

**BIOREMEDIASI BESI (Fe) OLEH *Bacillus sp.* DARI SEDIMEN
SUNGAI KRUENG ACEH**

TUGAS AKHIR

Diajukan Oleh:

**Cut Taffazani Fithrian Nazla
NIM. 170702053
Mahasiswa Fakultas Sains dan Teknologi
Program Studi Teknik Lingkungan**



**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI AR-RANIRY
BANDA ACEH
2021/1442 H**

LEMBAR PERSETUJUAN

BIOREMEDIASI BESI (Fe) OLEH *Bacillus* sp. DARI SEDIMEN SUNGAI KRUENG ACEH

TUGAS AKHIR

Diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh
Sebagai Beban Studi Memperoleh Gelar Sarjana dalam Ilmu Teknik Lingkungan

Diajukan Oleh:

CUT TAFAZANI FITHRIAN NAZLA
NIM. 170702053

Mahasiswa Fakultas Sains dan Teknologi
Prodi Teknik Lingkungan

Banda Aceh, 21 Juli 2022
Telah Diperiksa dan Disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,


Dr. Abd. Mujahid Hamdan, M.Sc.
NIDN. 2013128901


Syafrina Sari Lubis, M.Si.
NIDN. 2025048003

Mengetahui,
Ketua Program Studi Teknik Lingkungan Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh



Dr. Eng. Nur Aida, M. Si
NIDN. 2016067801

LEMBAR PENGESAHAN

BIOREMEDIASI BESI (Fe) OLEH *Bacillus* sp. DARI SEDIMEN SUNGAI KRUENG ACEH

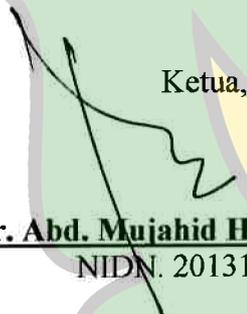
TUGAS AKHIR

Telah Diuji oleh Panitia Ujian Munaqasyah Tugas Akhir
Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh
serta Diterima Sebagai Salah Satu Beban Studi Program Sarjana (S-1)
dalam Ilmu Teknik Lingkungan

Pada Hari/Tanggal: Rabu, 21 Juli 2022
22 Dzulhijjah 1443

Panitia Ujian Munaqasyah Skripsi

Ketua,


Dr. Abd. Mujahid Hamdan, M.Sc.
NIDN. 2013128901

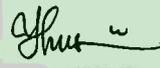
Sekretaris,


Syafrina Sari Lubis, M.Si.
NIDN. 2025048003

Penguji I,


Febrina Arfi, M.Si.
NIDN. 2021028601

Penguji II,


Husnawati Yahya, M.Sc.
NIDN. 2009118301

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh




Dr. Azhar Amsal, M.Pd.
NIDN. 2001066802

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Cut Taffazani Fithrian Nazla
NIM : 170702053
Program Studi : Teknik Lingkungan
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Skripsi : Bioremediasi Besi (Fe) Oleh *Bacillus* sp. dari Sedimen Sungai Krueng Aceh

Dengan ini menyatakan bahwa dalam penelitian skripsi saya ini, saya:

1. Tidak menggunakan ide orang lain tanpa mampu mengembangkan dan mempertanggungjawabkan;
2. Tidak melakukan plagiasi terhadap naskah karya orang lain;
3. Tidak menggunakan karya orang lain tanpa menyebutkan sumber asli atau tanpa izin pemilik karya;
4. Tidak manipulasi dan memalsukan data;
5. Mengerjakan sendiri karya ini dan mampu bertanggungjawab atas karya ini.

Bila dikemudian hari ada tuntutan dari pihak lain atas karya saya, dan telah melalui pembuktian yang dapat dipertanggungjawabkan dan ternyata memang ditemukan bukti bahwa saya melanggar pernyataan ini, maka saya siap dikenai sanksi berdasarkan aturan yang berlaku di Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry Banda Aceh. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan tanpa paksaan dari pihak manapun.

Banda Aceh, 03 Januari 2022

Yang Menyatakan



Cut Taffazani Fithrian Nazla

ABSTRAK

Nama : Cut Taffazani Fithrian Nazla
NIM : 170702053
Program Studi : Teknik Lingkungan
Judul : Bioremediasi Besi (Fe) Oleh *Bacillus* sp. Dari Sedimen Sungai Krueng Aceh
Tanggal Sidang : Kamis, 21 Juli 2022
Jumlah Halaman : 54 Halaman
Pembimbing I : Dr. Abdullah Mujahid Hamdan, M.Sc
Pembimbing II : Syafrina Sari Lubis, M.Si
Kata Kunci : Bioremediasi, Resistensi Logam, *Bacillus* sp.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji resistensi *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh, mengetahui kurva pertumbuhan *Bacillus* sp. dan kemampuan bioremediasi terhadap Fe. Metode penelitian ini bersifat kuantitatif. Isolat *Bacillus* sp. resisten terhadap FeSO_4 dengan konsentrasi 25-75 mg/L. Laju pertumbuhan *Bacillus* sp. pada media NB FeSO_4 50 mg/L memasuki fase lag pada jam ke 0-8, fase log pada jam ke 16-168, fase stasioner pada jam ke 176-360 dan fase kematian pada jam ke 366-400. Sedangkan pada isolat *Bacillus* sp. dengan media NB 0 mg/L FeSO_4 , fase lag terjadi pada jam ke 0-8, fase log terjadi pada jam ke 16-160, fase stasioner pada jam ke 168-312 dan fase kematian terjadi pada jam ke 320-400. Isolat *Bacillus* sp. mempunyai Laju pertumbuhan yang baik terhadap paparan logam besi (Fe) dibandingkan tanpa penambahan logam besi (Fe). Fase pertumbuhan isolat terpanjang dari isolat *Bacillus* sp. terdapat pada fase stasioner dengan konsentrasi logam Fe 50 mg/L pada media cair. Kemampuan bioremediasi isolat *Bacillus* sp. paling tinggi sebesar 88,44% pada konsentrasi 50 mg/L pada pH 4 dengan masa inkubasi 72 jam. Isolat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari Sungai Krueng Aceh merupakan isolat potensial sebagai agen bioremediasi.

Kata Kunci: Bioremediasi, Resistensi, Kurva pertumbuhan, *Bacillus* sp.

ABSTRACT

Name : Cut Taffazani Fithrian Nazla
Student ID : 170702053
Study Program : Environmental Engineering
Title : Bioremediation of Iron (Fe) using *Bacillus* sp. From River Krueng Aceh Sediments.
Defence Date : Kamis, 21 Juli 2022
Number of Page : 54 Halaman
Thesis Advisor I : Dr. Abdullah Mujahid Hamdan, M.Sc
Thesis Advisor II : Syafrina Sari Lubis, M.Si
Keywords : Bioremediasi, Resistensi Logam, *Bacillus* sp.

This study aims to test the resistance of *Bacillus* sp. from the sediments of the Krueng River in Aceh, knowing the growth curve of *Bacillus* sp. and the bioremediation ability to Fe. This research method is quantitative. Isolates of *Bacillus* sp. are resistant to FeSO_4 in a concentrate of 25-75 mg/L. The growth rate of *Bacillus* sp. in NB FeSO_4 media 50 mg/L enters the lag phase at the 0–8th hour, the log phase at the 16–168th hour, the stationary phase at the 176-300 hour 60, and the death phase at the 366-400th hour. In addition, isolates of *Bacillus* sp. with NB media 0 mg/L FeSO_4 , the lag phase occurs at the 0-8th hour, the log phase occurs at the 16-160th hour, the stationary phase at the 168–312th hour, and the death phase occurs at the 320-400th hour. Isolates of *Bacillus* sp. have an increased growth rate against exposure to ferrous metals (Fe) compared to without the addition of ferrous metals (Fe). The growth phase of the longest isolate of *Bacillus* sp. it spotted at the stationary phase with a metal concentration of Fe 50 mg/L in the liquid medium. The bioremediation ability of *Bacillus* sp. isolates was highest at 88.44% at a concentration of 50 mg/L at pH 4 with an incubation period of 72 hours. Isolates of *Bacillus* sp. isolated from the Krueng River in Aceh are potential isolates as bioremediation agents

Keyword: *Bioremediation, Resistance, Growth Curve, Bacillus* sp.

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Segala puji hanya milik Allah Subhanahu Wa Ta'ala yang telah melimpahkan segala karunia nya yang tak terhingga, khususnya nikmat Iman dan Islam, yang dengan keduanya diperoleh kebahagiaan dunia dan akhirat. Shalawat dan Salam semoga selalu tercurah kepada Nabi Muhammad Shalallahu'alaihiwassalam, dan atas keluarga dan sahabat beliau serta orang-orang yang mengikuti jejak langkah mereka itu hingga akhir zaman.

Dengan mengucapkan rasa syukur kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala, tugas akhir ini telah dapat saya selesaikan, dengan judul yang telah ditentukan. Untuk itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada:

1. Dr. Azhar, M.Pd. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknik Lingkungan.
2. Dr. Eng. Nur Aida, M.Si selaku Kepala Prodi Teknik Lingkungan Universitas Islam Negeri Ar-Raniry.
3. Ibu Husnawati Yahya S.Si., M.Sc. selaku koordinator tugas akhir.
4. Dr. Abd Mujahid Hamdan, M.Sc. sebagai dosen pembimbing tugas akhir yang telah banyak memberikan arahan dan bimbingan dalam penulisan tugas akhir yang dilakukan.
5. Ibu Syafrina Sari Lubis M.Si. selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan tugas akhir ini.
6. Bapak Teuku Muhammad Ashari, M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik Program Studi Teknik Lingkungan Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh atas segala arahan dan bimbingannya.
7. Seluruh dosen pengajar dan staf Program Studi Teknik Lingkungan yang telah memberikan arahan dan kesempatan kepada penulis untuk merasakan manisnya ilmu pada ruang lingkup Teknik Lingkungan.

8. Cut Taffazani Fithrian Nada dan Cut Zafira Annisa Keulara yang telah memberikan dukungan di saat penulis sedang dalam keadaan susah maupun senang.
9. Anggota penelitian yang didanai oleh Pusat Penelitian UIN Ar-Raniry Banda Aceh, Aris Munandar, Della Jaswita dan Zahratul Maulida yang telah memberikan kepada penulis untuk mempelajari banyak hal baru, arahan dan bimbingan saat proses penelitian dan pembuatan tugas akhir. Terimakasih untuk selalu memberikan dukungan positif kepada penulis untuk terus berkarya.

Penulis juga mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada Ibu Nur Raihan dan Bapak Teuku Armia (Almarhum) selaku orang tua penulis yang selalu mendukung penulis untuk berkarya dan menjadi pribadi yang produktif.

Penulis berharap, tugas akhir ini bisa menjadi tambahan pengetahuan dan acuan untuk pembaca. Semoga kedepannya tugas akhir ini dapat disempurnakan daripada bentuk dan isinya. Disebabkan kurangnya pengetahuan dan keahlian penulis, diakui besar kekurangan yang tertuai pada tugas akhir ini. Karenanya, diharapkan kritik dan saran yang memotivasi dari pembaca untuk kelengkapan tugas akhir ini.

Penghujung kata, penulis menyadari bahwa dalam pengerjaan dan penulisan tugas akhir ini masih terdapat kekurangan. Penulis berharap semoga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat dan gagasan, maupun ide baru bagi pembaca.

AR - RANIRY

Banda Aceh, Februari 2021

Penulis,

Cut Taffazani Fithrian Nazla

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN TUGAS AKHIR.....	ii
LEMBAR PERSETUJUAN TUGAS AKHIR.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH.....	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR PERSAMAAN.....	xiii
LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Bioremediasi.....	5
2.2 Logam Berat.....	6
2.3 Mekanisme Bioremediasi Fe oleh Bakteri	7
2.4 <i>Bacillus</i> sp.	9
2.5 Faktor yang Mempengaruhi Bioremediasi	11
2.6 Pengukuran Konsentrasi Besi (Fe).....	12
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	14
3.1 Tahapan Umum Penelitian.....	14
3.2 Pengukuran Konsentrasi Besi (Fe).....	15
3.3 Preparasi Larutan Stok Logam Berat	15
3.4 Peremajaan dan Pembuatan Suspensi Bakteri.....	15
3.5 Uji Resistensi dan <i>Range Finding Test Bacillus</i> sp. Terhadap FeSO ₄	16
3.6 Laju Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp.....	17
3.7 Kemampuan Bioremediasi Oleh <i>Bacillus</i> sp. Terhadap Besi (Fe)	19
3.8 Analisis Data	21
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Hasil	22
4.1.1. Resistensi <i>Bacillus</i> sp. Sungai Krueng Aceh terhadap Fe ...	22
4.1.2. Laju pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. pada media dengan kandungan Fe.....	24

4.1.3. Kemampuan Bioremediasi <i>Bacillus</i> sp. dari Sungai Krueng Aceh.....	25
4.2 Pembahasan.....	28
4.2.1 Resistensi <i>Bacillus</i> sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh .	28
4.2.2 Laju pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. terhadap media dengan kandungan logam besi (Fe).....	29
4.2.3 Kemampuan bioremediasi <i>Bacillus</i> sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh.....	32
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	44



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme Bioremediasi Logam oleh Mikroorganisme (Farida, 2016).....	9
Gambar 2.2 <i>Bacillus sp</i> (Dokumentasi pribadi)	10
Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri (Tortora dkk., 2010).....	12
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian	14
Gambar 3.2 Uji Degradasi dan Perbanyakan Bakteri	16
Gambar 3.3 Desain bioreaktor untuk bioremediasi logam berat (Fulekar dkk, 2012)	18
Gambar 3.4 Desain bioreaktor untuk bioremediasi besi (Fe) menggunakan <i>Bacillus sp.</i> (Desain pribadi).....	18
Gambar 3.5 Desain Penelitian	21
Gambar 4.1 Hasil uji resistensi isolat BKA1 (<i>Bacillus sp.</i>) terhadap sedimen Sungai Krueng Aceh (a) konsentrasi 25 mg/L dengan rata-rata total koloni $1,90 \times 10^7$ CFU/ml ; (b) konsentrasi 50 mg/L dengan rata-rata total koloni $4,65 \times 10^7$ CFU/ml ; (c) konsentrasi 75 mg/L dengan rata-rata total koloni $4,70 \times 10^6$	22
Gambar 4.2 Perbandingan total koloni terhadap konsentrasi besi (Fe)	23
Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan Isolat BKA1 (<i>Bacillus sp.</i>) pada Media NB tanpa Penambahan FeSO_4 (a) Fase lag pada jam ke 0-8; (b) Fase log pada jam ke 16-160; (c) Fase stasioner pada jam ke 168-312 (d) Fase kematian pada jam ke 320-400.....	24
Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat BKA1 (<i>Bacillus sp.</i>) pada Media NB dengan FeSO_4 50 mg/L (a) fase lag terjadi pada jam ke 0-8; (b) fase log terjadi pada jam ke 16-168; (c) fase stasioner terjadi pada jam ke 176-360; (d) fase kematian terjadi pada jam ke 366-400.	25
Gambar 4.5 Kurva Kalibrasi Larutan Standar Besi (Fe)	26
Gambar 4.6 Grafik Penurunan Logam Fe dengan Variasi pH yang berbeda .	27

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Perhitungan Jumlah Total <i>Koloni Bacillus sp.</i> dalam Media NA (<i>Nutrient Agar</i>).....	23
Tabel 4.2	Penurunan Konsentrasi Logam Besi (Fe) 50 mg/L oleh Isolat <i>Bacillus sp.</i>	27



DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 1. Penurunan Konsentrasi Besi (Fe) 50 mg/L oleh isolat <i>Bacillus</i> sp.	25
Persamaan 2. Perhitungan Jumlah Total Koloni <i>Bacillus</i> sp. dalam Media NA (<i>Nutrient Agar</i>)	26



LAMPIRAN

Lampiran 1	Perhitungan Konsentrasi Larutan FeSO ₄	44
Lampiran 2	Pengujian Statistik pada Pengujian Bioremediasi Logam FeSO ₄	46
Lampiran 3	Grafik Kurva Kelarutan Standar Logam Besi (Fe).....	48
Lampiran 4	Dokumentasi Kegiatan kerja di Laboraturium.....	49



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pencemaran logam berat merupakan salah satu permasalahan yang menjadi perhatian di seluruh dunia. Laju industrialisasi yang pesat, meningkatnya populasi manusia, kegiatan domestik serta pertanian, otomatisasi dan perubahan lingkungan lainnya telah merusak kualitas berbagai sistem akuatik (Chellaiah dkk., 2021 dan Nanda dkk., 2019). Pengelolaan limbah industri dengan metode yang tepat juga belum dapat mengurangi produksi limbah (Mehotra dkk., 2021). Bahan-bahan buangan dengan tingkat toksisitas yang tinggi, apabila masuk ke perairan, dapat menurunkan kualitas lingkungan tersebut (Putri, 2020). Salah satu bahan pencemar yang beracun adalah logam berat (De Fretes dkk., 2019).

