

Pengaruh CdCl₂ terhadap Produksi Eksopolisakarida dan Daya Hidup Azotobacter

Reginawanti Hindersah^{1*}, Dede Hidayah Arief¹, Soetijoso Soemitro²,
dan Lukman Gunarto³

¹⁾Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Bandung

²⁾Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Padjadjaran, Bandung

³⁾Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetika, Bogor

Diterima 07-11-2008

Disetujui 07-03-2009

ABSTRACT

The contamination of toxic heavy metal Cadmium (Cd) in soils will be endanger the human health because it is more available comparing to another toxic heavy metals. One method of Cd-contaminated soil bioremediation is using exopolysachharide-producing bacteria *Azotobacter*. Exopolysachharides (EPS) can mobilize Cd through the formation of complex Cd-EPS which sequentially can increase the availability of Cd for plants uptake. A laboratory experiment has been done to study the EPS production and the viability of six *Azotobacter* isolates in the liquid culture containing 0.01, 0.1, and 1 mM CdCl₂. The bacteria were cultured in liquid medium with and without CdCl₂ for 72 hours at room temperature. The EPS production was determined by gravimetric method after precipitation using acetone and centrifugation at 7000 rpm. The result was that all of *Azotobacter* isolates produce EPS in the presence of CdCl₂. In the culture with 1 mM CdCl₂, the density of *Azotobacter* sp. isolate BS3, LK5, LKM6 increased significantly, and that of isolate LH16 decreased. No significant effect of CdCl₂ on the density of isolate BS2 and LH15. This research suggested that some *Azotobacter* isolates were relatively resistance to the Cd and could be developed as biological agents in Cd-contaminated soil bioremediation.

Keywords: Cadmium, *Azotobacter*, Exopolysachharides, Bioremediation

PENDAHULUAN

Kadmium (Cd) adalah logam berat toksik yang telah ada di dalam tanah sebagai akibat dari proses pedogenesis (Alloway, 1995). Kontaminan Cd di tanah dapat berasal dari penambangan serta peleburan Zn dan S, limbah industri, aplikasi sludge, serta pupuk fosfat (Alloway, 1995, Chien *et al.*, 2003). Kadmium adalah logam berat yang paling mendapatkan perhatian karena lebih mudah diadsorpsi daripada logam Zn, Ni, Cu, dan Pb (Vries & Tiller, 1978; Alloway, 1995). Dengan demikian Cd mudah diserap tanaman dan memasuki rantai makanan. Bahaya peningkatan Cd di tanah adalah peningkatan Cd di tanaman konsumsi yang tidak dapat teramat karena tanaman sering tidak memperlihatkan gejala keracunan meskipun mengakumulasi Cd dalam jumlah berlebih (Peijnenburg *et al.*, 2000). Hal ini disebabkan karena tanaman dapat menghindari keracunan logam berat terutama Cd melalui sintesis peptida fiteokelatin (Cobbett, 2000; Ishmayana *et al.*, 2007) yang mengikat Cd dan

membawanya ke vakuola (Cobbett, 2000), sehingga tidak memasuki sistem metabolisme tanaman.

Bioremediasi adalah teknologi yang dikembangkan untuk restorasi tanah tercemar logam berat karena relatif mudah, murah dan berkelanjutan (Lasat *et al.*, 2002). Bakteri yang menghasilkan eksopolisakarida (EPS) berpotensi untuk digunakan sebagai agen bioremediasi. Eksopolisakarida adalah suatu struktur ekstrasel yang dapat mengelat logam dan meningkatkan ketersediaan hidup Cd di tanah (Chen *et al.*, 1995). Kompleks EPS-Cd bersifat seperti siderofor yang memudahkan serapan Cd oleh tanaman. Dengan demikian bioremediasi logam berat oleh bakteri dapat dilakukan bersamaan dengan ekstraksi logam oleh tanaman hiperakumulator (Brooks, 1998) sehingga proses restorasi tanah tercemar logam berat Cd menjadi lebih efektif.

