

Pengaruh $HgCl_2$ terhadap Viabilitas *Bacillus* S1 dan Potensi Enzim Pendegradasi Senyawa Organik

Wahyu Dewi Ifिता, Maya Shovitri dan Enny Zulaika
 Jurusan Bilogi, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
 Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: ennv@bio.its.ac.id

Abstrak—Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui viabilitas *Bacillus* S1 terhadap paparan $HgCl_2$ 2,5 mg/L selama 36 jam dan aktivitas enzim amilase, protease, selulase dan lipase. Penentuan viabilitas dilakukan dengan menghitung CFU *Bacillus* S1 yang ditumbuhkan pada medium NA setelah terpapar $HgCl_2$ 2,5 mg/L dengan metode *pour plate*, sedangkan aktivitas enzim ditentukan dengan menumbuhkan *Bacillus* S1 pada medium spesifik dan diamati zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. Hasil penelitian menunjukkan bahwa viabilitas *Bacillus* S1 terhadap paparan $HgCl_2$ 2,5 mg/L mengalami penurunan dalam kurun waktu 36 jam dari $4,7 \times 10^8$ CFU/ml menjadi $0,6 \times 10^8$ CFU/ml. *Bacillus* S1 mampu menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase.

Kata Kunci—*Bacillus* S1, viabilitas, merkuri, aktivitas enzim.

I. PENDAHULUAN

Merkuri merupakan logam berwarna perak dan bersifat cair dalam suhu ruang. Merkuri dapat berikatan secara kimiawi dengan elemen lain menjadi bentuk organik dan anorganik [1]. Merkuri dalam bentuk anorganik (Hg^{2+}) dapat mengakibatkan kerusakan pada ginjal, kardiovaskular dan organ pencernaan [2]. Sedangkan dalam bentuk organik (CH_3Hg) dalam konsentrasi yang tinggi dapat mengakibatkan kerusakan pada sistem pusat saraf dan perkembangan otak [3]. Rujukan [4] merkuri memasuki sistem peredaran darah dan terakumulasi di otak, tubuh menanggapi dengan mengoksidasi merkuri menjadi gas dan mengakumulasinya di ginjal sehingga terjadi kerusakan ginjal.

Beberapa jenis bakteri diketahui mempunyai kemampuan mereduksi atau menyerap logam berat [5]. Rujukan [6] bakteri yang tahan terhadap cekaman merkuri disebut bakteri resisten merkuri (BRM). Mekanisme yang terdapat dalam BRM untuk mendetoksifikasi merkuri salah satunya dengan mengubah Hg^{2+} menjadi Hg^0 dengan enzim merkuri reduktase yang dikode gen *merA* [7]. *Bacillus* merupakan bakteri yang ditemukan di berbagai lokasi seperti tanah [8], danau [9], dan laut [10]. *Bacillus* yang resisten merkuri dapat mereduksi kadar merkuri dari lingkungannya. *Bacillus megaterium* adalah BRM yang mampu mereduksi kadar merkuri sampai 98% [11].

Genus *Bacillus* juga merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim amilase [12], lipase [13], protease [14] dan selulase [15]. Enzim amilase, lipase, protease dan selulase

merupakan enzim yang dibutuhkan dalam perombakan senyawa organik seperti karbohidrat, selulosa, lipid, dan protein menjadi bentuk yang lebih sederhana [16]

Isolat *Bacillus* S1 merupakan isolat bakteri koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS yang diisolasi dari hilir sungai Kalimas yang tercemar merkuri dengan konsentrasi yang melebihi ambang batas, yakni 6,38 mg/L [17]. *Bacillus* S1 merupakan BRM yang berpotensi dikembangkan sebagai agen bioremediasi merkuri, disamping itu genus *Bacillus* mampu menghasilkan amilase, lipase, protein dan selulase sehingga bakteri dari genus *Bacillus* S1 dapat digunakan sebagai pengurai senyawa organik yang banyak terdapat pada limbah padat maupun cair.

