

**EFEKTIFITAS BAKTERI *Bacillus subtilis*
DALAM PENGIKATAN LOGAM
Pb, Zn, Fe, Cu, Cd**



TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister
pada Program Studi Biologi**

**Maulin Inggraini
NIM. P2BA11020**

**PROGRAM STUDI S2 ILMU BIOLOGI
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
PURWOKERTO**

2013

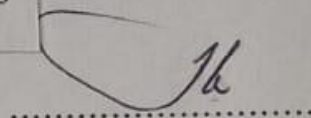
**EFEKTIFITAS BAKTERI *Bacillus subtilis*
DALAM PENGIKATAN LOGAM
Pb, Zn, Fe, Cu, Cd**

TESIS

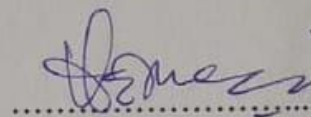
**Maulin Inggraini
NIM. P2BA11020**

Telah dipertahankan di depan tim penguji
Pada tanggal Agustus 2013

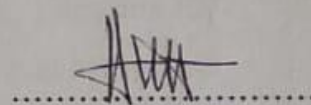
1. Prof. Agus Irianto, M.Sc., Ph.D.
Pembimbing I



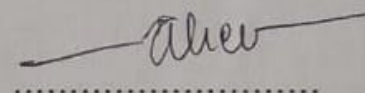
2. Dra. Ardhini Rin Maharning, M.Sc., Ph.D.
Pembimbing II



3. Dr. Hendro Pramono, M.S.
Penelaah I



4. Ir. Alice Yuniaty, M. Sc., Ph.D.
Penelaah II



Purwokerto, Agustus 2013

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN**



Prof. Dr. Hj. Triani Hardiyati, S.U.
NIP. 19510824 197701 2 001



Ketua Program Studi S2 Ilmu Biologi,

Romanus Edy Prabowo, M.Sc., Ph.D
NIP. 19720228 199903 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : MAULIN INGGRAINI

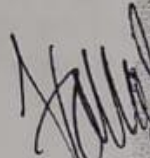
NIM : P2BA11020

Program Studi : BIOLOGI

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis ini benar-benar merupakan hasil karya saya. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa tesis ini hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan ketentuan yang berlaku atas perbuatan tersebut.

Purwokerto, Agustus 2013

Yang membuat pernyataan,



Maulin Inggraini

RINGKASAN

MAULIN INGGRAINI, Program Studi S2 Ilmu Biologi - Program Pascasarjana, Universitas Jenderal Soedirman. Efektifitas Bakteri *Bacillus subtilis* dalam Pengikatan Logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd. Komisi Pembimbing, Ketua : Prof. Agus Irianto, M.Sc., Ph. D., Anggota : Dra. Ardhini Rin Maharning, M.Sc., Ph.D.

Pesatnya perkembangan teknologi dan industri mengakibatkan tingginya pencemaran lingkungan oleh logam berat, seperti Pb, Zn, Fe, Cu dan Cd. Penanggulangan logam berat biasanya dilakukan dengan menggunakan teknik kimia dan fisika, namun alternatif lain adalah dengan teknik biologi yang lebih efisien, pengikatan logam lebih tinggi dan bahan baku mudah didapat. Bakteri yang berpotensi mengurangi pencemaran logam adalah *Bacillus subtilis*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd oleh *B. subtilis*; menguji toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada berbagai konsentrasi; dan mendeteksi tempat akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada *B. subtilis*.

Data yang diperoleh dari pengukuran logam menggunakan metode AAS, kemudian dianalisis menggunakan ANOVA dan BNJ dengan tingkat kesalahan 5% untuk mengetahui perbedaan efektifitas pada setiap perlakuan dan tempat akumulasi logam pada *B. subtilis*. Analisis toleransi *B. subtilis* terhadap logam dilakukan secara deskriptif.

Hasil menunjukkan bahwa *B. subtilis* mampu mengikat logam Pb, Zn, Fe, Cu dan Cd dengan presentasi efektifitas masing-masing adalah sebesar 17,45 %, 7,53 %, 80 %, 16,67 % dan 81,94 %. *B. subtilis* paling baik mentoleransi logam Pb. Logam Pb dan Cd diakumulasi pada dinding sel, logam Zn diakumulasi di dalam sitoplasma, sedangkan logam Fe dan Cu diakumulasi pada dinding sel dan sitoplasma.

Kata kunci : *Bacillus subtilis*, pengikatan Pb, Zn, Fe, Cu, Cd.

SUMMARY

MAULIN INGGRAINI, Biologycal Science-Postgraduate Program, Jenderal Soedirman University, Effectiveness of *Bacillus subtilis* bacteria in Metal Binding of Pb, Zn, Fe, Cu, Cd. Advisor : Prof. Agus Irianto, M. Sc., Ph. D., Co-advisor : Dra. Ardhini Rin Maharning, M.Sc., Ph.D.

The rapid development of technology and industries lead to higher environmental pollution by heavy metals, such as Pb, Zn, Fe, Cu and Cd. Reduction of heavy metals was typically done using chemical and physical approach. Another alternative was biological technique which was more efficient due to its higher metal binding and readily available as materials. *Bacillus subtilis* was a potential bacterium in reducing metal contamination. This study aimed to determine the *B. subtilis* binding effectiveness of Pb, Zn, Fe, Cu, Cd, to test the bacterial tolerance to metals Pb, Zn, Fe, Cu, Cd at varied concentrations, and to detect the accumulation sites of Pb, Zn, Fe, Cu, Cd within *B. subtilis*.

Data were obtained from measurements using a metal AAS method. Result of the experiments were analyzed with analysis of variance (ANOVA) and HSD test error rate of 5 % to know the difference in effectiveness of each treatment and the accumulation of metals in *B. subtilis*. Tolerance analysis of *B. subtilis* to metals were done descriptively.

The results showed that *B. subtilis* was able to bind Pb, Zn, Fe, Cu and Cd with the percentages effectiveness of 17.45%, 7.53%, 80%, 16.67% and 81.94% respectively. *B. subtilis* was mostly tolerant to Pb. Pb and Cd were accumulated in the cell walls, metal Zn was accumulated in the cytoplasm, whereas Fe and Cu were accumulated in both the cell wall and cytoplasm.

Key words : *Bacillus subtilis*, binding Pb, Zn, Fe, Cu, Cd.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “Efektifitas bakteri *Bacillus subtilis* dalam pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd” disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biologi Universitas Jenderal Soedirman.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada

1. Prof. Agus Irianto, M. Sc., Ph.D. dan Dra. Ardhini Rin Maharning, M.Sc., Ph.D, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan kepada penulis sehingga penulis dapat menyempurnakan tesis.
2. Dr. Hendro Pramono, M.S., dan Ir. Alice Yuniaty, M. Sc., Ph.D. yang telah banyak memberikan masukan untuk penyempurnaan tesis.
3. Kedua orangtua serta seluruh keluarga atas doa, materi, dan motivasi yang diberikan selama penulisan tesis.
4. Pemberi Beasiswa Unggulan Biro Perencanaan dan Kerjasama Luar Negeri (BPKLN) Kemendiknas atas bantuan biaya pendidikan yang telah diberikan.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penyusunan usulan penelitian ini masih kurang sempurna, oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan di masa yang akan datang.

Purwokerto, Agustus 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
RINGKASAN	iv
SUMMARY	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	
A. Latar belakang	1
B. Perumusan masalah	3
C. Tujuan	4
D. Manfaat	4
II. TELAAH PUSTAKA	
A. Pencemaran oleh logam berat	5
B. Bioremediasi logam	7
III. METODE PENELITIAN	
A. Materi penelitian	11
B. Rancangan percobaan	11
C. Cara kerja	12
D. Pengamatan	14
E. Analisis data	14
F. Waktu dan tempat	15
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
A. Pola pertumbuhan <i>B. subtilis</i>	16
B. Kemampuan medium pertumbuhan <i>B. subtilis</i> dalam mengikat logam ...	17
C. Efektivitas <i>B. Subtilis</i> dalam mengikat logam	18
D. Kemampuan toleransi <i>B. subtilis</i> terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd	20
E. Lokasi pengikatan logam <i>B. subtilis</i>	21

V. SIMPULAN DAN IMPLIKASI	
A. Simpulan	23
B. Implikasi	23
DAFTAR REFERENSI	24

DAFTAR TABEL

Halaman

3.1 Perlakuan uji efektifitas <i>B. subtilis</i> dalam mengikat logam.....	12
4.1 Konsentrasi logam pada medium NB pada waktu 0 jam dan 18 jam, n=3, rata-rata $\pm$ sd.....	17
4.2 Efisiensi pengikatan logam oleh <i>B. subtilis</i> (n=3, rata-rata $\pm$ sd)	19
4.3 Logam yang terikat oleh <i>B. subtilis</i> (n=3, rata-rata $\pm$ sd).....	20
4.4 Toleransi <i>B. subtilis</i> terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd (n=2, rata-rata $\pm$ sd).....	20

DAFTAR GAMBAR

Halaman

4.1 Pola pertumbuhan <i>B. subtilis</i> pada medium NB (n=3)	17
4.2 Tempat pengikatan logam oleh <i>B. subtilis</i> pada medium NB selama 18 jam (Pb dan Cd pada sitoplasma 0 ppm, Zn pada dinding sel 0 ppm, n=3, rata-rata $\pm$ sd)	21

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Pola pertumbuhan <i>B. subtilis</i>	29
2. Kadar logam medium kontrol	30
3. Kadar logam medium perlakuan	31
4. Kadar logam di <i>B. subtilis</i>	32
5. Kadar logam di sitoplasma.....	33
6. Kadar logam di dinding sel	34
7. Jumlah <i>B. subtilis</i> pada konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm pada jam ke-48.....	35
8. Analisis ragam pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada <i>B. subtilis</i>	36
9. Analisis ragam akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada dinding sel <i>B. subtilis</i>	37
10. Analisis ragam akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada sitoplasma <i>B. subtilis</i>	38
11. Analisis ragam akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada medium pertumbuhan <i>B. subtilis</i>	39
12. Foto hasil penelitian	40

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Logam berat merupakan salah satu pencemar lingkungan yang potensial. Pencemaran logam dapat berasal dari limbah rumah tangga dan limbah pabrik yang masuk ke badan air dan tanah (Akoto *et al.*, 2008). Menurut Lin *et al.* (2008) kandungan logam berat yang terus meningkat akibat masuknya limbah yang dihasilkan oleh industri dan aktivitas lainnya dapat mencemari lingkungan terakumulasi dan terdistribusi hingga beberapa kilometer dari sumber polusi logam. Pencemaran logam yang berlangsung secara terus menerus dalam jangka waktu lama dapat menurunkan kualitas lingkungan dan membahayakan kesehatan makhluk hidup.

