

Potensi *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis* Menurunkan Kandungan Logam Fe dan Mn pada Air Asam Tambang

Potential of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* to Decrease Fe and Mn Level in Acid Mine Drainage

Rizqi Nadhirawaty*¹, Yus Santo², Dhany Achmad Wicaksono¹, Moza Ajeng Azilla¹,
Muhammad Reviand Ari¹, Rindiani Evitaningrum Wadthe Kaiya¹

¹ Program Studi Teknik Lingkungan, Institut Teknologi Kalimantan

² Program Studi Magister Teknik Lingkungan, Institut Teknologi Yogyakarta

*corresponding email: rizqi.nadhirawaty@lecturer.itk.ac.id

ABSTRACT

Acid mine drainage (AMD) with pH 2,56, also high concentration of Fe and Mn respectively 35 mg/L and 8,83 mg/L should be treated to prevent the pollution. AMD treatment can be done by adding bacteria. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* isolated from AMD sample using selective media agar. Each bacteria was added 5% and 10% to the 200 mL AMD sample separately. The result shows that the highest removal of Fe and Mn in AMD was 62.03% and 18.02% with 10% *B. cereus*. Meanwhile, with addition 5% *B. subtilis* shows the highest Fe and Mn removal respectively 41.91% and 16.79%. Therefore, these bacteria have potential to decrease Fe and Mn concentrations in AMD.

Keywords: Acid Mine Drainage, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, Fe, Mn

PENDAHULUAN

Air asam tambang (AAT) yang terbentuk akibat kegiatan pertambangan batubara memiliki karakteristik pH rendah (pH<6) dan mengandung logam yang sangat tinggi. Saat air asam tambang terbentuk dan masuk ke lingkungan, kondisi tersebut dapat mempengaruhi kualitas air dan tanah disekitarnya. Hal tersebut mengarahkan pada perlunya pengolahan air asam tambang agar tidak mencemari lingkungan (Said, 2014).

Air asam tambang yang mengandung logam berat pada konsentrasi tinggi bersifat beracun (beracun) bagi makhluk hidup. Selain kandungan logam yang tinggi, permasalahan AAT juga terletak pada tingginya kandungan senyawa sulfat didalamnya. Senyawa sulfat yang tinggi dapat ditandai dengan nilai pH air yang rendah (asam). Air asam tambang dapat menurunkan kualitas air permukaan akibat

pH yang tergolong asam, serta kandungan Fe dan Mn yang tinggi. Menurut Prianto et al., (2016), air asam tambang menjadi salah satu dampak penting dari kegiatan pertambangan karena dampaknya yang dapat melebihi umur operasional pertambangan, sehingga harus dikelola dengan tepat.

Salah satu cara untuk mengolah air asam tambang adalah dengan metode biologis seperti memanfaatkan mikroorganisme berupa bakteri. Bakteri dapat berperan sebagai pereduksi sulfat atau memiliki kemampuan untuk menurunkan konsentrasi logam berat (Fahrudin et al., 2014). Metode ini dapat menjadi salah satu cara yang efektif dan hampir tidak ada pengaruh sampingannya pada lingkungan. Disamping itu, metode ini tidak menghasilkan racun atau *blooming*, mudah implementasinya, serta tidak menggunakan biaya yang besar (Lewaru et al., 2012).

Bacillus cereus tergolong sebagai bakteri aerob fakultatif berbentuk batang yang berspora dan bersifat gram positif. *B. cereus* merupakan bakteri penyebab intoksikasi yang menyebabkan keracunan dengan gejala muntah dan diare. *B. cereus* mudah ditemukan di alam dan memiliki spora yang tahan terhadap stres lingkungan daripada sel vegetatifnya (Bottone, 2010). Strain *B.cereus* yang termasuk dalam golongan ini dapat tumbuh pada makanan dan mempunyai waktu inkubasi sejak tertelan sampai timbulnya gejala intoksikasi yang berkisar antara 8-16 jam. Adapun strain *B.cereus* yang dapat menimbulkan gejala muntah, bereproduksi toksin emetik dan mempunyai masa inkubasi yang lebih pendek, yaitu sekitar 1-5 jam. Toksin ini selain menyebabkan gejala muntah, terkadang juga dapat menyebabkan diare. Strain ini hampir selalu ditemukan pada makanan penyebab keracunan yang mengandung bahan dasar berupa nasi (Nababan, 2015). Meskipun tergolong sebagai bakteri penyebab keracunan, *B.cereus* mengandung senyawa asam amino yang dapat mendukung proses pengikatan koloid tersuspensi sehingga mampu mengikat logam Fe hingga 70% (Kurniawan et al., 2022; Selim & Rostom, 2018).

