

Seleksi Material Penempelan Biofilm Isolat Bakteri Resisten Tembaga asal PT. Freeport Indonesia

Maria Massora ^{1)*}, Erni Martani ²⁾, Eko Sugiharto ³⁾, Roberth Sarwom ⁴⁾ Tumpal Sinaga ⁴⁾

¹⁾ Prodi Bioteknologi SPS UGM

²⁾ Fakultas Pertanian UGM

³⁾ Fakultas MIPA UGM

⁴⁾ Departement Environmental PTFI

email: ria_massora@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tailing adalah limbah dari proses pemisahan bijih mineral yang mengandung logam berat yang bersifat sangat toksik pada biota misalnya manusia, tanaman, ikan dan mikroba diantaranya bakteri. Bakteri yang mampu tumbuh pada lingkungan tercemar logam berat cenderung membentuk biofilm yang merupakan suatu bentuk mekanisme pertahanan sel terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim atau kurang menguntungkan. Biofilm terdiri dari berbagai kelompok bakteri yang tumbuh bersama mikroba lain yang diselubungi matriks polimer ekstraseluler (EPS) dan melekat pada permukaan materi organik maupun anorganik. Biofilm berpotensi sebagai agensia remediasi atau bioremediator yang handal. Empat isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri resisten tembaga yang diisolasi dari tailing PT Freeport Indonesia, Timika, Papua. Pada penelitian ini dilakukan seleksi materi penempelan biofilm berupa materi organik maupun anorganik untuk memperoleh materi penempelan yang optimal untuk pertumbuhan biofilm. Masing-masing isolat diinokulasikan kedalam medium LB yang mengandung 100 mg/L CuSO₄. Material uji digantung pada tutup erlenmeyer, diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan sedang, selama 2 minggu pada suhu ruang. Aktivitas pembentukan biofilm diamati setiap minggu sekali berdasarkan penempelan biofilm pada material yang diamati dibawah mikroskop. Untuk mengetahui massa biofilm yang terbentuk, dapat dihitung dengan cara menimbang material penempelan sebelum dan sesudah penempelan biofilm. Empat isolat dapat tumbuh dengan baik pada batu kali, kayu, plastik LLDPE dan plastik PET namun penempelan biofilm terlihat lebih stabil pada potongan kayu dan batu kali. *Pseudomonas aeruginosa strain C53* menunjukkan kemampuan paling tinggi dalam pembentukan biofilm kemudian diikuti *Bacillus cereus strain C38*, *Lycinibacillus fusiformis strain C40* dan *Bacillus subtilis strain C43*.

Kata Kunci : Bakteri Resisten tembaga, Biofilm, Material Penempelan.

ABSTRACT

Tailings are waste from the process of separation of ore containing heavy metals that are very toxic to organisms such as humans, plants, fish and microbes such as bacteria. Bacteria capable of growing in a heavy-metal polluted environment tend to form biofilm which is a form of cell defense mechanism against extreme or less favorable environmental conditions. Biofilm consists of various groups of bacteria that grow together with other microbes that are surrounded by the extracellular polymeric substance (EPS) and adhere to the surface of both organic and inorganic matter. Biofilm has potential as a reliable remediation agent or bioremediator. Four bacterial isolates used in this study were copper-resistant bacteria isolated from PT Freeport Indonesia's tailings, Timika, Papua. In this research, selection of biofilm attachment material was conducted in the form of organic or inorganic material to obtain optimal attachment material for biofilm growth. Each isolate was inoculated into LB medium containing 100 mg / L CuSO₄. The test material was suspended on the erlenmeyer cover, incubated in the incubator shaker with medium speed, for 2 weeks at room temperature. The biofilm forming activity was observed weekly based on the attachment of biofilms to the material observed under the microscope. To determine the mass of the biofilm formed, calculation of the attachment material weight was done before and after the biofilm attachment. Four isolates could grow well on stone, wood, LLDPE plastic and PET plastic. However, the biofilm attachment looked more stable on wood and stone fragments. The highest ability in the biofilm formation was performed by *Pseudomonas aeruginosa strain C53*, followed by *Bacillus cereus strain C38*, *Lysinibacillus fusiformis strain C40* and *Bacillus subtilis strain C43*.

