PENGARUH SUHU INKUBASI TERHADAP KEMAMPUAN BIOREMEDIASI TIMBAL OLEH BAKTERI T2P2 ASAL KAWASAN PERTAMBANGAN DI TULUNGAGUNG

SKRIPSI

Oleh :
RASYID NOOR HAKIM
NIM. 17630022

PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021

PENGARUH SUHU INKUBASI TERHADAP KEMAMPUAN BIOREMEDIASI TIMBAL OLEH BAKTERI T2P2 ASAL KAWASAN PERTAMBANGAN DI TULUNGAGUNG

SKRIPSI

Oleh :
RASYID NOOR HAKIM
NIM. 17630022

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

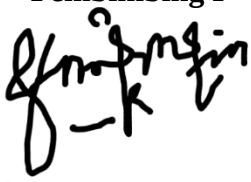
PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2021

PENGARUH SUHU INKUBASI TERHADAP KEMAMPUAN BIOREMEDIASI TIMBAL OLEH BAKTERI T2P2 ASAL KAWASAN PERTAMBANGAN DI TULUNGAGUNG

SKRIPSI

Oleh :
RASYID NOOR HAKIM
NIM. 17630022

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 20 Desember 2021

Pembimbing I	Pembimbing II
	
Anik Maunatin, S.T, M.P	**Ahmad Hanapi, M.Sc**
NIP. 19760105 20180201 2 248	**NIDT. 19851225 20160801 1 069**

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PENGARUH SUHU INKUBASI TERHADAP KEMAMPUAN BIOREMEDIASI TIMBAL OLEH BAKTERI T2P2 ASAL KAWASAN PERTAMBANGAN DI TULUNGAGUNG

SKRIPSI

Oleh :
RASYID NOOR HAKIM
NIM. 17630022

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 24 Desember 2021

Penguji Utama	**: Dr. Akyunul Jannah, M.P** **NIP. 19750410 200501 2 009**	**(.....)**
Ketua Penguji	**: Nur Aini, M.Si** **NIDT. 19840608 201903 2 009**	**(.....)**
Sekretaris Penguji	**: Anik Maunatin, S.T, M.P** **NIP. 19760105 20180201 2 248**	**(.....)**
Anggota Penguji	**: Ahmad Hanapi, M.Sc** **NIDT. 19851225 20160801 1 069**	**(.....)**

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama	:	Rasyid Noor Hakim
NIM	:	17630022
Program studi	:	Kimia
Fakultas	:	Sains dan Teknologi
Judul Penelitian	:	Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Kemampuan Bioremediasi Timbal oleh Bakteri T2P2 Asal Kawasan Pertambangan di Tulungagung

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Desember 2021
Yang membuat pernyataan,

Rasyid Noor Hakim
NIM. 17630022

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil'aalamiin
Puji syukur kehadirat Allah Swt. atas rahmat, hidayah dan ridhonya
sehingga karya sederhana ini dapat terselesaikan.

Saya mempersembahkan karya sederhana ini kepada:

Kedua orang tua saya,
Bapak Catur Saktiyanto dan Ibu Kusmini, yang selama ini telah memberikan
dukungan, bimbingan dan nasihat untuk dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
Untuk segala kebaikan, terimakasih.

Seluruh Tenaga Pendidik Program Studi Kimia,
terutama Ibu Dewi Yuliani, M.Si, Ibu Anik Maunatin, S.T, M.P dan
Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi; serta
Ibu Eny Yulianti, M.Si selaku dosen wali, yang telah memberikan bimbingan,
nasihat serta ilmu yang bermanfaat, baik dalam proses pembelajaran
di perkuliahan maupun dalam proses penelitian.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Swt. yang telah memberikan segala rahmat dan nikmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Kemampuan Bioremediasi Timbal oleh Bakteri T2P2 Asal Kawasan Pertambangan di Tulungagung**" dengan semaksimal mungkin. Sholawat serta salam selalu tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad Saw.

Penulisan naskah skripsi merupakan proses yang panjang. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak akan terselesaikan tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penyusun mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Catur Saktiyanto dan Ibu Kusmini, kedua orang tua, yang telah memberikan dukungan, nasihat dan doa.
2. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku Ketua Program Studi Kimia, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dewi Yuliani, M.Si, Ibu Anik Maunatin, S.T, M.P dan Bapak Ahmad Hanapi selaku dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama penelitian dan penulisan skripsi.
4. Seluruh Dosen dan Staf Laboran Program Studi Kimia yang telah memberikan ilmu dan pengalaman sehingga dapat menjadi bekal dalam penulisan skripsi.
5. Seluruh teman (Ifit, Dean, Salma,Tessa, Sandy, Berliana, Tria, Ilham, Elza, dan Verianika) dan kakak (Mbak Sonia dan Mas Edo) yang telah membantu, memberi masukan dan dukungan selama penelitian maupun penulisan skripsi.

6. Seluruh pihak yang memberi bantuan dan kontribusi namun tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari banyaknya kekurangan dan keterbatasan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengaharapkan kritik dan saran untuk menyempurnakannya. Semoga skripsi ini dapat memberikan informasi yang relevan dan kontribusi positif bagi ilmu pengetahuan, Aamiin.

Malang, 20 Desember 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL ..... **i**
LEMBAR PERSETUJUAN ..... **ii**
LEMBAR PENGESAHAN ..... **iii**
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN ..... **iv**
HALAMAN PERSEMBAHAN ..... **v**
KATA PENGANTAR ..... **vi**
DAFTAR ISI ..... **viii**
DAFTAR GAMBAR ..... **x**
DAFTAR TABEL ..... **xi**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xii**
ABSTRAK ..... **xiii**
ABSTRACT ..... **xiv**
مستخلص البحث ..... **xv**

BAB I PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 5
1.3 Tujuan 5
1.4 Batasan Masalah 5
1.5 Manfaat 6

BAB II TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Logam Berat Timbal 7
2.2 Bakteri dalam Perspektif Al Quran 8
2.3 Bioremediasi Timbal Menggunakan Bakteri 9
2.4 Pengaruh Suhu Inkubasi Terhadap Aktivitas Bioremediasi 13
2.5 Pewarnaan Gram 14
2.6 Uji Katalase 15
2.7 Prinsip Pengukuran Kadar Timbal Menggunakan Instrumen Spektrofotometer Serapan Atom - Nyala 16

BAB III METODE PENELITIAN
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 18
3.2 Alat dan Bahan 18
3.2.1 Alat 18
3.2.2 Bahan 18
3.3 Rancangan Penelitian 19
3.4 Tahapan Penelitian 19
3.5 Cara Kerja 20
3.5.1 Uji Kandungan Timbal pada Sampel Air 20
3.5.2 Peremajaan Bakteri 20
3.5.3 Pewarnaan Gram Bakteri 21
3.5.4 Uji Katalase 21

3.5.5 Pembuatan Inokulum Bakteri 21
3.5.6 Uji Aktivitas Bioremediasi Bakteri terhadap Timbal dengan Variasi Suhu Inkubasi 22
3.5.7 Analisis Kadar Timbal Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom - Nyala 22
3.5.8 Analisis Data 23

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1 Karakteristik Bakteri T2P2 24
4.2 Pembuatan Inokulum Bakteri 27
4.3 Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Kemampuan Bioremediasi Timbal 28
4.4 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif al-Qur'an 31

BAB V PENUTUP
5.1 Kesimpulan 35
5.2 Saran 35

DAFTAR PUSTAKA 36
LAMPIRAN 41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme bioremediasi timbal 11
Gambar 2.2 Pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x (a) bakteri Gram positif dan (b) bakteri Gram negatif 14
Gambar 2.3 Reaksi penguraian Hidrogen peroksida..... 15
Gambar 2.4 Rangkaian spektrofotometer serapan atom-nyala 16
Gambar 4.1 Bakteri T2P2 hasil regenerasi..... 24
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan Gram perbesaran 400x..... 25
Gambar 4.3 Hasil uji katalase 25
Gambar 4.4 Inokulum bakteri T2P2..... 28
Gambar 4.5 Pengaruh suhu terhadap konsentrasi timbal teremediasi 28
Gambar 4.6 Kurva standar timbal untuk residu aktivitas bioremediasi..... 46
Gambar 4.7 Kurva standar timbal untuk analisa sampel air 49

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kemampuan bioremediasi timbal berbagai spesies bakteri 10
Tabel 4.1 Karakteristik beberapa bakteri resisten timbal..... 27
Tabel 4.2 Signifikansi pengaruh suhu inkubasi terhadap timbal teremediasi..... 29
Tabel 4.3 Perbandingan kemampuan bioremediasi timbal oleh beberapa bakteri 31
Tabel 4.4 Volume pengenceran larutan induk timbal untuk analisis timbal teremediasi..... 45
Tabel 4.5 Data absorbansi residu timbal dalam media 46
Tabel 4.6 Konsentrasi residu timbal..... 47
Tabel 4.7 Konsentrasi timbal teremediasi..... 48
Tabel 4.8 Volume pengenceran larutan induk timbal untuk analisis sampel air 48
Tabel 4.9 Data absorbansi timbal dalam sampel air 49
Tabel 4.10 Konsentrasi timbal dalam sampel air..... 50
Tabel 4.11 Karakteristik sampel air dari kawasan pertambangan..... 53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan penelitian 41
Lampiran 2 Diagram alir 42
Lampiran 3 Perhitungan 44
Lampiran 4 Dokumentasi penelitian 51
Lampiran 5 Karakteristik lingkungan pertambangan di Tulungagung 53
Lampiran 6 Hasil analisis statistik 54

ABSTRAK

Hakim, Rasyid Noor. 2021. **Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Kemampuan Bioremediasi Timbal oleh Bakteri T2P2 Asal Kawasan Pertambangan di Tulungagung**. Skripsi. Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Pembimbing I : Anik Maunatin, S.T, M.P; Pembimbing II : Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata kunci: Bakteri, Bioremediasi Timbal, Suhu Inkubasi.

Timbal merupakan salah satu logam berat yang memiliki kelimpahan tinggi di alam dan bersifat toksik terhadap makhluk hidup. Aktivitas pertambangan menjadi salah satu sumber pencemaran timbal di lingkungan. Bioremediasi menggunakan bakteri merupakan salah satu alternatif penanganan pencemaran timbal yang ramah lingkungan dan efisien. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2 yang didapat dari kawasan pertambangan di Tulungagung.

Bioremediasi timbal dilakukan pada media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung 100 ppm timbal. Inkubasi bakteri dilakukan secara statis pada variasi suhu ruang, 30, 35, dan 40°C, dengan pH 7 selama 24 jam. Kadar residu timbal dalam media diukur menggunakan spektrofotometer serapan atom - nyala pada panjang gelombang 283,3 nm, lalu dibandingkan dengan konsentrasi awal timbal. Konsentrasi timbal teremediasi dianalisis secara statistik menggunakan *One Way* ANOVA.

Kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2 ditunjukkan dengan nilai timbal teremediasi. Pada variasi suhu ruang, nilai timbal teremediasi sebesar 39,81%; suhu 30°C sebesar 45,46%; suhu 35°C sebesar 59,89%; dan suhu 40°C sebesar 59,02%. Uji statistik menunjukkan adanya pengaruh nyata suhu inkubasi terhadap nilai timbal teremediasi (sig<0,05). Bakteri T2P2 menunjukkan kemampuan bioremediasi timbal optimal pada kondisi suhu inkubasi 35°C.

ABSTRACT

Hakim, Rasyid Noor. 2021. **The effect of Incubation Temperature on Lead Bioremediation Ability by Bacteria T2P2 from Mining Site in Tulungagung**. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Sains and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim. Supervisor I: Anik Maunatin, S.T, M.P; Supervisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keywords: Bacteria, Lead Bioremediation, Incubation Temperature.

Lead is a heavy metal that has high abundance in nature and toxic to living organisms. Mining activities are source of lead pollution in the environment. Bioremediation using bacteria is an alternative solution for handling lead pollution which is environmentally friendly and efficient. This research was conducted to determine the effect of incubation temperature on lead bioremediation ability by bacteria T2P2 obtained from mining site in Tulungagung.

Lead bioremediation assay was carried out on Nutrient Broth (NB) media containing lead 100 ppm. Bacteria was incubated with variations room temperature, 30, 35, and 40°C, pH 7 for 24 hours. Lead residue in the media was measured using flame atomic absorption spectrophotometer at wavelength 283.3 nm, then compared with the initial concentration. The effect of incubation temperature on the lead bioremediation was statistical analyzed using One Way ANOVA.

Lead bioremediation ability of bacteria T2P2 was showed by the value of remedied Lead that 39.81% at room temperature; 45.46% at 30°C; 59.89% at 35°C; and 59.02% at 40°C. Statistical test showed that there was a significant effect of incubation temperature on the value of remedied Lead (sig<0.05). The bacteria T2P2 showed optimal lead bioremediation ability at incubation temperature 35°C.

