

# ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS BAKTERI ASIDOFILIK PENGOKSIDASI BESI DAN SULFUR DARI EKOSISTEM AIR HITAM DI KALIMANTAN TENGAH

## *Isolation and Activity Test of Acidophilic Iron and Sulfur Oxidizing Bacteria from Black Water Ecosystem of Central Kalimantan*

Nurseha<sup>1</sup> dan G. Djajakirana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pengajar Fakultas Pertanian Universitas Prof. Dr Hazairin SH (UNIHAZ) Bengkulu

<sup>2</sup>Departemen Tanah, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor  
Jalan Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

### ABSTRACT

*The acidophilic iron and sulfur oxidizing bacteria were isolated from black water ecosystem, an 'extreme' ecosystem affected indirect or directly by peat land. Isolation and selection were done on minimal media (liquid and solid). All selected strain of bacteria (BB 179, OM 349, AH 41, TB 23, TB 27, TP 3, NN 323, and SI 188) were identified as Thiobacillus ferrooxidans. Biooxidation and bio-leaching tests were accomplished using the isolated bacteria. The results showed the capability of the isolated bacteria to oxidize ferrous-salt and to leach the low qualities of sulfide ores.*

**Keywords :** Acidophilic, bioleaching, biooxidation, Thiobacillus ferrooxidans

### PENDAHULUAN

Di masa mendatang, kebutuhan akan bahan logam untuk pembangunan prasarana industri, teknik serta prasarana perekonomian lain akan menjadi sangat besar seiring dengan meningkatnya aktivitas pembangunan nasional. Di lain pihak, persediaan sumber bahan tambang logam konsentrasi tinggi di masa mendatang akan semakin menyusut disebabkan oleh meningkatnya aktivitas eksploitasi yang terus-menerus. Yang banyak dijumpai pada masa mendatang adalah bahan tambang dengan konsentrasi rendah dan sisa-sisa tambang saat ini (*tailing*) yang dengan teknologi yang ada saat ini tidak menguntungkan untuk dieksploitasi. Dengan demikian, diperlukan suatu teknologi baru yang dapat mengolah mineral logam dengan kadar rendah, serta pengolahan kembali limbah *tailing* yang selama ini masih merupakan masalah dalam pertambangan.

Dalam beberapa tahun belakangan ini, pencucian dengan mikroba (*microbial leaching*) mendapat perhatian yang sangat besar dari beberapa negara karena teknologi ini terbukti mempunyai potensi untuk menyelesaikan masalah dalam pengolahan mineral berkadar logam rendah maupun tinggi. Beberapa keuntungan lain yang dapat diperoleh dengan melakukan proses *bioleaching* adalah biaya operasi relatif cukup rendah, aman terhadap lingkungan dan dapat mengolah *tailing* (Haris *et al.*, 1994)

Mikroorganisme yang mempunyai potensi untuk dikembangkan dan memegang peranan penting dalam proses-proses *bioleaching* adalah *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, dan dari genus *Sulfolobus* yaitu *S. acidocaldarius* (Handayani, 1997; Woods dan Rawlings, 1989). Menurut Holt *et al.* (1994), bakteri-bakteri di atas

dikelompokkan ke dalam bakteri khemolithotroph, yaitu bakteri yang mampu menghasilkan sendiri energi yang dibutuhkan dengan cara mengoksidasi senyawa-senyawa anorganik seperti Fe(II), S<sup>0</sup>, H<sub>2</sub>S, dan sebagainya. Ingledew (1990) menambahkan bahwa bakteri-bakteri di atas merupakan bakteri asidofilik, yaitu bakteri yang hidup di lingkungan yang relatif lebih asam dari keadaan normal.

Hanya ada sedikit tipe lingkungan asam yang sesuai untuk kehidupan organisme, akan tetapi tipe yang sedikit ini amat luas kisarannya. Tipe lingkungan ini biasanya berasosiasi dengan deposit-deposit pirit (FeS<sub>2</sub>) atau elemen sulfur (S<sup>0</sup>), dan mencakup wilayah pertambangan, wilayah geothermal, dan beberapa tanah masam yang letaknya rendah serta digenangi air. Relung-relung ekologi seperti ini terutama cocok untuk organisme pengoksidasi sulfur dan besi ferro yang bersifat khemolithotroph (Ingledew, 1990).

