

Uji Toleransi Logam Berat Bakteri Hidrokarbonoklastik dan Uji Kemampuan *Micrococcus* sp. LII61 dalam Menurunkan Kromium (Cr VI), Tembaga (Cu II), Seng (Zn II)

Heavy Metal Tolerance Determination of Hydrocarbon-Degrading Bacterial Strains and Reducing Ability of Micrococcus sp. LII61 Strain toward Chromium (Cr VI), Copper (Cu II), Zinc (Zn II)

Achmad Zainal Abidin¹, Elga Renjana¹, Fatimah¹, Ni'matuzahroh^{1*}

¹Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Kampus C Universitas Airlangga, Jalan Mulyorejo, 60115, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia

*Corresponding authors: First.Author@institution.org

Manuscript received: Revision accepted:

ABSTRACT

This research aimed to know: (1) tolerance level of hydrocarbon-degrading bacteria collected from Biology Laboratory of Airlangga University i.e. *Acinetobacter* sp P2(1) *Bacillus subtilis* 3KP, *Micrococcus* sp. LII61, *Pseudomonas putida* T1(8), at various concentration of heavy metal chromium (Cr⁶⁺), copper (Cu²⁺), zinc (Zn²⁺), and combination of that three metals; (2) growing ability of selected bacteria in lowering metals concentration; and (3) reduction percentage of metal concentration by selected bacteria. Tolerance test was performed using streak plate method on two types of solid mediums, i.e. *Mineral Salt Medium* (MSM) agar and *Mueller-Hinton Agar* (MHA) with a stratified concentration and 72 hours of incubation time. Bacterial growth and metal concentration reduction test were carried out in liquid medium containing single metal or combined metals. Viability of bacteria was calculated using Total Plate Count (TPC) method. Logarithmic of TPC were analyzed statistically using *Brown-Forsythe* test followed by *Games-Howell*. The results showed: (1) All bacteria was resistant to either single heavy metal or combined metals on both medium. However, *Micrococcus* sp. LII61, had the highest tolerance compared to the other three bacteria, which was able to grow at Zn²⁺ 1000 ppm in both medium. *Micrococcus* sp. LII61, was the selected bacteria to be tested for its ability to reduce heavy metal by single heavy metal and combined metals for 3 and 7 days of incubation time. (2) Ability levels of *Micrococcus* sp. LII61, to grow in some heavy metals was Zn²⁺ > Cu²⁺ > Cr⁶⁺ consecutively. (3) Ability levels of *Micrococcus* sp. LII61, in reducing heavy metals was Cu²⁺ > Zn²⁺ > Cr⁶⁺ consecutively. Percentage decrease of Cu²⁺ in single metal was 66.15%, while in combination metals was 54.25% at 3 days incubation. Percentage decrease of Cu²⁺ after seven day incubation in single metals and combination metals were 90.13% and 74.72% respectively.

Keywords: Hydrocarbon-degrading bacteria, heavy metals, *Micrococcus* sp. LII61, tolerance

PENDAHULUAN

Beberapa logam dalam kadar yang sedikit merupakan mikronutrien esensial bagi tubuh yang berperan sebagai metaloenzim, misalnya Cu, Co, Cr, Fe, Mg, Mn, K, Na, Ni, dan Zn. Namun, bila kadar logam berat tersebut melebihi nilai toleransi di dalam tubuh, akan menjadi toksik bagi organisme dan manusia (Chen, *et al.*, 2005; Chunxi, 2014). Logam berat umum digunakan oleh beberapa industri diantaranya metalurgi, elektronik, penyamakan kulit, pupuk, dan pertambangan baik sebagai bahan tambahan, bahan baku, ataupun katalis (Oves, *et al.*, 2013). Sistem pembuangan limbah logam yang kurang baik meningkatkan kadar baku mutu logam berat di lingkungan sehingga menyebabkan pencemaran. Logam yang mencemari lingkungan dapat berpindah ke dalam tubuh organisme melalui bioakumulasi, biotransfer dan biomagnifikasi (Ali dan Khan, 2018).

Reduksi kadar pencemaran logam berat dapat dilakukan secara konvensional, yaitu dengan metode fisiko-kimia misalnya ultrafiltrasi, ion-exchange, reverse osmosis, elektrodialisis, dan pengendapan kimiawi (Oves, *et al.*, 2013). Metode ini relatif mahal dan memiliki beberapa kelemahan diantaranya pemindahan ion logam yang tidak sempurna, membutuhkan reagen yang mahal dan energi yang besar, serta menghasilkan residu lumpur toksik yang menjadi limbah sekunder (Cristani, *et al.*, 2012). Bioremediasi merupakan metode mereduksi pencemaran lingkungan dengan menggunakan mikroba. Metode ini dapat dijadikan alternatif pilihan karena efektif, efisien, murah, tidak menghasilkan residu toksik dan ramah bagi lingkungan (Chen, *et al.*, 2005). Permukaan sel mikroba berpotensi tinggi untuk berinteraksi dengan logam di lingkungannya. Selain itu, beberapa jenis mikroba memiliki kemampuan adaptasi fisiologi yang baik pada kondisi lingkungan yang ekstrim (Wang, *et al.*, 2010).

