

Isolasi dan Karakterisasi Rhizobakteri pada Akar *Rhizophora mucronata* yang Terpapar Logam Berat Timbal (Pb)

Isolation and Characterization of Rhizobacteria of Rhizophora mucronata Roots Exposed by Plumbum Metals (Pb)

Aminullah*, Fida Rachmadiarti, Guntur Trimulyono
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya
*e-mail: ela_elo_boy@yahoo.co.id

ABSTRAK

Aktivitas manusia yang meningkat dalam memanfaatkan kawasan pesisir menghasilkan limbah bahan pencemar yang dapat mengganggu keberadaan ekosistem mangrove yang ada di muara sungai. Salah satu logam berat yang banyak mencemari air sungai adalah timbal (Pb). *Rhizophora mucronata* merupakan salah satu tumbuhan mangrove yang tumbuh pada lingkungan muara dan tepi pantai serta merupakan salah satu media alternatif proses biofiltrasi. Kemampuan mangrove dalam mengabsorpsi logam berat selain karena membentuk fitokhelatin juga karena bersimbiosis dengan rhizobakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat rhizobakteri yang terdapat pada akar *R. mucronata* yang terpapar logam berat Pb serta untuk mendeskripsikan karakteristik rhizobakteri yang diperoleh. Sampel berupa akar *R. mucronata* yang diambil dari kawasan hutan mangrove Wonorejo Surabaya. Isolasi bakteri dilakukan dengan melakukan skrining isolat rhizobakteri menggunakan media NA yang ditambahkan dengan 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm logam berat Pb. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 3 isolat bakteri yaitu AR1, AR2 dan AR3 mampu tumbuh pada media NA yang telah ditambahkan logam Pb. Isolat AR2 dan AR3 mampu tumbuh pada media NA dengan kadar Pb 10 ppm, sedangkan isolat AR1 mampu tumbuh dengan kadar Pb 15 ppm sehingga ketiga isolat dikategorikan sebagai isolat rhizobakteri yang resisten terhadap Pb karena mampu tumbuh pada kadar Pb \geq 5 ppm. Ketiga isolat tersebut juga dikarakterisasi berdasarkan karakteristik morfologi koloni, morfologi sel, fisiologi dan biokimia.

Kata kunci: isolasi; karakterisasi; rhizobakteri; logam Pb; *Rhizophora mucronata*

ABSTRACT

The increase of human activities in exploiting coastal areas have been produced many wastes that affected the mangrove ecosystem in the estuary. One of metals that most polluted river water is Plumbum (Pb). *Rhizophora mucronata* is one of mangrove plant that can grows in estuaries. In other hand, *R. mucronata* can absorb Pb by biofiltration process. *Rhizophora mucronata* is absorbing Pb by producing phytochelatin and also symbiotic with rhizobacteria. The purpose of this research is to isolate and to describe the character of rhizobacteria. Isolates obtained from roots sample were taken from the forest of *R. mucronata* mangrove at Wonorejo Surabaya. Isolation of bacteria carried by screened rhizobacteria isolates using NA medium added with 5 ppm, 10 ppm and 15 ppm of Pb. The results indicated that three isolates are AR1, AR2 and AR3 able to grow on NA medium by Pb. AR2 and AR3 isolates are able to grow on nutrient agar medium (NA) with Pb levels of 10 ppm, in while the AR1 isolates is able to grow with Pb levels of 15 ppm so that categorized as resistant Pb isolates for being able to grow at levels \geq 5 ppm Pb. All three isolates were characterized by characteristic of colony morphology, cell morphology, physiology and biochemistry.

