

TULISAN PENDEK

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Untuk Agen Bioremoval Logam Berat Merkuri

Muhammad Badjoeri

Pusat Penelitian Limnologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Jakarta-Bogor
KM 46 Cibinong Bogor 16911. Telp: 021.8757071, Fax: 021.8757076,
E-mail: mbadjoeri@yahoo.com

Logam berat merkuri (Hg) salah satu dari jenis logam berat yang pada konsentrasi tertentu merupakan unsur pencemar berbahaya bagi kehidupan organisme dan berdampak negatif bagi kesehatan manusia (Wild 1995. *Soils and The Environment : An Introduction*. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain). Logam berat apabila terakumulasi di dalam tubuh organisme dapat menghambat kerja enzim sehingga proses metabolisme terganggu, bahkan dapat jadi pemicu dan penyebab alergi, mutagen, teratogen atau karsinogen bagi manusia (Vouk 1986. *General Chemistry of Metal. Handbook on the Toxicology of Metal*. Elsvier. New York). Kasus keracunan akibat pencemaran merkuri pertama kali dilaporkan terjadi di Minamata, Jepang pada tahun 1953 (Suhendrayatna 2001. *Bioremoval Logam Berat dengan Menggunakan Mikroorganisme : Suatu Kajian Kepustakaan*. Institute for Science and Technology Studies (ISTECS), Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Kagoshima University, Japan).

Beberapa jenis bakteri telah dimanfaatkan sebagai agen bioremoval

untuk menyerap logam berat yaitu, marga *Pseudomonas*, *Leptotrix*, *Klebsiella*, *Citrobacter* dan *Bacillus*. Di antara marga bakteri tersebut hanya marga *Pseudomonas* dan *Bacillus* paling resisten terhadap logam berat (Satchanska G. *et al.* 2005. *Microbial Diversity in Heavy-Metal Polluted Waters. Environmental Bioteknologi*. 19 (3): 61-67). Hasil penelitian Cheung & Dong-Gu (2005. *Chromate Reduction by Bacillus megaterium TKW3 Isolated from Marine Sediments. World Journal of Microbiology an Bioteknologi*. 21 (3): 213-219) melaporkan bakteri *Bacillus megaterium* strain TKW3 hasil isolasi dari sedimen air laut yang terkontaminasi logam berat mampu mereduksi logam berat khrom (Cr) dan resisten terhadap logam Cr, Se dan As secara *in vitro*. Beberapa jenis dari marga *Pseudomonas* seperti *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* dan *Pseudomonas fulva* telah dimanfaatkan dalam proses *bioremoval* logam merkuri (Hg) secara *in vitro*, bahkan senyawa logam berat lainnya seperti kadmium (Cd) dan timbal (Cu) (Wagner-Dobler *et al.* 2000. *Removal of Mercury from Chemical Wastewater by*

Microorganisms in Technical Scale. *Environmental Science*.34, Wong *et al.* 1993 Removal and Recovery of Cu (II) from Industrial Effluent by Immobilization Cells of *Pseudomonas putida* II-11. *Appl. Microbiol. Biotech.* 39: 127-131. dan De Jaysankaar 2004. Mercury-Resistant Marine Bacteria an Their Role in Bioremediation of Certain Toxicants. Thesis. National Institute of Oceanography of Goa University, India).

Bakteri pengakumulasi logam berat dapat digunakan sebagai sebagai agen bioremediasi untuk perlindungan tanah dan air terhadap pencemaran logam berat (Yuniarti *et al.* 2002. Koleksi, karakterisasi dan presevasi mikroba remediasi. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.97– 105).

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri yang diambil dari air dan sedimen di hilir Sungai Cisadane, Tangerang, Banten, pada tahun 2007. Pengambilan sampel dilakukan di tiga titik sampling yaitu Outlet limbah PT. Indah Kiat Tangerang yang masuk ke sungai, Bendungan Baru Cisadane dan Tanjung Burung yang lokasinya dekat muara sungai. Pengambilan sampel air dilakukan secara aseptik menggunakan botol steril sebanyak 250 ml, sedangkan sampel sedimen menggunakan *ekman grab*.

