



ANALISIS KADAR LOGAM Cu DALAM BAKTERI SIMBION PADA SPONS *Callyspongia sp*

Adriani, Alfian Noor*, Abdul Rauf Patong, Maming
Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Hasanuddin
Kampus UNHAS Tamalanrea, Makassar 90245

*Kontak : nuklir@indosat.net.id

ABSTRACT

This research aims to analyze the levels of copper (Cu) in the sponge symbiont bacterial. The research was carried out through the steps of isolation, identification, and measurement of the metal content. Sponges used in this research is of *Callyspongia sp*. Bacteria were isolated from *Callyspongia sp* sponges in the *Bacillus sp* gram-positive. By using Atomic Absorption Spectrophotometer, the results showed that the levels of Cu for *Callyspongia sp* is 8.9112 ppm, while in the extracellular bacterial isolates Cu level ranging between 1.4009 ppm and 2.0336 ppm and in the intracellular is between 0.4786 ppm and 1.7813 ppm. It is concluded that bacterial isolates either in extra- as well as intracellular were both accomodated copper in their bodies.

Keyword: bacteria, *Callyspongia sp*, copper, sponge, symbiont

PENDAHULUAN

Spons merupakan hewan *filter feeder* dan memungkinkan banyaknya mikroorganisme yang hidup di dalamnya (Murniasih dan Rasyid, 2010). Beberapa penelitian telah dilakukan yang berhubungan dengan kemampuan spons dalam mengakumulasi logam berat. Selain sebagai alat monitor dan bioakumulator logam berat, spons digunakan dalam hal metabolit sekundernya di mana diketahui bahwa dalam spons terdapat mikroorganisme yang juga turut berperan dalam menghasilkan metabolit sekunder tersebut.

Banyak peneliti yang berpikir bahwa dalam penyerapan logam berat oleh spons, mikroorganisme simbiotnya pun mengambil peranan penting. Tujuan penelitian ini, untuk mengetahui bagaimana kandungan logam Cu pada bakteri simbiot spons.

METODE PENELITIAN

Penyegaran Sampel dalam Media Nutrient Broth

Bagian Permukaan Spons

Sebanyak 15 gram sampel spons dibilas dengan 30 mL NaCl fisiologis. Air bilasan dimasukkan dalam 30 mL media *nutrient broth*. Kemudian dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24-48 jam.

Bagian Dalam Spons

Sebanyak 15 gram sampel spons dibilas dengan 30 mL NaCl fisiologis. Spons yang telah dibilas digerus hingga halus menggunakan mortar, ditambahkan dengan NaCl fisiologis kemudian suspensi dimasukkan dalam 30 mL media *nutrient broth* lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24-48 jam.

Penentuan Pengenceran

Sampel yang telah diremajakan pada media *nutrient broth* dilakukan pengenceran bertingkat 10^{-1} - 10^{-10} . Pengenceran 10^{-5} - 10^{-10} , ditumbuhkan

masing-masing pada media nutrisi agar pada suhu kamar selama satu hari kemudian diamati pertumbuhannya dan ditentukan pengenceran yang optimal untuk pertumbuhan bakteri tersebut.

Penentuan Laju Pertumbuhan Bakteri

Isolat bakteri diencerkan hingga pengenceran yang telah ditentukan kemudian ditumbuhkan pada media nutrisi agar pada suhu kamar. Diamati pertumbuhan bakterinya setiap 1x24 jam, 2x24 jam, 3x24 jam, 4x24 jam, dan 5x24 jam. Ditentukan waktu yang sesuai untuk pertumbuhan maksimum bakteri.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Isolat bakteri dengan pengenceran yang telah ditentukan ditumbuhkan dan dimurnikan dengan metode gores. Isolat murni yang diperoleh kemudian diidentifikasi. Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan gram, pengamatan mikroskopis, dan pengujian biokimia (TSIA, SIM, uji fermentasi gula-gula, sitrat, urea, VP-MR).

Penentuan Kadar Logam Cu

Penentuan Kadar Logam Cu dalam Spons

Sampel spons yang telah kering digerus hingga menjadi serbuk. Dilanjutkan dengan proses destruksi menggunakan HNO₃ p.a. dan campuran HNO₃:H₂SO₄ (1:1), dipanaskan hingga diperoleh cairan jernih kekuningan. Selanjutnya didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah HNO₃ pekat 1,5 mL/L hingga tanda batas dan dikocok kemudian larutan disaring dengan kertas saring Whatman 42 dan larutan tersebut siap diukur kadarnya.

