

Saintek Vol 6, No 1 Tahun 2011

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGGUNA MERKURI DARI
SEDIMEN SUNGAI YANG TERKONTAMINASI LIMBAH TAMBANG EMAS.**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MERCURY UTILIZING BACTERIA
FROM THE CONTAMINATED RIVER SEDIMENT BY GOLD MINING WASTE**

Yuliana Retnowati

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan IPA

Universitas Negeri Gorontalo

ABSTRACT

The aim of the study was to obtain and determine the mercury utilizing bacteria from the contaminated river sediment by gold mining wastes. Mercury utilizing bacteria were isolated through batchwise enrichment culture techniques using modified nutrient broth containing 0.1 mgL^{-1} methyl mercury chloride (CH_3HgCl). Selection of isolates was carried out through the growth experiment based on their abilities to grow on different methyl mercury concentrations, in terms of generation time (g) and specific growth rates (μ). Three types of bacteria showing the highest, moderate, the lowest generation time were selected and purified for further identify experiments. The selected isolates were identified using standard methods. The results revealed that fourteen mercury utilizing bacteria were successfully isolated from river sediment ($133.5 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$). Only four isolates were able to grow on growth medium containing $2\text{--}4 \text{ mg L}^{-1}$ at generation times of $1.3\text{--}5.5 \text{ h}$ and specific growth rates of $0.1\text{--}0.5 \text{ generation h}^{-1}$. The four selected isolates were identified as *Bacillus* sp. (strain YLN002), *Alcaligenes* sp. (strain YLN004 and strain YLN005) and *Pseudo-monas* sp. (strain YLN006).

Keyword : Isolation, Identification, mercury utilizing bacteria.

PENDAHULUAN

Merkuri merupakan logam berat yang secara alami terdapat di alam, meskipun dalam kadar yang sangat rendah. Merkuri dalam jumlah tinggi mempunyai potensi sebagai polutan yang bersifat toksik. Kadar merkuri di lingkungan semakin meningkat akibat aktivitas manusia antara lain dari berbagai usaha seperti industri petroleum, penggunaan fungisida merkuri dalam industri kertas, pertanian dan proses penambangan emas khususnya dalam amalgamasi. Keberadaan residu merkuri di lingkungan dapat masuk kedalam rantai makanan sehingga memungkinkan terjadi biomagnifikasi di dalam jaringan tumbuhan atau biota air. Biomagnifikasi merkuri tersebut membahayakan ekosistem dan kesehatan manusia sebagai konsumen. (von-Canstein *et al*, 2002; Alpers & Hunerlach, 2001; Morel, 1995; Barkay, 1992). Merkuri, khususnya metil merkuri bersifat sebagai neurotoksin dan berbahaya bagi wanita hamil karena merkuri tersebut dapat masuk kedalam janin melewati plasenta dan masuk kedalam air susu ibu (Cewa. 2001; Barkay, 1992).

Merkuri dapat membunuh beberapa jenis mikrobia, meskipun ada beberapa bakteri yang mampu bertahan hidup pada lingkungan terkontaminasi merkuri. Bakteri tersebut mempunyai mekanisme resistensi terhadap cemaran merkuri yang belum diketahui dengan pasti (Nascimento & Chartone-Souza, 2003). Hampir sebagian besar bakteri heterotrofik menjadi resisten terhadap merkuri. Resistensi bakteri terhadap merkuri tersebut merupakan langkah awal dari proses detoksifikasi. Detoksifikasi merkuri, khususnya metil merkuri pada umumnya diawali dengan demetilasi. Metil merkuri didemetilasi menjadi ion merkuri (Hg^{2+}) kemudian mengalami reduksi menjadi Hg^0 yang bersifat volatil dan kurang toksik (Nascimento & Chartone-Souza, 2003; Misra, 2000; Chang et al., 1998; Barkay, 1992).

