



TUGAS AKHIR - SB091358

# *Azotobacter* SEBAGAI BIOAKUMULATOR MERKURI

KUSNUL KHOTIMAH  
1510 100 043

Dosen Pembimbing  
Dr. Enny Zulaika, M.P

Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2014



FINAL PROJECT - SB091358

# *Azotobacter* AS A MERCURY BIOACCUMULATOR

KUSNUL KHOTIMAH  
1510 100 043

Supervisor  
Dr. Enny Zulaika, M.P

Biology Department  
Faculty of Mathematics and Natural Sciences  
Sepuluh Nopember of Institute Technology  
Surabaya 2014

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, rasa syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Tugas Akhir dengan judul: ***Azotobacter* Sebagai Bioakumulator Merkuri**. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juni 2014. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar keserjanaan strata 1 (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dalam melakukan penelitian maupun penyusunan Tugas Akhir tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada ibu Dr Enny Zulaika, M.P selaku pembimbing serta tim penguji, N. Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si, Wirdhatul Muslihatin, S.Si., M.Si. Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada ayahanda dan ibunda, adik-adik serta keluarga atas doa dan kasih sayangnya. Penelitian ini juga tidak lepas dari bantuan dan dukungan teman-teman seperjuangan angkatan 2010, dan seluruh pihak yang telah membantu.

Walaupun penulis menyadari masih banyak kekurangan, namun besar harapan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 25 Juli 2014

Kusnul Khotimah

# HALAMAN PENGESAHAN

## *Azotobacter* SEBAGAI BIOAKUMULATOR MERKURI

### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada

Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

**KUSNUL KHOTIMAH**  
**NRP. 1510 100 043**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. Enny Zulaika, M.P. .... (Pembimbing)

**Surabaya, 25 Juli 2014**

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi

**Dr. rer. Nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si**  
**NIP. 19690907 199803 2 001**

## *Azotobacter* SEBAGAI BIOAKUMULATOR MERKURI

**Nama** : Kusnul Khotimah  
**NRP** : 1510 100 043  
**Jurusan** : Biologi  
**Dosen Pembimbing** : Dr. Enny Zulaika, MP.

### Abstrak

*Merkuri merupakan logam berat paling toksik dibandingkan dengan logam berat lainnya. Beberapa bakteri ada yang resisten merkuri. Salah satu genus bakteri resisten merkuri dan mampu mengakumulasi merkuri yaitu Azotobacter. Azotobacter merupakan bakteri pemfiksasi nitrogen bebas non simbiotik yang melimpah di daerah rhizosfer lahan pertanian dan merupakan bakteri penghasil EPS yang dapat berfungsi sebagai pengkhelat logam.*

*Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat Azotobacter yang resisten terhadap merkuri  $HgCl_2$ , dan mengukur kemampuan bioakumulasinya terhadap  $HgCl_2$ . Isolasi bakteri Azotobacter dilakukan dengan media selektif Azotobacter. uji resistensi  $HgCl_2$  dilakukan dengan streak agar miring dan kemampuan bioakumulasi diukur dengan metode serapan atom serta uji viabilitas menggunakan metode pour plate. Analisis beda nyata dengan ANOVA pada taraf 5% dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).*

*Tiga isolat Azotobacter dari lahan eco urban farming ITS resisten terhadap  $HgCl_2$  sampai 20 mg/L yaitu A5, A6, dan A9. Efisiensi bioakumulasi yang tertinggi pada pemaparan  $HgCl_2$  5 mg/L yaitu isolat A5 (89%) dan A9 (87%).*

*Kata kunci : Azotobacter, bioakumulator, merkuri, uji resistensi.*

## *Azotobacter* AS A MERCURY BIOACCUMULATOR

**Student Name** : Kusnul Khotimah  
**NRP** : 1510 100 043  
**Department** : Biology  
**Supervisor** : Dr. Enny Zulaika, MP.

### Abstract

Mercury is the most toxic heavy metals compared with other heavy metals. Some bacteria are resistant to mercury. One of mercury resistant bacteria genus and able to accumulate of mercury is *Azotobacter*. *Azotobacter* is free-living nitrogen fixing bacteria which abundant in rhizosphere area of agricultural land and it is EPS producing bacteria that can serve as chelating metals.

This research aims to get *Azotobacter* isolates resistant to mercury  $\text{HgCl}_2$ , and measure the ability of mercury bioaccumulation. Isolation of *Azotobacter* by selective *Azotobacter* media, resistance test by streak at slant agar, and bioaccumulation ability measured by atomic absorption method and viability test using *pour plate* method. Observed data analyzed by ANOVA, continued by Least Significant Difference (LSD) test, Both test at level 5 %.

Three *Azotobacter* isolates from eco urban farming ITS land are resistant until 20 mg/L of  $\text{HgCl}_2$  which is A5, A6 and A9. The highest efficiency bioaccumulation on exposure 5 mg/L  $\text{HgCl}_2$  is A5 (89%) and A9 (87%).

**Keywords** : *Azotobacter*, bioaccumulator, mercury, resistance test.

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan.....	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Batasan Masalah.....	2
1.5 Manfaat.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Merkuri.....	5
2.2 Bakteri Resisten Merkuri.....	6
2.3 Bioakumulasi.....	8
2.4 Genera <i>Azotobacter</i> .....	10
<b>BAB III METODOLOGI</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja.....	13
3.2.1 Isolasi <i>Azotobacter</i> .....	13
3.2.2 Uji resistensi terhadap HgCl <sub>2</sub> .....	13
3.2.3 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat <i>Azotobacter</i> .....	14
3.2.4 Uji bioakumulasi Hg.....	14
3.2.5 Uji viabilitas <i>Azotobacter</i> .....	15
3.2.6 Rancangan penelitian dan analisis data.....	16

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Isolasi <i>Azotobacter</i> .....	17
4.2 Uji Resistensi Terhadap HgCl <sub>2</sub> .....	23
4.3 Kurva Pertumbuhan Isolat <i>Azotobacter</i> .....	26
4.4 Uji Bioakumulasi Hg.....	29
4.5 Viabilitas <i>Azotobacter</i> .....	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	47



## DAFTAR TABEL

				Halaman
Tabel 4.1	Karakteristik	Morfologi	Koloni	
	<i>Azotobacter</i> .....			21
Tabel 4.2	Resistensi <i>Azotobacter</i>	Terhadap HgCl <sub>2</sub> ....		24
Tabel 4.3	Bioakumulasi	Merkuri	Isolat	
	<i>Azotobacter</i> .....			31
Tabel 4.4	Viabilitas <i>Azotobacter</i>	A1a, A5, dan A9....		34

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Gambar Skema <i>mer operon</i> Bakteri Resisten Merkuri.....	7
Gambar 2.2 Membran Sel Bakteri Gram-Negatif dan Gram-Positif.....	9
Gambar 2.3 <i>Azotobacter</i> sp.....	10
Gambar 4.1 Isolat <i>Azotobacter</i> yang Diisolasi Dari Tanah Lahan <i>Eco Urban Farming</i> ITS..	19
Gambar 4.2 Morfologi Koloni Tiap Isolat <i>Azotobacter</i> .....	20
Gambar 4.3 <i>Azotobacter</i> yang Membentuk Cysta.....	23
Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat <i>Azotobacter</i> A1a, A5, dan A9.....	28
Gambar 4.5 Grafik Efisiensi Bioakumulasi (%) Isolat <i>Azotobacter</i> .....	33

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Merkuri merupakan salah satu logam berat paling toksik dan keberadaannya di lingkungan dapat terakumulasi pada berbagai tingkat trofik rantai makanan. Pencemaran merkuri di lingkungan telah menjadi masalah dunia karena tingkat kontaminasinya di lingkungan semakin lama semakin meningkat akibat aktivitas antropogenik dan kegiatan industri yang menggunakan merkuri (Keramati *et al.*, 2011). Toksisitas merkuri tergantung dari struktur kimianya, rute masuknya dalam tubuh dan lamanya pemaparan (Inswiasri, 2008). Merkuri dalam bentuk ion ( $\text{Hg}^{2+}$ ) akan terakumulasi di ginjal dan metil merkuri ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ) akan terakumulasi di otak (Hodgson, 2004). Kasus keracunan merkuri pertama kali dilaporkan di Minamata Jepang pada tahun 1956 yang kemudian dinamakan “Minamata Disease” dengan gejala kerusakan otak, gangguan bicara, dan hilangnya keseimbangan (Hachiya, 2006).

Toksisitas logam berat merkuri dapat dikurangi oleh aktivitas bakteri. Beberapa bakteri mampu hidup pada lingkungan yang tercemar merkuri disebut bakteri resisten merkuri (BRM). Bakteri resisten merkuri biasanya memiliki gen resisten merkuri yang disebut gen *mer operon*. (Brown *et al.*, 2002). Berdasarkan penelitian Zulaika *et al* (2012), Genus *Bacillus*, *Staphylococcus*, dan *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri pada 11 mg/L  $\text{HgCl}_2$ . *Azotobacter* adalah bakteri non simbiotik yang mampu memfiksasi nitrogen, melarutkan fosfat, (Rojas *et al.*, 2011) dan banyak ditemukan di rhizosfer lahan pertanian (Mazinani *et al.*, 2012).

Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) mempunyai lahan *eco urban farming* yang ditanami sayuran organik dan pupuk yang digunakan adalah pupuk organik atau kompos ([www.digilib.its.ac.id](http://www.digilib.its.ac.id)). Salah satu bakteri yang berperan dalam meningkatkan hara nitrogen dalam kompos adalah *Azotobacter*

(Hasibuan *et al.*, 2012), sehingga pada lahan *Eco Urban Farming* ITS yang merupakan lahan pertanian ini diasumsikan terdapat *Azotobacter*. Disamping itu bakteri *Azotobacter* juga merupakan bakteri resisten merkuri dan dapat berperan sebagai bioakumulator merkuri (Zulaika, 2013). Sehingga untuk membuktikan apakah *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri, dilakukan isolasi *Azotobacter* dari lahan *Eco Urban Farming* ITS.

## 1.2 Permasalahan

*Azotobacter* merupakan bakteri penambat nitrogen yang mempunyai potensi resisten terhadap merkuri dan diasumsikan dapat mengakumulasi merkuri. Permasalahan dalam penelitian ini adalah

- a. Apakah di lahan *Eco Urban Farming* ITS dapat diisolasi bakteri *Azotobacter*
- b. Berapakah kemampuan resistensi isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari lahan *Eco Urban Farming* ITS terhadap  $\text{HgCl}_2$
- c. Berapakah kemampuan isolat *Azotobacter* yang resisten terhadap merkuri di atas, mampu mengakumulasi  $\text{HgCl}_2$

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk

- a. Mendapatkan isolat *Azotobacter* dari lahan *eco urban farming* ITS
- b. Mendapatkan isolat *Azotobacter* yang resisten terhadap merkuri  $\text{HgCl}_2$
- c. Mengukur kemampuan bioakumulasi isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS terhadap  $\text{HgCl}_2$

## 1.4 Batasan Permasalahan

- a. Isolat yang digunakan adalah isolat yang mempunyai resisten tinggi terhadap  $\text{HgCl}_2$
- b. pH yang digunakan adalah pH netral
- c. Suhu perlakuan adalah suhu ruang (suhu laboratorium)

d. Merkuri yang digunakan adalah merkuri anorganik  $\text{HgCl}_2$

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian adalah mendapatkan isolat *Azotobacter* yang unggul sebagai bioakumulator merkuri sehingga isolat tersebut dapat digunakan sebagai agensia bioremediasi pada lingkungan yang tercemar logam berat merkuri.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Merkuri**

Logam merkuri atau air raksa mempunyai nama kimia *hydragyrum* yang berarti perak cair. Logam merkuri dilambangkan dengan Hg. Merkuri merupakan salah satu unsur logam transisi dengan golongan IIB dan memiliki nomor atom (NA=80) dan massa molekul relatif (MR= 200,59). Merkuri merupakan satu-satunya logam yang berbentuk cair pada suhu kamar (25<sup>0</sup> C) dan mempunyai titik beku terendah dari semua logam yaitu -39<sup>0</sup> C, mudah bercampur dengan logam-logam lain menjadi logam campuran (amalgam/alloy). Merkuri merupakan logam yang paling mudah menguap jika dibandingkan dengan logam-logam yang lain, juga dapat digunakan sebagai konduktor arus listrik (Alfian, 2006).

Merkuri merupakan logam yang sangat toksik terhadap organisme, dalam penggunaan atau aktivitas tertentu merkuri akan disebarkan ke lingkungan baik berupa limbah bahan pertanian, obat-obatan, cat, kertas, pertambangan serta sisa buangan industri. Semua bentuk merkuri baik dalam bentuk unsur, gas, maupun dalam bentuk garam-garam merkuri adalah beracun (Alfian, 2006).

Menurut Inswiasri (2008), pada prinsipnya, merkuri dapat dibagi menjadi 3 bentuk utama yaitu

##### **1. Bentuk murni**

Merkuri metal (elemental merkuri) merupakan logam berwarna putih, pada suhu kamar berada berbentuk cair dan membentuk uap jika suhu semakin meningkat.

##### **2. Merkuri berbentuk senyawa anorganik**

Senyawa merkuri anorganik terbentuk ketika merkuri dikombinasikan dengan elemen lain seperti klorin (Cl ), sulfur atau oksigen dalam bentuk garam merkuri. Senyawa merkuri anorganik seperti HgCl<sub>2</sub> berbentuk bubuk putih atau kristal, kecuali merkuri sulfida (HgS) berwarna merah.

### 3. Merkuri berbentuk senyawa organik

Senyawa merkuri organik terjadi ketika merkuri bertemu dengan karbon membentuk organomercuri atau metilmerkuri. Senyawa merkuri organik pada hewan dan manusia diabsorpsi melalui jalur pencernaan, pernapasan, dan kulit, hampir 90 % diabsorpsi melalui jalur pencernaan. Selama di dalam tubuh, logam berat merkuri akan terikat pada struktur molekul protein, metalotionin-sistein dan hemoglobin. Keracunan merkuri dapat mengganggu fungsi ginjal dan dapat mengganggu sistem saraf pusat maupun sistem saraf tepi.

