

BIOSORPSI KADMIUM DAN KOMPOSISI EKSPOLISAKARIDA *Azotobacter* sp PADA DUA KONSENTRASI CdCl₂

Erni, Reginawanti Hindersah

Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran
Jalan Raya Jatinangor Km. 21 Bandung 40600
E-mail: reginawanti@yahoo.com

ABSTRAK

Azotobacter adalah bakteri yang dapat memfiksasi nitrogen dan memproduksi fitohormon. Namun bakteri ini menghasilkan eksopolisakarida, dimana eksopolisakarida bersifat mobil, karena tersusun atas bahan organik yang dapat mengadsorpsi logam berat seperti kadmium, sehingga semakin mobil dalam tanah dan mudah diserap tanaman. Suatu percobaan laboratorium telah dilakukan untuk mengetahui konsentrasi EPS, konsentrasi Cd di dalam EPS, populasi *Azotobacter* sp isolat LKM 6 dan komposisi EPS. Percobaan ini dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap dengan 6 ulangan. Hasil percobaan menunjukkan bahwa konsentrasi 0,1 dan 1 mM CdCl₂ tidak mempengaruhi populasi *Azotobacter* sp isolat LKM 6, namun terdapat perbedaan konsentrasi EPS tanpa CdCl₂ maupun dengan CdCl₂ sehingga biosorpsi Cd oleh EPS *Azotobacter* sp isolat LKM 6 meningkat dengan keberadaan Cd dan komposisi EPS semakin lengkap dengan kehadiran Cd.

Kata kunci : Biosorpsi, *Azotobacter*, eksopolisakarida, kadmium

EKSOPOLYSACCHARIDE COMPOSITION OF *Azotobacter* sp ON TWO LEVEL OF CdCl₂

ABSTRACT

Azotobacter is bacteria which able to fix nitrogen and produce phytohormone. However, *Azotobacter* produce exopolysaccharide (EPS) which mobile because EPS consist of organic matter which able to adsorption heavy metal such as cadmium and increasingly mobile in soil, so can easy to absorb by plant. An experiment on *Azotobacter* resistancy, EPS concentration, Cd in EPS and EPS composition was carried out in Laboratory, arranged in Randomized Complete Design with six replicates. The results showed that 0,1 and 1 mM of CdCl₂ don't have effect on *Azotobacter* sp isolate LKM 6 populations, however there are difference EPS concentration with CdCl₂ and without CdCl₂, so that Cd can increase biosorption by EPS *Azotobacter* sp isolate LKM 6 and EPS composition was completed by Cd present.

Key words : Biosorption, *Azotobacter*, exopolysaccharide, cadmium

PENDAHULUAN

Pencemaran lingkungan saat ini semakin meluas termasuk diantaranya adalah tanah yang terkontaminasi logam berat. Salah satu logam berat yang berbahaya adalah kadmium (Cd). Kadmium berbahaya dibandingkan dengan logam berat yang lain, karena cenderung bersifat mobil dalam tanah sehingga mudah diserap tanaman daripada logam berat Pb dan Cu. Lingkungan yang terkontaminasi Cd dapat diperbaiki kembali dengan sistem pengolahan limbah logam berat yakni dengan pendekatan bioremediasi. Beberapa peneliti telah melakukan pengelolaan terhadap

logam berat seperti Cd agar tidak mencemari lingkungan. Salah satu metode untuk mengelola logam berat tersebut adalah dengan biosorpsi yang melibatkan biomassa mikroorganisme (Suhendrayatna, 2001; Hussein *et al.*, 2004) dan tanaman akumulator (Ahalya *et al.*, 2004).

Salah satu mikroorganisme yang dapat dilibatkan dalam proses biosorpsi adalah *Azotobacter*. *Azotobacter* adalah bakteri yang dapat memfiksasi N₂ dan memproduksi fitohormon (Subba-Rao, 1982) serta relatif resisten terhadap logam berat Cd. Selain itu, *Azotobacter* dapat menghasilkan eksopolisakarida (EPS) yang berperan dalam biosorpsi logam

(Chen *et al.*, 1995; Emtiazi *et al.*, 2004) seperti Cd. Logam berat tersebut menjadi mobil di dalam tanah, sehingga Cd menjadi lebih mudah diambil tanaman akumulator. Eksopolisakarida dapat mengadsorpsi logam seperti Cd karena EPS bermuatan negatif dan logam membentuk ligan dengan EPS (Chen *et al.*, 1995). Sifat inilah yang menyebabkan logam berat dapat diadsorpsi EPS *Azotobacter*. Eksopolisakarida bersifat mobil karena umumnya tersusun atas bahan organik yang larut dalam air seperti monosakarida dan disakarida serta asam-asam organik. Sakarida yang terkandung dalam EPS sebagian besar mengandung D-galaktosa dan L-ramnosa. Asam organik yang terkandung dalam EPS sebagian besar mengandung asam piruvat dan sebagian kecil mengandung asam manuronat dan guluronat serta alginat bakteri, seperti yang terdapat dalam *Azotobacter beijerinckii* B-1615 (Likhosertov *et al.*, 1991).

