

IDENTIFIKASI BAKTERI *INDIGENOUS* PEREDUKSI LOGAM BERAT Cr (VI) DENGAN METODE MOLEKULER DI SUNGAI CIKIJING RANCAEKEK, JAWA BARAT

Syafrudin Lewaru*, Indah Riyantini** dan Yuniar Mulyani**

*) Alumni Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

**) Staf Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mencari bakteri *indigenous* dari sungai yang berpotensi mereduksi logam berat Cr (VI) dengan metode molekuler. Sampel berasal dari air dan sedimen Sungai Cikijing, Rancaekek Kabupaten Bandung Jawa Barat. Metode penelitian menggunakan analisis deskriptif, identifikasi molekuler dengan primer 16S rRNA, dan uji reduksi bakteri terhadap Cr (VI) dengan indikator *DiphenylCarbazide* (DPC). Tahapan penelitian meliputi kultivasi bakteri, ujiantang dengan konsentrasi yang digunakan yaitu 50, 150, 500, 1000, uji reduksi dengan konsentrasi 300, 700, dan 1000 ppm, dan identifikasi molekuler gen 16S rRNA. Hasil penelitian didapat 10 isolat murni bakteri, dan semua bakteri mempunyai resistensi terhadap konsentrasi Cr (VI). Dua bakteri yang mempunyai tingkat resistensi, tingkat reduksi tertinggi dengan melihat OD (*optical density*), yaitu A.3.3 yang dapat menurunkan 1083,25 ppm menjadi 468,30 ppm dan S.3.1⁴ dapat menurunkan 1083,25 ppm menjadi 856,20 ppm dalam waktu ± 24 jam. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan spesies bakteri A.3.3 adalah *Bacillus thuringiensis* dan isolat S.3.1⁴ adalah *Staphylococcus arlettae*.

Kata Kunci : Bakteri *indigenous*, Bakteri Pereduksi Cr (VI), 16S rRNA

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF BACTERIA INDIGENOUS REDUCING HEAVY METAL Cr (VI) WITH MOLECULAR METHODS IN CIKIJING RIVER RANCAEKEK, JAWA BARAT

This research was conducted to find the indigenous bacteria from river that could potentially reducing heavy metals Cr (VI) with molecular method. Samples of water and sediment from the Cikijing River, Rancaekek Kabupaten Bandung Jawa Barat. The method of research used descriptive analysis, test for bacteria to reduce Cr (VI) with indicator of *Diphenyl Carbazide* (DPC), and molecular identification by 16S rRNA primers. Stages of the study include the cultivation of bacteria, challenge test with concentrations used were 50, 150, 500, 1000, and 1500 ppm, the test reduction with a concentration of 300, 700, and 1000 ppm, and molecular identification of 16S rRNA gene. The results obtained were 10 pure bacterial isolates, and all bacteria have resistance to the concentration of Cr (VI). Two bacterial the highest resistance level were taken, the highest reduction was by observing the OD (*optical density*) value, The bacteria was A.3.3 which can degrade 1083.25 ppm to 468.30 ppm and S.3.1⁴ may decrease 1083.25 ppm to 856.20 ppm in ± 24 hour. The results of molecular identification showed the bacterial species was *Bacillus thuringiensis* for A.3.3 and for S.3.1⁴ isolate was *Staphylococcus arlettae*.

Keywords: indigenous bacteria, bacteria reducing Cr (VI), 16S rRNA

PENDAHULUAN

Pesatnya pembangunan di suatu wilayah dapat mempengaruhi keadaan dari wilayah itu sendiri. Perubahan yang dapat terjadi khususnya pada kondisi lingkungan baik yang di darat atau perairannya. Dampak terbesar dari pesatnya pembangunan adalah pencemaran yang seringkali merugikan lingkungan sekitar akibat dari industri, pembangunan perumahan atau gedung, asap yang menyebabkan polusi, dan bahkan pestisida pertanian sendiri.

Pencemaran perairan adalah pencemaran yang sangat krusial dan yang paling merugikan, dan pencemaran ini seringkali terjadi pada tempat-tempat yang perkembangannya pesat. Rancaekek adalah kota kecamatan yang sudah berkembang menjadi salah satu kawasan industri di wilayah Kabupaten Bandung bagian timur. Kehadiran industrialisasi, terutama sektor TPT (tekstil dan produk tekstil), telah mempengaruhi kualitas lingkungan setempat, khususnya kualitas lingkungan yang tercemar di perairan sungai Cikijing.

Sungai Cikijing merupakan salah satu sungai di Rancaekek selain Cimande yang keduanya adalah anak sungai dari Sungai Citarum. Sungai Cikijing telah menjadi sumber utama dari pengairan irigasi ke sawah-sawah di daerah sekitar Rancaekek. Namun pada kondisi terkini telah menurun drastis kualitasnya diakibatkan oleh pencemaran. Pencemaran perairan di Sungai Cikijing di kawasan industri Rancaekek ini sudah menjadi permasalahan serius berbagai pihak terkait. Sehingga hal ini banyak menarik peneliti baik dari instansi pemerintah terkait,

Pencemaran di Sungai Cikijing telah terjadi akibat dari pembuangan limbah yang pada umumnya berasal dari industri tekstil. Sehingga pencemaran logam berat yang pada umumnya yaitu tembaga (Cu), Krom (Cr), dan seng (Zn) yang biasanya digunakan dalam proses pewarnaan dan percetakan. Hasil penelitian tahun 2010 menunjukkan konsentrasi pencemaran logam berat dalam air 0,214 ppm sampai 0,54 ppm (Cu), 2,745 ppm sampai 3,335 ppm (Cr), dan 0,604 ppm sampai 1,518 ppm (Zn) (Andarani dan Roosmini, 2010). Analisis pencemaran tersebut

menunjukkan bahwa logam Cr yang memiliki konsentrasi pencemaran tertinggi.