Key words: isolation; characterization; rhizobacteria; Pb; *Rhizophora mucronata*

PENDAHULUAN

Pesatnya perkembangan kota-kota di daerah pesisir selain memberikan keuntungan ekonomis juga menyebabkan berbagai persoalan terutama terhadap lingkungan. Aktivitas manusia yang meningkat dalam memanfaatkan kawasan pesisir seringkali menghasilkan limbah bahan pencemar yang dapat membahayakan kehidupan perairan laut dan dapat mengganggu keberadaan

ekosistem mangrove yang ada di muara sungai (Fransisca, 2011). Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Hamzah dan Setiawan (2010), menunjukkan bahwa mangrove *R. mucronata* mampu mengakumulasi logam Pb sebesar 53,89 ppm pada akar dan 85,48 ppm pada daun. Penelitian yang dilakukan oleh Syarifah (2013), menyatakan bahwa pohon mangrove *R. mucronata* dapat dijadikan bioakumulator logam berat Cu

dan Pb, dengan nilai akumulasi 0,77 ppm pada akar dan 0,32 ppm pada daun.

Kemampuan mangrove dalam mengabsorpsi logam berat selain karena membentuk fitokhelatin juga karena bersimbiosis dengan rhizobakteri. Rhizobakteri merupakan bakteri yang hidup pada daerah rhizosfer dan mengkolonisasi sistem perakaran tumbuhan (Syamsuddin dan Ulim, 2013). Identifikasi rhizobakteri pada *Avicennia marina* dan *Pluchea indica* di Pantai Wonorejo, Pantai Timur Surabaya menunjukkan rhizobakteri tersebut termasuk dalam genus *Bacillus*, *Amphibacillus*, *Lampropedia*, *Acinetobacter*, *Planococcus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Sporosarcina*, *Listeria*, *Salmonella*, *Azotobacter* dan *Flavobacterium* (Shovitri dkk., 2011). Interaksi antara rhizobakteri dan tumbuhan menyebabkan terbentuknya eksudat akar yang berasal dari sel-sel pada ujung akar yang sedang tumbuh, mengandung selulosa, pektin, pati dan lignin yang disebut musilage (Widyati, 2013).

Penelitian Zulaika dkk. (2012) mengenai potensi rhizobakteri sebagai bioakumulator logam Pb menunjukkan bahwa rhizobakteri mampu mengakumulasi logam Pb hingga konsentrasi 25 ppm. Mekanisme akumulasi logam berat pada rhizobakteri yaitu dapat menghasilkan senyawa pengkhelat logam yaitu siderofor yang merupakan ligan dengan berat molekul rendah. Siderofor dapat membentuk kompleks dengan logam-logam termasuk logam berat, umumnya pengkhelatan logam berat oleh bakteri adalah sebagai mekanisme bakteri untuk mempertahankan diri terhadap logam berbahaya. Bakteri yang tahan terhadap toksisitas logam berat mengalami perubahan sistem transpor di membran selnya dan terjadi penolakan atau pengurangan logam yang masuk ke dalam sitoplasma sehingga logam tidak dapat melewati membran sel dan terakumulasi di permukaan sel (Sumarsih, 2003).

Penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi rhizobakteri pada *R. mucronata* perlu untuk dilakukan mengingat peran rhizobakteri pada akar *R. mucronata* sangat besar dalam proses bioremediasi logam Pb, sehingga perlu dilakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi rhizobakteri pada akar *R. mucronata* yang terpapar logam berat timbal (Pb) di kawasan hutan mangrove Wonorejo Surabaya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Juli-Agustus 2014, sampel akar *R. mucronata* diambil dari kawasan hutan mangrove Wonorejo. Isolasi dan

karakterisasi rhizobakteri pada akar *R. mucronata* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi dan pengujian kadar Pb dilakukan di Laboratorium Anorganik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah sampel akar *R. mucronata*. Bahan pewarnaan Gram: kristal violet, iodine, ethanol 95%, dan Safranin. Media *Nutrient agar* (NA) dan *Nutrient broth* (NB) (Oxoid) yang dimodifikasi, senyawa timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), H_2O_2 3%, *carbol fuchsin*, HCl 3%, glukosa, sukrosa, manitol, media malonat *broth*, media nitrat *broth*, asam sulfanilat, 2-3 dimetil- α -naftilanin, debu Zn, akuades, HNO_3 , H_2SO_4 , pekat, kapas, kertas label, aluminium foil, gula, agar-agar dan spiritus.

