

Potensi *Chlorella* sp. sebagai Bioakumulator Logam Berat Kadmium

Ryan Widi Anggar Kusuma dan Enny Zulaika
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: ennyzulaika@bio.its.ac.id

Abstrak— Kadmium adalah logam beracun yang bersifat toksik dan dapat membahayakan makhluk hidup serta ekosistem perairan. *Chlorella* sp. memiliki kapasitas tinggi untuk mengikat logam berat seperti kadmium. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan hidup *Chlorella* sp., daya resistensi di media terpapar logam Cd, serta kemampuan bioakumulasi terhadap logam Cd. Tahap pertama pemeliharaan kultur *Chlorella* sp. dengan subkultur setiap 48 jam. Penentuan kurva pertumbuhan *Chlorella* sp. dengan mengukur densitas (OD) menggunakan spektrofotometer setiap 2 jam selama 24 jam. Selanjutnya Uji resistensi logam Cd dilakukan dengan kisaran konsentrasi CdCl_2 0-50 mg/L selama 24, 48, dan 72 jam. Uji bioakumulasi logam Cd oleh *Chlorella* sp. berdasarkan hasil uji resistensi (*range finding test*), yaitu 0, 5, 10, dan 15 mg/L Cd selama 24, 48, dan 72 jam. Data dianalisis secara deksritif kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Chlorella* sp. resisten terhadap logam berat Cd hingga konsentrasi 15 mg/L.

Kata Kunci—*Chlorella* sp., mg/L, Logam Cd, Resistensi.

I. PENDAHULUAN

MENINGKATNYA berbagai aktivitas manusia seperti kegiatan industri, pertambangan, teknologi komunikasi dan transportasi akan menyebabkan berbagai dampak termasuk dampak yang merugikan. Salah satu dampak yang merugikan bagi lingkungan dan manusia adalah pencemaran lingkungan oleh logam berat di perairan [1]. Kadmium (Cd) merupakan logam berat yang sangat toksik yang mungkin dapat terpapar di perairan [2].

Penghilangan logam berat dari limbah industri sangat penting bagi masyarakat sebagai upaya untuk mendaur ulang dan menghilangkan logam dari lingkungan, namun remediasi logam dengan metode fisika-kimia masih mahal dan tidak ramah lingkungan [3]. Teknik bioremoval logam berat dengan memanfaatkan fitoplankton atau mikroalga merupakan salah satu alternatif teknik bioremediasi di lingkungan perairan [4].

Beberapa penelitian tentang mikroorganisme khususnya mikroalga sebagai agen bioremediasi telah banyak dikembangkan. Pada strain *Chlorella* mampu hidup di media terpapar Cd^{2+} 11,24 mg/L [5]. Paparan Cd^{2+} 5 $\mu\text{mol/L}$ menghambat 50% pertumbuhan *Chlorella vulgaris* [6]. Pada mikroalga *Isochrysis galbana* mampu mengakumulasi 0,02 mg/g Cd^{2+} dari 1 mg Cd [7]. Pada *Planorhodium lanceolatum* mampu mengakumulasi Cd^{2+} 3,1 mg/L [7], sehingga mikroalga berpotensi sebagai bioakumulator logam kadmium termasuk *Chlorella* sp. Penelitian ini akan menguji

apakah kultur *Chlorella* sp. dari BBAP Situbondo mampu resisten terhadap logam Cd.

Sel *Chlorella* sp. berbentuk bulat atau bulat telur dan umumnya merupakan alga bersel tunggal (*unicellular*), meskipun kadang-kadang dijumpai berkelompok. Diameter selnya berkisar antara 2-8 μm , berwarna hijau, dan dinding selnya keras yang terdiri dari selulosa dan pektin, serta mempunyai protoplasma yang berbentuk cawan. *Chlorella* sp. dapat bergerak tetapi sangat lambat sehingga pada pengamatan seakan-akan tidak bergerak [8].

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian berlangsung dari bulan Desember 2013 - Maret 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS. Analisis logam kadmium dilakukan di Laboratorium Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya.

B. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat untuk mensterilisasi semua peralatan dari kontaminasi mikroorganisme lain. Alat non-gelas (batu dan selang aerasi) dicuci menggunakan air mengalir dan detergen, ditiriskan sampai kering. Selanjutnya alat non-gelas direndam dalam larutan kaporit 20 ppm (selama 24 jam). Selanjutnya dibilas dengan air tawar dan dikering anginkan [9].