Penanganan limbah logam berat suatu perairan sudah banyak dikaji. Langkah penanganan pencemaran perairan dalam bidang mikrobiologis adalah langkah yang masih menjadi trend dan dinilai efektif karena tidak menimbulkan banyak efek samping lainnya. Secara khusus mikroba telah digunakan untuk tujuan lain misalnya sebagai agen pengendali hama dan penyakit, agen bioremediasi dan biodegradasi bahan pencemar, agen penghasil protein dan enzim-enzim penting yang telah dimanfaatkan dunia, agen-agen dalam bioteknologi modern, dan digunakan untuk menguak rahasia kehidupan bumi dan jagad raya (Suryanto, 2009).

Menurut Feliatra (1996) dalam Dharmawibawa (2004), metode biologi atau biodegradasi oleh mikroorganisme merupakan salah satu cara yang tepat, efektif dan hampir tidak ada pengaruh sampingannya pada lingkungan karena tidak menghasilkan racun atau blooming. Agar pengolahan limbah berlangsung secara efektif khususnya limbah yang banyak mengandung logam berat maka langkah awal yang perlu dilakukan adalah mencari mikroorganisme yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi logam berat.

Menurut Feliatra (1996) dalam Dharmawibawa (2004), metode biologi atau biodegradasi oleh mikroorganisme merupakan salah satu cara yang tepat, efektif dan hampir tidak ada pengaruh sampingannya pada lingkungan karena tidak menghasilkan racun atau blooming. Agar pengolahan limbah berlangsung secara efektif khususnya limbah yang banyak mengandung logam berat maka langkah awal yang perlu dilakukan adalah mencari mikroorganisme yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi logam berat.

Untuk itulah, dalam rencana penelitian di Sungai Cikijing ini akan menganalisis mikroba yaitu bakteri lokal (*indigenous*) dari Sungai Cikijing Rancaekek sendiri. Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri pendegradasi logam berat Cr (VI) dari Sungai Cikijing yang dilakukan dengan mengambil sample air dan

sedimen dilokasi sungai. Kromium yang diketemukan pada sungai bisa berupa trivalent chromium atau Cr (III) dan heksavalent chromium atau Cr (VI). Namun bagi badan sungai dengan nilai pH > 5, kromium yang terbentuk berupa kromium Cr (VI) (Effendi, 2003 dalam Agustinus, 2010).

Identifikasi melalui metode molekuler teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Penggunaan molekuler karena lebih cepat, efisien dan akurat, dan untuk mikrobapat mencakup keseluruhan mikroba (Suryanto, 2003).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari bakteri-bakteri potensial yang bisa menjadi kandidat agen pereduksi logam Cr (VI) di sungai Cikijing Rancaekek

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel bakteri diperoleh Sedimen dan Air dari Sungai Cikijing Rancaekek Kabupaten Bandung Jawa Barat.

Kultivasi/Isolasi Bakteri

Sampel diencerkan dengan NaCl fisiologis di dalam tabung reaksi. Sampel air sungai sebanyak 1 mL dan sedimen sebanyak 1 g, lalu masukkan masing-masing sampel ke dalam tabung pengencer yang masing-masing berisi 9 mL akuades secara aseptis. Membuat pengenceran sampel pada tabung yang lain sampai 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} . Memindahkan 1 ml biakan dari tabung pengencer ke atas media Nutrien Agar yang telah disiapkan di dalam cawan petri, kemudian ratakan dengan batang L. Diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2-3 hari. Setelah terlihat ada pertumbuhan bakteri, diambil single koloni secepatnya dan goreskan atau pindahkan ke media NA yang baru. Setelah terlihat tumbuh kembali pada media baru, lalu dilanjutkan pemurnian isolate hingga benar-benar tidak ada isolate lain yang tumbuh. Setelah murni, isolat dikultur dalam medium NA yang telah diperkaya K_2CrO_4 0,2 mg/L. Isolat diperbanyak dalam media agar miring dan cawan petri untuk dilakukan uji karakteristik isolat

Uji Tantang Bakteri Terhadap Logam Berat

Setelah didapatkan beberapa isolat murni bakteri, lalu bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair Nutrien Broth (NB) yang telah diperkaya K_2CrO_4 dengan konsentrasi masing-masing 50, 150, 500, 1000, dan 1500 ppm. Kemudian diinkubasikan kedalam *incubator shaker* selama 18 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 220 rpm, untuk melihat ketahanan bakteri terhadap logam berat. Kemudian masing-masing bakteri setiap perlakuan diukur nilai *Optical Density* (OD) dengan panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui tingkat kepadatan bakteri pada spektrofotometer. Setelah diketahui beberapa isolate yang bertahan terhadap logam berat berdasarkan tingkat kepadatan, diambil yang tertinggi untuk dilanjutkan ke tahap uji reduksi.