Isolasi diawali dengan pengambilan 10 g sampel akar dari *Rhizopora mucronata* di kawasan hutan mangrove Wonorejo. Sampel akar dibersihkan kemudian dihancurkan menggunakan lumpang dan alu. Akar yang sudah hancur kemudian dimasukkan ke dalam 90 ml media *Nutrient broth* steril dengan kadar Pb 0,263 ppm dan diinkubasi selama 24 jam. Suspensi tersebut merupakan pengenceran 10^{-1} . Sebanyak 1 ml suspensi 10^{-1} diencerkan secara berseri hingga mendapatkan suspensi pengenceran 10^{-5} . Sebanyak 0,1 ml diambil dari masing-masing pengenceran, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril secara duplo yang dilakukan secara aseptis. Sebanyak 15 ml media NA dengan kadar Pb 0,263 ppm dimasukkan ke setiap cawan petri yang telah diisi sampel dengan teknik *pour plate* dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan isolat rhizobakteri. Isolat rhizobakteri dipurifikasi dengan metode *streak plate* hingga diperoleh isolat murni. Isolat murni kemudian diskriming dengan media *nutrient agar* dengan kadar Pb 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm kemudian diinkubasi selama 24 jam. Isolat rhizobakteri kemudian dikarakterisasi meliputi morfologi koloni, morfologi sel, susunan sel dan fisiologis biokimia (uji motilitas, uji reduksi gula, uji katalase, uji fermentasi asam campuran atau butanadiol MR/VP, pewarnaan asam, uji malonat dan uji reduksi nitrat).

HASIL

Hasil isolasi rhizobakteri yang terdapat pada akar *R. mucronata* diperoleh 3 isolat bakteri yang paling dominan. Karakteristik morfologi koloni rhizobakteri meliputi bentuk koloni, elevasi, tepi koloni, warna koloni, diameter koloni dan optik koloni sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni rhizobakteri yang diisolasi dari akar *R. mucronata* yang terpapar logam berat Pb

Isolat	Karakter					
	Bentuk	Elevasi	Tepi	Warna	Diameter	Optik
AR1	Tidak beraturan	Cembung	Berombak	Putih	0,6 cm	<i>Opaque</i>
AR2	Lingkaran	Seperti kawah	Berombak	Kuning	0,6 cm	<i>Translucent</i>
AR3	Tidak beraturan	Seperti kawah	Berombak	Kuning	0,4 cm	<i>Opaque</i>

Keterangan: AR1: isolat pertama rhizobakteri hasil isolasi dari akar *R. Mucronata*; AR2: isolat kedua rhizobakteri hasil isolasi dari akar *R. mucronata*; AR3: isolat ketiga rhizobakteri hasil isolasi dari akar *R. mucronata*

Isolat bakteri kemudian diskriminasi pada media NA dengan kadar Pb 5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm kemudian diinkubasi selama 24 jam. Hasil skrining isolat bakteri resisten logam Pb dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil skrining isolat bakteri resisten logam Pb dengan kadar Pb 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm

Isolat	5 ppm	10 ppm	15 ppm
AR1	+	+	+
AR2	+	+	-
AR3	+	+	-

Keterangan: +: tumbuh bakteri, -: tidak tumbuh bakteri

Semua isolat bakteri dapat tumbuh pada media NA dengan kadar Pb 5 ppm dan 10 ppm, sedangkan pada media dengan kadar Pb 15 ppm hanya isolat AR1 yang dapat tumbuh. Ketiga isolat tersebut merupakan isolat yang resisten terhadap logam Pb karena dapat tumbuh dengan kadar Pb \geq 5 ppm (Zulaika dkk., 2012).

Karakterisasi bakteri berdasarkan morfologi sel, susunan sel dan uji aktivitas biokimia dilakukan dengan cara membandingkan morfologi sel dan susunan sel serta aktivitas biokimia setiap bakteri. Hal ini karena setiap bakteri mempunyai aktifitas enzimatis yang berbeda. Tabel 3 menunjukkan data karakter rhizobakteri yang diisolasi dari akar *R. mucronata* yang terpapar logam berat Pb.

