

BIOACCUMULATION OF IRON (Fe) IN *Bacillus* JA1, *Sporosarcina* JA4, AND *Lysinibacillus* JB2

Afianita Dian Rahmawati, Enny Zulaika*

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Teknik Kimia, Keputih, Kec. Sukolilo, Kota Surabaya, Jawa Timur
*Email: ennyzulaika123@gmail.com; enny@bio.its.ac.id

ABSTRACT

Carbonatogenic bacteria can produce calcium carbonate (CaCO_3). Steel reinforcement of concrete is mainly made of a mixture of carbon (C) and ferrous (Fe) elements. Fe is classified as heavy metal, when in high concentrations it is toxic to bacteria. The purpose of this study was to determine the bioaccumulation of carbonatogenic bacteria to Fe. The isolates used in this study were *Bacillus* JA1, *Sporosarcina* JA4, and *Lysinibacillus* JB2. All isolates were subcultured on nutrient agar slant media. Cultures were made on minimal salt medium: nutrient broth (95%:5%) with 24 hours incubation. Bioaccumulation test using minimal salt medium: nutrient broth (95%:5%) containing ferrous 5 ppm and 10 ppm. Accumulated ferrous concentration was measured using atomic absorption spectrophotometry. The result of this research is that the bioaccumulation of ferrous by the isolates after 2 hours of incubation is greater than 1 hour of incubation. *Bacillus* JA1 has the highest bioaccumulation ability which was 9,19 ppm after 2 hours exposure of 10 ppm ferrous and its ferrous bioaccumulation efficiency was 91,85%.

Keywords: Bioaccumulation; Carbonatogenic; Ferrous; MSM-NB.

PENDAHULUAN

Pencemaran logam berat merupakan permasalahan lingkungan yang sampai saat masih membutuhkan penanganan rehabilitasi yang serius (Tangahu et al., 2011). Logam berat memiliki berat lebih dari 5 g/cm^3 (Kurniawan dan Mustikasari, 2019), pada konsentrasi tinggi, logam berat memiliki efek toksik bagi organisme hidup, termasuk bakteri (Igiri et al., 2018). Di alam terdapat lebih 60 unsur yang termasuk logam berat, salah satunya adalah Fe atau besi (Kurniawan dan Mustikasari, 2019). Fe bersifat padat, korosif, memiliki titik lebur rendah dan 5% jumlah total di alam merupakan komponen kerak bumi. Fe termasuk logam berat esensial, yaitu dalam jumlah tertentu dibutuhkan oleh tubuh dan akan bersifat racun apabila dikonsumsi secara berlebihan (Ibrahim et al., 2017).

Pemulihan kontaminan logam berat dapat dilakukan dengan mekanisme bioremediasi, yaitu suatu metode

pemulihan menggunakan agen hayati untuk menghilangkan atau menurunkan kadar logam berat tersebut (Priadi, 2012). Bakteri dapat dimanfaatkan sebagai agen hayati untuk melakukan bioremediasi sebab bakteri akan mencari cara untuk bertahan hidup, salah satunya dengan mekanisme bioakumulasi dan atau bioadsorpsi (Irawati et al., 2017). Bakteri resistensi logam berat termasuk logam Fe dapat melakukan bioakumulasi (Kurniawan dan Ekowati, 2016), logam berat sebagai penerima elektron pada mekanisme respirasi sel. Selain itu, bakteri dapat memproduksi polisakarida ekstraselular yang berfungsi sebagai tempat bioadsorpsi atau membentuk metalothionein yaitu suatu protein yang akan mengkelat logam untuk detoksifikasi dan regulasi ion logam di dalam sel (Sonia dan Arashiro, 2018). Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri *Bacillus* JA1, *Lysinibacillus* JB2, dan *Sporosarcina* JA4 mengakumulasi logam besi (Fe).

METODE PENELITIAN

Subkultur Pada Nutrient Agar Miring

Komposisi media nutrient agar (NA) per liter adalah 28 g NA powder Himedia®, dilarutkan dengan akuades sampai 1000 ml, disterilkan menggunakan autoklaf (121°C, 15 menit). Sebanyak 10 ml dituang ke dalam tabung reaksi secara aseptis dan diletakkan dengan posisi miring supaya membentuk NA miring. Didiamkan 24 jam untuk melihat apakah media terkontaminasi atau tidak (Harley dan Prescott, 2002). Isolat *Bacillus* JA1, *Sporosarcina* JA4, dan *Lysinibacillus* JB2 diambil satu ose dan diinokulasikan secara aseptik pada media NA miring dengan metode goresan kontinyu (Basha et al., 2018). Kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, keberhasilan subkultur ditandai dengan adanya koloni yang tumbuh disepanjang goresan jarum ose (Harley dan Prescott, 2002).