Proses pengubahan merkuri tersebut melibatkan enzim kompleks yang terdiri dari organomercuri liase dan merkuri reduktase (Nascimento & Chartone-Souza, 2003; Misra, 2000; Chang et al., 1998; Barkay, 1992). Bakteri yang resisten terhadap merkuri diduga memiliki salah satu enzim tersebut atau keduanya sehingga memungkinkan merkuri masuk melalui membran sitoplasma kedalam sel dan terakumulasi. Bakteri pengakumulasi merkuri tersebut dapat dimanfaatkan sebagai agensia biologi yang dapat dikembangkan untuk membersihkan lingkungan dari cemaran merkuri atau logam berat.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dan mengetahui jenis bakteri heterotrofik yang mampu mengakumulasi atau menggunakan merkuri dari berbagai sedimen di Sungai Sangon, Yogyakarta dimana terjadi pencemaran merkuri akibat aktivitas penambangan emas secara tradisional. Dengan demikian penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi tentang keanekaragaman bakteri heterotrofik yang resisten terhadap merkuri dan mampu mengakumulasi merkuri.

METODE

1. Pengambilan Sampel.

Sampel sedimen diambil secara komposit pada beberapa titik sampling meliputi sebelum tempat pembuangan limbah, lokasi tempat pembuangan limbah dan setelah tempat pembuangan limbah. Sampel kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan mikrobiologis.

2. Strain Bakteri dan Kondisi Pertumbuhan.

Bakteri pengakumulasi merkuri diisolasi melalui tektik kultur diperkaya dengan menggunakan media Nutrient cair ditambah 0,1 mg/L metil merkuri klorida (CH_3HgCl). Setelah terjadi pertumbuhan kultur pada medium tersebut, bakteri yang dapat bertahan hidup pada metil merkuri diisolasi. Isolat yang diperoleh diseleksi berdasarkan kemampuan tumbuh pada media cair yang mengandung berbagai konsentrasi CH_3HgCl yang dinyatakan dalam waktu generasi (g) dan kecepatan tumbuh spesifik (μ). Isolat bakteri yang memiliki waktu generasi terendah, sedang dan tertinggi dipilih untuk selanjutnya dilakukan karakterisasi dan identifikasi.

3. Identifikasi Bakteri Pengguna Merkuri.

Isolat bakteri terpilih diidentifikasi berdasarkan pengamatan makroskopis atau morfologi koloni meliputi bentuk koloni, warna koloni, elevasi dan tepi koloni pada medium Nutrient Agar; pengamatan mikroskopis atau morfologi sel meliputi bentuk sel, sruktur dalam sel, reaksi pengecatan gram dan reaksi pengecatan kapsula; dan sifat-sifat fisiologis meliputi keperluan oksigen, fermentasi glukosa, laktosa dan fruktosa, pembentukan indol, katalase, urease, voges-prokauser, simmon citrat, MR (metyl red), oksidase, motilitas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kondisi Pertumbuhan Bakteri.

Sedimen Sungai Sangon di sekitar penambangan emas tradisional mengandung populasi bakteri sebanyak $133,5 \times 10^6$ CFU/ml dan didominasi oleh bakteri pengguna merkuri. Empatbelas macam isolat bakteri pengguna merkuri berhasil diisolasi dari sedimen tersebut. Diantara empatbelas macam isolat bakteri tersebut, hanya empat macam isolat bakteri (YLN002, YLN004, YLN005 dan YLN006) yang mampu tumbuh pada medium mengandung 2–4 mg/L CH_3HgCl (Tabel 1). Hal tersebut membuktikan bahwa konsentrasi CH_3HgCl yang tinggi menghambat pertumbuhan bakteri atau bersifat lebih toksik. Sifat toksisitas CH_3HgCl tersebut menyebabkan beberapa bakteri terbunuh dan hanya empat isolat bakteri yang mampu bertahan hidup. Empat isolat bakteri tersebut diduga mempunyai kemampuan adaptasi, meliputi adaptasi genetik dan adaptasi fisiologis.

Tabel 1 : Pertumbuhan isolat pada berbagai konsentrasi metil merkuri klorida (CH_3HgCl).