Bakteri tanah *Azotobacter*, yang sudah digunakan sebagai pupuk hidup, menghasilkan EPS dalam jumlah signifikan (Vermani, 1997; Emtiazi *et al.*, 2004; Hindersah *et al.*, 2006) dan dapat meningkatkan serapan Cd tanaman (Hindersah *et al.*, 2004; Hindersah & Kalay,

*Telp: +62811221834

Email: reginawanti@yahoo.com

2006). Selain itu, bakteri ini juga dapat diisolasi dari *sludge* Instalasi Pengolahan Air Limbah yang mengandung 4.73 mg kg⁻¹ Cd (Hindersah *et al.*, 2004). Namun efek Cd terhadap produksi EPS *Azotobacter* belum banyak dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari produksi EPS dan daya hidup beberapa isolat *Azotobacter* di dalam kultur cair yang mengandung 0.01, 0.1, dan 1 mM CdCl₂.

BAHAN DAN METODE

Isolat *Azotobacter*. *Azotobacter* yang diuji pada penelitian laboratorium ini adalah enam isolat *Azotobacter* sp. koleksi Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Isolat BS2 dan BS3 diisolasi dari *sludge* IPAL PDAM (3.74 mg kg⁻¹ Cd), LKM5 dan LKM6 diisolasi dari rizosfer kubis merah (481 µg kg⁻¹ Cd), dan LH15 dan LH16 diisolasi dari Andisols di hutan Lembang (117 µg kg⁻¹ Cd). Seluruh isolat dipelihara di agar miring dengan media menurut (Vermani *et al.* 1997).

Metode Inkubasi. Enam isolat *Azotobacter* ditumbuhkan di dalam media cair Vermani tanpa dan dengan 0.01 mM, 0.1 mM dan 1 mM CdCl₂. Sepuluh persen biakan murni dengan konsentrasi 10⁹ cfu mL⁻¹ ditambahkan ke dalam 20 mL media cair Vermani di dalam tabung reaksi 100 mL. Inkubasi dilakukan di atas pengocok dengan 115 rpm pada suhu kamar selama 72 jam. Setelah inkubasi, konsentrasi EPS dan sel bakteri di dalam kultur diamati.

Penentuan produksi EPS. Produksi EPS oleh *Azotobacter* di dalam kultur cair ditentukan dengan metode ekstraksi aseton dan sentrifugasi (Vermani *et al.*, 1997) yang dimodifikasi (Hindersah *et al.*, 2006). Sebanyak 10 mL kultur disentrifugasi 7000 rpm selama 20 menit di suhu kamar. Sebanyak 20 mL aseton dingin ditambahkan ke dalam supernatan dan disentrifugasi kembali. EPS di dasar tabung dikoleksi dan ditimbang di atas kertas saring setelah dipanaskan 35°C selama 1 jam. Konsentrasi sel bakteri di dalam kultur cair ditentukan dengan metode Pengenceran Plat menurut Schinner *et al.*, (1995) pada media agar Vermani dengan modifikasi. Sebanyak sepuluh µL suspensi pada pengenceran 10⁻⁵, 10⁻⁶ dan atau 10⁻⁷ (tergantung dari konsentrasi CdCl₂ di dalam kultur) diteteskan di permukaan media agar Vermani. Media diinkubasi pada suhu 30°C selama 18 jam. Koloni yang tumbuh dihitung

di bawah mikroskop stereo Olympus BH3 pada perbesaran 100 kali.

Percobaan ini dirancang dalam rancangan acak lengkap pola faktorial dengan tiga ulangan. Data dianalisis dengan analisis ragam dan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 0.05 menggunakan SigmaStat 2.01 (*Analitical software by JEZI Installer Version 3.0. Germany*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa produksi EPS setiap isolat tidak ditentukan oleh konsentrasi kadmium klorida (CdCl₂) di dalam media (Tabel 1). Kemampuan setiap isolat dalam menghasilkan EPS tidak sama. Produksi EPS isolat LKM6 lebih besar 4.2-31.7 % daripada isolat lainnya, sedangkan produksi EPS isolat BS3 sama besar dengan isolat AH 15 tetapi lebih besar daripada isolat lain selain isolat LKM6. Produksi EPS tidak berubah jika ke dalam media ditambahkan CdCl₂ sebanyak 0,01 mM (Tabel 1), sedangkan produksi EPS pada media yang mengandung 0,1 mM CdCl₂ meningkat dengan nyata dibandingkan kontrol. Namun peningkatan konsentrasi CdCl₂ di dalam media cair sampai 1 mM menekan produksi EPS.

