

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan potensi cadangan mineral yang besar, terutama di bidang mineral nikel menduduki peringkat ketiga dunia. Selain itu, Indonesia juga mencatatkan kontribusi terhadap produk emas sebesar 39% sehingga membuat Indonesia menempati peringkat urutan nomor dua setelah negara China (Faizal *et al.*, 2022). Sektor pertambangan telah berkembang menjadi bagian penting dari perekonomian Indonesia karena menghasilkan sebagian besar devisa negara dan menyediakan lapangan kerja bagi penduduk setempat. Akan tetapi, sumber daya ini seringkali dieksploitasi tanpa mempertimbangkan dampak lingkungan dan kesejahteraan masyarakat lokal setempat (Gunawan, 2023). Pertambangan di Indonesia, khususnya di Morowali, Sulawesi Tengah, merupakan contoh nyata bagaimana kekayaan alam berupa cadangan mineral, seperti nikel, telah menarik perhatian industri. Namun, aktivitas pertambangan di Morowali juga memberikan dampak negatif terhadap lingkungan (Tunggala *et al.*, 2024).

Penggundulan hutan dan rusaknya ekosistem sekitar yang sudah mencapai tingkat yang mengkhawatirkan merupakan salah satu dampak kerusakan lingkungan akibat aktivitas pertambangan di Morowali (Tunggala *et al.*, 2024). Hal ini dapat terjadi karena proses penambangan dilakukan dengan cara mengambil bahan galian dari lapisan bumi sehingga akan berdampak buruk terhadap lingkungan sekitar wilayah penambangan. Pencemaran limbah merupakan dampak utama yang paling sering terjadi dari aktivitas pertambangan yang dapat berdampak negatif pada ekosistem dan memengaruhi kualitas lingkungan (Nurfatimah, 2023). Salah satu bentuk pencemaran yang patut mendapat perhatian adalah pencemaran logam berat yang disebabkan oleh banyaknya lumpur atau tailing hasil aktivitas pertambangan yang seringkali tertinggal tanpa adanya pengelolaan yang baik (Yanti *et al.*, 2024).

Tailing merupakan sisa pengolahan mineral yang juga mengandung logam berat beracun. Endapan residu tailing tersebut dapat menyebabkan tertutupnya suatu ekosistem sehingga mengakibatkan perubahan sifat morfologi, fisik, struktur kimia tanah serta vegetasi yang tumbuh di sana (Yanti *et al.*, 2024). Endapan limbah berupa tailing juga menjadi salah satu faktor yang dapat menyebabkan terbentuknya air limbah asam tambang yang bersifat asam jika terkena air hujan atau badan air tanah (Saptawartono *et al.*, 2024). Pada air dan tanah, limbah air asam tambang dapat menyebabkan penurunan kualitas akibat dari meningkatnya konsentrasi asam dan logam berat sehingga mengganggu



n serta dapat menyebabkan keracunan (Febrianti *et al.*, 2024). Logam berat dianggap sebagai polutan bukan hanya karena di lingkungan, tetapi juga karena mempunyai efek toksik pada diri kadar konsentrasi tertentu (Yanti *et al.*, 2024). Jenis logam beracun sehingga merugikan jika melebihi konsentrasi tertentu (Cu), tembaga (Cu), litium (Li), besi (Fe), kromium (Cr) dan logam-

logam berat lainnya (Kurniawan *et al.*, 2022). Kromium (Cr) merupakan salah satu logam berat yang bersifat toksik yang mempunyai dampak negatif terhadap organisme seperti dapat menyebabkan penyakit kanker, gangguan sistem imun, gangguan sistem syaraf, kerusakan ginjal, mempengaruhi gula darah, dan gangguan saluran pernafasan (Azizah *et al.*, 2022).

Seiring perkembangan zaman, telah banyak teknik yang telah digunakan untuk mengatasi pencemaran logam berat, namun yang secara umum teknik tersebut dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori utama yaitu fisik, kimia, dan biologi. Diantara ketiga metode tersebut, metode biologis yaitu bioremediasi dianggap sebagai metode yang paling ekonomis dan ramah lingkungan karena menggunakan organisme hidup untuk menghilangkan logam berat berbahaya dari lingkungan yang tercemar tanpa menimbulkan dampak negatif lainnya (Leka dan Nasution, 2024). Bioremediasi merupakan teknik yang dalam proses untuk memurnikan lingkungan dan membuang bahan-bahan yang tercemar dengan melibatkan penggunaan bakteri, alga, jamur, dan ragi (Bala *et al.*, 2022). Melalui proses metabolisme mikroba, kontaminan di lingkungan yang tercemar diubah menjadi produk yang tidak berbahaya melalui proses seperti mineralisasi, produksi karbon dioksida, atau konversi menjadi biomassa sebagai hasil (Terna *et al.*, 2024).

Bakteri dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi logam berat karena mereka memiliki mekanisme resistensi terhadap suatu logam berat. Kemampuan bakteri tahan terhadap suatu logam berat karena adanya proses biosorpsi dan proses bioakumulasi. Proses biosorpsi merupakan proses bakteri akan menyerap logam berat secara pasif sehingga logam tersebut tidak akan merusak struktur dari suatu sel bakteri dan proses bioakumulasi merupakan proses secara aktif yang dimana bakteri akan melakukan akumulasi logam yang dapat merusak struktur suatu sel bakteri (Arifuddin dan Banna, 2021). Pada proses biosorpsi bakteri mampu menghasilkan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) yang merupakan kelompok polimer yang terhidrasi. EPS yang dihasilkan oleh bakteri memiliki berbagai macam jenis seperti karbohidrat, protein, hingga asam nukleat yang digunakannya untuk perlindungan terhadap bahaya lingkungan (Adeniran *et al.*, 2024). EPS bertindak sebagai agen yang memfasilitasi penyerapan ion kromium dari matriks tanah, kompleksasi dalam meningkatkan proses penyerapan dan resistensi kromium oleh bakteri (Fardami dan Abdullahi, 2024). Berdasarkan permasalahan yang telah diuraikan sebelumnya, maka dilakukan penelitian tentang isolasi dan uji resistensi bakteri pengakumulasi logam berat kromium (Cr) dari tanah tambang Morowali untuk mengurangi dampak terhadap pencemaran logam berat kromium (Cr).