Kode Isolat	Konsentrasi CH_3HgCl (mg/L)					
	0	0.5	1	2	3	4
YLN001	++	+++	+	-	-	-

YLN002	++	+++	+++	+++		
YLN004	++	++	+++	+++	++	++
YLN005	+++	++	++	+++	++	
YLN006	+++	+++	+++	++	-	-
YLN007	++	-	-	-	-	-
YLN008	++	+++	++	-	-	-
YLN009	++	++	+	-	-	-
YLN0010	+	-	-	-	-	-
YLN0011	+	++	-	-	-	-
YLN0012	+	-	-	-	-	-
YLN0013	++	++	-	-	-	-
YLN0014	+	+++	+	-	-	-
YLN0015	+	+++	++	-	-	-

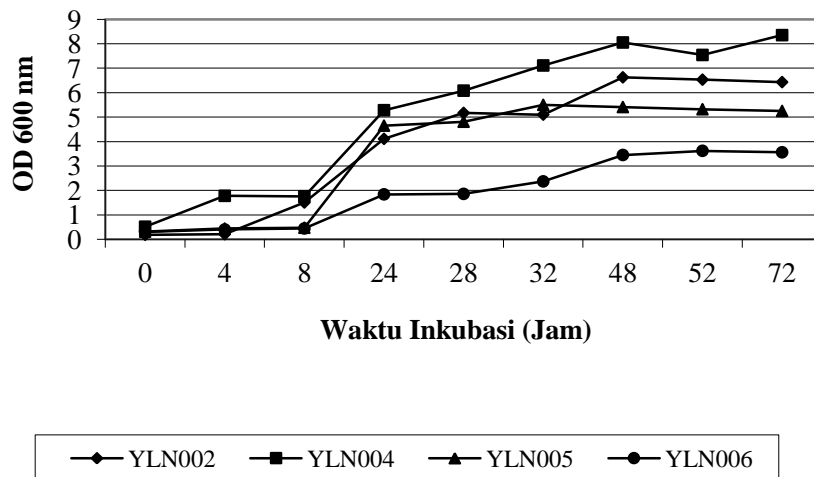
Ket : - : tidak tumbuh; + : tumbuh sedikit; ++ : tumbuh sedang; +++: tumbuh banyak

Empat isolat bakteri yang ditumbuhkan pada medium cair mengandung 2 mg/L CH_3HgCl menunjukkan pola pertumbuhan yang berbeda-beda (Gambar 1) sesuai dengan kinetika pertumbuhan isolat bakteri. Kinetika pertumbuhan isolat bakteri berbeda-beda pada setiap konsentrasi metil merkuri klorida (CH_3HgCl) (Tabel 2).

Tabel 2 : Kinetika pertumbuhan isolat bakteri pada medium mengandung berbagai konsentrasi metil merkuri klorida (CH_3HgCl).

Kons. Merkuri (mg/L)	Isolat YLN002		Isolat YLN004		Isolat YLN005		Isolat YLN006	
	g	μ	g	μ	g	μ	g	μ
0	1,2	0,5	1,0	0,6	1,3	0,5	1,2	0,6
1	3,9	0,2	2,4	0,3	2,4	0,3	3,2	0,2
2	2,0	0,3	1,3	0,5	2,0	0,3	2,9	0,2
3	-	-	3,5	0,2	3,0	0,2	-	-
4	-	-	5,5	0,1	-	-	-	-

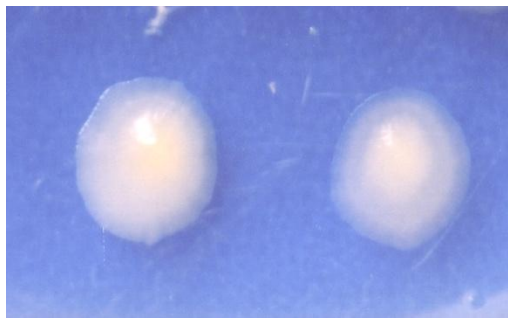
Keterangan : g : waktu generasi (jam); μ : konstanta pertumbuhan spesifik (/jam)



Gambar 1 : Pertumbuhan isolat YLN004; isolat YLN005; isolat YLN002 dan isolat YLN006 pada media Luria Bertani cair mengandung 2,0 mg/L CH_3HgCl .