Keywords : Copper Resistant Bacteria, Biofilm, Attachment Material

PENDAHULUAN

Tailing adalah limbah dari proses pemisahan bijih mineral yang terkandung dari bijih tambang. Tailing mengandung logam berat yang bersifat sangat toksik pada biota misalnya manusia, tanaman, ikan dan mikroba. Logam tersebut dapat terdistribusi ke bagian tubuh makhluk hidup dan terjadi bioakumulasi pada rantai makanan.

Bakteri yang mampu tumbuh pada lingkungan tercemar logam berat cenderung membentuk biofilm. Biofilm merupakan suatu bentuk mekanisme pertahanan sel terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim atau kurang menguntungkan. Biofilm terdiri dari

berbagi kelompok bakteri yang tumbuh bersama mikroba lain yang diselubungi matriks polimer ekstraseluler (EPS) dan melekat pada permukaan materi organik maupun anorganik. EPS dihasilkan oleh mikroba tersebut, sebagai sumber nutrisi (Klapper, 2006 ; Anderson, 2009). Matriks EPS pada biofilm memungkinkan sel bakteri bertahan lebih lama dibanding jika berada pada kondisi planktonik (Flemming, 2000). Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa sistem biofilm mempunyai potensi sebagai agensia remediasi atau bioremediator yang handal (Rajbir *et al.*, 2006).

Berdasarkan uraian diatas, dapat diketahui bahwa biofilm berperan penting dalam pengolahan limbah. Struktur biofilm yang dipengaruhi beberapa faktor dapat dimanfaatkan untuk mengontrol pertumbuhan biofilm, baik secara fisik maupun kimiawi. Faktor-faktor itu diantaranya sifat permukaan dan ruang antara, ketersediaan nutrient, komposisi komunitas mikroba dan hidrodinamika. Pada penelitian ini dilakukan seleksi materi penempelan biofilm berupa materi organik maupun anorganik untuk memperoleh materi penempelan yang optimal untuk pertumbuhan biofilm.

METODE, PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tailing PT Freeport Indonesia, batu kali, potongan kayu, tutup botol air mineral yang berbahan dasar plastik LLDPE (*Linear Low Density Polyethylene*) dan botol air mineral yang berbahan dasar plastik PET (*Polyethylene terephthalate*). Bahan kimia lain yang digunakan adalah Medium Luria-Bertani (LB) broth : *tryptone* 10 g; *yeast extract* 5 g; NaCl 10 g; *glucose* 0,1 g; *aquadest* 1 L.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Mikroskop, *laminar air-flow*, autoklaf dan inkubator.

Empat isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian in adalah

bakteri resisten tembaga yang mampu tumbuh pada medium LB yang mengandung 300-500 CuSO₄ mg/L. Bakteri diisolasi dari tailing PT Freeport Indonesia, Timika, Papua (Tabel 1).

Tabel 1. Isolat bakteri resisten tembaga

No.	Isolat	Acession Number
1	<i>Bacillus cereus strain C38</i>	MF521959
2	<i>Lycinibacillus fusiformis strain C40</i>	MF521962
3	<i>Bacillus subtilis strain C43</i>	MF521960
4	<i>Pseudomonas aeuruginosa strain C53</i>	MF521963

Seleksi Material Penempelan Biofilm

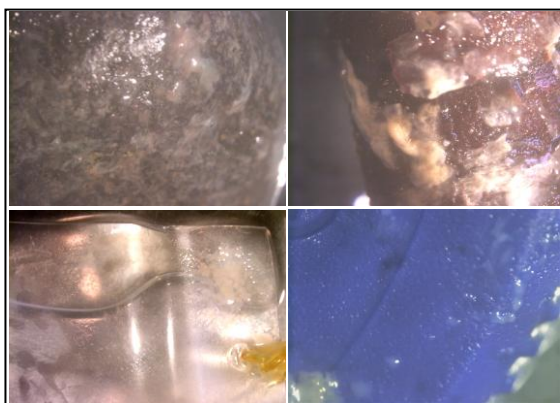
Pembentukan biofilm digunakan material batu kali, potongan kayu, tutup botol air mineral yang berbahan dasar plastik LLDPE dan botol air mineral yang berbahan dasar plastik PET sebagai material uji. Masing- masing isolat diinokulasikan kedalam Erlenmeyer 500 mL yang berisi medium LB yang mengandung 100 mg/L CuSO₄. Isolat bakteri yang dipakai adalah Isolat yang sebelumnya dibandingkan dengan larutan 0,5 McFarland Standar yang setara dengan 10⁶ cfu/ml. Larutan McFarland Standar dibuat dengan komposisi 0,5 ml BaCl₂ dan 99,5 ml H₂SO₄. Kekeruhan larutan diatur hingga bernilai 0,08 - 0,10 pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 600nm.

