

REDUKSI TOKSISITAS Cu TERHADAP BAKTERI *Burkholderia* sp. ISOLAT St.F DENGAN PENAMBAHAN ASAM AMINO GLISIN

I Made Sudiana¹

INTISARI

Sudiana, I.M. 2003. Reduksi Toksisitas Cu Terhadap Bakteri *Burkholderia* sp. Isolat St.F dengan Penambahan Asam Amino Glisin. *Biologi 3 (2)* : 129 - 143.

Pengaruh asam amino glisin terhadap penurunan toksisitas logam Cu pada bakteri *Burkholderia* sp. Isolat St.F dipelajari dalam media dengan pH yang berbeda. Tingkat toksisitas diukur dengan indikator kecepatan pertumbuhan dan tingkat konsumsi oksigen oleh bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan glisin dengan konsentrasi 3,2 mM menyebabkan bakteri isolat St.F mampu tumbuh normal pada medium yang mengandung 5 mg/l logam Cu. Padahal, tanpa penambahan glisin bakteri ini mampu tumbuh normal hanya sampai konsentrasi Cu sebesar 4 mg/l. Penambahan glisin diduga dapat mendetoksifikasi Cu melalui pembentukan ikatan kompleks Cu-glisin. Disamping itu, penambahan glisin juga mungkin meningkatkan ketersediaan sumber N bagi pertumbuhan sel bakteri.

Kata kunci: asam amino glisin, detoksifikasi Cu, *Burkholderia* sp.

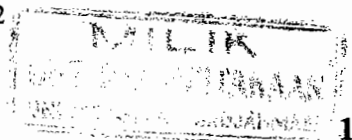
ABSTRACT

Sudiana, I.M. 2003. Reduction of Cu Toxicity on Bacterial Isolate of *Burkholderia* sp. St.F by Addition of Glycine. *Biologi 3 (2)* : 129 - 143.

The effect of glycine on the reduction of Cu toxicity against bacterial cell (*Burkholderia* sp. Isolate St.F) was studied in media with various pH. Toxicity was determined by using the indicator of cell growth rate and oxygen consumption. The result of experiments showed that the addition of glycine at the concentration of 3.2 mM enabled bacterial cell to grow normally in the medium containing Cu at 5 mg/l. However, in the medium without addition of glycine, the bacterial cells could grow normally only up to the concentration of 4 mg/l Cu. The addition of glycine was assumed to detoxify Cu by formation of Cu-glycine complex. Furthermore, the addition of glycine could possibly improve the supply of N for the growth of bacterial cells.

Keywords: amino acid glycine, detoxification of Cu, *Burkholderia* sp.

¹ Pusat Penelitian Biologi – LIPI, Jl. Juanda 18 Bogor 16122



PENDAHULUAN

Akibat eksploitasi kekayaan alam seperti kegiatan penambangan logam mulia yang melebihi daya dukung alami, menyebabkan meningkatnya jenis dan kuantitas limbah yang mengandung logam berat, seperti Pb, Sn, Cd, Fe, Mn, Zn, As dan Hg memasuki ekosistem perairan (Erns *et al.*, 1988).

Pengaruh kronis logam berat pada konsentrasi di atas ambang batas terhadap makhluk hidup diekspresikan dalam beberapa bentuk penurunan dan gangguan metabolisme sel, seperti ditunjukkan oleh terhentinya proses purifikasi alami pada ekosistem perairan, menurunnya aktivitas fotosintesis, dan bahkan menyebabkan terjadinya mutasi genetik (Bitton dan Dutka, 1982). Konsentrasi ion Cu melebihi ambang batas toleransi biasanya dijumpai pada ekosistem teresterial, tempat pengendapan *tailing*, pada kegiatan eksplorasi logam tembaga, dan juga pada ekosistem perairan yang membawa aliran *tailing* menuju area yang lebih rendah. Jelas terlihat konsentrasi logam Cu yang tinggi menyebabkan kerusakan komponen ekosistem perairan, misalnya mikroba heterotrofik yang berperan penting dalam proses pemurnian air secara hayati (Atlas dan Bartha, 1993). Salah satu fungsi utama mikroba perairan adalah mempercepat proses hidrolisis dan degradasi senyawa organik, serta memacu proses mineralisasi unsur hara