Pencemaran oleh logam berat di dalam perairan sudah banyak terjadi, salah satunya adalah di perairan PT BBS Lampung. Kandungan logam Cd di perairan lahan reklamasi PT BBS Lampung telah mencapai 0,026 ppm atau sekitar 26 kali dari baku mutu yang ditetapkan oleh pemerintah (Yudha, 2009). Menurut Kresnawaty dan Panji (2007) penggunaan ZnO dalam industri barang jadi lateks mampu mencemari air karena ion Zn^{2+} yang terbawa dalam air limbah tersebut mencapai 300 ppm.

Pemerintah menetapkan baku mutu logam berat yang tertuang dalam Peraturan Pemerintah Nomor 82 tahun 2001. Baku mutu untuk logam berat dikelompokkan dalam empat kelas. Kelas 1 adalah air yang digunakan untuk minum. Pada kelas tersebut, standar yang diperbolehkan untuk logam Fe lebih tinggi yaitu sebesar 0,3 mg/l dibandingkan dengan logam Pb (0,03 mg/l), Zn (0,05 mg/l), Cu (0,02 mg/l) dan Cd (0,01 mg/l). Kelas 2 adalah air yang digunakan untuk prasarana/sarana rekreasi, dengan standar logam berat yang diperbolehkan adalah sebesar 0,03 mg/l untuk Pb, Zn sebesar 0,05 mg/l, Cu sebesar 0,02 mg/l, Cd sebesar 0,01 mg/l, sedangkan untuk Fe tidak diperbolehkan. Air yang digunakan untuk budidaya ikan air tawar termasuk dalam kelas 3, dengan logam Pb yang diperbolehkan adalah sebesar 0,03 mg/l, logam Zn sebesar 0,05 mg/l, logam Cu sebesar 0,02 mg/l dan logam Cd sebesar 0,01 mg/l. Konsentrasi logam Pb sebesar 1 mg/l, logam Zn sebesar 2

mg/l, logam Cu sebesar 0,2 mg/l dan logam Cd sebesar 0,01 mg/l termasuk ke dalam kelas empat, yaitu air yang digunakan untuk mengairi lahan pertanian.

Pencemaran logam di tanah paling banyak terdapat pada kawasan industri, seperti kawasan industri PT X di Sungai Cikijing. Kandungan logam Cu sebesar 1,5 ppm sampai 2,489, Cr sebesar 2,725 ppm sampai 3,5 ppm, dan logam Zn sebesar 6,609 ppm sampai 8,467 ppm. Konsentrasi logam pada sedimen biasanya cenderung lebih besar daripada konsentrasi logam pada air. Hal ini disebabkan oleh kemampuan logam untuk berikatan dengan bahan organik dan mengendap. Semakin rendah aliran air maka semakin mudah logam terdeposit dalam tanah (Andarani dan Roosmini, 2009).

Logam berat secara alami memasuki badan air dan tanah melalui absorpsi, presipitasi dan pertukaran ion. Keseimbangan dinamik dan interaksi fisika-kimia menjadi pengendali distribusi logam. Interaksi fisika-kimia umumnya dipengaruhi oleh pH, konsentrasi, tipe senyawa, kondisi reduksi-oksidasi dan bilangan oksidasi dari logam tersebut (Singh *et al.*, 2005).

Menurut Ariono (1996) upaya yang umumnya dilakukan untuk mengatasi pencemaran logam berat adalah dengan cara fisika dan kimia. Secara fisika upaya yang dilakukan adalah dengan cara elektrolisa dan elektrodialisa sedangkan secara kimia dengan cara pengendapan. Penanganan pencemaran secara biologi mulai dijadikan alternatif karena efisiensi dan kapasitas pengikatan logam tinggi, biaya murah karena bahan baku mudah didapat, tidak memerlukan tambahan nutrisi jika menggunakan mikroorganisme yang sudah mati, berdampak jangka panjang, dan berdampak luas karena agen biologi dapat menyebar ke wilayah yang lain. Menurut Das *et al.* (2008) penggunaan mikroorganisme yang sudah mati untuk mengikat logam disebut juga dengan penyerapan logam secara pasif, karena tidak melibatkan metabolisme. Pengikatan berlangsung di dinding sel mikroorganisme yang memiliki gugus positif atau negatif yang mampu berikatan dengan kation atau anion pada logam. Dalam penanganan secara biologi, organisme yang pada umumnya digunakan adalah mikroalga, tanaman herba, dan mikroorganisme khususnya bakteri.

Mikroorganisme secara umum mengurangi pencemaran dengan cara detoksifikasi, biohidrometalurgi, *bioleaching* dan biosorpsi. Prinsip detoksifikasi pada umumnya adalah perubahan senyawa toksik menjadi tidak toksik. Mekanisme biohidrometalurgi mengubah ion logam yang tidak mampu larut dalam air menjadi ion yang dapat larut dalam air. *Bioleaching* adalah kemampuan mikroorganisme untuk dapat melarutkan ion logam dari senyawa yang mengikatnya dalam bentuk ion bebas, sedangkan prinsip biosorpsi adalah kebalikan dari *bioleaching* yaitu pengikatan ion-ion logam pada struktur mikroorganisme itu sendiri (Ariono, 1996).

Kemampuan mikroorganisme dalam mengakumulasi logam berat telah banyak dilaporkan. *Micrococcus* mampu mengikat logam Pb, selain itu *Escherichia coli* dan *Bacillus* sp. diketahui memiliki tempat pengikatan logam Cu (Oost *et al.*, 1992). Berdasarkan laporan Naryaningsih (2005), *Pseudomonas aeruginosa* mampu mengakumulasi logam Cd sebesar 76,34% dan *Bacillus cereus* mampu mengakumulasi Cd sebesar 55,88% dalam waktu 24 jam. Das *et al.* (2008) juga melaporkan bahwa *Bacillus* sp. telah digunakan pada preparasi biosorben secara komersial. *Streptomyces* sp. dan *Staphylococcus saprophyticus* telah terbukti mampu menghilangkan ion Cr, Pb, Cu dari limbah cair.

Berdasarkan hasil penelitian Zulaika *et al.* (2012) bakteri dari genus *Bacillus* sp. termasuk dalam bakteri yang resisten terhadap logam Hg, Pb, Cu dan Cd. Bakteri tersebut diisolasi dari sungai Kalimas Surabaya yang sudah tercemar logam berat. Salah satu genus *Bacillus* sp. yang mampu hidup pada habitat yang tercemar logam berat adalah *Bacillus subtilis*. Menurut Issazadeh *et al.* (2011) *B. subtilis* mampu mengikat logam Pb, Cd, Zn dan Cu. *B. subtilis* juga merupakan pengakumulasi logam Zn dan Pb lebih baik bila dibandingkan dengan *B. licheniformis*, *B. cereus* dan *B. amyloliquefaciens*.

B. MASALAH

Pencemaran air berakibat buruk pada ekosistem perairan. Salah satu penyebab pencemaran air adalah kandungan logam yang tinggi. Upaya untuk mengurangi kandungan logam berat di perairan dapat dilakukan dengan proses kimia dan fisika akan tetapi penanganan pencemaran secara biologi

mulai dijadikan alternatif. *B. subtilis* berpotensi dalam mengikat logam karena mampu hidup di lingkungan yang tercemar logam berat. Dalam penelitian ini akan diuji efektifitas *B. subtilis* dalam pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd sehingga dapat dijadikan referensi untuk mengatasi pencemaran lingkungan terutama lingkungan perairan. Berdasarkan uraian di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan:

1. Bagaimanakah tingkat efektifitas pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada bakteri *B. subtilis* melalui pengukuran kadar logam tertinggi yang mampu diakumulasi oleh *B. subtilis*.
2. Bagaimanakah tingkat toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd.
3. Dimanakah tempat akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada *B. subtilis*.

Tujuan dari penelitian yang akan dilakukan adalah untuk:

1. Menguji efektifitas pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada bakteri *B. subtilis* melalui pengujian kadar akumulasi tertinggi oleh *B. subtilis*.
2. Menguji toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada berbagai konsentrasi
3. Mendeteksi tempat akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada *B. subtilis*.

C. MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan dalam pemanfaatan *B. subtilis* sebagai pengelolaan limbah logam pada perairan.

II. TELAAH PUSTAKA

A. Pencemaran oleh logam berat

Pencemaran lingkungan terjadi apabila terdapat ketidakseimbangan daur materi di alam yang mengakibatkan terganggunya struktur dan fungsinya. Sumber pencemaran air dikategorikan menjadi dua, yaitu pencemaran langsung dan tidak langsung. Pencemaran langsung diantaranya adalah limbah pembuangan pabrik, instalasi penyulingan, pabrik penanganan sampah yang dibuang langsung ke perairan. Zat pencemar yang masuk melalui tanah dan atmosfer melalui air hujan termasuk ke dalam pencemaran tidak langsung (Vijayaraghavan dan Yun, 2008).

Pencemaran lingkungan dapat terjadi secara alami maupun karena perbuatan manusia. Pencemaran logam secara alami dapat terjadi karena aktivitas gunung merapi, erosi sungai karena pergerakan air, erosi gletser di daerah kutub kemudian diangkut oleh es-es yang mengambang (Apriadi, 2005). Pencemaran karena perbuatan manusia dapat terjadi karena pesatnya perkembangan teknologi dan industri, terutama pabrik baja, logam, elektronika, garmen, dan plastik. Pencemaran lingkungan hidup merupakan masuknya atau dimasukkannya makhluk hidup, zat, energi dan/atau komponen lain ke dalam lingkungan oleh kegiatan manusia sehingga melampaui batas minimum lingkungan hidup yang telah ditetapkan (Dirpenmenkeja, 2004).

