

# Viabilitas *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada Medium yang Terpapar Logam Kromium (Cr)

Adisya P. N. Sari dan Dr. Enny Zulaika, MP.

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

*e-mail:* enny@bio.its.ac.id

**Abstrak**— Kromium (Cr) tergolong logam berat yang dapat masuk ke lingkungan melalui limbah industri sehingga mencemari lingkungan. Telah diketahui terdapat bakteri resisten Cr yang diisolasi dari limbah yang mengandung logam Cr. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui resistensi dan viabilitas *Bacillus* yang tercekam Cr. Uji resistensi *Bacillus* dilakukan pada medium *nutrient agar* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L. Uji viabilitas *Bacillus* dilakukan pada 3 isolat yang dipilih dari uji resistensi. Isolat tersebut dikategorikan lebih resisten dari isolat yang lain. Uji viabilitas dilakukan pada media *nutrient broth* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  50, 100, dan 150 mg/L. Kepadatan sel diukur dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 600 nm selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan isolat *Bacillus* resisten pada medium *nutrient agar* yang mengandung logam Cr pada konsentrasi  $\leq 250$  mg/L. Pola pertumbuhan isolat *Bacillus* yang tercekam logam Cr relatif lebih rendah dibandingkan kontrol. Semakin tinggi konsentrasi Cr yang digunakan, semakin rendah pola pertumbuhan *Bacillus*.

**Kata Kunci**—*Bacillus*, kromium (Cr), resistensi, viabilitas.

## I. PENDAHULUAN

LOGAM berat adalah suatu istilah yang digunakan untuk sekelompok logam dan metaloid dengan densitas atom lebih dari  $5\text{g/cm}^3$ , sebagian besar bersifat toksik, tidak dapat didegradasi [1], sehingga selalu ada di lingkungan dalam keadaan persisten [2]. Salah satu logam berat yang berbahaya adalah kromium (Cr) [3], walaupun Cr dalam konsentrasi yang rendah [4].

Sebagian besar introduksi kromium ke lingkungan diakibatkan oleh kegiatan antropogenik. Kromium telah banyak digunakan dalam berbagai macam industri, seperti industri penyamakan kulit, *electroplating* [5], serta industri cat dan tekstil [6]. Penggunaan kromium yang semakin meluas dan tidak diimbangi dengan pengolahan limbah industri yang baik menyebabkan limbah industri yang mengandung kromium akan dilepas begitu saja ke lingkungan [2], sehingga dapat mencemari lingkungan.

Beberapa bakteri resisten terhadap kromium, di antaranya *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, dan *Thermus* [7]. Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam Cr antara lain melalui mekanisme reduksi Cr (VI) ekstraseluler dan intraseluler, pengurangan penyerapan melalui jalur sulfat, dan pompa Cr(VI) [8]. Bakteri anggota genus *Bacillus* dapat melakukan *bioremoval* terhadap logam

Cr dengan menurunkan valensi dari Cr VI menjadi Cr III sehingga toksisitas logam Cr tersebut menjadi berkurang [5].

Merkuri dan kromium adalah logam berat yang bersifat toksik walaupun dalam konsentrasi sangat rendah [9]. Isolat *Bacillus* merupakan bakteri yang diisolasi dari Sungai Kalimas Surabaya, telah diketahui merupakan bakteri resisten merkuri [10], dan secara enzimatis mampu menurunkan kadar merkuri dari media kulturnya [11]. Selain itu, isolat tersebut juga diketahui resisten terhadap logam Hg, Cd, Pb, dan Cu [12]. Isolat *Bacillus* belum diketahui resistensi dan viabilitas ketika tercekam logam Cr sehingga diharapkan isolat *Bacillus* juga resisten terhadap kromium.

## II. METODOLOGI PENELITIAN

### A. Uji Resistensi Isolat *Bacillus* Terhadap $K_2Cr_2O_7$

Isolat *Bacillus* umur 24 jam dengan kode S1, S6, SS19, DA11, A6, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol ditumbuhkan di pada media *nutrient agar*- $K_2Cr_2O_7$  dengan metode *continue streak plate*. Konsentrasi  $K_2Cr_2O_7$  yang digunakan adalah 0.1 ppm. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap  $K_2Cr_2O_7$ . Uji resistensi dilanjutkan dengan konsentrasi Cr 50 mg/L sampai 300 mg/L. Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap logam Cr.