Tabel 1. Data motilitas \pm standar deviasi cacing *Ascaridia galli* selama 12 jam

No	Karakter	Isolat		
		AR1	AR2	AR3
1	Gram*	negatif	negatif	negatif
2	Bentuk sel*	bulat	bulat	bulat
3	Susunan sel*	Stapilokokus	Stapilokokus	Streptokokus
4	Diameter*	1,5 μ m	1,5 μ m	1,5 μ m
5	Motilitas**	+	-	-
6	Produksi katalase**	+	+	+
7	Reduksi glukosa**	+	+	+
8	Reduksi sukrosa**	+	+	+
9	Reduksi manitol**	+	+	-
10	Fermentasi asam campuran**	+	+	-
11	Produksi 2,3 butanadiol**	+	+	+
12	Ketahanan terhadap asam**	+	-	+
13	Reduksi nitrat**	+	+	+
14	Reduksi malonat**	-	-	-

Keterangan:

+ : Reaksi fisiologi biokimia positif

- : Reaksi fisiologi biokimia negatif

* : Karakter morfologi dan susunan sel

** : Karakter fisiologi biokimia

PEMBAHASAN

Isolasi rhizobakteri pada akar *R. mucronata* yang terpapar logam berat Pb yang ditumbuhkan dalam media NA dengan kadar logam Pb 0,263 ppm, dilanjutkan dengan skrining dengan kadar Pb yaitu 5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm, mendapatkan 3 isolat rhizobakteri yang resisten logam Pb hingga kadar Pb 10 ppm yaitu AR1, AR2 dan AR3. Ketiga isolat tersebut mampu tumbuh dengan kadar Pb dalam media ≥ 5 ppm sehingga termasuk bakteri yang resisten terhadap logam berat Pb (Zulaika dkk., 2012).

Menurut Suhendrayatna (2001), mekanisme pembersihan logam berat oleh mikroorganisme sebagian besar merupakan proses pertukaran ion. Mekanisme ini dapat dibagi atas 3 cara yaitu berdasarkan metabolisme sel yang dibagi atas; proses yang terkait pada metabolisme dan proses yang tidak terkait pada metabolisme sel, sedangkan berdasarkan posisi logam berat dapat dibagi atas; akumulasi ekstraseluler (presipitasi), akumulasi intraseluler dan penyerapan logam oleh permukaan sel. Mekanisme yang terakhir adalah berdasarkan cara pengambilan logam berat.

Mekanisme akumulasi logam berat melalui proses pertukaran ion berdasarkan metabolisme sel dapat dibedakan menjadi fase pengikatan dan transpor aktif. Fase pengikatan yang tidak terkait dengan proses metabolisme sel yaitu absorpsi melalui dinding sel, kemudian diikuti dengan transpor aktif yang terkait pada metabolisme sel. Pada proses metabolisme, logam berat terakumulasi pada membran sel (ekstraseluler) dan pada sitoplasma (intraseluler) (Wulandari dkk., 2001).

Akumulasi logam Pb oleh bakteri berdasarkan posisi logam berat dibagi atas akumulasi ekstraseluler, akumulasi intraseluler dan penyerapan oleh permukaan sel. Akumulasi ekstraseluler dapat terjadi karena pengikatan ion-ion logam oleh polimer atau polisakarida ekstraseluler yang dihasilkan oleh sel-sel mikroba dan interaksi antara ion-ion logam bermuatan positif dengan sisi reaktif pada permukaan sel yang bermuatan negatif, sedangkan akumulasi intraseluler terjadi karena proses difusi yang tidak membutuhkan aktivitas mikroba secara langsung dimana gen-gen di dalam plasmid yang mengendalikan proses metabolisme tersebut (Wulandari dkk., 2001).