ملخص البحث

حاكم، رشيد نور. ٢٠٢١. **أثر درجة حرارة الحضانات نحو قدرة بؤوريميدياسي تيمبال من الجرثوم T2P2 من منطقة التعدين تولونج اكونج**. البحث العلميّ. القسم تعليم الكيمياء، كلّيّة العلم و التقنيّ، جامعة الإسلام الرسميّة مولانا مالك إبراهيم. المستشرفة الأول:أنيك معونة الماجيستير ، المستشرف الثاني: أحمد حنافي الماجيستير

الكلمات الرئيسيّة: الجرثوم، بؤوريميدياسي تيمبال، درجة حرارة الحضانات.

كان تيمبال هو أحد المعادن الثقيلة له الوفرة الرافعة في العالم و له صفة السمّ نحو كائن الحيّ. و تكون عمليّة التعدين أحد مصادر الوساخة تيمبال في البيئة. و يستعمل بؤوريميدياسي الجرثوم و هو أحد ردائف معاملة الوساخة تيمبال لطيف بيئته و الفعّال. و غرض هذا البحث لمعرفة أثر درجة الحرارة نحو قدرة بؤوريميدياسي تيمبال من ايسولات الجرثوم T2P2 الّتي تُنال من البحيرة تيكا ورنا تولونج اكونج.

و تُعمل تجربة قدرة بؤوريميدياسي تيمبال في الوسيلة *Nutrient Broth* (NB) الّتي تحتوي على ١٠٠ ppm تيمبال. و تُعمل الحضانات اينوكولوم ما دام ٢٤ ساعة بتنوّع درجة حرارة الغرفة، ٣٠، ٣٥ و ٤٠ °C. و يُقاس قياس ريسيدو تيمبال في الوسيلة باستعمال سفيكتروفوتوميتر سيرافان ذرّة في طويل موج ٢٨٣،٣ nm. و أثر درجة الحرارة نحو قدرة بؤوريميدياسي تيمبال تُحلّل إحصائيّة باستعمال تجربة *One Way* ANOVA.

و تدلّ قدرة بؤوريميدياسي تيمبال من T2P2 ايسولات الجرثوم بنتيجة تيمبال الوساطة؛ في تنوّع درجة حرارة الغرفة قدر ٣٩،٨١%؛ درجة حرارة ٣٠ °C قدر ٤٥،٤٦%؛ درجة حرارة ٣٥ °C قدر ٥٩،٨٩%؛ و درجة حرارة ٤٠ °C قدر ٥٩،٠٢%. و تدلّ تجربة الإحصائيّة وجود أثر ظاهر درجة حرارة الحضانات نحو نتيجة تيمبال الوساطة (sig<0,05). و تدلّ ايسولات الجرثوم T2P2 قدرة بؤوريميدياسي تيمبال الأمثل في حال درجة حرارة الحضانات ٣٥ °C.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Limbah logam berat merupakan salah satu pencemar berbahaya yang dihasilkan oleh aktivitas antropogenik, salah satunya aktivitas pertambangan. Banyak bekas tambang logam yang ditinggalkan begitu saja tanpa melakukan restorasi ekosistem ataupun reklamasi menjadi penyebab terjadinya pencemaran limbah logam berat. Hal tersebut menimbulkan limbah logam berat, seperti seng, kadmium, timbal, kromium, yang mengakibatkan konsentrasi logam berat dalam tanah meningkat (Jin dkk., 2018). Daldoul dkk. (2019) menunjukkan kandungan logam berat pada tambang di Tunisia dengan konsentrasi Zn 20 – 4.800 ppm dan Pb 85,7 – 2.761 ppm. Pulit dkk. (2018) menunjukkan adanya pencemaran logam berat akibat aktivitas tambang tembaga dengan konsentrasi Cu, Pb dan Cd masing-masing adalah 2.610 ppm, 1.132 ppm dan 1,0 ppm. Olobatoke dan Mathuthu (2016) menunjukkan adanya pencemaran As 13 – 82 ppm, Pb 3- 49 ppm dan Cu 4 – 39 ppm pada tanah di area tambang emas. Berdasarkan ketiga penelitian yang disampaikan, timbal (Pb) menjadi salah satu limbah logam berat yang banyak ditemukan sebagai dampak aktivitas pertambangan.

Timbal menempati peringkat pertama dalam daftar bahan beracun *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) berdasarkan prevalensi dan tingkat toksisitasnya. Hal ini diperburuk oleh sifat logam berat yang tidak dapat terdegradasi secara alami, sehingga dapat terakumulasi dalam tanah. Tumbuhan yang hidup di lingkungan terkontaminasi dapat menyebabkan paparan logam berat

pada rantai makanan manusia (Singh dan Prasad, 2015). Timbal bersifat teratogenik dan mutagenik bagi manusia (Heidari dan Panico, 2020). Bahaya pencemaran Timbal yang mengancam kelangsungan hidup manusia seharusnya menyadarkan kita akan konsekuensi dari perbuatan merusak alam. Allah berfirman dalam surat *Ar-Rum* ayat 41 :

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِى الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ اَيْدِى النَّاسِ لِيُذِيْقَهُمْ بَعْضَ الَّذِيْ عَمِلُوْا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُوْنَ (٤١)

Artinya: *"Telah tampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia; Allah menghendaki agar mereka merasakan sebagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)"* (Q.S *ar-Rum* : 41).

Menurut Gani dkk. (1995) ayat tersebut berisi pernyataan bahwa kerusakan yang terjadi di darat maupun di laut disebabkan perbuatan manusia. Perbuatan ini dapat terjadi karena manusia menyalahgunakan fitrah dari Allah sebagai *khalifah*. Manusia mengerjakan kerusakan dengan kehendaknya yang bebas tanpa mengingat setiap perbuatan manusia akan mendapat balasan kelak di akhirat. Sebagian dari balasan perbuatan buruk mereka juga diberikan Allah di dunia, seperti bencana alam ataupun limbah logam berat yang membahayakan kesehatan manusia. Dampak berbahaya logam berat ini dapat menjadi pengingat manusia untuk berhenti berbuat kerusakan dan menjaga lingkungan dengan baik.

Penanganan cemaran timbal secara konvensional dapat dilakukan dengan pendekatan kimia-fisik seperti oksidasi-reduksi, penukar ion, maupun pemisahan dengan membran (Heidari dan Panico, 2020; Huang dkk., 2006). Permasalahan utama yang menghambat remediasi timbal secara konvensional adalah biaya yang

tinggi, penggunaan bahan kimia berbahaya, dan potensi terbentuknya produk samping yang beracun atau pencemar sekunder (Bilal dan Iqbal, 2020). Hal ini mendorong adanya inovasi metode restorasi ekologis yang lebih ramah lingkungan (Jin dkk., 2018). Restorasi dengan memanfaatkan mikroorganisme sebagai agen remediasi, atau sering dikenal dengan istilah bioremediasi, secara umum dianggap lebih aman dan lebih baik dalam memulihkan fungsi tanah dibandingkan dengan metode kimia-fisik konvensional (Alvarez dkk., 2017). Selain itu, mikroorganisme yang digunakan dalam bioremediasi bisa diperoleh dengan mudah di alam dan dikembangbiakkan sangat cepat (Abbas dkk., 2014).

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang banyak digunakan sebagai agen bioremediasi timbal. Penggunaan bakteri untuk restorasi ramah lingkungan terus dikembangkan karena kemampuan resistensi bakteri terhadap timbal sangat baik (Arashiro, 2018). Beberapa penelitian menunjukkan hasil pengujian *minimum inhibitory concentration* pada bakteri resisten timbal yang diisolasi dari kawasan pertambangan. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Ihsani (2020) menunjukkan bakteri T2P2 memiliki kemampuan resisten timbal hingga 1242 ppm. Pulit dkk. (2018) menunjukkan bakteri *Pseudomonas azotoformans* mampu bertahan pada media yang mengandung timbal hingga konsentrasi 1.000 ppm. Selain itu, Marzan dkk. (2017) juga melaporkan bakteri *Hafnia sp.* memiliki resisten terhadap timbal hingga konsentrasi 1.200 ppm. Uraian penelitian tersebut menunjukkan bahwa bakteri resisten timbal dapat dijumpai di daerah tambang dan berpotensi untuk digunakan sebagai bioremediator timbal.

Eksplorasi kemampuan bioremediasi timbal yang dimiliki oleh bakteri resisten timbal terus dilakukan. Menurut Heidari dan Panico (2020) identifikasi

bakteri baru merupakan upaya penting untuk menemukan agen bioremediasi yang lebih efisien untuk menghilangkan pencemaran timbal. Heterogenitas spesies menjadi salah satu alasan adanya perbedaan kemampuan bioremediasi timbal oleh setiap bakteri. Marzan dkk. (2017) menunjukkan kemampuan bioremediasi timbal oleh *Gemella sp.* sebesar 55,16%, dimana hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan *Micrococcus sp.* sebesar 36,55%. Selain itu, penelitian Dabir dkk. (2019) menunjukkan kemampuan bioremediasi timbal oleh *Rhodococcus sp. AM1* sebesar 58%, dimana hasil tersebut lebih tinggi dibanding *Microbacterium oxydans CM3* sebesar 38%. Kedua penelitian tersebut membuktikan perbedaan jenis bakteri berpengaruh terhadap kemampuan bioremediasi timbal.

Faktor lingkungan juga menyebabkan perbedaan kemampuan bakteri dalam melakukan bioremediasi timbal (Abbas dkk., 2014). Faktor lingkungan yang mempengaruhi kemampuan bioremediasi meliputi pH, konsentrasi pencemar dan suhu. Efek suhu merupakan salah satu faktor yang banyak diteliti karena berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri, aktivitas enzim, ataupun fluiditas membran sehingga berdampak pada kemampuan bioremediasi timbal (Ali Redha, 2020). Masing-masing bakteri memiliki kondisi suhu optimal yang berbeda-beda. Audu dkk. (2020) mengidentifikasi kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri *Pantoea agglomerans* dapat optimal pada suhu 30°C. Heidari dan Panico (2020) melakukan studi optimalisasi kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri *Bacillus sp*. Q3 dan Q5 yang menunjukkan suhu optimal kedua bakteri masing masing 38,8°C dan 34,3°C. Selain itu, penelitian Shao dkk. (2019) menunjukkan kondisi optimal *Bacillus sp . Strain MRP-3* untuk melakukan bioremediasi timbal berada

pada suhu 37°C. Ketiga penelitian tersebut menunjukkan bahwa setiap bakteri memiliki suhu optimal yang beda.

Berdasarkan uraian yang telah disampaikan, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan bakteri T2P2 dalam melakukan bioremediasi timbal. Perlakuan suhu inkubasi dipilih untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap proses bioremediasi dan mengetahui suhu inkubasi optimal bakteri T2P2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi dalam riset komprehensif mengenai potensi bakteri tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2 ?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2.

1.4 Batasan Masalah

1. Bakteri T2P2 merupakan hasil isolasi oleh penelitian sebelumnya dari kawasan pertambangan di Desa Panggunguni, Kecamatan Pucanglaban, Kabupaten Tulungagung.
2. Uji bioremediasi timbal dilakukan pada kondisi pH 7 dan inkubasi statis (tanpa *shaker*) selama 24 jam.
3. Pengukuran kadar timbal dilakukan menggunakan spektrofotometer serapan

atom - nyala pada panjang gelombang 283,3 nm

1.5 Manfaat

1. Memberi alternatif solusi restorasi ekosistem dari pencemaran timbal secara ramah lingkungan menggunakan bioremediasi.
2. Memberi informasi mengenai kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2**.**

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Logam Berat Timbal

Unsur timbal atau *plumbum* dalam bahasa latin merupakan padatan logam berwarna abu-abu kebiruan. Nomor atom dari timbal adalah 82 dengan berat atom 207,20 dan termasuk golongan IVA dalam tabel periodik. Sifat timbal adalah lunak, elastis dan memiliki konduktivitas rendah. Titik lelehnya mencapai 328 ^{o}C dan mendidih pada suhu 1.740 ^{o}C (Ghazi dan Millette, 2006).

Timbal dapat ditemukan secara alami maupun timbul akibat kegiatan antropogenik. Kelimpahan timbal di alam menempati urutan ke 36 dan menempati posisi pertama pada unsur dengan nomor atom > 60 (Ghazi dan Millette, 2006). Sumber alami timbal meliputi emisi dari gunung berapi dan pelapukan batuan yang diperkaya logam. Sedangkan, sumber utama pencemaran timbal berasal dari aktivitas antropogenik seperti pertambangan dan industri baterai (Zaidi dkk., 2014).

Pencemaran timbal merupakan salah satu pencemaran yang sulit ditangani karena logam berat tidak dapat terdegradasi secara alami (Huang dkk., 2006). Tumbuhan yang hidup di lingkungan tercemar dapat mengakumulasi timbal dan menjadi pintu masuk paparan timbal ke rantai makanan (Singh dan Prasad, 2015). Pada tumbuhan, logam berat ini dapat mengganggu pertumbuhan, menghambat kinerja enzim dan penyerbukan (Ayangbenro dan Babalola, 2017). Timbal bersifat teratogenik dan mutagenik pada manusia, sehingga dapat mengakibatkan kanker, gagal ginjal, gangguan neurodegeneratif juga gangguan reproduksi (Heidari dan Panico, 2020).

