

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

RIBKA LAURINA TOBONDO

H411 16 501



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

2020

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

*Skripsi ini dibuat untuk Melengkapi Tugas Akhir dan memenuhi Syarat untuk
Memperoleh Gelar Sarjana*

RIBKA LAURINA TOBONDO

H411 16 501

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

LEMBAR PENGESAHAN

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

Disusun dan diajukan oleh:

RIBKA LAURINA TOBONDO

H411 16 501

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama



Dr. Fahrudin, M.Si
NIP. 19650915199103 1 002

Pembimbing Pertama



Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si
NIP. 19651209199008 2 001

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, yang telah melimpahkan rahmat dan berkatnya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Karakterisasi dan Uji Toleransi Timbal 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.

Penulis menyadari, karena keterbatasan ilmu dan pengetahuan yang dimiliki, sehingga masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Untuk itu demi sempurnanya skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran yang berupa kritik dan saran yang bersifat membangun.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis. Pada kesempatan ini, penulis menghanturkan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua, Ayahanda Noldi Tobondo dan ibunda Alse Bertha Tudjuka yang telah melahirkan, membesarkan, mendidik dan mengiringi setiap langkah penulis serta limpahan doa, kasih sayang serta dukungan moral dan material yang telah diberikan tanpa henti kepada penulis.

Kepada Bapak Dr.Fahrudin, M.Si. selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Zaraswati Dwiyana, M.Si. selaku pembimbing pertama, penulis

mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan dan arahnya berupa kritik dan saran yang membangun dan memotivasi yang telah diberikan selama penulis melaksanakan proposal, penelitian, hingga ke tahap penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena telah meluangkan waktu untuk terus memberi bimbingan dan arahan demi arahan yang sangat membantu hingga selesainya skripsi ini.

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. Kepada bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si. selaku Wakil Dekan 3 yang banyak membantu mahasiswa dalam kegiatan organisasi kampus
2. Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin serta selaku Pembimbing Akademik sekaligus penguji terima kasih atas ilmu, masukan serta saran kepada penulis.
3. Bapak Drs. Ambeng, M.Si dan Ibu Dr. Juhriah, M.Si selaku penguji sidang sarjana terima kasih atas segala saran dan ilmunya. 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 kak Fuad Gani S.Si, kak Heriadi 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 keceriaan dan kesabaran serta kebaikan hatinya selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Kepada orang tua terkasih saya yang lain Papa Henny H. Lumeno dan Mama Mintje S. Tobondo yang selalu memberi dukungan moral dan material serta selalu mendoakan yang terbaik buat penulis
6. Kepada Mama yang terkasih Lusiana Tudjuka yang menjadi tempat tinggal penulis selama berjuang di bangku studi S1 di makassar dan kepada kakak perempuan penulis Theresia E.Y.Tobondo dan adik laki-laki penulis Alberto Reynold Tobondo terima kasih telah banyak memberikan motivasi serta dukungan dan terima kasih atas segala doa-doa baik dan motivasi serta semangat untuk mendorong penulis dalam menyelesaikan skripsi hingga pada saat ini.
7. Kepada sahabat-sahabat terkasih Fera Yuniar yang juga adalah teman penelitian yang dengan setia mengingatkan dan menolong penulis selama pengerjaan proposal sampai penyusunan skripsi, banyak terima kasih juga untuk Suci Amalia, Fiqha Septia Ningsih, Joice Batara, Dyah Arindi, Elvirah Novry, Rizka Gunawan dan Genk Tim Sukses penulis selama kuliah terima kasih selalu mengingatkan dan mendorong penulis hingga selesainya skripsi ini dan terima kasih selalu menemani baik dalam suka maupun duka, terima kasih telah mendoakan dan memotivasi penulis untuk menyelesaikan skripsi.

8. 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.

Makassar, Juli 2020

Penulis

ABSTRAK

Penelitian dengan judul Karakterisasi dan Uji Toleransi Timbal pada Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat dari Air Asam Tambang yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat bakteri pereduksi sulfat terhadap timbal (Pb), mengetahui toleransi pH pada pertumbuhan isolat bakteri pereduksi sulfat, dan mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam mereduksi H₂S. Penelitian ini memiliki manfaat yaitu memberikan informasi ilmiah mengenai hasil karakterisasi dan uji toleransi bakteri pereduksi sulfat terhadap timbal. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Februari 2020, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Salah satu permasalahan lingkungan dalam aktivitas penambangan adalah terkait dengan Air Asam Tambang yang didalamnya mengandung beberapa logam berat salah satunya yaitu timbal (Pb). Timbal (Pb) dengan konsentrasi yang tinggi akan menghambat aktivitas enzim, dan merusak sistem metabolisme tubuh. Dampak dari lingkungan tercemar logam berat timbal dapat diatasi dengan mengandalkan bakteri yang memiliki kemampuan menurunkan konsentrasi timbal. Pada penelitian ini dilakukan peremajaan isolate bakteri menginokulasikan 5 *stock* isolat bakteri (R1,R2,M1,M2,M3) lalu dilakukan uji pereduksi H₂S dengan menggunakan media TSIA dan uji pH dengan variasi pH 3,5,7. Selanjutnya dilakukan uji toleransi bakteri terhadap timbal (Pb) dengan metode turbidimetri pada spektrofotometer. Hasil penelitian yang didapatkan yaitu semua isolat bakteri memiliki kemampuan dalam mentoleransi timbal hingga konsentrasi 50 ppm. Pada uji pereduksi H₂S didapatkan hasil ada tiga isolat yang dapat mereduksi H₂S yaitu isolat R1, M2 dan M3. Pada uji pH dari ke 5 isolat mampu tumbuh secara optimal pada pH netral atau pH 7. Pertumbuhan isolate M2 mencapai 37×10^3 .