Bacillus subtilis juga merupakan salah satu mikroorganisme yang bisa digunakan untuk menyerap logam berat (Fe dan Mn) yang terkandung di air asam tambang. *B.subtilis* menghasilkan enzim katalase yang berfungsi untuk memecah zat berbahaya dalam sel. *B.subtilis* juga mampu menghasilkan enzim reduktase yang berfungsi untuk menurunkan kadar toksisitas logam berat. Logam berat akan diubah struktur kimianya menjadi bentuk yang tidak toksik (*bioavailable*) (Mastang, 2016).

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bersifat eksperimental dan dilakukan untuk mengetahui potensi

bakteri *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis* dalam menurunkan kandungan logam Fe dan Mn pada air asam tambang.

METODOLOGI

Pengujian Sampel Air Asam Tambang

Air Asam Tambang (AAT) diambil dari sebuah settling pond di kegiatan pertambangan batubara PT. X yang terletak di Kabupaten Kutai Kartanegara. Pengukuran pH, konsentrasi Fe dan Mn dalam air asam tambang, masing-masing dilakukan dengan mengikuti SNI 6989.11:2019, SNI 6989.4:2009, dan SNI 6989.5:2009.

Isolasi dan Regrowth Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* yang diisolasi dari sampel AAT menggunakan *selective media agar*, yakni *Bacillus Differentiation Agar* (merk Himeda). Media agar tersebut dibuat dengan mencampurkan 22 gr *Bacillus Differentiation Agar* ke dalam 1000 mL akuades, lalu dimasukkan ke dalam autoklaf dengan tekanan 15 lbs dan suhu 121°C selama 15 menit.

Sebanyak 9 mL *selective media agar* dalam cawan petri ditambahkan 1 mL sampel AAT, lalu didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian, dilanjutkan dengan pengamatan terhadap koloni bakteri yang tumbuh. Pada *Bacillus Differentiation Agar*, koloni *B.subtilis* memiliki warna kuning, sedangkan koloni *B.cereus* tidak berwarna (transparan). Masing-masing koloni bakteri sesuai warnanya, selanjutnya diinokulasi ke media miring (*selective media agar*) di tabung reaksi menggunakan metode streak, lalu diamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Sebanyak 3 ose bakteri diinokulasikan ke dalam tabung reaksi berisi 250 mL *nutrient broth* (merk Himedia) steril. Bakteri *B.subtilis* dan

Nadhirawaty, R., et. al.(2022) "Potensi *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis* Menurunkan Kandungan Logam Fe dan Mn pada Air Asam Tambang", Jurnal Agriment, 7(2).

B.cereus diinokulasikan ke dalam *nutrient broth* yang berbeda.

Setelah 13 jam sejak inokulasi ke dalam *nutrient broth* pada suhu ruang, dilakukan pengukuran *optical density* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Sebanyak 2 mL *nutrient broth* OD₆₀₀ dengan absorbansi 0,8 dimasukkan ke dalam 100 mL *nutrient broth* steril, lalu didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya, *nutrient broth* dimasukkan ke dalam centrifuge kecepatan 3500 rpm selama 18 menit. Supernatan dan pellet hasil sentrifugasi dipisahkan menggunakan kertas saring kasar. Pada penelitian ini terdapat dua supernatan yang dihasilkan, yaitu supernatan yang mengandung bakteri *Bacillus cereus* dan supernatan lainnya yang mengandung bakteri *Bacillus subtilis*.