Logam berat masuk ke sistem perairan disebabkan oleh adanya aktivitas alam dan manusia (antropogenik) (Chandrasekaran dkk., 2020). Aktivitas dari industri dan antropogenik menghasilkan buangan yang mengandung logam berat dengan tingkat toksisitas yang tinggi (Cao dkk., 2019). Logam berat mengacu pada sekelompok logam dan metaloid dengan massa jenis atom lebih dari 4 g/cm^3 , yaitu lima kali massa jenis air (Trubus dan Wiguna, 2018). Timbal (Pb), kromium (Cr), seng (Zn), kadmium (Cd), besi (Fe), tembaga (Cu), mangan (Mn), nikel (Ni) dan logam berat beracun lainnya yang dibuang oleh industri melewati air (Priyadarshane dan Das, 2021).

Logam berat merupakan bahan pencemar yang sulit untuk didegradasi, sehingga terjadi akumulasi dan membentuk senyawa kompleks karena berikatan dengan zat organik dan anorganik, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi zat kimia pada waktu yang lama hingga menumpuk dan menimbulkan efek toksik bagi makhluk hidup, dan juga berbahaya bagi lingkungan (Adhani dan Husaini, 2017; Pambudiono dkk., 2018; Utami dkk., 2018). Salah satu logam dengan eksistensi keempat terbanyak pada kerak bumi adalah Fe setelah oksigen, silikon (Si) dan aluminium (Al) (Sulakhuddin, 2019). Besi merupakan logam esensial bagi

organisme (Nugraha dkk., 2014). Besi berperan sebagai mineral makro pada kerak bumi, namun pada biologis tubuh, besi memiliki peran untuk transfer oksigen oleh sel darah merah, dan produksi beberapa enzim dan hemoglobin yang berperan penting dalam sistem metabolisme tubuh (Kallang, 2020).

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 32 Tahun 2017 konsentrasi Fe maksimal pada air minum adalah 0,3 mg/L, sedangkan pada air baku, konsentrasi besi maksimal adalah 5 mg/L (Arba, 2017). Berdasarkan Kallang (2020) Air dengan kadar oksigen rendah, konsentrasi Fe bisa mencapai 10–100 mg/L. Pada konsentrasi tinggi, besi akan menimbulkan endapan yang bersifat korosif, berubahnya warna, rasa, bau tidak sedap, serta gangguan kesehatan berupa rasa mual, rusaknya dinding usus juga iritasi pada mata dan kulit (Dhimas dkk., 2013), penuaan dini hingga kematian mendadak. Logam berat apabila didegradasi dengan metode fisik-kimia seperti koagulasi, presipitasi, adsorpsi, akan membutuhkan biaya relatif mahal dan memerlukan peralatan khusus, serta bahan kimia dengan energi yang besar (Setiawan dkk., 2020). Bioteknologi merupakan metode alternatif masa mendatang yang menjanjikan dan ramah lingkungan dengan memanfaatkan bakteri yang disebut bioremediasi (Ikerismawati, 2019).

Bioremediasi didefinisikan sebagai penggunaan organisme biologis seperti bakteri, fungi dan algae untuk meremediasi, menanggihkan atau mendegradasi polutan organik dan anorganik dari lingkungan (Gupta dkk., 2014) dengan memanfaatkan aktivitas metabolisme mikroba (Aliyanta dkk., 2011). Untuk mendapatkan mikroba yang mampu mendegradasi berbagai polutan dapat diperoleh dari lingkungan yang tercemar polutan dalam hal ini dapat disebut mikroba *indigenous*. Salah satu mikroba yang potensial dalam bioremediasi, adalah bakteri *Bacillus* sp. (Putri, 2017) yang merupakan bakteri yang dapat tumbuh di berbagai ekosistem manapun dan memiliki kemampuan untuk hidup di lingkungan yang tercemar (Ojuederie dan Babalola, 2017). Sehingga bakteri berpotensi kuat menjadi agen bioremediasi logam berat (Tortora, 2010). Bakteri juga mampu mendegradasi zat yang berbahaya menjadi tidak berbahaya (Park dkk., 2011). Faktor yang mempengaruhi laju proses bioremediasi adalah faktor lingkungan yang meliputi suhu, pH, ketersediaan oksigen, kelembaban dan nutrisi (Vyatrawan, 2015).

Maulana dkk. (2017), memaparkan bahwa terdapat beberapa bakteri yang resisten sebagai agen bioremediasi logam berat Fe diantaranya adalah, *Bacillus* sp. (Farisna, 2015). Satishkumar dkk. (2021) memaparkan keunggulan *Bacillus* sp. menghasilkan EPS (Eksopolisakarida) yang dapat mengikat logam berat. Berdasarkan Prihatiningsih dkk. (2020), *Bacillus* sp. memiliki sifat siderofor yang dapat mengikat besi (Fe) menjadi siderofor-besi yang bermanfaat bagi lingkungan khususnya tanaman. Berdasarkan Farisna dan Zulaika (2015), *Bacillus* sp. mampu menurunkan kadar besi (Fe) sebesar 27,967 mg/L dari paparan 33,594 mg/L. Efisiensi penyisihan logam mencapai 83,248%. Ikerismawati (2020) melaporkan anggota genus *Bacillus* sp. yaitu *B. alvei* yang diisolasi dari limbah cair dapat menurunkan konsentrasi timbal (Pb) yang konsentrasi awalnya 3,3 ppm menjadi 0,26 ppm pada 8 hari perlakuan.

Berdasarkan Jayanti (2014), bioremediasi dengan *Bacillus subtilis* dan *Bacillus megaterium* dapat menurunkan konsentrasi limbah cair tercemar krom dengan efisiensi penyerapan 90%. Hakim (2020), memaparkan bahwa terdapat kelimpahan Fe pada Sungai Krueng Aceh dengan konsentrasi Fe sebesar 147,9 mg/kg (Hamdan dkk., 2022). Sedangkan baku mutu kandungan Fe pada sedimen yang ditetapkan oleh *Wisconsin Department of Natural Resources* (2003) adalah dengan kadar 20 mg/kg yang mengindikasikan bahwa kadar Fe pada Sungai Krueng Aceh telah tercemar dan melebihi batas baku mutu kelimpahan unsur besi (Fe).

Studi pendahuluan menunjukkan, kultur *Bacillus* sp. yang diisolasi dari Sungai Krueng Aceh merupakan isolat yang resisten terhadap Fe, dan kadar Fe pada Sungai Krueng Aceh, maka dilakukan penelitian “Bioremediasi besi (Fe) menggunakan *Bacillus* sp. yang diisolasi dari sedimen Sungai Krueng Aceh”.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah penelitian adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana resistensi *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh terhadap besi (Fe)?
2. Bagaimana laju pertumbuhan *Bacillus* sp. pada media dengan kandungan logam Fe?

3. Bagaimana kemampuan bioremediasi *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh terhadap besi (Fe)?

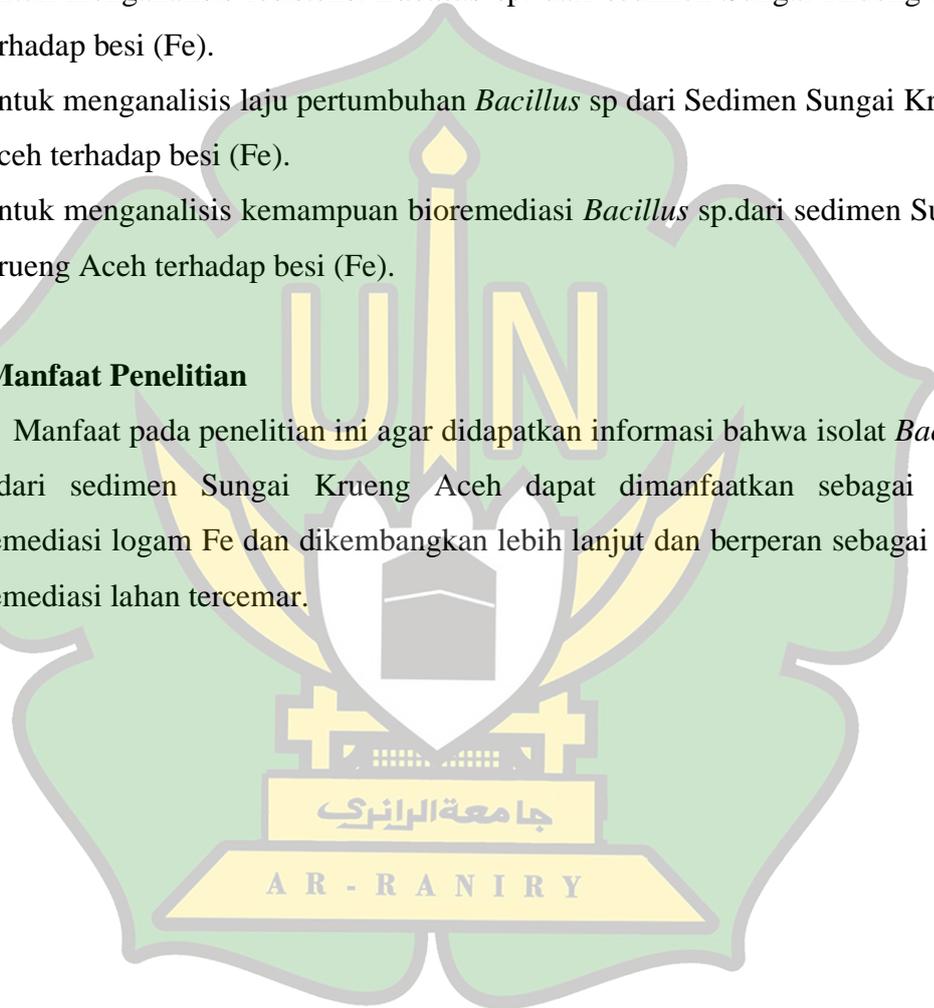
1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilaksanakannya penelitian ini adalah:

1. Untuk menganalisis resistensi *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh terhadap besi (Fe).
2. Untuk menganalisis laju pertumbuhan *Bacillus* sp dari Sedimen Sungai Krueng Aceh terhadap besi (Fe).
3. Untuk menganalisis kemampuan bioremediasi *Bacillus* sp.dari sedimen Sungai Krueng Aceh terhadap besi (Fe).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini agar didapatkan informasi bahwa isolat *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi logam Fe dan dikembangkan lebih lanjut dan berperan sebagai agen bioremediasi lahan tercemar.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bioremediasi

Ketergantungan masyarakat pada bahan kimia selama beberapa dekade terakhir telah menyebabkan peningkatan produksi, aplikasi, dan pelepasannya ke lingkungan. Penentuan persistensi bahan kimia sangat penting untuk penilaian risiko dan pengelolaan bahan kimia (Kowalczyk dkk., 2015). Bahan kimia organik dan anorganik beracun merupakan penyumbang utama pada pencemaran lingkungan dan menyebabkan terjadinya resiko kesehatan yang parah bagi populasi manusia (Dhanam, 2017). Berbeda dengan senyawa organik yang dapat terurai, senyawa anorganik membutuhkan penghilangan menjadi bentuk *inert* (netral) secara biologis. Bioremediasi memiliki strategi detoksifikasi (penurunan tingkat racun) dengan memanfaatkan mikroorganisme alami (seperti ragi, fungi dan algae) untuk mendegradasi substansi yang toksik menjadi substansi yang non toksik (Kafilzadeh dkk., 2015).

Bioremediasi merupakan teknologi dengan mekanisme detoksifikasi polutan dengan pemanfaatan mikroorganisme yang telah dikembangkan dan dimanfaatkan untuk mengolah limbah yang mengandung senyawa kimia sulit terdegradasi, dan bersumber dari aktivitas industri seperti pestisida, hidrokarbon, dan logam-logam berat (Ahmad, 2018; Priadie, 2012). Bioremediasi memiliki proses dimana material organik dirombak oleh mikroorganisme yang menghasilkan enzim (Perdana, 2012). Proses degradasi oleh mikroba dapat terjadi secara aerob dan anaerob. Akan tetapi sebagian besar berlangsung secara aerob (Yani dan Akbar, 2018).

Bioremediasi antara lain, menggunakan agen seperti bakteri, *fungi* dan *algae* (Hassan dkk., 2017; Kumar Mohapatra dkk., 2020). Pengurangan polutan dengan bantuan mikroorganisme terjadi karena mikroorganisme memiliki kemampuan untuk mendegradasi suatu polutan. Polutan akan diubah menjadi sumber nutrisi mikroba (Banerjee dkk., 2018). Enzim berperan penting pada saat bioremediasi berlangsung, karena enzim yang terdapat pada mikroorganisme memodifikasi

polutan beracun dengan mengubah struktur kimia polutan (biotransformasi). Studi tentang biotransformasi biasanya berujung pada proses biodegradasi, dimana polutan beracun terdegradasi, berubah menjadi struktur yang tidak kompleks dan mempunyai toksisitas yang rendah (Filote dkk., 2021).

Remediasi logam berat menggunakan metode fisika-kimia membutuhkan biaya dan energi yang besar. Bioremediasi dapat dicapai dengan beberapa metode yang berbeda, yaitu biostimulasi, bioaugmentasi dan biosorpsi (Nanda dkk., 2019). Biostimulasi merupakan suatu pendekatan dimana bakteri *indigenus* diatur dengan kondisi yang cocok untuk menstimulasi potensi bakteri resisten logam berat (Muthusamy dkk., 2019) dengan penambahan nutrisi seperti nitrogen, oksigen, karbon dan fosfor (Taufikurrahman dkk., 2020).

2.2 Logam Berat

Masuknya logam berat pada sistem akuatik disebabkan oleh aktivitas alam dan antropogenik (Chandrasekaran dkk., 2020), menyebabkan terjadinya penurunan kualitas air yang disebabkan oleh tingkat toksisitas yang tinggi (Dhimas dkk., 2013). Polutan Fe organik dan anorganik pada logam berat memicu permasalahan serius bagi kesehatan manusia (Lubis, 2020). Berdasarkan sudut pandang toksikologi, logam berat terbagi menjadi logam berat esensial dan logam berat non esensial (Junopia, 2015). Logam esensial seperti (Na, Ca, K, Mn, Mg, Cu, Co, Mo, Ni, Zn dan W) dikenali memiliki peran biologis yang apabila konsentrasi ion meningkat akan terjadi peningkatan toksisitas (Donati, 2018). Sedangkan logam beracun seperti (Ag, Sn, Cd, Au, Ti, Pb, Hg, Al serta metaloid Sb, Se, As dan Ge) tidak mempunyai peran biologis namun dapat mengganggu proses seluler. Sedangkan logam non esensial seperti (Rb, Sr, Cs dan T) tidak memiliki peran biologis namun, tidak beracun (Prabakharan, 2016). Berdasarkan Ahmad (2018) sifat logam secara umum dapat disebutkan sebagai antara lain:

1. Mudah terakumulasi pada sedimen sehingga konsentrasinya lebih tinggi daripada konsentrasi logam pada air. Hal itu berakibat pada sedimen menjadi sumber pencemar potensial pada waktu tertentu.

2. Terjadinya akumulasi pada organisme biota air, termasuk ikan dan kerang dan membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsi organisme tersebut.
3. Sulit terdegradasi sehingga mudah terakumulasi dalam kawasan akuatik dan keberadaannya secara alami sulit terdegradasi.
4. Logam bersifat konduktor dan konduktivitas termal yang tinggi, berada di alam sebagai logam oksida, karbonat dan sulfat.

Kriteria toksisitas logam berat berdasarkan (Lubis, 2020) antara lain, sifat toksik dapat bertahan lama di alam, terjadinya bioakumulasi dan biosorpsi logam berat yang menyebabkan kerusakan fisiologis bagi makhluk hidup, logam hanya dapat bertransformasi valensi, tidak dapat terdegradasi dengan metode apapun termasuk *biotreatment*. Tingkat toksisitas logam berat tergantung pada beberapa faktor, meliputi dosis, spesies bahan kimia, rute paparan, seperti umur, jenis kelamin, genetik dan status nutrisi dari individu yang terpapar.

Beberapa bakteri telah mengembangkan beberapa sistem yang efisien untuk detoksifikasi logam. Mekanismenya dapat digolongkan kedalam 5 kategori, yaitu, (1) penyerapan intraseluler (2) mengekspor (3) mereduksi (4) absorpsi ekstraseluler (5) detoksifikasi ekstraseluler. Hampir semua mekanisme resistensi bakteri dikode gen yang terdapat pada plasmid dan transposon dan hal itu memungkinkan transfer gen atau mutasi spontan yang menyebabkan bakteri resisten terhadap logam (Farisna dan Zulaika, 2015). Bakteri yang mampu resisten terhadap logam diharapkan mampu meremediasi cemaran logam di lingkungan. Resistensi bakteri terhadap logam dapat melalui mekanisme biosorpsi dan bioakumulasi. Mekanisme biosorpsi merupakan proses pasif sehingga logam tidak meracuni bakteri. Sedangkan mekanisme bioakumulasi merupakan proses aktif dimana logam berat dapat meracuni sel bakteri (Chojnacka, 2010).