Proses akumulasi logam berat oleh bakteri juga didasarkan atas absorpsi logam berat. Absorpsi logam berat oleh mikroorganisme dapat dibagi 2 yaitu *passive uptake* dan *active uptake*

(Suhendrayatna, 2001). *Passive uptake* terjadi ketika ion logam berat terikat pada dinding sel biosorben. Proses ini dikenal dengan nama biosorpsi. Proses biosorpsi lebih efektif apabila terdapat pH tertentu dan adanya ion-ion lain di media yang dapat terendapkan sebagai garam yang tidak terlarut. Mekanisme *passive uptake* dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan cara pertukaran ion dan pembentukan senyawa kompleks. Proses pertukaran ion terjadi karena ion pada dinding sel digantikan oleh ion-ion logam berat, sedangkan pembentukan senyawa kompleks terjadi antara ion-ion logam berat dengan gugus fungsional seperti karbonil, amino, thiol, fosfat, dan hidroksi-karboksil secara bolak balik dan cepat (Suhendrayatna, 2001).

Isolat rhizobakteri resisten logam Pb mempunyai beberapa karakteristik, diantaranya morfologi koloni. Isolat rhizobakteri yang terisolasi menunjukkan ciri morfologi koloni yang berbeda-beda. Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh ciri morfologi bakteri yaitu tak beraturan dan lingkaran, elevasi dominan cembung dan seperti kawah, tepi koloni seluruhnya berombak, warna koloni putih dan kuning dengan optik tidak tembus cahaya dan transparan. Menurut Sumarsih (2003) koloni suatu bakteri dipengaruhi oleh penyesuaian diri terhadap lingkungannya serta sifat-sifat fisiologis yang turun-menurun.

Karakteristik juga dapat dilihat dari morfologi sel rhizobakteri. Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan pewarnaan Gram. Hasil pengamatan bentuk sel menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali didapatkan bahwa semua isolat mempunyai bentuk sel bulat. Penelitian yang dilakukan oleh Indriani (2012), berhasil mendapatkan bakteri resisten logam berat yang memiliki bentuk sel bulat berpasangan, batang berpasangan dan batang pendek. Zulaika dkk. (2012), juga mengisolasi bakteri resisten logam berat yang mempunyai bentuk sel bulat, Gram negatif, dan termasuk anggota genus *Azotobacter*.

Rhizobakteri juga memiliki karakteristik fisiologi biokimia. Motilitas merupakan salah satu karakter bakteri yang bertujuan untuk mengetahui pergerakan sel bakteri. Hasil uji motilitas didapatkan bahwa isolat AR1 diketahui motil karena terdapat penyebaran bakteri di daerah bekas tusukan jarum ose pada media semi solid, sedangkan pada isolat AR2 dan AR3 tidak terdapat penyebaran bakteri di daerah bekas tusukan sehingga bersifat non motil. Motilitas pada bakteri didukung dengan adanya struktur

yang menyerupai benang panjang yang disebut flagel yang berasal dari membran sel. Energi untuk menggerakkan flagel diperoleh bakteri dari perubahan ATP yang diuraikan oleh koenzim *ATP-ase* (Raihana, 2011).

Bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif menggunakan oksigen sehingga menghasilkan hidrogen peroksida yang bersifat racun bagi sistem enzim bakteri sendiri. Akumulasi hidrogen peroksida menyebabkan kematian bagi bakteri sendiri. Enzim katalase berfungsi menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen (Indriani, 2012). Seluruh isolat rhizobakteri diketahui mampu memproduksi enzim katalase (positif) karena mampu menghasilkan gelembung-gelembung gas. Reaksi positif dari uji katalase ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas oksigen pada permukaan koloni setelah ditetesi H_2O_2 3%. Terbentuknya gelembung-gelembung gas mengindikasikan terjadi penguraian H_2O_2 oleh enzim katalase menjadi air dan oksigen.