Kata Kunci: Timbal, Air Asam Tambang, Bakteri Pereduksi Sulfat, Bakteri Toleran Timbal

ABSTRACT

Research with the title Characterization and Lead Tolerance Tests on Sulfate Reducing Bacteria Isolates from Acidic Mine Water which aims to determine the ability to grow sulfate reducing bacterial isolates to lead (Pb), determine the pH tolerance of the growth of sulfate reducing bacteria isolates, and determine the ability of bacterial isolates to reduce H₂S. This research has the benefit of providing scientific information about the results of the characterization and tolerance test of sulfate reducing bacteria to lead. This research was conducted in January-February 2020, located in the Microbiology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Hasanuddin University. One of the environmental problems in mining activities is related to Acid Mine Water which contains several heavy metals, one of which is lead (Pb). Lead (Pb) with high concentration will inhibit enzyme activity, and damage the body's metabolic system. The impact of the environment polluted by heavy metal lead can be overcome by relying on bacteria that have the ability to reduce lead concentration. In this study rejuvenation of bacterial isolates inoculated 5 bacterial isolates stock (R1, R2, M1, M2, M3) and then conducted H₂S reduction test using TSIA media and pH test with a pH variation of 3.5-7. Furthermore, a bacterial tolerance test for lead (Pb) was performed by the turbidimetry method on a spectrophotometer. The results obtained are all bacterial isolates have the ability to tolerate lead to a concentration of 50 ppm. In the H₂S reducing test it was found that there were three isolates that could reduce H₂S, namely isolates R1, M2 and M3. In the test pH of the 5 isolates were able to grow optimally at neutral pH or pH 7. M2 isolate growth reached 37x10³.

Keywords: Lead, Mine Acid Water, Sulfate Reducing Bacteria, Lead Tolerant Bacteria.

DAFTAR ISI

| | |
|---|-------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR TABEL | xii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiv |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Tujuan Penelitian..... | 4 |
| 1.3 Manfaat Penelitian..... | 5 |
| 1.4 Waktu dan Tempat Penelitian..... | 5 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| II.1 Logam Berat Timbal Pb | 6 |
| II.2 Dampak Logam Berat Timbal Bagi Kesehatan | 8 |
| II.3 Bakteri Toleran Timbal | 11 |
| II.4 Bakteri pada Air Asam Tambang | 15 |
| BAB III METODE PENELITIAN..... | 22 |
| III.1.1 Alat | 22 |
| III.1.2 Bahan | 22 |
| III.2 Prosedur Kerja | 22 |

| | |
|---|-----------|
| III.2.1 Sterilisasi Alat dan Bahan | 22 |
| III.2.2 .Pembuatan Media | 23 |
| a. Pembuatan Medium Tryptic Soy Broth (TSB)..... | 23 |
| b. Pembuatan Medium Tryptic Soy Agar (TSA)..... | 23 |
| c. Pembuatan Medium Triple <i>Sugar</i> Iron Agar (TSIA) | 24 |
| III.2.3 Peremajaan Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat | 24 |
| III.2.4 Pembuatan <i>Stock</i> Bakteri Pereduksi Sulfat..... | 24 |
| III.2.5 Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Air Asam Tambang pada Pb | 24 |
| III.2.6 Uji Pereduksi H ₂ S..... | 25 |
| III.2.7 Uji pH | 26 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 27 |
| IV.1 Uji Toleransi Bacteri terhadap Timbal (Pb) | 27 |
| IV.2 Uji Pereduksi H ₂ S | 31 |
| IV.3 Uji pH | 33 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... | 37 |
| V.1 Kesimpulan | 37 |
| V.2 Saran | 37 |
| DAFTAR PUSTAKA | 38 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Judul | Halaman |
|--------------|--------------------|----------------|
| Tabel 1. | Hasil Uji H2S..... | 31 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Judul | Halaman |
|---------------|--|----------------|
| Gambar 1. | Toleransi Timbal pada ke-5 Isolat Bakteri..... | 28 |
| Gambar 2. | Pertumbuhan Bakteri dengan Metode SPC..... | 35 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| Lampiran 1. Skema Kerja Karakterisasi dan Uji Toleransi Timbal pada Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat dari Air Asam Tambang | 42 |
| Lampiran 2. Skema Kerja Peremajaan Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat | 43 |
| Lampiran 3 Skema Kerja Pembuatan <i>Stock</i> Bakteri Pereduksi Sulfat (BPS) | 44 |
| Lampiran 4. Skema Kerja Uji Toleransi Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Timbal (Pb)..... | 45 |
| Lampiran 5. Skema Kerja Uji Toleransi Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Timbal (Pb) Tahap Akhir..... | 46 |
| Lampiran 6. Skema Kerja Uji Reduksi Sulfat..... | 47 |
| Lampiran 7. Skema Kerja Uji pH (Derajat Keasaman)..... | 48 |
| Lampiran 8. Skema Kerja Uji pH (Derajat Keasaman)..... | 49 |
| Lampiran 9. Tabel Perhitungan Total Bakteri..... | 50 |
| Lampiran 10. Tabel Perhitungan Nilai OD (<i>Optical Density</i>)..... | 51 |
| Lampiran 11. Gambar <i>Stock</i> Bakteri Pereduksi Sulfat | 52 |
| Lampiran 12. Gambar Peremajaan Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat..... | 53 |
| Lampiran 13. Gambar Uji Toleransi Tumbuh Bakteri Pereduksi Sulfat pada Timbal (Pb) Tahap Awal | 54 |
| Lampiran 14. Gambar Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Pereduksi Sulfat pada Pb Tahap Akhir (Perhitungan Nilai Transmitan Isolat BPS) | 55 |
| Lampiran 15. Gambar Uji pH (Derajat Keasaman) | 56 |

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Perkembangan industri di Indonesia berkembang sedemikian pesat, hal tersebut selain memberikan dampak yang positif, juga memberikan dampak negatif. Dampak positif berupa perluasan lapangan pekerjaan, sedangkan dampak negatifnya adalah penurunan kualitas perairan akibat buangan air limbah yang melampaui ambang batas. Pencemaran yang diakibatkan oleh dampak perkembangan industri harus dapat dikendalikan karena akan menimbulkan permasalahan yang serius bagi kelangsungan hidup manusia maupun biota di sekitarnya. 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 sungai akan terlarut dalam air dan akan terakumulasi dalam sedimen dan dapat bertambah sejalan dengan berjalannya waktu, tergantung pada kondisi lingkungan perairan tersebut (Setiawan,2013).

Salah satu kekayaan alam yang dimiliki oleh negara Indonesia adalah pertambangan, negara sebagai kekuasaan tertinggi, telah memberikan kewenangan kepada pemerintah dan/atau pemerintah daerah untuk menyelenggarakan penguasaan, pengelolaan dan pemanfaatan sumber daya alam di bidang pertambangan. Hadirnya pertambangan memberikan dampak positif bagi negara, diantaranya meningkatkan pendapatan negara, menciptakan lapangan pekerjaan, mempercepat pembangunan nasional. Disatu sisi pertambangan juga dapat menimbulkan permasalahan lingkungan hidup, diantaranya kerusakan bentang

alam, erosi, sedimentasi, hilangnya kesuburan tanah, dan pencemaran air (Ricardo, 2016).

