
H411 16 010

Dengan Panel Ujian Skripsi :

Ketua	: Dr. Fahrudin, M.Si
Sekretaris	: Dr. Syahrudin Kasim, M.Si
Anggota	: Dr. Eddy Soekendarsi, M.Sc Drs. Muhtadin Asnady. S, M.Si

Menyetujui,
Ketua Departemen Biologi
Fakultas MIPA UNHAS


Dr. Nur Haedar, M.Si.
NIP. 196801291997022001

ABSTRAK

Nama : Rabiyah Al Adawiah

NIM : H41116010

Judul Skripsi : Isolasi Bakteri Yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Timbal (Pb) Dari Lahan Tambang Emas Poboya Palu Sulawesi Tengah

Pertambangan Rakyat Poboya merupakan salah satu penambangan emas tradisional yang dalam proses pengolahannya menggunakan teknik amalgamasi. Pencemaran yang terjadi karena factor alam maupun aktivitas manusia menyebabkan kerusakan lingkungan. Salah satu sumber pencemar adalah logam berat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi timbal (Pb) dengan berbagai konsentrasi. Metode yang digunakan adalah menginokulasikan sampel sedimen pada media Zobell 2216 E, kemudian bakteri yang tumbuh dimurnikan pada media NA. Setelah itu bakteri identifikasi dan dilakukan uji kemampuan degradasi Pb dengan menggunakan metode AAS *Atomic Absorption Spectrophotometer*. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri yang didapatkan memiliki kemampuan untuk menurunkan konsentrasi logam timbal (Pb) untuk isolat A3 dari 150 ppm menjadi 57,67 ppm dengan persentase penurunan 61,55 % dan isolat A7 dari 150 ppm menjadi 67,32 ppm dengan persentase penurunan 55,12%.

Kata Kunci : *Timbal (Pb), amalgamasi, AAS*

ABSTRACT

Name : Rabiyah Al Adawiah
NIM : H41116010
Title : **Isolation of Bacteria Potential as a Lead Bioremediation Agent (Pb) from the Poboaya Gold Mine in Palu, Sulawesi Tengah**

Poboaya People's Mining is a traditional gold mining process that is processed using amalgamation techniques. Pollution that occurs due to natural factors. One source of pollutants is heavy metals. This study discusses the ability of bacteria to drive lead bioremediation (Pb) agents with various competencies. The method used is inoculating sediment samples on Zobell 2216 E media, then the growing bacteria is purified on NA media. After that the bacteria approve and test the degradation ability of Pb by using the AAS Atomic Absorption Spectrophotometer method. From this study it can be concluded that the bacteria obtained have the ability to reduce the concentration of lead metal (Pb) for A3 isolates from 150 ppm to 57.67 ppm with a decrease of 61.55% and A7 isolates from 150 ppm to 67.32 ppm with the advantage of decreasing 55.12%

Keywords : Metals lead (Pb), Amalgamation, AAS

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Alhamdulillah, segala puji hanya bagi Allah SWT pemilik semesta alam. Shalawat serta salam kepada Baginda Rasulullah Muhammad SAW, sahabat, keluarga, serta para pengikutnya.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Sarjana Sains pada Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Dalam proses penyusunan sampai dengan terselesaikannya skripsi yang berjudul “Isolasi Bakteri Yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Timbal (Pb) Dari Lahan Tambang Emas Poboya Palu Sulawesi Tengah”.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, tak lupa penulis menyampaikan rasa terimakasih kepada semua pihak yang telah memberikan arahan, bimbingan serta motivasi dalam penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada:

1. Abiku (Drs. Sirajuddin, M.PdI) dan Ummiku (Fatmawaty Djamaluddin, S.Pd) tercinta atas dukungan dan doa yang tak henti-hentinya selalu diberikan kepada penulis sehingga menyelesaikan pendidikan sebagai sarjana. Terima kasih juga telah mendidik, merawat dan membesarkan hingga kini dengan penuh kasih sayang.
2. Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si. selaku ketua Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin yang telah memberi motivasi untuk tetap melanjutkan pendidikan setinggi-tingginya.
3. Bapak Dr. Fahrudin, M.Si selaku Pembimbing I dan Bapak Dr. Syahrudin Kasim, M.Si selaku Pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan arahan serta motivasi kepada penulis.
4. Bapak Dr. Eddy Soekendarsi, M.Sc sebagai Pembimbing Akademik sekaligus Penguji Seminar dan Bapak Drs. Muhtadin Asnady, S. M.Si sebagai penguji seminar.

5. Seluruh Dosen Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, dan bimbingan selama penulis melaksanakan studi.
6. Seluruh Staff dan Karyawan Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin terkhusus Ibu Nini dan Pak Muhlis yang telah memberikan pemahaman dan pelayanan selama penulis melaksanakan studi.
7. Untuk Adik-adikku, Muhammad Nur Al Qadri dan Raihana Syahira yang senantiasa memberi semangat dan dukungan kepada penulis.
8. Untuk Nenek, Tante-tante, Om, Sepupu yang telah memberikan doa, semangat serta dukungannya. Semoga Allah membalas semua kebaikannya baik moral maupun materi.
9. Saudara Adil Farhan Prasetyo terima kasih atas bantuannya dalam kelancaran penulis dalam menyusun skripsi dan terima kasih atas segala doa, dukungan, semangat yang diberikan.
10. Saudara-saudara saya (Ririn, Rastina, Firqah, Imma, Novita, Nova dan Nunu) terima kasih atas doa dan dukungannya, motivasi serta nasehat yang selalu diberikan kepada penulis, sehingga mampu menyelesaikan pendidikan ini.
11. Teman Seperjuangan (Elvira, Eka Ummi, Dyah, dan Pramegita,) penulis sangat berterima kasih atas bantuan saat penelitian dan penolahan dana di laboratorium Mikrobiologi departemen Biologi sehingga skripsi ini terselesaikan.
12. Teman-teman KKN SEBATIK 102 TERKHSUS POSKO PADAIDI, BIODIVERSITY 2016, MIPA 2016, HPMM KOM. UNHAS, PULMAN 2016 dan ALUMNI IPA 1 MAN ENREKANG terima kasih untuk canda, tawa, dan tangis selama masa perkuliahan penulis. Terima kasih untuk setiap kenangannya.
13. Sepupu Tercinta (Putri Ayu Melindah Sarman) terima kasih sudah menemani penulis selama di Rumah Kost dalam canda, tawa, dan tangis.
14. Serta seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, terima kasih atas seluruh bantuan moril maupun materil yang telah diberikan.

