

Potensi Reduksi Cr(VI) di Tanah oleh Isolat Bakteri SpR3 dan SpR17

Dorys Batunan¹, V. Irene Meitiniarti²

^{1,2}Program Studi Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana
¹batunan.fun@gmail.com

Abstrak

Bioremediasi lingkungan tercemar Cr(VI) saat ini banyak dilakukan untuk mengatasi masalah pencemaran tanah oleh limbah-limbah industri yang mengandung Cr(VI). Umumnya proses bioremediasi mengandalkan kemampuan mikroba dalam mereduksi Cr(VI). Mikroba yang digunakan dapat berasal dari lingkungan setempat, sehingga lebih cocok dengan kondisi lingkungan. Isolat SpR3 dan SpR17 merupakan dua isolat yang mempunyai ketahanan terhadap Cr(VI) dan mampu mereduksi Cr(VI) pada media cair. Masih diperlukan pengujian potensi kedua isolat tersebut pada media tanah untuk mengaplikasikannya dalam bioremediasi Cr(VI). Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan potensi reduksi Cr(VI) oleh isolat SpR3 atau SpR17 menggunakan media tanah. Tahap-tahap yang dilakukan adalah menumbuhkan inokulum bakteri SpR3 dan SpR17, sterilisasi tanah, inokulasi kultur ke tanah, serta ekstraksi dan determinasi konsentrasi Cr (VI) total dari sampel tanah. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa Isolat yang diuji, yaitu SpR3 dan SpR17 sama-sama menunjukkan kemampuan reduksi yang tinggi pada tanah. Kemampuan reduksi Cr(VI) oleh SpR3 adalah $32,63 \mu\text{g g}^{-1}$ tanah, hasil ini sedikit lebih rendah dari kemampuan reduksi Cr(VI) oleh SpR17 yaitu $44,59 \mu\text{g g}^{-1}$ tanah. Melihat kemampuan kedua isolat bakteri mereduksi Cr(VI) di tanah, terbuka peluang besar untuk mengaplikasikannya bersama-sama dengan tanah bioakumulator Cr(VI) untuk bioremediasi tanah tercemar Cr(VI).

Kata kunci: Reduksi Cr (VI), Isolat SpR3, Isolat SpR17.

PENDAHULUAN

Konsentrasi krom di lingkungan semakin meningkat dengan meningkatnya jumlah industri. Peningkatan konsentrasi krom di lingkungan ini akibat penggunaan Cr dalam proses penyepuhan, pengecatan, penghambatan korosi, pembuatan baja, serta pemakaian fungisida. Pencemaran lingkungan oleh logam berat Cr mendapat perhatian besar karena krom merupakan polutan yang bersifat toksik, baik pada hewan maupun tumbuhan dan berpotensi menimbulkan kerusakan ekosistem bila konsentrasinya melebihi batas ambang. Sifat toksik krom diantaranya ditentukan oleh bentuk ion krom dan konsentrasinya.

Ada dua bentuk ion krom yang dijumpai di air, tanah maupun organisme yaitu Cr(III) dan Cr(VI). Krom dan bentuk-bentuk turunannya yang terdapat di alam

terutama berasal dari kegiatan antropogenik seperti emisi dari industri, proses-proses pembakaran dan lain-lain (Bielicka dkk., 2005).

Selain berasal dari aktivitas antropogenik, keberadaan krom di lingkungan juga berasal dari material batuan induk yang mengalami pelapukan. Kandungan krom di dalam tanah sangat bervariasi. Krom yang terdapat di dalam tanah pada umumnya dalam bentuk Cr(III) dan relatif kurang bisa diserap oleh tanaman. Peningkatan konsentrasi krom di dalam tanah kebanyakan terjadi karena adanya pembuangan limbah dari industri yang menggunakan krom. Krom yang terdapat di dalam lingkungan air berasal dari sumber alami seperti pelapukan batuan, curah hujan, atmosfer, dan dari

pencucian sistem terestrial (Bielicka, dkk. 2005).

Salah satu metode remediasi lingkungan yang murah dan prospektif dikembangkan untuk menangani pencemaran Cr adalah secara biologi dengan mempekerjakan mikroorganisme. Kemampuan mikroorganisme untuk mendegradasi polutan akhir-akhir ini banyak dimanfaatkan untuk membersihkan lingkungan yang terpolusi (Diaz, 2008). Teknologi yang memanfaatkan kemampuan mikroorganisme ataupun aktivitas enzimatisnya untuk mendegradasi atau mentransformasi polutan dari lingkungan yang tercemar biasa disebut sebagai bioremediasi.

