

Ekspresi protein pada mikroorganisme resisten Cr dengan metode elektroforesis

UMI FATMAWATI^{1,*}, SURANTO², SAJIDAN^{1,2}

Fatmawati U, Suranto, Sajidan. 2009. Protein expression on Cr resistant microorganism using electrophoresis method.

Hexavalent chromium (Cr(VI)) is known as toxic heavy metals, so the need is reduced to Cr(III) is much less toxicity. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* are resistant Cr(VI) microorganism and have ability to reduce Cr(VI). The aim of this research is to know ability of microorganism to reduce Cr(VI) and to know protein band pattern between Cr(VI) resistant microorganism and non resistant microorganism which inoculated on LB broth. SDS-PAGE was used to indentify protein expression. While, Cr(VI) concentration was identified by 1.5 *diphenylcarbazide* method. The quantitative data was analyzed by two factorial ANOVA that continued with DMRT at 1% level test. The qualitative data i.e. protein expression analyzed by relative mobility (Rf). The results showed that the ability of microorganisms to reduce Cr(VI) at initial concentration of 0.5 ppm, 1 ppm, 5 ppm and 10 ppm may vary, the average percentage of the ability of each microorganism in reducing Cr(VI) is *P. putida* (65%) > *S. cerevisiae* (64.45%) > *P. aeruginosa* (60.73%) > *Pantoea* sp. (50.22%) > *K. pneumoniae* (47.82%) > without microorganisms (34.25%). The adding microorganisms have significantly influenced toward reduction of Cr(VI). The SDS-PAGE shows that protein expression between resistant and not resistant microorganisms are no different, but resistant microorganisms have more protein (protein band is thicker).

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

♥ Alamat korespondensi:

- ¹ Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan Pendidikan MIPA, FKIP, Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126, Jawa Tengah, Indonesia
- ² Program Studi Biosains, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret, Surakarta 57126, Jawa Tengah, Indonesia

Manuskrip diterima: 19 Agustus 2008. Revisi disetujui: 17 November 2008.

♥♥

Edisi bahasa Indonesia dari: Fatmawati U, Suranto, Sajidan. 2009. Protein expression on Cr resistant microorganism using electrophoresis method. Nusantara Bioscience 1: 31-37.

Fatmawati U, Suranto, Sajidan. 2009. Ekspresi protein pada mikroorganisme resisten Cr dengan metode elektroforesis.

Krom heksavalen (Cr(VI)) dikenal sebagai logam berat beracun, sehingga perlu direduksi menjadi Cr(III) yang lebih rendah toksisitasnya. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* sp. dan *Saccharomyces cerevisiae* adalah mikroorganisme resisten dan mampu mereduksi Cr(VI). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam mengurangi Cr(VI) dan mengetahui pola pita protein antara mikroorganisme resisten Cr(VI) dan mikroorganisme tidak resisten yang diinokulasi pada medium kaldu LB. SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui ekspresi protein, sementara konsentrasi Cr(VI) diidentifikasi dengan metode 1,5 difenilkarbazid. Data kuantitatif dianalisis dengan ANAVA dua faktorial dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 1%. Data kualitatif yaitu ekspresi protein dianalisis dengan mobilitas relatif (Rf). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan mikroorganisme dalam mereduksi Cr(VI) pada konsentrasi awal 0.5 ppm, 1 ppm, 5 ppm dan 10 ppm berbeda-beda, persentase rata-rata kemampuan masing-masing mikroorganisme dalam mereduksi Cr(VI) adalah: *P. putida* (65%) > *S. cerevisiae* (64,45%) > *P. aeruginosa* (60,73%) > *Pantoea* sp. (50,22%) > *K. pneumoniae* (47,82%) > tanpa mikroorganisme (34,25%). Penambahan mikroorganisme secara nyata mempengaruhi reduksi Cr(VI). SDS-PAGE menunjukkan bahwa ekspresi protein antara mikroorganisme resisten dan tidak resisten tidak berbeda, tetapi mikroorganisme resisten memiliki lebih banyak protein (pita protein lebih tebal).

Kata kunci: logam berat Cr, mikroorganisme, protein, elektroforesis

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 makhluk 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; Lowe *et al.* 2002; Uprati *et al.* 2003; Rahman *et al.* 2007). Apabila masuk ke dalam sel, dapat menyebabkan kerusakan struktur DNA hingga terjadi mutasi (Larashati 2004).