Akhir kata, tidak ada gading sempurna yang tidak retak. Penulis menyadari bahwa Skripsi ini tentunya masih jauh dari kesempurnaan, baik dari segi sistematika penulisan maupun isinya. Oleh karena itu, dengan tangan terbuka penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang konstruktif

Makassar, 1 Juli 2020

Rabiyah Al Adawiah

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
LEMBAR PENGESAHAN KOMISI PENGUJI.....	ii
ABSTRAK	iii
ABSTACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
1.4 Waktu dan Tempat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Pertambangan.....	5
2.2 Pencemaran Logam Berat	7
2.3 Bioremediasi.....	13
2.4 Mekanisme Resistensi Bakteri Terhadap Logam Berat Timbal (Pb)..	17
BAB III METODE PENELITIAN	20
3.1 Alat.....	20
3.2 Bahan.....	20
3.3 Metode Kerja.....	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Pereduksi Timbal	27
4.2 Karakterisasi Bakteri.....	28
4.3 Uji Resistensi Bakteri terhadap Timbal (Pb)	32
4.4 Uji Penurunan dan Pengukuran Kadar Timbal oleh Bakteri.....	35
BAB V PENUTUP.....	37

5.1 Kesimpulan.....	37
4.1 Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Peta Kota Palu	6
Gambar 4.1 Pemurnian Bakteri yang berasal dari Lahan Tambang Emas Poboya Palu.....	29
Gambar 4.2 Penampakan hasil uji pewarnaan gram	33
Gambar 4.3 Hasil uji resistensi bakteri dari Lahan Tambang Emas Poboya Palu terhadap Pb Berdasarkan OD Panjang gelombang 580 nm.	34

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Hasil Isolasi dari Lahan Tambang Emas Poboya Palu.....	30
Tabel 4.2 Hasil Uji Pewarnaan Gram Isolat Bakteri	31
Tabel 4.3 Kemampuan bakteri dalam menurunkan kadar Pb dengan metode AAS37	

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Sumber daya alam yang dimiliki Negara Indonesia sangatlah melimpah baik sumber daya alam hayati maupun sumber daya alam non hayati. Sumber daya alam non hayati yang melimpah di Indonesia salah satunya adalah sumber daya mineral. Mineral sebagai sumber daya non hayati dapat berupa emas, batubara, perak, timah, dan lain-lain (Tuaputy, 2014).

Negara Indonesia pada sektor industri mempunyai peranan penting dalam tata perekonomian nasional yang dapat meningkatkan pendapatan negara, sektor industri dan juga dapat memberikan kesempatan baru dalam berusaha yang memberi kontribusi positif dalam upaya pemerataan kesejahteraan masyarakat. Namun pada sisi lain keberadaan industri pertambangan selama ini telah menimbulkan dampak negatif berupa pencemaran lingkungan dan selanjutnya terjadi pelanggaran hak-hak ekonomi, sosial, budaya masyarakat yang tinggal di sekitar wilayah pertambangan itu (Ayu, 2016). Kegiatan pertambangan juga berkontribusi besar bagi kerusakan lingkungan akibat pembuangan limbah operasional penambangan (*tailing*) di sungai, hutan, estuari dan telah mencapai kawasan laut, pengendapan sedimen, kandungan limbah logam dan berbahaya (Astuti, 2018). Kontaminasi pada tanah dan perairan dapat diakibatkan oleh banyak penyebab termasuk limbah industri, limbah penambangan, residu pupuk, dan pestisida hingga bekas instalasi senjata kimia (Fuad, 2013).

Salah satu bentuk kerusakan lingkungan akibat kegiatan industri yang menjadi perhatian serius karena terdapat kandungan logam berat yang dihasilkan. Lingkungan sekitar pertambangan dapat menjadi penyebaran utama dari logam berat (Gunawan, 2015). Beberapa jenis industri yang banyak mengandung logam berat adalah industri yang berhubungan dengan pekerjaan permesinan, metalurgi, pelapisan logam, cat, dan kulit. Beberapa logam berat serta senyawa beracun yang banyak dijumpai di dalam air limbah industri adalah Khrom (Cr), Nikel (Ni), Besi (Fe), Mangan (Mn), Seng (Zn), Tembaga (Cu), Cadmium (Cd), Perak (Ag), Timbal (Pb) dan senyawa Cianida. Air limbah yang mengandung logam berat telah menjadi isu lingkungan yang telah menyita perhatian banyak pihak mengingat dampak yang ditimbulkannya dapat berakibat buruk bagi kehidupan makhluk hidup termasuk manusia (Said, 2010).

Logam berat secara langsung maupun tidak langsung dapat membahayakan manusia seperti timbal (Pb) dengan mengkonsumsi biota perairan yang terakumulasi timbal sebab dapat mengakibatkan penghambatan sistem pembentukan hemoglobin (Hb). Hal ini disebabkan senyawa-senyawa timbal (Pb) dapat memberikan efek racun terhadap banyak organ yang terdapat dalam tubuh manusia (Astuti, 2016). Lebih jauh lagi, logam berat ini akan bertindak sebagai penyebab alergi, mutagen, teratogen, atau karsinogen bagi manusia. Jalur masuknya adalah melalui kulit, pernafasan dan pencernaan (Said, 2010).

Pencemaran akibat logam berat ini dapat diminimalkan dengan beberapa cara diantaranya dengan mengurangi penggunaan zat-zat berbahaya dan menjaga kebersihan lingkungan, maka kelangsungan hidup yang ada di darat maupun di perairan akan terjaga. Penanganan untuk pencemaran logam berat juga dapat dilakukan dengan menggunakan tumbuhan yang mampu menyerap logam berat,

salah satu tumbuhan yang digunakan tersebut adalah pohon api-api *Avicennia marina*. Upaya penanganan pencemaran logam berat sebenarnya dapat dilakukan juga dengan menggunakan proses kimiawi. Seperti penambahan senyawa kimia tertentu untuk proses pemisahan ion logam berat atau dengan resin penukar ion, serta beberapa metode lainnya seperti penyerapan menggunakan karbon aktif, elektrodialisis, dan reverse osmosis. Namun proses ini relatif mahal dan cenderung menimbulkan permasalahan baru, yaitu akumulasi senyawa tersebut dalam sedimen dan organisme akuatik. Penanganan logam berat dengan mikroorganisme atau mikroba menjadi alternatif yang dapat dilakukan untuk mengurangi tingkat keracunan elemen logam berat di lingkungan perairan (Rahmadani, 2015).

Industri pertambangan akan selalu berhadapan dengan sesuatu yang sangat terbatas, baik lokasi, jenis, jumlah maupun mutu materialnya. Keterbatasan tersebut ditambah lagi dengan usaha harus meningkatkan keselamatan kerja serta menjaga kelestarian fungsi lingkungan hidup. Sehingga dalam mengelola sumber daya mineral harus menerapkan sistem yang sesuai dan tepat, baik dari segi teknik maupun ekonomis, agar perolehannya dapat optimal. Begitu pula dengan pertambangan emas.

Pertambangan emas di Poboya Palu merupakan salah satu pertambangan dengan teknis secara tradisional. Kegiatan penambangan emas tradisional ini dicirikan oleh penggunaan teknik eksplorasi dan eksploitasi dengan menggunakan peralatan yang sederhana. Proses pengolahan emas menggunakan teknik amalgamasi, yaitu dengan mencampur bijih dengan merkuri untuk membentuk amalgam dengan media air (Wawo, 2017).