2.3 Mekanisme Bioremediasi Fe oleh Bakteri

Besi atau biasanya disebut sebagai ferum (Fe) adalah metal berwarna putih keperakan, liat dan dapat di dengan posisi terbanyak keempat di dunia. Limbah cair yang mengandung besi terlarut dalam bentuk Ferro (Fe^{2+}). Besi dalam bentuk Ferro dapat teroksidasi dalam bentuk Ferri (Fe^{3+}) bergabung dengan senyawa yang

bergabung dengan oksigen dan sulfur (Nurhayati dan Vigiani, 2018). Besi memiliki nomor valensi 2 dan 3 yang dihasilkan dari bijih besi (Botahala, 2019). Berdasarkan Suherman (2011), jika kondisi air tanah yang mengandung Fe^{2+} tidak ada oksigen akan tampak jernih. Air permukaan terindikasi mengandung besi dalam bentuk Fe^{3+} , dikarenakan adanya kontak langsung dengan oksigen dan Fe^{2+} mempunyai sifat yang reaktif terhadap oksigen, sehingga berubah menjadi Fe^{3+} yang bersifat stabil (sukar larut dalam air).

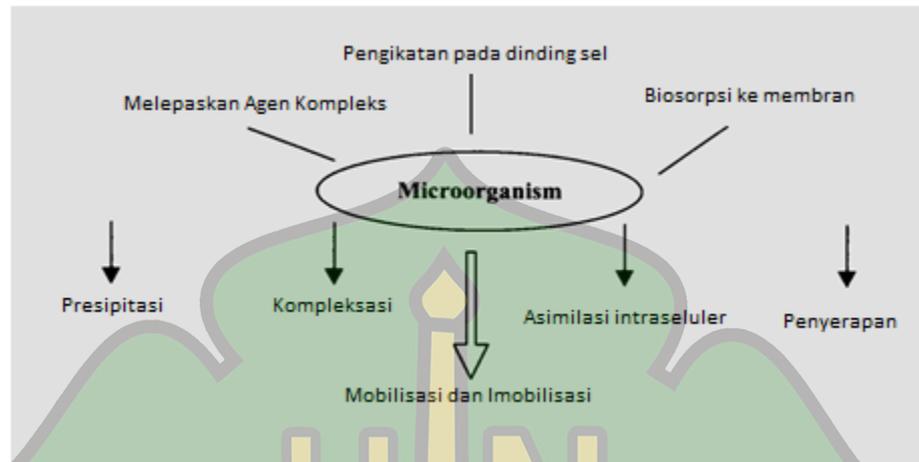
Kelebihan kandungan besi dalam lingkungan dapat mengakibatkan air tanah terkontaminasi dan mengganggu kelangsungan makhluk hidup lainnya. Logam Fe di dalam tanah akan diserap oleh tanaman melalui akar. Konsentrasi Fe yang tinggi di dalam tanah akan menyebabkan tanaman mengakumulasi Fe di dalam tubuhnya sehingga menyebabkan keracunan (Apriyanti and Candra, 2018). Pada manusia yang tidak sengaja mengkonsumsi besi dapat terserang penyakit seperti diabetes, gangguan hati, pankreas, disfungsi ereksi, radang sendi, hipotiroid dan perubahan kulit menjadi abu-abu (Tih dkk., 2015).

Apabila besi masuk kedalam tubuh akan menumpuk dalam bentuk $(\text{Fe}(\text{OH})_3)$ atau ferritin yang menghasilkan radikal bebas. Selain itu, besi juga memiliki bentuk yang berbeda di dalam air, yaitu fero bikarbonat ($\text{Fe}(\text{HCO}_3)_2$), ferohidroksida ($\text{Fe}(\text{OH})_2$), ferosulfat (FeSO_4) dan berbentuk organik kompleks (Febriana dan Ayuna, 2015). Besi merupakan nutrisi yang dibutuhkan mikroba termasuk *Bacillus* sp. sebagai pendukung pertumbuhan. Namun jika besi pada konsentrasi tinggi dan melewati batas toleransi, maka Fe akan bersifat toksik (Ahmad, 2018).

Mekanisme biodegradasi pada logam Fe adalah dengan memanfaatkan kemampuan mengakumulasi bakteri dalam menurunkan kadar logam berat atau bahkan menghilangkannya. Mekanisme pengolahan logam oleh mikroorganisme akan dijelaskan pada poin-poin berikut (Junopia, 2015):

- a. Mengeluarkan cairan ekstraseluler, yang mana akan bereaksi dengan logam berat Fe dan kemudian logam Fe yang sudah ada diendapkan pada sekeliling sel dalam bentuk selongsong.
- b. Logam Fe akan mengalami proses biotransformasi yang berupa reaksi reduksi dan kemudian membentuk molekul organik. Proses biotransformasi didukung

oleh adanya kemampuan bakteri dapat mensintesis enzim adaptif yang dapat menjadi katalisator reaksi biotransformasi tersebut.



Gambar 2.1 Mekanisme Bioremediasi Logam oleh Mikroorganisme (Farida, 2016)

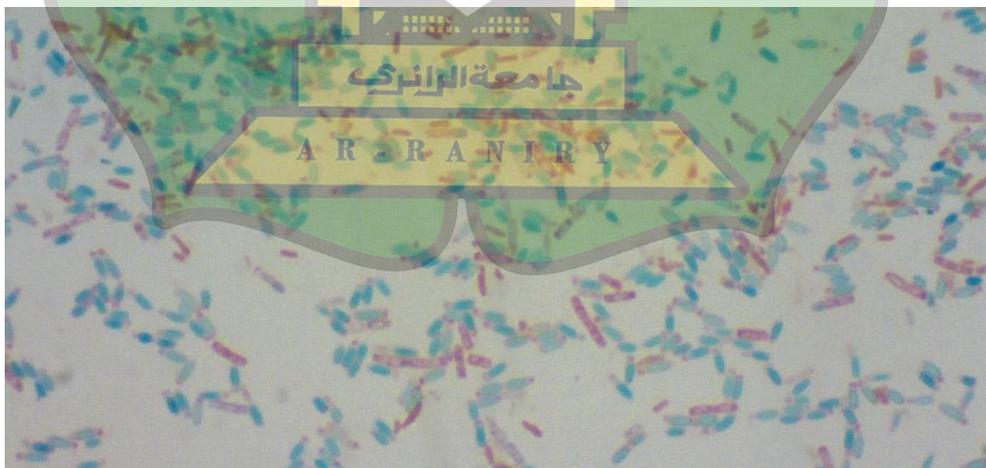
2.4 *Bacillus* sp.

Pada buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd*, *Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif, dengan karakteristik morfologi berbentuk *circular*, berukuran besar dan sedang, berwarna *creamy white*, tepi *entire* dengan elevasi *raised* dan *flat* (Lailiya, R 2021). Berdasarkan ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*) (2021), klasifikasi *Bacillus* sp. adalah antara lain:

Kingdom	: Procaryotae
Divisi	: Bacteria
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: Bacillus

Spesies : *Bacillus* sp.

Puspita dkk. (2017) memaparkan bahwa struktur *Bacillus* sp. berbentuk kapsul yang berisi polipeptida dari asam D-glutamat yang merupakan bakteri berspora. Genus ini dapat bersifat motil maupun non motil. Uji katalase positif hampir pada seluruh spesiesnya (Anusha dan Natarajan, 2020; Imron dan Purwanti, 2016). Kebanyakan bersifat aerobik, namun dapat hidup sebagai fakultatif anaerob, contohnya *Bacillus* sp. banyak ditemukan di berbagai habitat air, udara, dan tanah. Salah satu spesies dari *Bacillus* sp. adalah *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus azotoformans*, *Bacillus fordii*, *Bacillus fortis* dan *Bacillus oceanisediminis* (Chuljerm dkk., 2020; De Fretes dkk., 2019). Umumnya bakteri ini diisolasi dari tanah, namun juga terdapat di air, makanan, dan spesimen klinis. Studi pada interaksi ion logam dan dinding sel bakteri gram positif terutama *Bacillus* sp. menunjukkan adanya peranan gugus karboksil pada peptidoglikan dan atau gugus fosforil. Bakteri *Bacillus* merupakan bakteri lokal yang mampu menyerap logam berat kedalam sel-selnya sehingga logam berat tersebut tidak dapat bergerak kedalam substrat lebih jauh (Ikerismawati, 2019). Adanya eksopolisakarida (EPS) memungkinkan terikatnya logam pada permukaan sel (Imron dan Purwanti 2016). Mikroorganisme *Bacillus* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 *Bacillus* sp (Dokumentasi pribadi)

2.5 Faktor yang Mempengaruhi Bioremediasi

Keberhasilan proses bioremediasi ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya lama inkubasi, konsentrasi mikroba dan nilai pH. Lama inkubasi bergantung pada besar konsentrasi cemaran, semakin besar konsentrasi cemaran maka semakin lama waktu yang dibutuhkan mikroba untuk mendegradasi bahan pencemar. Derajat keasaman (pH) mempunyai pengaruh yang besar pada aktivitas mikroba untuk mengatasi limbah logam berat. Mikroorganisme memiliki peran yang sangat penting untuk mendegradasi logam berat pada tanah dan perairan. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi cepat lambatnya degradasi suatu pencemar yaitu:

a. Mikroorganisme

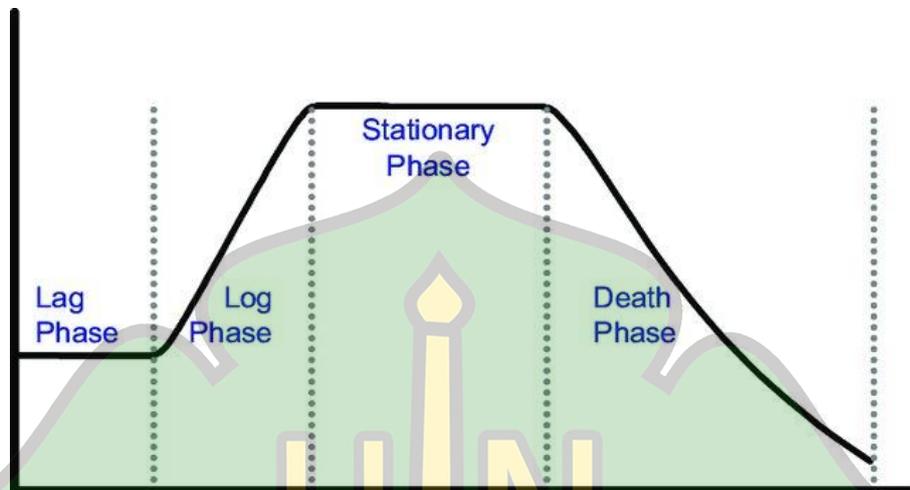
Pengurangan polutan oleh bantuan mikroorganisme terjadi karena, mikroba memiliki kemampuan untuk mendegradasi polutan logam berat. Polutan logam akan diubah menjadi komponen yang berperan sebagai nutrisi (Banerjee dkk., 2016).

b. Lingkungan

Lingkungan sangat berperan penting dalam kehidupan mikroba. Faktor lingkungan yang mempengaruhi laju degradasi adalah oksigen, suhu, pH, kelembaban dan tekstur tanah (Annisa, 2019). Pada pertumbuhan bakteri, diperlukan nutrisi dan lingkungan yang baik demi proses pertumbuhan itu sendiri, pengaruh faktor lingkungan akan memperlihatkan gambaran yang tidak sama dan gambaran terhadap kurva pertumbuhannya (Bertranda, 2019). Pertumbuhan mikroba dalam suatu media mengalami fase yang berbeda (Lestari, 2018). Kurva pertumbuhan bakteri dilakukan untuk menunjukkan jumlah sel hidup dalam populasi bakteri selama periode waktu tertentu. Ada empat fase yang berbeda dari kurva pertumbuhan: lag, eksponensial (log), stasioner, dan kematian (Septiana, 2016).

Fase lag merupakan fase awal dimana bakteri aktif secara metabolik tetapi tidak membelah (Bruslind, 2019). Dalam fase log, bakteri berkembang biak dengan pembelahan biner secara berkala, meningkatkan jumlah dan biomassa mereka secara eksponensial. Interval waktu replikasi, juga dikenal sebagai waktu generasi,

dapat bervariasi antar spesies, sebagaimana dibuktikan dari kurva pertumbuhan yang diperoleh (Alvarez & Sánchez, 2016).



Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri (Tortora dkk., 2010)

c. Nutrisi

Mikroba sangat membutuhkan nutrisi untuk bertahan hidup. Nutrisi dibutuhkan oleh bakteri tidak hanya sebagai sumber energi, namun dimanfaatkan juga dalam proses pembuatan protoplasma dan sel struktural lainnya. Ketersediaan nutrisi juga sangat berperan penting dalam kegiatan biodegradasi sebagai sumber energi. Nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba juga memiliki variasi berdasarkan jenisnya, namun seluruh mikroba memerlukan karbon (C), fosfor (P), dan nitrogen (N) (Priadie, 2012). Farida (2016) memaparkan, terdapat mineral lain yang dibutuhkan oleh mikroba, diantaranya mangan, kalsium, besi, potasium, tembaga, kobalt dan seng.

2.6 Pengukuran Konsentrasi Besi (Fe)

Analisa kandungan logam berat menggunakan metode absorbansi cahaya yang paling banyak digunakan antara lain adalah:

1. *Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS)*

Alat yang digunakan untuk menganalisa banyaknya kandungan logam Fe pada media bakteri adalah AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). AAS memiliki prinsip kerja secara absorpsi (penyerapan) cahaya oleh atom. Atom-atom melakukan absorpsi cahaya tersebut, pada panjang gelombang tertentu, sesuai pada sifat unsurnya. Dengan absorpsi energi, berarti memperoleh lebih banyak energi, suatu atom pada keadaan dasar dinaikkan tingkat energinya ketika eksitasi (Farida, 2016). Berdasarkan Trisnawati (2013) Pengukuran menggunakan instrumen AAS dapat mencapai 1 mg/L (1 ppm).

Cara kerja AAS berdasarkan penguapan larutan sampel, dan logam yang terkandung didalamnya diubah menjadi atom bebas. Cairan sampel diubah dimana ion mengalami atomisasi. Atom menyerap cahaya dari sumber. Analisis kuantitatif ini bisa dicapai dengan kadar serapan larutan dengan konsentrasi yang diketahui. Kurva kalibrasi dan persamaan garis bisa digunakan untuk menentukan konsentrasi berdasarkan serapannya.

