

Resistensi *Bacillus* Endogenik Kalimas Surabaya terhadap Logam Besi (Fe)

Septa T. Farisna 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: enny@bio.its.ac.id

Abstrak—Besi merupakan logam yang dibutuhkan oleh organisme untuk metabolismenya, namun dalam konsentrasi tinggi besi dapat membahayakan organisme dan lingkungan. Beberapa bakteri resisten terhadap logam besi, salah satu genus bakteri resisten besi adalah *Bacillus*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat *Bacillus* yang resisten terhadap logam besi dan viabilitasnya saat terpapar logam besi. Uji resistensi Fe dilakukan di medium *nutrient agar-FeCl₃.6H₂O* 0,1 mg/L dan dilanjutkan sampai dengan konsentrasi yang mampu ditoleransi isolat. Uji viabilitas isolat *Bacillus* dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada medium *nutrient broth-FeCl₃.6H₂O* dengan tingkat konsentrasi di bawah konsentrasi maksimum yang dapat ditoleransi isolat. Viabilitas divisualisasi dengan pola kurva pertumbuhan. Hasil dari penelitian isolat *Bacillus* A6, DA11, S6, dan SS19 resisten terhadap logam besi (Fe) pada medium *nutrient agar-Fe* sampai dengan 300 mg/L. Semua isolat mempunyai viabilitas terhadap pemaparan logam Fe dengan pola pertumbuhan isolat lebih tinggi daripada tanpa penambahan logam besi (Fe). Isolat *Bacillus* yang memiliki kemampuan viabilitas baik dalam medium terpapar Fe adalah *Bacillus* A6, DA11, dan SS19.

Kata Kunci—*Bacillus*, besi (Fe), resistensi, viabilitas.

I. PENDAHULUAN

BESI atau Ferrum (Fe) adalah metal berwarna putih keperakan, liat, dan dapat dibentuk. Di alam didapat sebagai hematit [1]. Besi sangat penting sebagai komponen pigmen sitokrom pada respirasi seluler [2] dan sebagai kofaktor enzim [3] pada mikroorganisme. Namun besi dalam konsentrasi tinggi yang mencemari lingkungan dapat menimbulkan bahaya bagi organisme. Menurut Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2014 Tentang Baku Mutu Air Limbah, baku mutu logam besi terlarut (Fe) yaitu 7 mg/L.

Beberapa bakteri telah mengembangkan beberapa sistem yang efisien untuk detoksifikasi logam. Mekanismenya dapat digolongkan ke dalam 5 kategori, yaitu (1) penyerapan intraseluler; (2) mengekspor; (3) mereduksi; (4) absorpsi ekstraseluler; dan (5) detoksifikasi ekstraseluler [4]. Hampir semua mekanisme resistensi bakteri dikode gen yang terdapat pada plasmid dan transposon [4] dan hal itu memungkinkan transfer gen atau mutasi spontan yang menyebabkan bakteri resisten terhadap logam. Bakteri yang mampu resisten

terhadap logam diharapkan mampu meremediasi cemaran logam di lingkungan. Resistensi bakteri terhadap logam dapat melalui mekanisme biosorpsi dan bioakumulasi. Mekanisme biosorpsi merupakan proses pasif sehingga logam tidak meracuni bakteri. Sedangkan mekanisme bioakumulasi merupakan proses aktif dimana logam berat dapat meracuni sel bakteri [5]. Mekanisme toleransi mikroba terhadap logam berat dengan cara kompleksasi meliputi produksi polisakarida ekstraseluler yang memiliki anion dan berfungsi sebagai bioakumulator yang efisien, produksi metabolit organik yang memiliki sifat pengkelat dan membentuk kompleks dengan logam, presipitasi, serta kristalisasi ekstraseluler [6].

Beberapa bakteri resisten terhadap logam, salah satunya adalah *Bacillus*. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa beberapa anggota genus *Bacillus* resisten terhadap logam berat Hg, Pb, Cu, Cd [7], As, Fe dan Mn [8]. Genera *Bacillus* merupakan genera yang tergolong melimpah di alam [9]. Beberapa karakter yang membedakan genus ini dengan genus bakteri yang lain yaitu produksi endospora, berbentuk batang [10], Gram positif, bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif, dan katalase positif [11].