Eksperimen Utama

Pada gelas beker berukuran 250 mL, dimasukkan sampel AAT dan supernatan yang mengandung bakteri sebanyak 5% dan 10% (volume/volume) dengan volume total uji sebanyak 200 mL. Kemudian, contoh uji diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 150 rpm selama 2 menit, lalu diaduk kembali dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit, serta didiamkan selama 30 menit. Parameter kandungan Fe dan Mn dianalisis dengan *atomic absorption spectrophotometer* (AAS), sedangkan pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter (merk *Hanna instrument*). Tahap ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, yaitu C1, C2, dan C3 untuk bakteri *B.cereus*, serta S1, S2, dan S3 untuk bakteri *B.subtilis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

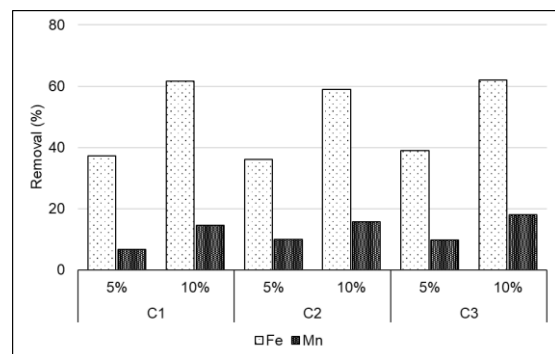
Adanya Fe³⁺, pyrite, dan oksigen dalam air membentuk ion Fe²⁺, senyawa sulfat (SO₄)²⁻, serta melepaskan ion H⁺.

Kehadiran sulfat dan hidrogen mengakibatkan nilai pH dalam air asam tambang menjadi rendah (asam) (Said, 2014). Karakteristik awal sampel air asam tambang PT. X (Tabel. 3.1) terdiri dari pH 2,56, serta kandungan Fe dan Mn masing-masing sebesar 35 mg/L dan 8,833 mg/L. Apabila dibandingkan dengan baku mutu AAT dalam Perda Kaltim No. 2 Tahun 2011, sampel AAT dari PT. X memiliki karakteristik kimia yang tidak memenuhi nilai baku mutu.

Tabel 1. Karakteristik Awal Air Asam Tambang

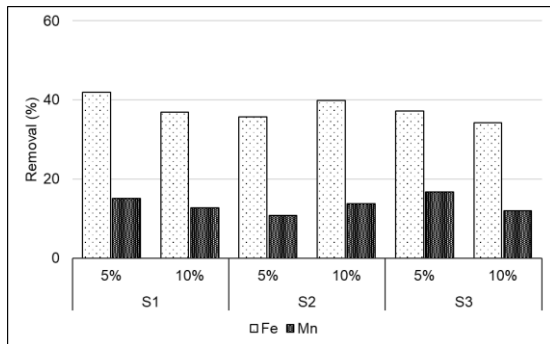
Parameter	Nilai	Baku Mutu*	Satuan
pH	2,56	6-9	-
Fe	35	7	mg/L
Mn	8,83	4	mg/L

*sumber: Perda Kaltim No. 2 Tahun 2011



Gambar 1. Penyisihan Fe dan Mn dalam air asam tambang setelah diberi *B.cereus*

Berdasarkan Gambar 1, bakteri *B.cereus* mampu menyisihkan Fe dan Mn dalam air asam tambang. Pada dosis 5%, pemberian bakteri *B.cereus* memiliki penyisihan Fe dalam air asam tambang berkisar 35,99 - 38,92% dan penyisihan Mn berkisar 6,58 - 10,00%. Adapun pada dosis 10%, pemberian bakteri *B.cereus* menunjukkan penyisihan Fe berkisar 58,96 - 62,03% dan penyisihan Mn berkisar 14,52 - 18,02%. Hasil ini menunjukkan penambahan *B.cereus* pada dosis 10% memberikan hasil removal Fe dan Mn yang lebih baik daripada dosis 5%.