Bioremediasi merupakan pengembangan dari bidang bioteknologi lingkungan dengan memanfaatkan proses biologi dalam mengendalikan

pencemaran (Hardiani, 2011). Bioremediasi dapat dikerjakan dengan bantuan bakteri. Berkaitan dengan beberapa hal ini maka akan dilakukan penelitian tentang isolasi bakteri yang dapat diaplikasikan untuk mengurangi dampak pencemaran timbal (Pb) yang ditimbulkan serta dapat dimanfaatkan juga untuk kepentingan penelitian lain sejenis.

1.2.Tujuan Penelitian

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini yaitu :

1. Untuk mendapatkan isolat bakteri pengakumulasi logam berat timbal (Pb) pada sampel tanah dari lahan tambang emas.
2. Untuk mengetahui kemampuan bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi timbal (Pb) pada berbagai konsentrasi.

1.3.Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi timbal (Pb) yang bersifat patogen terhadap manusia dan memberikan solusi penanganan pencemaran lingkungan oleh timbal (Pb) dengan menggunakan cara yang aman, murah, dengan memanfaatkan isolat bakteri dari lahan tambang emas.

1.4.Waktu dan Tempat

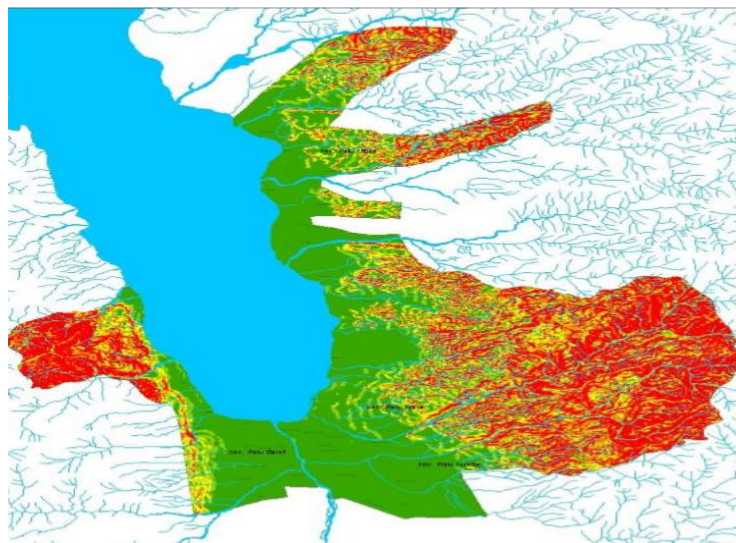
Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November sampai Desember 2019 di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pertambangan

2.1.1. Pertambangan Emas



Gambar 2.1 Peta Kota Palu
Sumber : Bappeda Kota Palu, 2010

Kota Palu yang berada pada kawasan dataran lembah Palu dan teluk Palu, secara astronomis terletak antara $0^{\circ},36''$ - $0^{\circ},56''$ Lintang Selatan dan $119^{\circ},45''$ - $121^{\circ},1''$ Bujur Timur. Ketinggian wilayah kota Palu sekitar 0-700 meter dari permukaan laut. Secara geografis, kota Palu di belah menjadi 2 wilayah besar yaitu wilayah barat dan timur yang secara langsung di belah oleh Sungai Palu. Anakan sungai-sungai yang mengalir dari perbukitan di bagian Utara, Timur selatan dan Barat menuju ke arah pedataran bermuara di Sunai Palu, serta menampung pula limbah-limbah air rumah tangga yang tersalurkan melalui

drainase yang kemudian menuju ke Teluk Palu. Wilayah Kota Palu dicirikan oleh bentuk utama berupa lembah (graben) dimana pusat kota terletak di bagian tengah dari lembah tersebut. Orientasi lembah ini mengikuti arah utama jalur pegunungan di kedua sisinya, yaitu berarah relatif di utara-selatan (Bappeda Kota Palu, 2010).

Industri pertambangan akan selalu berhadapan dengan sesuatu yang sangat terbatas, baik lokasi, jenis, jumlah maupun mutu materialnya. Keterbatasan tersebut ditambah lagi dengan usaha harus meningkatkan keselamatan kerja serta menjaga kelestarian fungsi lingkungan hidup. Sehingga dalam mengelola sumber daya mineral harus menerapkan sistem yang sesuai dan tepat, baik dari segi teknik maupun ekonomis, agar perolehannya dapat optimal. Begitu pula dengan pertambangan emas.

Pertambangan emas di Poboya Palu merupakan salah satu pertambangan dengan teknis secara tradisional. Kegiatan penambangan emas tradisional ini dicirikan oleh penggunaan teknik eksplorasi dan eksploitasi dengan menggunakan peralatan yang sederhana. Proses pengolahan emas menggunakan teknik amalgamasi, yaitu dengan mencampur bijih dengan merkuri untuk membentuk amalgam dengan media air (Wawo, 2017).

2.1.2. Dampak Lingkungan Pertambangan Emas

Industri pertambangan selain mendatangkan devisa dan menyedot lapangan kerja juga rawan terhadap pengrusakan lingkungan. Banyak kegiatan penambangan yang mengundang sorotan masyarakat sekitarnya karena pengrusakan lingkungan, apalagi penambangan tanpa izin yang selain merusak lingkungan juga membahayakan jiwa penambang karena keterbatasan pengetahuan si penambang dan juga karena tidak adanya pengawasan dari dinas instansi terkait (Yudhistira, 2011).

Bentang lahan yang terjadi di daerah penambangan ini yaitu proses bentang lahan asal proses denudasional, maka tidak lepas mengenai proses-proses pelapukan (weathering), erosi dan gerak massa batuan (mass movement) dan proses pengendapan (sedimentation). Oleh karena itu umumnya bentuk lahan ini terdapat pada daerah dengan topografi berombak, bergelombang, berbukit atau bergunung yang berbatuan lunak (akibat proses pelapukan) dan beriklim basah, sehingga bentuk struktur tidak nampak lagi karena adanya gerak massa batuan (Sintong, 2011).

Dampak negatif yang sering dialami masyarakat sekitar penambangan emas salah satunya mengakibatkan longsor setiap musim hujan. Banyaknya gundukan-gundukan pasir atau tanah yang ada di dekat rumah penduduk dan banyaknya limbah air yang tergenang disekitar tempat tinggal masyarakat akibat penambangan emas tersebut. Rusaknya vegetasi dan sumber air di DAS yang terletak di hulu Sungai. Salah satu penyebab pertumbuhan tanaman tidak maksimal adalah karena sifat tanah yang kedap air (Ma'mun, 2016).

Limbah yang dihasilkan dalam proses pengolahan ditampung dalam bak penampung yang ukurannya lebih besar dari bak penampung usaha silinder. Selanjutnya limbah cair dialirkan langsung ke selokan, parit, kolam atau sungai. Akibatnya dapat terjadi pencemaran areal persawahan, penggembalaan ternak, pakan dan air minum serta penduduk lokal sekitar tempat pemrosesan karena kerusakan lingkungan oleh limbah bahan berbahaya tersebut (Astuti, 2014).

