

UJIRESISTENSIBAKTERITERHADAP HgCl₂, YANG DIISOLASIDARI TANAH PENAMBANGAN EMAS DIPONGKOR, JAWABARAT¹ [Resistance Test of Bacteria Against HgCl₂ Isolated from Soil of Gold Mining in Pongkor, West Java]

Hartati Imamuddin

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Cibinong Science Center-LIPI, Jin Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong 16911
email: tatiklief@yahoo.com

ABSTRACT

Pollution of heavy metals mercury (Hg) is a serious problem especially in gold mining areas. This study aims to isolate the bacteria in the gold mining of Pongkor (West Java) and testing the bacterial resistance to mercury (Hg). The results showed that of the 5 isolates tested, qualitatively only 2 isolates (P3 and P5) that resistant to HgCl₂, each at a concentration of 30 and 40 ppm. Furthermore, up to 70 ppm concentration of HgCl₂, P5 bacteria can still grow well even require a longer time *lag phase* in period.

Key words: Mercury, bacteria resistant, HgCl₂, gold mining, Pongkor, West Java.

ABSTRAK

Pencemaran logam berat merkuri (Hg) merupakan masalah yang serius terutama pada daerah pertambangan emas. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri dari tanah penambangan emas di Pongkor (Jawa Barat), dan menguji daya resistensi bakteri terhadap merkuri (Hg). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dari 5 isolat yang diuji secara kualitatif hanya 2 isolat (P3 dan P5) yang resisten terhadap HgCl₂ masing-masing pada konsentrasi 30 dan 40 ppm. Selanjutnya sampai dengan konsentrasi HgCl₂ 70 ppm, bakteri P5 masih dapat tumbuh dengan baik meskipun memerlukan waktu yang lebih panjang dalam periode *lag phase*.

Kata kunci: Merkuri, bakteri resisten, HgCl₂, tambang emas, Pongkor, Jawa Barat.

PENDAHULUAN

Pencemaran logam berat yang berasal dari penggunaan bahan kimia di lahan pertambangan dapat menurunkan kualitas sumber daya alam dan produktivitas tanah. Beberapa logam berat merupakan unsur esensial seperti (Se, Cu, Zn, Ni, dan Mn) yang dibutuhkan sel dalam jumlah tertentu, tetapi jika tingkat konsentrasinya cukup tinggi, maka akan menyebabkan racun bagi organisme perairan dan juga manusia. Sedangkan pada logam berat non esensial dalam tingkat konsentrasi tertentu menjadi logam beracun bagi makhluk hidup di alam seperti Hg, Cd, As dan Pb (Darmono, 1995).

Konsentrasi logam berat yang tinggi akan menghambat pertumbuhan, mengubah morfologi, dan mengganggu metabolisme dari organisme secara invitro (Blaudez *et al.*, 2000). Oleh karena itu beberapa senyawa logam berat juga dimanfaatkan untuk mencegah pertumbuhan mikroba, insektisida, herbisida, dan sebagai disinfektan dengan konsentrasi tertentu. Beberapa mikroorganisme diketahui mempunyai mempunyai nilai batas ambang konsentrasi yang berbeda terhadap logam berat.

Merkuri adalah senyawa logam berat yang berasal dari sisa kegiatan industri yang dapat mengkontaminasi lingkungan. Selain itu Merkuri juga dapat dilepaskan di lingkungan melalui peristiwa alam atau antropogenik (Kiyono, dan Pan Hau, 2006). Logam berat ini banyak dipelajari karena dalam waktu yang panjang, merkuri dapat menyebabkan polutan yang berbahaya.

Salah satu usaha untuk detoksifikasi merkuri dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri resisten merkuri yang memiliki gen resisten merkuri, *mer operon* (Barkay *et al.*, 2003; Deckwer *et al.*, 2004). Mikroorganisme yang terdapat pada daerah tercemar merkuri umumnya tahan terhadap konsentrasi merkuri yang relatif tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian isolasi bakteri resisten merkuri dari tanah yang tercemar merkuri.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri yang resisten terhadap logam berat merkuri. Selanjutnya, dipelajari pola pertumbuhan isolat bakteri tersebut pada berbagai media yang mengandung merkuri (HgCl₂).