i tujuan sebagai berikut :

isolat bakteri pengakumulasi logam berat kromium (Cr) pada
tambang Morowali

konsentrasi pertumbuhan optimal bakteri pengakumulasi logam
n (Cr) sebagai agen bioremediasi

1.3 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bakteri yang berpotensi sebagai agen bioremediasi logam berat kromium (Cr) dan memberikan solusi penanganan pencemaran lingkungan oleh kromium (Cr) dengan cara yang efisien dan murah dengan memanfaatkan isolat dari tanah tambang Morowali.

1.4 Teori

1.4.1 Pencemaran Logam Berat

Salah satu sumber daya alam yang dimiliki Indonesia adalah kekayaan alam hasil industri pertambangannya. Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam dalam bentuk bahan baku tambang (Setuawan dan Fitri, 2024). Penambangan adalah kegiatan yang dilakukan oleh perusahaan pertambangan dalam upaya untuk memproduksi mineral, batu bara, dan mineral terkait lainnya (Widyaningrum dan Hamidi, 2024). Bijih besi, emas, perak, tembaga, minyak bumi, gas alam, batu bara, dan lain-lain yang melimpah di seluruh wilayah merupakan bentuk potensi sumber daya alam Indonesia di bidang pertambangan. Bahan baku hasil dari galian tambang menjadi sumber komoditi yang memiliki nilai tinggi dan berharga sehingga menjadikan Indonesia sebagai tujuan para investor baik dalam ataupun luar negeri dalam melakukan penanaman modal (Setuawan dan Fitri, 2024).

Kegiatan pertambangan dapat menyebabkan kerusakan lingkungan yang serius, seperti penggundulan hutan, erosi tanah, serta pencemaran air dan udara. Pembuangan limbah pertambangan dapat mengakibatkan kerusakan ekosistem dan potensi bahaya bagi kesehatan manusia serta dapat mencemari sungai dan sumber air setempat. Pertambangan di Indonesia, khususnya di Morowali, Sulawesi Tengah, merupakan salah satu sentral penting dalam industri nikel, namun aktivitas penambangan ini juga memberikan dampak negatif terhadap lingkungan sekitar wilayah penambangan (Tunggala *et al.*, 2024). Setiap tahun selalu muncul pertanyaan tentang ke mana limbah akan dibuang dan bagaimana proses pengelolaan limbah tersebut saat adanya rencana penambahan fasilitas pengolahan hasil tambang baru (Syarifuddin, 2022).

Fenomena-fenomena kerusakan lingkungan merupakan akibat dari aktivitas manusia yang lebih menonjolkan pentingnya antroposentrisme yaitu memenuhi kebutuhan manusia dibandingkan untuk mengutamakan kualitas lingkungan sehingga berujung pada banyaknya pencemaran lingkungan yang terjadi belakangan ini (Salsabila *et al.*, 2024). Pencemaran lingkungan hidup diatur dalam

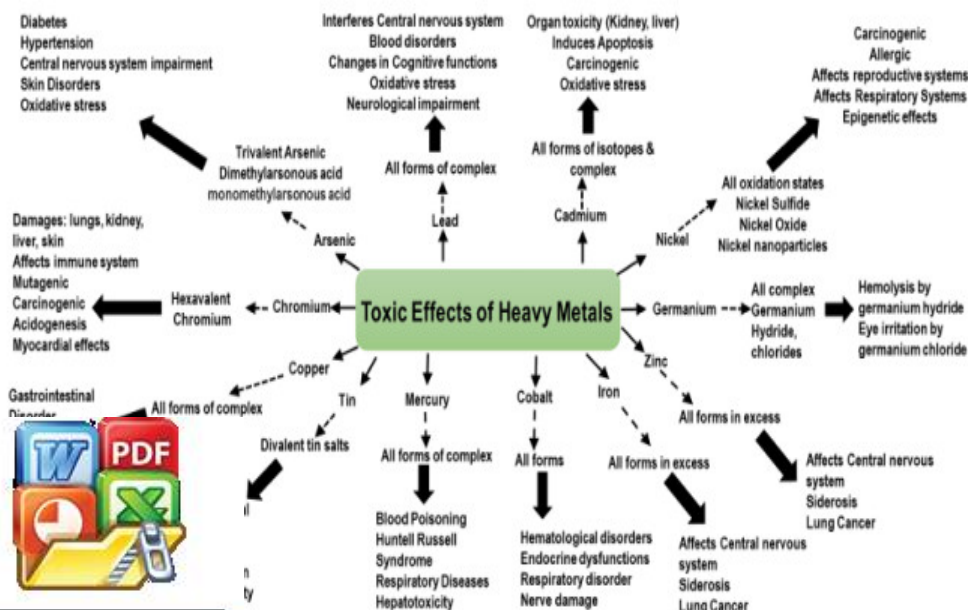
Undang-Undang Nomor 32 Tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 angka 14 yang mendefinisikan pencemaran lingkungan hidup yaitu masuk atau timbul di lingkungan hidup zat, energi, atau komponen lain ke dalam lingkungan hidup manusia sehingga melampaui baku mutu lingkungan hidup yang ditetapkan menurut peraturan (Ushudi, 2023). Salah satu kontaminan yang dapat menyebabkan pencemaran sehingga mempengaruhi kualitas lingkungan adalah



logam berat. Istilah logam berat mengacu pada sekelompok unsur logam yang memiliki massa jenis lebih dari 5 gr/cm^3 dan dapat membahayakan lingkungan pada konsentrasi tertentu karena dapat berubah menjadi racun (Juharna *et al.*, 2022).