Salah satu permasalahan lingkungan dalam aktivitas penambangan adalah terkait dengan Air Asam Tambang (AAT) atau *Acid Mine Drainage* (AMD). Air tersebut terbentuk sebagai hasil oksidasi dari mineral sulfida tertentu yang terkandung dalam batuan, yang bereaksi dengan oksigen di udara pada lingkungan berair. Penampakan air asam tambang di tahap awal adalah adanya air di pit tambang yang berwarna hijau. Timbulnya air asam tambang *Acid Mine Drainage* bukan hanya berasal dari hasil pencucian batubara, tetapi juga dari dibukanya suatu potensi keasaman batuan sehingga menimbulkan permasalahan kepada kualitas air dan juga tanah (Hidayat, 2017).

Air asam tambang (AAT) adalah istilah yang digunakan untuk merujuk pada air asam tambang yang timbul akibat kegiatan penambangan serta sering juga disebut air rembesan (*seepage*), atau aliran (*drainage*). Air ini terjadi akibat pengaruh oksidasi alamiah mineral sulfida (mineral belerang) yang terkandung dalam batuan yang terpapar selama penambangan. Perlu diketahui air asam tambang sebenarnya tidak terbentuk akibat kegiatan penambangan saja tetapi setiap kegiatan yang berpotensi menyebabkan terbuka dan teroksidasinya mineral sulfida akan menyebabkan terbentuknya air asam tambang. Air asam tambang dicirikan dengan rendahnya pH dan tingginya senyawa logam tertentu seperti besi (Fe), mangan (Mn), cadmium (Cd), aluminium (Al), sulfat. *Pyrite* merupakan senyawa yang umum dijumpai di lokasi pertambangan. Selain pirit masih ada berbagai macam mineral sulfida yang terdapat dalam batuan dan mempunyai potensi membentuk air asam tambang seperti *marcasite*, *pyrrhotite*, *chalcocite*, *covellite*

(CuS) *molybdenite*, *chalcopyrite*, *galena* (PbS), *sphalerite* (ZnS), dan *arsenopyrite* (FeAsS) dan timbal (Pb) (Hidayat, 2017).

Logam berat adalah unsur yang mempunyai densitas lebih dari 5 gr/cm³. Logam-logam berat merupakan salah satu dari bahan pencemar lingkungan. Sifat dari logam berat ini adalah mempunyai afinitas yang besar dengan sulfur (belerang). Logam ini menyerang ikatan sulfida pada molekul-molekul penting sel misalnya protein (enzim) sehingga enzim tidak berfungsi. Ion-ion logam berat bisa terikat pada molekul penting membran sel yang menyebabkan terganggunya proses transport yang melalui membran sel (Endrinaldi, 2009).

Penamanan logam berat telah dipergunakan secara luas, khususnya dalam pustaka ilmiah. Logam berat yang non esensial (elemen mikro) tidak mempunyai fungsi didalam tubuh manusia, dan bahkan sangat berbahaya hingga dapat menyebabkan keracunan (toksik) pada manusia diantaranya: timbal (Pb), merkuri (Hg), arsenik (As) dan cadmium (Cd). Logam berat merupakan komponen alami yang terdapat di kulit bumi yang tidak dapat didegradasi ataupun dihancurkan dan merupakan zat yang berbahaya karena dapat terjadi bioakumulasi (Adhani dan Husaini, 2017).

Toksisitas logam berat timbal (Pb) dapat memberikan pengaruh terhadap laju pertumbuhan, semakin lama pemaparan timbal dan semakin tinggi konsentrasi timbal akan menurunkan laju pertumbuhan. Timbal (Pb) dalam tubuh dengan konsentrasi yang tinggi akan menghambat aktivitas enzim. Penghambatan aktivitas enzim akan terjadi melalui pembentukan senyawa antara logam berat dengan gugus sulfhidril (S-H). Enzim – enzim yang memiliki gugus S-H merupakan kelompok enzim yang paling mudah terhalang kerjanya. Hal tersebut disebabkan karena gugus S-H mudah berikatan dengan ion – ion logam berat yang masuk ke dalam tubuh, akibat dari ikatan yang terbentuk antara gugus S-H dan logam berat, daya kerja

yang dimiliki oleh enzim menjadi sangat berkurang atau sama sekali tidak bekerja. Keadaan seperti ini akan merusak sistem metabolisme tubuh (Yulaipi dan Aunurohim, 2013).

Dampak dari lingkungan tercemar logam berat timbal ini dapat diatasi dengan mengandalkan bakteri yang memiliki kemampuan menurunkan konsentrasi logam berat timbal. Kemampuan tersebut berhubungan dengan gen yang terdapat di kromosom dan plasmid yang mengatur mekanisme tersebut. Bakteri memiliki permukaan sel yang bermuatan negatif karena terbentuk dari berbagai struktur anion sedangkan logam berat adalah ion yang bermuatan positif sehingga dapat terjadi ikatan antara permukaan sel bakteri dan ion logam berat. Bakteri juga dapat mengakumulasi logam berat di dalam sel yang membentuk ikatan antara logam berat dengan suatu protein dalam sel yang disebut metalotionein (Hasyimuddin dkk, 2018).

Berdasarkan uraian di atas, mengenai kemampuan bakteri dalam menurunkan konsentrasi logam berat maka dilakukan penelitian mengenai uji toleransi bakteri air asam tambang terhadap timbal (Pb) pada isolat bakteri pereduksi sulfat dari air asam tambang untuk mengetahui tingkat toleran bakteri tersebut.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui kemampuan tumbuh isolat bakteri pereduksi sulfat terhadap timbal (Pb).
2. Mengetahui toleransi pH pada pertumbuhan isolat bakteri pereduksi sulfat.
3. Mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam mereduksi H₂S.

I.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Memberikan informasi ilmiah mengenai hasil karakterisasi dan uji toleransi bakteri pereduksi sulfat terhadap timbal.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 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 Logam Berat Timbal (Pb)

Salah satu logam berat yang paling sering menjadi polutan pada lingkungan misalnya limbah rumah tangga hingga industri besar seperti pabrik-pabrik penghasil produk. Logam berat Pb bila terdapat pada lingkungan dalam jumlah yang banyak maka akan berbahaya bagi makhluk hidup di sekitarnya. Perairan adalah salah satu wadah alami yang paling rentan terhadap pencemaran logam berat Pb karena limbah industri yang berasal dari pemukiman ataupun pabrik yang dialirkan ke sungai akan bermuara ke laut. Selain itu kebiasaan masyarakat sekitar perairan yang membuang limbahnya ke perairan (Nur dan Karneli,2015).