Uji Reduksi Bakteri

Setelah didapatkan bakteri tahan Cr (VI), lalu bakteri diinokulasikan ke dalam medium cair Nutrien Broth (NB) yang telah diperkaya K_2CrO_4 dengan konsentrasi masing-masing 300, 700, dan 1000 ppm. Kemudian diinkubasikan kedalam *incubator shaker* selama ± 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 220 rpm. Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, masing-masing konsentrasi untuk mendapatkan supernatan cairan Cr (VI). Buat kompleks Cr dalam tabung reaksi dari supernatan dengan komposisi : 12,5 mL Aquades pH 3, 250 μ L Larutan Diphenil Charbazida 1g/400 mL aseton, sampel yang sesuai dengan faktor pengenceran. Diukur absorbansinya di dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Plotkan pada nilai kurva standar yang telah dibuat ($y = 0,1057x + 0,0025$). Setelah diamati, dan diperoleh beberapa isolate yang dapat mereduksi logam Cr, lalu diteruskan identifikasi bakteri PCR dengan 16S rRNA

Identifikasi Molekuler dengan Primer 16S rRNA

➤ Isolasi DNA Genom Bakteri

Metode isolasi DNA genom bakteri yang digunakan adalah metode *Alkaline Lysis* (Sambrook *et al.*, 1989). Setiap kultur dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 mL dan disentrifugasi selama 30 detik

pada kecepatan 1200 rpm, kemudian supernatan dibuang. Lalu sebanyak 100 μL larutan I (*resuspension solution*) ditambahkan ke dalam tiap tabung lalu diresuspensi dengan di-vortex. Selanjutnya ke dalam tiap tabung ditambahkan 200 μL larutan II (*lysis solution*) lalu dicampur dengan membolak-balikkan tabung beberapa kali dan biarkan lisis terjadi selama 2-3 menit di dalam es. Setelah itu, sebanyak 150 μL larutan III (*neutralizing solution*) ditambahkan (on ice) lalu di-vortex, lalu didiamkan selama 3-5 menit di dalam es. Kemudian tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit dalam *microcentrifuge*. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tube baru, ditambah ethanol absolute 2x volume larutan alkalin lisis ($\pm 900\mu\text{L}$), lalu di-vortex. Lalu disentrifugasi pada 12000 rpm selama 5 menit. Kemudian supernatannya dibuang. Lalu sebanyak 1 mL etanol (EtOH) 70% ditambahkan dan disentrifugasi kembali selama 5 menit. Kemudian supernatannya dibuang dengan cara dibalikkan sampai kering ± 10 menit. Akan terlihat pelet DNA. Pelet DNA dikeringkan, lalu diresuspensi dalam 30 μL *buffer TE* dan di-*flick* kemudian disimpan pada suhu -20°C .

➤ Amplifikasi DNA dengan PCR

Primer yang digunakan adalah primer 16S rRNA dengan urutan basa primer 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan primer 1492R (5'-GGCTACCTTGTACGACTT) (Sadi, 2009). Komponen reaksi PCR yaitu *Nuclease Free Water* 10,5 μL , KAPA 2G FAST Master Mix 12,5 μL , *Primer forward* dan *reverse* masing-masing 0,5 μL , dan *DNA template* 1 μL (Sadi, 2009). Pengaturan program PCR yaitu Pre-PCR (95°C , 2 menit), denaturasi (95°C , 30 detik), Annealing primer (55°C , 30 detik), Elongation (75°C , 1 menit), dan Post PCR (75°C , 5 menit). Jumlah siklus polimerisasi DNA sebanyak 30 kali.

➤ Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses untuk melihat produk amplifikasi dengan analisa lebih lanjut dan pewarnaan dengan menggunakan EtBr. Proses pembuatan gel agarosa 1 % dengan mencampurkan bubuk agarosa sebanyak

0,4 g dalam TBE 40 ml (Thris-Borate EDTA). Gel agarose direndam secara sub marine atau terendam seluruhnya dalam running buffer yaitu TBE. 5 μL DNA hasil PCR dan penanda berat molekul dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Voltase yang digunakan untuk proses elektroforesis adalah 75 volt, dengan kuat arus 100 mA selama 60 menit.

➤ Analisis Bioinformatik

Setelah mendapatkan hasil elektroforesis, kemudian isolat DNA bakteri produk 16S rRNA dipurifikasi untuk mendapatkan sequencing DNA isolat bakteri. Selanjutnya hasil sequencing DNA dianalisis menggunakan perangkat bioinformatik (bioedit) dan dicocokkan dengan data di www.ncbi.nlm.nih.gov melalui program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk menentukan jenis dari 2 isolat tersebut dari database yang ada.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri

Sungai Cikijing yang berada di Rancaekek Jawa Barat adalah salah satu anak sungai yang sudah tercemar oleh limbah dari pabrik tekstil. Pengukuran kadar Cr, Cu, dan Zn yang merupakan bagian dari komposisi pewarnaan dari tekstil di dalam Sungai Cikijing menunjukkan konsentrasi logam yaitu Cr 0,2776 mg/L, sedangkan Cu 0,0298 mg/L, dan Zn 0,0291 mg/L (Lampiran 2). Analisis ini berbeda dengan Andarani dan Roosmini (2010), yaitu 0,214 ppm sampai 0,54 ppm (Cu), 2,745 ppm sampai 3,335 ppm (Cr), dan 0,604 ppm sampai 1,518 ppm (Zn). Hal ini dikarenakan kondisi sungai yang telah berubah dari tahun 2010 sampai 2012, antara lain perubahan kadar limbah yang dibuang ke sungai.