Logam berat umumnya memiliki sifat yang beracun dan sulit larut dalam air sehingga cenderung akan menimbulkan pencemaran (Afifudin *et al.*, 2024). Logam berat tetap diklasifikasikan sebagai logam karena memiliki kriteria yang sama dengan logam lainnya. Perbedaannya logam berat dengan logam lainnya terletak pada efek yang akan terjadi ketika logam-logam tersebut dimasukkan atau diberikan ke dalam tubuh organisme hidup (Andira *et al.*, 2024). Pencemaran logam berat mempunyai jenis dan sifat yang berbeda-beda tergantung dari ion logam yang bersangkutan (Juharna *et al.*, 2022). Pada konteks bidang ilmu biologi dan kesehatan manusia, logam berat dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama yaitu logam berat esensial dan non esensial (Mauludi *et al.*, 2024).

Logam berat esensial merupakan unsur yang dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk menjalankan fungsi fisiologis dan biokimia normal, seperti besi (Fe), seng (Zn) dan tembaga (Cu). Sebaliknya, logam berat non-esensial merupakan unsur yang tidak memiliki manfaat dalam menjalankan fungsi biologis dan seringkali bersifat toksik meskipun dalam konsentrasi rendah, seperti timbal (Pb), merkuri (Hg), dan kadmium (Cd). Jenis logam berat yang paling banyak berperan dalam mencemari lingkungan antara lain merkuri (Hg), kadmium (Cd), arsen (As), kromium (Cr), nikel (Ni), tembaga (Cu) dan timbal (Pb) (Mauludi *et al.*, 2024). Polutan-polutan logam berat tersebut memiliki dampak buruk terhadap pertumbuhan dan perkembangan serta kesehatan tumbuhan, hewan, dan manusia seperti yang terlihat pada **Gambar 1** (Jeyakumar *et al.*, 2023; Ma'rifah *et al.*, 2024).



1. Toksisitas logam berat (Jeyakumar *et al.*, 2023)

1.4.1.1 Kromium (Cr)

Kromium (Cr) merupakan salah satu jenis logam berat pencemar yang memiliki sifat toksik, sulit terdegradasi secara alami, persisten, dan juga mempunyai sifat bioakumulatif (Aisy, 2024). Menurut konteks kimia, logam berat kromium merupakan unsur logam dari golongan 3 sampai 16 periode 4 atau lebih pada tabel periodik unsur. Kromium adalah logam transisi yang berada dalam golongan VI B dan terdapat pada baris pertama tabel periodik dengan sifat-sifat antara lain nomor atomnya 24, beratnya 52 g/mol, berat jenisnya 7,19 g/cm³, titik lelehnya 1875 °C, dan titik didihnya 2665 M (Handayanto *et al.*, 2017). Kromium (Cr) merupakan logam berat yang terdaftar sebagai polutan prioritas oleh US EPA (*United State Environmental Protection Agency*) (Suparman dan Retnaningrum, 2023).

Kromium (Cr) adalah logam berat yang memiliki sifat sangat beracun jika sedikit saja melebihi konsentrasi tertentu dan dapat menimbulkan efek negatif terhadap lingkungan sehingga akan meningkatkan risiko bagi kehidupan suatu organisme. Menurut US EPA tingkat kontaminan maksimum (*Maximum Contaminant Level* (MCL)) untuk logam kromium yang aman dikonsumsi dalam air minum yaitu hanya 0.1 ppm (Suparman dan Retnaningrum, 2023). Kromium mampu masuk dan mencemari lingkungan terutama air tanah dengan mekanisme ketika air limbah yang mengandung logam kromium merembes dan terserap ke air tanah akan menyebabkan air tanah tersebut tercemar. Namun, selain bersifat toksik kromium juga dibutuhkan oleh tubuh manusia untuk menjalankan beberapa fungsi fisiologis dan biokimia tubuh. Kromium merupakan mikronutrien esensial yang dibutuhkan tubuh manusia pada konsentrasi yang rendah, namun jika dalam konsentrasi yang tinggi akan menimbulkan berbagai dampak negatif sehingga akan berbahaya bagi kesehatan (Chamidah *et al.*, 2023).

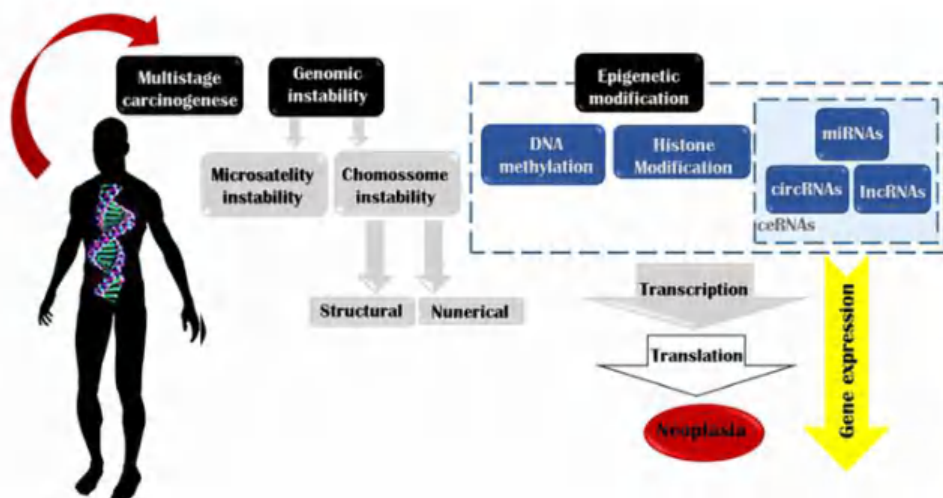
Kromium diklasifikasikan menjadi beberapa jenis berdasarkan bilangan oksidasinya, yaitu berkisar antara -2 hingga +6. Kromium yang sering kali terdapat di alam adalah kromium dengan bilangan oksidasi 2+, 3+, dan 6+, ketiga kromium tersebut memiliki masing-masing sifat yang berbeda satu sama lain. Cr²⁺ memiliki sifat basa dan Cr³⁺ memiliki sifat amfoter. Sifat amfoter merupakan sifat yang jika ada senyawa yang asam maka ia akan bersifat basa dan jika ada senyawa yang bersifat basa maka ia akan bersifat asam. Selain Cr²⁺ dan Cr³⁺ terdapat pula Cr⁶⁺ yang memiliki sifat lebih asam dibandingkan kedua kromium tersebut. Kromium dengan bilangan oksidasi Cr³⁺ dan Cr⁶⁺ merupakan bentuk kromium yang paling stabil dan juga terdeteksi sebagai polutan lingkungan yang berasal dari berbagai aktivitas industri (Rimanti *et al.*, 2024). Di antara ketiga bentuk kromium tersebut, kromium heksavalen (Cr⁶⁺) merupakan bentuk ionik yang memiliki sifat paling berbahaya dari kromium oksidasi lainnya (Kurniawan dan Mulyanto, 2023).