2.2. Pencemaran Logam Berat

Logam berat adalah unsur-unsur kimia dengan densitas lebih besar dari 5 g/cm³, terletak di sudut kanan bawah pada sistem periodik unsur, mempunyai afinitas yang tinggi terhadap S dan biasanya bernomor atom 22 sampai 92, dari

periode 4 sampai 7 (Setiawan, 2014). Logam berat dikenal sebagai toksikan yang potensial, tergantung dari konsentrasi dan jenis ikatan senyawa kimia yang dibentuknya di lingkungan. Keberadaan logam berat dalam suatu limbah akan mempengaruhi toksisitas suatu limbah yang dapat menimbulkan masalah yang serius. Logam berat seperti Ag, Hg, Sn, Pb, Cd dan Cu umumnya toksik pada konsentrasi yang sangat rendah (< 1 ppm) terhadap hampir semua jenis mikroorganisme (Imamuddin, 2001).

Logam berat dalam limbah biasanya berada dalam berbagai macam kondisi seperti tidak terlarut, terlarut, tereduksi, teroksidasi dan kompleks. Kecemasan yang berlebihan terhadap keberadaan logam berat di lingkungan dikarenakan oleh tingkat keracunannya yang sangat tinggi dalam seluruh aspek kehidupan makhluk hidup dan kemampuan akumulasinya yang tinggi (Ratnawati, 2010).

Logam berat masih termasuk golongan logam dengan kriteria yang sama dengan logam-logam lainnya. Perbedaannya terletak pada pengaruh yang diakibatkan bila logam ini diberikan dan atau masuk ke dalam tubuh organisme hidup. Meskipun semua logam berat dapat mengakibatkan keracunan pada makhluk hidup, namun sebagian dari logam berat tersebut tetap dibutuhkan dalam jumlah tertentu yang sangat kecil. Bahkan apabila kebutuhan yang sangat sedikit itu tidak dipenuhi, maka dapat berakibat fatal bagi kelangsungan hidup organisme (Ika, 2012).

Faktor yang menyebabkan logam tersebut dikelompokkan ke dalam zat pencemar yaitu logam berat tidak dapat terurai melalui biodegradasi seperti pencemar organik, logam berat dapat terakumulasi dalam lingkungan terutama sedimen sungai dan laut, karena dapat terikat dengan senyawa organik dan

anorganik, melalui proses adsorpsi dan pembentukan senyawa kompleks (Ika, 2012).

Dari sekian banyak limbah yang ada di laut, limbah logam berat merupakan limbah yang paling berbahaya karena menimbulkan efek racun bagi manusia. Pencemaran logam berat yang masuk ke lingkungan perairan akan terlarut dalam air dan akan terakumulasi dalam sedimen dan dapat bertambah sejalan dengan berjalannya waktu, tergantung pada kondisi lingkungan perairan tersebut. Logam berat dapat berpindah dari lingkungan ke organisme, dan dari organisme satu ke organisme lain melalui rantai makanan. Logam berat masuk ke dalam jaringan tubuh biota laut melalui beberapa jalan, yaitu saluran pernafasan (insang), saluran pencernaan (usus, hati, ginjal), maupun penetrasi melalui kulit. Jika biota laut yang telah terkontaminasi tersebut dikonsumsi oleh manusia dalam jangka waktu tertentu akan sangat berpengaruh terhadap kesehatan manusia (Setiawan, 2013).

2.2.1. Timbal (Pb)

Logam berat secara langsung maupun tidak langsung dapat membahayakan manusia seperti Timbal. Timbal (Pb) mempunyai berat atom 207,21; berat jenis 11,34; bersifat lunak serta berwarna biru atau silver abu - abu dengan kilau logam, nomor atom 82 mempunyai titik leleh 327,4°C dan titik didih 1.620°C. Timbal termasuk logam berat "trace metals" karena mempunyai berat jenis lebih dari lima kali berat jenis air. Jenis senyawa ini hampir tidak larut dalam air, namun dapat dengan mudah larut dalam pelarut organik misalnya dalam lipid. Timbal tidak mengalami penguapan namun dapat ditemukan di udara sebagai

partikel. Karena timbal merupakan sebuah unsur maka tidak mengalami degradasi (penguraian) dan tidak dapat dihancurkan (Tangio, 2013).

Timbal dahulu digunakan sebagai konstituen di dalam cat, materai dan saat ini banyak di gunakan dalam bensin. Pb organik (TEL singkatan dari *tetra ethyl lead*) sengaja ditambahkan ke dalam bensin untuk meningkatkan oktan (Said, 2010). Sehingga limbah dari kapal-kapal tersebut dapat menyebabkan kadar Pb di perairan tersebut menjadi tinggi. Logam berat Pb yang terkandung dalam bahan bakar sebagai anti pemecah minyak (seperti Pb tetraethyl dan tetramethyl) ini kemudian dilepaskan ke atmosfer melalui alat pembuangan asap dan bagian ini kemudian terlarut dalam laut. Selain itu aktivitas manusia yang terjadi di daratan seperti buangan limbah rumah tangga melalui sampah-sampah metabolik dan korosi pipa-pipa air yang mengandung logam-logam berat juga dapat memberikan andil yang cukup besar terhadap masuknya logam-logam berat di perairan laut (Ika, 2012).

Timbal banyak digunakan sebagai bahan pengemas, saluran air, alat-alat rumah tangga dan hiasan. Dalam bentuk oksida timbal digunakan sebagai pigmen/zat warna dalam industri kosmetik dan glase serta industri keramik yang sebagian diantaranya digunakan dalam peralatan rumah tangga. Dalam bentuk aerosol anorganik dapat masuk ke dalam tubuh melalui udara yang dihirup atau makanan seperti sayuran dan buah-buahan (Gusnita, 2012)

Timbal (Pb) adalah logam yang mendapat perhatian utama dalam segi kesehatan, karena dampaknya pada sejumlah besar orang akibat keracunan makanan atau udara yang terkontaminasi Pb memiliki sifat toksik yang berbahaya. Timbal (Pb) juga salah satu logam berat yang mempunyai daya toksitas yang

tinggi terhadap manusia karena dapat merusak perkembangan otak pada anak-anak, menyebabkan penyumbatan sel-sel darah merah, anemia dan mempengaruhi anggota tubuh lainnya. Timbal dapat diakumulasi langsung dari air dan dari sedimen oleh organisme laut (Ika, 2012).