Material penempelan digantung pada tutup erlenmeyer menggunakan tali nilon. Kemudian diinkubasi ada shaker inkubator selama 2 minggu pada

suhu ruang, dengan kecepatan sedang. Aktivitas pembentukan biofilm diamati setiap minggu sekali berdasarkan penempelan biofilm pada material yang diamati dibawah mikroskop. Untuk mengetahui massa biofilm yang terbentuk, dapat dihitung dengan cara menimbang material penempelan sebelum dan sesudah menempelnya biofilm. Berat material penempelan yang sudah diselubungi biofilm (Berat Akhir) dikurangi dengan berat material sebelum penempelan (Berat Awal).

HASIL DAN DISKUSI

Sebanyak 4 isolat bakteri yang diisolasi dari tailing mampu tumbuh pada medium yang mengandung 300-500 mg/L CuSO₄, diuji kemampuan pembentukan biofilmnya pada berbagai material penempelan. Semua material tampak mendukung pertumbuhan kultur. Pada penelitian ini, semua isolat diduga mampu membentuk *single-species biofilm* karena dari hasil pengamatan dengan mikroskop menunjukkan bahwa semua isolat mampu membentuk biofilm pada material uji (Gambar 1).



Gambar 1. Pembentukan biofilm oleh isolat bakteri resisten tembaga pada material penempelan

Ekspresi gen dari setiap mikroba atau bakteri berbeda-beda sehingga menyebabkan mekanisme penempelan dan kemampuan *single-cells* untuk melekat ke suatu permukaan berbeda-beda juga (Gordon dkk, 2017).

Aktivitas pertumbuhan merupakan parameter kemampuan pembentukan biofilm oleh isolat terpilih. Dari semua isolat uji, *Pseudomonas aeruginosa strain C53* menunjukkan kemampuan paling tinggi dalam pembentukan biofilm kemudian diikuti *Bacillus cereus strain C38*, *Lycinibacillus fusiformis strain C40* dan *Bacillus subtilis strain C43* (Tabel 2). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu jenis bakteri pembentuk biofilm yang dapat mensekresikan senyawa EPS berupa asam kolanat dan galaktoglukan (Vu dkk., 2009).

Tabel 2. Kemampuan Pembentukan biofilm oleh isolat

No	Isolat	Kayu (gr)	Batu (gr)	Plastik LLDPE (gr)	Plastik PET (gr)
1	<i>Bacillus cereus strain C38</i>	1,44	1,25	0,75	0,56
2	<i>Lycinibacillus fusiformis strain C40</i>	1,32	1,18	0,71	0,49
3	<i>Bacillus subtilis strain C43</i>	1,12	1,05	0,67	0,45
4	<i>Pseudomonas aeruginosa strain C53</i>	1,52	1,33	0,83	0,67

Pembentukan biofilm diawali dengan pergerakan mikroba menuju ke

permukaan material penempelan, kemudian akan menempel secara reversible maupun irreversible. Penempelan reversible dapat terjadi akibat , interaksi mikroba dengan permukaan, gerak Brown, dan aliran konveksi. Penempelan irreversible terjadi saat sel mikroba menghasilkan EPS yang membentuk ikatan dari sel ke sel, dan melekatkan kumpulan sel ke permukaan material penempelan. Pelekatan irreversible ini memicu kolonisasi dari mikroba, dimana sel-sel mikroba tumbuh membentuk mikrokoloni yang menyusun biofilm (Lindsay dan von Holy, 2006).

