

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI *PSEUDOMONAS* PADA TANAH YANG TERINDIKASI TERKONTAMINASI LOGAM

(*Identification and Characterization bacteria Pseudomonas on
Metal Contaminated Soil indicated*)

Yoyon Suyono dan Farid Salahudin

Baristand Industri Pontinak Jl. Budi Utomo No. 41 Pontianak 78243

E-mail: yo2nsu@yahoo.com

ABSTRACT. *The research goals to determine the species of bacteria that can live in soil containing metal as a source of biomaterial biosorben. The research was conducted through the stages of isolation and characterization by testing the morphology, growth and biochemistry. Two isolates which have characteristics similar to the Pseudomonas genus and species of Pseudomonas sp. Pseudomonas sp has the ability to grow in extreme conditions.*

Keywords: *bacteria, characterization, identification, pseudomonas*

1. PENDAHULUAN

Material biologi seperti kelompok bakteri dalam dekade terakhir menarik perhatian para peneliti. Peneliti melakukan pengembangan material biologi tersebut untuk mengurangi logam berat pada limbah cair dengan proses biosorpsi. Material biologi bakteri memiliki beberapa kelebihan dibandingkan material lain seperti *algae*, *fungi* dan *yeast*. Kelebihan material bakteri antara lain memiliki rasio permukaan-volume dan sisi aktif kemorsorpsi yang tinggi (Beveridge, 1989 dalam Viera dan Volesky, 2000). Efektifitas memisahkan ion logam berat terlarut dalam larutan kompleks tinggi, cepat dan volume besar (Hussein *et. al.*, 2004). Selektif pada konsentrasi rendah, kisaran pH yang luas sekitar 3 sampai dengan 9.

Salah satu bakteri yang banyak digunakan sebagai biomaterial dalam berbagai penelitian biosorpsi adalah *genus Pseudomonas* seperti spesies *Pseudomonas sp* mampu menyerap logam krom (VI) dan kadmium (Cd), *aeruginosa* untuk logam tembaga (Cu), kadmium (Cd) dan timbal (Pb). *Pseudomonas putida*, logam

kadmium (Cd), tembaga (Cu), timbal (Pb) dan seng (Zn). *Pseudomonas sp*, logam krom (VI) dan kadmium (Cd). *Pseudomonas stutzeri*, logam tembaga (Cu). Kondisi proses biosorpsi, pH mendekati netral (4-7) dan waktu kontak mulai 1 jam hingga 24 jam (Vijayaraghavan *et. al.*, 2008).

Bakteri *Pseudomonas* sendiri memiliki karakteristik seperti, gram negatif, berbentuk batang (*rods*) atau kokus (*coccus*), aerob obligat, motil mempunyai flagel polar. Bakteri ini, oksidase positif, katalase positif, nonfermenter dan tumbuh dengan baik pada suhu 4°C atau dibawah 43°C. *Pseudomonas* banyak ditemukan pada tanah, tanaman dan air. Beberapa spesies *Pseudomonas* seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas stutzeri* dan lain-lain.

Beberapa peneliti melakukan isolasi bakteri yang berasal dari lokasi tercemar mengingat menggunakan *seeding* dengan bakteri komersial dibutuhkan biaya yang lebih mahal dan belum tentu sesuai dengan karakteristik limbah yang diolah

(Dwipayana dan Aariesyady, 2011). Sumber bakteri *Pseudomonas* antara lain *sewage treatment* dan *waste water* (Hussein *et al.*, 2004 dan Narasimhulu *et al.*, 2004), *activated sludge treating industrial effluents* (W.C. Leung *et al.*, 2000), bengkel automotif dan bengkel pengelasan (Affan, *et al.*, 2009) dan *copper mining industry* (Jain *et al.*, 2009).

