

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
 I. PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan Penelitian	6
1.3 Keterbaruan Penelitian	7
1.4 Tujuan Penelitian	13
1.5 Manfaat Penelitian	13
 II. TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI	 14
2.1 Tinjauan Pustaka	14
2.1.1 Sejarah Penambangan Emas, Perak dan Tembaga di Papua.....	14
2.1.2 Proses Pengolahan Bijih Yang Menghasilkan Limbah Tailing	16
2.1.3 Toksisitas Tembaga	20
2.1.4 Bakteri Resisten Tembaga dan Mekanisme Resistensi.....	24
2.1.4.1 Mekanisme Resistensi Melalui Akumulasi Tembaga di Dalam Sel.....	 25
2.1.4.2 Mekanisme Resistensi Melalui Transport Tembaga Keluar Sel	26
2.1.4.3 Mekanisme Resistensi Melalui Akumulasi Tembaga di Luar Sel	28
2.1.5 Bioremediasi	29
2.1.6 Biofilm	31
2.1.6.1 Material Pendukung Biofilm (<i>Supporting Material</i>)	36
2.1.6.2 Aplikasi Biofilm Dalam Bioremediasi Tembaga	37
2.1.7 Analisis Keragaman Bakteri	38
2.2 Landasan Teori.....	40
2.3 Hipotesis.....	44
 III. METODE PENELITIAN	 46
3.1 Alat dan Bahan	46
3.1.1 Alat	46
3.1.2 Bahan	46

3.1.2.1	<i>Tailing</i> (Sumber Isolat)	46
3.1.2.2	Media Untuk Pertumbuhan Bakteri	46
3.1.2.3	Bahan Kimia lain Untuk Penelitian	47
3.1.2.4	Bahan Untuk Uji Pembentukan Biofilm	47
3.2	Waktu dan Lokasi Penelitian	48
3.3	Tahap dan Cara Penelitian	50
3.3.1	Tahap Persiapan	50
3.3.2	Survey, Penentuan Lokasi Sampling, dan Sampling	50
3.3.3	Analisis Sifat Fisik dan Kimia Sampel Tailing	50
3.3.4	Analisis DNA Genom Bakteri Sampel Tailing	50
3.3.4.1	Ekstraksi DNA Genom Bakteri Sampel Tailing	51
3.3.4.2	Elektroforesis DNA Genom Bakteri Sampel Tailing	51
3.3.4.3	Analisis T-RFLP	52
3.3.4.3.1	Amplifikasi dengan PCR dan Digesti dengan Enzim Restriksi	52
3.3.4.3.2	Identifikasi Fragmen Produksi Digesti	53
3.3.4.3.3	Analisis Data T-RFLP	53
3.3.5	Analisis Mikrobiologi	53
3.3.5.1	Isolasi Total Bakteri (Total Plate Count/TPC)	53
3.3.5.2	Isolasi dan Seleksi Bakteri Resistensi Tembaga	54
3.3.5.2.1	Isolasi Bakteri Resistensi Tembaga	54
3.3.5.2.2	Seleksi Bakteri Resistensi Tembaga	55
3.3.5.2.2.1	Uji Resistensi Tembaga pada berbagai konsentrasi CuSO ₄	55
3.3.5.2.2.2	Uji Kemampuan Pembentukan Biofilm	55
3.3.5.2.2.2.1	Analisis Kualitatif Pembentukan Biofilm	56
3.3.5.2.2.2.2	Analisis Kuantitatif Pembentukan Biofilm	56
3.3.6	Uji Antagonis Antar Isolat Terpilih Dan Kemampuan Tumbuh Pada Ni, Pb, Cd, Al, Cr, Hg	57
3.3.6.1	Uji Antagonis antar Isolat Terpilih	57
3.3.6.2	Uji Kemampuan Tumbuh Bakteri Resistensi Tembaga pada Medium yang Mengandung Ni, Pb, Cd, Al, Cr dan Hg	57
3.3.7	Uji Kemampuan Isolat Bakteri Resistensi Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada Berbagai Suhu dan pH	58
3.3.7.1	Uji Kemampuan Isolat Bakteri Resistensi Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada Berbagai Suhu	58
3.3.7.2	Uji Kemampuan Isolat Bakteri Resistensi Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada berbagai pH	58
3.3.8	Deteksi Gen yang Mengkode Resistensi Bakteri terhadap Tembaga	58
3.3.8.1	Isolasi DNA Plasmid	58
3.3.8.2	Amplifikasi Gen Resistensi Tembaga	59
3.3.9	Seleksi Material Pendukung (Support Material) Biofilm Skala Laboratorium	60
3.3.10	Aplikasi Isolat Bakteri Resistensi Tembaga Pembentuk Biofilm Skala Laboratorium dan Analisis Kemampuan Akumulasi Tembaga pada Biofilm, Sitoplasma, dan Dinding Sel	61

