

**KARAKTERISASI DAN UJI TOLERANSI KADMIUM PADA ISOLAT  
BAKTERI PEREDUKSI SULFAT DARI AIR ASAM TAMBANG**

**FERA YUNIAR**

**H411 16 317**



**DEPARTEMEN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2020**

**KARAKTERISASI DAN UJI TOLERANSI KADMIUM PADA ISOLAT  
BAKTERI PEREDUKSI SULFAT DARI AIR ASAM TAMBANG**

*Skripsi ini dibuat untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat untuk  
memperoleh gelar sarjana*

**FERA YUNIAR**

**H411 16 317**

**DEPARTEMEN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2020**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**KARAKTERISASI DAN UJI TOLERANSI KADMIUM PADA ISOLAT  
BAKTERI PEREDUKSI SULFAT DARI AIR ASAM TAMBANG**


*Disusun dan Diajukan oleh:*

**FERA YUNIAR**

**H411 16 317**

*Di setujui oleh:*

**Pembimbing Utama**

  
**Dr. Fakhruddin, M.Si.**  
**NIP. 19650915 199103 1 002**

**Pembimbing Pertama**

  
**Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si.**  
**NIP. 19651209 199008 2 001**

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur Atas Kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat berkah dan hidayah-Nya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Karakterisasi dan Uji Toleransi Kadmium pada Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat dari Air Asam Tambang”** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Selama proses perwujudan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan baik moral maupun material dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, dengan hati yang tulus dan ikhlas penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang dengan penuh suka cita memberikan semangat, motivasi dan bantuan selama proses pencapaian gelar sarjana. Dengan segala kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada keluarga terkhusus kepada kedua orang tua penulis yakni, Ibunda Harlina dan Ayahanda Jutin serta kedua adik penulis Nova dan Ferdi yang telah mendukung dan memotivasi penulis dalam menuntut ilmu dan doa dari mereka yang tak henti-hentinya serta cinta kasih yang diberikan kepada penulis. Terima kasih untuk segala pengertian dan dukungannya yang menjadi alasan utama penulis untuk segera menyelesaikan skripsi ini, semoga ini bisa membuat ayahanda dan ibunda bahagia dan bangga.

Kepada Bapak Dr. Fahrudin, M.Si. selaku pembimbing utama sekaligus pembimbing akademik dan Ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si. selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas waktu, bimbingan dan

arahannya berupa kritik dan saran yang membangun dan memotivasi yang telah diberikan selama penulis melaksanakan proposal, penelitian, hingga ke tahap penyusunan skripsi.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
2. Ibu Dr. Nur Haedar M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin terima kasih atas ilmu, masukan serta saran kepada penulis.
3. Ibu Dr. Zohra Hasyim, M.Si. dan Bapak Andi Arfan Sabran, S.Si., M.Si selaku penguji sidang sarjana. Kepada seluruh dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Kepada staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
4. Kepada Fuad Gani S.Si. dan Nurul Qalby, S.Si. yang telah banyak membantu, membimbing, dan memberi arahan penulis dalam mengerjakan penelitian baik berupa ilmu, kritik, saran yang sangat berharga bagi penulis. Terima kasih untuk kesabaran dan kebaikan hatinya selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Kepada Heriadi, S.Si. terima kasih yang teramat dalam untuk segala bantuan, bimbingan dan kesabarannya dalam mendampingi penulis sampai selesainya penelitian. Semoga selalu diberikan kebahagiaan dan keberkahan dalam setiap detik dalam hidupnya.

6. Kepada Siti Selvi Sridayanti, terima kasih atas dukungan dan doanya kepada penulis
7. Kepada teman seperjuangan, khususnya kepada Ribka L. Tobondo, terima kasih selalu mengingatkan dan mendorong penulis hingga selesainya skripsi ini.
8. Kepada sahabatku Fiqha Septia Ningsih terima kasih selalu menemani, mendoakan dan memotivasi penulis untuk menyelesaikan skripsi.
9. Kepada Muh. Syahdan Aska terima kasih selalu meluangkan waktu untuk mendampingi penulis dalam melakukan penelitian.
10. Kepada teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2016; terima kasih atas pengalaman organisasi yang tercipta, kebersamaan, canda tawa, dukungan, motivasi, serta bantuan yang tidak dapat penulis jabarkan satu persatu.

Dengan ini Penulis mengucapkan terima kasih banyak untuk semua pihak yang terlibat dan kepada semua pihak yang mungkin terlupa untuk disebutkan. Sesungguhnya Allah-lah sebaik-baiknya pembalas segala kebaikan. Penulis berharap semoga karya kecil ini mendapatkan ridho-Nya dan semoga kedepannya dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan. Penulis juga menyadari masih banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini karena sesungguhnya kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT.

Makassar, Maret 2020

Penulis

## ABSTRAK

Penelitian ini berjudul “Karakterisasi dan Uji Toleransi Kadmium pada Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat dari Air Asam Tambang”. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan toleransi isolat bakteri pereduksi sulfat terhadap kadmium (Cd), mengetahui toleransi pH dari isolat bakteri pereduksi sulfat dan mengetahui kemampuan isolat bakteri pereduksi dalam mereduksi sulfur menjadi H<sub>2</sub>S. Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Januari-Februari 2020 di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Isolat bakteri Pereduksi sulfat (BPS) yakni R1, R2, M1, M2 dan M3 dilakukan uji produksi H<sub>2</sub>S dengan menggunakan medium TSIA dan uji pH dengan variasi pH 3, 5 dan 7. Selanjutnya dilakukan uji toleransi terhadap kadmium (Cd) dengan metode turbidimetri menggunakan spektrofotometer. Hasil penelitian yang telah dilakukan, yaitu isolat R1, R2, M1, M2 dan M3 memiliki kemampuan toleransi pada kadmium hingga konsentrasi 50 ppm. Hal ini dapat dilihat dari nilai OD (*Optical Density*) dari setiap isolat, yaitu Isolat M2 memiliki nilai OD 1,208, M3 0,845, R1 0,594, isolat M1 0,157 dan isolat R2 0,069. Sedangkan kemampuan pertumbuhan tertinggi setiap isolat yaitu pada konsentrasi 0 ppm (kontrol). Hasil uji produksi H<sub>2</sub>S menunjukkan positif pada isolat R1, M2 dan M3 yang ditandai dengan terbentuknya endapan hitam pada dasar media. Pada uji pH menunjukkan ke-5 isolat bakteri toleran terhadap lingkungan asam, tetapi hanya 3 isolat bakteri (M2, R1 dan M3) yang memiliki jumlah total bakteri tertinggi yaitu  $34 \times 10^3$ ,  $31 \times 10^3$  dan  $27 \times 10^3$ , sedangkan jumlah total bakteri isolat M1 hanya mencapai  $11 \times 10^3$  dan R2  $9 \times 10^3$ .

Kata Kunci: Bakteri pereduksi sulfat, Logam berat, Turbidimetri, Air asam Tambang.

## ABSTRACT

This study is entitled "Characterization and Cadmium Tolerance Test on Sulfate Reducing Bacteria Isolates from Acidic Mine Water". This study aims to determine the tolerance ability of sulfate reducing bacterial isolates to cadmium (Cd), determine the pH tolerance of sulfate reducing bacterial isolates and determine the ability of reducing bacterial isolates in reducing sulfur to H<sub>2</sub>S. This research was conducted in January-February 2020 in the Microbiology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Hasanuddin University. Sulfate reducing bacteria (SRB) isolates is R1, R2, M1, M2 and M3 werw tested for H<sub>2</sub>S production using TSIA medium and pH test with variations in pH 3, 5 and 7. Furthermore, a tolerance test for cadmium (Cd) using the turbidimetry method used spectrophotometer. The results of research that have been carried out, namely isolates R1, M2 and M3 have the ability to tolerance cadmium to a concentration of 50 ppm. This can be seen from the OD (Optical Density) value of each isolate, namely M2 isolates having OD values 1,208, M1 0.845, R1 0.594, M1 0,157 and isolates R2 0,069. While the highest growth ability of each isolate is at 0 ppm concentration (control). H<sub>2</sub>S production test results showed positive on isolates R1, M2 and M3 which were marked by the formation of black deposite on the medium. The pH test showed that 5 bacterial isolates tolerant of the acidic environment, but only 3 bacterial isolates (M2, R1 and M3) had the highest total bacterial count were  $34 \times 10^3$ ,  $31 \times 10^3$  and  $27 \times 10^3$ , while the total number of isolate bacteria M1 only reaches  $11 \times 10^3$  and R2  $9 \times 10^3$ .

Keywords: Sulfate reducing bacteria, Heavy metals, Turbidimetry, Acid mine water.