2.2 Bakteri dalam Perspektif Al Quran

Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, manusia mampu mengidentifikasi bentuk kehidupan yang sangat kecil melalui mikroskop. Manusia mulai mempelajari bentuk-bentuk kehidupan tersebut hingga dapat mengidentifikasi suatu mikroorganisme bernama bakteri. Jauh sebelum itu, al-Qur'an telah mengindikasikan keberadaan bentuk-bentuk kehidupan yang belum diketahui manusia saat wahyu tersebut turun. Diantara beberapa ayat Al-Quran yang mengindikasikan peristiwa tersebut adalah *al-Baqarah* ayat 26 dan *an-Nahl* ayat 8 (Lajnah Pentashihan Mushaf Al Quran, 2015).

إِنَّ ٱللَّهَ لَا يَسْتَحْيِۦٓ أَن يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۚ فَأَمَّا ٱلَّذِينَ ءَامَنُوا۟ فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ ٱلْحَقُّ مِن رَّبِّهِمْ ۖ وَأَمَّا ٱلَّذِينَ كَفَرُوا۟ فَيَقُولُونَ مَاذَآ أَرَادَ ٱللَّهُ بِهَٰذَا مَثَلًا ۘ يُضِلُّ بِهِۦ كَثِيرًا وَيَهْدِى بِهِۦ كَثِيرًا ۚ وَمَا يُضِلُّ بِهِۦٓ إِلَّا ٱلْفَٰسِقِينَ (٢٦)

Artinya: *"Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?". Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik".* (QS. *al-Baqarah*: 26)

Menurut tafsir Departemen Agama RI (2011), kata مَثَلٌ pada *al-Baqarah* ayat 26 menggambarkan suatu makna yang umumnya abstrak dalam bentuk yang indrawi agar mudah dimengerti, indah, dan menarik. Penjelasan tersebut sama seperti pendapat Ibnul Qayyim, مَثَلٌ digunakan untuk mendekatkan sesuatu yang abstrak dengan yang indrawi, agar yang abstrak itu dapat dimengerti lebih mudah. Allah menyandingkan seekor nyamuk yang merupakan binatang kecil yang dapat

dilihat indrawi untuk menggambarkan ukuran suatu makhluk yang lebih kecil darinya. Sesuatu yang lebih kecil dari nyamuk bisa dipersepsikan sebagai mikroorganisme seperti bakteri yang belum teridentifikasi atau diketahui saat ayat tersebut turun.

وَٱلْخَيْلَ وَٱلْبِغَالَ وَٱلْحَمِيرَ لِتَرْكَبُوهَا وَزِينَةً ۚ وَيَخْلُقُ مَا لَا تَعْلَمُونَ (٨)

Artinya: *"Dan (Dia telah menciptakan) kuda, bagal dan keledai, agar kamu menungganginya dan (menjadikannya) perhiasan. Dan Allah menciptakan apa yang kamu tidak mengetahuinya".* (QS. *An-Nahl* : 8)

Lajnah Pentashihan Mushaf Al Quran (2015) melalui buku Jasad Renik dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains, mengartikan kalimat "Dan Allah menciptakan apa yang tidak kamu ketahui" pada surah *an-Nahl* ayat 8 di atas sebagai petunjuk akan eksistensi jasad renik atau mikroorganisme yang belum diketahui oleh manusia pada saat itu. Frasa tersebut disandingkan dengan kuda, bagal dan keledai, yang sudah dikenal masyarakat dan diketahui manfaatnya sebagai transportasi. Hal tersebut diterjemahkan sebagai petunjuk bahwa banyak hal dari "sesuatu yang tidak kamu ketahui" yang menyimpan manfaat. Seiring perkembangan zaman, berbagai jenis mikroorganisme dapat teridentifikasi dengan teknologi yang tersedia dan manfaatnya mulai dikembangkan dalam berbagai bidang, salah satunya peningkatan kualitas lingkungan hidup melalui bioremediasi menggunakan bakteri.

2.3 Bioremediasi Timbal Menggunakan Bakteri

Bioremediasi merupakan salah satu teknik yang sering digunakan untuk

menghilangkan pencemaran logam berat menggunakan mikroorganisme (bakteri, fungi atau *yeast*) endogen ataupun eksogen (Huang dkk., 2006). Bakteri menjadi salah satu mikroorganisme yang banyak dimanfaatkan untuk mengatasi pencemaran logam berat seperti timbal (Zhang dkk., 2020). Dibandingkan dengan metode fisika-kimia konvensional, bioremediasi timbal dengan bakteri lebih dipilih karena lebih ramah lingkungan (Huang dkk., 2006). Hampir seluruh polutan dan bakteri dapat dihilangkan, sehingga pencemaran sekunder dapat dihindari dan struktur (kandungan) tanah tetap terjaga (Jin dkk., 2018). Keuntungan lain penggunaan bakteri adalah mudah didapat, mudah diregenerasi, dan dapat digunakan untuk mendegradasi beberapa jenis logam sekaligus (Abbas dkk., 2014).

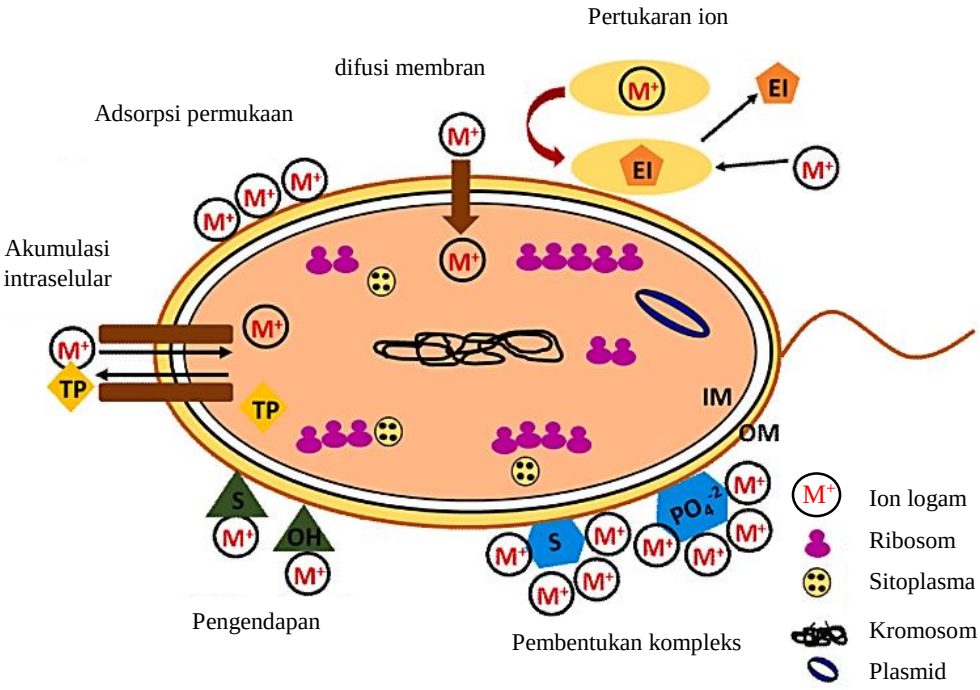
Beberapa penelitian mengenai kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri disajikan pada Tabel 2.1. Pengukuran kemampuan bakteri dapat dilakukan dengan menginokulasikan bakteri pada media perlakuan diperkaya timbal dalam jangka waktu yang ditentukan. Setelah mencapai batas waktu, konsentrasi residu timbal akan dibandingkan dengan konsentrasi awal untuk mengetahui jumlah timbal yang hilang akibat aktivitas bakteri (Irawati dkk., 2017; Jin dkk., 2018; Marzan dkk., 2017).

Tabel 2.1 Kemampuan bioremediasi timbal oleh berbagai jenis bakteri

Nama Bakteri	Konsentrasi Awal (ppm)	Konsentrasi Teremediasi (ppm)	Referensi
Pantoea agglomerans	15	13,039	(Audu dkk., 2020)
Rhodococcus sp. AM1	400	232	(Dabir dkk., 2019)
Gemella sp.	100	54,84	(Marzan dkk., 2017)
Enterobacter cloacae KJ-46	7,2	4,9	(Kang dkk., 2015)

Bakteri memiliki mekanisme bioremediasi timbal yang membantu mereka

bertahan di lingkungan tercemar timbal. Beberapa mekanisme bioremediasi timbal diantaranya biosorpsi dan bioakumulasi. Biosorpsi merupakan mekanisme bioremediasi timbal yang memanfaatkan pengikatan ion logam oleh gugus anionik pada dinding sel. Sedangkan bioakumulasi merupakan mekanisme bioremediasi secara intraseluler dengan melibatkan transpor protein atau difusi logam berat dan serangkaian aktivitas enzimatik di dalam sel (Abbas dkk., 2014; Jarosławiecka dan Piotrowska-Seget, 2014).



Gambar 2.1 Mekanisme bioremediasi logam berat (Priyadarshanee dan Das, 2021)

1. Biosorpsi

Biosorpsi melibatkan peran dinding sel bakteri dalam mengikat ion timbal. Kemampuan biosorpsi timbal oleh dinding sel bakteri disebabkan adanya gugus anion dari makromolekul penyusunnya. Berdasarkan penelitian Gabr dkk. (2008), gugus anionik yang berperan dalam biosorpsi timbal pada bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a adalah gugus amina, hidroksil, karboksil,

sulfonat dan fosfat. Berdasarkan Gambar 2.1, biosorpsi memiliki beberapa jenis mekanisme seperti pengendapan, pembentukan kompleks, pertukaran ion, dan adsorpsi permukaan. Pengendapan timbal oleh dinding sel terjadi akibat reaksi ion logam dengan gugus fungsi pada permukaan sel bakteri dan menghasilkan endapan logam dalam bentuk senyawa organik yang tidak larut dan menempel pada dinding sel. Pembentukan kompleks pada dinding sel melibatkan pengikatan ion logam oleh ligan organik pada dinding sel. Selain itu, mekanisme biosorpsi juga melibatkan pertukaran ion yang terjadi antara logam timbal dengan ion pada dinding sel. Terakhir, adsorpsi permukaan memanfaatkan adanya gaya *Van Der Waals* yang terjadi antara dinding sel dengan ion logam (Priyadarshanee & Das, 2021).

2. Bioakumulasi

Akumulasi timbal secara intraseluler dibantu oleh proses transpor protein melalui membran sel. Transpor protein membantu timbal masuk ke dalam membran sel bakteri dimediasi oleh mekanisme yang sama yang digunakan untuk membawa ion esensial seperti Mg^{2+} Mn^{2+} dan Zn^{2+}. Sistem transpor tersebut menjadi kacau dengan adanya ion logam berat dengan muatan yang sama dan jari-jari ionik yang terkait dengan ion esensial. Dalam mekanisme ini, protein ATPase tipe-P mengangkut kation logam melintasi membran sitoplasma menggunakan ATP sebagai sumber energi (Jarosławiecka dan Piotrowska-Seget, 2014; Javanbakht dkk., 2014).

Timbal yang masuk ke dalam sitoplasma melalui transpor protein akan memicu bakteri untuk melakukan serangkaian aktivitas enzimatik dan mensintesis *metallothionein* (MT) sebagai respon peningkatan paparan timbal. MT merupakan

salah satu protein pengkelat timbal yang membantu proses sekuestrasi di dalam sel. Sintesis MT dikode oleh plasmid bmtA dan smtAB yang dimiliki bakteri resisten timbal (Arashiro, 2018; Zhang dkk., 2020). Murthy dkk. (2011) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa konsentrasi MT yang dihasilkan *Bacillus cereus* sebanding dengan peningkatan konsentrasi timbal. Sharma dkk. (2016) meneliti sekuestrasi timbal dengan bantuan *metallothionein* sebesar 155,12 mg g^{-1} oleh *Providencia vermicola* yang memiliki gen BmtA. Kedua penelitian tersebut membuktikan adanya bioremediasi timbal secara intraseluler dengan bantuan MT.

2.4 Pengaruh Suhu Inkubasi Terhadap Aktivitas Bioremediasi Logam Berat

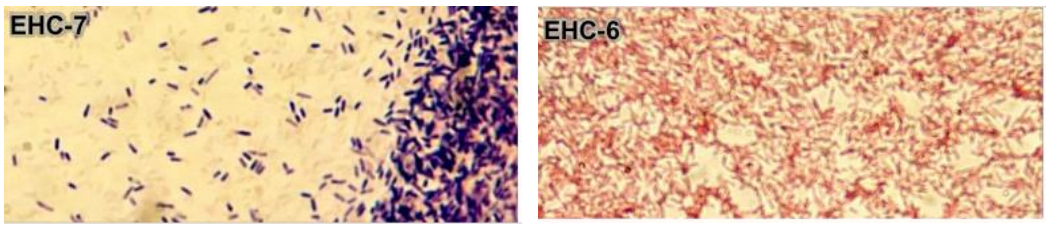
Suhu inkubasi mempengaruhi pertumbuhan bakteri, sehingga berdampak pada efektivitas bioremediasi logam berat (Jin dkk., 2018). Pertumbuhan dan aktivitas enzimatik bakteri mencapai nilai tertinggi pada rentang suhu 30-40°C (Heidari dan Panico, 2020). Kenaikan suhu juga menyebabkan meningkatkan difusi logam melintasi lapisan membran sel karena viskositas cairan menurun dengan meningkatnya suhu. Efek lain kenaikan suhu yaitu mempengaruhi kelarutan nutrisi maupun timbal dalam media (Igiri dkk., 2018; Kumar dkk., 2009).