Baku mutu berdasarkan keputusan Gubernur Jawa Barat No. 39 Tahun 2000 tentang peruntukkan air dan baku mutu air pada Sungai Citarum dan Anak-anak Sungainya di Jawa Barat adalah Cr 0,05 mg/L ; Cu 0,02 mg/L ; dan Zn 0,02 mg/L, artinya bahwa kondisi logam di Sungai Cikijing sudah melebihi ambang batas. Menurut Atlas dan Bartha (1998) dalam Sadi (2009) Bakteri tahan logam dapat ditemukan dalam lingkungan alamiah atau

lingkungan buatan yang mengandung ion logam dalam konsentrasi tinggi. Dari Sungai Cikijing diharapkan dapat mengisolasi bakteri yang dapat tahan Cr (VI) dan juga dapat mereduksinya.

Isolasi Bakteri dilakukan dalam medium Nutrien Agar (NA) pada awal penyebarannya. Kemudian setelah bakteri telah murni dilanjutkan dengan uji resistensinya yang masih dalam medium

padat NA tetapi diperkaya oleh K_2CrO_4 sebesar 0,2 mg/L. Pada tahap ini didapat 13 isolat bakteri murni yang dapat bertahan pada medium. Setelah itu dari 13 isolat dilakukan pewarnaan untuk uji gram pada bakteri dan pengamatan mikroskop. Sehingga dari 13 isolat bakteri yang telah diisolasi hanya 10 isolat bakteri yang benar-benar murni dan berbeda (Tabel 1)

Tabel 1. Isolat Bakteri

No	Kode Bakteri	Warna Koloni	Warna Pengamatan	Bentuk	Gram	Sumber Sampel
1	A.3.5	Putih	Ungu	- Bacil duplo - Berspora	+	Air
2	A.2.1	Putih	Ungu	- Bacil panjang - Duplo	+	Air
3	A.3.3	Putih	Ungu	- Bacil - Solitair	+	Air
4	S.3.1. ⁴	Kuning Pekat	Ungu	- Coccus - Bergerombol	+	Sedimen
5	S.1 ³ .2.2	Kuning Bening	Ungu	- Coccus - Tidak Bergerombol	+	Sedimen
6	S.1 ⁴ .2	Kuning	Ungu	- Coccus - Seperti Anggur	+	Sedimen
7	S.1 ³ .2.1.1	Kuning	Ungu	- Bacil - Pendek	+	Sedimen
8	S.7.1	Kuning Terang	Merah	Coccus	-	Sedimen
9	S.1 ⁴ .3.1.1	Putih Susu	Ungu	- Bacil - Pendek	+	Sedimen
10	S.1 ³ .2.1	Orange	Ungu	Coccus	+	Sedimen

Semua bakteri diatas terdapat beberapa perbedaan warna pada koloni, hal ini dikarenakan terjadi ekskresi zat warna ke dalam medium atau pigmentasi sel. Kemampuan bakteri untuk membentuk zat warna, terfiksasi secara genetik dan menjadi penanda khusus. Zat-zat warna ini merupakan derivat dari kelas zat karotenoid, zat warna fenazin, zat warna pirol, azakuinon, dan antosian (Schlegel, 1994).

Dari kesepuluh isolat bakteri, terdiri dari 3 isolat yang bersumber dari sampel air yaitu A.3.5 ; A.2.1 dan A.3.3. Sedangkan sampel bakteri dari sedimen berjumlah 7 isolat yaitu S.3.1.⁴ ; S.1³.2.2 ; S.1⁴.2 ; S.1³.1.1 ; S.7.1 ; S.1⁴.3.1.1 dan S.1³.2.1. Jumlah isolat dari sedimen lebih banyak dikarenakan bakteri lebih banyak hidup pada substrat-substrat daripada pada air yang lebih cenderung mengalirkan bakteri.

Uji Tantang Bakteri Terhadap Cr (VI)

Seluruh isolat bakteri yang berhasil ditumbuhkan dalam medium NA yang diperkaya K_2CrO_4 konsentrasi 0,2 mg/L dilakukan ujiantang. Ujiantang dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke medium cair Nutrien Broth (NB) yang diperkaya dengan K_2CrO_4 konsentrasi 50, 150, 500, 1000, dan 1500 ppm.

Dari hasil ujiantang ini, semua bakteri dapat tahan sampai konsentrasi 1500 ppm berdasarkan pengujian OD 600 nm pada spektrofotometer (lampiran 4). Menurut APHA (1998) dalam Setya dan Putra (2011), pada dasarnya 600 nm digunakan karena sel-sel menyerap pada panjang gelombang ini. Dari 10 isolat yang diuji, dipilih 3 isolat bakteri yang mempunyai OD terbesar pada konsentrasi tertinggi 1500 ppm (tabel 2)

Tabel 2. Isolat Bakteri dengan Nilai OD 600 nm Tertinggi pada 1500 ppm

Kode Bakteri	Optical Density (OD)
S.3.1 ⁴	1,125
A.3.3	0,366
A.2.1	0,348.