2. Identifikasi Bakteri Pengguna Merkuri.

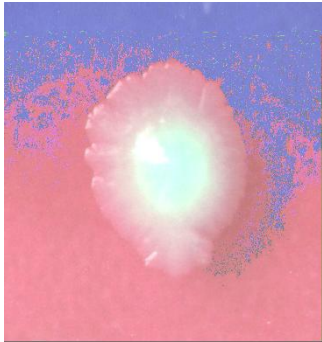
Identifikasi bakteri pengguna merkuri dilakukan melalui tahap karakterisasi berbagai sifat biokimia dan kenampakan morfologi koloni dan sel. Morfologi koloni bakteri yang resisten terhadap CH_3HgCl menunjukkan kenampakan morfologi koloni yang berbeda pada media tanpa merkuri dan yang mengandung merkuri (Gambar 2). Koloni bakteri pada medium yang mengandung CH_3HgCl tampak lebih kasar dan tepi agak berkerut. Perbedaan kenampakan morfologi koloni pada media tanpa dan dengan CH_3HgCl merupakan salah satu usaha bakteri untuk bertahan pada kondisi stres lingkungan atau lingkungan yang toksik. Pada awal pertumbuhan, bakteri menggunakan sumber karbon yang ada pada medium, sehingga koloni yang tumbuh tipis. Ketika sumber karbon pada medium mulai berkurang, bakteri berusaha memecah ikatan karbon pada CH_3HgCl dengan enzim organomercuri liase, sehingga mudah digunakan. Aktivitas tersebut menyebabkan koloni bakteri menjadi lebih kasar dan agak berkerut.