Mikroba mampu mengakumulasi logam melalui mekanisme yang bergantung pada metabolisme (metabolism-dependent / active uptake) atau tidak bergantung metabolisme (metabolism-independent/ passive uptake). Pereduksian logam berat oleh mikroba dapat dilakukan dengan cara bioakumulasi atau biosorpsi. Pada proses bioakumulasi, logam akan ditransportasi melalui membran sel ke dalam sitoplasma. Adsorpsi logam ditentukan oleh kemampuan menyerap permukaan sel yang dipengaruhi oleh komponen penyusun dinding sel. Komponen permukaan dinding sel berupa gugus fungsional gugus karboksil, gugus fosfat, lipopolisakarida, asam teikoat dan asam teikuronat (Jiang, et al., 2004).

Mikroba yang berpotensi sebagai agen bioremediasi logam berat adalah mikroba yang resisten dan toleran terhadap keberadaan logam berat di lingkungan (Silva, et al., 2009). Beberapa mikroba yang sering diuji untuk mereduksi kadar cemaran logam berat di lingkungan antara lain dari kelompok fungi adalah *Aspergillus* (Binupriya 2006), *Penicillium* (Tan & Cheng, 2003), dan *Rhizopus* (Park, et al., 2005), dari kelompok bakteri adalah, *Acinetobacter* (Irawati, et al., 2015), *Bacillus* (Tunali, et al., 2006; Oves, et al., 2013), *Micrococcus* (Puyen, et al., 2012) *Pseudomonas* (Uslu & Tanyol, 2006; Wani & Ayoola, 2015), dan *Serratia* (Cristani, 2012). Sel yang digunakan dapat berupa sel hidup maupun sel mati, misalnya pada biosorpsi Zn^{2+} oleh *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14 (Li, et al., 2010) dan Cd^{2+} oleh *Bacillus cereus* RC-1 (Huang, et al., 2013).

Beberapa bakteri menghasilkan biosurfaktan yang dapat menyerap berbagai jenis logam. Mekanisme reduksi oleh biosurfaktan yaitu dengan ion-exchange, presipitasi, dan ikatan ion (Acikel, 2011). Bakteri yang mampu menghasilkan biosurfaktan diantaranya adalah kelompok bakteri pendegradasi hidrokarbon yang kemudian disebut bakteri hidrokarbonoklastik (Rojo, 2009). Kelompok bakteri hidrokarbonoklastik akan melepaskan biosurfaktan ke lingkungan untuk menjerat senyawa hidrokarbon di lingkungan yang kemudian digunakan dalam metabolisme (Nugroho, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toleransi empat isolat bakteri hidrokarbonoklastik penghasil biosurfaktan, koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya yang terdiri dari *Acinetobacter* sp P2(1) *Bacillus subtilis* 3KP, *Micrococcus* sp. LII61, *Pseudomonas putida* T1(8), terhadap logam berat (Cr, Cu, Zn) tunggal maupun campuran. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui profil pertumbuhan *Micrococcus* sp. LII61 terhadap paparan logam dan kemampuannya untuk mereduksi logam tunggal maupun campuran.

METODE PENELITIAN

Persiapan Suspensi Isolat

Empat isolat bakteri berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Surabaya terdiri dari *Acinetobacter* sp P2(1), *Bacillus subtilis* 3KP, *Micrococcus* sp. LII61, *Pseudomonas putida* T1(8). Keempat isolat diinokulasikan pada media cair *Nutrient Broth* (NB) (Oxoid) selama 12-24 jam dengan penggojokan 100 rpm

menggunakan *rotary shaker*. Selanjutnya, kekeruhan kultur diatur hingga mencapai nilai *Optical Density* (OD) 0,1 pada λ 600 nm, dengan melakukan seri pengenceran.

Uji Toleransi Terhadap Logam Berat

Uji toleransi dilakukan dengan metode *streak* pada dua media padat berbeda, yaitu *Mueller-Hinton Agar* (MHA) (Merck) dan Air Mineral Sintetik (AMS) agar (dalam aquades satu liter: 10 gram NaCl; 5 gram KH_2PO_4 ; 3 gram $(NH_4)_2SO_4$; 2 gram K_2HPO_4 ; 0,2 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 gram $CaCl_2$; 0,001 gram $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,005 gram $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,001 gram H_3BO_3 ; 0,001 gram $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,001 gram $Na_2Mo_2O_4$; 0,001 gram $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,0006 gram $FeSO_4$; (Pruthi & Comeotra, 1997). Logam berat yang digunakan diperoleh dengan melarutkan $Cr_2O_2O_7$ (untuk Cr^{6+} terlarut), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (untuk Cu^{2+} terlarut), $ZnSO_4$ (untuk Zn^{2+} terlarut), dan campuran ketiga logam ($Cr^{6+} + Cu^{2+} + Zn^{2+}$) ke dalam air demineralisasi. Media AMS agar dibuat dengan menambahkan 1% *yeast extract*, 2% agar-agar serbuk dan 2% sukrosa dalam satu liter AMS. Konsentrasi logam berat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 0-200 ppm (interval 25 ppm) dan 200-1000 ppm (interval 50 ppm). Logam berat dengan berbagai konsentrasi dilarutkan ke dalam media AMS agar dan MHA, kemudian dituang ke cawan Petri. Kultur cair bakteri kemudian digores pada media padat dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Goresan dilakukan sebanyak 4 kali pada daerah yang berbeda di permukaan media padat. Konsentrasi paling rendah dimana koloni terhambat pertumbuhannya adalah nilai *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) (Chen, 2006; Yilmaz, 2003). Data dianalisis secara deskriptif.