Reduksi Cr(VI) oleh bakteri yang telah banyak dilaporkan berasal dari beberapa genera yang berbeda, seperti *Enterobacter*, *Bacillus*, *Ochrobacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Providencia*, *Exiguobacterium*, *Leucobacter* (Mondaca dkk, 1998; Cheung dan Gu, 2007; Sarangi dan Krishnan, 2008), *Microbacterium* (Pattanapipaisal dkk., 2001), *Desulfovibrio* (Michel dkk., 2001), *Enterobacter* sp (Wang dan Mori, 1990), *Escherichia coli* (Shen dan Wang, 1993), dan *Bacillus* spp. (Campos dkk., 1995). Beberapa mikroorganisme pada kondisi ada atau tidak ada oksigen dapat mereduksi Cr(VI) ke bentuk trivalen yang tidak toksis (Politi dkk. 2007; Francisco dkk. 2002).

Beberapa isolat mikroorganisme telah berhasil diisolasi dari sampel limbah penyamakan kulit dan *rhizofe* tanaman *A. indica* (Meitiniarti dkk. 2012). Dari isolat-isolat tersebut, isolat SpR3 dan SpR17 merupakan dua isolat yang telah diteliti

dan menunjukkan kemampuan reduksi Cr(VI) yang cukup baik pada media luria cair yang mengandung Cr(VI) (Marchelin, 2015). Kedua isolat ini berpotensi digunakan sebagai pereduksi Cr(VI), namun masih diperlukan penelitian kemampuan reduksi Cr(VI) oleh kedua isolat ini di tanah sebelum diaplikasikan dalam bioremediasi Cr(VI). Adapun tujuan dari penelitian ini menentukan potensi reduksi Cr(VI) oleh isolat SpR3 dan SpR17 menggunakan media tanah.

BAHAN DAN METODE

1. Isolat Bakteri SpR3 dan SpR17, dan media tanah yang digunakan

Isolat SpR3 dan SpR17 merupakan dua isolat bakteri yang diisolasi dari rhizosfir *A. indica* yang ditanam pada tanah yang terkontaminasi Cr(VI). Kedua bakteri ini mempunyai ketahanan terhadap Cr(VI) hingga 100 ppm. Tanah yang digunakan berasal dari lapisan 0-30 cm tanah kebun yang terletak di Salatiga. Sebelum digunakan tanah disaring dahulu dengan saringan tanah diameter 2 mm.

2. Pemeliharaan/ perbanyakan isolat SpR3 dan SpR17

Medium pemeliharaan/ perbanyakan yang digunakan adalah medium LB cair dengan komposisi : NaCl 5 gram, *Extra Yeast* 5 gram, *Trypton* 5 gram, $K_2Cr_2O_7$ 200 ml, akuades 800 ml. Medium yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada penggojok dengan kecepatan 145 rpm selama 5 hari atau hingga mencapai konsentrasi sel $1,10^8$ CFU/ml.

3. Persiapan Tanah dan wadah botol

Sampel tanah yang akan digunakan, disterilkan dengan *autoclave* pada suhu $120^\circ C$, 1,1 atm selama 30 menit (Alef,

1995). Parameter yang akan diukur adalah jenis tanah, pH, dan kadar air.

Botol kaca yang dipakai dalam penelitian ini harus disterilkan dengan cara merendam botol-botol kaca dalam larutan H_2SO_4 dan air selama satu hari. Setelah itu botol-botol di cuci dengan air keran dan di bilas dengan akuades. Botol penelitian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu $121^\circ C$ selama 20 menit.

4. Perlakuan Inokulasi Kultur ke Tanah dan parameter yang diukur

Pada penelitian ini diteliti ada 3 perlakuan yang akan diuji yaitu kontrol (tanpa inokulasi bakteri), inokulasi SpR3 dan SpR17. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

Pertama-tama, panen kultur isolat SpR3 dan SpR17 dengan cara *dicentrifuse* dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Resuspensikan pelet sel yang terbentuk dengan menambah 1 ml medium LB cair dengan Cr(VI) 100 ppm. Dari masing-masing suspensi sel diambil 100 μl di dalam *ependof* dan ditambahkan dengan 400 μl medium LB cair dengan Cr(VI) 100 ppm, siap untuk diinokulasikan ke tanah. Untuk perlakuan kontrol, digunakan 500 μl medium LB cair dengan Cr(VI).