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	4
1.3 Manfaat Penelitian .....	4
1.4 Waktu dan Tempat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
II.1 Tinjauan Umum Logam Berat .....	5
II.1.1 Pencemaran Lingkungan oleh Logam Berat .....	5
II.1.2 Akumulasi Logam Berat .....	7
II.2 Tinjauan Umum Logam Berat Kadmium (Cd) .....	9
II.2.1 Sifat dan Bentuk dari Kadmium (Cd) .....	9
II.2.2 Kegunaan Kadmium (Cd) .....	10
II.2.3 Sumber Kadmium (Cd) .....	11
II.2.4 Dampak Kadmium (Cd) .....	13

II.3 Tinjauan Umum Air Asam Tambang.....	17
II.3.1 Pencemaran Air Asam Tambang (AAT) .....	17
II.3.2 Bakteri Air Asam Tambang (AAT).....	20
II.4 Bakteri yang Toleran Kadmium.....	25
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
III.1 Alat dan Bahan.....	28
III.1.1 Alat .....	28
III.1.2 Bahan.....	28
III.2 Prosedur Kerja .....	28
III.2.1 Sterilisasi ALat dan Medium.....	28
III.2.2 Pembuatan Medium.....	29
III.2.3 Peremajaan Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat .....	30
III.2.4 Pembuatan <i>Stock</i> Bakteri Pereduksi Sulfat .....	30
III.2.5 Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Cd	30
III.2.6 Uji Produksi H <sub>2</sub> S .....	31
III.2.7 Uji pH .....	32
III.2.8 Analisis Data .....	33
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>34</b>
IV.1 Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Cd .....	34
IV.2 Uji Produksi H <sub>2</sub> S .....	38
IV.3 Uji pH .....	42
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>40</b>
V.1 Kesimpulan .....	45
V.2 Saran .....	45
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>46</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 1.	Karakteristik isolat uji produksi H <sub>2</sub> S .....	39

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 1.	Pertumbuhan Bakteri pada Berbagai Konsentrasi Kadmium (A.) Pertumbuhan isolat bakteri R1, (B.) Pertumbuhan isolat bakteri R2 dan (C.) Pertumbuhan isolat bakteri M1, (D.) Pertumbuhan isolat bakteri M2 dan (E.) Pertumbuhan isolat bakteri M3.....	36
Gambar 2.	Jumlah total pertumbuhan isolat bakteri pada berbagai variasi pH ...	43

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1.	Skema Kerja Keseluruhan .....	51
Lampiran 2.	Skema Kerja Peremajaan Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat.....	52
Lampiran 3.	Skema Kerja Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Cd Tahap Awal.....	53
Lampiran 4.	Skema Kerja Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Cd Tahap Akhir .....	54
Lampiran 5.	Skema Kerja Uji Produksi H <sub>2</sub> S.....	55
Lampiran 6.	Skema Kerja Uji pH (Derajat Keasaman) Tahap Awal.....	56
Lampiran 7.	Skema Kerja Uji pH (Derajat Keasaman) Tahap Akhir .....	57
Lampiran 8.	Tabel Perhitungan Nilai OD ( <i>Optical Density</i> ) .....	58
Lampiran 9.	Tabel Perhitungan Total Bakteri.....	59
Lampiran 10.	Gambar Peremajaan Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat.....	60
Lampiran 11.	Gambar <i>Stock</i> Bakteri Pereduksi Sulfat.....	61
Lampiran 12.	Gambar Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Cd Tahap Awal .....	62
Lampiran 13.	Gambar Uji Toleransi Tumbuh Bakteri Pereduksi Sulfat pada Cd Tahap Akhir.....	63
Lampiran 14.	Gambar Uji pH (Derajat Keasaman) .....	64

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **I.1 Latar Belakang**

Pesatnya pembangunan industri selain dampak positif, kemajuan industri juga menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan. Hal ini merupakan suatu kenyataan yang harus dihadapi bahwa dalam proses produksi suatu industri selain produk yang bernilai juga dihasilkan limbah. Limbah tersebut apabila tidak dikelola secara benar dapat menyebabkan terjadinya pencemaran lingkungan. Apabila dilihat dari bentuknya, pencemaran yang disebabkan oleh limbah industri dapat berbentuk padat, cair, gas maupun kebisingan. Sedang dilihat dari komponen-komponen pencemar yang terkandung dalam limbah tersebut maka pencemaran yang terjadi dapat dalam bentuk pencemaran fisika, kimia, biologis dan radioaktif (Moertinah, 2010).

Salah satu industri adalah pertambangan yang karena nilainya dalam memacu kemakmuran ekonomi negara juga menimbulkan dampak terhadap lingkungan. Dampak lingkungan inipun dapat berimbas ke kehidupan masyarakat, baik dari air yang tercemar logam berat hingga organisme yang hidup di air tersebut, tanah dan bahkan tumbuhan.

Limbah pertambangan yang bersifat asam ini, akan menurunkan pH perairan yang menampung limbah tambang tersebut. Hal ini sebagai peran dari unsur Fe yang membentuk pirit. Akibat pelepasan buangan tambang batu bara yang masih aktif, dan tingginya kadar logam seperti Fe, Mn, Zn, Cu, Ni dan terjadi urutan reaksi-reaksi oksidasi sehingga terbentuk  $\text{FeS}_2$  yang potensial menurunkan pH perairan sehingga timbul air asam tambang (AAT) yang memiliki

dampak besar bagi kelestarian lingkungan maupun masyarakat sekitar baik secara langsung maupun tidak langsung. Pembentukan air asam tambang dipengaruhi oleh tiga faktor utama yaitu air, udara dan material yang mengandung mineral-mineral sulfid. Pada sistem tambang terbuka sangat berpotensi terbentuk air asam tambang karena sifatnya berhubungan langsung dengan udara bebas sehingga faktor-faktor yang dapat membentuk air asam tambang akan semakin mudah bereaksi (Kiswanto, *et al.*, 2018).

AAT merupakan air yang mengalir atau yang terdapat pada daerah pertambangan yang mempunyai pH <3. Menurunnya pH akibat AAT memberikan serangkaian dampak pada lingkungan. Dampak penurunan pH yang paling penting adalah meningkatnya kelarutan logam-logam termasuk logam berat. Oleh karena itu, kandungan logam harus menjadi perhatian utama pada pengelolaan air asam tambang (AAT) (Widyati, 2011). Pencemaran logam berat merupakan salah satu faktor penyebab timbulnya isu perubahan lingkungan terutama dalam hal pencemaran lingkungan oleh senyawa logam berat beracun (Nur, 2013).

Keberadaan logam berat di lingkungan dengan konsentrasi tinggi merupakan pencemar dan masalah lingkungan yang sangat penting sehingga dapat menimbulkan permasalahan ekologi yang serius. Peningkatan jumlah limbah yang mengandung logam berat yang tidak terkendali menyebabkan peningkatan beban ekonomis dan kerugian kesehatan yang besar terutama untuk orang-orang tinggal di dekat daerah itu. Hal ini dikarenakan limbah industri dikeluarkan ke lingkungan dari berbagai sumber antropogenik seperti limbah industri, otomotif emisi, kegiatan pertambangan dan praktek-praktek pertanian dan melalui rantai makanan mempengaruhi manusia dan hewan, serta kerusakan kualitas lingkungan (Wijayanti dan Dinna, 2017).

Logam berat kadmium (Cd) dapat meracuni perairan dan berdampak buruk bagi kesehatan makhluk hidup di sekitarnya. Selain itu juga dapat mengakibatkan penurunan kualitas lingkungan (Pinandari, *et al.*, 2011). Kadmium dikenal sebagai logam berat non esensial bagi tubuh, sehingga dengan kadar rendah dapat menyebabkan karsinogenik, teratogenik, dan mutagenik pada berbagai jenis hewan (Rumahlatu, *et al.*, 2014).

Jumlah kadmium masuk ke dalam tubuh manusia tergantung pada rute masuk. Sekitar 3-10% (rata-rata 5%) dari kadmium yang tertelan diserap dari saluran pencernaan. Tingkat ini tergantung pada dosis yang tepat dan status gizi. Beberapa faktor diet seperti protein, kalsium, vitamin D dan elemen pelacak seperti seng dan tembaga dapat mempengaruhi jumlah penyerapannya, yaitu tingginya kadar seng, kalsium, timbal, nikel, kromium dan magnesium bisa mengurangi serapan kadmium. Individu dengan kekurangan zat besi misalnya pada anemia, hamil dan wanita usia reproduksi memiliki afinitas tinggi terhadap kadmium serapan. Sistem pernapasan dan paparan kadmium terhadap jaringan kulit adalah rute lain kadmium masuk dalam tubuh. Kompleks kadmium sistein adalah bentuk utama dari masuknya kadmium melalui sistem pernapasan. Kadmium bisa masuk ke dalam sirkulasi darah sistemik melalui pengikatan dengan radikal sulfhidril sistein dalam keratinosit dan kemudian metallothionein di kulit (Bishak, *et al.*, 2015).