### B. Uji Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam $K_2Cr_2O_7$

Satu ose isolat diinokulasi secara aseptis ke dalam 20 ml media *nutrient broth* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi 50, 100, dan 150 mg/L dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Sebanyak 20 ml kultur ditambahkan ke dalam 180 ml media *nutrient broth* dengan konsentrasi Cr 50, 100, dan 150 mg/L dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Kepadatan sel diukur *optical density* (OD)nya dengan spektrofotometer *UV-Vis* ( $\lambda = 600$  nm). Pengukuran OD dilakukan setiap setengah jam dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-4, setelah jam ke-4 dilakukan pengukuran setiap 2 jam. Data pengukuran OD ditampilkan dalam bentuk kurva dengan sumbu x sebagai waktu pengukuran dan sumbu y sebagai nilai OD yang didapat.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Resistensi dan Bacillus Terhadap  $K_2Cr_2O_7$

Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui kemampuan resistensi isolat *Bacillus* pada medium yang mengandung logam berat Cr. Hasil uji resistensi menunjukkan bahwa isolat dapat tumbuh pada medium yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  sampai dengan konsentrasi 300 mg/L. Semua isolat dapat tumbuh dengan baik karena pertumbuhan koloni mengikuti pola *streak* yang dibuat secara penuh (Tabel 1).

Tabel 1.  
Resistensi *Bacillus* Terhadap  $K_2Cr_2O_7$

Isolat <i>Bacillus</i>	Pertumbuhan isolat <i>Bacillus</i> spp. pada medium yang mengandung $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)						
	0.1	50	100	150	200	250	300
A6	+++	+++	+++	++	++	+	+
DA11	+++	+++	+++	++	++	++	++
S1	+++	+++	+++	++	++	++	++
S6	+++	+++	+++	++	++	+	+
SS19	+++	+++	+++	++	++	++	++
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++

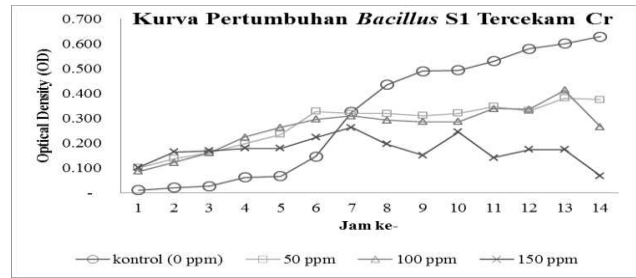
Koloni *Bacillus* dapat tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung logam Cr pada konsentrasi  $\leq 100$  mg/L, dan kemampuan pertumbuhan koloni isolat *Bacillus* mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya konsentrasi logam Cr dalam medium. Koloni *Bacillus* tumbuh cukup baik pada konsentrasi 150 - 300 mg/L, kecuali koloni isolat A6 dan S6 yang tumbuh kurang baik pada konsentrasi 250 dan 300 mg/L.

Mekanisme resistensi *Bacillus* diatur oleh operon *chrA1* dan gen *chrA* yang diduga merupakan transpoter Cr(VI). Operon *chrA1* dan gen *chrA* telah diketahui merupakan *inducible genes*, yaitu gen yang akan terekspresi dalam kondisi tertentu. Adanya penambahan Cr ke dalam medium pertumbuhan menyebabkan aktifnya gen *chrA*. Ekspresi dari kedua gen tersebut adalah suatu protein transporter (*chrA1*) yang dapat mengeluarkan kromat dari dalam sel menggunakan *proton-motive force* sehingga *chrA1* bertanggung jawab terhadap sifat resistensi *Bacillus* terhadap Cr [13].

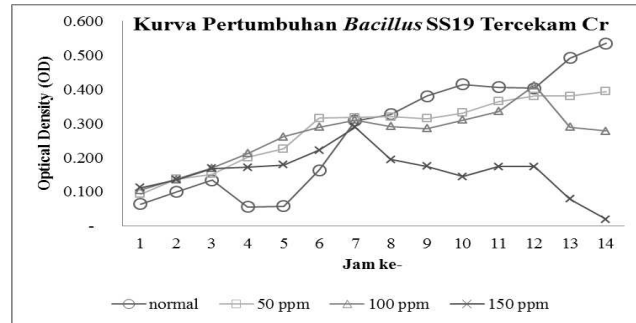
Berdasarkan hasil uji resistensi tersebut dipilih tiga isolat yang lebih resisten dibandingkan isolat lain, yaitu *Bacillus* S1, SS19 dan DA11. Konsentrasi  $K_2Cr_2O_7$  yang dipilih (*range finding test*) adalah tiga konsentrasi di bawah konsentrasi maksimal, yaitu 50, 100, dan 150ppm.

B. Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam  $K_2Cr_2O_7$

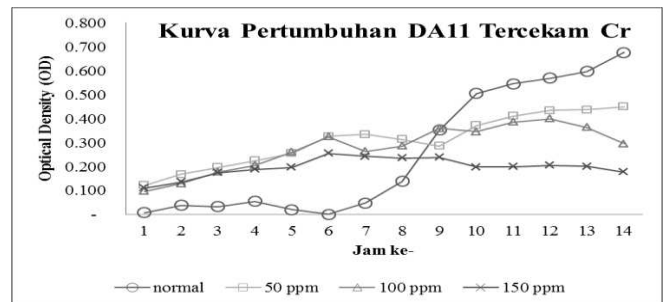
Pola pertumbuhan *Bacillus* yang tercekam logam Cr digunakan untuk mengetahui daya hidup isolat uji pada media *nutrient broth* yang terpapar logam  $K_2Cr_2O_7$  dengan konsentrasi 50, 100, dan 150 mg/L. Daya hidup isolat uji dapat dilihat dari pola pertumbuhan pada Gambar 1 sampai Gambar 4.



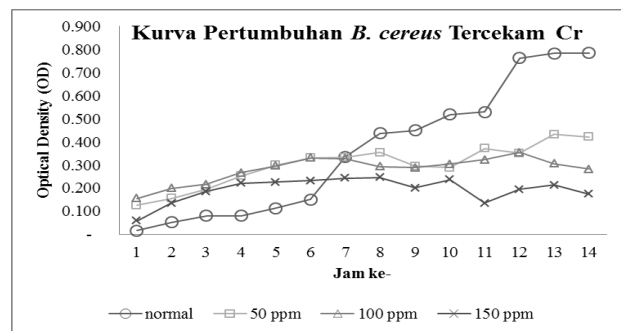
Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Bacillus* S1



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Bacillus* SS19



Gambar 3. Kurva pertumbuhan *Bacillus* DA11



Gambar 4. Kurva pertumbuhan *Bacillus cereus* ATCC 1178

Berdasarkan pola pertumbuhan pada Gambar 1 sampai 4, isolat *Bacillus* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama. Pertumbuhan semua isolat yang tercekam logam lebih rendah dibanding kontrol (media tanpa logam). Semua isolat menunjukkan pola pertumbuhan yang relatif rendah pada konsentrasi 150 mg/L dibanding konsentrasi 50 dan 100 mg/L.

Secara umum tidak terjadi fase lag pada kurva pertumbuhan masing-masing kultur *Bacillus* yang tercekam logam. Kurva pertumbuhan semua kultur langsung memasuki fase log sejak pengukuran OD jam ke-0. Isolat *Bacillus* yang digunakan telah diuji resistensinya terhadap logam Cr, dengan hasil uji semua isolat *Bacillus* mampu tumbuh dengan baik pada media *nutrient agar* 300 mg/L (Tabel 1), sehingga semua isolat ketika dikultur pada medium *nutrient broth* yang mengandung Cr dengan

konsentrasi di bawah 300 mg/L tidak perlu lagi beradaptasi dan langsung memasuki fase log.

Kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* yang tercekam logam Cr menunjukkan nilai OD paling tinggi berkisar 0,4, baik S1, SS19, DA11, maupun *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol. Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai OD isolat *Bacillus* yang dikultur pada medium tanpa penambahan logam Cr, dengan nilai OD 0,5 – 0,7. Nilai OD juga semakin lebih rendah seiring meningkatnya konsentrasi logam Cr yang ditambahkan dalam medium. Penurunan nilai OD paling signifikan terlihat pada kultur yang ditumbuhkan pada medium *nutrient broth* yang mengandung Cr konsentrasi 150 mg/L. Kultur yang ditumbuhkan dalam medium *nutrient broth* yang mengandung  $K_2Cr_2O_7$  konsentrasi 50 dan 100 mg/L hampir tidak berbeda, antara kultur S1, SS19, DA11, dan *B. cereus* ATCC 1178 sebagai control positif. Hal ini menunjukkan bahwa logam  $K_2Cr_2O_7$  pada konsentrasi 50, 100, dan 150 mg/L memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan isolat *Bacillus*.

Semua kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* yang terpapar kromium menunjukkan pola pertumbuhan yang lebih rendah dibanding kontrol. Adanya perbedaan pola pertumbuhan antara kultur yang ditumbuhkan pada medium tanpa logam Cr dengan kultur pada medium yang ditambah logam Cr mengindikasikan efek toksik Cr terhadap pertumbuhan sel terjadi selama 24 jam masa inkubasi [14]. Efek toksik tersebut berkaitan dengan adanya perubahan materi genetik dan reaksi fisiologis serta metabolisme *Bacillus*. [15]-[14]. Mikroorganisme yang terpapar kromium dalam jangka waktu lama dapat menurunkan diversitas mikrobia, populasi, dan aktivitas mikroorganisme tersebut [16].