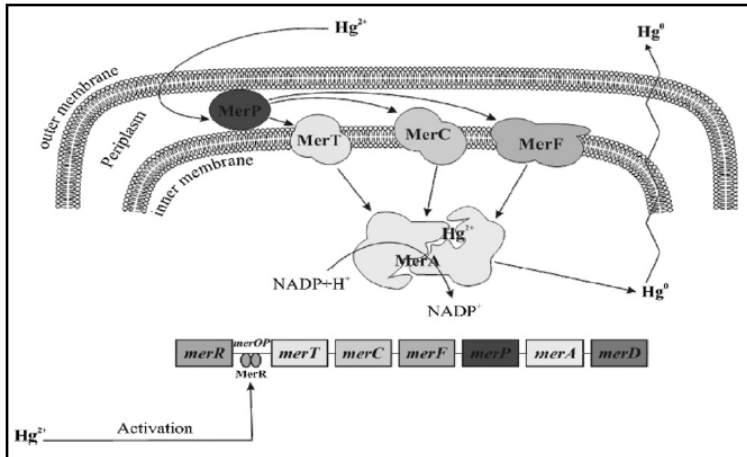
## 2.2 Bakteri Resisten Merkuri

Merkuri merupakan logam yang paling beracun, namun beberapa bakteri memiliki mekanisme resistensi terhadap merkuri dan memainkan peran utama dalam siklus merkuri di alam (Osborn *et al.*, 1997). Berbagai macam bakteri Gram-positif dan Gram-negatif memiliki mekanisme resistensi yang unik terhadap logam berat merkuri dan mengubah bentuk merkuri yang beracun menjadi bentuk yang tidak beracun. Populasi bakteri resisten merkuri berbanding lurus dengan tingkat kontaminasi merkuri yang ada di lingkungan (Dash & Das, 2012).

Bakteri resisten merkuri dapat bersifat aerob atau anaerob fakultatif dan dapat diisolasi dari berbagai media seperti air, tanah, sediman, bahkan dari manusia atau hewan. Beberapa anggota genera bakteri seperti *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Beijerinckia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Paracoccus*, *Proteus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas* dan *Yersinia* merupakan bakteri resisten merkuri (Barkay *et al.*, 2003).



Resistensi bakteri terhadap merkuri karena pada bakteri resisten merkuri memiliki gen resisten merkuri yang disebut gen *mer operon*. Umumnya struktur *mer operon* terdiri dari gen metaloregulator (*merR*), gen transport merkuri (*merT*, *merP*, *merC*, *merF*), gen merkuri reduktase (*merA*) dan organomerkuri liase (*merB*) (Nascimento & Souza, 2003). Gen *merA* mengkode merkuri reduktase yang berfungsi untuk mereduksi  $\text{Hg}^{2+}$  menjadi  $\text{Hg}^0$  volatil dan *merB* mengkode organomerkuri liase yang berfungsi untuk memutus ikatan C-Hg. Mekanisme dalam *mer operon* ini adalah  $\text{Hg}^{2+}$  masuk ke dalam periplasma terikat ke residu sistein *merP* yang kemudian ditransfer ke residu sistein *merT* atau *merC* atau *merF*. Setelah masuk ke dalam sel, ion merkuri menyeberang membran sitoplasma melalui proses pertukaran ligan menuju sisi aktif merkuri reduktase (*merA*) dimana  $\text{Hg}^{2+}$  direduksi menjadi  $\text{Hg}^0$  volatil yang selanjutnya dikeluarkan dari sel (Dash & Das, 2012). Skema *mer operon* bakteri resisten merkuri dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Skema *mer operon* Bakteri Resisten Merkuri (Dash & Das, 2012).

Bakteri resisten merkuri dibagi menjadi 2 tipe yaitu (1) bakteri resisten merkuri spektrum sempit adalah bakteri yang hanya resisten terhadap merkuri anorganik dan (2) bakteri resisten merkuri spektrum luas adalah bakteri yang resisten terhadap merkuri anorganik dan merkuri organik (Dash & Das, 2012).

### **2.3 Bioakumulasi**

Beberapa jenis bakteri diketahui memiliki kemampuan menyerap, mereduksi dan mengakumulasi logam berat. Akumulasi logam dari mediumnya merupakan perbandingan kandungan logam dalam biota terhadap kandungan logam dalam mediumnya (Haryoto & Wibowo, 2004).

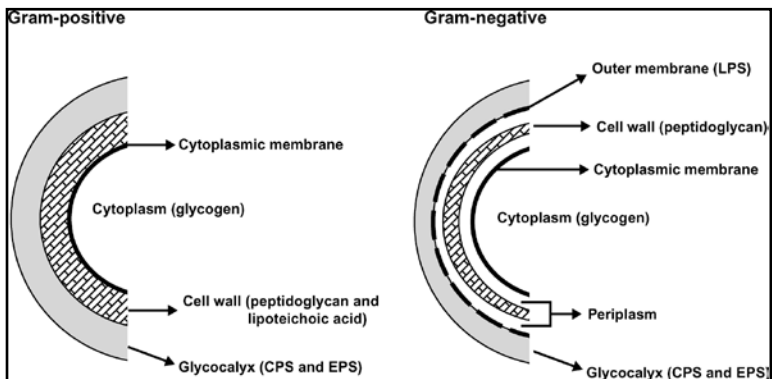
Bakteri yang mempunyai habitat tercemar logam berat dan resistensi terhadap logam berat mempunyai mekanisme biosorpsi dan atau bioakumulasi terhadap logam berat tersebut (Zulaika *et al.*, 2012). Umumnya proses biosorpsi adalah proses pasif yaitu proses pengikatan melalui pertukaran ion logam atau polutan dengan gugus fungsional pada dinding atau permukaan sel seperti gugus karboksil, sulfonat, fosforil, amino, dan imidazol (Chojnacka, 2010).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses biosorpsi meliputi jenis biomassa (komposisi dinding sel), pH, suhu, kehadiran ion pesaing lainnya (baik kation atau anion). Umumnya, kenaikan pH menyebabkan deprotonasi pada ion logam dan penurunan pH menyebabkan kompetisi antara proton dan ion logam (Chojnacka, 2010).

Menurut Chojnacka (2010), bioakumulasi didefinisikan sebagai akumulasi logam atau polutan secara intraseluler oleh biosorben yang terjadi dalam dua tahap yaitu (1) proses cepat atau biosorpsi dan (2) proses lambat atau bioakumulasi, termasuk pengangkutan logam atau polutan ke dalam sel melalui sistem transport aktif. Proses bioakumulasi lebih kompleks dibandingkan dengan biosorpsi karena proses bioakumulasi membutuhkan aktivitas metabolisme sel. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses bioakumulasi antara lain komposisi medium pertumbuhan

pH, suhu, adanya polutan lain, dan surfaktan. Disisi lain, proses bioakumulasi juga didukung oleh sintesis protein yang disebut metalotionein yang kaya akan gugus thiol. Gugus thiol akan mengikat logam atau polutan dan menjadikannya dalam bentuk tidak aktif secara biologis. Protein metalotionein disintesis sebagai respon terhadap keberadaan logam dalam lingkungan atau medium pertumbuhannya. Proses bioakumulasi akan lebih optimal jika digunakan spesies bakteri yang diisolasi dari lingkungan yang tercemar.

Menurut Primaharinastiti *et al* (2004), mekanisme akumulasi logam dapat terjadi pada komponen ekstraseluler, pada permukaan sel, dan pada intraseluler. Pada ekstraseluler, akumulasi logam dapat disebabkan oleh adanya pembentukan polimer ekstraseluler membentuk kompleks dengan logam. Akumulasi pada permukaan sel merupakan hasil reaksi kompleks antara ion logam dan konstituen dinding sel. Skema dinding sel dan membran sel bakteri dapat dilihat pada Gambar 2.2, sedangkan proses akumulasi intrasel memerlukan sistem transport aktif yang sangat spesifik untuk masuknya logam ion pada suatu sel.

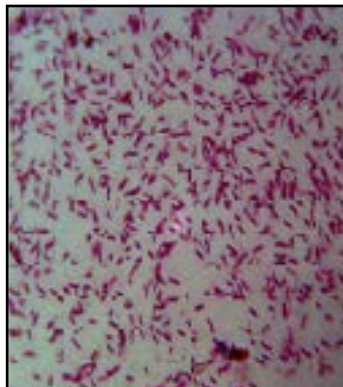


Gambar 2.2. Membran Sel Bakteri Gram-negatif dan Gram-positif (Ruas-Madiedo & Reyes-Gavilan, 2005).

## 2.4 Genus *Azotobacter*

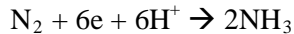
*Azotobacter* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki ciri-ciri : sel dengan diameter  $\geq 2.0 \mu\text{m}$ , pleumorfik, berbentuk batang hingga bulat, tunggal, (Gambar 2.3) berkoloni tidak beraturan, dan kadang-kadang membentuk rantai dengan panjang bervariasi, memiliki kista dengan dinding yang tebal, tidak menghasilkan endospora, motil dengan flagela peritrik atau non motil. Beberapa spesies dari genus *Azotobacter* menghasilkan pigmen sehingga dapat larut dalam air yang tampak berwarna hijau di bawah sinar ultraviolet. *Azotobacter* mampu tumbuh pada bermacam-macam media yang mengandung sumber karbon dari karbohidrat, alkohol atau asam organik. Bersifat aerob tetapi juga mampu tumbuh pada kondisi sedikit oksigen. Suhu optimum pertumbuhannya antara  $20^0\text{-}30^0 \text{ C}$ , kisaran pH untuk pertumbuhannya 5,5 - 8,5 dan pH optimum 7-7,5 (Buchanan & Gibbons, 1974).

Genus *Azotobacter* termasuk dalam subclass proteobacteria yang terdiri dari tujuh spesies antara lain : *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* dan *A. salinestri*. *Azotobacter* dapat ditemukan dalam tanah, air dan sedimen (Jimenez *et al.*, 2011).



Gambar 2.3. *Azotobacter* sp. (Jimenez *et al.*, 2011).

Anggota genus *Azotobacter* adalah bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik, mampu memfiksasi 10 mg nitrogen per gram sumber karbon yang digunakan. Fiksasi nitrogen dikatalisis oleh enzim nitrogenase yang mereduksi N<sub>2</sub> menjadi amonia (NH<sub>3</sub>) (Patel *et al.*, 2013). Kemampuan memfiksasi nitrogen bebas dikendalikan oleh gen *nif*, reaksi kimia reduksi N<sub>2</sub> menjadi amonia (NH<sub>3</sub>) adalah :



(Ristiati & Muliadihardja, 2008).

Anggota genus *Azotobacter* banyak digunakan sebagai pupuk hayati dalam bidang agrikultur (Rajeswari & Kasthuri, 2009) karena memiliki kemampuan mensintesis antibiotik, hormon pertumbuhan tanaman, vitamin, dan dapat melarutkan fosfat (Jimenez *et al.*, 2011). Beberapa anggota *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri sehingga mampu mereduksi merkuri dari lingkungan hidupnya (Ray *et al.*, 1989). *Azotobacter* sp. dikenal sebagai penghasil polisakarida ekstraseluler (EPS) seperti alginat dan polimer. Polisakarida ekstraseluler ini berfungsi untuk melindungi sel dan metabolisme nitrogenase sehingga meningkatkan fiksasi nitrogen dan untuk mengabsorpsi logam (Widiastuti, 2010). Menurut Penelitian Ghosh *et al* (1999), *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri spektrum luas yang selain mampu memvolatilisasi merkuri juga resisten terhadap merkuri organik.

Semua anggota dari genus *Azotobacter* memiliki ciri koloni yang berair (slimy), berkilau (glistening), berwarna keputi-putihan, memiliki elevasi convex, dan diameter koloni berkisar 2-10 mm (Aquilanti *et al.*, 2004). Menurut Gomare *et al* (2013), koloni *Azotobacter* memiliki karakteristik berukuran besar, flat, berwarna putih susu, seperti berlendir dan berair.

Berdasarkan penelitian Ray *et al.* (1989), *Azotobacter* yang telah diisolasi dari tanah pertanian, mampu resisten sampai dengan konsentrasi 100 nmol HgCl<sub>2</sub> dan mampu mereduksi 2,6 mg HgCl<sub>2</sub> dalam 200 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung HgCl<sub>2</sub> 3,3 mg. Selain itu, berdasarkan penelitian

Ghosh *et al.* (1997), *Azotobacter* yang telah diisolasi dari tanah perkebunan Bengal dan Bihar Timur, India, mampu memvolatilisasi  $\text{HgCl}_2$  hingga 80 % dari 200 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung 3,3 mg  $\text{HgCl}_2$ .

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Januari – Juni 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS. Analisis bioakumulasi logam merkuri dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya.

### **3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja**

#### **3.2.1 Isolasi *Azotobacter***

Sampel tanah diambil dari lahan *eco urban farming* ITS secara komposit, ditimbang 10 gram sampel tanah, dimasukkan ke dalam 90 ml akuades steril. Dilakukan pengenceran  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-7}$  (Saraswati *et al.*, 2007). Masing-masing pengenceran, diambil sebanyak 0,1 ml (Saraswati *et al.*, 2007), ditumbuhkan pada media selektif *Azotobacter* agar yang mengandung 0,1 mg/L  $HgCl_2$  dengan metode *spread plate*. (Harley & Prescott, 2002). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati karakteristiknya dan dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Azotobacter chroococcum*. Koloni *Azotobacter chroococcum* mempunyai ciri putih basah dan berubah menjadi coklat setelah 3-5 hari inkubasi (Saraswati *et al.*, 2007).

Koloni yang diduga *Azotobacter chroococcum* dimurnikan dengan metode 16 goresan pada media *Nutrient Agar*. Selanjutnya dilakukan pengamatan kemurnian sel dengan metode pewarnaan methylen blue dan untuk memastikan bahwa isolat tersebut *Azotobacter*, dilakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan kista.

#### **3.2.2 Uji resistensi terhadap $HgCl_2$**

Uji resistensi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Azotobacter* yang didapat dari hasil isolasi pada media selektif *Azotobacter* slant agar (Zulaika *et al.*, 2013), yang mengandung  $HgCl_2$  berbagai konsentrasi mulai dari konsentrasi 0.5 mg/L dan

seterusnya sampai konsentrasi yang mampu ditoleransi isolat *Azotobacter*. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang, koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap HgCl<sub>2</sub>. Isolat yang digunakan adalah isolat yang mempunyai resisten tinggi terhadap HgCl<sub>2</sub>.