Beberapa penelitian menunjukkan suhu inkubasi optimal bakteri untuk bioremediasi timbal berkisar antara 25^{o}C hingga 40^{o}C. Bakteri *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus rhamnosus* memiliki kondisi optimal pada suhu 25 ^{o}C (Al-Hadedee dkk., 2019). Penelitian lain menunjukkan bakteri *Pantoea agglomerans* (Audu dkk., 2020) dan *Rhodobacter sphaeroides* (Li dkk., 2016) memiliki suhu optimal antara suhu 30 - 35^{o}C. Penelitian Heidari dan Panico (2020) menunjukkan *Bacillus sp.* Q3 dan Q5 memiliki suhu optimum masing masing 34,3

dan 38,8 ^{o}C. Uraian penelitian tersebut menunjukkan bahwa setiap bakteri memiliki suhu optimal yang berbeda.

2.5 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan diferensial yang digunakan untuk mengelompokkan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Harley, 2005). Prinsip pewarnaan Gram didasarkan pada interaksi pewarna dengan sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang tebal dan mengandung lipid yang relatif sedikit, sehingga mengikat warna ungu dari kristal violet-iodin dengan kuat dan tidak pudar akibat pembilasan alkohol. Sebaliknya, bakteri Gram negatif memiliki dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi dan dapat larut oleh pembilasan alkohol, sehingga warna dari kristal violet pudar dan sel bakteri menjadi berwarna merah karena penambahan safranin (*counterstain*) (Zhou & Li, 2015).



(a) (b)

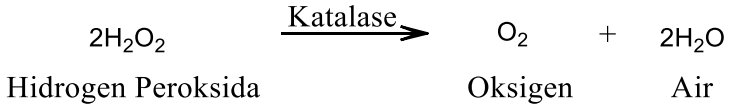
Gambar 2.2 Pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x (a) bakteri Gram positif dan (b) bakteri Gram negatif (Wulandari dan Purwaningsih, 2020)

Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal (20-80 nm) dengan lapisan peptidoglikan multilayer yang berperan untuk mencegah ion logam masuk ke dalam sel. Lapisan peptidoglikan bakteri Gram positif juga mengandung asam

teikoat dan asam teikuronat yang menyumbangkan gugus anionik lebih banyak, sehingga meningkatkan situs pengikatan ion logam pada dinding selnya. Disisi lain, bakteri Gram negatif hanya memiliki 1-3 lapis peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat dan asam teikuronat, sehingga situs pengikatan ion logam yang dimiliki lebih sedikit dibanding bakteri Gram positif. Namun, dinding sel yang tipis (8-10 nm) pada bakteri Gram negatif memberikan jalur lebih mudah dan cepat bagi bakteri tersebut untuk menyerap ion logam berat dan melakukan akumulasi intraseluler (Fathollahi dkk., 2021; Wierzba, 2015).

2.6 Uji Katalase

Uji katalase digunakan untuk mengetahui adanya produksi enzim katalase oleh bakteri (Hemraj dkk., 2013). Aktivitas enzim katalase ditunjukkan dengan munculnya gelembung saat pengujian (Harley, 2005). Gelembung-gelembung tersebut berasal dari oksigen yang terbentuk dari reaksi penguraian Hidrogen peroksida seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3 (Nurhidayati dkk., 2015).



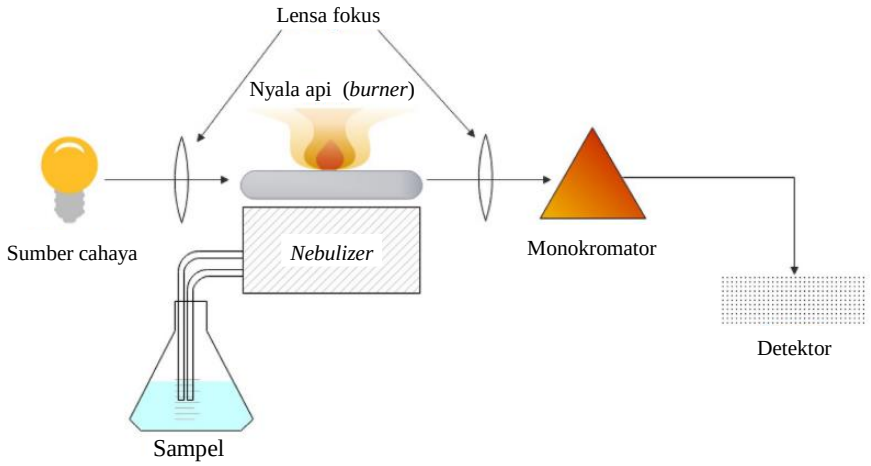
Gambar 2.3 Reaksi penguraian Hidrogen peroksida (Hemraj dkk., 2013)

Hidrogen peroksida merupakan senyawa yang terbentuk sewaktu bakteri melakukan metabolisme aerobik. Senyawa tersebut bersifat toksik karena dapat menginaktifkan aktivitas enzimatik bakteri. Bakteri aerob dan anaerob fakultatif memproduksi enzim katalase yang membantunya untuk menguraikan Hidrogen

peroksida menjadi senyawa yang tidak berbahaya (Nurhidayati et al., 2015).

2.7 Pengukuran Kadar Timbal Menggunakan Instrumen Spektrofotometer Serapan Atom - Nyala

Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) - nyala merupakan salah satu instrumen yang dapat digunakan untuk mengukur kadar timbal dan sejumlah logam berat lainnya. Instrumen ini dipilih karena memiliki sensitifitas yang cukup baik, sampel yang dibutuhkan relatif sedikit dan batas deteksi yang dapat diukur rendah (Usman dkk., 2018). Rangkaian SSA - nyala menggunakan nyala api untuk proses atomisasi sampel dan kebanyakan menggunakan lampu katoda berongga sebagai sumber cahaya seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.4 (Fairulnizal dkk., 2019).



Gambar 2.4 Rangkaian spektrofotometer serapan atom-nyala (Fairulnizal dkk., 2019)

Prinsip kerja SSA-nyala dapat disederhanakan menjadi dua tahapan, yaitu pengubahan sampel menjadi atom bebas (atomisasi) dan pengukuran cahaya yang diserap oleh atom pada panjang gelombang tertentu. Jumlah cahaya yang diserap akan sebanding dengan konsentrasi atom yang menyerap (Fairulnizal dkk., 2019). Timbal dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 217 nm dan 283,3 nm

(Badan Standardisasi Nasional, 2009). Beberapa penelitian menggunakan alat ini untuk mengukur residu timbal dari proses bioremediasi oleh bakteri (Irawati dkk., 2017; Marzan dkk., 2017; Sharma dkk., 2017).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2021 sampai dengan November 2021 di Laboratorium Biokimia, Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pengambilan sampel adalah termometer, pH meter digital, botol kaca, kotak pendingin. Peremajaan bakteri dan pembuatan inokulum bakteri membutuhkan jarum ose, bunsen, cawan petri steril, botol kaca steril, seperangkat alat gelas, inkubator, dan spektrofotometer UV-Vis. Pewarnaan Gram dan uji katalase menggunakan kaca preparat, bunsen dan pipet tetes. Uji aktivitas bioremediasi logam timbal membutuhkan seperangkat alat gelas, mikropipet, *blue tip* steril, bunsen, inkubator, tabung sentrifugasi steril dan *centrifuge*. Analisis kadar timbal memerlukan seperangkat alat gelas, penangas, dan instrumen Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) - nyala.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam analisis sampel air adalah HNO_3 pekat. Peremajaan bakteri dan pembuatan inokulum bakteri membutuhkan bahan berupa stok bakteri T2P2, media *Nutrient Agar* (NA), dan media *Nutrient Broth* (NB). Pewarnaan Gram bakteri menggunakan *kit* pewarnaan Gram HIMEDIA K001 dan

akuades steril. Uji katalase menggunakan H_2O_2 3%. Uji aktivitas bioremediasi timbal menggunakan inokulum bakteri, media NB, larutan induk timbal 1.000 ppm, akuabides, HNO_3 0,1 M dan NaOH 1 M. Analisis kadar timbal menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom - nyala memerlukan larutan standar timbal konsentrasi 1-4 ppm, larutan standar konsentrasi 10-40 ppm, larutan HNO_3 0,5M dan larutan HNO_3 pekat.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu pengaruh suhu inkubasi dengan variasi suhu ruang, 30, 35 dan 40ºC. Bakteri dikarakterisasi dengan pewarnaan Gram dan uji katalase. Inokulum bakteri T2P2 dibuat menggunakan bakteri yang telah diremajakan dan diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam. Bakteri yang akan digunakan uji bioremediasi timbal disetarakan *Optical Density*-nya menjadi 0,6. Konsentrasi residu timbal pada media akan dianalisis menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) - nyala pada panjang gelombang 283,3 nm.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Uji Kandungan Timbal pada Sampel Air
2. Peremajaan Bakteri
3. Pewarnaan Gram
4. Uji Katalase

5. Pembuatan Inokulum
6. Uji Aktivitas Bioremediasi Timbal dengan Variasi Suhu Inkubasi
7. Analisis Kadar Timbal Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom - Nyala
8. Analisis Data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Uji Kandungan Timbal pada Sampel Air

Pengambilan sampel air dilakukan di 3 bekas galian tambang, dimana pada setiap galian terdapat 3 titik pengambilan (lampiran 4). Metode pengambilan sampel air dilakukan sesuai SNI 6989.57:2008. Sampel air akan disimpan dalam botol kaca yang telah dibersihkan dan dibilas dengan HNO_3 sebelumnya. Pengukuran suhu dan pH dilakukan secara langsung di lokasi. Selanjutnya, sampel tersebut dibawa ke laboratorium dalam keadaan dingin dan pH 2.

Preparasi sampel dilakukan sesuai SNI 6989.8:2009 untuk uji kandungan timbal total. Sampel air dari masing masing titik diambil sebanyak 50 mL lalu ditambahkan asam nitrat pekat sebanyak 5 mL. Selanjutnya, sampel dipanaskan menggunakan penangas hingga volume menyusut menjadi 15-20 mL. Kandungan timbal pada sampel diukur menggunakan menggunakan spektrofotometer serapan atom - nyala.

3.5.2 Peremajaan Bakteri

Stok bakteri T2P2 dari lemari pendingin diambil dan didiamkan pada suhu ruang. Peremajaan bakteri dilakukan dengan menginokulasikan satu ose bakteri ke *Nutrient Agar* (NA) dalam cawan petri. Selanjutnya, media berisi bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 ºC (Setyati dkk., 2015).

3.5.3 Pewarnaan Gram Bakteri

Bakteri sebanyak 1 ose digoreskan ke kaca preparat yang sudah steril. Sel bakteri pada kaca preparat ditetesi dengan akuades steril lalu diratakan. Setelah itu, sel bakteri difiksasi diatas nyala bunsen. Larutan pewarna Gram A (kristal violet), Gram B (Iodin), Gram C (Etanol 95%) dan Gram D (Safranin 0,5%), diteteskan secara bergantian sebanyak 2-3 tetes pada preparat dan didiamkan selama 1 menit. Kaca preparat dibilas dengan akuades dan dikering anginkan setiap pergantian penambahan larutan pewarna Gram. Setelah penambahan larutan pewarna Gram, kaca preparat ditambahkan minyak imersi 1 tetes lalu diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 400x. Hasil pewarnaan menunjukkan Gram positif jika terlihat bakteri berwarna ungu. Sedangkan Gram negatif ditunjukkan dengan bakteri berwarna merah (Hendrati dkk., 2017).

3.5.4 Uji Katalase

Bakteri sebanyak 1 ose digoreskan ke kaca preparat yang sudah steril. Hidrogen peroksida 3% ditetes pada sel bakteri. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya gelembung (Hendrati dkk., 2017).

3.5.5 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan menggunakan bakteri yang telah diremajakan. Bakteri diambil sebanyak dua ose kemudian diinokulasikan dalam media *Nutrient Broth* (NB). Kemudian bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 37 ºC selama 24 jam. Setelah waktu inkubasi tercapai, inokulum diukur *optical density* (OD) -nya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 600

nm. Inokulum yang akan dipakai disetarakan OD-nya menjadi 0,6 (Marzan dkk., 2017).

3.5.6 Uji Aktivitas Bioremediasi Timbal dengan Variasi Suhu Inkubasi

Uji aktivitas bioremediasi dilakukan dengan kandungan awal timbal 100 ppm. Inokulum bakteri diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan pada media NB 8 mL yang mengandung logam Pb 125 ppm. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Sampel diinkubasi dengan kondisi suhu ruang, 30, 35, dan 40^{o}C pada pH 7 selama 24 jam (Audu dkk., 2020).

