Isolasi, Identifikasi, dan Uji Potensi Bakteri Laut sebagai Agen Bioremediasi Logam Berat Kromium (Cr)

Isolation, Identification, and Potential Test of Marine Bacteria as Chromium (Cr) Heavy Metal Bioremediation Agent

Nasywa Fajriatun Nisa Suparman[1], Endah Retnaningrum[2*]
[1]Program Studi Sarjana Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia 55281
[2]Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta. Indonesia 55281

*Email korespondensi : endahr@ugm.ac.id

ABSTRAK

Pencemaran air oleh logam berat terjadi akibat perkembangan industri seperti tekstil, *electroplating*, dan penyamakan kulit. Kromium (Cr) merupakan salah satu logam berat yang dihasilkan dengan tingkat toksisitas tinggi bagi makhluk hidup bahkan dalam konsentrasi rendah. Upaya penanggulangan yang ramah lingkungan dilakukan dengan metode bioremediasi dapat memanfaatkan kemampuan bakteri resisten logam berat. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan melakukan uji potensi reduksi logam berat kromium oleh bakteri laut resisten kromium. Penelitian ini menggunakan bahan sampel air laut, pasir Pantai Samas dan Pantai Pandansimo, media kultur *Zobell marine broth* 2216, serta logam berat $K_2Cr_2O_7$. Langkah awal penelitian dilakukan dengan pengambilan sampel air laut dan pasir pantai. Selanjutnya dilakukan isolasi, seleksi, karakterisasi morfologi sel dan biokimia serta identifikasi bakteri resisten kromium untuk diuji potensi reduksinya. Hasil tiga isolat terseleksi memiliki kemampuan resistensi tertinggi terhadap kromium. Proses identifikasi menunjukkan bahwa dua isolat, yaitu PSAA1 dan SMCS21 diduga merupakan anggota genus *Proteus*, sedangkan satu isolat PSAA8 diduga merupakan anggota genus *Micrococcus*. Ketiga isolat bakteri PSAA8, SMCS21, dan PSAA1 menunjukkan kemampuan reduksi kromium dengan efisiensi reduksi secara berurutan sebesar 22.54%, 21.54%, dan 18.44%. Sehingga ketiga isolat bakteri laut disimpulkan memiliki potensi sebagai agen bioremediasi untuk mengurangi konsentrasi logam berat kromium dari lingkungan perairan.

Kata kunci: bakteri laut, bioremediasi, kromium, *Micrococcus*, *Proteus*

ABSTRACT

Water pollution by heavy metals occurs as a result of industrial developments such as textiles, electroplating and leather tanning. Chromium (Cr) is one of the heavy metals that is produced with a high level of toxicity to living things even in low concentrations. Environmentally friendly countermeasures carried out by the bioremediation method can utilize the ability of heavy metal resistant bacteria. This study aims to isolate, identify, and test the potential reduction of chromium heavy metal by chromium-resistant marine bacteria. This study used seawater samples, sand from Samas Beach and Pandansimo Beach, culture media Zobell marine broth 2216, and heavy metal $K_2Cr_2O_7$ *solution. The initial step of the research was carried out by taking samples of seawater and beach sand. Furthermore, isolation, selection, morphological, cell and biochemical characterization were carried out as well as identification of chromium resistant bacteria to test their reduction potential. The results of the three selected isolates had the highest resistance ability to chromium. The identification process showed that two isolates, namely PSAA1 and SMCS21 were suspected to be members of the genus Proteus, while one isolate PSAA8 was suspected to be a member of the genus Micrococcus. The three bacterial isolates PSAA8, SMCS21, and PSAA1 showed the ability to reduce chromium with reduction efficiencies of 22.54%, 21.54%, and 18.44% respectively. So that the three*

marine bacterial isolates were concluded to have potential as bioremediation agents to reduce the concentration of the heavy metal chromium from the aquatic environment.

Keywords: bioremediation, chromium, marine bacteria, Micrococcus, Proteus

PENDAHULUAN

Pertumbuhan populasi, perkembangan industrialisasi, dan peningkatan urbanisasi memberikan dampak negatif bagi lingkungan (Marzan et al., 2017). Pencemaran air merupakan salah satu permasalahan lingkungan yang disebabkan oleh fenomena tersebut. Peningkatan aktivitas perindustrian seperti industri tekstil, *electroplating*, penyamakan kulit, pembuatan cat, percetakan, dan penyulingan menjadi salah satu sumber utama penyumbang polutan ke dalam ekosistem air (Jeyakumar et al., 2023). Salah satu logam berat yang termasuk ke dalam *priority pollutants* oleh US EPA (*United State Environmental Protection Agency*) adalah kromium (Cr) (Sparling, 2016). Kromium merupakan salah satu logam berat dengan toksisitas tinggi jika sedikit saja melebihi konsentrasi seharusnya di dalam lingkungan. Konsentrasi kontaminan maksimum (*Maximum Contaminant Level* (MCL)) logam kromium dalam air minum menurut US EPA adalah 0.1 ppm (Sparling, 2016). Begitupula menurut SK Menteri Negara LH Kep 03/MENKLH/11/1991 disebutkan bahwa konsentrasi maksimum kromium total yang diperbolehkan dalam perairan adalah 0.1 ppm dan untuk kadar Cr (VI) adalah 0.05 ppm (Adhani & Husaini, 2017).

