



TUGAS AKHIR - SB184830

KETAHANAN DAN PROFIL PROTEIN BAKTERI GRAM POSITIF TERHADAP SENYAWA EMAS HAuCl_4

LINTANG ARUM WULANDARI
0131154000065

Dosen Pembimbing
Dr. Enny Zulaika, M.P.

DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2019



TUGAS AKHIR - SB184830

**KETAHANAN DAN PROFIL PROTEIN BAKTERI
GRAM POSITIF TERHADAP SENYAWA EMAS
HAuCl₄**

LINTANG ARUM WULANDARI
0131154000065

Dosen Pembimbing
Dr. Enny Zulaika, M.P.

DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2019



FINAL PROJECT - SB184830

**SURVIVAL AND PROTEIN PROFILES OF
GRAM POSITIVE BACTERIA TO GOLD
COMPOUNDS HAuCl_4**

LINTANG ARUM WULANDARI
0131154000065

Advisor Lecturer
Dr. Enny Zulaika, M.P.

BIOLOGY DEPARTMENT
FACULTY OF SCIENCE
INSTITUTE OF TECHNOLOGY SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2019

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**KETAHANAN DAN PROFIL PROTEIN BAKTERI
GRAM POSITIF TERHADAP SENYAWA EMAS
HAuCl₄**

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Departemen S-1 Biologi
Fakultas Sains
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

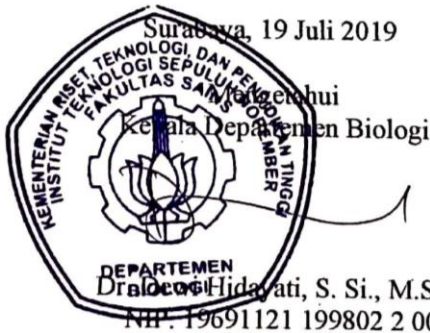
Oleh:

LINTANG ARUM WULANDARI
NRP. 0131154000065

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir.

Dr. Enny Zulaika, M.P. *Enny Zulaika* (Pembimbing 1)

Surabaya, 19 Juli 2019



KETAHANAN DAN PROFIL PROTEIN BAKTERI GRAM POSITIF TERHADAP SENYAWA EMAS HAuCl₄

Nama Mahasiswa : Lintang Arum Wulandari
NRP : 01311540000065
Departemen : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, M.P.

Abstrak

Emas atau Aurum (Au) merupakan salah satu limbah yang dihasilkan oleh industri electroplating yang dapat bersifat toksik bagi beberapa organisme, namun beberapa bakteri mampu mentolerir. HAuCl₄ merupakan senyawa kimia yang mengandung Au. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ketahanan bakteri Gram positif terhadap HAuCl₄ dan perbedaan migrasi proteinnya dengan elektroforesis SDS-PAGE. Penelitian diawali dengan uji resistensi isolat Bacillus cereus S1, Lactobacillus sp. dan Staphylococcus aureus menggunakan medium MSM broth+glukosa 2% mengandung HAuCl₄ 0,1 ppm; 1 ppm; 5 ppm; dan 10 ppm. Kultur diinkubasi selama 24 jam. Kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan spektrofotometer λ 600 nm dan dilakukan uji profil protein dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga isolat uji tahan terhadap senyawa emas HAuCl₄ sampai dengan konsentrasi 10 ppm dan semua isolat mempunyai protein yang berperan untuk resisten HAuCl₄ pada berat molekul 38,9 kDa.

Kata kunci: Aurum (Au), Bacillus cereus S1, Lactobacillus sp, Profil Protein, Resistensi, Staphylococcus aureus

SURVIVAL AND PROTEIN PROFILES OF GRAM POSITIVE BACTERIA TO GOLD COMPOUNDS HAuCl₄

Name : Lintang Arum Wulandari
NRP : 0131154000065
Department : Biology
Advisor Lecturer : Dr. Enny Zulaika, M.P.

Abstract

Gold or Aurum (Au) is one of the waste produced by the electroplating industry that can be toxic to some organisms, but some bacteria are able to tolerate. H₂AuCl₄ is a chemical compound that contains Au. The research aims to determine the resistance of Gram positive bacteria to H₂AuCl₄ and the difference of protein migration with electrophoresis using SDS-PAGE. The research begins with isolating resistance test of *Bacillus Cereus* S1, *Lactobacillus* sp. and *Staphylococcus aureus* using MSM medium broth + 2% glucose containing of H₂AuCl₄ 0,1 ppm; 1 ppm; 5 ppm; and 10 ppm. Cultures incubated for 24 hours. Then made a growth curve with the spectrophotometer λ 600 nm and tested protein profile with SDS-PAGE method. The results showed that the three isolates were resistant to gold compounds H₂AuCl₄ up to a concentration of 10 ppm and all isolates had a contributing protein to H₂AuCl₄ resistance at a molecular weight of 38.9 kDa.

Keywords: Aurum (Au), *Bacillus cereus* S1, *Lactobacillus casei*, Protein Profile, Resistance, *Staphylococcus aureus*

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kehadirat Tuhan YME atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Ketahanan dan Profil Protein Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas HAuCl₄**.

Penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari bimbingan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si. sebagai Kepala Departemen Biologi, Dr. Enny Zulaika, M.P. sebagai dosen pembimbing tugas akhir yang tidak pernah lelah dan selalu sabar membimbing penulis, Dr. Techn. Endry Nugroho P., S.Si., MT. dan Wirdhatul Muslihatin, S.Si., M.Si. sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan kepada penulis, Maya Erlinda Wibowo, A.Md., A.K. sebagai laboran Laboratorium Mikrobiologi yang telah membantu dalam proses tugas akhir, teman-teman yang senantiasa memberi semangat dan motivasi kepada penulis, dan kedua orang tua yang selalu mendukung dan memberi semangat kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa penulisan tugas akhir ini masih memiliki banyak kekurangan, namun besar harapan penulis supaya proposal ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| HALAMAN PENGESAHAN..... | vii |
| ABSTRAK | ix |
| <i>ABSTRACT</i> | xi |
| KATA PENGANTAR..... | xiii |
| DAFTAR ISI..... | xv |
| DAFTAR GAMBAR | xvii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xxi |
| BAB I PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 3 |
| 1.3 Batasan Masalah | 3 |
| 1.4 Tujuan | 3 |
| 1.5 Manfaat | 3 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Emas (Au) | 5 |
| 2.2 Toksisitas Emas..... | 6 |
| 2.3 Bakteri Resisten Emas..... | 7 |
| 2.4 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Logam Berat Lain..... | 10 |
| 2.4.1 Resistensi terhadap Logam Cu | 10 |
| 2.4.2 Resistensi terhadap Logam Hg..... | 11 |
| 2.4.3 Resistensi terhadap Logam Pb..... | 12 |
| 2.4.4 Resistensi terhadap Logam Cr..... | 14 |
| 2.5 Peptidoglikan pada Bakteri Gram Positif | 15 |
| 2.6 <i>Bacillus cereus</i> S1 | 16 |
| 2.7 <i>Lactobacillus casei</i> | 17 |
| 2.8 <i>Staphylococcus aureus</i> | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.9 Profil Protein dengan SDS-PAGE..... | 19 |
|---|----|

BAB III METODOLOGI

| | |
|---|----|
| 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian..... | 21 |
| 3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja | 21 |
| 3.2.1 Isolat yang Digunakan | 21 |
| 3.2.2 Persiapan dan Subkultur Isolat | 21 |
| 3.2.3 Pembuatan Media <i>Mineral Salt Medium</i> (MSM)..... | 21 |
| 3.2.4 Aklimatisasi Isolat pada Media <i>Mineral Salt Medium</i> (MSM)..... | 22 |
| 3.2.5 Uji Resistensi Isolat terhadap H _{Au} Cl ₄ | 22 |
| 3.2.5 Pengukuran Kadar Protein | 23 |
| 3.2.7 Uji Profil Protein | 23 |
| 3.2.7.1 Preparasi Sampel Protein..... | 23 |
| 3.2.7.2 Preparasi Gel Poliakrilamid..... | 24 |
| 3.2.7.3 <i>Running</i> SDS-PAGE | 25 |
| 3.2.7.4 Pewarnaan dan Pencucian Gel Poliakrilamid..... | 26 |
| 3.2.8 Rancangan Penelitian dan Analisis Data..... | 27 |

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

| | |
|--|----|
| 4.1 Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas H _{Au} Cl ₄ | 29 |
| 4.2 Pengukuran Kadar Protein Total Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas H _{Au} Cl ₄ | 31 |
| 4.3 Profil Protein Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas H _{Au} Cl ₄ | 32 |

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

| | |
|---------------------|----|
| 5.1 Kesimpulan..... | 35 |
| 5.2 Saran..... | 35 |

| | |
|---------------------|----|
| DAFTAR PUSTAKA..... | 37 |
| LAMPIRAN | 45 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1 Mekanisme Gen Resisten terhadap Logam Emas pada Sel Bakteri | 8 |
| Gambar 2.2 Mekanisme Transportasi Logam Emas dalam Sel Bakteri..... | 9 |
| Gambar 2.3 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Logam Cu..... | 10 |
| Gambar 2.4 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Logam Hg | 11 |
| Gambar 2.5 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Logam Pb | 13 |
| Gambar 2.6 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Logam Cr | 14 |
| Gambar 2.7 <i>Bacillus cereus</i> S1 | 17 |
| Gambar 2.8 <i>Lactobacillus casei</i> | 18 |
| Gambar 2.9 <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| Gambar 4.1 Pola Pertumbuhan Bakteri Gram Positif yang Terpapar HAuCl_4 | 30 |
| Gambar 4.2 Elektroforegram Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas HAuCl_4 | 36 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 4.1 Pengukuran Kadar Protein Total Bakteri Gram | |
| Positif | 32 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--|---------|
| Lampiran 1: Diagram Alur Penelitian | 45 |
| Lampiran 2: Tabel Hasil Pengukurann Uji Resistensi Isolat terhadap Senyawa Emas H _{Au} Cl ₄ | 46 |
| Lampiran 3: Tabel Nilai Absorbansi Pengukuran Kadar Protein..... | 48 |
| Lampiran 4: Kurva Standar BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)..... | 49 |
| Lampiran 5: Nilai Log BM Pita Marker <i>ExactPro Broad Prestained Protein Leader</i> | 50 |

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Logam berat adalah kelompok logam dengan massa jenis yang lebih besar dari 5 g/cm^3 (Issazadech *et al.*, 2013). Logam emas (Au) juga termasuk dalam logam berat karena memiliki massa jenis $19,32 \text{ g/cm}^3$. Emas merupakan salah satu limbah yang dihasilkan oleh industri elektroplating (Yang dan Li., 2013). Seperti halnya logam berat lainnya, ion emas (Au^{3+}) yang terdapat di alam juga dapat bersifat toksik bagi beberapa makhluk hidup, namun beberapa bakteri mampu mentolerir keberadaan ion emas tersebut. Bakteri yang toleran terhadap ion emas memiliki kemampuan resistensi yang mungkin tidak dimiliki oleh bakteri lain diantaranya ialah bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki kemampuan resistensi terhadap logam berat lebih tinggi daripada bakteri Gram negatif dikarenakan dinding selnya mengandung peptidoglikan lebih tebal yang menjadi tempat pengendapan logam lebih efisien daripada bakteri Gram negatif. Interaksi ion logam dan dinding sel bakteri sel bakteri Gram positif menunjukkan adanya peranan gugus karboksil pada peptidoglikan dan atau gugus fosforil pada polimer sekunder asam teikoat dan teikuronat (Slavin *et al.*, 2017).