Pengolahan limbah cair industri yang mengandung logam berat secara biologi dapat dilakukan dengan memanfaatkan aktivitas metabolisme mikroorganisme. Oleh Hughes dan Poole (1989) menyatakan bahwa mikroorganisme dapat menghilangkan logam berat melalui proses adsorpsi, produksi senyawa ekstraseluler atau sintesis enzimatis. Demikian pula Bewtra dan



Biswar (1990) melaporkan bahwa berbagai mikroorganisme memiliki kemampuan dalam mentoleransi logam pada konsentrasi yang lebih tinggi setelah aklimatisasi (Husain dan Irna, 2005).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukanlah penelitian untuk memperoleh isolat bakteri yang memiliki kemampuan toleransi terhadap logam berat kadmium (Cd).

## **I.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui kemampuan toleransi isolat bakteri pereduksi sulfat terhadap kadmium (Cd).
2. Mengetahui toleransi pH dari isolat bakteri pereduksi sulfat.
3. Mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam mereduksi sulfur menjadi H<sub>2</sub>S.

## **I.3 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah mengenai hasil karakterisasi dan uji toleransi bakteri pereduksi sulfat terhadap kadmium dari air asam tambang.

## **I.4 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan bulan Januari - Februari tahun 2020, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **II.1 Tinjauan Umum Logam Berat**

##### **II.1.1 Pencemaran Lingkungan oleh Logam Berat**

Seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi yang semakin pesat, manusia telah banyak menciptakan berbagai macam industri yang bertujuan untuk memenuhi kebutuhannya. Selain memberikan dampak yang menguntungkan juga memberikan dampak yang kurang menguntungkan seperti dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Masalah pencemaran lingkungan akhir-akhir ini merupakan masalah yang banyak mendapat perhatian serius (Nur, 2013).

Peningkatan jumlah industri akan selalu diikuti oleh penambahan jumlah limbah, baik berupa limbah padat, cair maupun gas. Limbah tersebut mengandung bahan kimia yang beracun dan berbahaya (B3). Salah satu dari limbah tersebut adalah logam berat dapat bersumber dari pabrik atau industri. Sifat beracun dan berbahaya dari logam berat ditunjukkan oleh sifat fisik dan kimia bahan baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya (Dwyana dan Fahrudin, 2012). Pencemaran tanah dan air oleh logam berat adalah masalah besar seiring meningkatnya kegiatan industri, pertambangan dan lain-lain. Kebocoran maupun tumpahan limbah atau cara pencemaran lain seperti penumpukan (*dumping*) sisa kegiatan pertambangan merupakan beberapa penyebab proses pencemaran logam berat ini. Masalah pencemaran logam berat dilaporkan banyak terjadi di daerah pertambangan. Pada saat yang sama pada lokasi pertambangan tersebut terjadi pula masalah air asam tambang (AAT). Terbentuknya air asam tambang adalah masalah penting yang tidak diinginkan dari aktifitas industri pertambangan. Air

asam tambang berpotensi untuk digunakan sebagai larutan pengkondisi dalam perlakuan elektrokinetik dari tanah yang terkontaminasi logam berat karena kemasamannya (Suryaningtyas, *et al.*, 2005).

Salah satu pencemar yang berpotensi menurunkan dan merusak daya dukung lingkungan adalah logam berat. Logam berat merupakan bahan pencemar yang berbahaya karena bersifat toksik jika terdapat dalam jumlah besar dan mempengaruhi berbagai aspek dalam perairan, baik secara biologis maupun ekologi. Keberadaan logam berat di perairan dapat berasal dari berbagai sumber, antara lain kegiatan pertambangan, rumah tangga, limbah pertanian dan limbah industri. Penyebab utama logam berat menjadi bahan pencemar berbahaya yaitu logam berat tidak dapat dihancurkan (*non degradable*) oleh organisme hidup di lingkungan dan terakumulasi ke lingkungan. Sedimen merupakan habitat bagi biota benthik dan menjadi salah satu daerah perangkap bagi logam berat. Logam berat yang mengendap di dasar perairan membentuk senyawa kompleks bersama bahan organik dan anorganik secara adsorpsi dan kombinasi (Miranda, *et al.*, 2018).

Salinitas juga dapat mempengaruhi keberadaan logam berat di perairan, bila terjadi penurunan salinitas karena adanya proses desalinasi maka akan menyebabkan peningkatan daya toksik logam berat dan tingkat bioakumulasi logam berat semakin besar. Berdasarkan dampak yang ditimbulkan dari pencemaran oleh logam berat tersebut terutama di badan perairan, maka sangat diperlukan kisaran konsentrasi atau nilai ambang batas dari konsentrasi logam berat yang direkomendasikan untuk masuk dan berada di lingkungan perairan tersebut (Yudiati, *et al.*, 2009).

Logam berat di alam ditemukan dalam jumlah yang kecil dan umumnya ditemukan dalam bentuk senyawa dengan sulfida atau kompleks mineral yang

terdiri dari oksigen, silica dan sulfur. Selain itu logam berat ditemukan sebagai suatu sampingan dari kegiatan penambangan, seperti kadmium (Cd) yang ditemukan pada proses pencairan seng (Komarawidjaja, *et al.*, 2017).

### **II.1.2 Akumulasi Logam Berat**

Logam berat masuk kedalam tubuh manusia melalui mulut, yaitu makanan yang terkontaminasi oleh alat masak, wadah (minum/makanan kaleng) dan juga melalui pernapasan seperti asap dari pabrik, proses industri dan buangan limbah. Kontaminasi makanan juga bisa terjadi dari tanaman pangan (bidang pertanian) yang diberi pupuk dan pestisida yang mengandung logam. Logam berat terserap kedalam jaringan tanaman melalui akar dan daun, yang selanjutnya melalui siklus rantai makanan. Sumber utama kontaminan logam berat sesungguhnya berasal dari udara dan air yang mencemari tanah. Selanjutnya semua tanaman yang tumbuh di atas tanah yang telah tercemar akan mengakumulasi logam-logam tersebut pada bagian akar, batang, daun dan buah. Logam akan terakumulasi pada jaringan tubuh dan dapat menimbulkan keracunan pada manusia, hewan, dan tumbuhan apabila melebihi batas toleransi (Agustina, 2014).

Beberapa logam berat dalam jumlah yang kecil diperlukan untuk hidup, sebagai elemen mikro (mikronutrien) seperti besi, tembaga dan seng. Logam berat yang lain seperti air raksa dan kadmium, meskipun belum diketahui perannya dalam metabolisme namun beracun bagi manusia, binatang dan tanaman. Oleh karenanya sebutan “logam berat” biasanya diperuntukan bagi logam-logam yang beracun, termasuk didalamnya adalah unsur-unsur timbal (Pb), kadmium (Cd), tembaga (Cu), selenium (Se), arsen (As), air raksa (Hg), dan kromium (Cr) (Komarawidjaja, *et al.*, 2017).

Senyawa logam berat tidak dapat didegradasi secara biologi. Penyisihan secara biologi yang dapat terjadi hanya merupakan adsorpsi oleh jasad hidup, dan logam berat tersebut akan terakumulasi di dalam sel jasad hidup tersebut. Pada konsentrasi tinggi, kehadiran ion logam berat di dalam air akan meracuni kehidupan air. Pada konsentrasi rendah, organisme air tingkat rendah seperti plankton, akan mengadsorpsi ion logam tersebut dan berakumulasi dalam sel plankton tersebut. Apabila organisme air yang lebih tinggi seperti ikan plankton-plankton tersebut, akumulasi logam berat di dalam tubuh ikan akan akhirnya ikan-ikan tersebut dikonsumsi manusia akan dapat menimbulkan gangguan-gangguan kesehatan yang serius bagi manusia, terutama yang menyerang sistem saraf (Fahrudin, 2010).

Dengan perkembangan bioteknologi pengolahan limbah, pencemaran logam berat dapat diatasi dengan cara biologi dengan memanfaatkan jasad hidup, terutama mikroorganisme, walaupun kadang-kadang memanfaatkan tanaman dalam mengakumulasi logam berat. Beberapa bakteri diketahui mampu melakukan biotransformasi pada logam berat menjadi *immobil* maupun *mobil* (Fahrudin, 2010).

Aplikasi mikroba dalam menanggulangi polusi logam berat, baik limbah industri maupun limbah domestik telah banyak dilakukan pula. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa banyak mikroorganisme dari jenis bakteri, yeast, maupun jamur yang dapat mengakumulasi ion-ion logam berat dalam selnya, sehingga dapat berkurang konsentrasi ion logam dalam lingkungan. Mekanisme akumulasi ion logam tersebut dapat secara pengikatan pada permukaan sel, serta absorpsi intraselluler yang kemudian dijumpai melalui sistem transpor aktif ataupun melalui mekanisme lain yang belum diketahui secara jelas (Fahrudin, 2010).

