

EKSPRESI PROTEIN PADA MIKROORGANISME RESISTEN LOGAM BERAT Cr DENGAN METODE ELEKTROFORESIS

Umi Fatmawati¹⁾, Suranto¹⁾, Sajidan^{1,2)}

¹⁾ Program Studi Biosains Program Pascasarjana UNS

²⁾ Program Studi Pendidikan Biologi FKIP UNS

ABSTRAK

Hexavalent chrom (Cr(VI)) is recognize as toxic heavy metal. Negatif effect of Cr(IV) should be reduced towards biotic environment, so it is important to reduce Cr(IV) become Cr(III) which little hazard. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumonia*, *Pantoea sp* and *Saccharomyces cerevisiae*. They are including as resistant Cr(IV) microorganism and they have ability to reduce Cr(IV). Tolerance microorganism have similar protein structure compared with common microorganism which have been inoculated on LB broth. It had been known based on protein band which appeared in SDS-PAGE using electrophoresis methode.

The aim of the research is to know the ability of microorganism in reducing Cr(IV) and knowing protein band pattern between Cr(IV) resistant microorganism and microorganism which is inoculated on LB broth without Cr(IV). Electrophoresis SDS-PAGE is the methode which is used to indentified protein expression. While, for knowing concentration Cr(IV) in liquid medium is used by 1,5 difenilkarbazid methode. The quantitative data is obtained being analyzed by ANAVA two factorial continued with Duncan test at 1% level test. The qualitative data include protein ekspresion analyzed by *Relative mobility* (Rf) and for knowing molecular weight of protein is used protein marker. The qualitative data had been analyzed by descriptive qualitative methode.

The result of the research shows that in Cr(VI) concentration after being treat by the microorganisms at the initial concentration 0, 5ppm, 1 ppm, 5 ppm and 10 ppm and compared the reduce Cr(VI) capability from the average percentage data each microorganism are: *P. putida* (65%) > *S. cerevisiae* (64,45%) > *P. aeruginosa* (60,73%) > *Pantoea sp* (50,22%) > *K. pneumonia* (47,82%) > *without microorganism* (34,25%). The adding microorganisms have influence toward reduction of Cr(VI). The result from electrophoresis methode using SDS-PAGE shows that the protein expression between resistant microorganism with non resistant microorganism have no difference, but in resistant microorganism have more quantity protein than microorganism non resistant, it was showed that protein band in reistent microorganism more thick than non resisten microorganism.

Key word: Cr heavy metal, microorganism, protein, electrophoresis

PENDAHULUAN

Krom (Cr) sebagai salah satu logam berat berpotensi sebagai pencemar akibat kegiatan pewarnaan kain pada industri tekstil, cat, penyamakan kulit, pelapisan logam, baterai atau industri krom (Ackerley, *et.al*: 2004). Melalui rantai makanan krom dapat terdeposit dalam bagian tubuh mahluk hidup yang pada suatu ukuran tertentu dapat menyebabkan racun (Mulyani, 2004). Umumnya krom di alam berada pada valensi 3 (Cr³⁺) dan valensi 6 (Cr⁶⁺). Cr⁶⁺ bersifat toksik dibandingkan dengan Cr³⁺. Toksisitas Cr⁶⁺ diakibatkan karena sifatnya yang berdaya larut dan mobilitas tinggi di lingkungan (Palar, 1994; Rahman,*et.al*: 2007; Uprati,*et.al*: 2003; Lowe,*et.al*: 2002). Apabila masuk ke dalam sel, dapat menyebabkan kerusakan struktur DNA hingga terjadi mutasi (Larashati, 2004).

Beberapa jenis mikroorgansime *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Klebsiella pneumonia, *Pantoea sp* dan *Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroorganisme yang resisten terhadap kontaminasi logam berat dan mempunyai kemampuan untuk mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III). Penelitian oleh Krauter (2002) menyimpulkan bahwa *S. cerevisiae* mampu mereduksi Cr(VI) sebesar 100% dari konsentrasi awal 1,89 ppm pada pH optimum 6,5-7. Sedangkan dalam suasana asam (pH=2,1), jasad *S. cerevisiae* yang mati juga masih dapat menurunkan kadar Cr(VI) sebesar 70%. Oleh Jianlong, *et. al* (2003) menguji tingkat toleransi *S. cerevisiae* pada konsentrasi Cr (VI) 5 uM tidak mempengaruhi pertumbuhan mikrobia, sedangkan pada konsentrasi Cr (VI) 15 uM pertumbuhan mikrobia terhambat sebesar 30%.

Menurut Ganguli & Tripathi (2004) melaporkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* mampu mereduksi Cr (VI) sebesar 96% dari konsentrasi awal Cr (VI) sebesar 10 ppm, namun bakteri *P*

aeruginosa juga memiliki batas kemampuan reduksi pada konsentrasi 50 ppm hanya tereduksi sebesar 16%. *P. putida* merupakan salah satu jenis bakteri yang resisten terhadap Cr dan Cd, sehingga dapat digunakan dalam mereduksi Cr dalam suatu media (Ackerley, *et.al*: 2004; Lowe,*et.al*: 2002; Timotius, dkk: 1989; Rahman, *et.al*: 2007). Bakteri *P. putida* dapat mereduksi Cr(VI) dengan kecepatan 6 ppb min⁻¹ yang diuji pada medium agar yang mengandung Cr(IV) (Lowe,*et.al*: 2002). *K. pneumonia* yang diinokulasi dalam media BHI mampu mereduksi Cr(VI) sebesar 27% (Mardiyono, 2005). Oleh Obrastsova, *et.al* (2002) dikemukakan bahwa reduksi Cr(VI) 150 ppm oleh *Pantoea sp* optimal dengan penambahan sulfat (SO₄⁻²) dicapai pada waktu 20 jam.