Tanah yang telah disterilkan ditimbang 3 gram dan dimasukkan pada botol penelitian telah disterilisasi. Tanah dalam botol-botol tersebut diinokulasi dengan kultur maupun medium LB cair dengan Cr(VI) (kontrol) yang telah disiapkan diatas.

Setelah itu, ambil botol-botol penelitian untuk sampel t0 dan inkubasi sisanya pada tempat gelap. Parameter yang akan diuji dalam penelitian ini adalah jumlah sel, dan reduksi Cr (VI), dan

pengamatan dilakukan saat 0 jam, 24 jam, 96 jam dan 192 jam.

5. Penentuan jumlah sel

Sampel tanah dari tiap pengamatan ditimbang sebanyak 1 gram dan diencerkan dengan akuades steril dan diencerkan hingga 10^8 . Langkah selanjutnya, ambil 200 μl dari pengenceran 1×10^{-6} - 1×10^{-8} kemudian ditabur pada media lempeng LB padat dengan Cr (VI) 100 ppm. Koloni bakteri tumbuh setelah 3 hari kemudian dihitung dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*).

6. Ekstraksi dan determinasi konsentrasi Cr(VI) total dari sampel tanah

Ekstraksi dan determinasi konsentrasi Cr(VI) total dari sampel tanah mengikuti prosedur Gheju *et al.* (2009). Satu gram tanah kering udara dimasukkan ke dalam botol 150 ml yang berisi 20 ml (KH_2PO_4 & K_2HPO_4). Botol ditutup rapat dan di *shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 24 jam. Konsentrasi Cr(VI) diukur dengan menggunakan metode kolorimetri 1,5-difenilkarbasida, berdasarkan kompleks ungu yang dibentuk oleh Cr(VI) dengan adanya 1,5-difenilkarbasida (Eaton *et al.*, 1992). Warna sepenuhnya terbentuk selama 15 menit dan absorbansi diukur pada 540 nm menggunakan UV-VIS *spektrofotometers* (UV mini-1240).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh, diketahui bahwa walaupun dari kultur bakteri dengan kerapan yang sama (diperkirakan jumlah sel $1,10^8$ CFU/ml), pada saat diinokulasikan dan dihitung, ternyata jumlah sel SpR3 50% lebih sedikit dibanding jumlah sel SpR17 (Tabel 1). Hal ini kemungkinan karena isolat SpR3 lebih lambat tumbuhnya dibanding SpR17. Hal

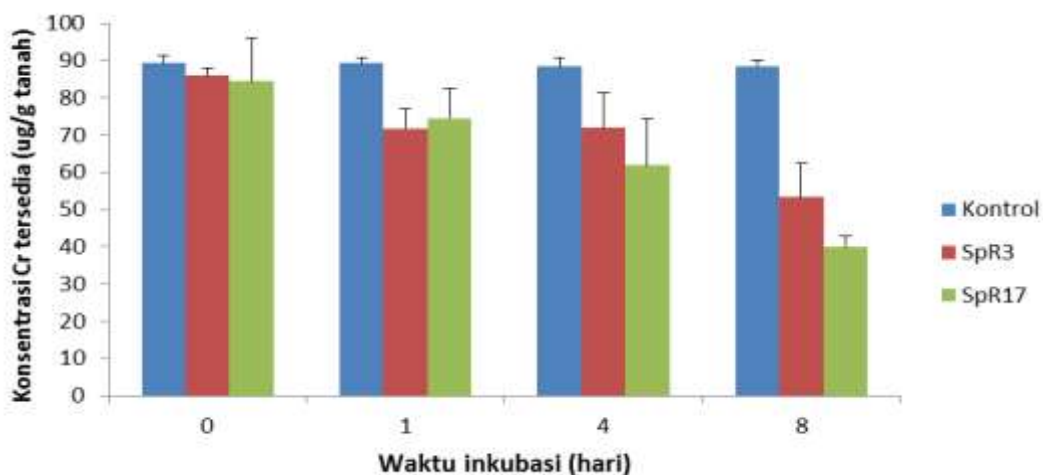
ini diperkuat dengan data jumlah sel selama penelitian yang menunjukkan bahwa isolat SpR3 memang lebih lambat tumbuhnya (hari ke 8 baru mencapai jumlah sel yang sama dengan SpR17 hari pertama dan ke 4). Dari data pada Tabel 1 juga dapat dilihat bahwa isolat SpR17 lebih cepat tumbuh di tanah yang mengandung Cr(VI), namun pertumbuhannya tidak sebanyak SpR3 dan tidak mampu bertahan lama di lingkungan (pada saat 8 hari setelah inokulasi, jumlah sel sudah menurun). Data Tabel 1 juga menunjukkan bahwa di tanah biasa tidak terdapat bakteri yang tahan terhadap Cr(VI) karena jumlahnya nol (tidak terdeteksi).

