

Resistensi *Azotobacter* terhadap HgCl_2 yang Berpotensi Menghasilkan Enzim Merkuri Reduktase

Anjar Lulu Sakinah 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

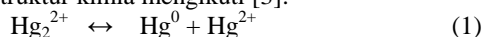
Abstrak—Merkuri adalah logam berat yang sangat toksik dan berbahaya. Beberapa bakteri dapat hidup di habitat yang tercemar merkuri disebut bakteri resisten merkuri, satu diantaranya adalah *Azotobacter*. Tujuan penelitian adalah mendapatkan isolat unggul *Azotobacter* dari lahan *Eco Urban Farming* ITS yang resisten terhadap HgCl_2 yang berpotensi menghasilkan enzim merkuri reduktase. Isolasi dilakukan menggunakan media selektif *Azotobacter* agar. Pengujian resistensi merkuri dilakukan dengan metode goresan agar miring yang mengandung HgCl_2 . Kurva pertumbuhan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm. Hasil isolasi mendapatkan 10 isolat *Azotobacter* resisten HgCl_2 . Isolat A5, A6 dan A9 mempunyai resistensi tertinggi pada penambahan HgCl_2 20 mg/L. Pada A7, A10 dan *A. chroococcum* resisten mencapai 15 mg/L sedangkan A1a resisten mencapai 10 mg/L. Sedangkan yang hanya resisten sampai 5 mg/L adalah isolat A1b, A2, A3, dan A8. Dari kesepuluh isolat yang berpotensi menghasilkan enzim merkuri reduktase adalah isolat yang mempunyai resisten tertinggi yaitu isolat A5 dan A9.

Kata kunci--*Azotobacter*, enzim merkuri reduktase, gen *mer operon*, Merkuri HgCl_2 .

I. PENDAHULUAN

MERKURI mempunyai toksisitas yang tinggi untuk semua organisme karena kekuatan afinitas terhadap grup thiol dalam protein [1]. Merkuri dapat menyebabkan kerusakan otak, kerusakan syaraf motorik, *cerebral palsy*, dan retardasi mental. Keracunan Hg yang akut dapat menyebabkan terjadinya kerusakan saluran pencernaan, gangguan kardiovaskuler, kegagalan ginjal akut maupun *shock* [2]. Ambang batas minimal merkuri yang telah ditetapkan Pemerintah melalui Peraturan Pemerintah Republik Indonesia no.82 tahun 2001 adalah 0,001 mg/L.

Di alam, merkuri terbagi menjadi tiga bentuk yaitu Hg^0 (metalik merkuri), Hg^{2+} (merkurik merkuri) dan Hg_2^{2+} (mercurous merkuri). Ketiga bentuk merkuri tersebut menjaga keseimbangan struktur kimia mengikuti [3]:



Merkuri mempunyai toksisitas yang tinggi untuk semua organisme karena kekuatan afinitas terhadap grup thiol dalam protein [1].

Bakteri resisten merkuri adalah bakteri yang resisten merkuri di lingkungan habitatnya, baik yang bersifat bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Resistensi merkuri oleh

bakteri disebabkan adanya gen *mer operon* yang terdiri dari 2 tipe yaitu *mer* spektrum sempit yang hanya resisten merkuri anorganik dan *mer* spektrum luas yaitu resisten terhadap merkuri organik dan merkuri anorganik [4]. Gen *mer operon* terdapat di plasmid [5], kromosom, transposons, dan integron [3]. Bakteri dikatakan resisten terhadap merkuri jika mampu tumbuh pada medium yang mengandung merkuri lebih dari 5 mg/L [6].

Gen *mer operon* terdiri dari gen-gen struktural di antaranya gen merkuri reduktase (*merA*) dan gen transport protein yaitu *merT* dan *merP* yang bersebelahan oleh *merR* dan *merD* yang melibatkan regulasi ekspresi gen struktural dalam respon ion garam merkuri [4]. *MerA* mempunyai fungsi mereduksi ion merkuri yang toksik menjadi logam merkuri Hg^0 yang kurang toksik dan mudah menguap pada suhu kamar, sedangkan gen *merB* mempunyai fungsi mengkatalisis pemutusan ikatan merkurikarbon sehingga dihasilkan senyawa organik dan ion Hg^{2+} [7].

Azotobacter adalah bakteri yang banyak dijumpai di rhizosfer tanah melimpah di tanah pertanian. *Azotobacter* mampu menambat N_2 bebas di atmosfer sehingga dapat digunakan sebagai *biofertilizer* dan merupakan bakteri aerob [8]. *Eco Urban Farming* di ITS merupakan lahan kebun sayur sebagai wujud kontribusi ITS dalam melaksanakan program *Eco Campus* [9]. Pada lahan kebun sayur tersebut diasumsikan terdapat bakteri fiksasi N_2 di rhizosfer tanah, salah satunya adalah *Azotobacter*. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan isolat unggul *Azotobacter* yang resisten tinggi terhadap HgCl_2 yang berpotensi menghasilkan enzim merkuri reduktase.