Melihat potensi beberapa jenis mikroorganismenya diantaranya: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *K. pneumonia*, *Pantoea sp* dan *S. cerevisiae* dalam mereduksi logam berat Cr, maka akan dilakukan penelitian tentang kemampuan mikroorganismenya tersebut mereduksi Cr(VI) dalam media cair yang mengandung logam berat Cr, dan mengetahui perubahan genetik mikroorganismenya melalui ekspresi pita protein dengan deteksi pada gel poliakrilamid elektroforesis SDS-PAGE. Elektroforesis dikatakan sebagai analisis yang ideal untuk memurnikan komponen protein dari campuran sampel dengan cara penambahan medium yang dapat mengikat protein selama elektroforesis. Metode terbaik dalam pemurnian protein dengan teknik elektroforesis adalah dengan bahan *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE). Gel poliakrilamid merupakan larutan dari akrilamid dan bisakrilamid (Hames, 1990; Matsudaira, 1993; Davis,*et.al*, 1994).

BAHAN DAN METODE

A. Mikroorganismenya yang digunakan

Mikroorganismenya yang meliputi *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Pantoea sp*, dan *S. cerevisiae* digunakan dalam pengujian reduksi Cr(VI) dan ekspresi pola pita protein. Isolat bakteri diperbanyak dalam media cair LB dengan komposisi masing-masing isolat 100 ml yaitu 1 g Trypton, 0,5 g Yeast Ekstrakt, dan 0,5 g NaCl, dan untuk perkembangbiakan kapang digunakan media cair PDA.

B. Pembuatan Media Cair yang mengandung Logam Berat Cr

Sebanyak 0,1414 g K₂Cr₂O₇ dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1 liter dan diencerkan sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi larutan 0,05 mg/mL untuk pembuatan larutan sediaan Cr baku. Kemudian dibuat larutan siapan krom baku dengan mengencerkan 1 mL larutan sediaan Cr ke dalam 100 mL media cair maka diperoleh konsentrasi media cair yang mengandung logam berat Cr 0,5 ppm. Untuk

konsentrasi 1 ppm, 5 ppm, dan 10 ppm dilakukan pengenceran larutan sediaan Cr baku ke dalam media cair (LB atau PDA) sebanyak 100 mL.

C. Penghitungan Jumlah Sel Mikroorganismenya

Untuk mengetahui kemampuan hidup mikroorganismenya dalam media yang mengandung logam berat, maka dilakukan penghitungan jumlah sel mikroorganismenya yang diinokulasi pada media cair dengan konsentrasi Cr(VI) 0 ppm dan 10 ppm selama 16 jam. Biakan yang tumbuh diencerkan beberapa kali pengenceran 10⁻⁵ dan 10⁻⁶. Hasil pengenceran ditumbuhkan pada media LB padat sebanyak 100 µl, dan diinkubasi lagi selama 16 jam suhu 37 °C. Koloni yang terbentuk dihitung dengan *colony counter* dan dihitung jumlah sel mikroorganismenya dalam satuan sel/ml (Hadioetomo, 1993).

D. Inokulasi mikroorganismenya pada media cair LB yang mengandung logam berat Cr(VI) untuk mengetahui kemampuan reduksi Cr(VI)

Masing-masing mikroorganismenya diambil dengan menggunakan jarum ose dan ditumbuhkan ke dalam erlenmeyer berisi media cair LB dengan konsentrasi Cr(VI) 0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm dan 10 ppm, satu jenis mikroorganismenya ditumbuhkan dalam 100 ml media cair LB pada lima macam konsentrasi awal Cr(VI) di atas kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30°C-36°C selama 16 jam.

E. Uji Krom Heksavalen

Sebanyak 50 mL media cair kultur bakteri yang mengandung krom dimasukkan ke dalam tabung ependorf dan disentrifugasi 3000 rpm selama 30 menit, supernatan dikumpulkan dan disaring dengan kertas saring Whatman 0,2 µm filter dan dianalisis kandungan logam beratnya (Lowe, *et.al*: 2002). Larutan tersebut dinetralkan dengan penambahan H₂SO₄ (1+1) atau NH₄OH, kemudian ditambahkan dengan 1 mL H₂SO₄ (1+1) dan 0,3 mL H₃PO₄ 85%. Larutan secara kuantitatif dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan 2 mL larutan difenil karbazid, diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai rata. Baca setelah 5-10 menit diukur dengan alat spektrofotometer UV VIS dengan panjang gelombang 540 nm.

F. Pembuatan Larutan Standar Krom baku

Sebanyak 2,0-20,0 mL dipipet (2, 4, 6, 8, 10, dan seterusnya secara bertingkat) larutan siapan krom baku ke dalam beberapa buah labu ukur 100 ml. Pada labu ukur lain masukkan 25 mL air suling sebagai blanko. Pada masing-masing labu ukur, tambahkan 1 mL H₂SO₄ (1+1) 0,3 mL H₃PO₄ 85% dan 2 mL larutan difenil karbazid, kemudian diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai rata, diamkan selama 5-10 menit. Tetapkan serapan dalam panjang gelombang 540 nm dan buat kurva kalibrasi kemudian hitung kadar Krom dalam mg/liter terhadap kurva kalibrasi.

