

BIOREMEDIASI Pb OLEH BAKTERI INDIGEN LIMBAH CAIR AGAR

Senja Ikerismawati^{1*}

¹Universitas Yudharta Pasuruan, Jl. Yudharta No 7 (Pesantren Ngalah) Sengon Agung Purwosari
Pasuruan Jawa Timur 67152

*Corresponding author, e-mail: *rismawati@yudharta.ac.id

ABSTRACT

Bacteria isolated from an environment contaminated with heavy metals are very potential as heavy metal bioremediation agents called indigenous bacteria. The purpose of this study was to isolate and identify indigenous bacteria that have the potential as Pb bioremediation agents in agar liquid waste and to analyze the ability of indigenous bacteria in reducing Pb. The research design used Completely Randomized Design (RAL) two factorial with variation of bacteria and eight days of treatment. Data were analyzed using two-way ANOVA with Duncan's advanced test. The results showed that there were eight isolates resulting from the isolation of agar liquid waste. The isolates of liquid waste indigenous bacteria so that the most potential in reducing Pb were isolated H, E and F. The three isolates were able to reduce Pb in sterile agar liquid waste by 82.6%, 81.3% and 79.3% for eight days of treatment. The identification results using Microbact™ GNB 12A / B / E, 24 Identification Kits showed that H bacterial isolates were *Bacillus alvei*, E isolates were *Bacillus pumilus* species and F isolates were *Bacillus licheniformis* species

Keywords: *Bioremediation, Indigenous, Bacteria, Pb, Agar Liquid Waste*

PENDAHULUAN

Perkembangan dan kemajuan teknologi yang berhubungan dengan pembangunan di sektor industri banyak memberikan keuntungan, akan tetapi kemajuan teknologi juga memberikan dampak buruk. Pembangunan di bidang industri tidak jarang menimbulkan dampak negatif berupa limbah yang dihasilkan baik dalam bentuk padat, cair dan gas (Khasanah, 2009). Meningkatnya industrialisasi akan menyebabkan pula meningkatnya keluaran bahan kimia berbahaya ke lingkungan yang berasal dari limbah industri, terutama limbah yang mengandung logam berat (Gerhart, dkk, 2008). Kontaminasi oleh logam berat menjadi perhatian serius karena dapat mencemari lingkungan, terakumulasi dalam tumbuhan dan hewan sehingga dapat masuk ke dalam rantai makanan yang dapat menyebabkan penyakit-penyakit degeneratif (Zahoor & Rehman, 2009). Salah satu logam berat yang memiliki toksitas tinggi adalah Pb. Logam Pb merupakan neurotoxin yang bersifat kumulatif, destruktif dan kontinu pada sistem haemofilik, kardiovaskuler dan ginjal (Gusnita, 2012)

Logam berat bersifat *nonbiodegradable* sehingga proses degradasi dan reduksi logam berat tidak semudah mendegradasi limbah organik (Gupta & Rastolgi, 2008). Degradasi dan reduksi logam berat dapat dilakukan dengan cara fisik dan kimia melalui pertukaran ion, presipitasi, koagulasi, *inverse osmosis* dan adsorpsi. Semua metode tersebut cukup efisien tetapi akan sangat merugikan jika digunakan untuk mengelola limbah industri, karena relatif mahal, membutuhkan energi dan bahan kimia yang cukup besar (Zulaiaka, dkk., 2012) serta membutuhkan peralatan khusus (Park, dkk., 2010). Pendekatan secara bioteknologi dengan menggunakan bakteri

merupakan alternatif cara yang dapat dilakukan untuk masa yang akan datang dan merupakan rekayasa yang cukup menjanjikan (Vijayaraghavan & Yun, 2008). Pendekatan secara bioteknologi secara teknis maupun ekonomis sangat menguntungkan dan merupakan cara yang ramah lingkungan (Suhendrayatna, 2011). Bioteknologi menggunakan bakteri disebut bioremediasi, merupakan proses penghilangan logam dengan memanfaatkan aktivitas metabolisme mikroorganisme (Lutfi, dkk., 2018). Bakteri indigen merupakan bakteri yang diisolasi dari limbah itu sendiri yang secara alamiah hidup pada limbah, sehingga berpotensi dalam proses bioremediasi (Fidiastuti & Suarsini, 2017)