Pencemaran logam di lingkungan merupakan masalah yang besar, karena logam dapat meracuni perairan, berdampak buruk bagi kesehatan makhluk hidup serta menurunkan kualitas lingkungan perairan (Kresnawaty dan Panji, 2007). Pencemaran oleh logam dapat terjadi akibat dari limbah hasil pabrik penyepuhan logam, baterai, pengolahan kulit, metalurgi dan bahkan limbah rumah tangga (Ezzouhri *et al.*, 2009). Menurut Abdelatey *et al.* (2011) logam berat sering didefinisikan sebagai sekelompok atom logam dengan kerapatan lebih besar dari 5 g/cm^3 .

Beberapa logam berat yang sering mencemari lingkungan adalah Pb, Zn, Fe, Cu, Cd. Pada umumnya Pb digunakan dalam pembuatan baterai, aki, bahan peledak, pestisida, cat serta pelapisan logam. Penggunaan barang-barang yang berbahan Pb dalam skala besar dapat mengakibatkan polusi baik di daratan

maupun perairan. Apabila Pb masuk ke dalam tubuh makhluk hidup, maka logam tersebut dapat terakumulasi di dalam tubuh sehingga tubuh mengalami keracunan (Wulandari *et al.*, 2005). Menurut Andarani dan Roosmini (2009) kelarutan logam Zn dalam air relatif rendah. Sumber logam Zn di perairan dapat berasal dari materi geokimia, bahan baku minyak, besi, cat dan sisa-sisa kaleng. Zn memiliki sifat yang mudah menguap.

Logam Fe ditemukan dalam bentuk kation ferri (Fe^{3+}) dan ferro (Fe^{2+}). Fe hanya ditemukan pada kondisi anaerob akibat degradasi bahan organik yang berlebihan, senyawa ini umumnya bersifat sukar larut dalam air dan banyak terdapat di tanah. Fe merupakan mineral penting dalam pembentukan sel darah merah dalam tubuh. Fe juga berperan bagi tumbuhan, dalam proses penyusunan sitokrom dan klorofil. Akan tetapi kadar Fe yang berlebihan akan mengalami pengendapan di dalam organ-organ vital, sehingga menyebabkan kerusakan hati dan penyumbatan pembuluh jantung (Rahmayani, 2009).

Keberadaan logam Cu di tanah, air dan udara biasanya dapat berbentuk ion ataupun senyawa. Cu merupakan logam yang umum digunakan untuk melapisi galangan kapal, industri tekstil, dan bahan bakar. Tubuh manusia memerlukan Cu dalam jumlah sedikit untuk proses enzimatik, sintesa hormon adrenalin dan untuk pembentukan jaringan ikat (Palar, 1994). Menurut Rahmayani (2009) apabila kandungan Cu dalam tubuh tinggi maka akan mengakibatkan gangguan kesehatan seperti terhambatnya pembentukan air kemih, anemia karena pecahnya sel-sel darah merah karena hemolisis, penyakit Wilson yang disebabkan oleh berkumpulnya Cu pada jaringan sehingga menyebabkan kerusakan.

Kadmium (Cd) merupakan salah satu unsur logam yang sangat jarang ditemukan di alam dalam bentuk bebas. Biasanya Cd tersedia dalam bentuk batuan, tanah, batu bara dan minyak. Pencemaran Cd umumnya berasal dari limbah industri pertambangan, pengelasan logam dan pipa air. Cd dapat masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan, pernafasan serta kulit. Kandungan Cd yang terakumulasi dalam tubuh manusia dapat mengakibatkan tekanan darah tinggi, gangguan ginjal, kerusakan jaringan testikular, dan sel darah merah (Sudarwin, 2008).

B. Bioremediasi logam

Teknologi yang umum digunakan untuk mengatasi masalah pencemaran lingkungan adalah dengan cara fisik atau kimiawi. Pemisahan logam secara fisik biasanya dilakukan dengan cara elektrolisa dan elektrodialisa. Pengolahan logam secara kimiawi yang umum digunakan adalah dengan menambahkan bahan kimia yang dapat mengendapkan logam berat. Pengolahan logam secara fisik dan kimiawi memiliki kendala teknis dan membutuhkan biaya yang tinggi, sehingga mulai dikembangkan pengolahan logam dengan cara biologi (Naryaningsih, 2005).

Bioremediasi merupakan proses penggunaan makhluk hidup untuk mendegradasi bahan pencemar hingga tercapai kondisi yang tidak membahayakan atau menurunkan konsentrasi pencemar hingga berada di bawah ambang batas. Teknik yang digunakan adalah dengan menggunakan makhluk hidup spesifik yang mampu hidup di lingkungan tercemar dan memiliki kemampuan untuk mengurangi toksisitas yang beresiko terhadap kesehatan manusia dan/atau lingkungan (Kumar *et al.*, 2011). Menurut Dua *et al.* (2002) proses bioremediasi dipengaruhi oleh bahan pencemaran. Setiap agen biologi memiliki kemampuan remediasi bahan yang berbeda-beda. Ketersediaan nutrisi yang berlimpah memberikan pertumbuhan optimum bagi agen biologi. Keanekaragaman mikroorganisme yang tinggi dapat meningkatkan proses bioremediasi, dan kondisi lingkungan seperti pH, pH optimum berkisar antara 6,5-8. Suhu optimum antara 20-30°C. Kelembaban antara 25-85%. Ma *et al.* (2007) menambahkan bahwa aktifitas bioremediasi dipengaruhi oleh oksigen, kandungan substrat dan mikroorganisme yang memiliki kemampuan yang diinginkan. Pada umumnya bioremediasi dilakukan pada kondisi aerob, akan tetapi ada juga yang dilakukan pada kondisi anaerob tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Mikroorganisme memanfaatkan bahan pencemar sebagai nutrisi atau sumber energi.

Bioremediasi terbagi menjadi dua tipe, yaitu bioremediasi *in situ* dan bioremediasi *ex situ*. Bioremediasi *in situ* merupakan teknik bioremediasi tanpa melakukan penggalian atau pemindahan tanah dan air dalam proses remediasi. Bioremediasi *in situ* pada umumnya digunakan untuk tanah dan air tanah

(Kumar *et al.*, 2011). Menurut Shukla *et al.* (2010) permukaan sel mikroorganisme memiliki protein yang spesifik, sehingga mampu untuk memindahkan, mengakumulasi dan mengurangi toksisitas dari bahan pencemar seperti logam berat. Menurut Kumar *et al.* (2011) tipe ini membutuhkan ketersediaan oksigen dan nutrisi oleh sirkulasi larutan melalui bahan yang tercemar untuk merangsang mikroorganisme menurunkan toksisitas bahan pencemar tersebut secara alami. Teknik ini banyak digunakan karena murah dan mikroorganisme yang digunakan tidak berbahaya. Adapun kerugian dari bioremediasi *in situ* adalah waktu yang dibutuhkan bervariasi bergantung pada pola pertumbuhan mikroorganisme yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Apabila kondisi lingkungan tidak baik maka akan menurunkan kemampuan mikroorganisme dalam mereduksi bahan pencemar. Bioremediasi *ex situ* memerlukan proses penggalian tanah atau pemompaan air dalam tanah yang tercemar kemudian dicampur dengan mikroorganisme di dalam wadah besar yang disebut dengan bioreaktor. Pengaturan kadar nutrisi dan oksigen harus diperhatikan agar tercapai kondisi optimum untuk pertumbuhan mikroorganisme mendegradasi bahan pencemar.

Bioremediasi merupakan teknik yang efektif untuk mengurangi masalah pencemaran lingkungan, seperti dalam tanah dan air. Hal ini dikarenakan bahan sisa bioremediasi seperti karbondioksida, air dan biomassa sel tidak membahayakan. Selain penghilangan bahan tercemar, bioremediasi juga dapat memindahkan bahan tercemar dari satu tempat ke tempat lainnya, dalam hal ini memindahkan bahan pencemar ke dalam tubuh agen biologi seperti mikroorganisme (Kumar *et al.*, 2011).

Mahluk hidup digunakan dalam proses bioremediasi untuk mengontrol atau mengurangi pencemaran di lingkungan, terutama mikroorganisme seperti yeast, jamur atau bakteri (Shukla *et al.*, 2010). Menurut Kumar *et al.* (2010) mikroorganisme dapat diisolasi hampir dari semua kondisi lingkungan, karena mikroorganisme dapat beradaptasi pada lingkungan dengan suhu yang ekstrim, daerah gurun, perairan, dalam kondisi aerob ataupun anaerob. Hal terpenting pada mikroorganisme adalah tersedianya sumber energi dan sumber karbon. Mikroorganisme yang digunakan dapat

berupa mikroorganisme *indigenous* ataupun induksi, akan tetapi mikroorganisme yang dimanfaatkan bervariasi berdasarkan sifat alami yang dimiliki dan kemampuannya dalam bertahan hidup pada kondisi yang ekstrim.

Mikroorganisme memainkan peran besar dalam siklus biogeokimia dan dalam mengurangi pencemaran oleh logam berat. Logam berat mempengaruhi populasi mikroorganisme, dengan mempengaruhi pertumbuhan, morfologi, dan kegiatan biokimia yang akhirnya mengakibatkan penurunan biomassa dan keanekaragaman. Bakteri melakukan beberapa mekanisme agar mampu bertahan hidup pada lingkungan yang mengandung logam berat (Abdelatey *et al.*, 2011). Menurut Nies (1999) kebanyakan bakteri mengikat logam dengan melakukan salah satu dari dua mekanisme, mekanisme yang pertama merupakan mekanisme yang cepat dan tidak spesifik. Mekanisme ini cepat karena dibantu oleh gradien kemiosmotik melintasi membran sitoplasma bakteri. Mekanisme kedua berlangsung lebih lambat dan sering menggunakan hidrolisis ATP sebagai sumber energi. Ketika sel berada pada substrat dengan logam dalam konsentrasi tinggi, bakteri melakukan pengikatan logam secara cepat dan diangkut ke dalam sitoplasma. Pengikatan logam ke dalam sitoplasma secara cepat dapat mengakibatkan perubahan ekspresi gen akibat tingginya konsentrasi logam pada sel, sehingga menghasilkan bakteri mutan yang toleran terhadap logam.