Dengan melewati limbah cair yang mengandung logam berat pada suatu kumpulan sel mikroba yang diimobilisasi, atau suatu lumpur aktif (*activated sludge*) yang diinokulasikan mikroorganisme pengakumulasi logam berat. Buangan limbah cair tersebut diharapkan sudah tidak lagi mengandung logam berat, sehingga tidak mengakibatkan polusi dan keracunan logam berat. Keuntungan cara biologis dibandingkan dengan cara absorpsi kimiawi, antara lain logam tersebut dapat dilakukan recovery kembali setelah permukaan sel jenuh oleh ion-ion logam (Fahrudin, 2010).

## **II.2 Tinjauan Umum Logam Berat Kadmium (Cd)**

### **II.2.1 Sifat dan Bentuk dari Kadmium (Cd)**

Kadmium (Cd) berwarna putih keperakan, lunak, mengkilap, tidak larut dalam basa, mudah bereaksi dan menghasilkan kadmium oksida bila dipanaskan dengan nomor atom 48 dan elemen grup 12 dalam blok d serta periode 5. Cd umumnya terdapat dalam kombinasi dengan klor (Cd klorida), atau belerang (Cd sulfid). Kadmium membentuk  $Cd^{2+}$  yang bersifat tidak stabil, berat atom 112,4, titik leleh  $321^{\circ}C$ , titik didih  $767^{\circ}C$  dan memiliki massa jenis  $8,65 \text{ g/cm}^3$ . Ditemukan oleh ahli kimia Jerman F. Strohmeyer pada tahun 1817 sebagai konstituen dari smithsonit ( $ZnCO_3$ ) dari bijih seng. Konfigurasi elektronik dari kadmium adalah  $[Kr] 4d^{10} 5s^2$ . Konsentrasi kadmium di kerak bumi adalah 0,15 ppm dan yang paling umum mineral kadmium adalah greenockite ( $CdS$ ) (Sharma, *et al.*, 2015).

Kadmium sukar mengalami pelapukan baik secara kimiawi, fisika maupun biologi. Dalam perairan, kadar kadmium yang relatif rendah pun dapat terabsorpsi dan terakumulasi secara biologis oleh organisme yang ada di perairan, dan akan terlibat dalam sistem jaringan makanan (Martuti, *et al.*, 2016).

Logam kadmium (Cd) memiliki karakteristik berwarna putih keperakan seperti logam aluminium, tahan panas, tahan terhadap korosi. Kadmium (Cd) digunakan untuk elektrolisis, bahan pigmen untuk industri cat, enamel dan plastik. Logam kadmium (Cd) biasanya selalu dalam bentuk campuran dengan logam lain terutama dalam pertambangan timah hitam dan seng. Kadmium (Cd) adalah metal berbentuk kristal putih keperakan. Cd didapat bersama-sama Zn, Cu, Pb, dalam jumlah yang kecil. Kadmium (Cd) didapat pada industri alloy, pemurnian Zn, pestisida, dan lain-lain. Logam kadmium (Cd) mempunyai penyebaran yang sangat luas di alam. Berdasarkan sifat-sifat fisiknya, kadmium (Cd) merupakan logam yang lunak dapat dibentuk, berwarna putih seperti putih perak. Logam ini akan kehilangan kilapnya bila berada dalam udara yang basah atau lembab serta cepat akan mengalami kerusakan bila dikenai uap amoniak ( $\text{NH}_3$ ) dan sulfur hidroksida ( $\text{SO}_2$ ) (Istarani dan Ellina, 2014).

### **II.2.2 Kegunaan Kadmium (Cd)**

Kadmium (Cd) merupakan logam yang sangat penting dan banyak kegunaannya, khususnya untuk elektroplating (pelapis elektrik) serta galvanisasi karena Cd memiliki keistimewaan nonkorosif. Cd banyak digunakan dalam pembuatan alloy. Kadmium (Cd) merupakan hasil sampingan dari pengolahan bijih logam seng (Zn), yang digunakan sebagai pengganti seng. Unsur ini bersifat lentur, tahan terhadap tekanan, memiliki titik lebur rendah serta dapat dimanfaatkan untuk pencampur logam lain seperti nikel, perak, tembaga, dan besi. Senyawa kadmium juga digunakan bahan kimia bahan fotografi, pembuatan bahan kimia, bahan fotografi, pembuatan tabung TV, cat, karet, sabun, kembang api, percetakan tekstil dan pigem untuk gelas dan email gigi (Triwuri, 2017).

Penggunaan utama dalam industri yaitu sebagai zat tambahan bahan bakar dan pewarna dalam cat, yang merupakan penyebab utama peningkatan kadar kadmium di lingkungan, kini secara berangsur-angsur mulai dihentikan. Penggunaan lainnya dari kadmium adalah untuk produk-produk logam seperti amunisi, pelapis kabel, pipa dan solder, bahan kimia, pewarna dan lain-lainnya. Beberapa produk logam dibuat dari kadmium murni yang diubah menjadi berbagai bentuk dan sebagian besar terbuat dari alloy timbal. Air minum dapat tercemar cukup tinggi oleh timbal karena penggunaan pipa berlapis timbal dan pipa polivinil klorida (Fardiaz, 1992).

Kadmium biasanya digunakan untuk melapisi logam lain sehingga tidak mudah berkarat, misalnya pipa-pipa yang dialiri bahan-bahan kimia bersifat yang korosif yang mutunya lebih baik daripada pelapis seng, walaupun harganya lebih mahal. Kadmium murni juga digunakan untuk melapisi kabel-kabel listrik bawah tanah atau pipa-pipa air. Lebih dari 200.000 ton kadmium digunakan dalam industri kimia yang berbentuk tetra etil Cd, yang biasanya dicampur dengan bahan bakar minyak untuk melindungi mesin supaya lebih awet. Senyawa kadmium juga digunakan untuk campuran pembuatan cat sebagai bahan pewarna dan dapat melindungi bahan yang dicat terhadap korosif (Darmono, 1995).

### **II.2.3 Sumber Kadmium (Cd)**

Kadmium ditemukan di kulit bumi ataupun hasil letusan gunung vulkanik. Selain itu kadmium dihasilkan dari berbagai aktivitas manusia, baik disengaja maupun tidak disengaja. Contoh penggunaan bahan bakar, kebakaran hutan, limbah industri maupun penggunaan pupuk dan pestisida (Agustina, 2014). Menurut Darmono (1999), Kandungan kadmium dalam kerak bumi jumlahnya



relatif kecil (sekitar 0,15-0,2 µg/g), mencerminkan kondisi kadar kadmium dalam tanah di suatu lokasi. Di sisi lain, kandungan kadmium dalam tanah dapat meningkat karena suatu proses alamiah seperti peristiwa bencana alam (gunung meletus) dan oleh ulah manusia yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan maupun proses pemupukan yang berlebihan. Kadmium banyak digunakan untuk pelapisan logam, yang mutunya lebih baik dari pada pelapis seng, walaupun harganya lebih mahal. Proses tersebut biasanya dilakukan dengan cara elektrolisis, pencelupan atau penyemprotan. Dari proses tersebut kemungkinan akan terbuang kadmium ke dalam lingkungan dan terbawa melalui air, serta udara, sehingga menyebar luas ke daerah pertanian dan permukiman, sehingga berpengaruh terhadap kehidupan tanaman, hewan maupun manusia.

Mineral-mineral bijih yang mengandung kadmium diantaranya adalah sulfide greenockite (xanthochroite), karbonat otavite, dan oksida kadmium. Mineral-mineral tersebut terbentuk berasosiasi dengan bijih sfalerit dan oksidanya, atau diperoleh dari debu sisa pengolahan dan lumpur elektrolitik. Kadmium mempunyai titik didih rendah dan mudah terkonsentrasi ketika memasuki atmosfer. Air dapat juga tercemar apabila dimasuki oleh sedimen dan limbah pertambangan mengandung Cd, sementara ketika bercampur dengan asap akan membentuk pencemaran terhadap udara (Triwuri, 2017).

Kadmium (Cd) merupakan jenis logam yang banyak ditemukan di perairan. Kadmiun berasal dari limbah berbagai industri seperti industri pelapisan, pewarna, pembuatan plastik, baterai dan campuran, limbah rumah sakit, serta kegiatan pertanian (Wijayanti dan Dinna, 2017).

Secara global sumber utama Cd adalah dari deposisi atmosferik, proses *smelting* dan *refining* dari logam non ferrous, proses industri terkait produksi bahan kimia dan metalurgi, serta air buangan limbah domestik. Hanya 15% saja dari deposisi atmosfer yang berasal dari sumber-sumber alamiah. Diperkirakan 1.000 ton Cd dilepaskan per tahun ke atmosfer dari smelters dan pabrik-pabrik yang mengolah Cd. Pelepasan Cd ke dalam perairan alamiah sebagian besar berasal dari industri galvanik, sumber lain polusi Cd adalah industri baterai, pupuk dan fungisida yang mengandung Cd dan Zn juga merupakan sumber potensial polusi kedua logam ini (Gilman *et al.*, 1998).