2.2.2. Pengaruh Timbal pada Lingkungan dan Mahluk Hidup

Sumber kontaminasi logam berat ada dua, yaitu lewat pencemaran udara dan dari bahan makanan. Pencemaran lewat udara terutama berasal dari asap buangan kendaraan bermotor (Widaningrum, 2007). Emisi Timbal dari gas buangan tetap akan menimbulkan pencemaran udara dimanapun kendaraan itu berada. Timbal sebagai gas buang kendaraan bermotor dapat membahayakan kesehatan dan merusak lingkungan. Timbal yang terhirup oleh manusia setiap hari akan diserap, disimpan dan kemudian ditampung dalam darah (Gusnita, 2012).

Keberadaan timbal di lingkungan yang berasal dari polusi kendaraan bermotor, tambang timah, pabrik plastik, pabrik cat, percetakan, peleburan timah. Logam Pb diperairan merupakan suatu masalah yang perlu mendapat perhatian khusus, karena logam berat ini dapat berpengaruh buruk terhadap seluruh organisme yang ada di perairan dan dapat terakumulasi dalam rantai makanan (Tangio, 2013).

Selain udara, timbal juga dapat mencemari air. Biota perairan yang terakumulasi timbal apabila dikonsumsi dapat mengakibatkan penghambatan sistem pembentukan hemoglobin (Hb). Jumlah timbal (Pb) yang diserap oleh tubuh walaupun hanya sedikit, logam ini ternyata sudah sangat menjadi sangat berbahaya. Sebagian kecil logam Pb dieksresikan lewat urin atau feses karena sebagian terikat oleh protein, sedangkan sebagian lagi terakumulasi dalam ginjal,

hati, kuku, jaringan lemak, dan rambut (Hardiani, 2011). Hal ini disebabkan senyawa-senyawa Timbal (Pb) dapat memberikan efek racun terhadap banyak organ yang terdapat dalam tubuh manusia (Astuti, 2016).

Logam berat masuk ke lingkungan tanah melalui penggunaan bahan kimia yang langsung mengenai tanah, penimbunan debu, hujan atau pengendapan, pengikisan tanah dan limbah buangan. Menurut Darmono (1995), interaksi logam berat dan lingkungan tanah dipengaruhi oleh tiga faktor, yaitu: a) proses sorpsi atau desorpsi, b) difusi pencucian, dan c) degradasi (Widaningrum, 2017).

Keberadaan logam berat dalam tanah perlu mendapatkan perhatian yang serius karena tiga hal, meliputi: 1) bersifat racun dan berpotensi karsinogenik; 2) logam dalam tanah pada umumnya bersifat mobile 3) mempunyai sifat akumulatif dalam tubuh manusia. Kandungan logam dalam tanah terkontaminasi sudah cukup lama sekitar 3 tahun lebih, maka senyawa organik yang ada telah mengalami degradasi. Oleh karena itu kandungan logam yang terdapat dalam tanah terus menerus terjadi peningkatan (Hardiani, 2011).

Timbal (Pb) sebagian besar diakumulasi oleh organ tanaman, yaitu daun, batang, akar dan umbi-umbian (bawang merah). Perpindahan timbal dari tanah ke tanaman tergantung komposisi dan pH tanah. Konsentrasi timbal yang tinggi (100-1000 mg/kg) akan mengakibatkan pengaruh toksik pada proses fotosintesis dan pertumbuhan. Timbal hanya mempengaruhi tanaman bila konsentrasinya tinggi. Tanaman dapat menyerap logam Pb pada saat kondisi kesuburan dan kandungan bahan organik tanah rendah. Pada keadaan ini logam berat Pb akan terlepas dari ikatan tanah dan berupa ion yang bergerak bebas pada larutan tanah. Jika logam lain tidak mampu menghambat keberadaannya, maka akan terjadi

serapan Pb oleh akar tanaman. Timbal merupakan logam berat yang sangat beracun, dapat dideteksi secara praktis pada seluruh benda mati di lingkungan dan seluruh sistem biologis (Widaningrum, 2007).

Logam berat telah banyak terdeteksi pada sayuran, terutama yang ditanam dekat dengan jalan raya yang rentan polusi udara, antara lain yang berasal dari asap pabrik dan asap kendaraan bermotor. Penelitian yang dilakukan Ayu (2002) menunjukkan bahwa pada komoditas kangkung dan bayam yang dijual di pasar daerah Bogor mempunyai kadar timbal (Pb) di atas ambang batas cemaran logam sesuai yang ditetapkan Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, yaitu 2 ppm. Pencemaran timbal (Pb) pada sayuran setelah pasca panen terjadi selama pengangkutan, penjualan, dan distribusi (Widaningrum, 2017).

2.3. Bioremediasi

Bioremediasi ini dengan menggunakan makhluk hidup spesifik yang mampu hidup di lingkungan tercemar dan memiliki kemampuan untuk mengurangi toksisitas yang beresiko terhadap kesehatan manusia dan/atau lingkungan (Inggraini, 2014). Selain hemat biaya, dapat juga dilakukan secara *in situ* langsung di tempat dan prosesnya alamiah. Laju degradasi mikroba terhadap logam berat tergantung pada beberapa faktor, yaitu aktivitas mikroba, nutrisi, derajat keasaman dan faktor lingkungan (Hardiani, 2011). Keberhasilan bioremediasi adalah dapat mengubah logam aktif dalam tanah terkontaminasi menjadi tidak aktif oleh aktivitas mikroba.

Sehubungan dengan bioremediasi, Pemerintah Indonesia telah mempunyai payung hukum yang mengatur standar baku kegiatan Bioremediasi dalam mengatasi permasalahan lingkungan akibat kegiatan pertambangan dan perminyakan serta bentuk pencemaran lainnya (logam berat dan pestisida) melalui

Kementerian Lingkungan Hidup, Kep Men LH No.128 tahun 2003, tentang tatacara dan persyaratan teknis dan pengelolaan limbah minyak bumi dan tanah terkontaminasi oleh minyak bumi secara biologis (Bioremediasi) yang juga mencantumkan bahwa bioremediasi dilakukan dengan menggunakan mikroba lokal (Priadie, 2012).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses bioremediasi adalah; mikroba, nutrisi dan lingkungan. Mikroba memiliki kemampuan untuk mendegradasi, mentransformasi dan menyerap senyawa pencemar. Mikroba yang digunakan dapat berasal dari golongan fungi, bakteri, ataupun mikroalga., nutrisi dan lingkungan. Nutrisi, jenis nutrisi yang dibutuhkan bagi mikroba, diantaranya unsur karbon (C), Nitrogen (N), Posfor (P) dan lain lain.; Lingkungan yang berpengaruh antara lain oksigen, suhu. DO, dan pH (Puspitasari, 2016).

2.3.1. Macam-macam Bioremediasi

Berdasarkan agen proses biologis serta pelaksanaan rekayasa, bioremediasi dapat dibagi menjadi empat kelompok yaitu, fitoremediasi, bioremediasi *in situ*, bioremediasi *ex situ*, dan bioaugmentasi.

