

***Azotobacter chroococcum* SEBAGAI REDUKTOR MERKURI TOKSIK (Hg^{2+}) MENJADI MERKURI VOLATIL NON TOKSIK (Hg^0)**

Enny ZULAIKA^{1*}

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITS-Surabaya.
*enny@bio.its.ac.id

Abstrak

Merkuri merupakan logam berat yang sangat toksik dibandingkan logam berat lainnya. Beberapa genus bakteri resisten dan dapat hidup di habitat yang tercemar merkuri, satu diantaranya adalah genus *Azotobacter*. Salah satu mekanisme resistensi *Azotobacter* terhadap merkuri adalah kemampuannya mereduksi merkuri (Hg^{2+}) toksik menjadi merkuri (Hg^0) volatil secara enzimatis.

Tujuan penelitian adalah mengetahui resistensi *Azotobacter chroococcum* yang resisten $HgCl_2$ dan mengetahui aktivitas enzim merkuri reduktase sebagai bioreduktor Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Pengujian resistensi merkuri dilakukan dengan metode goresan agar miring yang mengandung $HgCl_2$. Aktivitas enzim merkuri reduktase dianalisis dengan metode Mercury Reductase Assay dan spektrofotometri dengan panjang gelombang 340 nm.

Azotobacter chroococcum resisten sampai dengan 10 mg/L $HgCl_2$ dengan menunjukkan pertumbuhan yang optimum. Aktivitas enzim merkuri reduktase relatif tinggi dengan daya reduksi ± 2 mg/L dan efisiensi reduksi >70% pada konsentrasi 5 mg/L $HgCl_2$.

Keywords: *Azotobacter*, merkuri reduktase, resistensi

1. Pendahuluan

Merkuri merupakan salah satu logam berat yang sangat beracun dan berbahaya walaupun dalam konsentrasi sangat rendah (Guzzi *et al.*, 2007). Merkuri mempunyai toksisitas yang tinggi untuk semua organisme karena kekuatan afinitasnya terhadap grup thiol dalam protein, merkuri juga dapat menyebabkan kerusakan otak, kerusakan syaraf motorik, *cerebral palsy*, dan *retardasi mental* (Takeuchi & Sugio, 2006).

Beberapa jenis bakteri dapat digunakan untuk mengurangi toksisitas merkuri, di antaranya genus *Bacillus* dan *Azotobacter* (Zulaika *et al.*, 2012). Salah satu mekanisme pengurangan toksisitas merkuri secara enzimatis menggunakan enzim merkuri reduktase yang berfungsi mereduksi merkuri Hg^{2+} menjadi merkuri volatil Hg^0 sehingga merkuri Hg^{2+} tidak meracuni sel bakteri (Kiyono & Pan-Hou, 2006). *Azotobacter* adalah salah satu genus bakteri yang banyak dijumpai di rhizosfer tanah, mampu menambat N_2 bebas di atmosfer, merupakan bakteri aerob dan dapat digunakan sebagai agen *biofertilizer* (Salhia, 2010). *Azotobacter chroococcum* adalah salah satu spesies anggota genus *Azotobacter*, juga bersifat sebagai bakteri non simbiotik yang banyak digunakan sebagai agen *biofertilizer* karena mampu memfiksasi nitrogen bebas, melarutkan fosfat, dan menghasilkan hormon auksin (Rojas *et al.*, 2011). Apakah *Azotobacter chroococcum* di atas juga mampu mereduksi merkuri Hg^{2+} menjadi merkuri volatil Hg^0 yang non toksik sehingga *Azotobacter chroococcum* selain dapat digunakan sebagai agen *biofertilizer* juga sebagai agen *bioremediasi* merkuri.

2. Metode Penelitian

Resistensi *A. chroococcum* terhadap merkuri

Resistensi *A. chroococcum* terhadap merkuri dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media *Azotobacter*-agar miring yang ditambah $HgCl_2$ 5 mg/L, 10 mg/L, dan 15 mg/L. Diinkubasi 24 jam pada suhu ruang dan diamati pertumbuhan koloninya. Isolat yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap merkuri $HgCl_2$.

