Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Asam Sulfat dari Tanah Sungai Kejayan sebagai Agen Biooksidasi

Fahimatul Ulya
Fakultas Teknik, Institut Teknologi dan Sains Nahdlatul Ulama Pasuruan, Indonesia
fahim.ulya@itsnupasuruan.ac.id

Abstrak

Bakteri pengoksidasi sulfur menjadi asam sulfat mampu diisolasi dari area masam atau yang bersifat asam. Sungai Kejayan Pasuruan dialiri oleh limbah industri penyamakan kulit yang bersifat asam. Penelitian ini bertujuan mendapatkan bakteri penghasil asam sulfat. Isolasi dan seleksi bakteri penghasil asam sulfat dari tanah sungai Kejayan menggunakan medium tiosulfat. Isolat murni diperoleh menggunakan metode *streak plate* tipe goresan kuadran. $CuFeS_2$ digunakan pada proses Biooksidasi, metode turbidimetri digunakan untuk mengukur kadar asam sulfat, serta kadar [Fe] dan [Cu] pada media biooksidasi diuji menggunakan AAS. Isolat K.2 terseleksi sebagai bakteri penghasil asam sulfat dengan perolehan kadar sulfat [SO_4^2] tertinggi 13,9 ppm pada jam ke-48. Bakteri ini dapat dijadikan opsi lain sebagai agen biooksidasi logam Cu dan Fe.

Kata Kunci: Bakteri Asam Sulfat, Biooksidasi, Limbah Asam.

ABSTRACT

Sulfuric acid-producing bacteria can be isolated from acidic areas. Kejayan River is drained by acidic industrial waste. This study aims to obtain sulfuric acid-producing bacteria. For the isolation and selection of sulfuric acid-producing bacteria from the Rejoso river soil, Thiosulfate medium was used. Pure isolates were obtained using streak plate quadrant. $CuFeS_2$ was used for biooxidation process, sulfate levels were measured using the turbidimetric method, and the levels of [Cu] and [Fe] in the biooxidation medium were tested using AAS. Isolate K.2 selected as sulfuric acid-producing bacteria with highest sulfate level [SO_4^{2-}] reach on 48th hour is 13,9 ppm. Sulfuric acid-producing bacteria can be isolated from the Kejayan river and this bacteria has the potential as biooxidizing agents.

Keywords: *Sulfuric acid-producing bacteria, Biooxidation, Acidic Waste*.

Article Info

Received date:	Revised date:	Accepted date:
29 Oktober 2021	12 November 2021	26 November 2021

PENDAHULUAN

PT. PIER merupakan kawasan khusus industri yang berada di Kecamatan Rembang Kabupaten Pasuruan, area ini telah menyediakan infrastruktur yang memadai termasuk pengolahan limbah (Kominfo, 2021). Selain kawasan industri tersebut, terdapat wilayah Kabupaten Pasuruan yang diperuntukkan sebagai pembangunan industri, sehingga aliran sungai di sekitarnya terdampak oleh limbah yang dihasilkan. Sungai Kejayan merupakan salah satu sungai yang terdampak oleh limbah industri sekitar. Limbah industri dan domestik umumnya merupakan pencemar logam berat pada sungai (Yudo, 2018).

Salah satu industri yang memberikan dampak lingkungan oleh limbahnya pada sungai Kejayan adalah industri yang bergerak di bidang penyamakan kulit. Terdapat 3 tahapan utama dalam proses penyamakan kulit, salah satunya adalah pengasaman (*picling*) yang bertujuan agar kulit tidak bengkan saat direaksikan dengan obat penyakan, proses ini bersifat asam dengan pH sekitar 3,0-3,5. Selain proses tersebut masih banyak lagi proses penyamakan yang menggunakan bahan kimia. Secara umum nilai pH limbah campuran tiap proses penyamakan kulit adalah 3,6 (Fachria *et al*., 2020).

Proses penyamakan kulit melibatkan berbagai aktivitas fisik, kimiawi dan biologi. Cemaran mikroba pada lingkungan limbah penyamakan kulit merupakan dampak aktivitas biologi, berbagai mikroba dapat hidup di area tersebut terutama mikroba yang mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan tercemar dan pH rendah.