Biosorpsi logam oleh mikroorganisme sebagian besar bergantung kepada komponen selnya, terutama komponen permukaan sel dan struktur dari dinding sel. Komponen kimia seperti peptidoglikan, *teichoic acid* dan *lipoteichoic acid* merupakan komponen kimia terpenting yang menyusun permukaan dinding sel bakteri. Peptidoglikan merupakan tempat menempelnya *teichoic acid* dan *lipoteichoic acid*. Peptidoglikan memiliki struktur yang berpori, sehingga memungkinkan molekul atau logam masuk ke dalam sitoplasma. *Teichoic acid* dan *lipoteichoic acid* memiliki muatan negatif dan hanya terdapat pada bakteri gram positif. Molekul ini membuat bakteri gram positif mampu melakukan absorpsi logam, karena kation pada logam akan terikat pada *teichoic acid* dan *politeichoic acid* pada permukaan dinding sel bakteri (Wang dan Chen, 2009).

Molekul kompleks penyusun dinding sel bakteri antara lain adalah gugus kimia fosforil, karboksil, dan amino yang mampu berinteraksi dengan ion atau molekul bermuatan. Molekul penyusun dinding sel itulah yang mampu mengikat kation logam dari lingkungan secara elektrostatik. *B. subtilis* merupakan bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki gugus karboksil pada peptidoglikan dan atau gugus fosforil pada polimer sekunder asam teikoat dan teikuronat yang dapat memberi muatan negatif pada dinding sel bakteri, sehingga dapat mengikat kation logam secara elektrostatik pada permukaan sel bakteri. (Langley dan Beveridge, 1999). Menurut Johnson (2006) peptidoglikan tersusun atas dua gula, yaitu *N-acetylglucosamine* dan *N-acetylmuramic acid*. Asam teikoat merupakan polimer dari gliserol yang dihubungkan oleh grup fosfor. Gugus fungsional tersebut merupakan situs adsorpsi logam yang aktif.

Bakteri gram positif memiliki kapasitas pengikatan logam yang tinggi. (McLean *et al.*, 1994). Menurut Yadav *et al.* (2012) *B. subtilis* mampu hidup pada medium yang diberi logam Pb, dengan batas toleransi mencapai 50 mg/L. Absorpsi logam Pb oleh *B. subtilis* dipengaruhi oleh pH, jumlah biomassa *B. subtilis* dan konsentrasi logam Pb.

III. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efektifitas pengikatan logam dan deteksi tempat akumulasi logam oleh *B. subtilis*, serta toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd. Efektifitas bakteri *B. subtilis* dalam pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd dilakukan dengan pengukuran kadar logam menggunakan metode AAS (*Atomic Absorption Spectrometry*), efektifitas yang tinggi ditandai dengan banyaknya jumlah logam yang terakumulasi pada *B. subtilis*. Deteksi tempat akumulasi logam oleh *B. subtilis* ditentukan berdasarkan keberadaan logam pada dinding sel dan/atau sitoplasma. Toleransi logam oleh *B. subtilis* dilakukan dengan membandingkan jumlah *B. subtilis* yang hidup pada konsentrasi logam yang berbeda.

A. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *B. subtilis* koleksi laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, medium NB, aquades steril, plastik tahan panas, alkohol 70%, kapas, HCl pekat, Pb, Zn, Fe, Cu, Cd. Sedangkan alat yang digunakan adalah autoklaf, *hot plate* dan *stirrer*, gelas ukur, pipet ukur 10 ml, labu Erlenmeyer, botol gelas 125 ml, tabung reaksi, pH meter, inkubator, *haemocytometer*, *shaker*, *tissue grinder*, *sentrifuge*, instrument AAS Shimadzu A4.

B. Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan untuk menguji efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam adalah penambahan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd dengan konsentrasi 0,35 ppm pada medium NB. Konsentrasi yang digunakan didasarkan pada baku mutu yang ditetapkan dalam Peraturan Pemerintah Nomor 82 tahun 2001 untuk kelas 1 yang digunakan sebagai air minum. Perlakuan yang dilakukan disajikan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Perlakuan uji efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam

Kode perlakuan	Perlakuan (0,35 ppm)	Inokulum <i>B. subtilis</i> (ml)
B1	Medium NB ditambah logam Pb	5
B2	Medium NB ditambah logam Zn	5
B3	Medium NB ditambah logam Fe	5
B4	Medium NB ditambah logam Cu	5
B5	Medium NB ditambah logam Cd	5
Kontrol	Medium NB yang ditambahkan logam sesuai masing-masing perlakuan, tanpa inokulum <i>B. subtilis</i> .	

Pengujian kemampuan toleransi *B. subtilis* terhadap logam adalah dengan menumbuhkan *B. subtilis* pada medium NB pada konsentrasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd masing-masing 1 ppm, 10 ppm dan 20 ppm. Masing-masing perlakuan diulang 2 kali. Sel *B. subtilis* dipanen ketika mencapai fase stasioner. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam, kemampuan tumbuh *B. subtilis* pada berbagai konsentrasi logam berat dan tempat akumulasi logam oleh *B. subtilis*. Parameter yang diukur adalah akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd oleh *B. subtilis* dengan mengukur penurunan konsentrasi logam dalam medium, mengukur logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada sitoplasma dan dinding sel dengan menggunakan alat AAS, mengukur *B. subtilis* yang hidup dengan menggunakan *haemocytometer*.

C. Cara Kerja

a. Pembuatan medium pertumbuhan *Nutrient Broth* (NB) (Primaharinastiti *et al.*, 2004).

Medium NB dengan komposisi peptone 5 gram dan *meat extract* 3 gram, ditambah dengan aquades steril 1 L dalam erlenmeyer dan dihomogenkan dengan *hot plate and stirrer*. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 20 menit.

b. Perbanyak isolat dan pembuatan suspensi *B. subtilis* (Modifikasi Joetono *et al.*, 1980 dalam Nur, 2005).

Kultur *B. subtilis* diinokulasi sebanyak 1 ose ke dalam 50 ml medium NB steril secara aseptis lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Selama inkubasi, setiap tiga jam dilakukan penghitungan jumlah sel bakteri menggunakan *haemocytometer* untuk mengetahui pola pertumbuhan *B. subtilis*. Setiap biakan yang berada dalam fase pertumbuhan *logaritmik* tertinggi digunakan dalam biakan starter untuk uji pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu Cd.

c. Pembuatan stok larutan standar logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd (Badjoeri, 2008).

Stok larutan logam yang diperlukan adalah 0,35 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm. Larutan stok Pb 1000 ppm dibuat dengan cara melarutkan 100 mg PbCl₂ ke dalam 100 ml HCl 1%. Larutan standar Pb 1000 ppm dikonversi dengan metode pengenceran sehingga didapatkan larutan logam dengan konsentrasi yang diinginkan menggunakan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

V1= Volume logam larutan 1 (ml)

V2 = Volume logam larutan 2 (ml)

N1 = Konsentrasi logam larutan 1 (mg/ml)

N2 = Konsentrasi logam larutan 2 (mg/ml)

Hal yang sama juga dilakukan untuk logam Zn, Fe, Cu dan Cd.

d. Inokulasi *B. subtilis* ke dalam medium yang mengandung logam (Primaharinastiti *et al.*, 2004).

1. Pengukuran efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd.

Medium cair NB sebanyak 65 ml masing-masing diberi Pb, Zn, Fe, Cu, Cd dengan konsentrasi 0,35 ppm sesuai perlakuan. Medium diatur hingga pH mencapai 7 kemudian ditambah *B. subtilis* sebanyak 5% (v/v) lalu diinkubasi pada suhu kamar dan dikocok dengan kecepatan 100 rpm. Sel dipanen pada saat pertumbuhan optimal (fase *stationer*). Perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

2. Toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu dan Cd

Medium NB sebanyak 10 ml masing-masing diberi Pb, Zn, Fe, Cu, Cd hingga mencapai konsentrasi 1 ppm, 10 ppm dan 20 ppm sesuai perlakuan. Medium diatur hingga pH mencapai 7 kemudian ditambah *B. subtilis* sebanyak 5% (v/v) lalu diinkubasi pada suhu kamar dan dikocok dengan kecepatan 100 rpm. Sel dipanen pada jam ke-48

D. Pengamatan

a. Efektifitas pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu Cd oleh *B. subtilis* (Modifikasi Naryaningsih, 2005).

Sel dipanen pada saat mencapai pertumbuhan optimal. Suspensi sel dipisahkan dari medium dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Konsentrasi logam pada supernatan diukur dengan menggunakan AAS, untuk mengetahui konsentrasi logam pada medium. Natan yang terbentuk dihancurkan dengan menggunakan *tissue grinder*, ditambah dengan aquades steril hingga mencapai 10 ml. Natan yang sudah ditambah dengan akuades steril disentrifugasi pada kecepatan 5000 g selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk diukur kandungan logamnya dengan menggunakan AAS, untuk mengetahui konsentrasi logam pada sitoplasma *B. subtilis*. Kandungan logam yang terdapat pada dinding sel diperoleh dari selisih antara logam awal dengan logam yang berada pada medium dan sitoplasma. Efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* dilakukan dengan rumus (Joshi, 2003 dalam Badjoeri, 2008):

$$R = \frac{C_{eq\ K} - C_{b\ P}}{C_{eq\ K}} \times 100\%$$

$C_{eq\ K}$ = konsentrasi akhir logam dalam medium kontrol (mg/l)

$C_{b\ P}$ = Jumlah logam yang tidak terserap pada perlakuan (mg/l)

b. Toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu dan Cd

B. subtilis yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*.

c. Identifikasi akumulasi logam pada *B. subtilis*.

Berdasarkan perhitungan jumlah logam pada sitoplasma dan dinding sel dengan menggunakan metode AAS, maka diketahui tempat akumulasi logam pada *B. subtilis*.

E. Analisis Data (Steel dan Torrie, 1991).

Data yang diperoleh dari pengukuran logam menggunakan AAS, pada tiap-tiap perlakuan dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan BNJ tingkat kesalahan 5% untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan efektifitas pada setiap perlakuan dan tempat akumulasi logam pada *B. subtilis*. Analisis toleransi *B. subtilis* terhadap logam dilakukan secara deskriptif.