Ekosistem air hitam merupakan pengembangan istilah yang sudah dikenal yaitu sungai air hitam yang merujuk ke sungai-sungai yang memiliki air berwarna coklat tua jernih; juga beberapa danau dan rawa yang memiliki air berwarna coklat tua, tidak berbau, terbentuk melalui proses alamiah yang berlangsung ribuan tahun, kaya akan bahan organik, dipengaruhi baik langsung maupun tidak langsung oleh gambut (Santosa *et al.*, 1998). Berbagai kelompok mikroba yang mampu hidup dalam kondisi ekstrem, baik pada pH rendah (*asidofilik*), pH tinggi (*alkalofilik*), suhu tinggi (*termofilik*), serta mikroba lain yang mempunyai potensi untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi dapat ditemukan dalam lingkungan ini. Bakteri ini tergolong unik karena hidup dalam ekosistem yang „tidak normal“. Sifat fisiko-kimia air sangat ekstrem, pH air rendah (3.00 - 4.00) serta mengandung berbagai senyawa toksik, H<sub>2</sub>S, fenol, dan logam berat (Mn, Zn dan Pb).

\*Alamat korespondensi email: gdjajak@yahoo.com

Sesuai dengan kondisinya yang tidak normal (non fisiologis) dari ekosistem air hitam seperti yang disebutkan di atas, diharapkan dapat ditemukan isolat-isolat dari bakteri asidofilik yang mampu mengoksidasi sulfur dan besi pada kondisi yang ekstrem.

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) Mengisolasi bakteri asidofilik dari ekosistem air hitam yang mampu mengoksidasi besi ( $Fe^{2+}$ ) dan sulfur ( $S^0$ ); (2) Melakukan pengujian aktivitas isolat terpilih dalam mengoksidasi  $Fe^{2+}$  menjadi  $Fe^{3+}$  maupun aktivitasnya terhadap pelarutan logam-logam sulfida pada kondisi non fisiologis/ekstrem (pH rendah).

## BAHAN DAN METODE

Tahap Penelitian terdiri atas: isolasi, seleksi, dan uji aktivitas mikroorganisme asidofilik pengoksidasi besi dan sulfur, dilakukan di Laboratorium Biologi Tanah, dan Laboratorium Kimia & Kesuburan Tanah, Departemen Tanah Fakultas Pertanian, IPB di Bogor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 1999 sampai bulan Maret 2000.

Bahan yang digunakan antara lain contoh sedimen yang diambil dari ekosistem air hitam Danau Mayun, Kabupaten Kapuas, Kalimantan Tengah dan ekosistem air hitam pulau Begantung (Danau Mentangai), Kabupaten Barito Selatan, Kalimantan Tengah.

Bahan lain yang digunakan yaitu semua bahan kimia yang diperlukan untuk mengisolasi, menyeleksi, dan menguji aktivitas isolat bakteri yang terpilih, serta bahan-bahan seperti: kapas, aluminium foil, alkohol, dan spiritus.

Bahan sulfida yang digunakan berupa bijih sulfida berkadar rendah (limbah batuan penutup) dari daerah penambangan di Wonogiri, yang didapat dari Pusat Pengembangan dan Penelitian Teknologi Mineral (P3TM) Bandung.

### Isolasi Bakteri Pengoksidasi Besi.

Isolasi dilakukan dengan cara: satu gram tanah dilarutkan dalam sembilan ml larutan fisiologis (0.85% NaCl) dengan cara dikocok, kemudian larutan tanah ini dipipet satu ml dan dimasukkan ke dalam medium yang telah dipersiapkan.