Bacillus yang diisolasi dari Kalimas Surabaya (isolat A6, S1, S6, SS19, dan DA11) merupakan genera yang resisten logam Hg, Pb, Cd, dan Cu [7]. *Bacillus* tersebut belum diteliti resistensinya terhadap logam Fe. Sehingga dilakukan uji resistensi *Bacillus* terhadap logam Fe untuk mengetahui potensinya sebagai agen bioremediasi pencemaran Fe.

II. METODOLOGI

A. Uji Resistensi *Bacillus*

Isolat *Bacillus* S6, SS19, DA11, dan A6 berumur 24 jam ditumbuhkan pada media *nutrient agar-FeCl₃.6H₂O* dengan metode *continue streak plate*. Konsentrasi $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ yang digunakan yaitu 0.1 mg/L. Kultur *Bacillus* diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$. Koloni yang tumbuh selanjutnya diuji resistensinya secara bertingkat pada logam Fe sampai konsentrasi maksimum yang dapat ditoleransi oleh isolat. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh adalah isolat yang resisten logam Fe.

Kemudian dipilih 3 isolat yang memiliki kemampuan resistensi terhadap $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ lebih baik dibanding isolat lain untuk uji viabilitas.

B. Uji Viabilitas *Bacillus* Pada Medium Tercekam $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Sebelum uji viabilitas, dibuat kultur starter. Pembuatan kultur starter dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama untuk kultur starter I. Satu ose isolat *Bacillus* berumur 24 jam diinokulasikan secara aseptis ke dalam 10 ml medium *nutrient broth* dalam Erlenmeyer, diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* (100 rpm). Selanjutnya tahap kedua untuk kultur starter II. Setelah diinkubasi 18 jam, 5 ml kultur starter I diinokulasikan secara aseptis ke dalam 45 ml medium *nutrient broth* dalam Erlenmeyer dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* (100 rpm).

Sebanyak 10 ml kultur starter II diinokulasikan secara aseptis ke dalam Erlenmeyer berisi 90 ml medium *nutrient broth* dengan penambahan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sesuai konsentrasi yang dibutuhkan. Untuk kontrol tidak ditambahkan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Setiap 2 jam sebanyak 1,5 ml kultur diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur nilai *Optical Density* (OD) nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 600 nm [12]. Pengukuran OD dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke 24. Data OD yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai nilai OD.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Resistensi *Bacillus* Terhadap Logam Fe

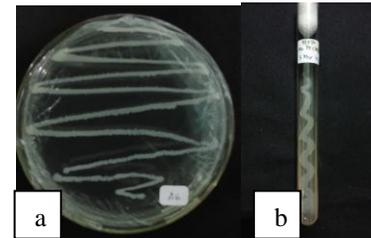
Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolate dalam medium yang mengandung logam Fe. Isolat yang digunakan untuk uji resistensi adalah isolat *Bacillus* A6, DA11, S6, dan SS19. Konsentrasi perlakuan Fe untuk uji viabilitas adalah 50, 100, dan 150 mg/L, setelah pengukuran AAS, konsentrasi Fe pada media mengalami penurunan cukup besar sekitar $\geq 70\%$ yang menyebabkan konsentrasi Fe di media rendah. Hasil yang didapat, semua isolat *Bacillus* mampu tumbuh pada media yang mengandung logam Fe (Tabel 1 dan Gambar 1) sampai dengan 300 mg/L Fe-*nutrient agar*. Sesuai dengan [13], *Bacillus* mampu tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung Fe (III) konsentrasi rendah.

Semua *Bacillus* (A6, DA11, S6, dan SS19) mampu tumbuh dalam medium yang mengandung Fe karena Fe dibutuhkan dalam metabolisme sel bakteri. Hal tersebut juga dinyatakan oleh [14] secara umum semua mikroorganisme, termasuk *Bacillus* membutuhkan Fe untuk aktivitas metabolisme dan juga sebagai komponen struktural utama pada beberapa enzim. Dalam penelitiannya [13] menyatakan bahwa beberapa spesies *Bacillus* resisten terhadap logam Fe sampai dengan 6000 mg/L pada medium *nutrient agar*, walaupun ada beberapa spesies *Bacillus* yang hanya mampu resisten hingga 100 mg/L.