Tabel 1. Jumlah sel bakteri tahan Cr di tanah yang tidak diinokulasi (K), yang diinokulasi SpR3 dan SpR17 pada T0, T1, T4 dan T8.

Jumlah sel bakteri (CFU/g tanah)			
Waktu pengambilan sampel	Kontrol	SpR3	SpR17
0	0	$6,76 \times 10^7$	$12,28 \times 10^7$
1	0	2295×10^7	$4272,5 \times 10^7$
4	0	2656×10^7	4336×10^7
8	0	4812×10^7	3956×10^7

Isolat SpR3 dan SpR17 terbukti dapat tumbuh di tanah yang tercemar oleh Cr(VI). Ke dua isolat ini dapat tumbuh pada tanah yang tercemar oleh Cr(VI), hal ini terbukti dari hasil perhitungan jumlah sel bakteri pada sampel tanah (Tabel 1). Isolat SpR3 dan SpR17 memang bersifat resisten terhadap Cr(VI) karena keduanya diperoleh dari rhizosfer *Acalypha indica* yang ditumbuhkan pada tanah yang dicampur dengan limbah tekstil (SpR3) atau penyamakan kulit (SpR17) yang mengandung Cr(VI) (Meitiniarti *et al.*, 2012).

Jika dilihat dari jumlah sel pada medium yang mengandung Cr(VI), tampak bahwa isolat SpR17 lebih tahan terhadap Cr(VI) dan mampu tumbuh dengan cepat dibanding SpR3. Namun setelah di media tanah, tampak bahwa isolat SpR3 lebih mampu bertahan terhadap Cr(VI) dan mampu memperbanyak diri untuk waktu yang lebih lama. Jika jumlah sel SpR3 di awal sama dengan jumlah sel SpR17, kemungkinan isolat SpR3 ini dapat lebih banyak jumlahnya dan dapat bertahan lebih lama di lingkungan dibanding isolat SpR17.



Gambar 1. Konsentrasi Cr tersedia (ug/g tanah) pada kontrol dan tanah yang diinokulasi bakteri SpR3 dan SpR17 pada T0, T1, T4 dan T8.

Jika dikaitkan dengan kemampuan mereduksi Cr(VI) (Tabel 2) tampak bahwa konsentrasi Cr(VI) pada tanah yang tidak diinokulasi bakteri, relatif tetap (sekitar 90 ug/gram tanah) karena tidak ada bakteri yang tahan terhadap Cr(VI) dalam tanah tersebut. Pada tanah yang diinokulasi, terjadi pengurangan konsentrasi Cr(VI) (Gambar 1). Pengurangan konsentrasi Cr(VI) pada tanah yang diinokulasi isolat SpR17 meningkat hingga hari ke 8, walaupun jumlah sel nya telah menurun. Sedangkan konsentrasi Cr(VI) pada tanah yang diinokulasi isolat SpR3 tampak terus menurun, sejalan dengan peningkatan jumlah sel. Dari hasil ini tampak bahwa ada perbedaan pola kemampuan reduksi Cr(VI) oleh kedua isolat ini. Isolat SpR3 mereduksi Cr(VI) bersamaan dengan pertumbuhan sel, yaitu jika jumlah sel meningkat, kemampuan reduksi Cr(VI) juga meningkat. Sebaliknya, isolat SpR17 melakukan reduksi Cr(VI) lambat di awal pertumbuhan, dan setelah terjadi penurunan jumlah sel, reduksi Cr(VI) tetap terjadi.

Tabel 2. Konsentrasi Cr tersedia ($\mu\text{g g}^{-1}$ tanah) pada kontrol dan tanah yang diinokulasi bakteri SpR3 dan SpR17 pada T0, T1, T4 dan T8.