Gambar 2. Penyisihan Fe dan Mn dalam air asam tambang setelah diberi *B.subtilis*

Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa bakteri *B.subtilis* juga mampu menyisihkan kandungan Fe dan Mn dalam air asam tambang, meskipun nilai penyisihannya lebih rendah daripada air asam tambang yang diberi bakteri *B.cereus*. Pada dosis 5%, pemberian bakteri *B.subtilis*, penyisihan Fe dalam air asam tambang berkisar 35,66 - 41,91% dan penyisihan Mn berkisar 10,79 - 16,79%. Adapun pada dosis 10%, pemberian bakteri *B.subtilis* menunjukkan penyisihan Fe berkisar 34,26 - 39,84% dan penyisihan Mn berkisar 11,97 - 13,79%. Hasil ini menunjukkan penambahan *B.subtilis* pada dosis 5% dan 10% tidak memberikan perbedaan besar terhadap removal Fe dan Mn, meskipun pada dosis 5% nilai removal Fe dan Mn tertinggi.

Menurut Vijayalakshmi & Raichur (2003), bakteri *B.cereus* dan *B.subtilis* memiliki permukaan yang bersifat hidrofilik, mengandung surfaktan, dan merupakan penyumbang elektron yang tinggi. Proses pengikatan koloid berlangsung sangat cepat, yakni sekitar 15 menit. Pada kondisi asam, permukaan bakteri dan koloid memiliki muatan yang berbeda. Kondisi tersebut mengakibatkan bakteri dan koloid menjadi saling berikatan.

Bakteri *Bacillus sp.* mengandung senyawa *carboxyl*, *hydroxyl*, dan *methoxyl* yang mendukung proses flokulasi. Kandungan OH, COOH, COO⁻ pada bakteri, serta H⁺ dan OH⁻ pada permukaan

partikel dapat membentuk rantai hidrogen saat bakteri berikatan dengan partikel. Kehadiran kation divalen seperti Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ dapat meningkatkan performa bakteri *Bacillus sp.* sebagai bioflokulan terutama bakteri yang tergolong *haloalkalophilic* (Zheng et al., 2008). Menurut Syed & Chinthala (2015), *B.cereus* dan *B.subtilis* yang diisolasi dari lahan garam memiliki kemampuan tinggi untuk menurunkan kontaminan logam dalam air. Hal ini juga dapat mengarahkan bahwa kedua bakteri tersebut dapat dikatakan sebagai *haloalkalophilic* karena ditemukan pada air dengan kandungan garam yang tinggi.

Namun, dalam penelitian ini *B.cereus* dan *B.subtilis* diisolasi dari air asam tambang yang memiliki pH rendah (pH 2.56). Hal tersebut didukung hasil penelitian Senouci-Rezkallah et al. (2011) yang menunjukkan bahwa *B.cereus* dapat beradaptasi dan tumbuh pada lingkungan yang asam. Kondisi tersebut sangat bergantung pada homeostasis sel dan kehadiran senyawa asam amino seperti *glutamate*, *arginine*, dan *lysine*. Dalam penelitian Nadhirawaty & Titah (2019), bakteri *B.subtilis* bersama bakteri *Acinetobacter lwoffii* mampu menurunkan kandungan Fe dan Mn dalam tanah masing-masing sebesar 87,10% dan 29%.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *B.cereus* lebih baik dalam menurunkan kandungan Fe dan Mn daripada *B.subtilis*. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Hashim et al. (2019) yang menunjukkan bahwa *B.cereus* memiliki potensi tinggi sebagai bioflokulan, sedangkan *B.subtilis* memiliki potensi yang terbilang menengah.