Persiapan ekstrak enzim

Satu ose koloni *A. chroococcum* diinokulasi kedalam 10 ml nutrisi broth, diinkubasi dengan *rotary shaker* (100 rpm) dalam suhu ruang sampai fase logaritmik. Sebanyak 3 ml kultur sel fase logaritmik diinokulasikan ke dalam 30 ml NB- $HgCl_2$ 0,1 mg/L, diinkubasi sampai fase eksponensial. Dilakukan perhitungan jumlah sel/ml dengan *Haemocytometer*. Selanjutnya kultur sel disentrifugasi (12000 rpm, 20 menit) pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet sel disuspensi dengan 30 ml PBS (*Phospat Buffer Saline*) pH ± 7 . Suspensi sel disonikasi dengan *ultrasonic processor* (600 watt, amplitude 50%) selama 60 detik, disentrifugasi (12000 rpm, 30 menit) pada suhu 4°C (Ghosh *et al.*,

1999). Supernatant sebagai ekstrak enzim dipindah secara hati-hati kedalam botol gelap yang bersih dan steril dan disimpan pada suhu -20°C (Ogunseitan, 1998).

Uji aktivitas enzim merkuri reduktase

Aktivitas enzim merkuri reduktase diukur dengan menambahkan ekstrak enzim kedalam larutan MRA (*Mercury Reduktase Assay*), perbandingan 1:1. Larutan MRA terdiri dari 50 mM larutan PBS pH ± 7; 0,5 mM EDTA; 0.1% (v/v) β-mercaptoethanol, 100 μM NADH, 0,2 mM, MgSO₄ dan HgCl₂ (Ogunseitan, 1998). HgCl₂ yang ditambahkan adalah 5, 10 dan 15 mg/L. Inkubasi dilakukan selama 0, 30, 60, dan 120 menit pada suhu ruang. Pengukuran aktivitas enzim merkuri reduktase menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang λ 340 nm (Zeroual *et al.*, 2003). Sebagai kontrol adalah larutan MRA tanpa penambahan ekstrak enzim yang diinkubasi 0 menit. Satu unit aktivitas enzim merkuri reduktase didefinisikan sebagai jumlah μM NADH yang teroksidasi per jumlah sel permenit dengan satuan μM NADH/jumlah sel/menit (Zeroual *et al.*, 2003). Pengukuran aktivitas enzim merkuri reduktase dilakukan menggunakan kurva standar NADH.

Perhitungan HgCl₂ tereduksi (mg/L)

$$= (N \mu\text{M}/1.000.000) \times 271,59 \times 1000$$

Keterangan :

N = NADH teroksidasi
 1.000.000 = konversi M menjadi μM
 271,59 = massa relatif HgCl₂
 1000 = konversi gram menjadi mg

Perhitungan Hg²⁺ tereduksi (mg/L)

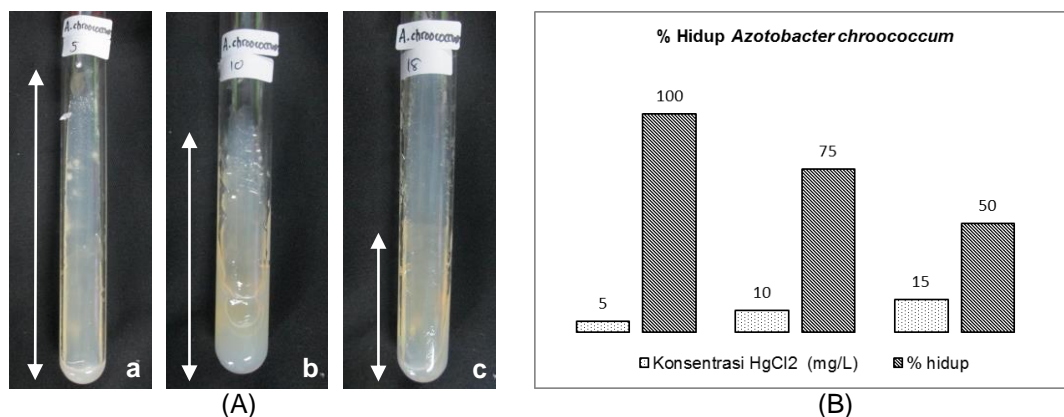
$$= (Ar \text{ Hg}/Mr \text{ HgCl}_2) \times \text{mg/L HgCl}_2 \text{ tereduksi}$$

Keterangan:

Ar: massa atom relatif Hg (= 200,59)
 Mr: massa molekul relatif HgCl₂ (= 271,59)

3. Hasil dan Pembahasan

Azotobacter chroococcum mampu tumbuh pada media nutrisi agar HgCl₂ sampai dengan 15 mg/L (Gambar 1). Hal ini menunjukkan *Azotobacter chroococcum* merupakan bakteri resisten merkuri. Bakteri dinyatakan resisten terhadap merkuri jika mampu tumbuh pada medium yang mengandung merkuri lebih dari 5 mg/L (De *et al.*, 2008).