Kromium merupakan unsur logam transisi dan terletak di golongan VI-B dalam tabel periodik yang dapat ditemukan dalam sembilan keadaan valensi mulai dari -2 hingga +6 (Cervantes et al., 2001; Chug et al., 2016). Keadaan valensi kromium yang sering ditemukan dialam adalah dalam bentuk kromium trivalen Cr (III) dan kromium heksavalen Cr (VI) (Chug et al., 2016). Kromium merupakan mikronutrien esensial yang dibutuhkan oleh berbagai organisme untuk tumbuh, seperti Cr (III) yang berperan dalam metabolisme glukosa dan lipid. Berdasarkan perkiraan asupan makanan harian yang aman dan memadai (*Estimated Safe and Adequate Daily Dietary Intake* / ESADDI) untuk kromium adalah 50-200 µg (Anderson, 1997). Namun, jika kromium dikonsumsi dalam jumlah konsentrasi yang tinggi maka dapat memberikan efek toksik, karsinogenik, dan teratogenik (Nguema & Luo, 2012). Kromium dapat menyebabkan kerusakan oksidatif bagi sel. Cr (III) merupakan unsur kation yang dapat berikatan dengan gugus fungsional seperti karboksil dan tiol dari enzim sehingga dapat menyebabkan perubahan pada struktur dan aktivitasnya. Selain itu, muatan positif yang dimiliki Cr (III) dapat bereaksi dengan gugus fosfat DNA yang bermuatan negatif sehingga akan mengganggu proses transkripsi, replikasi serta menyebabkan mutasi (Igiri et al., 2018). Keadaan kromium lainnya yang banyak ditemukan dialam adalah kromium heksavalen (Cr (VI)). Cr (VI) adalah unsur kromium dengan keadaan valensi yang paling berbahaya dan paling toksik dengan estimasi 10-100 kali lebih berbahaya dibandingkan Cr (III) (Kanmani et al., 2012). Hal ini dikarenakan Cr (VI) memiliki kemampuan mobilisasi dan penetrasi sel yang lebih tinggi dibandingkan Cr (III). Sedangkan sebagian besar sel impermeabel terhadap Cr (III) karena membentuk senyawa yang tidak larut dalam air dalam lingkungan yang tidak asam (Cervantes et al., 2001).

Keberadaan polutan kromium dalam lingkungan dapat diatasi dengan bioremediasi menggunakan mikroorganisme, meliputi bakteri, archaea, dan jamur. Proses bioremediasi tersebut sangat aman bagi lingkungan karena bersifat *eco-friendly* (Abatenh et al., 2017). Selama terpapar logam pada lingkungan, mikroorganisme berusaha bertahan hidup dari paparan logam berbahaya tersebut dengan cara mengubah polutan logam menjadi tidak atau kurang berbahaya bagi sel, sehingga polutan logam sekaligus dapat dihilangkan dari lingkungan (Luka et al., 2018).

Lingkungan laut merupakan lingkungan unik dengan variasi kondisi fisiko-kimia

yang berfluktuasi. Sehingga di lingkungan laut potensial diperoleh mikroorganisme, khususnya bakteri laut dengan kemampuan adaptasi yang lebih tinggi, serta mekanisme pertahanan lainnya yang dapat membantu bertahan hidup (Kulkarni & Bee, 2015). Oleh karena itu, pada lingkungan laut potensial diperoleh bakteri laut yang berfungsi sebagai bioremediator pencemaran logam berat. Berdasarkan penelitian terdahulu beberapa bakteri laut dengan kemampuan resistensi dan reduksi logam berat diantaranya adalah *Corynebacterium* sp., *Streptomyces* sp., *Salinobacter* sp., *Micromonospora* sp., *Saccharomonospora* sp., *Micrococcus* sp. *Escherichia* sp. *Pseudomonas* sp., *Alteromonas* sp., *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Moraxella* sp., *Pseudochrobactrum* sp., dan *Proteus* sp. (Ge et al., 2013; Iyer et al., 2005; Naik et al., 2012). Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri dari Pantai Samas dan Pantai Pandansimo yang resisten terhadap kromium. Isolat bakteri yang diperoleh selanjutanya diidentifikasi dan diuji efisiensi dalam mereduksi konsentrasi kromium.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu timbangan analitik digital (OHAUS model: PA413 dan AD-600i ACIS, Changzhou), *magnetic stirrer*, *hot plate* (IKA®C-MAG HS 7 dan HI-COOK), pH meter (Eutech Instrument pH700), autoklaf (HICLAVE HVE-50), mikropipet 100-1000µL dan 10-100 µL (OHAUS dan Dragon Lab), vortex mixer (Gemmy model: VM-300), OptiLab, mikroskop (BOECO model number: BM-180), haemocytometer (Neubauer), Oven pengering (Despatch), inkubator 30°C dan 37°C (Memmert), shaker water bath (Memmert), *class* II *Biological Safety Cabinet* (ESCO StreamLine model: SC2-4S1), Atomic Absorption Spectrophotometer (PerkinElmer AAnalyst 600_, spektrofotometer Uv-Vis (thermo scientific Genesys 150).

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain sampel air laut dan pasir pantai. Bahan berupa medium meliputi *zobell marine broth* 2216 (*ZMB* 2216), H*ugh and Leifson's OF basal medium*, medium nitrat, medium cair, *tryphtophan* broth, medium *methyl red-voges proskauer* (*MR-VP*), *methyl red*. Selain itu medium *Simmon's citrate agar* (*SCA*), medium *sulfide indole motility* (*SIM*), medium pati agar, medium *skim milk* agar dan media *christensen urea agar* juga digunakan. Bahan lain yang digunakan berupa glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol, $K_2Cr_2O_7$, *bromthymol blue* (BTB), minyak paraffin α-naftilamin, asam sulfanilat, zinc, *kovac's reagent*, larutan iod, larutan Gram *malachite green*, H_2O_2, *phenol red*, alkohol 70% akuades dan spirtus.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juli 2023. Sampel diambil dari Pantai Samas dan Pantai Pandansimo, Bantul, D.I Yogyakarta. Masing-masing lokasi diambil tiga titik sampling sehingga total titik sampling adalah enam titik. Selanjutnya isolasi, identifikasi, dan uji potensi reduksi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi dan Laboratorium Kimia Analitik, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada.

Pengambilan Sampel

Sampel air laut dan pasir pantai diambil dari zona intertidal. Setiap titik sampling diambil sampel air laut diambil sebanyak ±50 mL ke dalam *conical tube* secara steril saat gelombang ombak mendekat ke arah pantai. Sampel pasir pantai dengan kedalaman ±10 cm diambil sebanyak ±50 g ke dalam *conical tube* secara steril. Sampel dimasukkan ke dalam *cool box* dengan suhu ±4°C untuk menjaga kualitas sampel.