### 3.2.3 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter*

Satu ose isolat *Azotobacter* berumur 24 jam dari media padat NA-HgCl<sub>2</sub> 0,1 mg/L diinokulasikan ke dalam 40 ml media cair ½ *Nutrient Broth* (NB) dalam Erlenmeyer kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang di atas *Rotary Shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Setelah 24 jam, sebanyak 40 ml kultur sel diinokulasikan ke dalam 160 ml media ½ NB-HgCl<sub>2</sub> 0,1 mg/L (Harley & Prescott, 2002), diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang di atas *Rotary Shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Setiap jam diambil sebanyak 2 mL kultur dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur nilai *Optical Density* (OD) nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 600 nm (Harley & Prescott, 2002). Pengukuran *Optical Density* (OD) dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24. Data *Optical Density* (OD) yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai hasil *Optical Density* (OD). Berdasarkan kurva pertumbuhan, umur kultur untuk perlakuan ( $\mu$ ) yang digunakan adalah pada rata-rata waktu fase eksponensial.

### 3.2.4 Uji bioakumulasi Hg

Konsentrasi HgCl<sub>2</sub> yang digunakan adalah konsentrasi yang mampu ditoleransi *Azotobacter* (sesuai sub bab 3.2.2.). misal K1, K2, dan K3. Kultur starter dibuat dengan cara 1 ose stok kultur *Azotobacter* diinokulasikan ke dalam 10 ml media cair ½ NB dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang. Selanjutnya 5 ml kultur *Azotobacter* uji diinokulasikan dalam 45 ml media cair ½ NB. Setelah diinkubasi selama  $\mu$  jam, dipapar HgCl<sub>2</sub> sesuai konsentrasi perlakuan, dan dilakukan penghitungan kepadatan sel menggunakan Haemocytometer (jumlah sel/ml). Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang di atas *Rotary Shaker*



dengan kecepatan 100 rpm. Pengukuran bioakumulasi  $\text{Hg}^{2+}$  dilakukan pada 24 jam inkubasi setelah terpapar  $\text{HgCl}_2$ .

Kultur perlakuan setelah 24 jam disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 60 menit untuk memisahkan filtrat dan pelet sel *Azotobacter*. Pada filtrat ditambahkan 2 tetes  $\text{HNO}_3$ , dipanaskan  $< 85^\circ \text{C}$  30 menit. Pengukuran konsentrasi  $\text{Hg}^{2+}$  di filtrat dilakukan dengan menggunakan AAS (*Atomic Absorbtion Spectrophotometry*). Konsentrasi  $\text{Hg}^{2+}$  pada filtrat medium merupakan konsentrasi logam  $\text{Hg}^{2+}$  sisa ( $K_s$ ) yang tidak diakumulasi dan tidak divolatilisasi oleh *Azotobacter*. Konsentrasi yang mampu diakumulasi oleh *Azotobacter* adalah

$$R = K_0 - K_s$$

$R$  = Konsentrasi  $\text{Hg}^{2+}$  yang diakumulasi oleh *Azotobacter*

$K_0$  = Konsentrasi awal  $\text{Hg}^{2+}$  dalam media kontrol tanpa inokulum *Azotobacter*

$K_s$  = Konsentrasi akhir  $\text{Hg}^{2+}$  sisa pada filtrat media

Efisiensi bioakumulasi  $\text{Hg}^{2+}$  oleh *Azotobacter* adalah

$$E = \frac{K_0 - K_s}{K_0} \times 100 \%$$

$E$  = Efisiensi bioakumulasi merkuri  $\text{Hg}^{2+}$  oleh *Azotobacter*

$K_0$  = Konsentrasi awal  $\text{Hg}^{2+}$  dalam media kontrol tanpa inokulum *Azotobacter*

$K_s$  = Konsentrasi akhir  $\text{Hg}^{2+}$  pada filtrat media

### 3.2.5 Viabilitas *Azotobacter*

Kultur perlakuan yang telah terpapar  $\text{HgCl}_2$  sesuai konsentrasi perlakuan, diambil sebanyak 1 ml, dilakukan pengenceran hingga  $10^{-7}$ , diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan menggunakan metode *pour plate*. Koloni yang tumbuh diamati. Pengamatan dilakukan pada pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ .

### **3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perbedaan perlakuan diuji dengan *Analysis of Varians* (ANOVA) dengan taraf kepercayaan ( $p = 5\%$ ), uji beda nyata dilakukan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi *Azotobacter*

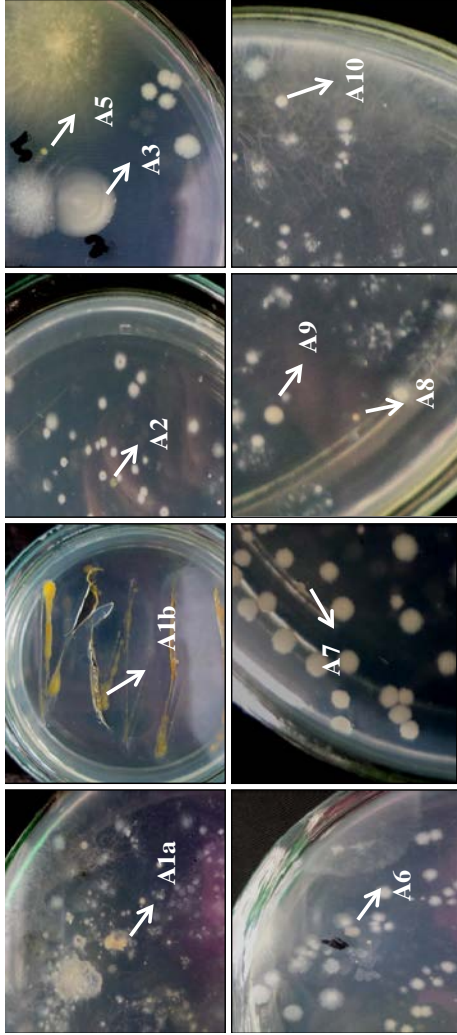
Isolasi *Azotobacter* dilakukan pada tanah pertanian yang berasal dari lahan *eco urban farming* ITS. *Azotobacter* merupakan bakteri penambat nitrogen non simbiotik (Rojas *et al.*, 2011) yang banyak ditemukan di tanah terutama di rhizosfer lahan pertanian (Mazinani *et al.*, 2012), selain itu *Azotobacter* juga merupakan bakteri resisten merkuri (BRM) dan dapat berperan sebagai biakumulator merkuri (Zulaika, 2013). Berdasarkan hasil analisis merkuri pada sampel tanah dan sampel air, lahan *eco urban farming* ITS sudah tercemar merkuri sebesar 0,002 mg/L pada sampel air dan 0,004 mg/L pada sampel tanah. Konsentrasi ini telah melebihi ambang batas yang telah ditetapkan oleh pemerintah sesuai dengan PP. No.82/2001 yaitu 0,001 mg/L. Isolat *Azotobacter* resisten merkuri yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS diharapkan dapat digunakan sebagai agen bioremediasi di lahan pertanian yang tercemar merkuri.

Sampel yang mengandung inokulum ditumbuhkan pada media selektif *Azotobacter* Mannitol Agar yang mengandung 0,1 mg/L HgCl<sub>2</sub> dengan menggunakan metode spread plate. Pada media ditambahkan HgCl<sub>2</sub> dengan tujuan untuk memperoleh isolat yang mampu resisten terhadap merkuri. Metode spread plate digunakan untuk memudahkan pengambilan koloni saat isolasi dan purifikasi. Menurut Cain *et al* (2013), media selektif merupakan media yang didesain untuk menghambat pertumbuhan satu kelompok bakteri atau lebih tanpa menghambat pertumbuhan bakteri yang diinginkan. Media *Azotobacter* mannitol agar merupakan media bebas nitrogen dengan mannitol sebagai sumber karbon. *Azotobacter* mampu menggunakan berbagai macam gula, alkohol, atau garam dari asam organik sebagai sumber karbon (Holt *et al*, 1994). Dengan media selektif *Azotobacter*, hanya bakteri *Azotobacter* pemfiksasi nitrogen saja

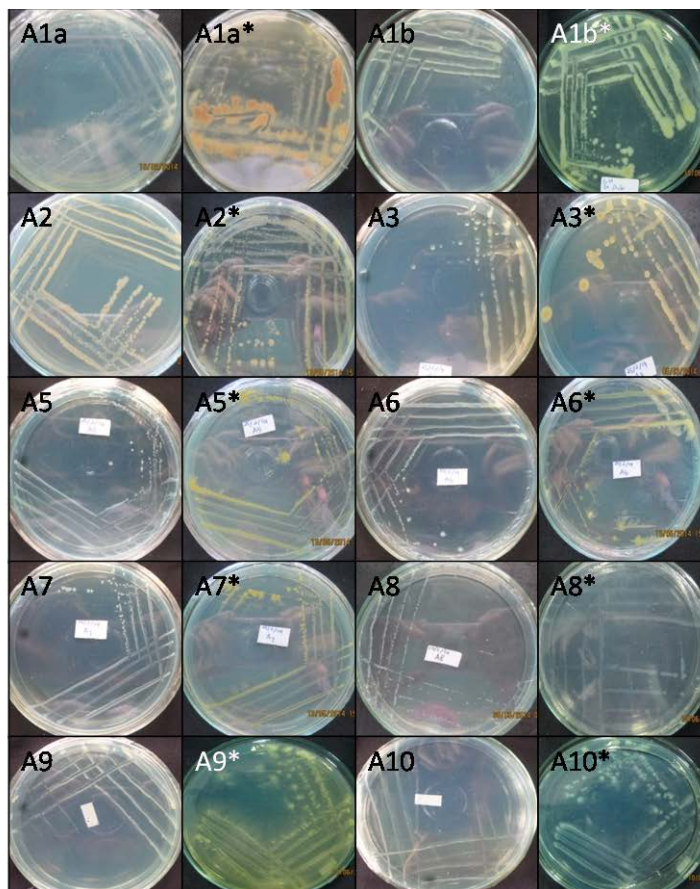
yang mampu tumbuh pada media tersebut. Media ini sangat sesuai digunakan untuk isolasi, kultivasi dan identifikasi *Azotobacter* dari tanah (*Azotobacter* Agar Mannitol<sup>®</sup> Himedia'2011). Berdasarkan penelitian Aquilanti *et al.* (2004), media mannitol bebas nitrogen merupakan media yang cocok digunakan untuk memastikan *Azotobacter chroococcum* yaitu ditunjukkan dengan adanya perubahan warna koloni secara bertahap menjadi coklat.

Pada penelitian ini, media selektif *Azotobacter* Mannitol Agar yang digunakan untuk isolasi mengalami modifikasi dengan penambahan natrium molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dan BTB. BTB dalam media digunakan sebagai indikator pH yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media (Saraswati *et al.*, 2007), sedangkan molibdenum ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) merupakan unsur yang sangat dibutuhkan bagi bakteri penambat nitrogen karena molibdenum merupakan salah satu komponen dalam enzim nitrogenase yang berfungsi dalam proses fiksasi nitrogen (Ristiati *et al.*, 2008).

Koloni yang dipurifikasi dari hasil isolasi sampel tanah lahan *eco urban farming* ITS berwarna krem hingga coklat setelah 3-5 hari inkubasi, koloni tersebut diasumsikan merupakan bakteri *Azotobacter chroococcum* (Saraswati *et al.*, 2007). Hasil isolasi *Azotobacter* menghasilkan 10 isolat (Gambar 4.1) yaitu A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Isolat yang telah dipurifikasi (Gambar 4.2) kemudian dilanjutkan dengan pengamatan karakteristik morfologi koloni (Tabel 4.1).



Gambar 4.1. Isolat *Azotobacter* yang Diisolasi Dari Tanah Lahan *Eco Urban Farming* ITS.



Gambar 4.2. Morfologi Koloni Tiap Isolat *Azotobacter*.  
Keterangan gambar : (tanpa tanda \* : koloni berumur muda (24 jam); tanda \* : koloni berumur tua (> 1 bulan).

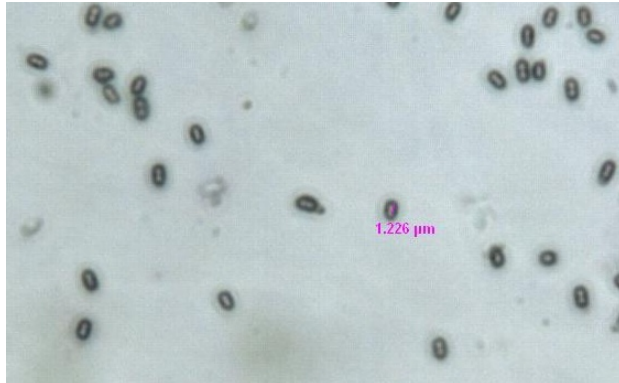
Tabel 4.1. Karakteristik Morfologi Koloni *Azotobacter*

Isolat	Pengamatan								
	Bentuk koloni	Elevasi	Tepi	Warna koloni muda	Warna koloni tua (> 1 bln)	Ukuran koloni	Bentuk sel	Gram	cysta
A1a	Irregular	Flat	Undulate	Krem Slimy (berair)	Coklat	1 cm	Basil pendek	(-)	+
A1b	Circular	Convex	Entire	Krem bening Slimy (berair)	Krem kecoklatan	2 mm	Basil pendek	(-)	+
A2	Circular	Convex	Entire	Krem kecoklatan	Coklat muda	2 mm	Coccus	(-)	+
A3	Circular	Pulvinate	Entire	Krem bening Slimy (berair)	Kuning; pusat koloni: orange	3 mm	Basil pendek	(-)	+
A5	Circular	Convex	Undulate	Putih susu	Kuning kecoklatan	3 mm	Basil pendek	(-)	+
A6	Circular	Convex	Erose	Putih susu	Krem kecoklatan	3 mm	Basil pendek	(-)	+
A7	Circular	Convex	Erose	Putih susu	Krem	2 mm	Basil pendek	(-)	+
A8	Circular	Flat	Entire	Tranparan	Tranparan	2 mm	Basil pendek	(-)	+
A9	Irregular	Flat	Undulate	Putih susu	Krem kekuningan	3 mm	Basil pendek	(-)	+
A10	Irregular	Raised	Erose	Putih susu	Krem	5 mm	Basil pendek	(-)	+

Pada tabel 4.1, semua isolat merupakan bakteri Gram (-), memiliki kista (+), dengan bentuk sel basil pendek kecuali isolat A2 yang memiliki bentuk sel coccus. Menurut Holt *et al* (1994), *Azotobacter* memiliki ciri-ciri selnya berbentuk batang dengan ujung membulat, batang pendek hingga bulat, umumnya diameter selnya berukuran  $\geq 2 \mu\text{m}$  dengan panjang  $4 \mu\text{m}$ . Gram (-), bersifat pleomorfik, selnya dapat individu, berpasangan, atau mengelompok dengan bentuk tidak beraturan dan kadang-kadang membentuk rantai dengan panjang yang bervariasi. *Azotobacter* tidak membentuk endospora tetapi membentuk cysta. *Azotobacter* bersifat motil karena memiliki flagela peritrik atau non motil. *Azotobacter* bersifat aerob tetapi masih dapat hidup dengan tekanan oksigen rendah (Holt *et al.*, 1994). Menurut Gomare *et al.* (2013), *Azotobacter* dapat ditemukan pada tanah netral hingga basa, Gram (-), motil, pleomorfi, aerob, selnya berbentuk batang hingga bulat, memproduksi slime eksopolisakarida (EPS) dalam jumlah besar, memiliki cysta, memiliki tingkat respirasi yang sangat tinggi, bersifat mesofilik dengan temperatur optimum yaitu  $30^{\circ}\text{C}$ . Menurut Sandeep *et al.* (2011), *Azotobacter chroococcum* mampu memproduksi pigmen berwarna coklat hingga kehitaman dan mampu menggunakan mannitol, glukosa, dan sukrosa sebagai sumber karbon.