Beberapa jenis mikroorganisme *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 dan 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 μ M tidak mempengaruhi pertumbuhan mikrobial, sedangkan pada konsentrasi Cr(VI) 15 μ M pertumbuhan mikrobial terhambat sebesar 30%.

Ganguli dan Tripathi (2002) 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 bakteri yang resisten terhadap Cr dan Cd, sehingga dapat digunakan dalam mereduksi Cr dalam suatu media (Timotius *et al.* 1989; Lowe *et al.* 2002; Ackerley *et al.* 2004; 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 Obratsova *et al.* (2002) dikemukakan bahwa reduksi Cr(VI) 150 ppm oleh *Pantoea* sp. optimal dengan penambahan sulfat (SO_4^{2-}) dicapai pada waktu 20 jam.

Melihat potensi beberapa jenis mikroorganisme di antaranya: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *K. pneumonia*, *Pantoea* sp. dan *S. cerevisiae* dalam mereduksi logam berat Cr, maka dilakukan penelitian tentang kemampuan mikroorganisme tersebut untuk mereduksi Cr(VI) dalam media cair yang mengandung logam berat Cr, dan mengetahui perubahan genetik mikroorganisme melalui ekspresi pita protein dengan deteksi pada gel poliakrilamid elektroforesis SDS-PAGE. Elektroforesis

merupakan 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 (Davis dan Heywood 1963; Hames dan Rickwood 1990; Matsudaira 1993).

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme yang digunakan. Mikroorganisme yang meliputi *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Pantoea* sp., dan *S. cerevisiae* digunakan dalam pengujian reduksi Cr(VI) dan ekspresi pola pita protein diperoleh dari Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Isolat bakteri diperbanyak dalam media cair LB dengan komposisi masing-masing isolat 100 mL yaitu 1 g Trypton, 0.5 g ekstrak khamir, dan 0.5 g NaCl, dan untuk perkembangbiakan kapang digunakan media cair PDA (*potato dextrose agar*).

Pembuatan media cair yang mengandung logam berat Cr. Sebanyak 0.1414 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 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, sehingga 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.

Penghitungan jumlah sel mikroorganisme. Untuk mengetahui kemampuan hidup mikroorganisme dalam media yang mengandung logam berat, maka dilakukan penghitungan jumlah sel mikroorganisme 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 μ L, dan diinkubasi lagi selama 16 jam suhu 37°C . Koloni yang terbentuk dihitung dengan *colony counter* dan dihitung jumlah sel mikroorganisme dalam satuan sel/mL (Hadioetomo 1993). Biakan yang tumbuh pada

kedua konsentrasi Cr(VI) merupakan mikroorganisme resisten, sedangkan biakan yang hanya tumbuh pada kontrol merupakan mikroorganisme tidak resisten.

Inokulasi mikroorganisme pada media cair LB. Untuk mengetahui kemampuan mereduksi Cr(VI), masing-masing mikroorganisme diambil dengan jarum ose dan ditumbuhkan dalam erlenmeyer berisi media cair LB dengan konsentrasi Cr(VI) 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 5 ppm dan 10 ppm. Setiap jenis mikroorganisme 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.

Uji krom heksavalen. Sebanyak 50 mL media cair kultur bakteri yang mengandung krom dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan disentrifugasi 3000 rpm selama 30 menit, supernatan dikumpulkan dan disaring dengan kertas saring Whatman 0.2 µm 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 difenilkarbazid, diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai rata. Setelah 5-10 menit diukur dengan spektrofotometer UV VIS dengan panjang gelombang 540 nm.

Pembuatan larutan standar krom baku. Larutan siapan krom baku sebanyak 2-20 mL dipipet (2, 4, 6, 8, 10, dan seterusnya secara bertingkat) ke dalam beberapa buah labu ukur 100 mL. Pada labu ukur lain masukkan 25 mL akuades sebagai blanko. Pada masing-masing labu ukur, ditambahkan 1 mL H₂SO₄ (1+1), 0.3 mL H₃PO₄ 85% dan 2 mL larutan difenilkarbazid, kemudian diencerkan sampai tanda batas dan dikocok sampai rata, didiamkan selama 5-10 menit. Ditetapkan serapan dalam panjang gelombang 540 nm dan dibuat kurva kalibrasi kemudian dihitung kadar krom dalam mg/L terhadap kurva kalibrasi.