II. METODE PENELITIAN

A. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

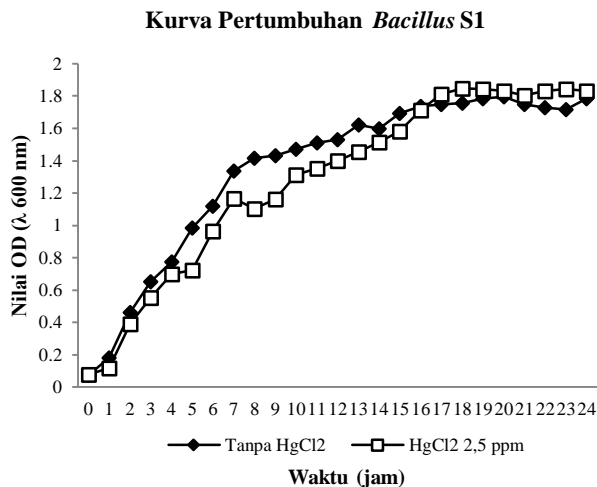
Kultur *Bacillus* S1 sebanyak 25 ml berumur umur <24 jam diinokulasikan ke 225 ml media cair *Nutrient Broth* (NB). Sebanyak 2 ml kultur dimasukkan dalam kuvet dan diukur nilai *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 600 nm. Pengukuran OD dimulai dari jam ke-0 hingga 24 jam dengan selang waktu 1 jam. Data OD yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu *x* sebagai waktu (*t*) dan sumbu *y* sebagai nilai OD. Setelah diketahui fase pertumbuhannya, maka dapat ditentukan umur starter (μ) yaitu diambil dari nilai pertengahan fase eksponensial [18].

B. Viabilitas *Bacillus* S1

Viabilitas *Bacillus* S1 diamati dengan menghitung CFU/ml. Pengamatan viabilitas dilakukan setelah pemaparan $HgCl_2$ 2,5 mg/L pada jam ke-6, jam ke-12, jam ke-18, jam ke-24, jam ke-30 dan jam ke-36. Satu ml kultur uji diambil secara aseptis dan diencerkan secara bertingkat hingga 10^{-6} dan ditumbuhkan pada media NA secara *pour plate* [18]. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan formulasi jumlah koloni dikali faktor pengenceran (CFU/ml).

C. Uji Potensi Aktivitas Enzim

Uji potensi aktivitas enzim amilase, selulase, lipase dan protease dilakukan secara kualitatif dengan menumbuhkan isolate *Bacillus* S1 pada medium spesifik. Medium NA-amilum 0,5% untuk uji amilase, medium NA-susu skim 2%



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* S1

untuk uji protease [18], medium CMC untuk uji selulase [19] dan medium Tween 80 untuk uji lipase [20]. Setelah inokulasi kemudian diinkubasi 24-48 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni menunjukkan adanya aktivitas enzim. Pada medium NA-amilum 0,5% ditetaskan larutan iodin dan pada medium CMC ditetaskan *congo red* 1% untuk mempertegas zona bening yang terbentuk.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

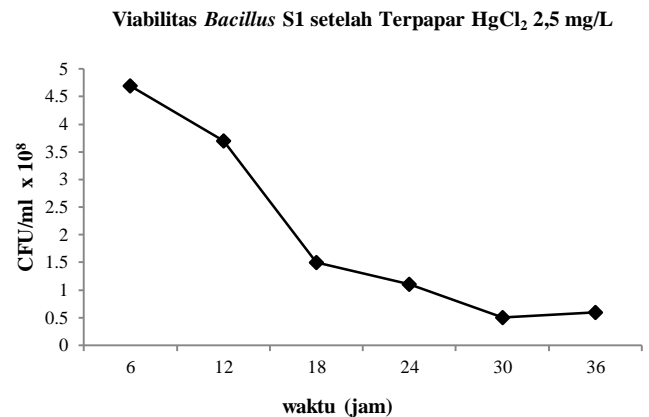
A. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* S1

Pada kurva pertumbuhan *Bacillus* S1 dengan medium NB tidak menunjukkan adanya fase lag, karena pada masa persiapan kultur, *Bacillus* S1 sudah beradaptasi sehingga pada saat pengukuran OD langsung menunjukkan peningkatan kepadatan sel. Rujukan [21] menyebutkan bakteri yang dikultur pada media dan lingkungan yang sama seperti sebelumnya, tidak memerlukan adanya masa adaptasi. Sedangkan pada pertumbuhan *Bacillus* S1 dengan medium NB-HgCl₂ 2,5 mg/L, kondisi mediumnya tidak sama dengan medium sebelumnya dan mengakibatkan adanya fase lag di 1 jam pertama pada kurva pertumbuhan (Gambar 1).