Hasil Observasi limbah cair industri penepungan agar di PT Agar X, Lawang Malang diperoleh data bahwa limbah cair proses penepungan agar mengandung logam berat Pb sebesar 2,42 mg/L. Nilai tersebut sangat tinggi apabila dibandingkan dengan persyaratan logam berat Pb dalam air berdasarkan Peraturan Pemerintah RI No 82 Tahun 2001, nilai ambang batas logam berat Pb untuk baku mutu air kelas 1 sampai dengan kelas 3 adalah sebesar 0,003 mg/L. Mengacu kepada fakta tersebut bahwa kandungan logam Pb dalam limbah cair industri pengolahan tepung agar telah melebihi ambang batas baku mutu air.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif dengan pendekatan observasi laboratorium yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri indigen yang berpotensi sebagai agensia bioremediasi Pb pada limbah cair penepungan agar. Alat yang digunakan adalah *autoclaf*, cawan Petri, tabung reaksi, erlenmeyer, batang pengaduk, erlenmeyer, gelas ukur, timbangan analitik, lemari pendingin, kompor gas, kontainer es, plastik steril, botol steril, inkubator *shaker*, aminar air flow, inkubator, tabung reaksi, votex, mikro pipet 5 ml dan 10 ml, rak tabung, bunsen, jarum ose, *colony counter*, mikroskop, kaa benda, kaca benda cekung, kaca penutup, mangkuk pewarna kawat penyangga, pipet, pinset, bunsen, botol penyemprot dan jarum ose. Bahan yang digunakan adalah medium Luria Bertani, nutrien agar, nutrien cair, pepton, sampel limbah cair, alkohol 70%, aquades steril, lisol, kertas penghisap, sabun cuci, bahan pewarnaan gram, aluminium foil, kertas label, tisu, kapas dan kasa

Cara Kerja

Cara kerja penelitian ini sesuai dengan Pambudiono dkk (2017) dengan modifikasi.
Pengambilan Sampel Air Limbah

Sampel air limbah diambil dari kolam IPAL PT Agar X di Lawang, Malang menggunakan botol sampel steril pada tiga titik pengambilan dengan tiga kali ulangan dan ditransportasikan dalam termos berisi es menuju laboratorium dan disimpan di lemari es selama penelitian berlangsung.

Isolasi Bakteri Resisten Pb

Sampel limbah sebanyak 50 ml dicampurkan dengan medium Luria Bertani 450 ml yang telah ditambah dengan $Pb(NO_3)_2$ sebanyak 1,65 mg sehingga konsentrasi logam berat Pb dalam 500 ml (limbah cair + medium Luria bertani) sebesar 3,3 ppm dan dikocok menggunakan shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 7 hari. Setelah 7 hari, sampel limbah diambil sebanyak 1ml diencerkan hingga konsentrasi 10^{-10} menggunakan pepton water 9 ml dan diinokulasikan kedalam medium lempeng NA-Pb dan diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium lempeng dipurifikasi hingga diperoleh isolat murni dan dilakukan pengkodean dan pengamatan morfologi.

Uji Reduksi Pb Oleh Isolat Bakteri

Uji kemampuan isolat bakteri dalam menurunkan (mereduksi) Pb dilakukan dengan menginokulasikan tiap isolat bakteri hasil isolasi pada limbah cair agar steril selama 8 hari. Biakan murni tiap isolat bakteri dibiakkan dalam medium NC dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ diinokulasikan kedalam botol sampel berisi limbah cair agar steril dengan rasio 1:10 dan digunakan kontrol adalah aquades steril. Dikocok menggunakan shaker dengan kecepatan 100rpm. Setiap hari selama 8 hari dilakukan analisis konsentrasi Pb menggunakan metode *spektrofotometry*. Data dianalisis menggunakan ANAVA dua arah dengan uji lanjut Duncan dengan menggunakan *software SPSS ver 18*.