Sterilisasi untuk alat gelas (pipet tetes, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, wadah kaca) dicuci dengan air mengalir dan detergen kemudian dikering anginkan. Selanjutnya alat gelas diautoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 30 menit [9].

C. Persiapan Media Untuk Kultivasi *Chlorella* sp.

Media untuk kultur *Chlorella* sp. menggunakan air tawar (pH netral) yang disaring dengan filter bag dan ditampung dalam wadah yang bersih dan tahan panas. Selanjutnya air tawar tersebut dipanaskan sampai mendidih (100°C) selama 5 menit, didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 1, filtrat ditampung ke dalam wadah kaca volume 250 ml [9].

Nutrisi kultur *Chlorella* sp. adalah pupuk Aqua-Walne dan vitamin (Tabel 1). Semua bahan nutrisi dilarutkan ke dalam akuades 1 L kemudian dipanaskan dengan suhu 60°C selama 15 menit, selanjutnya diautoklaf dengan suhu 120°C selama 30 menit [9].

Tabel 1.
Komposisi pupuk aqua-Walne dan vitamin

Komposisi Aqua-Walne	Jumlah	Komposisi Vitamin	Jumlah
NaNO ₃	100 gr	B ₁	100 mg
Na ₂ EDTA	45 gr	B ₁₂	5 mg
H ₃ BO ₃	33,6 gr		
NaH ₂ PO ₄	20 gr		
FeCl ₂	1,3 gr		
MnCl ₂	0,36 gr		

[9]

D. Pembuatan Larutan Stok CdCl₂

Larutan stok digunakan untuk persediaan larutan CdCl₂ sebagai bahan baku untuk pemaparan logam Cd. Larutan stok CdCl₂ 1000 mg/L dibuat dengan cara melarutkan 500 mg CdCl₂ ke dalam akuades steril dalam labu ukur volume 500 ml. Penyimpanan larutan stok CdCl₂ dilakukan pada suhu ruang. Untuk setiap perlakuan pemaparan CdCl₂ dihitung menggunakan persamaan (1), yaitu:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (1)$$

Keterangan:

C₁ : Konsentrasi yang diinginkan (mg/L)

V₁ : Volume larutan yang diinginkan (kultur *Chlorella* sp.)

C₂ : Konsentrasi larutan stok (mg/L)

V₂ : Volume konsentrasi larutan stok kadmium yang ditambahkan ke V₁

E. Kultivasi *Chlorella* sp. Untuk Perlakuan

Biakan *Chlorella* sp. diperoleh dari Balai Besar Penelitian Air Payau (BBAP) Situbondo dengan kepadatan awal (100×10⁴) sel/ml. Stok kultur *Chlorella* sp. dibuat dengan mencampurkan 100 ml biakan *Chlorella* sp. dan air tawar 400 ml ke dalam erlenmeyer volume 500 ml, kemudian ditambahkan pupuk aqua-Walne dan vitamin masing-masing 1 ml. Selanjutnya diletakkan di atas Rotary shaker 100 rpm, diinkubasi pada suhu ruang serta pencahayaan 12 jam menggunakan lampu TL 40 watt [7]. Setiap 48 jam dilakukan sub kultur untuk kontinyuitas kultivasi *Chlorella* sp [4].

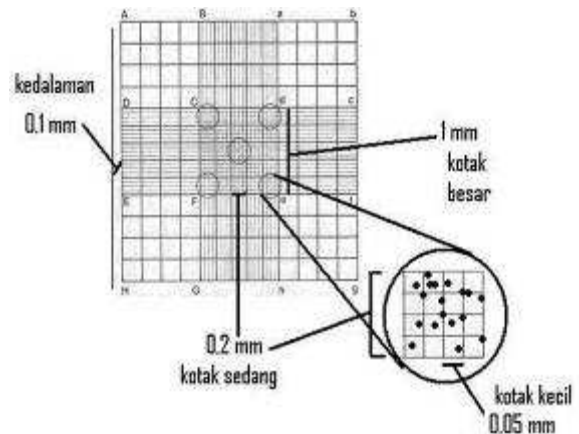
F. Kurva Pertumbuhan *Chlorella* sp.