Uji Pertumbuhan *Micrococcus* sp. LII61 Terhadap Logam Berat

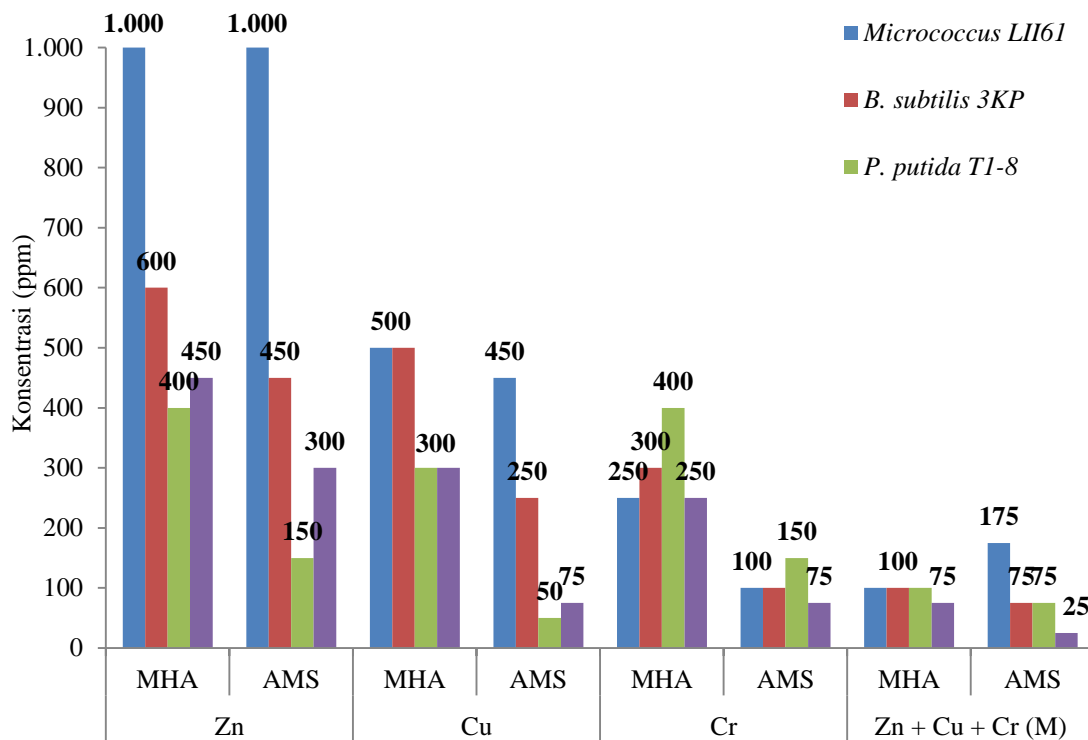
Uji pertumbuhan dilakukan dengan cara menginokulasi inokulum cair *Micrococcus* sp. LII61 (OD_{600nm} 0,1) sebanyak 1 mL ke dalam media cair *Mueller-Hinton Broth* (MHB) (Merck) yang mengandung logam berat tunggal Cr, Cu, Zn dengan konsentrasi 50, 100, 150 ppm dan konsentrasi 25, 50, 75 ppm untuk campuran ketiga logam. pH media diatur hingga 7 dengan menambahkan NaOH 1 M. Kultur diinkubasi selama 7 hari dengan penggojokan 100 rpm. Pertumbuhan populasi bakteri diamati pada hari ke-3 dan ke-7 menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Kultur diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam air fisiologis steril (0.85% NaCl) dan dilakukan pengenceran berseri. Sebanyak 1 mL suspensi dari pengenceran yang representatif kemudian dicawakan menggunakan metode *pour plate* dalam medium *Nutrient Agar* (Merck) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Populasi bakteri yang tumbuh dihitung dengan bantuan alat *colony counter* dan dinyatakan dalam CFU/mL. Data pertumbuhan dianalisis dengan menggunakan uji *Brown-Forsythe* dan dilanjutkan dengan uji *Games-Howell*.

Uji Penurunan Logam Berat

Kultur pada uji pertumbuhan di hari ke-3 dan ke-7 diambil supernatannya dengan sentrifugasi 3500 rpm selama 15 menit. Residu logam berat dalam supernatan dianalisis

menggunakan *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS). Hasil penurunan konsentrasi logam berat dalam medium diukur menggunakan persamaan (1) (Anwar, *et al.*, 2017; Marzan, *et al.*, 2017). Data penurunan logam berat dianalisis secara deskriptif.

$$\% \text{ Logam berat} = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad \dots \dots \dots (1)$$



Gambar 1. Batas toleransi konsentrasi dapat tumbuh *Acinetobacter* sp P2(1) *B. subtilis* 3KP, *Micrococcus* sp. L II 61, *P. putida* T1(8), pada media MHA dan AMS yang mengandung berbagai logam berat (Cr^{+6} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , campuran ketiga logam (M)) pada konsentrasi 0-200 ppm (interval 25 ppm), dan konsentrasi 200-1000 ppm (interval 50 ppm).

Keempat isolat bakteri resisten terhadap paparan logam baik tunggal (Cr^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) maupun campuran ketiga logam (M) pada media MHA maupun AMS agar yang ditunjukkan dengan kemampuan untuk dapat tumbuh terhadap paparan logam yang diberikan. Kemampuan tumbuh bakteri tampak terhambat oleh konsentrasi tertentu logam berat yang dipaparkan. Bakteri punya batasan toleransi konsentrasi logam yang berbeda-beda untuk mampu tumbuh (Gambar 1).