Gambar 1. (A) Koloni yang tumbuh pada media Nutrien Agar-HgCl₂. (B) % koloni yang tumbuh (tanda panah menunjukkan arah pertumbuhan koloni)

Isolat bakteri yang resisten terhadap merkuri merupakan isolat yang potensial digunakan sebagai agensia bioremediasi pencemaran merkuri. Tingkat adaptasi suatu bakteri terhadap senyawa merkuri berperan penting untuk menentukan kemampuan bakteri dalam mendegradasi senyawa merkuri dari lingkungannya. Secara umum ada dua kemampuan resistensi bakteri terhadap merkuri yaitu mekanisme enzimatik dan mekanisme biosorpsi (Rehman *et al.*, 2007).

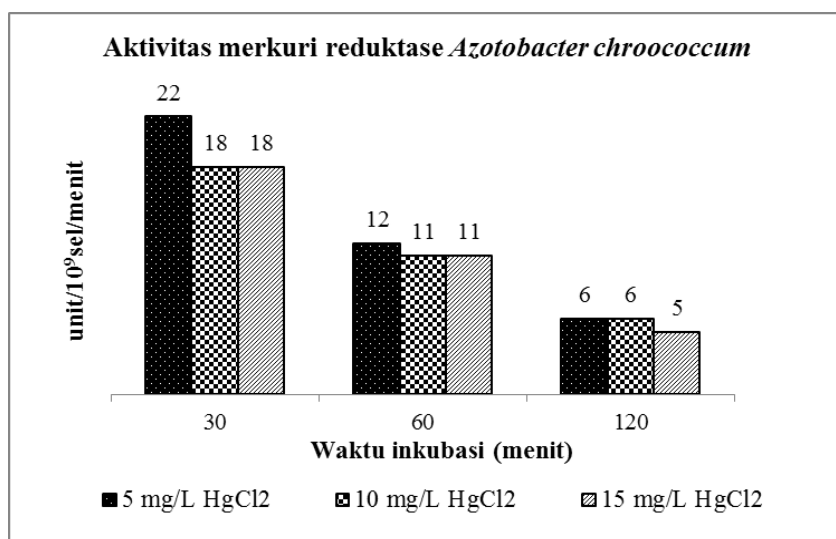
Satu unit aktivitas enzim merkuri reduktase didefinisikan sebagai jumlah NADH yang teroksidasi per jumlah sel per menit ($\mu\text{M NADH}/\text{jumlah sel}/\text{menit}$) (Zeroual *et al.*, 2003). Aktivitas enzim merkuri reduktase dari *Azotobacter chroococcum* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas merkuri reduktase, NADH teroksidasi, Hg^{2+} tereduksi dan Efisiensi reduksi Hg^{2+}