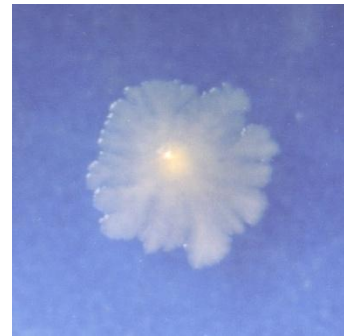
A



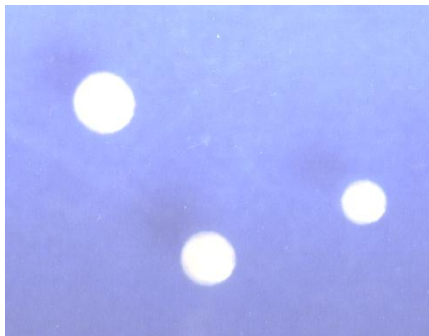
B



C



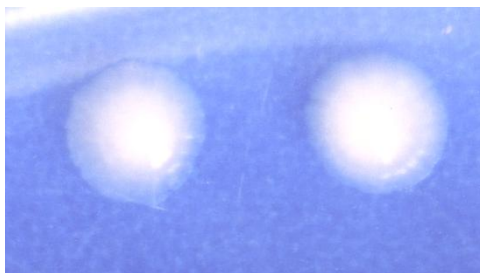
D



E



F



G

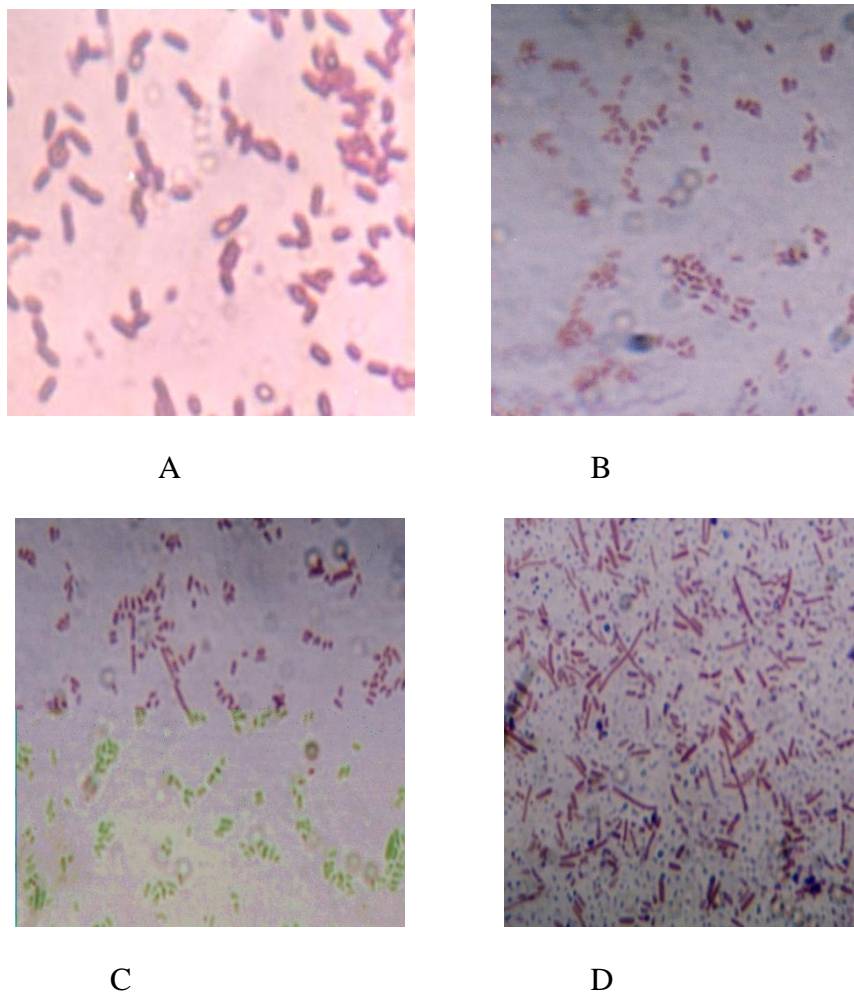


H

Gambar 2 : Morfologi koloni isolat bakteri pengguna merkuri yang berhasil diisolasi dari sedimen Sungai Sangon – D.I Yogyakarta. A. Isolat YLN006 pada media 0 mg/L CH_3HgCl ; B. Isolat YLN006 pada media

3 mg/L CH₃HgCl; C. Isolat YLN004 pada media 0 mg/L CH₃HgCl; D. Isolat YLN004 pada media 4 mg/L CH₃HgCl; E. Isolat YLN002 pada media 0 mg/L CH₃HgCl; F. Isolat YLN002 pada media 0,5 mg/L CH₃HgCl ; G. Isolat YLN005 pada media 0 mg/L CH₃HgCl; H. Isolat YLN005 pada media 3 mg/L CH₃HgCl.

Hasil pengecatan terhadap masing-masing isolat bakteri menunjukkan bahwa tiga isolat bakteri tergolong kedalam kelompok bakteri Gram-negatif dan satu isolat merupakan bakteri Gram-positif (Gambar 3).



Gambar 3 : Morfologi sel bakteri pengguna merkuri dengan pengecatan gram perbesaran 1000 kali. A. Isolat YLN002; B. Isolat YLN004; C. Isolat YLN005; D. Isolat YLN006.

Tabel 3 : Karakteristik morfologi isolat YLN002, YLN004, YLN005 dan YLN006.

Isolat	Kenampakan morfologi isolat	
	Morfologi koloni	Morfologi sel

	Warna koloni pada NA	Bentuk koloni	Elevasi	Tepi	Struktur dalam	Bentuk sel	Sifat Gram	Gerakan
YLN002	Putih	sirkuler	konveks	entire	opaque	batang	positif	motil
YLN004	Putih	sirkuler	konveks	lobate	transparan	bulat	negatif	non motil
YLN005	Putih	sirkuler	konveks	lobate	transparan	bulat	negatif	non motil
YLN006	Putih	sirkuler	konveks	entire	transparan	batang	negatif	motil

Tabel 4. Karakteristik fisiologis dan biokimia isolat YLN002, YLN004, YLN005 dan YLN006.

Isolat	Sifat fisiologis dan biokimia								
	F. Glukosa	F. Laktosa	F. manitol	F. maltosa	F. sukrosa	Hidro. pati	Red. nitrat	katalase	BCPM
YLN002	-	-	-	-	-	-	+	+	-
YLN004	-	-	-	-	-	-	+	+	+F
YLN005	-	-	-	-	-	-	+	+	-
YLN006	+	-	-	-	-	-	+	+	-