heksavalen terbentuk dari mekanisme dimana senyawa kromium trivalen yang memiliki sifat yang stabil dan aman di lingkungan akan teroksidasi menjadi kromium heksavalen dalam kondisi asam. Perubahan tersebut terjadi dari lingkungan sekitar dan jika telah berubah menjadi kromium heksavalen memiliki sifat yang 100 kali lebih beracun dibandingkan kromium trivalen. Kromium trivalen teroksidasi menjadi kromium heksavalen dengan bantuan asam hidrogen (H⁺) yang turut berpartisipasi dalam reaksi oksidasi

dalam lingkungan asam (Kurniawan dan Mulyanto, 2023). Toksisitas logam berat kromium dapat mempengaruhi berbagai organisme baik itu manusia, hewan, dan tumbuhan. Sifat beracun kromium khusus pada manusia dapat menyebabkan permasalahan keracunan akut maupun kronis. Selain itu, kemampuan kromium untuk mengikat oksigen melalui proses oksidasinya sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada suatu sel darah (Chamidah *et al.*, 2023).

Logam kromium tergolong karsinogen karena dapat menghambat aktivitas enzim benzopyrene hydroxylase sehingga menyebabkan melambatnya pertumbuhan sel tubuh sehingga menyebabkan sel tumbuh tidak terkendali (liar) dan kemudian menyebabkan kanker (Chamidah *et al.*, 2023). Proses karsinogenik dibagi menjadi tiga tahap: inisiasi, penyebaran, dan perkembangan. DNA dapat diubah oleh kerusakan pada protein dan membran sel yang disebabkan oleh stres oksidatif dan ROS (Murthy *et al.*, 2023). *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah suatu senyawa yang mengandung oksigen yang bersifat reaktif sehingga mudah untuk membentuk suatu senyawa baru dengan mekanisme saling berikatan dengan molekul lain yang berada di sekitarnya (Hikmah *et al.*, 2021). Munculnya sel kanker pada stadium lanjut akan meningkatkan jumlah mutasi DNA, menyebabkan tingkat protein mutan yang jauh lebih tinggi, sehingga menyebabkan stres proteotoksik seperti yang terlihat pada **Gambar 2** (Murthy *et al.*, 2023).



Gambar 2. Dampak paparan kromium terhadap manusia (Murthy *et al.*, 2023)

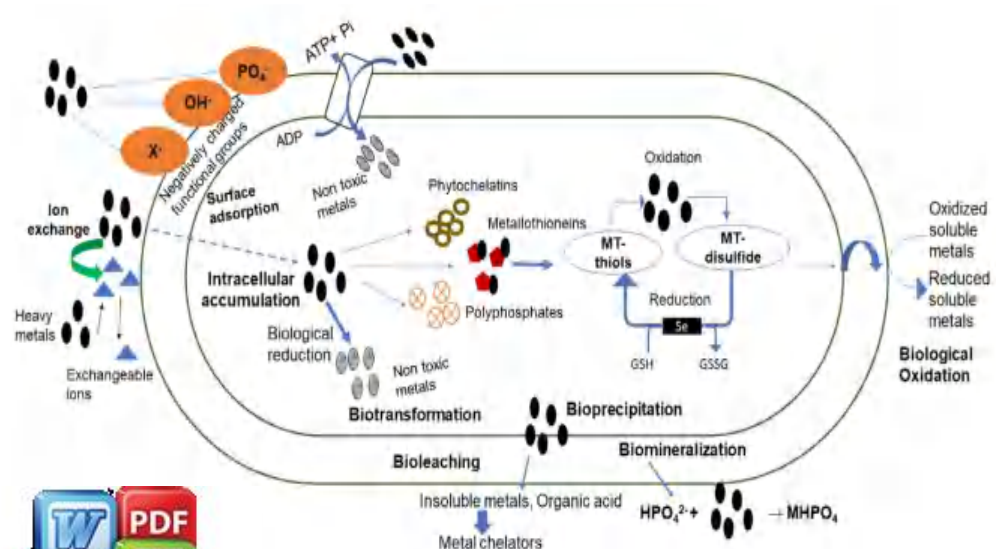


Kromium pada manusia juga dapat berdampak pada saluran pernapasan dan perforasi dan ulserasi septum, bronkitis, penurunan fungsi a, serta hidung gatal dan nyeri. Selain berpengaruh terhadap juga memberikan efek negatif terhadap hewan dan tumbuhan. ering ditemukan terjadi kerusakan pada bagian insang ikan dan kibat dari ketidakseimbangan kadar ion yang terdapat di dalam an bentuk dampak negatif yang diakibatkan efek racun dari yang mencemari lingkungan perairan. Selain itu, pada

tumbuhan tanda-tanda keracunan kromium heksavalen dapat diamati dengan kualitas pertumbuhan dan perkembangannya yang terhambat. Gejala lainnya dari keracunan kromium heksavalen tersebut adalah pertumbuhan daun terhambat, ujung dan tepi daun berwarna coklat, daun mengalami kekeringan, menguning dan terjadi nekrosis (Kurniawan dan Mulyanto, 2023).