Kurva pertumbuhan untuk menentukan umur perlakuan *Chlorella* sp. Pertumbuhan sel *Chlorella* sp. diamati dengan cara mengukur optical density (OD) pada 600 nm menggunakan spektrofotometer. Pengukuran dilakukan setiap 2 jam sekali dimulai dari jam ke - 0 sampai jam ke - 24. Umur inokulum ditentukan pada titik tengah (μ) fase eksponensial [4].

G. Uji Resistensi *Chlorella* sp.

Uji resistensi dilakukan untuk mencari *range finding test* untuk menentukan konsentrasi maksimal yang dapat ditolerir oleh *Chlorella* sp. Uji resistensi *Chlorella* sp. dilakukan pada wadah kaca volume 100 ml, inokulum didapatkan dari hasil kultivasi. Media kultur *Chlorella* sp. untuk uji resistensi mengandung pupuk aqua-Walne, vitamin, dan logam CdCl₂ berbagai konsentrasi dimulai dengan 0 mg/L sebagai kontrol; 2,5; 5; 7,5; 10 mg/L [10] kemudian konsentrasi ditingkatkan 12,5; 15 mg/L, 25 mg/L dan 50

mg/L. Kultur yang dipapar CdCl₂ diletakkan di atas *Rotary shaker* 100 rpm, diinkubasi pada suhu ruang serta pencahayaan 12 jam menggunakan lampu TL 40 watt [7]. Pengamatan jumlah kepadatan sel hidup dilakukan setelah kultur berumur 24 jam menggunakan *haemocytometer* dan mikroskop (Gambar 1.). *Haemocytometer* dibersihkan 1 ml kultur mikroalga *Chlorella* sp. ditetaskan di bidang pengamatan *haemocytometer*, penetesan harus hati-hati supaya tidak terjadi gelembung udara di bawah gelas penutup [8].



Gambar 1. Area perhitungan *haemocytometer* [8].

Chlorella sp. di area pengamatan yang berjumlah 5 atau disebut kamar R, dihitung jumlahnya dengan menggunakan *hand tally counter* baik yang mati ataupun hidup. Jika sudah didapatkan jumlah mikroalga maka untuk mengetahui jumlah mikroalga per 1 ml dengan menggunakan rumus persamaan yang disajikan pada persamaan (2) [11], yaitu :

$$\text{Jumlah sel/ml} = [(A+B+C+D+E) / 5] \times 4.10^6 \quad (2)$$

Keterangan :

A, B, C, D, E

:jumlah sel yang dihitung menggunakan *hand tally counter* tiap kamar R

5

:jumlah kotak yang diamati dalam kamar R

4.10⁶

:volume setiap kotak pengamatan *haemocytometer*

Resistensi *Chlorella* sp. dihitung dengan persamaan (3), yaitu :

$$[(a / b) \times 100\%] \quad (3)$$

Keterangan :

A : jumlah sel yang hidup

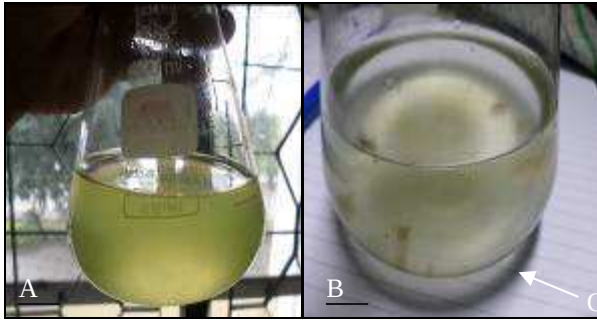
B : jumlah sel total (hidup & mati)

Konsentrasi yang mampu ditoleransi jika jumlah sel hidup > 50%

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Kultivasi *Chlorella* sp.

Kultivasi *Chlorella* sp. dilakukan untuk pemeliharaan kultur biakan yang berasal dari BBAP Situbondo. Menurut [4], pemeliharaan stok kultur *Chlorella* sp. dengan melakukan subkultur setiap 48 jam. Keberhasilan pemeliharaan stok kultur *Chlorella* sp. ditandai dengan kultur yang berwarna hijau sedangkan kultur yang mati ditandai dengan kultur yang memudar dan menjadi jernih (Gambar 2).