Secara umum nilai MIC bakteri terhadap paparan logam berat lebih tinggi pada media tumbuh MHA dibandingkan pada AMS. Nilai MIC *Micrococcus* sp. LII61 pada paparan campuran ketiga logam (M) lebih tinggi pada media AMS daripada pada media MHA yaitu sebesar $\text{MIC}_{(\text{AMS-M})}$ 175 ppm dan $\text{MIC}_{(\text{MHA-M})}$ 100 ppm. Toleransi tumbuh paling rendah bakteri tampak pada media AMS dengan campuran ketiga logam (AMS-M) yaitu *Acinetobacter* sp. P2(1) dengan nilai $\text{MIC}_{(\text{AMS-M})}$ 25 ppm.

Kemampuan toleransi paling tinggi tampak pada *Micrococcus* sp. LII61 yang tetap dapat tumbuh pada

Keterangan:

A : kadar logam berat sebelum perlakuan.

B : kadar logam berat setelah perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Toleransi Bakteri Terhadap Logam Berat

■ *Micrococcus LII61*
 ■ *B. subtilis 3KP*
 ■ *P. putida T1-8*

paparan konsentrasi Zn^{2+} 1000 ppm (batas konsentrasi logam paling tinggi yang dipaparkan) dalam media MHA maupun AMS. Nilai MIC_{Cu} paling tinggi pada media MHA dengan nilai $\text{MIC}_{(\text{MHA-Cu})}$ 500 ppm tampak pada *Micrococcus* sp. LII61 dan *B. subtilis* 3KP sedangkan pada media AMS ditunjukkan oleh *Micrococcus* sp. LII61 dengan $\text{MIC}_{(\text{AMS-Cu})}$ 450 ppm. Nilai MIC_{Cr} paling tinggi pada media MHA dengan nilai $\text{MIC}_{(\text{MHA-Cr})}$ 400 ppm tampak pada pertumbuhan *P. putida* T1(8) sedangkan pada media AMS *P. putida* T1(8) memiliki nilai $\text{MIC}_{(\text{AMS-Cr})}$ 150 ppm. Nilai MIC campuran ketiga logam (M) paling tinggi pada media MHA tampak pada *Micrococcus* sp. LII61, *B. subtilis* 3KP, *P. putida* T1(8) dengan nilai $\text{MIC}_{(\text{MHA-M})}$ 100 ppm sebaliknya pada media AMS hanya *Micrococcus* sp. LII61 yang menunjukkan nilai $\text{MIC}_{(\text{AMS-M})}$ paling tinggi yaitu 175 ppm.

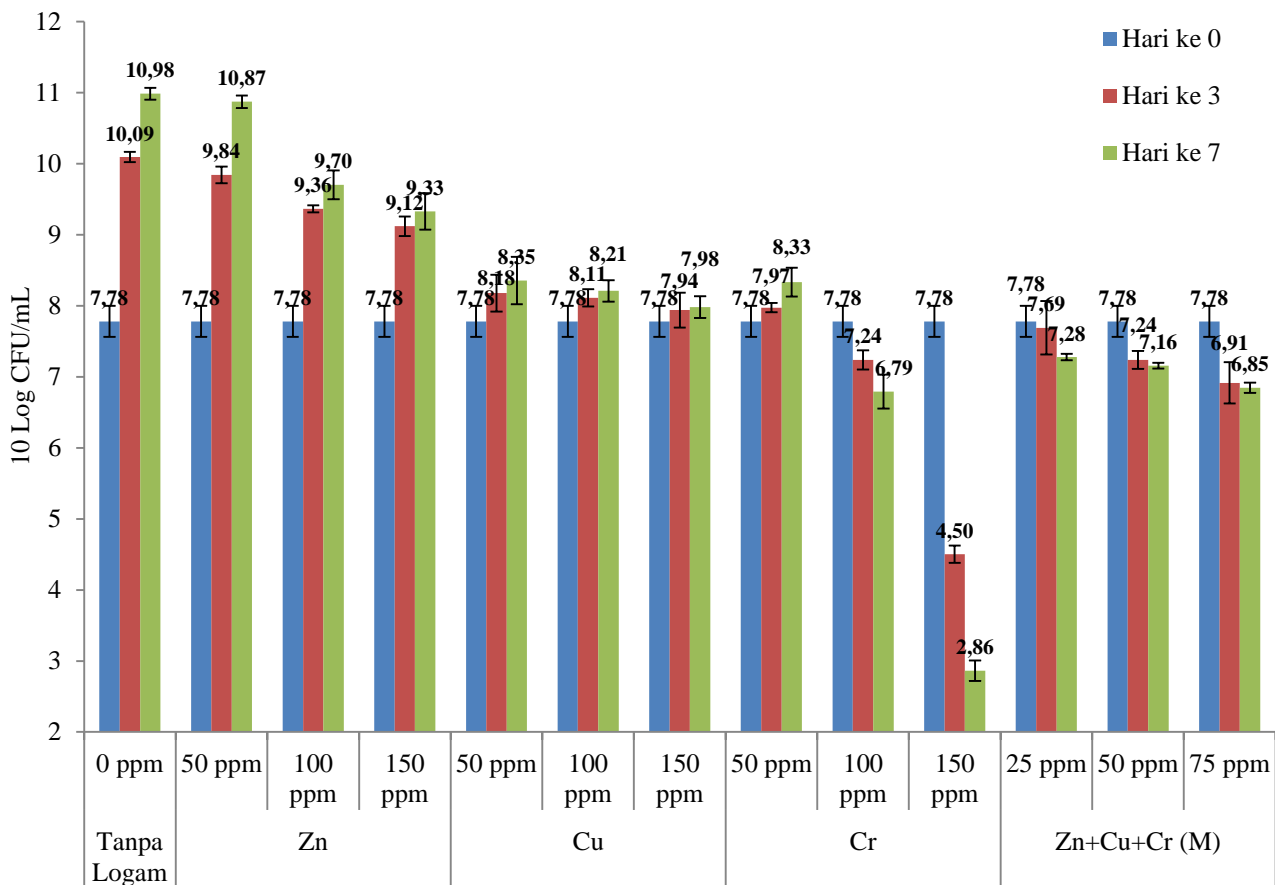
Hasil uji toleransi empat bakteri terhadap paparan logam yang diujikan menunjukkan bahwa *Micrococcus* sp. LII61 memiliki kemampuan toleransi paling tinggi terhadap logam berat (tunggal maupun campuran) diantara