Karakterisasidan Identifikasi Isolat Bakteri

Bakteri paling potensial dalam mereduksi Pb yang terpilih selanjutnya dilakukan karakterisasi dan indentifikasi menggunakan *Microbact TM GNB 12A/B/E, 24 Identification Kits*. Data hasil isolasi bakteri indigen limbah cair agar dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri indigen Limbah cair agar (LCA) berhasil memperoleh 8 isolat bakteri yang dapat hidup dan tumbuh dalam medium *Luria Bertani* yang diperkaya dengan $Pb(NO_3)_2$ dengan konsentrasi sebesar 3,3 ppm. Adapun ciri morfologi kedelapan isolat bakteri hasil isolasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Ciri Morfologi Isolat Bakteri Indigen Hasil Isolasi

Kode Koloni	Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi	Mengkilat/suram
A	krem	bundar	Kerang	datar	suram
B	krem	bundar	Licin	timbul	mengkilat
C	putih	bundar	menyebar	datar	suram
D	krem	konsentris	Berlekuk	datar	suram
E	putih	tak beraturan	Berlekuk	datar	suram
F	krem	bundar	Kerang	timbul	suram
G	putih	bundar	menyebar	datar	suram
H	putih	tak beraturan	Tak beraturan	datar	suram

Kedelapan macam isolat bakteri tersebut berhasil tumbuh sehingga memiliki potensi dalam menurunkan konsentrasi logam berat Pb. Hal ini sesuai dengan pernyataan Suyasa (2012) bahwa pada lingkungan atau habitat yang tercemar serta kolam pengolahan limbah dimungkinkan terdapat bakteri pendegradasi zat pencemar, secara alamiah dimana bakteri tersebut dapat bersaing maupun berkonsorsium dengan bakteri lainnya. Bakteri yang diisolasi dari lingkungan yang tercemar logam berat mempunyai tolereansi terhadap logam berat yang ada disekitarnya (Chojnacka, 2010).

Untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri indigen dalam menurunkan konsentrasi logam Pb dilakukan uji reduksi. Hasil uji ANAVA dua arah (Tabel 2) menunjukkan bahwa variasi isolat bakteri, lama perlakuan dan kombinasi keduanya memiliki pengaruh terhadap penurunan (reduksi) logam Pb Hal ini ditunjukkan dengan nilai signifikansi kurang dari $\alpha = 5\%$

Tabel 2. Hasil Pengujian ANAVA Dua arah

Sumber	Signifikansi	Keterangan
Variasi Bakteri	0.000	Berbeda Nyata
Lama Perlakuan (Hari)	0.000	Berbeda Nyata
Variasi Bakteri * Hari	0.000	Berbeda Nyata

Untuk mengetahui pada variasi bakteri mana, hari ke berapa serta kombinasi antara hari dan variasi bakteri yang menyebabkan perbedaan penurunan konsentrasi Pb maka dilakukan uji lanjutan (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil Uji Lanjut Penurunan (Reduksi) Konsentrasi Pb Berdasarkan Variasi Bakteri

Variasi Bakteri	Rata-Rata (ppm)	Notasi
A	1,2131	g
B	1,1206	f
C	1,0538	e
D	1,0122	c
E	0,9667	b
F	1,0105	c
G	1,0238	d
H	0,9571	a
Kontrol	1,5377	h

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa semua jenis bakteri memiliki perbedaan penurunan konsentrasi Pb pada limbah cair agar, terkecuali untuk jenis bakteri F dan D yang ditunjukkan dengan notasi sama yaitu c. Hasil uji lanjutan penurunan konsentrasi logam Pb berdasarkan lama perlakuan (hari) dapat dilihat pada Tabel 4.