Ulya *et al.*, (2018) mampu mengisolasi bakteri pengoksidasi $CuFeS_2$ dan FeS yang juga menghasilkan asam sulfat dari tanah masam Kalimantan. Umumnya bakteri pengoksidasi logam Fe dan S yang meghasilkan asam sulfat berasal dari limbah pertambangan (Vargas et al., 2020) (Lopes et al., 2020) (Ahn et al., 2019) (Mubarok et al., 2017) (Zhao *et al*., 2013) (Lindström et al., 1992) dan area kawah (Praminati *et al*., 2018) serta bakteri yang digunakan umumnya adalah *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Zhao et al., 2013) (Liu et al., 2017). Ulya *et al*., (2018) membuktikan bahwa selain pada area pertambangan dan kawah dapat ditemukan bakteri penghasil asam sulfat dengan karakter tanah pertumbuhannya bersifat asam. Bakteri pengoksidasi logam Fe dan S ini adalah agen pada proses *Bioleaching* yang merupakan proses pengolahan limbah logam ramah lingkungan.

Selama ini penelitian pemanfaatan limbah industri penyamakan kulit umumnya terbatas pada bakteri penghasil enzim protease (Said & Likadja, 2012). Isolasi bakteri penghasil asam sulfat selama ini dilakukan pada area-area pertambangan dan area dengan keasaman sangat rendah, namun isolasi bakteri penghasil asam sulfat dari area sungai yang terdampak limbah industri penyamakan kulit belum dilakukan. Maksud dan tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri penghasil asam sulfat dari tanah area sungai Kejayan sebagai agen *Bioleaching*.

METODE PENELITIAN

Populasi dan Sampel

Tanah pinggiran sungai Kejayan Kabupaten Pasuruan digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada dua titik sebagai variabel. Sampel dimasukkan dalam plastik ziplock steril dan disimpan pada suhu 5^0C untuk langsung dikerjakan di laboratorium.

Media Bakteri

Media pertumbuhan Isolat bakteri menggunakan hasil modifikasi Ulya *et al*., (2018) yakni medium thiosulfat dengan kandungan $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 7,85g, $MgCl_2.6H2O$ 0,1g, KH_2PO_4 3g, $CaCl_2.2H_2O$ 0,13g, NH_4Cl 0,1g, $FeCl_2.4H_2O$ 0,014g dan glukosa 5g dalam 1000mL, pH larutan 4,2 (*adjust* dengan HCl pekat), dan untuk medium agar tiosulfat dilakukan penambahan 15g/L bacto agar.

Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Pengenceran terhadap dua jenis tanah (titik A, titik B) merupakan tahap awal dalam isolasi bakteri, dimulai dengan menimbang masing-masing sebanyak 1g tanah diencerkan dalam 9mL aquades steril (10^0), kemudian satu seri pengenceran 10^{-1}–10^{-5} dibuat dari larutan 10^0. Sebanyak 100µL masing-masing pengenceran dilakukan *spreading/pour plate* pada medium agar thiosulfat yang mengandung antifungi dan diinkubasi pada suhu 32^0C sampai teramati pertumbuhan koloni bakteri.

Tahap selanjutnya adalah pemurnian isolat, koloni bakteri yang tumbuh titik-titik terpisah dipindah ke media agar tiosulfat baru dan dilakukan pemurnian dengan metode *streak plate* tipe goresan kuadran sampai diperoleh isolat murni.

Seleksi Bakteri

Satu ose isolat murni yang didapat diinokulasikan ke dalam media tiosulfat cair dan diinkubasi dalam *shaker* pada suhu ruang selama 24 jam dengan kecepatan 125rpm. Di akhir masa inkubasi dilakukan uji kandungan tiosulfat. Isolat terpilih untuk

proses biooksidasi selanjutnya adalah yang dapat menurunkan kadar tiosulfat.