ketiga isolat lainnya. Toleransi *Micrococcus* sp. LII61 terhadap logam berat $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Cr^{6+} > M$ pada media MHA. Telah dilaporkan juga *Bacillus* sp, *Micrococcus* sp. *Pseudomonas* sp., menunjukkan tren toleransi yang sama $Cu^{2+} > Cr^{6+}$ (Mohammed, *et al.*, 2017) dan tren toleransi *Micrococcus luteus* adalah $Zn^{2+} > Cu^{2+}$ (Benmalek & Fardeau, 2016).

Secara umum, nilai MIC terhadap logam berat lebih tinggi pada media MHA dibandingkan pada media AMS, hal ini menunjukkan bahwa jenis media berpengaruh terhadap nilai MIC. Nilai MIC bisa jadi akan berbeda bila uji dilakukan pada media cair, hal ini disebabkan karena difusi, kompleksitas, *bioavailability* logam, akan berbeda pada setiap media uji (Haseen, *et al.*, 1998). Beberapa

penelitian menunjukkan hasil MIC lebih tinggi pada media padat dibandingkan pada media cair begitu juga pada media kaya nutrisi dibandingkan dengan media minimal nutrisi (Yilmaz, 2003; Kumar, *et al.*, 2013). MIC *P. putida* VI lebih tinggi pada media kaya nutrisi *Luria Bertani* (LB) dengan nilai $MIC_{(LB-Cr,Cu,Zn)}$ 1000 ppm, sedangkan pada media *Minimal Medium* (MM) nilainya rendah yaitu $MIC_{(MM-Cr)}$ 100 ppm dan $MIC_{(MM-Cu,Zn)}$ 400 ppm (Cabral, *et al.*, 2012).

Pertumbuhan *Micrococcus* sp. LII61 Terhadap Logam Berat



Gambar 2. Pertumbuhan *Micrococcus* sp. L II 61 pada media MHB yang mengandung berbagai logam berat (Cr^{+6} , Cu^{2+} , Zn^2 , campuran ketiga logam (M)) pada konsentrasi 50, 100, 150 ppm (Cr^{+6} , Cu^{2+} , Zn^2), dan konsentrasi 25, 50, 75 ppm (M).

Gambar 2. menunjukkan pertumbuhan *Micrococcus* sp. LII61 pada paparan logam berat di hari ketiga. Pada logam Zn^{2+} , pertumbuhan yang paling tinggi tampak pada paparan Zn^{2+} 50 ppm dan terendah pada Zn^{2+} 150 ppm, pertumbuhan pada Zn^{2+} 50 ppm dengan 150 ppm berbeda signifikan, namun pada Zn^{2+} 50 ppm tidak berbeda signifikan dengan Zn^{2+} 100 ppm sedangkan Zn^{2+} 100 ppm tidak berbeda signifikan dengan Zn^{2+} 150 ppm. Pada logam berat Cu^{2+} maupun M tidak ada perbedaan pertumbuhan yang signifikan di semua konsentrasi. Pada logam Cr^{6+}

pertumbuhan bakteri berbeda signifikan pada setiap peningkatan konsentrasi.

Pertumbuhan *Micrococcus* sp. LII61 pada logam berat di hari ketujuh. Pada logam Zn^{2+} , pertumbuhan yang paling tinggi tampak pada paparan Zn^{2+} 50 ppm dan terendah pada Zn^{2+} 150 ppm, pertumbuhan pada Zn^{2+} 100 ppm tidak berbeda signifikan dengan Zn^{2+} 150 ppm namun berbeda signifikan dengan Zn^{2+} 50 ppm sedangkan Zn^{2+} 50 ppm berbeda signifikan dengan Zn^{2+} 100 ppm dan 150 ppm. Pada logam berat Cu^{2+} tidak ada perbedaan pertumbuhan yang signifikan di setiap peningkatan

konsentrasi. Pada logam Cr^{6+} pertumbuhan bakteri berbeda signifikan pada setiap peningkatan konsentrasi. Pertumbuhan pada M 25 ppm dengan M 75 ppm berbeda signifikan, namun pada M 25 ppm tidak berbeda signifikan dengan M 50 ppm sedangkan M 50 ppm tidak berbeda signifikan dengan M 75 ppm.