Penelitian tentang *Azotobacter* yang dikaitkan dengan fiksasi N dan produksi hormon telah banyak dilakukan tetapi kajian terhadap kemampuannya dalam mengadsorpsi dan menghasilkan EPS termasuk komposisinya belum banyak diteliti. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai biosorpsi kadmium oleh EPS dan komposisi EPS *Azotobacter* sp isolat LKM 6 pada beberapa konsentrasi CdCl₂.

METODOLOGI

Suspensi Cair *Azotobacter*

Azotobacter sp isolat LKM 6 dipindah-tanamkan ke dalam media agar miring vermani dan diinkubasikan di dalam inkubator selama 3 hari. Pindah tanam bakteri ini bertujuan untuk memperbaharui isolat yang akan digunakan untuk penelitian. Suspensi cair *Azotobacter* dibuat dengan menambahkan 5 mL akuades steril ke dalam agar miring, kemudian isolat bakteri digores dan dikocok agar tercampur dengan akuades. Selanjutnya supaya tercampur merata (tidak terdapat bakteri yang menggumpal) inokulan cair *Azotobacter* diaduk dengan *steerer* dan ditambahkan lagi 5 mL akuades. Konsentrasi sel dalam suspensi ini adalah 10⁷ CFU mL⁻¹. *Azotobacter* dikulturkan di dalam media Vermani 20 mL tanpa dan dengan 0,1 mM CdCl₂ dan 1 mM. Inkubasi dilakukan pada *gyratory shaker* (115 rpm) pada suhu kamar selama 48 jam. Jumlah dan komposisi eksopolisakarida ditentukan pada waktu inkubasi 48 jam.

Konsentrasi EPS

Sepuluh mililiter kultur diambil secara aseptik untuk perhitungan konsentrasi EPS. Selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 4⁰ C selama 20 menit. Ke dalam 10 mL supernatan ditambahkan aseton teknis sebanyak 20 mL. Kemudian kultur yang telah ditambahkan aseton teknis, didiamkan dalam lemari es 24 jam. Setelah didiamkan semalam, supernatan disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 4⁰ C untuk mendapatkan endapan berupa EPS. Kelebihan aseton dibuang, dan EPS dikoleksi dengan kertas saring Whatman No. 1 yang telah dipanaskan dalam oven 35⁰ C selama 1 jam, dan di simpan dalam desikator 20 menit. Kertas saring Whatman No. 1 berisi EPS, dikeringkan dalam oven pada suhu 35⁰C selama 1 jam, dan dimasukkan ke dalam desikator selama 20 menit. Kemudian kertas saring Whatman no 1 dan EPS tersebut ditimbang. Berat kering EPS adalah selisih berat kertas berisi EPS dengan berat kertas. Konsentrasi EPS di dalam kultur (g L⁻¹) ditentukan sebagai berikut :

$$\text{Konsentrasi EPS (g L}^{-1}\text{)} = E \times \frac{1}{0,01}$$

dimana :

E = konsentrasi EPS (g L⁻¹) dalam 0.01 L kultur

Konsentrasi Cd di Dalam EPS

Eksopolisakarida basah dalam tabung ditambah asam nitrat biarkan 1 malam. Kemudian dipanaskan dalam *digestion blok* dengan suhu 100^o C selama 1 jam 30 menit, lalu suhu ditingkatkan menjadi 130^o C selama 1 jam, kemudian suhu ditingkatkan lagi menjadi 150^o C selama 2 jam 30 menit. Setelah uap kuning habis, suhu *digestion blok* ditingkatkan menjadi 200^o C.

Destruksi selesai setelah terbentuknya endapan putih atau sisa larutan jernih sekitar 1 mL. Tabung diangkat dan dibiarkan dingin. Ekstrak diencerkan dengan air bebas ion hingga volume tepat 10 mL dan kocok dengan pengocok tabung hingga homogen. Kadmium (Cd) diukur langsung dari ekstrak contoh menggunakan AAS dengan deret standar masing-masing sebagai pembandingan, dengan menggunakan nyala campuran udara-Asetilen.