G. Elektroforesis SDS-PAGE untuk mengetahui ekspresi protein mikroorganisme.

Sebanyak 5 mL kultur bakteri dituangkan ke dalam tabung ependorf 1,5 mL dan sel-selnya diendapkan dengan disentrifugasi selama 5 menit 13.000 rpm. Endapan sel dibersihkan dari media LB cair dengan membuang supernatannya, pelet sel yang mengendap disuspensi dengan *Phospat Buffered Saline Solution* (PBS) sebanyak dua kali, kemudian disentrifuse kembali, dan supernatan PBS dibuang. Pelet kemudian ditambahkan 1 mL PBS. Untuk memecah sel digunakan sonikasi selama 30 detik sebanyak 4 kali, disentrifuse ulang dan diambil supernatannya untuk dirunning dengan menambahkan buffer sampel (4:1/v:v). Sebelum diload ke dalam sumuran, campuran sampel dan buffer sampel direbus dalam air mendidih selama 2 menit, kemudian dimasukkan ke dalam es selama \pm 5 menit, setelah itu sampel siap dirunning.

Gel yang sudah terbentuk (*discontinuous gel* 10 % dan *stacking gel* 3%), dipindahkan ke dalam tangki elektroforesis (Hames & Rickwood, 1990). Selanjutnya tangki elektroforesis diisi dengan running buffer (0,19 M Glycine, 10 ml SDS 10 %, dan 0,0248 M Tris dalam 1 Liter) hingga penuh. Letakkan 10 μ L mikropipet campuran sampel dan buffer sampel dan masukkan dalam sumuran elektroforesis secara hati-hati. Setelah semua

sampel masuk dalam sumuran pasang tutup tanki dan atur voltase (100V, 90 menit).

Pewarnaan dengan menggunakan metode Comassie Blue untuk pewarnaan protein. Larutan dibuat dengan komposisi 1 g zat warna Comassie Blue dilarutkan dalam 1 L larutan destaining (100 ml asam asetat, 400 mL metanol, kemudian diencerkan dengan penambahan akuades hingga mencapai volume 1 L). (Hames & Rickwood, 1990). Setelah dirunning, gel direndam dalam larutan pewarna Comassie Blue selama 12 jam, kemudian dicuci dengan destainig sebanyak 3-4 kali selama 2 jam hingga didapatkan pola pita protein yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kemampuan tumbuh mikroorganisme dalam media yang mengandung logam berat Cr

Hasil uji pendahuluan yang berupa penghitungan jumlah koloni atau Colony Form Unit (CFU) dari lima macam mikroorganisme yang ditumbuhkan dalam media agar yang mengandung Cr(VI) sebesar 10 ppm seperti yang tercantum pada Tabel 1. menunjukkan bahwa kelima macam mikroorganisme tersebut mampu hidup dalam media yang mengandung Cr(VI). Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan resistensi mikroorganisme yang diujicobakan pada media Cr.

Tabel 1. Jumlah Sel Mikroorganisme yang Diinokulasi pada Media LB padat dengan penambahan Cr(VI) 0 ppm dan 10 ppm.

Jenis Mikroorganisme	Rata-rata Jumlah Sel (sel/ml)		Prosentase penurunan jumlah sel
	0 ppm	10 pp.	
<i>P. aeruginosa</i>	370×10^6	287×10^6	22,4%
<i>P. putida</i>	352×10^6	230×10^6	34,6%
<i>K. pneumonia</i>	303×10^6	240×10^6	20,7%
<i>Pantoea sp</i>	254×10^6	177×10^6	30,3%
<i>S. cerevisiae</i>	460×10^6	317×10^6	31%

Jumlah sel terbanyak terdapat pada species *S. cerevisiae* yaitu 460×10^6 sel/ml pada konsentrasi Cr(VI) 0 ppm. Sedangkan pada konsentrasi Cr(VI) 10 ppm. *S. cerevisiae* juga menghasilkan sel terbanyak sebesar 317×10^6 sel/ml. Angka tersebut didapatkan dari perhitungan jumlah koloni rata-rata dari dua macam pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} . Media agar yang digunakan untuk menumbuhkan *S. cerevisiae* adalah media Potato Dextrosa Agar (PDA), hal ini dikarenakan *S. cerevisiae* merupakan jenis khamir yang dapat melakukan fermentasi sehingga membutuhkan banyak substrat glukosa yang nantinya akan diubah menjadi ethanol. Kemampuan hidup *S. cerevisiae* dalam media agar yang mengandung Cr(VI) menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut resisten atau toleran terhadap logam berat Cr (Hwang: 2006; Jianlong, et. al (2003); Mulyani, 2004). *P. aeruginosa* juga memiliki kemampuan hidup dalam media yang

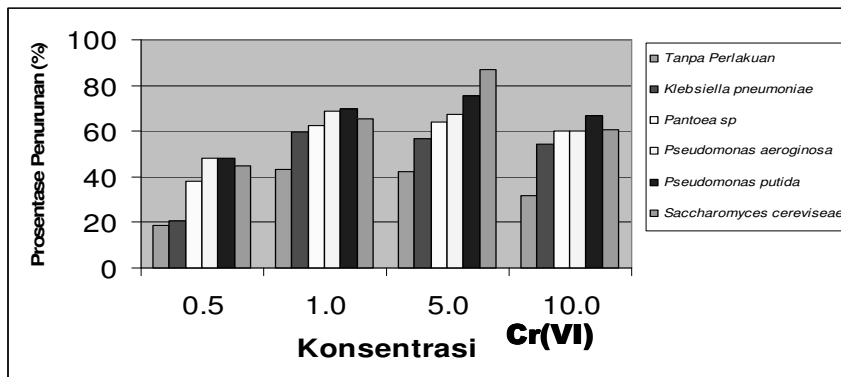
mengandung logam berat Cr(VI) 10 ppm. Hal ini terbukti dengan tumbuhnya koloni pada media agar LB yang mengandung Cr(VI) 10 ppm dengan jumlah sel rata-rata sebanyak 287×10^6 sel/ml. Pada mikroorganisme yang lain juga memiliki kemampuan hidup dalam media yang mengandung logam berat Cr(VI) 10 ppm. Jumlah sel paling sedikit terlihat pada species *Pantoea sp* dengan jumlah sel sebanyak 177×10^6 sel/ml.