Pertumbuhan *Micrococcus* sp. LII61 pada media mengandung Zn^{2+} 50 ppm tidak berbeda signifikan dengan pertumbuhan pada media tanpa logam berat (kontrol) baik pada hari ketiga maupun pada hari ketujuh. Secara umum pada hari ketiga maupun hari ketujuh, pertumbuhan paling tinggi ditunjukkan pada paparan Zn^{2+} 50 ppm sedangkan paling rendah ada pada paparan Cr^{6+} 150 ppm. Secara umum tingkat toksisitas logam berat secara tunggal yaitu $\text{Cr}^{6+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Toksisitas $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, tren yang sama juga dilaporkan terhadap bakteri *B. circulans* strain EB1 (Yılmaz, 2003); *P. putida* CZ1 (Chen, *et al.*, 2006); dan *Arthrobacter* sp. (Sengor, *et al.*, 2012). Toksisitas ini sejalan dengan toleransi *Micrococcus* sp. LII61 terhadap logam $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ pada kedua media uji baik pada MHA maupun AMS (Gambar 1).

Pada pertumbuhan di hari ketiga di konsentrasi Cu^{2+} 50 ppm dengan M 50 ppm tampak tidak terdapat perbedaan yang signifikan sebaliknya pada uji toleransi selisih nilai toleransi sangat besar (nilai $\text{MIC}_{(\text{Cu})}$ 500 ppm, $\text{MIC}_{(\text{M})}$ 100 ppm). Artinya paparan Cu^{2+} tunggal maupun Cu^{2+} dalam campuran logam dengan konsentrasi sama-sama 50 ppm tingkat pengaruhnya adalah sama. Hal ini bisa jadi disebabkan adanya efek stimulasi pertumbuhan logam 50

ppm Zn^{2+} yang dapat mengatasi hambatan pertumbuhan akibat adanya 50 ppm Cu^{2+} . Sengor, *et al.* (2012), melaporkan pertumbuhan *Arthrobacter* sp. pada paparan Zn^{2+} 50 ppm lebih tinggi daripada Cu^{2+} 50 ppm namun pada kondisi Zn^{2+} dan Cu^{2+} dicampur dalam media dengan konsentrasi 50 ppm, pertumbuhan tampak sama dengan kontrol tanpa logam. Cabrero, *et al.* (1998), juga melaporkan hal yang serupa pada lumpur aktif yang diberikan campuran Cu^{2+} dan Zn^{2+} , adanya Zn^{2+} pada lumpur aktif mengatasi penghambatan pertumbuhan mikroba yang disebabkan oleh Cu^{2+} .

Pertumbuhan bakteri menurun sejalan dengan bertambahnya konsentrasi logam berat disebabkan karena sifat redoks aktif dari logam berat dapat menginduksi pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui reaksi Fenton. Senyawa ROS seperti radikal hidroksil ($-\text{OH}$), radikal superoksida ($-\text{O}_2^-$), nitrit oksida (NO^-) bersifat toksik. ROS akan berinisiasi dengan membran sel yang kemudian memicu peroksida lipid sehingga menurunkan integritas membran sel bahkan merusak membran. Dampak lebih jauh, ROS juga akan merusak organel sel dan inti sel. Hasil dari peroksidasi lipid dapat dideteksi dengan adanya senyawa malondialdehid (MDA) sebagai senyawa akhir yang kemudian dijadikan sebagai biomarker terjadinya stres oksidatif (Sengor, *et al.*, 2012).

Penurunan Logam Berat

Gambar 3. Persentase penurunan logam berat oleh *Micrococcus* sp. L II 61 pada media MHB yang mengandung berbagai logam berat (Cr^{+6} , Cu^{2+} , Zn^2 , campuran ketiga logam (M)) pada konsentrasi 50, 150 ppm (Cr^{+6} , Cu^{2+} , Zn^2), dan konsentrasi 25 ppm (M).

Gambar 3 menunjukkan kemampuan *Micrococcus* sp. LII61 untuk menurunkan logam berat pada kultur cair yang mengandung logam berat tunggal Cr^{6+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (50 ppm dan 150 ppm) dan campuran dari ketiga logam (25 ppm) dengan waktu diinkubasi selama 3 dan 7 hari. Tampak jelas, persentase penurunan logam berat tunggal secara umum mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Persentase penurunan logam berat tampak lebih tinggi pada pemberian konsentrasi inisial yang rendah. Kemampuan menurunkan logam berat tunggal Cu^{2+} merupakan yang paling tinggi dibandingkan dengan Zn^{2+} dan Cr^{6+} . Pada konsentrasi inisial 50 ppm Cu^{2+} dengan waktu tiga hari inkubasi, nilai persentase penurunan sebesar 66,15% sedangkan pada konsentrasi inisial 150 ppm Cu^{2+} , nilai persentase penurunan yang didapatkan lebih rendah yaitu sebesar 56,94%. Persentase penurunan logam Cu^{2+} mengalami peningkatan di hari ketujuh inkubasi menjadi 90,13% untuk inisial konsentrasi Cu^{2+} 50 ppm dan sebesar 85,61% untuk inisial 150 ppm. Persentase penurunan Zn^{2+} dan Cr^{6+} di hari ketiga secara berturut-turut adalah 56,43% dan 22,69%, persentase penurunan meningkat menjadi 80,37% dan 76,37% di hari ketujuh waktu inkubasi dengan konsentrasi inisial 50 ppm Zn^{2+} dan Cr^{6+} , nilai persentase penurunan di hari ketujuh tersebut lebih kecil jika dibandingkan pada konsentrasi inisial 150 ppm baik pada Zn^{2+} maupun Cr^{6+} secara berturut-turut sebesar 82,10% dan Cr^{6+} sebesar 76,77%. Persentase penurunan Zn^{2+} maupun Cr^{6+} yaitu sebesar 42,59% dan 34,34% di hari ketiga waktu inkubasi pada konsentrasi inisial 150 ppm Zn^{2+} dan Cr^{6+} .