Isolasi Bakteri Resisten Kromium

Isolasi bakteri dilakukan *enrichment* terlebih dahulu untuk memberikan kondisi yang mendukung organisme target tumbuh dengan baik, sekaligus menghambat pertumbuhan organisme non-target (Madhuri et al., 2019). Sampel air laut dimasukkan ke dalam media *Zobell marine broth* 2216 steril yang ditambahkan dengan larutan $K_2Cr_2O_7$ 2 ppm steril. Sterilisasi larutan $K_2Cr_2O_7$ dilakukan dengan *syringe filter nylon* 25 mm 0,45 µm, karena sterilisasi menggunakan autoklaf pada larutan yang mengandung Cr (VI) dapat mengurangi

toksisitasnya (Srinath et al., 2002). Selanjutnya untuk sampel pasir pantai dibuat suspensi terlebih dahulu, kemudian dimasukkan ke dalam media kultur cair yang sama. Proses inkubasi dilakukan selama tujuh hari pada suhu ruang, dan dilakukan *resubculturing* sebanyak dua kali.

Tahapan selanjutnya dilakukan *plating* dengan teknik *spread plate* pada media *marine agar* yang telah ditambahkan larutan $K_2Cr_2O_7$ 2 ppm. *Serial dilution* dilakukan terlebih dahulu hingga 10^{-6} untuk mengurangi konsentrasi bakteri dalam media kultur cair dan didapatkan koloni bakteri tunggal. Proses plating dilakukan pada seri pengenceran 10^{-4}, 10^{-5}, dan 10^{-6} kemudian diinkubasi di suhu ruang selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan pemurnian koloni tunggal yang memiliki morfologi koloni berbeda dari *mix culture* hasil inkubasi dengan teknik *quadrant streak*. Setelah itu dilakukan seleksi bertahap untuk mendapatkan tiga isolat bakteri dengan kemampuan resistensi kromium tertinggi. Isolat-isolat tunggal hasil pemurnian diseleksi berdasarkan kemampuannya untuk tumbuh dalam media *Zobell marine broth* 2216 dengan penambahan berbagai konsentrasi larutan $K_2Cr_2O_7$ mulai dari 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, hingga 300 ppm.

Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan karakterisasi morfologi koloni, morfologi sel dan uji biokimia. Karakterisasi morfologi koloni dilakukan dengan pengamatan bentuk koloni pada media kultur petri agar, media miring, media tegak, dan media cair. Karakterisasi morfologi sel dilakukan dengan pengamatan pewarnaan diferensial yaitu pewarnaan gram dan endospora. Pewarnaan gram dilakukan untuk menentukan bentuk sel bakteri dan mengelompokkannya menjadi bakteri gram positif atau negatif. Sedangkan pewarnaan endospora dilakukan untuk mengamati keberadaan endospora yang dihasilkan bakteri dengan menggunakan teknik *Schaeffer-Fulton stain*. Kedua pewarnaan diferensial tersebut dilakukan sesuai dengan metode dalam *Microbiology: A Laboratory Manual* (Cappuccino & Welsh, 2017).

Serangkaian uji biokimia yang dilakukan adalah uji katalase, uji fermentasi karbohidrat, uji oksidatif-fermentatif, uji reduksi nitrat dan nitrit, uji pembentukan indol, uji *methyl red*, uji sitrat, uji pembentukan hidrogen sulfida (H_2S) dan motilitas, *triple sugar iron agar* (TSIA), uji hidrolisis urea, uji hidrolisis pati, dan uji hidrolisis kasein. Pengujian tersebut menggunakan metode sebagai berikut:

1. Uji katalase dilakukan dengan dengan menggunakan H_2O_2 3%.
2. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menggunakan media kultur cair dengan sumber gula yang berbeda-beda dan diberi indikator *phenol red*.
3. Uji oksidatif-fermentatif dilakukan dengan menggunakan media agar tegak Hugh and Leifson yang mengandung indikator *brom thymol blue* (BTB) dengan penambahan minyak parafin
4. Uji reduksi nitrat dan nitrit dilakukan menggunakan media kultur cair masing-masing mengandung 0,1% KNO_3 dan KNO_2.
5. Uji pembentukan indol dilakukan dengan menggunakan medium *tryptone broth*
6. Uji *methyl red* dilakukan dengan mrnggunakan media cair *Methyl Red-Voges Proskauer* (MV-RP)
7. Uji sitrat dilakukan dengan menggunakan media kultur miring *Simmons citrate agar* (SCA).
8. Uji pembentukan hidrogen sulfida (H_2S) dan motilitas dilakukan dengan menggunakan medium agar tegak semisolid *Sulfide Indole Motility* (SIM)
9. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dilakukan menggunakan media mengandung glukosa, sukrosa, laktosa dan Fe
10. Uji hidrolisis urea dilakukan menggunakan media *Christensen's urea slant agar*
11. Uji hidrolisis pati dilakukan media mengandung 1% pati
12. Uji hidrolisis kasein dilakukan menggunakan media *skim milk agar*

Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri pada media kultur dengan dan tanpa penambahan kromium dilakukan untuk mengetahui pengaruh kromium terhadap pertumbuhan bakteri. Penyetaraan konsentrasi bakteri berumur 24 jam dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (thermo scientific Genesys 150) dengan metode *McFarland standard*. Skala standar yang biasa digunakan untuk bakteri adalah 0.5 dengan nilai OD_{625} sebesar 0.08 - 0,1. Sehingga jumlah bakteri dalam suspensi dapat diestimasi sebanyak 1.5×10^8 sel/mL (Yanti et al., 2021). Suspensi bakteri yang setara kemudian dimasukkan ke dalam media kultur cair *Zobell marine broth* 2216 dengan dan tanpa penambahan larutan $K_2Cr_2O_7$ 100 ppm. Selanjutnya dilakukan inkubasi dalam Memmert *water bath shaker incubator* selama 48 jam pada suhu 30°C 160spm. Pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan setiap 6 jam dengan mengambil sampel kultur cair untuk diukur nilai OD_{625} dengan spektrofotometer UV-Vis dan jumlah sel dengan haemocytometer (Neubauer) diamati dibawah mikroskop cahaya (BOECO model number: BM-180). Selanjutnya dilakukan perhitungan laju pertumbuhan spesifik (*specific growth rate*) menggunakan Persamaan 1 (Maier et al., 2009)