Elektroforesis SDS-PAGE. Sebanyak 5 mL kultur bakteri dituangkan ke dalam tabung eppendorf 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 dimasukkan ke dalam sumuran, campuran sampel dan buffer sampel direbus dalam air mendidih selama 2 menit, kemudian dimasukkan ke dalam es selama ± 5 menit, setelah itu sampel siap dirunning. Gel yang sudah terbentuk (*discontinuous gel* 10% dan *stacking gel* 3%), dipindahkan ke dalam tangki elektroforesis (Hames dan Rickwood 1990). Selanjutnya tangki elektroforesis diisi dengan *running buffer* (0.19 M Glycine, 10 mL SDS 10%, dan 0.0248 M Tris dalam 1 L) hingga penuh. Sebanyak 10 µL mikropipet campuran sampel dan buffer sampel dimasukkan dalam sumuran elektroforesis secara hati-hati, lalu dipasang tutup tanki dan diatur voltasenya (100V, 90 menit). Untuk identifikasi berat molekul protein, maka digunakan marka protein yang memiliki rentang berat molekul 212-11.3 kDa.

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

Analisis data. Perbedaan kemampuan setiap mikroorganisme untuk mereduksi logam berat Cr(VI) pada setiap konsentrasi dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji lanjut beda jarak nyata Duncan (DMRT). Adapun perbedaan ekspresi protein antar mikroorganisme dijelaskan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan mikroorganisme pada media yang mengandung logam berat Cr

Hasil uji pendahuluan yang berupa penghitungan jumlah koloni atau *Colony Form Unit* (CFU) dari lima jenis mikroorganisme yang ditumbuhkan dalam media agar yang mengandung Cr(VI) sebesar 10 ppm menunjukkan bahwa kelima jenis mikroorganisme tersebut mampu hidup dalam media yang mengandung Cr(VI) (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah sel mikroorganisme yang diinokulasi pada media LB padat dengan penambahan Cr(VI) 0 ppm dan 10 ppm.

Jenis	Rata-rata jumlah sel (sel/mL)		Persentase penurunan jumlah sel
	0 ppm	10 ppm	
<i>P. aeruginosa</i>	370x10 ⁶	287x10 ⁶	22.4%
<i>P. putida</i>	352x10 ⁶	230x10 ⁶	34.6%
<i>K. pneumonia</i>	303x10 ⁶	240x10 ⁶	20.7%
<i>Pantoea sp</i>	254x10 ⁶	177x10 ⁶	30.3%
<i>S. cerevisiae</i>	460x10 ⁶	317x10 ⁶	31%

Jumlah sel terbanyak terdapat pada *S. cerevisiae* yaitu 460x10⁶ sel/mL pada konsentrasi Cr(VI) 0 ppm, sedangkan pada konsentrasi Cr(VI) 10 ppm *S. cerevisiae* juga menghasilkan sel terbanyak sebesar 317x10⁶ 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), karena *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 (Jianlong *et al.* 2003; Mulyani 2004; Gao *et al.* 2006). *P. aeruginosa* juga memiliki kemampuan hidup dalam media yang mengandung logam berat Cr(VI) 10 ppm, terbukti dengan tumbuhnya koloni pada media agar LB yang mengandung Cr(VI) 10 ppm dengan jumlah sel rata-rata sebanyak 287x10⁶ sel/mL. Mikro-organisme yang lain juga memiliki kemampuan hidup dalam media yang mengandung logam berat Cr(VI) 10 ppm. Jumlah sel paling sedikit teramati pada *Pantoea sp.* dengan jumlah sel sebanyak 177x10⁶ sel/mL.

Lima jenis mikroorganisme di atas pada umumnya mengalami penurunan jumlah sel pada media yang mengandung logam berat Cr(VI). Penurunan jumlah sel terendah terdapat pada *K. pneumonia* sebesar 20.7%, sedangkan penurunan tertinggi terdapat pada *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, penurunan jumlah sel mikroorganisme setelah

diinokulasikan ke dalam media agar dengan penambahan Cr(VI) 10 ppm, pada umumnya sebesar 20-30%; suatu penurunan yang tidak terlalu ekstrim dan mengindikasikan bahwa kelima jenis mikroorganisme tersebut resisten terhadap lingkungan yang mengandung logam berat Cr(VI).