Hasil *Optical Density* (OD) menunjukkan tingkat kepadatan bakteri, nilai OD 600 nm isolat S.3.1⁴ adalah yang terbesar yaitu 1,125 yang artinya isolat tersebut tahan dan dapat beradaptasi terhadap konsentrasi 1500 ppm, kemudian OD A.3.3 sebesar 0,366 ; dan OD A.2.1 sebesar 0,348. Dari data nilai OD keseluruhan yang diperoleh, menunjukkan bakteri dengan konsentrasi rendah 50 ppm mempunyai nilai tinggi pada OD 600 nm, sedangkan dengan konsentrasi tinggi yang diberikan sampai 1500 ppm nilai OD semakin rendah. Sehingga semakin tinggi nilai yang ditunjukkan OD dengan panjang gelombang 600 nm berbagai konsentrasi maka semakin tinggi pula kepadatan bakteri dan semakin tahan bakteri terhadap konsentrasi Cr (VI). Kemampuan mikroorganisme untuk mengatasi toksisitas logam berat menurut Gadd (1990) dalam Sadi (2009) karena memiliki mekanisme pertahanan yaitu dapat melalui :

1. Presipitasi atau pembentukan kompleks ekstraseluler.
2. Menurunkan permeabilitas logam atau transport logam melewati membran sel.
3. Kompartementalisasi intraseluler, antara lain melalui penumpukan dalam vakuola.
4. Detoksifikasi melalui sejumlah reaksi kimia dalam sel.

Ketiga isolat bakteri yang terbesar nilai yang memiliki nilai OD 600 nm tersebut dilanjutkan pada tahap selanjutnya yaitu tahap uji reduksi bakteri.

Uji Reduksi Bakteri terhadap Cr (VI)

Pada tahap uji tantangan, didapatkan 3 isolat bakteri yang mampu bertahan pada konsentrasi 1500 ppm. Selanjutnya bakteri tersebut diuji tingkat reduksinya terhadap Cr (VI) yaitu 300, 700, dan 1000 ppm. Penentuan jumlah konsentrasi sampai 1000 ppm atas dasar karena bakteri telah tahan pada tahap uji ketahanan yaitu sampai 1500 ppm. Kemudian dengan penentuan konsentrasi yang jauh diatas konsentrasi Cr di Sungai Cikijing yaitu Cr 0,05 mg/L (ppm), agar dapat lebih memungkinkan untuk mengurangi pencemaran Cr di Sungai Cikijing dan wilayah lain.

Perhitungan jumlah reduksi bakteri terhadap Cr (VI) dilakukan dengan *Diphenyl Carbazida* (DPC) sebagai indikator Cr (VI). Menurut Svehla (1985) dan Clesceriet *al.* (1998) dalam Firindyta *et al.* bahwa senyawa yang bereaksi spesifik dengan Cr (VI) adalah *diphenylcarbazide*. Senyawa ini akan bereaksi dengan Cr (VI) yang ada dalam larutan kalium dikromat membentuk warna merah-ungu. Warna inilah yang akan diuji spektrofotometer, semakin sedikit warna merah-ungu pada larutan maka makin sedikit Cr (VI) yang terkandung.

Kurva standar yaitu $y = 0,1057x + 0,0025$ digunakan untuk mengetahui tingkat reduksi bakteri yang telah dilakukan selama ± 24 jam.. Dari perhitungan reduksi ketiga isolat bakteri terhadap Cr (VI) melalui kurva standar yang dibuat, didapatkan bahwa ketiga isolat mampu menurunkan konsentrasi Cr (VI) dengan berbagai konsentrasi.

Berikut adalah jumlah penurunannya berdasarkan kurva standar :

Tabel 3. Penurunan Jumlah Konsentrasi Cr (VI) Selama ± 24 jam

Bakteri	Konsentrasi Awal (ppm)	Konsentrasi Akhir (ppm)	Total Reduksi (ppm)	Persentase
A.3.3	314,56	210,50	104,06	33,08 %
	799,4	80,42	718,98	89,94 %
	1083,25	468,30	614,95	56,77 %
A.2.1	314,56	295,65	18,91	6,01 %
	799,4	298,013	501,387	62,72 %
	1083,25	553,40	529,85	48,91 %
S.3.1 ⁴	314,56	224,69	89,87	28,57 %
	799,4	250,709	548,69	68,63 %
	1083,25	856,20	227,05	20,96 %

Pengurangan konsentrasi Cr (VI) oleh bakteri pada tabel 3. menunjukkan bahwa isolat bakteri dari limbah tekstil efektif dalam menurunkan kadar Cr (VI). Dari hasil diatas terlihat bahwa persentase reduksi terbesar yaitu pada bakteri A.3.3 yang bersumber dari air yaitu 314,56 ppm dengan persentase reduksi 33,08 % ; 799,4 ppm dengan persentase reduksi 89,94 % ; dan 1083,25 ppm dengan persentase reduksi 56,77 %. Isolat A.2.1 yang masih bersumber dari air memiliki kemampuan reduksi rendah pada konsentrasi 314,56 ppm yaitu 6,01 %. Sedangkan konsentrasi yang lebih tinggi pada 799,4 ppm dan 1083,25 ppm memiliki persentase konsentrasi yang lebih besar yaitu 48,91 % dan 28,57 %. Kemudian pada isolat bakteri dari sedimen yaitu S.3.1⁴ cenderung lebih konstan daya reduksinya, ditunjukkan pada persentase reduksi 314,56 ppm yaitu 28,57 %, dan 799,4 ppm persentasenya adalah 68,63 %, serta 1083,25 ppm hanya 20,96 %.