Pembuatan Larutan Stok Logam Fe

Logam Fe yang digunakan adalah $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Larutan stok dibuat dengan konsentrasi 500 ppm (mg/L). Sebanyak 50 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah akuades sampai dengan 100 ml, disterilisasi dengan autoclave (121°C, 15 menit). Larutan stok logam Fe disimpan di botol gelap.

Penentuan Umur Perlakuan

Umur kultur untuk perlakuan bioakumulasi berpedoman pada kurva pertumbuhan tanpa paparan logam Fe di media minimal salt medium: nutrient broth 95% : 5% (MSM-NB) yaitu ketika kultur berumur 24 jam. MSM dibuat dengan komposisi (per liter): NaCl 10 g, Na_2HPO_4 5 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; disterilisasi dengan autoclave (121°C, 15 menit) (Prabhakaran et al., 2014).

Sebanyak 10 ose isolat diinokulasikan secara aseptis ke dalam 50 ml medium MSM-NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang di atas rotary shaker (100 rpm). Kultur starter sebanyak 20 ml diinokulasikan ke dalam 90 ml MSM-NB + $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi Fe 5 ppm

dan 10 ppm. Sebagai kontrol adalah kultur tanpa logam Fe. Kultur yang telah terpapar Fe diinkubasi selama 1 jam dan 2 jam di atas rotary shaker (100 rpm), dilakukan secara duplo (Pamungkas dan Zulaika, 2015)

Bioakumulasi

Kultur yang telah dipapar logam Fe sesuai waktu paparan ditambah 10 tetes HNO_3 , dipanaskan 100°C selama 10 menit. Dilakukan filtrasi menggunakan kertas whatman nomor 42 untuk memisahkan bakteri dengan filtratnya.. Konsentrasi Fe diukur dengan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*), panjang gelombang 248,3 nm (Farisna dan Zulaika, 2015). Konsentrasi Fe pada filtrat merupakan konsentrasi logam Fe sisa yang tidak diakumulasi oleh bakteri. Konsentrasi yang diakumulasi bakteri dan efisien akumulasinya dihitung dengan formula:

$$R = K_0 - K_s$$

$$E = (R/K_0) \times 100\%$$

Keterangan :

R : Konsentrasi Fe yang diakumulasi bakteri

E : Efisiensi bioakumulasi Fe

K_0 : Konsentrasi awal Fe tanpa bakteri

K_s : Konsentrasi akhir Fe pada filtrat

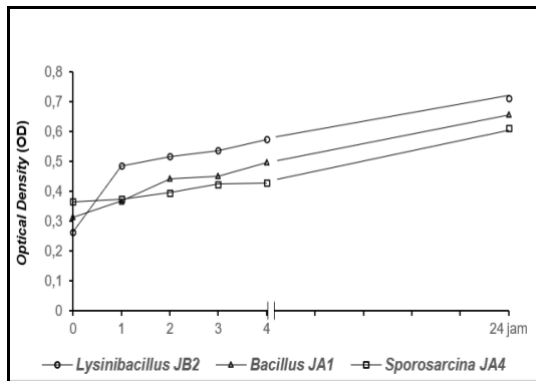
Konsentrasi bioakumulasi Fe pada isolat dan efisiensinya dianalisis dengan *Analysis of Variance* (Anova) *two-way*, taraf kepercayaan α : 5%. Adanya perbedaan di uji signifikansinya dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur Starter

Starter untuk bioakumulasi logam Fe mengacu pola pertumbuhan pada fase eksponensial di media MSM : NB (95% : 5%) sampai 24 jam, yang dicapai pada OD 0,6 - 0,7 (Gambar 1). Berdasarkan Prescott et al., (2008), bakteri akan membelah dengan laju yang konstan dan

massa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama ketika memasuki fase eksponensial. Selain itu, enzim dan senyawa metabolit yang dibutuhkan untuk pembelahan sel sudah tersedia sehingga pembelahan sel dapat berjalan secara maksimal.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat pada media MSM-NB (95% : 5%)