makro dan mikro di dalam air (Bora dan Bezbaruah, 1999). Komunitas mikroba perairan yang kompleks secara fungsional dapat dibagi ke dalam dua kelompok, yaitu kelompok mikroba yang berperan aktif dalam siklus biogeo-kimiawi seperti mikroba litotrofik dan heterotrofik, serta mikroba yang berperan dalam fiksasi karbon dioksida melalui proses fotosintetik (Cosgrove, 1977). Mikroba heterotrofik berperan dalam hidrolisis senyawa organik dengan berat molekul tinggi seperti selulosa, lignin, dan pati di dalam air menjadi senyawa organik sederhana yang dapat digunakan dengan mudah oleh mikroba yang lain. Salah satu kelompok mikroba tersebut adalah mikroba yang mempunyai kemampuan memproduksi enzim ekstra-selular seperti selulase, amilase, invertase, dan kelompok enzim hidrolase yang lain. Beberapa mikroba yang mempunyai kemampuan fermentasi berperan memacu pelarutan fosfat anorganik seperti H_2PO_4 atau HPO_4^- (Kpombekou dan Tabatai, 1994). Aktivitas degradasi oleh mikroba heterotrofik juga dipengaruhi oleh pH lingkungan.

Pengaruh toksikan seperti Cu terhadap mikroba dapat diketahui dengan menganalisis perubahan metabolisme sel (Dunn dan Bull, 1982; Haque dan Subramanian, 1982; Grill *et al.*, 1988; Arduini *et al.*, 1995), seperti ditunjukkan oleh menurunnya respirasi sel, pembelahan sel, reaksi enzimatik, dan

bahkan dapat menyebabkan berhentinya metabolisme sel (Bitton, 1983; Liu dan Dutka, 1984). Proses penghambatan metabolisme sel oleh logam berat dan metabolit intraselular yang terlibat belum banyak diketahui. Diduga proses tersebut sangat kompleks. Keberadaan logam berat golongan halogen di dalam sel pada konsentrasi di atas ambang batas akan mengikat material DNA. Pengikatan tersebut pada toksisitas tingkat lanjut dapat menyebabkan denaturasi protein. Senyawa fenol dapat merusak dinding sel yang akhirnya dapat menyebabkan lisisnya material DNA, RNA, protein, dan komponen sel yang lain. Senyawa toksik asam dan basa dapat menyebabkan lepasnya Na^+ , Ca^+ yang terikat pada metabolit sel (Bitton, 1983). Diketahui bahwa pengaruh logam berat pada bakteri adalah pada aktivitas enzim yang berperan pada proses transfer elektron (Bitton dan Dutka, 1982). Tingkat pengaruh tersebut tergantung kepada pH, redok potensial, suhu, senyawa organik seperti asam amino dan adanya kation kompetitor (Liu dan Dutka, 1984). Beberapa asam amino, terutama yang memiliki gugus fungsional sulfidril (-SH) seperti misalnya *glutathion*, glisin, dan sistein dapat mereduksi toksitas logam pada organisme tingkat tinggi, melalui pembentuk kompleks logam atau senyawa koordinasi (Bitton dan Dutka, 1982). Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh penambahan glisin

terhadap penurunan toksistas Cu, melalui analisis laju pertumbuhan biomassa bakteri, dan aktivitas respirasinya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Isolasi bakteri dari perairan yang tercemar Cu

Sebanyak 10 ml air sungai dari daerah tercemar Cu (Timika, Papua), dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 100 ml larutan fisiologis steril. Campuran tersebut dikocok dengan menggunakan *shaker* kecepatan 170 rpm selama 1 jam. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat. Suspensi dituangkan pada medium $\frac{1}{2}$ komposisi medium *nutrien agar* (NA). Selanjutnya kultur diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari. Koloni bakteri yang tumbuh cepat selanjutnya diisolasi dan ditumbuhkan pada medium NA. Bakteri yang diuji adalah bakteri yang memiliki kemampuan tumbuh cepat pada medium yang mengandung bahan organik seperti NA, dengan asumsi bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri heterotropik yang berperan dalam purifikasi alami pada ekosistem perairan.

