

# EFEKTIFITAS PENGIKATAN LOGAM Pb OLEH BAKTERI, *Bacillus subtilis*

Maulin Inggraini  
Program Studi DIII Analisis Kesehatan STIKes Mitra Keluarga  
Jl. Pengasinan Rawa Semut Margahayu  
Bekasi Timur 17133  
e-mail : molinmool@gmail.com

## ABSTRACT

### *Effectiveness of Heavy Metal (Pb) Binding of Bactery Bacillus subtilis*

*The rapid development of technology and industries lead to higher environmental pollution by heavy metals, especially Pb. Reduction of heavy metals is commonly done using chemical and physical approach. Another alternative is biological technique which is more efficient due to its higher metal binding and readily available as materials. Bacillus subtilis was a potential bacterium in reducing heavy metal contamination. This study aimed to determine the B. subtilis binding effectiveness of Pb; to test the bacterial tolerance to Pb at varied concentrations; and to detect the accumulation sites of Pb within B. subtilis. The results showed that B. subtilis was able to bind Pb with the effectiveness percentage of 17.45%. Pb was accumulated in the cell walls.*

*Keyword: Bacillus subtilis, Pb binding*

## ABSTRAK

Pesatnya perkembangan teknologi dan industri menyebabkan pencemaran lingkungan yang lebih tinggi dengan logam berat, terutama Pb. Pengurangan logam berat yang biasanya dilakukan dengan menggunakan bahan kimia dan pendekatan fisik. Alternatif lain adalah teknik biologi yang lebih efisien karena logam yang lebih tinggi mengikat dan tersedia sebagai bahan. *Bacillus subtilis* adalah bakteri potensial dalam mengurangi kontaminasi logam. Penelitian ini bertujuan untuk mendeterminasi *B. subtilis* yang efektivitas mengikat Pb; untuk menguji toleransi bakteri terhadap Pb pada konsentrasi yang bervariasi; dan untuk mendeteksi akumulasi Pb dalam *Bacillus subtilis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *B. subtilis* mampu mengikat Pb dengan efektivitas persentase 17,45%. Pb terakumulasi dalam dinding sel.

Kata Kunci : *Bacillus subtilis*, pengikatan Pb

## PENDAHULUAN

Air merupakan salah satu kebutuhan hidup yang sangat penting sehingga pencemaran air oleh zat-zat dalam golongan B3 (Bahan Berbahaya Beracun) menjadi permasalahan besar karena menjadi sumber pencemar dan tempat berkembangnya mikroba patogen. Kandungan logam berat yang tinggi merupakan penyebab pencemaran air yang potensial. Logam yang mencemari air dapat berasal dari limbah rumah tangga, dan limbah pabrik yang masuk ke badan air (Akoto *et al.*, 2008).

Bioremediasi merupakan proses penggunaan makhluk hidup untuk mendegradasi bahan pencemar hingga tercapai kondisi yang tidak membahayakan atau menurunkan konsentrasi pencemar hingga

berada di bawah ambang batas. Teknik yang digunakan adalah dengan menggunakan makhluk hidup spesifik yang mampu hidup di lingkungan tercemar dan memiliki kemampuan untuk mengurangi toksisitas yang beresiko terhadap kesehatan manusia dan/atau lingkungan (Kumar *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil penelitian (Zulaika *et al.*, 2012) bakteri dari genus *Bacillus* sp. Termasuk dalam bakteri yang resisten terhadap logam Hg, Pb, Cu dan Cd. Bakteri tersebut diisolasi dari sungai Kalimas Surabaya yang sudah tercemar dengan logam berat.

Salah satu genus *Bacillus* sp. yang mampu hidup pada habitat yang tercemar logam berat adalah *Bacillus subtilis*. Menurut Issazadeh *et al.* (2011) *B. subtilis* mampu mengikat logam Pb, Cd, Zn dan Cu. *B. subtilis* juga merupakan pengakumulasi

logam Zn dan Pb terbaik bila dibandingkan dengan *B. licheniformis*, *B. cereus* dan *B. amyloliquefaciens*.

Studi ini bertujuan untuk mengetahui:

1. Efektifitas pengikatan logam Pb pada bakteri *B. subtilis*
2. Toleransi *B. subtilis* terhadap logam Pb
3. Tempat akumulasi logam Pb pada *B. subtilis*.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan dalam pemanfaatan *B. subtilis* sebagai pengelolaan limbah logam pada perairan.