Penentuan Kadar Logam Cu dalam Bakteri Symbion Spons

Isolat bakteri yang telah diinkubasi pada media nutrisi agar berdasarkan waktu dan pertumbuhan maksimumnya dipanen. Didestruksi menggunakan HNO₃ p.a. dan campuran HNO₃:H₂SO₄

(1:1) hingga diperoleh cairan jernih kekuningan. Didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah HNO₃ pekat 1,5 mL/L hingga tanda batas. Dilakukan pula hal yang sama terhadap isolat bakteri pada medium *nutrient broth*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyegaran dan Peremajaan Bakteri

Spons yang digunakan pada penelitian ini adalah spons *Callyspongia sp* (lampiran 1). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Farid Samawi dkk. pada tahun 2010 menunjukkan bahwa spons jenis *Callyspongia sp* dapat mengakumulasi logam Cu di perairan. Spons merupakan Hewan *filter feeder* sehingga memungkinkan banyaknya mikroorganisme yang bersarang di dalamnya.

Mikroorganisme simbiosis berada pada ekstra maupun intra selular (Lee dkk, 2001) dan diduga bahwa simbiosis tersebut berperan dalam akumulasi logam berat. Berdasarkan dugaan tersebut, maka bakteri ekstraselular dan intraselular perlu diekstrak kemudian disegarkan dan diremajakan pada media *nutrient broth*.

Penentuan Pengenceran

Pengamatan pertumbuhan bakteri simbiosis spons *Callyspongia sp* dilakukan dengan cara menumbuhkan pada media nutrisi agar dengan beberapa variasi pengenceran.

Menurut Herdiyantoro (2009), pengenceran yang biasa dilakukan adalah 10⁻¹-10⁻⁷ dan dipilih tiga pengenceran terakhir. Pada penelitian ini, dilakukan pengenceran hingga 10⁻¹⁰, dipilih lima pengenceran terakhir dan ditumbuhkan pada media nutrisi agar kemudian diamati setelah 1 x 24 jam. Pengenceran yang sesuai ditentukan berdasarkan perhitungan jumlah koloni bakteri dan mengikuti syarat perhitungan koloni (SPC).

Tabel 1. Jumlah Hitungan Bakteri Ekstraseluler Spons *Callyspongia sp*

Pengenceran (x)	Jumlah hitungan (koloni)
10^{-5}	577
10^{-6}	445
10^{-7}	274
10^{-8}	104
10^{-9}	27
10^{-10}	10

Berdasarkan data pada Tabel 1 dan syarat perhitungan koloni, diperoleh bahwa pengenceran yang sesuai untuk bakteri ekstraseluler spons *Callyspongia sp* adalah pengenceran $10^{-7}(x)$.

Tabel 2. Jumlah Hitungan Bakteri Intraseluler Spons *Callyspongia sp*.

Pengenceran (x)	Jumlah hitungan (koloni)
10^{-5}	601
10^{-6}	556
10^{-7}	425
10^{-8}	312
10^{-9}	114
10^{-10}	27

Dengan cara perhitungan koloni yang sama, diperoleh pengenceran yang sesuai untuk bakteri Intraseluler *Callyspongia sp* berdasarkan data pada Tabel 2 yaitu pengenceran $10^{-9}x$. Kedua pengenceran yang telah ditentukan digunakan untuk proses selanjutnya.

Penentuan Laju Pertumbuhan Bakteri

Penentuan waktu inkubasi dilakukan terhadap isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media nutrisi agar sesuai dengan tingkat pengenceran yang telah ditentukan. Kedua pengenceran bakteri tersebut ditumbuhkan pada media nutrisi agar dan diamati pertumbuhan bakteri pada 1 x 24 jam,

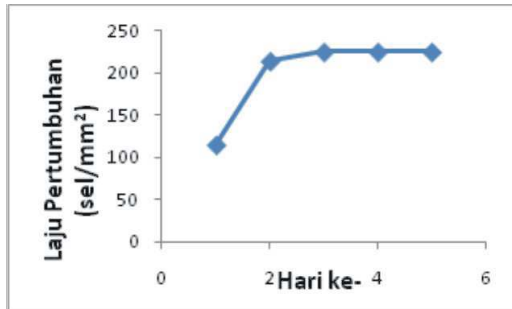
2 x 24 jam, 3 x 24 jam, 4 x 24 jam, dan 5 x 24 jam. Waktu inkubasi yang sesuai untuk bakteri didasarkan pada pertumbuhan maksimum bakteri simbiosis yang ditinjau dari peningkatan angka pertumbuhan bakteri.

Tabel 3. Pertumbuhan Maksimum Bakteri Ekstraseluler Spons *Callyspongia sp*.