Lima macam mikroorganisme pada umumnya mengalami penurunan jumlah sel pada media yang mengandung logam berat Cr(VI). Penurunan jumlah sel terendah terdapat pada species *K. pneumonia* sebesar 20,7%, sedangkan penurunan tertinggi terdapat pada species seperti *P. putida* sebesar 34,5%. Penurunan jumlah sel mikroorganisme yang diinokulasikan pada media yang mengandung logam berat Cr(VI) menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut melakukan seleksi pada varian yang toleran

terhadap logam berat. Berdasarkan Tabel 1 di atas, penurunan jumlah sel mikroorganisme setelah diinokulasikan ke dalam media agar dengan penambahan Cr(VI) 10 ppm, pada umumnya mengalami penurunan sebesar 20%-30 % merupakan penurunan yang tidak terlalu ekstrim dan mengindikasikan bahwa kelima macam mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan resisten terhadap lingkungan yang mengandung logam berat Cr(VI).

Mikroorganisme yang mampu hidup dalam media yang mengandung Cr(VI) juga dapat berperan sebagai reduktor logam berat Cr(VI) menjadi Cr(III). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa keberadaan Cr(VI) pada kadar 0,00-50 ppm dalam sel mikroorganisme tidak mengganggu pertumbuhan sel (Hwang: 2006; Jianlong, *et.al* 2003; Rahman.*et.al*, 2007) hal ini disebabkan karena selain pertumbuhan, mikroorganisme akan menghasilkan produk samping yang berupa H₂S. Kenaikan jumlah sel mikroorganisme akan menaikkan kecepatan produksi H₂S yang akan mempercepat reduksi Cr(VI). H₂S yang dihasilkan bakteri akan bereaksi dengan Chromium untuk membentuk Chromium sulfida yang bersifat tidak stabil dalam larutan dan akan lebih cepat terdeposit untuk membentuk Cr(OH)₃ yaitu Cr dengan valensi tiga yang memiliki toksisitas lebih rendah dari Cr valensi enam.

B. Reduksi Cr(VI) pada Media Cair



Gambar 1. Grafik Presentase Penurunan Cr(VI) oleh Lima Macam Mikroorganisme

S. cerevisiae mempunyai kemampuan reduksi paling tinggi diantara mikroorganismenya yang lain. Presentase penurunan pada *S. cerevisiae* sebesar 87% pada konsentrasi awal 5 ppm. Sedangkan presentase penurunan terendah pada konsentrasi awal 5 ppm adalah *K. pneumoniae* dengan presentase penurunan sebesar 56,7%. Pada perlakuan tanpa bakteri juga terjadi penurunan sebesar 42,5%. Beberapa penelitian lain menyatakan bahwa *Saccharomyces* adalah mikroorganisme yang mempunyai efektifitas paling tinggi dalam mereduksi Cr(VI). Krauter & Krauter

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan bahwa lima macam mikroorganisme terbukti mampu hidup dalam media agar yang mengandung logam berat Cr(VI), maka dilakukan uji untuk mengetahui perubahan kadar Cr(VI) sebelum dan sesudah perlakuan. Perlakuan dilakukan dengan lima macam mikroorganisme diantaranya adalah: *K. pneumoniae*, *Pantoea sp*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, dan *S. cerevisiae* yang diinokulasikan dalam media cair LB yang mengandung Cr(VI) 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, dan 10 ppm dengan konsentrasi inokulum awal 1% (Mardiyono, 2005) dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu ruang diatas shaker. Presentase penurunan Cr(VI) oleh lima macam mikroorganisme pada konsentrasi yang berbeda (Gambar 1).

Kemampuan reduksi Cr(VI) oleh lima macam mikroorganisme diuji pada larutan media cair LB dengan konsentrasi Cr(VI) 1 ppm. Pada pengamatan secara visual terdapat perbedaan antara media cair LB yang tidak diinokulasi mikroorganisme dengan media cair LB yang diinokulasi lima macam mikroorganisme bahwa pada media cair yang diinokulasi mikroorganisme terlihat lebih keruh. Hal ini menandakan bahwa terjadi pertumbuhan dan perkembangbiakan sel di dalam media. Selain melakukan aktifitas pertumbuhan, beberapa mikroorganisme tersebut juga memiliki kemampuan mereduksi Cr(VI) (Ganguli & Tripathi, 2004; Jianlong, *et. al* 2003; Krauter,*et.al*: 2002; Mardiyono 2005; Mulyani, 2004; Suzuki, *et.al*: 1992; Upreti, *et.al*: 2004).