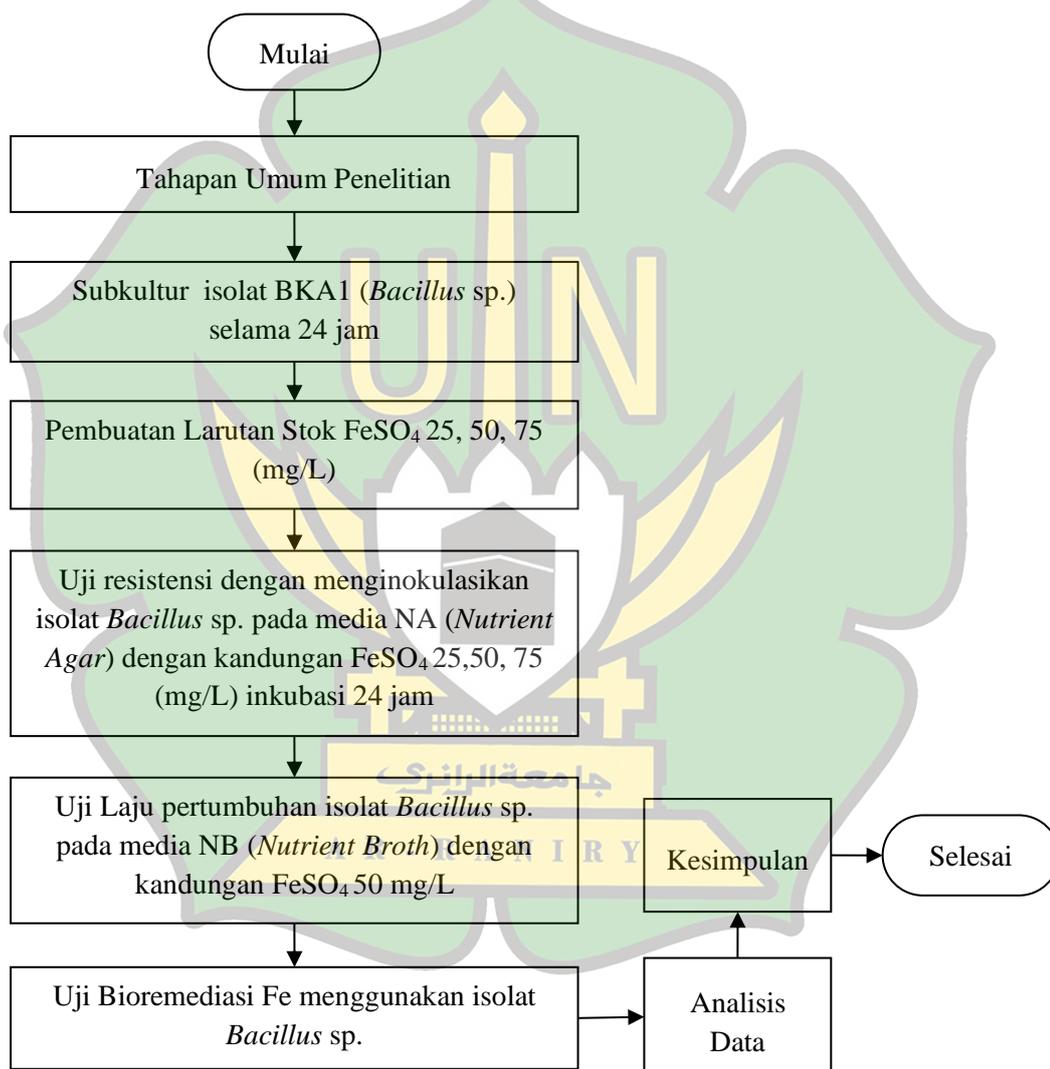
2. Spektrofotometer UV-Vis

Salah satu metode sederhana untuk menentukan zat organik dan anorganik adalah dengan metode Spektrofotometri UV-Vis. Prinsip kerja alat ini adalah dengan penyerapan cahaya dan atau energi radasi oleh suatu larutan. Jumlah cahaya yang diserap memungkinkan terjadinya pengukuran jumlah zat penyerap pada larutan secara kuantitatif. Prinsip kerja dari spektrofotometer adalah sumber sinar akan dilewatkan melalui monokromator, menuju kuvet dan diteruskan menuju detektor. Acuan dari spektrofotometer UV-Vis adalah Hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa, intensitas yang diteruskan oleh larutan zat adsorben berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tahapan Umum Penelitian

Tahapan umum pada penelitian ini dideskripsikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.2 Pengukuran Konsentrasi Besi (Fe)

Salah satu metode sederhana untuk menentukan zat organik dan anorganik adalah dengan metode Spektrofotometri UV-Vis. Prinsip kerja alat ini adalah dengan penyerapan cahaya dan atau energi radiasi oleh suatu larutan. Jumlah cahaya yang diserap memungkinkan terjadinya pengukuran jumlah zat penyerap pada larutan secara kuantitatif (Pratiwi dan Nandiyanto, 2022). Prinsip kerja dari spektrofotometer adalah sumber sinar akan dilewatkan melalui monokromator, menuju kuvet dan diteruskan menuju detektor. Acuan dari spektrofotometer UV-Vis adalah Hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa, intensitas yang diteruskan oleh larutan zat adsorben berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan (Andhini, 2017; Guo dkk., 2020).

3.3 Preparasi Larutan Stok Logam Berat

Stok logam pada penelitian ini berperan sebagai suplemen yang akan ditambahkan kedalam media *Nutrient Agar* (NA) pada uji berikutnya. Alat yang digunakan pada tahapan ini adalah, labu ukur, mikropipet, pipet ukur dan timbangan analitik. Sedangkan bahan yang digunakan adalah $\text{FeSO}_4 + 6\text{H}_2\text{O}$ dan akuades steril.

Konsentrasi berbeda disiapkan untuk melarutkan FeSO_4 yang diencerkan dengan aquades (Audu dkk., 2020). Konsentrasi berbeda disiapkan dengan perbedaan konsentrasi 25, 50, 75 mg/L. Logam Fe berupa bubuk yang akan dilarutkan dengan 1 liter aquades. Perhitungan pembuatan larutan stok FeSO_4 dapat dilihat pada lampiran 1.

3.4 Peremajaan dan Pembuatan Suspensi Bakteri

Peremajaan kembali isolat *Bacillus* sp dilakukan guna mendapatkan kultur yang baik saat perlakuan dalam penelitian berlangsung. Isolat bakteri yang dipakai adalah isolat yang berumur 24 jam (Sari dkk., 2016). Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah, erlenmeyer, bunsen, ose, cawan petri, inkubator, *beaker glass*, tabung reaksi, autoklaf dan oven. Sedangkan bahan yang digunakan adalah media NA (*Nutrient Agar*), akuades, alkohol, isolat *Bacillus* sp. dan spirtus. Isolat *Bacillus*

yang digunakan merupakan hasil perolehan dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry yang diisolasi dari sedimen Sungai Krueng Aceh dengan kode BKA1 (Bakteri Krueng Aceh 1). Subkultur diperbanyak dengan perlakuan, satu ose dari *culture stock* (media agar miring) ditanam pada media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung FeSO_4 sebanyak 1 mg/L pada 100 mL. Kemudian isolat diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Berdasarkan Vebrian (2015), keberhasilan subkultur ditandai dengan adanya koloni yang tumbuh pada media NA.



Gambar 3.2 Uji Degradasi dan Perbanyakan Bakteri

3.5 Uji Resistensi dan *Range Finding Test Bacillus sp.* Terhadap FeSO_4

Pada tahapan resistensi, alat yang digunakan adalah kuvet, cawan petri steril, *hot plate*, *magnetic stirrer*, bunsen, tabung reaksi, ose, *aluminium foil*, *beaker glass*, inkubator, *colony counter*, dan mikropipet. Bahan yang digunakan adalah kultur *Bacillus sp.* berumur 24 jam, alkohol, akuades, media NA (*Nutrient agar*) dan larutan stok besi.

Berdasarkan Astutik (2015), *range finding test* merupakan metode yang dimanfaatkan untuk mendapatkan konsentrasi optimal yang mampu di ditoleransi oleh isolat *Bacillus sp.* Sebanyak 1 ose kultur isolat *Bacillus* dimasukkan kedalam 9 ml aquades dan homogenisasi suspensi menggunakan vorteks. Dilakukan pengenceran suspensi sampai 10^{-5} . Kemudian 0,1 ml suspensi kultur *Bacillus sp.* ditumbuhkan pada media NA yang mengandung FeSO_4 dengan konsentrasi 25, 50 dan 75 mg/L, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang 36°C . Koloni yang

tumbuh pada masing-masing cawan dihitung menggunakan *colony counter*. Interval koloni yang dihitung berkisar antara 25-250 koloni.

Uji resistensi besi dilakukan untuk mengetahui *range* yang dapat dimanfaatkan sebagai konsentrasi yang digunakan untuk tahapan uji bioremediasi terhadap *Bacillus* sp. Pengujian resistensi menggunakan RFT dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri pada media NA yang berisi suplemen besi dengan masing-masing konsentrasi 25 mg/L, 50 mg/L dan 75 mg/L. Pada tahapan ini, pembiakan *Bacillus* sp. dilakukan dengan metode *spread plate* pada cawan petri. Hasil yang didapatkan menyatakan bahwa isolat *Bacillus* sp. sangat baik pada media NA yang mengandung FeSO₄ hingga konsentrasi 75 mg/L. Ion Fe²⁺ yang terdapat pada FeSO₄ dapat dikonversikan menjadi Fe³⁺ oleh bakteri termasuk *Bacillus* sp. dalam keadaan oksidatif (Puspitasari dkk., 2014).

Perhitungan jumlah koloni dihitung berdasarkan rumus empiris berikut (Febrinawati, 2017):

$$\left(\frac{\text{Koloni}}{\text{ml}}\right) = \text{Jumlah Koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \quad (1)$$

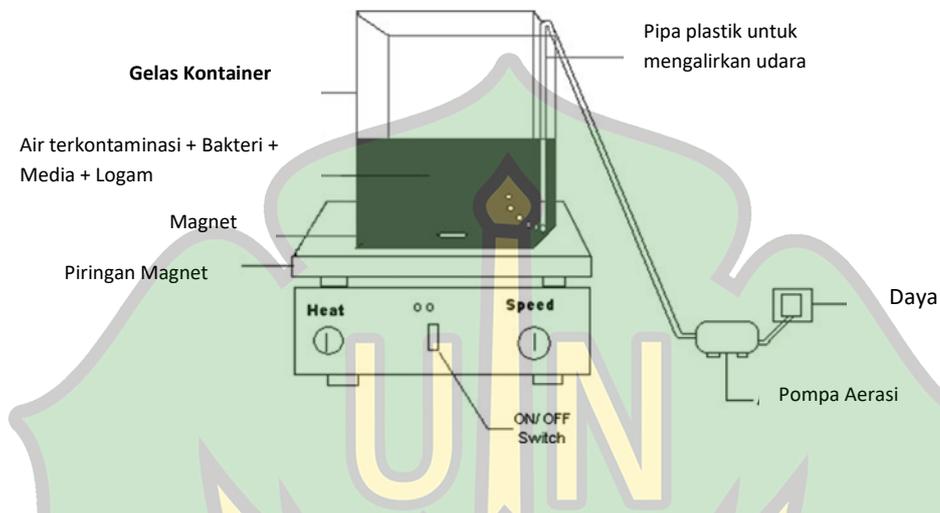
Hasil dari *range finding test* yang digunakan pada uji bioremediasi adalah konsentrasi FeSO₄ di bawah tingkat konsentrasi maksimal yang mampu ditoleransi oleh *Bacillus* sp. (Verdian, 2015).

3.6 Laju Pertumbuhan *Bacillus* sp.

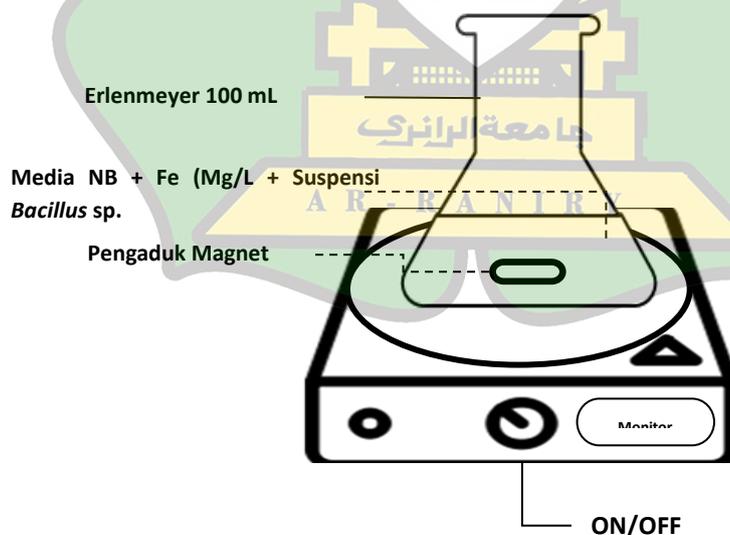
Laju pertumbuhan bakteri, dilakukan tahapan yang memanfaatkan alat yaitu ose, kuvet, *hot plate*, *magnetic stirrer*, mikropipet, erlenmeyer, tabung reaksi dan *beaker glass*. Adapun bahan yang dipergunakan sebagai bahan adalah media NB (*Nutrient Broth*) dan larutan stok logam besi.

Berdasarkan Pramono dan Irfan (2013) sebanyak 100 ml media NB (*Nutrient Broth*) yang berisi dua konsentrasi logam berat sesuai *range test* pada prosedur uji resistensi, diinokulasikan dengan bakteri 1 ml dari 10⁸ sel/ml dan ditumbuhkan selama 400 jam (hingga fase kematian terjadi). Isolat *Bacillus* sp. diberi perlakuan

pengadukan dan homogenisasi menggunakan *hot plate* dengan *magnetic stirrer* (Fulekar dkk., 2012) pada kecepatan 125 rpm pada suhu ruang. Homogenisasi dilakukan dengan model bioreaktor sebagai berikut:



Gambar 3.3 Desain bioreaktor untuk bioremediasi logam berat (Fulekar dkk, 2012)



Gambar 3.4 Desain bioreaktor untuk bioremediasi besi (Fe) menggunakan *Bacillus* sp. (Desain pribadi)

Berdasarkan Park dkk. (2018) dengan modifikasi. Sebanyak 2,5 ml sampel suspensi diatas, diambil secara berkala, pada interval 12 jam selama 400 jam (0,12,24 sampai dengan 400 jam) untuk mengukur kepadatan sel dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada OD 600 nm (Park dkk., 2018). Laju pertumbuhan digambarkan dengan grafik. Dimana, pada sumbu x adalah waktu inkubasi dan sumbu y adalah kerapatan sel (Pramono dan Irfan, 2013).

3.7 Kemampuan Bioremediasi Oleh *Bacillus* sp. Terhadap Besi (Fe)

Tahapan uji bioremediasi memerlukan alat seperti *shaker*, inkubator, ose, tabung reaksi, erlenmeyer, *aluminium foil*, mikropipet dan *beaker glass*. Sedangkan bahan yang digunakan adalah media NB, stok logam besi, akudes, alkohol dan stok kultur *Bacillus* sp. 24 jam.

Berdasarkan (Kang dkk., 2016) sebanyak 5 ml kultur *Bacillus* dengan jumlah sel setara dengan 10^8 diinokulasikan pada 45 media NB yang telah berisi logam, dengan konsentrasi logam 50 mg/L mengikuti hasil *range test* pada prosedur uji resistensi sebelumnya. Kemudian suspensi diinkubasi dengan variasi waktu, yaitu 12, 24, 48 dan 72 jam dengan pH pada rentang 4, 5 dan 6. Homogenisasi suspensi dilakukan menggunakan *waterbath shaker*. Setelah inkubasi, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Dilakukan pengukuran kandungan Fe pa *supernatan* hasil sentrifugasi dengan menggunakan spektrofotometer pada OD 600 nm (Oziegbe dkk., 2021).

Kurva standar logam Fe yang digunakan sebagai standar analisis logam. Kurva standar logam dibuat dari larutan besi (Fe) 1000 mg/L. Pembuatan larutan stok melalui rumus pengenceran (Persamaan 2) Pengukuran kurva larutan standar dapat dilihat pada lampiran 5. Persamaan garis regresi untuk kurva kalibrasi dapat diturunkan rumusnya pada persamaan 3 (Anggraeni dan Triajie, 2021). Nilai a diperoleh dengan mensubstitusikan nilai-nilai yang terdapat pada lampiran 5. Untuk mendapatkan pengukuran konsentrasi menggunakan persamaan berikut:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \quad (2)$$

Keterangan:

V_1 : Volume larutan standar yang diencerkan

V_2 : Volume larutan pengenceran

M_1 : Konsentrasi larutan yang diencerkan

M_2 : Konsentrasi larutan pengenceran

$$y = ax + b$$

(3)