Uji Kadar Tiosulfat

Pengecekan kadar tiosulfat menggunakan metode titrasi iodometri modifikasi (Kamil *et al*., 2008). Sebanyak 10 mL larutan iodin 0,025 N ditambah aquades 10 mL, 5 mL sampel dan 2 mL HCl 6 N kemudian ditetesi indikator amilum dan dititrasi dengan $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 0,025 N hingga warna biru memudar dan hilang. Kadar ion tiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) dihitung menggunakan rumus:

$$S_2O_3^{2-}\,(mg/L) = \frac{[(A \times B)-(C \times D)] \times 1{,}121.10^5}{mL\ sampel}$$

A: Volume larutan iodin yang terpakai (mL)
B: Normalitas larutan iodin
C: Volume $Na_2S_2O_3.5H_2O$ yang terpakai
D: Normalitas larutan $Na_2S_2O_3.5H_2O$

Biooksidasi $CuFeS_2$

25 mL *preculture* dengan komposisi media $CuFeS_2$ 5,85 g/L (sebagai ganti $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 7,85 g/L), $CaCl_2.2H_2O$ 0,13 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $FeCl_2.4H_2O$ 0,014g/L, NH_4Cl 0,1 g/L, $MgCl_2.6H2O$ 0,1 g/L dan glukosa 5 g/L. Satu ose bakteri dimasukkan dalam media *preculture* dan dishaker, setelah 24 jam 5 mL inokulum dimasukkan pada 100 mL media oksidasi (komposisi sama dengan media *preculture*) dan diinkubasi 150 rpm pada suhu 37 ^{0}C selama 24 jam, media kontrol (abiotik) adalah tanpa penambahan inokulum. Tahap ini dilakukan pengecekan kadar asam sulfat, OD dan pH serta uji konsentrasi Cu dan Fe total pada filtrat.

Pengecekan OD media menggunakan kertas saring whattman no.1 dan diukur absorbansinya menggunakan spektofotometer VWR UV-1600PC di λ 600 nm.

Uji Kadar Asam Sulfat

Kadar asam sulfat pada media biooksidasi diukur menggunakan metode turbidimetri, larutan standar sulfat yang digunakan adalah K_2SO_4 dengan konsentrasi 0-10 mM. Sampel uji adalah media biotik maupun abiotik disaring dengan kertas whattman no. 41, dan disentrifugasi dingin dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit. Sedangkan sampel kontrol (blangko) menggunakan 1 mL dH_2O.

Satu mL reagen *conditioning* (150 g NaCl, 60 mL HCl pekat, 100 mL gliserol, 200 mL etanol 95% dalam 1 L dH_2O) ditambah 0,06 g $BaCl_2$ dan mL sampel kemudian divortex 30 detik, setelah itu absorbansinya diukur dengan spektrofotometer VWR UV-1600PC pada λ 420 nm. Kadar asam sulfat yang dihasilkan isolat dalam sampel dihitung rumus.

$[SO_4^{2-}] = [A] – [B]$

[A] : Kadar $[SO_4^{2-}]$ pada sampel biotik
[B] : Kadar $[SO_4^{2-}]$ pada sampel abiotik

Cat Gram Bakteri

Suspensi bakteri diambil secara aseptis dan diletakkan di atas *object glass* lalu difiksasi untuk karakterisasi gram bakteri, lalu ditetesi cat gram A (*crystal violet*) diamkan selama 1 menit, dicuci menggunakan aquades dan dikeringkan. Langkah selanjutnya ditetesi cat gram B (*mordan lugol's iodine*) dibiarkan selama 1 menit, dicuci menggunakan aquades dan dikeringkan. Cat gram C (*alcohol*) kemudian diteteskan sebagai cat peluntur dan dibiarkan selama 15 detik dan dicuci dengan aquades. Selanjutnya ditetesi cat gram D (*safranin*) dibiarkan selama 1 menit dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan. Hasil pengecatan gram diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran kuat serta ditetesi minyak imersi.

Identifikasi gram bakteri juga menggunakan cat gram KOH 3%. KOH 3% diteteskan pada *object glass*, ditambahkan isolat bakteri dan diaduk selama 1 menit. Bakteri gram negatif akan menyebabkan suspensi menjadi kental seperti lendir (Erkmen, 2021).

Uji Kadar Cu dan Fe

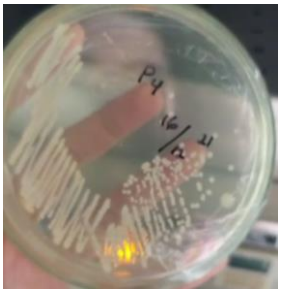
Kadar Cu dan Fe total yang terlarut pada media biooksidasi dicek menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel tanah sungai Kejayan terdiri dari dua jenis yaitu tanah dinding sungai pada kedalaman 5-10 cm dari permukaan tanah (titik A), dan tanah pinggiran sungai pada kedalaman 5-10 cm dari permukaan tanah (titik B). Kedua jenis tanah tersebut kemudian dilakukan pengenceran dan diratakan pada media agar tiosulfat dengan metode *pour plate*.