Medium isolasi yang pertama dipergunakan berupa medium cair, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar di tempat yang cukup cahaya tetapi tidak terkena cahaya matahari langsung selama 6 minggu; setiap contoh tanah diulang tiga kali. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap warna media, bila warna media berubah dari kuning kehijauan menjadi berwarna kuning kecoklatan (warna karat), maka telah terjadi oksidasi besi akibat aktivitas bakteri.

Isolat yang mampu tumbuh pada media cair, kemudian ditumbuhkan pada media padat selektif. Komposisi media yang dicobakan berupa media padat 9K (Erskindi dan Budiayanto, 1994) dan media padat 9K dengan ekstrak ragi (*Yeast extract*, Sugio *et al.*, 1995). Pengamatan dilakukan setiap hari dengan melihat adanya pembentukan

koloni karat, dan media agar di sekitar koloni juga berubah dari bening menjadi kuning yang terjadi akibat teroksidasinya besi ferro ( $Fe^{2+}$ ) menjadi besi ferri ( $Fe^{3+}$ ) oleh isolat bakteri.

Koloni yang letaknya terpisah, kemudian ditumbuhkan kembali pada media cair seperti pada langkah pertama untuk memperjelas aktivitas isolat yang terpilih. Isolat-isolat yang tumbuh pada media cair tahap III ini digunakan sebagai isolat unggulan dan selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas bio-oksidasi.

### Uji Aktivitas Bio-Oksidasi Isolat-isolat Terpilih

Untuk melihat aktivitas oksidasi besi ferro menjadi besi ferri, dilakukan pengujian dengan cara menumbuhkan isolat terpilih pada media garam ferro dengan menggunakan erlenmeyer berukuran 250 ml selama 6 hari. Konsentrasi ferro sulfat yang digunakan adalah 5 gr/liter (Untung, 1999). Pengujian dilakukan pada pH 2.80. Isolat yang digunakan pada masing-masing erlenmeyer sebanyak 2% dari total volume yaitu 100 ml. Sebagai kontrol, digunakan media garam ferro steril. Selama inkubasi, medium dikocok dengan kecepatan rendah supaya besi ferri yang terbentuk mengendap.

Setiap hari diambil 10 ml larutan untuk dilakukan analisis terhadap kandungan besi ferro pada medium. Sebelum diukur, larutan yang akan dianalisis disaring dengan filter *milipore* berukuran 0.2  $\mu m$  supaya bakteri yang ada dalam larutan dan besi ferri yang terbentuk tidak terukur pada saat pengukuran. Pengukuran besi ferro dilakukan dengan menggunakan AAS.

Untuk melihat aktivitas bakteri terhadap oksidasi sulfur, dilakukan pengujian pada medium tiosulfat cair. Dengan menggunakan jarum ose diambil satu koloni isolat bakteri dan dicampurkan ke dalam media tiosulfat cair. Sebelum inokulasi, pada media yang dicobakan dilakukan pengukuran pH dan konsentrasi sulfat ( $SO_4^{2-}$ ). Media yang telah diinokulasi selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar selama 14 hari sambil dilakukan pengocokan secara terus-menerus dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 125 rpm.

Pada akhir inkubasi, kembali dilakukan pengukuran pH dan konsentrasi sulfat. Pengukuran sulfat dilakukan dengan menggunakan UV-Spectrofotometer pada panjang gelombang 432 nm. Sepuluh ml larutan dari setiap strain isolat bakteri ditambahkan 2 ml HCl 4 N dan 2 ml BaCl<sub>2</sub> + Tween 80 sebagai larutan pereaksi.

### Pengujian Pelarutan Logam Sulfida secara Biologi (*Bioleaching*)

Pengujian ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat kemampuan isolat bakteri terpilih dalam melepas logam dari bijih sulfida. Hasil analisis kimia pendahuluan dari bijih sulfida dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Analisis Kimia Pendahuluan Bijih Sulfida Contoh

S	Fe	Cu	Mn	Zn
.....(%),.....	.....(ppm).....			
2.80	7.30	601	362	621

Sebelum uji dilakukan, isolat ditumbuhkan dulu pada media ATCC 64 (Atlas, 1993) pada pH 2.50. Pada saat isolat berumur satu minggu, uji aktivitas pelarutan dimulai. Bijih sulfida yang telah dihaluskan sampai berukuran lebih kurang 30 mesh ditimbang sebanyak 15% dari volume larutan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 500 ml, kemudian disterilkan dengan autoklaf.