Berdasarkan penelitian Farisna dan Zulaika, (2015), fase eksponensial starter untuk bioakumulasi logam Fe berada pada jam ke 12 setelah inkubasi. Hal tersebut terjadi karena media pertumbuhan isolat yang digunakan adalah NB saja, dimana media tersebut kaya nutrisi karena mengandung pepton dan ekstrak daging sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan

isolat. Namun, medium NB yang memiliki kandungan pepton dapat membiaskan bioakumulasi logam Fe pada bakteri sebagai bioakumulator logam, karena gugus fungsi amina dan karboksil pada pepton akan berikatan dengan Fe, sehingga bioakumulasi oleh bakteri tidak berjalan optimal (Zhou et al., 2010). Hal tersebut dibuktikan pada penelitian Farisna dan Zulaika (2015), terjadi penurunan konsentrasi Fe pada media NB sebelum diinokulasi bakteri, yaitu dari 50 ppm menjadi 9,5 ppm.

Bioakumulasi

Isolat *Bacillus* JA1, *Sporosarcina* JA4, dan *Lysinibacillus* JB2 dapat mengakumulasi logam Fe. Bioakumulasi Fe oleh isolat setelah 2 jam inkubasi lebih besar daripada 1 jam inkubasi. Terdapat perbedaan bioakumulasi Fe dan efisiensi bioakumulasi pada isolat terhadap konsentrasi Fe 5 ppm dan 10 ppm kecuali pada *Lysinibacillus* JB2. Sedangkan waktu inkubasi 1 jam dan 2 jam, tidak berbeda nyata antar isolat terhadap bioakumulasi Fe dan efisiensi bioakumulasinya. Bioakumulasi Fe yang tertinggi terdapat pada *Bacillus* JA1, yaitu 9,19 ppm pada paparan 10 ppm dan efisiensi bioakumulasinya 91,85 % (Tabel 1).

Tabel 1. Bioakumulasi Fe dan efisiensi bioakumulasi oleh isolat

No	Isolat	Paparan Fe (ppm)	Konsentrasi Bioakumulasi		Efisiensi Bioakumulasi (%)	
			1 Jam	2 Jam	1 Jam	2 Jam
1.	<i>Bacillus</i> JA1	5	4,50 ^a ± 0,54	4,30 ^a ± 0,13	89,90 ± 10,89	85,90 ± 2,69
		10	8,59 ^b ± 0,40	9,19 ^b ± 0,21	85,90 ± 3,96	91,85 ± 2,05
2.	<i>Sporosarcina</i> JA4	5	4,24 ^a ± 0,20	4,23 ^a ± 0,11	84,80 ± 3,96	84,60 ± 2,26
		10	7,93 ^b ± 0,95	8,93 ^b ± 0,18	79,30 ± 9,48	89,25 ± 1,77
3.	<i>Lysinibacillus</i> JB2	5	4,35 ^a ± 0,10	4,38 ^a ± 0,06	87,00 ^a ± 1,98	87,60 ^a ± 1,13
		10	7,88 ^b ± 0,03	8,39 ^b ± 0,30	78,80 ^b ± 0,28	83,90 ^b ± 2,97

*Angka yang didampingi huruf berbeda pada kolom yang sama, berbeda signifikan ($p < 0,05$).

Pada penelitian Farisna dan Zulaika, (2015), diperoleh bioakumulasi Fe tertinggi pada *Bacillus* DA11, yaitu 27,97 ppm pada paparan Fe 33,6 ppm dan efisiensi bioakumulasi 83,25%. Berdasarkan penelitian Pamungkas dan Zulaika (2015), perbedaan konsentrasi paparan Fe mempengaruhi jumlah Fe

yang diakumulasi oleh masing-masing isolat. Hal tersebut berkaitan dengan perbedaan kebutuhan Fe masing-masing isolat. Bakteri membutuhkan ion logam supaya proses aktivasi seluler, seperti transport elektron selama oksidasi dapat berjalan efisien (Cappucino dan Sherman, 2014).

Bacillus JA1, *Sporosarcina* JA4, dan *Lysinibacillus* JB2 merupakan bakteri Gram positif. Gugus karboksil pada dinding sel bakteri Gram positif berperan sebagai tempat pengikatan kation logam di permukaan sel (Fomina dan Gadd, 2014). Beberapa bakteri mampu mengeluarkan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) berupa polisakarida yang disekresikan keluar dinding sel, pada gugus hidoksilnya dapat mengikat Fe. Selain itu, beberapa bakteri dapat mensintesis metallothionein, yaitu suatu protein sebagai respons terhadap peningkatan paparan logam (Das et al., 2016). Mekanisme yang lain adalah bakteri mempresipitasikan Fe untuk menurunkan konsentrasinya menjadi kompleks yang tidak larut sehingga dapat mengurangi bioavailabilitas dan toksisitasnya. Jalur mekanisme logam Fe di dalam sel bakteri supaya tidak meracuni sel diatur oleh senyawa yang disebut siderofor (Saha et al., 2016). Bioakumulasi logam oleh bakteri dapat dipengaruhi oleh temperatur, pH, biomassa, kemampuan toleransi bakteri terhadap logam, dan waktu paparan logam (Shaaban et al., 2015).