Bakteri yang resisten terhadap logam emas berpotensi digunakan sebagai biosorben dan bioakumulator sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agensia bioremediasi pencemaran logam emas. Bakteri mampu resisten terhadap logam emas karena bakteri mempunyai mekanisme biotransformasi, bioadsorpsi, biosorpsi, bioakumulasi dan/atau biopresipitasi baik secara fisik, mekanis, ataupun enzimatik. Bakteri dari Genera *Bacillus*, *Lactobacillus*, dan *Staphylococcus* termasuk bakteri Gram positif telah teruji resistensinya terhadap beberapa logam berat antara lain logam Cd, Cu, Cr, Pb, dan Hg (Pal *et al.*, 2017), namun belum diketahui kemampuan resistensinya terhadap logam emas sehingga diharapkan juga memiliki kemampuan resisten terhadap

logam emas supaya dapat dijadikan salah satu alternatif agen bioremediasi logam emas. Asam kloroaurat (HAuCl_4) merupakan senyawa kimia yang mengandung logam Au. Bakteri yang resisten terhadap logam Au akan mereduksi Au^{3+} dalam HAuCl_4 menjadi nanopartikel Au (AuNP) sehingga tidak lagi bersifat toksik (Koperuncholan *et al.*, 2015). Penelitian sebelumnya, isolat bakteri yang resistensi terhadap logam emas ditumbuhkan pada medium agar padat yang terpapar logam emas konsentrasi 0,1 ppm (Fitria dan Zulaika, 2017). Hal tersebut memiliki kekurangan yakni dimungkinkan isolat yang resisten terhadap logam emas hanya isolat pada bagian atas bukan isolat yang bersentuhan langsung dengan medium agar padat. Oleh karena itu penelitian ini akan menumbuhkan isolat bakteri pada medium cair yang dipapar logam emas sehingga diharapkan seluruh sel bakteri dapat terpapar logam emas dengan konsentrasi logam emas lebih tinggi.

Menurut PP. No.82 tahun 2001, kadar paling tinggi untuk logam berat yaitu yaitu 0,001 ppm. Paparan logam berat dapat menyebabkan terganggunya gugus fungsional protein pada bakteri. Protein yang terganggu diantaranya adalah asam amino, enzim, dan protein metallothioneins yang mengandung gugus sulfhidril (-SH) (Verdian dan Zulaika, 2015). Beberapa protein yang ada di sel bakteri dapat diketahui kualitasnya melalui profil protein. Profil protein adalah suatu pola distribusi protein ditinjau dari berat molekul (Roy dan Vikash, 2012). Paparan logam berat dapat menginduksi gen dalam plasmid sehingga menyebabkan ekspresi protein yang berbeda. Perubahan profil protein yang terganggu oleh logam berat akan berbeda dengan profil protein yang tidak terganggu oleh logam berat. Deteksi profil protein dapat dilakukan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). SDS-PAGE memberikan informasi tentang berat molekul dan komposisi subunit dari setiap kompleks protein (Mulik *et al.*, 2018).

1.2 Rumusan Permasalahan

Rumusan permasalahan dalam penelitian ini yaitu bagaimana ketahanan bakteri Gram positif terhadap HAuCl_4 dan migrasi proteinnya dengan elektroforesis menggunakan SDS-PAGE?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini yaitu isolat bakteri Gram positif yang digunakan untuk uji resistensi adalah isolat *Bacillus cereus* S1, *Lactobacillus* sp., dan *Staphylococcus aureus* dan emas yang digunakan adalah senyawa asam kloroaurat (HAuCl_4).

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui ketahanan bakteri Gram positif terhadap HAuCl_4 dan perbedaan migrasi proteinnya dengan elektroforesis menggunakan SDS-PAGE.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian adalah bakteri yang tahan terhadap HAuCl_4 dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen bioremediasi lahan tercemar emas yang ramah lingkungan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Emas (Au)

Emas merupakan logam transisi dalam tabel periodik yang memiliki simbol Au berasal dari bahasa latin aurum. Emas memiliki konfigurasi elektron $[\text{Xe}] 4f^{14} 6d^{10} 6s^1$ (Ostrounov *et al.*, 2014). Logam ini merupakan salah satu logam berharga karena memiliki sifat yang unik pada stabilitas kimia, konduktivitas listrik, dan mudah ditempa. Emas berwarna kuning dan lunak (titik leleh 1063°C) dengan kemudahan ditarik dan ditempa yang tinggi dibandingkan unsur apapun. Logam ini tidak reaktif dan tidak diserang oleh oksigen atau sulfur namun mudah bereaksi dengan halogen atau dengan larutan yang mengandung atau melepaskan klor seperti aqua regia, konduktivitas listrik yang baik, dan mampu ditempa. Emas sangat resisten terhadap pelarut oksidatif dan tidak larut dalam kondisi alam disekitarnya (Agtuca, 2014).

Emas merupakan logam inert dimana dalam reaksi kimia emas tidak mudah bereaksi dengan unsur lain dan cenderung tereduksi. Emas juga termasuk ke dalam salah satu logam mulia, bersifat non esensial bagi tubuh, dan memiliki efek toksik bagi organisme pada konsentrasi tertentu. Emas merupakan salah satu dari sepuluh elemen paling langka di kerak bumi dengan konsentrasi rata-rata 5 ng/g tanah. Distribusi emas tidak merata sehingga ada bagian yang memiliki konsentrasi emas tinggi ada pula sebaliknya. Pada permukaan tanah, emas sering ditemukan dalam bentuk larutan sebagai logam koloid (Au^0), aurous (Au^{+1}) dan auric (Au^{+3}) (Shuster dan Reith, 2018).

Logam emas juga termasuk dalam logam berat karena memiliki massa jenis $19,32 \text{ g/cm}^3$. Logam berat adalah kelompok logam dengan massa jenis yang lebih besar dari 5 g/cm^3 (Issazadech *et al.*, 2013). Dalam industri jenis emas yang digunakan yaitu senyawa natrium dicyanoaurat ($\text{NaAu}(\text{CN})_2$) sebagai pelapis elektroda dan asam kloroaurat (HauCl_4) untuk

bidang obat-obatan dan pelapis keramik. Emas merupakan salah satu limbah yang dihasilkan oleh industri elektroplating (Yang dan Li., 2013).

2.2 Toksisitas Emas

Emas merupakan salah satu limbah yang dihasilkan oleh industri elektroplating (Yang dan Li., 2013). Seperti halnya logam berat lainnya, ion emas (Au^{3+}) yang terdapat di alam juga dapat bersifat toksik bagi beberapa makhluk hidup. Kandungan emas alami dapat terpecah menjadi ion emas yang dapat bersifat toksik bagi makhluk hidup, namun beberapa bakteri mampu mentolerir keberadaan ion emas tersebut. Bakteri yang toleran terhadap ion emas memiliki kemampuan resistensi yang mungkin tidak dimiliki oleh bakteri lain.

Toksisitas emas sama halnya dengan logam berat lainnya yaitu tergolong dalam sitotoksik. Agtuca (2014) menyebutkan bahwa penggunaan nanopartikel emas dalam pestisida, pupuk dan remediasi tanah akan menyebabkan bioakumulasi pada tanah. Lahan yang mengandung nanopartikel emas (AuNP) dengan konsentrasi 60 ppm akan menyebabkan biotoksisitas dan nekrosis pada tanaman yang tumbuh di atasnya. Cekaman nanopartikel emas ukuran 3,5 nm konsentrasi 60 ppm menyebabkan perubahan pada DNA-binding dan kerusakan sel-sel akar. Nanopartikel akan masuk ke dalam sel dan menyebabkan lisis sel akar (Agtuca, 2014). Akumulasi nanopartikel emas 14 nm dengan menyuntikkan nanopartikel emas dosis 0,9 , 9, dan 90 μg pada hewan uji tikus menyebabkan kerusakan sel hati dan ginjal (Rambanapsi *et al.*, 2016).

Pada organisme perairan, akumulasi logam emas pada konsentrasi yang tinggi akan mempengaruhi materi genetik dari *Danio rerio* (*zebra fish*). Gen tersebut meliputi regulator stres oksidatif (*sod1 sod2*), gen regulasi mitokondria (*cox1*), regulator perbaikan DNA (*gaad dan rad51*), detoksifikasi logam (*mt2*) dan regulator neurotransmitter (*ache*). Pada konsentrasi 0,8 mg/L emas mampu mempengaruhi peningkatan ekspresi gen terutama

untuk gen *mt*, *gaad*, dan *ache*. Meningkatnya ekspresi gen tersebut menunjukkan adanya aktivitas sel yang lebih untuk menjaga kestabilan sel (Dedeh *et al.*, 2014).

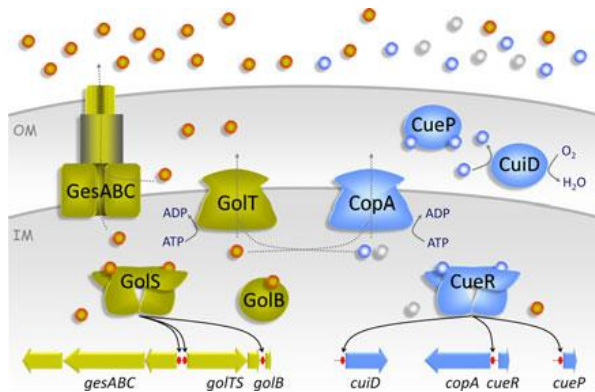
Bioakumulasi logam emas dalam bentuk nanopartikel pada organ reproduksi dapat menyebabkan kerusakan DNA pada sel ovarium. Nanopartikel emas mampu memecah untai DNA pada sel ovarium. Hal ini menjadi salah satu penyebab perubahan degeneratif dan penurunan kinerja reproduksi betina. Penelitian tersebut membuktikan bahwa akumulasi nanopartikel emas dapat mengganggu fungsi reproduksi betina normal dengan adanya induksi efek sitotoksik pada sel struktural ovarium. Hal tersebut mengganggu pematangan kogenesis, folikel, dan merubah tingkat hormon seksual (Dayah *et al.*, 2017). Namun efek akumulasi logam emas pada tubuh manusia belum diteliti dengan detail (Rambanapsi *et al.*, 2017).

2.3 Bakteri Resisten Emas

Seperti halnya logam berat lainnya, logam emas yang terdapat di alam juga dapat bersifat toksik bagi beberapa makhluk hidup (Reith *et al.*, 2007). Namun beberapa bakteri mampu mentolerir keberadaan logam emas. Bakteri tersebut memiliki kemampuan resistensi emas yang tidak dimiliki oleh bakteri lain maupun makhluk hidup lain. Bakteri yang mampu meresistensi keberadaan ion emas contohnya *Cupriavidus metallidurans*, *Salmonella enterica*, dan *Micrococcus luteus* (Reith *et al.*, 2007).