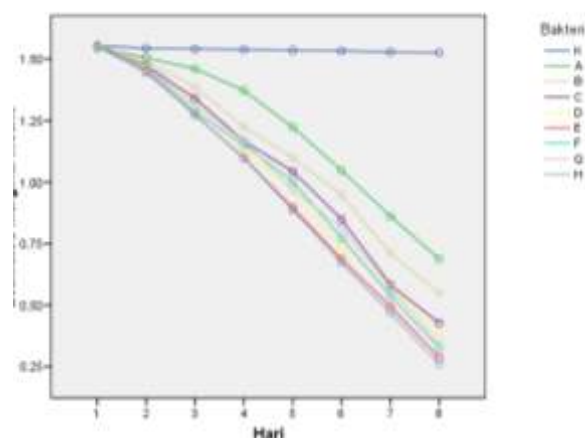
Tabel 4. Hasil Uji Lanjut Reduksi Pb Berdasarkan Hari

Hari	1	2	3	4	5	6	7	8	notasi
1	—	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	a
2		—	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	b
3			—	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	c
4				—	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	d
5					—	0.000*	0.000*	0.000*	e
6						—	0.000*	0.000*	f
7							—	0.000*	g
8								—	h

* : berbeda nyata pada taraf 5%

Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa terjadi penurunan konsentrasi Pb dari hari ke hari. Hal ini ditunjukkan dari nilai signifikansi masing pasangan hari yang kurang dari $\alpha = 5\%$ serta notasi yang berbeda. Untuk mengetahui lebih jelas kombinasi antara hari dan variasi bakteri yang menyebabkan penurunan konsentrasi Pb dapat dilihat pada Gambar 1

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa pada setiap jenis bakteri yang diamati selama 8 hari mengalami penurunan konsentrasi logam Pb. Penurunan konsentrasi logam berat Pb pada limbah cair agar dengan konsentrasi paling kecil terjadi pada hari ke-8 dengan jenis bakteri H yaitu sebesar 0.26 ppm.



Gambar 1. Grafik Kombinasi Variasi Bakteri dan Hari Terhadap Penurunan Konsentrasi Pb

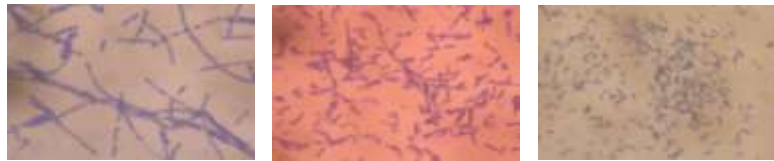
Tabel 5. Nilai Efisiensi Isolat Bakteri Indigen

Jenis isolat	Awal (ppm)	Akhir (ppm)	Efisiensi (%)
A	1,557	0,628	59,66
B	1,557	0,552	64,54
C	1,557	0,421	72,96
D	1,557	0,385	72,27
E	1,557	0,291	81,31
F	1,557	0,322	79,31
G	1,557	0,338	78,29
H	1,557	0,255	83,62

Berdasarkan hasil uji statistik dan nilai efisiensi tiap isolat bakteri (Tabel 5), maka bakteri indigen limbah cair agar paling potensial dalam mereduksi logam berat Pb adalah bakteri F, E dan H.. Isolat bakteri F, E dan H merupakan isolat bakteri yang memiliki kemampuan menurunkan logam berat Pb paling potensial, karena ke tiga isolat tersebut dapat menurunkan logam berat Pb dengan konsentrasi terkecil. Kemampuan efisiensi reduksi logam berat Pb isolat F sebesar 79,31%, isolat E sebesar 81,31% dan isolat H sebesar 83,62%. Ketiga isolat tersebut mempunyai nilai efisiensi reduksi yang paling tinggi. Nilai akhir konsentrasi logam berat Pb yang dicapai oleh isolat bakteri F, E dan H berturut-turut sebesar 0,32 ppm; 0,29 ppm; dan 0,25 ppm. Nilai akhir tersebut telah memenuhi baku mutu air golongan 4