BAHANDAN METODA

Isolasi mikroba

Sampel tanah yang diambil pada lokasi penambangan emas tanpa ijin (peti) di Pongkor, Jawa Barat diencerkan secara berseri (10¹, 10² dan 10³) dengan aquadest steril. Sebanyak 50 ml larutan suspensi tersebut kemudian diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media selektif yaitu Nutrien Agar (NA) yang mengandung 10 ppm larutan HgCl₂. Komposisi media NA adalah ekstrak *beef* 3,0 g, peptone 5,0 g dan agar 15,0 g. Isolat bakteri yang diperoleh kemudian dimurnikan dan disimpan dalam media agar miring untuk pengujian selanjutnya.

Uji daya hambat HgCl₂ terhadap pertumbuhan bakteri

Uji daya hambat logam berat terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan pada 2 isolat-bakteri terpilih yang mampu tumbuh dengan baik pada media selektif. Biak murni bakteri terpilih ditumbuhkan pada 15 ml media Nutrien Broth (NB) di atas shaker pada suhu kamar hingga nilai OD media tersebut mencapai 0,5 pada panjang gelombang 436 nm. Sebanyak 0,5 ml larutan suspensi bakteri tersebut diteteskan pada cawan petri yang berisi media Muller Hinton (MH) dan diratakan dengan spatula steril. Komposisi media MH adalah *beef* infusio 2 g, acid casein peptone (H) 17,5 g, corn starch 1,5 g dan agar 17 g per 1 liter aquadest. Selanjutnya kertas uji (*disk blank*) dengan diameter 6 mm yang telah direndam selama 5 menit dalam berbagai konsentrasi larutan HgCl₂ diletakkan pada cawan petri di atas. Resistensi bakteri terhadap logam HgCl₂ ditandai dengan ada atau tidaknya zona bening disekeliling kertas uji. Semakin besar diameter zona bening semakin tinggi resistensi bakteri tersebut terhadap HgCl₂.

Uji pertumbuhan bakteri pada media yang mengandung HgCl₂ dengan sumber karbon dan nitrogen

Media yang digunakan untuk menguji pertumbuhan bakteri yang resisten terhadap HgCl₂ adalah Mineral Media (MM) dengan komposisi sbb: 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 0,05 g CaCO₃, 0,05 g MnSO₄, 0,05 g MgSO₄, 0,025 g FeSO₄·7H₂O dan 0,001 % ekstrak yeast dalam 1 liter aquades. Pada media tersebut

ditambahkan glukosa (0,1g) untuk sumber karbon, NaNO₃ (1g) untuk sumber N dan campuran glukosa dan nitrogen (Meyer, *et al.*, 1983). Bakteri yang mempunyai resistensi paling tinggi terhadap HgCl₂ ditumbuhkan pada media NB untuk mendapatkan suspensi bakteri dengan nilai 0,5 pada panjang gelombang 436 nm. Selanjutnya suspensi tersebut diinokulasikan ke media MM dengan komposisi seperti di atas. Selain itu bakteri tersebut juga ditumbuhkan pada media MM yang mengandung 5 ppm HgCl₂ untuk mengetahui pertumbuhan bakteri tersebut dengan media yang mengandung HgCl₂. Pertumbuhan bakteri diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 436 nm. (Prescott *et al.*, 2002)

Toksisitas HgCl₂ terhadap pertumbuhan bakteri

Uji toksisitas HgCl₂ terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media Luria Bertani (LB) pada berbagai konsentrasi HgCl₂ (0 sampai 70 ppm) (Horn *et al.*, 1994). Komposisi media LB adalah 10 g pepton; 5g yeast ekstrak dan 5 g NaCl dalam 1 liter aquadest. Sebanyak 3 ml isolat yang telah diinkubasi selama 24 jam (OD = 0,8) dalam media Nutrient Broth, diinokulasikan ke dalam 147 ml media cair Luria Bertani. Pertumbuhan bakteri diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 436 nm.