1.4.2 Mekanisme Resistensi Bakteri Terhadap Kromium

Biostimulasi merupakan salah satu metode dalam proses bioremediasi dengan menggunakan bakteri yang ditumbuhkan pada bahan kontaminan yang kemudian dilakukan perbanyakan dan pertumbuhan. Bakteri yang ditumbuhkan juga akan dimodifikasi dari aspek aktivitas metabolismenya yang dipercepat dengan melakukan proses penambahan nutrisi yang cukup, misalnya dengan menambahkan sumber nitrogen dan fosfor untuk mendorong pertumbuhan mikroba yang ditargetkan. Pada saat metode berlangsung jika jumlah bakteri yang ada sangat sedikit, bakteri tambahan perlu ditambahkan hingga rata-rata jumlah mikroorganisme mencapai 10^3 CFU/gram bahan yang telah terkontaminasi agar pengolahan secara biologis dapat dimulai (Wignyanto, 2020). Pada proses bioremediasi, mikroorganisme sangat sering digunakan sebagai sarana untuk menghilangkan zat berbahaya berupa polutan dari lingkungan dengan mengubahnya menjadi produk yang tidak berbahaya melalui berbagai proses seperti mineralisasi dan produksi karbon dioksida atau mengubahnya kembali menjadi biomassa sebagai hasil seperti yang terlihat pada **Gambar 3** (Jeyakumar *et al.*, 2023; Terna *et al.*, 2024).



nisme mikroorganisme dalam proses bioremediasi polutan pencemar (Jeyakumar *et al.*, 2023)

manfaatnya sebagai agen bioremediasi logam berat karena mekanisme resistensi terhadap suatu logam berat. Kemampuan

bakteri tahan terhadap suatu logam berat karena adanya proses biosorpsi dan proses bioakumulasi. Proses biosorpsi merupakan proses bakteri akan menyerap logam berat secara pasif sehingga logam tersebut tidak akan merusak struktur dari suatu sel bakteri, dan proses bioakumulasi merupakan proses secara aktif yang dimana bakteri akan melakukan akumulasi logam yang dapat merusak struktur suatu sel bakteri (Arifuddin dan Banna, 2021). Pada proses biosorpsi bakteri mampu menghasilkan senyawa eksopolisakarida (EPS) yang merupakan kelompok polimer yang terhidrasi (Adeniran *et al.*, 2024).

EPS yang dihasilkan oleh bakteri memiliki berbagai macam jenis seperti karbohidrat, protein, hingga asam nukleat yang digunakannya untuk perlindungan terhadap bahaya lingkungan (Adeniran *et al.*, 2024). Sekuestrasi logam secara sekuestrasi fisik ekstraseluler dilakukan oleh bakteri dengan memanfaatkan senyawa EPS (Adeniran *et al.*, 2024). Zat polimer ekstraseluler (EPS) atau eksopolisakarida yang dihasilkan oleh bakteri mengandung ligan yang mampu membentuk kompleks stabil dengan ion kromium. Senyawa EPS ini bertindak sebagai agen pengikat, memfasilitasi penyerapan ion kromium dari matriks tanah, kompleksasi dalam meningkatkan penyerapan dan resistensi oleh bakteri (Fardami dan Abdullahi, 2024).

Peran utama EPS dalam lingkungan mikroba adalah untuk melekatkan molekul bermuatan berlawanan melalui gaya tarik elektrostatis menggunakan gaya *Van der Waal* atau ikatan kovalen untuk menstabilkan kompleks. Hal ini penting dalam membangun sifat aktif permukaan yang bertanggung jawab untuk perlekatan melalui jembatan polimer ke molekul bermuatan berlawanan. Daya tarik molekul cair ke permukaan padat atau adsorpsi merupakan prinsip umum yang digunakan oleh EPS untuk menghilangkan ion logam dari air limbah karena tersedianya gugus fungsi yang berbeda seperti hidroksil, karboksil, dan amina. Dominasi gugus fungsi hidroksil dan karboksil membuat EPS menjadi bermuatan negatif yang merupakan alasan utama EPS memiliki afinitas yang tinggi terhadap molekul bermuatan positif seperti ion logam di lingkungan yang tercemar oleh suatu polutan (Adeniran *et al.*, 2024). Selain itu, reduksi Cr (VI) yang beracun menjadi Cr(III) yang kurang beracun juga dapat difasilitasi oleh produksi berbagai enzim oleh bakteri (Ramli *et al.*, 2023).

Enzim yang dapat berperan dalam proses reduksi kromium biasanya dilepaskan atau diproduksi oleh bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Bakteri-bakteri tersebut diklasifikasikan menjadi dua kelompok berdasarkan jalur reduksinya. Kelompok enzim pertama didominasi oleh enzim reduktase kromium seperti *Chr*, *NemA*, *YieF* dan lain-lain, sedangkan kelompok enzim kedua yang umumnya terlibat dalam jalur nitroreduktase meliputi *YcnD*, *NfsA*, *Nfs* dan lain sebagainya. Kromium reduktase dalam mekanismenya dapat mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) yang terjadi di sitoplasma dan membran sel, akan tetapi juga dapat terjadi di luar organel sel. Bakteri mampu melepaskan enzim kromium reduktase yang berfungsi untuk



di dalam maupun di luar sel. Pada mekanisme reduksi, jalur pertahanan dengan jalur kromium reduktase karena dalam masing-masing keduanya jalur memerlukan penginduksi yang aktifkan reaksi agar terjadi proses reduksi (Ramli *et al.*, 2023).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Januari hingga Februari 2025 di Laboratorium Mikrobiologi untuk isolasi dan karakterisasi bakteri, Laboratorium Terpadu, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar untuk pengujian *Optical Density* (OD), Laboratorium Kimia dan Kesuburan Tanah, Departemen Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar untuk pengujian CNPK sampel tanah, dan Instalasi Kimia Lingkungan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Kota Makassar untuk pengujian kemampuan akumulasi kromium oleh bakteri.