## BAHAN DAN METODE

### Alat dan Bahan

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *B. subtilis* koleksi laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UNSOED, medium NB, aquades steril, plastik tahan panas, alkohol 70%, kapas, HCl pekat, Pb. Sedangkan alat yang digunakan adalah autoklaf, *hot plate and stirrer*, gelas ukur, pipet ukur 10 ml, labu Erlenmeyer, botol gelas 125 ml, tabung reaksi, pH meter, inkubator, *haemocytometer*, *shaker*, *tissue grinder*, *sentrifuge*, instrument AAS.

### Metode Penelitian

#### 1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan untuk menguji efektifitas *B. subtilis* dalam mengikat logam adalah penambahan logam Pb dengan konsentrasi 0,35 ppm pada medium NB. Pengujian kemampuan toleransi *B. subtilis* terhadap logam adalah dengan menumbuhkan *B. subtilis* pada medium NB dengan penambahan logam Pb pada konsentrasi 1 ppm, 10 ppm dan 20 ppm. Penentuan tempat akumulasi logam berdasarkan jumlah logam yang terdapat pada sitoplasma dan dinding sel.

## 2. Cara Kerja

### a. Pembuatan Medium Pertumbuhan NB (Primaharinastiti *et al.*, 2004)

Medium NB ditambah dengan aquades steril 1 L pada erlenmeyer, dihomogenkan dengan *hot plate and stirrer*. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 20 menit.

### b. Perbanyakkan Isolat dan Pembuatan Suspensi *B. subtilis* (Modifikasi Joetono *et al.*, 1980 dalam Nur, 2005).

Kultur *B. subtilis* diinokulasi sebanyak 1 ose ke dalam 50 ml medium NB steril secara aseptis lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Selama inkubasi, setiap dua jam dilakukan penghitungan jumlah sel bakteri menggunakan *haemocytometer* untuk mengetahui pola pertumbuhan *B. subtilis*. Setiap biakan yang berada dalam fase pertumbuhan *logaritmik* tertinggi digunakan dalam biakan starter untuk uji pengikatan logam Pb.

### c. Pembuatan Stok Larutan Standar Logam Pb (Badjoeri, 2008).

Stok larutan logam yang diperlukan adalah 0,35 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm. Larutan stok Pb 1000 ppm dibuat dengan cara melarutkan 100 mg PbCl<sub>2</sub> ke dalam 100 ml HCl 1%. Larutan standar Pb 1000 ppm dikonversi dengan metode pengenceran sehingga didapatkan larutan logam dengan konsentrasi yang diinginkan menggunakan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

V1 = Volume logam larutan 1 (ml)

V2 = Volume logam larutan 2 (ml)

N1 = Konsentrasi logam larutan 1 (mg/ml)

### d. Inokulasi *B. subtilis* ke dalam Medium yang Mengandung Logam (Primaharinastiti *et al.*, 2004).

#### 1). Pengukuran Efektifitas *B. subtilis* dalam Mengikat Logam Pb

Medium cair NB sebanyak 65 ml ditambah logam Pb dengan konsentrasi 0,35

ppm sesuai perlakuan. Medium diatur hingga pH mencapai 7 kemudian ditambah *B. subtilis* sebanyak 5% (v/v) lalu diinkubasi pada suhu kamar dan dikocok dengan kecepatan 100 rpm. Sel dipanen pada saat pertumbuhan optimal (fase *stationer*). Perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