HASIL

Isolasi mikroba

Hasil isolasi mikroba dari 12 lokasi tanah yang diindikasikan tercemar logam berat (HgCl₂) menunjukkan bahwa jumlah koloni bakteri paling banyak ditemukan pada sample yang diisolasi dari lokasi P5 diikuti P2, P1 dan P3. Pada lokasi P4 dan beberapa lokasi lainnya koloni bakteri yang diperoleh pertumbuhannya berhenti pada hari ke 4. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semua isolat terisolasi pada ke empat lokasi di atas mampu tumbuh pada media NA padat yang mengandung 10 ppm HgCl₂ (Tabel 1.)

Uji daya hambat HgCl₂ terhadap pertumbuhan bakteri

Dari hasil seleksi awal dan pemurnian koloni isolat, diambil 2 isolat untuk diuji secara kualitatif yaitu isolat P3 dan P5 yang memiliki ciri-ciri koloni berbentuk bulat warna kuning dan warna coklat. Selanjutnya

Tabel 1. Hasil seleksi awal bakteri resisten merkuri dari tanah bekas tambang emas Pongkor

Sampel Tanah (•)	Jumlah koloni bakteri resisten HgCl ₂ CFU/ml x (10 ⁴)				
	Lama Inkubasi <i>Qam</i>				
	0	24	48	72	144
PI (lumpur sawah)	0	0	138	160	251
P2 (lumpur peti)	0	0	97,5	170	315,5
P3 (tailing dam)	0	0	96	111	235
P5 (air PETI)	0	0	737,5	909	1.161
P4 (air sungai)	0	0	0	tidak tumbuh	

(*) Sampel tanah diambil dari 12 lokasi.

Tabel 2. Uji Kualitatif Beberapa Isolat Resisten HgCl₂

Isolat	Konsentrasi HgCl ₂ (ppm)	Pembentukan Zona Bening pada Isolat		
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
P3	0	Tidak terbentuk clearing zone	Tidak terbentuk clearing zone	Tidak terbentuk clearing zone
	4			
	30	++	++	++
	35	++	++	++
	40	++	+++	++
	45	++	+++	+++
	50	++	+++	++
P5	0	Tidak terbentuk clearing zone	Tidak terbentuk clearing zone	Tidak terbentuk clearing zone
	1			
	40	++	-	++
	45	++	++	++
	50	++	++	++
	60	++	++	++

Keterangan: (+) Lingkaran Zona Bening Kecil (d=0,5-0,9 cm)
 (++) Lingkaran Zona Bening Sedang (d=1,00-1,4 cm)
 (+++) Lingkaran Zona Bening Besar (d=1,5-1,9 cm)

kedua isolat tersebut diuji daya hambatnya terhadap HgCl₂ dengan menggunakan metoda disk blank. Hasil uji daya hambat menunjukkan bahwa pada isolat P3 zona bening mulai terbentuk pada konsentrasi HgCl₂ sebesar 30 ppm sedangkan pada isolat P5, zona bening mulai terbentuk pada konsentrasi HgCl₂ 40 ppm (Tabel 2).

Uji pertumbuhan bakteri pada media dengan penambahan sumber karbon dan nitrogen yang mengandung HgCl₂

Dalam uji ini digunakan minimal media (MM) yang mengandung nitrat sebagai sumber Nitrogen (MN), glukosa sebagai sumber Karbon (MG) dan kedua sumber nitrat dan glukosa (MNG). Sebagai pembanding

digunakan minimal media yang tidak mengandung HgCl₂. Hasil uji pertumbuhan tersebut disajikan dalam Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Pertumbuhan isolat P5 pada berbagai media tumbuh tidak mengandung HgCl₂

Pengamatan Jam	Macam Media			
	MM	MG	MN	MNG
0	0.0090	0.0465	0.0000	0.0355
24	0.0054	0.1140	0.1641	0.2601
48	0.0066	0.1755	0.1817	0.3465
72	0.0292	0.1744	0.2057	0.3416
96	0.0252	0.1745	0.2262	0.3629
120	0.0143	0.1400	0.2135	0.3614
144	0.0104	0.1606	0.2028	0.2869
168	0.0448	0.2419	0.2802	0.386
192	0.006	0.1822	0.1619	0.2667
216	0.0043	0.1796	0.1736	0.2506
240	0.0198	0.1419	0.1471	0.2333