2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, cawan petri, batang pengaduk, kuvet, labu semprot, spatula, batang pengaduk, sendok tanduk, gegep kayu, *object glass*, ose bulat, bunsen, rak tabung, pinset, masker, *handscoon*, korek api, kamera, botol sampel, aluminium foil, *cling wrap*, kapas, tissue, kasa, spoit, gunting, timbangan analitik digital, mikroskop binokuler, mikroskop stereo, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, autoklaf, *incubator shaker*, *hot plate*, Spektrofotometer UV-Vis, Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

2.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel tanah tambang Morowali, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *lactosa broth* (LB), *congo red*, kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), asam sulfanilat (H_2SO_4), asam klorida (HCl 25%), *cristal violet*, JKJ, alkohol-aseton, akuades, alkohol 70%, dan spiritus.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sampel yang telah tersedia dari tanah pertambangan Morowali. Sampel tanah di ambil dengan menggunakan sendok kemudian dimasukkan ke dalam botol sampel dan selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan perlakuan pengujian.

2.4.2 Sterilisasi Alat



Alat yang digunakan disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat yang terbuat dari logam disterilkan dengan cara direbus dalam air mendidih selama 15 menit. Alat-alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan cara direbus dalam air mendidih selama 15 menit. Alat-alat yang terbuat dari gelas disterilkan dengan cara direbus dalam air mendidih selama 15 menit. Alat yang terbuat dari non gelas yang memiliki permukaan halus disterilkan dalam autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Untuk sterilisasi jarum ose dan pinset dilakukan dengan cara direbus dalam air mendidih selama 15 menit.

dengan cara mencelupkan ke dalam alkohol 70% dan dilakukan pemijaran menggunakan nyala api bunsen.

2.4.3 Identifikasi Kandungan Unsur Hara Tanah

Analisis Kandungan Karbon (C). Sampel tanah yang telah dikeringkan, kemudian diayak. Sampel tanah selanjutnya ditimbang sebanyak 0,500 g dengan ukuran <0,5 mm, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Sampel tanah selanjutnya ditambahkan sebanyak 5 ml $K_2Cr_2O_7$ 1 N, lalu dihomogenkan. Sampel kembali ditambahkan sebanyak 7,5 ml H_2SO_4 pekat, lalu dihomogenkan dan diaduk selama 30 menit. Sampel kemudian dilakukan pengenceran dengan air bebas ion, biarkan dingin dan diimpitkan. Sampel yang telah didiamkan selama semalam akan diukur absorbansi larutan jernih dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 561 nm. Sebagai pembanding dibuat standar 0 dan 250 ppm, dengan memipet 0 dan 5 ml larutan standar 5.000 ppm ke dalam labu ukur 100 ml dengan perlakuan yang sama dengan pengerjaan.

Analisis Kandungan Nitrogen (N). Analisis ini dilakukan dengan menggunakan metode Kjeldahl. Sampel tanah yang telah dikeringkan, kemudian diayak. Sampel tanah selanjutnya ditimbang 0,500 g dengan ukuran <0,5 mm, lalu dimasukan ke dalam tabung digest. Sampel tanah ditambahkan 1 g campuran selen dan 3 ml asam sulfat pekat, kemudian didestruksi hingga suhu $350^\circ C$ selama 3-4 jam. Jika tahap destruksi telah selesai ditandai dengan keluar uap putih dan didapat ekstrak jernih. Tabung diangkat dan didinginkan, selanjutnya ekstrak diencerkan dengan air bebas ion hingga tepat 50 ml. Ekstrak dihomogenkan dan dibiarkan semalam agar partikel mengendap. Setelah didiamkan semalam, ekstrak dipipet ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 2 ml. Ekstrak sampel selanjutnya ditambahkan berturut-turut larutan Sangga Tartrat dan Na-fenat masing-masing sebanyak 4 ml, kemudian dihomogenkan dan dibiarkan selama 10 menit. Ekstrak tersebut kemudian ditambahkan 4 ml $NaOCl$ 5 %, dihomogenkan dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 636 nm setelah 10 menit sejak pemberian pereaksi.

Analisis Kandungan Fosfor (P). Analisis ini dilakukan dengan menggunakan metode Olsen. Sampel tanah yang telah dikeringkan, kemudian diayak. Sampel tanah selanjutnya ditimbang 1,000 g dengan ukuran <2 mm, lalu dimasukkan ke dalam botol. Sampel tanah selanjutnya ditambah 20 ml pengeksrak Olsen dan kemudian dihomogenkan selama 30 menit. Sampel kemudian disaring dan bila larutan keruh dikembalikan lagi ke atas saringan semula. Ekstrak sampel yang diperoleh selanjutnya dipipet sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung dian kembali ditambahkan sebanyak 10 ml pereaksi pewarna homogenkan dan biarkan 30 menit. Ekstrak sampel, selanjutnya n absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada 93 nm.