3.3.11 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Resistan Tembaga dan Pembentuk Biofilm	62
3.3.11.1 Karakterisasi Fenotipik Isolat Terpilih	62
3.3.11.2 Identifikasi secara Molekuler Berdasarkan 16S rDNA	63
3.3.11.2.1 Isolasi DNA Genom Isolat Bakteri	63
3.3.11.2.2 Amplifikasi Gen 16S rDNA	64
3.3.11.2.3 Sequencing DNA	64
3.3.11.2.4 Analisis Filogenetik	64
3.3.12 Analisa Data Penelitian	65
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	66
4.1 Survey, Penentuan Titik Lokasi Sampling	66
4.2 Analisis Sifat Fisik dan Kimia Tailing	67
4.3 Analisis keragaman bakteri sampel tailing dengan metode T-RFLP	72
4.4 Hubungan antara Keragaman Bakteri dengan Sifat Fisik dan Kimia Tailing	85
4.5 Hasil Isolasi Total bakteri (TPC)	88
4.6 Hubungan antara Sampel, Sifat Fisik -Kimia Tailing dengan Total Bakteri Resistan Tembaga, dengan	89
4.7 Isolasi dan Seleksi Bakteri Resistan Tembaga Pembentuk Biofilm	91
4.7.1 Isolasi dan Purifikasi Bakteri Resistan Tembaga	91
4.7.2 Seleksi Bakteri Resistan Tembaga Pembentuk Biofilm	93
4.7.2.1 Uji Resistan Tembaga pada berbagai konsentrasi CuSO ₄	93
4.7.2.2 Uji Kemampuan Pembentukan Biofilm	98
4.7.2.2.1 Analisis Kualitatif Pembentukan Biofilm	98
4.7.2.2.2 Analisis Kuantitatif Pembentukan Biofilm	99
4.7.2.2.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm	103
4.8 Kajian Isolat Unggul	104
4.8.1 Uji Antagonis antar Isolat Terpilih	104
4.8.2 Pertumbuhan Bakteri Resistan Tembaga pada Medium yang Mengandung Berbagai Ni, Pb, Cd, Al, Cr dan Hg	107
4.8.3 Uji Kemampuan Isolat Bakteri Resistan Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada Berbagai Suhu dan pH	109
4.8.3.1 Uji Kemampuan Isolat Bakteri Resistan Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada Berbagai Suhu	109
4.8.3.2 Uji Kemampuan Isolat Bakteri Resistan Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada Berbagai pH	111
4.8.4 Deteksi Gen yang Mengkode Resistensi Bakteri terhadap Tembaga	114
4.8.4.1 Isolasi DNA Plasmid	114
4.8.4.2 Amplifikasi Gen CopA	116
4.9 Seleksi Material Pendukung (Supporting Material) Biofilm Skala Laboratorium	119
4.10. Aplikasi Isolat Bakteri Resistan Tembaga Pembentuk Biofilm Skala Laboratorium	123

4.10.1 Analisis Kemampuan Akumulasi Tembaga Pembentuk pada Biofilm, Sitoplasma, dan Dinding sel	123
4.10.2 Mekanisme Resistensi Isolat Bakteri Terhadap Tembaga	129
4.11 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Resistensi Tembaga dan Pembentuk Biofilm	131
4.11.1 Pewarnaan Gram	131
4.11.2 Visualisasi Morfologi Sel Menggunakan SEM	132
4.11.3 Karakterisasi Fenotipik Isolat Terpilih	133
4.11.4 Identifikasi Molekuler berdasarkan 16S rDNA	136
V. KESIMPULAN DAN REKOMENDASI	142
5.1 Kesimpulan	142
5.2 Rekomendasi	143
DAFTAR PUSTAKA	145
LAMPIRAN	164