Secara umum untuk mengetahui suatu jenis bakteri dapat dilakukan dengan isolasi dan identifikasi. Isolasi merupakan memisahkan bakteri satu dengan bakteri lain yang berasal dari campuran berbagai bakteri. Isolasi dilakukan karena secara alami, bakteri di alam ditemukan dalam populasi campuran. Sedangkan identifikasi bakteri merupakan langkah lanjutan dari hasil isolasi. Identifikasi dapat ditentukan berdasarkan uji morfologi, pertumbuhan dan biokimia (Waluyo, 2008; Pelczar, 2008; Purwoko, 2007).

Pemanfaatan biomaterial bakteri pada proses biosorpsi berdasarkan sifat biologi yaitu *metal binding capacities*. Biosorpsi dapat didefinisikan sebagai interaksi tidak langsung secara fisika-kimia antara logam/radionukleotida dan sel mikroba (Shumate dan Stranberg, 1985 dalam Alluri *et al.*, 2007). Mekanisme biosorpsi berdasarkan metabolisme sel yaitu *metabolisme dependent* dan *non-metabolisme*. Sedangkan berdasarkan tempat dimana logam dapat diserap dari larutan salah satunya *cell surface sorption*. Mekanisme *non-metabolisme* dengan *cell surface sorption* dapat menggunakan bakteri pasif (*non living cells*) melalui interaksi fisika-kimia antara logam dengan gugus fungsional yang terdapat pada dinding sel. Dimana di dinding sel tersusun polisakarida, liposakarida, glikoprotein yang mampu mengikat logam. Metode ini relatif cepat, reversibel (Kuyucak dan Volesky, 1988 dalam Ahalya, *et al.*, 2003) dan tanpa penambahan nutrisi (Hussein, *et al.*, 2004). Tahapan biosorpsi meliputi pemilihan biomaterial, *pretreatment* biomaterial, imobilisasi biosorben (pembuatan biosorben) dan biosorpsi (Alluri, *et al.*, 2007).

Identifikasi dan karakterisasi bakteri *Pseudomonas* pada tanah yang terindikasi

mengandung logam bertujuan untuk mengetahui spesies melalui uji morfologi, pertumbuhan dan biokimia sebagai biomaterial biosorben logam.

2. METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan meliputi *Buffered Pepton Wáter* (Difco), NaCl (e-Merck), Nutrien Agar (Difco), Alkohol (e-Merck), *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) (Difco), *Casamino Acid Media* (Difco) dan Aluminium foil.

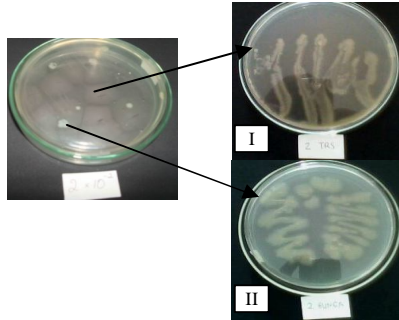
Peralatan meliputi wadah contoh (bahan dari gelas dan plastik) dan alat sampling. *Glass ware*, cawan petri, jarum ose, pipet tetes, *micro* pipet, pipet ukur, botol pengencer, tabung reaksi, labu ukur, gelas kimia, erlenmeyer, pinset dan bunsen. Peralatan utama, timbangan analitik, timbangan *top loading*, oven, inkubator (menginkubasi atau memeras bakteri pada suhu yang terkontrol, merek Memert dan WTB Binder), autoklaf, *hot plate stirrer*, *laminar flow*, pH meter dan termometer.

Prosedur penelitian meliputi pengambilan contoh tanah pada salah satu industri pelapisan logam di kabupaten Kubu Raya Kalimantan Barat untuk isolasi bakteri (sesuai prosedur pengambilan contoh tanah untuk analisa mikroba, 2004, Balai Penelitian Tanah, Jawa Barat). Sebanyak 25 g contoh tanah ditimbang kemudian dilarutkan dalam 225 ml *Buffered Pepton Wáter*. Larutan contoh diencerkan sampai 5 kali pengenceran (10^{-5}). Sebanyak 1 ml dari masing-masing pengenceran dicampurkan dengan media selektif *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) pada cawan petri. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan posisi cawan petri terbalik. Setelah diinkubasi pertumbuhan bakteri diamati.