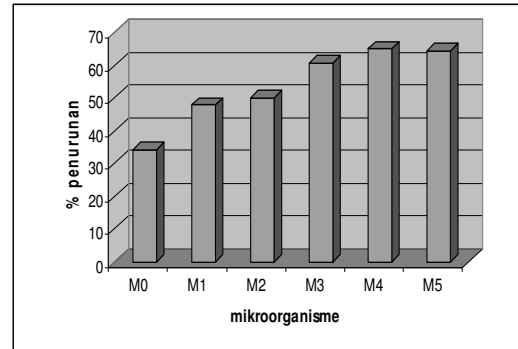
(2002) menyatakan bahwa *S. cerevisiae* dapat mereduksi Cr(VI) 100% pada pH 6,5-7. sedangkan pada pH asam kemampuan bioremoval *S. cerevisiae* kurang efektif. Salah satu keunggulan *Saccharomyces* sebagai agen biosorpsi Cr(VI) adalah sifatnya yang tidak patogen dibandingkan bakteri lain seperti *P. aeruginosa* dan *K. pneumoniae*. *Saccharomyces cerevisiae* juga memiliki kemampuan dalam mereduksi jenis logam berat lain seperti: Mo, Co, Ca, Zn, Sr, Hg dan Cu dalam air (Krauter,*et.al*: 2002; Mulyani: 2004).

P. putida memiliki prosentase terbesar kedua dalam mereduksi Cr(VI) yaitu sebesar 66,8% pada konsentrasi Cr(VI) awal 5 ppm. Kemampuan terendah adalah pada bakteri *K. pneumonia* sebesar 20,4% pada konsentrasi awal 0,5 ppm. Pada perlakuan tanpa penambahan mikroorganisme juga terjadi penurunan sebesar 31%. Beberapa penelitian lain juga memanfaatkan bakteri *P. putida* untuk mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) diantaranya adalah Ackerley, *et.al*: 2004; Lowe,*et.al*: 2002; Timotius, dkk: 1989; Rahman,*et.al*: 2007.

Konsentrasi awal Cr(VI) paling tinggi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 ppm. Pada konsentrasi ini mikroorganisme masih dapat tumbuh dan berkembang biak, hal ini terlihat dari kekeruhan media cair LB yang diinokulasi dengan lima macam mikroorganisme dengan yang tanpa inokulasi. Secara logika, dengan daya tahan hidup yang lebih besar, tentunya lebih banyak mikroorganisme yang hidup sehingga dapat meningkatkan kemampuan reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) dalam lingkungan yang mengandung Cr(VI) yang juga lebih besar.

Berdasarkan grafik di bawah dapat dilihat urutan kemampuan mikroorganisme dalam mereduksi Cr(VI). Kemampuan tertinggi adalah pada bakteri *P. putida* dengan prosentase reduksi rata-rata 65%, sedangkan kemampuan terendah adalah jenis bakteri *K. pneumonia* dengan prosentase reduksi rata-rata 47,8%. Urutan

perbandingan kemampuan mereduksi Cr(VI) antara mikroorganisme satu dengan yang lain adalah sebagai berikut: *P. putida* (65%) > *S. cerevisiae* (64,45%) > *P. aeruginosa* (60,73%) > *Pantoea sp* (50,22%) > *K. pneumonia* (47,82%) > Tanpa mikroorganisme (34,25%).



Keterangan:

M0= Tanpa Mikroorganisme M3=*P. aeruginosa*

M1=*K. pneumonia*

M4=*P. putida*

M2=*Pantoea sp*

M5=*S. cerevisiae*

Gambar 2. Rata-rata Kemampuan Reduksi Cr(VI) pada lima macam Mikroorganisme

Hasil perhitungan analisis sidik ragam pengaruh variasi konsentrasi awal logam berat Cr(VI) dan jenis mikroorganisme terhadap penurunan konsentrasi Cr(VI) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Analisis Sidik Ragam Variasi Konsentrasi awal Cr(VI) dan Jenis Mikroorganisme Terhadap Penurunan Konsentrasi Cr(VI)

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F tabel	
					5%	1%
Ulangan	2	108,258	54,129			
Mikroorganisme (A)	5	8626,752	1752,350	50,858	3,330*	5,640
Galat (a)	10	339,249	33,925			
Konsentrasi Awal Cr(VI) (B)	3	8988,810	2996,270	101,644	2,860*	4,380
A x B	15	1350,517	90,034	3,054	1,960*	2,580
Galat (b)	36	1061,207	29,478			
Umum	71	20474,792				

kk (a) = 10,631%; kk (b) = 9,910%

* = beda nyata pada taraf 1%

Berdasarkan perhitungan ANAVA dua faktorial dengan faktor utama adalah jenis bakteri dan faktor anak petak adalah konsentrasi maka dapat disimpulkan bahwa jenis mikroorganisme berpengaruh nyata terhadap penurunan konsentrasi Cr(VI) pada taraf 1%. Konsentrasi awal Cr(VI) berpengaruh nyata terhadap penurunan konsentrasi Cr(VI) pada taraf 1%, dan interaksi jenis mikroorganisme dengan konsentrasi awal Cr(VI)

berpengaruh nyata terhadap penurunan konsentrasi Cr(VI) pada taraf 1%. Dari di atas, terdapat pengaruh variasi jenis mikroorganisme dan konsentrasi awal logam berat Cr(VI) terhadap penurunan konsentrasi logam berat Cr(VI). Hasil uji lanjut Beda Jarak Nyata Duncan terhadap penurunan konsentrasi logam berat Cr(VI) terdapat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Lanjut Beda jarak Nyata Duncan Terhadap Penurunan Konsentrasi Logam Berat Cr(VI)

Jenis Mikroorganisme	Konsentrasi awal Cr(VI)			
	0,5 ppm	1 ppm	5 ppm	10 ppm
Tanpa Mikroorganisme	18,8 ^c	43,06 ^c	42,52 ^c	31,83 ^c
<i>K. pneumonia</i>	20,46 ^c	59,82 ^{abcd}	56,72 ^{cd}	54,42 ^{abcd}
<i>Pantoea sp</i>	38,16 ^{abcd}	62,59 ^{abcd}	64,00 ^{bcd}	59,94 ^{abcd}
<i>P. aeruginosa</i>	48,12 ^{ab}	68,95 ^{ab}	67,32 ^{bc}	60,14 ^{abc}
<i>P. putida</i>	48,16 ^a	69,50 ^a	75,63 ^{ab}	60,65 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	44,81 ^{abc}	65,4 ^{abc}	87,00 ^a	66,87 ^{ab}

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada taraf DMRT 1%.