.

$$\mu = \frac{(\ln N_2 - \ln N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Keterangan:

μ = laju pertumbuhan spesifik (*specific growth rate*) (generasi/jam)

N_1 = jumlah bakteri mula-mula pada fase eksponensial (sel/mL)

N_2 = jumlah bakteri setelah tumbuh selama waktu t (sel/mL)

t_1 = waktu pertumbuhan bakteri pada N_1 (jam)

t_2 = waktu pertumbuhan bakteri pada N_2 (jam)

Uji Potensi Reduksi Kromium

Uji reduksi konsentrasi kromium dilakukan menggunakan *Zobell marine broth* 2216 dengan penambahan larutan $K_2Cr_2O_7$ 100 ppm yang telah diinkubasi selama 48 jam. Konsentrasi kromium yang tersisa dalam media cair diukur dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) PerkinElmer AAnalyst 600 pada panjang gelombang 357.9 nm (Singh et al., 2013). Setelah itu dilakukan pengukuran efisiensi reduksi konsentrasi kromium oleh bakteri dengan menggunakan Persamaan 2 (Nguema & Luo, 2012).

$$E(\%) = \left[\frac{Cr_0 - Crf}{Cr_0}\right] \times 100 \quad (2)$$

Keterangan:

E = efisiensi reduksi (%)

Cr_0 = konsentrasi awal kromium (ppm)

Cr_f = konsentrasi akhir kromium (ppm)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Isolat Bakteri Laut Resisten Kromium

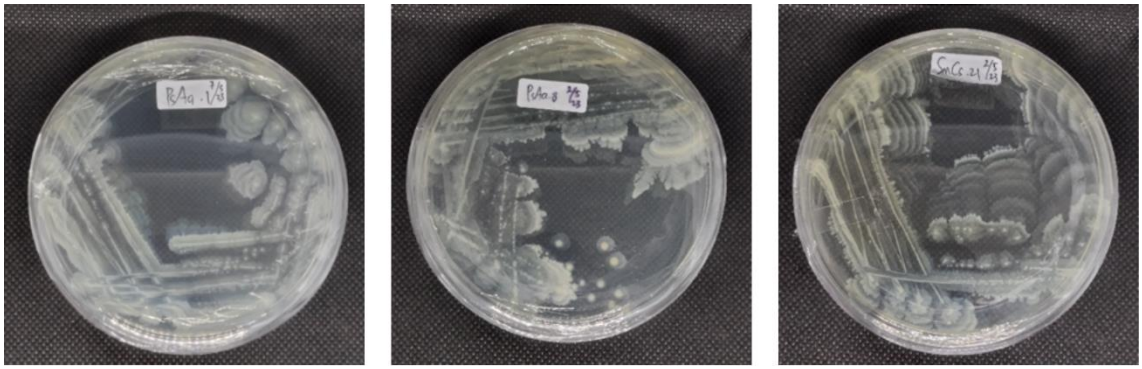
Hasil *plating* dan pemurnian isolat pada media *marine agar* yang ditambahkan dengan larutan $K_2Cr_2O_7$ 2 ppm didapatkan 14 isolat dengan karakter morfologi koloni yang berbeda. Isolat-isolat bakteri tersebut kemudian diseleksi secara bertahap dengan penambahan larutan $K_2Cr_2O_7$ berbagai konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, hingga 300 ppm. Hasil seleksi bertahap didapatkan tiga isolat bakteri dengan kemampuan resistensi kromium tertinggi yaitu PSAA1, PSAA8, dan SMCS21. Isolat PSAA1 dan PSAA8 merupakan isolat yang berasal dari sampel air laut Pantai Pandansimo, sedangkan isolat SMCS21 merupakan isolat yang berasal dari sampel Pasir Pantai Samas.

Karakter morfologi koloni ketiga isolat dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1. Berdasarkan karakterisasi morfologi koloni isolat PSAA1 dan SMCS21 memiliki kemiripan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat PSAA8. Ketiga isolat menunjukkan bentuk koloni yang menyebar (*spreading*) mengindikasikan kemampuan motilitas. Menurut Penttinen et al. (2018) bentuk koloni yang menyebar (*spreading*) disebabkan oleh kemampuan motilitas secara *gliding* diatas permukaan agar. Karakteristik pada media kultur cair semua isolat bakteri tumbuh secara merata dan

tersebar halus di seluruh bagian media cair. Tipe pertumbuhan demikian menunjukkan bahwa ketiga isolat merupakan bakteri *facultative anaerobic*, dimana bakteri mampu tumbuh pada kondisi lingkungan dengan dan tanpa O_2 (Cappuccino & Welsh, 2017). Bakteri tersebut cenderung menggunakan O_2 saat melakukan respirasi aerob untuk mendapatkan energi lebih tinggi. Namun jika tidak ada O_2 maka bakteri bisa menggunakan senyawa lain sebagai penerima elektron akhir seperti NO_3^-, SO_4^{2-} atau melalui jalur fermentatif (Cappuccino & Welsh, 2017).