Inkubasi Hari Ke-	Angka Pertumbuhan (koloni)
1	124
2	+ 100
3	+ 10
4	Tidak mengalami penambahan
5	Tidak mengalami penambahan

Gambar 1. Grafik Pertumbuhan Maksimum Bakteri Ekstraseluler Spons *Callyspongia sp*.Tabel 4. Pertumbuhan Maksimum Bakteri Intraseluler Spons *Callyspongia sp*.

Inkubasi Hari Ke-	Angka Pertumbuhan (koloni)
1	115
2	+ 99
3	+ 11
4	Tidak mengalami penambahan
5	Tidak mengalami penambahan



Gambar 2. Grafik Pertumbuhan Maksimum Bakteri Intraselular Spons *Callyspongia sp.*

Berdasarkan data pada Tabel 3 dan Tabel 4, baik bakteri ekstraselular maupun bakteri intraselular mengalami pertumbuhan maksimum pada waktu inkubasi dua hari.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Simbion Spons *Callyspongia sp.*

Tahap identifikasi bakteri simbion spons diawali dengan isolasi dan

pemurnian isolat bakteri. Bakteri diisolasi pada media nutrisi agar dan dimurnikan dengan metode gores. Identifikasi bakteri simbion terdiri dari pewarnaan gram, pemeriksaan mikroskopik, dan uji biokimia.

Tahap pewarnaan Gram terdiri dari proses fiksasi dan penambahan beberapa jenis zat pewarna. Pewarnaan gram dilanjutkan dengan uji mikroskopik dan diperoleh bahwa bakteri simbion spons *Callyspongia sp.* adalah gram positif berbentuk batang.

Uji biokimia yang dilakukan terdiri dari uji gula-gula (sukrosa, maltosa, laktosa, glukosa), TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), SIM (*Sulfid Indol Motility*), sitrat, urea, dan VP-MR (*Voger Proskaur-Methyl Red*).

Tabel 5. Hasil Pengamatan Uji Biokimia Bakteri Simbion Spons

Pengujian		Hasil	
		Ekstraselular	Intraselular
S I M	Indol	-	-
	Motil	+	+
	H ₂ S	-	-
T S I A	Slant	acid	Acid
	B	acid	Acid
	H ₂ S	-	-
	Gas	-	-
Katalase		+	+
MR		+	+
VP		-	-
Sitrat		-	-
Urea		-	+
Uji gula	Glukosa	+	+
	Sukrosa	+	+
	Maltosa	+	+
	Laktosa	+	+

Berdasarkan semua hasil pengujian yang telah dilakukan dan setelah dibandingkan dengan tabel identifikasi bakteri, diketahui bahwa bakteri simbion pada spons *Callyspongia sp.* yang ditumbuhkan adalah *Bacillus sp.*

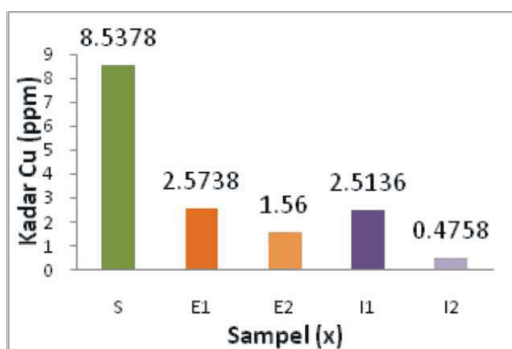
Bacillus sp. semula dikenal sebagai bakteri asal daratan namun Rosenfeld dan Zobell dalam Effendi (1998) menemukan bahwa *Bacillus sp.* ternyata merupakan penghuni laut sejati yang dapat menghasilkan antibiotik. *Bacillus*

sp. digolongkan ke dalam kelas bakteri heterotrofik, yaitu protista bersifat uniseluler, termasuk dalam golongan mikroorganisme redusen atau yang lazim disebut sebagai dekomposer. Sebagian besar bakteri laut termasuk dalam kelompok bakteri bersifat heterotrofik dan saprofitik (Rheinheimer, 1980).

4.5 Penentuan Kadar Logam Cu

Logam berat sesuai sifatnya merupakan polutan. Polusi logam berat berpengaruh terhadap pertumbuhan, morfologi, dan metabolisme mikroorganisme, melalui gangguan fungsi, perubahan protein atau penghancuran membran sel karena menurut Ghorbani pada tahun 2002, mikroorganisme adalah makhluk hidup yang lebih sensitif/stress terhadap logam-logam berat dibandingkan binatang dan tanaman. Selain itu, menurut Spain (2003), Logam berat yang ditambahkan pada suatu ekosistem dalam jumlah dan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan mikroorganisme (bakteri) tertekan atau stres.