Sampel akan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil sebanyak 5 mL lalu ditambahkan asam nitrat pekat sebanyak 5 mL. Larutan sampel dipanaskan menggunakan penangas hingga volume menyusut menjadi 5 mL. Sampel yang telah dipreparasi kemudian diambil 3 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, sampel diencerkan dengan penambahan 3 mL asam nitrat 0,5M. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Analisis residu timbal menggunakan spektrofotometer serapan atom - nyala (Marzan dkk., 2017).

3.5.7 Analisis Kadar Timbal Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom - Nyala

Metode analisis kadar timbal dilakukan menggunakan spektrofotometer serapan atom - nyala sesuai dengan SNI 6989.8:2009. Kurva standar dibuat dengan konsentrasi larutan standar timbal 0, 1, 2, 3, dan 4 ppm untuk pengukuran sampel air dan konsentrasi 0, 10, 20, 30, dan 40 ppm untuk pengukuran sampel residu aktivitas bioremediasi. Absorbansi larutan standar dan sampel dianalisis dengan

spektrofotometer serapan atom - nyala pada panjang gelombang 283,3 nm (Kusuma dkk., 2019). Kadar timbal teremediasi dihitung menggunakan persamaan 3.1 : (Marzan dkk., 2017)

$$\text{Pb teremediasi (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi awal Pb} - \text{Konsentrasi residu Pb}}{\text{Konsentrasi awal Pb}} \text{ x } 100\% \quad (3.1)$$

3.5.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini yaitu konsentrasi timbal teremediasi akan dianalisis dengan ragam varian *one way* ANOVA menggunakan aplikasi IBM SPSS *statistics* 25. Apabila terdapat pengaruh nyata pada perlakuan, maka analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan signifikansi 5%.

BAB IV

PEMBAHASAN

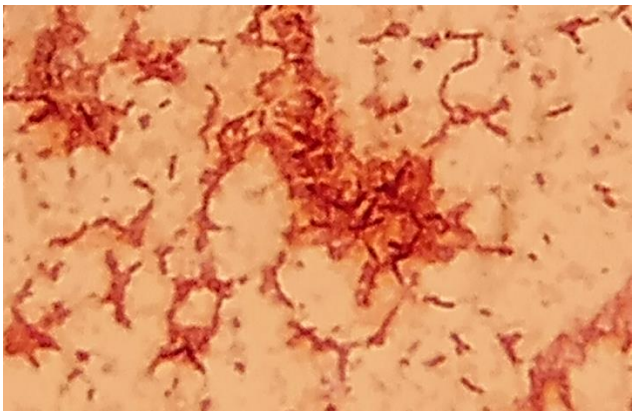
4.1 Karakteristik Bakteri T2P2

Bakteri T2P2 yang disimpan terlalu lama di lemari pendingin perlu diregenerasi dahulu sebelum dikarakterisasi. Regenerasi dilakukan untuk mengaktifkan kembali metabolisme bakteri yang semula inaktif akibat penyimpanan / pengawetan dalam lemari pendingin menjadi aktif kembali (Wijayati dkk., 2014). Hasil regenerasi ditunjukkan dengan munculnya koloni bakteri seperti pada Gambar 4.2.

Gambar 4.1 Bakteri T2P2 hasil regenerasi

Karakterisasi bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji katalase. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui struktur dinding sel bakteri berdasarkan pengelompokan Gram positif dan Gram negatif. Hasil pewarnaan Gram bakteri T2P2 menunjukkan sel bakteri berwarna merah seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.3, sehingga diketahui bahwa bakteri tersebut

merupakan bakteri Gram negatif. Bakteri tersebut juga teridentifikasi memiliki sel berbentuk batang.



Gambar 4.2 Hasil pewarnaan Gram perbesaran 400x

Hasil uji katalase menunjukkan bakteri T2P2 mampu menghasilkan enzim katalase. Hal tersebut ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung setelah penambahan H_2O_2 3% seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.4. Enzim katalase digunakan bakteri aerob untuk memecah hidrogen peroksida yang terbentuk dari proses respirasi menjadi H_2O dan O_2 (Nurhidayati dkk., 2015)

Gambar 4.3 Hasil uji katalase

Berdasarkan uraian yang telah disampaikan, bakteri T2P2 memiliki karakteristik sel berbentuk batang, Gram negatif dan memiliki enzim katalase.

Dinding sel bakteri Gram negatif tersusun atas lipopolisakarida, fosfolipid, protein dan peptidoglikan. Makromolekul penyusun dinding sel tersebut berperan dalam pengikatan timbal menggunakan gugus anionik penyusunnya. Berdasarkan penelitian Gabr dkk. (2008), gugus anionik yang berperan dalam biosorpsi timbal pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a adalah gugus amina, hidroksil, karboksil, sulfonat dan fosfat. Hasan dkk. (2009) menduga gugus fenol dan karboksil pada dinding sel bakteri *Aeromonas hidrophila* terlibat dalam biosorpsi ion timbal melalui mekanisme pertukaran ion.

Dinding sel bakteri Gram negatif memiliki ketebalan 8 - 10 nm, lebih tipis dibanding bakteri Gram positif yang memiliki ketebalan 20 - 80 nm. Hal tersebut disebabkan oleh lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif hanya lapisan tipis tunggal. Lapisan peptidoglikan bakteri Gram negatif juga tidak mengandung asam teikoat atau asam teikuronat sehingga memiliki lebih sedikit gugus karboksil bermuatan negatif dan berdampak pada kapasitas biosorpsi timbal yang dimilikinya lebih rendah. Namun, dinding sel yang tipis menguntungkan bakteri Gram negatif untuk melakukan difusi ion logam ke dalam sel secara lebih mudah. Hal ini membuat bakteri Gram negatif lebih dominan melakukan bioakumulasi (Aryal & Liakopoulou-Kyriakides, 2015; Fathollahi et al., 2021; Wierzba, 2015).

Bateri T2P2 memiliki kemiripan karakteristik dengan beberapa bakteri yang ditunjukkan pada Tabel 4.1. Beberapa bakteri tersebut terbukti memiliki kemampuan bioremediasi timbal. Hasil penelitian menunjukkan *Pantoea agglomerans* (Audu dkk., 2020) *Hafnia sp.* (Marzan dkk., 2017), *Aeromonas Hydrophila* (Hasan dkk., 2009), dan *Pseudomonas sp.* W6 (Gabr dkk., 2008)

masing masing memiliki kemampuan bioremediasi timbal hingga 99,6; 18,3; 47,2; dan 49,4%

Tabel 4.1 Karakteristik beberapa bakteri resisten timbal

Bakteri	Karakteristik	Referensi
Bakteri T2P2	Sel berbentuk batang, Gram negatif, dan katalase positif	Penelitian saat ini
Pantoea agglomerans	Sel berbentuk batang, Gram negatif, dan katalase positif	(Audu dkk., 2020) (Mardaneh dan Dallal, 2013)
Hafnia sp.	Sel berbentuk batang, Gram negatif, dan katalase positif	(Marzan dkk., 2017)
Aeromonas Hydrophila	Sel berbentuk batang, Gram negatif, dan katalase positif	(Sarkar dkk., 2012) (Hasan dkk., 2009)
Pseudomonas sp. W6	Sel berbentuk batang, Gram negatif, dan katalase positif	(Gabr dkk., 2008)

4.2 Pembuatan Inokulum Bakteri

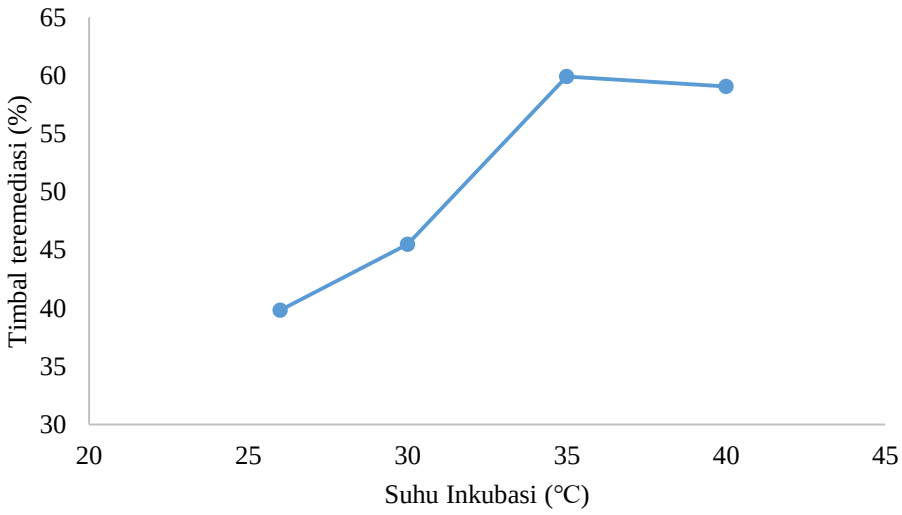
Inokulum merupakan biakan bakteri aktif yang berada pada fase eksponensial. Inokulum dibuat dari biakan bakteri menggunakan media *Nutrient Broth* (NB). Biakan bakteri dalam NB diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37℃. Menurut Pelczar dan Chan (2008), fase eksponensial bakteri dapat dicapai saat biakan berumur 24 jam.

Inokulum akan berubah menjadi keruh setelah mencapai waktu inkubasi. Pengukuran nilai *Optical Density* (OD) dilakukan untuk mengetahui tingkat kekeruhan inokulum. Pengukuran OD dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Kekeruhan inokulum yang diukur berbanding lurus dengan jumlah sel bakteri didalamnya, dimana semakin banyak sel bakteri maka inokulum akan semakin keruh. Setelah diketahui nilai OD-nya, inokulum bakteri yang akan dipakai uji aktivitas disetarakan nilai OD menjadi 0,6 untuk mendapat jumlah biomassa yang mendekati sama.

Gambar 4.4 Inokulum bakteri dengan *optical density* 0,6

4.3 Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Bioremediasi Timbal

Pengujian pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas bioremediasi timbal oleh bakteri dilakukan pada variasi suhu ruang, 30°C, 35°C, dan 40°C. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi suhu inkubasi optimal untuk aktivitas bioremediasi timbal oleh bakteri. Penentuan suhu optimal ini dilihat dari jumlah logam timbal teremediasi oleh bakteri pada suatu variasi suhu dibanding variasi suhu lain. Gambar 4.4 menunjukkan data hasil uji aktivitas bioremediasi timbal oleh bakteri dengan variasi suhu yang telah ditentukan.



Gambar 4.5 Pengaruh suhu inkubasi terhadap timbal teremediasi

Data hasil penelitian pada Gambar 4.3 menunjukkan jumlah timbal teremediasi mengalami *trend* kenaikan seiring bertambahnya suhu inkubasi. Pada variasi suhu ruang (±26℃), konsentrasi timbal teremediasi memiliki nilai paling rendah dibandingkan variasi suhu lain, yaitu sebesar 39,81%. Nilai tersebut terus naik menjadi 45,46%; 59,89%; dan 59,02% seiring kenaikan suhu menjadi 30, 35 dan 40℃. Hasil uji *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa suhu inkubasi memiliki pengaruh nyata terhadap kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2 (sig < 0,05).

Tabel 4.2 Signifikansi pengaruh suhu inkubasi terhadap timbal teremediasi

Variasi suhu	Timbal teremediasi (%)
Suhu ruang	39,81[a]
Suhu 30 ℃	45,46[a]
Suhu 35 ℃	59,89[b]
Suhu 40 ℃	59,02[b]

keterangan : huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi nilai p < 0,05

Tabel 4.2 menunjukkan jumlah timbal teremediasi pada suhu inkubasi 35℃ memiliki nilai paling tinggi dan berbeda nyata dengan variasi suhu ruang dan suhu 30℃. Jika dibandingkan dengan suhu 40℃, jumlah timbal teremediasi tidak berbeda signifikan dengan variasi suhu 35℃. Berdasarkan uraian tersebut, kondisi optimal bakteri T2P2 untuk melakukan bioremediasi timbal adalah pada suhu 35℃. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri jenis *Pseudomonas stutzeri* (Moghannem dkk., 2015) dan *Rhodobacter sphaeroides* (Li dkk., 2016) optimal pada suhu 35℃.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, suhu memiliki pengaruh signifikan dalam aktivitas bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2. Nilai timbal teremediasi meningkat seiring bertambahnya suhu dan mencapai nilai tertinggi pada rentang suhu inkubasi 35 dan 40℃. Hal tersebut dapat terjadi diduga karena kenaikan suhu menyebabkan peningkatan aktivitas enzimatik bakteri T2P2 yang berperan dalam bioremediasi timbal. Diduga pada rentang suhu 35 dan 40℃ aktivitas enzim mengalami kondisi optimum. Hal ini sejalan dengan pendapat Igiri dkk. (2018) yang menyebutkan bahwa kenaikan suhu pada rentang tertentu akan meningkatkan aktivitas enzim pada bakteri sehingga mempercepat proses bioremediasi.