Timbal atau timah hitam atau Plumbum (Pb) adalah salah satu bahan pencemar utama saat ini di lingkungan. Hal ini bisa terjadi karena sumber utama pencemaran timbal adalah dari emisi gas buang kendaraan bermotor. Selain itu timbal juga terdapat dalam limbah cair industri yang pada proses produksinya menggunakan timbal, seperti industri pembuatan baterai, industri cat, dan industri keramik. Timbal digunakan sebagai aditif pada bahan bakar, khususnya bensin di mana bahan ini dapat memperbaiki mutu bakar. Bahan ini sebagai anti knocking (anti letup), pencegah korosi, anti oksidan, diaktifator logam, anti pengembunan dan zat pewarna (Naria, 2005).

Timbal (Pb) termasuk dalam kelompok logam berat golongan IVA dalam Sistem Periodik Unsur kimia, mempunyai nomor atom 82 dengan berat atom 207,2, berbentuk padat pada suhu kamar, bertitik lebur 327,4 0C dan memiliki berat jenis

sebesar 11,4/1. Pb jarang ditemukan di alam dalam keadaan bebas melainkan dalam bentuk senyawa dengan molekul lain, misalnya dalam bentuk PbBr_2 dan PbCl_2 . Logam Pb 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 glaze 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. Logam Pb tersebut dalam jangka waktu panjang dapat terakumulasi dalam tubuh karena proses eliminasinya yang lambat (Gusnita, 2012).

Timbal (plumbum/Pb) atau timah hitam adalah satu unsur logam berat yang lebih tersebar luas dibanding lebih dari sebagian logam toksik lainnya. Timbal berupa serbuk berwarna abu-abu gelap digunakan antara lain sebagai bahan produksi baterai dan amunisi, komponen pembuatan cat, pabrik tetraethyl lead, pelindung radiasi, lapisan pipa, pembungkus kabel, gelas keramik, barang-barang elektronik, tube atau kontainer, juga dalam proses mematri (Ardillah, 2016).

Partikel timbal yang terdapat dalam asap kendaraan bermotor berukuran 0,02–1,00 μm , dengan masa tinggal di udara mencapai 4–40 hari. Partikel yang sangat kecil ini memungkinkan timbal terhirup dan masuk sampai ke paru paru. Timbal dalam bentuk, gas akan masuk ke dalam tubuh dan dapat terikat di dalam darah. Pada perairan sumber utama adanya timbal di air berasal dari pembuangan limbah yang mengandung timbal. Salah satu industri yang dalam air limbahnya mengandung timbal adalah industri aki penyimpanan di mobil, di mana elektrodanya mengandung 93% timbal dalam bentuk timbal oksida (PbO_2). Public

Health Service Amerika Serikat menetapkan bahwa sumber-sumber air untuk masyarakat tidak boleh mengandung timbal lebih dari 0,05 mg/L, sedangkan WHO menetapkan batas timbal di dalam air sebesar 0,1 mg/L. Dalam mengkontaminasi sumber air, hampir semua timbal terdapat dalam sedimen, dan sebagian lagi larut dalam air sedangkan pada tanah Keberadaan timbal di dalam tanah dapat berasal dari emisi kendaraan bermotor, di mana partikel timbal yang terlepas ke udara, secara alami dengan adanya gaya gravitasi, maka timbal tersebut akan turun ke tanah. Kandungan timbal dalam tanah bervariasi misalnya karena kepadatan lalu lintas, jarak dari jalan raya dan kondisi transportasi. Kandungan timbal lebih banyak ditemukan pada permukaan tanah sampai beberapa cm di bawahnya. Kandungan timbal di tanah yang belum diolah 6 – 20 ppm, dan pada tanah yang sudah diolah mencapai 300 ppm. Logam berat, seperti timbal, di dalam tanah ditemukan juga dalam bentuk ion. Logam yang tidak terikat dengan senyawa kompleks bersifat larut dan relatif tersedia bagi tanaman. Adanya senyawa organik di dalam tanah dapat mengikat logam menjadi senyawa kompleks sehingga dapat mengurangi bahaya akumulasi logam di dalam tanaman (Naria, 2005).

II.2 Dampak Logam Berat Timbal (Pb) Bagi Kesehatan

Selain itu penurunan kualitas udara ambient khususnya Pb juga berdampak terhadap kesehatan, batasan toleransi Pb yang masuk kedalam tubuh per mingguan (*provisional tolerable weekly intake atau PTWI*) Pb adalah 50 µg/kg berat badan untuk dewasa dan 25 µg/kg berat badan untuk anak-anak. Kadar normal dalam darah orang dewasa rata-rata adalah 10—25 µg/100 ml. Bila kandungan Pb lebih dari 80 µg/100 ml membahayakan bagi kesehatan berdasarkan standar WHO. Pada anak-anak, kadar yang diperkenankan oleh Centre for Disease Control (CDC) adalah 10 µg/100 ml. Efek toksik yang banyak menarik perhatian adalah efek toksik Pb pada bayi dan anak-anak. Kadar Pb yang rendah menyebabkan kerusakan

otak yang bersifat tidak balik yang berpengaruh pada gangguan belajar/daya ingat dan penurunan kapasitas intelektual. Efek toksik Pb atau yang disebut dengan istilah plumbisme ditandai dengan anemia, kerusakan ginjal, kerusakan syaraf, paralysis parsial otot, ertentu, dan kerusakan otak dengan gejala akut kolik pain pada abdomen, mual, penurunan berat badan, hipotensi, insommia, dan gangguan saluran cerna (Sunoko dkk, 2011).

Konsentrasi Pb dalam darah merupakan hal yang penting dalam evaluasi pemaparan terhadap Pb karena membantu diagnosa keracunan dan dapat dipakai sebagai indeks pemaparan untuk menilai tingkat bahaya, baik terhadap orang yang terpapar melalui pekerjaan atau pada masyarakat umum. Kadar timbal dalam darah menggambarkan refleksi kesinambungan dinamis antara pemaparan, absorpsi, distribusi dan ekskresi sehingga merupakan salah satu indikator untuk mengetahui dan mengikuti pemaparan yang sedang berlangsung. Rata-rata kadar normal Pb dalam darah orang dewasa adalah 10-25 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ darah. dapat menaikkan tekanan darah sehingga 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ dijadikan sebagai nilai ambang batas yang harus diwaspadai dan 55,3% responden penelitian ini mempunyai kandungan timbal dalam darah diatas nilai tersebut . Timbal yang terabsorpsi akan didistribusikan ke sel darah, jaringan lunak dan tulang. Dalam darah timbal yang ada di dalam darah akan diekskresikan setelah 25 hari, timbal yang di jaringan dieksresikan setelah 40 hari dan timbal di tulang dieksresikan setelah 25 tahun. Paparan timbal yang berlangsung lama dapat mengakibatkan gangguan terhadap berbagai sistem organ (Ardillah,2016).