KESIMPULAN

Semua isolat resisten terhadap Fe dan dapat mengakumulasi Fe. Bioakumulasi setelah 2 jam inkubasi lebih besar daripada 1 jam inkubasi. Isolat *Bacillus* JA1 mempunyai kemampuan bioakumulasi Fe tertinggi, yaitu 9,19 ppm pada paparan 10 ppm dengan waktu inkubasi 2 jam dan efisiensi bioakumulasi 91,85 %.

DAFTAR PUSTAKA

Basha, S., Lingamgunta, L. K., Kannali, J., Gajula, S. K., Bandikari, R., Dasari, S., & Balaji, V. K. (2018). Subsurface endospore-forming bacteria possess bio-sealant

properties. *Scientific reports*, 8: 1-13.

Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology a Laboratory Manual. 10th edition*. USA: Pearson Education, Inc.

Das, S., Dash, H. R., Chakraborty, J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100: 2967-2984.

Farisna, S. T., & Zulaika, E. (2015). Potensi *Bacillus* Sebagai Bakteri Siderofor dan Bioremoval Logam Besi (Fe). *Tugas Akhir*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Fomina, M., & Gadd, G. M. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition, and application. *Bioresour Technol*, 160: 3-14.

Harley, J. P., & Prescott, L. M. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition*. USA: The McGraw-Hill Companies.

Igiri, B. E., Okoduwa, S. I. R., Idoko, G. O., Akabuogo, E. P., Adeyi, A. O., & Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of Toxicology*, 1-16.

Irawati, W., Parhusip, A. J. N., Christian, S., & Yuwono, T. (2017). The potential capability of bacteria and yeast strains isolated from Rungkut Industrial Sewage in Indonesia as bio accumulators and biosorbents of copper. *Biodiversitas*, 18(3): 971-977.

Irhamni., Pandia, S., Purba, E., & Hasan, W. (2017). Serapan Logam Berat Esensial dan Non Esensial pada Air Lindi TPA Kota Banda Aceh dalam Mewujudkan Pembangunan Berkelanjutan. *Jurnal Serambi Engineering*, 2(3): 134 – 140.

Kurniawan, A., & Ekowati, N. (2016). Review: Mikoremediasi Logam

- Berat. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 3(1): 36-45.
- _____, & Mustikasari, D. (2019). Review: Mekanisme Akumulasi Logam Berat Di Ekosistem Pasca tambang Timah. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 17(3): 408-415.
- Pamungkas, A., & Zulaika, E. (2015). Viabilitas *Azotobacter* pada Medium yang Terpapar Logam Besi (Fe). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 4(1): 2337-3520.
- Prabhakaran, P., Sureshbabu, A., Rajakumar, S., & Ayyasamy, P. M. (2014). Bioremediation of Crude Oil in Synthetic Mineral Salts Medium Enriched with Aerobic Bacterial Consortium. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering, and Technology*, 3(2): 1-7.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2008). *Microbiology*, Seventh Edition. New York: McGraw-Hill.
- Priadie, B. (2012). Teknik bioremediasi sebagai alternatif dalam upaya pengendalian pencemaran air. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 10(1): 38-48.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Kumar, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res*, 23: 3984–3999.
- Shaaban, M. T., Ibrahim, H. A. H., Abouhend, A. S., & El-Moselhy, K. M. (2015). Removal of Heavy Metals from Aqueous Solutions Using Multi-Metals and Antibiotics Resistant Bacterium Isolated from The Red Sea, Egypt. *American Journal of Microbiological Research*, 3(3): 93-106.
- Sonia, M., & Arashiro, T. (2018). Lead absorption mechanisms in bacteria as strategies for lead bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-8.
- Tangahu, B. V., Abdullah, S. R. S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int J Chem Eng*, 1 -31.
- Zhou, J. C., Wang, X., Xue, M., Xu, Z., Hamasaki, T., Yang, Y., Wang, K., & Dunn, B. (2010). Characterization of gold nanoparticle binding to microtubule filaments. *Materials Science and Engineering*, 30: 20–26.