Fitoremediasi adalah salah satu teknik dari bioremediasi dengan menggunakan tumbuhan untuk menghilangkan polutan dari tanah atau perairan yang terkontaminasi. Fitoremediator dapat berupa herba, semak bahkan pohon. Semua tumbuhan mampu menyerap logam dalam jumlah yang bervariasi, tetapi beberapa tumbuhan mampu mengakumulasi unsur logam tertentu dalam konsentrasi yang cukup tinggi. Untuk mempercepat proses fitoremediasi dapat digunakan mikoriza. Mikoriza tidak hanya meningkatkan laju transfer nutrisi di akar tanaman inang, tetapi juga meningkatkan ketahanan terhadap cekaman biotik

dan abiotik. Selain itu, mikoriza juga membantu mempertahankan stabilitas pertumbuhan tanaman pada kondisi tercemar (Sianipar, 2019).

Bioaugmentasi, dimana mikroorganisme pengurai ditambahkan untuk melengkapi populasi mikroba yang telah ada. Alasan menambahkan mikroorganisme pendegradasi minyak adalah karena populasi mikroba asli mungkin tidak mampu menurunkan berbagai substrat/senyawa dalam campuran kompleks seperti minyak bumi (Yasmin, 2017).

Bioremediasi *in situ* menggunakan pupuk organik kompos sangat efektif, karena mikroorganisme dalam pada kompos akan mampu mendegradasi residu pestisida dalam tanah. Selain itu kompos mampu memperbaiki sifat fisik tanah, sifat biologis dan sifat kimia tanah untuk peningkatan kesuburan tanah (Setiyo, 2011).

Bioremediasi dapat diaplikasikan pada masalah lingkungan yang bervariasi dan dapat dilakukan secara langsung pada lahan tercemar *in situ* atau dengan memindahkan atau mengeduk lahan untuk dilakukan pemulihan (*land treatment* atau *landfarming*) di suatu wilayah khusus, perlakuan *composting*, perlakuan fase padat dan dapat menggunakan bioreaktor diatas tanah (*ex situ*). Modifikasi bioremediasi *landfarming* dapat dilakukan dengan perlakuan tanah, meningkatkan intensitas penyiraman, proses aerasi, penambahan nutrisi berupa kompos atau bahan-bahan lain seperti serbuk kayu (Pudji, 2006). *Ex situ* adalah pengelolaan yang meliputi pemindahan secara fisik bahan-bahan yang terkontaminasi ke suatu lokasi untuk penanganan lebih lanjut. Penggunaan bioreaktor, pengolahan lahan (*landfarming*), pengkomposan dan beberapa bentuk

perlakuan fase padat lainnya adalah contoh dari teknologi *ex situ* (Puspitasari, 2016).

2.3.2. Bioremediasi Logam Berat menggunakan Mikroorganisme

Secara umum, mikroba mengurangi bahaya pencemaran logam berat dengan cara bioleaching, biopresipitasi, biohidrometalurgi, dan bioakumulasi. Bioleaching adalah proses pelindian untuk melarutkan logam dari mineralnya dengan bantuan aktivitas mikroorganisme. Sama halnya dengan proses pelindian pada umumnya, prinsip proses pelindian menggunakan mikroorganisme adalah melakukan pelarutan selektif unsur/logam dari mineral tertentu. Asam yang dimanfaatkan sebagai reagen pelindi merupakan hasil metabolisme mikroorganisme (Mubarok, 2015).

Biohidrometalurgi pada prinsipnya mengubah ion logam yang terikat pada senyawa yang tidak dapat larut dalam air menjadi senyawa yang dapat larut dalam air. Biopresipitasi pada prinsipnya mengubah ion logam yang bersifat toksik menjadi suatu senyawa yang tidak toksik. Proses ini umumnya berlangsung dalam kondisi anaerob dan memanfaatkan senyawa kimia sebagai akseptor elektron. Bioakumulasi pada prinsipnya merupakan pengikatan ion-ion logam pada struktur sel mikroba (khususnya dinding sel). Pengikatan ini disebabkan oleh beberapa macam cara yaitu sistem transport aktif kation, ikatan permukaan, dan mekanisme lain (Rohmah, 2017).

2.4. Mekanisme Resistensi Bakteri Terhadap Logam Berat Timbal (Pb)

Mikroorganisme mampu mengabsorpsi atau mentransfer logam melalui reaksi enzimatik, logam tersebut kemudian dapat dimanfaatkan untuk proses metabolisme di dalam sel atau diubah menjadi bentuk kimia lain yang tidak toksik di dalam tanah, air maupun minyak, Menurut Abdelatey et al. (2011) pada

konsentrasi yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan toksik pada mikroorganisme tersebut. Keberadaan logam yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi pertumbuhan, morfologi, aktivitas biokimia, penurunan biomassa dan keanekaragaman populasi mikroorganisme (Inggraini, 2014).

Bakteri indigen merupakan bakteri yang diisolasi dari limbah itu sendiri yang secara alamiah hidup pada limbah, sehingga berpotensi dalam proses bioremediasi (Ikerismawati, 2019). Salah satu mekanisme resistensi pada bakteri terhadap logam adalah adanya protein RND (Resistance, Nodulation, Cell Division) yang mengatur transportasi logam melalui membran sel (Farisna, 2015).

Ahmad et al. (2005) mengemukakan bahwa kemampuan bakteri menghasilkan polisakarida ekstraselular dapat melindungi sel dari pengaruh toksik logam berat. Jenis bakteri yang resisten terhadap logam berat mungkin berada di dalam tanah dan di lokasi tambang. Apabila bakteri tersebut dapat beradaptasi pada lingkungan dengan tingkat kontaminasi logam berat yang tinggi, maka diasumsikan bahwa penggunaan bakteri tersebut sangat efektif dalam meningkatkan reduksi logam berat (Suryani, 2011).

Metabolisme bakteri berkaitan erat dengan mekanisme toleransi atau resistensi bakteri terhadap logam berat Pb. Sebagian besar bakteri toleran terhadap logam berat dengan cara melakukan mekanisme *efflux*. Terdapat juga mekanisme toleransi atau resistensi lainnya, yaitu dengan cara kompleksasi meliputi produksi polisakarida ekstraselular (EPS) bersifat anion yang berfungsi sebagai bioakumulator, produksi metabolit organik yang memiliki sifat pengkelat dan membentuk kompleks dengan logam, presipitasi, kristalisasi ekstraselular oleh bakteri pereduksi sulfat sehingga membentuk deposit sulfida yang kaya akan

logam dan biakumulasi interseluler melalui pembentukan metallothionein (protein kaya sistein dalam sel dapat mengikat logam) yang berfungsi untuk detoksifikasi, penyimpanan, dan regulasi ion logam dalam sel (Ikerismawati, 2019).