Media yang digunakan yaitu ATCC 64, dengan pH ditetapkan 2.50. Isolat yang telah berumur 7 hari diambil sebanyak 10% dan media ATCC 64 yang telah steril dimasukkan ke dalam erlemeyer yang telah berisi bijih sulfida sampai total volume campuran menjadi 200 ml. Semua erlenmeyer dikocok secara terus menerus selama 21 hari menggunakan shaker dengan kecepatan 125 rpm pada suhu kamar. Untuk membantu kebutuhan oksigen bagi bakteri, digunakan pompa udara aquarium (air pump). Udara yang dialirkan pada setiap erlemeyer, terlebih dahulu disterilkan menggunakan filter sterilisasi berukuran 0.2 µm.

Pengamatan dilakukan setiap tiga hari dengan mengambil 10 ml larutan media. Pengamatan dilakukan terhadap konsentrasi logam (Fe, Cu, Zn, dan Mn) terlarut dengan menggunakan AAS. Sebelumnya larutan disaring dengan menggunakan kertas saring. Larutan yang diambil diganti dengan menambahkan medium segar bebas besi, sedangkan air yang hilang karena penguapan diganti dengan air bebas ion steril.

#### Isolasi Kembali Isolat Bakteri setelah Uji Pelarutan (Bioleaching)

Untuk melihat apakah isolat yang digunakan dalam uji bioleaching masih hidup, dilakukan isolasi kembali terhadap isolat tersebut. Isolasi ini dilakukan dengan cara mengambil satu ml suspensi bijih sulfida (dalam keadaan tercampur), dan ditumbuhkan pada media cair 9K (pH 2.50). Diinkubasikan selama dua minggu pada suhu kamar. Bila terjadi perubahan warna menjadi berkarat seperti pada isolasi terdahulu, maka diduga isolat bakteri yang digunakan masih hidup.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Mikroorganisme Hasil Isolasi dan Seleksi

Dari contoh-contoh tanah, yang dicobakan, diperoleh 53 isolat bakteri yang menunjukkan adanya aktivitas oksidasi besi dari garam ferro menjadi ferri pada media minimal cair. Contoh-contoh tanah yang mengandung isolat bakteri tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Isolasi dan Seleksi Isolat Terpilih, pada Media Cair I (Seleksi I), Media Agar Padat I (Seleksi II), Media Cair II, dan Media Agar Padat II (Seleksi III).

Contoh tanah	Media cair I (hari)	Media agar padat I (hari)		Media cair II (hari)	Media agar padat II (hari)
		A	A		
DH.13	28	x	x	x	x
DH.14	16	x	x	x	x
DH.18	10	x	x	x	x
DH.20	34	x	x	x	x
DH.23	10	10	x	6	28*
BB.161	32	x	x	x	x
BB.166	28	x	x	x	x
BB.171	21	x	x	x	x
BB.174	17	10	x	30	28*
BB.176	18	x	x	x	x
BB.178	28	x	x	x	x
BB.179	14	10	19	11	10
BB.183	45	x	x	x	x
OM.349	14	15	x	28	14
PB.151	20	x	x	x	x
PB.161	20	x	x	x	x
AH.31	14	21	x	x	x
AH.32	21	x	x	14	28*
AH.34	16	x	x	x	x
AH.36	14	10	x	32	30*
AH.39	34	x	x	x	x
AH.41	14	21	x	18	14
AH.43	28	x	x	x	x
AH.44	28	x	x	x	x
TP.1	28	x	x	x	x
TP.3	9	14	x	10	10
TP.6	34	x	x	x	x
PR.61	21	x	x	x	x
PR.66	28	x	x	x	x
PR.71	34	x	x	x	x
PR.77	34	x	x	x	x
PR.81	28	x	x	x	x
PR.86	28	x	x	x	x
PR.87	34	x	x	x	x
TB.23	10	3	x	2	4
TB.27	9	21	10	10	10
TB.29	14	10	x	18	21*
GR.116	17	x	x	x	x
GR.122	10	x	x	x	x
GR.126	14	45	x	x	x
GR.127	16	x	x	x	x
GR.128	34	x	x	x	x
GR.131	12	45	x	x	x
GR.258	45	x	x	x	x
BG.258	9	x	x	x	x
SI.58	10	x	x	x	x
SI.188	15	1	x	10	10
SI.203	16		x	x	x
SI.339	14		x	x	x
NN.323	9		x	4	6
NN.329	34		x	x	x
DB.366	45		x	x	x