Proses reduksi bakteri melalui aerobik dan anaerobik. Dalam kondisi aerobik Cr (VI) direduksi dengan bantuan NADH sebagai donor elektron (Suzuki *et al.*, 1992 dalam Kouadjo dan Zeze, 2010), dan bila dalam kondisi anaerobik Cr (VI) direduksi menggunakan cytochrome b, c dan d atau *cytoplasmic membrane proteins* yang dimiliki oleh bakteri ((Bopp and Ehlich (1988) dalam Kouadjo dan Zeze, 2010).

Jumlah reduksi yang dihasilkan oleh ketiga isolat bakteri diatas menunjukkan keefektifan bakteri dalam menurunkan konsentrasi Cr (VI). Pada Sungai Cikijing

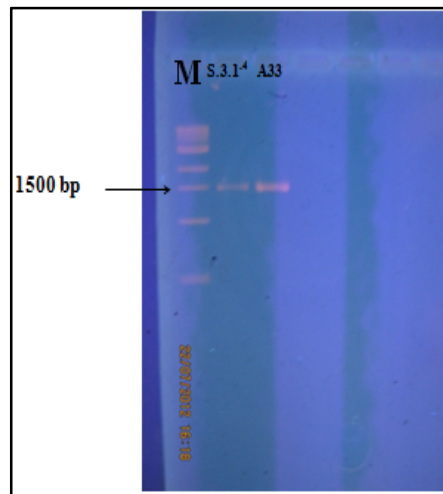
konsentrasi Cr adalah 0,2776 mg/L, sedangkan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 300, 700, dan 1000. Tetapi dari konsentrasi yang lebih tinggi terjadi penurunan konsentrasi, yang artinya ketiga bakteri diatas juga dapat menurunkan konsentrasi Cr di Sungai Cikijing.

Ketiga isolat yang diketahui mampu menurunkan kadar Cr (VI) kemudian diidentifikasi dengan metode molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Tetapi hanya diidentifikasi 2 isolat unggul, yaitu A.3.3 dan S.3.1⁴ karena memiliki kemampuan reduksi lebih tinggi.

Identifikasi Molekuler 16S rRNA

Isolasi DNA dilakukan pada dua isolat terbaik yaitu A.3.3 dan S.3.1⁴. Primer yang digunakan adalah primer 16S rRNA dengan urutan basa primer 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan primer 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT) (Sadi, 2009). Primer 16S rRNA adalah *universal primer* yang dapat mengidentifikasi berbagai macam bakteri dengan metode molekuler.

Tahap awal dari proses identifikasi ini adalah proses isolasi DNA dengan metode *Alkaline Lysis* dari Sambrook (1989). kemudian dilanjutkan proses amplifikasi dengan PCR sampai kepada proses elektroforesis. Hasil akhir dari elektroforesis marker *1kb ladder* menunjukkan pita DNA kedua isolat bakteri A.3.3 dan S.3.1⁴ berukuran 1500 bp. (gambar 1)

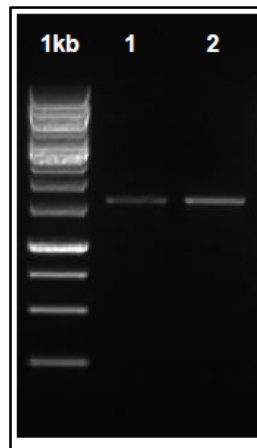


Gambar 1. Hasil Elektroforesis Amplikon

Keterangan : M = Marker ; 1500 bp = Panjang pita DNA ; A.3.3 = Isolat DNA bakteri ; S.3.1⁴ = Isolat DNA bakteri

Hasil dari amplifikasi yang telah menunjukkan pita berukuran 1500 bp (*basephare*) kemudian dilanjutkan untuk proses akhir purifikasi dan sequencing.

Proses purifikasi dan sequencing dilakukan oleh DNA Sequencing Service 1st BASE Malaysia. Berikut adalah hasil dari purifikasi DNA dari 1st BASE (Gambar 2):



Gambar 2. Hasil Purifikasi PCR. Sumber : 1st BASE

Gambar 2. diatas merupakan hasil dari purifikasi yang menunjukkan pita 1500 bp pada kode DNA 1 yaitu isolat bakteri A.3.3 dan kode kode DNA 2 yaitu isolat bakteri S.3.1⁴. Hasil purifikasi tersebut menunjukkan bahwa produk PCR dapat dilanjutkan untuk sequencing.

Analisis Bioinformatika

Setelah mendapatkan hasil sequencing dari bakteri, lalu diteruskan pada proses bioinformatik. Data di www.ncbi.nlm.nih.gov melalui program BLAST menunjukkan spesies bakteri untuk isolat A.3.3 adalah *Bacillus*

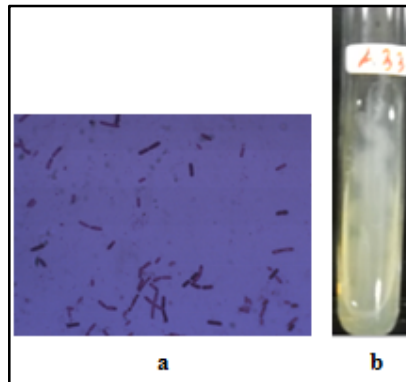
Thuringiensis strain IAM 12077 dengan nilai *Query Coverage* 98 % dan keidentikan maksimum sebesar 95 %. Sedangkan isolat S.3.1⁴ adalah *Staphylococcus Arlettae* strain ATCC 43957 dengan nilai *Query Coverage* 99 % dan keidentikan maksimum sebesar 96 % (lampiran 7). Addinilia (2012) menyatakan bahwa tingkat kesamaan nukleotida sekitar 80% termasuk cukup tinggi.