Sampel disimpan dalam kotak pendingin untuk selanjutnya di analisa di laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Hidrokimia Pusat Penelitian Limnologi LIPI Cibinong. Isolasi bakteri menggunakan metode *streak plate* dan

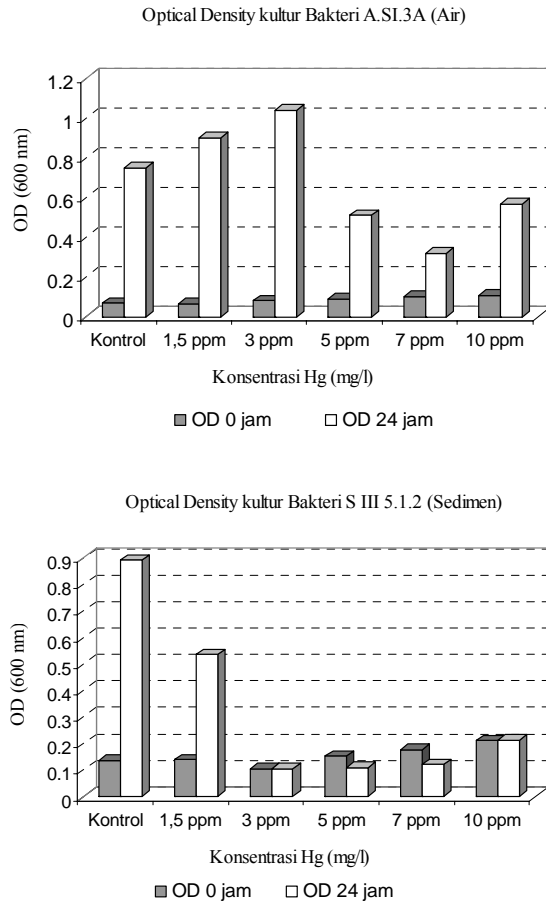
spread plate serta teknik pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-6} pada media *nutrien agar*, inkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (Cappuccino, JG & Sherman. N. 1996. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 4th. Ed. The Benjamin and Cumming Publishing Company Inc, California). Karakterisasi bakteri meliputi pengamatan morfologi sel bakteri, pewarnaan *Gram*, pengamatan mikroskopis (Rhodina AG. 1972. *Methods in Aquatic Microbiology*. University Park Press. Baltimore), dan uji resistensi bakteri terhadap logam berat.

Pengamatan morfologi koloni meliputi parameter warna, tepi, tipe dan permukaan koloni. Pengamatan sel menggunakan *preparat kering* dengan pewarnaan *Gram* pada mikroskop perbesaran 100 - 1000 kali dan identifikasi bakteri di lakukan di Lab. Balai Penelitian Penyakit Hewan Bogor (Balitvet-Bogor).

Uji viabilitas bakteri pada media *nutrient broth* yang mengandung logam Hg dengan konsentrasi 1,5 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm dan 10 ppm, isolat uji yang digunakan yaitu isolat *A.SI.3A* berasal dari sampel air dan isolat *SIII 5.1.2* berasal dari sample sedimen. Isolat di inkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam di suhu ruang. Pengamatan pertumbuhan bakteri dengan mengukur kerapatan optik (OD) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 600 nm, pada kultur dengan masa inkubasi 0 jam dan 24 jam.

Berhasil diisolasi bakteri sebanyak 4 isolat (dari air) dan 11 isolat (dari sedimen) (Tabel 1). Hasil isolasi

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Untuk Agen Bioremoval



Gambar 1. Uji viabilitas bakteri A.SI.3A dan S III 5.1.2 pada media yang mengandung logam berat merkuri

menunjukkan sedimen sungai merupakan sumber isolat yang lebih potensial untuk mendapatkan koleksi isolat bakteri. Hasil uji viabilitas bakteri A.SI.3A dan S III 5.1.2 pada media yang mengandung logam merkuri dengan berbagai konsentrasi menunjukkan bakteri uji mampu beradaptasi dan tumbuh pada media yang mengandung logam berat

merkuri sampai konsentrasi 10 ppm selama 24 jam (Gambar1).

Perbedaan komposisi dinding sel bakteri terhadap pewarnaan menyebabkan terjadinya reaksi warna yang berbeda. Bakteri akan memberikan reaksi *Gram positif* dikarenakan kandungan lipid pada dinding selnya rendah (1–4 %) dengan ketebalan dinding

selnya berkisar 15-80 nm, berlapis tunggal dan rentan terhadap gangguan fisik. Kandungan lipid dinding sel yang rendah menyebabkan sel mudah terdehidrasi, sehingga pada pembilasan dengan alkohol menyebabkan pori-pori dinding sel mengecil dan permeabilitasnya berkurang maka senyawa kompleks *Cristal violet-Yodium* tidak terekstraksi sehingga warna ungu dari *crystal violet* terperangkap di dalam dinding sel (reaksi Gram positif).