Keterangan : \* = isolat yang tidak digunakan dalam uji aktivitas, x = tidak tumbuh; A = Erskini dan Budiyanto (1994), B = Sugio *et al.* (1995).

Tabel 3. Konsentrasi Besi Ferro selama Uji Biooksidasi Garam Ferro dan Hasil Pengukuran pH serta Konsentrasi Sulfat pada Uji Biooksidasi Sulfur

Isolat	Konsentrasi besi ferro pada hari ke -						pH dan konsentrasi sulfat pada akhir uji biooksidasi sulfur	
	1	2	3	4	5	6	pH	Sulfat (ppm)
	(ppm)							
OM.349	1350	1170	1021	732	521	262	3.20	4012
AH.41	1560	1210	1062	640	510	270	3.60	3799
TP.3	1336	1088	988	575	440	190	3.50	3812
TB.23	1355	1120	972	632	492	210	3.10	4079
TB.27	1645	1421	1173	9687	631	373	3.40	3851
NN.323	1360	1211	1052	40	540	280	3.50	3809
SI.188	1352	1096	897	460	197	140	3.05	4255
Kontrol	1731	1728	1726	1721	1719	1713	5.40	1254

Dari media yang dicobakan, ternyata media yang paling sesuai bagi pertumbuhan bakteri pengoksidasi besi dan sulfur adalah media cair dari Leathen *et al.* (1956 dalam Dunger dan Fiedler, 1989; dan selanjutnya hanya disebut media Leathen). Hal ini mungkin disebabkan karena media tersebut memiliki komposisi yang paling cocok bagi isolat yang berasal dari ekosistem air hitam, di mana kandungan logamnya tidak terlalu tinggi. Kandungan besi ferro pada media ini juga tidak tinggi (1,0 gr per liter), keadaan inilah diduga menyebabkan isolat bakteri lebih mampu menyesuaikan diri pada media tumbuh tersebut.

Perubahan warna media dari kuning kehijauan menjadi kuning kecoklatan (warna karat) disebabkan terbentuknya besi ferri ( $Fe^{3+}$ ) karena dioksidasinya besi ferro ( $Fe^{2+}$ ) oleh bakteri pengoksidasi besi (Untung, 1999; Sugio *et al.*, 1995; Erskini dan Budiyanto, 1994; Brock dan Madigan, 1991). Dari Tabel 2. juga dapat dilihat bahwa isolat bakteri sebagian besar dapat tumbuh pada media padat 9K (Erskini dan Budiyanto, 1994), sedangkan pada media Sugio *et al.* (1995) hanya tumbuh 2 isolat. Keadaan ini disebabkan karena komposisi media, di mana pada media agar A (Erskini dan Budiyanto, 1994), kandungan besi ferronya ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) lebih rendah dibandingkan media B (Sugio *et al.*, 1995). Di samping itu media agar A memiliki pH 3.50, sama dengan pH pada media cair Leathen.