Persentase penurunan logam Cu^{2+} dan Zn^{2+} pada campuran ketiga logam (M) dengan inisial 25 ppm tampak lebih rendah dibandingkan dengan penurunan logam Cu^{2+} dan Zn^{2+} secara tunggal baik pada konsentrasi inisial 50 ppm maupun 150 ppm, sedangkan penurunan Cr tampak lebih besar pada kondisi logam M dibandingkan pada kondisi logam Cr^{6+} tunggal di hari ketiga waktu inkubasi. *Micrococcus* sp. LII61 mampu menurunkan Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} sebesar 54,25%; 40,88% dan, 35,37% secara berturut-turut selama tiga hari waktu inkubasi. Persentase penurunan Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} meningkat menjadi 74,72%; 75,94; dan 71,22% secara berturut-turut di hari ketujuh waktu inkubasi. Kemampuan menurunkan logam berat *Micrococcus* sp. LII61 secara tunggal maupun campuran ketiga logam $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$.

Mekanisme menurunkan logam oleh bakteri dapat berlangsung secara pasif maupun aktif yang bersifat bolak-balik. Pengambilan secara aktif yaitu mengakumulasi secara intraseluler untuk kepentingan metabolisme bakteri selama pertumbuhan namun jumlahnya terbatas. Secara pasif terjadi melalui pengikatan ion logam pada komponen dinding sel bakteri Gram-positif maupun bakteri Gram-negatif. Ikatan ion yang terbentuk secara monovalen atau divalen (Alam, *et al.*, 2011). Ion logam yang bermuatan positif akan berikatan dengan sisi permukaan sel yang bermuatan negatif.

Micrococcus sp. LII61 merupakan bakteri Gram-positif. Dinding sel bakteri Gram-positif tersusun atas peptidoglikan, asam teikoat dan asam teikuronat yang bermuatan negatif (Vijayaraghavan & Yun, 2008). Komponen tersebut dapat berikatan dengan ion logam berat yang bermuatan positif. *Micrococcus* sp. juga diketahui

mampu memproduksi eksopolisakarida (EPS) pada permukaan dinding sel sebagai mediasi biosorpsi logam berat (Kilic & Donmez, 2008; Gupta & Diwan, 2017). Gugus fungsional EPS yang bermuatan negatif diantaranya amino (-NH), fosforil (PO_4^{3-}), hidroksil (OH^-), karboksil (COO^-), atau sulfhidridil (-SH). Afinitas logam nonesensial sangat kuat terhadap gugus SH. Beberapa bakteri menghasilkan siderofor dan metalotionin. Siderofor berfungsi untuk mengkelasi logam. Metalotionin sangat berperan penting untuk detoksifikasi logam baik esensial maupun non esensial (Cristani, 2012).

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan, keempat bakteri yang diteliti bersifat toleran terhadap logam berat. Nilai MIC pada media MHA lebih tinggi dibandingkan pada media AMS. *Micrococcus* sp. LII61 adalah isolat yang paling toleran terhadap logam berat pada media MHA maupun AMS dibandingkan tiga bakteri lainnya. *Micrococcus* sp. LII61 paling toleran terhadap Zn^{2+} hingga konsentrasi 1000 ppm yang dipaparkan. Urutan toleransi tumbuh *Micrococcus* sp. LII61 pada paparan logam berat yaitu $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{M}$. *Micrococcus* sp. LII61 mampu menurunkan logam berat tunggal Cr^{6+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} dan campuran ketiga logam. Urutan kemampuan *Micrococcus* sp. LII61 dalam menurunkan logam berat yaitu $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$. Penurunan logam tertinggi adalah Cu^{2+} . Penurunan Cu^{2+} sebanyak 90,13% pada paparan tunggal dan sebanyak 74,72% pada paparan logam campuran selama 7 hari inkubasi. *Micrococcus* sp. LII61 berpotensi sebagai agen bioremediasi logam berat di lingkungan terutama pada pencemaran logam Cu^{2+} . Saran, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan tiga bakteri lainnya dalam menurunkan logam berat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih terutama kepada Zaini dan Siti Amina selaku orang tua penulis pertama yang telah memfasilitasi dan mendanai penelitian ini serta kepada saudara dan teman-teman yang turut membantu selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Acikel, Y.S. (2011). Use of biosurfactants in the removal of heavy metal ions from soils. *Environmental Pollution* 20:182-223.
- Alam, M.Z, Ahmad, S, & Malik, A. (2011). Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluents and affected soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 178:281-291.
- Ali, H. & Khan, E. (2018). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chain/webs-concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 24(8):1-24.
- Anwar, M., Ali, S., & Al-Tae, A. (2017). Evaluation of heavy metals resistant *Micrococcus* sp. isolated from Rivers in Basra, Iraq. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 8 (1):2-4.