Bakteri *Gram negatif* memiliki kandungan lipid yang tinggi (11–22 %) dengan struktur dinding sel yang tipis (10–15 nm), berlapis tiga dan tahan terhadap gangguan fisik. Pembilasan dengan alkohol menyebabkan lipid terekstraksi sehingga pori-pori dinding sel memperbesar, sehingga senyawa kompleks *Cristal violet-Yodium* yang terbentuk dan memasuki dinding sel dapat diekstraksi dan warna ungu menjadi hilang dan tertinggal warna merah dari safranin di dalam dinding sel (reaksi Gram negatif), (Pelczar M.J. & E.C.S. Chan 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, alih bahasa Ratna SH. dkk. Penerbit UI Press, Jakarta).

Hasil isolasi bakteri yang didapatkan dari sampel air sebanyak 4 isolat sedangkan hasil isolasi bakteri yang didapatkan dari sampel sedimen 11 isolat. Hal ini diduga pengaruh kandungan oksigen di air yang cukup tinggi, sehingga bakteri yang dapat diisolasi dari sampel air hanya bakteri yang bersifat aerob obligat, sedangkan bakteri yang hidup di sedimen yang kandungan oksigennya rendah banyak ditemukan bakteri yang bersifat anaerob obligat, anaerob

fakultatif dan bakteri fermentatif. Selain itu di sedimen biasanya terjadi akumulasi bahan organik yang merupakan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari sedimen lebih banyak. Hal ini sesuai dengan penelitian Rheinheimer (1985. *Aquatic microbiology*. 3rd Ed. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. Chichester. 257 pp.) yang mengamati kelimpahan populasi bakteri nitrifikasi, dimana perbandingan kelimpahan populasi bakteri nitrifikasi di kolom air dengan di sedimen adalah 1: 2.

Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri melalui kerapatan optiknya (OD) memperlihatkan pertumbuhan isolat bakteri A.SI.3A (air) pada media dengan konsentrasi logam Hg 1,5 ppm (OD 0,901) dan Hg 3 ppm (OD 1,04) lebih tinggi dari pada kontrol (OD 0,747) hal ini menunjukkan isolat bakteri tidak mengalami penghambatan pertumbuhan, namun pada media dengan konsentrasi Hg 5 ppm (OD 0,51), 7 ppm (OD 0,32) dan 10 ppm (OD 0,507) terjadi penurunan pertumbuhan dan menunjukkan telah terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri oleh logam Hg. Sedangkan isolat bakteri S III 5.1.2 (sedimen), pertumbuhannya mengalami hambatan pada media yang mengandung Hg, namun demikian terlihat isolat bakteri S III 5.1.2 masih dapat tumbuh pada media yang mengandung Hg 10 ppm.

Uji viabilitas menunjukkan isolat bakteri A.SI.3A mempunyai kemampuan adaptasi dan daya tumbuh yang cukup baik pada media yang mengandung logam berat Hg. Menurut (Gaudy A. F & E.T. Gaudy 1981. *Microbiology for*

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Untuk Agen Bioremoval

Tabel 1. Hasil isolasi dan karakterisi isolat bakteri asal hilir Sungai Cisadane

Kode dan asal isolat	Karakterisasi koloni dan sel bakteri				Pewarnaan Gram dan bentuk sel
	Tipe	Warna/pigmen	Tepi	Permukaan	
A.SI.3A, air	<i>Irregular</i>	Tepi: bening kejinggaan Tengah: jingga	<i>Lobate</i>	<i>Umbonate</i>	Negatif, bacill
A.SII.3X, air	<i>Circular</i>	Tepi: bening Tengah: putih krem	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Positif, coccus
A.SII.3Y, air	<i>Circular</i>	Tepi: bening Tengah: bening	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Negatif, bacill
A.SIII.2, air	<i>Irregular</i>	Tepi: putih krem Tengah: bening	<i>Undulate</i>	<i>Convex</i>	Positif, bacill
S III.4.KCB, sedimen	<i>Circular</i>	Krem dan Mengkilat	<i>Lobate</i>	<i>Convex</i>	Negatif, coccus
S III.3.TB, sedimen	Rhizoid	Krem dan Mengkilat	Filamentous	<i>Convex</i>	Positif, bacill
S III.5.BBZ, sedimen	<i>Circular</i>	Pinggir bening, tengah pudar	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Positif, bacill
S III.5.AT, sedimen	<i>Irregular</i>	Pinggir bening, tengah putih dan mengkilat	<i>Lobate</i>	<i>Convex</i>	Positif, bacill
S I.5.A, sedimen	<i>Circular</i>	Krem dan tidak mengkilap	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>	Negatif, bacill
S III.3.TR, sedimen	<i>Circular</i>	Bening agak keputihan dan tidak mengkilap	<i>Undulate</i>	<i>Flat</i>	Negatif, coccus
S I.7*, sedimen	<i>Circular</i>	Pinggir bening, tengah putih dan mengkilat	<i>Entire</i>	<i>Flat</i>	Positif, coccus
S III.5.1.2(2) sedimen	<i>Irregular</i>	Putih dan mengkilat	<i>Undulate</i>	<i>Raised</i>	Positif, coccus
S II.5.1, sedimen	<i>Irregular</i>	Pinggir bening, tengah putih dan mengkilat	<i>Undulate</i>	<i>Convex</i>	Negatif, bacill
S III.5.1.2, sedimen	<i>Circular</i>	Pinggir bening, tengah putih dan mengkilat	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Negatif, bacill
S III.4.LB sedimen	Rhizoid	Pinggir koloni mengkilat, tengah bening	Filamentous	<i>Flat</i>	Positif, bacill