Perbedaan kedelapan isolat bakteri dalam menurunkan logam Pb dapat disebabkan oleh perbedaan metabolisme dari masing-masing isolat. Metabolisme bakteri berkaitan erat dengan mekanisme toleransi atau resistensi bakteri terhadap logam berat Pb. Sebagian besar bakteri toleran terhadap logam berat dengan cara melakukan mekanisme *efflux* (Spain, 2003). Terdapat juga mekanisme toleransi atau resistensi lainnya, yaitu dengan cara kompleksasi meliputi produksi polisakarida ekstraselular (EPS) bersifat anion yang berfungsi sebagai bioakumulator, produksi metabolit organik yang memiliki sifat pengkelat dan membentuk kompleks dengan logam, presipitasi, kristalisasi ekstraselular oleh bakteri pereduksi sulfat sehingga membentuk deposit sulfida yang kaya akan logam dan biakumulasi interseluler melalui pembentukan metallothionein (protein kaya sistein dalam sel dapat mengikat logam) yang berfungsi untuk detoksifikasi, penyimpanan, dan regulasi ion logam dalam sel (Naik & Dubey, 2013).

Ketiga isolat bakteri yang paling berpotensi mereduksi Pb selanjutnya dilakukan karakterisasi dan identifikasi. Ketiga isolat bakteri memiliki karakter yang sama yaitu bakteri Gram Positif dan berbentuk basil (Gambar 2). Hasil identifikasi menggunakan *Microbact TM GNB 12A/B/E, 24 Identification Kits* disajikan pada Tabel 6.



Gambar 2. Pewarnaan Gram Isolat H, E dan F dari kanan ke kiri

Tabel 6. Hasil Uji *Microbact TM GNB 12A/B/E, 24 Identification Kits*

Jenis Tes	E	F	H
BGP	+	+	+
Spora	+	+	+
FERMENT GULA-GULA			
Glukosa	+	+	+
Xylosa	-	+	-
Mannitol	+	+	-
Laktosa	-	-	-
Sukrosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Arabinosa	+	+	-
SUHU PERTUMBUHAN			
20°C	+	+	+
37°C	+	+	+
40°C	+	+	+
45°C	+	+	+
TUMBUH DI			
Nutrient Broth	+	+	+
SDA	-	-	-
TSI	A/AH2S-	A/AH2S-	A/AH2S-
Citrat	+	+	-
Indol	+	-	+
VP	+	+	+
Indol	+	-	+
VP	+	+	+
NaCl 7%	+	-	+
Mortilitas	+	+	+
Strach Hidrolisis	-	+	+
Casein Hidrolisis	+	+	+
PENICILIN	Sensitif	Sensitif	Sensitif
BETA-HEMOUSA	+	+	+
Katalase	+	+	+
Oksidase	+	+	+
Reduksi Nitrat	-	+	-
Reduksi Metylene Blue	-	-	-
DX-Lab	<i>B. pumilus</i>	<i>B. lichenformis</i>	<i>B. alvei</i>

Tabel 6 menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri indigen tersebut dalam genus yang sama yaitu genus *Bacillus*. Bakteri yang tergolong genus *Bacillus* merupakan bakteri yang resisten terhadap logam berat Cu, Cd, Pb dan Hg (Zulaika, dkk., 2012). Bakteri *Bacillus* merupakan bakteri lokal yang mampu menyerap logam berat kedalam sel-selnya sehingga logam berat tersebut tidak dapat bergerak kedalam substrat lebih jauh atau terbawa aliran air bawah (Pudji dkk., 2006). Hasil

identifikasi menunjukkan bahwa Isolat H merupakan spesies *Bacillus alvei*, isolat E merupakan spesies *Bacillus pumilus* dan isolat F merupakan spesies *Bacillus lichenformis*.