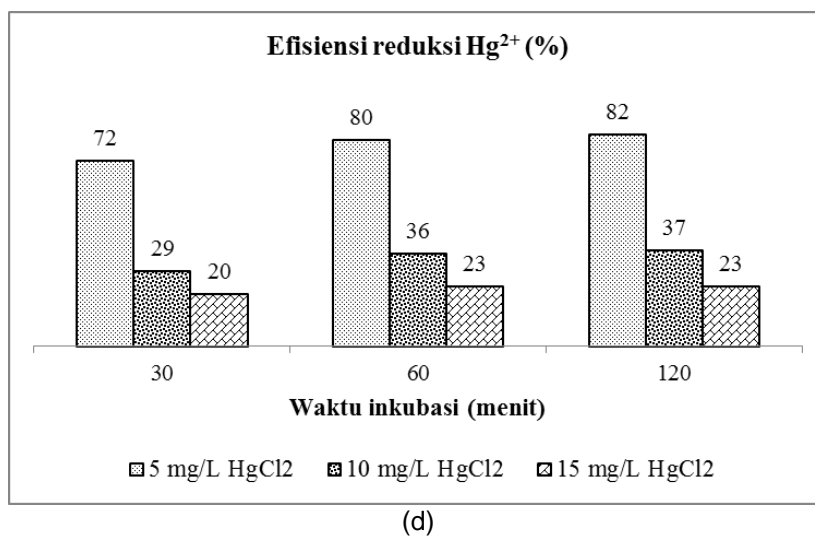
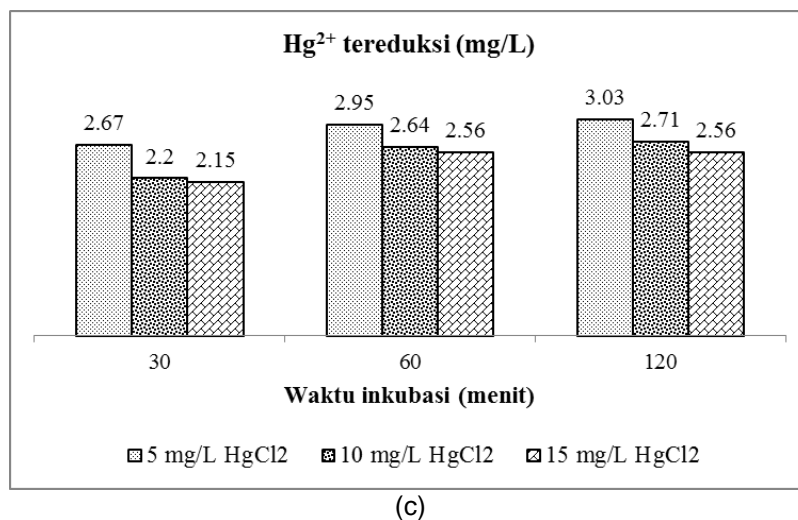
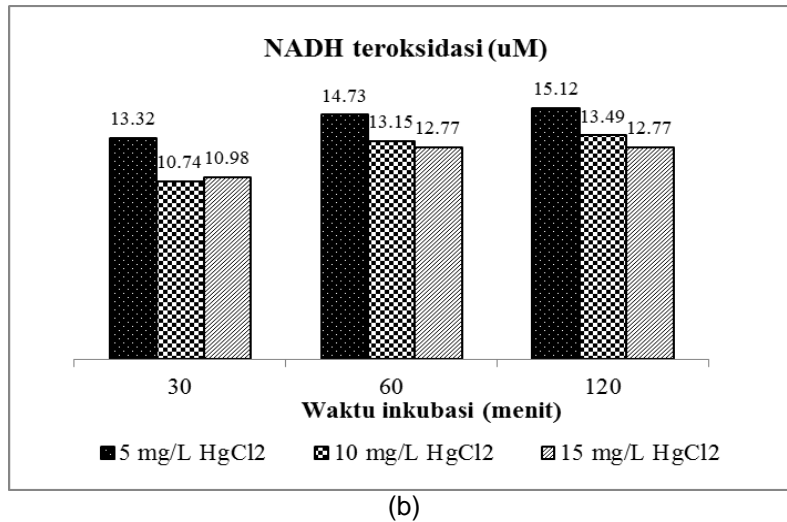
HgCl_2 (mg/L)	Aktivitas mer-red ($\times 10^4$) (unit/ 10^9 sel/menit), diinkubasi (menit)			NADH teroksidasi (μM), diinkubasi (menit)			Hg^{2+} tereduksi (mg/L)			Efisiensi reduksi Hg^{2+} (%)		
	30	60	120	30	60	120	30	60	120	30	60	120
5	22	12	6	13,32	14,73	15,12	2,67	2,95	3,03	72	80	82
10	18	11	6	10,74	13,15	13,49	2,20	2,64	2,71	29	36	37
15	18	11	5	10,98	12,77	12,77	2,15	2,56	2,56	20	23	23

Enzim merkuri reduktase memerlukan koenzim NADPH untuk mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Beberapa strain bakteri dapat menggunakan NADH sebagai koenzim. Substrat yang digunakan untuk mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 dalam penelitian ini adalah NADH. Berdasar tabel 1 di atas, semakin lama waktu inkubasi, aktivitas enzim merkuri reduktase semakin rendah. Hal ini dikarenakan substrat semakin berkurang, substrat hanya diberikan satu kali dengan konsentrasi $100 \mu\text{M}$ sehingga NADH semakin habis dalam pengikatan enzim dan substrat. Dari ketiga waktu inkubasi aktivitas enzim merkuri reduktase paling efektif pada waktu inkubasi 30 menit, pada keseluruhan konsentrasi HgCl_2 yang diberikan.