Efek pertama pada keracunan timbal kronis sebelum mencapai target organ adalah adanya gangguan pada biosintesis hemoglobin, apabila hal ini tidak segera diatasi akan terus berlanjut mengenai target organ lainnya. Timbal menyebabkan 2 macam anemia, yang sering disertai dengan eritrosit berbintik basofilik. Dalam keadaan keracunan timbal akut terjadi anemia hemolitik, sedangkan pada keracunan timbal yang kronis terjadi anemia makrositik hipokromik, hal ini

disebabkan oleh menurunnya masa hidup eritrosit akibat intervensi logam timbal dalam sintesis hemoglobin (Ardillah,2016).

Unsur Pb umumnya ditemukan berasosiasi dengan Zn - Cu dalam tubuh bijih. Logam ini penting dalam industri modern yang digunakan untuk pembuatan pipa air karena sifat ketahanannya terhadap korosi dalam segala kondisi dan rentang waktu lama. Pigmen Pb juga digunakan untuk pembuatan cat, baterai, dan campuran bahan bakar bensin tetraethyl. Dampak lebih jauh dari keracunan Pb adalah dapat menyebabkan hipertensi dan salah satu faktor penyebab penyakit hati. Ketika unsur ini mengikat kuat sejumlah molekul asam amino, haemoglobin, enzim, RNA, dan DNA maka akan mengganggu saluran metabolik dalam tubuh (Dewa dkk., 2015).

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 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 (Dewa dkk., 2015).

Umumnya bahan bakar minyak mendapat zat tambahan tetraethyl yang mengandung Pb untuk meningkatkan mutu, 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 (Ika dkk, 2012).

Logam berat timbal sangat beracun, mempunyai sifat bioakumulatif dalam tubuh organisme air, dan akan terus diakumulasi hingga organisme tersebut tidak mampu lagi mentolerir kandungan logam berat timbal dalam tubuhnya. Karena sifat bioakumulatif logam berat timbal, maka bisa terjadi konsentrasi logam tersebut dalam bentuk terlarut dalam air adalah rendah, dalam sedimen semakin meningkat akibat proses-proses fisika, kimia dan biologi perairan, dan dalam tubuh hewan air meningkat sampai beberapa kali lipat (Sitorus, 2004). Logam berat secara langsung maupun tidak langsung dapat membahayakan manusia seperti Timbal (Pb) dapat mengakibatkan penghambatan sistem pembentukan hemoglobin (Hb) sehingga menyebabkan anemia, terganggunya sistem syaraf pusat dan tepi, sistem ginjal, sistem reproduksi, idiot pada anak - anak, sawan (epilepsi), cacat rangka dan merusak sel - sel somatik. Walaupun jumlah Timbal (Pb) yang diserap oleh tubuh hanya sedikit, logam ini ternyata menjadi sangat berbahaya. Hal ini disebabkan senyawa – senyawa Timbal (Pb) dapat memberikan efek racun pada banyak organ yang terdapat di tubuh (Ika dkk, 2012).

II.3 Bakteri Toleran Timbal (Pb)

Menurut Lewaru (2012) proses bakteri dalam mereduksi logam berat timbal (Pb) dalam melalui kondisi aerobik dan anaerobik. Dalam kondisi aerobik logam direduksi dengan bantuan NADH sebagai donor elektron dan pada kondisi anaerobik logam direduksi menggunakan Cytoplasmic membrane protein yang dimiliki oleh bakteri.

Bioremediasi dapat dilakukan dengan mengandalkan mikroba indigen atau dapat ditingkatkan dengan penambahan mikroba eksogen. Mikroba indigen yang mampu tumbuh dalam media tercemar logam berat mempunyai kemampuan mengakumulasi logam berat dalam dinding selnya. Ion logam bermuatan positif, sehingga secara elektrostatik akan terikat pada permukaan sel. Interaksi antara ion logam dan dinding sel bakteri, menunjukkan adanya peranan gugus karboksil pada peptidoglikan dan gugus fosforil pada polimer sekunder asam teikoat dan teikuronat. Mekanisme biosorpsi oleh mikroba yang mampu hidup pada lingkungan yang tercemar logam Pb adalah *active uptake*. Mekanisme ini terjadi secara simultan sejalan dengan konsumsi ion logam untuk pertumbuhan mikroorganisme (Maulana dkk, 2017)

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* juga mampu mengakumulasi berbagai logam berat diantaranya, merkuri (Hg), tembaga (Cu), kromium (Cr), dan timbal (Pb) yang mencemari tanah maupun air dan menjadi masalah besar dalam kesehatan publik (Nagashetti, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* ditandai dengan tingkat resistensi yang tinggi terhadap xenobiotik. Termasuk agen antimikroba, pelarut dan logam berat (Wang, C. L dkk, 1997).

Teknik yang digunakan adalah 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 (Kumar et al., 2011). Berdasarkan hasil penelitian (Zulaika et al., 2012) bakteri dari genus *Bacillus* sp. termasuk dalam bakteri yang resisten terhadap logam Hg, Pb, Cu dan Cd. Bakteri tersebut diisolasi dari sungai Kalimas Surabaya yang sudah tercemar dengan logam berat. Salah satu genus *Bacillus* sp. yang mampu hidup pada habitat yang tercemar logam berat adalah *Bacillus subtilis*. *B. subtilis*

mampu mengikat logam Pb, Cd, Zn dan Cu. *B. subtilis* juga merupakan pengakumulasi logam Zn dan Pb terbaik bila dibandingkan dengan *B. licheniformis*, *B. cereus* dan *B. amyloliquefaciens*.

Beberapa jenis bakteri diketahui mempunyai afinitas tinggi terhadap logam dan mampu mengakumulasi logam berat dan logam beracun dengan berbagai mekanisme. Bakteri termasuk salah satu mikroorganisme yang mampu memanfaatkan ion logam berat dalam aktivitas metabolismenya. Pencarian mikroorganisme yang dapat digunakan sebagai biosorben logam telah banyak dilakukan. Bakteri yang sering digunakan sebagai biosorben logam umumnya diisolasi dari lingkungan tercemar logam berat. Bakteri dari genus *Bacillus* termasuk dalam bakteri yang resisten terhadap logam Hg, Pb, Cu dan Cd. Pengikatan logam Pb oleh salah satu spesies dari genus ini yaitu *Bacillus subtilis* terjadi pada dinding sel. Bakteri *Pseudomonas* dan *Bacillus* merupakan bakteri lokal yang mampu menyerap logam berat ke dalam sel-selnya sehingga logam berat tersebut tidak dapat bergerak kedalam tanah lebih jauh atau terbawa aliran air bawah tanah (Hasyimuddin dkk, 2018).