Stabilitas suhu pada kondisi optimum penting untuk mempertahankan fluiditas membran. Menurut Murínová dan Dercová (2014), pertumbuhan bakteri dibawah suhu optimum akan menyebabkan fluiditas membran sel yang rendah dan meningkatkan kekakuannya. Kondisi tersebut menyebabkan transpor nutrisi maupun timbal ke dalam sel terhambat. Sebaliknya, kenaikan suhu pada rentang tertentu akan menyebabkan fluiditas membran sel meningkat, sehingga berdampak pada timbal yang dapat diakumulasi bakteri meningkat (Igiri dkk., 2018). Pernyataan tersebut sesuai dengan hasil penelitian dimana terjadi kenaikan suhu pada rentang 25–35℃ yang menyebabkan kenaikan jumlah timbal teremediasi. Fluiditas membran sel diduga mencapai kondisi optimal pada rentang suhu 35-40℃. Berdasarkan uraian yang disampaikan, diduga mekanisme bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2 dominan dilakukan secara intraseluler atau menggunakan mekanisme bioakumulasi.

Tabel 4.3 Perbandingan kemampuan bioremediasi timbal oleh beberapa bakteri

Bakteri	Timbal Teremediasi (%)	Referensi
Bakteri T2P2	59,89	Penelitian saat ini
Pantoea agglomerans	99,6	(Audu dkk., 2020)
Hafnia sp.	18,3	(Marzan dkk., 2017)
Aeromonas Hydrophila	47,2	(Hasan dkk., 2009)
Pseudomonas sp. W6	49,4	(Gabr dkk., 2008)

Berdasarkan Tabel 4.4, bakteri T2P2 memiliki kemampuan bioremediasi timbal mencapai 59,89%. Kemampuan bioremediasi timbal bakteri T2P2 lebih tinggi dibandingkan bakteri lain seperti *Hafnia sp.* sebesar 18,3% (Marzan dkk., 2017), *Aeromonas Hydrophila* sebesar 47,2% (Hasan dkk., 2009) dan *Pseudomonas sp.* W6 sebesar 49,4% (Gabr dkk., 2008). Namun, kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2 lebih rendah dibandingkan *Pantoea agglomerans* sebesar 99,6% (Audu dkk., 2020).

4.4 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif al-Qur'an

Kekayaan sumber daya alam Indonesia merupakan nikmat yang diberikan Tuhan untuk diambil manfaatnya oleh masyarakat luas. Aktivitas pertambangan merupakan salah satu kegiatan pemanfaatan sumber daya alam berupa mineral, seperti emas dan tembaga, yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Namun di sisi lain, kegiatan tersebut berpotensi menghasilkan pencemaran berupa logam berat yang berbahaya atau toksik, seperti yang ditemukan pada hasil uji sampel air dari kawasan pertambangan di Tulungagung yang menunjukkan adanya kandungan timbal. Hal tersebut tentu berbahaya bagi lingkungan sekitar pertambangan yang notabene dekat dengan pemukiman warga dan aliran sungai. Toksisitas timbal ini dapat membahayakan kesehatan warga dan merusak ekosistem di sekitarnya.

Manusia akan menjadi makhluk perusak yang paling kuat jika tidak memiliki kesadaran dan pemahaman yang baik tentang peran serta tanggung jawabnya sebagai *khalifah* di bumi (Lajnah Pentashihan Mushaf Al Quran dan LIPI, 2015). Dalam al-Qur'an surat *al A'raf* ayat 55-56 terdapat perintah untuk tidak berbuat kerusakan di bumi yang disandingkan dengan pernyataan bahwa Tuhan tidak menyukai orang-orang yang melampaui batas.

ادْعُوا رَبَّكُمْ تَضَرُّعًا وَخُفْيَةً إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُعْتَدِينَ (٥٥) وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَةَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِنَ الْمُحْسِنِينَ (٥٦)

Artinya:*"(55) Berdoalah kepada Tuhanmu dengan rendah hati dan suara yang lembut. Sungguh, Dia tidak menyukai orang-orang yang melampaui batas. (56) Dan janganlah kamu berbuat kerusakan di bumi setelah (diciptakan) dengan baik. Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut dan penuh harap. Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat kepada orang yang berbuat kebaikan." (QS. al-A'raf: 55-56)*

Menurut tafsir Departemen Agama RI (2008), penggalan kalimat "Dia tidak menyukai orang-orang yang melampaui batas" pada ayat 55 diatas merupakan peringatan Tuhan bagi manusia agar tidak melampui batas dalam segala perbuatannya. Peringatan tersebut disambung dengan larangan berbuat kerusakan di bumi pada ayat 56. Hal tersebut menunjukkan segala perbuatan manusia yang melampaui batas berpotensi memicu kerusakan di bumi. Kita telah melihat berbagai kerusakan yang diakibatkan oleh aktivitas manusia seperti kepunahan satwa, pencemaran limbah berbahaya, dan wabah penyakit. Terakhir, ayat 56 ditutup dengan suatu pengingat bahwa orang yang berbuat kebaikan adalah orang yang paling dekat dengan rahmat Allah. Perbuatan baik memiliki arti yang sangat luas. Dalam penelitian ini, perbuatan baik dalam konteks lingkungan dapat dimaknai

dengan upaya menjaga ekosistem alam maupun melakukan pemulihaan lingkungan yang telah rusak.

Penelitian ini membahas mengenai metode bioremediasi timbal menggunakan bakteri sebagai salah satu upaya memulihkan lingkungan yang tercemar timbal. Bakteri yang digunakan sebagai agen bioremediasi limbah timbal mudah diisolasi / didapatkan dari lokasi pencemaran limbah itu sendiri (endogen). Hal tersebut mengingatkan pada *surah Yasin* ayat 36 yang menerangkan bahwa segala sesuatu diciptakan Allah secara berpasang-pasangan, seperti siang dengan malam, jantan dengan betina, limbah dan pengurainya.

سُبْحٰنَ الَّذِيْ خَلَقَ الْاَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْۢبِتُ الْاَرْضُ وَمِنْ اَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُوْنَ (٣٦)

Artinya: *"(36) Mahasuci (Allah) yang telah menciptakan semuanya berpasang-pasangan, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka sendiri, maupun dari apa yang tidak mereka ketahui." (QS. Yasin: 36)*

Menurut tafsir al Misbah (2002), kata (**ازواج**) adalah bentuk jamak dari kata (**زوج**) yang berarti pasangan. Kata ini digunakan untuk masing masing dari dua hal yang berdampingan (bersamaan). Berpasangan pada ayat ini bisa diakibatkan kesamaan maupun karena bertolak belakang. Hal tersebut layaknya limbah timbal dengan bakteri resisten timbal yang merupakan suatu pasangan yang bertolak belakang, yaitu pencemaran dan pengurainya. Pada ayat ini juga terdapat frasa "baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka sendiri, maupun dari apa yang tidak mereka ketahui", dimana menurut buku tafsir al-Qur'an Departemen Agama RI (2011), merupakan suatu tanda bahwa terdapat ciptaan Allah yang belum diketahui manusia karena suatu keterbatasan pemahaman ketika

ayat ini diturunkan. Kini, seiring masifnya perkembangan riset dan teknologi, berbagai hal tersebut dapat terungkap. Dimana bakteri yang merupakan mikroorganisme tak kasat mata, sekarang dapat diteliti dan dipelajari kegunaannya. Kita menjadi tahu bahwa lokasi pencemaran timbal seperti pada area pertambangan juga memiliki bakteri yang dapat menjadi solusi penanganan pencemaran itu sendiri. Penelitian ini menunjukkanbakteri bakteri T2P2 yang diisolasi dari kawasan pertambangan di Tulungagung memiliki kemampuan bioremediasi timbal hingga 59,89%.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kemampuan bioremediasi timbal oleh bakteri T2P2 memiliki kondisi optimal pada suhu inkubasi 35℃ dengan jumlah timbal teremediasi mencapai 59,89 %.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai faktor yang berpengaruh terhadap viabilitas dan kemampuan bioremediasi bakteri, seperti faktor waktu inkubasi, pH media dan konsentrasi awal timbal.
2. Identifikasi fenotip dan genotip pada bakteri T2P2 perlu dilakukan untuk mengetahui spesies bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, S. H., Ismail, I. M., Mostafa, T. M., dan Sulaymon, A. H. (2014). Biosorption of Heavy Metals. *Journal of Chemical Science and Technology*, 3(4), 74–102.

Ali Redha, A. (2020). Removal of Heavy Metals from Aqueous Media by Biosorption. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 27(1), 183–193.

Alvarez, A., Saez, J. M., Davila Costa, J. S., Colin, V. L., Fuentes, M. S., Cuozzo, S. A., Benimeli, C. S., Polti, M. A., dan Amoroso, M. J. (2017). *Actinobacteria*: Current Research and Perspectives for Bioremediation of Pesticides and Heavy Metals. *Chemosphere*, 166, 41–62.

Arashiro, S. M. T. (2018). Lead Absorption Mechanisms in Bacteria as Strategies for Lead Bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(13), 5437–5444.

Aryal, Mahendra dan Liakopoulou-Kyriakides, Maria. (2015). Bioremoval of Heavy Metals by Bacterial Biomass. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1).

Audu, K. E., Adeniji, S. E., dan Obidah, J. S. (2020). Bioremediation of Toxic Metals in Mining Site of Zamfara Metropolis Using Resident Bacteria (*Pantoea agglomerans*): A optimization approach. *Heliyon*, 6, e04704.

Ayangbenro, A. S., dan Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: a Review of Microbial Biosorbents. International *Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1).

Bilal, M., dan Iqbal, M. N. (2020). Microbial Bioremediation as a Robust Process to Mitigate Pollutans of Environmental Concern. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2.

Dabir, A., Heidari, P., Ebrahimi, A., dan Ghorbani, H. (2019). Cadmium and Lead Removal by New Bacterial Isolates from Coal and Aluminum Mines. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(12), 8297–8304.

Daldoul, G., Souissi, R., Tlil, H., Elbahri, D., El Hamiani, O., Chebbi, N., Boularbah, A., dan Souissi, F. (2019). Assessment of Heavy Metal Toxicity in Soils Contaminated by a Former Pb–Zn Mine and Tailings Management Using Flotation Process, Jebel Ghozlane, Northern Tunisia. *Environmental Earth Sciences*, 78(24), 1–14.

Departemen Agama RI. (2008). *Al-Qur ' an Dan Tafsirnya Jilid III (Juz 7,8,9)*. Jakarta : Widya Cahaya

Departemen Agama RI. (2011). *Al-Quran dan Tafsirnya (Edisi yang Disempurnakan) Jilid V*. Jakarta : Widya Cahaya.

Fairulnizal, M. N. M., Vimala, B., Rathi, D. N., dan Naeem, M. N. M. (2019). *Evaluation Technologies for Food Quality*. Zhong, Jian dan Wang, Xichang, editor. Amsterdam : Elsevier

Fathollahi, A., Khasteganan, N., Coupe, S. J., dan Newman, A. P. (2021). A Meta-Analysis of Metal Biosorption by Suspended Bacteria From Three Phyla. *Chemosphere*, 268, 129290.

Gabr, R. M., Hassan, S. H. A., dan Shoreit, A. A. M. (2008). Biosorption of Lead and Nickel by Living and Non-Living Cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(2), 195–203.

Gani, B. A., dkk. (1995). *Al Qur'an dan Tafsirnya*. Yogyakarta : Universitas Islam Indonesia.

Ghazi, A. M., dan Millette, J. R. (2006). *Environmental Forensics : Contaminant Specific Guide* (R. D. Morrison dan B. L. Murphy (ed.)). Cambridge : Academic Press.

Harley, J. P. (2005). *Laboratory Exercises in Microbiology*. Sixth Edition. New York : Mc Graw Hill.

Hasan, S. H., Srivastava, P., dan Talat, M. (2009). Biosorption of Pb(II) from Water Using Biomass of *Aeromonas hydrophila*: Central Composite Design for Optimization of Process Variables. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2–3), 1155–1162.

Heidari, P., dan Panico, A. (2020). Sorption Mechanism and Optimization Study for the Bioremediation of Pb (II) and Cd (II) Contamination by Two Novel Isolated Strains Q3 and Q5 of *Bacillus sp. International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4059), 1–20.

Hendrati, P. M., Kusharyati, D. F., dan Ryandini, D. (2017). Characterization of *Bifidobacteria* from Infant Feces with Different Mode of Birth at Purwokerto , Indonesia. *Biodiversitas*, 18(3), 1265–1269.

Hemraj, V., Diksha, S., dan Avneet, G. (2013). A Review on Commonly Used Biochemical Test For Bacteria. *Innovare Journal of Science*, 1(1).

Huang, D., Zeng, G., Jiang, X., Feng, C., Yu, H.-Y., Huang, G.-H., dan Liu, H. L. (2006). Bioremediation of Pb-Contaminated Soil by Incubating with *Phanerochaete chrysosporium* and Straw. *Journal of Hazardous Materials*, 134, 268–276.

Igiri, B. E., Okoduwa, S. I. R., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., dan Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals

Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater : A Review. *Journal of Toxicology*, 2018.

Ihsani, S. H. (2020). Isolasi dan Analisis Ketahanan Bakteri di Daerah Bekas Tambang Telaga Tiga Warna Tulungagung Terhadap Logam Berat Timbal (Pb). *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Irawati, W., Riak, S., Sopiah, N., dan Sulistia, S. (2017). Heavy Metal Tolerance in Indigenous Bacteria Isolated from The Industrial Sewage in Kemisan River, Tangerang, Banten, Indonesia. *Biodiversitas*, 18(4), 1481–1486.