Selanjutnya koloni isolat yang tumbuh pada media agar A, pH 3.50 dipilih dan diambil satu koloni terpisah dari setiap strainnya untuk ditumbuhkan kembali pada media cair yang paling cocok yaitu media Leathen. Dari Tabel 2. dapat dilihat bahwa waktu pertumbuhan dari isolat beragam. Dari 15 isolat pada media agar (I), hanya 13 isolat yang dipilih untuk ditumbuhkan kembali pada media cair (II). Isolat GR 126 dan GR 131 tidak diambil karena waktu pertumbuhannya pada agar (I) terlalu lama yaitu 45 hari. Lebih lanjut isolat yang tumbuh pada media cair (II), ditumbuhkan kembali pada media agar padat (disebut: agar II). Pada tahap ini media yang digunakan hanya media agar A (Erskini dan Budiyanto, 1994), tetapi pH media diturunkan menjadi 2.80. Penurunan pH ini ditujukan untuk membiasakan isolat tumbuh pada media yang lebih asam. Hasil kultivasi pada media agar padat II dapat dilihat pada Tabel 2. Dari 13 isolat yang ditumbuhkan, hanya 8

isolat yang digunakan dalam uji aktivitas yaitu isolat BB 179, OM 349, AH 41, TP 3, TB 23, TB 27, NN 323, dan SI 188.

Dari koloni-koloni terpisah, diambil koloni tunggal dari setiap isolat untuk ditumbuhkan pada media cair 9K dengan pH 2.50 (cair III). Pemurnian terus dilakukan sampai pada tingkat media cair IV yang digunakan sebagai stok.

Untuk mengidentifikasi mikroorganisme dari isolat-isolat terpilih, dilakukan penanaman isolat murni cair pada media agar seperti cara-cara sebelumnya untuk mendapatkan koloninya. Berdasarkan hasil identifikasi ternyata semua isolat adalah *Thiobacillus ferrooxidans* (Holt *et al.*, 1994).

#### Uji Aktivitas Biooksidasi Isolat Terpilih

Dari sekian banyak bakteri asidofilik, hanya 7. *ferrooxidans* yang mampu mengoksidasi besi ferro dan sulfur. Dalam proses pengoksidasian besi dari besi ferro ( $Fe^{2+}$ ) menjadi besi ferri ( $Fe^{3+}$ ) dihasilkan energi. Energi ini digunakan oleh bakteri untuk memfiksasi  $CO_2$  dan pertumbuhan sel (Ragusa dan Madgwick, 1990; Nagpal, 1996; Brock dan Madigan, 1991).

Uji aktivitas oksidasi garam ferro ditujukan untuk melihat kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan energi, sehingga secara tidak langsung dapat menunjukkan kecepatan pertumbuhan dari bakteri itu sendiri. Data hasil pengukuran garam ferro disajikan pada Tabel 3. Dari Tabel 3. dapat dilihat bahwa setiap hari terjadi penurunan konsentrasi besi ferro yang belum dioksidasi. Perbedaan yang nyata dapat dilihat bila dibandingkan dengan kontrol, di mana sampai hari ke-6 pada kontrol belum menunjukkan adanya perubahan warna pada media yang menandakan belum terjadi oksidasi besi ferro atau oksidasi masih sangat sedikit. Kenyataan ini dapat dijadikan dasar bahwa isolat sangat besar pengaruhnya terhadap oksidasi besi. Hasil dari oksidasi ini berperan sangat penting dalam melarutkan logam dari bijih-bijih sulfida.

Pada uji aktivitas biooksidasi sulfur, isolat-isolat bakteri ditumbuhkan pada media tiosulfat cair dan diinkubasikan selama dua minggu di atas *shaker* dengan kecepatan 125 rpm. Media yang digunakan diukur pH

awalnya yaitu 5.80 dan konsentrasi sulfat pada media 90.7 ppm. Setelah inkubasi kembali dilakukan pengukuran pH dan konsentrasi sulfat. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 3. Dari tabel ini dapat dilihat bahwa secara umum isolat dapat menyebabkan penurunan pH media. Makin menurunnya pH tersebut disebabkan karena terbentuknya asam sulfat pada media akibat aktivitas oksidasi sulfur oleh isolat bakteri.