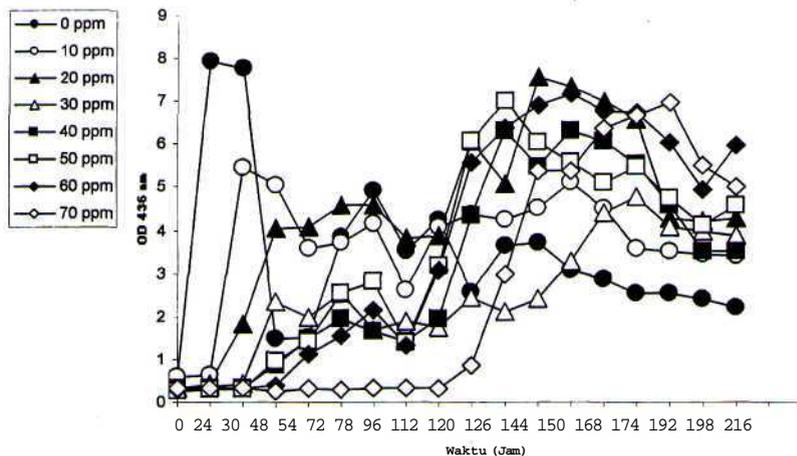
Tabel 4. Pertumbuhan bakteri resisten pada berbagai media tumbuh + 5 ppm HgCl₂

Pengamatan Jam	Macam Media			
	MM	MG	MN	MNG
0	0.0000	0.0385	0.0700	0.0940
24	0.0254	0.0593	0.1120	0.1373
48	0.0142	0.0713	0.1795	0.1290
72	0.0234	0.0737	0.1580	0.2259
96	0.0326	0.0807	0.1752	0.2335
120	0.0237	0.1752	0.2315	0.3429
144	0.0204	0.2249	0.2961	0.3665
168	0.0316	0.1762	0.1963	0.2757
192	0.0291	0.2452	0.2896	0.3826
216	0.0297	0.2469	0.2841	0.3612
240	0.0228	0.2331	0.2937	0.342

Pada semua jenis media yang tidak mengandung HgCl₂ bakteri P5 mencapai pertumbuhan tertinggi pada 168 jam waktu inkubasi. Pertumbuhan paling tinggi dicapai berturut-turut pada media MNG, MN, MG dan MM masing-masing pada nilai absorbansi 0,386, 0,280, 0,242 dan 0,045. Sedangkan pada media yang mengandung HgCl₂, pertumbuhan paling tinggi untuk masing-masing jenis media terjadi pada waktu inkubasi yang berbeda. Pertumbuhan tertinggi pada media MNG setelah 192 jam inkubasi dengan nilai absorbansi 0,383 dan berturut-turut pada media MN, MG dan MM masing-masing 144 jam dengan nilai absorbansi 0,296, 216 jam dengan nilai absorbansi 0,246 dan 96 jam dengan nilai absorbansi 0,032.

Uji Toksisitas HgCl₂ terhadap pertumbuhan bakteri

Uji toksitas HgCl₂ terhadap pertumbuhan bakteri P5 dilakukan pada media LB yang mengandung berbagai konsentrasi HgCl₂. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi HgCl₂, diperlukan waktu yang lebih lama untuk mencapai fase stasioner (Gambar 1). Selain itu pertumbuhan bakteri P5 pada media LB yang mengandung HgCl₂ dari 0 sampai 30 ppm menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama. Pola pertumbuhan yang mirip juga ditunjukkan pada media LB yang mengandung 40, 50 dan 60 ppm HgCl₂ dengan waktu inkubasi yang lebih lama untuk mencapai fase stasioner. Selanjutnya sampai dengan konsentrasi HgCl₂ 70 ppm, bakteri P5 masih



Gambar 1. Pertumbuhan isolat P5 pada media LB yang mengandung HgCl₂.