Konsentrasi Sel *Azotobacter*

Satu mililiter sampel diambil secara aseptik dari kultur. Kemudian ke dalam 1 mL sampel ditambahkan akuades steril 9 mL untuk mendapat-

kan pengenceran 10^{-1} . Satu tetes suspensi diambil dengan pipet tetes dan diletakkan diatas bilik hitung, kemudian ditutup dengan cover glass (gelas penutup). Konsentrasi sel dihitung dengan menggunakan prosedur menghitung sel dengan bilik hitung.

Komposisi EPS

EPS basah diekstraksi dengan 1 mL campuran methanol-asetonitril (2:1). Polisakarida sederhana dan asam amino ditentukan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan pelarut methanol-asetonitril dan kolom C₁₈.

Rancangan Percobaan

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah, Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran dan Laboratorium Hortikultura dan Aneka Tanaman, Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura (BPSBTPH), Dinas Pertanian Propinsi Jawa Barat. Penelitian ini dilaksanakan selama satu bulan dari bulan Juni sampai dengan Juli 2007.

Percobaan ini menguji konsentrasi Cd dimana *Azotobacter* sp isolat LKM 6 masih dapat bertahan hidup, pengaruh Cd terhadap konsentrasi

Azotobacter sp isolat LKM 6 dan komposisi EPSnya serta jumlah Cd yang diadsorpsi *Azotobacter* sp isolat LKM 6 dalam kultur dengan Cd dan tanpa Cd. Pengamatan yang dilakukan setelah inkubasi selama 72 jam adalah (1). Konsentrasi EPS (g L^{-1}), Berat kering EPS yang terdapat di dalam satuan volume kultur diukur dengan metode gravimetri pada suhu 35°C setelah pengendapan dengan aseton teknis menurut vermani *et al.* (1997) yang dimodifikasi. (2). Konsentrasi Cd di dalam EPS (mg kg^{-1}), jumlah Cd dihitung dengan menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). (3). Populasi *Azotobacter* (CFU mL^{-1}), jumlah sel *Azotobacter* ditentukan dengan metode langsung (*direct microscopic count*) dengan metode bilik hitung menggunakan *haemocytometer*. (4). Komposisi EPS (tidak diuji statistik), yang terdiri dari polisakarida sederhana dan asam amino ditentukan dengan KCKT.

Data konsentrasi EPS, jumlah Cd di dalam EPS dan populasi *Azotobacter* dianalisis dengan analisis ragam menggunakan uji F dengan taraf 5%. Jika hasil analisis bernilai signifikan maka perbedaan nilai rata-rata diuji dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5% (Gomen & Arturo, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Konsentrasi EPS, Konsentrasi Cd di Dalam EPS, dan Populasi *Azotobacter* sp isolat LKM 6 di Dalam Kultur Setelah 48 Jam Inkubasi.

Perlakuan	Konsentrasi EPS (g L^{-1})	Konsentrasi Cd di dalam EPS (mg kg^{-1})	Populasi <i>Azotobacter</i> ($\times 10^7 \text{CFU mL}^{-1}$)
0 = tanpa CdCl ₂	1,075 b	0,05 a	5,536 a
A = 0,1 mM CdCl ₂	0,525 a	23,08 b	5,717 a
B = 1 mM CdCl ₂	0,50 a	21,50 b	5,160 a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji lanjut Duncan pada taraf 5%.

Kultur yang tidak diberi CdCl₂ menghasilkan konsentrasi EPS lebih tinggi yaitu 1.075 g L^{-1} dibandingkan dengan perlakuan yang diberi 0,1 mM CdCl₂ dan 1 mM CdCl₂ yang masing-masing menghasilkan konsentrasi EPS sebesar 0,525 dan $0,50 \text{ g L}^{-1}$. Tidak ada perbedaan konsentrasi EPS di dalam kultur dengan 1 mM CdCl₂ maupun 0,1 mM CdCl₂. Hasil tersebut

menunjukkan bahwa Cd dapat menentukan produksi EPS dalam kultur cair dan EPS yang diproduksi oleh setiap 10^6 sel *Azotobacter* sp isolat LKM 6, tanpa pemberian Cd yaitu $1,94 \times 10^{-4} \text{ mg}$ sedangkan dengan pemberian 0,1 mM CdCl₂ yaitu $0,91 \times 10^{-4} \text{ mg}$ serta pemberian 1 mM CdCl₂ yaitu $0,97 \times 10^{-4} \text{ mg}$. EPS yang diproduksi oleh setiap 10^6 sel *Azotobacter* sp isolat LKM 6

sangat sedikit, karena metabolisme sel terganggu dengan kehadiran Cd. Penurunan produksi EPS pada perlakuan dengan Cd disebabkan oleh efek negatif Cd. Penurunan produksi EPS dengan kehadiran Cd disebabkan oleh tingkat toksisitas Cd (Chen *et al.*, 1995) dan daya racun Cd dapat menekan aktivitas enzim makhluk hidup (Darmono, 2001) termasuk *Azotobacter*, sehingga produksi EPS menjadi rendah. Konsentrasi EPS pada paparan 0,1 mM dan 1 mM CdCl₂ tidak berbeda, diduga karena pada kisaran konsentrasi tersebut *Azotobacter* sp isolat LKM 6 memiliki ketahanan yang sama.