Menurut Hardiani dkk (2011) proses bioremediasi tanah terkontaminasi logam Pb dari limbah padat industri kertas proses deinking telah menggunakan aktivitas mikroba sebagai sumber energi, sumber karbon atau aseptor elektron untuk metabolisme hidupnya. Masuknya bakteri pada ukuran populasi tertentu terutama bakteri yang adaptif dan resisten terhadap lahan terpolusi, dapat mengikat logam berat karena mikroba memproduksi protein permukaan yang mampu mengikat logam berat. Keberhasilan bioremediasi adalah mengubah logam aktif dalam tanah terkontaminasi menjadi tidak aktif oleh aktivitas mikroba, dengan melalui analisis fraksinasi dengan cara ekstraksi berurutan. Hal ini ditunjukkan

dengan adanya peningkatan kandungan logam dalam fase residual dan menurunnya kandungan logam dalam fase tertukarkan. Analisis fraksinasi dengan cara ekstraksi berurutan digunakan secara tidak langsung untuk mengkaji mobilitas potensial dan ketersediaan logam dalam tanah. Fraksi kation yang teradsorpsi pada permukaan logam Pb di dalam tanah menentukan sifat aktif maupun tidak aktif logam dalam tanah. Tujuan dari bioremediasi tanah terkontaminasi logam Pb adalah mereduksi logam Pb aktif dalam tanah menjadi tidak aktif.

Pertumbuhan bakteri merupakan salah satu faktor yang harus diperhatikan dalam proses pengolahan limbah. Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri adalah pH. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri ini berkaitan dengan aktivitas enzim. Enzim ini dibutuhkan oleh beberapa bakteri untuk mengkatalis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri. Apabila pH dalam suatu medium atau lingkungan tidak optimal maka akan mengganggu kerja enzim-enzim tersebut dan akhirnya mengganggu pertumbuhan bakteri itu sendiri(14). Nilai pH merupakan faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, dimana aktivitas enzim ini akan maksimum pada kondisi pH optimum. Bila pH lingkungan tidak sesuai untuk aktivitas enzim secara optimal, maka bakteri tidak dapat melakukan metabolisme dengan baik. Akibatnya bakteri tidak dapat tumbuh dengan optimal. Berdasarkan pH, bakteri dikelompokkan menjadi golongan asidofil (bakteri yang tumbuh dengan baik pada pH asam), netral (bakteri yang tumbuh dengan baik pada pH netral) dan alkalifil (bakteri yang tumbuh dengan baik pada pH basa). Kisaran pH untuk pertumbuhan setiap kelompok bakteri sangat bervariasi. Beberapa bakteri mampu tumbuh pada kisaran pH yang lebar (Sopiah dkk, 2017).

II.4 Bakteri Pada Air Asam Tambang

Limbah asam tambang merupakan limbah dari sisa ekstraksi bijih yang berasal dari batuan yang mengandung sulfida akan teroksidasi di permukaan bumi dan membentuk air asam tambang yang bersifat asam dan mengandung logam berat. Asam sulfat merupakan komponen asam utama dalam limbah asam tambang yang berasal dari batuan yang kaya kandungan sulfurnya. Kandungan asam sulfat dalam limbah air asam tambang merupakan penyebab utama pencemaran pada lingkungan air maupun pada lingkungan darat dari sifat asam limbah ini. Jika sudah masuk di lingkungan, terus akan terbentuk asam oleh adanya kelompok bakteri *Thiobacillus* yang menjadi pemicunya. Mengingat sedemikian banyaknya limbah air asam tambang yang dihasilkan dari aktivitas pertambangan dengan dampak atau risiko kerusakan lingkungan yang sangat besar, maka teknologi penanganan limbah air asam tambang haruslah sedemikian efektif serta memiliki dampak yang minimal terhadap terjaganya kelestarian lingkungan. Kajian bioteknologi untuk pengolahan limbah merupakan langkah yang bijaksana dengan memperhatikan sisi efektif dan ekonomis yaitu dengan memanfaatkan bakteri pereduksi sulfat (Fahrudin dan Abdullah, 2018).

Air asam tambang merupakan limbah pencemar lingkungan yang terjadi akibat aktifitas pertambangan. Limbah ini terjadi karena adanya proses oksidasi bahan mineral pirit (FeS_2) dan bahan mineral sulfida lainnya yang tersingkap ke permukaan tanah dalam proses pengambilan bahan mineral tambang. Proses kimia dan biologi dari bahan-bahan mineral tersebut menghasilkan sulfat dengan tingkat keasaman yang tinggi. Secara langsung maupun tidak langsung tingkat keasaman yang tinggi mempengaruhi kualitas lingkungan dan kehidupan organisme. Pengaruh mineral sulfida yang berpengaruh terhadap pembentukan air asam

tambang membuat penulis tertarik untuk meneliti pengaruh spent ore emas proses head leach dalam pembentukan air asam tambang (Wahyudin dkk, 2018).

Untuk membedakan dengan air asam yang timbul akibat kegiatan lain seperti penggalian untuk pembangunan fondasi bangunan, pembuatan tambak dan sebagainya. Beberapa mineral sulfida yang ditemukan pada proses AAT FeS₂, CuS₂, CuS, CuFeS₂, MoS₂, NiS, PbS dan ZnS. Pirit merupakan mineral sulfida yang umum ditemukan pada kegiatan penambangan terutama batubara. 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 O₂ yang rendah (Wahyudin dkk, 2018).

Areal pertambangan merupakan habitat yang cukup sesuai 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 yang 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 dikatalis oleh bakteri pengoksidasi besi dan sulfur, seperti *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* dan *Thiobacillus thiooxidans*. Proses kimia dan biologi dari bahan-bahan mineral sulfida tersebut menghasilkan senyawa sulfat dengan tingkat kemasaman yang tinggi. Pada kondisi demikian hanya mikroorganisme asidofil yang mampu bertahan dan hidup. Sampai saat ini pengolahan air asam tambang di area pertambangan Muara Enim dilakukan dengan meningkatkan pH limbah dalam kolam penampungan. Secara alami kolam penampungan limbah tersebut merupakan habitat yang cukup sesuai untuk

pertumbuhan bakteri pereduksi sulfat. Keberadaan bakteri pereduksi sulfat akan sangat membantu mengurangi kandungan sulfat pada air asam tambang, sehingga dapat meningkatkan pH limbah air asam tambang. Bakteri pereduksi sulfat dapat dipergunakan secara bioteknologi untuk mengolah air asam tambang sehingga tidak berbahaya bagi lingkungan (Yusron dkk, 2009).