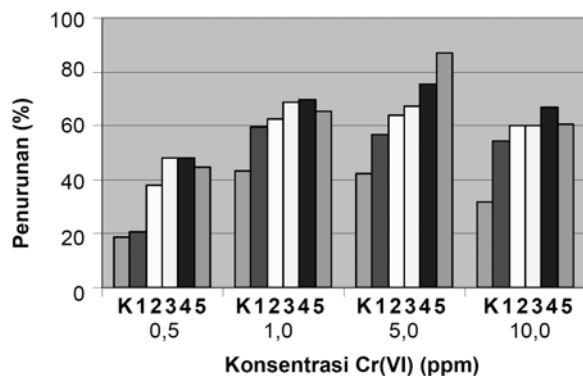
Mikroorganisme yang mampu hidup dalam media yang mengandung Cr(VI) juga dapat berperan sebagai reduktor logam berat Cr(VI) menjadi Cr(III). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa keberadaan Cr(VI) pada kadar 0-50 ppm dalam sel mikroorganisme tidak mengganggu pertumbuhan sel (Jianlong *et al.* 2003;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

Reduksi Cr(VI) pada media cair

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan bahwa lima jenis 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 jenis mikroorganisme yaitu: *K. pneumonia*, *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 di atas shaker. Persentase penurunan Cr(VI) oleh lima jenis mikroorganisme pada konsentrasi yang berbeda ditunjukkan pada Gambar 1.

Kemampuan reduksi Cr(VI) oleh lima jenis 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 jenis 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) (Suzuki *et al.* 1992; Ganguli dan Tripathi 2002; Krauter dan Krauter 2002; Jianlong *et al.* 2003; Mulyani 2004; Upreti *et al.* 2004; Mardiyono 2005).



Gambar 1. Persentase penurunan Cr(VI) oleh lima jenis mikroorganisme. Keterangan: K = Tanpa mikroorganisme (kontrol), 1 = *K. pneumonia*, 2 = *Pantoea sp.*, 3 = *P. aeruginosa*, 4 = *P. putida*, 5 = *S. cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae mempunyai kemampuan reduksi paling tinggi di antara mikroorganismenya yang lain. Persentase penurunan pada *S. cerevisiae* sebesar 87% pada konsentrasi awal 5 ppm. Pada konsentrasi awal 5 ppm ini persentase penurunan terendah terjadi pada *K. pneumonia* yaitu sebesar 56.7%. Pada perlakuan tanpa bakteri juga terjadi penurunan sebesar 42.5%. Beberapa penelitian lain menyatakan bahwa *Saccharomyces* adalah mikroorganisme yang mempunyai efektivitas paling tinggi dalam mereduksi Cr(VI). Krauter dan Krauter (2002) menyatakan bahwa *S. cerevisiae* dapat mereduksi Cr(VI) 100% pada pH 6.5-7, sedangkan pada pH asam kemampuan bioremovalnya kurang efektif. Salah satu keunggulan *Saccharomyces* sebagai agen biosorpsi Cr(VI) adalah sifatnya yang tidak patogen dibandingkan bakteri lain seperti *P. aeruginosa* dan *K. pneumonia*. *S. cerevisiae* juga memiliki kemampuan mereduksi jenis logam berat lain seperti: Mo, Co, Ca, Zn, Sr, Hg dan Cu dalam air (Krauter dan Krauter 2002; Mulyani 2004).

Pseudomonas putida memiliki persentase 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) di antaranya adalah Ackerley *et al.* (2004), Lowe *et al.* (2002), Timotius *et al.* (1989), dan Rahman *et al.* (2007). Hasilnya menunjukkan bahwa *P. putida* mampu mereduksi Cr(VI).

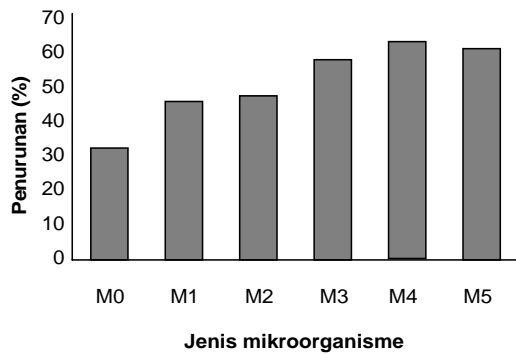
Konsentrasi awal Cr(VI) paling tinggi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 ppm. Pada konsentrasi ini mikroorganisme masih dapat tumbuh dan berkembang biak, hal ini terlihat dari kekeruhan media cair LB yang diinokulasi dengan lima jenis mikroorganisme dengan yang tanpa inokulasi. Secara logika, 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. Persentase penurunan Cr(VI) tertinggi terjadi pada konsentrasi 1 ppm dan 5 ppm.