Potensi *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis termasuk bakteri yang mampu dalam mendegradasi berbagai senyawa dalam lingkungan.

Hasil Rojas-Avelizapa *et al.* (1999) dalam Erdogan *et al.* (2011) menyatakan *Bacillus thuringiensis* dapat mendegradasi PCB (*polychlorinated biphenyls*) sebesar 75% dalam konsentrasi PCB tinggi. *Polychlorinated biphenyls* adalah salah satu komponen dielektrik dan pendingin cairan yang termasuk zat toksik bagi lingkungan (Wikipedia, 2012). Isolat Bakteri jenis tersebut juga ditemukan dapat mendegradasi minyak diesel (Kebria *et al.*

2009). Dalam Meli (2009) yang mengisolasi bakteri dari limbah pabrik di Afrika Selatan mendapatkan *Bacillus thuringiensis* yang mereduksi Cr (VI) dari 100 mg/L menjadi 20 mg/L selama 115 jam. Sedangkan dalam penelitian ini *Bacillus thuringiensis* dapat mereduksi dari konsentrasi 314,56 ppm menjadi 210,50 ppm ; 799,4 ppm menjadi 80,42 ppm ; dan 1083,25 ppm menjadi 468,30 ppm selama ± 24 jam.



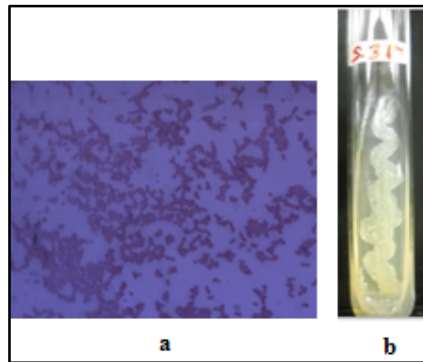
Gambar 3. *Bacillus thuringiensis*
(a) pengamatan mikroskop ;
(b) warna koloni kultur

Bacillus sp. banyak ditemukan di berbagai habitat air, udara, dan tanah. Salah satu spesies dari *Bacillus* sp. yaitu *Bacillus thuringiensis*. Spesies ini paling banyak ditemukan di berbagai tanaman. Berbentuk batang, dengan ukuran lebar 1,0 - 1,2 μm dan panjang 3 - 5 μm (Krieg dan Holt (1984) dalam Muharsini, *et al.* 2003). Bakteri ini Termasuk bakteri gram positif yang berspora yang umumnya hidup di tanah (Kumar, *et al.* 2008). *Bacillus thuringiensis* mengandung δ -endotoxins, cytolytic proteins, dan vegetative insecticidal proteins yang dapat dijadikan sebagai agen biologi pemberantasan hama pada tanaman (Kumar, 2008)

Potensi *Staphylococcus arlettae*

Staphylococcus arlettae merupakan bakteri gram positif dan bersifat anaerobik. Bakteri ini umumnya ditemukan di dalam limbah tekstil. Penelitian tentang *Staphylococcus arlettae* sebagai agen

pereduksi telah banyak dilakukan, diantaranya adalah bakteri jenis ini dapat menghilangkan cemaran warna pada limbah tekstil Azo di Campinas, Brazil. (Elisangela *et al.*, 2008). Azo adalah komposisi dari pewarnaan tekstil yang besarnya berkisar 50-60 % pada warna. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Kouadjo dan Zeze (2010) bakteri *Staphylococcus arlettae* mereduksi Cr dari 250 $\mu\text{g/ml}$ menjadi 30 $\mu\text{g/ml}$. *Staphylococcus arlettae* memiliki senyawa enzim proteases, amylases, carboxymethylcellulases, cellulases dan xylanases untuk bahan pada pabrik farmasi, makanan, tekstil, dan yang terpenting sebagai bakteri yang mengatasi air limbah (Wiseman, 1985 dalam Akhtar *et al.*, 2008). *Staphylococcus arlettae* strain R1-7A yang diisolasi dari limbah pabrik penyamakan krom dapat mereduksi, dan juga dapat resisten terhadap Cr sampai 760 mM selama 24 jam (Zolfaghary, 2012)



Gambar 4. *Staphylococcus arlettae*
(a) pengamatan mikroskop ;
(b) warna koloni kultur

Menurut Bopp and Ehlich (1988) dalam Kouadjo dan Zeze (2010) Genus dari *Staphylococcus*, *Rhodobacter*, *Geobacter*, *Desulfovibrio*, *Bacillus*, *Leucobacter*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, dan *Escherichia*, dapat mereduksi Chrom dalam kondisi aerobik maupun anaerobik dari enzim yang dihasilkan yaitu Chromium reductase. Dari hasil penelitian ini, bakteri *Staphylococcus arlettae* dapat mereduksi Cr (VI) dari konsentrasi awal 314,56 ppm menjadi 224,69 ppm ; 799,4 ppm menjadi 250,709 ppm ; dan 1083,25 ppm menjadi 856,20 ppm selama ± 24 jam.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Dari kesepuluh isolat bakteri yang diperoleh, isolat bakteri dengan kode A.3.3 dan S.3.1⁴ yang memiliki daya reduksi dalam medium NB yang diperkaya K₂CrO₄ paling tinggi yaitu dengan total reduksi 614,95 ppm dan 227,05 ppm dari konsentrasi awal 1083,25 ppm selama ± 24 jam
2. Berdasarkan identifikasi dari www.ncbi.nlm.nih.gov melalui program BLAST, hasil dari Bioedit menunjukkan spesies bakteri untuk isolat A.3.3 adalah *Bacillus thuringiensis* strain IAM 12077 dengan nilai Query Coverage 98 % dan keidentikan maksimum sebesar 95 %. Sedangkan isolat S.3.1⁴ adalah *Staphylococcus arlettae* strain ATCC 43957 dengan nilai Query Coverage 99 % dan keidentikan maksimum sebesar 96 %

3. Kedua isolat bakteri yang diperoleh dari Sungai Cikijing Rancaekek Jawa Barat memiliki potensi mereduksi logam Cr (VI) berdasarkan hasil penelitian dan referensi.