Tabel 1. Morfologi koloni isolat bakteri PSAA1, PSAA8, dan SMCS21

Jenis Media	Karakter	Isolat Bakteri		
		PSAA1	PSAA8	SMCS21
Agar Petri	Bentuk Koloni	*Concentric*	*Irregular with raised center*	*Irregular*
	Tepi Koloni	*Lobate*	*Undulate / Wavy*	*Lobate*
	Elevasi Koloni	*Flat*	*Low umbonate*	*Flat*
	Warna Koloni	Krem	Krem	Krem
Agar Miring	Bentuk Pertumbuhan	*Beaded*	*Arborescent*	*Filiform*
	Opacity	*Translucent*	*Translucent*	*Translucent*
	Warna Pertumbuhan	Krem	Krem	Krem
Agar Tegak	Bentuk pertumbuhan	*Filiform*	*Villous*	*Filiform*
Cair	Penampakan media	*Uniform fine turbidity*	*Uniform fine turbidity*	*Uniform fine turbidity*



(a) (b) (c)

Gambar 1. Morfologi koloni isolat PSAA1 (a), PSAA8 (b), dan SMCS21 (c)

Karakter morfologi sel ketiga isolat dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan karakterisasi morfologi sel isolat PSAA1 dan SMCS21 memiliki kemiripan karakter yang termasuk ke dalam kelompok bakteri gram negatif dengan bentuk sel *bacillus*. Sedangkan isolat PSAA8 masuk ke dalam kelompok bakteri gram positif berbentuk *coccus*. Berdasarkan hasil pewarnaan endospora diperoleh hasil bahwa ketiga isolat tidak memproduksi endospora. Selanjutnya untuk karakter biokimia ketiga isolat dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Morfologi sel isolat bakteri PSAA1, PSAA8, dan SMCS21

Karakter	Isolat Bakteri		
	PSAA1	PSAA8	SMCS21
Sifat Gram	Negatif	Positif	Negatif
Bentuk Sel	*Bacillus*	*Coccus*	*Bacillus*
Endospora	Negatif	Negatif	Negatif

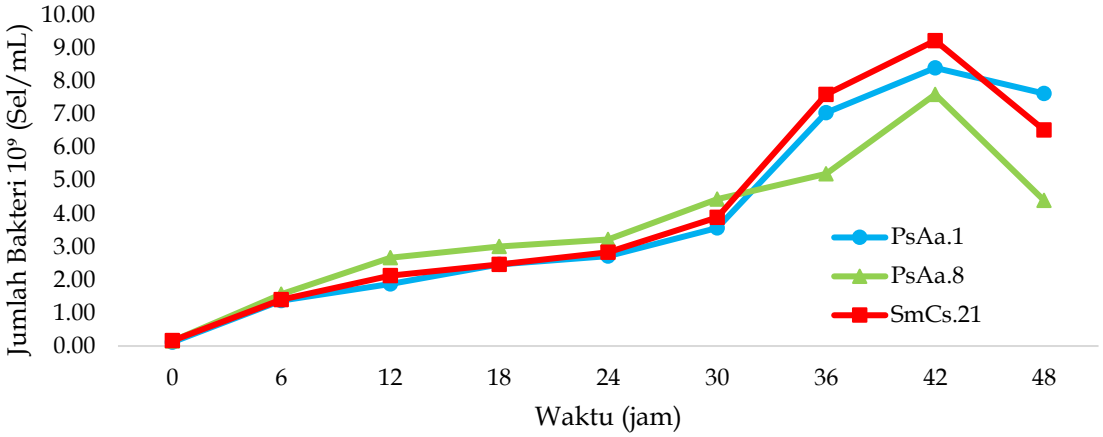
Berdasarkan karakter-karakter morfologi koloni, morfologi sel, dan biokimia serta sumber acuan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th* isolat PSAA1 dan SMCS21 memiliki kemiripan karakter dengan genus *Proteus*. Sedangkan isolat PSAA8 memiliki karakteristik yang mirip dengan genus *Micrococcus*.

Genus *Proteus* yang termasuk kedalam bakteri gram negatif memiliki karakteristik utama yang membedakannya dengan genus-genus *non-lactose fermenting* Enterobacteriaceae lainnya adalah kemampuannya untuk menggunakan urea sebagai sumber nitrogen dan memproduksi hidrogen sulfida (Holt et al., 1994; Willey et al., 2009). Selain itu, genus ini memiliki kemampuan motilitas yang didukung oleh flagela dengan jumlah banyak dan acak disekeliling sel bakteri (*peritrichous*) (Holt et al., 1994). Sedangkan Genus *Micrococcus* merupakan bakteri gram negatif dengan karakteristik pembeda dimana sebagian besar anggotanya tidak bisa menghasilkan asam dari berbagai macam karbohidrat (Holt et al., 1994). Karakter ini kemudian menjadi pembeda dengan genus lainnya dari *family* Micrococcaceae (Holt et al., 1994).

Tabel 3. Karakter biokimia isolat bakteri PSAA1, PSAA8, dan SMCS21

Uji Biokimia	Isolat Bakteri		
	PSAA1	PSAA8	SMCS21
Uji Katalase	+	+	+
Uji Fermentasi Karbohidrat			
a. Glukosa	+	-	+
b. Laktosa	-	-	-
c. Sukrosa	+	-	+
d. Manitol	-	-	-
Uji Oksidatif-Fermentatif	F	-	F
Uji Reduksi Nitrat	+	+	+
Uji Reduksi Nitrit	-	-	-
Uji Pembentukan Indol	+	-	+
Uji Methyl Red	+	-	+
Uji Sitrat	-	+	-
Uji Pembentukan Hidrogen Sulfida (H_2S) dan Motilitas	+	-	+
Triple Sugar Iron Agar	+	-	+
Uji Hidrolisis Urea	+	+	+
Uji Hidrolisis Pati	-	-	-
Uji Hidrolisis Kasein	-	-	+

Keterangan: + = Reaksi Positif, - = Reaksi Negatif, F = Fermentatif



Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolat bakteri PSAA1, PSAA8, dan SMCS21 pada media kultur tanpa penambahan kromium

Analisis Pertumbuhan Bakteri pada Media Kultur dengan dan Tanpa Kromium (Cr)