KESIMPULAN

Sampel air asam tambang memiliki pH rendah, serta kandungan Fe dan Mn yang melebihi baku mutu, sehingga perlu dilakukan pengolahan agar tidak

Nadhirawaty, R., et. al.(2022) "Potensi *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis* Menurunkan Kandungan Logam Fe dan Mn pada Air Asam Tambang", Jurnal Agriment, 7(2).

mencemari lingkungan sekitarnya. Bakteri *B.cereus* dan *B.subtilis* yang diisolasi dari air asam tambang memiliki potensi untuk menurunkan kandungan Fe dan Mn. Bakteri *B.cereus* memiliki kemampuan yang lebih baik daripada *B.subtilis*. Nilai removal Fe dan Mn tertinggi dalam air asam tambang diperoleh setelah menambahkan dosis sebesar 10%. Bakteri *B.cereus* memiliki nilai removal Fe dan Mn masing-masing sebesar 62,03% dan 18,02% pada dosis 10%. Bakteri *B.subtilis* memiliki nilai removal Fe dan Mn yang lebih rendah masing-masing sebesar 41,91% dan 16,79% pada dosis 5%.

DAFTAR PUSTAKA

- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 23, Issue 2, pp. 382–398). <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
- Fahrudin, Haedar, N., & Nafie, N. Ia. (2014). Perbandingan Kemampuan Sedimen Rawa dan Sawah Untuk Mereduksi Sulfat dalam Air Asam Tambang (AAT). *Jurnal Sainsmat*, 11(2), 135–142. <http://ojs.unm.ac.id/index.php/sainsmat>
- Kurniawan, S. B., Imron, M. F., Chik, C. E. N. C. E., Owodunni, A. A., Ahmad, A., Alnawajha, M. M., Rahim, N. F. M., Said, N. S. M., Abdullah, S. R. S., Kasan, N. A., Ismail, S., Othman, A. R., & Hasan, H. A. (2022). What compound inside biocoagulants/biofloculants is contributing the most to the coagulation and flocculation processes? *Science of the Total Environment*, 806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150902>
- Lewaru, S., Riyantini, I., & Mulyani, Y. (2012). Identifikasi Bakteri Indigenous Pereduksi Logam Berat Cr (VI) dengan Metode Molekuler di Sungai Cikijing Rancaekek, Jawa Barat. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan*, 3(4), 81–92.
- Mastang. (2016). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pengakumulasi Logam Berat Timbal (Pb) pada Endapan Sedimen Kanal Sekitar Rumah Susun Kota Makassar*. Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Nababan, E. (2015). *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum sanctum L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri Bacillus cereus*. Universitas Negeri Medan.
- Nadhirawaty, R., & Titah, H. S. (2019). Simultaneous bioaugmentation and biostimulation to remediate soil contaminated by ship dismantling in Bangkalan District, Indonesia. *Journal of Health and Pollution*, 9(24).
- Prianto, F. A., Fauzi, A. M., & Mansur, I. (2016). *Rekayasa Pengolahan Air Asam Tambang Secara Pasif Menggunakan Biomassa Serbuk Gergaji, Kotoran Ayam dan Bakteri Pereduksi Sulfat*. Institut Pertanian Bogor.
- Said, N. I. (2014). Teknologi Pengolahan Air Asam Tambang Batubara "Alternatif Pemilihan Teknologi." *Jurnal Air Indonesia*, 7(2), 119–138.
- Selim, K. A., & Rostom, M. (2018). Bioflocculation of (Iron oxide – Silica) system using *Bacillus cereus* bacteria isolated from Egyptian iron ore surface. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27(2), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2017.07.002>
- Senouci-Rezkallah, K., Schmitt, P., & Jobin, M. P. (2011). Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain. *Food Microbiology*, 28(3), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.003>
- Syed, S., & Chinthala, P. (2015). Heavy Metal Detoxification by Different *Bacillus* Species Isolated from Solar Salterns. *Scientifica*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/319760>

- Vijayalakshmi, S. P., & Raichur, A. M. (2003). The utility of *Bacillus subtilis* as a bioflocculant for fine coal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29(4), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00005-5)
- Zheng, Y., Ye, Z. L., Fang, X. L., Li, Y. H., & Cai, W. M. (2008). Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus* sp. F19. *Bioresource Technology*, 99(16), 7686–7691. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.068>