II. URAIAN PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Maret 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS.

A. Isolasi *Azotobacter*

Sampel tanah diambil dari lahan *Eco Urban Farming* ITS 10 gram tanah dimasukkan kedalam 90 ml akuades steril, selanjutnya dibuat seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} kemudian ditumbuhkan pada media selektif *Azotobacter* agar (*High selective media* M372-500G) dengan 0,1 mg/L HgCl_2 dengan metode spread dan diinkubasi pada suhu ruang. Koloni yang

tumbuh diamati karakteristik koloninya dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Azotobacter chroococcum*. Koloni yang diduga *Azotobacter* dimurnikan dengan metode 16 gores pada media *Nutrient Agar* dan dilakukan pewarnaan *methylen blue* untuk pengamatan kemurnian *Azotobacter*. Dilakukan pewarnaan gram dan pewarnaan kista untuk memastikan bahwa isolat tersebut adalah *Azotobacter*.

B. Uji resistensi HgCl₂

Isolat *Azotobacter* ditumbuhkan pada media *Azotobacter* agar dan ditambahkan HgCl₂ sesuai konsentrasi uji yaitu 0,5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L dan seterusnya sampai konsentrasi yang mampu ditoleransi *Azotobacter* dengan interval selanjutnya 5 mg/L. Diinkubasi 24 jam pada suhu ruang.

C. Pembuatan kurva pertumbuhan genera *Azotobacter*

Azotobacter ditumbuhkan pada media NB- HgCl₂ 0,1 mg/L dan diinkubasi diatas *rotary shaker* (100 rpm). Setiap selang 1 jam, diambil 2 ml dan diukur nilai kerapatan optik (*OD*; *Optical Density*) pada panjang gelombang (λ) 600 nm). Pengukuran OD dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Isolasi *Azotobacter*

Hasil isolasi *Azotobacter* didapatkan 10 isolat yang diberi kode A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Koloni yang berwarna krem sampai coklat adalah isolat yang diidentifikasi sebagai *A. chroococcum*. Perubahan warna koloni karena mekanisme pengikatan nitrogen bebas dengan indikator bromtimol biru dan Isolat *A. chroococcum* akan melakukan metabolisme dengan memanfaatkan mannitol sebagai sumber karbon (C) dan mengubah pH media menjadi asam (pH rendah) ditandai dengan perubahan warna biru menjadi krem-coklat [10]. Selain itu pada media agar *Azotobacter* ditambahkan molibdenum (Na₂MoO₄) sebagai kofaktor yang sangat esensial yang diperlukan untuk metabolisme N bakteri [11]. Molibdenum adalah logam yang dibutuhkan untuk *Azotobacter*.

Tabel 1.
Generic assignment isolat Azotobacter uji

Karakter	Kode isolat									
	A1a	A1b	A2	A3	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Bentuk sel basil-kokus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ukuran sel 1,5-2,0 μ m	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Membentuk kista	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram negatif	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fiksasi nitrogen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Membutukan Molibdenum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B. Uji Resistensi HgCl₂

Pengujian resistensi 10 isolat *Azotobacter* terhadap HgCl₂ dimulai dengan konsentrasi terendah sebesar 0,5 mg/L, kemudian dilanjutkan dengan konsentrasi 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 15 mg/L, dan 20 mg/L. Isolat yang tumbuh pada media

yang mengandung HgCl₂ merupakan *Azotobacter* yang resisten terhadap merkuri. Hasil uji resistensi ditampilkan pada Tabel 2. Pada konsentasi 5 mg/L kesepuluh isolat mampu tumbuh dengan baik, hal ini menunjukkan 10 sudah termasuk bakteri resisten merkuri (BRM). Bakteri dikatakan resisten terhadap merkuri jika mampu tumbuh pada medium yang mengandung merkuri lebih dari 5 mg/L [12].