Cr(VI) pada lima jenis mikroorganisme

Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat urutan kemampuan mikroorganisme dalam mereduksi Cr(VI). Kemampuan tertinggi adalah pada bakteri *P. putida* dengan persentase reduksi rata-rata 65%, sedangkan kemampuan terendah adalah jenis bakteri *K. pneumonia* dengan persentase 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%).

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



Gambar 2. Rata-rata kemampuan reduksi. Keterangan: M0 = Tanpa mikroorganisme (kontrol), M1 = *K. pneumonia*, M2 = *Pantoea* sp., M3 = *P. aeruginosa*, M4 = *P. putida*, M5 = *S. cerevisiae*

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
AxB	15	1350,517	90,034	3,054	1,960*	2,580
Galat (b)	36	1061,207	29,478			
Umum	71	20474,792				

Keterangan: kk (a) = 10,631%; kk (b) = 9,910%; * = beda nyata pada taraf 1%

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 ^e	43,06 ^e	42,52 ^e	31,83 ^e
<i>K. pneumonia</i>	20,46 ^e	59,82 ^{abcd}	56,72 ^{cd}	54,42 ^{abcd}
<i>Pantoea</i> sp	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 berbahaya 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.

Sebagaimana dikemukakan sebelumnya, menurut Rahman *et al.* (2007) reduksi Cr(VI) terjadi karena selain pertumbuhan, mikroorganisme juga menghasilkan produk samping berupa H₂S. Kenaikan jumlah sel mikroorganisme akan menaikkan kecepatan produksi H₂S yang akan mempercepat reduksi Cr(VI). H₂S yang dihasilkan bakteri akan bereaksi dengan krom untuk membentuk krom 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 dengan valensi enam. Sedangkan menurut Suhendrayatna (2001) reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III) oleh mikroorganisme yang disebut bioremoval memiliki dua macam mekanisme, yaitu secara pasif dan aktif. Penyerapan pasif dikenal dengan nama biosorpsi. Proses ini terjadi ketika ion logam berat mengikat dinding sel dengan dua cara yang berbeda, yaitu (i) pertukaran ion dimana ion monovalen dan divalent seperti Na, Mg, dan Ca pada dinding sel digantikan oleh ion-ion logam berat, dan (ii) formasi kompleks antara ion-ion logam berat dengan gugus fungsional seperti karbonil, amino, thiol, hidroksil, fosfat, 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 pada pH tertentu dan dengan kehadiran ion-ion lain di media di mana logam berat dapat terendapkan sebagai garam yang tidak terlarut.

Penyerapan logam berat juga dapat terjadi secara aktif, yang terjadi pada berbagai tipe sel hidup. Mekanisme ini secara simultan 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. Proses ini tergantung dari energi yang terkandung dan sensitifitasnya terhadap parameter-parameter yang berbeda seperti pH, suhu, kekuatan ikatan ionik, dan cahaya. Proses ini juga dapat dihambat oleh suhu yang rendah, tidak tersedianya sumber energi dan penghambatan metabolisme sel (Suhendrayatna 2001).

Ekspresi protein pada mikroorganisme resisten Cr

Pada Gambar 3 diperlihatkan pola pita protein hasil *running* pada SDS-PAGE dari lima jenis mikroorganisme yaitu *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.