## 2). Toleransi *B. subtilis* terhadap Logam Pb

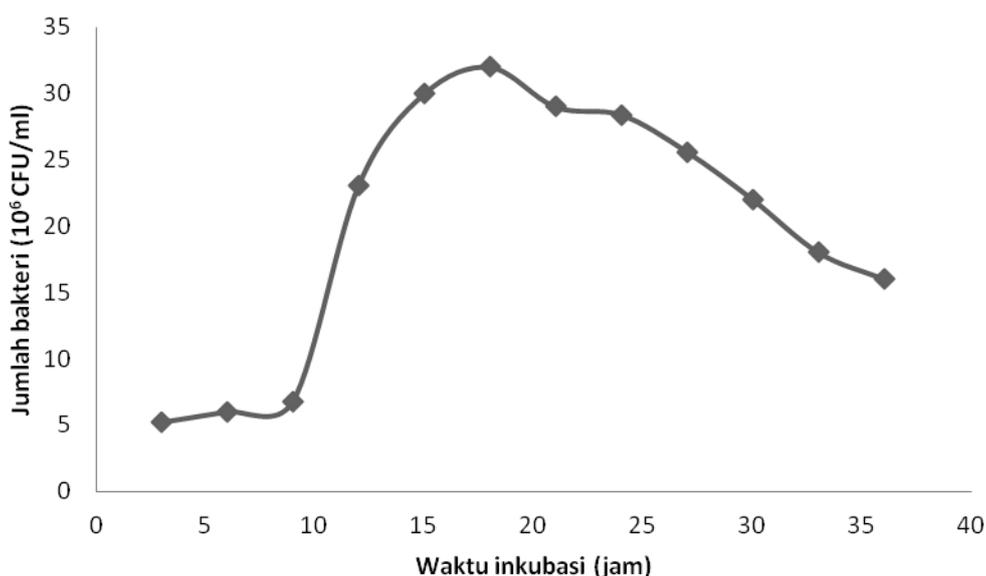
Medium NB sebanyak 10 ml diberi Pb hingga mencapai konsentrasi 1 ppm, 10 ppm dan 20 ppm sesuai perlakuan. Medium diatur hingga pH mencapai 7 kemudian ditambah *B. subtilis* sebanyak 5% (v/v) lalu diinkubasi pada suhu kamar dan dikocok dengan kecepatan 100 rpm. Sel dipanen pada jam ke-48.

Pola Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium NB (n=3) terdapat pada Gambar 1. Selama fase lag, massa sel bertambah  $0,8 \times 10^6$  cfu/ml tanpa merubah densitas sel. Faktor yang mempengaruhi panjangnya fase lag adalah tersedianya nutrient dan faktor pertumbuhan dalam medium, yang pada penelitian ini menggunakan medium NB yang memiliki kandungan nutrient yang dibutuhkan oleh pertumbuhan *B. subtilis*

(Shuler dan Kargi, 1992). Pada fase log, bakteri sudah mampu beradaptasi dengan medium, kecepatan pertumbuhan dipengaruhi oleh kandungan nutrient, pH, dan juga suhu (Fardiaz, 1992). Pada penelitian ini *B. subtilis* diinkubasi pada pH dan suhu yang optimum untuk pertumbuhan *B. subtilis*, yaitu pada pH 7 dan suhu  $37^\circ\text{C}$ . Menurut Pelczar dan Chan (1986) bakteri yang telah memasuki fase log mengalami peningkatan proses reproduksi dua kali lipat, sehingga jumlah bakteri bertambah pesat. Pertumbuhan terhenti pada fase kematian, karena sel sudah menghabiskan energi cadangan ATP untuk proses respirasi (Badjoeri, 2008).

### Analisis Data (Steel dan Torrie, 1991).

Data yang diperoleh dari pengukuran logam menggunakan metode AAS, pada tiap-tiap perlakuan dianalisis dengan ANOVA untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan efektifitas pada setiap perlakuan dan tempat akumulasi logam pada *B. subtilis*. Apabila diperoleh hasil yang berbeda nyata dilakukan uji BNJ tingkat kesalahan 5%. Analisis toleransi *B. subtilis* terhadap logam dilakukan secara deskriptif.



Gambar 1. Pola Pertumbuhan *B. subtilis* pada Medium NB (n=3)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Konsentrasi Logam pada Medium NB pada Waktu 0 Jam dan 18 Jam

Ulangan	Logam	Konsentrasi awal (ppm) 0 jam	Konsentrasi akhir (ppm) 18 jam
1.	Pb	0,35	0,298 ± 0,002
2.	Pb	0,35	0,3 ± 0,002
3.	Pb	0,35	0,296 ± 0,002
<b>Rata-rata</b>			0,298 ± 0,002

### Efektifitas *B. subtilis* dalam Mengikat Logam

Efektifitas pengikatan logam oleh *B. subtilis* dilakukan dengan rumus (Joshi, 2003 dalam Badjoeri, 2008):

$$R = \frac{C_{eq\ K} - C_b\ P}{C_{eq\ K}} \times 100\%$$

$C_{eq\ K}$  = konsentrasi akhir logam dalam medium kontrol (mg/l)

$C_b\ P$  = Jumlah logam yang tidak terserap pada perlakuan (mg/l)