Koloni yang terpisah dipindahkan menggunakan jarum ose ke dalam media agar miring *Casamino Acid Media*. Kemudian diinkubasi selama 48 jam hingga diperoleh bakteri tunggal (isolat murni). Isolat murni yang dihasilkan di analisa morfologi, pertumbuhan dan biokimia di Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Serpong, Tangerang, Banten.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri dari satu titik di area dekat *outlet* (pengolahan limbah cair) pada pengenceran (10^{-2}) ditemukan 2 (dua) isolat yaitu bentuk transparan (kode I) dan bentuk bunga (kode II) seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Isolat bakteri: bentuk transparan (I) dan bentuk bunga (II)

Hasil identifikasi dan karakterisasi melalui pengujian morfologi, pertumbuhan dan biokimia dari masing-masing contoh isolat seperti pada Tabel 1, memiliki kesamaan. Sifat morfologinya adalah bentuk sel batang (Gambar 2), termasuk kelompok bakteri gram negatif, motil. Pertumbuhannya pada suhu 20-40°C obligat aerobik, Sedangkan sifat biokimianya adalah katalase positif dan glukosa negatif.

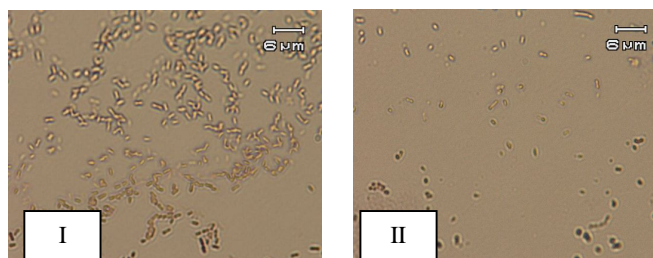
Mengacu karakteristik di atas dengan menggunakan *Bergey's Manual Determinative Bacteriology eight edition, part 7*, isolat I dan II memiliki sifat-sifat yang serupa dengan kelompok 7 (batang, aerobik dan gram negatif) yaitu famili *Pseudomonadaceae* genus *Pseudomonas*. Ciri-ciri terpilih dengan morfologi, bentuk batang, motil karena flagella, dan gram negatif. Pertumbuhan bersifat aerobik, dan suhu pertumbuhan 4-43 °C.

Tabel 1. Hasil uji penentuan genus bakteri

Parameter	Hasil		
	I*	II*	III**
a. Morfologi			
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang
Sifat gram	Negatif	Negatif	Negatif
Motility	Positif	Positif	Positif
b. Pertumbuhan (<i>Growth</i>)			
Aerob/Anaerob	Obligat aerobik	Obligat aerobik	Aerobik
pH Optimal	5-9	5-9	7-8.5
Suhu optimal (°C)	20-40	20-40	4-43
c. Biokimia			
Katalase	Positif	Positif	Positif
Fermentasi karbohidrat			
▪ Glukosa	Negatif	Negatif	Negatif
O/F	Negatif/Negatif	Positif/Negatif	Oxidation
Diidentifikasi	famili <i>Pseudomonadaceae</i> genus <i>Pseudomonas</i>		

*) Sumber: *Laboratorium Mikrobiologi Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Serpong 2010*

***) *Bergey's Manual Determinative Bacteriology eight edition, part 7, 1975*



Gambar 2. Hasil pengamatan bentuk sel: isolat I (kiri) dan isolat II (kanan)
(Sumber: *Laboratorium Mikrobiologi Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Serpong 2010*)

Ciri-ciri metabolik dapat mengoksidasi senyawa berkarbon satu seperti metanol atau metan, beberapa dapat menguraikan berbagai senyawa. Habitatnya tanah dan lingkungan akuatik air asin. Beberapa spesies memiliki sifat patogenik bagi manusia dan binatang (Pelczar, 2008).