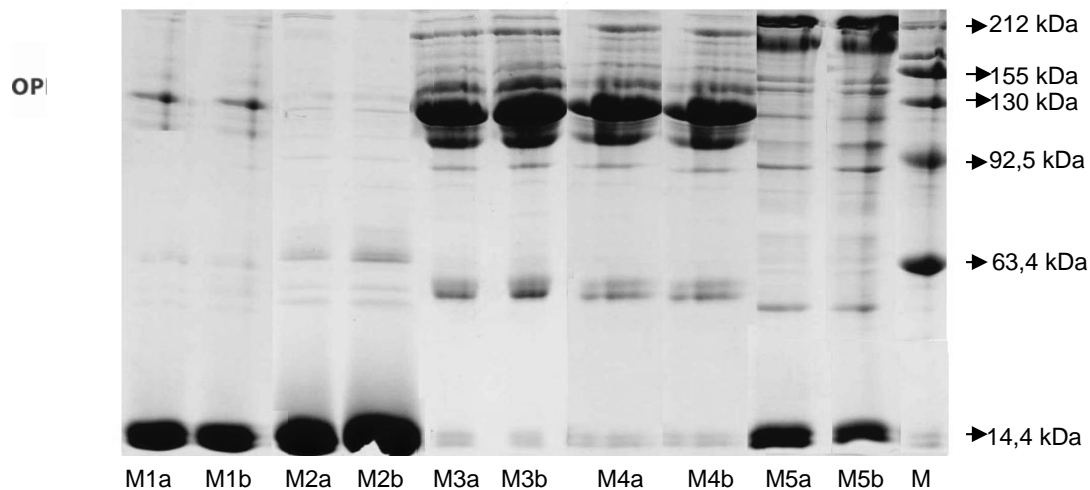
Marka protein dapat digunakan untuk mengidentifikasi berat molekul dari campuran polipeptida (Hames dan Rickwood 1990). Dalam penelitian ini, marka protein yang digunakan memiliki rentang berat molekul 212-11.3 kDa. Dari hasil elektroforesis terdapat sejumlah pita protein yang memiliki ketebalan berbeda-beda. Protein yang memiliki ketebalan dan intensitas warna yang lebih besar dibandingkan protein lain dan selalu ada di setiap varietas disebut protein mayor (Wijaya dan Rahman 2005). Pada hasil elektroforesis terdapat beberapa protein mayor pada jenis *P. aeruginosa* (M3) dan *P. putida* (M4). Berat molekul protein mayor ini berkisar 148.7 kDa, 121.6 kDa, dan 105 kDa. Kedua jenis ini memiliki protein mayor yang intensitas warna dan ketebalannya hampir sama karena kedua mikroorganisme ini masih termasuk dalam genus yang sama yaitu *Pseudomonas*.

Bakteri *K. pneumonia* (M1) memiliki beberapa pita protein, namun karena konsentrasai protein dari sampel yang dirunning sedikit, maka pembentukan pita pada gel poliakrilamid masih kurang optimal. Dari Gambar 3 diketahui 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 tersebut tidak memiliki perbedaan yang mencolok, karena masih merupakan satu jenis.

Hasil running *S. cerevisiae* (M5) memperlihatkan pola pita yang sama antara mikroorganisme yang resisten dan 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. Metode tersebut tidak mempengaruhi struktur biopolimer, serta sangat sensitif terhadap perbedaan muatan dan berat molekul yang cukup kecil (Bachrudin 1999). Protein yang dialirkan dalam medium yang menagndung medan listrik menyebabkan senyawa-senyawa yang bermuatan akan bergerak dalam larutan sebagai akibat dari sifat polaritas yang berlawanan, sehingga mobilitas suatu molekul merupakan 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 dan Rohman 2005). Oleh karena itu, kompleks SDS-protein yang lebih besar mempunyai mobilitas yang lebih rendah dibandingkan dengan kompleks SDS-protein yang lebih kecil.



Gambar 3. Ekspresi protein pada lima jenis mikroorganisme yang ditumbuhkan pada media cair LB dengan konsentrasi Cr(VI) 0 ppm dan 10 ppm. Keterangan: M = marka protein, M1a, M1b = *K. pneumoniae*, M2a, M2b = *Pantoea sp.*, M3a, M3b = *P. aeruginosa*, M4a, M4b = *P. putida*, M5a, M5b = *S. cerevisiae*. a = 0 ppm b = 10 ppm

Metode ekstraksi protein pada mikroorganisme dilakukan dengan *Phosphat Buffer Saline Solution* (PBS) yang dilanjutkan pemecahan sel dengan menggunakan alat sonifikasi (alat pemecah sel dengan menggunakan gelombang bunyi yang menghasilkan frekuensi tinggi). Tujuan pemecahan sel adalah memberikan kesempatan keluarnya protein yang akan dimurnikan. Sel yang telah dipecah harus terjaga dari pengaruh oksigen, karena oksigen dapat menyebabkan protein tidak aktif, terdenaturasi, dan timbul pematatan (Bachrudin 1999).