Pada bakteri *Azotobacter* pemfiksasi nitrogen, polisakarida ekstraseluler dibentuk untuk menahan kekeringan, stres lingkungan, dan terutama melindungi nitrogenase dari oksigen (Sabra *et al.*, 2000). Paparan Cd dalam konsentrasi kecil mungkin tidak menyebabkan efek toksik karena bakteri termasuk mikroba yang relatif toleran terhadap logam berat (Trevor *et al.*, 1986). Peningkatan produksi EPS pada konsentrasi CdCl₂ relatif rendah dapat diartikan sebagai mekanisme adaptasi terhadap logam berat (Chen *et*

Tabel 1. Produksi EPS oleh berbagai isolat *Azotobacter* di dalam kultur cair dengan berbagai konsentrasi CdCl₂.

Isolat <i>Azotobacter</i>	CdCl ₂ (mM)				Rata-rata
	0	0.01	0.1	1	
BS2	1.35	1.60	1.55	1.17	1.42 ab
BS3	1.66	1.73	1.87	1.12	1.60 b
LK5	1.40	1.40	1.57	0.65	1.25 a
LKM6	1.83	1.77	1.98	1.07	1.67 c
LH15	1.78	1.68	1.90	1.17	1.63 b
LH16	1.18	1.17	1.43	0.78	1.14 a
Rata-rata	1.53 b*	1.56 bc	1.72 c	0.99 a	

*Angka rata-rata yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Jarak Berganda Duncan 5%

al., 1995b). Peningkatan produksi EPS diperlukan untuk adsorpsi Cd²⁺ agar tidak memasuki proses fisiologis bakteri. Emtiazi et al., (2004) membuktikan bahwa EPS *Azotobacter* sp. strain AC2 dapat mengadsorpsi logam berat Zn²⁺ yang memiliki struktur kimia mirip dengan Cd²⁺.

Berbeda dengan produksi EPS, konsentrasi sel isolat *Azotobacter* ditentukan konsentrasi CdCl₂ (Tabel 2). Pada awal inkubasi, konsentrasi sel *Azotobacter* di dalam kultur cair Vermani untuk setiap isolat adalah sekitar 10⁸ cfu mL⁻¹ sedangkan di akhir inkubasi menjadi sekitar 10¹⁰ cfu mL⁻¹ (Tabel 2)

Kemampuan setiap isolat untuk tumbuh di beberapa konsentrasi CdCl₂ tidak sama. Pertumbuhan isolat BS2 dan LH15 tidak berubah di setiap konsentrasi CdCl₂, sedangkan pertumbuhan isolat LH16 menurun pada 0.1 dan 1 mM CdCl₂. Konsentrasi sel isolat BS3, LK5, LKM6 meningkat pada 0.1 dan 1 mM CdCl₂ yang menjelaskan daya adaptasi terhadap perubahan konsentrasi CdCl₂ di dalam media (Tabel 2). Jika konsentrasi sel di awal inkubasi menjadi pertimbangan, maka peningkatan konsentrasi sel isolat LKM6 lebih besar daripada isolat LK5. Peningkatan tersebut adalah 4.5 x 10² untuk isolat LKM6 dan 3.7 x 10² untuk isolat LK5. Secara umum, pertumbuhan keenam isolat *Azotobacter* di bawah pengaruh CdCl₂ tidak berubah sampai satu unit log yang menggambarkan resistensi *Azotobacter* terhadap Cd.

Kadmium adalah polutan yang berpotensi meracuni tanah. Bakteri memiliki mekanisme tertentu untuk mengurangi keracunan logam. Sejumlah bakteri

memiliki plasmid yang mengkode resistensi sehingga penyerapan Cd dapat dikurangi (Trevors et al., 1986). Resistensi bakteri Gram negatif untuk menurunkan akumulasi logam berat di sel melalui pompa efluks telah dijelaskan oleh Nies (1992). Sistem ini didorong oleh protein resistensi, *P*-type ATPases, fasilitator difusi kation dan protein porter, serta faktor resistensi NreB- and CnrT (Stuczynski et al., 2003). Pada bakteri Gram negatif *Alcaligenes eutrophus*, efluks ion Co²⁺, Zn²⁺, dan Cd²⁺ memerlukan protein CzcA, CzcB, dan CzcC dan diregulasi oleh CzcD (Nies et al., 1992)

Penelitian (Bouarbah et al., 1992) membuktikan bahwa akumulasi Cd di bakteri yang resisten akan meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi Cd sampai 100 mg mL⁻¹ di larutan. Dijelaskan pula bahwa *Bacillus brevis* lebih resisten daripada *B. Subtilis*, dan dapat mengakumulasi Cd sampai 70 mg g⁻¹ bobot kering sel.