F. Waktu dan Tempat

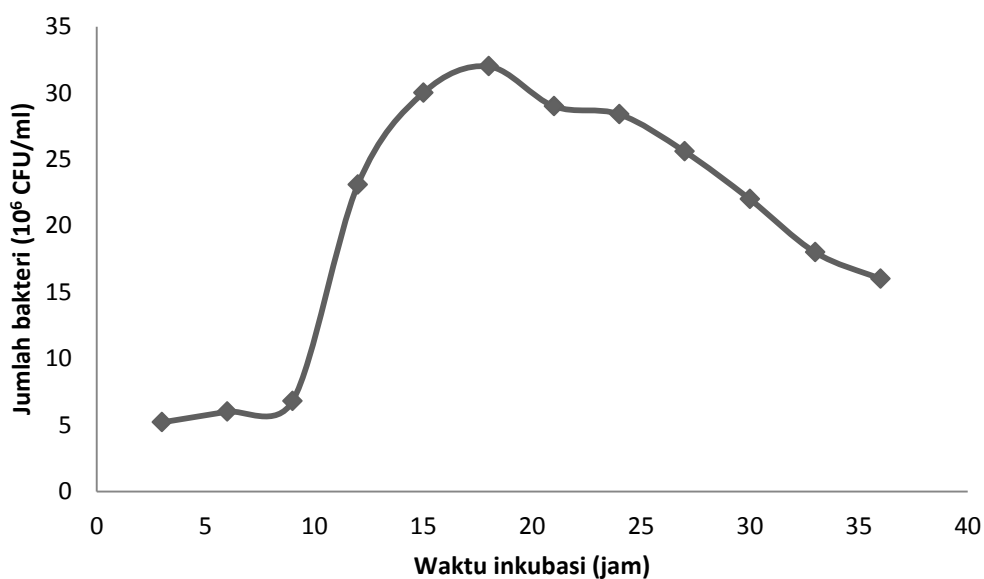
Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Struktur Perkembangan Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman dan Laboratorium Kimia Analitik, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada. Penelitian dilakukan dalam waktu 3 bulan.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pola pertumbuhan *B. subtilis*

Perhitungan jumlah sel *B. subtilis* menggunakan *haemocytometer* setiap 3 jam sekali selama 36 jam ditampilkan pada Gambar 4.1 dan Lampiran 1. Fase lag berlangsung dalam waktu 9 jam, dengan jumlah bakteri berkisar antara $5,2 \times 10^6$ dan $6,8 \times 10^6$ CFU. Pertumbuhan sel mulai meningkat dan memasuki fase log pada jam ke 12 sampai jam ke 18. Pertumbuhan mencapai angka tertinggi pada waktu inkubasi 18 jam yaitu sebesar 32×10^6 cfu/ml. Sel mulai memasuki fase kematian setelah melewati waktu inkubasi 18 jam, yang ditunjukkan dengan terjadinya penurunan pertumbuhan sel secara drastis. Inokulum *B. subtilis* yang digunakan untuk perlakuan selanjutnya adalah kultur pada umur 12 jam, karena telah memasuki fase log dengan kecepatan pertumbuhan tertinggi.

Selama fase lag, massa sel bertambah $0,8 \times 10^6$ cfu/ml tanpa merubah densitas sel. Faktor yang mempengaruhi panjangnya fase lag adalah tersedianya nutrient dan faktor pertumbuhan dalam medium, yang pada penelitian ini menggunakan medium NB yang memiliki kandungan nutrient yang dibutuhkan oleh pertumbuhan *B. subtilis* (Shuler dan Kargi, 1992). Pada fase log, bakteri sudah mampu beradaptasi dengan medium, kecepatan pertumbuhan dipengaruhi oleh kandungan nutrient, pH, dan juga suhu (Fardiaz, 1992). Pada penelitian ini *B. subtilis* diinkubasi pada pH dan suhu yang optimum untuk pertumbuhan *B. subtilis*, yaitu pada pH 7 dan suhu 37°C . Menurut Pelczar dan Chan (1986) bakteri yang telah memasuki fase log mengalami peningkatan proses reproduksi dua kali lipat, sehingga jumlah bakteri bertambah pesat. Pertumbuhan terhenti pada fase kematian, karena sel sudah menghabiskan energi cadangan ATP untuk proses respirasi (Badjoeri, 2008).



Gambar 4.1 Pola pertumbuhan *B. subtilis* pada medium NB (n=3)

B. Kemampuan medium pertumbuhan *B. subtilis* dalam mengikat logam

Medium bakteri atau bahan organik juga mampu mengurangi kadar logam. Hal ini ditunjukkan oleh menurunnya konsentrasi logam pada medium masing-masing kontrol yang diberi logam dengan konsentrasi yang sama, 0,35 ppm. Medium kontrol yang diberi logam Pb mengalami penurunan sebesar 14,86%. Konsentrasi Zn juga mengalami penurunan sebesar 5,14%. Penurunan logam Fe sebanyak 37,14%, sedangkan penurunan konsentrasi logam Cu sebesar 85,72%. Konsentrasi logam Cd juga mengalami penurunan sebesar 79,43% (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Konsentrasi logam pada medium NB pada waktu 0 jam dan 18 jam, n=3, rata-rata $\pm$ sd

No	Logam	Konsentrasi awal (ppm)	Konsentrasi akhir (ppm)
		0 jam	18 jam
1.	Pb	0,35	$0,298 \pm 0,002$
2.	Zn	0,35	$0,332 \pm 0,005$
3.	Fe	0,35	$0,22 \pm 0,003$
4.	Cu	0,35	$0,05 \pm 0,004$
5.	Cd	0,35	$0,072 \pm 0,004$

Bahan organik dan anorganik mampu mengikat logam. Senyawa organik di perairan seperti polisakarida, protein dan asam humat mampu

bereaksi dengan ion-ion logam melalui reaksi redoks atau reaksi pengikatan yang membentuk senyawa kompleks organik-logam (Buffle dan Stumm, 1994). Menurut Lahuddin (2007) logam Zn dapat diadsorpsi oleh tanah apabila tanah tersebut mengandung bahan organik. Selain itu, logam Cu lebih mudah diikat dengan kuat pada bahan organik dibandingkan dengan unsur mikro lainnya.

Bahan organik di tanah dibagi menjadi tiga fraksi, yaitu humin, asam humat dan asam fulvat. Bahan-bahan organik ini dapat larut dalam air, sehingga bahan organik tersebut banyak dijumpai di dalam air (Guo dan Chorover, 2003). Humin merupakan bahan organik yang tidak dapat larut dalam asam maupun basa, tidak aktif dalam reaksi kimia pembentukan kompleks dengan logam. Asam humat merupakan makromolekul polielektrolit yang memiliki gugus fungsi -COOH , -OH fenolat ataupun -OH alkoholat sehingga asam humat mampu membentuk kompleks dengan ion logam karena gugus tersebut mengalami deprotonasi pada pH yang relatif tinggi. pH yang tinggi (sekitar pH 8-10) akan mengakibatkan gugus mengalami deprotonasi, konsentrasi H^+ menjadi rendah, dan gugus menjadi bermuatan negatif sehingga gugus pada asam humat berfungsi sebagai ligan. Asam fulvat memiliki berat molekul yang lebih rendah dari asam humat, sehingga asam fulvat memiliki mobilitas yang lebih tinggi dari pada asam humat. Kemampuan mobilitas yang tinggi mengakibatkan asam fulvat memiliki kemampuan yang besar untuk membentuk kompleks dengan logam (Alimin *et al.*, 2005).

C. Efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam

Kandungan logam dalam medium dapat diketahui secara kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan metode AAS. Pengukuran logam dengan metode AAS didasarkan pada besarnya energi radiasi yang diserap ketika atom dalam bentuk gas. Berdasarkan hasil pengukuran AAS, efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam berbeda-beda untuk setiap logamnya (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Efisiensi pengikatan logam oleh *B. subtilis* (n=3, rata-rata $\pm$ sd)

No	Logam	Efisiensi pengikatan logam oleh <i>B. subtilis</i> (%)
1.	Pb	17,45 $\pm$ 0,002
2.	Zn	7,53 $\pm$ 0,005
3.	Fe	80 $\pm$ 0,003
4.	Cu	16,67 $\pm$ 0,004
5.	Cd	81,94 $\pm$ 0,004

Faktor yang dapat mempengaruhi berkurangnya kadar logam di lingkungan adalah populasi mikroorganisme yang mampu menurunkan toksisitas logam, kemampuan mikroorganisme untuk mengikat logam di dalam sel, faktor lingkungan seperti suhu, pH, keberadaan oksigen atau akseptor elektron lain serta nutrisi (Kumar *et al.*, 2010). Kondisi lingkungan pada penelitian disesuaikan dengan kondisi optimum untuk *B. subtilis*. *B. subtilis* memiliki kemampuan untuk mengikat logam Pb, Zn, Fe, Cu dan Cd. Efisiensi pengikatan oleh *B. subtilis* yang tertinggi adalah pada logam Cd yaitu sebesar 81,94%. Menurut Wang dan Cheng (2009), efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam Cu adalah 20,8 %. Hossain dan Anantharaman (2006) menyatakan bahwa pengikatan logam Pb oleh *B. subtilis* yang optimum adalah pada waktu inkubasi 48 jam, yaitu sekitar 98,66 %, 90,85 %, 76,83 % dan 34,57% untuk konsentrasi logam Pb sebesar 500, 600, 700 dan 800 ppm dengan jumlah inokulum *B. subtilis* sebesar 30 % (v/v).

Teknik untuk mengurangi logam berat pada air limbah secara biologi mulai dilakukan sejak tahun 1990 an. Hal ini karena jumlah materi biologi yang berlimpah mampu mengurangi logam dengan efektif, dan mikroorganisme mampu hidup pada kondisi lingkungan yang luas. Mikroorganisme mampu menyerap logam secara aktif (bioakumulasi) dan/atau secara pasif (biosorpsi). Berhubungan dengan kemampuan permukaan sel mikroorganisme untuk mengikat logam, karena dinding sel bakteri memiliki situs komponen kimia yang mampu berikatan dengan ion pada logam (Samarth *et al.*, 2012).

Berdasarkan pengukuran kadar logam dengan menggunakan AAS (Tabel 4.3) didapatkan logam yang paling efektif diikat oleh *B. subtilis* adalah

logam Cd dengan kadar yang mampu diikatnya adalah sebesar 0,337 ppm, sedangkan yang terendah adalah logam Zn yaitu sebesar 0,063 ppm. Penelitian yang dilakukan oleh Issazadeh *et al.* (2011) menunjukkan bahwa kemampuan *B. subtilis* dalam mengikat logam Pb berkisar dari 0,1 sampai 1,8 mol/g biomasa, logam Cd berkisar antara 0,2 sampai 9,5 mol/g biomasa, 0,2 sampai 5,9 mol/g biomasa untuk logam Cu, sedangkan untuk logam Zn berkisar dari 0,1 sampai 5 mol/g biomasa. Menurut Gupta *et al.* (2000) glikoprotein pada sisi luar dari dinding sel gram positif memiliki potensi yang tinggi untuk mengikat logam Cd dari lingkungan. Hal ini mengakibatkan *B. subtilis* sangat efektif dalam mengikat logam Cd.