DAFTAR ACUAN

- Andarani, P., Roosmini, D. 2010. *Profil Pencemaran Logam Berat (Cu,Cr, dan Zn) pada Air Permukaan dan Sedimen di Sekitar Industri Tekstil PT X (Sungai Cikijing)*. Program Studi Teknik Lingkungan, Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Agustinus, E.T.S. 2010. *Intra LIPI :Mengolah Karbon Mengatasi Pencemaran: Smac Sebagai Solusi Alternatif*. <http://www.lipi.go.id/intra/masuk.cgi?cetakberita&&&2010&&1278903314&&1037172554> (diakses 23 April 2012).
- Akhtar, N., Ghauri, M.A., Iqbal, A., Anwar, M.A., Akhtar, K.2008. *Biodiversity and Phylogenetic Analysis of Culturable Bacteria Indigenousto Khewra Salt Mine of Pakistan and Their Industrial Importanc.* Bioprocess Technology Division, National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering. Faisalabad - Pakistan. *Brazilian Journal of Microbiology* (2008) 39:143-150.

- Dharmawibawa, I.D. 2004. *Isolasi, Identifikasi dan Uji Kemampuan Bakteri Pengurai Minyak Solar dari Perairan Pelabuhan Benoa Bali*. Universitas Udayana. Bali.
- Erdogan, E.E., Sahnin, F., and Karaca, A. 2011. *Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey*. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ankara University. Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Architecture and Engineering, Yeditepe University. Istanbul – Turkey. *African Journal of Biotechnology*.
- Elisangela, F., Andrea, Z., Fabio, D.G., Cristiano, R.M., Regina, D.L., Artur, C.P. 2008. *Biodegradation of textile azo dyes by a facultative Staphylococcus arlettae strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (2009) 280–288 p.
- Firnindyta, F., Suhartana, dan Widodo, D.S. 2011. *Pengaruh pH pada Proses Reduksi Krom (VI) Menjadi Krom (III) Dengan Menggunakan Besi (II) Sulfat*. Kimia Anorganik, Jurusan Kimia Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kouadjo, C.G. and Zeze, A. 2010. *Chromium Tolerance and Reduction Potential of Staphylococci Species Isolated From a Fly Ash Dumping Site in South Africa*. Département d'Agriculture et Ressources Animales, Institut National Polytechnique. Yamoussoukro, Côte d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(69), pp. 15587-15594.
- Kumar, S., Chandra, A., and Pandey, K.C. 2008. *Bacillus Thuringiensis (Bt) Transgenic Crop: An Environment Friendly Insect-Pest Management Strategy*. Division of Crop Improvement, Indian Grassland and Fodder Research Institute. Jhansi-India. *Journal of Environmental Biology*, 29(5) 641-653 (2008).
- Kebria, D.Y., Khodadadi, A., Ganjidoust, H., Badkoubi, A., Amoozegar, M.A. 2009. *Isolation and Characterization of a Novel Native Bacillus Strain Capable of Degrading Diesel Fuel*. Department of Civil Engineering, Faculty of Environmental Engineering, Tarbiat Modares University, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Tehran. Tehran – Iran. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 6 (3), 435-442 p.
- Meli, K. 2009. *Dissertation : Microbial Cr (VI) Reduction in Indigenous Cultures of Bacteria : Characterization and Modelling*. University of Pretoria.

- Muharsini, S., Wardhana¹, A.H., Rijzaani, H., dan Amirhusein, B. 2003. *Karakteristik Isolat Bacillus Thuringiensis dari Beberapa Daerah di Jawa dan Sulawesi Selatan*. Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor. JITV Vol. 8. No. 4 Th. 2003.
- Sadi, N.H. 2009. *Tesis : Identifikasi Isolat Bakteri Tahan Krom(Vi) Dan Pengujian Aktivitas Enzim Krom(Vi) Reduktase*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor . Bogor.
- Sambrook., Fritsch., E.F., and Maniatis., T. 1989. *Molecular Cloning 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Press. USA.
- Schlegel, H. G. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Setya, R.A. dan Putra, S..R. 2011. Identifikasi biohidrogen secara fermentatif Dengan kultur campuran menggunakan glukosa sebagai substrat. Jurusan Kimia FMIPA ITS. Surabaya.
- Suryanto, D. 2009. *Pengukuhan Guru Besar :Prospek Keanekaragaman Hayati Mikroba (Microbial Bioprospecting) Sumatera Utara*. Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Suryanto, D. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Zolfaghary. 2012. *The Frequency and Antibiotic Resistance of Chromate Tolerating Microorganisms in Qom Industrial wastewater*. Qom University of Medical Sciences Journal Vol 6, No 2 (2012)