Belum ada penjelasan mengenai resistensi bakteri Gram negatif *Azotobacter* terhadap Cd melalui mekanisme seperti yang dijelaskan di atas. Efek toksik Cd terhadap *Azotobacter* lebih dikaitkan dengan aktivitas fiksasi nitrogen. Aktivitas nitrogenase bakteri ini mulai menurun pada 0.5 dan 1 mg kg⁻¹ Cd dan terhenti pada 5 mg kg⁻¹ Cd karena Cd menghambat glutamin sintase (GS) dan glutamat sintase (GOGAT) melalui pengikatan Cd oleh gugus tiol (Kothandaraman et al., 2002). Sehubungan dengan EPS yang diproduksi *Azotobacter* pada percobaan ini, resistensi *Azotobacter* isolat BS3, LK5, LKM6, dan LH15 terhadap 0,01-1 mM CdCl₂ dapat disebabkan

Tabel 2. Konsentrasi sel (x 10¹⁰ sel mL⁻¹) berbagai isolat *Azotobacter* di dalam kultur cair dengan berbagai konsentrasi CdCl₂

Isolat <i>Azotobacter</i> [*]	CdCl ₂ (mM)			
	0	0.01	0.1	1
BS2 (1.17 x 10 ⁸ sel mL ⁻¹)	2.3 a ^{**} A	1.83 a A	1.87 a A	1.75 a A
BS3 (1.18 x 10 ⁸ sel mL ⁻¹)	2.9 a A	3.18 b A	3.74 b B	4.54 b B
LK5 (1.14 x 10 ⁸ sel mL ⁻¹)	2.49 a A	2.88 b A	3.31 b B	4.26 b B
LKM6 (1.04 x 10 ⁸ sel mL ⁻¹)	2.51 a A	3.2 b A	4.01 b B	4.68 b B
LH15 (2.01 x 10 ⁸ sel mL ⁻¹)	9.06 b A	8.97 c A	8.77 c A	9.48 c A
LH16 (1.55 x 10 ⁸ sel mL ⁻¹)	7.24 b B	8.12 c B	3.91 b A	4.11 b A

^{*}Angka di dalam kurung adalah konsentrasi sel setiap isolat sebelum inkubasi

^{**}Angka yang diikuti huruf yang sama tidak nyata menurut uji Jarak Berganda Duncan 5%. Huruf kecil dibaca arah vertikal dan huruf besar dibaca arah horisontal.

pembentukan EPS yang diinduksi Cd. Selanjutnya EPS menghilangkan efek toksik Cd dengan cara mengikat ion logam melalui ikatan ionik dan koordinasi (Chen et al., 1995). Eksopolisakarida terikat lemah di dinding sel *Azotobacter* (Cohen & Johnstone, 1964) sehingga EPS yang mengikat Cd dapat terlepas dari sel dan Cd tidak memasuki sistem metabolisme sel *Azotobacter*.