Tabel 4.3 Logam yang terikat oleh *B. subtilis* (n=3, rata-rata $\pm$ sd)

No	Logam	Logam yang terikat oleh <i>B. subtilis</i> (ppm)
1.	Pb	0,104 $\pm$ 0,030
2.	Zn	0,063 $\pm$ 0,006
3.	Fe	0,306 $\pm$ 0,033
4.	Cu	0,292 $\pm$ 0,008
5.	Cd	0,337 $\pm$ 0,002

D. Kemampuan toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd

Kemampuan *B. subtilis* dalam mentoleransi keberadaan logam Pb, Zn, Fe, Cu dan Cd berbeda-beda. Pertumbuhan *B. subtilis* semakin terhambat seiring dengan meningkatnya konsentrasi logam. *B. subtilis* memiliki kemampuan mentoleransi logam Pb lebih baik bila dibandingkan dengan logam Fe, Zn, Cu dan Cd (Tabel 4.4).

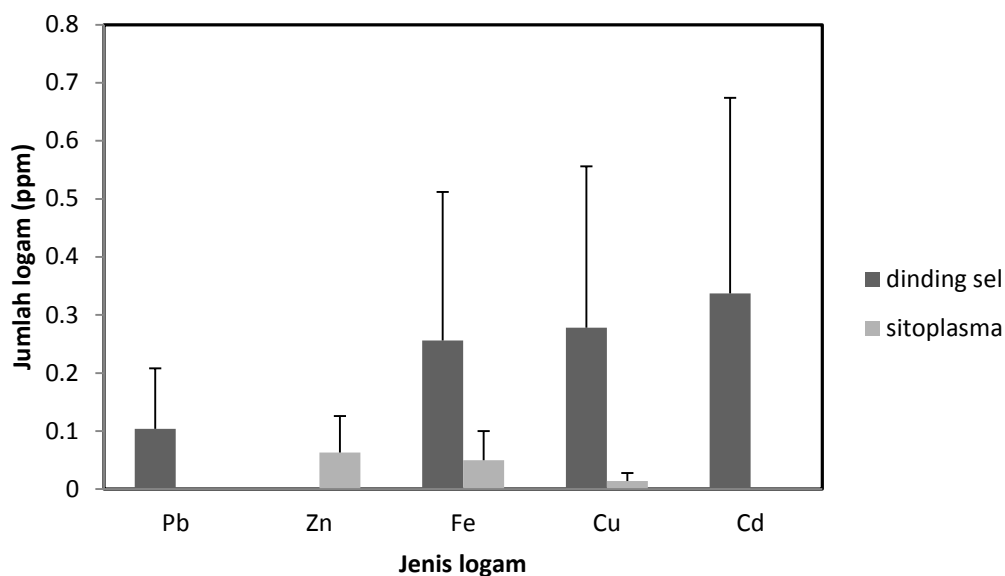
Tabel 4.4 Toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd (n=2, rata-rata $\pm$ sd)

No	Logam	Jumlah <i>B. subtilis</i> (CFU/ml)		
		1 ppm	10 ppm	20 ppm
1.	Pb	9,13x10 ⁶ $\pm$ 0,39	6,4x10 ⁶ $\pm$ 0,14	4,45x10 ⁶ $\pm$ 0,21
2.	Zn	7,38x10 ⁶ $\pm$ 0,11	3,28x10 ⁶ $\pm$ 0,04	1,7x10 ⁶ $\pm$ 0,14
3.	Fe	8,55x10 ⁶ $\pm$ 0,21	6,05x10 ⁶ $\pm$ 0,21	2,18x10 ⁶ $\pm$ 0,18
4.	Cu	6,2x10 ⁶ $\pm$ 0,14	2,58x10 ⁶ $\pm$ 0,25	1,28x10 ⁶ $\pm$ 0,39
5.	Cd	3,7x10 ⁶ $\pm$ 0,35	1,7x10 ⁶ $\pm$ 0,07	0,63x10 ⁶ $\pm$ 0,11
6.	kontrol	11,25x10 ⁶ $\pm$ 0,21		

Mikroorganisme mampu mengabsorpsi atau mentransfer logam melalui reaksi enzimatik. Logam tersebut kemudian dapat dimanfaatkan untuk proses metabolisme di dalam sel atau diubah menjadi bentuk kimia lain yang tidak toksik di dalam tanah, air maupun minyak (Yadav *et al.*, 2012). Namun, pada konsentrasi yang terlalu tinggi dapat bersifat toksik bagi mikroorganisme tersebut. Keberadaan logam yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi pertumbuhan, morfologi, aktivitas biokimia, serta mengakibatkan penurunan biomassa dan keanekaragaman populasi mikroorganisme (Abdelatey *et al.*, 2011)

E. Lokasi pengikatan logam *B. subtilis*

Berdasarkan jumlah logam yang terikat pada dinding sel dan sitoplasma dapat disimpulkan bahwa bentuk pengikatan *B. subtilis* adalah biosorpsi (Gambar 4.2). Hal ini ditandai dengan terdapatnya logam pada dinding sel dan/atau sitoplasma.



Gambar 4.2 Tempat pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium NB selama 18 jam (Pb dan Cd pada sitoplasma 0 ppm, Zn pada dinding sel 0 ppm, n=3, rata-rata $\pm$ sd).

Logam Pb hanya ditemukan pada dinding sel. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Varghese *et al.*, 2012) yang menyebutkan bahwa Pb diendapkan menjadi bentuk yang tidak dapat larut, kemudian dilokalisasi ke membran sel atau dinding sel. Hal ini terjadi pada umumnya karena adanya gugus

karboksil, hidroksil dan posporil yang bermuatan negatif pada dinding sel bakteri. Gugus tersebut menyerap kation logam melalui berbagai mekanisme, seperti interaksi elektrostatik, van der Waals, ikatan kovalen atau kombinasi dari proses tersebut. Logam dapat diikat oleh mikroorganisme dengan cara penyerapan ke dalam komponen selnya. Penelitian Stefanescu *et al.* (2011) menunjukkan bahwa logam tersebut dapat diendapkan di dalam sel sebagai komponen organik yang tidak dapat larut atau anorganik.

Biosorpsi merupakan pembersihan logam, senyawa, butiran dari sampel atau medium oleh makhluk hidup. Biosorpsi dapat terjadi pada biomassa yang hidup, mati, ataupun produk sel seperti polisakarida (Gadd, 1993). Pengikatan logam secara biosorpsi tidak melibatkan proses metabolik untuk pengikatan logam, sehingga disebut dengan pengikatan logam secara pasif. Sedangkan *bioleaching* melibatkan proses metabolik, sehingga disebut dengan pengikatan logam secara aktif (Samarth *et al.*, 2012). Menurut Vijver *et al.* (2004) komponen sel yang berperan pada proses *bioleaching* pada sel hidup yang berperan adalah sitoplasma dalam berinteraksi dengan logam. Setelah logam memasuki sel, oleh sitoplasma disebar ke berbagai organel seperti mitokondria dan vakuola

Mekanisme pengikatan logam secara biosorpsi berlangsung sangat kompleks, karena bergantung pada status biomassa hidup atau tidak hidup, jenis komponen sel dan kondisi lingkungan seperti pH. Biosorpsi pada sel mati tidak melibatkan metabolisme, logam terikat pada gugus aktif yang terdapat pada dinding sel bakteri. Biosorpsi oleh sel hidup terdiri dari dua langkah, langkah pertama adalah ion logam diserap oleh permukaan sel. Langkah ke dua, ion logam harus melewati dinding sel untuk dapat memasuki membran sel dan sitoplasma. Dinding sel terdiri dari berbagai polisakarida dan protein yang menyebabkan sel mampu mengikat ion logam. Pengikatan logam dapat berlangsung optimal apabila *B. subtilis* berada pada pH yang optimal untuk pertumbuhannya, yaitu pada pH 7 (Das *et al.*, 2008).

V. SIMPULAN DAN IMPLIKASI

A. Simpulan

1. *B. subtilis* mampu mengikat logam Pb, Zn, Fe, Cu dan Cd dengan presentasi efektifitas masing-masing sebesar 17,45 %, 7,53 %, 80 %, 16,67 % dan 81,94 %.
2. *B. subtilis* paling baik mentoleransi logam Pb.
3. Logam Pb dan Cd diakumulasi di dinding sel, logam Zn diakumulasi di sitoplasma, sedangkan logam Fe dan Cu diakumulasi di dinding sel dan sitoplasma.

B. Implikasi

Dengan adanya penelitian tersebut, diharapkan dapat dilakukan studi lebih lanjut dengan pengujian kemampuan *B. subtilis* dalam mengikat logam di habitat aslinya.

DAFTAR REFERENSI

- Abdelatey, L. M., W. K. B. Khalil, T. H. Ali and K. F. Mahrous. 2011. Heavy Metal Resistance and Gene Expression Analysis of Metal Resistance Genes in Gram-Positive Gram-Negative Bacteria Present in Egyptian Soils. *Journal of Applied Science in Environmental Sanitation*, 6(2): 201-211.
- Akoto, O., T.N. Bruce and G. Darkol. 2008, Heavy Metals Pollution Profiles in Streams Serving the Owabi Reservoir. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 2(11): 354-359.
- Andarani, P. dan D. Roosmini. 2009. Profil Pencemaran logam Berat (Cu, Cr dan Zn) pada Air Permukaan dan Sedimen di Sekitar Industri tekstil PT X (Sungai Cikijing). *Laporan Penelitian*. Fakultas Teknik Sipil dan Lingkungan, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Apriadi, D. 2005. Kandungan Logam Berat Hg, Pb dan Cr pada Air, Sedimen dan Kerang Hijau (*Perna viridis* L.) di perairan Kamal Muara, Teluk Jakarta. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ariono, D. 1996. Bioremediasi Logam Berat di Lingkungan Perairan dengan Bantuan Mikroorganisme. *Biota*, 1(2): 23-27.
- Buffle, J. and W. Stumm. 1994. General Chemistry of Aquatic Systems, In: *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*. Buffle, J. and R. De Vitre Eds). Lewis publishers, Tokyo.
- Alimin, Narsito, S. J. Santosa, dan S. Noegrohati. 2005. Fraksinasi Asam Humat dan pengaruhnya pada Kelarutan Ion Logam Seng (II) dan Kadmium (III). *Jurnal Ilmu Dasar*, 6(1): 1-6.
- Badjoeri, M. 2008. Uji Kemampuan *Bacillus megaterium* Menyerap Logam Berat Merkuri. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 6 (1):5-11.
- Das, N., R. Vimala dan P. Karthika. 2008. Biosorption of Heavy Metals-An Overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(2): 159-169.
- Direktorat Pendidikan Menengah Kejuruan (Dirpenmenkej), 2004. Pencemaran Lingkungan, Direktorat Jenderal Pendidikan Dasar Menengah, Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta.
- Dua, M., A. Singh, N. Sethunathan, and A. Johri. 2002. Biotechnology Bioremediation Success and Limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3):143-152.