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menggunakan tiga jenis karbohidrat yaitu glukosa (monosakarida), sukrosa (disakarida) dan manitol (polisakarida). Hasil uji fermentasi gula didapatkan bahwa semua isolat mampu mereduksi glukosa yang ditandai oleh perubahan warna media dari merah menjadi kuning dan terbentuknya gelembung udara pada tabung Durham. Isolat yang dikarakterisasi mampu mereduksi glukosa menjadi komponen yang lebih sederhana yaitu etanol maupun asam laktat dan karbondioksida bergantung pada jenis fermentasinya. Perubahan warna medium dari merah menjadi kuning disebabkan karena terdapatnya indikator *phenol red* dalam medium. Penambahan indikator *phenol red* ke dalam medium yang mengalami fermentasi karbohidrat jadi asam dalam keadaan aerob, maka pH akan turun dan indikator *phenol red* ini akan berubah warna menjadi kuning (Aisyah, 2009). Semua isolat rhizobakteri juga mampu melakukan reduksi sukrosa yang merupakan anggota disakarida. Sukrosa akan dipecah menjadi komponen yang lebih sederhana menjadi fruktosa dan glukosa oleh enzim intestin, sukrosa dipecah menjadi maltosa dan glukosa oleh enzim maltase (Machmud dkk., 2011). Isolat AR1 dan AR2 dapat mereduksi manitol ditandai dengan perubahan warna media dari merah menjadi kuning, tetapi isolat AR3 menunjukkan reaksi negatif karena tidak mampu merubah warna media. Manitol yang merupakan anggota polisakarida dipecah menjadi gula yang lebih sederhana yaitu manosa dan galaktosa. Manosa dan galaktosa kemudian

diubah menjadi asam piruvat selanjutnya diubah kembali menjadi produk asam, gas dan produk akhir lainnya (Aisyah, 2009).

Uji fermentasi asam campuran (MR) dilakukan untuk mengetahui kemampuan mikroba memproduksi asam organik hasil metabolisme glukosa. Hasil uji MR didapatkan bahwa hanya isolat AR3 yang menunjukkan reaksi negatif karena warna media tidak berubah, sedangkan isolat AR1 dan AR2 menunjukkan reaksi positif karena terjadi perubahan warna media menjadi merah. Kemampuan bakteri untuk memproduksi asam organik hasil fermentasi sangat bervariasi. Perubahan warna media menjadi merah disebabkan oleh produksi asam organik oleh bakteri yang dideteksi oleh indikator *methyl red* (Indriani, 2012).

Uji produksi 2,3 butanadiol (VP) dilakukan untuk mengetahui kemampuan mikroba dalam memproduksi hasil metabolisme glukosa yang bersifat tidak asam seperti aseton (Indriani, 2012). Hasil uji VP menunjukkan bahwa semua isolat memiliki reaksi positif karena mampu merubah warna media menjadi merah muda. Reagen Barritt's yang digunakan mengandung alfa naftol yang berikatan dengan aseton dan akan dioksidasi oleh reagen KOH 40 % menjadi senyawa diasetil. Terbentuknya kompleks warna merah muda pada medium disebabkan terbentuknya guanidin dari aseton dalam media VP yang berikatan dengan diasetil yang mengubah media menjadi berwarna merah muda yang menunjukkan reaksi positif (Cappuccino dan Sherman, 2005).

Pewarnaan tahan asam bertujuan untuk mengetahui jenis-jenis bakteri apa saja yang mampu hidup pada lingkungan asam. Bakteri anaerob fakultatif memproduksi senyawa bersifat asam yang berasal dari hasil fermentasi karbohidrat. Suasana asam juga membantu bakteri dalam melakukan proses biosorpsi logam berat (Sumarsih, 2003). Bakteri tahan asam dapat mempertahankan zat warna primer *carbol fuchsin* ketika dicuci dengan larutan alkohol asam sehingga sel bakteri berwarna merah. Bakteri yang tidak tahan asam tidak dapat mempertahankan zat warna primer *carbol fuchsin* ketika dicuci dengan larutan pemucat alkohol asam sehingga sel bakteri berwarna biru karena terwarnai oleh *methylene blue* (Hendra, 2012). Hasil uji pewarnaan tahan asam didapatkan bahwa isolat AR2 mengalami reaksi negatif karena sel bakteri berwarna biru, sedangkan isolat AR1 dan AR3 mengalami reaksi positif karena sel bakteri berwarna merah.