KESIMPULAN

Jenis-jenis mikroorganisme *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Pantoea sp.*, dan *S. cerevisiae* berpengaruh sangat nyata terhadap persentase penurunan Cr(VI). Variasi konsentrasi awal Cr(VI) juga berpengaruh sangat nyata terhadap persentase 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 pneumoniae* (47.82%) > tanpa mikroorganisme (34.25%). Ekspresi protein yang terbentuk pada masing-masing mikroorganisme

yang resisten maupun yang tidak resisten memiliki pola pita protein yang hampir sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackerley DF, Gonzales CF, Park CH, Blake R Keyhan M, Martin A. 2004. Chromat reducing properties of soluble flavoprotein from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Biol* 70 (2): 873-882.
- Bachrudin Z. 1999. Petunjuk laboratorium: isolasi, identifikasi, dan pewarnaan protein. PAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta.
- Davis PH, VH Heywood. 1963. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. Appleton & Lange. Conecticut.
- Ganguli A, Tripathi A. 2002. Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 416-420.
- Gao J, Zhang Y, Ntoni J, Begonia MFT, Lee KS, Hicks L, Hwang WW, Hwang H-M. 2006. Effects of selected by-products of an acid hydrolyzate on cell growth and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mississippi Acad Sci*. October 01, 2006 <http://www.accessmylibrary.com/article-1G1-156274382/effects-selected-products-acid.html>
- Hadioetomo RS. 1993. Mikrobiologi dasar dalam praktek. UI Press. Jakarta.
- Hames BD, Rickwood D. 1990. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Oxford University Press. London.
- Jianlong W, Zeyu M, Xuan Z. 2003. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to chromium stress. *Process Biochem* 39 (10): 1231-1235.
- Krauter PAW, Krauter GW. 2002. Water treatment process and system for metals removal using *Saccharomyces cerevisiae*. The Regents of the University of California, United States Patent and Trademark Office Granted Patent. www.uspto.gov/patft/index.html

- Larashati S. 2004. Reduksi krom (Cr) secara in-vitro oleh kultur campuran bakteri yang diisolasi dari lindi tempat pembuangan akhir sampah (TPA). [Tesis]. ITB. Bandung.
- Lowe KL, Fliflet RE, Ly T, Little BJ, Jones-Meehan J. 2002. Chromium tolerant microbial communities from the Chesapeake Bay watershed. *Virginia J Sci* 53(3): 142-155.
- Mardiyono. 2005. Reduksi Cr(VI) Limbah Cair Industri Tekstil oleh Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia 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. Academic Press. San Fransisco, CA.
- Mulyani B. 2004. Analisis variasi biomassa *Saccharomyces cerevisiae* terhadap serapan logam krom. *Sain Mat* 2 (4): 1-9.
- Obraztsova AY, Francis CA, Tebo BM. 2002. Sulfur disproportionation by the facultative anaerob *Pantoea agglomerans* sp-1 as a mekanisme for chromium (VI) reduction. *Geomicrobil J* 19: 121-132
- Palar H. 1994. Pencemaran dan toksikologi logam berat. Rineka Cipta. Jakarta.
- Rahman MU, Gul S, UIHaq MZ. 2007. Reduction of chromium (VI) by locally isolated *Pseudomonas* sp. C171. *Turkey J Biol* 31: 161-166
- Suhendrayatna. 2001. Bioremoval logam berat dengan menggunakan mikroorganisme: suatu kajian kepustakaan. Seminar Bioteknologi. Sinergi Forum-Institut of Technology. Tokyo
- 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). *J Bacteriol* 174 (16): 5340-5345
- Timotius KH, Widianarko B, Laksmani S. 1989. Interaksi antara bakteri dan logam berat. Kumpulan Hasil Seminar Ilmiah Ekologi Tanah dan Ekotoksikologi. Fakultas Biologi UKSW. Salatiga.
- Upreti RK, Srivastha R, Chaturvedi UC. 2004. Gut microflora, toxic metal: chromium as a model. *Indian J Med Res* 119: 49-59.
- Wijaya SKS, Rahman L. 2005. Fraksinasi dan karakterisasi protein utama biji kedelai. Fakultas MIPA Universitas Jember. Jember.