Pada titik A dan B teramati mulai tumbuh koloni bakteri pada hari ke 3, Koloni bakteri yang didapat dimurnikan kembali dengan metode *streak plate* tipe goresan kuadran, dari hasil tersebut didapat 6 isolat murni, 2 isolat dari titik A dan 4 isolat dari titik B. Isolat-isolat murni tersebut dicek kadar tiosulfat sebagai tahap seleksi selanjutnya. Kurva pertumbuhan dan kultivasi isolat murni menggunakan media cair tiosulfat. Isolat yang dapat menurunkan kadar tiosulfat diseleksi untuk tahap selanjutnya, Tiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) diasumsikan mengalami oksidasi menjadi sulfat (SO_4^{2-}) walaupun dalam konsentrasi yang sangat rendah sehingga konsentrasi tiosulfat akan terus menurun pada kadar tertentu jika bakteri tersebut dapat melakukan oksidasi tiosulfat. Asumsi lainnya tiosulfat

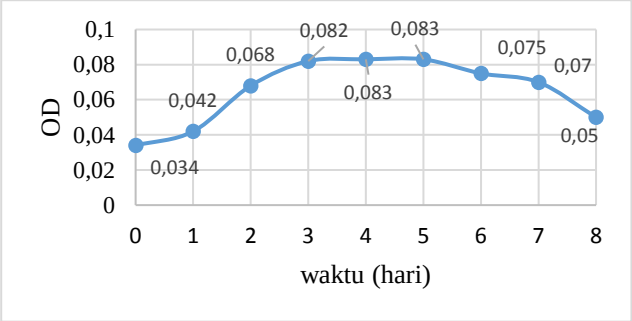
diduga sebagai senyawa metastabil yang mengalami dekomposisi pada sistem *leaching*.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri metode *streak plate* tipe goresan kuadran

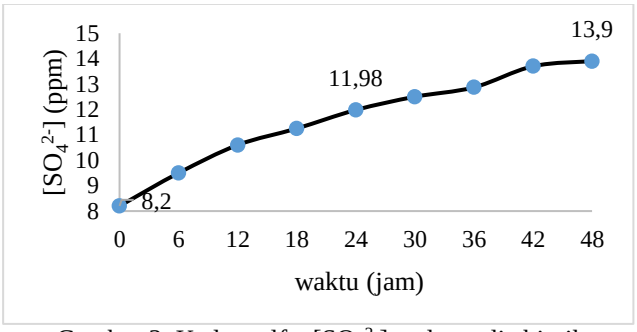
Dari uji kadar tiosulfat didapat hanya ada 1 isolat (isolat K.2) yang terseleksi untuk tahap selanjutnya. Langkah pertama pada proses Biooksidasi terhadap isolat K.2 adalah membuatan media *preculture* (media adaptasi) dan *main culture* menggunakan $CuFeS_2$ 5,85 g/L sebagai ganti $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 7,85g. Isolat K.2 diinkubasi selama 24 jam dalam media *preculture* kemudian dipindahkan ke dalam media *main culture*.

Terlihat pada kurva pertumbuhan yang ditunjukkan oleh gambar 2, isolat K.2 mengalami fase stasioner pada hari ke-3 hingga ke-5, fase kematian pada hari ke-6. Tahap ini juga dilakukan pengecekan kadar keasaman (pH) terhadap media *main culture*. Berdasarkan gambar 3 kurva pH masa biooksidasi, isolat R.1 dapat terus menurunkan pH media menjadi 3,5 pada hari ke-9 sedangkan pada isolat R.4 pH terendah dicapai pada hari ke-8 namun pada hari ke-10 mengalami sedikit kenaikan pH menjadi 4,51 maka isolat R.1 yang terseleksi untuk diuji kadar sulfat (SO_4^{2-}) serta uji kadar Cu dan Fe menggunakan AAS.