Pewarnaan cysta dilakukan untuk memastikan bahwa isolat yang didapatkan adalah *Azotobacter*. Pembentukan cysta diinduksi dengan cara menumbuhkan isolat *Azotobacter* pada media Burk's dengan butanol sebagai sumber karbon selama 7 hari (Stella & Suhaimi, 2010). Proses pembentukan cysta terjadi pada fase stasioner akhir setelah ditumbuhkan pada media yang mengandung butanol sebagai sumber karbon (Barleman & Bauer, 2004). Sel bakteri yang membentuk cysta dapat diwarnai dengan pewarna Giemsa. Hasil pewarnaan menunjukkan cysta mempunyai ukuran lebih kecil atau lebih pendek dan dinding cysta tampak menebal. Keberadaan cysta merupakan karakter kunci pada genus *Azotobacter* (Gambar 4.3).





Gambar 4.3. *Azotobacter* yang Membentuk Cysta  
(Dokumentasi pribadi, 2014).

Menurut Madigan *et al.* (2012), *Azotobacter* dapat membentuk struktur istirahat (*resting cell*) yang disebut cysta dimana sel dikelilingi oleh dinding sel yang tebal dan cysta resisten terhadap desikasi serta UV tetapi tidak resisten terhadap panas atau suhu tinggi.

#### 4.2 Uji Resistensi Terhadap $\text{HgCl}_2$

Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui tingkat resistensi isolat *Azotobacter* dan untuk mengetahui *range finding test* perlakuan selanjutnya yaitu uji bioakumulasi  $\text{Hg}^{2+}$ . Uji resistensinya terhadap  $\text{HgCl}_2$  dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat *Azotobacter* pada media selektif *Azotobacter* slant agar yang mengandung  $\text{HgCl}_2$  dari konsentrasi 0,5 mg/L hingga konsentrasi yang mampu ditoleransi oleh isolat *Azotobacter*.

Resistensi isolat *Azotobacter* terhadap  $\text{HgCl}_2$  bervariasi dan hanya 3 isolat yang masih mampu tumbuh pada konsentrasi 20 mg/L  $\text{HgCl}_2$  yaitu isolat A5, A6 dan A9 (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Resistensi *Azotobacter* Terhadap  $HgCl_2$ 

Isolat	Pertumbuhan isolat <i>Azotobacter</i> pada media yang mengandung $HgCl_2$ (mg/L)				
	0,5	5	10	15	20
<b>A1a</b>	+++	++	++	-	-
<b>A1b</b>	+++	+++	-	-	-
<b>A2</b>	+++	+++	-	-	-
<b>A3</b>	+++	+++	-	-	-
<b>A5</b>	+++	+++	+++	+++	++
<b>A6</b>	+++	+++	+++	+++	++
<b>A7</b>	+++	+++	+++	+++	-
<b>A8</b>	+++	+++	-	-	-
<b>A9</b>	+++	+++	+++	+	+
<b>A10</b>	+++	+++	+++	++	-

Ket : +++ (baik), ++ (cukup baik), + (kurang baik).

Menurut Ray *et al.* (1989), beberapa spesies dari genus *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri yang mampu mereduksi merkuri dari lingkungan hidupnya. Berdasarkan penelitian Zulaika *et al.* (2012), genus *Azotobacter* S8 yang diisolasi dari Kalimas Surabaya resisten terhadap merkuri  $HgCl_2$  sampai dengan 11 mg/L dan merupakan salah satu genus bakteri resisten merkuri. Berdasarkan hasil pengukuran sampel tanah, konsentrasi kandungan Hg adalah 0,004 mg/L dan sampel air adalah 0,002 mg/L. Isolat *Azotobacter* yang diisolasi menunjukkan sifat resistensi yang lebih tinggi dari konsentrasi merkuri di habitatnya. Menurut Manampiring dan Keppel (2011), suatu bakteri dikatakan resisten merkuri apabila bakteri tersebut dapat bertahan pada konsentrasi merkuri 0,01 ppm.

Berdasarkan pada tabel 4.2, semua isolat *Azotobacter* mampu tumbuh dengan baik pada konsentrasi 0,5 dan 5 mg/L  $HgCl_2$  kecuali isolat A1a yang mampu tumbuh cukup baik pada konsentrasi 5 mg/L  $HgCl_2$ . Pada konsentrasi 10 mg/L  $HgCl_2$ , hanya isolat A5, A6, A7, A9, dan A10 yang mampu tumbuh dengan baik. Pada konsentrasi 15 mg/L  $HgCl_2$  terdapat 3 isolat (A5, A6, A7) mampu tumbuh baik, dan pada konsentrasi 20

mg/L  $\text{HgCl}_2$  hanya 2 isolat yang mampu tumbuh cukup baik yaitu A5, dan A6.

Pada bakteri dan juga Archaea, resistensi terhadap merkuri didasarkan pada kemampuannya mereduksi  $\text{Hg}^{2+}$  menjadi bentuk volatil  $\text{Hg}^0$  yang dikatalisis oleh enzim merkuri reduktase (*mer A*) yang merupakan gen *mer operon*. Gen *mer operon* banyak ditemukan di plasmid (Ramond, 2009). Menurut Das & Dash (2012), resistensi bakteri terhadap merkuri karena bakteri memiliki gen resisten merkuri yang disebut gen *mer operon*. Gen *mer operon* pada bakteri selain ditemukan di plasmid, juga terdapat di kromosom atau transposon (Barkay *et al.*, 2003). Gen resisten merkuri (*mer operon*) mempunyai 2 tipe yaitu *mer operon* spektrum sempit yang hanya resisten terhadap merkuri anorganik dan *mer operon* spektrum luas yang mampu resisten terhadap merkuri anorganik dan merkuri organik (Bogdanova, 2001). Menurut Ray *et al.* (1989), *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri sehingga mampu mereduksi merkuri  $\text{Hg}^{2+}$  menjadi  $\text{Hg}^0$  dari lingkungan hidupnya. Berdasarkan penelitian Ghosh *et al* (1997), *Azotobacter* juga merupakan bakteri resisten merkuri spektrum luas yang mampu mengubah merkuri organik menjadi merkuri anorganik menggunakan enzim organomercuri liase dan mereduksi ion  $\text{Hg}^{2+}$  dari merkuri anorganik menjadi  $\text{Hg}^0$  volatil menggunakan enzim merkuri reduktase.

Gen resisten merkuri (*mer operon*) yang dimiliki oleh *Azotobacter* juga dapat berasal dari bakteri lain yang terdapat di lingkungannya. Menurut Narita (2003), gen resisten merkuri pada plasmid dan atau transposon dapat memfasilitasi terjadinya transfer gen secara horisontal dalam populasi bakteri di lingkungan. Sehingga adanya transfer gen tersebut, selain berperan dalam hal resistensi bakteri di lingkungan, juga memberikan keuntungan dalam hal adaptasi pada lingkungan yang tercemar merkuri.

Isolat *Azotobacter* yang berhasil diisolasi menunjukkan tingkat resistensi terhadap merkuri yang berbeda-beda. Perbedaan tingkat resistensi terhadap merkuri  $\text{HgCl}_2$  disebabkan oleh

susunan gen *mer* operon yang berbeda disetiap isolat. Komponen gen *mer* operon pada setiap spesies adalah tidak sama, terdapat variasi komposisi gen-gen penyusunnya (Narita, 2003). Selain itu, perbedaan kemampuan resistensi juga dipengaruhi oleh perbedaan tingkat ekspresi gen *mer operon* antara spesies bakteri satu dengan spesies bakteri yang lain (Ranjard *et al.* 1997).

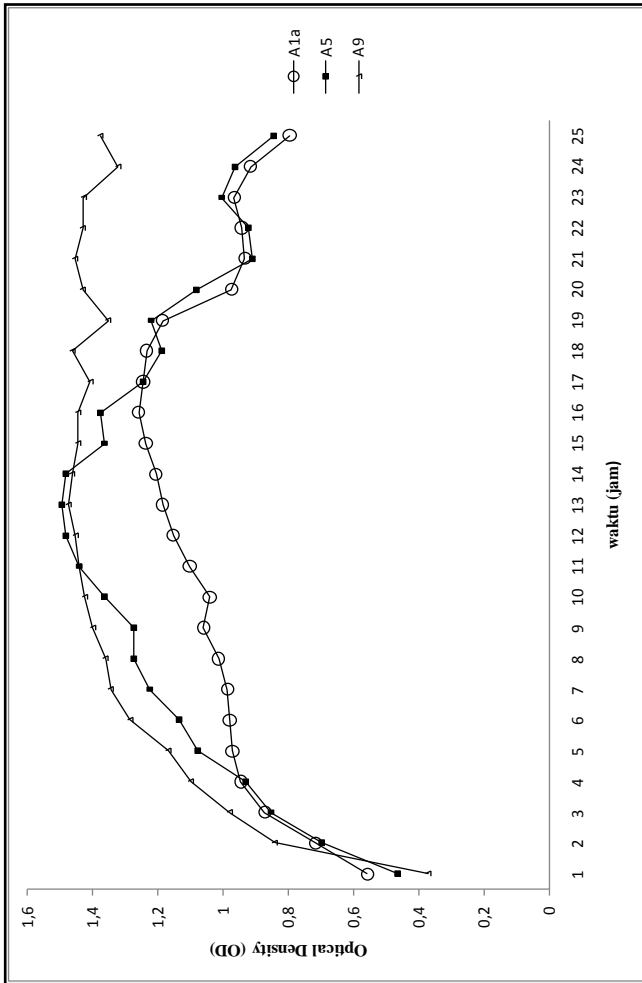
### **4.3 Kurva Pertumbuhan Isolat *Azotobacter***

Isolat yang digunakan pada uji bioakumulasi adalah isolat yang paling resisten dengan morfologi koloni yang mempunyai perbedaan menyolok, isolat tersebut adalah A1a, A5, dan A9. Pemilihan ketiga isolat tersebut didasarkan pada perbedaan karakteristik morfologi koloni tua dan tingkat resistensinya terhadap HgCl<sub>2</sub> diatas 10 mg/L. Isolat A1a mempunyai warna koloni coklat, resisten pada 10 mg/L HgCl<sub>2</sub>, A5 kuning kecoklatan dan A9 krem kekuningan yang resisten terhadap HgCl<sub>2</sub> 20 mg/L.

Siklus hidup bakteri dapat divisualisasikan melalui kurva pertumbuhan yang menggambarkan pola pertumbuhan bakteri dari fase adaptasi atau fase lag, eksponensial (log), stasioner dan kematian. Pada penelitian ini, media cair Nurient Broth (NB) untuk tumbuh telah mengalami modifikasi yaitu dengan pengurangan konsentrasi 50 % media NB, artinya konsentrasi media NB secara normal adalah 8 gr/1000 mL dimodifikasi menjadi 4 gr/1000 mL. Pengurangan konsentrasi media NB ini dilakukan karena media NB yang digunakan secara normal untuk media kultur kurva pertumbuhan menunjukkan kurva pertumbuhan *Azotobacter* sampai fase stasioner melebihi 24 jam. Berdasarkan penelitian Dhanraj *et al* (2012) pertumbuhan maksimum (puncak eksponensial) *Azotobacter chroococcum* pada jam ke-48. Penelitian Munawar dan Elfita (2011) juga menunjukkan bahwa fase puncak eksponensial isolat *Azotobacter* yang dikultur pada media Zobell cair yang ditambahkan minyak mentah terjadi pada jam ke-48. Pengurangan konsentrasi media NB dilakukan sebagai bentuk strategi untuk mempercepat fase

stasioner *Azotobacter* yang kurang dari 24 jam. Pada penelitian ini, media kultur juga ditambahkan  $\text{HgCl}_2$  0,1 mg/L dengan tujuan untuk menjaga sifat resistensinya terhadap merkuri ( $\text{HgCl}_2$ ).

Hasil kurva pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A5, dan A9 menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama. Ketiga pola pertumbuhan isolat *Azotobacter* langsung memasuki fase eksponensial tanpa melalui fase lag (Gambar 4.4). Fase lag merupakan fase adaptasi dimana bakteri belum menunjukkan adanya pertumbuhan. Pada fase lag, terjadi peningkatan ukuran sel, sel bakteri sedang mempersiapkan komponen-komponen untuk proses pembelahan seperti sintesis DNA, enzim-enzim intraseluler, dan lain-lain (Al-Qadiri *et al.*, 2008). Menurut Madigan *et al.* (2012), ada tidaknya fase lag pada kurva pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh waktu inokulasi dan usia inokulum. Jika inokulum diinokulasikan pada media baru yang sama pada saat fase eksponensial, maka pertumbuhan bakteri langsung melanjutkan fase eksponensial tanpa melalui fase lag lagi. Sedangkan jika inokulum diinokulasikan ke media baru pada saat memasuki fase kematian, maka pertumbuhan bakteri akan mengalami fase lag terlebih dahulu sebelum ke fase eksponensial, hal ini disebabkan sel-sel bakteri membutuhkan waktu untuk mempersiapkan komponen-komponen pembelahan sel terlebih dahulu.