Tabel 2.
Persentase (%) tumbuh hasil uji resistensi HgCl₂

Kode Isolat	Konsentrasi HgCl ₂ (mg/L)				
	0.5	5	10	15	20
A1a	100	60	50	-	-
A1b	100	100	-	-	-
A2	100	100	-	-	-
A3	100	80	-	-	-
A5	100	90	100	50	50
A6	100	100	100	50	25
A7	100	90	100	50	-
A8	100	80	-	-	-
A9	100	100	80	35	30
A10	100	100	80	60	-
<i>Azotobacter chroococcum</i>	100	100	50	50	-

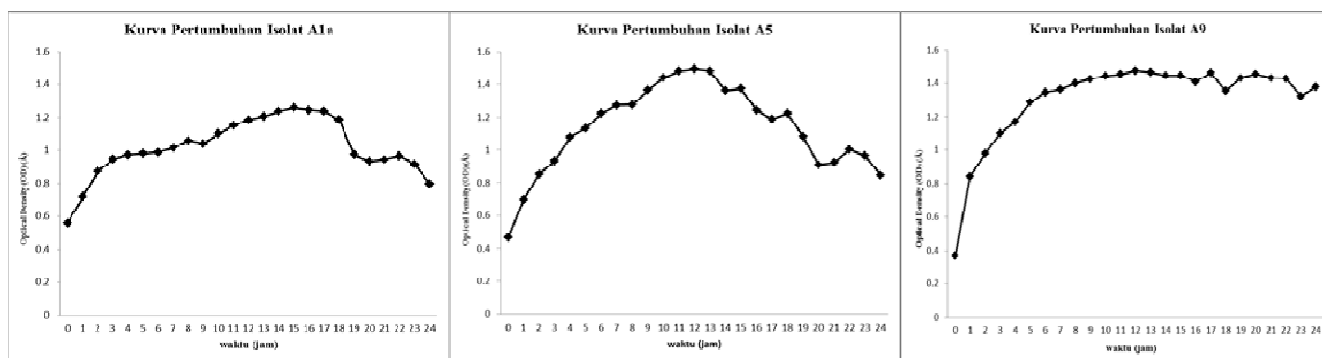
*inkubasi dilakukan 48 jam

Pada konsentrasi HgCl₂ 10 mg/L hanya 6 isolat ditambah isolat kontrol *A. chroococcum* yang mampu tumbuh yaitu A1a dengan pertumbuhan 50%, isolat *Azotobacter* A5, A6 dengan pertumbuhan 100%, isolat *Azotobacter* A7, A9, dan A10 tumbuh dengan 100% serta *A. chroococcum* mencapai 50%. Selanjutnya yang digunakan sebagai isolat yang berpotensi memproduksi enzim merkuri reduktase adalah isolat yang 100% resisten pada konsentrasi HgCl₂ 20 mg/L dengan karakter koloni yang berbeda diantaranya adalah isolat *Azotobacter* A5 dan A9, kemudian ditambah isolat *Azotobacter* A1 sebagai pembanding, sebab karakter koloni *Azotobacter* A1 yang mendekati kontrol *A. chroococcum* dan isolat kontrol *A. chroococcum*.

Bakteri resisten merkuri toleransi terhadap logam berat karena mempunyai gen yang mengontrol mekanisme resisten terhadap merkuri didalam kromosom, plasmid, atau transposon [13]. Secara umum ada dua kemampuan resistensi bakteri yaitu dengan mekanisme enzimatik dan mekanisme biosorpsi [14].

C. Kurva Pertumbuhan Genera *Azotobacter*

Hasil kurva pertumbuhan dilakukan pada 3 isolat *Azotobacter* uji ditampilkan pada Gambar 1. Pola pertumbuhan isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9 mempunyai pola pertumbuhan yang hampir sama yaitu fase lag merupakan fase adaptasi, pada kurva pertumbuhan tidak dijumpai sebab hasil pengukuran OD (*Optical Density*) dilakukan setelah melakukan subkultur pada media yang sama. Apabila subkultur dilakukan dalam keadaan fase eksponensial pada medium yang sama maka tidak akan terjadi fase lag dan secara cepat akan memasuki kedalam fase eksponensial [15]. Pada penelitian ini pemindahan inokulum *Azotobacter* dilakukan setelah 24 jam, pada medium yang sama sehingga langsung terjadi fase eksponensial dan tidak tampak adanya fase

Gambar. 1. Kurva pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A5 dan A9

adaptasi. Fase eksponensial pada isolat *Azotobacter* A5 dan A9 mempunyai pola hampir sama yaitu terjadi pada jam ke-1 sampai jam ke-13 berbeda dengan isolat *Azotobacter* A1a mempunyai fase eksponensial yang terjadi pada jam ke-1 sampai jam ke-17. Pertumbuhan sel pada fase eksponensial biasanya paling tinggi dibandingkan fase-fase yang lain pada pola pertumbuhan [15]. Selama pertumbuhan sel terjadi peningkatan massa sitoplasma pada saat fase eksponensial akibatnya massa sel akan meningkat pula [16]. Waktu pada fase eksponen kemudian dilakukan perhitungan rata-rata sebagai umur perlakuan.

Berdasarkan fase pertumbuhan, umur perlakuan untuk pengujian aktivitas enzim merkuri reduktase, lebih tepat dilakukan saat rata-rata fase eksponensial ketika dilakukan proses ekstraksi enzim, pada isolat *Azotobacter* A1a pada jam ke-9 isolat *Azotobacter* A5 dan A9 dilakukan pada jam ke-7. Kurva pertumbuhan ditampilkan pada Gambar 1.