- Ezzouhri, L., E. Castro, M. Moya, F. Espinola, and K. Lairini. 2009. Heavy Metal Tolerance of Filamentous Fungi Isolated from Polluted Sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3(2): 035-048.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Gadd G.M. 1993. Interactions of Fungi with Toxic Metals. *Phytologist*, 124(1): 25– 60.
- Guo, M and J. Chorover. 2003. Transport and Fractionation of Dissolved Organic Matter in Soil Columns. *Soil Science*, 168(2); 108-118.
- Gupta, R., P. Ahuja, S. Khan, R. K. Saxena and H. Mohapatra. 2000. Microbial Biosorbents: Meeting Challenges of Heavy Metal Pollution in Aqueous Solutions. *Current Science*, 78(8): 967-973.
- Hossain, S. and N. Anantharaman. 2006. Studies on Bacterial Growth and Lead (IV) Biosorption using *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13(6): 591-596.
- Issazadeh, K., M. R. Majid, K. Pahlaviani and A. Massiha. 2011. Bioremediation of Toxic Heavy Metals Pollutan by *Bacillus* spp. Isolated from Guilan Bay Sediments, North of Iran. *International Conference on Biotechnology and Environmental Management*, 18:67-71.
- Johnson, K. J. 2006. Bacterial Adsorption of Aqueous Heavy Metals: Molecular Simulations and Surface Complexation Models. *Dissertation*. Graduate Program in Civil Engineering and Geological Sciences, Notre Dame, Indiana.
- Kresnawaty, I dan T. Panji. 2007. Biosorpsi logam Zn oleh biomassa *Saccharomyces cerevisiae*. *Menara Perkebunan*, 75(2): 80-92.
- Kumar, A., B. S. Bisht and V. D. Joshi. 2010. Biosorption of Heavy Metals by Four Acclimated Microbial Species, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. and *Aspergillus niger*. *Journal Biology Environmental Science*, 4(12): 97-108.
- Kumar, A., B. S. Bisht, V. D. Joshi and T. Dhewa. 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(6): 1079-1093.
- Lahuddin. 2007. *Aspek Unsur Mikro dalam kesuburan Tanah*. USU Press, Medan.
- Langley S., and T. J. Beveridge. 1999. Effect of O-Side-Chain-Lipopolysaccharide Chemistry on Metal Binding. *Applied Environmental Microbiology*, 65(2):489-498.

- Lin, C., He, M., Zhou, Y., Guo, W., Yang, Z., 2008, Distribution and Contamination Assessment of Heavy Metals in Sediment of the Second Songhua River, China, *Environmental Monitoring Assessment*, 137(1-3). 329–342.
- Ma, X., P. J. Novak, J. Ferguson, M. Sadowsky, T. M. LaPara, M. J. Semmens, R. M. Hozalski. 2007. The Impact of H₂ Addition on Dechlorinating Microbial Communities. *Bioremediation Journal*, 11(2): 45-55.
- McLean, R. J. C., A. M. Campbell, P. T. Khu, A. T. Persaud, L. E. Bickerton and D. Beauchemin. 1994. Repeated use of *Bacillus subtilis* Cell Walls for Copper Binding. *World Journal of Microbiology*, 10(4): 472-474.
- Naryaningsih, A. 2005. Keefektifan *Bacillus cereus* (Frankland and Frankland) ATCC 11778 (Bakteri Gram Positif) dan *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) ATCC 27853 (Bakteri Gram Negatif) sebagai Bioakumulator Kadmium. Tesis. Magister Ilmu Lingkungan, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-Metal Resistance. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51(6): 730-750.
- Nur, H. S. 2005. Pembentukan Asam Organik oleh Isolat Bakteri Asam Laktat pada Media Ekstrak Daging Buah Durian (*Durio zibethinus Murr.*). *Bioscientiae*, 2 (1): 15-24.
- Oost, J. V. D., P. L. A. Musacchio, A. W. L. Lemieux, J. Rumbley, R. B. Gennis, R. Aasa, T. Pascher, B. G. Malmstrom and M. Saraste. 1992. Restoration of a lost metal-binding site: construction of two different copper sites into a subunit of the *E.coli* cytochrome o quinol oxidase complex. *The EMBO Journal*, 11(9): 3209-3217.
- Palar, H. 1994. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. PT Rineka, Jakarta.
- Pelczar, Jr. M. J. Dan E. C. S. Chan. 1986. *Dasar - Dasar Mikrobiologi*, alih bahasa Ratna SH, dkk. Penerbit UI Press, Jakarta.
- Peraturan Pemerintah Nomor 82 Tahun 2001, 2001. *Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air*.
- Primaharinastiti, R., A. T. Poernomo dan N. S. Noor. 2004. Bioakumulasi Logam Berat Cu oleh *Bacillus* sp.. *Berkas Penelitian Hayati*, 10(1): 19-23.
- Rahmayani, F. 2009. Analisa Kadar Besi (Fe) dan Tembaga (Cu) dalam Air Zamzam secara Spektrofotometri Serapan Atom (SSA). *Karya Ilmiah*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, Medan.

- Samarth, D. P., C. J. Chandekar and R. K. Bhadekar. 2012. Biosorption of Heavy Metals from Aqueous Solution using *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Pure Applied Sciences and Technology*, 10(2): 12-19.
- Shukla, K. P., N. K. Singh and S. Sharma. 2010. Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 3: 1-20.
- Shuler, M.L. and Kargi, F. (1992). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Singh, K. P., A. Malik, S. Sinha, K. Singh and R. C. Murthy. 2005. Estimation of Source of Heavy Metal Contamination in Sediments of Gomti River (India) Using Principal Component Analysis. *Water, Air, and Soil Pollution*, 166(1): 321-341.
- Steel, R.E.D., dan J.H.Torrie. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Stefanescu, I. I., L. Gavrilă and R. Mocanu. 2011. Evaluation of the Solubilization Ability of Two Strains of *Bacillus megaterium* for Heavy Metals from Residual Phosphogypsum. *Romanian Biotechnology Letters*, 16(5):6513-6522.
- Sudarwin. 2008. Analisis Spasial Pencemaran logam berat (Pb dan Cd) pada Sedimen Aliran Sungai dari Tempat pembuangan Akhir (TPA) Sampah Jatibarang, Semarang. *Tesis*. Magister Kesehatan lingkungan, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Vijver, M. G. C. A. M. Van Gestel, R. P. Lanno, N. M. Van Straalen, W. Peijnenburg. 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: a Review. *Environmental Science Technology*, 38(18): 4705-4712.
- Vijayaraghavan, K and Y. S. Yun. 2008. Bacterial Biosorbents and Biosorption. *Biotechnology Advances*, 26(3): 266-291.
- Varghese, R., M. P. Krishna, B. V. Arun and A. A. M. Hatha. 2012. Biological Removal of Lead by *Bacillus* sp. Obtained from Metal Contaminated Industrial Area. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(2): 756-770.
- Wang, J. And C. Chen. 2009. Biosorbents for Heavy Metals Removal and Their Future. *Research Review Paper*, 27(2): 195-226.
- Wulandari, S., N. F. Dewi dan Suwondo. 2005. Identifikasi Bakteri Pengikat Timbal (Pb) pada Sedimen di Perairan Sungai Siak. *Jurnal Biogenesis*, 1(2): 62-65.

- Yadav, H., N. Satish, M. B. Prakash, and Maradala. 2012. Studies on Biological Removal of Plumb (Pb) by *Bacillus subtilis*. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 3(7):336-339.
- Yudha, I. G. 2009. Kajian Logam Berat Pb, Cu, Hg dan Cd yang terkandung pada Beberapa Jenis Ikan di Wilayah Pesisir Kota Bandar Lampung. *Laporan Penelitian*. Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Lampung.
- Zulaika, E., A. Luqman, T. Arindah dan U. Sholikah. 2012. Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi sebagai Biosorben dan Bioakumulator. *Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development*. Program Studi Biologi FMIPA, ITS. 21 Februari 2012, Surabaya.