Paparan 0,1 mM dan 1 mM CdCl₂ EPS *Azotobacter* mengadsorpsi 23,08 mg kg⁻¹ Cd dan 21,50 mg kg⁻¹ Cd. Konsentrasi Cd di dalam EPS tersebut tidak berbeda nyata. Adsorpsi logam oleh EPS terjadi karena adanya proses khelasi dimana ligan organik membentuk ikatan koordinat dengan logam lebih dari sepasang elektron, yang mampu

mengkhelat logam berat untuk membentuk kompleks yang relatif stabil (Chen *et al.*, 1995). Adsorpsi Cd oleh EPS menyebabkan mobilisasi Cd meningkat, sehingga mudah diambil tanaman, karena EPS yang mengikat logam tidak mudah didegradasi dan bersifat mobil (Pang *et al.*, 2005).

Populasi *Azotobacter* isolat LKM 6 tanpa dan dengan pemberian CdCl₂ menunjukkan jumlah yang sama. Kadmium tidak mempengaruhi pertumbuhan *Azotobacter* karena *Azotobacter* relatif resisten terhadap Cd sehingga berpotensi sebagai agen bioremediasi. Bakteri lebih resisten terhadap Cd dibandingkan dengan alga dan sianobakteri, karena beberapa bakteri gram negatif mengandung gen yang mengkode sistem resistensi bakteri terhadap Cd (Trevors *et al.*, 1986). Kadmium toksik terhadap alga dan sianobakteri (Trevors *et al.*, 1986), tetapi alga cenderung resisten terhadap Pb (Hong & Shan-Shann, 2005).

Komposisi Ekspolisakarida

Tabel 2. Komposisi Ekspolisakarida *Azotobacter* sp Isolat LKM 6 Pada Beberapa Konsentrasi CdCl₂.

Komponen	Tanpa CdCl ₂ (%)	Dengan 0,1 mM CdCl ₂ (%)	Dengan 1 mM CdCl ₂ (%)
Sakarida			
Glukosa	2,000	0,983	0,738
Mannosa	-	0,594	0,870
Galaktosa	-	-	0,698
Fruktosa	3,341	1,011	1,198
Asam Organik			
Asam Asetat	0,825	0,733	0,787
Asam Laktat	-	-	0,318
Asam Piruvat	-	0,270	0,324

Pemberian Cd mengubah komposisi EPS *Azotobacter* sp isolat LKM 6. Terdapat perbedaan antara kuantitas sakarida dan asam organik di dalam EPS *Azotobacter* sp isolat LKM 6 yang diproduksi pada media tanpa dan dengan CdCl₂. Komposisi sakarida dan asam organik dipengaruhi keberadaan Cd. Pemberian Cd mengubah jumlah dan jenis sakarida dan asam organik. Dengan pemberian 0,1 dan 1 mM CdCl₂, jenis sakarida atau asam organik semakin lengkap.

Perlakuan tanpa CdCl₂, sakarida yang terbentuk hanya glukosa dan fruktosa. Penambahan 0,1 mM CdCl₂ menginduksi pembentukan glukosa, mannanosa dan fruktosa. Konsentrasi glukosa menurun dengan

penambahan 0,1 mM CdCl₂ dan 1 mM CdCl₂, begitupun konsentrasi fruktosa menurun dengan penambahan 0,1 mM CdCl₂ tetapi dengan penambahan 1 mM CdCl₂ jumlahnya relatif tetap. Konsentrasi mannanosa naik dengan penambahan 0,1 mM dan 1 mM CdCl₂. Penambahan 1 mM CdCl₂ membentuk glukosa, mannanosa, galaktosa dan fruktosa.