#### **II.2.4 Dampak Kadmium (Cd)**

Kadmium merupakan logam toksik, terjadi secara primer di alam bercampur dengan seng (Zn) dan timbal (Pb). Proses ekstraksi dan pengolahan logam Zn dan Pb sering menyebabkan pencemaran lingkungan oleh kadmium. Batu bara dan bahan fosil lainnya mengandung kadmium, dan pembakaran bahan ini melepaskan kadmium ke lingkungan. Sifat kimiawi yang bermanfaat menyebabkan kadmium digunakan secara luas dalam elektroplating, pewarna cat dan pembuatan plastik. Pekerja pada tempat peleburan dan pabrik pengolahan logam lainnya dapat terpapar kadmium kadar tinggi. Sedangkan bagi kebanyakan penduduk paling utama melalui kontaminasi makanan. Kadmium sukar diabsorpsi dari saluran pencernaan, tetapi sebagian besar diabsorpsi melalui saluran napas para perokok. Kadmium diangkut dalam darah, sebagian besar terikat pada sel

darah merah dan albumin. Waktu paruh kadmium dalam tubuh berkisar antara 10-30 tahun (Endrinaldi, 2010).

Kadmium adalah ion logam berat paling berbahaya yang dicirikan dengan stabilitas dan toksisitas tinggi. Tidak terdegradasi di alam dan sekali dilepaskan ke lingkungan, tetap dalam sirkulasi. Kadmium dapat mengikat enzim penting pernapasan, menyebabkan stres oksidatif dan kanker, mengganggu pengikatan Zn pada tubuh, peningkatan tekanan darah, menyebabkan kerusakan ginjal, jaringan testis, sel darah merah dan toksik bagi biota perairan (Wijayanti dan Dinna, 2017).

Logam kadmium akan mengalami proses biotransformasi dan bioakumulasi dalam organisme hidup (tumbuhan, hewan dan manusia). Logam ini masuk ke dalam tubuh bersama makanan yang dikonsumsi, tetapi makanan tersebut telah terkontaminasi oleh logam Cd dan atau persenyawaannya. Dalam tubuh biota perairan jumlah logam yang terakumulasi akan terus mengalami peningkatan. Di samping itu, tingkatan biota dalam sistem rantai makanan turut menentukan jumlah Cd yang terakumulasi. Dimana pada biota yang lebih tinggi stratanya akan ditemukan akumulasi Cd yang lebih banyak, sedangkan pada biota top level merupakan tempat akumulasi paling besar. Bila jumlah Cd yang masuk tersebut melebihi ambang maka biota dari suatu level atau strata tersebut akan mengalami kematian dan bahkan kemusnahan (Nur, 2013).

Pencemaran logam berat sangat berbahaya bagi lingkungan. Banyak laporan memberikan fakta betapa berbahayanya pencemaran lingkungan terutama oleh logam berat pada kawasan perairan, baik akibat penggunaan untuk konsumsi

sehari-hari maupun ketika mengkonsumsi biota air tawar yang hidup di perairan tercemar tersebut. Kasus pertama kali dilaporkan terjadi di Jepang, yaitu timbulnya penyakit “itai-itai” yang menyebabkan para nelayan dan keluarganya terkena keracunan kronis akibat logam berat Cd dan mengakibatkan kematian manusia 100 orang (Prabowo, *et al.*, 2016). Menurut Ratnaningsih (2004), timbul penyakit yang disebut penyakit “itai-itai” sebagai akibat dari mengkonsumsi beras yang mengandung kadar kadmium yang tinggi.

Kadmium ini mengkontaminasi lingkungan, air, dan makanan. Studi yang dilaporkan oleh Sutrisno dan Kuntastyuti menemukan bahwa lahan pertanian di Indonesia mengalami pencemaran logam berat ini. Air sumur di Driyo Gresik mengalami pencemaran kadmium dan berefek terhadap peningkatan kadar kadmium dalam darah penduduknya (Sutrisno dan Budiyono, 2004). Penelitian terhadap beras di Iran ditemukan bahwa beras Iran memiliki kadar kadmium lebih dari 0,2 mg/kg yang merupakan ambang batas keamanan kadmium yang ditetapkan oleh WHO (Mehrnia, 2013) Sumber kontaminasi paparan kadmium antara lain bahan bakar minyak, produksi besi dan baja, insersasi, rokok dan pupuk (Sharma *et al.*, 2015). Paparan logam ini bisa memasuki tubuh dengan cara inhalasi, peroral, maupun kontak dengan kulit namun kasus ini jarang. Hal ini ini berdampak pada kesehatan (Sofiana *et al.*, 2019).

Keracunan akut kadmium biasanya terjadi karena menghirup debu dan asap yang mengandung kadmium dan garam kadmium yang termakan. Setiap batang rokok mengandung 1 sampai 2 meg kadmium. Efek toksik dini disebabkan oleh peradangan setempat. Kadmium yang termakan akan menyebabkan mual, muntah, salivasi, diare dan kejang perut. Secara akut, kadmium lebih toksik bila

dihirup. Toksisitas kadmium bisa berkembang menjadi udem paru. Efektoksik paparan kronis kadmium tergantung dari caranya masuk tubuh. Efek toksik dari kadmium menyebabkan kerusakan pada paru-paru, ginjal, hati dan tulang. Ginjal terkena paparan melalui paru atau saluran pencernaan. Kadar kadmium 300 meg/g ginjal akan menyebabkan cedera ginjal (Endrinaldi, 2010).

Ginjal merupakan organ utama yang rusak akibat paparan kadmium dalam jangka waktu yang lama yaitu tubulus proksimal. Survei yang dilakukan National Health and Nutrition Examination Survey (1999 – 2006) ditemukan kadar kadmium 0,41 µg/L memiliki faktor resiko gagal ginjal kronis (a Navas-Acien *et al.*, 2009). Protein uria merupakan indikasi cedera pada tubulus proksimal ginjal. Kadmium dalam sistem sirkulasi terikat ke protein dalam bentuk metalotionin yang disintesis dihati, kemudian mengalami filtrasi diglomerulus ginjal. Kadmium metalotionin (CdMT) direabsorpsi oleh sel tubulus proksimal dan terakumulasi di lisosom. CdMT terurai menjadi  $Cd^{2+}$  dan menghambat lisosom yang menyebabkan kerusakan (cedera) sel tubulus proksimal ginjal. Sesak nafas merupakan keluhan yang paling sering terjadi karena fibrosis dan emfisema. Dimana secara spesifik menghambat biosintesis alfa-antitripsin plasma, ini terlihat adanya asosiasi antara defisiensi alfa-antitripsin yang berat dengan emfisema pada manusia. Penyimpanan kalsium dalam tulang menurun pada orang yang terpapar kadmium. Efek kadmium ini menyebabkan gangguan keseimbangan kalsium dan fosfat (Endrinaldi, 2010). Logam ini juga menurunkan kepadatan tulang (Schutee *et al.*, 2008). Bahkan tingginya logam ini dalam darah berasosiasi dengan penurunan fungsi paru pada survei di korea (Oh *et al.*, 2014).

Dampak lainnya adalah diare, sakit perut dan muntah-muntah, keretakan tulang, kegagalan reproduktif bahkan ketidaksuburan/kemandulan, kerusakan sistem syaraf pusat, kerusakan sistem imunitas, gangguan psikologis, kerusakan DNA atau kanker (Agustina, 2014). Beberapa penelitian epidemiologi menemukan ada kaitan antara kadmium di dalam darah maupun di dalam urin yang berkaitan dengan penyakit. Konsentrasi kadmium 2,28 µg/L memiliki faktor resiko terjadinya kanker payudara pada wanita (Peng *et al.*, 2015). Penelitian di korea oleh Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) menemukan bahwa dengan kadar konsentrasi kadmium di dalam darah sebesar 1,53 µg/L memiliki faktor resiko terjadinya IHD (Infark Heart Disease). Kadmium memperburuk pasien dengan peritoneal dialisis (Sofiana *et al.*, 2019).