dapat tumbuh dengan baik meskipun memerlukan waktu yang lebih panjang dalam periode *lag phase*.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini jumlah koloni bakteri tertinggi yang diperoleh pada tanah di lokasi penambangan emas di daerah Pongkor, Jawa Barat lebih kecil dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan di daerah Cikotok, Jawa Barat yaitu rata-rata mencapai $0,25 \times 10^7$ - $13,2 \times 10^7$ (Hartati, 1996). Menurut Bibiana (1994), hanya isolat-isolat tertentu yang tahan terhadap cemaran logam berat dapat diisolasi dari tanah tercemar. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat P5 adalah isolat yang tahan terhadap cemaran Hg. Selanjutnya Smith *et al.* (1998) menambahkan bahwa perbedaan resistensi ini berhubungan dengan mekanisme respon populasi bakteri terhadap merkuri. Ada 3 mekanisme respon terhadap stres merkuri. Pertama, dengan cara menghambat metabolisme sel sehingga pertumbuhan sel lambat atau sel mati. Kedua, menginduksi sistem operon resisten merkuri untuk bekerja sehingga sel tetap hidup dalam kondisi stres. Ketiga, adanya plasmid yang mengandung gen resisten merkuri yang masuk ke dalam sel.

Pada uji kualitatif isolat resisten menunjukkan bahwa isolat P5 lebih tahan dibanding isolat P3 yang ditunjukkan dengan pembentukan zona bening yang mengindikasikan kepekaan mikroorganisme terhadap logam berat (HgCl_2). Selain itu, luasnya zona bening juga berkaitan dengan kecepatan berdifusi zat toksik dalam medium (Bibiana, 1994). Ini membuktikan semakin luas zona bening yang terbentuk semakin rentan isolat tersebut terhadap HgCl_2 .

Pertumbuhan isolat P5 pada media MM, MN, MG dan MNG yang mengandung HgCl_2 relatif lebih baik dibanding media yang tidak mengandung HgCl_2 . Hal ini menunjukkan bahwa penambahan HgCl_2 dapat memacu pertumbuhan bakteri resisten merkuri dengan atau tanpa penambahan sumber C dan N. Beberapa bakteri dapat menggunakan HgCl_2 sebagai sumber energi melalui 2 step reaksi. Reaksi pertama adalah akibat dari aktivitas enzim merkuri reduktase yang dapat mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Secara bersamaan terjadi oksidasi NADPH menjadi NADP. Reaksi yang ke dua adalah residu NADPH yang

teroksidasi via PMS (phenazine methosulfate) dan MTT (methyl thiazolyl blue) direduksi menjadi formazan yang larut dalam air (Canstein *et al.*, 1999). Pada perlakuan penambahan HgCl_2 , bakteri mulai tumbuh pada jam ke-48, hal ini terjadi karena lingkungan bakteri yang mengandung toksin menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga diperlukan waktu adaptasi lebih lama dibanding pertumbuhan bakteri pada kontrol. Pertumbuhan bakteri pada media MNG lebih baik dibanding dengan pertumbuhan pada media yang lain. Hal ini diduga karena pada media MNG mengandung nutrisi yang lebih lengkap yaitu glukosa sebagai sumber C dan nitrat sebagai sumber N.

Bertambahnya konsentrasi HgCl_2 dalam media dapat menyebabkan pertumbuhan bakteri terganggu walaupun media yang diberikan cukup nutrisi. Media Luria Bertani merupakan media yang sering digunakan untuk pengujian pertumbuhan bakteri pada media yang mengandung logam berat. Hal ini disebabkan karena media ini mengandung komposisi nutrisi yang lengkap, sehingga dapat menunjang kebutuhan pertumbuhan bakteri. Logam berat dalam media kadang dapat berikatan dengan komponen media dan mereduksi derajat logam berat. Penelitian Chang *et al.* (1993) tentang pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dalam media yang mengandung HgCl_2 menunjukkan bahwa hampir 30-40% merkuri (Hg^{2+}) membentuk kompleks dengan tryptone dan yeast extract.