Kemampuan resistensi bakteri terhadap logam emas tersebut dikarenakan adanya kompleksasi oleh ligan oleh adanya gugus sulfhidril pada sel bakteri. Gugus tersebut memiliki afinitas tinggi sehingga mampu mengikat logam berat. Asam amino sistein dan metionin juga terikat dalam resistensi ion emas (Susana *et al.*, 2011). Mekanisme lain yaitu secara aktif mengangkut ion emas dari periplasma ke sitoplasma dan sebaliknya yang bertujuan untuk menjaga keseimbangan antara sitoplasma dan membran sel. Dalam mekanisme enzimatik menurut Susana *et al* (2011) juga menjelaskan bahwa terdapat

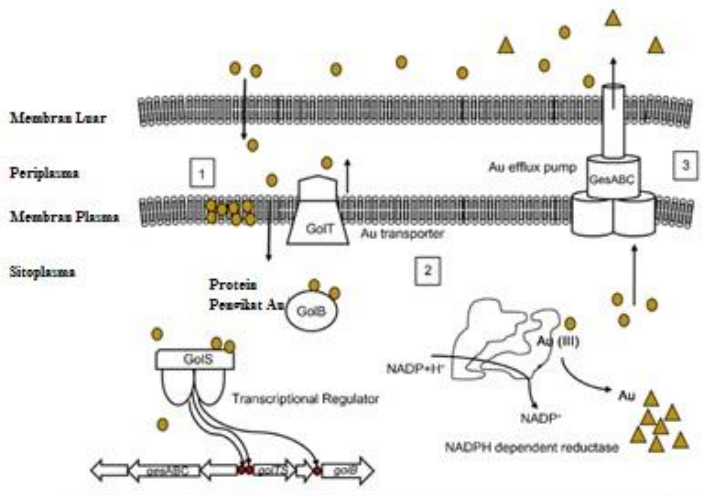
gen yang bertanggung jawab terhadap resistensi logam emas. Induksi logam emas akan mengaktifkan beberapa protein seperti GoIS, GoIT, GoIB. GoIS merupakan protein yang meregulasi proses transkripsi, GoIT merupakan protein yang berada pada periplasma, serta GoIB merupakan protein yang mengikat logam emas pada sitoplasma. Protein-protein tersebut diinduksi oleh suatu gen yang disebut dengan *gold induced genes (gig)*. Terdapat beberapa macam *gig* seperti *gigP* berfungsi untuk menginduksi protein periplasmik, *gigA* dan *gigB* berfungsi untuk menginduksi protein sitoplasmik, serta *gigT* berfungsi untuk menginduksi protein transmembran (Wiesemann *et al.*, 2013). Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam emas dapat diketahui melalui Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Mekanisme Gen Resisten terhadap Logam Emas pada Sel Bakteri (Susana *et al.*, 2011)

Sistem transportasi adalah garis pertahanan yang signifikan terhadap efek beracun biosorpsi dan bioakumulasi emas, pompa effluks yang terletak di membran plasma akan memainkan peran penting dalam pembuangan ion emas yang berlebihan dari sitoplasma, dan setelah beberapa saat memungkinkan untuk mempertahankan keadaan ekuilibrium antara membran plasma

dan sitoplasma. Namun, jika ruang sitoplasma dilengkapi dengan mengurangi kation emas menjadi emas metalik dan menghasilkan bionanopartikel dengan efek kurang beracun. Ada kemungkinan bahwa vesikel dalam sitoplasma terlibat dalam rantai transpor elektron, dan oleh karena itu pengurangan partikel emas dapat terjadi di sana (Johnson *et al.*, 2017). Mekanisme tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Mekanisme Transportasi Logam Emas dalam Sel Bakteri (Johnson *et al.*, 2017).

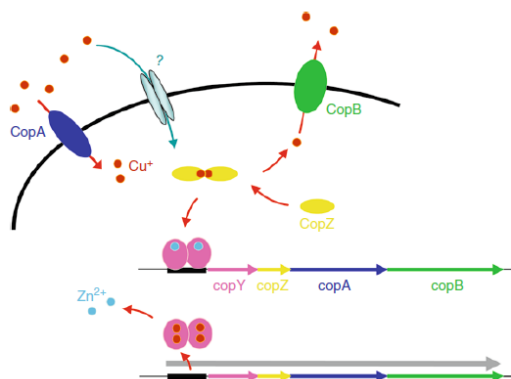
Pada Gambar 2.2 merupakan penggambaran oleh Johnson *et al* (2017). Tanda bulat kuning mewakili Au (III) atau Au³⁺ dan tanda segitiga mewakili partikel emas yang telah direduksi menjadi Au nanopartikel (AuNP) atau Au⁰. Mekanisme pertama adalah penyerapan logam berat Au pada lapisan membran plasma. Mekanisme kedua mencakup pengurangan ion logam Au menjadi logam nanopartikel Au dengan toksisitas lebih rendah di sitoplasma. Mekanisme ketiga adalah mengangkut ion logam Au

ke dalam sitoplasma menuju protein periplasmik dan mengeluarkan ion Au.

2.4 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Logam Berat Lain

2.4.1 Resistensi terhadap Logam Cu

Pada penelitian yang dilakukan oleh Solioz *et al* (2011) menggunakan bakteri Gram positif *Lactobacillus* sp. menjelaskan bahwa mekanisme resistensi logam Cu bakteri Gram positif dipengaruhi oleh beberapa gen yaitu *copY*, *copZ*, *copA*, dan *copB*. Mekanisme resistensi bakteri Gram positif terhadap Cu dapat diketahui melalui Gambar 2.3.



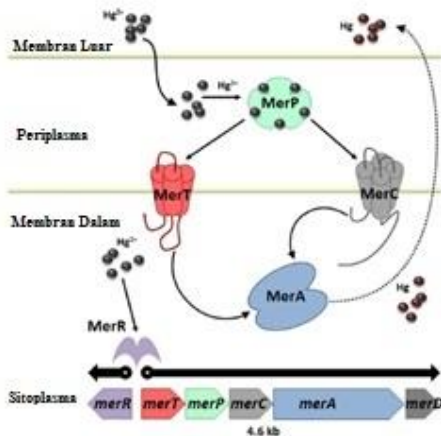
Gambar 2.3 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap logam Cu (Solioz *et al.*, 2011).

Logam Cu masuk ke dalam sel melalui CopA dengan celah nonspesifik. Setelah berada di sitoplasma Cu diikat oleh *copZ*, kemudian mendonorkan Cu⁺ pada *copB* untuk ditransfer keluar sel. Selain itu Cu⁺ ditransfer kepada *copY* untuk menginduksi cop operon. Pada beberapa spesies bakteri Gram positif terdapat CopA dan CopB, yang mana fungsi dari CopA dan CopB antara satu spesies dengan spesies lain akan berbeda. Pada *B. subtilis*

copA berfungsi sebagai pompa eksport Cu^+ , sedangkan CopB pada *E. Hirae* bertanggung jawab sebagai pompa eksport Cu^+ (Solioz *et al.*, 2011).

2.4.2 Resistensi terhadap Logam Hg

Pada dasarnya mekanisme resistensi bakteri terhadap merkuri (Hg) memerlukan pengurangan Hg^{2+} menjadi Hg^0 dalam sitoplasma bakteri oleh enzim merkuri reduktase dikodekan oleh gen *merA* (Pal *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Iftitta *et al* (2013) mengatakan bakteri Gram positif contohnya *Bacillus cereus* S1 telah terbukti resisten terhadap Hg hingga konsentrasi 2,5 ppm, sehingga *Bacillus cereus* S1 memiliki toleransi yang baik terhadap logam, sebab Hg merupakan logam berat yang paling toksik dibandingkan logam berat lainnya. Mikroba yang hidup pada lingkungan kaya logam cenderung lebih resisten terhadap logam berat daripada yang hidup di lingkungan tidak kaya logam. Mekanisme resistensi bakteri Gram positif terhadap logam Hg dapat diketahui melalui Gambar 2.4



Gambar 2.4 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap logam Hg (Pal *et al.*, 2017).

Mekanisme resisten merkuri bakteri Gram positif adalah sebagai berikut Hg (II) yang masuk periplasma terikat ke pasangan residu sistein MerP. Selanjutnya MerP mentransfer Hg (II) ke residu sistein MerT atau MerC. Akhirnya ion Hg menyeberang membran sitoplasma melalui proses reaksi pertukaran ligan menuju sisi aktif flavin disulfide oksidoreduktase, merkuri reduktase (MerA). Merkuri reduktase mengkatalisis reduksi Hg (II) menjadi Hg (0) volatil dan sedikit reaktif. Akhirnya Hg (0) berdifusi dilingkungan sel untuk selanjutnya dikeluarkan dari sel. Bakteri yang hanya memiliki protein merkuri reduktase (MerA) disebut dengan bakteri resisten merkuri spektrum sempit. Beberapa bakteri selain memiliki protein merkuri reduktase (MerA) juga memiliki protein organomerkuri liase MerB). MerB berfungsi dalam mengkatalisis pemutusan ikatan merkuri-karbon sehingga dihasilkan senyawa organik dan ion Hg yang berupa garam tiol. Bakteri yang memiliki kedua protein merkuri reduktase (MerA) dan organomerkuri liase (MerB) disebut dengan bakteri resisten merkuri spektrum luas (Pal *et al.*, 2017).

2.4.3 Resistensi terhadap Logam Pb

Bakteri Gram positif seperti halnya *Staphylococcus aureus* telah terbukti memiliki kemampuan resistensi terhadap logam timbal (Pb). Mekanisme resistensi timbal operasional pada bakteri yaitu sebagai berikut: (1) tipe PIB ATPase dimediasi penghabisan timbal, (2) timbal penyerapan oleh metallothionein (BmtA), (3) penyerapan timbal di eksopolisakarida, (4a) adsorpsi permukaan sel timbal, (4b) biosorpsi timbal dalam dinding sel dan ruang periplasma (bioakumulasi), (5a) timbal diendapkan oleh bakteri penurun sulfat, (5b) menyebabkan presipitasi yang dikatalisis oleh enzim fosfatase (PbrB) (Naik *et al.*, 2013). Mekanisme resistensi bakteri Gram positif terhadap logam Pb dapat diketahui melalui Gambar 2.5.



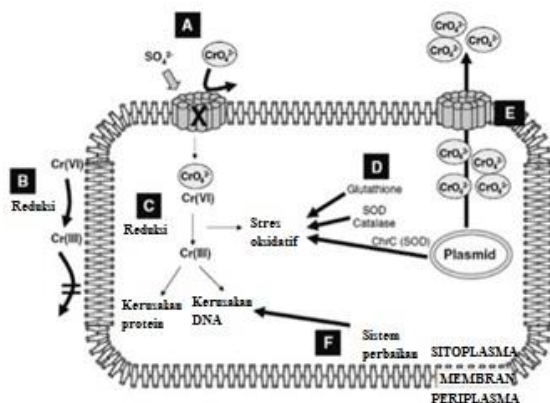
Gambar 2.5 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap logam Pb (Naik *et al.*, 2013).

Bakteri dapat mentoleransi adanya logam Pb karena adanya transport aktif logam Pb dengan pompa ATP. Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam timbal (Pb) terjadi ketika keberadaan Pb^{2+} diluar sel dalam jumlah yang banyak. Kemudian Pb^{2+} akan berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) yang berada pada membran sel. Pb^{2+} akan diikat oleh PbrT di periplasma untuk ditransfer ke sitoplasma. Selanjutnya, pada sitoplasma terdapat PbrD yang mengikat Pb^{2+} . Kemudian Pb^{2+} ditansfer menuju PbrA dimana merupakan protein efflux ATPase. Proses tersebut akan menghasilkan ADP dan Pi. Setelah itu, Kristal Pb akan dikeluarkan melalui PbrC. Proses tersebut juga melibatkan beberapa protein seperti PbrT yang berfungsi mentransport Pb^{2+} menuju sitoplasma, PbrA yang berfungsi sebagai protein efflux ATPase, PbrB dan PbrC yang memfasilitasi lipoprotein dan prolipoprotein signal peptidase ketika transport Pb, PbrD berfungsi dalam sekuestrasi sitoplasmik Pb, serta PbrR berfungsi untuk memediasi Pb yang diinduksi dari promotor yang berbeda dan meregulasi ekspresi dari operan *pbr*. Terdapat gen-gen yang berperan pada bakteri dalam mekanisme resistensi terhadap logam Pb seperti gen *pbrA*. Gen tersebut berkaitan dengan P-type kation translocating ATPase. ATPase memfasilitasi proses difusi

transporter dari sitoplasma menuju periplasma (Naik *et al.*, 2013).

2.4.4 Resistensi terhadap Logam Cr

Mekanisme resistensi bakteri Gram positif terhadap logam kromium (Cr) terjadi pada jalur kromat melalui sulfat transporter karena memiliki bentuk yang mirip (kromat : CrO_4^{2-} sedangkan sulfat SO_4^{2-}). Kemudian, plasmid DNA mengkode sistem efflux. Setelah itu, terjadi reduksi Cr^{6+} menjadi Cr^{3+} melalui reduksi NADPH. Reduksi Cr tersebut melibatkan protein ChrR yang berada pada periplasma. Kemudian, terbentuk ROS dari siklus redoks Cr^{6+} menjadi Cr^{5+} . Untuk mengatasi ROS, sel akan mengekspresikan enzim protektif seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathionin. Proses reduksi Cr^{6+} menjadi Cr^{3+} mengakibatkan kerusakan DNA dan merubah ekspresi gen. Sehingga, akan terjadi pengaktifan sistem perbaikan DNA untuk memperbaiki DNA (Vaiopoulou dan Gikas, 2011). Mekanisme resistensi bakteri Gram positif terhadap logam Cr dapat diketahui melalui Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap logam Cr (Vaiopoulou dan Gikas, 2011).