## **II.3 Tinjauan Umum Air Asam Tambang (AAT)**

### **II.3.1 Pencemaran Air Asam Tambang (AAT)**

Air asam tambang terbentuk karena adanya mineral FeS (*pyrite*) yang teroksidasi. Air asam tambang (*acid mine drainage, AMD*) atau air asam batuan, yang secara keseluruhan disebut air asam (*acid drainage, AD*) adalah air yang berasal dari tambang atau batuan yang mengandung mineral sulfida tertentu yang terpapar dan dalam keadaan teroksidasi. Beberapa sulfida logam yang sering dijumpai pada wilayah pertambangan antara lain FeS (*pyrite*), FeS<sub>2</sub> (*marcasite*), Fe<sub>x</sub>S<sub>x</sub> (*pyrrhotite*), PbS (*galena*), Cu<sub>2</sub>S (*chalcocite*), CuS (*covellite*), CuFeS<sub>2</sub> (*chalcopyrite*), MoS<sub>2</sub> (*molybdenite*), NiS (*millerite*), ZnS (*sphalerite*), dan FeAsS (*arsenopyrite*) (Said, 2014). Terbentuknya AAT ditandai oleh pH yang rendah

(1,5-4) konsentrasi logam terlarut yang tinggi, nilai acidity yang tinggi, nilai sulfat yang tinggi dan konsentrasi O<sub>2</sub> yang rendah (Wahyudin, *et al.*, 2018).

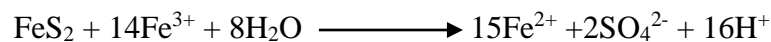
Menurut Fahrudin (2018), reaksi terbentuknya AAT dapat dinyatakan dengan persamaan reaksi sebagai berikut:

- a. Oksidasi dari mineral sulfide. Proses oksidasi mineral sulfida dapat terjadi akibat adanya udara, air dan bakteri. Reaksi yang terbentuk adalah :



Dampaknya, lingkungan sedikit asam (pH menurun) sehingga memicu perkembangan bakteri *Thiobacillus ferroxidans*. Sumber energi diperoleh bakteri tersebut dari senyawa anorganik yang mengandung S dan Fe, akibatnya terjadi oksidasi pirit.

- b. *Thiobacillus ferroxidans* mempercepat laju reaksi secara kimia oksidasi pirit dari 500.000-1.000.000 kali. Ion Fe<sup>3+</sup> merupakan oksidan sangat kuat, sehingga reaksi yang terbentuk adalah:



- c. Menyebabkan pH larutan turun secara drastis dan terbentuk:



Ion Fe<sup>2+</sup> yang dihasilkan akan digunakan lagi oleh *Thiobacillus ferroxidans* membentuk AAT secara berulang, sehingga sekali saja AAT dapat dihentikan hingga ratusan tahun.

Berdasarkan persamaan reaksi tersebut, bahan mineral yang adalah pirit (FeS<sub>2</sub>) selanjutnya *Thiobacillus ferroxidans* menggunakan sulfur sebagai sumber energi dan memperoleh kebutuhan nutrisi dari atmosfer dan mineral seperti sulfur

dan fosfor. Bakteri ini berfungsi sebagai agen yang mempercepat terjadinya reaksi oksidasi Fe menjadi Fe dan ion sulfat yang terdapat pada mineral pirit akan terlarut menjadi presipitat yang dibebaskan ke dalam air dan membentuk senyawa Fe(OH), yang membentuk selaput seperti *jelly* berwarna merah orange sehingga disebut *yellow boy*. *Yellow boy* yang melapisi dasar perairan menghambat pertukaran udara sehingga dapat membunuh organisme yang hidup di dasar perairan (Fahrudin, 2018).

Air asam tambang adalah air tambang dengan pH rendah yang berasal dari oksidasi mengandung sulfida sehingga menghasilkan asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Sulfat merupakan komponen utama yang akan menimbulkan keasaman dan melarutkan logam berat yang sangat berbahaya bagi kehidupan dan kelestarian lingkungan. AAT akan sangat berbahaya jika sampai ke pemukiman masyarakat melalui pengaliran langsung ke sungai, danau, dan lingkungan akuatis lainnya karena AAT memiliki pH yang sangat rendah dan banyak mengandung logam dengan tingkat toksisitas yang tinggi seperti logam tembaga (Cu), timbal (Pb), besi (Fe), kadmium (Cd), kobalt (Co), dan masih banyak lagi. Logam timbal (Pb), tembaga (Cu), dan besi (Fe) yang berada pada lingkungan sekitar akan sangat berbahaya jika terpapar ke tubuh manusia dalam konsentrasi yang tinggi. Logam-logam ini dapat mengganggu sistem pernafasan, sistem pencernaan bahkan dapat mengganggu sistem saraf pusat. Oleh sebab itu, diperlukan adanya pengelolaan AAT yang baik sehingga tidak membahayakan bagi lingkungan. Menurut banyak teori kandungan sulfat (termasuk dalam AAT) dapat diturunkan dengan memanfaatkan aktivitas bakteri pereduksi sulfat (BPS) (Fahrudin, 2018).



### II.3.2 Bakteri Air Asam Tambang (AAT)

Lahan tambang umumnya mengandung senyawa sulfidik yang akan teroksidasi dan melepaskan sulfat ke lingkungan sehingga pH lingkungan sangat rendah. Kondisi pH yang sangat rendah meningkatkan kelarutan logam-logam, sehingga pada lahan bekas tambang umumnya terjadi akumulasi logam. Akumulasi logam besi sulfide pada pH rendah di lahan tambang akan membentuk pirit atau FeS<sub>2</sub>. Beberapa bakteri mampu menggunakan energi dari proses oksidasi/reduksi logam maupun senyawa-senyawa lainnya untuk pertumbuhannya. Bakteri pengoksidasi besi dan sulfur melakukan oksidasi mineral yang akan menghasilkan ferro sulfat dan “oksidan”. Bakteri yang mampu mengoksidasi besi dan sulfur antara lain *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfolobus acidocalderius* dan umumnya dari genus *Thiobacillus*. Selain itu dalam penelitian Puspitasari, *et al.*, (2014), memperoleh tiga isolat bakteri yang mampu mengoksidasi besi dan sulfur yaitu *Bacillus anthracis* strain Ames dan *Bacillus cereus* ATCC strain 14579, *Staphylococcus sciuri* subsp. *Sciuri* strain DSM 20345 dan *Micrococcus luteus* NCTC 2665.

Pada lahan bekas penambangan terbuka, pH tanah yang rendah dan hilangnya bahan organik tanah dapat memberikan keuntungan bagi populasi bakteri pengoksidasi sulfur (BOS). Salah satu BOS adalah *Thiobacillus* spp.. Aktivitas bakteri ini dapat meningkatkan laju air asam tambang sebesar 500.000 sampai 1.000.000 kali lipat jika dibandingkan dengan reaksi yang terjadi secara geokimia. *Thiobacillus* spp. hidup pada kisaran pH yang asam (asidofilik), mendapatkan energi dari oksidasi besi dan atau sulfur (*T. ferrooxidans*), obligat

autotrof yang tidak dapat menggunakan senyawa organik untuk menyusun sel-sel tubuhnya (untuk pertumbuhan dan perbanyakannya) serta obligat aerob yang memerlukan oksigen bebas sebagai aseptor elektron untuk metabolisme selnya (Widyati, *et al.*, 2010). Menurut Fahrudin (2018), kajian bioteknologi untuk pengolahan limbah merupakan langkah yang bijaksana dengan memperhatikan sisi efektif dan ekonomis yaitu dengan memanfaatkan bakteri pereduksi sulfat. BPS merupakan mikroorganisme anaerob yang mampu mereduksi asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) menjadi sulfida ( $H_2S$ ) banyak tumbuh pada lingkungan anaerob, termasuk pada sedimen lahan basah.

BPS juga mampu menurunkan konsentrasi logam berat misalnya besi, seng, tembaga, dan lain-lain, melalui proses reduksi sehingga dapat menurunkan konsentrasi sulfat dengan cara BPS mereduksi sulfat menjadi sulfid yang tidak larut. Beberapa spesies BPS dapat mereduksi logam berat menjadi *immobil*, misalnya *Desulfovibrio vulgaris* yang dapat mereduksi uranium VI ( $U^{VI}$ ) menjadi  $U^{IV}$  (Febriyanti, *et al.*, 2010). BPS merupakan mikroorganisme anaerob fakultatif yaitu bakteri yang dapat hidup dengan baik bila ada oksigen maupun tidak ada oksigen. BPS tersebar luas pada ekosistem alami, seperti sedimen pada perairan tawar maupun perairan laut. Demikian juga pada bak perombakan secara anaerob, yang kaya akan kandungan sulfat dan akan menghambat metanogenesis. Substrat sebagai sumber elektron yang ada pada sedimen perairan dapat dimanfaatkan oleh BPS berkisar antara 75-99% akan menghasilkan gas sulfida (Isa, *et al.*, 1986).

Sulfida merupakan bentuk tereduksi dari sulfur (S), sedangkan sulfur dioksida (SO<sub>2</sub>) dan ion sulfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) adalah bentuk teroksidasinya. Pembentukan sulfida telah didorong oleh proses biologi dari kelompok bakteri pereduksi sulfat (BPS). BPS adalah kelompok heterotrofik yang menggunakan senyawa organik sederhana menggunakan sumber karbon. Dengan respirasi metabolik, bakteri tersebut memanfaatkan sulfat, tiosulfat, sulfit dan senyawa-senyawa sulfur yang dapat direduksi lainnya sebagai akseptor elektron. Penggunaan BPS yang bersumber dari sedimen pantai ataupun bakau diharapkan dapat mengatasi limbah air asam tambang dengan indikasi adanya kenaikan pH yang menandakan adanya peningkatan populasi bakteri pereduksi sulfat dan penurunan kadar sulfat pada air (Febriyanti, *et al.*, 2010).