Uji reduksi nitrat bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri yang mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Ion nitrat dapat diubah menjadi bahan organik oleh mikroba melalui proses asimilasi reduksi nitrat. Proses ini membutuhkan enzim nitrat dan nitrit reduktase. Nitrat diubah menjadi nitrit oleh enzim nitrat reduktase. Nitrit kemudian diubah menjadi ammonium oleh enzim nitrit reduktase. Ammonium kemudian disintesis menjadi protein agar bisa digunakan oleh bakteri dalam proses metabolisme (Sumarsih, 2003). Hasil uji reduksi nitrat didapatkan bahwa semua isolat mampu melakukan reduksi nitrat karena mampu mengubah warna media dari putih menjadi merah. Perubahan warna tersebut terjadi karena adanya reaksi antara reagen asam sulfanilat dan α -naftilamin dengan nitrit. Uji ini dapat bernilai negatif atau positif sehingga perlu ditambahkan bubuk Zn. Penambahan bubuk Zn tersebut tidak menyebabkan perubahan warna pada media yang menandakan Zn tidak berikatan dengan nitrat sehingga media tidak menghasilkan warna merah dan uji bernilai positif (Hadioetomo, 1993).

Uji reduksi malonat bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri yang mampu mendegradasi asam malonat (Suyati, 2010). Asam malonat merupakan salah satu inhibitor enzim dehidrogenase yang berfungsi sebagai transpor ion hidrogen. Penghambatan malonat disebabkan oleh adanya senyawa yang mempunyai struktur mirip dengan substrat saat reaksi enzimatik akan terjadi. Asam malonat memiliki struktur sama seperti asam suksinat yang merupakan kofaktor enzim dehidrogenase sehingga asam malonat bersaing dengan asam suksinat (substrat) untuk dapat bergabung dengan bagian aktif protein enzim dehidrogenase. Asam malonat akan direduksi oleh bakteri menjadi sodium dioksidase yang bersifat asam sehingga terjadi perubahan warna media dari hijau menjadi biru yang disebabkan indikator *Bromthymol blue* (BTB) dalam media (Aisyah, 2009). Hasil uji reduksi malonat didapatkan bahwa semua isolat rhizobakteri diketahui negatif karena tidak mampu merubah warna media dari hijau menjadi berwarna biru.

Hasil isolasi rhizobakteri yang terdapat pada akar *R. mucronata* yaitu AR1, AR2 dan AR3 menunjukkan bahwa ketiga isolat rhizobakteri tersebut resisten terhadap logam Pb karena dapat tumbuh pada media dengan kadar Pb ≥ 5 . Isolat AR2 dan AR3 mampu tumbuh pada media NA dengan kadar Pb 10 ppm, sedangkan isolat AR1 mampu tumbuh hingga kadar 15 ppm. Berdasarkan hasil tersebut, rhizobakteri pada akar

R. mucronata memiliki potensi sebagai agens bioremediasi ekosistem perairan yang tercemar logam berat Pb. Adapun untuk mengoptimalkan kinerja bakteri tersebut harus didukung dengan kondisi lingkungan yang sesuai sehingga dapat menunjang pertumbuhan bakteri tersebut.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh tiga isolat rhizobakteri yang diisolasi dari akar mangrove yang terpapar logam berat Pb yaitu isolat AR1, AR2 dan AR3 yang mampu tumbuh pada media *Nutrient agar* (NA) dengan kadar Pb mencapai 10 ppm (AR2 dan AR3), sedangkan isolat AR1 mampu tumbuh dengan kadar Pb 15 ppm. Ketiga isolat tersebut dikategorikan sebagai isolat rhizobakteri yang resisten terhadap Pb karena mampu tumbuh pada kadar Pb ≥ 5 ppm.