Thiobacillus spp merupakan bakteri yang hidup secara aerob, suka kondisi asam (acidophilic) dan menggunakan sumber energi dari oksidasi sulfur dan sumber karbon dari CO₂ (kemolitotrof). Disamping oksidasi sulfur beberapa kelompok *Thiobacillus* juga mampu menggunakan sumber energi dari proses oksidasi ferro menjadi ferri. Karena sumber energi dan karbon yang diperlukan seperti tersebut di atas, *thiobacillus* dapat ditemukan pada tanah bekas tambang batubara, pada batubara, pada air asam tambang, pada tanah pertanian yang mempunyai kandungan besi tinggi, pada tanah gambut dan pada tanah sulfat masam. Hasil eksplorasi mikrob yang bermanfaat dapat dikoleksi dan digunakan sesuai dengan kegunaannya serta dapat dikembangkan untuk proses-proses bioremediasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat *Thiobacillus* spp. dan formulasi inokulum untuk biodesulfurisasi batubara (Hazra dan Widyati,2007).

Karakterisasi isolat yang dilakukan meliputi pewarnaan gram. Pewamaan ini digunakan untuk menentukan sifat dinding sel bakteri dan bentuk sel bakteri. Karakter lain yang dipelajari pada penelitian ini adalah pH tempat bakteri tersebut ditemukan, kebutuhan akan mineral ferro dan nitrogen. Data yang didapat selanjutnya dibandingkan dengan sifat-sifat bakteri *Thiobacillus* pada literatur. Seleksi isolat dilakukan melalui pertumbuhan bakteri pada media yaitu dilakukan

pengukuran kerapatan sel bakteri dengan menghitung kerapatan optik (optical density) dengan spektrofotometer. Optical density diukur dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang yang menunjukkan nilai absorbansi maksimum. Pengukuran dilakukan tiap hari selama 12 hari inkubasi. Untuk mengetahui pertumbuhan sel bakteri *Thiobacillus* spp. ini dapat diukur dengan berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang yang menunjukkan nilai absorbansi maksimum (Hazra dan Widyati,2007).

Menurut Widyati (2011) air asam tambang (AAT) sudah cukup lama menjadi masalah pada lahan pertambangan. AAT merupakan air yang mengalir atau yang terdapat pada daerah pertambangan yang mempunyai pH kurang dari 3. AAT dapat terjadi pada lahan bekas pertambangan dengan batuan induk yang tersusun atas mineral sulfidik, baik pada lahan sisa galian maupun timbunan tailing. Menurunnya pH akibat AAT memberikan serangkaian dampak pada lingkungan. Dampak penurunan pH yang paling penting adalah meningkatnya kelarutan logam-logam termasuk logam berat. Logam merupakan kofaktor dan aktivator enzim-enzim, sehingga apabila masuk ke dalam tubuh hewan, tumbuhan, mikroba dan manusia akan mengacaukan sistem metabolisme. Oleh karena itu, kandungan logam harus menjadi perhatian utama pada pengelolaan air asam tambang. Karena pertambangan umumnya berada di daerah yang jauh dari fasilitas PDAM, di mana masyarakat yang terdapat di sepanjang daerah aliran sungai sangat menggantungkan hidupnya pada air sungai tersebut, maka pengelola pertambangan perlu memberikan perhatian terhadap kualitas air tersebut. Apabila diidentifikasi, permasalahan utama AAT adalah terakumulasinya sulfat. Menurut banyak teori kandungan sulfat (termasuk dalam air asam tambang) dapat diturunkan dengan

memanfaatkan aktivitas bakteri pereduksi sulfat (BPS). Karena BPS mampu menggunakan ion sulfat, sulfit atau thiosulfat sebagai aseptor elektron untuk mendapatkan energi dalam proses metabolismenya. Ion-ion tersebut setelah menerima elektron akan tereduksi menjadi sulfida. Terbentuknya hidrogen sulfida juga akan sangat menguntungkan terhadap lingkungan yang mengandung logam terlarut tinggi. Karena senyawa ini sangat reaktif dan akan segera berreaksi dengan logam membentuk logam-sulfida yang sangat stabil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tanah bekas tambang batubara yang diberi perlakuan bahan organik yang dikoloni oleh BPS dapat menurunkan ketersediaan logam Fe, Mn, Zn dan Cu dalam tanah dengan efisiensi antara 68 - 97% setelah 15 hari inkubasi. Untuk pertumbuhannya BPS memerlukan donor elektron dari asam-asam organik berbobot molekul rendah seperti laktat, asetat, propionat, butir, etanol yang dapat diperoleh dari mineralisasi bahan organik. Sedangkan sebagai sumber karbon (C) BPS memerlukan bahan organik sehingga BPS dikelompokkan ke dalam bakteri heterotrof.

Bakteri pereduksi sulfat dapat diperoleh dari substrat-substrat berlumpur seperti pada sedimen. Cara ini dilakukan dalam bioreaktor yang tidak diinokulasikan lagi mikroba dari luar karena secara alami sudah ada mikroba didalamnya dan menetap pada sedimen wetland. Sedimen rawa maupun sedimen sawah pada air asam tambang mampu meningkatkan pH air asam tambang, menurunkan kadar sulfat dan meningkatkan pertumbuhan bakteri pereduksi sulfat (BPS) sehingga dapat digunakan untuk penanggulangan pencemaran lingkungan akibat air asam tambang. Beberapa peneliti telah menggunakan sedimen dari lahan basah atau wetland sebagai sumber bahan organik, reduksi logam dalam air

terkontaminasi menggunakan wetland dapat menurunkan kandungan seng 150 menjadi 0,2 mg/l; tembaga 55 menjadi 0,05 mg/l; besi 700 menjadi 1 mg/l; dan mangan 80 menjadi 1 mg/l. Kandungan materi organik yang tinggi dalam sedimen wetland menyediakan lingkungan yang ideal untuk populasi bakteri pereduksi sulfat (BPS) untuk proses presipitasi kompleks logam. Presipitasi logam juga dapat terjadi melalui pembentukan mineral karbonat pada penelitian (May, 2007) yang telah dilakukan sebelumnya (Fahrudin dkk, 2014).