Identifikasi bakteri

Penyiapan DNA

Isolasi DNA dari bakteri dilakukan mengikuti metoda Maloy *et al.*, 1994. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium

NA. Koloni yang berumur 2 hari, ditumbuhkan kembali pada medium *nutrient broth* (NB) selama 14 jam. Selanjutnya 1,5 ml kultur disentrifugasi selama 2 menit pada temperatur 4°C, dengan kecepatan 15.000 rpm. Kemudian pelet diambil dan diencerkan lagi dengan larutan penyangga TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), disentrifugasi lagi selama 5 menit pada temperatur 4°C, dengan kecepatan 15.000 rpm. Pelet diambil dan diencerkan dengan 500 µl larutan penyangga TE, kemudian ditambahkan 30 µl 10 % SDS (*sodium dodecyl sulfate*), dan selanjutnya dihomogenasi dengan *Braun Cell Homoginizer*; (*B. Braun, Melsungen, Germany*). Larutan *Tris-buffered phenol* ditambahkan sebanyak 500 µl. Larutan dihomogenasi, dan disentrifugasi selama 10 menit pada temperatur 4°C, dengan kecepatan 15000 rpm. Ekstraksi DNA dilakukan dengan *phenol-chloroform-isoamyl-alcohol* dengan perbandingan (25:24:1), dan DNA dipresipitasi dengan isopropanol. DNA kemudian dicuci dengan 70 % etanol, dan dikeringanginkan pada temperatur 37°C selama 20 menit. DNA dilarutkan dengan menggunakan larutan penyangga TE.

Pemurnian DNA

DNA selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan *Wizard DNA*

Cleanup system (*Promega, Madison*). Total DNA di visualisasi dengan elektroforesis pada agarose gel 0.8 % (b/v).

Amplifikasi daerah 16s rDNA

Amplifikasi 16s rDNA dilakukan dengan menggunakan pasangan primer F968(5'ACGCGAAGAACCCTTAC 3'), dan R1378 (5'CGGTGTGTACAA-GGCCCCGGGAACG 3'). Komposisi campuran PCR : 2 µl DNA bakteri, 5 µl 10 kali larutan penyangga Stoffel (10 mM Tris HCl (pH 8,3), 10 mM KCl), 20 pMol primer, 200 µmol dNTP, 3,75 mM MgCl₂, 1% (v/v) formamide, dan 5 U Taq DNA polymerase Stoffel fragment (*Perkin-Elmer, Cetus, Nieuwerker, The Netherlands*). Kondisi amplifikasi adalah : 1 siklus untuk denaturasi awal pada suhu 95°C selama 4 menit; 25 kali ulangan denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, untuk *annealing* pada suhu 62°C selama 1,5 menit, dan pemanjangan (*extention*) pada suhu 72°C selama 2 menit; dan siklus untuk melengkapi proses pemanjangan (*complete extension*) pada suhu 72°C selama 10 menit. 5 µl dari hasil PCR di visualisasi pada 1,4 % (w/v) agarose gel pada larutan penyangga 0,5 TBE (45 mM Tris base, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA pH 8,0). Kemudian hasil PCR dipurifikasi dengan *GFXPCR DNA kit* (*Amersham Pharmacia*).

Kloning DNA Hasil Amplifikasi

Ligasi DNA hasil amplifikasi dilakukan terhadap pGEMO-T Easy Vector (Promega). Metoda yang digunakan adalah metoda kejut-panas sesuai dengan protocol Promega. Bakteri yang digunakan untuk media transformasi adalah *Eschericia coli* JM 109 (Promega).

Sikuensing DNA

Sikuensing DNA dilakukan dua arah menggunakan pasangan primer F968 dan primer R1378, dengan menggunakan mesin otomatis sikuensing ABI Prism 3100 dan pewarnaan dengan kit ABI PRISMTM Dye terminator (Perkin Elmer).

Analisis hasil sikuensing

Analisis hasil sikuensing diawali dengan melakukan analisis urutan DNA dengan menggunakan program computer GENETYX-MAC/ATSQ versi 3,0, GENETYX-MAC versi 9,0 dan program BLAST.

Penyiapan biomassa untuk uji pertumbuhan dan respirasi

Pengaruh Cu terhadap pertumbuhan sel Koloni bakteri hasil isolasi yang berumur 24 jam, yang ditumbuhkan pada medium NA, disub-kultur pada 5 ml medium NB selama 24 jam, kemudian kultur dipindahkan ke dalam 500 ml

media NB yang baru pada erlenmeyer volume 1000 ml. Selanjutnya kultur ditumbuhkan dengan penggojokan (150 rpm) pada suhu 30°C selama 2 hari. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 5°C. Supernatan dibuang dan pelet diambil untuk uji respirasi dan uji pertumbuhan.