Lampiran 1. Pola pertumbuhan *B. subtilis*

No	Waktu inkubasi (jam)	Sel <i>B. subtilis</i> (cfu/ml)			
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
1.	3	5×10^6	$5,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$
2.	6	$5,4 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	6×10^6	6×10^6
3.	9	$6,5 \times 10^6$	7×10^6	$6,8 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$
4.	12	21×10^6	$26,6 \times 10^6$	$21,7 \times 10^6$	$23,1 \times 10^6$
5.	15	$26,5 \times 10^6$	$34,2 \times 10^6$	$29,4 \times 10^6$	30×10^6
6.	18	29×10^6	35×10^6	32×10^6	32×10^6
7.	21	28×10^6	31×10^6	28×10^6	29×10^6
8.	24	27×10^6	30×10^6	28×10^6	$28,3 \times 10^6$
9.	27	24×10^6	27×10^6	26×10^6	$25,6 \times 10^6$
10.	30	19×10^6	24×10^6	23×10^6	22×10^6
11.	33	16×10^6	21×10^6	17×10^6	18×10^6
12.	36	$14,3 \times 10^6$	$18,8 \times 10^6$	15×10^6	16×10^6

Lampiran 2. Kadar logam medium kontrol

No	Logam	Kadar logam jam ke- 0 (ppm)	Kadar logam pada medium jam ke- 18 (ppm)			Rata-rata	DF
			Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1.	Pb	0,35	0,298	0,3	0,296	0,298	0,002
2.	Zn	0,35	0,333	0,328	0,338	0,332	0,005
3.	Fe	0,35	0,222	0,193	0,250	0,22	0,003
4.	Cu	0,35	0,056	0,062	0,049	0,05	0,004
5.	Cd	0,35	0,076	0,068	0,072	0,072	0,004

Lampiran 3. Kadar logam medium perlakuan

No	Logam	Kadar (ppm)			Rata-rata	DF
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1.	Pb	0,228	0,228	0,282	0,246	0,031
2.	Zn	0,303	0,315	0,303	0,307	0,007
3.	Fe	0,012	0,077	0,044	0,044	0,033
4.	Cu	0,053	0,060	0,053	0,056	0,004
5.	Cd	0,015	0,013	0,011	0,013	0,002

Lampiran 4. Kadar logam di *B. subtilis*

No	Logam	Kadar (ppm)			Rata-rata	DF
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1.	Pb	0,122	0,122	0,068	0,104	0,03
2.	Zn	0,063	0,057	0,069	0,063	0,006
3.	Fe	0,338	0,273	0,306	0,306	0,033
4.	Cu	0,288	0,288	0,301	0,292	0,008
5.	Cd	0,335	0,337	0,339	0,337	0,002

Lampiran 5. Kadar logam di sitoplasma

No	Logam	Kadar logam (ppm)			Rata-rata	Transformasi $\sqrt{x+0,5}$	DF
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
1.	Pb	0	0	0	0	0,710	0
2.	Zn	0,063	0,057	0,069	0,063	0,746	0,006
3.	Fe	0,050	0,078	0,021	0,050	0,740	0,020
4.	Cu	0,008	0,014	0,021	0,014	0,717	0,006
5.	Cd	0	0	0	0	0,710	0

Lampiran 6. Kadar logam di dinding sel

No	Logam	Kadar logam (ppm)			Rata-rata	Transformasi $\sqrt{x+0,5}$	DF
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
1.	Pb	0,122	0,122	0,068	0,104	0,770	0,017
2.	Zn	0	0	0	0	0,710	0
3.	Fe	0,288	0,195	0,285	0,256	0,870	0,035
4.	Cu	0,280	0,274	0,280	0,278	0,887	0,006
5.	Cd	0,335	0,337	0,339	0,337	0,915	0,001

Lampiran 7. Jumlah *B. subtilis* pada konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm pada jam ke- 48

No	Logam	Konsentrasi (ppm)		Konsentrasi (ppm)		Konsentrasi (ppm)	
		1		10		20	
		Jumlah <i>B. subtilis</i> (cfu) ulangan 1	Jumlah <i>B. subtilis</i> (cfu) ulangan 2	Jumlah <i>B. subtilis</i> (cfu) ulangan 1	Jumlah <i>B. subtilis</i> (cfu) ulangan 2	Jumlah <i>B. subtilis</i> (cfu) ulangan 1	Jumlah <i>B. subtilis</i> (cfu) ulangan 2
1.	Pb	36	30	21	26	18	15
		35	32	23	27	19	18
		41	42	26	30	20	17
		35	38	27	22	17	17
		40	35	28	25	18	19
Rata-rata		37,4	35,4	25	26	18,4	17,2
2.	Zn	32	31	12	11	5	4
		29	29	10	10	8	8
		28	32	16	15	9	7
		27	27	18	13	10	4
		30	30	10	16	4	9
Rata-rata		29,2	29,8	13,2	13	7,2	6,4
3.	Fe	33	39	19	27	8	8
		36	30	30	23	10	11
		36	34	25	20	9	9
		34	32	24	19	6	5
		35	33	25	29	8	13
Rata-rata		34,8	33,6	24,6	23,6	8,2	9,2
4.	Cu	26	25	11	12	4	6
		25	25	12	10	5	7
		30	20	15	8	4	8
		33	30	8	10	3	4
		22	22	9	8	4	6
Rata-rata		27,2	24,4	11	9,6	4	6,2
5.	Cd	16	13	4	6	1	2
		19	11	8	6	2	2
		17	19	7	5	3	3
		12	12	5	9	2	3
		15	14	9	9	3	4
Rata-rata		15,8	13,8	6,6	7	2,2	2,8

No.	Perlakuan	Jumlah <i>B. subtilis</i> (Cfu) ulangan 1	Jumlah <i>B. subtilis</i> (cfu) ulangan 2
1.	kontrol	48	39
		44	42
		40	50
		50	48
		46	43
Rata-rata		45,6	44,4

Lampiran 8. Analisis ragam pengikatan logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada *B. subtilis*

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF
Logam	0,193092267	4	0,048273	113,6015	2,73E-08 **
Residual	0,004249333	10	0,000425		
Total	0,1973416	14	0,014096		

Keterangan : **= Berpengaruh sangat nyata

Perlakuan	Rata-rata logam (ppm)	
Zn	0,063	a
Pb	0,104	b
Cu	0,292333	c
Fe	0,305667	d
Cd	0,337	e

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada BNJ dengan tingkat kesalahan 5%.

Lampiran 9. Analisis ragam akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada dinding sel
B. subtilis

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF	
Logam Berat	0,090106667	4	0,022527	73,40865	2,26E-07	**
Residual	0,003068667	10	0,000307			
Total	0,093175333	14	0,006655			

Keterangan : **= Berpengaruh sangat nyata

Perlakuan	Rata-rata logam (ppm)	
Cd	0,71	a
Cu	0,77	b
Fe	0,87	c
Zn	0,886667	d
Pb	0,915	e

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada BNJ dengan tingkat kesalahan 5%.

Lampiran 10. Analisis ragam akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada sitoplasma *B. subtilis*

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF
Logam berat	0,00364	4	0,00091	9,75	0,001763 **
Residual	0,000933333	10	9,33E-05		
Total	0,004573333	14	0,000327		

Keterangan : **= Berpengaruh sangat nyata

Perlakuan	Rata-rata logam (ppm)	
Pb	0,71	a
Cu	0,71	a
Zn	0,716667	b
Fe	0,74	c
Cd	0,746667	d

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada BNJ dengan tingkat kesalahan 5%.

Lampiran 11. Analisis ragam akumulasi logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd pada medium pertumbuhan *B. subtilis*

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF	
Logam Berat	0,213861067	4	0,053465	125,9389	1,65E-08	**
Residual	0,004245333	10	0,000425			
Total	0,2181064	14	0,015579			

Keterangan : **= Berpengaruh sangat nyata

Perlakuan	Rata-rata logam (ppm)	
Pb	0,013	a
Fe	0,044333	b
Zn	0,055667	c
Cu	0,246	d
Cd	0,307	e

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada BNJ dengan tingkat kesalahan 5%.

Lampiran 12. Foto hasil penelitian



Uji toleransi *B. subtilis* pada logam Pb



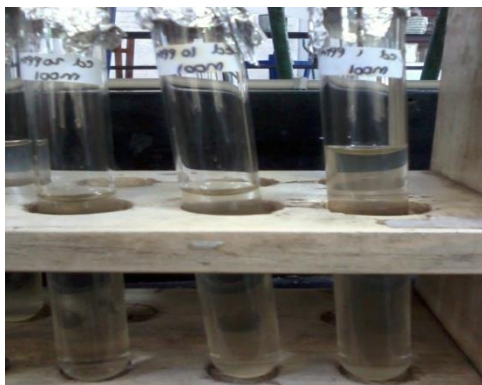
Uji toleransi *B. subtilis* pada logam Zn



Uji toleransi *B. subtilis* pada logam Fe



Uji toleransi *B. subtilis* pada logam Cu



Uji toleransi *B. subtilis* pada logam Cd



Kontrol uji toleransi *B. subtilis*

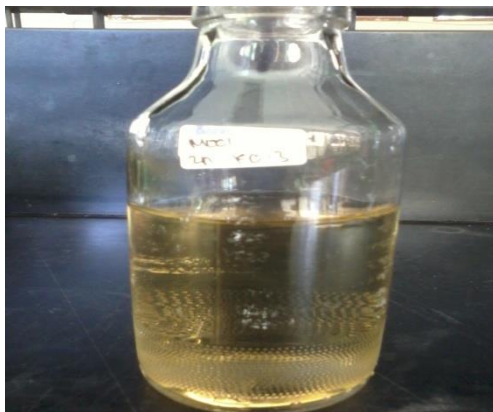
Lampiran 13. Foto hasil penelitian (lanjutan)



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium kontrol logam Pb



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium logam Pb



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium kontrol logam Zn



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium logam Zn



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium kontrol logam Fe



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium logam Fe

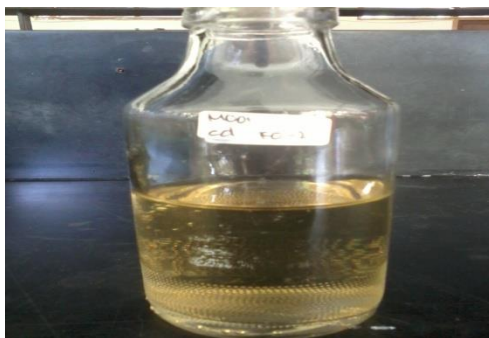
Lampiran 14. Foto hasil penelitian (lanjutan)



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium kontrol logam Cu



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium logam Cu



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium kontrol logam Cd



Uji efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* pada medium logam Cd

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 3 Oktober 1989 sebagai anak ke- 2 dari tiga bersaudara dari pasangan Hasan Wasi dan Elly Yulia. Saat ini penulis bertempat tinggal di Jl. Narogong megah 1 Blok D 119 No. 17 Bekasi Timur. Pendidikan sarjana di tempuh di Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, lulus tahun 2011. Pada tahun 2011, penulis diterima di Program Studi S2 Ilmu Biologi Program Pascasarjana Universitas Jenderal Soedirman, dan menamatkannya pada tahun 2013. Beasiswa pendidikan Program Pascasarjana diperoleh dari Program BU BPKLN Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan. Selama mengikuti program S2, penulis aktif menjadi anggota badan pengawas Ikatan Himpunan Biologi Seluruh Indonesia (IKAHIMBI). Sebuah artikel telah diterbitkan dengan judul Efektifitas Bakteri *Bacillus subtilis* dalam Pengikatan Logam Pb, Zn, Fe, Cu, Cd. Artikel tersebut merupakan bagian tesis penulis.