2.5 Peptidoglikan pada Bakteri Gram Positif

Perbedaan bakteri Gram positif dan Gram negatif didasarkan pada pewarnaan Gram pada bakteri. Pewarnaan Gram dikembangkan oleh Hans Christian Gram pada tahun 1884. Reaksi pewarnaan Gram berdasarkan retensi pewarna *crystal violet* dalam dinding sel bakteri dikompleksasikan dengan yodium. Bakteri Gram positif akan mempertahankan pewarna saat terdekolorisasi oleh alkohol, sedangkan bakteri Gram negatif akan kehilangan pewarna karena terdekolorisasi oleh alkohol sehingga dapat terwarnai oleh pewarna pembanding yaitu safranin (Thairu *et al.*, 2016).

Bakteri Gram positif terlihat berwarna ungu karena asam-asam ribonukleat pada sitoplasma sel-sel Gram positif membentuk ikatan yang lebih kuat dengan kompleks ungu kristal violet sehingga ikatan kimiawi tersebut tidak mudah dipecahkan oleh pemucat warna. Reaksi tersebut didasarkan atas perbedaan komposisi kimiawi dinding sel. Sel Gram positif mempunyai dinding dengan lapisan peptidoglikan yang tebal daripada bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif terlihat berwarna merah muda. Bakteri Gram negatif mengandung lipid dan lemak dalam persentase yang lebih tinggi daripada bakteri Gram positif, selain itu bakteri Gram negatif juga memiliki peptidoglikan yang lebih tipis daripada bakteri Gram positif (Madigan *et al.*, 2005).

Bakteri Gram positif memiliki kemampuan resistensi terhadap logam berat lebih tinggi daripada bakteri Gram negatif dikarenakan dinding selnya mengandung peptidoglikan lebih tebal yang menjadi tempat pengendapan logam lebih efisien daripada bakteri Gram negatif. Interaksi ion logam dan dinding sel bakteri sel bakteri Gram positif menunjukkan adanya peranan gugus karboksil pada peptidoglikan dan atau gugus fosforil pada polimer sekunder asam teikoat dan teikuronat (Slavin *et al.*, 2017).

Bacillus, *Lactobacillus*, dan *Staphylococcus* merupakan contoh beberapa genus dari bakteri Gram positif. *Bacillus* adalah bakteri Gram positif berbentuk batang yang memiliki endospora,

Lactobacillus adalah bakteri Gram positif berbentuk batang dan tidak memiliki endospora, sedangkan *Staphylococcus* adalah bakteri Gram positif berbentuk bulat (Holt *et al.*, 1994).

2.6 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus merupakan bakteri di alam yang jumlah dan keanekaragamannya cukup tinggi baik spesies, habitat maupun potensinya. Klasifikasi ilmiah *Bacillus cereus* menurut NCBI adalah sebagai berikut:

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clasis : Bacilli

Ordo : Bacillales

Familia : Bacillaceae

Genus : Bacillus

Spesies : *Bacillus cereus*

Bacillus cereus S1 dapat diisolasi dari berbagai macam habitat sampai habitat yang ekstrim seperti lingkungan yang tercemar (Zulaika *et al.*, 2013). *Bacillus cereus* memiliki karakteristik berbentuk batang lurus dengan ukuran 0,5-2,5 x 1,2-10 μm , termasuk bakteri Gram positif, bersifat motil, mampu membentuk endospora, katalase positif, dan bersifat anaerob fakultatif (Holt *et al.*, 1994).

Bacillus cereus S1 adalah bakteri yang diisolasi dari Kalimas Surabaya dan telah teruji resistensinya terhadap beberapa logam berat yaitu logam Hg, Cd, Pb, Cu (Zulaika *et al.*, 2012), dan Cr (Sari dan Zulaika.,2015). Morfologi sel *Bacillus cereus* S1 dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 *Bacillus cereus* S1 dengan perbesaran 1000x (Zulaika *et al.*, 2012)

2.7 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus merupakan bakteri yang banyak terdistribusi di alam (Holt *et al.*, 1994). Klasifikasi *Lactobacillus* sp. menurut NCBI sebagai berikut:

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clasis : Bacilli

Ordo : Lactobacillales

Familia: Lactobacillaceae

Genus : *Lactobacillus*

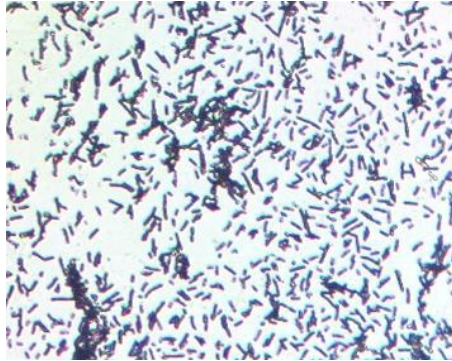
Spesies : *Lactobacillus* sp.

Lactobacillus dapat diisolasi dari berbagai macam habitat sampai habitat ekstrim seperti tanah yang tercemar logam berat (Ogunnusi dan Oyetunji, 2017). *Lactobacillus* sp. memiliki karakteristik berbentuk batang lurus dengan ukuran 0,5-1,0 x 1,0-10 μm , termasuk bakteri Gram positif, tidak memiliki endospora, tidak motil, bersifat anaerob, dan mampu memfermentasi asam laktat (Holt *et al.*, 1994).

Lactobacillus sp. termasuk *Lactic Acid Bacteria* (LAB) yaitu kelompok bakteri yang mampu memfermentasi asam laktat. LAB

telah teruji resistensinya terhadap logam berat antara lain Pb, Cu, dan Hg (Pal *et al*, 2017).

Morfologi sel *Lactobacillus* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 *Lactobacillus* sp. dengan perbesaran 1000x (Somnath *et al.*, 2017)

2.8 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus ialah salah satu bakteri Gram positif berbentuk kokus atau bulat bergerombol seperti anggur dengan diameter sel 0,5-1,5 μm . *Staphylococcus* bersifat anaerob fakultatif, kemoorganotrof, dan oksidase negatif (Holt *et al.*, 1994). Klasifikasi ilmiah *Staphylococcus aureus* menurut NCBI adalah sebagai berikut:

Domain: Bacteria

Phylum : Firmicutes

Clasis : Bacilli

Ordo : Lactobacillales

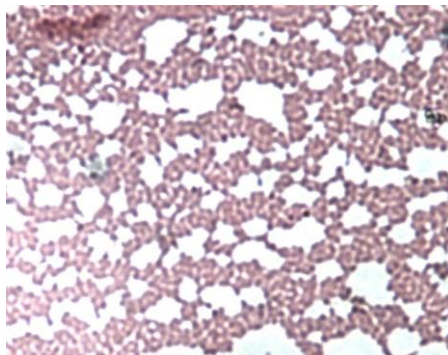
Familia : Staphylococcaceaceae

Genus : Staphylococcus

Spesies : *Staphylococcus aureus*

Salah satu spesies dari genus *Staphylococcus* yaitu *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* telah teruji resistensinya terhadap beberapa logam berat antara lain Zn, Pb,

dan Cd (Chudobova *et al.*, 2015). Morfologi sel *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 *Staphylococcus aureus* dengan perbesaran 1000x (Zulaika *et al.*, 2012)

2.9 Profil Protein dengan SDS-PAGE

Protein merupakan polipeptida yang berlipat membentuk struktur biologi yang aktif. Terdapat 2 jenis protein, yaitu protein struktural, contohnya protein penyusun dinding sel dan protein fungsional, contohnya enzim (Tropp, 2012). Profil protein adalah suatu pola distribusi protein ditinjau dari berat molekul. Perubahan profil protein pada bakteri yang terpapar oleh logam berat akan berbeda dengan profil protein bakteri yang tidak terpapar oleh logam berat. Deteksi profil protein dapat dilakukan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). SDS-PAGE memberikan informasi tentang berat molekul dan komposisi subunit dari setiap kompleks protein (Mulik *et al.*, 2018).

SDS-PAGE merupakan teknik untuk memisahkan protein berdasarkan arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang rantai polipeptida atau berat molekulnya, hal ini dilakukan dengan cara menambahkan deterjen SDS dan pemanasan untuk merusak struktur tiga dimensi pada protein dengan terpecahnya ikatan

disulfide yang selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfidhidril (Patricia dan Irawati, 2017).

Prinsip kerja SDS-PAGE melibatkan denaturasi awal protein komponen dengan deterjen anionik yang juga mengikat protein, memberikan semua protein muatan negatif sebanding dengan massa molekul protein. Langkah ini diikuti dengan elektroforesis melalui akrilamida matriks gel berpori yang memisahkan protein berdasarkan berat molekul. Molekul-molekul yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat pada gel, sedangkan molekul yang lebih besar akan bergerak secara lambat sehingga menghasilkan pita yang dekat dengan well pada gel (Nowakowski *et al.*, 2014).

Menurut Arsad *et al* (2012), logam berat yang masuk ke dalam sel berbentuk ion dan bersenyawa dengan gugus fungsional pada protein melalui ikatan ligan membentuk senyawa kompleks metaloprotein. Logam berat non esensial yang berikatan dengan protein dapat menyebabkan toksis. Semakin banyak logam berat yang terakumulasi dalam sel bakteri maka semakin banyak sel yang mengalami ekspresi protein (Rumahlatu *et al.*, 2012). Paparan logam berat dapat menginduksi gen dalam plasmid sehingga menyebabkan ekspresi protein yang berbeda. Perbedaan ekspresi protein diketahui melalui pita protein pada SDS-PAGE. Pita protein bakteri yang terpapar logam berat menunjukkan perbedaan dengan pita protein yang tidak terpapar logam berat (Susana *et al.*, 2017). Bakteri yang mampu mentoleransi keberadaan logam Au memiliki pita protein yang terletak pada berat molekul 35–40 kDa. Adanya protein tersebut menyebabkan bakteri resisten terhadap logam Au (Makumere *et al.*, 2012).

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 hingga Juni 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja

3.2.1 Isolat yang Digunakan

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Bacillus cereus* strain S1 (Zulaika *et al.*, 2012), *Lactobacillus* sp., dan *Staphylococcus aureus*. Isolat tersebut merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

3.2.2 Persiapan dan Subkultur Isolat

Sub kultur isolat bertujuan meremajakan isolat yang akan diuji sehingga isolat dalam kondisi optimal ketika dilakukan pengujian. Subkultur isolat *Bacillus cereus* strain S1 dilakukan dengan menggunakan *Nutrient Agar (NA) slant*, *Lactobacillus* sp. menggunakan *De Man Rogosa dan Shape Agar (MRSA)*, dan *Staphylococcus aureus* menggunakan *Manitol Salt Agar (MSA)* yang telah disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Isolat diambil satu ose kemudian dinokulasi dengan metode *continue streak slant* dan dinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Keberhasilan subkultur ditandai dengan tumbuhnya isolat pada medium miring NA (Harley dan Prescott, 2002).

3.2.3 Pembuatan Media *Mineral Salt Medium* (MSM)

Pembuatan media *Mineral Salt Medium* (MSM) bertujuan supaya isolat mampu beradaptasi dengan MSM. MSM

broth dibuat dengan melarutkan 0,2 g MgSO_4 ; 0,02 g CaCl_2 ; 1 g KH_2PO_4 ; 1 g K_2HPO_4 ; 1 g NH_4NO_3 ; dan 0,05 g FeCl_3 dalam 1 L aquades (Fitria dan Zulaika, 2018).

Komposisi MSM dimodifikasi dari Aboelwafa (2009) dengan penambahan glukosa 2% sebagai sumber C dengan volume medium adalah 200 ml. Kemudian media disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Fitria dan Zulaika, 2018).

3.2.4 Aklimatisasi Isolat pada Media MSM

Aklimatisasi bertujuan supaya isolat mampu beradaptasi dengan MSM *broth* + glukosa 2%. Isolat subkultur diambil sebanyak 2-3 ose kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml MSM *broth*+glukosa 2% kemudian diinkubasi di *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Medium yang telah berisi isolat dituang ke dalam 180 ml MSM *broth*+glukosa 2% kemudian diinkubasi di *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam dan dilakukan pengukuran tiap 2 jam dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 600 nm (Fitria dan Zulaika, 2018).