### Pengujian Pelarutan Logam Sulfida secara Biologi (*Bioleaching*), pH dan Konsentrasi Sulfat

Sebelum uji dilaksanakan, pH media ditetapkan dahulu yaitu 2.50, sedang pH bahan mineral (bijih sulfida) 4.00. Pengukuran pH dan konsentrasi sulfat yang pertama dilakukan pada hari ke-3, ternyata terjadi peningkatan pH pada larutan media. Hal ini dikarenakan pH bijih sulfida yang digunakan lebih tinggi daripada pH media, sehingga penambahan bijih sulfida dapat meningkatkan pH media. Hasil pengukuran pH dan konsentrasi sulfat disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengukuran pH dan Konsentrasi Sulfat pada Awal dan Akhir Percobaan

No	Isolat	pH		Konsentrasi sulfat (ppm)	
		Awal	Akhir	Awal	Akhir
1.	BB.179	2.80	2.20	3773.48	8699.41
2.	OM.349	2.80	2.10	3551.26	8143.85
3.	AH.41	2.90	2.30	3514.22	9254.96
4.	TP.3	2.90	2.30	3773.48	8514.22
5.	TB.23	2.80	2.30	3329.04	8514.22
6.	TB.27	2.90	2.30	4254.96	8329.04
7.	NN.323	2.75	2.20	4440.15	9625.33
8.	SI.188	2.80	2.20	3551.26	8143.85
9.	Kontrol	2.90	2.50	3032.74	6662.37

Dari Tabel 4, dapat dilihat bahwa walaupun pada pengukuran pertama di hari ke-3 terjadi kenaikan pH larutan, tetapi pada pengukuran terakhir pada hari ke-18, terjadi penurunan pH kembali sampai di bawah pH media awalnya. Konsentrasi sulfat mengalami peningkatan yang sangat tinggi, di mana hal ini adalah akibat teroksidasinya sulfida menjadi sulfat, baik secara biologi oleh isolat maupun secara kimia akibat pengasaman.

Terjadinya oksidasi kimia dapat dibuktikan dengan peningkatan konsentrasi sulfat pada kontrol. Namun demikian, peningkatan konsentrasinya tetap lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi sulfat pada perlakuan dengan isolat bakteri. Keadaan ini seiring dengan meningkat konsentrasi logam-logam terlarut yang makin tinggi dari awal hingga akhir percobaan.

### Konsentrasi Logam-Logam Terlarut

Dari hasil pengukuran logam terlarut dapat dilihat bahwa isolat bakteri mampu melarutkan logam-logam dari

bijih sulfida berkualitas rendah yang berasal dari batuan penutup (limbah batuan tambang). Menurut Ragusa dan Madgwick (1990), batuan tambang dengan kandungan logam kurang dari 0.2% digolongkan sebagai batuan berkualitas rendah atau dapat digolongkan sebagai limbah batuan.

Data menunjukkan bahwa isolat bakteri mampu melakukan pelepasan logam Cu jauh lebih besar bila dibanding dengan kontrol, di mana pada kontrol hanya mampu dilepaskan lebih kurang 3%, sedangkan isolat mampu mencapai 6%. Hal yang sama juga terjadi pada pelepasan logam Zn dan Mn.

Ragusa dan Madgwick (1990) menyimpulkan bahwa mikroorganisme berhasil melarutkan logam-logam berat dan sulfida secara langsung melalui ketergantungan pada metabolisme atau secara tidak langsung dengan produk-produk dari metabolismenya. Dalam setiap sistem pelarutan logam di mana terdapat besi, suatu kombinasi dari serangan secara langsung dan tak langsung (secara kimia/tidak menggunakan enzim) terhadap sulfida dapat terjadi.

Pada pelarutan secara tak langsung hampir selalu melibatkan  $Fe^{3+}$  yang merupakan pengoksidasi yang kuat yang mampu mengoksidasi mineral/bijih sulfida (Fowler dan Crundwell, 1998). Ragusa dan Madgwick (1990) melaporkan bahwa oksidasi  $Fe^{2+}$  menjadi  $Fe^{3+}$  secara abiotik berlangsung amat lambat, sedangkan bakteri pengoksidasi besi dapat mengkatalis reaksinya dengan suatu faktor dari  $10^5$  sampai  $10^6$ .