Javanbakht, V., Alavi, S. A., dan Zilouei, H. (2014). Mechanisms of Heavy Metal Removal Using Microorganisms as Biosorbent. *Water Science and Technology*, 69(9), 1775–1787.

Jin, Y., Luan, Y., Ning, Y., dan Wang, L. (2018). Effects and Mechanisms of Microbial Remediation of Heavy Metals in Soil : A Critical Review. *Applied Science*, 8(1336), 1–17.

Kang, C., Oh, S. J., Shin, Y., Han, S., Nam, I., dan So, J. S. (2015). Bioremediation of Lead by Ureolytic Bacteria Isolated from Soil at Abandoned Metal Mines in South Korea. *Ecological Engineering*, 74, 402–407.

Kumar, A. V. A., Naif A. Darwish, dan Hilal, N. (2009). Study of Various Parameters in the Biosorption of Heavy Metals on Activated Sludge. *World Applied Sciences Journal*, 32–40.

Kusuma, A. T., Effendi, N., Abidin, Z., dan Awaliah, S. S. (2019). Analisis Kandungan Logam Berat Timbal (Pb) dan Raksa (Hg) pada Cat Rambut yang Beredar di Kota Makassar dengan Metode Spektrofotometri Serapan Atom (SSA). *Celebes Environmental Science*, 1(April), 6–12.

Lajnah Pentashihan Mushaf Al Quran, dan LIPI (2015). *Jasad Renik Dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains*. Jakarta : Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an.

Lajnah Pentashihan Mushaf Al Quran, dan LIPI. (2015). *Kepunahan Makhluk Hidup Dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains. Jakarta* : Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an.

Li, X., Peng, W., Jia, Y., Lu, L., dan Fan, W. (2016). Bioremediation of Lead Contaminated Soil with *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere*, 156, 228–235.

Mardaneh, J., dan Dallal, M. M. S. (2013). Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Pantoea (Enterobacter) agglomerans* Isolated from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in NICU Ward: First report from Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(3).

Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., dan Chowdhury, A. M. M. A. (2017). Isolation and Biochemical Characterization of Heavy-Metal Resistant Bacteria from Tannery Effluent in Chittagong City, Bangladesh : Bioremediation Viewpoint. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65–74.

Moghannem, Saad A. dkk (2015). Characterization of Heavy Metal and Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Polluted Localities in Egypt. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 14(3)

Murínová, S., dan Dercová, K. (2014). Response Mechanisms of Bacterial Degraders to Environmental Contaminants on the Level of Cell Walls and Cytoplasmic Membrane. *International Journal of Microbiology*.

Murthy, S., Bali, G., dan Sarangi, S. K. (2011). Effect of Lead on Metallothionein Concentration in Lead-resistant Bacteria *Bacillus cereus* Isolated from Industrial Effluent. *African Journal of Biotechnology*, 10(71), 15966–15972.

Mustika, D., Asminar, Rahmiati, dan Torowati. (2016). Penentuan *Recovery* dan Limit Deteksi Unsur Kadmium, Kobalt, Tembaga, Mangan, Nikel, Molibdenum, dan Timbal pada Uranium Oksida Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom. *Jurnal teknik lingkungan*, 9(17), 12–21.

Nurhidayati, S., Faturrahman dan Ghazali, M. (2015). Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*. 1(2), 24-30.

Priyadarshanee, M., dan 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.

Pulit, A. C., Bednarek, J. S., dan Laba, W. (2018). Ecotoxicology and Environmental Safety Optimization of Copper , Lead and Cadmium Biosorption Onto Newly Isolated Bacterium Using a Box-Behnken Design. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 275–283.

Sarkar, A., Saha, M., dan Roy, P. (2012). Identification and Typing of *Aeromonas Hydrophila* through 16S rDNA-PCR Fingerprinting. *Journal of Aquaculture*, 3(6), 14–17.

Setyati, W. A., Martani, E., Triyanto, T., dan Zainuddin, M. (2015). Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k Berasal dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara. *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 20(3), 163.

Shao, W., Li, M., Teng, Z., Qiu, B., Huo, Y., dan Zhang, K. (2019). Effects of Pb (II) and Cr (VI) Stress on Phosphate-Solubilizing Bacteria (*Bacillus sp* . Strain MRP-3): Oxidative Stress and Bioaccumulation Potential.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(2172).

Sharma, J., Shamim, K., Kumar, S., dan Murti, R. (2017). Science of The Total Environment Metallothionein Assisted Periplasmic Lead Sequestration as Lead Sulfite by *Providencia vermicola* Strain SJ2A. *Science of the Total Environment*.

Singh, A., dan Prasad, S. M. (2015). Remediation of Heavy Metal Contaminated Ecosystem: an Overview on Technology Advancement. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(1), 353–366.

Shihab, M. Quraish. (2002). *Tafsir Al-Mishbah Jilid 11*. Jakarta : Lentera Abadi

Usman, A. I., Seydou, H., dan Abubakar, A. (2018). Validation of Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) for Trace Elements Analysis of Environmental Samples. *Research & Review: Journal of Physics*, 6(2), 7–13.

Wierzba, S. (2015). Biosorption of Lead (II), Zinc (II) and Nickel (II) from Industrial Wastewater by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Bacillus subtilis*. *Polish Journal of Chemical Technology*, 17(1).

Wijayati, N., Astutiningsih, C., Mulyati, S., dan Artikel, I. (2014). Transformasi α-Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. Biosaintifika: *Journal of Biology dan Biology Education*, 6(1), 24–28.

Wulandari, D., dan Purwaningsih, D. (2020). Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Amilolitik pada Umbi *Colocasia esculenta L.* secara Morfologi, Biokimia, dan Molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(2).

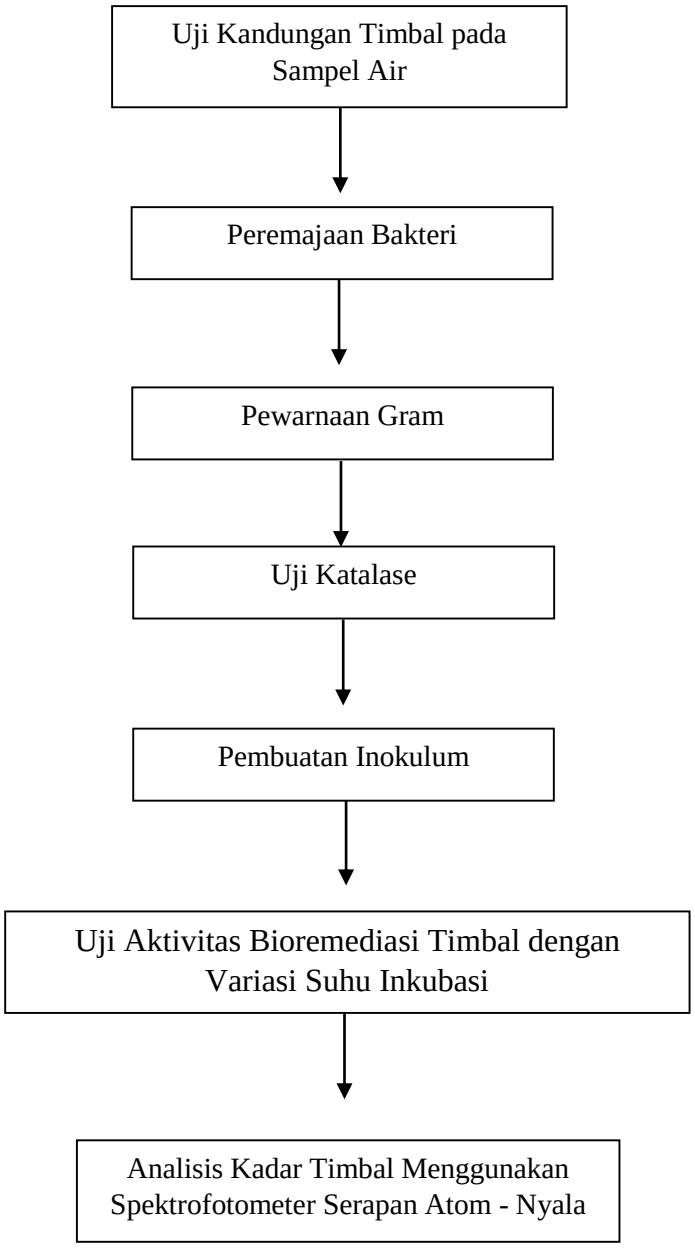
Zaidi, A., Wani, P. A., dan Khan, M. S. (2014). *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*. Wien : Springer.

Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., dan Jiang, L. (2020). Bioremediation of co-Contaminated Soil with Heavy Metals and Pesticides: Influence Factors, Mechanisms and Evaluation Methods. *Chemical Engineering Journal*, 398(125657).

Zhou, Xuedong dan Li, Yuqing. (2015). *Atlas of Oral Microbiology*. Cambridge : Academic Press

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Diagram Alir

a. Uji Kandungan Timbal Pada Sampel Air

Air tambang

- diambil meggunakan botol kaca yang sudah disiapkan
- diukur suhu dan pH lokasi
- dibawa ke laboratorium dalam keadaan dingin dan pH 2
- diambil sebanyak 50 mL lalu ditambahkan asam nitrat pekat sebanyak 5 mL
- dipanaskan hingga volume menyusut menjadi 15-20 mL
- diuji kandungan logam dengan spektrofotometer serapan atom-nyala

Hasil

b. Peremajaan Bakteri

Bakteri

- diambil sebanyak satu ose
- digoreskan ke media NA dalamcawan petri steril
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC

Hasil

c. Pewarnaan Gram Bakteri

Bakteri

- diambil satu ose dan digoreskan ke kaca preparat steril
- dibasahi dengan akuades steril lalu diratakan
- difiksasi diatas nyala bunsen
- ditambahkan pewarna Gram A (kristal violet), Gram B (Iodin), Gram C (Etanol 95%) dan Gram D (Safranin 0,5%), secara bergantian sebanyak 2-3 tetes pada sel bakteri dan didiamkan selama 1 menit.
- dibilas dengan akuades dan dikering anginkan setiap pergantian penambahan pewarna Gram
- ditambahkan minyak imersi 1 tetes
- diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x

Hasil

d. Uji Katalase

Bakteri

- diambil satu ose dan digoreskan ke kaca preparat steril
- ditambahkan H_2O_2 sebanyak 1-2 tetes
- diamati gelembung yang terbentuk

Hasil

e. Pembuatan Inokulum Bakteri

Inokulum Bakteri OD 0,6

- diambil sebanyak dua ose
- diinokulasikan ke media NB
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC
- diukur *optical density*-nya menggunakan spektrometri UV-Vis panjang gelombang 600 nm
- dibuat inokulum dengan *optical density* 0,6

Hasil

f. Uji Aktivitas Bakteri Bioremediasi Timbal Dengan Variasi Suhu Inkubasi

Inokulum Bakteri OD 0,6

- diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan dalam 8 mL media NB yang mengandung timbal 125 ppm.
- dibuat 3 kali pengulangan
- diinkubasi dengan kondisi pH 7; suhu ruang, 30, 35, dan 40ºC selama 24 jam
- disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit
- diambil supernatan sebanyak 5 mL
- ditambahkan asam nitrat pekat sebanyak 5 mL
- dipanaskan hingga volume menyusut menjadi 5 mL
- diambil 3 mL dan ditambahkan 3 mL asam nitrat 0,5 M
- dihomogenkan dengan *vortex mixer*
- dianalisis menggunakan spektrofotometer serapan atom - nyala

Hasil

g. Analisis Kadar Timbal Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom - Nyala

Sampel

- dibuat kurva standar untuk analisis sampel air menggunakan larutan standar timbal 0, 1, 2, 3, dan 4 ppm
- dibuat kurva standar untuk analisis timbal teremediasi menggunakan larutan standar timbal 0, 10, 20, 30, dan 40 ppm
- diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer serapan atom - nyala pada panjang gelombang 283,3 nm

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan

1. Pembuatan Media NB Diperkaya Pb 125 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1.000 \text{ ppm} \times V1 = 125 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V1 = 12{,}5 \text{ mL}$$

Cara Pembuatan :

Larutan induk timbal 1.000 ppm diambil sebanyak 12,5 mL. Larutan timbal diencerkan hingga 100 mL menggunakan media NB dan ditambahkan HNO_3 atau NaOH untuk mengatuh pH menjadi 7. Selanjutnya, larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditandabataskan dan dihomogenkan. Larutan tersebut kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave*.

2. Pembuatan Inokulum Bakteri *Optical Density* (OD) 0,6

Nilai *Optical Density* pada inokulum bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam adalah 1,614.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1{,}614 \text{ ppm} \times V1 = 0{,}6 \text{ ppm} \times 13 \text{ mL}$$

$$V1 = 4{,}833 \text{ mL}$$

Inokulum dengan *Optical Density* 1,614 diambil sebanyak 4,833 mL menggunakan mikropipet secara aseptis lalu dimasukkan ke dalam vial steril. Pengeceran dilakukan menggunakan pelarut media NB steril hingga volume akhir 13 mL.