3.2.5 Uji Resistensi Isolat terhadap HAuCl_4

Uji resistensi terhadap HAuCl_4 dilakukan dengan tujuan mengetahui apakah isolat uji mampu tahan ketika terpapar oleh logam emas dalam HAuCl_4 . Uji ketahanan dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada MSM cair + glukosa 2%- HAuCl_4 . Kultur hasil aklimatisasi MSM cair+glukosa 2% sebanyak 20 ml dimasukkan ke dalam 180 ml MSM cair+glukosa 2% yang mengandung HAuCl_4 dengan konsentrasi 0,1 ppm; 1 ppm; 5 ppm; 10 ppm dan MSM tanpa HAuCl_4 sebagai kontrol. Kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 600 nm (Verdian dan Zulaika, 2015). Pengukuran dilakukan tiap 2 jam. Data OD yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x

sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai nilai OD (Sari dan Zulaika, 2013).

3.2.6 Pengukuran Kadar Protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) Fraction V sebagai standar protein. Sebanyak 100 mg BSA ditimbang dan ditambahkan 25 ml aquades. Larutan kemudian dikocok pelan-pelan, setelah larut, diencerkan sampai 50 ml. Konsentrasi akhir larutan stok untuk standar ini adalah 2 mg/ml. Kemudian sederetan larutan standar dibuat dengan menggunakan larutan stok. Langkah selanjutnya adalah memipet masing-masing larutan sampel dalam tabung sebanyak 0,1 ml dan sebanyak 5 ml pereaksi Bradford ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Blanko dibuat dengan cara mencampurkan 0,1 ml dan direaksikan dengan 5 ml pereaksi Bradford. Setelah 5 menit, masing-masing campuran reaksi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer panjang gelombang 595 nm (Baehaki *et al.*, 2011).

3.2.7 Uji Profil Protein

Profil protein bakteri yang terpapar logam emas ditentukan dengan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polycrylamide Gel Electrophoresis*), melalui beberapa tahapan yaitu preparasi sampel protein, preparasi gel poliakrilamid, proses *running*, proses pewarnaan serta pencucian gel poliakrilamid.

3.2.7.1 Preparasi Sampel Protein

Kultur isolat yang telah terpapar HAuCl_4 dipanen. Kultur disentrifugasi 4.000 rpm selama 15 menit untuk menghasilkan supernatan (medium pertumbuhan) dan *pellet* (sel). *Pellet* dicuci dengan *buffer* fosfat pH 7 untuk menghilangkan medium yang tersisa sehingga dihasilkan sel bebas medium. Sel disuspensikan ke dalam 25 ml *buffer* fosfat pH 7 kemudian disonikasi selama 45 detik (OD bakteri= 0,8) untuk memecah sel secara mekanik.

Ekstrak hasil sonikasi disentrifugasi 13.000 rpm selama 5 menit untuk menghasilkan supernatan (protein intraseluler) dan *pellet* (pecahan membran dan dinding sel). Supernatan digunakan untuk analisis protein intraseluler.

Sampel dipekatkan dengan menggunakan aseton (perbandingan 1:2). Sampel diinkubasi pada suhu -20°C selama satu malam. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan *pellet* (protein intraseluler) dan supernatan (aseton). *Pellet* dikeringanginkan selama ± 2 jam pada -20°C dan diresuspensi dengan *buffer* fosfat pH 7 (Patricia dan Irawati, 2017). Sampel kemudian diberi loading dye dan dipanaskan pada suhu 70°C .

3.2.7.2 Preparasi Gel Poliakrilamid

Komposisi gel poliakrilamid terdiri dari *separating gel* 12% dan *stacking gel* 5%. *Stacking gel* yang telah terbentuk diberi sisir yang berfungsi untuk membentuk sumuran.

Pembuatan *separating gel* 12% diawali dengan pengambilan 30% poliakrilamid 4 ml dan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer. Ditambahkan 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 sebanyak 2,6 ml; 0,1 ml SDS 10%; dan aquades sebanyak 3,2 ml. TEMED ditambahkan sebanyak 10 μl dan APS (*Ammonium Presulfate*) 10% sebanyak 100 μl . Campuran dihomogenkan dan segera dimasukkan ke dalam *glass plate* dengan menggunakan pipet mikro sampai 2/3 bagian. Permukaan gel ditambahkan aquades untuk menghindari terbentuknya gelembung dan meratakan permukaan *separating gel*. Didiamkan selama 30 menit hingga gel memadat dan terpolimerisasi. Aquades dibuang dengan diambil menggunakan *syringe*.

Pembuatan *stacking gel* 5% diawali dengan pengambilan poliakrilamid 30% sebanyak 0,83 ml dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer. Ditambahkan Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 sebanyak 0,63 ml dan SDS 10% sebanyak 0,05 ml serta aquades sebanyak 3,04 ml. Ditambahkan TEMED sebanyak 5 μl dan APS 10% sebanyak 50 μl . Campuran dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam *glass*

plate yang sudah berisi *separating gel* 12% dengan menggunakan pipet mikro sampai memenuhi *glass plate*. Kemudian dipasang sisir pada bagian *stacking gel* 5% dan ditunggu selama 30 menit hingga gel memadat. Setelah gel memadat sisir diambil perlahan secara tegak lurus, sehingga membentuk sumuran (Roy and Vikash, 2012). *Glass plate* yang sudah berisi gel poliakrilamid dimasukkan ke dalam chamber. Kemudian dimasukkan 1 liter PBS ke dalam chamber untuk dilakukan running sampel protein.

3.2.7.3 Running SDS-PAGE

Masing-masing sampel protein sebanyak 28 μ l dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran *stacking gel*. Pada salah satu sumuran dimasukkan marker protein dengan volume 10 μ l. *Running* elektroforesis dilakukan dengan tegangan 120 V dan arus 28 A selama 90 menit (Machsun dan Zulaika, 2017). Marker yang digunakan yaitu marker produk *ExactPro Broad Prestained Protein Leader* yang memiliki rentang berat molekul 10 – 245 kDa.

Analisis terhadap profil protein yang muncul pada gel poliakrilamid hasil elektroforesis SDS-PAGE dilakukan dengan mengidentifikasi BM pada pita-pita protein yang terbentuk pada masing-masing sampel, kemudian dibandingkan dengan standar dari marker protein. Penentuan nilai-nilai BM pada pita-pita protein dalam sampel dilakukan dengan menggunakan grafik kalibrasi berat molekul. Hal tersebut dilakukan dengan menentukan jarak migrasi sampel atau nilai *Retardation Factor* (Rf). Nilai Rf dari masing-masing pita yang muncul pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE, dihitung dengan rumus: Rf sama dengan jarak pergerakan protein dari tempat awal/ jarak pergerakan warna dari tempat awal.

Nilai Rf yang telah diperoleh kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi linier $y = ax + b$, dengan y adalah nilai berat molekul dan x adalah nilai Rf sampel. Interpretasi dari profil protein pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE dapat

dibaca dengan membuat persamaan regresi linier dari pita-pita protein yang terdapat di dalam marker *Page-Ruler Low Range Unstained Protein Ladder*. Pita-pita protein tersebut digunakan sebagai standar acuan penentuan BM pita protein dalam sampel-sampel lainnya. Jika persamaan regresi linier menghasilkan R^2 yang nilainya semakin mendekati 1, maka persamaan regresi linier yang diperoleh semakin bagus. Semakin mendekati 1 menunjukkan bahwa persamaan tersebut mendekati kepastian nilai berat molekul dari protein yang dianalisis (Suryohastari, 2016).

Analisis data dilakukan dengan perhitungan berat molekul (BM) dari masing-masing protein yang didasarkan pada standar *marker* yang tersedia. Perhitungan dilakukan dengan mengukur nilai R_f (total jarak *tracking* dari *stacking gel* ke *separating gel*) (a) dibandingkan jarak *tracking* dari *stacking gel* ke masing-masing pita protein yang terbentuk (b), kemudian dicari *retardation factor* (R_f) dengan membagi jarak masing-masing pita dengan jarak *tracking* total (b/a), selanjutnya dihitung nilai log BM dari masing-masing BM pita *marker*. BM pita fragmen polipeptida pada sampel dihitung dengan persamaan linier $\{Y = a + bX\}$ dimana nilai R_f sebagai sumbu X dan nilai log BM sebagai sumbu Y (Hermanto *et al.*, 2015).

3.2.7.4 Pewarnaan dan Pencucian Gel Poliakrilamid

Setelah proses running elektroforesis selesai, gel dilepas dari plate kaca kemudian direndam dalam 20 ml larutan staining sambil digoyang selama 30 menit untuk mewarnai. Larutan staining dibuat dengan mencampurkan *coomassie blue R-250* dengan metanol dan aquades. Larutan ini kemudian dihomogenkan dengan menggunakan stirer dan ditambahkan asam asetat glasial. Kemudian larutan staining dituang kembali ke dalam wadahnya. Setelah itu gel dicuci dengan menggunakan aquades sebanyak 2 kali, lalu direndam dalam 50 ml larutan destaining sambil digoyang selama 30 menit. Larutan destaining dibuat dengan mencampurkan metanol dengan asam asetat glasial

beserta aquades. Larutan dihomogenkan dengan menggunakan stirer. Larutan destaining diganti sebanyak 3 kali atau hingga warna pada gel pudar dan pita protein terlihat jelas (Patricia dan Irawati, 2017).

3.2.8 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan metode deskriptif kuantitatif berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri hasil uji resistensi terhadap logam HAuCl_4 dan berat molekul pada profil protein.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 1V

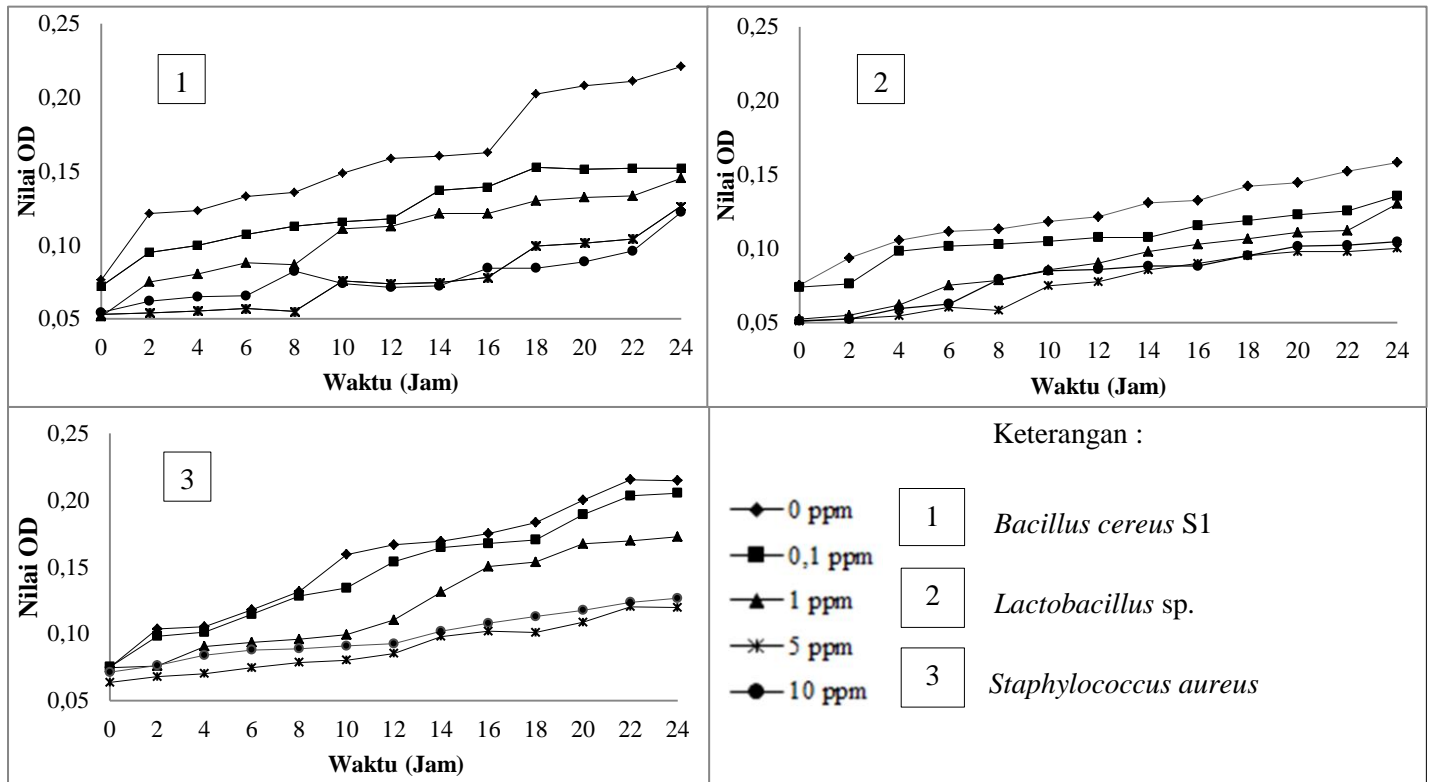
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Resistensi Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas H_{Au}Cl₄