Pada kurva pertumbuhan yang menggunakan media NB, fase eksponensial terjadi setelah jam ke-0 sampai dengan jam ke-17, sedangkan pada medium NB-HgCl₂ 2,5 mg/L fase eksponensial dimulai pada jam ke-1 sampai jam ke-17. Fase eksponensial merupakan fase dimana bakteri dalam pertumbuhan yang stabil, sel-sel baru terbentuk dengan laju yang konstan dan sel-sel bakteri membelah secara optimum [22]. Fase stasioner berlangsung setelah jam ke-17 sampai jam ke-24 baik pada kultur NB maupun NB-HgCl₂ 2,5 mg/L. Tidak terlihat adanya fase kematian karena pengamatan hanya dilakukan sampai jam ke-24 dan yang teramati masih fase stasioner.

B. Viabilitas *Bacillus* S1

Viabilitas merupakan tingkat ketahanan dan kemampuan hidup dari suatu organism termasuk bakteri pada



Gambar 2. Viabilitas *Bacillus* S1

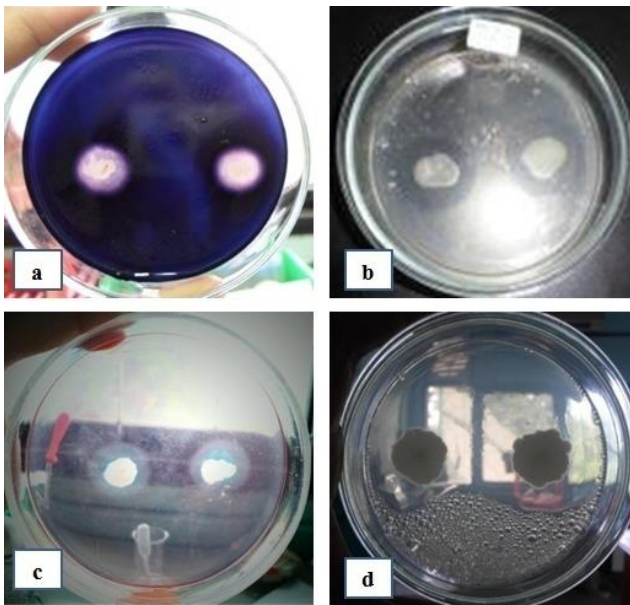
lingkungan yang baru [23]. CFU *Bacillus* S1 setelah paparan 6 jam dan 12 jam relatif sama ($3,7-4,7 \times 10^8$ CFU/ml), setelah 18 jam dan 24 jam umlah CFU menurun dari waktu kultur 6 jam dan 12 jam. Hal ini sesuai dengan kurva pertumbuhan pada media NB-HgCl₂ 2,5 mg/L bahwa fase eksponensial terjadi pada jam ke 1 – 17. Setelah jam ke-18 pada kurva pertumbuhan menunjukkan fase stasioner, CFU setelah paparan 18 dan 24 jam menunjukkan jumlah CFU menurun ($1,1-1,8 \times 10^8$ CFU/ml), setelah 24 jam jumlah CFU pada paparan 30 jam dan 36 jam menurun drastic menjadi $0,5 - 0,6 \times 10^8$, hal ini mengindikasikan terjadi fase kematian (Gambar 2).

C. Uji Enzimatis pada *Bacillus* S1

Bacillus S1 mampu menghasilkan zona bening pada media NA-amilum 0,5%, hal ini menunjukkan bahwa *Bacillus* S1 menghasilkan enzim amilase (Gambar 3.a). Rujukan [24] menyatakan bahwa enzim amilase merupakan enzim induksibel yang dapat dihasilkan jika terdapat induksi keberadaan amilum atau produk hidrolisisnya seperti maltose di dalam medium tumbuh. Rujukan [25] menyatakan spesies *Bacillus acidocaldarius* memiliki aktivitas enzim amilase yang mampu menghidrolisis amilum sebanyak 87% dan dapat mencapai 100% dengan substrat glikogen. Rujukan [18] menyebutkan hidrolisis amilum dengan amilase tidak akan menghasilkan perubahan warna pada media. Untuk mempertegas visualisasi zona bening hasil hidrolisis amilum digunakan indikator iodine. Iodin akan berikatan dengan penyusun amilum (monosakarida atau disakarida) yang menghasilkan warna biru sampai coklat. Zona bening yang terbentuk tidak akan terwarnai sehingga dapat dijadikan sebagai indikator terhidrolisisnya polisakarida karena munculnya enzim amilase yang disekresikan oleh *Bacillus* S1.