Uji pertumbuhan

Ke dalam tujuh gelas erlenmeyer volume 500 ml yang telah berisi 150 ml media $\frac{1}{4}$ NB ditambahkan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sehingga konsentrasi Cu di dalam media NB menjadi 0, 1, 2, 3, 4, 5 dan 10 mg/L. Selanjutnya medium disterilisasi dengan autoklaf (121°C) selama 10 menit. Media steril ditambahkan dengan 5 ml suspensi bakteri. Suspensi bakteri dibuat dengan mengencerkan pelet bakteri dengan larutan fisiologis. Sebanyak 3,2 mM glisin ditambahkan ke dalam semua media uji. Kultur ditumbuhkan pada suhu 30°C, dengan penggojokan 150 rpm selama 28 jam. Pertumbuhan biomassa sel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm, setiap 2 jam.

Uji respirasi

Uji ini dilakukan untuk menentukan persen penghambatan pengambilan O_2 oleh bakteri isolat St.F akibat kehadiran Cu di dalam media tumbuh.

Uji pengambilan O₂ di dalam media akuades

Dari hasil uji pendahuluan diketahui keberadaan logam Cu pada konsentrasi 6 mg/L di dalam media akuades pada pH netral menyebabkan konsumsi O₂ oleh biomassa untuk keperluan respirasi mulai terhenti pada menit ke-85. Oksigen terlarut di dalam media tersebut adalah 2,6 mg/L. Di atas waktu tersebut nilai DO mulai konstan. Hal tersebut menunjukkan bahwa kondisi anaerobik di dalam media tidak tercapai.

Pengaruh pH

Pengujian dilakukan pada media akuades dan media sintetik pada pH netral (6,82), asam (4,3) dan basa (9,2).

Media akuades

Prosedur uji adalah sebagai berikut: sebanyak 3 liter akuades dibagi menjadi 3 pada erlenmeyer 1000 ml, kemudian diatur pH-nya, masing-masing menjadi 6,82; 4,32; dan 9,2, dengan menggunakan H₂SO₄ dan NaOH. Akuades tersebut digunakan sebagai media uji respirasi (*oxygen uptake test*) dari biomassa bakteri isolat St.F. Akuades dengan pH 6,82 sebanyak 85 ml masing-masing dimasukkan ke dalam tujuh gelas erlenmeyer volume 500 ml. Selanjutnya ditambahkan CuSO₄·5H₂O sehingga konsentrasi di dalam larutan menjadi 0, 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 mg/L Cu.

Kemudian ke dalam media uji ditambahkan 0,475 g glukosa monohidrat, kemudian ke dalam media uji diberikan aerasi selama 3 menit. Kemudian 10 ml biomassa (konsentrasi biomassa dalam larutan uji adalah 1500 mg/L), selanjutnya elektroda DO meter (DO Meter OM-14, HORIBA) dimasukkan ke dalam larutan, dan kondisi media uji dibuat steril dari pengaruh udara luar. Oksigen terlarut di dalam larutan uji diukur dengan DO meter, yang sebelumnya dikalibrasi dengan NaSO₃ 5 %.

Media sintetik

Prosedur pengujian sama seperti media akuades, hanya media akuades diganti dengan media sintetik dengan kandungan logam-logam seperti tempat asal bakteri tersebut yaitu kandungan 2 mg/L Pb(CH₃COO)₂·2H₂O; 0,6 mg/L SnCl₂·2H₂O; 4,08 mg/L ZnSO₄·7H₂O; 12,9 mg/L FeSO₄·7H₂O; 2,23 MnSO₄·H₂O; 0,1 mg/L Cd (CH₃COO)₂·2H₂O; 0,03 mg/L CoCl₂·6H₂O, dan 0,003 mg/L As₂O₃.