Tujuan uji resistensi adalah untuk mengetahui ketahanan bakteri Gram positif terhadap H_{Au}Cl₄. Hasil inkubasi selama 24 jam menunjukkan *B. cereus* S1, *Lactobacillus* sp., dan *S. aureus* tahan terhadap logam Au (H_{Au}Cl₄). Ketahanan tersebut ditandai dengan meningkatnya kepadatan sel pada medium MSM *broth* + Glukosa 2% yang mengandung H_{Au}Cl₄ sampai dengan 10 ppm. Pola pertumbuhan bakteri yang terpapar H_{Au}Cl₄ lebih rendah dibandingkan yang tidak terpapar (Gambar 4.1).

Fase lag dari semua isolat uji yang terpapar H_{Au}Cl₄ sedikit lebih lambat dibandingkan isolat yang tidak terpapar H_{Au}Cl₄, sebab isolat membutuhkan adaptasi terhadap media yang mengandung H_{Au}Cl₄. Penambahan H_{Au}Cl₄ menyebabkan adanya adaptasi sehingga terjadi perlambatan fase lag. Menurut Gikas *et al* (2018) adanya perbedaan lama fase lag dipengaruhi oleh keberadaan logam berat yang terdapat di dalam medium, semakin tinggi konsentrasi logam berat maka fase lag akan lebih panjang.

Menurut Srinath *et al* (2017), H_{Au}Cl₄ merupakan senyawa anorganik yang mengandung logam emas (Au) dan termasuk logam berat yang memiliki massa jenis 19,32 g/cm³. Pola pertumbuhan bakteri yang terpapar H_{Au}Cl₄ lebih rendah dibandingkan yang tidak terpapar mengindikasikan efek toksik dari logam emas tersebut. Efek toksik tersebut berkaitan dengan adanya perubahan protein, materi genetik, reaksi fisiologis dan metabolisme bakteri (Srinath *et al.*, 2017). Semua isolat uji merupakan bakteri Gram positif dan dapat tumbuh pada medium yang terpapar H_{Au}Cl₄ (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Pola Pertumbuhan Bakteri Gram Positif yang Terpapar HauCl₄

Menurut Slavin *et al* (2017) bakteri Gram positif mempunyai dinding sel mengandung peptidoglikan lebih tebal dari pada bakteri Gram negatif dimana gugus fungsional pada peptidoglikan merupakan tempat terjadinya ikatan ligan dengan logam berat. Ikatan ligan menunjukkan peranan gugus karboksil atau gugus fosforil pada polimer sekunder asam teikoat dan teikuronat yang merupakan komponen peptidoglikan (Slavin *et al.*, 2017).

Bakteri tahan terhadap cekaman logam berat melalui mekanisme adaptasi, hal ini karena adanya transposon dan plasmid yang mengatur sistem resistensi pada bakteri (Baby *et al.*, 2013). Menurut Johnson *et al* (2017), mekanisme resistensi bakteri terhadap logam emas (Au) melalui sistem transport. Mekanisme tersebut melibatkan pompa *efflux* yang terletak pada membran plasma untuk mengeluarkan ion logam emas yang terserap berlebihan di sitoplasma. Proses tersebut berlangsung dengan bantuan regulator transkripsi melalui gen *GoIB*, *GoIS*, *goIT*, dan *gesABC* sehingga logam emas Au^{3+} toksik berubah menjadi logam nanopartikel Au^0 yang toksisitas lebih rendah di dalam sitoplasma. Mekanisme tersebut melibatkan reaksi antara $NADP^-$ dan ion H^+ menjadi $NADP^+$ yang dikatalis oleh *NADPH dependent reductase* sehingga logam emas dikeluarkan dari sitoplasma. (Johnson *et al.*, 2017).

4.2 Pengukuran Kadar Protein Total Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas $H AuCl_4$

Pada uji Bradford semua isolat terdeteksi memiliki protein. Kadar protein yang diperoleh pada uji resistensi isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 4.1. Semua isolat memiliki kadar protein lebih dari 10 mg/ml. Menurut Prasad dan Trivedi (2012) standar kadar protein untuk dapat dilakukan uji profil protein dengan SDS-PAGE yaitu jika protein memiliki kadar ≥ 10 mg/ml.

Berdasarkan Tabel 4.1, semakin tinggi konsentrasi $H AuCl_4$ maka kadar protein semakin tinggi. Menurut Arsad *et al* (2012), logam berat yang masuk ke dalam sel berbentuk ion dan bersenyawa dengan gugus fungsional pada protein melalui ikatan

ligan membentuk senyawa kompleks metaloprotein. Logam berat non esensial yang berikatan dengan protein dapat menyebabkan toksis. Semakin banyak logam berat yang terakumulasi dalam sel bakteri maka semakin banyak sel yang mengalami ekspresi metaloprotein (Rumahlatu *et al.*, 2012).

Tabel 4.1 Pengukuran Kadar Protein Total Bakteri Gram Positif

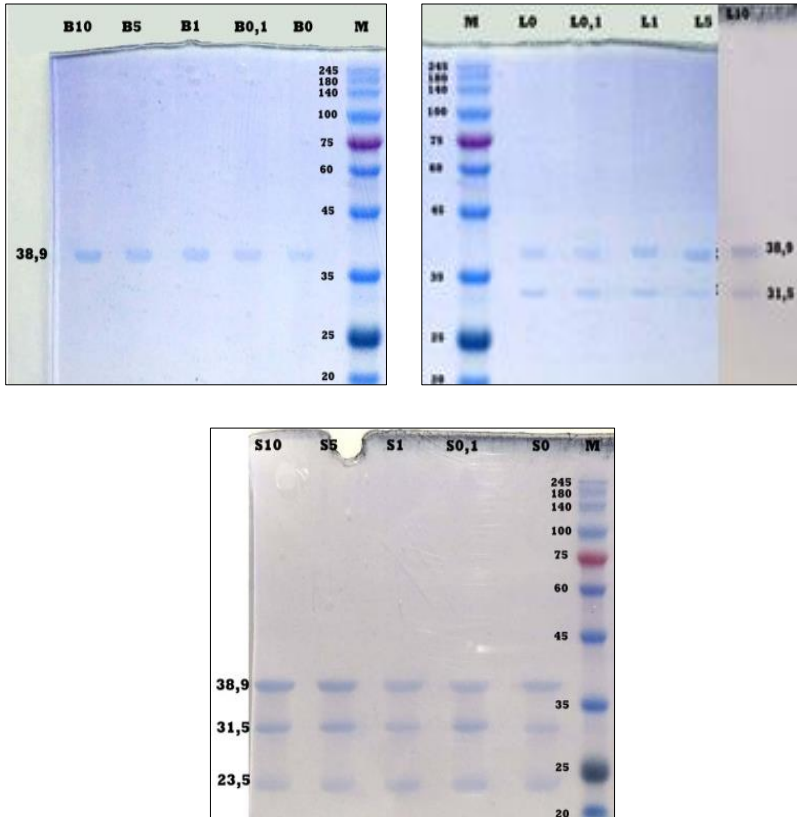
| HAuCl ₄ (ppm) | Kadar Protein (mg/ml) | | |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | <i>Bacillus cereus</i> S1 | <i>Lactobacillus</i> sp. | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 0 | 30,4 | 19,0 | 22,2 |
| 0,1 | 30,6 | 19,2 | 22,6 |
| 1 | 41,8 | 41,6 | 103,2 |
| 5 | 42,4 | 42,0 | 103,4 |
| 10 | 48,6 | 47,6 | 361,5 |

4.3 Profil Protein Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas HAuCl₄

Profil protein bakteri yang terpapar HAuCl₄ setelah dielektroforesis dengan SDS-PAGE menunjukkan pola yang berbeda diantara berat molekul 23,5 – 38,9 kDa (Gambar 4.2). Protein yang menyebabkan bakteri tahan terhadap ion Au memiliki berat molekul yang terletak pada 35 – 40 kDa (Makumere *et al.*, 2012).

B. cereus S1 memiliki 1 pita protein dengan berat molekul 38,9 kDa, *Lactobacillus* sp. memiliki dua pita protein dengan berat molekul 38,9 dan 31,5 kDa, *S. aureus* memiliki 3 pita protein dengan berat molekul 38,9 ; 31,5; dan 23,5 kDa. Protein yang terelektroforesis pada SDS-PAGE dengan berat molekul 38,9 kDa merupakan ekspresi ketahanan protein terhadap Au. Menurut Wiesemann *et al* (2013) ekspresi protein yang

mengindikasikan ketahanan terhadap Au dapat mereduksi Au^{3+} menjadi nanopartikel Au^0 .



Gambar 4.2 Elektrofogram Bakteri Gram Positif terhadap Senyawa Emas HAuCl_4

Keterangan :

M: Marker, B: *B. cereus* S1, L: *Lactobacillus* sp., S: *S. aureus*, 0: 0 ppm HAuCl_4 , 0,1: 0,1 ppm HAuCl_4 , 1: 1 ppm HAuCl_4 , 5: 5 ppm HAuCl_4 , 10: 10 ppm HAuCl_4 .

Bakteri uji yang terpapar HAuCl_4 tinggi (10 ppm) menunjukkan pita protein yang lebih tebal dibandingkan konsentrasi yang rendah (gambar 4.2). Semakin banyak logam yang terpapar maka bakteri akan membentuk protein yang lebih banyak supaya resisten terhadap logam tersebut melalui mekanisme ikatan ligan (Susana *et al.*, 2011). Menurut Arsad *et al* (2012), logam berat yang masuk ke dalam sel berbentuk ion dan bersenyawa dengan gugus fungsional pada protein melalui ikatan ligan membentuk senyawa kompleks metaloprotein. Adanya ikatan ligan menyebabkan perubahan ekspresi protein menjadi protein lain yang berbeda dari yang seharusnya diekspresikan (Susana *et al.*, 2011).

Berdasarkan tabel 4.1 dibandingkan gambar 4.2 ada beberapa protein yang tidak terdeteksi pada SDS-PAGE. Menurut Mahmood dan Yang (2012) beberapa protein lain tidak terlihat atau *smear* dapat disebabkan oleh beberapa hal yaitu: protein telah terdegradasi akibat penyimpanan terlalu lama, voltase terlalu tinggi saat *running* SDS-PAGE, atau adanya kontaminasi lipid sehingga mengganggu distribusi protein pada gel (Mahmood dan Yang, 2012).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri Gram positif (*B. cereus* S1, *Lactobacillus* sp., dan *S. aureus*) tahan terhadap senyawa emas HAuCl_4 sampai dengan konsentrasi 10 ppm dan semua isolat mempunyai protein yang berperan untuk resisten HAuCl_4 pada berat molekul 38,9 kDa.

5.2 Saran

Perlu dilakukan analisis asam amino yang mempunyai gugus fungsional pada protein yang dapat mengekspresikan ketahanan terhadap logam emas.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

Aboelwafa, A.M. dan Alwasify, R.S. 2009. Biodegradation of Crude Oil Using Local Isolates. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Vol. 3 (4): 4742-4751.