Material penempelan yang digunakan pada penelitian ini adalah batu kali, potongan kayu, tutup botol air mineral yang berbahan dasar plastik LLDPE dan botol air mineral yang berbahan dasar plastik PET. Material uji tersebut merupakan bahan yang mudah diperoleh, dan umumnya ditemukan sebagai bahan buangan, sehingga bernilai ekonomis. Aspek-aspek yang menjadi pertimbangan dalam pemilihan material penempelan biofilm adalah aspek lingkungan, ekonomi dan fungsionalitas bahan selama proses berlangsung. Aspek lingkungan meliputi efek produksi dan pembuangan material, aspek ekonomi meliputi biaya awal dan operasional, sedangkan aspek fungsional meliputi biodegradabilitas dan

tidak mudah terkikis (Anderson dkk, 2008). Berdasarkan pertimbangan aspek tersebut, maka material penempelan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan material terbaik yang dapat mendukung pertumbuhan biofilm bakteri resisten tembaga dan dapat digunakan dalam pengolahan limbah. Isolat-isolat terpilih dapat tumbuh dengan baik pada batu kali yang memiliki permukaan kasar, plastik LLDPE dan plastik PET yang memiliki permukaan yang halus, serta kayu yang permukaannya berpori dan kasar, namun penempelan biofilm terlihat lebih stabil pada potongan kayu dan batu kali.

Goller dan Romeo (2008) menyatakan bahwa ada beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm diantaranya kondisi permukaan dan hidrodinamika/aliran cairan, nutrisi, suhu, oksigen dan osmolaritas. Mikroba pada umumnya lebih cepat menempel pada permukaan yang kasar dan membentuk biofilm karena permukaan untuk penempelan sel lebih luas dan *shear forces* lebih rendah (Qureshi dkk., 2005; Denkhaus dkk.,2006). Plastik HDPE memiliki permukaan yang halus sehingga sulit untuk dikolonisasi oleh bakteri, namun jika bakteri sudah berhasil melakukan penempelan awal, maka akan diikuti dengan *irreversible attachment* dan maturasi biofilm yang cepat (Anderson dkk, 2008).

Pembentukan biofilm pada materi yang porous juga lebih menguntungkan bagi pembentukan biofilm karena pori-pori memberikan perlindungan dari tekanan lingkungan (Qureshi dkk., 2005).

KESIMPULAN

1. Empat isolat dapat tumbuh dengan baik pada batu kali, kayu, plastik LLDPE dan plastik PET namun penempelan biofilm terlihat lebih stabil pada potongan kayu dan batu kali.
2. Isolat *Pseudomonas aeruginosa* strain C53 menunjukkan kemampuan paling tinggi dalam pembentukan biofilm kemudian diikuti *Bacillus cereus* strain C38, *Lysinibacillus fusiformis* strain C40 dan *Bacillus subtilis* strain C43

SARAN

Penelitian lanjutan mengenai material-material lain yang berpotensi sebagai tempat penempelan biofilm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi atas bantuan dana penelitian melalui Program Penelitian Disertasi Doktor (PDD).

DAFTAR PUSTAKA

- Andersson, S., Nilson, M., Dalhammar, G., and Rajaro, G. K. 2008, "Assessment of Carrier Materials for Biofilm Formation and Denitrification", *Vatten*, 64: 201-207.
- Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U., and Wingender, J. 2006. Chemical and Physical Methods for Characterization of Biofilms" *Microchim. Acta.* 158 : 1-27.
- Flemming, H., Wingender, J., Griebe, T., and Mayer. 2000. Physico-chemical Properties of Biofilms, dalam *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*, Editor: LV. Evans, Amsterdam: Harwood Academic Publisher.
- Goller, C.C and Romeo., 2008. Environmental Influences on Biofilm Development, dalam *Bacterial Biofilm*, diedit oleh Romeo, Tony, Heidelberg: Springer.
- Gordon, D. V., Fields, M.D., Kovach, K., and Rodesney, C.A. 2017. Biofilms and Mechanics: a review of experimental techniques and findings. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 50: 1-12.
- Klapper, I., Biofilm Mechanics .Downloaded from <http://www.erc.montana.edu/CBEessential-SW/bf-basis999/basic01.html> on 15/06/2016.
- Lindsay D dan A. Von Holy. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what health care professionals should know. *Journal of Hospital Infection.* 64(4): 313-325
- Qureshi, N., Annous, B.A., Ezeji, T.C., karcher, P., and Maddox, I.S.2005. Bofilm Reactors for Industrial Bioconversion Processes: Employing Potential of Enhanced Reaction Rates. *Microbial Cell Factories.* 4 (24): 1-21.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanasa EP. 2009. Bacterial ekstracellulær polysaccharydes involved in biofilm formation. *Molecules.* 14: 2535 – 2554.