Dengan:

a : Kemiringan (*Slope*)

b : Intersep

x : Konsentrasi Logam

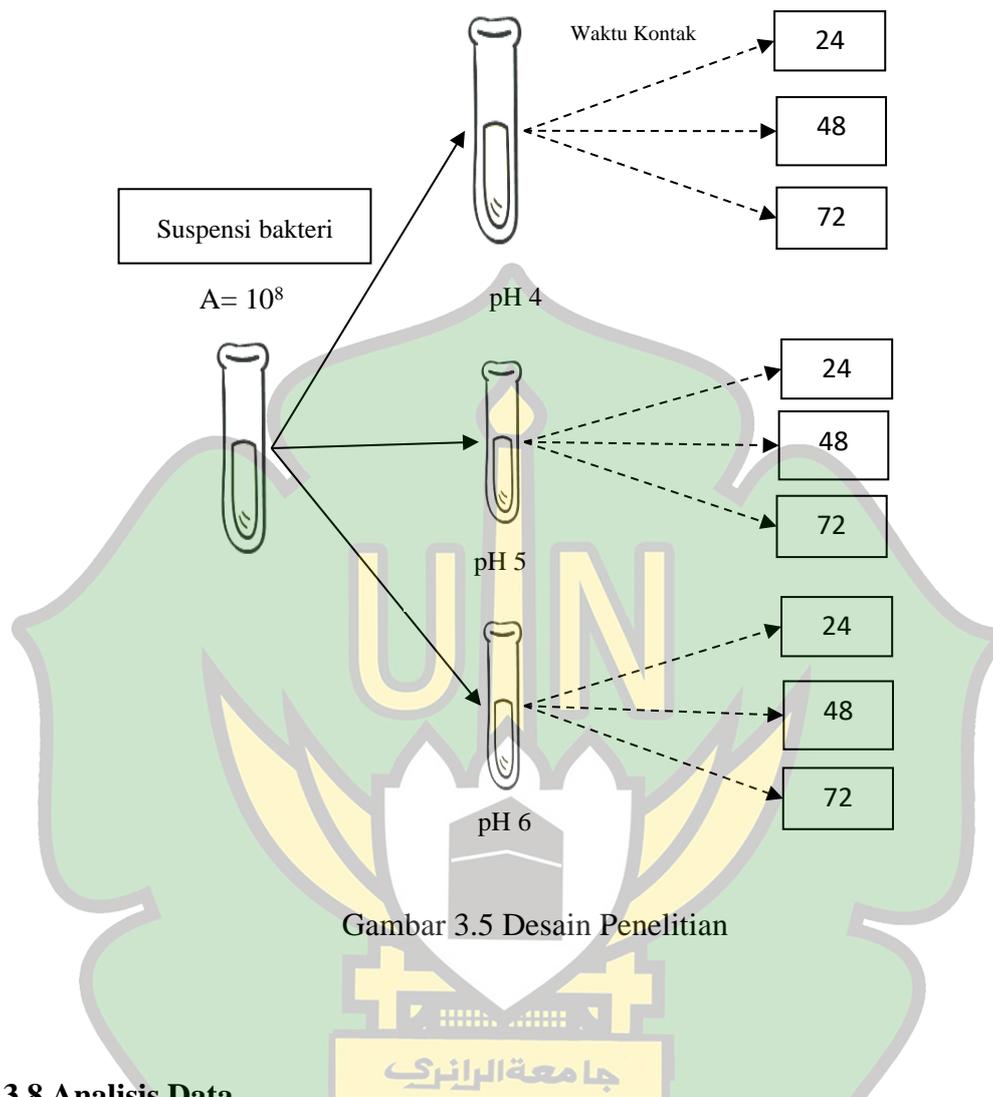
y : Nilai Absorbansi

Intersep adalah nilai respon instrumen terhadap blanko dengan nilai idealnya adalah 0. Kemiringan adalah nilai sensitivitas dari metode pengujian, semakin besar nilai kemiringan, maka semakin sensitif metode tersebut. Pengukuran remediasi konsentrasi logam berat pada media kultur dilakukan dengan menggunakan *waterbath shaker* dengan persamaan empiris:

$$\text{Konsentrasi logam} = \frac{\text{absorbansi} - b}{a} \quad (3)$$

$$\frac{\text{Konsentrasi Logam Awal} - \text{Konsentrasi Akhir Logam}}{\text{Konsentrasi Awal Logam}} \times 100 \quad (4)$$

Desain penelitian pada uji bioremediasi *Bacillus* sp terhadap logam Fe akan ditunjukkan pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5 Desain Penelitian

3.8 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *Software* IBM SPSS Statistik 26 menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui pengaruh antara isolat dengan konsentrasi Fe yang berbeda dilakukan secara triplikate. Adanya perbedaan diantara perlakuan akan dianalisis dengan uji ANOVA (*Analysis of Varians*).

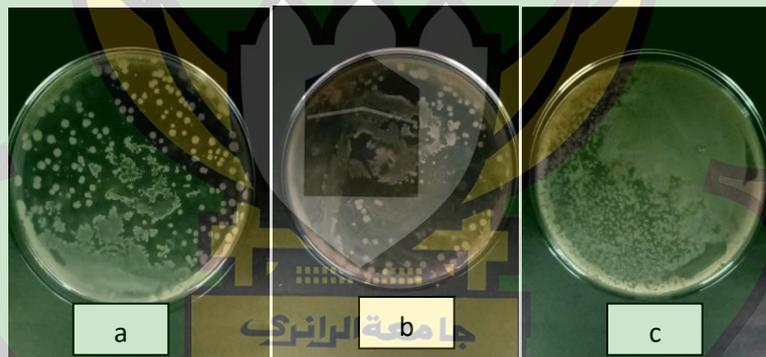
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1. Resistensi *Bacillus* sp. Sungai Krueng Aceh terhadap Fe

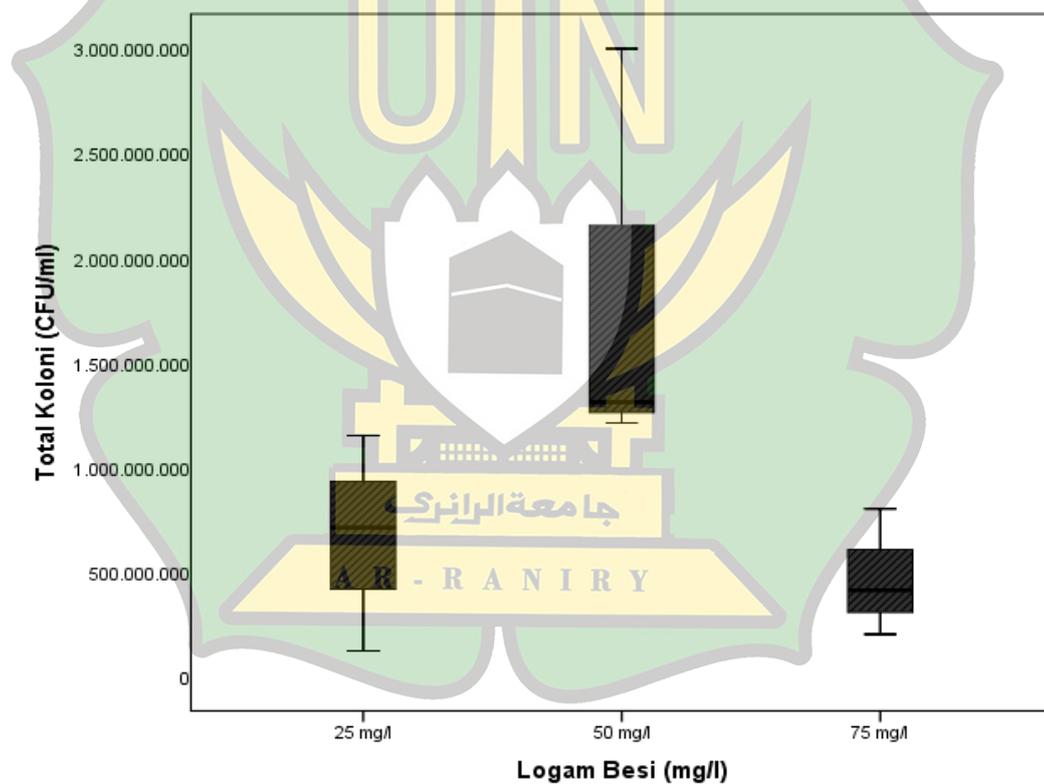
Resistensi *Bacillus* sp. terhadap Fe dapat dilihat dari hasil pengujian *Range Finding Test* (RFT). Hasil pengujian resistensi yang didapatkan, memperlihatkan bahwa semua isolat BKA1 (*Bacillus* sp.) tumbuh sangat baik pada media *nutrient agar*, yang mengandung logam FeSO_4 dengan konsentrasi 25 mg/L, 50 mg/L dan 75 mg/L. Hasil uji resistensi menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. tumbuh dengan pertumbuhan koloni yang baik. Morfologi koloni isolat *Bacillus* sp. dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil uji resistensi isolat BKA1 (*Bacillus* sp.) terhadap sedimen Sungai Krueng Aceh (a) konsentrasi 25 mg/L dengan rata-rata total koloni $1,90 \times 10^7$ CFU/ml ; (b) konsentrasi 50 mg/L dengan rata-rata total koloni $4,65 \times 10^7$ CFU/ml ; (c) konsentrasi 75 mg/L dengan rata-rata total koloni $4,70 \times 10^6$.

Tabel 4.1 Perhitungan Jumlah Total *Koloni Bacillus sp.* dalam Media NA (*Nutrient Agar*)

Konsentrasi logam (mg/L)	Total koloni (CFU/ml)	Rata-rata koloni (CFU/ml)
25	$7,10 \times 10^6$	$6,60 \times 10^6$
25	$1,15 \times 10^7$	
25	$1,20 \times 10^6$	
50	3×10^7	$1,84 \times 10^7$
50	$1,21 \times 10^7$	
50	$1,31 \times 10^7$	
75	8×10^6	$4,70 \times 10^6$
75	$4,10 \times 10^6$	
75	2×10^6	

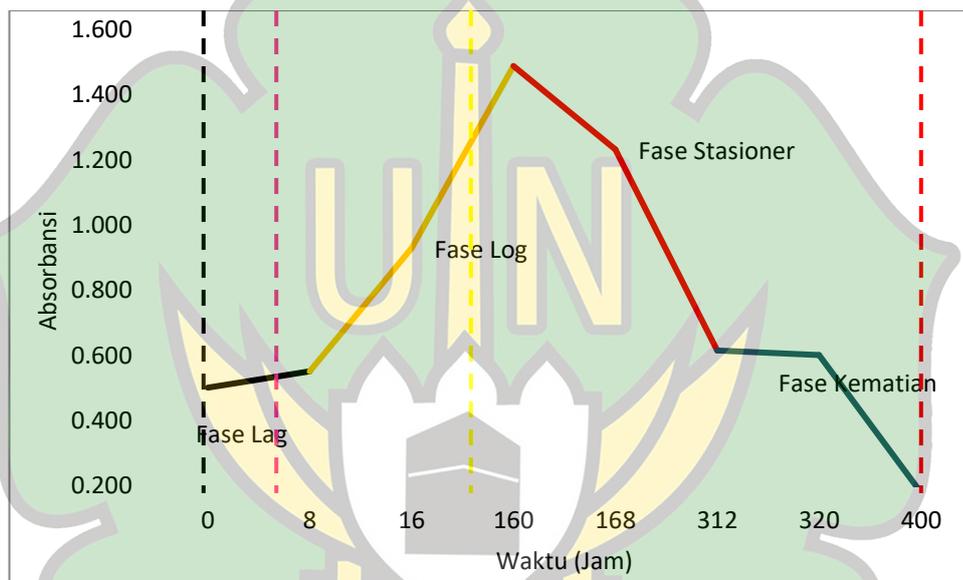


Gambar 4.2 Perbandingan total koloni terhadap konsentrasi besi (Fe)

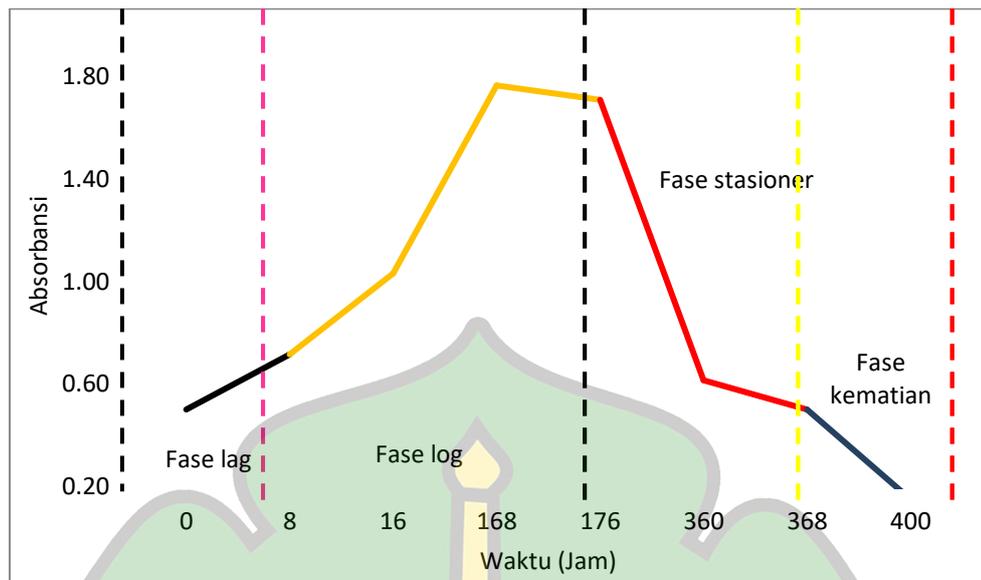
Berdasarkan hasil perhitungan total koloni, *Bacillus* sp. yang ditumbuhkan pada media NA pada dengan konsentrasi yang berbeda diperoleh rata-rata tertinggi $4,65 \times 10^7$ pada konsentrasi Fe 50 mg/L (Tabel 4.1 dan Gambar 4.2). Untuk pengukuran laju pertumbuhan *Bacillus* sp. dipergunakan konsentrasi 50 mg/L.

4.1.2. Laju pertumbuhan *Bacillus* sp. pada media dengan kandungan Fe

Pengukuran laju pertumbuhan *Bacillus* sp. pada media *Nutrient Broth* (NB) diperkaya Fe 50 mg/L, dan tanpa penambahan Fe (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan Isolat BKA1 (*Bacillus* sp.) pada Media NB tanpa Penambahan FeSO_4 (a) Fase lag pada jam ke 0-8; (b) Fase log pada jam ke 16-160; (c) Fase stasioner pada jam ke 168-312 (d) Fase kematian pada jam ke 320-400.

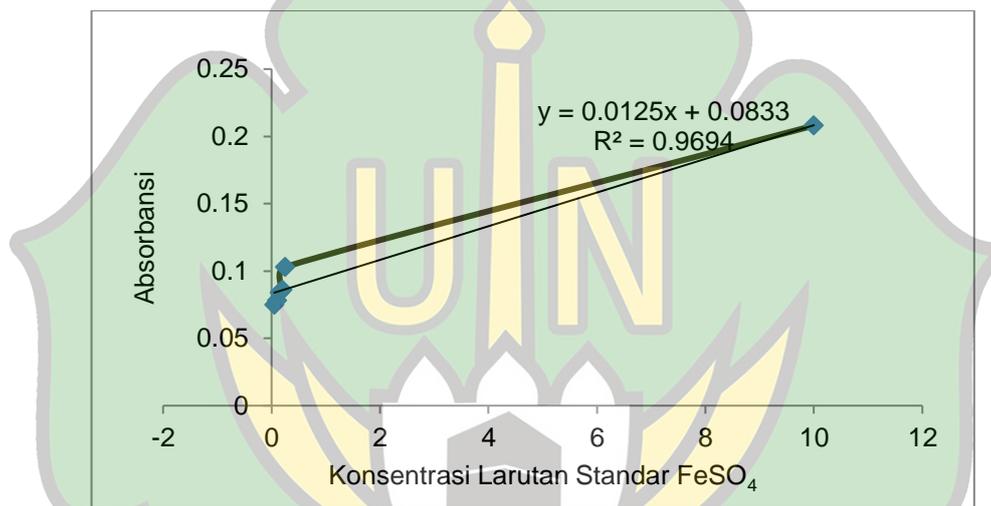


Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat BKA1 (*Bacillus* sp.) pada Media NB dengan FeSO_4 50 mg/L (a) fase lag terjadi pada jam ke 0-8; (b) fase log terjadi pada jam ke 16-168; (c) fase stasioner terjadi pada jam ke 176-360; (d) fase kematian terjadi pada jam ke 366-400.

4.1.3. Kemampuan Bioremediasi *Bacillus* sp. dari Sungai Krueng Aceh

Hasil penelitian dari perlakuan yang dilakukan pada *Bacillus* sp yang telah ditumbuhkan pada cekaman logam besi dengan konsentrasi 50 mg/L dengan pH dan dilakukan uji bioremediasi menggunakan media NB pada waktu 3 hari dengan pengamatan pada jam ke 12, 24, 36, 48, 56, 60 dan 72 jam dengan variasi pH 4, 5 dan 6 diinkubasi menggunakan *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Kemudian, *Bacillus* sp. yang telah diinkubasi, dilakukan pengujian kepadatan bakteri dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan cair. Penyisihan logam besi oleh *Bacillus* sp. dapat dilihat pada tabel 4.2. Untuk mengetahui penurunan konsentrasi logam pada suspensi yang berisi logam besi dihitung dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Data yang dihasilkan berupa nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan linearitas. Diperolehnya Gambar 4.5, dari persamaan garis regresi linier hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan standar yaitu $y = 0,125x + 0,0833$ dengan nilai R^2

(koefisien korelasi) sebesar 0,969. Hal ini menunjukkan bahwa, antara kandungan besi dalam konsentrasi absorbansi berkorelasi positif dengan korelasinya erat sebesar $R^2 = 0,9694$ yang berarti kurva mempunyai keakuratan dalam menentukan konsentrasi sebesar 96,94%. Untuk menentukan konsentrasi Fe sampel dapat dihitung dengan persamaan $y = 0,0125x + 0,0833$ dimana y adalah nilai absorbansi dari sampel. Dengan mensubstitusikan nilai absorbansi (y) dari masing-masing sampel akan diperoleh nilai x yaitu konsentrasi besi (Fe) pada tabel 4.2.