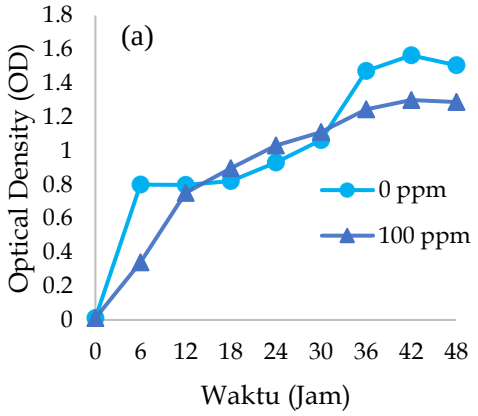
Hasil kurva pertumbuhan ketiga isolat pada media kultur tanpa penambahan kromium disajikan dalam Gambar 2. Berdasarkan kurva tersebut menunjukkan bahwa ketiga isolat PSAA1, PSAA8, dan SMCS21 memiliki pola kurva pertumbuhan fase lag, fase log, dan fase kematian yang cukup mirip satu sama lain. Fase lag dimana sel-sel bakteri melakukan adaptasi terhadap lingkungan baru terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-24. Selanjutnya memasuki fase log yang merupakan tahapan pertumbuhan bakteri dengan tingkat pembelahan tertinggi hingga tercapai jumlah maksimal sel (Cappuccino & Welsh, 2017) terjadi setelah jam ke-24 hingga mencapai jumlah sel tertinggi pada jam ke-42. Isolat SMCS21, PSAA1, dan PSAA8 memiliki jumlah sel terbanyak masing-masing sebesar $9.23x10^9$, $8.40x10^9$, dan $7.60x10^9$ sel/mL. Setelah jam ke-42 semua isolat bakteri mengalami fase kematian akibat sumber nutrisi di dalam kultur terus menurun dan akumulasi produk akhir metabolisme yang semakin menumpuk. Hal tersebut yang menyebabkan kondisi lingkungan tidak mendukung bakteri untuk terus berkembangbiak dan bertahan (Cappuccino & Welsh, 2017).

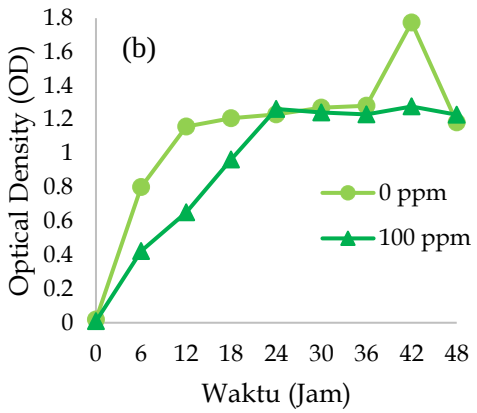
Pengukuran laju pertumbuhan bakteri dapat dihitung dari fase log (eksponensial), karena pembelahan sel terjadi dengan interval waktu yang konstan (Willey et al., 2009). Laju pertumbuhan dari masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 4. Laju pertumbuhan tercepat secara berurutan adalah SMCS21, PSAA1, dan PSAA8 dengan nilai laju pertumbuhan masing-masing $6.57x10^{-2}$, $6.27x10^{-2}$, dan $4.78x10^{-2}$ generasi/jam. Perbedaan laju pertumbuhan jenis bakteri satu dengan lainnya dapat dikarenakan perbedaan pada properti sel seperti jenis dan kandungan enzim yang dimiliki dapat mempengaruhi proses metabolisme bakteri (Imron & Purwanti, 2016).

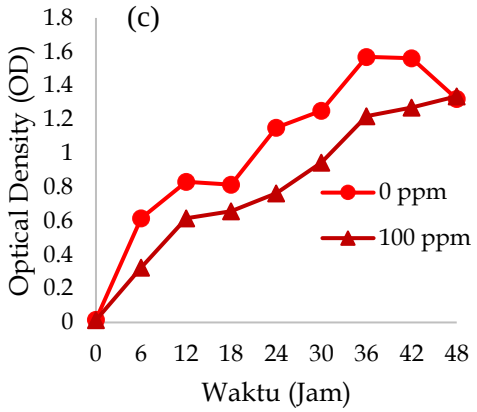
Selain itu, pertumbuhan masing-masing isolat dibandingkan dalam media kultur dengan dan tanpa penambahan larutan $K_2Cr_2O_7$ 100 ppm untuk mengetahui efek kromium pada pertumbuhan bakteri. Kurva pertumbuhan masing-masing isolat bakteri pada media kultur dengan tanpa penambahan kromium disajikan dalam Gambar 3. Berdasarkan kurva tersebut dapat diketahui bahwa penambahan kromium ke dalam media kultur dapat menghambat pertumbuhan ketiga isolat bakteri. Hasil yang sama diperoleh dari penelitian sebelumnya pada pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus megaterium* dan *Bacillus circulans* yang menunjukkan pertumbuhan bakteri yang semakin terhambat seiring dengan bertambah tingginya konsentrasi kromium dalam media kultur (Mistry et al., 2010; Munawaroh et al., 2017; Nguema & Luo, 2012; Rida et al., 2012; Singh et al., 2013; Srinath et al., 2002). Hal tersebut menunjukkan toksisitas logam berat kromium yang merupakan agen pengoksidasi kuat dapat mempengaruhi metabolisme bakteri dan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bakteri, elongasi pada fase lag, hingga menghambat pengambilan oksigen untuk sel (Ayangbenro & Babalola, 2017; Cervantes et al., 2001).