Waktu pengambilan sampel	Konsentrasi Cr tersedia ($\mu\text{g Cr g}^{-1}$ tanah)		
	kontrol	SpR3	SpR17
0	89,32 ± 2,13	85,91 ± 2,16	84,43 ± 11,6
1	89,22 ± 1,62	71,72 ± 5,27	74,53 ± 7,87
4	88,39 ± 2,22	71,93 ± 9,28	61,82 ± 12,44
8	88,59 ± 1,62	53,28 ± 9,13	39,84 ± 3,16

Dari perhitungan penurunan konsentrasi Cr(VI) pada Tabel 2, kemampuan isolat SpR3 untuk mereduksi

Cr(VI) selama 8 hari adalah $32,63 \mu\text{g g}^{-1}$ tanah, sedikit lebih rendah dibanding isolat SpR17, yang mampu mereduksi Cr(VI) sebesar $44,59 \mu\text{g g}^{-1}$ tanah. Kemampuan kedua isolat ini hampir sama dengan kemampuan reduksi Cr(VI) oleh *Streptomyces* sp. MCI yang mampu mereduksi $47 \mu\text{g g}^{-1}$ berat kering tanah setelah 7 hari (Politi *et al.*, 2011). Melihat kemampuan kedua isolat bakteri mereduksi Cr(VI) di tanah, terbuka peluang besar untuk mengaplikasikannya bersama-sama dengan tanah bioakumulator Cr(VI) untuk bioremediasi tanah tercemar Cr(VI).

KESIMPULAN

Isolat yang diuji, yaitu SpR3 dan SpR17 sama-sama menunjukkan kemampuan reduksi yang tinggi pada tanah. Kemampuan reduksi Cr(VI) oleh SpR3 adalah $32,63 \mu\text{g g}^{-1}$ tanah, hasil ini sedikit lebih rendah dari kemampuan reduksi Cr(VI) oleh SpR17 yaitu $44,59 \mu\text{g g}^{-1}$ tanah.

DAFTAR PUSTAKA

- Alef, K. 1995. Sterilization of soil and inhibition of microbial activity. *Methods Biochemistry*. 52.
- Bielicka A., Bojanowska, I., Winiewski, A. 2005. Two Faces of Chromium - Pollutant and Bioelement. *Polish Journal of Environmental Studies* 14(1): 5-10.
- Campos, J., M. Martinez-Pacheco and C. Cervantes. 1995. Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. Strain. *Anton. Leeuw.*, 68: 203-208

- Cheung, K. H. and Gu, J. (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation potential: A review. *Int. Biodeter. Biodeg.* **59**,8-15.
- Diaz E (editor). (2008). *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology* (1st ed.). Caister Academic Press.
- Eaton A.D., Clesceri L.S., Greenberg A.E. (1992). "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," APHA/AWWA/WEF, Washington.
- Francisco, R., Alpoim, M.C. and Morais, P.V. (2002) Diversity of chromium-resistant and reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. *J Appl Microbiol* **92**, 837–843.
- Gheju M., Balcu I., Ciopec M., (2009). Analysis of hexavalent chromium uptake by plants in polluted soils. *Ovidius Univ. Ann. Chem.*, **20**, 127-131.
- Meitiniarti VI, Agna S Krave, S. Kasmiyati. 2012. Isolasi Bakteri Toleran-Cr(VI) dari Rhizosfer *Acalypha indica* yang Tumbuh pada Tanah yang Mengandung Limbah Tekstil & Penyamakan Kulit. Prosiding Sem Nas Peranan Bio & Pend Bio dlm pengemb karakter konservasi, UNNES
- Michel, C., M. Brugma, C. Aubert, A. Bernadae and M. Bruschi, 2001. Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate reducing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**: 95.
- Mondaca, M.A., C.L. Gonzalez and C.A. Zaror, 1998. Isolation, characterization and expression of a plasmid encoding chromate resistance in *Pseudomonas putida* KT2441. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**: 367
- Pattanapitpaisal, P., N.L. Brown and L.E. Macaskie. 2001. Chromate reduction and 16SrRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI) contaminated site. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 257-261.
- Polti, M.A., Amoroso, M.J., Abate, C.M. 2011. Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* p. MC1 Water Air & Soil Polutin **214**: 9-57
- Sarangi, A. and Krishnan, C. 2008. Comparison of invitro Cr(VI) reduction by CFEs of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil. *Bioresour. Technol.* **99**, 4130-4137.
- Salunkhe P.B., Dhakephalkar P.K., Paknikar K.M. (1998). Bioremediation of hexavalent chromium in soil microcosms. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 749-751.
- Shen, H., Wang, Y.-T. 1994. Modeling hexavalent chromium reduction in *Escherichia coli* ATCC 33456. *Biotechnology and Bioengineering*, **43** (4), 293-300
- Wang P, Mori T. 1990. Membrane – associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*, *Journal of Bacteriology* **172**, 1670-1672.