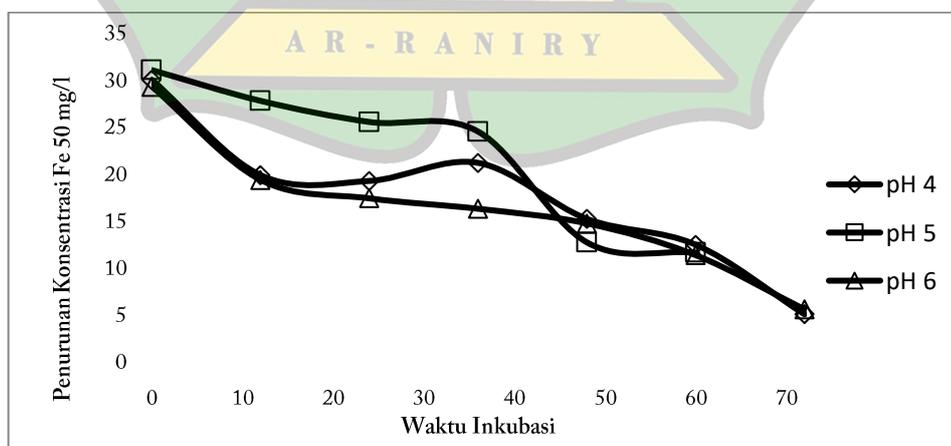


Gambar 4.5 Kurva Kalibrasi Larutan Standar Besi (Fe)

جامعة الرانيري
AR - RANIRY

Tabel 4.2 Penurunan Konsentrasi Logam Besi (Fe) 50 mg/L oleh Isolat *Bacillus* sp.

pH	Waktu (jam)	Konsentrasi awal (mg/L)	Konsentrasi akhir	Persentase (%)
Isolat BKA1 (<i>Bacillus</i> sp.)				
pH 4	0	50	30,78	38,44
	12		20,61	58,78
	24		20	60
	36		21,92	56,16
	48		15,95	68,10
	60		13,19	73,62
	72		5,78	88,44
	pH 5		0	50
12		28,53	42,94	
24		26,28	47,44	
36		25,25	49,50	
48		13,44	73,12	
60		12,36	75,28	
72		10,58	78,84	
pH 6		0	50	
	12	20,11		59,78
	24	18,14		63,72
	36	17,03		65,94
	48	15,47		69,06
	60	12,08		75,84
	72	6,3		87,4



Gambar 4.6 Grafik Penurunan Logam Fe dengan Variasi pH yang berbeda

4.2 Pembahasan

4.2.1 Resistensi *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh

Secara keseluruhan, jika diperhatikan pada Gambar 4.1, *Bacillus* sp. resisten terhadap variasi konsentrasi besi yang diujikan. Total koloni paling besar adalah pada konsentrasi 50 mg/L dengan rata-rata total koloni $4,70 \times 10^7$ cfu/ml. Berdasarkan (Miranti dkk., 2021), semakin tinggi konsentrasi pada logam maka, semakin sedikit koloni bakteri yang tumbuh. Faktor yang menyebabkan bakteri tumbuh yaitu karena logam besi merupakan komponen penting pada pigmentasi sitokrom respirasi seluler dan pemeliharaan metabolisme seluler (Chen dkk., 2022; Krohling dkk., 2016; Kaushik dkk., 2016). Respirasi sel menghasilkan energi yang tersedia yang dapat digunakan untuk melakukan pembelahan sel dan pertumbuhan koloni tumbuh (Fahrudin dkk., 2019).

Kemampuan hidup bakteri pada media dengan penambahan Fe, dapat menunjukkan resistensi terhadap logam. Resistensi dapat terjadi karena adaptasi dari bakteri, perbedaan kromosomal, plasmid dan transposon yang menangani mekanisme resistensi pada masing-masing bakteri (Kepel dkk., 2021). Mekanisme resistensi pada bakteri terhadap logam berat dapat terjadi secara ekstraseluler dan intraseluler. Mekanisme ekstraseluler berperan dalam pencegahan masuknya logam berat ke dalam tubuh bakteri, dengan memproduksi polimer ekstraseluler yang dikeluarkan dari dinding sel dengan membuat ikatan dengan ion logam diluar sel (Fahrudin dkk., 2019).

Sedangkan pada mekanisme intraseluler, mekanisme melakukan upaya preventif untuk mencegah adanya ion logam yang mengganggu metabolisme sel bakteri dengan menghasilkan enzim fosfatase dan *Metallothioneins* yang dapat mengikat ion logam di dalam tubuh sel itu sendiri, atau akumulasi ion logam pada organ tertentu, seperti vakuola dan mitokondria (Rohmah, 2017). Fahrudin dkk. (2019) memaparkan, bakteri yang resisten terhadap logam disebabkan oleh kemampuan mendetoksifikasi pengaruh logam berat dengan adanya material atau protein tertentu seperti protein Fur dan siderofor pada sel yang mampu mengikat besi. Protein Fur merupakan protein yang mengatur zat besi secara umum pada sebagian prokariota, termasuk *Bacillus* sp. (Kaushik et al., 2016).

Pada penelitian terdahulu, isolat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari Sungai Kalimas Surabaya resisten logam pada rentang konsentrasi 50–300 mg/L (Farisna dan Zulaika, 2015). Pada penelitian Baby dkk. (2013) beberapa spesies pada *Bacillus* resisten terhadap Fe sampai dengan 6000 mg/L walaupun terdapat beberapa species pada *Bacillus* yang hanya mampu resisten hingga 100 mg/L. Koloni tumbuh dengan baik pada variasi konsentrasi yang diujikan, karena Fe merupakan logam esensial bagi pertumbuhan *Bacillus* sp. (Verdian, 2015). Logam besi juga merupakan komponen pigmentasi sitokrom pada respirasi seluler, juga sebagai kofaktor enzim.

Salah satu penghalang pertahanan melawan adanya polusi logam adalah dengan protein khusus yaitu protein fur (*Ferric Uptake Regulator*) yang mempengaruhi pengambilan berlebihan pada saat lingkungan hidup bakteri kaya akan Fe dengan menyerap Fe dan mengurangi ketersediaannya di lingkungan, melakukan pengembangan sistem penyerapan besi yang diperantarai oleh siderofor (Marcoleta dkk., 2018). Berdasarkan paparan dapat dijelaskan bahwa, pada media dengan isolat *Bacillus* sp. Pada media diperkaya Fe pada konsentrasi rendah, ditemukan peningkatan pertumbuhan bakteri, sedangkan pada isolat yang berkonsentrasi tinggi ditemukan penurunan pertumbuhan bakteri. Namun pada konsentrasi yang lebih tinggi, bakteri dapat tumbuh karena terdapat faktor yang mempengaruhinya.

4.2.2 Laju pertumbuhan *Bacillus* sp. terhadap media dengan kandungan logam besi (Fe)

Laju pertumbuhan *Bacillus* dapat dilihat pada gambar 4.3 dan 4.4. Laju pertumbuhan bakteri adalah penambahan populasi sel dan kemampuan berkembang biak pada bakteri yang digambarkan dalam kurva pertumbuhan (Khrisnamurthi dkk., 2021). Kurva pertumbuhan bakteri terdiri dari 4 fase yaitu, fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian (Cappucino dan Sherman, 2014). Berdasarkan Gambar 4.3, isolat *Bacillus* sp mampu dalam membelah dan bertahan hidup. Pertumbuhan isolat *Bacillus* sp. pada media NB dengan konsentrasi 50 mg/L FeSO₄, diawali dengan fase adaptasi yaitu fase lag yang berlangsung selama 8 jam, yaitu dari jam 0-8 dengan nilai absorbansi 0,75. Pada media NB tanpa penambahan

FeSO₄, fase lag dilalui selama 8 jam. Namun pertumbuhan *Bacillus* sp. pada media NB-FeSO₄ 50 mg/L lebih cepat dibandingkan media tanpa logam Fe.

Besi merupakan logam esensial yang dibutuhkan sebagai mikronutrien bagi bakteri (Júnior dkk., 2022 dan Mendoza-Suárez dkk., 2021). Perubahan fase lag ditandai dengan tidak adanya penambahan populasi bakteri (Haque dkk., 2017), adanya penambahan pada substansi seluler dan perubahan komposisi kimiawi (Capuccino dan Sherman, 2014). Lama atau tidaknya fase lag sangat ditentukan oleh jumlah sel yang diinokulasikan serta media pertumbuhan yang digunakan. Fase lag pada kurva pertumbuhan *Bacillus* sp. pada media NB tanpa penambahan Fe, terjadi karena adanya perpindahan isolat *Bacillus* sp dari media NA padat ke media NB yang sifatnya cair. Perpindahan antar media, mengharuskan *Bacillus* sp. untuk beradaptasi ke jenis media yang baru. Pada fase lag, mikroorganisme membutuhkan waktu untuk aklimatisasi dengan lingkungan baru (Verdian, 2015).

Berdasarkan Gambar 4.3 dan 4.4, isolat *Bacillus* sp yang ditumbuhkan pada media NA dengan penambahan FeSO₄ dan tanpa penambahan logam Fe memulai fase log pada jam yang sama yaitu jam ke 16-168. Fase log berjalan selama 152 jam ditandai dengan pertumbuhan yang signifikan dari sel isolat *Bacillus* sp. Peningkatan densitas sel membuktikan bahwa, isolat *Bacillus* sp. dapat memanfaatkan nutrisi yang ada pada media. Saat fase log terjadi, adanya penambahan sel sebanyak 2 kali lipat dibandingkan pada saat fase lag terjadi. Sel bakteri akan terus membelah hingga jumlah maksimum sel tercapai (Capuccino & Sherman, 2014). Kecepatan tumbuh isolat pada fase log, dipengaruhi oleh media tumbuhnya, kandungan nutrisi dan pH, kondisi lingkungan, suhu dan kelembaban udara (Igiri dkk., 2018).

Pertumbuhan isolat *Bacillus* sp. pada media NB dengan penambahan FeSO₄ dan tanpa penambahan logam Fe dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan 4.4. Pada pertumbuhan *Bacillus* sp. dengan penambahan Fe, fase stasioner terjadi selama 184 jam yaitu pada jam ke 176-360. Sedangkan pada pertumbuhan *Bacillus* sp. tanpa penambahan Fe, fase stasioner terjadi pada jam ke 168-312 selama 144 jam. Panjang fase pada media tanpa penambahan logam lebih pendek daripada media dengan penambahan logam Fe. Pada fase ini, pertumbuhan sel bersifat stasioner,

karena sel telah kehabisan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pertumbuhan sel akan seimbang jika, jumlah kematian pada sel-sel yang lama bernilai konstan.

Fase kematian terjadi pada jam ke 368-400 selama 32 jam. Sedangkan pada media yang berisi 0 mg/L logam Fe, fase kematian berlangsung selama 80 jam pada jam ke 320-400. Pada fase ini, jumlah sel mati lebih besar daripada jumlah sel hidup karena media kekurangan nutrisi, sehingga populasi *Bacillus* sp. menurun. Pertumbuhan *Bacillus* sp. yang ditambahkan logam Fe 50 mg/L pada media yang berisi suspensi menyebabkan fase kematian terjadi lebih cepat daripada suspensi tanpa logam. Hal ini disebabkan oleh adanya kekurangan nutrisi akibat terpapar konsentrasi logam yang tinggi.

Pertumbuhan merupakan respon dari proses metabolisme yang dihasilkan, dan proses katalisasi oleh enzim yang akan mempercepat proses pertumbuhan (Rosmaniya dan Yanti, 2020). Peningkatan populasi pada pertumbuhan isolat pada media dengan penambahan logam Fe, menunjukkan bahwa logam penting untuk proses biologis mikroba dan juga, toksisitas logam tergantung pada penggunaan dosis yang dipakai (Oladipo dkk., 2018).

Berdasarkan hasil penelitian, diasumsikan bahwa, fase paling lama dalam kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* sp. adalah fase stasioner. Memasuki fase stasioner pertumbuhan mulai berhenti, tetapi sel-sel tetap aktif secara metabolik. Pada fase stasioner, sel menjadi bulat dan kecil, fluiditas membran yang berkurang, aktivasi mekanisme ini memungkinkan bakteri untuk memprogram ulang ekspresi pada gen untuk aklimatisasi (penyesuaian) dengan tekanan yang berbeda. *Bacillus* sp membentuk spora resisten yang membantu mereka bertahan di lingkungan dengan saturasi polutan yang jenuh (Rohmah, 2017). Sel bakteri telah mati, mengalami mekanisme *passive uptake*, adanya proses pengikatan ion logam pada permukaan sel bakteri, sehingga ion logam yang diserap jauh lebih tinggi dibandingkan pada fase log (Shamim, 2018). Pada penelitian ini, isolat *Bacillus* sp. yang diujikan memiliki kemampuan yang baik pada media yang diperkaya FeSO_4 dengan kadar 50 mg/L.

4.2.3 Kemampuan bioremediasi *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh

Tahapan terakhir pada penelitian ini adalah tahapan uji bioremediasi logam besi oleh bakteri. Tujuan uji bioremediasi adalah untuk mengetahui kemampuan degradasi isolat *Bacillus* sp. terhadap Fe. Pengukuran kadar logam Fe dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Permulaan proses dilakukan dengan membuat media NB dan dilakukan penambahan Fe sulfat yang berfungsi sebagai sumber Fe dengan konsentrasi 50 mg/L. Media NB yang telah ditambahkan logam diinokulasikan dengan isolat uji, yaitu *Bacillus* sp. dan setelah itu, media diinkubasi dengan *waterbath shaker* selama 72 jam dengan variasi masing-masing pH 4, 5 dan 6.

Penggunaan *shaker* digunakan untuk memaksimalkan kontak antara media dan isolat yang diujikan. Sebelum diukur dengan spektrofotometer UV-VIS sampel disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 8000 rpm dengan hasil cairan supernatan yang berasal dari sampel yang disentrifugasi. Setelah itu, diukur dengan instrumen spektrofotometer UV-VIS terhadap media untuk mengetahui kadar logam Fe yang tersisa setelah proses inokulasi.

Pengukuran logam Fe dengan instrumen spektrofotometer UV-VIS, menggunakan larutan standar dengan konsentrasi yang berbeda. Larutan standar dibuat berdasarkan larutan baku, yang merupakan larutan induk yang diencerkan sehingga, didapatkan pengenceran dengan konsentrasi yang lebih rendah. Pengukuran absorbansi larutan standar dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Berdasarkan hasil pengukuran, diketahui bahwa logam Fe menurun berdasarkan lamanya waktu inkubasi dan variasi nilai pH.

Hasil analisis spektrofotometer UV-VIS pada media NB yang diperkaya FeSO_4 50 mg/L dengan variasi perlakuan pH menunjukkan adanya penurunan konsentrasi pada logam Fe (Gambar 4.6) *Bacillus* sp. dari sedimen Sungai Krueng Aceh mampu dalam mengurangi logam Fe dan berpotensi sebagai agen bioremediasi. Berdasarkan pengujian statistik dengan Anova satu arah, penurunan konsentrasi logam Fe dipengaruhi oleh variasi nilai pH dan lama waktu inkubasi

dengan signifikansi sebesar $0,000 < 0,005$. Jika nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 maka, perlakuan pH yang berbeda pada waktu inkubasi yang sama berpengaruh nyata terhadap penurunan kadar logam FeSO_4 . Variasi pH yang digunakan pada penelitian yaitu, pH 4, 5 dan 6 dengan waktu inkubasi selama 72 jam. Pada pH 4 didapatkan persentase penurunan Fe sebesar 88,44%, adapun pada pH 6, persentase penurunan logam Fe senilai 78,84% dan 87,40%. Penurunan kadar logam Fe yang terjadi berpengaruh secara signifikan $0,000 < 0,05$ dengan perlakuan variasi pH. Hal ini menunjukkan bahwa derajat pH dan lamanya waktu inkubasi mempengaruhi dan signifikan dalam menurunkan kadar Fe.

Variasi pH yang memiliki penurunan kadar Fe tertinggi adalah pH 4 pada jam ke 72 dengan persentase penurunan hingga 88%. Efektivitas penurunan kadar Fe, didukung oleh faktor lingkungan tempat isolat *Bacillus* sp hidup. Hal ini sesuai dengan Gauvry dkk. (2020) yang menyatakan bahwa, *Bacillus* sp. mampu hidup pada pH 4-9 dan kisaran suhu $5,5-55^\circ\text{C}$. Bioremediasi logam berat oleh mikroorganisme dilakukan dengan adanya pembentukan ikatan antara logam berat dan sel, baik secara absorpsi atau kompleksasi sehingga logam tersebut terakumulasi dan terikat di dalam sel (Igiri dkk., 2018).

Berdasarkan Mousavi dkk. (2021), saat bioremediasi terjadi, enzim sangat efisien dalam mengubah struktur kimia yang kompleks pada polutan menjadi metabolit yang tidak berbahaya dan beracun. Peningkatan penurunan logam yang tinggi pada ketiga perlakuan pH mengindikasikan isolat *Bacillus* sp. meremediasi logam. Mekanisme pada bakteri dalam membersihkan logam dilakukan dengan adanya akumulasi, presipitasi dan penyerapan logam oleh permukaan sel (Rahadi dkk., 2020).