Menurut Sumiarsih (2003), logam berat seperti Hg, Ag, Cu, Au dan Pb pada kadar rendah dapat bersifat racun (toksik) terhadap mikroorganisme, Walaupun demikian mikroorganisme mempunyai peran penting dalam mengubah efek racun dari logam berat dengan cara mereduksi ion dari elemen logam berat. Selain itu juga dapat mengubah merkuri dari anorganik menjadi organik melalui bioakumulasi di level tertentu (Madigan, 1997). Hal inilah yang diduga menyebabkan bakteri yang diisolasi dari daerah penambangan emas dapat tumbuh pada konsentrasi logam berat yang cukup tinggi.

KESEMPULAN

Diperoleh 2 isolat bakteri yaitu P3 dan P5 yang resisten terhadap HgCl_2 pada konsentrasi 30 dan 40 ppm. Pada media LB dengan konsentrasi HgCl_2 sampai

70 ppm P5 masih dapat tumbuh dengan OD = 4,3 pada jamke216.

UCAPAN TERMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh kegiatan DIPA-Tematik Pusat Penelitian Biologi-LIPI Tahun Anggaran 2008. Penulis sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Maharani, Nani, Ety dan Ary yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bibiana. 1994.** *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Raja Grafindo. Jakarta
- Barkay T, SM Miller and AO Summers, 2003.** Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystem. *FEMS. Microbiol. Rev.* 27, 355-384.
- Blaudez D, B Botton and M Chalot. 2000.** Effects of heavy metals on nitrogen uptake by mycorrhizal birch seedings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33, 61-67.
- Canstein Y. K Li, N Timmis, W-D Deckwer and I Wagner-Dobler. 1999.** Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. *App Environ Microbiol.* 65(12), 5279.
- Chang JS, J Hong, O Oa and Bh Oa. 1993.** Interaction of mercuric ions with the bacterial growth medium and its effects on enzymatic reduction of mercury. *Biotechnology Program* 9, 526-532.
- Darmono. 1995.** *Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup*. UI-Press, Jakarta.
- Deckwer WD, FU Becker, S Ledakowicz and LW Dobler. 2004.** Microbial removal of ionic mercury in three phase fluidized bed reactor. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1858-1865.
- Gusrizal dan Risa Noffiani. 2004.** Bakteri resisten merkuri spektrum sempit dari daerah bekas penambangan emas tanpa izin (PETI) Mandor, Kalimantan Barat. *Jurnal Natur Indonesia* 6(2), 67-74.
- Hassen A. N Saidi, M Cherif dan M Boudabous. 1998.** Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64, 7-15.
- Hartati. 1996.** Resistensi beberapa isolat bakteri terhadap logam berat. *Seminar Nasional Mikrobiologi Lingkungan II*. Bogor 9-10 Oktober 1996. Balitbang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- Horn JM, M Brunke, WD Deckwer and KN Timmis, 1994.** *Pseudomonas putida* strains which constitutively overexpress mercury resistance for bioremediation of organomercurials pollutants. *Applied Environ. Microbiol.* 60,357-362.
- Kiyono M and H Pan Hau. 2006.** Genetic engineering of bacteria for environmental remediation of mercury. *J. Health Sci.* 52, 199-204.
- Madigan MT, JM Martinko and J Parker. 1997.** *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International Inc., New Jersey.
- Meyer O and HG Schlegel. 1983.** Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Annual Review Microbiology* 37, 277-310.
- Pelezar MJ Jr, ECS Chan and FP Merna. 1986.** *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI-Press, Jakarta.
- Prescott H, P John and, KA Donald. 2002.** *Microbiology-Sixth Edition*. Me Graw Hill Companies, North America.
- Smith E, A Wolters and JDV Elsas. 1998.** Self-transmissible mercury resistance plasmids with gene mobilizing capacity in soil bacterial population: influence of wheat roots and mercury addition. *Appl. Environment Microbiology* 64, 1210-1219.
- Sumarsih. 2003.** *Diktat Kuliah Mikrobiologi Dasar*. Jurusan Ilmu Tanah-Fakultas Pertanian UPN Veteran, Yogyakarta.