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1 Penelitian terkait yang pernah dilakukan.....	8
Tabel 2.1 Resistensi Bakteri Terhadap Tembaga Disandi oleh Gen Kromosomal	24
Tabel 2.2 Resistensi Bakteri Terhadap Tembaga Disandi oleh Gen Plasmid	24
Tabel 4.1 Hasil Analisis Sifat Kimia dan Fisik Tailing	68
Tabel 4.2 Indeks diversitas berdasarkan profil T-RFLP menggunakan enzim restriksi <i>MspI</i> dan <i>BsuRI</i>	82
Tabel 4.3 Total Bakteri (TPC).....	88
Tabel 4.4 Hasil isolasi bakteri resisten tembaga pada medium yang mengandung berbagai konsentrasi CuSO ₄	92
Tabel 4.5 Uji MIC bakteri pada berbagai konsentrasi CuSO ₄ pada Medium Cair	93
Tabel 4.6 Hasil Uji Kuantitatif kemampuan pembentukan biofilm	100
Tabel 4.7 Uji Antagonis antar Isolat Bakteri Resistensi Tembaga	104
Tabel 4.8 Pertumbuhan Bakteri Resistensi Tembaga pada Medium LB Cair yang mengandung Ni, Pb, Cd, Al, Cr dan Hg	108
Tabel 4.9 Pembentukan biofilm oleh isolat pada berbagai material Pendukung	120
Tabel 4.10 Karakterisasi Bakteri Gram Negatif menggunakan API 20NE	134
Tabel 4.11 Karakterisasi Bakteri Gram Positif menggunakan API 50 CHB	135
Tabel 4.12 Family filogenetik terdekat isolat bakteri dari tailing Pertambangan Emas, Perak dan Tembaga	138

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Peta Lokasi Area PT Freeport Indonesia (PTFI, 2015)	14
Gambar 2.2 Proses Pengolahan Bijih Mineral (PTFI, 2015)	17
Gambar 2.3 Daerah Aliran Tailing PT. Freeport Indonesia (PTFI, 2015).....	19
Gambar 2.4 Mekanisme resistensi bakteri terhadap tembaga (Rensing dan Grass, 2003)	26
Gambar 2.5 Skema Pembentukan Biofilm (Cabarkapa <i>et al.</i> , 2006)	32
Gambar 3.1 Alur Penelitian	49
Gambar 4.1 Titik Lokasi Pengambilan Sampel	66
Gambar 4.2 Dendrogram Similaritas Komunitas Bakteri Berdasarkan Ukuran TRF pada Pemotongan dengan Enzim <i>MspI</i> dan <i>BsuRI</i>	74
Gambar 4.3 Prediksi Bakteri berdasarkan Database TRF	76
Gambar 4.4 Analisis Komponen Utama Hubungan antara Sifat Fisik Kimia Tailing dengan Keragaman Bakteri	86
Gambar 4.5 Analisis Komponen Utama Hubungan antara Sifat Fisik Kimia Tailing dengan Total Bakteri	90
Gambar 4.6 Uji kemampuan pertumbuhan EC38, FC40, JC41, HC43, EC45, CC53, IC61, FC62, DC66 dan BC67 pada Medium LB cair	94
Gambar 4.7 Hasil uji kualitatif pembentukan biofilm oleh isolat bakteri resisten tembaga	99
Gambar 4.8 Uji antagonis antar isolat resisten tembaga	106
Gambar 4.9 Uji Kemampuan Pertumbuhan Isolat Bakteri Resistensi Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada berbagai macam suhu	110
Gambar 4.10 Uji Kemampuan Pertumbuhan Isolat Bakteri Resistensi Tembaga dalam Pembentukan Biofilm pada berbagai macam pH	112

Gambar 4.11 Hasil isolasi DNA Plasmid	115
Gambar 4.12 DNA plasmid setelah diamplifikasi dengan primer Cop A	117
Gambar 4.13 Pembentukan biofilm isolat CC53 pada <i>Supporting Material</i> ...	119
Gambar 4.14 Akumulasi tembaga pada setiap fraksi sel	124
Gambar 4.15 Total Akumulasi Tembaga pada Isolat Terpilih	125
Gambar 4.16 Hasil Pewarnaan Gram Isolat Bakteri (Perbesaran 1000x)	132
Gambar 4.17 Visualisasi Morfologi sel Bakteri Menggunakan SEM.....	133
Gambar 4.18 Pohon filogenetik menunjukkan jarak evolusioner di antara bakteri resisten tembaga berdasarkan urutan gen 16rRNA. Jumlah pada setiap node adalah bootstrap dari 100 ulangan	137

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Komposisi dan cara pembuatan medium.....	164
Lampiran 2 Protokol UltraClean Soil DNA Kit.....	166
Lampiran 3 Komposisi bakteri pada sampel tailing hasil pemotongan enzim <i>MspI</i> dan <i>BsuRI</i>	167
Lampiran 4 Analisa ANOVA hasil T-RFLP	169
Lampiran.5 Analisa ANOVA Biofilm pada Berbagai Material Pendukung.....	171
Lampiran 6 Analisa ANOVA Akumulasi Tembaga pada Sitoplasma, Dinding Sel dan Biofilm	175