Tabel 1. Hasil Uji Resistensi $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Kode Isolat	Konsentrasi (mg/L)						
	0,1	25	50	100	150	200	300
A6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DA11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S6	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
SS19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Keterangan: (+++) = tumbuh baik, (++) = tumbuh sedang, (+) = tumbuh rendah, (-) = tidak tumbuh



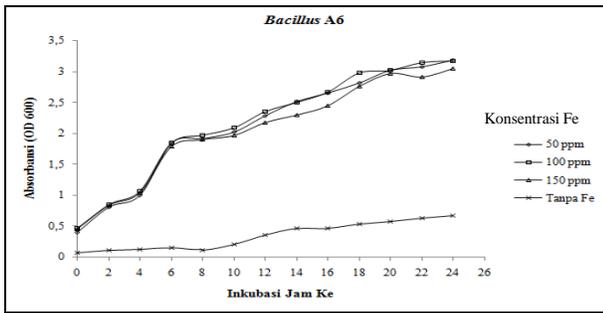
Gambar 1. Hasil Uji Resistensi *Bacillus*

Ket: (a: Hasil uji resistensi *Bacillus* A6 pada 0,1 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, b: Hasil uji resistensi *Bacillus* A6 pada 300 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

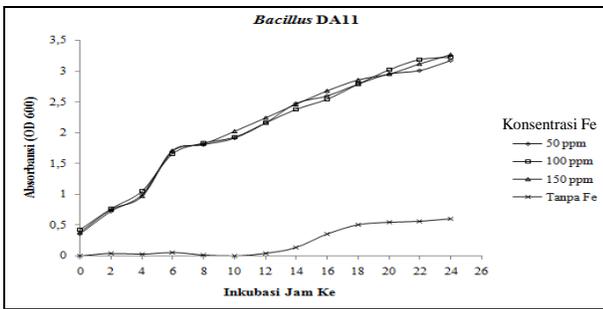
Menurut [5], bakteri yang diisolasi dari lingkungan yang tercemar logam berat merupakan bakteri yang mempunyai resistensi tinggi terhadap logam berat di sekitarnya. Isolat *Bacillus* yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari sungai Kalimas Surabaya yang diketahui telah tercemar merkuri antara 0,105 hingga 6,38 mg/L [15] dan resisten terhadap 25 mg/L HgCl_2 [16], sehingga *Bacillus* yang diuji pada penelitian ini memiliki toleransi yang baik terhadap logam, sebab Hg merupakan logam berat yang paling toksik dibandingkan logam berat lainnya. Mikroba yang hidup pada lingkungan kaya logam cenderung lebih resisten terhadap logam berat daripada yang hidup di lingkungan tidak kaya logam [17]. Resistensi tersebut melalui mekanisme adaptasi [18], hal ini karena adanya perbedaan kromosomal, transposon, dan plasmid yang mengatur sistem resistensi pada masing-masing bakteri [14]. Pada dasarnya, populasi mikroorganisme yang resisten terhadap logam melibatkan perubahan kelarutan dari logam tersebut melalui reduksi, akumulasi, dan immobilisasi in-situ [14]. Menurut [18] salah satu mekanisme resistensi pada bakteri terhadap logam adalah adanya protein RND (*Resistance, Nodulation, Cell Division*) yang mengatur transportasi logam melalui membran sel. Pada *Bacillus subtilis* pengambilan Fe diatur oleh protein Fur. Dalam kondisi lingkungan yang kaya akan Fe, protein Fur menekan sistem pengambilan Fe [19].

B. Viabilitas *Bacillus* Pada Medium Tercekam Logam Fe

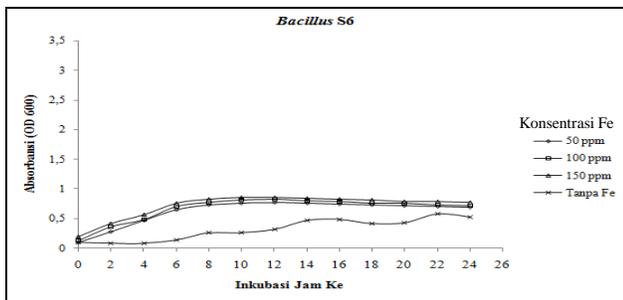
Kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* dalam medium *nutrient broth* yang tercekam logam Fe digunakan untuk mengetahui kemampuan hidup (viabilitas) isolat pada medium yang terpapar logam Fe. Konsentrasi Fe yang digunakan untuk uji viabilitas adalah 50, 100, dan 150 mg/L Fe-*nutrient broth*. Semua isolat *Bacillus* mempunyai kemampuan hidup pada medium terpapar logam Fe dapat dilihat dari hasil kurva pertumbuhan (Gambar 2-5).