Dalam manual tersebut berisi banyak informasi untuk identifikasi bakteri, tetapi tidak berisi banyak informasi deskriptif spesies yang telah ada. Untuk mendapatkan spesies bakteri adalah dengan membandingkan bakteri yang telah diidentifikasi sebelumnya. Bila tidak terdapat bakteri yang ciri-ciri 100% serupa, maka dilakukan pendekatan terhadap bakteri yang memiliki ciri-ciri yang paling menyerupai. Oleh karena itu teknik identifikasi konvensional akan selalu menghasilkan suatu bakteri tertentu yang sudah teridentifikasi sebelumnya dan tidak

akan dapat menemukan spesies baru (Cowan, 1974 dalam Dwipayana dan Aariesyady, 2011). Berdasarkan teori tersebut kedua isolat I dan II dibandingkan dengan spesies *Pseudomonas* sp yang teridentifikasi sebelumnya memiliki ciri-ciri yang menyerupai seperti pada Tabel 2. Sebaliknya melalui identifikasi molekuler (DNA) parameter PCR-16SrRNA yang dianalisis secara bioinformatika dengan membandingkan pada database di situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Isolat I, *identity* 99% *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85, kode akses HQ023428.1 dan isolat II, *identity* 99% *Pseudomonas* sp J16, kode akses EU099381.1. Isolat II, *Pseudomonas* sp memiliki evolusi dan kekerabatan dengan *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA *gene isolate* 29 (Suyono, 2010).

Tabel 2. Hasil uji penentuan spesies bakteri isolat I

Parameter	Hasil				
	I	II	III	IV	V
a. Morfologi					
Motility	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
b. Pertumbuhan (Growth)					
Suhu optimal (°C)	20-40	20-40	5-42		28
Biokimia					
Oksidase	Negatif	Negatif	-	Positif	Positif
Indol	Negatif	Negatif	-	Negatif	Negatif
Fermentasi karbohidrat					
▪ Sukrosa	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	-
▪ Laktosa	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	-
▪ Glukosa	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Negatif
Urease	Negatif	Negatif	-	Negatif	
c. 16S rRNA*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp			
Diidentifikasi	<i>spesies Pseudomonas sp 1 dan Pseudomonas sp 2</i>				

*) Sumber: - *Laboratorium Mikrobiologi Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT Serpong 2010*
- I: Dwipayana dan Aariesyady, 2011; II: Uzair, et al., 2006; III: Lazaroaie, 2010

Hasil uji terhadap tanah lokasi pengambilan contoh mengandung logam seng (Zn) melebihi 234 mg/kg atau dikatakan tanah terkontaminasi (Notohadiprawiro, 2006 dalam Hardiani, 2011) dengan pH basa. Secara instrinsik bakteri mempunyai kemampuan tumbuh pada kondisi tanah yang ekstrim (Clausen, 2000 dalam Hussein et al., 2003).

4. KESIMPULAN

Bakteri yang diperoleh dari isolasi merupakan famili *Pseudomonadanceae*

genus *pseudomonas* dan spesiesnya *Pseudomonas* sp yaitu *Pseudomonas* sp 1 dan *Pseudomonas* sp 2. Memiliki ciri-ciri terpilih dengan morfologi, bentuk batang,