Pengaruh asam amino glisin terhadap pengurangan toksisitas Cu

Asam amino glisin ditambahkan sebesar 3,2 mM, kepada semua media uji yaitu media akuades dan media sintetik. Kemudian aktivitas respirasi diukur dengan mengukur oksigen terlarut yaitu dengan DO Meter OM-14, HORIBA yang telah dikalibrasi dengan NaSO₃ 5 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi bakteri heterotrofik

Bakteri dengan kode isolat St.F merupakan koloni yang tumbuh cepat pada medium yang mengandung bahan organik tinggi seperti NA data (tidak ditunjukkan) diisolasi dari perairan tercemar Cu di Timika, Irian Jaya. Karena kemampuannya menggunakan bahan organik dengan cepat, diduga bakteri St.F mempunyai peran penting dalam proses purifikasi alami pada ekosistem perairan. Oleh karena itu kemampuannya beradaptasi pada lingkungan tercemar Cu, dan pengaruh faktor lingkungan seperti nutrisi perlu diketahui. Pada penelitian ini digunakan nutrisi asam amino glisin, karena glisin merupakan salah satu asam amino yang mampu membentuk senyawa kompleks organik-logam (Bitton dan Dutka, 1982). Dengan demikian diharapkan senyawa ini mempunyai dua fungsi, yaitu berikatan dengan ion Cu, yang menyebabkan ion-Cu kurang reaktif, dan berikatan dengan material sel seperti DNA (Diaz-Ravina dan Baath, 2000). Aktivitas respirasi merupakan indikator yang paling cepat yang dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh toksikan terhadap sel bakteri (Bitton dan Dutka, 1982). Sedangkan analisa laju pertumbuhan dengan mengetahui kecepatan pertumbuhan sel dengan mengikuti kecepatan perubahan rapatan optis dengan spektrofotometer

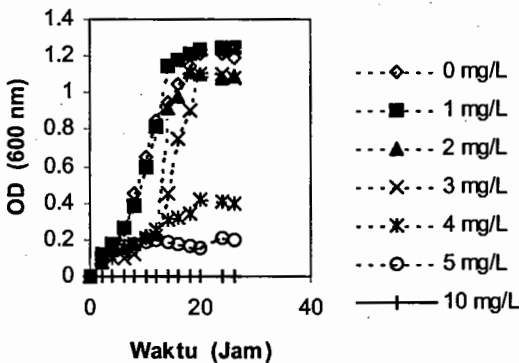
merupakan metoda yang mudah dan dapat dilakukan pada laboratorium yang sederhana. Diharapkan penelitian ini memberikan informasi tentang penggunaan metoda respirasi dan analisa kecepatan pertumbuhan sel dengan metoda turbiditas untuk mengetahui pengaruh toksikan terhadap jasad renik heterotrofik aerobik. Pengukuran kecepatan pertumbuhan (μ) tidak dilakukan karena untuk mengetahui μ secara akurat sebaiknya dilakukan dengan menghitung pertumbuhan biomassa sel (mg atau gram berat kering sel per satuan waktu). Sedangkan jumlah biomassa sel yang digunakan dalam penelitian ini hanya sekitar 1500 mg/L, dan kandungan bahan organik yang rendah, sehingga hasil konversi senyawa organik menjadi biomassa sel sangat kecil dan sulit untuk mengukur berat kering sel secara akurat. Akan tetapi metoda yang digunakan cukup sederhana yang dapat dilakukan oleh peneliti pemula. Metoda ini sangat murah jika dibandingkan dengan metoda lain seperti misalnya metoda penghambatan emisi cahaya oleh bakteri akuatik *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, yang lazim di pasaran dengan nama dagang MICROTOX[®]. Disamping itu penelitian ini menggunakan bakteri *indogenous* yang hasilnya lebih dapat merefleksikan keadaan alami. Indikator aktivitas respirasi lebih bersifat umum dibandingkan dengan metoda emisi

cahaya oleh *luminescent bacteria*. Hasil pemetaan DNA yang dianalisis dengan metoda BLAST menunjukkan bahwa urutan-urutan nukleotida pada isolat St.F menunjukkan tingkat homologi 85 % dengan *Burkholderia cepacia*, dan oleh karena itu isolat St.F diduga termasuk anggota genus *Burkholderia*.

Bakteri isoat St.F ini merupakan bakteri yang hidup di perairan tercemar logam berat, terutama Cu, dengan konsentrasi sekitar 653 mg/L, ternyata setelah diisolasi dengan medium $\frac{1}{4}$ NB, mempunyai daya tahan yang lebih rendah dibandingkan dengan lingkungan aslinya. Karakteristik kecepatan respirasi sebagai indikator perubahan metabolisme sel akibat toksisitas Cu juga dipengaruhi oleh keberadaan senyawa pengomplek asam amino (Bitton dan Dutka, 1982). Adanya asam amino glisin meningkatkan

kemampuan sel untuk tumbuh normal pada konsentrasi logam lebih dari 4 mg/L (Gambar 1. dan 2.).