Tabel 2. Efisiensi Pengikatan Logam oleh *B. subtilis*

No	Ulangan	Efisiensi pengikatan logam oleh <i>B. subtilis</i> (%)
1.	I	23,49 ± 0,002
2.	II	24 ± 0,002
3.	III	4,73 ± 0,002
<b>Rata-rata</b>		17,4 ± 0,002

### Kemampuan Toleransi *B. subtilis* terhadap Logam Pb

Mikroorganisme mampu mengabsorpsi atau mentransfer logam melalui reaksi enzimatik, logam tersebut kemudian dapat dimanfaatkan untuk proses metabolisme di dalam sel atau diubah menjadi bentuk kimia lain yang tidak toksik di dalam tanah, air

maupun minyak (Yadav *et al.*, 2012). Menurut Abdelatey *et al.* (2011) pada konsentrasi yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan toksik pada mikroorganisme tersebut. Keberadaan logam yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi pertumbuhan, morfologi, aktivitas biokimia, penurunan biomassa dan keanekaragaman populasi mikroorganisme.

Tabel 3. Toleransi *B. subtilis* terhadap Logam Pb (n=2, Rata-rata ± sd)

No Logam	Jumlah <i>B. subtilis</i> (CFU/ml)		
	1 ppm	10 ppm	20 ppm
1. Pb	9,13x10 <sup>6</sup> ± 0,39	6,4x10 <sup>6</sup> ± 0,14	4,45x10 <sup>6</sup> ± 0,21
2. kontrol	11,25x10 <sup>6</sup> ± 0,21		

### Lokasi Pengikatan Logam *B. subtilis*

Tempat pengikatan logam pada *B. subtilis* untuk masing-masing logam berbeda-beda, logam Pb hanya diikat di dinding sel.

Tabel 4. Tempat Pengikatan Logam Pb oleh *B. subtilis*

No.	Lokasi penyimpanan	Kadar Pb (ppm)
1.	Sitoplasma	0
2.	Dinding sel	0,104

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan diatas dapat disimpulkan bahwa :

1. *B. subtilis* mampu mengikat logam Pb dengan presentasi efektifitas sebesar 17,4 %.
2. *B. subtilis* paling baik mentoleransi logam Pb pada konsentrasi 1 ppm.
3. Lokasi pengikatan logam Pb pada *B. subtilis* adalah di dinding sel.

## DAFTAR REFERENSI

Abdelatey, L. M., W. K. B. Khalil, T. H. Ali and K. F. Mahrous. 2011. Heavy Metal Resistance and Gene Expression Analysis of Metal Resistance Genes in Gram-Positive Gram-Negative Bacteria Present in

- Egyptian Soils. *Journal of Applied Science in Environmental Sanitation*, 6(2): 201-211.
- Akoto, O., T.N. Bruce and G. Darkol. 2008, Heavy Metals Pollution Profiles in Streams Serving the Owabi Reservoir. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 2 (11): 354-359.
- Badjoeri, M. 2008. Uji Kemampuan *Bacillus megaterium* Menyerap Logam Berat Merkuri. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 6 (1).
- Kumar, A., B. S. Bisht and V. D. Joshi. 2010. Biosorption of Heavy Metals by Four Acclimated Microbial Species, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. and *Aspergillus niger*. *Journal Biology Environmental Science*, 4(12): 97-108.
- Issazadeh, K., M. R. Majid, K. Pahlaviani and A. Massiha. 2011. Bioremediation of Toxic Heavy Metals Pollutan by *Bacillus* spp. Isolated from Guilan Bay Sediments, North of Iran. *International Conference on Biotechnology and Environment Management*, 8.
- Nur, H. S. 2005. Pembentukan Asam Organik oleh Isolat Bakteri Asam Laktat pada Media Ekstrak Daging Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Bioscientiae*, 2 (1): 15-24.
- Primaharinastiti, R., A. T. Poernomo dan N. S. Noor. 2004. Bioakumulasi Logam Berat Cu oleh *Bacillus* sp.. *Berkas Penelitian Hayati*, 10: 19-23.
- Steel, R.E.D., dan J.H.Torrie. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Yadav, H., N. Satish, M. B. Prakash, and Maradala. 2012. Studies on Biological Removal of Plumb (Pb) by *Bacillus subtilis*. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 3(7).
- Zulaika, E., A. Luqman, T. Arindah dan U. Sholikah. 2012. Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi sebagai Biosorben dan Bioakumulator. *Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development*. Program Studi Biologi FMIPA, ITS. 21 Februari 2012, Surabaya.