Enzim merkuri reduktase akan mereduksi ion merkuri anorganik menjadi elemental merkuri yang volatil, FAD menggunakan NADPH sebagai donor elektron (Fox & Walsh, 1982). NADPH dan NADH mempunyai fungsi yang sama sebagai donor elektron dengan potensial reduksi pada NADPH sebesar $-0,320$ volt dan NADH sebesar $-0,315$ volt sehingga kemolarannya sama yaitu $0,000622 \mu\text{M}$ (Voet & Voet, 1990). Jumlah NADH yang teroksidasi semakin tinggi maka jumlah HgCl_2 yang tereduksi juga akan semakin besar, begitu pula dengan Hg^{2+} yang tereduksi. Hal ini menunjukkan NADPH atau NADH sebagai donor elektron berperan dalam reaksi enzimatik reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 (Gambar 2)



(a)



Gambar 2. a. Aktivitas merkuri reduktase, b. NADH teroksidasi, c. Hg²⁺ tereduksi dan d. Efisiensi reduksi Hg²⁺ pada *Azotobacter chroococcum*

Berdasar gambar 2 di atas, secara umum efisiensi reduksi Hg^{2+} relatif tinggi pada konsentrasi 5 mg/L yaitu di atas 70% pada semua waktu inkubasi dan akan menurun efisiensinya ketika konsentrasi $HgCl_2$ menjadi 10 mg/L dan 15 mg/L. Pada bakteri resisten merkuri, mekanisme reduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 secara enzimatik disebabkan adanya gen *mer* operon yaitu gen *merA* yang menyandi enzim merkuri reduktase (Brown *et al.*, 2003). Aktivitas enzim merkuri reduktase membutuhkan koenzim NADPH atau NADH sebagai reduktor atau sebagai donor elektron yang akan diberikan ke Hg^{2+} sehingga tereduksi menjadi Hg^0 (Essa *et al.*, 2002).

4. Kesimpulan

Azotobacter chroococcum resisten terhadap merkuri (II) dan secara enzimatik dapat mereduksi merkuri (II) menjadi merkuri (0) volatil dengan efisiensi reduksi di atas 70% pada pemaparan 5 mg/L $HgCl_2$

Daftar Pustaka

- Brown, N.L., Shih, Y.C., Leang, C., Glendinning, K.J., Hobman, J.L. and Wilson, J.R. (2003): Mercury Transport and Resistance, *Biochemical Society Transactions*, Vol 30, No. 4, pp. 715-718.
- De, J., Ramaiah, N. and Vardanyan, L. (2008): Detoxification of Toxic Heavy Metals by Marine Bacteria Highly Resistant to Mercury, *Marine Biotechnology*, Vol. 10, pp. 471-477.
- Ghosh, S., Sadhukhan, P.C., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K. and Mandal, A. (1999): Purification and Properties of Mercuric Reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 86, pp. 7-12.
- Guzzi, G. P. & La-Porta, C.A.M. (2007): Molecular Mechanisms Triggered by Mercury, *Review, Toxicology*, Vol. 244, pp. 1 - 12.
- Kiyono, M. & Pan-Hou, H. (2006): Genetic Engineering of Bacteria for Environmental Remediation of Mercury. *Journal of Health Science*, Vol. 52, No. 3, pp. 199 - 204.
- Ogunseitan, O.A. (1998): Protein Method for Investigating Mercuric Reductase Gene Expression in Aquatic Environments, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 2, pp. 695-702.
- Rehman, A., Ali, A., Muneer, B. and Shakoori, A.R. (2007) Resistance and Biosorption of Mercury by Bacteria Isolated from Industrial Effluents, *Pakistan J. Zool.*, Vol. 39, No. 3, pp. 137-146.
- Salhia, B. M. (2010): The Effect of *Azotobacter chroococcum* as Nitrogen Biofertilizer on the growth and yield of *Cucumis Sativus*. *Thesis Master of Biological Sciences Botany*. The Islamic University, Gaza.
- Takeuchi, F. and Sugio, T. (2006). Volatilization and Recovery of Mercury from Mercury Pluted Soils and Wastewater Using Mercury Resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains SUG 2-2 and MON-1, *Research Microbiology*, Vol. 152, pp. 503-514.
- Voet, D. and Voet. (1990): *Biochemistry*. New York: J Wiley. 1223p.
- Fox, B. and Walsh, C.T. (1982): Mercuric Reduktase. Purification and Characterization of a Transposon-encoded Flavoprotein Containing an Oxidation Reductionactive Disulfide, *Journal Biology Chemistry*, Vol. 257, pp. 2498-2503.
- Zeroual, Y., Moutaouakkil A., Dzairi F.Z., Talbi M., Chung P.U., Lee K., and Blaghen M. (2003): Purification and Characterization of Cytosolic Mercuric Reductase from *Klebsiella pneumonia*. *Annals of Microbiology*, Vol . 53, pp. 149-160.
- Zulaika, E., Sembiring, L. & Soegianto, A. (2012): Characterization and identification of Mercury-resistant Bacteria from Kalimas River Surabaya-Indonesia by Numerical Phenetic Taxonomy, *Journal Basic Applied Science Research*, Vol. 2, No. 7, pp. 7263 - 7269.