Keberadaan Cr(VI) di lingkungan dapat mengganggu organisme tetapi juga dapat menghasilkan seleksi bakteri yang resisten. Senyawa Cr(VI) secara nyata lebih efektif dari pada Cr(III) karena kelarutannya yang tinggi dalam air, permeabilitasnya yang cepat dan interaksi berikutnya dengan protein intraseluler dan asam nukleat (Upreti, *et.al.*: 2004). Mikroorganisme dapat mengembangkan mekanisme resistensi untuk menyeleksi varian yang resisten.

Menurut Rahman, *et.al* (2007) menyatakan bahwa reduksi Cr(VI) terjadi karena selain pertumbuhan, mikroorganisme akan menghasilkan produk samping yang berupa H₂S. Kenaikan jumlah sel mikroorganisme akan menaikkan kecepatan produksi H₂S yang akan mempercepat reduksi Cr(VI). H₂S yang dihasilkan bakteri akan bereaksi dengan Chromium untuk membentuk Chromium sulfida yang bersifat tidak stabil dalam larutan dan akan lebih cepat terdeposit untuk membentuk Cr(OH)₃ yaitu Cr dengan valensi tiga yang memiliki toksisitas lebih rendah dari Cr valensi enam. Sedangkan menurut Suhendrayatna (2001) reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) oleh mikroorganisme disebut bioremoval. Terdapat dua macam mekanisme bioremoval, yaitu secara *passive up take* dan secara *active up take*. Penyerapan pasif (*passive uptake*) dikenal dengan nama biosorpsi. Proses ini terjadi ketika ion logam berat mengikat dinding sel dengan dua cara yang berbeda, pertama pertukaran ion di mana ion monovalen dan divalent seperti Na, Mg, dan Ca pada dinding sel digantikan oleh ion-ion logam berat, dan yang kedua adalah formasi kompleks antara ion-ion logam berat dengan gugus fungsional seperti karbonil, amino, thiol, hidroksil, phosphate, hidroksil-karboksil yang berada pada dinding sel. Proses biosorpsi ini dapat terjadi secara bolak-balik dan cepat. Proses bolak-balik ikatan ion logam berat di permukaan sel ini dapat terjadi pada sel mati dan sel hidup dari suatu biomassa. Proses biosorpsi ini juga dapat lebih efektif dengan kehadiran pH tertentu dan adanya ion-ion lain di media di mana logam berat dapat terendapkan sebagai garam yang tidak terlarut.

Penyerapan logam berat juga dapat terjadi secara *active uptake*, yang terjadi pada berbagai tipe sel hidup. Mekanisme ini secara stimultan terjadi sejalan dengan konsumsi ion logam untuk pertumbuhan mikroorganisme atau akumulasi intraseluler ion logam berat tersebut. Logam berat juga dapat diendapkan pada proses metabolisme dan ekskresi pada tingkat ke dua. Proses ini tergantung dari energi yang terkandung dan sensitifitasnya terhadap parameter-parameter yang berbeda seperti pH, suhu, kekuatan ikatan ionik, cahaya, dll. Selain itu, proses ini juga dapat dihambat oleh suhu yang rendah, tidak tersedianya sumber energi dan penghambat metabolisme sel (Suhendrayatna, 2001).

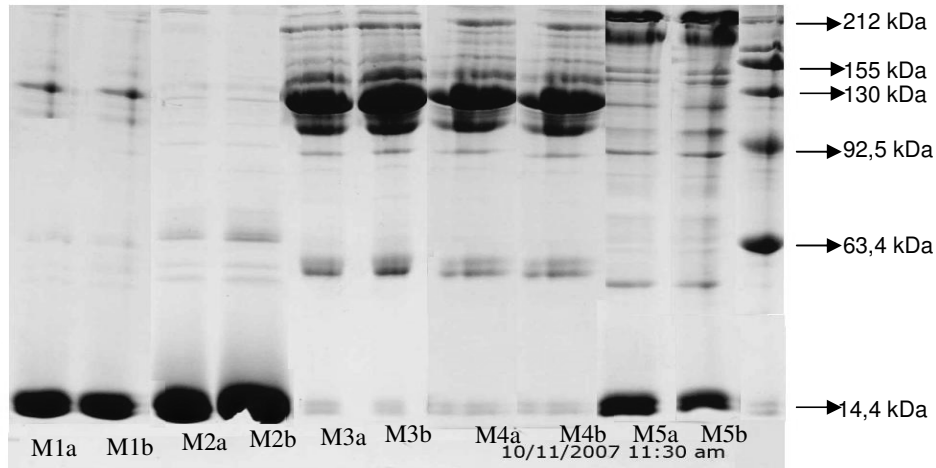
C. Ekspresi Protein pada Mikroorganisme Resisten Logam Berat Cr dengan Metode SDS-PAGE

Hasil *running* dari lima macam mikroorganisme diantaranya *K. pneumonia*, *Pantoea sp*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, dan *S. Cerevisiae* yang masing-masing sampelnya diekstrak dari sel-sel mikroorganisme yang ditumbuhkan dalam kultur LB cair dengan konsentrasi Cr(VI) 0 ppm dan 10 ppm. Dua macam konsentrasi ini dipilih untuk membedakan antara populasi mikroorganisme yang resisten dengan yang tidak resisten. Pola Pita protein hasil *running* dengan menggunakan gel polyakrilamid seperti terlihat pada Gambar 3.