Kandungan Kalium (K). Sampel tanah yang telah dikeringkan, sampel tanah selanjutnya ditimbang sebanyak 2,000 g dengan



ukuran <2 mm, lalu dimasukkan ke dalam botol dan di homogenkan. Setelah itu ditambahkan 10 ml HCl 25% dan di homogenkan lagi dengan mesin selama 5 jam. Sampel yang telah dihomogenkan selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dibiarkan semalam sambil disentrifuse. Ekstrak jernih yang didapatkan di pipet sebanyak 0,5 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan 9,5 ml air bebas ion yang telah dilakukan pengenceran 20 kali dan dihomogenkan. Ekstrak yang telah diencerkan dan dihomogenkan selanjutnya di pipet sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml larutan pereaksi pewarna P dan dikocok. Campuran ekstrak dan pereaksi dibiarkan selama 30 menit, lalu ukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 889 nm. Untuk kalium, ekstrak contoh encer dan deret standar K diukur langsung dengan SSA secara emisi.

2.4.4 Pembuatan Media Pertumbuhan

Media Nutrien Agar (NA). Pembuatan media *Nutrient Agar* dilakukan dengan cara menimbang 2,8 gram NA kemudian dilarutkan dengan menggunakan akuades 100 ml didalam erlenmeyer lalu dipanaskan dengan bantuan hot plate kemudian aduk sampai semuanya terlarut secara sempurna dan larutan media menjadi berwarna bening, kemudian tutup erlenmeyer dengan menggunakan kapas. Proses sterilisasi dapat dilakukan dengan menggunakan autoklaf selama kurang lebih 15 menit dengan tekanan 2 atm pada suhu 121°C. setelah suhu turun menjadi 60°C tuangkan secara aseptis ke dalam cawan petri yang sebelumnya sudah disterilkan sebanyak kurang lebih 20 ml.

Media Nutrien Broth (NB). Pembuatan media *Nutrient Broth* dilakukan dengan cara menimbang 0,8 gram NB kemudian dilarutkan dengan menggunakan akuades 100 ml didalam erlenmeyer lalu dipanaskan dengan bantuan hot plate kemudian aduk sampai semuanya terlarut secara sempurna dan larutan media menjadi berwarna bening, kemudian tutup erlenmeyer dengan menggunakan kapas. Proses sterilisasi dapat dilakukan dengan menggunakan autoklaf selama kurang lebih 15 menit dengan tekanan 2 atm pada suhu 121°C. setelah suhu turun menjadi 60°C tuangkan secara aseptis ke dalam cawan petri yang sebelumnya sudah disterilkan sebanyak kurang lebih 20 ml.

Media Congo Red Agar (CRA). Pembuatan media *Congo Red Agar* (CRA) dilakukan dengan menggunakan campuran media Lactosa Broth, sukrosa, bubuk agar, dan pewarna merah congo. Masing-masing komponen media ditimbang dengan komposisi yang berbeda yaitu LB sebanyak 3 gram, sukrosa 3,6 gram, agar 1,8 gram, dan pewarna congo red 0,08 gram. Media LB, sukrosa dan bubuk agar aduk dengan menggunakan akuades sebanyak 100 mL dan dididihkan dengan *hot plate* hingga berwarna merah Congo ditempatkan pada wadah tersendiri dan dipisahkan dengan larutan media agar. Pewarna merah congo ditambahkan ke media agar setelah selesai diautoklaf dan suhu larutan media sudah tercampur dengan pewarna merah congo, media agar dituangkan ke dalam cawan petri steril.



2.4.5 Total Plate Count (TPC) Bakteri Tanah Tambang Morowali

Isolasi bakteri dilakukan dengan teknik pengenceran bertingkat 10^{-4} . Pengenceran bertingkat diawali dengan mengambil sampel dan ditimbang sebanyak 1 gr. Sampel kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan akuades sebanyak 9 ml dan dihomogenkan, pada tahapan ini merupakan pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya ambil 1 ml dari tabung pengenceran 10^{-1} dan dipindahkan kedalam tabung reaksi berikutnya yang berisi sebanyak 9 ml akuades dan dihomogenkan, pada tahapan merupakan pengenceran 10^{-2} . Kemudian, diambil kembali 1 ml dari tabung pengenceran 10^{-2} dan dipindahkan kedalam tabung reaksi berikutnya yang berisi sebanyak 9 ml akuades dan dihomogenkan, pada tahapan merupakan pengenceran 10^{-3} , dan dilakukan hingga pengenceran 10^{-4} .

Sampel yang telah dilakukan pengenceran bertingkat kemudian diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan pada permukaan media *Nutrient Agar* (NA) dengan teknik tuang (*pour plate*). Setelah itu, cawan petri direkatkan dengan cling wrap dan kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam pada inkubator dengan posisi cawan petri terbalik. Hasil inkubasi sampel kemudian dilakukan perhitungan total koloni bakteri dengan menggunakan metode *Standart Plate Count*. Perhitungan tersebut dihitung dengan persamaan sebagai berikut :

$$\text{TPC} = \text{Jumlah Koloni Bakteri} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

2.4.6 Isolasi Bakteri Tahan Logam Berat Kromium (Cr)

Ketahanan bakteri terhadap logam berat kromium (Cr) dilakukan dengan menggunakan kultur bakteri yang telah dibuat. Isolasi bakteri pengakumulasi krom (Cr) dilakukan dengan media *Nutrient Agar* (NA) yang telah diperkaya dengan kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Isolasi diawali dengan media *Nutrient Agar* (NA) ditambahkan $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sebanyak 0,002 mg (2 ppm) dan dituang ke dalam cawan petri. Setelah media memadat, kultur bakteri kemudian diinokulasi menggunakan ose bulat dan digores pada cawan yang berisi media NA dengan metode *streak plate*. Kemudian, cawan petri direkatkan dengan cling wrap dan kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam pada inkubator dengan posisi cawan petri terbalik.