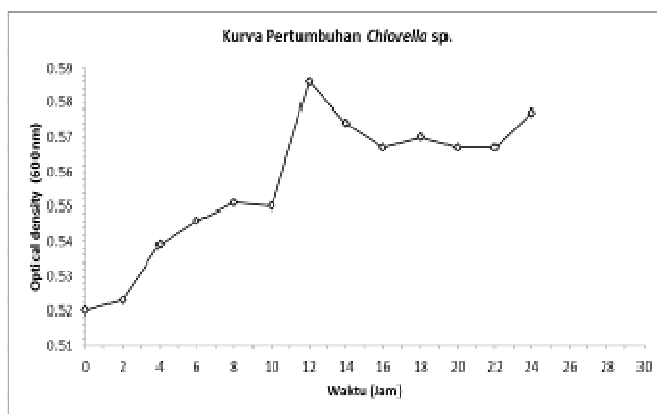


Gambar 2. Stok kultur *Chlorella* sp. (A. hidup, B. mati, C. *Chlorella* sp. mati yang menggumpal di dasar tabung kultur) (Dokumentasi Pribadi, 2014).

Sel induk *Chlorella* sp. dalam kisaran waktu 15 menit akan berubah menjadi sporangium yang berisi 2-4 autospora [12], selanjutnya lapisan dinding sel induk sporangium pecah dan 2-4 autospora dilepas, autospora kemudian akan membentuk sel vegetatif baru [13].

B. Kurva Pertumbuhan

Pengamatan kurva pertumbuhan digunakan untuk menentukan umur perlakuan. Pertumbuhan *Chlorella* sp. diamati dengan mengukur kekeruhan (*optical density*) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Kurva pertumbuhan *Chlorella* sp. dari jam ke – 0 sampai dengan jam ke – 24 ditampilkan pada (Gambar 3).



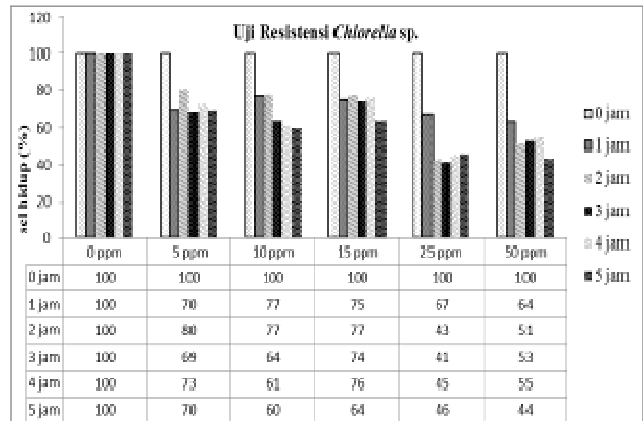
Gambar 3. Kurva pertumbuhan *Chlorella* sp.

Kultur *Chlorella* sp. mencapai fase eksponensial pada jam ke – 4 sampai dengan jam ke – 12. Berdasarkan gambar 4.3 di atas, umur inokulum perlakuan yang digunakan untuk uji resistensi dan bioakumulasi adalah 8 jam setelah kultur.

Kurva pertumbuhan *Chlorella* sp. diawali dengan fase adaptasi, dilanjutkan fase eksponensial, stasioner, dan diakhiri dengan fase kematian. Fase eksponensial ditandai dengan penambahan jumlah sel yang sangat cepat melalui pembelahan sel dan apabila dihitung secara matematis membentuk fungsi logaritmik [11].

C. Uji Resistensi *Chlorella* sp.

Uji resistensi dilakukan untuk mencari range finding test yang fungsinya untuk menentukan konsentrasi maksimal yang dapat ditolerir oleh *Chlorella* sp. Uji resistensi *Chlorella* sp. terhadap logam Cd dimulai dari konsentrasi 5 mg/L sampai dengan 50 mg/L. Hasil uji resistensi *Chlorella* sp. yang dipapar dengan logam Cd konsentrasi 0–50 mg/L bervariasi dari 44% - 100% (Gambar 4).