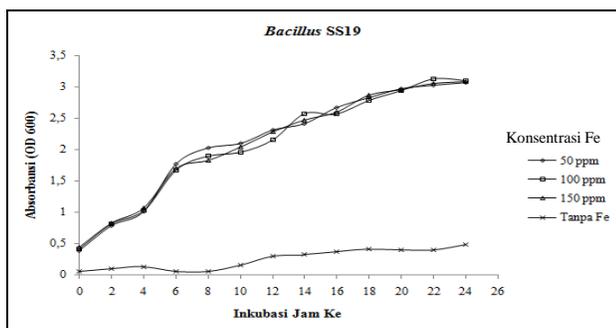
Gambar 2. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* A6 yang Terpapar Logam Fe.



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* DA11 yang Terpapar Logam Fe.



Gambar 4. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* S6 yang Terpapar Logam Fe.



Gambar 5. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* SS19 yang Terpapar Logam Fe.

Berdasarkan pola pertumbuhan pada Gambar 2-5, pada *Bacillus* A6, DA11, dan SS19 menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir serupa, sedangkan isolat *Bacillus* S6 memiliki pola pertumbuhan yang berbeda. Nilai OD paling tinggi berkisar pada nilai 3,25 (pengenceran 5x) pada semua konsentrasi logam Fe dan untuk isolat *Bacillus* S6 berkisar pada nilai OD 0,85 (tanpa pengenceran). Nilai OD tersebut

lebih tinggi dibandingkan dengan nilai OD isolat *Bacillus* yang ditumbuhkan pada medium *nutrient broth* tanpa terpapar logam yang berkisar antara 0,5 - 0,6 Å (tanpa pengenceran). Nilai OD semakin tinggi seiring meningkatnya konsentrasi logam Fe. Hal tersebut dapat terjadi karena *Bacillus* resisten terhadap 300 mg/L Fe-*nutrient agar* sehingga dalam medium *nutrient broth* tercekam logam Fe, *Bacillus* masih mampu tumbuh dengan baik. Hal tersebut disebabkan logam besi (Fe) merupakan komponen pigmen sitokrom pada respirasi seluler [20] dan sebagai kofaktor enzim [21] serta karena adanya protein Fur yang menekan sistem pengambilan Fe berlebih saat kondisi lingkungan bakteri kaya akan Fe [19].

Kurva pertumbuhan *Bacillus* S6 menunjukkan pertumbuhan yang paling rendah jika dibandingkan dengan ketiga isolat *Bacillus* lainnya. Hal ini dapat terjadi karena setiap organisme mempunyai respon genetik yang berbeda terhadap lingkungan sekitar termasuk bakteri. *Bacillus* S6 merupakan satu genus dengan A6, DA11, dan SS19, dengan adanya pola pertumbuhan yang berbeda kemungkinan *Bacillus* S6 berbeda spesies dengan *Bacillus* A6, DA11, dan SS19 [10]. Pada uji resistensi *Bacillus* S6 menunjukkan pertumbuhan yang kurang baik pada konsentrasi 75 mg/L Fe-*nutrient agar* demikian juga untuk konsentrasi yang lebih tinggi. Hal tersebut dapat dikarenakan adaptasi kromosomal, transposon dan plasmid pada *Bacillus* S6 yang kurang baik terhadap cekaman logam Fe [14]. Berdasarkan hasil kurva pertumbuhan ini, tiga isolat *Bacillus* uji yang memiliki kemampuan viabilitas baik dalam medium terpapar Fe yaitu *Bacillus* A6, DA11, dan SS19.