Analisis data dilakukan dengan menggunakan Anova satu arah pada SPSS, didapatkan hasil bahwa, nilai pH dan waktu berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan konsentrasi logam Fe pada media NB yang berisi suspensi *Bacillus* sp. Hasil analisis satu arah pada variasi yang berbeda memperoleh data bahwa, output nilai pH dan waktu masing-masing adalah $0,000 < 0,05$ sehingga dapat diartikan adanya pengaruh pH dan waktu kontak terhadap penurunan kadar logam Fe.

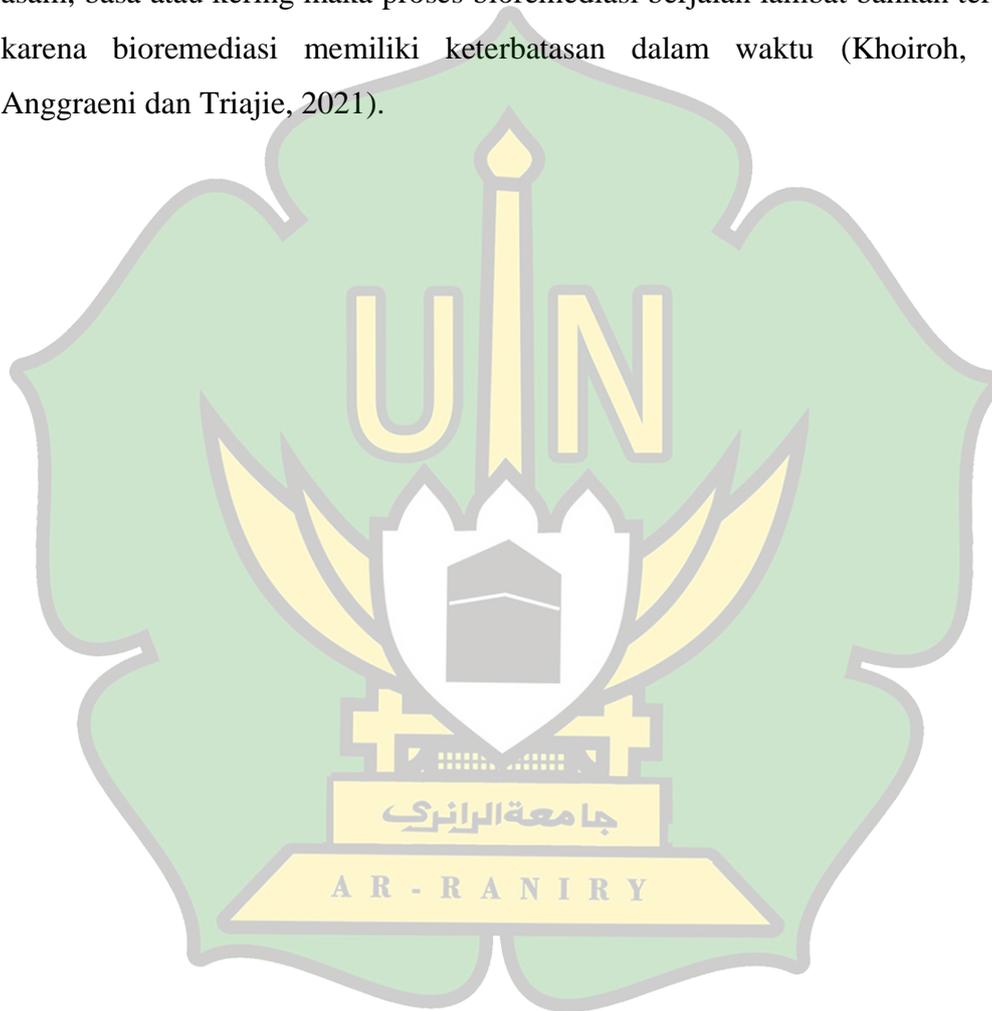
Derajat pH merupakan indikator penting pada saat proses bioremediasi terjadi. Besar kecilnya nilai pH mempengaruhi kehidupan mikroorganisme (Ratnasari, 2020). Sebagian besar, bioremediasi berlangsung pada pH netral, namun pada penelitian ini derajat pH dengan persentase penurunan kadar Fe paling tinggi adalah pH 4 dengan nilai $p < 0,005$ sebesar 88,44%. Hal ini disebabkan oleh bakteri memiliki mekanisme homeostasis pH karena adanya membran sebagai transportasi bagi kation dan anion pada kondisi tercekam pH. Pada kondisi yang lebih asam, konsentrasi hidrogen (H^+) diluar sel akan lebih banyak.

Penurunan konsentrasi pada derajat pH 4 lebih tinggi dibandingkan variasi pH 5 dan 6. Hal ini menunjukkan derajat pH pada homeostasis berjalan dengan baik antara intraseluler dan ekstraseluler. Sedangkan pada pH 5 dan 6 hasil persentase penurunan logam turun hingga 78,44% dan 87,4% yang menunjukkan bahwa penurunan kadar Fe tidak ada perbedaan yang signifikan antara pH 4. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri tumbuh dengan baik pada media, dan diasumsikan lebih banyak penyerapan logam terjadi. Berdasarkan Fitria dan Zulaikha (2019) terdapat perbedaan pH pada media dan pH sitoplasma. Sehingga pH antara ekstraseluler dan intraseluler bekerja dengan baik.

Gambar 4.6 menunjukkan grafik kadar logam selama proses bioremediasi. Pada 0 jam inkubasi masing-masing perlakuan adalah 30,7, 31,81, 30,05 mg/L. Inkubasi selama 72 jam logam besi (Fe) mengalami penurunan pada semua perlakuan signifikan $p < 0,05$ hingga dibawah 10 mg/L pada masing-masing perlakuan pH. Hal ini berarti, bioremediasi dari *Bacillus* sp. pada media perlakuan memiliki kemampuan yang tinggi sebagai agen bioremediasi. Adanya fluktuasi penurunan konsentrasi yang terjadi antar perlakuan menunjukkan adanya penurunan logam.

Kadar Fe kemungkinan akan mengalami penurunan akibat penguapan pengencer akuades. Apabila kadar logam naik diasumsikan terjadinya penguapan kadar air pada Fe sehingga, konsentrasi meningkat karena adanya pemekatan logam (Komari, 2013). Kemampuan bioremediasi dari *Bacillus* sp. juga menentukan konsentrasi Fe pada media tumbuh. Semakin lama waktu inkubasi menyebabkan

penurunan kinerja oleh bakteri yang telah mengalami titik jenuh sehingga memiliki kecenderungan dalam mengikat logam berkurang dan dapat mengeluarkan kembali logam berat yang telah di serap. Kemampuan tumbuh makhluk hidup dalam lingkungan yang tercemar dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, penyerapan, *desorption*, difusi dan *dissolution*. Bila lingkungan terlalu dingin, basah, panas, asam, basa atau kering maka proses bioremediasi berjalan lambat bahkan terhenti, karena bioremediasi memiliki keterbatasan dalam waktu (Khoiroh, 2014; Anggraeni dan Triajie, 2021).



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Isolat bakteri dari Sungai Krueng Aceh resisten terhadap logam Fe pada konsentrasi 25, 50 dan 75 mg/L.
2. Laju pertumbuhan bakteri menunjukkan variasi panjang fase pertumbuhan yang berbeda. Kurva pertumbuhan bakteri pada media dengan konsentrasi Fe 50 mg/L, menunjukkan fase log lebih panjang dari fase lain. Untuk pertumbuhan bakteri tanpa logam Fe, fase pertumbuhan paling panjang berada di fase stasioner.
3. Pada tahapan pengujian bioremediasi, penurunan konsentrasi logam signifikan pada pH 4 dengan persentase sebesar 88,44% pada jam ke 72. Sedangkan pada pH 5 dan pH 6 penurunan kadar Fe terjadi sebesar 78,48% dan 87,4% pada jam ke 72 masa inkubasi. Hasil analisis data menggunakan *One Way Anova* diperoleh hasil yang signifikan karena nilai $p < 0,05$ mengindikasikan derajat pH dan waktu inkubasi mempengaruhi laju penurunan kadar logam Fe.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian, terdapat beberapa saran yang ditujukan, antara lain:

1. Perlu dilakukan adanya identifikasi lebih lanjut secara molekuler sebagai validitas bagi isolat *Bacillus* sp.
2. Untuk penelitian selanjutnya, diharapkan isolat *Bacillus* sp. dapat digunakan sebagai akumulator logam-logam berat yang ada pada Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL).

DAFTAR PUSTAKA

- Adhani, R., & Husaini. (2017). Logam Berat Sekitar Manusia. In *Lambang Mangkurat University Press*.
- Ahmad, R. Z. (2018). *Mikoremediasi Menghilangkan Polusi Logam Berat pada Lahan Bekas Tambang untuk Lahan Peternakan (Mycoremediation to Remove Heavy Metal Pollution in Post-Mining Areas for Farmland Utilization)*. 28(1), 41–50.
- Aliyanta, B., Sumarlin, & Mujab, A. S. (2011). *Penggunaan Biokompos dalam Bioremediasi Lahan Tercemar Limbah Minyak Bumi*. 2(3), 430–442.
- Alvarez, E. C., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluasi del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. In *Bogotá* (Vol. 14, Issue 26).
- Andhini, N. F. (2017). Spektrofotometer. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Anggraeni, A., & Triajie, H. (2021). Uji Kemampuan Bakteri (*Pseudomonas Aeruginosa*) Dalam Proses Biodegradasi Pencemaran Logam Berat Timbal (Pb), Di Perairan Timur Kamal Kabupaten Bangkalan. *Juvenil:Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan*, 2 (3), 176–185. doi.org/10.21107/juvenil.v2i3.11754
- Anusha, P., & Natarajan, D. (2020). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Bioremediation Potency of Multi-Metal Tolerant Native Bacteria *Bacillus cereus* Isolated from Bauxite Mines, Kolli Hills, Tamilnadu - A Lab to Land Approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25(November 2019), 101581. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101581>
- Arba, H. N. (2017). Identifikasi Logam Besi (Fe) Pada Zonasi Radius 1-5 Km Tempat Pembuangan Akhir (Tpa) Antang Makassar Terhadap Pengaruh Kualitas Air Sumur Gali.
- Baby, V., Rajakumar, S., dan Ayyasamy, P. M. (2013). Reduction of Ferric Iron in Synthetic Medium Amended with Acetate As A Sole Carbon Source. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* Vol. 2 No. 12: 501-513.
- Banerjee, A., Jhariya, M. K., Yadav, D. K., & Raj, A. (2018). Micro-remediation of Metals: A New Frontier in Bioremediation. In *Handbook of Environmental*

Materials Management. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_10-1

- Bertranda, R. L. (2019). Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of Bacteriology*, 201(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00697-18>
- Capuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin/ Cummings Publishing Co. Inc.
- Chandrasekaran, S., Sankaran Pillai, G., & Venkatraman, B. (2020). Spatial and heavy metal assessment in beach sands of east coast of Tamil Nadu, India. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 14(June), 100324. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100324>
- Chellaiah, E. R., Ravi, P., & Uthandakalaipandian, R. (2021). Isolation and identification of high fluoride resistant bacteria from water samples of Dindigul district, Tamil Nadu, South India. *Current Research in Microbial Sciences*, 2(March), 100038. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100038>
- Chen, X., Wang, J., Du, Z., Shu, Q., Zheng, Z., & Luo, X. (2022). *Transcriptomic Analysis of the Molecular Response Mechanism of Microcystis aeruginosa to Iron Limitation Stress*.
- Chuljerm, H., Deudom, M., Fucharoen, S., Mazzacuva, F., Hider, R. C., Srichairatanakool, S., & Cilibrizzi, A. (2020). Characterization of two siderophores produced by *Bacillus megaterium*: A preliminary investigation into their potential as therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1864(10), 129670. doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129670
- De Fretes, C. E., Sutiknowati, L. I., & Falahudin, D. (2019). Isolasi dan identifikasi bakteri toleran logam berat dari sedimen mangrove di Pengudang dan Tanjung Uban, Pulau Bintan, Indonesia. *Oseanologi Dan Limnologi Di Indonesia*, 4(2), 71. <https://doi.org/10.14203/oldi.2019.v4i2.244>
- Dhimas, F., Yulianto, B., & Sedjati, S. (2013). Studi Kandungan Logam Berat Besi (Fe) dalam Air, Sedimen. *Journal of Marine Research*, 2, 45–54.
- Donati, E. R. (2018). *Heavy Metals in The Environment: Microorganism and Bioremediation*.
- Dos Santos Júnior, V., Nizoli, É., Galvan, D., Gomes, R. J., Biz, G., Ressutte, J. B., Rocha, T. de S., & Spinosa, W. A. (2022). Micronutrient Requirements And Effects On Cellular Growth Of Acetic Acid Bacteria Involved In Vinegar Production. *Food Science and Technology (Brazil)*, 42, 1–10. <https://doi.org/10.1590/fst.05121>
- Fahrudin, Haedar, N., Sentosa, S., & Wahyuni, S. (2019). *Uji Kemampuan*

Tumbuh Isolat Bakteri dari Air dan Sedimen Sungai Tallo Terhadap Logam Timbal (Pb). 10(2), 58–64.

- Febrina, L. and Ayuna, A. (2015) 'Studi Penurunan Kadar Besi (Fe) Dan Mangan (Mn) Dalam Air Tanah Menggunakan Saringan Keramik', *Jurnal Teknologi*, 7, pp. 35–40. doi: 10.24853/jurtek.7.1.35-44.
- Filote, C., Simion, I. M., Ros, M., Hlihor, R. M., Apostol, M., & Gavrilesco, M. (2021). *Sustainable Application of Biosorption and Bioaccumulation of Persistent Pollutants in Wastewater Treatment: Current Practice*. 1–38.
- Fitria, A. N., & Zulaika, E. (2019). Aklimatisasi pH dan Pola Pertumbuhan *Bacillus cereus* S1 pada Medium MSM Modifikasi. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 7(2), 3–5. <https://doi.org/10.12962/j23373520.v7i2.36788>
- Gauvry, E., Mathot, A., Couvert, O., & Coroller, L. (2020). Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *International Journal of Food Microbiology*, 108915. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108915>
- Guo, Y., Liu, C., Ye, R., & Duan, Q. (2020). Advances on water quality detection by uv-vis spectroscopy. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10 (19), 1–18.
- Hakim, F. (2020). Uji Reliabilitas Metode Suseptibilitas Magnetik dalam Memonitoring Logam Berat pada Sedimen Dasar Sungai Krueng Aceh. *Skripsi*, 1–100.
- Hassan, Z., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Nafees, M., & Waseem, M. (2017). *Bioremediation Agents (Bacteria, Fungi, and Algae) in Alleviating Heavy Metal Toxicity. Probiotics in Agroecosystem*. 1–537. doi.org/10.1007/978-981-10-4059-7
- Hamdan, A. M., Kirana, K. H., Hakim, F., Iksan, M., Bijaksana, S., Mariyanto, M., Ashari, T. M., Ngkoimani, O., Kurniawan, H., Pratama, A., & Wahid, M. A. (2022). Magnetic susceptibilities of surface sediments from estuary rivers in volcanic regions. *Environmental monitoring and assessment*, 194(3), 239. doi.org/10.1007/s10661-022-09891-z
- Igiri, B. E., Okoduwa, S., Idoko, G., Akabuogu, E., Adeyi, A., & Ejiogu, I. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of Toxicology*, May. <https://doi.org/1155/2018/2568038> Review
- Ikerismawati, S. (2019). Bioremediasi Pb Oleh Bakteri Indigen Limbah Cair Agar. *Jurnal Biosilampari: Jurnal Biologi*, 1(2), 51–58. doi.org/10.31540/biosilampari.v1i2.288

- Imron, M. F., & Purwanti, I. F. (2016). Uji Kemampuan Bakteri Azotobacter S8 dan Bacillus subtilis untuk Menyisihkan Trivalent Chromium pada Limbah Cair. *Jurnal Teknik*, 5(1), 2301–9271.
- Junopia, A. C. (2015). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Logam Timbal (Pb) Yang Bersumber dari Danau Tempe Kabupaten Wajo Sulawesi Selatan*.
- Kafilzadeh, F., Ebrahimnezhad, M., & Tahery, Y. (2015). Isolation and Identification of Endosulfan- Degrading Bacteria and Evaluation of Their Bioremediation in Kor River , Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 6(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.12.003>
- Kallang, G. K. (2020). Mikoremediasi Logam Berat Berat Besi (Fe) Pada Sedimen IPAL Menggunakan Aspergillus niger Penambahan Variasi Bulking Agent (Vol. 68, Issue 1).
- Kaushik, M. S., Singh, P., Tiwari, B., & Mishra, A. K. (2016). *Ferric Uptake Regulator (FUR) protein : properties and implications in cyanobacteria*. 61–75. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1134-x>
- Kepel, B. J., Bodhi, W., Fatimawali, & Tallei, T. E. (2021). Heavy metal (As, Cd, Cr, Hg, Pb) analysis and identification of heavy metal resistant bacteria in sediments from Manado Bay. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 926(1), 0–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/926/1/012096>
- Khrisnamurthi, V., Niyonshuti, I., Chen, J., & Wang, Y. (2021). A New Analysis Method for Evaluating Bacterial Growth with Microplate readers. *Plos One*, January. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245205>
- Kowalczyk, A., Martin, T. J., Price, O. R., van Egmond, R. A., Finnegan, C. J., Schäfer, H., Davenport, R. J., & Bending, G. D. (2015). Refinement of Biodegradation Tests Methodologies and The Proposed Utility of New Microbial Ecology Techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 09–22. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2014.09.021>
- Krohling, C. A., Eutrópio, F. J., Bertolazi, A. A., Dobbss, L. B., Campostrini, E., Dias, T., & Ramos, A. C. (2016). Ecophysiology of iron homeostasis in plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62(1), 39–47. <https://doi.org/10.1080/00380768.2015.1123116>.
- Kumar Mohapatra, R., Srichandan, H., Mishra, S., & Parhi, P. K. (2020). *Native Soil Bacteria: Potential Agent for Bioremediation. Soil Microenvironment for Bioremediation and Polymer Production*. 17–34.