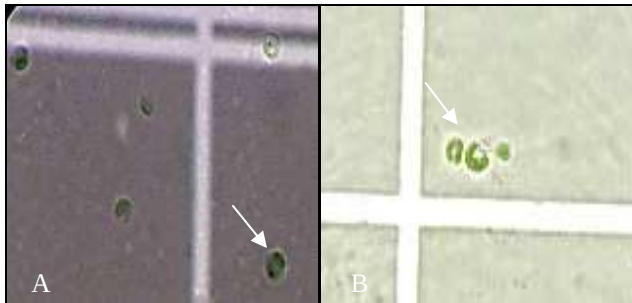
Gambar 4. Hasil uji resistensi *Chlorella* sp. pada paparan logam CdCl₂ dari 0 jam sampai 5 jam.

Pada konsentrasi 0 mg/L CdCl₂, persentase sel hidup mencapai 100 % dari jam ke – 0 sampai dengan jam ke – 5. Selanjutnya paparan konsentrasi CdCl₂ 5 mg/L, 10 mg/L dan 15 mg/L terjadi penurunan jumlah sel hidup *Chlorella* sp. hingga akhir pengamatan jam ke – 5. Hasil uji logam CdCl₂ sampai 15 mg/L menunjukkan persentase jumlah sel hidup di atas 50%, sehingga konsentrasi maksimal yang dapat ditolerir oleh *Chlorella* sp. supaya tetap hidup dan memungkinkan untuk digunakan sebagai agen bioremediasi adalah konsentrasi 15 mg/L CdCl₂. Range finding test yang akan diujikan adalah 0, 5, 10 & 15 mg/L CdCl₂.

Menurut Arunakumara dan Zhang, Cd merupakan logam berat yang dapat terakumulasi di dalam sel mikroalga, bersifat fitotoksik kuat, menghambat pertumbuhan dan bahkan dapat menyebabkan kematian [14]. Secara umum efek logam berat terhadap sel mikroalga adalah menghambat aktivitas enzim, misal enzim yang tersusun oleh asam amino cysteine gugus sulfhidrilnya akan tergantikan oleh ion logam Cd²⁺, sehingga enzim tersebut kehilangan aktivitasnya. Selain itu ion logam Cd²⁺ juga dapat mengacaukan reaksi redoks di dalam sel. Radikal bebas di dalam sel ROS (*reactive oxygen species*) yang dapat direduksi oleh enzim antioksidan menjadi tidak tereduksi sehingga enzim antioksidan akan mengikat ion logam Cd²⁺.

Menurut Carfagna, dkk., logam Cd mempunyai muatan ion positif sehingga ion Cd²⁺ akan berikatan dengan protein atau enzim di dalam sel yang bermuatan negatif [15]. Salah satu senyawa di dalam sel adalah protein atau enzim, jika ion logam berat Cd terikat dengan enzim atau protein maka hal tersebut akan mengganggu fungsi enzim atau protein. Mikroalga mempunyai mekanisme menanggulangi toksisitas logam berat di dalam sel termasuk logam Cd dengan cara sistem pertahanan menggunakan antioksidan, enzimatis dan non-enzimatis, yang dirancang untuk mengontrol konsentrasi radikal bebas (ROS). Protein termasuk enzim yang mengandung asam amino cysteine merupakan salah satu bentuk pertahanan mikroalga terhadap logam berat termasuk Cd. Protein cysteine berperan sebagai donor dan akseptor elektron. Cysteine merupakan protein yang berfungsi mengikat radikal bebas (ROS), namun kehadiran ion logam Cd²⁺ menyebabkan cysteine harus mengikat (ROS) dan ion logam Cd²⁺ bersamaan. Kehadiran ion logam Cd²⁺ dalam jumlah berlebihan di dalam sitoplasma sel *Chlorella* sp. menyebabkan keseimbangan (homeostasis) *Chlorella* sp. terganggu.

Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara induksi logam Cd terhadap produksi GSH yang mengandung tripeptida cysteine untuk mengikat logam berat yang masuk ke dalam sitoplasma sel *Chlorella* sp. Jika jumlah logam Cd yang diikat grup sulfhidril cystein berlebih akan menyebabkan sel terganggu dan akhirnya mati dengan bentuk tidak utuh, pecah (lisis), dan berwarna pudar (bening) tidak mengandung kloroplas seperti ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Bentuk sel *Chlorella* sp. yang dipapar logam CdCl_2 (A. Hidup, B. Mati) (Dokumentasi pribadi, 2014).