Tabel 2. Hasil uji biokimia isolat bakteri A.SI.3A yang diambil dari sampel air hilir Sungai Cisadane

Kode Isolat	Uji Biokimia	Hasil	Keterangan
A.SI.3A	Katalase	Positif (+)	Metode :
	Oksidase	Negatif (-)	Holt J. G. <i>et al.</i> 1994.
	Acid from glucose	Positif (+)	<i>Bergey's Manual of</i>
	Methyl Red	Negatif (-)	<i>Determinative</i>
	Voges Proskauer (VP)	Negatif (-)	<i>Bacteriology.</i> 9 th ed.
	Citrate	Positif (+)	Williams & Wilkins
	Nitrate reduction	Negatif (-) (gas)	428 East Preston
	Haemolysis (blood agar)	Positif (+)	Street. Baltimore.
	Growth at 45 °C	Positif (+)	USA.
	Arabinose	d Positif (+)	
	Glucose	Positif (+)	
	Manitol	d Positif (+)	
	Xylose	Negatif (-)	

Hasil identifikasi : *Bacillus megaterium*

Environmental scientist and Engineers. International Student Edition, McGraw-Hill International Book Company, Auckland. p 176-195). Bakteri yang telah lama hidup di lingkungan tercemar logam maka bakteri tersebut akan mampu beradaptasi terhadap cemaran logam. Kedua isolat uji bila dibandingkan terlihat bahwa isolat bakteri A.SI.3A mempunyai daya adaptasi dan daya tahan yang lebih baik dibanding isolat S III 5.1.2. Kemampuan adaptasi dan daya tahan mikroorganisme terhadap logam merkuri (Hg) berbeda-beda. Perbedaan ini berhubungan dengan mekanisme respon bakteri terhadap stress merkuri, dimana bakteri akan menginduksi sistem operon resisten merkuri untuk bekerja sehingga sel tetap hidup dalam kondisi stress dan adanya plasmid yang mengandung gen resisten merkuri di dalam sel (Smith E. *et al.* 1998 Self Transmissible Mercury Resistance *Plasmids with Gene Mobilizing Capacity in Soil Bactery Populations: Influence of Wheat Roots and Mercury Addition. Appl. Environment. Microbiol.* 64 : 1210-1219).

Bakteri mampu bertahan hidup pada lingkungan yang mengandung logam

merkuri dapat terjadi karena bakteri memiliki *mer operon* (gen resisten merkuri) (Silver S. & Phung L.T. 1996. Bacterial Heavy Metal Resistance: new surprises. *Annual. Rev. Microbiol.* 50: p753-789) namun setiap jenis bakteri mempunyai struktur *mer operon* berbeda. Umumnya struktur *mer operon* terdiri dari gen metaloregulator (*merR*), gen transport merkuri (*merT*, *merP*, *merC*), gen merkuri reduktase (*merA*) dan organomercuri liase (*merB*) yang berfungsi dalam mengkatalisis pemutusan ikatan merkuri-karbon sehingga dihasilkan senyawa organik dan ion Hg yang berupa garam tiol (De Jaysankar 2004. Mercury-resistant Marine Bacteria and Their Role in Bioremediation of Certain Toxicants. *Thesis*. National Institute of Oceanography Goa University. India).

Berdasarkan uji biokimia (tabel 2) menunjukkan isolat uji A.SI.3A adalah *Bacillus megaterium*.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka isolat bakteri *Bacillus megaterium* yang diambil dari perairan tercemar di hilir Sungai Cisadane dapat dijadikan sebagai isolat terpilih untuk agen bioremoval logam berat merkuri.