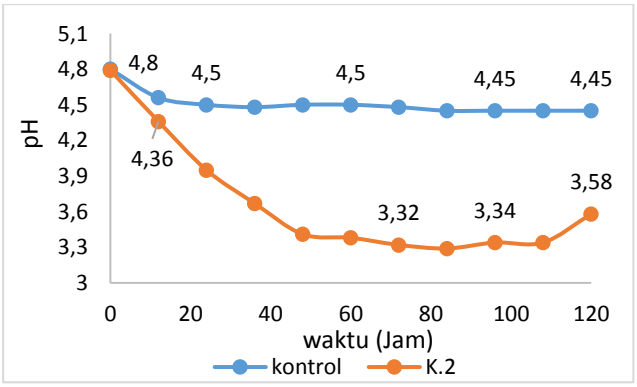
Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolat pada media biooksidasi

Uji kadar sulfat (SO_4^{2-}) pada media abiotik (kontrol, tidak mengandung isolat K.2) dan media biotik (mengandung isolat K.2) mengacu pada larutan standar sulfat K_2SO_4 dengan konsentrasi 0-10 mM. Gambar 3 menunjukkan bahwa pada kondisi biotik dan abiotik memiliki pola kurva kadar sulfat (SO_4^{2-}) yang hampir sama dengan kondisi biotik terukur hampir lebih tinggi dibanding kondisi abiotik, hal tersebut juga sebanding dengan pH yang terukur pada media biooksidasi (gambar 4).



Gambar 3. Kadar sulfat [SO_4^{2-}] pada media biotik

Pengecekan kadar sulfat dilakukan enam jam sekali selama 48 jam. Pada jam ke-0 terukur sebesar 8,2 ppm, dan terus meningkat hingga jam ke-48 sebesar 13,9 ppm. Selaras dengan pH yang terukur pada jam ke-0 adalah 4,8 untuk kontrol dan 4,78 untuk abiotik yang kemudian tergambar terus menurun hingga jam ke-84 pada media biotik dan mengalami sedikit peningkatan pada jam ke-96 hingga jam ke-120. Sedangkan pada media kontrol pH yang terukur hampir konstan di angka 4,5. Hal tersebut dapat diasumsikan bahwa penurunan pH dapat disebabkan oleh adanya kenaikan kadar asam sulfat (H_2SO_4) yang dihasilkan oleh isolat K.2. kadar sulfat tertinggi diperoleh pada jam ke-48 sebesar 13,9 ppm.

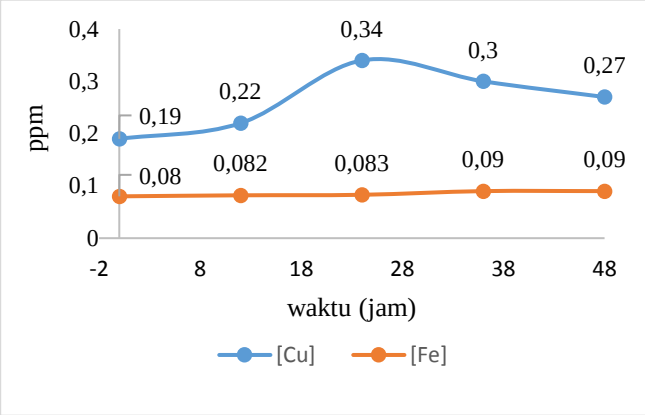


Gambar 4. pH media biotik dan abiotik

Berdasarkan gambar 5, kadar [Cu] total tertinggi diperoleh pada jam ke-24 sebesar 0,34 ppm, sedangkan [Fe] total tertinggi 0,09 ppm pada jam ke-36 dan 48. Dalam media Biooksidasi senyawa $CuFeS_2$ mengalami dekomposisi melibatkan proses pelepasan

dan penangkapan beberapa ion yang tergambar pada persamaan (Mubarok et al., 2017):

$$CuFeS_2+O_2+2H_2SO_4 \rightarrow Fe^{2+}+Cu^{2+}+2SO_4^{2-}+2S+2H_2O$$



Gambar 5. Kadar [Cu] dan [Fe] total pada media biooksidasi

Berdasarkan pengecatan gram yang dilakukan pada isolat K.2 menunjukkan warna kemerahan, hal tersebut mengindikasikan bahwa isolat adalah bakteri gram negatif. Penggunaan KOH 3% juga menghasilkan suspensi kental seperti lendir, hal ini membuktikan bahwa isolat K.2 adalah bakteri gram negatif.