IV. KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian Potensi *Chlorella* sp. Sebagai Bioakumulator Logam Berat Kadmium adalah :

1. Mikroalga *Chlorella* sp. resisten terhadap logam Cd^{2+} sampai dengan konsentrasi 15 mg/L.
2. Mikroalga *Chlorella* sp. berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen bioremediasi logam berat kadmium di IPAL yang mengandung logam kadmium.
3. Data bioakumulasi logam kadmium oleh *Chlorella* sp. tidak ditampilkan

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis Ryan Widi mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Dr. Enny Zulaika yang telah meluangkan waktu, tenaga serta pikiran dalam penyusunan jurnal POMITS". Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada seluruh teman-teman seperjuangan *Tursiops truncatus* yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ahuja, S. 2009. "Overview, in Satinder Ahuja edition, Handbook of Water Quality and Purity 1st edition". Academic Press. New York.
- [2] Cotton, F.A. & Wilkinson, G. 1995. "Kimia Anorganik Dasar". UI Press. Jakarta.
- [3] Hashim, S.O., Delgado, O., Hatti, K.R., Mulaa, F.J. & Mattiasson, B. 2004. "Starch Hydrolyzing *Bacillus halodurans* Isolated From A Kenyan Soda Lake". Biotechnology. 26 (8): 23–828.
- [4] Monteiro, C.M., Castro, P.M.L. & Malcata, F.X. 2010. "Cadmium Removal by Two Strain of *Desmodesmus pleiomorphus* Cells". Water Air Soil Pollution. 208: 17-27.
- [5] Matsunaga, T., Takeyama, H.N.T. & Yamazawa, A. 1999. "Screening of Marine Microalgae for Bioremediation of Cadmium Polluted Seawater". Journal Biotechnology. 70: 33–38.
- [6] Ouyang, H., Kong, X, He, W., Qin, N., He, Q., Wang, Y. Wang, R. & Xu, F. 2012. "Effects of Five Heavy Metals at Sub-Lethal Concentrations on The Growth and Photosynthesis of *Chlorella vulgaris*". Chinnese Science Bulletin. 57 (25): 3363-3370.
- [7] Sbihi, K., Cherifi O., Gharmali A.E., Oudra, B. & Aziz. 2012. "Accumulation and Toxicological Effects of Cadmium, Copper And Zinc on The Growth and Photosynthesis of The Freshwater Diatom

- Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot: A laboratory study". Journal Material Environmental Science. 3 (3) 497-506.
- [8] Isnansetyo, A. & Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Fitoplankton dan Zooplankton Untuk Pembenihan Organisme Laut*. Kanisius. Jakarta.
- [9] Cahyaningsih, S., Muchtar, A.N.M., Purnomo, S.J., Pujiati, Kusumaningrum, I., Haryono, A. Slamet., Y;ulaeni, F., Ramadhan, F. & Bagus. 2006. *Petunjuk Teknis Produksi Pakan Alami*. Departemen Kelautan dan Perikanan Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Balai Budidaya Air Payau Situbondo.
- [10] Edris, G., Alhamed, Y. & Alzahrani, A. 2012. "Cadmium and Lead Biosorption by *Chlorella vulgaris*". Sixteenth International Water Technology Conference. Turkey. 16: 1-11.
- [11] Suminto. 2005. *Budidaya Pakan Alami Mikroalga dan Rotifer*. Universitas Diponegoro. Semarang.
- [12] Klockova, T.A. & Kim, G.H. 2005. "Ornamented Resting Spores of a Green Alga, *Chlorella* sp., Collected from the Stone Standing Buddha Statue at Jungwon Miruksazi in Korea". Algae. 20 (4): 295-298.
- [13] Manisha, S.C.A. 2007. "Growth, Survival and Reproduction in *Chlorella vulgaris* and *Chlorella variegata* with Respect to Culture Age and Under Different Chemical Factors". Folia Microbiology. 52 (4), 399-406.
- [14] Arunakumara, K. K. I. U. & Zhang, X. 2008. "Heavy Metal Bioaccumulation and Toxicity with Special Reference to Microalgae". Journal Ocean University Chinesse. 1 (7): 25-30.
- [15] Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S. & Vincenza, V. 2013. "Physiological and Morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiana* 211-8K (*Chlorophyceae*)". SpringerPlus. 2: 147.