Karakteristik isolat rhizobakteri yang toleran terhadap logam Pb diantaranya berbentuk lingkaran dan tidak beraturan dengan tepi berombak. Warna koloni yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri tersebut yaitu putih dan kuning dengan optik *translucent* dan tidak tembus cahaya. Bentuk dan warna yang berbeda-beda pada tiap isolat merupakan karakter khas bagi suatu koloni bakteri tertentu. Isolat tersebut memiliki karakteristik fisiologi biokimia tertentu yang berbeda-beda.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, 2009. *Aktivitas Biokimia Organisme*. <http://rgmaisyah.wordpress.com>. Diunduh tanggal 25 Juni 2014.
- Cappuccino J G & Sherman N, 2005. *Laboratory manual for General Microbiology*. Miami: Miami Dade College.
- Fransisca A, 2011. Tingkat Pencemaran Perairan Ditinjau dari Pemanfaatan Ruang di Wilayah Pesisir Kota Cilegon. *Jurnal Perencanaan Wilayah dan Kota*, 22(2): 145-160.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek, Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Hamzah F & Setiawan A, 2010. Akumulasi Logam Berat Pb, Cu dan Zn di Hutan Mangrove Muara Angke, Jakarta Utara. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 2(2): 41-52.
- Hendra FDR, 2012. *Pewarnaan Tahan Asam*. Tasikmalaya: Universitas Siliwangi.
- Indriani A D, 2012. Identifikasi Bakteri Resistensi Logam Krom dari Limbah Cair Industri Penyamakan Kulit Sukaregang Kabupaten Garut. *Skripsi*. Tidak Dipublikasikan. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.

- Machmud N A, Retnowati Y & Uno W D, 2011. *Aktivitas Lactobacillus bulgaricus pada Fermentasi Susu Jagung dengan Penambahan Sukrosa dan Laktosa*. Gorontalo: Universitas Negeri Gorontalo.
- Raihana N, 2011. Profil Kultur dan Uji Sensitivitas Bakteri Aerob dari Infeksi Luka Operasi Laparatomi di Bangsal Bedah RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Skripsi*. Tidak Dipublikasikan. Padang: Universitas Andalas.
- Shovitri M, Nurhidayati T, Zulaika E, Ashuri N M & Purwati. 2011. Rhizobakteria di Rhizosfer *Avicennia marina* dan *Pluchea indica* di Pantai Wonorejo, Pantai Timur Surabaya. *Makalah*. Disampaikan pada Seminar Kelautan Nasional VII, Institut Teknologi 10 November, Surabaya.
- Suhendrayatna, 2001. Bioremoval Logam Berat dengan Menggunakan Mikroorganisme: Suatu Kajian Kepustakaan. *Makalah*. Disampaikan pada Seminar Bioteknologi, Kagoshima University, Tokyo.
- Sumarsih S, 2003. *Mikrobiologi Dasar*. Yogyakarta: UPN Yogyakarta.
- Suyati, 2010. Identifikasi dan Uji Antibiotik Bakteri Gram Negatif pada Sampel Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK). *Skripsi*. Tidak dipublikasikan Manokwari: Universitas Negeri Papua.
- Syamsuddin & Ulim M A, 2013. Daya Hambat Rhizobakteri Kandidat Agens Biokontrol Terhadap Pertumbuhan Koloni Patogen *Phytophthora capsici* Secara *In Vitro*. *Jurnal Floratek*, 8: 64 – 72.
- Syarifah M, 2013. Akumulasi Logam Berat Tembaga (Cu) dan Timbal (Pb) pada Pohon Mangrove (*Rhizopora mucronata*) di Perairan Karangsong, Indramayu. *Skripsi*. Tidak dipublikasikan Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Widyati E, 2013. *Memahami Interaksi Tanaman – Mikroba*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peningkatan Produktivitas Hutan Kampus Balitbang Kehutanan.
- Wulandari S, Dewi N F & Suwondo, 2005. Identifikasi Bakteri Pengikat Timbal (Pb) pada Sedimen di Perairan Sungai Siak. *Jurnal Biogenesis*, 1 (2): 62-65.
- Zulaika E, Luqman A, Arindah T & Sholikah U, 2012. Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator. *Makalah*. Disampaikan pada Seminar Nasional *Waste Management for Sustainable Urban Development*, Institut Teknologi 10 November, Surabaya 21 Februari 2012.