- Lestari, P. (2018). Perbedaan Angka Kuman Udara Sebelum Dan Sesudah Penyinaran Lampu Ultraviolet 90 Watt Di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. *Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta*, 6(19), 387–387.
- Lubis, S. S. (2020). Bioremediasi Logam Berat Oleh Fungi Laut. *Amina*, 1(2), 91–102. <https://doi.org/10.22373/amina.v1i2.411>
- Marcoleta, E., Gutie, S., Hurtado, F., & Argando, Y. (2018). *The Ferric uptake regulator (Fur) and iron availability control the production and maturation of the antibacterial peptide microcin E492*. 1–26.
- Mendoza-Suárez, M., Andersen, S. U., Poole, P. S., & Sánchez-Cañizares, C. (2021). Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 12(August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.690567>
- Miranti, I., Lingga, R., & Fabiani, V. A. (2021). *Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Resisten Timbal Dari Sedimen Laut Terdampak Penambangan Timah Inkonvensional Di Pantai Sampur, Bangka Tengah*. 7(2), 66–74.
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Iman Moezzi, S. M., Ravan, N., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Yousefi, K., & Behbudi, G. (2021). Recent Advances in Enzymes for the Bioremediation of Pollutants. *Biochemistry Research International*, 2021. doi.org/10.1155/2021/5599204
- Muthusamy, G., Jayaprakash, K., Mythili, R., Arts, M., Thangaswamy, S., & Arts, M. (2019). *Bioaugmentation and Biostimulation Remediation Technologies for Heavy Metal Lead Contaminant*. January. <https://doi.org/10.1201/b22151-2>
- Nanda, M., Kumar, V., & Sharma, D. K. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to ‘clean-up’ heavy metal contaminants from water. *Aquatic Toxicology*, 212(January), 1–10. doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.011
- Nugraha, W. C., Elishian, C., & Ketria, R. (2014). Penentuan Logam Besi dan Seng Total dalam Produk Perikanan Menggunakan Flame Atomic Absorbtion Spectrophotometry dan Pengukuran Nilai Ketidakpastiannya. *JKTI*, 16, 62–67.
- Nurhayati, I., & Vigiani, S. (2018). *Penurunan Kadar Besi (Fe), Kromium (Cr), COD dan BOD Limbah Cair Laboraturium dengan Pengenceran, Koagulasi dan Adsorpsi*. 14(1), 74–87.
- Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International*

Journal of Environmental Research and Public Health, 14(12).
<https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>

Oladipo, O. G., Ezeokoli, O. T., Maboeta, M. S., Bezuidenhout, J. J., Tiedt, L. R., Jordaan, A., & Bezuidenhout, C. C. (2018). Tolerance and growth kinetics of bacteria isolated from gold and gemstone mining sites in response to heavy metal concentrations. *Journal of Environmental Management*, 212, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.038>

Pambudiono, A., Suarsini, E., & Amin, M. (2018). *The Potential of Indigenous Bacteria for Removing Cadmium from Industrial Wastewater in*. 8(1), 62–67. <https://doi.org/10.11594/jtls.08.01.11>

Park, J. H., Paneerselvan, P., Choppala, G., Bolan, N., & Chung, J. W. (2011). Role of Organic Amendments of Enhanced Bioremediation of Heavy Metalloid Contaminated Soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2), 540–574.

Perdana, J. (2012). *Uji Resistensi Dan Uji Biodegradasi Logam Berat (Pb, Zn Dan Hg) Oleh Isolat Bakteri Lumpur Pantai Kenjeran*. Universitas Airlangga.

Pratiwi, R. A., & Nandiyanto, A. B. D. (2022). How to Read and Interpret UV-VIS Spectrophotometric Results in Determining the Structure of Chemical Compounds. *Indonesian Journal of Educational Research and Technology*, 2(1), 1–20. <https://doi.org/10.17509/ijert.v2i1.35171>

Priadie, B. (2012). Teknik Bioremediasi Dalam Upaya Pengendalian Pencemaran Air. *Ilmu Lingkungan*, 10(1), 38–48.

Priyadarshanee, M., & Das, S. (2021). Biosorption and Removal of Toxic Heavy Metals by Metal Tolerating Bacteria for Bioremediation of Metal Contamination: A Comprehensive Review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104686. doi.org/10.1016/j.jece.2020.104686

Puspita, F., Ali, M., & Pratama, R. (2017). Isolasi dan karakterisasi morfologi dan fisiologi bakteri *Bacillus* sp. endofitik dari tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Agrotek*, 6(2), 44–49.

Puspitasari, D., Pramono, H., & Oedjijono, O. (2014). Identifikasi Bakteri Pengoksidasi Besi dan Sulfur Berdasarkan Gen 16s Rrna Dari Lahan Tambang Timah Di BelitunG. *Scripta Biologica*, 1(1), 10. <https://doi.org/10.20884/1.sb.2014.1.1.12>

Putri, P. D. K. (2020). *Perbedaan Kualitas Air Limbah Rumah Sakit Wangaya Denpasar Tahun 2020*. 9–41.

Rahadi, B., Susanawati, L. D., & Agustianingrum, R. (2020). Bioremediasi Logam

Timbal (Pb) Menggunakan Bakteri Indigenous Pada Tanah Tercemar Air Lindi (Leachate) Bioremediation of Lead using Indigenous Bacteria Isolated from Leachete Contaminated Soil. 11–18.

Ratnasari, S. D. (2020). *Perubahan Parameter Fisika Pada Proses Biodegradasi Limbah Tenun oleh Bakteri Indigenous*. Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.

Rohmah, N. S. (2017). Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Timbal (Pb) dari Lumpur Lapindo. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Issue January).

Sari, D. Y. R., Saputro, T. B., & Muhibuddin, A. (2016). Uji Potensi Fermentasi Etanol Yeast Tanah yang Diisolasi dari Metode Budidaya SDN di Daerah Batu, Jawa Timur. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 5(2), 5–9.

Septiana, N. S. (2016). *Pengaruh Penambahan Co-Substrat pada Biodegradasi Crude Oil*.

Setiawan, A., Ramadani, T. A., & Hanastasia, R. L. (2020). Artikel Riset Pengolahan Logam Pb(II) pada Limbah Cair Menggunakan Metode Kombinasi Elektrokoagulasi–Adsorpsi Karbon Aktif. *Jurnal Presipitasi*, 17(2), 96–103.

Shamim, S. (2018). Biosorption of Heavy Metals. *Biosorption*. doi.org/10.5772/intechopen.72099

Taufikurrahman, T., Juanda, A., & Suryati, A. (2020). *Pengaruh Cekaman Logam Berat Kadmium (Cd) Dengan Penambahan Nitrogen Logam Berat Terhadap Laju Relatif*. May.

Utami, R., Rismawati, W., & Sapanli, K. (2018). Pemanfaatan Mangrove Untuk Mengurangi Logam Berat Di Perairan Utilization of Mangroves To Reduce Heavy Metals in The Waters. *Prosiding Seminar Nasional Hari Air Dunia*, 2(1), 141–153.

Yani, M., & Akbar, Y. (2018). Proses Biodegradasi Minyak Diesel Oleh Campuran Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon. *Teknologi Industri Pertanian*, 19(1), 40–44.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Konsentrasi Larutan FeSO₄

A. Perhitungan Konsentrasi FeSO₄

$$1000 \text{ ppm} = 1 \text{ M} \rightarrow 25.50.75 \text{ mg/L}$$

$$M = \frac{gr}{mr} \times \frac{1000}{v}$$

$$1 \text{ M} = \frac{x}{260} \times \frac{1000}{100}$$

$$x = 26 \text{ gram}$$

Larutan baku induk dibuat dengan cara menimbang sebanyak 4,66 gr FeSO₄.6H₂O kemudian diencerkan dengan akuades 1000 ml pada labu ukur hingga tanda batas.

$$\begin{aligned} Gr &= \frac{Bm \text{ FeSO}_4, 6\text{H}_2\text{O}}{BA \text{ Fe} \times 1 \text{ gr}} \\ &= \frac{55.84 \times 1}{260} \\ &= 4.66 \text{ gr} \end{aligned}$$

➤ Konsentrasi 25 mg/L

$$V_1, M_1 = V_2, M_2$$

$$V_1, 1000 = 50,25$$

$$V_1 = \frac{1250}{1000}$$

$$V_1 = 1.25 \text{ ml}$$

➤ Konsentrasi 50 mg/L

$$V_1, M_1 = V_2, M_2$$

$$V_1, 1000 = 50,50$$

$$V_1 = \frac{2500}{1000}$$

$$V_1 = 2.5 \text{ ml}$$

➤ Konsentrasi 75 mg/L

$$V_1, M_1 = V_2, M_2$$

$$V_1, 1000 = 50,75$$
$$V_1 = \frac{3750}{1000}$$
$$V_1 = 3.75 \text{ ml}$$

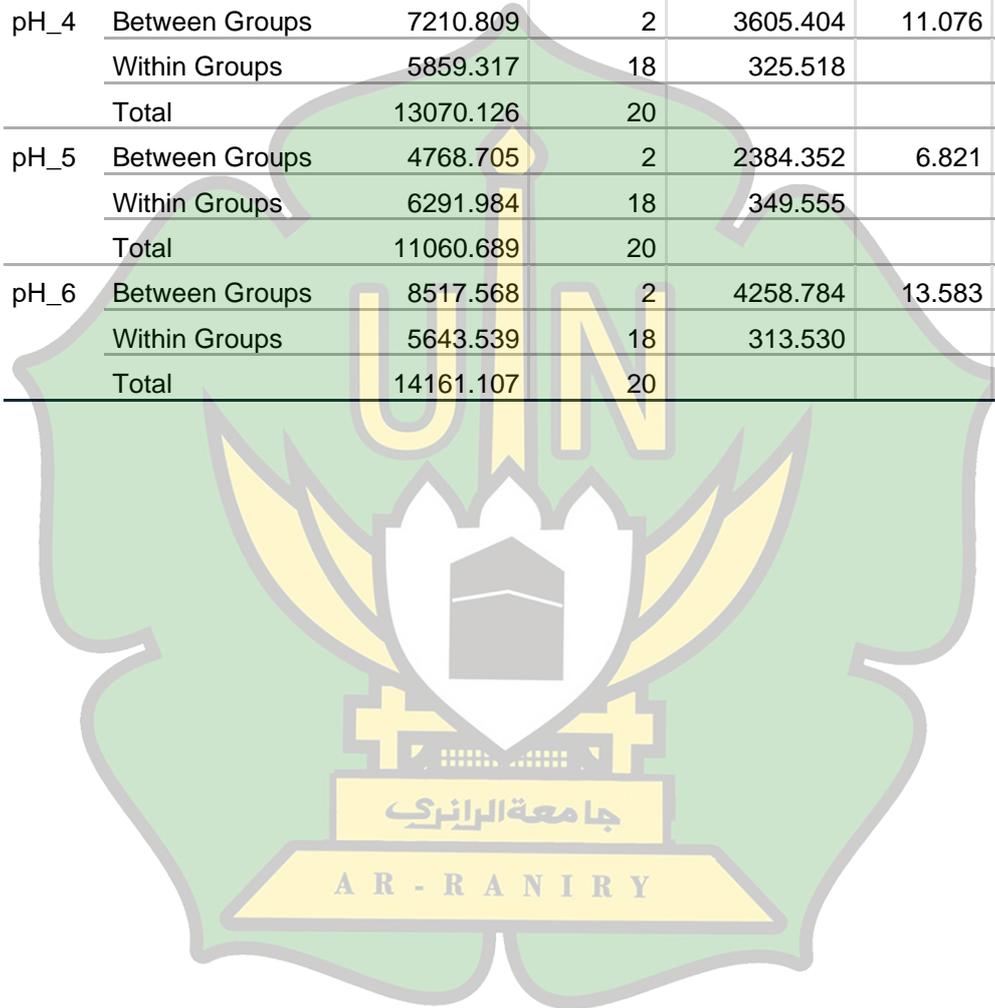


Lampiran 2 Pengujian Statistik pada Pengujian Bioremediasi Logam FeSO₄

Tests of Normality							
Kelompok_perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			Sig.
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
pH_4	Waktu Inkubasi	.108	7	.200 [*]	.978	7	.949
	Konsentrasi akhir	.179	7	.200 [*]	.975	7	.934
	Persentase penurunan Fe	.179	7	.200 [*]	.975	7	.934
pH_5	Waktu Inkubasi	.108	7	.200[*]	.978	7	.949
	Konsentrasi akhir	.251	7	.200 [*]	.865	7	.168
	Persentase penurunan Fe	.247	7	.200 [*]	.869	7	.183
pH_6	Waktu Inkubasi	.108	7	.200 [*]	.978	7	.949
	Konsentrasi akhir	.194	7	.200 [*]	.962	7	.836
	Persentase penurunan Fe	.194	7	.200 [*]	.962	7	.836

Test of Homogeneity of Variances						
		Levene	df1	df2	Sig.	
		Statistic				
pH_4	Based on Mean	4.037	2	18	.036	
	Based on Median	3.781	2	18	.043	
	Based on Median and with adjusted df	3.781	2	13.623	.049	
	Based on trimmed mean	4.037	2	18	.036	
pH_5	Based on Mean	4.136	2	18	.033	
	Based on Median	2.685	2	18	.095	
	Based on Median and with adjusted df	2.685	2	14.270	.102	
	Based on trimmed mean	4.139	2	18	.033	
pH_6	Based on Mean	4.401	2	18	.028	
	Based on Median	4.401	2	18	.028	
	Based on Median and with adjusted df	4.401	2	13.090	.035	
	Based on trimmed mean	4.401	2	18	.028	

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pH_4	Between Groups	7210.809	2	3605.404	11.076	.001
	Within Groups	5859.317	18	325.518		
	Total	13070.126	20			
pH_5	Between Groups	4768.705	2	2384.352	6.821	.004
	Within Groups	6291.984	18	349.555		
	Total	11060.689	20			
pH_6	Between Groups	8517.568	2	4258.784	13.583	.000
	Within Groups	5643.539	18	313.530		
	Total	14161.107	20			



Lampiran 3 Grafik Kurva Kelarutan Standar Logam Besi (Fe)

Data Kurva Standarisasi Larutan Standar Logam Fe

No	Konsentrasi (x)	Absorbansi (y)	Y ²	X ²	x.y
1	0.05	0.075	0.005625	0.0025	0.00375
2	0.1	0.078	0.006084	0.01	0.0078
3	0.15	0.084	0.007056	0.0225	0.0126
4	0.2	0.086	0.007396	0.04	0.0172
5	0.25	0.103	0.010609	0.0625	0.02575
6	10	0.208	0.043264	100	2.08
N = 6	$\sum x = 10.75$	$\sum y = 0.634$	$\sum x^2 = 080034$	$\sum y^2 = 100.1375$	$\sum x.y = 2.1471$

➤ **Analisis Data**

$$y = a + bx$$

$$b = 0.012502718$$

$$a = 0.083265964$$

Jadi, persamaan linier yang dihasilkan adalah:

$$y = a + bx$$

$$y = 0.012502718 + 0.083265964x$$

Lampiran 4 Dokumentasi Kegiatan kerja di Laboratorium

Nama Kegiatan	Dokumentasi
Peremajaan Isolat	
Pembuatan Larutan Standar Fe	

Pengujian
Rekonfirmasi Isolat
(Uji Endospora)



Uji Resistensi Isolat
Bacillus sp.



Pengujian Absorbansi
Logam pada Laju
Pertumbuhan Bakteri



Perhitungan Total
Koloni *Bacillus* sp.



Sterilisasi Cawan
Petri



Pembacaan Hasil
Spektrofotometer
pada Laju
Pertumbuhan *Bacillus*
sp.



Spektrofotometer
UV-Vis



Sentrifugasi