KESIMPULAN

Setiap isolat *Azotobacter* dapat memproduksi EPS dengan keberadaan CdCl₂. Namun, dengan mengabaikan isolat, CdCl₂ menurunkan produksi EPS. Produksi EPS di media tanpa CdCl₂ adalah 1.53 mg kg⁻¹, dan menurun sampai 0.99 mg kg⁻¹ di media dengan 1 mM CdCl₂. Di lain pihak, peningkatan CdCl₂ sampai 1 mM meningkatkan populasi *Azotobacter* sp. isolat BS3, LK5, LKM6, menurunkan populasi *Azotobacter* sp. Isolat dan LH16, tetapi tidak berpengaruh terhadap populasi sel isolat BS2 dan LH15. Penelitian ini membuktikan bahwa *Azotobacter* relatif resisten terhadap Cd dan dapat memproduksi EPS dengan keberadaan Cd.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Dana Hibah Bersaing Dirjen DIKTI dengan nomor kontrak 013/SP2H/PP/DP2M/III/2007. Kami berterimakasih kepada Kepala Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Dinas Pertanian Jawa Barat atas izin penggunaan peralatan di laboratorium Hortikultura dan Aneka Tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Alloway, B.J.** 1995. Cadmium. Di dalam: Alloway, B.J (ed). *Heavy Metals in Soils*. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Boulaabah, A., Morel, J.L., Bitton, G., & Guckert, A.** 1992. Cadmium biosorption and toxicity to six cadmium-resistant gram positive bacteria isolated from contaminated soil. *Environ. Toxicic. and water qual.* 7: 237-246.
- Brooks, R.R.** 2000. Phytochemistry of Hyperaccumulators Di dalam: Brooks, R.R. (ed). *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. Cambridge: CAB International.
- Chen, J.H., Lion, L.W., Ghiorse, W.C., & Shuler, M.L.** 1995a. Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Res.* 29: 421-430.
- Chen, J.H., Czajka, D.R., Lion, L.W., Shuler, M. L. & Ghiorse, W.C.** 1995b. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ. Health Perspect.* 103: 53-58.
- Chien, S.H., Carmona, G., Prochnow, L.L., & Austin, E.R.** 2003. Cadmium availability from granulated and bulk-blended phosphate-potassium fertilizers. *J. Environ. Qual.* 32: 1911-1914.
- Cobbett, C.S.** 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123:825-832.
- Cohen, G.H. & Johnstone, D.B.** 1964. Capsular polysaccharide of *Azotobacter agilis*. *J. Bacteriol.* 88: 1695-1699.
- Emtiaz, G., Ethemadifar, Z., & Habibi, M.H.** 2004. Production of extracellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. *Afr. J. Biotech.* 3:330-333.
- Hindersah, R., Muntalif, B.S. & Kalay, A.M.** 2004a. Isolasi dan identifikasi mikroorganisme aerob dari lumpur kolam Anaerob di Instalasi Pengolahan Air Limbah Bandung. Makalah disampaikan pada Pertemuan Ilmiah Tahunan Persatuan Mikrobiologi. Semarang, 27-29 Agustus 2004.
- Hindersah, R., Arief, D.H., & Kalay, A.M.** 2004b. Rhizobacteria *Azotobacter*: Influence on Pb and Cd adsorption by roots of sweet corn. Makalah disampaikan pada International Biotechnology Conference. Sanur, 1-3 Desember 2004.
- Hindersah, R. & Kalay, A.M.** 2006. Akumulasi timah hitam dan kadmium pada tajuk selada setelah aplikasi *Azotobacter* dan lumpur IPAL.J. *Budidaya Pertanian* 2: 1-5.
- Hindersah, R., Arief, D.H., Soemitro, S., & Gunarto, L.** 2006. Exopolysaccharide Extraction from Rhizobacteria *Azotobacter* sp. Proc. International Seminar IMTGT. Medan, 22-23 Juni 2006. Hal 50-55.
- Ishmayana, S., Rosita, N., Kristina, Y., Kamara, D.S., Hindersah, R., & Soemitro, S.** 2007. Komposisi asam amino peptida α -glutamilsistein yang diisolasi dari tajuk selada (*Lactuca sativa L.*) dengan dan tanpa inokulasi *Azotobacter* sp. LKM6. Makalah dipresentasikan di Seminar Nasional Biokimia. Depok, 9 januari 2007.
- Kothandaraman, R., Vasundhara, G., Kurup, G.M., Jacob, V.B., & Sethuraj, M.R.** 2002. Nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum* under cadmium stress. *Indian J. of Microbiol.* 42: 15-17.
- Lasat, M.M.** 2002. Phytoextraction of toxic metals. A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31: 109-120.
- Nies, D.H.** 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid.* 27: 17-28.
- Sabra, W., Zeng, A.P., Lunsdorf, H., & Deckwer, W.D.** 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4037-4044.
- Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R.** 1995. *Methods in Soil Biology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Stuczynski, T.I., McCarty, G.W., & Siebielec, G.** 2003. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead, and zinc salt amendments. *J. Environ. Qual.* 32: 1346-1355.
- Trevor, J.T., Stratton, G.W., & Gadd, G.M.** 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32: 447-464.
- Vermani, M.V., Kelkar, S.M., & Kamat, M.Y.** 1997. Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 379-383.
- Vries, M.P.C. & Tiller, K.G.** 1978. The effect of sludge from two Adelaide sewage treatment plants on the growth of and heavy metal concentration in lettuce. *Australian J. of Agric. and Animal Husban.* 18: 143-147.