- Benmalek, Y. & Fardeau, M.L. (2016). Isolation and characterization of metal-resistant bacterial strain from wastewater and evaluation of its capacity in metal-ions removal using living and dry bacterial cells. *International Journal Environmental Science and Technology*, 13:2153-2162.
- Binupriya, A.R, Sathiskumar, M, Swaminathan, K, Jeong E.S., Yun, S.E., & Pattabi, S. (2006). Biosorption of metal ions from aqueous solution and electroplating industry wastewater by *7Aspergillus japonicus*: Phytotoxicity studies. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 77:219-27
- Cabral, L, Giovanella, P, Gianello, C, Bento, F.M, Andreazza, R, Camargo, F.A.O. (2012). Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. *Biodegradation*, 24:319-331.
- Cabrero, A, Fernandez,S, Mirada, F, & Garcia, J. (1998). Effects of copper and zinc on the activated sludge bacteria growth kinetics. *Water Research*, 32(5):1355-1362.
- Chen, X, Shi, J, Chen, Y, Xu, X, Xu, S, & Wang, Y. (2006). Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ1 isolated from metal polluted soil. *Canadian Journal of Microbiology* , 52 (4):308-316.
- Chen, X.C, Wang, Y.P, Lin, Q, Shi, J.Y, Wu, W.X, & Chen, Y.X. (2005). Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids and Surfaces B*, 46:101-107.
- Chunxi, K, Pingxiao, W, yuewu, L, Bo, R, Nengwu, Z, & Zhi, D. (2014). Estimates of heavymetal tolerance and chromium (VI) reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB93066: chromium (VI) toxicity and environmental parameters optimization. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 30:2733-2746.
- Cristani, M, Naccari, C, Nostro, A, Pizzimenti, A, Trombetta, D, & Pizzimenti, F. (2012). Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(1):161-168.
- Gupta, P. & Diwan, B. (2017). Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13:58-71.
- Hassen, A, Saidi, N, Cherif, M, & Boudabus, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metal. *Bioresource Technology*, 64 (1):7-15.
- Huang, F, &g, Z, Guo, C, Lu, G, Gu, R,R, Liu, H, & Zhang, H. (2013). Biosorption of Cd (II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107:11-18.
- Irawati, W, Parhusip, A.J.N, & Sopiah, R.N. (2015). Heavy metals biosorption. *Microbiology Indonesia*, 9(4):163-170.
- Jiang, W, Saxena, A, Song, b, Ward, B.B, Beveridge T.J, & Myneni S.C.B. (2004). Elucidation of functional groups on Gram-positif and Gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy. *Langmuir*, 20:11433-11442.
- Kilic, N.K.. & Donmez, G. (2008). Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 154:1019-1024.
- Kumar, R, Nongkhlaw, M, Acharya, C, & Joshi, S.R. (2013). Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya. *Indian Journal of Biotechnology*, 12:115-119.
- Li, H, Lin, Y, Guan, W, Chang, J, Xu, Lin, Guo, J, & Wei, G. (2010). Biosorption of Zn (II) bu live and dead cells of *Steptomycetes ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. *Journal of hazardous materials*, 179:151-159.
- Marzan, L.W, Hossain, M., Mina, S.A, Akter, Y, & Chodhury, A.M.M.A. Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation.
- Mohammed, J.N, Aliyu, M.M, Kasim, Z.J., & Gana, M. (2017). Heavy metal tolerance of bacteria isolated from mechanic workshops. *Nigerian Journal of Microbiology*, 31(1):3867-3872.
- Nugroho, A. (2006). Bioremediasi hidrokarbon minyak bumi. Jakarta, Indonesia: Graha Ilmu.
- Oves, M, Saghir Khan, M, & Zaidi, A. (2013). Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20:121-129.
- Park, D, Yun, Y.S, & Park, J.M. (2005) Use of dead fungal biomass for the detoxification of hexavalent chromium: screening and kinetics. *Process Biochemical*, 40:2559-65.
- Pruthi, V. & Comeotra, S.S. (1997) Rapid identification of biosurfactant producing bacterial strain using a cell surface hydrophobicity techniques. *Biotechnology Techniques*, 11:671-674.
- Puyen, Z.M, Villagrasa, E, Maldonado, J, Diestra, E, Esteve, I, & Sole, A. (2012). Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. *Biosource Technology*, 126:233-237.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(10):2477-2490.
- Sengor, S.S, Gikas, P, Moberly, J.G, Peyton, B.M, & Ginn, T.R. (2012). Comparison of single and joint effects of Zn and Cu in continous flow and batch reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(3):374-380.
- Silva, R.M.P, Rodriguez, A.A, Oca, J.M.G.M.D, & Moreno, D.C. (2009) Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomoas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology*, 100:1533-1538.
- Tan, T, & Cheng, P. (2003). Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*, 104(2):119-128.

- Tunali, S, Cabuk, A, & Akar, T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal*, 115(3):203-211.
- Uslu, G & Tanyol, M. (2006). Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: effect of temperature. *Journal of Hazardous Material*, 135:87-93.
- Vijayaraghavan, K. & Yun, Yeoung-Sang. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26:266-291.
- Wang, Q, Dai, J, Yu, Y, Shen, T, Liu, J, & Wang, R. (2010). Efficiencies of different microbial parameters as indicators to assess slight metal pollution in a farm near a gold mining area. *Environmental Monitoring and Assessment*, 161:495-508.
- Wani, P.A. & Ayoola, O.H. (2015). Bioreduction of Cr (IV) by heavy metal resistant *Pseudomonas* species. *Journal of Environmental Science and Technology*, 8(3):122-130.
- Yilmaz, E.I. (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in microbiology*, 154:409-415.