3. Pembuatan Inokulum Bakteri untuk Uji Aktivitas Bioremediasi Timbal

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$125 \text{ ppm} \times V1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 8 \text{ mL}$$

Cara Pembuatan :

Larutan media diperkaya Pb 125 ppm yang sudah steril diambil sebanyak 8 mL dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi steril. Inokulum bakteri dengan OD 0,6 ditambahkan ke dalam media yang telah disiapkan sebelumnya secara aseptis.

4. Pembuatan Larutan Kurva Standar Pb untuk Analisis Timbal Teremediasi

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 1 \text{ mL}$$

Tabel 4.4 Volume pengenceran larutan induk timbal untuk analisis timbal teremediasi

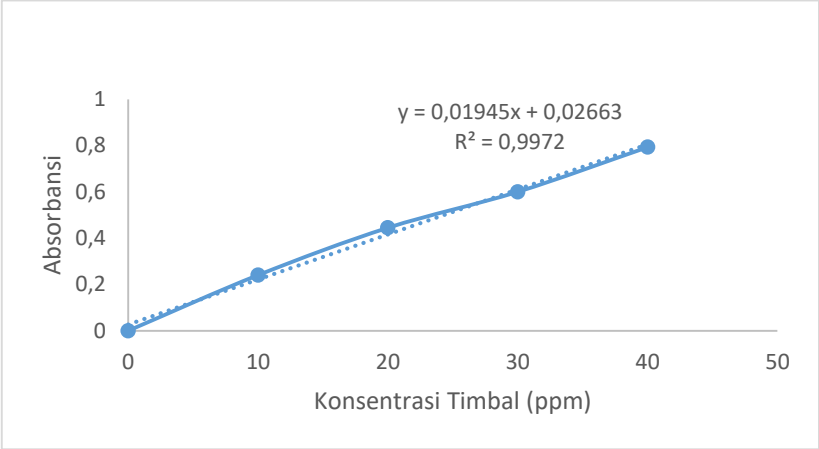
Konsentrasi larutan Pb target (ppm)	Volume larutan Pb target (mL)	Volume larutan stok Pb yang diambil (mL)
10	10	1
20		2
30		3
40		4

Cara Pembuatan :

Larutan stok timbal 100 ppm diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Larutan ditandabataskan menggunakan HNO_3 0,5 M

dan dihomogenkan. Langkah diulang untuk membuat larutan standar konsentrasi 20, 30 dan 40 ppm.

5. Konsentrasi Residu Timbal Hasil Uji Aktivitas Bioremediasi



Gambar 4.6 Kurva standar timbal untuk residu aktivitas bioremediasi

Berdasarkan Gambar 3.2, persamaan regresi linear yang didapatkan adalah y = 0,01945x + 0,02663; dimana x merupakan konsentrasi sampel yang akan dihitung dan y merupakan absorbansi sampel. Persamaan tersebut akan digunakan untuk menghitung kadar timbal residu timbal berdasarkan absorbansinya. Data absorbansi residu timbal dalam media ditunjukkan pada Tabel 3.2 berikut.

Tabel 4.5 Data absorbansi residu timbal dalam media

Variasi Perlakuan	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3
Suhu Ruang (±26℃)	0,6123	0,6182	0,6054
Suhu 30℃	0,5736	0,5421	0,5553
Suhu 35℃	0,4514	0,4247	0,3741
Suhu 40℃	0,3925	0,4232	0,4597

Perhitungan konsentrasi residu timbal dalam media digambarkan dengan contoh variasi suhu ruang sebagai berikut :

y = 0,01945x + 0,02663

0,6119 = 0,01945x + 0,02663

0,01945x = 0,6123 – 0,02663

x = 30,11 ppm

x = 30,11 ppm x faktor pengenceran

x = 30,11 ppm x $\frac{6 \text{ mL}}{3 \text{ mL}}$

x = 60,22 ppm

Tabel 4.6 Konsentrasi residu timbal

Variasi Perlakuan	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3
Suhu Ruang (±26℃)	60,22	60,83	59,51
Suhu 30℃	56,24	53,00	54,36
Suhu 35℃	43,68	40,93	35,73
Suhu 40℃	37,62	40,78	44,53

6. Konsentrasi Timbal Teremediasi

Konsentrasi timbal teremediasi dapat diketahui dengan cara menghitung konsentrasi awal timbal dikurangi konsentrasi residu timbal dalam media. Konsentrasi awal timbal yang digunakan adalah 100 ppm dan data konsentrasi residu timbal ditunjukkan pada Tabel 3.3. Contoh perhitungan digambarkan pada variasi suhu ruang pengulangan 1 sebagai berikut :

Cf = $\frac{Ci - Cr}{Ci}$ x 100%

Cf = $\frac{100\ ppm - 60{,}22\ ppm}{100\ ppm}$ x 100%

Cf = 39,78 %

dimana Cf : konsentrasi timbal teremediasi, Ci : konsentrasi awal timbal, Cr : konsentrasi residu timbal.

Tabel 4.7 Data konsentrasi timbal teremediasi

Variasi Perlakuan	Pengulangan 1 (%)	Pengulangan 2 (%)	Pengulangan 3 (%)	Rata rata (%)
Suhu Ruang (±26℃)	39,78	39,17	40,49	39,81
Suhu 30℃	43,76	47,00	45,64	45,46
Suhu 35℃	56,32	59,07	64,27	59,89
Suhu 40℃	62,38	59,22	55,47	59,02

7. Pembuatan Larutan Kurva Standar Timbal untuk Analisis Sampel Air

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$10 \text{ ppm} \times V1 = 1 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 1 \text{ mL}$$

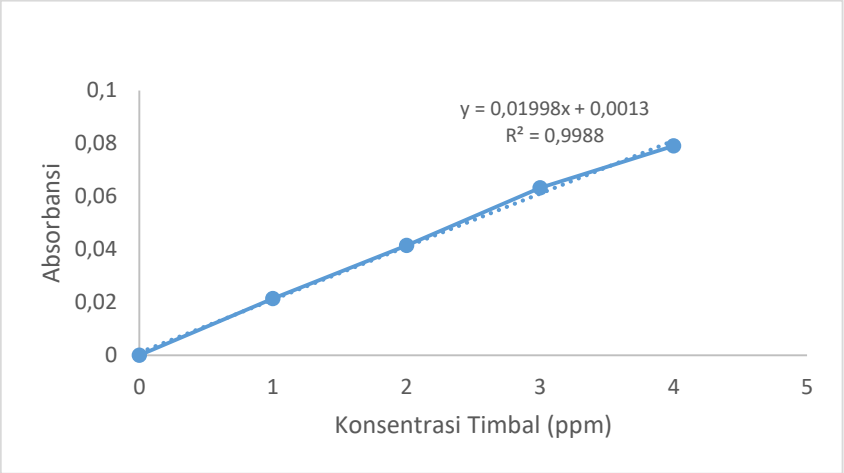
Tabel 4.8 Volume pengenceran larutan induk timbal untuk analisis sampel air

Konsentrasi larutan Pb^{2+} target (ppm)	Volume larutan Pb^{2+} target (mL)	Volume larutan stok Pb^{2+} yang diambil (mL)
1	10	1
2		2
3		3
4		4

Cara Pembuatan :

Larutan stok timbal 10 ppm diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Larutan ditandabataskan menggunakan HNO_3 0,5 M dan dihomogenkan. Langkah diulang untuk membuat larutan standar konsentrasi 2, 3 dan 4 ppm.

8. Konsentrasi Timbal dalam Sampel Air



Gambar 4.7 Kurva standar untuk analisis sampel air

Berdasarkan Gambar 3.3, persamaan regresi linear yang didapatkan adalah y = 0,01998x + 0,0013; dimana x merupakan konsentrasi sampel yang akan dihitung dan y merupakan absorbansi sampel. Persamaan tersebut akan digunakan untuk menghitung kadar timbal dalam sampel air berdasarkan data absorbansinya. Data absorbansi timbal dalam sampel air ditunjukkan pada Tabel 3.6.

Tabel 4.9 Data absorbansi timbal dalam sampel air

Lokasi pengambilan sampel	Titik 1	Titik 2	Titik 3
Bekas Galian 1	0,0054	0,0012	0,0110
Bekas Galian 2	0,0067	0,0052	0,0111
Bekas Galian 3	0,0017	0,0228	0,0200

Perhitungan konsentrasi timbal digambarkan dengan contoh absorbansi dari bekas galian 1, titik 1 berikut :

y = 0,01998x + 0,0013

0,0054 = 0,01998x + 0,0013

0,01998x = 0,0054 – 0,0013

x = 0,205

Tabel 4.10 Konsentrasi timbal dalam sampel air

Lokasi pengambilan sampel	Titik 1	Titik 2	Titik 3
Bekas Galian 1	0,205	0,004	0,496
Bekas Galian 2	0,277	0,205	0,501
Bekas Galian 3	0,027	1,087	0,943

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

Denah lokasi pengambilan sampel air

Lokasi Tambang

Bekas Galian 1

Bekas Galian 2

Bekas Galian 3

Preparasi sampel air

Sampel air setelah dipreparasi

Inokulum hasil uji bioremediasi	Destruksi sampel residu timbal

Lampiran 5. Karakteristik lingkungan pertambangan di Tulungagung

Tabel 4.11 Karakteristik sampel air dari kawasan pertambangan

Lokasi pengambilan sampel	Warna air	pH	Suhu (℃)	Konsentrasi timbal (ppm)	Konsentrasi timbal maksimum* (ppm)
Bekas Galian 1	Hijau kebiruan	6,8	30	0,004-0,496	
Bekas Galian 2	Jingga kekuningan	1,8	32	0,205-0,501	1
Bekas Galian 3	Hijau jernih	2,5	28	0,027-1,087	

***** keputusan menteri lingkungan hidup no. 202 tahun 2004

Lampiran 6. Hasil Analisis Statistik

Descriptives

Konsentrasi timbal Teremediasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Suhu Ruang	3	39.8200	.66091	.38158	38.1782	41.4618	39.18	40.50
Suhu 30℃	3	45.4867	1.62694	.93931	41.4451	49.5282	43.78	47.02
Suhu 35℃	3	59.9000	4.03301	2.32846	49.8814	69.9186	56.34	64.28
Suhu 40℃	3	59.0400	3.46433	2.00013	50.4341	67.6459	55.48	62.40
Total	12	51.0617	9.34383	2.69733	45.1249	56.9985	39.18	64.28

ANOVA

Konsentrasi timbal Teremediasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	897.677	3	299.226	38.178	.000
Within Groups	62.701	8	7.838		
Total	960.378	11			

Multiple Comparisons

Variabel Terikat: Konsentrasi timbal Teremediasi

	(I) Suhu	(J) Suhu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Suhu Ruang	Suhu 30℃	-5.66667	2.28585	.138	-12.9867	1.6534
		Suhu 35℃	-20.08000*	2.28585	.000	-27.4001	-12.7599
		Suhu 40℃	-19.22000*	2.28585	.000	-26.5401	-11.8999
	Suhu 30℃	Suhu Ruang	5.66667	2.28585	.138	-1.6534	12.9867
		Suhu 35℃	-14.41333*	2.28585	.001	-21.7334	-7.0933
		Suhu 40℃	-13.55333*	2.28585	.002	-20.8734	-6.2333
	Suhu 35℃	Suhu Ruang	20.08000*	2.28585	.000	12.7599	27.4001
		Suhu 30℃	14.41333*	2.28585	.001	7.0933	21.7334
		Suhu 40℃	.86000	2.28585	.981	-6.4601	8.1801
	Suhu 40℃	Suhu Ruang	19.22000*	2.28585	.000	11.8999	26.5401
		Suhu 30℃	13.55333*	2.28585	.002	6.2333	20.8734
		Suhu 35℃	-.86000	2.28585	.981	-8.1801	6.4601
LSD	Suhu Ruang	Suhu 30℃	-5.66667*	2.28585	.038	-10.9378	-.3955
		Suhu 35℃	-20.08000*	2.28585	.000	-25.3512	-14.8088
		Suhu 40℃	-19.22000*	2.28585	.000	-24.4912	-13.9488
	Suhu 30℃	Suhu Ruang	5.66667*	2.28585	.038	.3955	10.9378
		Suhu 35℃	-14.41333*	2.28585	.000	-19.6845	-9.1422
		Suhu 40℃	-13.55333*	2.28585	.000	-18.8245	-8.2822
	Suhu 35℃	Suhu Ruang	20.08000*	2.28585	.000	14.8088	25.3512
		Suhu 30℃	14.41333*	2.28585	.000	9.1422	19.6845
		Suhu 40℃	.86000	2.28585	.717	-4.4112	6.1312
	Suhu 40℃	Suhu Ruang	19.22000*	2.28585	.000	13.9488	24.4912
		Suhu 30℃	13.55333*	2.28585	.000	8.2822	18.8245
		Suhu 35℃	-.86000	2.28585	.717	-6.1312	4.4112

Konsentrasi

Tukey HSD[a]

Suhu	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Suhu Ruang	3	39.8200	
Suhu 30℃	3	45.4867	
Suhu 40℃	3		59.0400
Suhu 35℃	3		59.9000
Sig.		.138	.981