IV. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah hasil dari isolasi *Azotobacter* yang resisten $HgCl_2$ dari lahan *eco urban farming* ITS adalah 10 isolat yaitu A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10. Pada isolat A5, A6 dan A9 resisten sampai 20 mg/L $HgCl_2$, isolat A7, A10 dan kontrol *A. chroococcum* resisten sampai 15 mg/L, isolat A1a resisten sampai 10 mg/L $HgCl_2$, isolat A1b, A2, A3 dan A8 resisten sampai 10 mg/L $HgCl_2$. isolat yang berpotensi memproduksi enzim merkuri reduktase adalah isolat yang 100% resisten pada konsentrasi $HgCl_2$ 20 mg/L dengan karakter koloni yang berbeda diantaranya adalah isolat *Azotobacter* A5 dan A9.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis A. mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, MP. selaku Dosen Pembimbing penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Takeuchi, F. and Sugio, T. 2006. Volatilization and Recovery of Mercury from Mercury Pluted Soils and Wastewater Using Mercury Resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strains SUG 2-2 and MON-1. *Research Microbiology*. 152: 503–514.
- [2] Sudarmaji, Mukono, J. dan I.P. Corie. 2006. Toksikologi Logam Berat B3 dan Dampaknya Terhadap Kesehatan. *Bagian Kesehatan Lingkungan FKM. Jurnal Kesehatan Lingkungan*.2(2) : 129-142.
- [3] Dash, H.R. and Das, S. 2012. Bioremediation of Mercury and Importance of Bacterial *Mer* Genes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 75: 207-213.
- [4] Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J., Hobman, J.L. and Wilson, J.R. 2003. Mercury Transport and Resistance. *Biochemical Society Transactions*. 30 (4): 715-718.
- [5] Fox, B. and Walsh, C.T. 1982. Mercuric Reduktase. Purification and Characterization of a Transposon-encoded Flavoprotein Containing an Oxidation Reductionactive Disulfide. *Journal Biology Chemistry*. 257: 2498-2503.
- [6] De, J., Ramaiah, N. and Vardanyan, L. 2008. Detoxification of Toxic Heavy Metals by Marine Bateria Highly Resistant to Mercury. *Marine Biotechnology*. 10: 471–477.
- [7] Barkay, T., Miller, S.M. and Summers, A.O. 2003. Bacterial Mercury Resistance from Atoms to Ecosystems. *FEMS Microbiological Reviews*. 27:355-384.
- [8] Sahlia, Basel M. 2010. The Effect of *Azotobacter chroococcum* as Nitrogen Biofertilizer on the growth and yield of *Cucumis Sativus*. Thesis *Master of Biological Sciences Botany*. The Islamic University: Gaza.
- [9] Institut Teknologi Sepuluh Nopember. 2013. ITS Eco Urban Farming. <https://www.its.ac.id/article/urban-farming/en->> [25 Nopember 2013. Pukul 19.15 WIB.]
- [10] Muhaimin, A.N., Siswanto, H.P., Tyasningsih, W. dan Suryanie. 2013. Perbedaan Warna Koloni *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Media Ekstrak Daging Sapi dan Sari Kacang Hijau yang Ditambah Sitrat dan *Bromthymol Blue*. *Veterinaria Medika*. Vol.6 (1). 9-14.
- [11] Armiadi. 2009. Peranan Unsur Hara Molibdenum Dalam Penambatan Nitrogen. *Wartazoa*. Vol.19 (3). 150-155.
- [12] De, J., Ramaiah, N. and Vardanyan, L. 2008. Detoxification of Toxic Heavy Metals by Marine Bateria Highly Resistant to Mercury. *Marine Biotechnology*. 10: 471–477.
- [13] Zulaika, E. and Sembiring, L. 2013. Indigenous Mercury Resistant Bacterial Isolates Belong To The Genus *Bacillus* From Kalimas Surabaya As A Potential Mercury Bioreducer . *J. Appl. Environ. Biol. Sci*. 4(1)72-76.
- [14] Rehman, A., Ali, A., Muneer, B. and Shakoori, A.R. 2007. Resistance and Biosorption of Mercury by Bacteria Isolated from Industrial Effluents. *Pakistan j. Zool.*, vol. 39 (3). 137-146.
- [15] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. and Clark, D.P. 2006. *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. Benjamin Cummings: Netherlands.
- [16] Cooper, Stephen. 2003. Distinguishing Between Linear and Exponential Cell Growth During The Division Cycle: Single-cell Studies, Cell-culture Studies, and The object of Cell-cycle Research. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 3(10). 1-15.