Bakteri dapat dimanfaatkan dalam proses biosorbent atau pengikatan logam berat agar tidak membahayakan lingkungan. Pengikatan logam berat oleh bakteri dapat dipisahkan menjadi fase pengikatan dan transport aktif. Fase pengikatan tergantung pada metabolisme sel yaitu absorpsi melalui dinding sel atau permukaan eksternal, kemudian diikuti dengan transport aktif yang tergantung pada metabolisme sel. Pada proses metabolisme, logam berat dapat terakumulasi pada membran sel (ekstraseluler) dan pada sitoplasma (intraseluler). Akumulasi ekstraseluler dapat terjadi karena pengikatan ion-ion logam oleh polimer ekstraseluler atau polisakarida ekstraseluler yang dihasilkan sel-sel mikroorganisme dan komplikasi antara ion-ion logam yang bermuatan positif dengan sisi reaktif pada permukaan sel yang bermuatan negatif. Sedangkan akumulasi intraseluler dapat terjadi karena proses difusi yang tidak membutuhkan aktivitas mikroorganisme secara langsung dimana gen-gen yang mengendalikan plasmid dalam proses metabolisme tersebut

Cara lain adalah reverse osmosis, elektrodialisis, ultrafiltrasi dan resin penukar ion. Reverse osmosis adalah proses pemisahan logam berat oleh membran semipermeabel dengan menggunakan perbedaan tekanan luar dengan tekanan osmotik dari limbah. Kerugian sistem ini adalah biaya yang mahal sehingga sulit terjangkau oleh industri di Indonesia. Teknik elektrodialisis menggunakan membran ion selektif permeabel berdasarkan perbedaan potensial antara 2 elektroda yang menyebabkan perpindahan kation dan anion, juga

menimbulkan kerugian yakni terbentuknya senyawa logam-hidroksi yang menutupi membran, sedangkan melalui ultrafiltrasi yaitu penyaringan dengan tekanan tinggi melalui membran berpori, juga merugikan karena menimbulkan banyak sludge (lumpur). Resin penukar ion berprinsip pada gaya elektrostatik di mana ion tersebut terdapat (Aminah, 2018).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop, gelas kimia, Erlenmeyer, gelas ukur, pipet volume, neraca analitik, jangka sorong, pipet tetes, incubator, autoklaf, shaker, batang pengaduk, *hockey stick*, pinset, kaca slide, botol sampel, ose lurus, lampu spiritus, *laminary air flow* (laf), tabung reaksi, rak tabung cawan petri, dan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). .

3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah yang terkontaminasi limbah logam berat yang berasal dari lahan tambang emas Poboya Palu, aluminium foil, cling wrap, aquades steril, alkohol 70%, $PbCl_2$, H_2SO_4 , $K_2Cr_2O_7$, HNO_3 , $HClO_4$, NaCl, HCl 25%, Nutrien Agar (NA), Nutrien Broth (NB), $(Pb(CH_3COO)_2)$, *Cristal violet*, *Gram's iodine mordant*, safranin, etil alkohol, water pepton,

3.3. Metode Kerja

3.3.1. Sterilisasi Alat dan Medium

Semua alat yang digunakan disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat yang terbuat dari gelas dan logam disterilkan dalam oven dengan suhu $180^{\circ}C$ selama 2 jam. Alat-alat plastik dan yang tidak tahan dengan suhu tinggi disterilkan menggunakan autoklaf, dengan suhu $121^{\circ}C$ tekanan 2 atm selama 15 menit, sedangkan ose disterilkan dengan cara melidahapikannya menggunakan nyala api

pada lampu spiritus. Sterilisasi medium menggunakan panas basah dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.2. Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil adalah sampel dari tanah lahan tambang emas Poboya Palu, dengan pertimbangan bahwa tanah tersebut memiliki kandungan logam berat khususnya timbal yang tinggi. Sampel diambil dengan metode yang sangat sederhana yaitu langsung mengambilnya menggunakan sendok kemudian dimasukkan ke dalam toples kaca steril dan selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi kemudian disimpan pada suhu ruangan 37⁰C atau pada suhu kamar.

3.3.3. Karakterisasi Kimia Sampel Tanah

3.3.3.1. Analisis Karbon (C)

Sampel tanah dikeringkan kemudian di ayak setelah itu ditimbang 0,500 g ukuran < 0,5 mm, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan 5 ml K₂Cr₂O₇ 1 N, lalu dikocok. Ditambah 7,5 ml H₂SO₄ pekat, dikocok lalu didiamkan selama 30 menit. Diencerkan dengan air bebas ion, dibiarkan dingin dan diimpitkan. Keesokan harinya diukur absorbansi larutan jernih dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 561 nm. Sebagai pembanding dibuat standar 0 dan 250 ppm, dengan memipet 0 dan 5 ml larutan standar 5.000 ppm ke dalam labu ukur 100 ml dengan perlakuan yang sama dengan pengerjaan contoh.

3.3.3.2. Analisis Nitrogen (N)

Analisis ini dilaksanakan dengan menggunakan metode Kjeldahl. Sampel tanah dikeringkan kemudian digerus dan di ayak kemudian ditimbang 0,5 g dengan ukuran < 0,5 mm, lalu dimasukkan ke dalam tabung digest. Ditambahkan 1 g campuran selen dan 3 ml asam sulfat pekat, didestruksi hingga suhu 350⁰C (3-

4 jam). Destruksi selesai bila keluar uap putih dan didapat ekstrak jernih (sekitar 4 jam). Tabung diangkat, didinginkan dan kemudian ekstrak diencerkan dengan air bebas ion hingga tepat 50 ml. dikocok sampai homogen, dibiarkan semalam agar partikel mengendap. Ekstrak digunakan untuk pengukuran N dengan cara destilasi atau cara kolorimetri.

3.3.3.3. Analisis Posfor (P)

Analisis ini dilaksanakan dengan menggunakan metode Olsen. Sampel tanah dikeringkan kemudian digerus dan di ayak setelah sampel tanah < 2 mm ditimbang sebanyak 1,0 g, dimasukkan ke dalam botol kocok, ditambah 20 ml pengestrak Olsen, kemudian dikocok selama 30 menit. Disaring dan bila larutan keruh maka dikembalikan lagi ke atas saringan semula. Ekstrak dipipet 2 ml ke dalam tabung reaksi dan selanjutnya bersama deret standar ditambahkan 10 ml pereaksi pewarna fosfat, dikocok hingga homogen dan biarkan 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 889 nm.

3.3.3.4. Analisis Kalium (K)

Sampel tanah dikeringkan kemudian di ayak setelah itu ditimbang 2,000 ukuran < 2 mm lalu dimasukkan ke dalam botol lalu dikocok dan ditambahkan 10 ml HCl 25% lalu dikocok dengan mesin kocok selama 5 jam lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dibiarkan semalam atau disentrifuse. Ekstrak jernih contoh dipipet 0,5 ml ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 9,5 ml air bebas ion (pengenceran 20 x) dan dikocok. Ekstrak contoh encer dan deret standar dipipet sebanyak 2 ml masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml larutan pereaksi pewarna P dan dikocok. Campuran tersebut dibiarkan selama 30 menit, lalu ukur absorbansinya dengan

spektrofotometer pada panjang gelombang 889 nm. Untuk kalium, ekstrak contoh encer dan deret standar K diukur langsung dengan alat SSA secara Emisi.