Jorgensen (1982), melaporkan bahwa jumlah dan aktivitas bakteri pereduksi sulfat meningkat dengan ketebalan lapisan sedimen, Namun demikian, ada kelompok bakteri pereduksi sulfat yang mampu tumbuh pada kondisi oksik. Hal ini yang menyebabkan ada keragaman bakteri yang tumbuh dalam sedimen. Kelompok *Desulfovibrio* lebih dominan dibagian atas sedimen, sedangkan *Desulfotomaculum* sp. banyak ditemukan pada bagian bawah sedimen. *Desulfovibrio* sp. merupakan bakteri pereduksi sulfat yang mampu hidup pada kondisi yang sedikit oksik. Karakteristik ini berkaitan dengan kemampuan bakteri menghasilkan enzim yang mampu melindungi sel dari stres oksigen, Berkaitan dengan kemampuan *Desulfovibrio* sp. hidup dalam kondisi sedikit oksik. Fournier *et al* (2003), mengemukakan bahwa dalam sel *Desulfovibrio* sp, terdapat enzim *superoxide reductase* (Sor) yang berperan dalam mereduksi oksigen. Oleh karena

itu kelompok bakteri ini sering ditemukan di bagian atas sedimen. Walaupun demikian *Desulfovibrio* sp tetap membutuhkan kondisi anaerob untuk dapat mempertahankan perkembangannya. Bakteri ini hanya mampu tumbuh dengan baik pada kondisi oksik selama tidak lebih dari 24 jam, setelah itu pertumbuhannya akan turun drastis.

Areal pertambangan merupakan habitat yang cukup untuk pertumbuhan bakteri pereduksi sulfat. Hal ini dikarenakan aktivitas pertambangan menyebabkan terbentuknya limbah air asam tambang. Air asam tambang merupakan hasil reaksi oksidasi batuan tambang kaya akan mineral sulfida. Pirit merupakan mineral sulfida yang banyak dijumpai pada pertambangan batu bara. Batuan sulfida tersebut mengalami oksidasi dengan adanya air dan oksigen, yang dikatalisis oleh bakteri pengoksidasi besi dan sulfur, seperti *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* dan *Thiobacillus thiooxidans* (Yusron, *et al.*, 2009).

*Thiobacillus* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang, tidak memiliki spora yang hidup dalam kondisi aerob. Sebagian besar *Thiobacillus* adalah spesies kemolitotrof yang memanfaatkan karbon dioksida dari atmosfer sebagai sumber karbon untuk sintesis bahan sel baru. Energi berasal dari oksidasi senyawa sulfur yang berkurang atau tereduksi sebagian, termasuk sulfida, elemen sulfur dan tiosulfat, produk oksidasi akhir menjadi sulfat. Bakteri ini bekerja dalam lingkungan asam pada nilai pH antara 1,5 dan 3, dimana sebagian besar ion logam tetap dalam larutan. Oleh karena itu, spesies asidofilik *Thiobacillus ferrooxidans* dan *T. thiooxidans* sangat penting. *Thiobacillus* lain juga

mampu mengoksidasi sulfur dan sulfida tetapi bakteri ini hanya tumbuh pada nilai pH yang lebih tinggi, dimana ion logam tidak bertahan dalam larutan (Bosecker, 1997).

Di antara bakteri yang berpartisipasi dalam komunitas lingkungan tercemar yang didominasi oleh genera, yang diketahui terlibat dalam biodegradasi polutan organik. Bakteri tersebut memiliki genus *Pseudomonas*, *Comamonas* dan *Acinetobacter*. Bakteri tersebut termasuk bakteri gram negatif. Namun, di lingkungan terkontaminasi tidak hanya dengan polutan organik tetapi juga dengan logam berat, keanekaragaman spesies dan aktivitas metabolisme mikroorganisme berkurang, dan populasi bakteri toleran logam dikembangkan dengan spesies *Pseudomonas* atau bakteri asidofilik mendominasi. Sebagai respons terhadap tantangan logam berat, baik proteksi sel adaptif yang diinduksi logam berevolusi yang membutuhkan protein yang baru disintesis, atau beberapa logam bakteri resisten ion berevolusi yang mengandung berbagai penentu resistensi logam yang dikodekan oleh plasmid, e. g. *Staphylococcus aureus* dan *Alcaligenes eutrophus* strain CH34 (Chovanova, *et al.*, 2014).

Biomassa alga, jamur dan bakteri telah dikenal mudah menyerap atau mengakumulasi ion logam. Kemampuan bioakumulasi logam oleh beberapa spesies bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *P. syringae*, *P. aeruginosa* didirikan pada produksi protein pengikat kadmium intraseluler. Lebih jauh lagi, bakteri gram negatif berbentuk batang lainnya, *Alcaligenes eutrophus* strain CH34 dikenal sebagai biosorben dari logam berat. Diantara logam-logam berat yang beracun, memiliki masa tinggal yang lama dan

memiliki waktu paruh biologis yang panjang, kadmium khususnya merupakan masalah besar di negara-negara industri, karena kehadirannya di lingkungan sebagian besar membahayakan kesehatan publik. Kadmium adalah agen oksidatif kuat yang menghambat replikasi DNA dan tampaknya membuat DNA lebih rentan serangan nukleolitik menghasilkan DNA untai tunggal istirahat. Selain itu, pengamatan bahwa penentu resistensi logam terletak paling sering pada plasmid. Identifikasi lebih banyak strain bakteri yang dapat menyerap logam dengan efisiensi dan spesifisitas tinggi menarik perhatian yang meningkat dari kedua medis dan sudut pandang bioteknologi (Chovanova, *et al.*, 2014).

#### **II.4 Bakteri yang Toleran Kadmium**

Usaha-usaha yang sudah dilakukan mengatasi pencemaran logam berat umumnya secara fisik, dengan cara elektrolisa, dan elektrodialisa sedangkan secara kimiawi digunakan cara pengendapan. Banyaknya kendala dan biaya yang mahal menyebabkan digunakannya cara biologi sebagai salah satu alternatif penanganan limbah logam berat. Salah satunya dengan menggunakan mikroorganisme seperti bakteri, kapang, alga, dan protozoa yang seringkali ditemukan pada limbah industri yang mengandung logam berat. Mikroorganisme tersebut mampu beradaptasi dengan lingkungannya melalui berbagai mekanisme seperti adsorpsi, penyerapan, oksidasi, dan reduksi sehingga resisten terhadap logam berat yang dapat dimanfaatkan untuk remediasi lingkungan yang tercemar oleh logam berat (Nugraha, *et al.*, 2018).

Limbah cair yang dapat mengandung logam Pb dan Cd dapat pula menjadi habitat dari berbagai jenis mikroba antaralain *Enterobacter*, *Achromonas*,

*Flavobacterium*, dan *Pseudomonas* yang termasuk dalam kelompok bakteri gram negatif. Mikroba yang hidup pada air buangan industri mencerminkan kemampuan mikroba tersebut untuk beradaptasi terhadap lingkungan dengan kandungan logam berat yang relatif tinggi. Pengolahan limbah cair industri yang mengandung logam berat secara biologi dapat dilakukan dengan memanfaatkan aktivitas metabolisme mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menghilangkan logam berat melalui proses adsorpsi, produksi senyawa ekstraseluler atau sintesis enzimatis. Berbagai mikroorganisme memiliki kemampuan dalam mentoleransi logam pada konsentrasi yang lebih tinggi setelah aklimatisasi. Bakteri yang resisten (tahan) terhadap logam berat disebabkan kemampuan untuk mendetoksifikasi pengaruh logam berat dengan adanya protein atau material granuler seperti polifosfat di dalam sel yang mampu mengikat Pb dan Cd. Demikian pula oleh adanya plasmid pada bakteri menyebabkan bakteri dapat resisten terhadap logam berat. Bakteri dari sungai yang tercemar oleh logam berat dalam konsentrasi tinggi dapat tumbuh pada media yang mengandung CdSO<sub>4</sub>. Isolat bakteri tersebut dapat tumbuh hingga konsentrasi 50 ppm (Husain dan Irna, 2005).