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Isolat *Bacillus* A6, DA11, S6, dan SS19 resisten terhadap logam besi (Fe) sampai dengan 300 mg/L pada medium Fe-*nutrient ngar*. Semua isolat *Bacillus* memiliki kemampuan viabilitas yang baik kecuali isolat *Bacillus* S6 dalam medium Fe-*nutrient broth* yaitu *Bacillus* A6, DA11, dan SS19.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis S. T. F mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, MP atas dukungan penelitian melalui pendanaan PNPB ITS tahun anggaran 2015 sesuai nomor kontrak 003246.IT2.11/PN.08/2015.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. Yudo, "Kondisi Pencemaran Logam Berat di Perairan Sungai DKI Jakarta," (2006) JAI 2: No 1.
- [2] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl, and D. P. Clark, "Brock Biology of Microorganims," San Francisco: Pearson Education (2012).
- [3] Prescott, Harley, and Klein, "Microbiology, Seventh Edition," New York: McGraw-Hill (2008).
- [4] I. Sheramati and A. Varma, "Soil Biology: Soil Heavy Metals," New York: Springer Heidelberg Dordrecht (2010).
- [5] K. Chojnacka, "Biosorption and Bioaccumulation-The Prospects for Practical Applications", (2010) Environment International 36: 299-307.
- [6] R. Saraswati dan E. Yuniarti, "Metode Analisis Biologi Tanah", Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian (2007).

- [7] E. Zulaika, L. Sembiring, and A. Soegianto, "Characterization and Identification of Mercury-resistant Bacteria From Kalimas River Surabaya-Indonesia By Numerical Phenetic Taxonomy", (2012) Journal of Basic and Applied Scientific Research 2 (7): 7263-7269.
- [8] R. Kanwal, T. Ahmed, S. S. Tahir, and N. Rauf, "Resistance of *Bacillus cereus* and *E. coli* Towards Lead, Copper, Iron, Manganese and Arsenic", (2004) Pakistan Journal of Biological Sciences 7: 6-9.
- [9] K. Elder, D. Baker, and J. Ribes, "Infections, Infertility, and Assisted Reproduction", Cambridge: Cambridge University Press (2005).
- [10] M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, and E. Stackebrand, "The Prokaryotes: A Handbook on The Biology of Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria", Springer Science Business Media (2006).
- [11] A. K. Patel, M. K. Deshattiwari, B. L. Chaudari, and S. B. Chincholkar, "Production, Purification, and Chemical Characterization of The Catecholate Siderophore from Potent Probiotic Strains of *Bacillus* sp.", (2008) Bioresource Technology 100: 368-373.
- [12] Harley and Prescott, "Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition", The McGraw-Hill Companies (2002).
- [13] V. Baby, S. Rajakumar, and P. M. Ayyasamy, "Prevalence and Screening of Potential Fe(III) and Mn(VI) Resistant Microorganisms in Industrial Soil", (2014) International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology Vol. 3: 7.
- [14] V. Baby, S. Rajakumar, and P. M. Ayyasamy, "Reduction of Ferric Iron in Synthetic Medium Amended with Acetate As A Sole Carbon Source", (2013) International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences Vol. 2 No. 12: 501-513.
- [15] E. Zulaika, U. Sholikah, dan A. Prasetya, "Potensi Bakteri *Bacillus* Sebagai Agen Bioremediasi Limbah Industri yang Mengandung Merkuri", (2012) Seminar Pemetaan Potensi dan Inovasi Ilmu Pengetahuan, Teknologi, Seni dan Budaya (IPTEKSB).
- [16] E. Zulaika, L. Sembiring, dan A. Soegianto, "Characterization and Identification of Mercury-resistant Bacteria From Kalimas River Surabaya-Indonesia By Numerical Phenetic Taxonomy", (2012) Journal of Basic and Applied Scientific Research 2 (7): 7263-7269.
- [17] R. Kumar, Nongkhaw, C. Acharya, and S. R. Joshi, "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", (2013) Indian Journal of Biotechnology Vol. 12: 115-119.
- [18] C. Nithya, B. Gnanalakshmi, and S. K. Pandian, "Assesment and Characterization of Heavy Metal Resistance in Palk Bay Sediment Bacteria", (2011) Marine Environmental Research: 283-294.
- [19] M. Fuangthong, A. F. Herbig, N. Bsath, dan J. D. Helmann, "Regulation of The *Bacillus subtilis fur* and *perR* Genes by PerR: Not All Members of The PerR Regulon Are Peroxide Inducible", (2002) Journal of Bacteriology: 3276-3286.
- [20] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl, and D. P. Clark, "Brock Biology of Microorganisms", San Fransisco: Pearson Education (2012).
- [21] Prescott, Harley, Klein, "Microbiology, Seventh Edition", New York: McGraw-Hill (2008).