KESIMPULAN

Bakteri pengoksidasi sulfur atau penghasil asam sulfat dapat diisolasi pada area bukan pertambangan. Pada tanah sungai Kejayan Pasuruan ditemukan bakteri yang menghasilkan asam sulfat dengan kadar tertinggi 13,9 ppm pada jam ke-48. Bakteri ini berpotensi sebagai agen biooksidasi logam Cu dan Fe.

Rekomendasi untuk tahap selanjutnya adalah sequensing isolat K.2 hingga BLAST NCBI dan *Phylogenetic tree*.

DAFTAR PUSTAKA

Ahn, J., Wu, J., Ahn, J., & Lee, J. (2019). Comparative investigations on sulfidic gold ore processing: A novel biooxidation process option. *Minerals Engineering*, *140*(April). https://doi.org/10.1016/j.mineng.2019.105864

Erkmen, O. (2021). *Laboratory Practices in Microbiology* (1st editio). Academic Press.

Fachria, R., Ramdan, H., & Aryantha, I. (2020). Efektivitas pengolahan limbah cair industri penyamakan kulit Sukaregang Garut dengan adsorben karbon aktif dan ijuk. *Jurnal Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan (Journal of Environmental Sustainability Management)*, *3*(3), 379–388. https://doi.org/10.36813/jplb.3.3.379-388

Kamil, I., Ini, S., Untuk, D., Sebagian, M., Menjadi, P., Teknik, S., Kimia, D. T., Teknik, F., & Indonesia, U. (2008). *Pemanfaatan Bakteri Thiobacillus thioparus untuk Mendegradasi Kandungan Sulfur dalam Gas Alam*.

Kominfo, A. (2021). *Gambaran Umum Kabupaten Pasuruan 2021*. 09 Agustus. https://www.pasuruankab.go.id/pages-29-gambaran-umum-kabupaten-pasuruan-2021

Lindström, E. B., Gunneriusson, E., & Tuovinen, O. H. (1992). Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. *Critical Reviews in Biotechnology*, *12*(1–2), 133–155. https://doi.org/10.3109/07388559209069190

Liu, H. chang, Xia, J. lan, Nie, Z. yuan, Liu, L. zhu, Wang, L., Ma, C. yan, Zheng, L., Zhao, Y. dong, & Wen, W. (2017). Comparative study of S, Fe and Cu speciation transformation during chalcopyrite bioleaching by mixed mesophiles and mixed thermophiles. *Minerals Engineering*, *106*, 22–32. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2017.01.013

Lopes, A. R., Madureira, D., Diaz, A., Santos, S., Vila, M. C., & Nunes, O. C. (2020). Characterisation of bacterial communities from an active mining site and assessment of its potential metal solubilising activity. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *8*(6), 104495. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104495

Mubarok, M. Z., Winarko, R., Chaerun, S. K., Rizki, I. N., & Ichlas, Z. T. (2017). Improving gold recovery from refractory gold ores through biooxidation using iron-sulfur-oxidizing/sulfur-oxidizing mixotrophic bacteria. *Hydrometallurgy*, *168*, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.10.018

Said, M. I., & Likadja, J. C. (2012). Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi sebagai

Penghasil Enzim Protease pada Industri Penyamakan Kulit PT.Adhi Satria abadi (ASA), Yogyakarta. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pertenakan*, *2*(9), 121–128.

Ulya, F., Prijambada, I. D., & Wiratni. (2018). *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pengoksidasi CuFeS2 dan FeS dari Tanah Sulfat Masam Kalimantan*. Universitas Gadjah Mada.

Vargas, T., Estay, H., Arancibia, E., & Díaz-Quezada, S. (2020). In situ recovery of copper sulfide ores: Alternative process schemes for bioleaching application. *Hydrometallurgy*, *196*, 105442. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105442

Yudo, S. (2018). Kondisi Pencemaran Logam Berat Di Perairan Sungai Dki Jakarta. *Jurnal Air Indonesia*, *2*(1), 1–15. https://doi.org/10.29122/jai.v2i1.2275

Zhao, X., Wang, R., Lu, X., Lu, J., Li, C., & Li, J. (2013). Bioleaching of chalcopyrite by Acidithiobacillus ferrooxidans. *Minerals Engineering*, *53*, 184–192. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.08.008