Gambar 4.4. Kurva Pertumbuhan Isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9.

Pada penelitian ini stok kultur diinokulasikan ke media kurva pertumbuhan setelah 24 jam inkubasi pada media yang sama. Pada jam tersebut, kultur bakteri diperkirakan masih dalam fase eksponensial akhir dan akan memasuki fase stasioner. Isolat A1a mulai memasuki fase eksponensial pada jam ke-1 hingga jam ke-17, sedangkan pada jam ke-1 hingga jam ke-13 merupakan fase eksponensial untuk isolat A5 dan A9. Berdasarkan gambar 4.4, pada kurva pertumbuhan dapat diketahui bahwa rata-rata fase eksponensial isolat A1a adalah jam ke-9, sedangkan rata-rata fase eksponensial isolat A5 dan A9 adalah jam ke-7. Fase eksponensial merupakan fase dimana sel-sel bakteri berada pada kondisi yang sangat stabil atau seimbang, tingkat pembelahan sel-sel sangat tinggi (Madigan *et al.*, 2012), dan laju pertumbuhannya konstan (Al-Qadiri *et al.*, 2008).

Pola pertumbuhan isolat A1a mulai menurun pada jam ke-18, sedangkan isolat A5 dan A9 mulai menurun pada jam ke-14, selanjutnya akan memasuki fase stasioner dan fase kematian. Fase stasioner dicirikan dengan tidak adanya kenaikan atau penurunan jumlah sel dalam populasi artinya jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Hal ini disebabkan karena nutrisi dalam media semakin berkurang. Sedangkan fase kematian merupakan fase dimana sel-sel bakteri mengalami kematian yang disebabkan karena nutrisi dalam media telah habis. Pada gambar 4.4 fase kematian terlihat setelah memasuki jam ke-25 pada isolat A1a dan A5, sedangkan pada isolat A9 sampai jam ke-25 masih dalam fase stasioner.

#### **4.4 Uji Bioakumulasi Hg**

Uji bioakumulasi isolat *Azotobacter* dilakukan untuk mengukur kemampuan bioakumulasi isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS terhadap  $\text{HgCl}_2$ . Isolat *Azotobacter* yang digunakan adalah isolat A1a, A5, dan A9. Konsentrasi perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi yang lebih rendah dari konsentrasi maksimal yang mampu ditoleransi oleh isolat *Azotobacter* sehingga kemampuan sel-sel dalam

mengakumulasi  $\text{HgCl}_2$  dapat terjadi secara optimal. Dalam penelitian ini, konsentrasi perlakuan yang digunakan dalam uji bioakumulasi yaitu 5, 10, dan 15 mg/L  $\text{HgCl}_2$ . Kultur stok yang telah dibuat, diinokulasikan pada media cair  $\frac{1}{2}$  NB kemudian diinkubasi selama  $\mu$  jam (rata-rata fase eksponensial) sebelum dipapar  $\text{HgCl}_2$  sesuai konsentrasi perlakuan yaitu untuk isolat A1a diinkubasi selama 9 jam sedangkan isolat A5 dan A9 diinkubasi selama 7 jam. sebelum dipapar dengan  $\text{HgCl}_2$ , terlebih dahulu dilakukan penghitungan jumlah sel dengan menggunakan Haemocytometer (sel/ml) untuk mengetahui kepadatan/jumlah sel yang akan diuji kemampuan bioakumulasinya terhadap  $\text{HgCl}_2$  (Lampiran 11). Pada penelitian ini, bioakumulasi Hg diukur pada filtrat media hasil sentrifugasi yang merupakan  $\text{Hg}^{2+}$  sisa yang tidak diakumulasi dan tidak divolatilisasi oleh isolat *Azotobacter*. Konsentrasi yang diakumulasi dapat diketahui dengan cara mengurangi konsentrasi awal dengan konsentrasi sisa pada filtrat media.

Bioakumulasi merupakan akumulasi logam atau polutan secara intraseluler yang terjadi dalam 2 tahap yaitu (1) proses cepat atau biosorpsi pada permukaan sel, dan (2) proses lambat atau bioakumulasi, termasuk pengangkutan logam atau polutan ke dalam sel melewati membran sel (Chojnacka, 2010). Selain itu, *Azotobacter* dapat menghasilkan eksopolisakarida (EPS) yang berperan dalam biosorpsi logam. Eksopolisakarida dapat mengadsorpsi logam seperti  $\text{Hg}^{2+}$  karena EPS bermuatan negatif dan logam membentuk ikatan ligan dengan EPS (Erni dan Hindersah, 2011).

Dinding sel bakteri sangat melimpah dengan gugus-gugus yang mengandung muatan negatif seperti fosforil ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), karboksil ( $\text{COO}^-$ ), sulfhidril atau tiol ( $-\text{SH}$ ) dan hidroksil ( $-\text{OH}$ ) sehingga akan terjadi interaksi ion logam yang bermuatan positif dengan muatan negatif tersebut membentuk ikatan ligan (Murthy *et al.*, 2012). Menurut Zulaika *et al.* (2012), bakteri yang mempunyai habitat tercemar logam berat akan resisten terhadap logam berat tersebut melalui mekanisme biosorpsi dan atau



bioakumulasi. Mekanisme biosorpsi biasanya berhubungan dengan adanya eksopolisakarida (EPS) pada dinding sel bakteri yang dapat berfungsi sebagai pengkelat logam di permukaan sel. Sedangkan bioakumulasi berhubungan dengan adanya gen *operon* sesuai dengan logam yang diakumulasi.

Pada penelitian ini konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  yang terukur, ada yang mengalami kenaikan dan juga penurunan. Perubahan konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  pada media dapat disebabkan deviasi dari AAS. Hasil pengukuran bioakumulasi pada ketiga isolat *Azotobacter* menunjukkan bahwa isolat A5 memiliki kemampuan bioakumulasi yang rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan isolat A1a dan A9. Pada pemaparan 5 mg/L  $\text{HgCl}_2$ , efisiensi bioakumulasi isolat A5 yaitu sebesar 89 %, pada pemaparan 10 mg/L  $\text{HgCl}_2$ , efisiensi bioakumulasinya 79 %, sedangkan pada pemaparan 15 mg/L  $\text{HgCl}_2$ , efisiensi bioakumulasinya 87 %. Efisiensi bioakumulasi isolat A9 juga lebih tinggi jika dibandingkan dengan isolat A1a. Pada pemaparan 5, 10, dan 15 mg/L  $\text{HgCl}_2$ , efisiensi biokumulasinya berturut-turut adalah 87 %, 77 % dan 69 % (Tabel 4.3 dan Gambar 4.5).

Kemampuan bioakumulasi yang tinggi pada isolat *Azotobacter* A5 dan A9, sesuai dengan tingkat resistensinya yang tinggi terhadap  $\text{HgCl}_2$  yaitu mencapai 20 mg/L  $\text{HgCl}_2$ , dan kemampuan bioakumulasi isolat *Azotobacter* A1a yang relatif rendah mempunyai tingkat resistensi terhadap  $\text{HgCl}_2$  yang relatif rendah pula yaitu 10 mg/L  $\text{HgCl}_2$ .

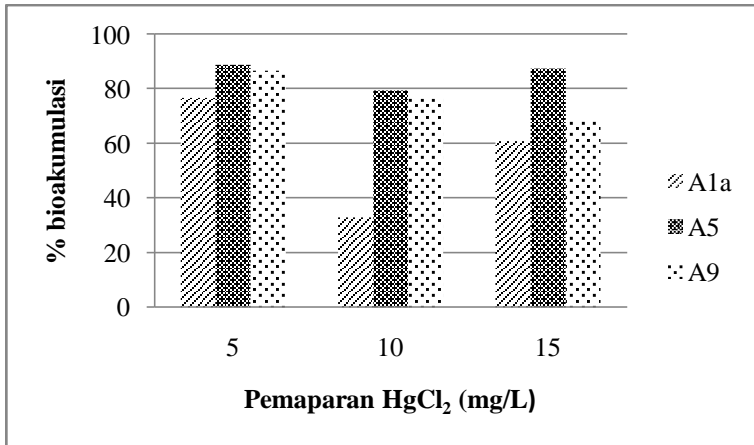
Tabel 4.3. Bioakumulasi Merkuri Isolat *Azotobacter*

Pemaparan $\text{HgCl}_2$ (mg/L)	$\text{Hg}^{2+}$ terukur (mg/L)	Bioakumulasi $\text{Hg}^{2+}$ (mg/L)/ $4,6 \times 10^7$ sel/mL			Efisiensi bioakumulasi (%)		
		A1a	A5	A9	A1a	A5	A9
5	5,62	4,31 b	4,99 a	4,88 a	77	89	87
10	9,86	3,25 a	7,84 b	7,56 b	33	79	77
15	14,91	9,09 c	13,04 c	10,28 c	61	87	69

Ket : Angka yang didampingi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan pada  $p=5\%$ .

Hasil analisis perlakuan konsentrasi dan bioakumulasi HgCl<sub>2</sub> didapatkan nilai p *value* 0,000 (Lampiran 13). Jika nilai p *value* dibawah < 0,05 menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan, sebaliknya jika nilai p *value* > 0,05 menunjukkan tidak ada pengaruh yang signifikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi merkuri mempengaruhi bioakumulasi *Azotobacter* terhadap HgCl<sub>2</sub>. Selanjutnya, dilakukan uji Beda nyata terkecil (BNT) dengan tujuan untuk mengetahui dan membandingkan pengaruh antar konsentrasi terhadap bioakumulasi. Hasil analisis didapatkan, semua nilai p *value* < 0,05 (Lampiran 14). Hal itu menunjukkan bahwa semua perlakuan konsentrasi berpengaruh signifikan terhadap bioakumulasi HgCl<sub>2</sub>. Namun konsentrasi merkuri tidak mempengaruhi kapasitas bioakumulasi pada masing-masing isolat. Berdasarkan Tabel 4.3 terbukti bahwa kemampuan bioakumulasi tiap isolat memiliki perbedaan disetiap konsentrasi perlakuan.

Bioakumulasi dipengaruhi oleh suhu, ada tidaknya sumber energi, inhibitor dan toksisitas logam berat itu sendiri. Faktor yang mempengaruhi biosorpsi antara lain suhu, pH, jumlah mikroorganisme, keberadaan logam lain, afinitas logam terhadap sel, dan imobilisasi mikroorganisme (Ahmad & Kibret, 2013). Sedangkan menurut Violante (2010), Faktor lingkungan yang mempengaruhi pengikatan ion logam pada permukaan sel bakteri antara lain: pH, kekuatan ionik, suhu, adanya logam lain, dan senyawa organik. Kemampuan bakteri mengakumulasi logam toksik tergantung pada usia sel, gugus fungsional pengikat logam, dan jumlah *reactive site* pengikatan ion logam.



Gambar 4.5. Grafik Efisiensi Bioakumulasi (%) Isolat *Azotobacter*.

Berdasarkan gambar 4.5, ketiga isolat *Azotobacter* uji memiliki efisiensi bioakumulasi lebih dari 50 % kecuali isolat A1a pada pemaparan 10 mg/L HgCl<sub>2</sub> yaitu 33 %. Efisiensi bioakumulasi paling tinggi adalah isolat A5 pada pemaparan 5 mg/L HgCl<sub>2</sub> yaitu 89 %. Berdasarkan penelitian Green-Ruiz (2006), reduksi merkuri lebih efisien pada konsentrasi Hg rendah dari pada konsentrasi Hg tinggi.

#### 4.4 Viabilitas *Azotobacter*

Uji viabilitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat *Azotobacter* setelah terpapar HgCl<sub>2</sub> selama 24 jam sesuai konsentrasi perlakuan. Viabilitas merupakan tingkat ketahanan dan kemampuan hidup dari suatu organisme termasuk bakteri pada lingkungan yang baru (Sobariah, 2007). Pada penelitian ini, kultur uji ditumbuhkan pada media NA menggunakan metode *pour plate*. Pengamatan dilakukan pada pengenceran 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-7</sup>.

Hasil uji viabilitas menunjukkan bahwa, ketiga isolat masih mampu tumbuh dengan baik (tabel 4.4).

Tabel 4.4. Viabilitas *Azotobacter* A1a, A5, dan A9

Isolat	Viabilitas ( $10^7$ )		
	5 mg/L HgCl <sub>2</sub>	10 mg/L HgCl <sub>2</sub>	15 mg/L HgCl <sub>2</sub>
<b>A1a</b>	+++	++	++++
<b>A5</b>	+++	+	+
<b>A9</b>	+++	++	++

Ket : ++++ (sangat tinggi), +++ (tinggi), ++ (sedang), + (rendah).

Berdasarkan Tabel 4.4, isolat A1a memiliki viabilitas yang tinggi dibandingkan dengan isolat A5 dan A9. Viabilitas isolat A1a yang tinggi, kurang sesuai dengan kemampuan bioakumulasinya terhadap HgCl<sub>2</sub>. Begitu pula dengan isolat A5 dan A9, viabilitasnya juga kurang sesuai dengan kemampuan bioakumulasinya terhadap HgCl<sub>2</sub>. Seharusnya apabila kemampuan bioakumulasinya tinggi memiliki viabilitas yang tinggi pula. Isolat A1a memiliki viabilitas yang tinggi namun kemampuan efisiensi bioakumulasinya relatif rendah. Sedangkan isolat A5 dan A9 memiliki viabilitas yang relatif lebih rendah namun memiliki efisiensi bioakumualasi yang tinggi. Berdasarkan karakteristik morfologi koloni, isolat A1a memiliki morfologi koloni yang sangat berlendir atau berair (*slimy*), sedangkan isolat A5 dan A9 memiliki morfologi koloni yang kurang berlendir atau berair (*slimy*). Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat A1a memiliki EPS yang lebih tebal dibandingkan dengan isolat A5 dan A9. Karakteristik morfologi koloni yang berlendir merupakan karakteristik bakteri yang memproduksi EPS (Wacharamusik *et al.*, 2008). EPS merupakan polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroorganisme dan diekresikan di luar selnya atau ke lingkungan sekitarnya. Pada umumnya EPS mengandung monosakarida dan beberapa komponen non-karbohidrat seperti protein, lipid, asetat piruvat, suksinat dan fosfat (Orsod *et al.*, 2012). EPS bakteri selain berfungsi sebagai sarana pelekatan ke permukaan, meningkatkan serapan nutrisi di lingkungannya dan sebagai agen pengkhelet logam (Pal & Paul, 2008), EPS juga

bertindak sebagai penghalang yang efisien mencegah masuknya ion-ion logam yang toksik ke dalam sel untuk melindungi sel dari keracunan logam berat (Wacharamusik *et al.*, 2008). Bakteri yang memiliki EPS yang tebal memiliki viabilitas yang lebih tinggi.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Sepuluh isolat *Azotobacter* resisten merkuri yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS yaitu A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10.
2. Semua isolat resisten 5 mg/L HgCl<sub>2</sub>. Isolat yang resisten 10 mg/L HgCl<sub>2</sub> adalah A1a, A5, A6, A7, A9, dan A10. Sedangkan isolat yang resisten 15 mg/L HgCl<sub>2</sub> adalah A5, A6, A7, A9, dan A10, dan hanya 3 isolat yang resisten sampai dengan konsentrasi 20 mg/L yaitu isolat A5, A6, dan A9.
3. Kemampuan bioakumulasi HgCl<sub>2</sub> yang tertinggi yaitu isolat A5 (4,99 mg/L) dengan efisiensi bioakumulasi 89 % pada pemaparan 5 mg/L HgCl<sub>2</sub>. Isolat A1a memiliki kemampuan bioakumulasi 4,31 mg/L dengan efisiensi bioakumulasi 77 %. Sedangkan isolat A9 memiliki kemampuan bioakumulasi 4,88 mg/L dengan efisiensi bioakumulasi 87 % pada pemaparan 5 mg/L HgCl<sub>2</sub>.