Agtuca, B.J. 2014. Gold Nanoparticles in The Enviroment: Studying The Genetic Toxicity and Bioavaible in Soils and Hydroponic Exposures with *Lycopersicon esculentum* (Tomato Brandywine). **Honors Theses**, Paper 37.

Arsad, M., Irwan, S., dan Suherman. 2012. Akumulasi Logam Timbal (Pb) dalam Ikan (*Liza melinoptera*) yang Hidup di Perairan Muara Poboya. **Jurnal Akademi Kimia**, Vol. 1 (4): 187-192.

Baby, V., Rajakumar, S., dan Ayyasamy, P.M. 2014. Prevalence and Screening of Potential Fe(III) and Mn(VI) Resistant Microorganisms in Industrial Soil. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology** Vol. 3 (7): 1-9.

Baehaki, A. Rinto., dan Arief, B. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Protease Dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan. **Jurnal Teknologi dan Industri Pangan**, Vol. 22 (1): 1-6.

Brady, P.N. dan Macnaughtan, M.A. 2015. Evaluation of Colorimetric Assays for Analyzing Reductively Methylated Proteins: Biases and Mechanistic Insights. **Anal Biochem.**, Vol. 15 (491): 43-51.

Chudobovaa, D., Simon, D., Branislav, N., Roma, G., Miguel, A.M.R., Katerina, T., Sona, K., Ondrej, Z., Vojtech, A., dan Rene, K. 2015. The Effect Of Metal Ions on *Staphylococcus aureus* Revealed Bybiochemical and Mass Spectrometric Analyses. **Microbiological Research**, Vol. 170 : 147–156.

Edward dan Bottone. 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 23 (2): 382–398.

Eggers, S., Nasia, S., dan Kristen, M.C.M. 2018. Heavy Metal Exposure and Nasal *Staphylococcus aureus* Colonization: Analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **Environmental Health**, Vol.17 (2): 1-11.

Fitria, A.N. dan Zulaika, E. 2018. Aklimatisasi pH dan Pola Pertumbuhan *Bacillus cereus* S1 pada Medium MSM Modifikasi. **Jurnal Sains dan Seni ITS**, Vol. 7 (2): 39-41.

Gikas, P., Sengor, S.S., Ginn, T., Moberly, J., dan Peyton, B. 2018. The Effects Of Heavy Metals And Temperature on Microbial Growth and Lag. **Global NEST Journal**, Vol 11 (3): 325-332.

Harley dan Presscot. 2002. **Laboratory Exercise in Microbiology**. USA: McGraw-Hill Publisher.

Hermanto, S., Fahrur, R.S., dan Zilhada. 2015. Aplikasi Metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) untuk Mengidentifikasi Sumber Asal Gelatin pada Kapsul Keras. **Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia**, Vol. 1 (1): 26-32.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T dan Williams, S.T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition**. Philadelphia, USA : Lippincot Williams & Wilkins.

Iftita, W.D. Zulaika, E., dan Shovitri, M. 2013. Pengaruh HgCl₂ terhadap Viabilitas *Bacillus* S1 dan Potensi Biodegradasi Limbah Organik. **Jurnal Sains dan Seni ITS**, Vol. 2 (1): 2337-3520.

Issazadeh,K., Nadiya, J., Fataneh, P., Golnaz, R., dan Jamileh, F. 2013. Heavy metals resistance by bacterial strains. **Annals of Biological Research**, Vol. 4 (2): 60-63.

Johnson, H., Kafle, R.C., Choudhary, M. 2017. Cellular Localization of Gold and Mechanisms of Gold Resistance in *Rhodobacter sphaeroide*. **Advances in Microbiology**, Vol. 7: 602-616.

Karimela, E.J., Frans, G.I., dan Henny, A.D. 2017. Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated Smoked Fish Pinekuhe from Traditionally Processed from Sangihe District. **JPHPI**, Vol. 20 (1): 1-11.

Koperuncholan, M. 2015. Bioreduction of Chloroauric Acid (HAuCl₄) For The Synthesis of Gold Nanoparticles (Gnps): a Special Empathies of Pharmacological Activity. **International Journal of Phytopharmacy Research Article**, Vol. 5 (4): 72-80.

Machsun, I.R. dan Zulaika, E. 2017. Profil Protein Bakteri Ureolitik. **Jurnal Sains dan Seni ITS**, Vol.6 (2) : 2337-3520.

Madigan, M.T., David,P., Clarck, D.S., dan John, M.M. 2005. **Brock Microbiology of microorganisms**. San Francisco: Benjamin Cummings publishing.

Mahmood, T dan Yang, P.C. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, Vol. 4 (9): 429-434.

Makumire, S. 2012. Evaluation of The Effects of Gold Nanoparticles (AUNPs) on Protein Folding in *Escherichia coli*. **Thesis Department of Biochemistry and Microbiology**. Faculty of Science and Agriculture, University of Zululand.

Maulana, A., Supartono., dan Mursiti, S. 2017. Bioremediasi Logam Pb pada Limbah Tekstil dengan *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*. Indonesian **Journal of Chemical Science**, Vol. 3 (6): 1-6.

Monachese, M., Jeremy P., Burton dan Gregor, R. 2012. Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics?. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 78 (18): 6397–6404.

Mulik, A., Jina, B., dan Ram, B. 2018. Protein Profiling and Antioxident Enzyme Activity of Cadmium and Lead Tolerant *Kocuria sp.* BRI 36. **International Journal of Applied Engineering Research**, Vol. 13 (10): 8357-8363.

Naik, M.M., Santosh., dan Kumar., D. 2013. Lead resistant bacteria: Lead Resistance Mechanisms, Their Applications in Lead Bioremediation and Biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Vol. 98: 1–7.

Nowakowski, A.B., William, J.W., dan David H.P. 2014. Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins with Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. **Metallomics**, Vol. 6 (5): 1068 – 1078.

Ogunnusi, T. A. dan Oyetunji, O. A. 2017. Isolation of Indigenous Microorganisms from Soil Contaminated with Metal Scraps for The Uptake Of Selected Heavy Metals in Constituted Growth Media. **African Journal of Microbiology Research**, Vol. 11 (46): 1643-1648.

Ostroumov, S.A., Poklonov, V. A., Kotelevtsev, S. V., dan Orlov, S. N. 2014. Toxicity of Gold Nanoparticles for Plants in

Experimental Aquatic System. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, Vol. 69 (3): 108–112.

Pal, C., Karishma, A., Sankalp, A., Christophe,r R., Dov, J. S., Larsson, D.G.J., Jon, L., dan Hobman. 2017. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. **Advances in Microbial Physiology Elsevier Ltd**: ISSN 0065-2911.

Patricia dan Irawati, W. 2017. Profil Protein Isolat Bakteri Resisten Merkuri dari Pertambangan Emas Rakyat di Desa Pongkor, Bogor-Jawa Barat, Indonesia. **Biota**, Vol. 2 (1): 21–28.

Prasad, K.M. dan Trivedi, V. 2012. Engineering High Resolution Horizontal Native PAGE for proteins: potential in biotechnology analytical applications. **International Research Journal of Biotechnology** , Vol. 3 (4) : 40-46.

Rambanapasi, C., Zeevaart, J.R., Bunting, H., Bester, C., Kotze, D., Hayeshi, R., dan Grobler, A. 2016. Bioaccumulation and Subchronic Toxicity of 14 nm Gold Nanoparticles in Rats. **Journal Molecules**, Vol. 21 (6): 2-12.

Reith,F., Maggy, F.L., Donna, F., David, C., dan Gordon, S. 2007. The Geomicrobiology of Gold. **The ISME Journal**, Vol. 1: 567–584.

Roy, S., dan Vikash, K. 2012. A Practical Approach on SDS-PAGE for Separation of Protein. **International Journal of Science and Research**, Vol. 3 (8): 955-960.

Rumahlatu, D., Corebima, A.D., Amin, M., dan Rachman, F. 2012. Kadmium dan Efeknya terhadap Ekspresi Protein Metallothionein pada *Deadema setosum* (Echinoidea; Echinodermata). **Jurnal Penelitian Perikanan**, Vol.1 (1): 26-35.

Sari, A.P.N. dan Zulaika, E. 2015. Viabilitas *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada Medium yang Terpapar Logam Kromium (Cr). **Jurnal Sains dan Seni ITS**, Vol. 4 (2) : 1-3.

Sekhar, S.M.CH. 2013. Identification and Characterisation of Predominant Heavy Metal Resistant Bacteria Isolated From Industrial Effluents. **Society for Sci. Dev. in Agric. and Tech. Progressive Research**, Vol. 8: 315-318.

Shuster, J and Reith, F. 2018. Reflecting on Gold Geomicrobiology Research: Thoughts and Considerations for Future Endeavors. **Journal Minerals**, Vol 8 (401): 1-12.

Slavin, Y,N., Jason, A., Urs, O.H dan Horacio,B. 2017. Metal Nanoparticles: Understanding The Mechanisms Behind Antibacterial Activity. **Journal of Nanobiotechnology**, Vol. 15 (65): 1-20.

Solioz, M., Mélanie, M., Helge , K. A., dan Stefano, M. 2011. **Responses of Lactic Acid Bacteria to Heavy Metal Stress Chapter 9**. Switzerland: Springer Science+Business Media.

Somnath, D., Atanu, P., Aditya, K.D., Suchismit, P., Soura,J., and Priyanka, P. 2017. Isolation and Characterization of *Lactobacillus Spp*. From Curd And Its Pharmacological Application in Probiotic Chocolate. **The Journal of Phytopharmacology**, Vol. 6 (6): 335-339.

Srinath, B.S., Namratha, K. dan Byrappa, K. 2017. Eco-friendly Synthesis of Gold Nanoparticles by Gold Mine Bacteria *Brevibacillus Formosus* and Their Antibacterial and Biocompatible Studies. **IOSR Journal Of Pharmacy**, Vol.7 (8): 53-60.

Suryohastari, B. 2016. Analisis Protein Defensin Dari Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) Pada Mencit (*Mus musculus*) yang Diberi Biji Jinten Hitam melalui Teknik SDS-PAGE. **Jurnal Biologi**, Vol. 9 (1): 26-36.

Susana K. C., dan Fernando C.S. 2011. Bacterial Gold Sensing and Resistance. **Biometals**, Vol. 24 : 419 - 427.

Susana K.C., Martín, E., María, E. Pérez, A., Pablo, E.B., Silvana, V.S. dan Fernando C.S. 2017. Bacterial Sensing of and Resistance to Gold Salts. **Molecular Microbiology**, Vol. 63 (5): 1307–1318.

Thairu, Y., Idris, A.N., dan Yahaya, U. 2016. Laboratory Perspective of Gram Staining and its Significance in Investigations of Infectious Diseases. **African Journal of Medicine**, Vol. 1 (4): 1-8.

Tropp, B.E. 2012. **Molecular Biology Fourth Edition: Genes in Proteins**. New York: Jones And Bartlett Learning.

Vaiopoulou, E dan Gikas, P. 2011. Effects of Chromium on Activated Sludge and on The Performance Of Wastewater Treatment Plants: a Review. **Water Research Elsevier Ltd**, Vol.46: 549-570.

Verdian, T. dan Zulaika, E. 2015. Resistensi dan Viabilitas *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada Medium yang terpapar Logam Kadmium (Cd). **Jurnal Sains dan Seni ITS**, Vol. 4 (2) : 1-3.