Kadar logam berat Cu dianalisis menggunakan AAS. Berdasarkan hasil pengukuran menggunakan AAS diperoleh kadar logam Cu pada spons dan simbiannya yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Histogram Kadar Logam Cu menggunakan AAS (keterangan : S (spons); E1 (ekstaselular awal); E2 (ekstraselular akhir); I1 (Ekstraselular awal); I2 (ekstraselular akhir)).

Hasil pengukuran dan perhitungan kadar logam Cu menunjukkan bahwa logam Cu lebih banyak terakumulasi dan terdistribusi pada sampel spons *Callyspongia sp* dibanding pada bakteri simbiannya. Hal tersebut dipengaruhi oleh pola makan spons. Menurut Shumate dan Stranberg dalam Primaharinastiti dkk. (2004), pada ekstraseluler, akumulasi logam dapat disebabkan oleh adanya pembentukan polimer ekstraseluler membentuk kompleks dengan logam. Mekanisme ini terjadi bila logam mengendap dan secara fisik terjebak oleh matriks polimer yang diinduksi oleh kondisi lingkungan. Akumulasi pada permukaan sel merupakan hasil reaksi kompleks antara ion logam dan konstituen dinding sel. Proses akumulasi logam sangat bergantung pada jenis spesies dan kondisi lingkungan. Sedangkan proses akumulasi intrasel memerlukan sistem transport aktif yang sangat spesifik untuk masuknya logam ion pada suatu sel. Dari hasil pengukuran juga diketahui bahwa kadar logam Cu pada isolat akhir lebih kecil dibanding isolat awal. Pengurangan kadar logam dari isolat awal terjadi karena kadar logam isolat akhir yang terukur merupakan kadar logam pada bakteri dengan pertumbuhan maksimum. Pertumbuhan maksimum bakteri diperoleh melalui pengenceran pada isolat awal. Selain itu, pengurangan kadar logam Cu kemungkinan juga disebabkan karena Cu digunakan oleh bakteri dalam proses metabolisme selama pertumbuhannya.

Berdasarkan data yang diperoleh, diketahui simbiosis spons *Callyspongia sp* mengandung logam Cu yang artinya bahwa simbiosis tersebut dapat menyerap logam Cu dan mengakumulasinya dalam tubuh sehingga kemungkinan dapat digunakan sebagai bioakumulator ataupun bioindikator.

KESIMPULAN

Bakteri simbion spons *Callyspongia sp* dapat diisolasi pada media *nutrient broth* dan media nutrisi agar. Bakteri simbion spons *Callyspongia sp* digolongkan dalam bakteri *Bacillus sp* gram positif. Kadar logam berat Cu untuk spons *Callyspongia sp* sebesar 8,9112 ppm, kadar logam berat Cu untuk isolat awal bakteri ekstraseluler sebesar 2,0336 ppm, kadar logam berat Cu untuk isolat akhir bakteri ekstraseluler sebesar 1,4009 ppm, kadar logam berat Cu untuk isolat awal bakteri intraseluler sebesar 1,7813 ppm, dan kadar logam berat Cu untuk isolat akhir bakteri intraseluler yaitu sebesar 0,4786 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Effendi, I., 1998. *Strategi Pembangunan Perikanan dan Kelautan Nasional dalam meningkatkan Devisa Negara*, Universitas Riau Press, Riau.
2. Ghorbani, N. R., Salehrastin, N., and Moeni, A., 2002. *Heavy metals affect the microbial populations and their activities*. Symposium No. 54. 17th WCSS 14-21 August, Thailand. **2234**, 1-11.
3. Murniasih, T., dan Rasyid, A., 2010, Potensi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Barrang Lompo (Makassar) Sebagai Sumber Bahan Antibakteri, *Oceanologi dan Limnologi di Indonesia*, **36**(3): 281-292
4. Hatmanti, A., 2000, Pengenalan *Bacillus sp*, *J. Oseana*, **25**(1), 31-41.
5. Herdiyantoro, 2009, *Metode Mempelajari Pertumbuhan Mikroorganisme*, (online), (<http://herdiyantoro.files.wordpress.com/2009/mikrum-metode-mempelajari-pertumbuhan-mikroba-dyan-herdiyantoro.pdf> diakses pada 13 Februari 2012).
6. Lee, Y., K., Lee, J., H., dan Lee, H., K., 2001, Microbial symbiosis in marine sponges, *J Microbiol*, **30**, 254-264.
7. Primaharinastiti, R., Poernomo, T., A., dan Erma, N., 2004, Bioakumulasi Logam Berat Cu oleh *Bacillus sp*, *Berk. Penel. Hayati*, **10**, 19-23.
8. Rheinheimer, 1980. *Aquatic Microbiology*, A. Willey Inter Science Publication Chichester: 225.
9. Spain, A., 2003. Implication of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Review in Undergraduate Research*. **2**: 1-6.