Perlakuan tanpa CdCl₂, asam organik yang terbentuk hanya asam asetat. Penambahan 0,1 mM CdCl₂ membentuk asam asetat dan asam piruvat. Konsentrasi asam asetat menurun dengan 0,1 mM CdCl₂ tetapi relatif tetap dengan penambahan 1mM CdCl₂. Konsentrasi asam piruvat naik dengan penambahan 0,1 mM CdCl₂ dan 1 mM

CdCl₂. Penambahan 1 mM CdCl₂ membentuk asam asetat, asam laktat dan asam piruvat. Komposisi berubah diduga berhubungan dengan kemampuan-nya dalam adsorpsi Cd dan proteksi nitrogenase.

Asam organik juga berperan dalam memobilisasi logam sehingga tersedia untuk tanaman. Asam organik ini membantu dalam melarutkan (solubilisasi) senyawa logam dimana logam dapat diadsorpsi atau dikompleksasi oleh kelompok karboksil (Ahalya *et al.*, 2004).

SIMPULAN

Penambahan 0,1 mM dan 1 mM CdCl₂ tidak menurunkan daya hidup *Azotobacter* sp isolat LKM 6. Sedangkan konsentrasi EPS yang dihasilkan *Azotobacter* sp isolat LKM 6 menurun pada paparan 0,1 mM dan 1 mM CdCl₂ yaitu 0,525 g L⁻¹ dan 0,50 g L⁻¹. Biosorpsi Cd oleh eksopolisakarida *Azotobacter* sp isolat LKM 6 meningkat dengan keberadaan Cd.

Komposisi eksopolisakarida *Azotobacter* sp isolat LKM 6 semakin lengkap dengan kehadiran Cd. Komposisi eksopolisakarida *Azotobacter* sp isolat LKM 6 di dalam kultur tanpa Cd terdiri dari glukosa, fruktosa, dan asam asetat, sedangkan di dalam kultur dengan 0,1 mM CdCl₂ terdiri dari glukosa, mannanosa, fruktosa, asam asetat dan asam piruvat serta dengan 1 mM CdCl₂ terdiri dari glukosa, mannanosa, galaktosa, fruktosa, asam asetat, asam laktat, dan asam piruvat.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahalya, N., Ramachandra, T.V & R.D. Kanamadi. 2004. Biosorption of Heavy Metals. Online; <http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/water/paper/biosorption/biosorption.htm>. (02/10/2007).
- Chen, J. H., Czajka, R.d., Lion, L.W., Shuler, M.L & W.C. Ghiorse. 1995. Trace Metal Mobilization in Soil by Bacterial Polimers. *Environmental Health Perspectives* 103 (supplement 1): 53-58.
- Darmono, 2001. Lingkungan Hidup dan Pencemaran: Hubungannya dengan toksikologi senyawa logam. Jakarta. UI Press.
- Emtiazi, G., Ethemadifar, Z & M.H. Habibi. 2004. Production of Extracellular Polymer In *Azotobacter* sp and Biosorption of Metal by Exopolymer. *African Journal of Biotechnology* 3: 330 – 333.
- Gomez, K.A & A.G. Arturo. 1995. Prosedur Statistik Untuk Penelitian Pertanian. Diterjemahkan E. Sjamsuddin & J.S. Bahasjay. Jakarta: UI Press.
- Hong, C & P. Shan-Shan. 2005. Bioremediation Potential Of Spirulina : Toxicity and Biosorption Studies of Lead. Online ; <http://www.zju.edu.cn/jzus> . (15/01/2008).
- Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K & H. Moawad. 2004. Biosorption of Heavy Metals From Waste Water Using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. Online; <http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/water/paper/biosorption.htm>. [06/03/2007].
- Likhosherstov, L.M., Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., Derevitskaya, V.A., Danilova, I.V., Botvinko, I.V. 1991. Structure of the major exopolysaccharide produced by *Azotobacter beijerinckii* B-1615. *Carbohydr Res.* 222: 233-238.
- Pang, L., Close, M.E., Noonan, M.J., Fintoft, M.J & P. Van den Brink. 2005. Heavy Metals in The Environment : A Laboratory Study of Bacteria-Facilitated Cadmium Transport In Alluvial Gravel Aquifer Media. *J. Environ. Qual.* 34: 237-247.
- Subba – Rao. 1982. Biofertilizer in Agriculture. New Delhi: Oxford dan IBH Publ, Co.
- Suhendrayatna. 2001. Bioremoval logam Berat Dengan Menggunakan Mikroorganisme : Suatu Kajian Kepustakaan (Heavy Metal Bioremoval by Microorganisms: A Literature Study). Seminar on-Air Bioteknologi untuk Indonesia Abad 21. Japan, 1-14 Februari 2001.
- Trevors, J.T., Stratton, G.W & Gadd, G.M. 1986. Cadmium Transport, Resistance and Toxicity In Bacteria, Algae and Fungi. *J. Microbiol.* 447-64.