Tabel 4. Laju pertumbuhan isolat bakteri PSAA1, PSAA8, dan SMCS2

Isolat Bakteri	N_1 (sel/mL)	N_2 (sel/mL)	μ (generasi/jam)
PSAA1	$2.72x10^9$	$8.40x10^9$	$6.27x10^{-2}$
PSAA8	$3.22x10^9$	$7.60x10^9$	$4.78x10^{-2}$
SMCS21	$2.83x10^9$	$9.23x10^9$	$6.57x10^{-2}$







Gambar 3. Kurva pertumbuhan isolat bakteri (a) PSAA1, (b) PSAA8, dan (c) SMCS21 pada media kultur dengan dan tanpa penambahan kromium 100 ppm

Uji Potensi Reduksi Kromium (Cr) oleh Bakteri

Hasil pengukuran uji potensi reduksi kromium dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) pada panjang gelombang 357.9 nm disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Konsentrasi dan efisiensi reduksi kromium (Cr) isolat PSAA1, PSAA8, dan SMCS21

Isolat Bakteri	Konsentrasi Kromium (ppm)		Efisiensi Reduksi (%)
	Awal (0 Jam)	Akhir (48 Jam)	
PSAA1	100	81.56	18.44
PSAA8	100	77.16	22.84
SMCS21	100	78.46	21.54

Berdasarkan Tabel 5 efisiensi reduksi kromium tertinggi dilakukan oleh isolat PSAA8 sebesar 22.84%, kemudian isolat SMCS21 sebesar 21.54%, dan terakhir isolat PSAA1 sebesar 18.44%. Hal tersebut menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri memiliki kemampuan untuk mereduksi kromium. Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa bakteri anggota *Micrococcus* sp. dan *Proteus* sp. memiliki kapasitas degradasi logam kromium (Ge et al., 2013; Marzan et al., 2017). Perbedaan kemampuan reduksi logam berat ini dapat dipengaruhi oleh berbagai properti yang dimiliki oleh masing-masing isolat. Yamina et al. (2012) menunjukkan bahwa anggota bakteri genus *Micrococcus* sp. memiliki kemampuan resistensi terhadap logam kromium dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan *Proteus* sp. Kemampuan resistensi terhadap logam berat yang tinggi dapat berkorelasi dengan kemampuan degradasi logam berat yang lebih tinggi pula. Selain itu, kemampuan reduksi logam salah satunya dipengaruhi oleh struktur dinding sel bakteri (Priyadarshanee & Das, 2021). Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tersusun dari peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan bakteri gram negatif yang tersusun dari monolayer peptidoglikan. Peptidoglikan tebal pada bakteri gram positif seringkali dilengkapi asam teikoat yang saling berikatan fosfodiester dan menjadikan dinding sel bermuatan lebih negatif. Muatan negatif ini menyebabkan penyerapan kation logam berat menjadi lebih kuat. Kation-kation logam berat akan bereaksi dan berikatan dengan grup fosfat pada lipopolisakarida membran fosfolipid dan membentuk grup fungsional di dinding sel yang selanjutnya akan masuk ke dalam sel dan mengalami metabolisme intraseluler (Priyadarshanee & Das, 2021).

Micrococcus sp. adalah salah satu bakteri yang memiliki kemampuan resisten logam berat dan banyak ditemukan di ekosistem air dan sedimen laut (Naik et al., 2012). Kemampuan reduksi logam berat oleh *Micrococcus* sp. salah satunya terjadi dengan mekanisme bioakumulasi yang dilakukan oleh sel bakteri hidup secara aktif mengambil logam berat dari lingkungannya

(Jeyakumar et al., 2023). Sedangkan kemampuan reduksi logam berat kromium oleh *Proteus* sp. salah satunya difasilitasi secara enzimatik. Dinding sel bakteri yang tersusun atas polisakarida dan protein dapat berinteraksi dengan logam berat. Penelitian Jhunjhunwala et al. (2016) menunjukkan bahwa aktivitas reduksi bakteri *Proteus* sp. terjadi karena beberapa interaksi berupa ikatan langsung antara gugus OH (grup hidroksil), gugus C=O, dan gugus fosfat dengan logam berat kromium pada dinding sel yang menyebabkan reduksi konsentrasi kromium pada media. Selain itu, dalam penelitian tersebut menyebutkan bahwa teramatinya *chromium reductase* dengan NADH *reductase* sebagai *coenzyme*-nya dalam aktivitas reduksi logam berat kromium.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan tiga isolat bakteri laut resisten logam berat kromium dari sampel air laut Pantai Pandansimo dan Pasir Pantai Samas. Isolat bakteri PSAA1 dan SMCS21 teridentifikasi merupakan anggota genus *Proteus*, sedangkan isolat PSAA8 teridentifikasi merupakan anggota genus *Micrococcus*. Kemampuan efisiensi reduksi kromium tertinggi adalah isolat PSAA8 sebesar 22.54%, kemudian isolat SMCS21 sebesar 21.54%, dan isolat PSAA1 sebesar 18.44%. Sehingga ketiga isolat tersebut berpotensi menjadi agen bioremediasi ekosistem perairan yang tercemar logam berat kromium.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi dan Laboratorium Kimia Analitik, Fakultas MIPA UGM yang telah memberi fasilitas selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The Role of Microorganisms in Bioremediation-A Review. *Open Journal of Environmental Biology*, *1*(1), 38–46. https://doi.org/10.17352/ojeb.000007.

Anderson, R. A. (1997). Chromium as an Essential Nutrient for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *26*, S35–S41. https://doi.org/10.1006/rtph.1997.1136.

Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(1), 94. https://doi.org/10.3390/ijerph14010094.

Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2017). *Microbiology: A Laboratory Manual* (Eleventh edition). Pearson.

Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of Chromium with Microorganisms and Plants. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(3), 335–347. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x.

Chug, R., Gour, V. S., Mathur, S., & Kothari, S. L. (2016). Optimization of Extracellular Polymeric Substances Production Using *Azotobacter beijreinckii* and *Bacillus subtilis* and Its Application in Chromium (VI) Removal. *Bioresource Technology*, *214*, 604–608. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.010.

Ge, S., Dong, X., Zhou, J., & Ge, S. (2013). Comparative Evaluations on Bio-Treatment of Hexavalent Chromate by Resting Cells of *Pseudochrobactrum* sp. And *Proteus* sp. In Wastewater. *Journal of Environmental Management*, *126*, 7–12. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.011.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth edition* (Ninth Edition). Lippincott Williams & Wilkins.

Igiri, B. E., Okoduwa, S. I. R., Idoko, G. O., Akabuogu, 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, 2018, e2568038. https://doi.org/10.1155/2018/2568038.