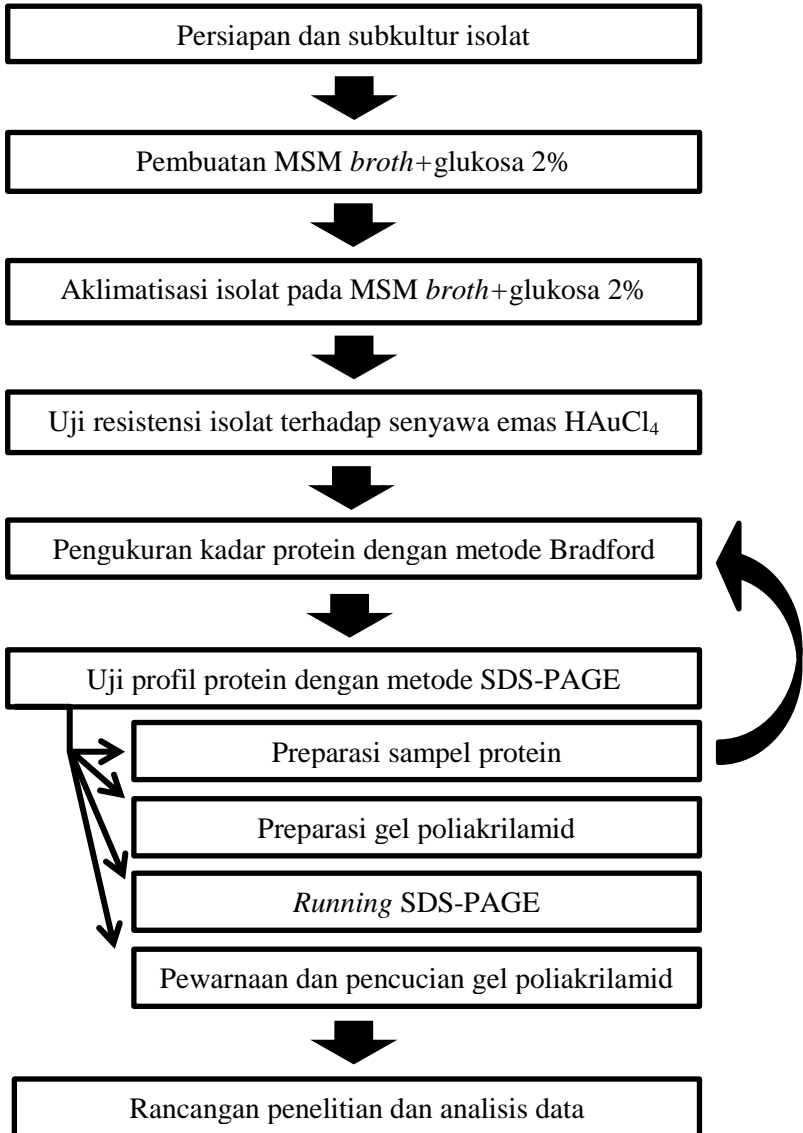
Wiesemann, N., Juliane, M., Cornelia, G., Martin, H., Gerd, H., Frank, R., dan Dietrich H. N. 2013. Influence of Copper Resistance Determinants on Gold Transformation by *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34. **Journal of Bacteriology**, Vol. 195 (10) :2298- 2308.

Yang, J.S. dan Li, L.J. 2013. Research on Electroplating Wastewater Treatment and Operation Effect in Jiangmen. **Advanced Materials Research**, Vol. 765-767: 2904-2907.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
diakses pada 27 November 2018 pukul 07.59 WIB

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alur Penelitian



Lampiran 2. Tabel Hasil Pengukurann Uji Resistensi Isolat terhadap Senyawa Emas HAuCl₄

Bacillus cereus S1

| Waktu (Jam) | 0 ppm | 0,1 ppm | 1 ppm | 5 ppm | 10 ppm |
|-------------|-------|---------|-------|-------|--------|
| 0 | 0,076 | 0,072 | 0,052 | 0,053 | 0,054 |
| 2 | 0,121 | 0,095 | 0,075 | 0,054 | 0,062 |
| 4 | 0,123 | 0,100 | 0,080 | 0,055 | 0,065 |
| 6 | 0,133 | 0,107 | 0,088 | 0,057 | 0,066 |
| 8 | 0,136 | 0,113 | 0,087 | 0,055 | 0,082 |
| 10 | 0,149 | 0,116 | 0,111 | 0,076 | 0,074 |
| 12 | 0,159 | 0,118 | 0,113 | 0,074 | 0,071 |
| 14 | 0,160 | 0,137 | 0,121 | 0,075 | 0,072 |
| 16 | 0,163 | 0,139 | 0,121 | 0,078 | 0,084 |
| 18 | 0,202 | 0,153 | 0,130 | 0,099 | 0,084 |
| 20 | 0,208 | 0,151 | 0,132 | 0,101 | 0,089 |
| 22 | 0,211 | 0,152 | 0,133 | 0,104 | 0,096 |
| 24 | 0,221 | 0,152 | 0,145 | 0,126 | 0,122 |

Lactobacillus sp.

| Waktu (Jam) | 0 ppm | 0,1 ppm | 1 ppm | 5 ppm | 10 ppm |
|-------------|-------|---------|-------|-------|--------|
| 0 | 0,075 | 0,074 | 0,052 | 0,051 | 0,051 |
| 2 | 0,094 | 0,076 | 0,055 | 0,052 | 0,053 |
| 4 | 0,106 | 0,098 | 0,062 | 0,060 | 0,055 |
| 6 | 0,112 | 0,102 | 0,075 | 0,063 | 0,060 |
| 8 | 0,113 | 0,103 | 0,079 | 0,079 | 0,058 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10 | 0,118 | 0,105 | 0,086 | 0,085 | 0,075 |
| 12 | 0,122 | 0,108 | 0,090 | 0,086 | 0,078 |
| 14 | 0,131 | 0,108 | 0,098 | 0,088 | 0,086 |
| 16 | 0,133 | 0,116 | 0,103 | 0,088 | 0,090 |
| 18 | 0,142 | 0,119 | 0,107 | 0,095 | 0,095 |
| 20 | 0,145 | 0,123 | 0,111 | 0,102 | 0,098 |
| 22 | 0,152 | 0,126 | 0,112 | 0,102 | 0,098 |
| 24 | 0,158 | 0,136 | 0,130 | 0,105 | 0,100 |

Staphylococcus aureus

| Waktu (Jam) | 0 ppm | 0,1 ppm | 1 ppm | 5 ppm | 10 ppm |
|-------------|-------|---------|-------|-------|--------|
| 0 | 0,075 | 0,075 | 0,075 | 0,071 | 0,064 |
| 0,5 | 0,075 | 0,075 | 0,075 | 0,072 | 0,065 |
| 1 | 0,096 | 0,081 | 0,076 | 0,074 | 0,066 |
| 1,5 | 0,098 | 0,091 | 0,076 | 0,075 | 0,067 |
| 2 | 0,104 | 0,098 | 0,076 | 0,076 | 0,068 |
| 4 | 0,105 | 0,101 | 0,091 | 0,084 | 0,070 |
| 6 | 0,118 | 0,115 | 0,094 | 0,088 | 0,075 |
| 8 | 0,132 | 0,128 | 0,096 | 0,089 | 0,079 |
| 10 | 0,159 | 0,134 | 0,099 | 0,091 | 0,080 |
| 12 | 0,167 | 0,154 | 0,110 | 0,093 | 0,085 |
| 14 | 0,169 | 0,165 | 0,131 | 0,102 | 0,098 |
| 16 | 0,175 | 0,168 | 0,150 | 0,108 | 0,102 |
| 18 | 0,183 | 0,170 | 0,154 | 0,113 | 0,101 |
| 20 | 0,200 | 0,189 | 0,167 | 0,118 | 0,109 |
| 22 | 0,215 | 0,203 | 0,170 | 0,124 | 0,120 |
| 24 | 0,215 | 0,205 | 0,173 | 0,127 | 0,120 |

Lampiran 3. Tabel Nilai Absorbansi Pengukuran Kadar Protein

Bacillus cereus S1

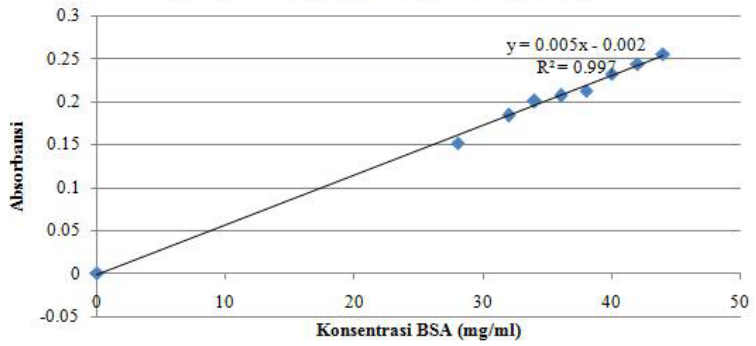
| Konsentrasi | OD 1 | OD 2 | OD 3 | rata-rata | Kadar protein (mg/ml) |
|-------------|-------|-------|-------|-----------|-----------------------|
| 0 ppm | 0,154 | 0,152 | 0,143 | 0,150 | 30,4 |
| 0,1 ppm | 0,152 | 0,155 | 0,147 | 0,151 | 30,6 |
| 1 ppm | 0,207 | 0,212 | 0,202 | 0,207 | 41,8 |
| 5 ppm | 0,211 | 0,212 | 0,207 | 0,210 | 42,4 |
| 10 ppm | 0,241 | 0,243 | 0,238 | 0,241 | 48,6 |

Lactobacillus sp.

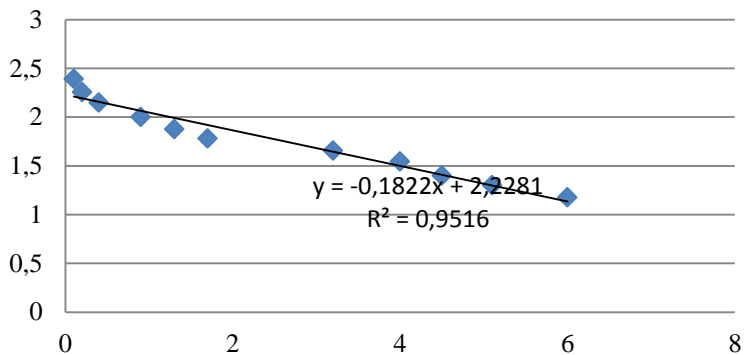
| Konsentrasi | OD 1 | OD 2 | OD 3 | rata-rata | Kadar protein (mg/ml) |
|-------------|-------|-------|-------|-----------|-----------------------|
| 0 ppm | 0,136 | 0,144 | 0,150 | 0,143 | 19,0 |
| 0,1 ppm | 0,135 | 0,146 | 0,150 | 0,144 | 19,2 |
| 1 ppm | 0,200 | 0,205 | 0,213 | 0,206 | 41,6 |
| 5 ppm | 0,204 | 0,209 | 0,211 | 0,208 | 42,0 |
| 10 ppm | 0,234 | 0,237 | 0,237 | 0,236 | 47,6 |

Staphylococcus aureus

| Konsentrasi | OD 1 | OD 2 | OD 3 | rata-rata | Kadar protein (mg/ml) |
|-------------|-------|-------|-------|-----------|-----------------------|
| 0 ppm | 0,103 | 0,111 | 0,113 | 0,109 | 22,2 |
| 0,1 ppm | 0,105 | 0,111 | 0,116 | 0,111 | 22,6 |
| 1 ppm | 0,514 | 0,514 | 0,515 | 0,514 | 103,2 |
| 5 ppm | 0,511 | 0,516 | 0,517 | 0,515 | 103,4 |
| 10 ppm | 0,814 | 0,832 | 0,517 | 0,721 | 361,5 |

Lampiran 4. Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Lampiran 5. Nilai Log BM Pita Marker *ExactPro Broad Prestained Protein Leader*



BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Mojokerto, 2 November 1996. Penulis merupakan anak kelima dari lima bersaudara dari pasangan Jumawan dan Nuryani. Penulis memulai pendidikan di SDN Betro, SMPN 2 Kota Mojokerto, dan SMAN 1 Puri Mojokerto. Setelah lulus pendidikan SMA, penulis melanjutkan pendidikan S1 Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Penulis aktif mengikuti organisasi mahasiswa seperti Himpunan Mahasiswa Biologi ITS sebagai Bendahara Big Event Biological Opus Fair 10 (2016) dan menjadi asisten laboratorium untuk mata kuliah mikrobiologi, bioremediasi, dan perkembangan tumbuhan. *e – mail* : lintangarumwulandari@gmail.com