Bacillus S1 mampu menghasilkan enzim kaseinase yang membentuk zona bening atau zona proteolitik di sekitar koloni pada media NA-kasein (Gambar 3.b). Kaseinase merupakan enzim golongan protease yang dapat menghidrolisis kasein menjadi komponen yang lebih sederhana yaitu asam amino [18]. Zona bening yang muncul di sekitar koloni mengindikasikan adanya aktifitas enzim protease.

Bacillus S1 mampu menghasilkan zona bening pada medium *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Zona bening



Gambar 3. Zona Bening Aktifitas Enzim yang Dihasilkan *Bacillus* S1.
a. Amilase, b. Kaseinase, c. Selulase dan d. Lipase

adalah indikasi selulosa terhidrolisis oleh enzim selulase (Gambar 3.c). Penambahan *congo red* 1% sebagai indikator untuk memperjelas daerah zona bening di sekitar koloni [26]. CMC merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air sehingga mudah dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi gula sederhana [27]. Enzim selulase merupakan enzim selulolitik yang mampu menghidrolisis selulosa menjadi glukosa [28], dapat disimpulkan *Bacillus* S1 memiliki enzim selulolitik.

Pada uji enzim lipase digunakan metode yang dilakukan oleh Kumar [20] dengan medium yg mengandung komposisi NaCl, CaCl, pepton, agar dan *Tween* 80, hasilnya tidak dapat diketahui apakah terdapat aktifitas enzim lipase, sebab tidak terlihat zona bening atau perubahan warna di sekitar koloni (Gambar 3.d). Rujukan [28] menyatakan metode penentuan aktifitas lipolitik dari lipase dilakukan dengan menambahkan indikator pewarna seperti *phenol red*. Aktifitas enzim lipase ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari merah menjadi kuning-oranye di sekitar koloni. Pada penelitian ini tidak terjadi perubahan warna ada media, sehingga *Bacillus* S1 belum diketahui apakah memiliki enzim lipase atau tidak.

IV. KESIMPULAN

Bacillus S1 mampu tumbuh pada medium NA setelah terpapar HgCl_2 2,5 mg/L pada interval waktu 6 jam selama 36 jam dengan jumlah sel sebanyak $0,5 - 4,7 \times 10^8$ CFU/ml. *Bacillus* S1 menghasilkan enzim amilase, kaseinase (protease) dan selulase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Diniyah dan Pondok Pesantren KEMENAG RI yang telah memberikan dukungan finansial melalui Program Beasiswa Santri Berprestasi 2009-2014. Penulis juga