motil karena flagella dan gram negatif. Pertumbuhan bersifat aerobik, suhu pertumbuhan 20-40°C dan pH 5-9. Sifat biokimianya adalah katalase-positif, indol negatif, fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa dan laktosa) negatif dan urease negative serta mempunyai kemampuan tumbuh pada kondisi yang ekstrim.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada anggota tim penelitian berdasarkan Surat Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Industri No. 12/KEP/BPPI/I/2010 tanggal 19 Januari 2010, Surat Keputusan Kepala Balai Riset dan Standardisasi Industri Pontianak No. 035/BPPI/BRS.Ptk/SK/1/2010 tanggal 25 Januari 2010 dan Industri Pelapisan Logam di Kabupaten Kubu Raya Kalimantan Barat sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahalya, N., T.V. Ramachandra., and R.D. Kanamadi., 2003, Biosorption of Heavy Metals, *Res.J.Chem. Environ.*, 7(4) Des.
- Affan, Q.A., E. Shoeb, U. Badar and J. Akhtar, 2009, Isolation and Characterization of Bacterial Isolates Having Heavy Tolerance, *Journal of Basic and Applied Sciencis*, 7 (2), 56-60.
- Alluri, H.K., S.R. Ronda, V.S. Settalluri, J. Singh, Bondili, Suryanarayana and Venkateshwar, P, 2007, Biosorption: An-eco-Friendly Alternative for Heavy Metal Removal, *African Journal of Biotechnology*, 6(25), 2924-2931.
- Dwipayana dan H.D. Ariesyady, 2011, *Identifikasi Keberagaman Bakteri Pada Lumpur Hasil Pengolahan Limbah Cat dengan Teknik Konvensional*, www.ftsl.itb.ac.id/kk/rekayasa.../pe-ww7-dwipayana-15305020.pdf, (diakses 10 Juni 2011)
- Hardiani, H., T. Kardiansyah dan S. Sugesty, 2011, Bioremediasi Logam Timbal (Pb) Dalam Tanah Terkontaminasi Limbah Sludge Industri Kertas Proses Deinking, *Jurnal Selulosa*, 1 (1), Juni: 31-41.
- Hussein, H., Moawad H., S.F. Ibrahim, K. Kandeel, and H. Moawad, 2004, Biosorption of Heavy Metal from Waste Water Using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (1).
- Hussein, H., H. Moawad, and Farag, S., 2003, Isolation and Characterization of *Pseudomonas* Resistant to Heavy Metals Contaminants, *Arab J. Biotech*, 7 (1), Jan: 13-22.
- Jain, P.K., S. Ramachandran, V. Shukla, D. Bhakuni and S.K. Verna, 2009, Characterization of Metal and Antibiotic Resistance in a Bacterial Population Isolated from a Copper Mining Industry, *International Journal of Integrative Biologi*, 6 (20).
- Lazaroaie, M.M., 2010, Multiple Response of Gram-Positive and Gram Negative Bacteria Mixture of Hydrocarbons, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 649-66.
- Leung, W.C., M.F. Wong, H.Chua, W.Lo, P.H.F. Yu, and C.K. Leung, 2000, Removal and Recovery of Heavy Metals by Bacteria Isolated from Activated Sludge Treating Industrial Effluents and Municipal Wastewater, *Water Science and Technology*, 41 (12) : 233-240.
- Narasimhulu, K and P.S. Rao, Studies of Removal of Toxic Metals From Wastewater Using *Pseudomonas* Species, *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, 4 (7).
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S., 2008, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Penerbit UI, Jakarta.
- Purwoko, T., 07, *Fisiologi Mikroba*, Cetakan Pertama, PT. Bumi Aksara, Jakarta .

- Suyono, Y., 2010, Penentuan Spesies Bakteri *Pseudomonas* dan Analisis Phylogenetic Tree Secara Bioinformatika, *Jurnal BIOPROPAL Industri*, 20 (01).
- Uzair, Bushra, N. Ahmed, F. Kousar, D H. Edward, 2006, Isolation and Characterization of *Pseudomonas* Strain That Inhibit Growth of Indigenous and Clinical Isolate, *The Internet Jurnal of Microbiology*, 2 (2).
- Vijayaraghavan, K dan Yeoung-Sang Yun, 2008, Bacterial Biosorbents and Biosorption, *Biotechnology Advance*, 26 , 266–291.
- Viera, B.H.S.F dan B. Volesky, 2000, Biosorption: Solution to Pollution?, *Intenatl. Microbiol.*, 3, 17-24.
- Waluyo, L., 2008, *Teknik dan Metode Dasar Mikrobiologi*, Cetakan Pertama, UMM Press, Malang