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

- 1) Isolat *Bacillus* S1, SS19, dan DA11 resisten terhadap kromium pada media *nutrient agar*-kromium konsentrasi  $\leq 250$  ppm.
- 2) Pola pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19, DA11 dan *Bacillus cereus* yang ditumbuhkan di medium *nutrient broth* tanpa  $K_2Cr_2O_7$  relatif lebih tinggi dibandingkan pola pertumbuhan *Bacillus* yang ditumbuhkan di medium *nutrient broth*- $K_2Cr_2O_7$ .

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis A.P.N.S. mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, MP melalui pendanaan penelitian dari PNBP ITS tahun anggaran 2015 sesuai nomor kontrak 003246.IT2.11/PN.08/2015

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] J. P. Chen, *Decontamination of Heavy Metals: Process, Mechanisms, and Applications*. Florida: Taylor & Francis Group (2012).
- [2] R. S. Laxman and S. More, "Reduction of Hexavalent Chromium by *Streptomyces griseus*," *Mineral Engineering*, Vol 15 (2002) 831-837.
- [3] L. Velasques and J. Dussan, "Biosorption and Bioaccumulation of Heavy Metals on Dead and Living Biomass of *Bacillus sphaericus*," *Journal of Hazard. Materials*, Vol. 167 (2009) 713-716.
- [4] J. O. Nriagu and E. Neiboer, *Chromium In The Natural and Human Environments*. Canada: John Wiley and Sons, Inc. (1998).
- [5] L. Yun-guo, F. Bao-ying, F. Ting, Z. Hai-zhou, and L. Xin, "Tolerance and Removal of Chromium (VI) by *Bacillus* sp. Strain YB-1 Isolated from Electroplating Sludge," *Trans Nonferrous Met. Soc. China*, Vol 18 (2008) 480-487.
- [6] H. Tian-pei, X. Ying, P. Jie-ru, C. Zhi, L. L. Fen, X. Lei, Z. Ling-ling, and G. Xiong, "Aerobic Cr(VI) Reduction by An Indegenous Soil Isolate *Bacillus thuringiensis* BRC-ZYR2," *Pedosphere*, Vol. 24 (2014) 652-661.
- [7] H. Ohtake, C. Cervantes, and S. Silver, "Decreased Chromate Uptake in *Pseudomonas fluorescens* Carrying A Chromate Resistance Plasmid," *Journal of Bacteriology* (1987, Aug) 3853-3856.
- [8] H. Thatoi, S. Das, J. Mishra, B. P. Rath, and N. Das, "Bacterial Chromate Reductase, A Potential Enzyme for Bioremediation of Hexavalent Chromium: A Review," *Environmental Management*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014> (2014).
- [9] P. Govind and S. Madhuri, "Heavy Metals Causing Toxicity in Animals and Fishes," *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, Vol. 2 (2014) 17-23.
- [10] E. Zulaika, L. Sembiring and A. Soegianto, "Characterization and Identification of Mercury-resistant Bacteria from Kalimas River Surabaya-Indonesia by Numerical Phenetic Taxonomy," *Journal Basic and Applied Science Res.*, Vol. 2 (2012) 7263-7269.
- [11] E. Zulaika and L. Sembiring, "Indegenous Mrcry Resistant Bacterial Isolates Belong to The Genus *Bacillus* from Kalimas Surabaya As A Potential Mercury Bioreducer," *Journal Applied Environmental Biological Sciences*, Vol. 4 (2014) 72-76.
- [12] E. Zulaika, A. Luqman, T. Arindah, dan U. Sholikah, "Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator," in *Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development*, (2012, Feb).
- [13] M. He, X. Li, L. Guo, S. J. Miller, C. Rensing, and G. Wang, "Characterization and Genomic Analysis of Chromate Resistant and Reducing *Bacillus cereus* strain SJ1," *BMC Microbiology*, Vol. 10 (2010) 221.
- [14] G. Cheng and X. Li, "Bioreduction of Chromium (VI) by *Bacillus* sp. Isolated from Soils of Iron Mineral Area," *European Journal of Soil Biology*, Vol. 45(2009) 483-487.
- [15] M. E. Losi, C. Amrhein, W. T. Frankenberger, "Environmental Biochemistry of Chromium," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 36(1994) 91-121.
- [16] S. Basu, M. Dasgupta, and B. Chakraborty, "Removal of Chromium (VI) by *Bacillus subtilis* Isolated from East Calcutta Wetlands, West Bengal, India," *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 14(2014) 7-10.