Protein marker digunakan untuk mengidentifikasi berat molekul dari campuran polypeptida (Hames & Rickwood, 1990). Marker protein yang digunakan memiliki rentang berat molekul 212 kDa- 11,3 kDa. Dari hasil elektroforesis terdapat sejumlah pita protein yang memiliki ketebalan berbeda-beda. Protein yang memiliki ketebalan dan intensitas warna yang lebih besar dibandingkan protein lain dan selalu ada di setiap varietas disebut protein mayor (Wijaya & Rahman: 2005). Pada hasil elektroforesis di atas terdapat beberapa buah protein mayor pada spesies *P. aeruginosa* (M3) dan *P. putida* (M4). Berat molekul dari protein mayor ini berkisar 148,7 kDa, 121,6 kDa, dan 105 kDa. Kedua species ini memiliki protein mayor yang intensitas warna dan

ketebalan yang hampir sama karena kedua mikroorganisme ini masih termasuk dalam genus

yang sama yaitu *Pseudomonas*.



Keterangan gambar:

M = marker protein

M1a = *K. Pneumonia*

M2a = *Pantoea sp*

M3a = *P. aeruginosa*

M4a = *P. putida*

M5a = *S. Cerevisiae*

*a = 0 ppm b = 10 ppm

M1b = *K. pneumonia*

M2b = *Pantoea sp*

M3b = *P. aeruginosa*

M4b = *P. putida*

M5b = *S. cerevisiae*

Gambar 3. Ekspresi Protein pada Lima Macam Mikroorganisme yang Ditumbuhkan pada Media Cair LB dengan Konsentrasi Cr(VI) 0 ppm dan 10 ppm

Bakteri *K pneumonia* (M1) memiliki beberapa pita protein, namun karena konsentrasai protein dari sampel yang dirunning terlalu sedikit, sehingga pembentukan pita pada gel polyakrilamid masih kurang optimal. Dari gambar di atas dapat dideteksi terdapat tiga pita protein mayor dari mikroorganisme yang resisten dan yang tidak resisten dengan berat molekul sebesar 121,6 kDa, 14,4 kDa dan 14,3 kDa. Pada umumnya pola pita protein dari dua sampel yang running tetapi masih merupakan satu species tidak memiliki perbedaan yang mencolok.

Hasil running *S. cerevisiae* (M5) memperlihatkan pola pita yang sama antara mikroorganisme yang resisten maupun yang tidak resisten. Mikroorganisme ini memiliki tiga pasang protein mayor yang memiliki berat molekul 212 kDa, 188,5 kDa, 14,5 kDa, dan 14,4 kDa. Selain itu juga terdapat beberapa pita yang lebih sedikit intensitas warnanya, disebabkan karena konsentrasi proteinnya lebih sedikit. Semakin ke bawah letak pita protein muncul, maka semakin kecil berat molekulnya, hal ini terjadi karena berat molekul rendah memiliki kecepatan yang lebih besar untuk bermigrasi dalam matriks medium polyakrilamid.

Alasan elektroforesis digunakan dalam penelitian ini karena memiliki peran sangat penting dalam proses pemisahan molekul-molekul biologi, khususnya protein. Karena disamping metode

tersebut tidak mempengaruhi struktur biopolimer, tetapi juga sangat sensitif terhadap perbedaan muatan dan berat molekul yang cukup kecil (Bachrudin, 1999). Protein yang dialirkan dalam medium yang menagndung medan listrik maka senyawa-senyawa yang bermuatan akan bergerak dalam larutan sebagai akibat dari sifat polaritas yang berlawanan, maka mobilitas suatu molekul meupakan fungsi dari bentuk, ukuran molekul, dan besar tipe muatan.

Penggunaan SDS dan merkaptoetanol disertai dengan pemanasan akan memecah struktur tiga dimensi dari protein, terutama ikatan disulfida menjadi subunit-subunit polipeptida secara individual. SDS juga membungkus rantai protein yang tidak terikat dengan muatan negatif yang sama membentuk kompleks SDS-protein. Kompleks SDS protein mempunyai densitas muatan yang identik dan bergerak pada gel hanya berdasarkan ukuran protein (Wijaya & Rohman, 2005). Jadi kompleks SDS-protein yang lebih besar mempunyai mobilitas yang lebih rendah dibandingkan dengan kompleks SDS-protein yang lebih kecil.

Metode ekstraksi protein pada mikroorganisme menggunakan *Phosphat Buffer Saline Solution* (PBS) kemudian dilakukan pemcahan sel dengan menggunakan alat sonifikasi (alat pemecah sel dengan menggunakan gelombang

bunyi yang menghasilkan frekuensi tinggi). Tujuan dari pemecahan sel adalah memberikan kesempatan keluarnya protein yang akan dimurnikan. Sel yang telah dipecah harus terjaga dari pengaruh oksigen, hal ini karena oksigen dapat membuat protein tidak aktif, terdenaturasi, dan timbul pematatan (Bachrudin, 1999).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat diambil kesimpulan yakni jenis mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini berpengaruh sangat nyata terhadap prosentase penurunan Cr(VI). Variasi konsentrasi awal Cr(VI) juga berpengaruh sangat nyata terhadap prosentase penurunan Cr(VI) dan interaksi jenis mikroorganisme dengan konsentrasi awal Cr(VI) berpengaruh nyata terhadap penurunan konsentrasi Cr(VI).