Pada pelarutan secara langsung,  $Fe^{3+}$  tidak dilibatkan. Lebih lanjut Fowler dan Crundwell (1998) mengatakan bahwa bila logam sulfida bereaksi dengan asam maka akan membentuk hidrogen sulfida, di mana bakteri kemudian akan mengoksidasinya lebih lanjut menjadi sulfat.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Bakteri asidofilik pengoksidasi besi dan sulfur telah berhasil diisolasi dari sedimen ekosistem air hitam Kalimantan Tengah, dari 53 isolat yang ditemukan dipilih delapan isolat untuk dilihat aktivitasnya yaitu BB 179; OM 349; AH 41; TP 3; TB 23; TB 27; SI 188 dan NN 323. Kedelapan isolat tersebut diidentifikasi sebagai *Thiobacillus ferrooxidans*.
2. Isolat bakteri mempunyai kemampuan untuk mengoksidasi besi dan sulfur serta melarutkan logam Cu, Zn, dan Mn dari bijih sulfida berkualitas rendah.
3. Ditemukannya bakteri asidofilik pengoksidasi besi dan sulfur ini membuktikan potensi yang dimiliki oleh ekosistem air hitam lahan gambut Kalimantan Tengah yang harus dipelihara keberadaannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M. 1993. Hand Book of Microbiological Media. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida.

- Brock, T.D. And M.T. Madigan. 1991. Biology of Microorganisms (6<sup>th</sup> ed.), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 880p.
- Dunger, W. und H.J. Fiedler. 1989. Methoden der Bodenbiologie. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York. 432p.
- Erskini dan Budiyo. 1994. Penelitian leaching mikroba mineral sulfida daerah Sangkaropi Sulawesi Tenggara. *Majalah BPPT*. LVII: 1-19.
- Fowler, T.A and F.K. Crundwell. 1998. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: experiment with a controlled redox potential indicate no direct bacterial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10): 3570 – 3575.
- Handayani, S. 1997. The immobilization of soluble metals by bacterial walls. *Indon. Min. J.* 3(1): 31-36.
- Haris, A., B. Ciptodi dan Erskini. 1994. Bioleaching: Kajian aspek teknik, teknologis dan prospek pengembangannya. *Majalah BPPT*. LX: 94-106.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneat, J.T. Stanley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth edition. Williams and Wilkins. A Waverly Company, Maryland.
- Ingledeu, W.J. 1990. Acidophiles. In Edward C. (ed.). *Environmental Biotechnology. Microbiology of Extreme Environments*. Mc Graw-Hill, New York p: 33 – 53.
- Nagpal, S. 1996. A structured model for *Thiobacillus ferrooxidans* growth on ferrous Iron. *Biotech. Bioeng.* 53 (3): 310-319.
- Ragusa, S. and J. Madgwick. 1990. Acidophilic, iron oxidizing bacteria in mineral leaching. *Aust. J. Biotech.* 4 (2): 109 - 112.
- Santosa, D.A., A. Suwanto, R. Saraswati, M.T. Suhartono. 1998. Ekosistem Air Hitam (*Black Water Ecosystem*): Biodiversity makro dan mikro, Isolasi DNA *In Situ*, dan kloning shotgun gen penyandi ekstremozim. Laporan Riset Unggulan Terpadu V Dewan Riset Nasional, Jakarta.
- Sugio, T., S. Uemura, I. Makino, K. Iwahori, T. Tano, and R.C. Blake. 1995. Isolation and some properties of an Iron oxidizing bacterium *Thiobacillus ferro-oxidans* resistant to bisulfite ion. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (3): 435-438.
- Untung, S.R. 1999. Isolating *Thiobacillus ferrooxidans* from the Cikotok gold mine for leaching purposes. *Indon. Min. J.* 5 (2):54-60.
- Wood, D. and D.E. Rawlings. 1989. Bacterial Leaching and Biomining. In J. L. Mark (ed). *A Revolution in Biotechnology*. Cambridge. ISCU. New York.
-