3.3.3.5. Analisis Kandungan Logam Berat Timbal pada Tanah

Sampel tanah yang telah kering, dihaluskan dan diayak, lalu ditimbang 1 g dan dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 5 ml HNO₃ dan 0,5 ml PbCl₂, dipanaskan diatas hotplate, setelah itu didiamkan 1 malam kemudian di saring, hasil saringan dianalisis dengan metode AAS (*Atomic Absorption Speckhrofotometry*) (Juhriah dan Alam, 2016).

3.3.4. Isolasi dan Seleksi Bakteri Pereduksi Timbal

Proses isolasi bakteri diawali dengan mengambil 5gram sampel ke dalam 45 ml aquades lalu dihomogenkan sehingga didapatkan pengenceran 10⁻¹. Kultur diencerkan dengan pengenceran bertingkat dari 10⁻¹ sampai 10⁻⁶. Setelah itu dilakukan proses plating, kultur hasil dari pengenceran 10⁻¹ sampai 10⁻⁶ diambil dengan memipet sebanyak 0,1 ml dan diinokulasikan pada permukaan media Nutrien Agar (NA) yang ditambahkan 0,2 mg Pb 2 ppm dengan metode *pour plate*, kemudian diratakan dengan menggunakan *hockey stick* yang telah disterilkan menggunakan alkohol 70% dan api Bunsen. Media yang telah terisi sampel inkubasi secara terbalik dalam inkubator ± 72 jam dengan suhu 37° C hingga terjadi pertumbuhan koloni.

Koloni tunggal yang tumbuh dimurnikan kembali dengan metode *streak plate*. Satu koloni isolat bakteri diambil secara aseptis menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke permukaan media NA, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Satu koloni dipindahkan ke media NA baru berulang-ulang sampai didapatkan kultur murni.

Seleksi bakteri pereduksi timbal dilakukan dengan melihat pertumbuhan koloni bakteri, jika terdapat koloni bakteri yang hidup pada media NA yang mengandung timbal maka bakteri tersebut dapat dikatakan sebagai bakteri yang dapat mereduksi timbal. Hal ini disebabkan karena adanya bakteri tertentu saja yang dapat hidup pada medium yang mengandung timbal.

3.3.5. Karakterisasi Bakteri

3.3.5.1. Pemeriksaan Makroskopis

Pemeriksaan makroskopis koloni dinilai dari bentuk (*punctiform, irregular, filamentous, atau rhizoid*), elevasi (*flat, raised, atau convex*), karakteristik optis (warna, opak, translusen, atau tansparan) dan permukaan (halus atau kasar).

3.3.5.2. Pemeriksaan Mikroskopis (Pewarnaan Gram)

Isolat bakteri yang telah dibuat dioles pada kaca slide dan ditambahkan 1 tetes Kristal violet kemudian didiakan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir, Setelah itu, ditambahkan dengan 1 tetes Gram's iodine mordant (Emerck) dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya isolat bakteri ditambah etil alkohol 95% selama 30 detik dicuci dengan air mengalir kembali. Akhirnya isolat bakteri ditambahkan safranin selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dan diperiksa dibawah mikroskop, uji gram positif jika berwarna ungu dan negative jika berwarna merah.

3.3.6. Uji Resistensi Bakteri terhadap Timbal (Pb)

Setelah didapatkan isolat murni, bakteri kemudian diinokulasikan ke dalam medium cair *Nutrient Broth* (NB) yang telah diperkaya dengan timbal ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) dengan konsentrasi masing-masing 0, 50, 100, 150 ppm. Masing-

masing perlakuan diberi ulangan tiga kali. Kemudian diinkubasikan ke dalam incubator shaker selama 72 jam dengan kecepatan 220 rpm, untuk melihat ketahanan bakteri terhadap logam berat. Kemudian masing-masing bakteri setiap perlakuan diukur nilai *Optical Density* (OD) dengan Panjang gelombang 600 nm, untuk mengetahui tingkat kepadatan bakteri pada spektrofotometer. Semakin tinggi nilai yang ditunjukkan OD pada berbagai konsentrasi, maka semakin tinggi pula kepadatan bakteri dan semakin tahan bakteri terhadap konsentrasi Pb.

Kemudian masing-masing bakteri setiap perlakuan diukur nilai *Optical Density* (OD) dengan Panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui tingkat kepadatan bakteri pada spektrofotometer. Setelah diketahui beberapa isolat yang bertahan terhadap logam berat berdasarkan tingkat kepadatan, dilanjutkan ke tahap uji penurunan kadar Pb.

III.3.7 Uji Penurunan Kadar Timbal (Pb) oleh bakteri

Setelah didapatkan bakteri tahan Pb, lalu bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair *Nutrient Broth* (Nb) yang telah diperkaya dengan timbal dengan konsentrasi resistensi tertinggi, yaitu 150 ppm. Ulangan pada perlakuan ini adalah tiga kali. Kemudian diinkubasikan ke dalam *incubator shaker* selama 24 jam pada suhu 37⁰C dengan kecepatan 220 rpm, sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit kemudian dibuat kurva pertumbuhan bakteri dengan mengukur OD dan TPC nya setiap 4 jam sekali, selanjutnya diukur kadar timbal (Pb) dengan SSA.

III.3.8 Pengukuran Kadar Timbal (Pb)

III.3.8.1 Pengukuran Kadar Pb Menggunakan SSA

Dilakukan pengambilan 5 ml sampel lalu dimasukkan ke dalam gelas beaker ukuran 100 mL lalu ditambahkan dengan 10 ml HNO₃ dan 3 ml HClO₄. Dipanaskan HClO₄ diatas *hot plate* dengan suhu 100⁰C hingga volumenya berkurang setengahnya dari volume awal, untuk menguapkan sebanyak mungkin

zat organik yang ada. Jika masih keruh, maka ditambahkan HNO₃ dan zat pengoksidasi lain selain sesuai dengan komposisi, kemudian disaring ke dalam labu ukur 50 ml dan diencerkan dengan menggunakan HNO₃ 1 M hingga tanda batas dan diukur kadar timbal (Pb) dengan SSA (Rohmah, 2017).

III.3.8.2 Pengukuran Efisiensi Penurunan Kadar Pb oleh Bakteri

Menurut Fauziah (2011), menyatakan bahwa perhitungan konsentrasi logam Pb terserap atau menggunakan metode Langmuir dengan persamaan sebagai berikut :

$$C_s = C_a - C_b$$

Perhitungan % Penurunan Kadar Logam Penentuan persentase logam berat Pb sesuai dengan persamaan :

$$D = \frac{C(a)-C(b)}{C(a)} \times 100\%$$

Keterangan : D = Daya Penurunan Kadar Pb

C_s = Pb yang kadarnya berkurang (ppm)

C(a) = Konsentrasi awal Pb (ppm)

C(b) = Konsentrasi akhir Pb (ppm)