Imron, M. F., & Purwanti, I. F. (2016). Uji Kemampuan Bakteri *Azotobacter S8* dan *Bacillus subtilis* untuk Menyisihkan Trivalent Chromium (Cr^{3+}) pada Limbah Cair. *Jurnal Teknik ITS*, *5*(1). https://doi.org/10.12962/j23373539.v5i1.14854.

Iyer, A., Mody, K., & Jha, B. (2005). Biosorption of Heavy Metals by a Marine Bacterium. *Marine Pollution Bulletin*, *50*(3), 340–343. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.012.

Jeyakumar, P., Debnath, C., Vijayaraghavan, R., & Muthuraj, M. (2023). Trends in Bioremediation of Heavy Metal Contaminations. *Environmental Engineering Research*, *28*(4), 220631. https://doi.org/10.4491/eer.2021.631.

Jhunjhunwala, P., Roy, R., Roy, S., & Chaudhuri, A. N. (2016). Bioremediation of Chromium by Unique Chromium Reductase Activity in *Proteus* sp. Isolated from Waste Water. *International Journal of Applied Research*, *2*(11), 249–256.

Kanmani, P., Aravind, J., & Preston, D. (2012). Remediation of Chromium Contaminants Using Bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *9*, 183–193. https://doi.org/10.1007/s13762-011-0013-7.

Kulkarni, P., & Bee, H. (2015). Marine-Bacteria Actinomycetes: A Case Study for Their Potential in Bioremediation. *Biotechnological Research*, *1*(3), 171-174. http://br.biomedpress.org/index.php/br/article/view/704.

Luka, Y., Highina, B. K., & Zubairu, A. (2018). Bioremediation- A Solution to Environmental Pollution-A Review. *American Journal of Engineering Research*, *7*(2), 101–109.

Madhuri, R. J., Saraswathi, M., Gowthami, K., Bhargavi, M., Divya, Y., & Deepika, V. (2019). Chapter 19—Recent Approaches in the Production of Novel Enzymes from Environmental Samples by Enrichment Culture and Metagenomic Approach. In V. Buddolla (Ed.), *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 251–262). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00019-2.

Maier, R. M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (Eds.). (2009). *Environmental microbiology* (second ed). Elsevier/Academic Press.

Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., & Chowdhury, A. M. M. A. (2017). Isolation and Biochemical Characterization of Heavy-Metal Resistant Bacteria from Tannery Effluent in Chittagong City, Bangladesh: Bioremediation Viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, *43*, 65–74. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.11.002.

Mistry, K., Desai, C., Lal, S., Patel, K., & Patel, B. (2010). Hexavalent Chromium Reduction by *Staphylococcus* sp. Isolated from Cr (VI) Contaminated Land Fill. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, *6*(1), 117–129. https://www.researchgate.net/publication/52006736_Hexavalent_Chromium_Reduction_by_Staphylococcus_Sp_Isolated_From_Cr_Vi_Contaminated_Land_Fill.

Munawaroh, H. S. H., Gumilar, G. G., Nandiyanto, A. B. D., Kartikasari, S., Kusumawaty, D., & Hasanah, L. (2017). Microbial Reduction of Cr (VI) in to Cr (III) by Locally Isolated *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *180*, 012296. https://doi.org/10.1088/1757-899X/180/1/012296.

Naik, M. M., Pandey, A., & Dubey, S. K. (2012). Bioremediation of Metals Mediated by Marine Bacteria. In Anil Prakash, T. Satyanarayana, & B. N. Johri (Eds.), *Microorganisms in Environmental Management* (pp. 665–682). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_29.

Nguema, P. F., & Luo, Z. (2012). Aerobic Chromium (VI) Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Activated Sludge. *Annals of*

Microbiology, *62*, 41–47. https://doi.org/10.1007/s13213-011-0224-7.

Penttinen, R., Hoikkala, V., & Sundberg, L.-R. (2018). Gliding Motility and Expression of Motility-Related Genes in Spreading and Non-spreading Colonies of *Flavobacterium columnare*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 525. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00525.

Priyadarshanee, M., & Das, S. (2021). Biosorption and Removal of Toxic Heavy Metals by Metal Tolerating Bacteria for Bioremediation of Metal Contamination: A Comprehensive Review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(1), 104686. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104686.

Rida, B., Yrjälä, K., & Hasnain, S. (2012). Hexavalent Chromium Reduction by Bacteria from Tannery Effluent. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(4), 547–554. https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08029.

Singh, N., Verma, T., & Gaur, R. (2013). Detoxification of Hexavalent Chromium by An Indigenous Facultative Anaerobic *Bacillus Cereus* Strain Isolated from Tannery Effluent. *African Journal of Biotechnology*, *12*(10), 1091–1103. https://doi.org/10.5897/AJB12.1636

Sparling, D. W. (2016). *Ecotoxicology Essentials: Environmental Contaminants and Their Biological Effects on Animals and Plants*. Elsevier/Academic Press.

Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., & Garg, S. K. (2002). Chromium (VI) Biosorption and Bioaccumulation by Chromate Resistant Bacteria. *Chemosphere*, *48*(4), 427–435. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00089-9.

Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., & Prescott, L. M. (2009). *Prescott's principles of microbiology* (1st ed). McGraw-Hill Higher Education.

Yamina, B., Tahar, B., & Marie Laure, F. (2012). Isolation and Screening of Heavy Metal Resistant Bacteria from Wastewater: A Study of Heavy Metal Co-Resistance and Antibiotics Resistance. *Water Science and Technology*, *66*(10), 2041–2048. https://doi.org/10.2166/wst.2012.355.

Yanti, D. H., Nursyirwani, N., & Yoswaty, D. (2021). Isolation and Identification of Bacteria from Dumai Marine Waters that Have Potencial as Lead Bioremediation Agents. *Journal of Coastal and Ocean Sciences*, *2*(3), 217–222. https://doi.org/10.31258/jocos.2.3.217-222.