*Bacillus* adalah bakteri yang melimpah di alam, dapat diisolasi dari udara, tanah, air tawar atau asin, baik di lingkungan normal ataupun ekstrim seperti tercemar logam berat. Genera *Bacillus* memiliki beberapa manfaat diantaranya untuk produksi enzim, antibiotik, pelarut, dan insektisida alami pada tanaman. Sebaliknya, ada juga *Bacillus* yang bersifat patogen bagi manusia dan hewan yaitu. Kemampuan *Bacillus* yang beragam salah satunya resisten

logam berat. Bakteri genera *Bacillus* mampu tumbuh 100% pada medium yang mengandung Cd dengan konsentrasi 30-45 ppm. Persentase tumbuh *Bacillus* pada medium yang mengandung Cd bervariasi pada konsentrasi 50 ppm (Arinda, *et al.*, 2012). Penurunan persentase pertumbuhan yang signifikan ini disebabkan karena tingkat toleransi bakteri terhadap kadmium mulai menurun. Kemampuan *Bacillus* tumbuh pada medium yang mengandung Cd karena *Bacillus* mempunyai gen cad-Operon di dalam plasmid menyandi resistensi terhadap logam Cd (Silver, 1996).



## **BAB III**

### **METODELOGI PENELITIAN**

#### **III.1 Alat dan Bahan**

##### **III.1.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah LAF (*laminar air flow*), autoklaf, enkas, timbangan analitik, timbangan digital, oven, tabung reaksi, gelas ukur, gelas kimia, kuvet, tabung reaksi kecil, erlenmeyer, cawan petri, rak tabung, jarum ose, *magnetic stirrer*, *hot plate*, *vortex*, *shaker*, bunsen, kulkas, *disposable* 1 mL, pipet ukur, kamera digital, pinset, sendok tanduk, spatula, mikropipet, tip, sarung tangan, inkubator, spektrofotometer, batang pengaduk, dan alat tulis.

##### **III.1.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 kultur isolat bakteri pereduksi sulfat koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Universitas Hasanuddin (R1, R2, M1, M2 dan M3), medium *Agar Bacteriological*, media *Tryptic Soy Broth* (TSB), medium *Triple Iron Sugar Agar* (TSIA), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub> masing-masing dibuat dalam konsentrasi (ppm) 0, 10, 20 30, 40 dan 50, akuades, *tissue*, *aluminium foil*, kertas lakmus, alkohol 70%, *cling wrap*, kapas dan kain kasa.

#### **III.2 Prosedur Kerja**

##### **III.2.1 Sterilisasi Alat dan Medium**

- a. Membersihkan semua peralatan yang terbuat dari gelas seperti pipet tetes, cawan petri, tabung reaksi dan erlenmeyer.

- b. Sterilisasi dilakukan dengan sterilisasi panas kering (udara panas) pada oven. Sterilisasi dilakukan pada temperature 170°C-180°C selama 1-2 jam.
- c. Jarum ose disterilisasikan dengan sterilisasi panas kering dalam nyala api bunsen sampai merah membara.
- d. Mensterilisasikan media dan aquades dengan sterilisasi basah yaitu dengan menggunakan autoklaf. Sterilisasi dilakukan selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

### **III.2.2 Pembuatan Medium**

- a. Medium *Tryptic Soy Broth* (TSB)

Sebanyak 3 gr medium TSB dan dimasukkan ke dalam gelas kimia, lalu menambahkan 100 mL aquades dan diaduk dengan batang pengaduk hingga larut. Kemudian disterilkan larutan medium dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Selanjutnya media dibiarkan hingga dingin.

- b. Medium *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Sebanyak 3 gr medium TSB dan 2 gr *Agar Bacteriological* dimasukkan ke dalam gelas kimia, lalu ditambahkan aquades sebanyak 100 mL dengan menggunakan gelas ukur dan diaduk dengan batang pengaduk hingga larut. Kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* serta dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

- c. Medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Sebanyak 6,5 gr medium TSIA dimasukkan ke dalam gelas kimia yang ditambahkan aquades sebanyak 100 mL dan diaduk hingga larut. Kemudian

dipanaskan menggunakan *hot plate* dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Selanjutnya disterilkan pada autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 Atm.

### **III.2.3 Peremajaan Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat**

Koleksi bakteri pereduksi sulfat yang telah tersedia di Laboratorium Mikrobiologi di remajakan untuk memperoleh biakan yang aktif. Peremajaan dilakukan dengan menginokulasikan 5 *stock* isolat bakteri secara aseptis ke dalam masing-masing tabung reaksi yang berisi media cair *Tryptic Soy Broth* (TSB) dengan menggunakan jarum ose. Selanjutnya diinkubasi selama 3 × 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C.

### **III.2.4 Pembuatan *Stock* Bakteri Pereduksi Sulfat**

Kultur bakteri pereduksi sulfat yang telah diremajakan kemudian dibuatkan *stock* yang akan digunakan untuk pengujian selanjutnya. Penginokulasian kultur bakteri yang telah diremajakan menggunakan jarum ose ke dalam media TS agar miring dalam tabung reaksi diinkubasi selama 1 × 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C.

### **III.2.5 Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Cd**

Setelah dilakukan isolasi isolat BPS, dilakukan pengujian 5 isolat bakteri pada beberapa konsentrasi kadmium (Cd) yaitu 0 ppm (kontrol), 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm dengan metode turbidimetri. Tingkat toleransi isolat bakteri terhadap kadmium (Cd) diperoleh dengan mengukur kekeruhan media pertumbuhan bakteri menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm. Jumlah sinar yang diabsorpsi dinyatakan dalam OD (*Optical Density*)

yang berbanding lurus dengan konsentrasi sel. Uji toleransi yang dilakukan dengan menumbuhkan 0,5 mL suspensi bakteri ke dalam medium cair *Tryptic Soy Broth* (TSB) yang telah diperkaya dengan kadmium ( $\text{CdSO}_4$ ) dalam berbagai konsentrasi. Kemudian dilakukan inkubasi selama  $1 \times 24$  jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , untuk melihat ketahanan bakteri terhadap logam berat. Kemudian masing-masing bakteri setiap perlakuan diukur nilai *Optical Density* (OD) untuk mengetahui tingkat kepadatan bakteri pada spektrofotometer. Semakin tinggi nilai yang ditunjukkan OD, maka semakin tinggi pula kepadatan bakteri dan semakin tahan bakteri terhadap konsentrasi kadmium. Perhitungan OD (*Optical Density*) dapat digunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{OD} = 2 - \log \% T$$

Ketereangan:

OD = *Optical Density*

T = Nilai Transmittan

### **III.2.6 Uji Reduksi Sulfat**

Uji reduksi sulfat untuk mengetahui bakteri mampu mengurai sulfat menjadi sulfida. Isolat bakteri yang digunakan adalah isolat bakteri yang telah diremajakan pada medium *Tryptic Soy Broth* (TSB). Selanjutnya menginokulasikan isolat bakteri secara aseptis ke medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) sebanyak 1 ose dengan metode tusuk pada *butt* hingga mendekati dasar tabung dan metode gores pada *slant*. Kemudian diinkubasi selama  $2 \times 24$  jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dan diamati perubahan yang terjadi pada media yaitu uji positif terbentuknya endapan hitam yang ditandai dengan produksi  $\text{H}_2\text{S}$ .

### III.2.7 Uji pH

Uji pH dilakukan untuk melihat bakteri yang mampu tumbuh pada kondisi asam (pH rendah) sehingga merupakan salah satu uji untuk melihat isolat bakteri termasuk bakteri pereduksi sulfat. Uji pH dilakukan dengan menginokulasikan stok isolat bakteri pada media agar miring ke dalam aquades sampai keruh. Kemudian menginokulasikan suspensi isolat bakteri sebanyak 0,5 mL pada medium cair *Tryptic Soy Broth* (TSB) dengan menggunakan variasi pH 3, 5 dan 7. gelas kimia pertama ditambahkan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) hingga pH menjadi 3, begitu pula pada gelas kimia kedua untuk pH 5 dengan mengukur pH menggunakan kertas lakmus. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap semua isolat yang dikarakterisasi dengan variasi pH. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama  $2 \times 24$  jam pada suhu  $37^\circ C$ . Setelah diinkubasi, dilakukan pengenceran bertingkat dengan mengambil sebanyak 1 mL suspensi bakteri dan diencerkan dengan aquades steril dari  $10^{-1} - 10^{-5}$ . Selanjutnya sampel pengenceran dari  $10^{-3} - 10^{-5}$  diambil masing-masing 1 mL dan ditumbuhkan pada medium *Tryptic Soy Agar* (TSA). Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ C$  selama  $2 \times 24$  jam. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan metode SPC (*Standart Plate Count*). Perhitungan koloni bakteri dilakukan dengan metode SPC (*Standart Plate Count*) menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah Sel} = v \times n \times 1/f$$

Keterangan:

v = jumlah sampel yang ditumbuhkan

n = jumlah koloni dalam cawan

f = faktor pengenceran

### **III.2.8 Analisis Data**

Data diperoleh dari uji pH, uji reduksi sulfat dan uji aktivitas bakteri terhadap logam berat kadmium, yang dibahas secara deskriptif serta diolah dalam bentuk tabel dan gambar.