Kemampuan mikroorganisme dalam mereduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) dapat diurutkan sebagai berikut: *Pseudomonas putida* (65%) > *Saccharomyces cerevisiae* (64,45%) > *Pseudomonas aeruginosa* (60,73%) > *Pantoea sp* (50,22%) > *Klebsiella pneumonia* (47,82%) > Tanpa mikroorganisme (34,25%).

Eksresi protein yang terbentuk pada masing-masing mikroorganisme yang resisten maupun yang tidak resisten memiliki pola pita protein yang hampir sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackerley, D.F, Gonzales.C.F, Park, C.H, Blake,R. Keyhan,M.& Martin,A.2004. *Chromat Reducing Properties of Soluble Flavoprotein from Pseudomonas putida and Escherichia coli.*"Applied and Environmental Biology". 70.(2): 873-882.
- Bachrudin. Z. 1999. *Petunjuk Laboratorium: Isolasi, Identifikasi, dan Pewarnaan Protein.* PAU Bioteknologi: UGM Yogyakarta.
- Davis, P.H dan V.H Heywood. 1963. *Basic Methods in Molecular Biology.* 2nd Ed. Conecicut: Appleton & Lange.
- Ganguli,A & Tripathi, A.2004. *Bioremediation of Toxic Chromium from Electroplating Effluent by Chromat Reducing Pseudomonas aeruginosa A2chrin Two Bioreactor.*"Springer Link". 58 (3) 2002:416-420
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek.* Jakarta: UI Press
- Hames, B.D & Rickwood.1990. *A Practical Approach: Gel elektroforesis protein.* Huntington: Robert E Krieger Publishing Company
- Huang & Min,H.2006. *Effect of Selected by Product of an acid Hidrolizate on cell Growth and ethanol Fermentation by Saccharomyces cerevisiae.*"Journal of the Missisipi Academy of Science".2006.The Free Library.com. (10 November 2007).
- Jianlong, W.,Zeyu,M & Xuan, Z. 2004. *Response of Saccharomyces cerevisiae to Chromium Stess.*"Process Biochemistry".39.(10):1231-1235
- Krauter, P.A.W & Krauter, G.W.2002. *Water Treatment Process and System for Metals Removal Using Saccharomyces cerevisiae.*"patent storm".7.2002
- Larashati, S. 2004. *Reduksi Krom (Cr) Secara In-Vitro oleh Kultur campuran Bakteri yang Diisolasi dari Lindi Tempat Pembuangan akhir Sampah (TPA).* Thesis: ITB
- Lowe, K.L.,Fliflet,R.E.,Tonny Le., Little, B.J, & Meehan, J.J.2002. *Chromium Tolerant Microbila Communities from The Chesapeake Bay watershed.*"Virginia Journal of science".53.(3): 142-155
- Mardiyono. 2005. *Reduksi Cr(IV) Limbah Cair Industri Tekstil oleh Bakteri Pseudomonas aeruginosa, Ecsherichia coli, dan Klebsiella pneumonia.* Tesis. Program Studi Ilmu Lingkungan. Program Pasca Sarjana. UNS
- Matsudaira, P. 1993. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing.* 2nd Ed. California: Academic Press. Inc
- Mulyani. B. 2004. "Analisis Variasi Biomassa Saccharomyces cerevisiae terhadap Serapan Logam Krom". *Sain Mat.2* (4) 1-9
- Obraztsova,A.Y, Francis,C.A, Tebo,B.M.2002. *Sulfur Disproportionation by The Facultative Anaerob pantoea aglomerans sp-1 as a Mechanisme for Chromium (VI) Reduction.*"Geomicrobiology Journal".19.2002:12-132
- Palar, H. 1994. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat.* Jakarta: Rineka Cipta.
- Rahman, M.U.,Gul,S., UIHaq, M.Z.2007. *Reduction of Chromium (VI) by Locally Isolated pseudomonas sp. C171.*"Turkey journal BioI".31.2007:161-166
- Suhendrayatna. 2001. *Bioremoval Logam Berat dengan Menggunakan Mikroorganisme: Suatu Kajian Kepustakaan.* Seminar Bioteknologi. Tokyo: Sinergi Forum-Institut of Technology
- Suzuki, T, Miyata, N.Horitsu,H, Kawai, K. Takamizawa,K, Tai,Y,& Okazaki,M. 1992. *NAD(P)H Dependent Chromium (VI) Reductase of Pseudomonas ambigua G-1:a Cr(V) Intermediated is formed During the Reductin of Cr(VI) to Cr(III).*" Journal of Bacteriology". V. 174. (16): 5340-5345
- Timotius. K.H, Widianarko. B, Laksmani, S. 1987. *Interaksi antara Bakteri dan Logam Berat. Kumpulan Hasil Seminar Ilmiah Ekologi*

Tanah dan Ekotoksikologi. Fakultas Biologi.
UKSW.

Upreti, R.K, Srivastha,R., Chaturvedi,U.C.2004.
*Gut Microflora & Toxic Metal: Chromium
as a Model."Indian Journal. Medicine
Res."*119.2004:49-59

Wijaya. S.K.S & Rohman, L. 2005. *Fraksinasi dan
Karakterisasi protein Utama Biji Kedelai.*
Fakultas MIPA Universitas Jember