#### **5.2 Saran**

Untuk membuktikan bahwa isolat hasil isolasi pada penelitian ini adalah *Azotobacter chroococcum*, perlu dilakukan karakterisasi dengan marka gen penyandi 16S rRNA.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## DAFTAR PUSTAKA

Ahemad, M., and Kibret, M. 2013. Recent Trends in Mcrobial Biosorption of Heavy Metal : A Review. **Biochemistry and Molecular Biology** 1 (1) : 19-26.

Ahalya, N., Ramachandra, T.V., and Kanamadi, R.D. 2003. Biosorption of Heavy Metal. *Research Journal of Chemistry And Environment* 7 (4) : 71-79.

Alfian, Z. 2006. Merkuri : **Antara Manfaat dan Efek Penggunaannya Bagi Kesehatan Manusia dan Lingkungan**. Medan : USU Repository.

Al-Qadiri, H.M., Al-Alami, N.I., Lin, M., Al-Holy, M., Cavinato, A.G., and Rasco, B.A. 2008. Studying of Bacterial Growth Phases Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. **Journal of Rapid Method and Automation in Microbiology** 16 : 73-89.

Aquilanti, L., Favilli, F., and Clementi, F. 2004. Comparison of Different Strategies for Isolation And Preliminary Identification of *Azotobacter* From Soil Samples. **Soil Biology and Biochemistry** 36 : 1475-1483.

Barkay, T., Miller, S.M., and Summers, A.O. 2003. Bacterial Mercury Resistance From Atoms To Ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews** 27 : 355-384.

Barleman, J.E., and Bauer, C.E. 2004. Characterization of Cyst Cell Formaion in the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum centenum*. **Microbiology** 150 : 383-390.

Bogdanova, E., Manakhin, L., Bass, I., Volodin, A., Hobman, J.L., and Nikiforov, V. 2001. Class II Broad-Spectrum Mercury

Resistance Transposons In Gram-Positive Bacteria From Natural Environments. **Research Microbiology** 152 : 503-414.

Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J., Hobman, J.L., and Wilson, J.R. 2002. Mercury Transport and Resistance. **Biochemical Society Transactions** 30 (4) : 715-718.

Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> Edition.** USA : The William and Wilkins Company.

Cain, D., Hanks, H., Weis, M., Bottoms, C., and Lawson, J. 2013. **Microbiology Laboratory Manual.** Collin County Community College.

Chojnacka, K. 2010. Biosorption and Bioaccumulation - The Prospects For Practical Applications. **Environment International** 36 : 299-307.

Dash, H.R., and Das, S. 2012. Bioremediation of Mercury and The Importance of Bacterial mer Genes. **International Biodeterioration and Biodegradation** 75 : 207-213.

Dhanraj, S.N., Sonal, C., and Pallavi, B. 2012. Halophilic Nitrogen Fixing *Azotobacter chroococcum* N-21 and Its Use As a Biofertilizer for Saline Soils. **Journal Microbiology Biotechnology Research** 2 (2) : 319-326.

Erni dan Hindersah, R. 2011. Biosorpsi Kadmium dan Komposisi Eksopolisakarida *Azotobacter* sp. Pada Dua Konsentrasi CdCl<sub>2</sub>. **Agrinimal** 1 (1) : 33-37.

Ghosh, S., Sadhukhan, P.C., Ghosh, D.K., Chaudhuri, J., and Mandal, A. 1997. Elimination of Mercury and Organomercurials by Nitrogen-Fixing Bacteria. **Bulletin Environment Contamination Toxicology** 58 : 993-998.

Ghosh, S., Sadhukhan, P.C., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K., and Mandal, A. 1999. Purification and Properties of Mercuric Reductase from *Azotobacter chroococcum*. **Journal of Applied Microbiology** 86 : 7–12.

Gomare, K.S., Mese, M., and Shetkar, Y. 2013. Isolation of *Azotobacter* and Cost Effective Production of Biofertilizer. **Indian Journal of Applied Research**. 3 (5) : 54-56.

Green-Ruiz, C. 2006. Mercury(II) Removal From Aqueous Solution by Nonviable *Bacillus* sp. From a Tropical Estuary. **Bioresource Technology** 97 : 1907-1911.

Harley, J.P., and Prescott, L.M. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology**. 5<sup>th</sup> Edition. USA : The McGraw-Hill Companies.

Hachiya, N. 2006. The History And The Present Of Minamata Disease. **Japan Medical Association Journal** 49 (3) : 112-118.

Haryoto dan Wibowo, A. 2004. Kinetika Bioakumulasi Logam Berat Kadmium Oleh Fitoplankton *Chlorella* sp. Lingkungan Perairan Laut. **Jurnal Penelitian Sains and Teknologi** 5 (2) : 89-103.

Hasibuan, Z.H., Sabrina, T., dan Sembiring, M.B. 2012. Potensi Bakteri *Azotobacter* dan Hijauan *Mucuna bracteata* Dalam Meningkatkan Hara Nitrogen Kompos Tandan Kosong Kelapa Sawit. **Jurnal Agroekoteknologi** 1 (1) : 237-253.

Hodgson, E. 2004. **A Textbook Of Modern Toxicology**. 3<sup>rd</sup> Edition. Hoboken, New Jersey : John Wiley and Sons, Inc.

Holt, J.G., Krig, N.R., Sneath, P., Staley, J., and Williams, S. 1994. **Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology** 9<sup>th</sup> Edition. Philadelphia USA: Lipincott Williams and Wilkins Company

Inswiasri. 2008. Paradigma Kejadian Penyakit Pajanan Merkuri. **Jurnal Ekologi Kesehatan** 7 (2) : 775-785.

Jensen, H.L. 1954. **The Azotobacteriaceae**. Denmark.: Department of Bacteriology, State Laboratory of Plant Culture, Lyngby, 18 : 195-214.

Jimenez, D.J., Montana, J.S., and Martinez, M.M. 2011. Characterization of Free Nitrogen Fixing Bacteria of The Genus *Azotobacter* In Organic Vegetable-Grown Colombian Soils. **Brazilian Journal of Microbiology** 42: 846-858.

Keramati, P., Hoodaji, M., and Tahmourespour, A. 2011. Multi-Metal Resistance Study of Bacteria Highly Resistant to Mercury Isolated from Dental Clinic Effluent. **African Journal of Microbiology Research** 5 (7) : 831-837.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., and Clark, D.P. 2012. **Brock Biology of Microorganisms** 13th Edition. USA : Pearson Education, Inc.

Manampiring A.E., dan Keppel, B.J. 2011. Studi Populai Bakteri Resisten Merkuri Di Daerah Aliran Sungai Tondano, Kelurahan Ketang Baru, Manado. **Jurnal Ilmiah Sains** 11 (1) : 26-30.

Mazinani, Z., Aminafshar, M., Asgharzadeh, A., and Chamani, M. 2012. Effect of *Azotobacter* Population On Physico-Chemical Characteristics of Some Soil Sample In Iran. **Annals of Biological Research** 3 (7) : 3120-3125.

Munawar dan Elfita. 2011. Ketahanan Hidup Konsorsium Bakteri Petrofilik Pada Media Pembawa Tanah Gambut Selama Masa Penyimpanan. **Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian Tahun 2011, Palembang**. ISBN 978-602-95965-2-6.

Murthy, S., Bali, G., and Sarangi, S.K. 2012. Biosorption of Lead by *Bacillus cereus* Isolated From Industrial Effluents. **British Biotechnology Journal** 2 (2) : 73-84.

Narita, M., Chiba, K., Nishizawa, H., Ishii, H., Huang, C.C., Kawabata, Z., Silver, S., and Endo, G. 2003. Diversity of Mercury Resistance Determinants Among *Bacillus* Strains Isolated From Sediment of Minamata Bay. **FEMS Microbiology Letters** 223 : 73-82.

Nascimento, A.M.A., and Chartone-Souza, E. 2003. Operon mer : Bacterial Resistance To Mercury And Potential For Bioremediation Of Contaminated Environments. **Genetics and Molecular Research** 2 (1) : 92-101.

Orsod, M., Joseph, M., and Huyop, F. 2012. Characterization of Exopolisaccharides Produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. Isolated From sian Sea Bass (*Lates calcarifer*). **Malaysian Journal of Microbiology** 8 (3) : 170-174.

Osborn, A. M., Bruce, K.D., Strike, P., and Ritchie, D.A. 1997. Distribution, Diversity, and Evolution of the Bacterial Mercury Resistance (mer) Operon. **FEMS Microbiology Reviews** 19 : 239-262.

Pal, A., and Paul, A.K. 2008. Microbial Extracellular Polimeric Substances : Central Element in Heavy Metal Bioremediation. **Indian Journal Microbiology** 48 : 49-64.

Patel, P.H., Patel, J.P., and Bhatt, S.A. 2013. Characterization and phylogenetic Relatedness of *Azotobacter salinestris*. **Journal Microbiology Biotechnology Research** 3 (1) : 65-70.

Primaharinastiti, R., Poernomo, A.T., and Erma, N. 2004. Bioakumulasi Logam Berat Cu Oleh *Bacillus* sp. **Berkala Penelitian Hayati** 10 : 19-23.

Rajeswari and Kasthuri, M. 2009. Molecular Characterization of *Azotobacter* spp. *nifH* Gene Isolated from Marine Source. **African Journal of Biotechnology** 8 (24) : 6850-6855.

Ramond, J.B., Berthe, T., Duran, R., and Petit, F. 2009. Comparative Effect of Mercury Contamination and Wastewater Effluent Input On Gram-Negative *mer-A* Gene Abundance in Mudflats of Anthropized Estuary (Seine, France): A Microcosm Approach. **Research in Microbiology** 160 : 10-18.

Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-Monrozier, L., and Nazaret, S. 1997. Response of Soil Bacteria to Hg(II) in Relation to Soil Characteristics and Cell Location. **FEMS Microbiology** 24 : 321-331.

Ray, S., Gachhui, R., Pahan, K., Chaudhury, J., and Mandal, A. 1989. Detoxification of Mercury and Organomercurials by Nitrogen-Fixing Soil Bacteria. **Journal Bioscience** 14 (2) : 173-182.

Ristiati, N.P., Muliadihardja, S., dan Nurlita, F. 2008. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiosis Dari Dalam Tanah. **Jurnal Penelitian dan Pengembangan Sains and Humaniora** 2 (1) : 68-80.

Rojas, I.G., Geraldo, A.B.T., and Sarmiento, N.M. 2011. Optimising Carbon and Nitrogen Sources for *Azotobacter chroococcum* Growth. **African Journal of Biotechnology** 10 (15) : 2951-2958.

Ruas-Madiedo, P., and Reyes-Gavilan, C.G de los. 2005. Invited Review : Methods For Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced By Lactic Acid Bacteria. **Journal Dairy Science** 88 : 843-856.

Salhia, B.M. 2010. The Effect of *Azotobacter chroococcum* as Nitrogen Biofertilizer on The Growth and Yield of *Cucumis sativus*. **Master of Biological Sciences/Botany**. Gaza : The Islamic University.

Sandeep, C., Rashmi, S.N., Sharmila, V., Surekha, R., Tajewini, R., and Suresh, C.K. 2011. Growth Response of *Amaranthus gangeticus* to *Azotobacter chroococcum* Isolated From Different Agroclimatic Zones of Karnataka. **Journal of Phytology** 3 (7) : 29-34.

Saraswati, R., Husen, E., dan Simanungkalit, R.D.M. 2007. **Metode Analisis Biologi Tanah**. Jawa Barat : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Lahan Pertanian.

Sobariah, E. 2007. Viabilitas Bakteri Probiotik In Vitro dan Pengaruh Pemberian Air Beroksigen Terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik Secara In Vivo. Tesis Pasca Sarjana IPB- Bogor

Stella, M., and Suhaimi, M. 2010. Selection of Suitable Growth Medium For Free-Living Diazotrophs Isolated From Compost. **Journal Tropical Agricultural and Food Science** 38 (2) : 211-219.

Violante, A., Cozzolino, V., Perelonov, L., Caporale, A.g., and Pigna, M. 2010. Mobility and Bioavailability of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments. **Journal of Soil Science Plant Nutrition** 10 (3) : 268-292.

Wacharamusik, A., Prapagdee, B., Thavipoke, P., and Boontanon, N. 2008. The Role of Exopolymers in Protection of *Ralstonia* sp., a Cadmium-Resistant Bacterium, From Cadmium Toxicity. **EnvironmentAsia** 2 : 37-42.

Widiastuti, H., Siswanto, dan Suharyanto. 2010. Karakterisasi dan Seleksi Beberapa Isolat *Azotobacter* sp. untuk Meningkatkan

Perkecambahan Benih dan Pertumbuhan Tanaman. **Buletin Plasma Nutfah** 16 (2) : 160-167.