SIMPULAN

Isolat bakteri indigen limbah cair agar yang berpotensi untuk mereduksi logam Pb adalah isolat H, E dan F. Ketiga isolat mampu menurunkan logam Pb pada limbah cair agar steril sebesar 83,62%, 81,31% dan 79,31%. Isolat Bakteri H merupakan *Bacillus alvei*, isolat E merupakan spesies *Bacillus pumilus* dan isolat F merupakan spesies *Bacillus lichenformis*

REFERENSI

- Chojnacka, K. (2010). Biosorption and Bioaccumulation The Prospects for Practical Applications. *Environment International*, 39 (3): 299-307.
- Fidiastuti, H., & Suarsini, E. (2017). Potensi Bakteri Indigen dalam Mendegradasi Limbah Cair Pabrik Kulit Secara In Vitro. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*, 3(1), 1-10.
- Gerdhart, K.E., Huang, X., Bernard R., Greenberg., and Bruce, M. (2008). Phytoremediation of organic soil contaminants: Potential and Challenges. *Plant Science*, 176 (1):20-30.
- Gusnita, D. (2012). Pencemaran Logam Berat Timbal Di Udara dan Upaya Penghapusan Bensin Bertimbal. *Berita Dirgantara*, 13 (3): 95-101.
- Gupta, V.K dan Rastolgi, A. (2008). Biosorption of Lead (II) From Aqueous Solutions by Non Living Algal Biomass *Oedogonium* sp. and *Nostoc* sp.: A Comparative Study, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 64 (2): 170-178.
- Khasanah, Eliya. (2009). Adsorpsi Logam Berat. *Oseana*, XXXIV(4), 1-7.
- Lutfi, SR., Wignyanto, & Kurniati, E. (2018). Bioremediasi Merkuri Menggunakan Bakteri Indigenus dari Limbah Penambangan Emas di Tumpang Pitu Banyuwangi. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 19 (1): 15-24.
- Naik, M.M, & Dubey, S.K. (2013). Lead Resistant Bacteria: Lead resistance mechanisms, their application in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98(1), 1-7.
- Pambudiono, A., Suarsini, E., & Amin, M. (2017) The Potential of Indigenous Bacteria for Removing Cadmium from Industrial Wastewater in Lawang East Java. *The Journal of Tropical Life Science*, 8(1), 62-67.
- Park, J., Bolan, N., Megharaj, M & Naidu, R. (2010). Isolation of Phosphate-Solubilizing Bacteria and Characterization of Their Effect on Lead Immobilization. *Pedologist*, 53(3): 67-75
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001. *Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air*.
- Pudji S.R, Sumingkrat, Noer. S.T, Agustina S, Trisni A, Rofienda, & Deni. (2006). Penelitian Bioremediasi (Ex-Situ) Tanah Terkontaminasi Limbah B3 Yang Mengandung Logam Berat. *Buletin Penelitian*, 28 (1): 8-17.
- Suhendrayatna. (2001). *Bioremoval Logam Berat dengan Menggunakan Mikroorganisme: Suatu Kajian Kepustakaan (Heavy metal bioremoval by microorganisms : A literature study)*. Prosiding Bioteknologi untuk Indonesia Abad 21. Sinergy Forum - PPI Tokyo Institute of Technology

- Suyasa, I.WB. (2012). Bakteri Pendegradasi Minyak Dari Beberapa Sedimen Perairan Tercemar dan Bak Penampungan Limbah. *Bumi Lestari Journal of Environment*, 7(1): 1-6.
- Spain, A. (2003). Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Reviews in Undergraduate Research* 2, 1-6.
- Vijayaraghavan, K. & Yun, Y.S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26 (3): 266-291.
- Zahoor, A. & Rehman, A. (2009). Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, 21 (6): 814 – 820
- Zulaika, E. (2012). *Bakteri Resisten Logam Berat Yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator*. Seminar Nasional Waste Managment For Sustainable Urban Developing Teknik Lingkungan ITS. Surabaya: ITS