2.4.7 Pemurnian Isolat Bakteri

Koloni bakteri yang tumbuh pada media NA dilakukan pemurnian dengan menggunakan media NA kembali sebanyak dua kali. Pemurnian dilakukan dengan mengambil koloni bakteri yang tumbuh secara terpisah atau koloni tunggal. Koloni



okulasi menggunakan ose bulat dan digores pada cawan yang dengan metode *streak plate*. Setelah itu, cawan petri direkatkan an kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 dengan posisi cawan petri terbalik. Tahapan pemurnian kedua ang sama pada pemurnian pertama.

2.4.8 Pembuatan Kultur Bakteri

Pembuatan kultur bakteri dilakukan menggunakan hasil pemurnian dengan menggunakan media NA miring di dalam tabung reaksi. Koloni bakteri dikultur dengan menggunakan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam pada inkubator.

2.4.9 Karakterisasi Bakteri

Pengamatan Morfologi Koloni. Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, tepian, dan elevasi dari koloni bakteri murni. Koloni bakteri yang diamati berasal dari isolat bakteri yang sebelumnya telah ditumbuhkan menggunakan ose dan diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan teknik gores kuadran (*quadran streak*).

Pengamatan Morfologi Sel. Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan menggunakan teknik pewarnaan Gram. Teknik pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati bentuk dan sifat isolat, bakteri gram positif ditandai dengan sel bakteri berwarna ungu dan bakteri gram negatif ditandai dengan sel bakteri berwarna merah. Pewarnaan Gram dimulai dengan membuat ulasan yang berasal dari isolat yang kemudian ditetaskan akuades dan dilakukan fiksasi diatas nyala api bunsen. Isolat yang telah difiksasi kemudian ditetaskan larutan *cristal violet* sebanyak 2-4 tetes dan didiamkan selama 60 detik. Setelah 60 detik, dilakukan pembilasan dengan akuades hingga larutan *cristal violet* meluruh dan dikeringkan secara perlahan menggunakan *tissue*. Kemudian, ulasan ditetesi larutan JKJ sebanyak 2-4 tetes dan didiamkan selama 60 detik. Setelah 60 detik, dilakukan pembilasan dengan akuades hingga larutan JKJ meluruh dan dikeringkan secara perlahan menggunakan *tissue*. Selanjutnya, ulasan ditetesi larutan alkohol-aseton sebanyak 2-4 tetes dan didiamkan selama 30 detik. Setelah 30 detik, dilakukan pembilasan dengan akuades hingga larutan alkohol-aseton meluruh dan dikeringkan secara perlahan menggunakan *tissue*. Kemudian, ditetaskan larutan safranin sebanyak 2-4 tetes dan didiamkan selama 30 detik. Setelah 30 detik, dilakukan pembilasan dengan akuades hingga larutan safranin meluruh dan dikeringkan secara perlahan menggunakan *tissue*. Setelah ditetesi larutan safranin sebagai indikator warna terakhir, ulasan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi.

2.4.10 Uji Pembentukan Slime Bakteri

Uji pembentukan slime bakteri dilakukan dengan menggunakan Metode *Congo Red Agar* (CRA). Kultur bakteri yang memiliki kemampuan mengakumulasi kromium ke media CRA dalam cawan petri dengan metode *streak plate* selama 2x24 jam pada suhu 37° C pada kondisi aerobik. Kualitasitatif diukur berdasarkan warna koloni bakteri yang tumbuh interpretasi hasil dilakukan dengan ketentuan yang meliputi strain warna hitam pekat, hitam, dan hitam kemerahan dianggap sedangkan koloni merah dan kemerahan diklasifikasikan produksi slime.



2.4.11 Uji Resistensi Bakteri Terhadap Kromium (Cr)

Pengujian resistensi bakteri terhadap kromium (Cr) dilakukan beberapa konsentrasi kromium dengan menggunakan metode turbidimetri. Isolat murni yang telah didapatkan selanjutnya diinokulasikan pada media *Nutrient Broth* (NB) yang telah diperkaya dengan kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$). $K_2Cr_2O_7$ yang digunakan memiliki konsentrasi yang berbeda yaitu 0 ppm, 5 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 35 ppm, dan 50 ppm. Masing-masing medium yang telah diperkaya selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 25 mL. Isolat murni kemudian disuspensikan kedalam tabung reaksi dengan menggunakan spoit sebanyak 1 mL. Tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas dan diinkubasi pada inkubator *shaker* selama 3x24 jam dengan kecepatan 180 rpm untuk melihat ketahanan bakteri terhadap logam berat. Setelah diinkubasi, masing-masing perlakuan dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm untuk mengetahui kepadatan populasi bakteri yang mampu untuk mengakumulasi logam berat kromium.

2.4.12 Uji kemampuan Akumulasi Logam Berat Kromium (Cr) oleh Bakteri

Pengujian kemampuan akumulasi logam berat kromium dilakukan setelah diperoleh bakteri resisten terhadap kromium. Isolat bakteri kemudian diinokulasi kedalam *Nutrient Broth* (NB) yang telah diperkaya dengan konsentrasi kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$) tertinggi yaitu 50 ppm. Kemudian, dilakukan inkubasi selama 3x24 jam dengan menggunakan *incubator shaker* pada suhu 37°C dengan kecepatan 180 rpm. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, dilakukan pengukuran kadar kromium menggunakan *Spektrofotometer Serapan Atom* (SSA) dengan metode Langmuir. Perhitungan tersebut dilakukan dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$Cs = C(a) - C(b)$$

Perhitungan persentase (%) konsentrasi logam berat kromium sesuai dengan persamaan :

$$E (\%) = \frac{Cr_0 - Cr_f}{Cr_0} \times 100\%$$

Keterangan :

E = efisiensi reduksi (%)

Cr₀ = konsentrasi awal kromium (ppm)

i akhir kromium (ppm)



:NPK dan karakterisasi bakteri disajikan dalam bentuk tabel, hasil pengukuran uji akumulasi kromium (Cr) oleh bakteri trofotometer Serapan Atom (SSA) disajikan dalam bentuk