Zulaika, E., Luqman, A., Arindah, T., dan Sholikah, U. 2012. Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator. **Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development**. Teknik Lingkungan, FTSP-ITS. 21 Februari 2012. Surabaya. Indonesia.

Zulaika, E. 2013. Eksplorasi Bakteri Resisten Merkuri (BRM) Endogenik Kalimas Surabaya Sebagai Kandidatus Agensia Pencemaran Merkuri. **Disertasi**. Universitas Airlangga. Surabaya.



## BIODATA PENULIS



Penulis bernama Kusnul Khotimah. Anak pertama dari dua bersaudara ini dilahirkan di Gresik, 14 Maret 1992. Penulis menempuh pendidikan dari mulai sekolah dasar di SDN Mojotengah I, SMP Sunan Giri Menganti Gresik, dan menempuh studi di Madrasah Aliyah Roudlotun Nasyi'in Berat Kulon Kemlagi Mojokerto. Ketertarikan terhadap ilmu pengetahuan terlihat sejak menempuh jenjang menengah atas dengan masuk program studi IPA.

Selain pendidikan formal, penulis menempuh pendidikan Diniyah di Madrasah Diniyah Roudlotun Nasyi'in naungan Pondok Pesantren Roudlotun Nasyi'in Kemlagi Mojokerto. Setelah menempuh jenjang menengah ke atas penulis melanjutkan pendidikan di jurusan Biologi FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya.

Selama menempuh studi di Biologi penulis tertarik pada bidang Mikrobiologi dan Bioteknologi yang terlihat dari Program Kerja Praktek di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset dan Standardisasi Industri Surabaya, beberapa seminar dan program keilmiah lain seperti PKM didanai DIKTI, dan dilanjutkan dengan penulisan Tugas Akhir yang bertema Bioremediasi logam berat merkuri oleh bakteri. Selain tertarik di Mikrobiologi penulis juga aktif pada bidang akademik lain, penulis tercatat pernah menjadi Asisten Struktur Hewan, Asisten Mikrobiologi dan Asisten Genetika.

Penulis juga tertarik dengan dunia organisasi intra kampus (HIMABITS dan FKIQ). Penulis pernah menjabat sebagai Bendahara Departement SOSMAS HIMABITS periode 2012-2013, dan Bendahara umum FKIQ. Penulis berharap dengan penelitian ini penulis mampu menjadi pribadi yang bermanfaat dunia akhirat untuk diri penulis dan untuk lingkungan sekitar.

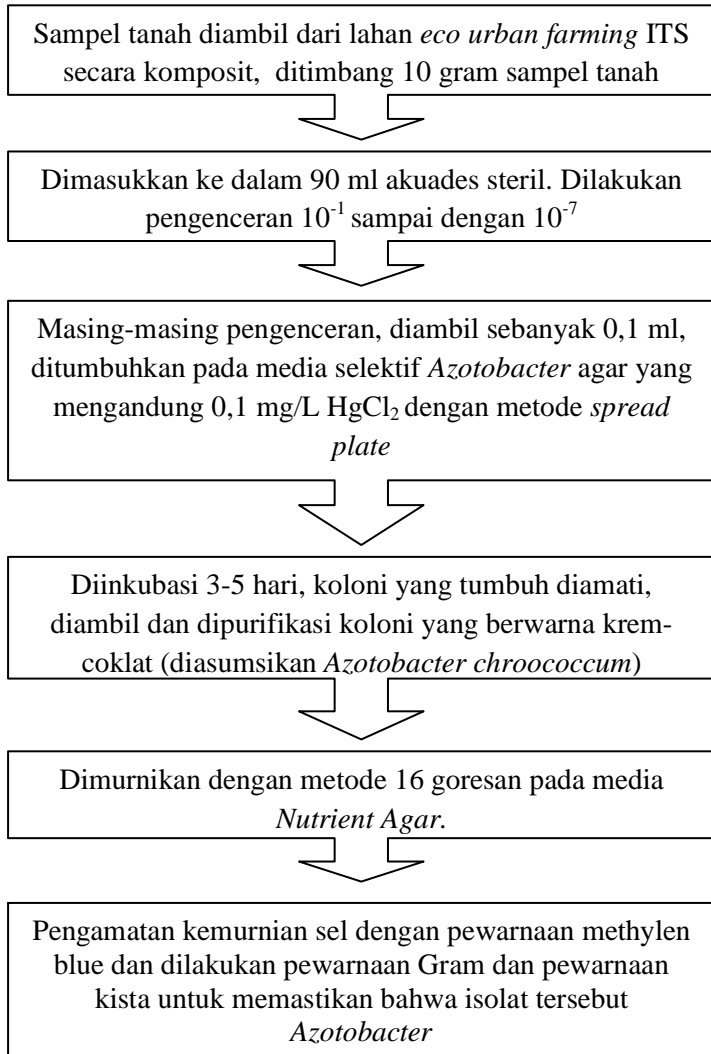
## DAFTAR LAMPIRAN

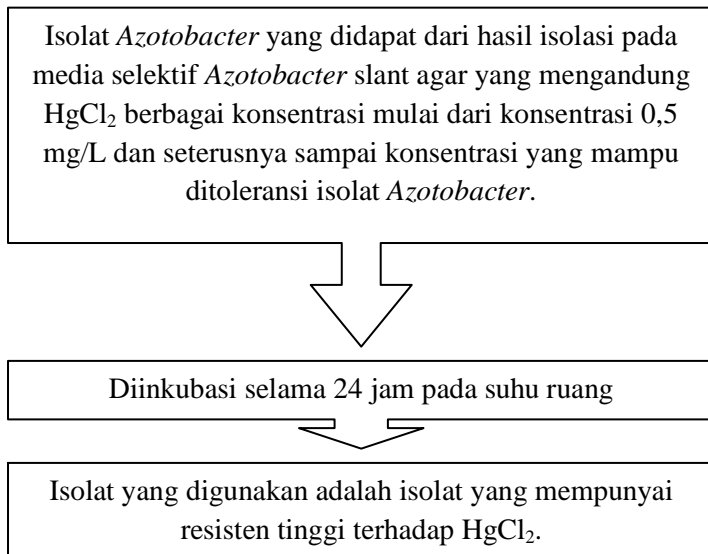
		Halaman
Lampiran 1	Skema Kerja Isolasi <i>Azotobacter</i> .....	47
Lampiran 2	Skema Kerja Uji Resistensi Terhadap HgCl <sub>2</sub> .....	48
Lampiran 3	Skema Kerja Kurva Pertumbuhan Isolat <i>Azotobacter</i> .....	49
Lampiran 4	Skema Kerja Uji Bioakumualsi Hg.....	50
Lampiran 5	Skema Kerja Viabilitas <i>Azotobacter</i> ....	51
Lampiran 6	Dokumenasi Pengambilan Sampel di Lahan <i>Eco Urban Farming</i> ITS.....	52
Lampiran 7	Bentuk dan Ukuran Sel Isolat <i>Azotobacter</i> .....	53
Lampiran 8	Pewarnaan Gram Isolat <i>Azotobacter</i> ....	55
Lampiran 9	Pewarnaan Cysta Tiap Isolat <i>Azotobacter</i> .....	56
Lampiran 10	Uji Resistensi Isolat <i>Azotobacter</i> .....	57
Lampiran 11	Hasil Perhitungan dan Grafik Jumlah Sel (sel/ml).....	59
Lampiran 12	Konsentrasi Hg Sisa pada Filtrat Media.....	60
Lampiran 13	Uji Analysis of Varians (ANOVA)	

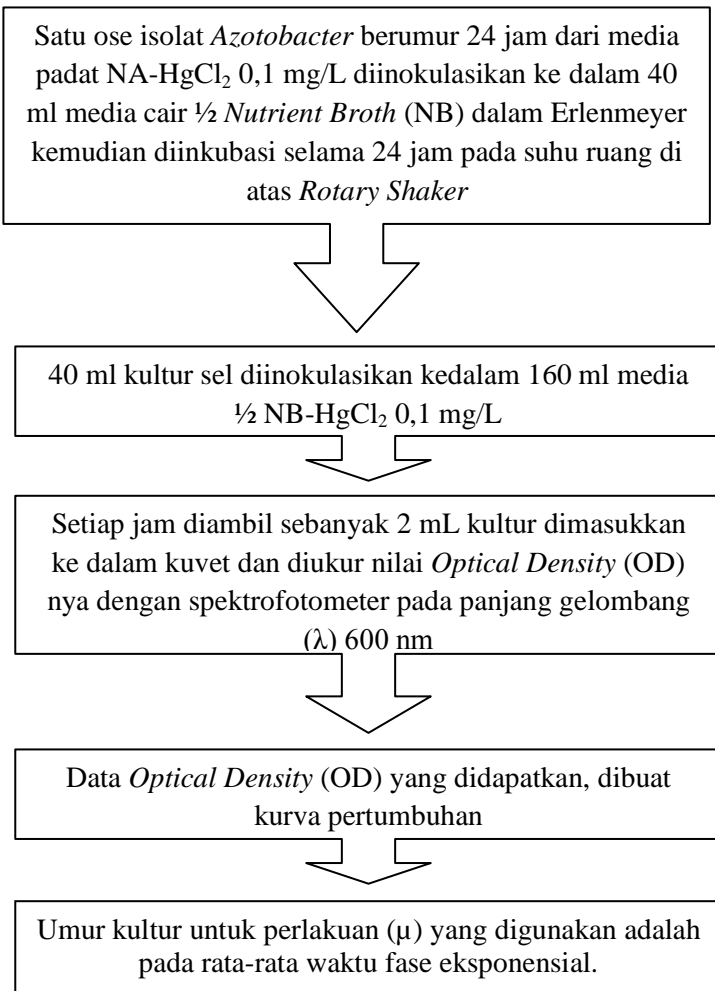
	One-way.....	61
Lampiran 14	Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).....	62
Lampiran 15	Viabilitas Isolat <i>Azotobacter</i> .....	63
Lampiran 16	Hasil Uji AAS HgCl <sub>2</sub> .....	66

## LAMPIRAN

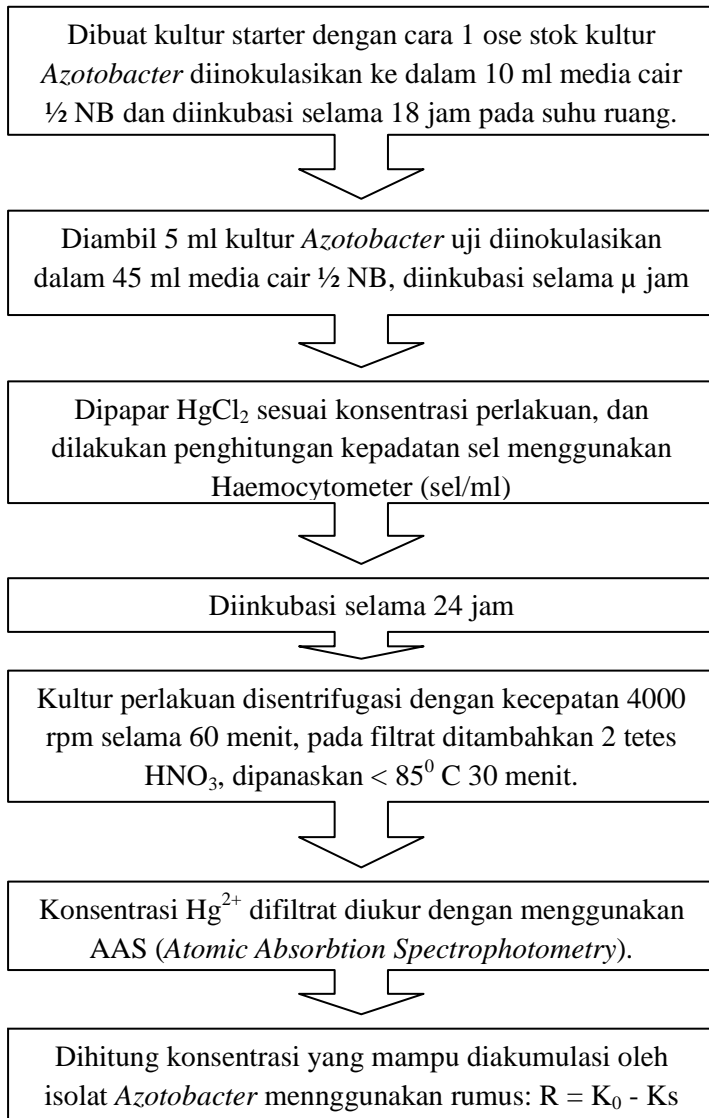
### Lampiran 1. Skema Kerja Isolasi *Azotobacter*



Lampiran 2. Skema Kerja Uji Resistensi Terhadap HgCl<sub>2</sub>

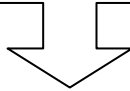
Lampiran 3. Skema Kerja Kurva Pertumbuhan Isolat *Azotobacter*

## Lampiran 4. Skema Kerja Uji Bioakumulasi Hg



Lampiran 5. Skema Kerja Viabilitas *Azotobacter*

Satu ml kultur perlakuan yang telah terpapar  $\text{HgCl}_2$  sesuai konsentrasi perlakuan, dilakukan pengenceran hingga  $10^{-7}$ , diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan menggunakan metode *pour plate*



Koloni yang tumbuh diamati. Pengamatan dilakukan pada pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$



Lampiran 6. Pengambilan Sampel Di Lahan *Eco Urban Farming* ITS



Lokasi sampling



*Green house* tempat pengambilan sampel tanah



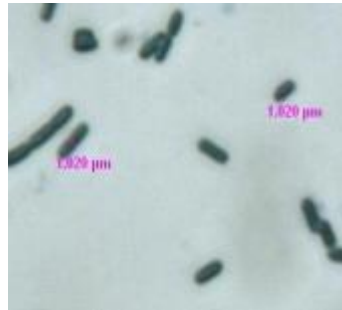
Pengambilan sampel tanah



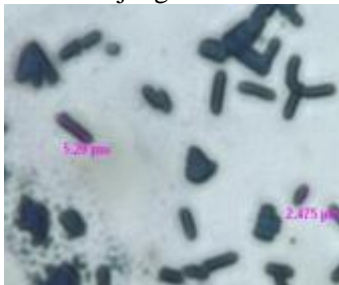
Pengambilan sampel air disekitar lahan *eco urban farming* ITS