Dewasa ini, tantangan investasi di sektor pertambangan semakin berat untuk daerah-daerah yang memiliki cadangan tembaga yang relatif kecil. Investor tidak tertarik karena menghadapi banyak kendala, diantaranya nilai keekonomian cadangan, ketidak-jelasan pengaturan kewenangan penanganan sumberdaya mineral di era otonomi daerah, diperlukan peralatan yang kapasitasnya besar sehingga memerlukan modal yang besar pula. Mencermati hal di atas, diperlukan terobosan teknologi pertambangan, khususnya eksplorasi tembaga sehingga deposit tembaga yang relatif kecil di daerah dapat di manfaatkan secara optimal dan berkelanjutan oleh perusahaan lokal, dengan memperhatikan lingkungan sosial, fisik dan biologi. Telah lama diketahui bahwa mikroorganisme berperan dalam pelarutan logam sulfida, tetapi baru pada tahun 1947, Colmer dan Hinkle berhasil mengisolasi bakteri genus *Acidithiobacillus ferrooxidans* dan *Thiobacillus thiooxidans* dari air tambang asam. Sejak periode 1950-1980, teknologi biohidrometalurgi atau *bioleaching* telah dijadikan pilihan utama untuk pemisahan tembaga dan logam lainnya dari pembuangan (dumps) atau dari mineral berkadar rendah. Jika dilihat, proyek biohidrometalurgi besar yang sukses justru berada di negara-negara berkembang. Hal ini dimungkinkan karena selain negara-negara

berkembang banyak memiliki cadangan mineral, teknologi biohidrometalurgi cocok dikembangkan karena biaya yang ringan (Male dkk, 2019).

Bioleaching merupakan suatu proses untuk melepaskan atau mengekstraksi logam dari mineral atau sedimen dengan bantuan organisme hidup atau untuk mengubah mineral sulfida sukar larut menjadi bentuk yang larut dalam air dengan memanfaatkan mikroorganisme. *Bioleaching* menyebabkan proses asidifikasi dan kelarutan logam berat, sehingga proses bioleaching menjadi metode yang menjanjikan untuk menghilangkan logam berat dari sedimen atau lingkungan terkontaminasi. Bakteri *Acidithiobacillus ferrooxidans* memiliki kemampuan untuk melarutkan logam berat dan telah lama digunakan pada proses bioleaching tembaga dan emas. Selain itu bakteri *A. ferrooxidans* mampu melarutkan sulfide logam (MS) menjadi ion sulfat (SO_4^{2-}) dan ion logam senyawa logam sulfat (MSO_4). Dari proses tersebut logam dapat dipisahkan dan diperoleh kembali secara *bioleaching* (Male dkk, 2019).

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, 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), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 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 Bahan

1. Membersihkan semua peralatan yang terbuat dari gelas seperti pipet kaca, botol saring, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, tip pipet, dan tabung mikro ukuran 1,5 mL.
2. Membersihkan erlenmeyer terlebih dahulu menggunakan larutan kimia pembebas logam dengan cara direndam selama 24 jam

3. Mengangkat erlenmeyer dan dibilas menggunakan aquades. Sterilisasi dilakukan dengan sterilisasi panas kering (udara panas) pada oven. Sterilisasi dilakukan pada temperature 170°C-180°C selama 1-2 jam.
4. Melakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 Atm dengan semua peralatan terbuat dari gelas yang akan disterilisasi, terlebih dahulu dibungkus aluminium *foil* dan koran. Sedangkan jarum ose disterilisasikan dengan sterilisasi panas kering dalam nyala api Bunsen sampai merah membara.
5. Mensterilisasikan media dan air suling dengan sterilisasi basah yaitu dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

III.2.2 Pembuatan Media

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 hotplate 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

Peremajaan dilakukan dengan menginokulasikan 5 *stock* isolat bakteri yang merupakan koleksi bakteri pereduksi sulfat yang telah tersedia di Laboratorium Mikrobiologi 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, hal ini dilakukan untuk memperoleh biakan yang aktif.

III.2.4 Pembuatan *Stock* Bakteri Pereduksi Sulfat

Untuk pengujian selanjutnya dilakukan pembuatan stock dari kultur bakteri pereduksi sulfat yang telah diremajakan. Kultur bakteri yang telah diremajakan diinokulasikan menggunakan jarum ose ke dalam media TS agar miring dalam tabung reaksi.

III.2.5 Uji Toleransi Tumbuh Isolat Bakteri Air Asam Tambang pada Pb

Pengujian 3 isolat bakteri pada beberapa konsentrasi timbal (Pb) dengan menggunakan metode turbidimetri. Untuk melihat tingkat toleransi bakteri terhadap

timbangan (Pb) diperoleh dengan cara mengukur kekeruhan media pertumbuhan bakteri tersebut menggunakan spektrofotometer. 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 timbal (Pb) dalam berbagai konsentrasi yaitu konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm. Kemudian dilakukan inkubasi selama 1×24 jam pada suhu 37°C , untuk melihat ketahanan bakteri terhadap logam berat. Kemudian masing-masing bakteri setiap perlakuan diukur nilai *Optical Density* (OD) dengan panjang gelombang 580 nm. Semakin tinggi nilai yang ditunjukkan OD pada berbagai konsentrasi, maka semakin tinggi pula kepadatan bakteri serta tingkat toleransi bakteri terhadap konsentrasi timbal semakin tinggi pula.

III.2.6 Uji Pereduksi H₂S

Setelah dilakukan uji toleransi tumbuh bakteri AAT terhadap timbal dilakukan uji produksi H₂S untuk mengetahui apakah bakteri tersebut mampu memecah asam amino yang mengandung sulfur yang ditandai dengan terdapatnya endapan berwarna hitam pada media dan terbentuknya gas yang ditandai dengan pecah serta terangkatnya media dan terjadinya perubahan warna pada *butt* ataupun *slant* yang ditandai terjadinya fermentasi 3 gula oleh bakteri. Pada uji ini digunakan isolat bakteri yang telah diremajakan sebelumnya pada medium *Tryptic Soy Broth* (TSB). Selanjutnya diinokulasikan isolat bakteri secara aseptis ke medium *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan metode tusuk pada bagian *butt* dan metode gores pada bagian *slant*. Kemudian diinkubasi selama 2×24 jam pada suhu 37°C .

III.2.7 Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menginokulasikan stok 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 tabung kedua dengan mengukur pH menggunakan kertas lakmus. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap semua isolat yang dikarakterisasi dengan variasi pH. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 2×24 jam pada suhu 37°C dan diamati perubahan warna atau kekeruhan pada medium. 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°C selama 2×24 jam. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan metode SPC (*Standart Plate Count*).