menyampaikan terimakasih kepada Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si. dan Dr. Enny Zulaika, MP, rekan-rekan laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, serta civitas akademik Jurusan Biologi-ITS.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] EPA. "Organic Mercury : TEACH Chemical Summary". United States : Environmental Protection Agency (2006) .
- [2] Risher, J. F. "Elemental Mercury and Inorganic Mercury Compounds : Human Health Aspects". Geneva :WHO (2003).
- [3] Guynup, S. "Mercury : Sources in Environment, Healt Effects and Politics" New York : Blue Ocean Institute (2010).
- [4] Griesbauer, L. (2012, Nopember 17) Methylmercury Contamination in Fish and Shellfish. [online]. Available :<http://www.csa.com>
- [5] Bourquin, A. W. "Bioremediation of Hadzarous Waste Biofutura" (1990). p 24 – 35.
- [6] De, J. dan N, Ramaiah. "Characterterization of Marine Bacteria Highly Resistant to Mercury Exhibiting Multiple Resistances to Toxic Chemicals". *Ecological Indicators*, 7 (2007) : 511 – 520.
- [7] Barkay, T., S. M. Miller dan A. O. Summers. "Bacterial Mercury Resistance from Atom to Ecosystems". *FEMS Microbiology Reviews*, 27 (2003) : 355-384
- [8] Medina, J.A.C., J.E. Farias, A.C. Hernandez, R.G Martinez, S. S. Valdes, G. H. Silva, G. H. Jones dan J. Campos-Guillen. "Isolation and Characterization of Mercury Resistant *Bacillus* sp. from Soil with an Extensive History as Substrates for Mercury Extraction in Mexico". *Geomicrobiology Journal*, 30 (2013): 454-461.
- [9] Kannan, S. K. dan R. Krishnamoorthy. "Isolation of Mercury Resistant Bacteria and Influence of Abiotic Factors on Bioavailability of Mercury – A Case Study in Pulikat Lake North of Chennai, South East India". *Science of Total Environment*, 367 (2005): 341 – 353.
- [10] Francois, F., C. Lombard, J. Guigner, P. Soreau, F. Brian-Jaisson, G. Martino, M. Vandervennet, D. Garcia, A. Molinier, D. Pignol, J. Peduzzi, S. Zirah dan S. Rebuffa. "Isolation and Charactization of Environmental Bacteria Capable of Extracellular Biosorption of Mercury". *Applied and Environmental Microbiology*, (2011) p.1097-1106
- [11] Badjoeri, M. "Uji Kemampuan *Bacillus megaterium* Menyerap Logam Berat Merkuri". *Jurnal Kimia Mulawarman*, 1 (2008): 5 – 11
- [12] Gurudeban, S., K. Satyavani dan T. Ramanathan. "Production of Extra Cellular α -amylase using *Bacillus megaterium* isolated from White Mangrove (*Avicennia marina*)". *Asian Journal of Biotechnology*, 3 (2011): 310-316
- [13] Sekhon, A., N. Daniya, R. P. Tewari dan G. S. Hoondal. "Production of Extracellular Lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 in Submerged Fermentation". *Indian Journal of Biotechnology* Vol 5 (2006) pp 179-183
- [14] Rajkumar. R., K. R. Jayappryan., P. R. Kannan, dan R, Rengasamy. "Optimization of Culture Conditions for Production of Protease From *Bacillus megaterium*". *Journal of Ecobiotechnology*. Vol 2. (2010). 40-46.
- [15] Pelletier, A dan J. Sygusch. "Purification and Characterization of Three Chitosanase Activities from *Bacillus megaterium* PI". *Applied and Environmental Microbiology*, (1990) :844-848.
- [16] Haq, P. S. E. dan E. S. Soedjono. "Potensi Lumpur Tinja Manusia Sebagai Penghasil Biogas". (2009) Jurusan Teknik Lingkungan FTSP-ITS.
- [17] Widiyanti, A. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Resisten Merkuri di Hilir Kali Mas Surabaya. Tugas Akhir. (2011) Surabaya : Jurusan Biologi FMIPA-ITS.
- [18] Harley, J. P. dan L. M Prescott. "Laboratory Exercise in Microbiology, 5th Edition". New York : The Mc Graw Hill Companies (2002).
- [19] Florencio, C., Couri, S. dan Farinas, C. S. "Correlation between Agar Plate Sreening and Solid-State Fermentation for Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains". *Enzyme Research*, (2012) 793708 : 1 – 7
- [20] Kumar, D., L. Kumar, S. Nagar, C. Raina, R. Parshad dan V. K. Gupta. "Screening, Isolation and Production of Lipase/Esterase *Bacillus* sp. Strain DVL2 and its Potential Evaluation in Esterification and Resolution Reactions". *Archives of Applied Science Research*, Vol 4 (2012) : 1763 – 1770.

- [21] Middlebeek, E.J., R.O. Jenkins and J.S. Drijver-de Haas. *Growth in batch culture. In Vitro Cultivation of Micro-organisms*. Biotechnology by Open Learning (1992)
- [22] Hogg, S. "Essential Microbiology". United Kingdom : John Wiley & Sons (2005)
- [23] Sobariah, E. "Viabilitas Bakteri Probiotik *In Vitro* dan Pengaruh Pemberian Air Beroksigen terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik secara *In Vivo*". Tesis. Bogor : Pasca Sarjana IPB (2007)
- [24] Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami dan B. Chauhan. "Microbial α -amylases : a Biotechnological Perspective". *Process Biochemistry*, 00 (2003): 1-18.
- [25] Buonocore, V., C. Caporale, M. De Rosa dan A. Gambacorta. "Stable, Inducible Thermoacidophilic α -Amylase from *Bacillus acidocaldarius*". *Journal of Bacteriology*, 2 (1976): 515-521
- [26] Apun, K. "Cellulase Production - Practical Biotechnology". Malaysia : National Centre for Biotechnology Education (1995).
- [27] Jo, K., Y. Lee, B. Kim, B. Lee, C. Chung, S. Nam, S. Kim dan J. Lee. "Pilot-scale Production of Carboxymethylcellulase from Rice Hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13 (2012):182 – 188.
- [28] Sharma, S., A. Shrestha. dan B. Rai. "Screening, Optimization and Pilot Scale Production of Enzyme Lipase in a Bioreactor from *Aspergillus* Spesies". Lalitpur : White House Institute of Science and Technology (2012).