Lampiran 7. Bentuk dan Ukuran Sel Isolat *Azotobacter*

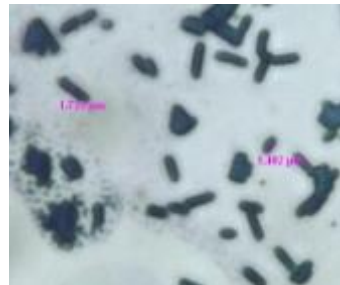
Panjang sel A1a



Lebar sel A1a



Panjang sel A3



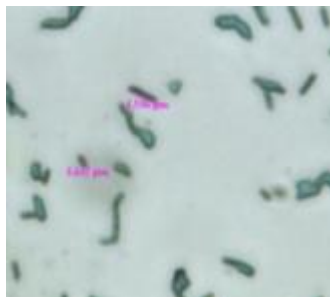
Lebar sel A3



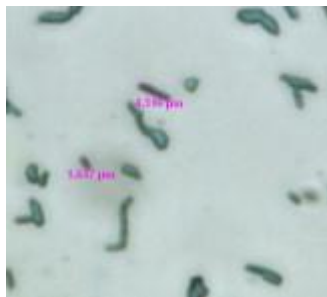
Panjang sel A5



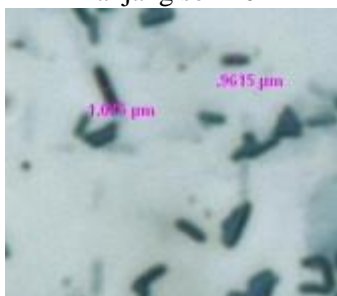
Lebar sel A5



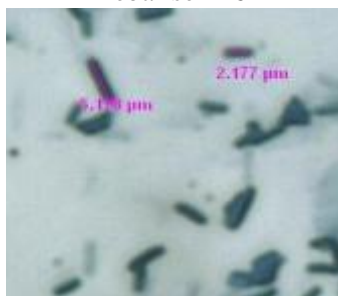
Panjang sel A6



Lebar sel A6



Panjang sel A7



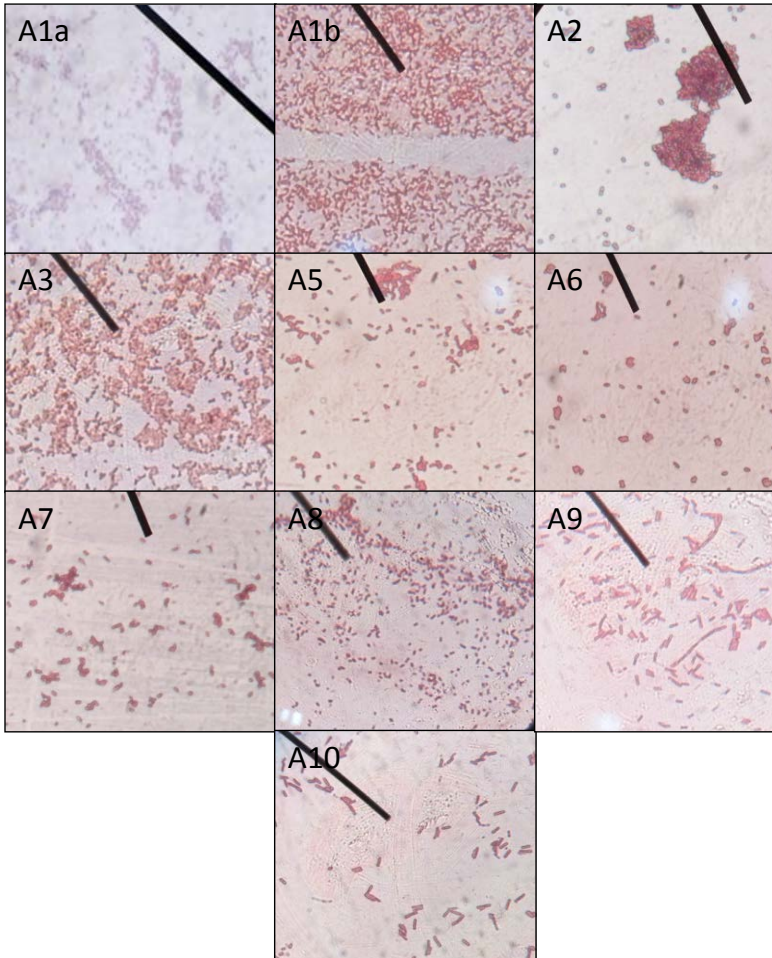
Lebar sel A7

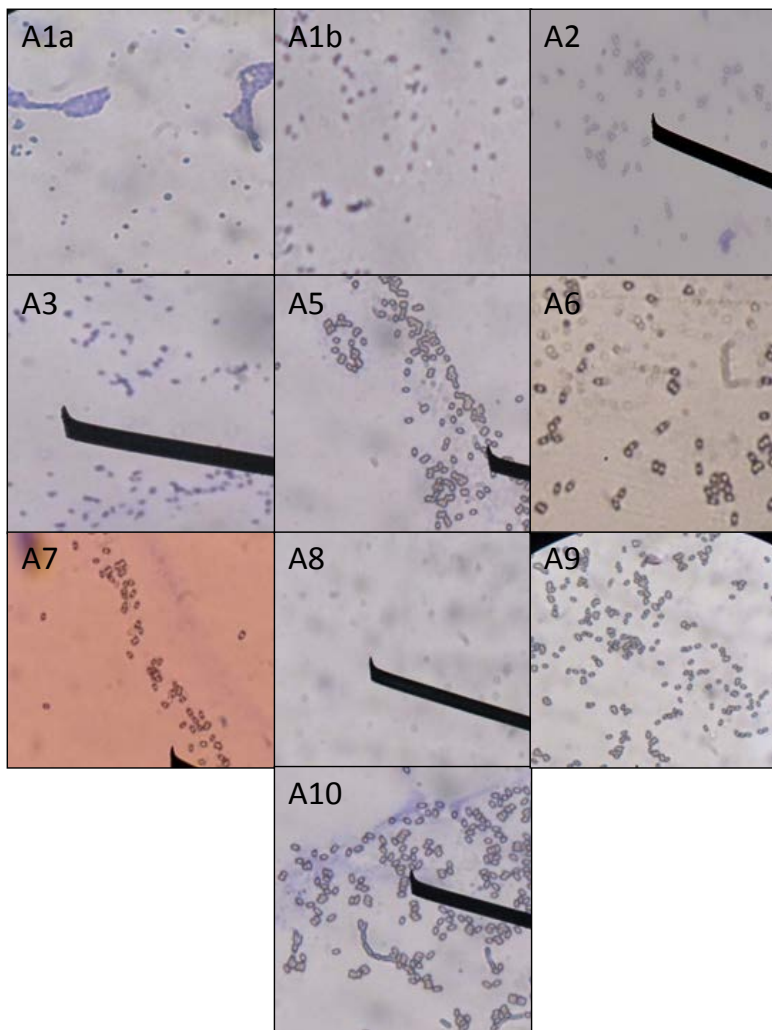


Panjang sel A9



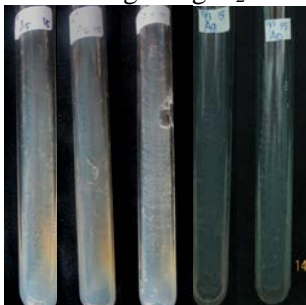
Lebar sel A9

Lampiran 8. Pewarnaan Gram Isolat *Azotobacter*

Lampiran 9. Pewarnaan Cysta Tiap Isolat *Azotobacter*

Lampiran 10. Uji Resistensi Isolat *Azotobacter*0,5 mg/L HgCl<sub>2</sub>5 mg/L HgCl<sub>2</sub>10 mg/L HgCl<sub>2</sub>

15 mg/L HgCl<sub>2</sub>

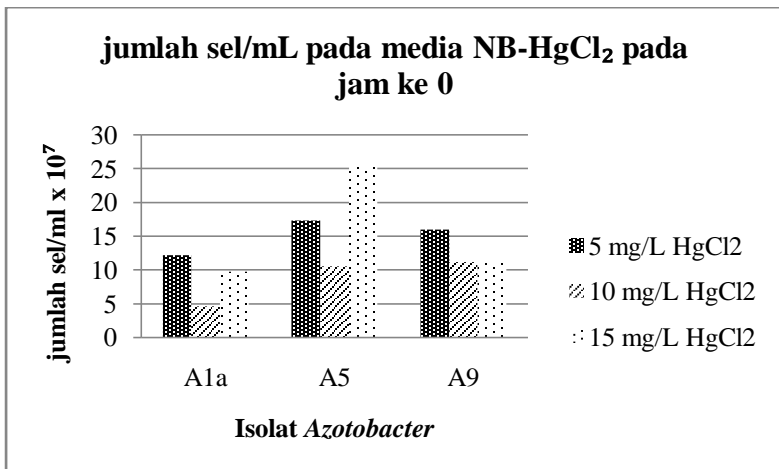


20 mg/L HgCl<sub>2</sub>



## Lampiran 11. Hasil Perhitungan dan Grafik Jumlah Sel (sel/ml)

Jumlah sel/ml x 10 <sup>7</sup>								
A1a			A5			A9		
U1	U2	Rata-rata	U1	U2	Rata-rata	U1	U2	Rata-rata
11,95	12,4	12,175	18,95	15,6	17,275	15,55	16,30	15,925
5,45	3,7	4,575	13,60	7,5	10,55	10,3	12,05	11,175
9,3	10,1	9,7	24,70	26,15	25,425	11,15	11,50	11,325





Lampiran 12. Konsentrasi  $\text{Hg}^{2+}$  Sisa Pada Filtrat Media

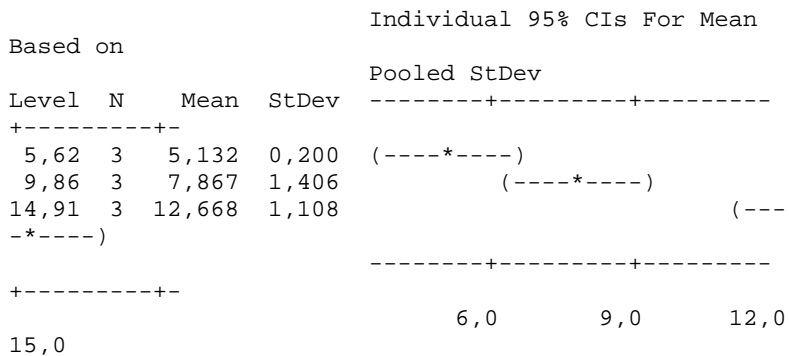
Pemaparan $\text{HgCl}_2$ (mg/L)	Konsentrasi $\text{Hg}^{2+}$	$\text{Hg}^{2+}$ terukur (mg/L)	Konsentrasi $\text{Hg}^{2+}$ sisa setelah inkubasi 24 jam (mg/L)								
			A1a U1	A1a U2	rata- rata	A5 U1	A5 U2	Rata- rata	A9 U1	A9 U2	rata- rata
5	3,692	5,62	3,46	3,51	3,485	2,38	2,36	2,37	2,56	2,6	2,58
10	7,385	9,86	6,33	6,9	6,615	4,78	4,55	4,665	5,74	5,52	5,63
15	11,077	14,91	12,5	12,18	12,34	10,51	10,22	10,365	11,54	11,36	11,45

## Lampiran 13. Uji Analysis of Varians (ANOVA) One-way

**One-way ANOVA: bioakumulasi versus konsentrasi**

Source	DF	SS	MS	F	P
konsentrasi	2	87,31	43,65	40,34	0,000
Error	6	6,49	1,08		
Total	8	93,80			

S = 1,040    R-Sq = 93,08%    R-Sq(adj) = 90,77%



Pooled StDev = 1,040

## Lampiran 14. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

**ANOVA**

bioakumulasi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	87.295	2	43.647	40.337	.000
Within Groups	6.492	6	1.082		
Total	93.787	8			

**Multiple Comparisons**

bioakumulasi

LSD

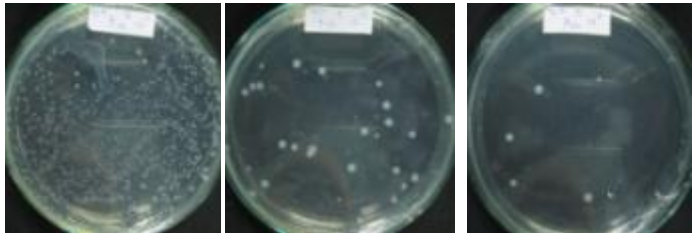
(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
konsent rasi	9.86	-2.734600*	.849341	.018	-4.81286	-.65634
	14.9	-7.534867*	.849341	.000	-9.61313	-5.45660
konse ntrasi	5.62	2.734600*	.849341	.018	.65634	4.81286
	14.9	-4.800267*	.849341	.001	-6.87853	-2.72200
	5.62	7.534867*	.849341	.000	5.45660	9.61313
	9.86	4.800267*	.849341	.001	2.72200	6.87853

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

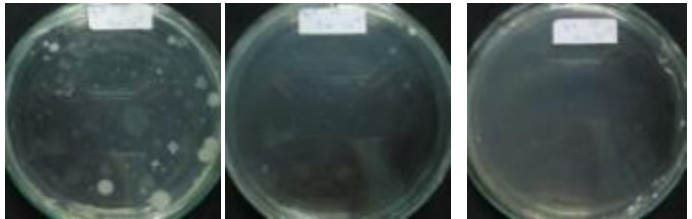
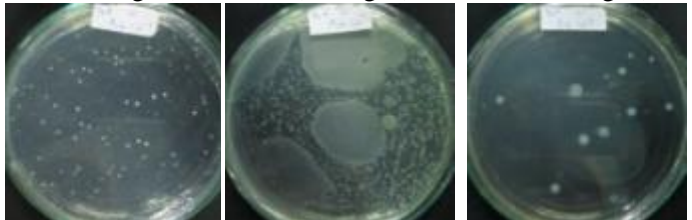
Lampiran 15. Viabilitas Isolat *Azotobacter*

Isolat

Viabilitas

 $10^{-3}$  (5 mg/L) $10^{-5}$  (5 mg/L) $10^{-7}$  (5 mg/L)

A1a

 $10^{-3}$  (10 mg/L) $10^{-5}$  (10 mg/L) $10^{-7}$  (10 mg/L) $10^{-3}$  (15 mg/L) $10^{-5}$  (15 mg/L) $10^{-7}$  (15 mg/L)

A5