Isolat YLN002 memiliki sifat karakteristik meliputi sel berbentuk batang pendek berukuran $0,5 - 2,5 \times 1,2 - 10 \mu\text{m}$. Berdasar perwarnaan gram, sel tergolong kedalam kelompok Gram-positif dan motil. Umumnya katalase positif. Isolat YLN004 dan YLN005 memiliki sifat karakteristik yang sama meliputi sel berbentuk bulat (coccus) berukuran $0,5 - 1,0 \times 0,5 - 2,6 \mu\text{m}$. Berdasar pewarnaan gram, sel tergolong kedalam kelompok Gram-negatif. Koloni pada nutrient agar tidak berpigmen. Oksidase positif dan katalase positif, indol negatif, tidak menggunakan karbohidrat. Sifat karakteristik yang dimiliki isolat YLN006 meliputi sel berbentuk batang dengan ukuran sel $0,5 - 1,0 \times 1,5 - 5,0 \mu\text{m}$. Berdasar pewarnaan gram, sel tergolong kedalam kelompok Gram-negatif. Sel motil dan beberapa non motil dan katalase positif.

Berdasar karakteristik morfologi sel dan pengujian biokimia, serta mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, diduga bahwa isolat YLN002 adalah *Bacillus*, isolat YLN004 dan YLN005 adalah *Alcaligenes* dan isolat YLN006 adalah *Pseudomonas*.

SIMPULAN

- Empatbelas macam isolat bakteri pengguna merkuri berhasil diisolasi dari sedimen Sungai Sangon dengan populasi sebanyak $133,5 \times 10^6$ CFU/ml. Hanya empat isolat yang mampu tumbuh pada $2-4 \text{ mg/L CH}_3\text{HgCl}$ dengan waktu generasi (g) $1,3-5,5$ jam, kecepatan tumbuh spesifik (μ) $0,1-0,5$ /jam.
- Empat isolat terpilih berhasil diidentifikasi sebagai *Bacillus* sp. (strain YLN002), *Alcaligenes* sp. (strain YLN004 dan YLN005) dan *Pseudomonas* sp. (strain YLN006).

DAFTAR PUSTAKA

- Alpers, C. N, and M. P. Hunerlach.** 2001, Mercury Contamination from Historic Gold Mining in California, USGS FS-061-00.
- Barkay, T.** 1992, Mercury Cycle. *Enciclopedia of Microbiology* 3th Ed. Academic Press. Inc. New York. 3: 65 – 74.
- Chang, J.S., Y.P. Chao., W.S Law.** 1998. Repeated fed-batch operations for Microbial Detoxification of Mercury Using Wild-Type and Recombinant Mercury-Resistant Bacteria. *Biotechnol.* 64: 219 – 230.
- Chen, S. and D.B. Wilson.** 1997. Genetic Engineering of Bacteria and their Potential for Hg²⁺ Bioremediation. *Biodegradation.* 8: 97 – 103.
- Gadd, G.M.** 1990. Metal Tolerance in Microbiology of Extreme Environments. C. Edwards Ed, Open University Press, Millon Keynes, p: 178 – 192.
- _____, 2000, Heavy Metal Pollutant Environmental and Biotechnological Aspect. *Encyclopedia of Microbiology* 2nd Ed, 2: 607 – 617.
- Hughes, M.N and R.K Poole.** 1989. Metals and Microorganisms. Chapman and Hall. London.
- Misra, T.K,** 2000. Heavy Metals Bacterial Resistance. *Encyclopedia of Microbiology* 2nd Ed. 2: 618 – 627.
- Morel, F.M. M.** 1995. The Role of Hg (II) reduction and Chemical Speciation in Controlling the Concentration of Mercury and its methylation in Natural Waters. *National Centers for Environmental Research.* P : 1 – 4.
- Nascimento, A.M.A., and E. Chartone-Souza.** 2003. Operon mer : Bacterial Resistance to Mercury and potential for bioremediation of Contaminated Environments. *Genet. Mol. Res.* 2 (1) : 92 – 101.
- Ogunseitan, O.A.,** 2002. Episodic Bioavailability of Environmental Mercury : Implications for Biotechnological Control of Mercury Pollution. *African Journal Of Biotechnology.* 1 (1) : 1 – 9.
- von Canstein, H., S. Kelly., Ying Li, and I. Wagner-Dobler.** 2002. Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury- Reducing Biofilm under Changing Environmental Conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 68 (6) : 2829 - 2837.