Mekanisme peningkatan daya adaptasi sel terhadap logam Cu belum diketahui secara pasti. Glisin merupakan salah satu asam amino essential yang memiliki kemampuan berikatan dengan logam berat seperti Cu (Bitton dan Dutka, 1982; Diaz-Ravina dan Baath, 2000). Di samping itu glisin merupakan sumber nitrogen penting di dalam sel. Mekanisme detoksifikasi yang lain, yang mungkin terjadi adalah terbentuknya senyawa kompleks logam antara glisin dan Cu, yang mengakibatkan Cu terikat dan tidak lagi reaktif berikatan dengan makromolekul di dalam sel seperti kromosom (Bitton dan Dutka, 1982), dan komponen metabolit yang lain. Oleh karena itu, makromolekul dapat



Gambar 1. Profil pertumbuhan isolat St.F pada media NB dengan berbagai konsentrasi Cu

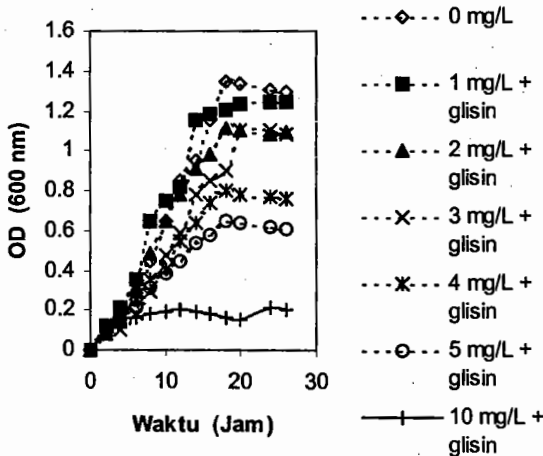
melaksanakan fungsinya secara normal seperti replikasi DNA, translasi dan transkripsi seperti pada proses sintesis protein. Proses sintesis protein merupakan proses yang paling penting dalam aktivitas metabolisme sel, karena sebagian besar kegiatan metabolisme memerlukan enzim sebagai katalisator. Terhentinya proses sintesis protein akan menyebabkan terganggunya proses anabolisma dan katabolisma di dalam sel hidup. Penghambatan tersebut bahkan dapat menyebabkan kematian sel (Barcelo dan Poschenreider, 1990).

Ikatan antara ion Cu dan molekul glisin akhirnya mengurangi aktivitas ion Cu. Fenomena tersebut ditunjukkan oleh sel masih dapat tumbuh baik pada konsentrasi di atas 4 mg/L. Bahkan pertumbuhan sel masih terlihat pada

konsentrasi Cu sekitar 10 mg/L (Gambar 2.).

Respirasi aerobik

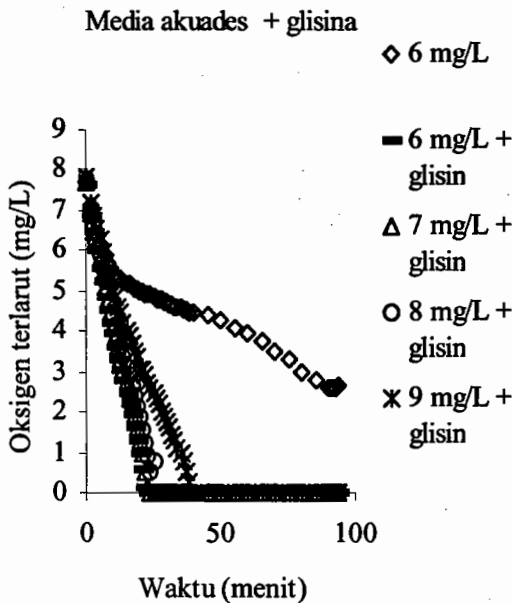
Hasil yang disampaikan dalam bentuk penurunan kadar oksigen didalam larutan (mg/L). Hal tersebut dilakukan untuk memudahkan mengetahui pengaruh waktu terhadap ketahanan sel. Pengukuran oksigen per satuan waktu tidak dilakukan karena informasi yang diperoleh tidak jauh berbeda. Penelitian selanjutnya disarankan menghitung konsumsi oksigen persatuan waktu per satuan biomassa. Tetapi penelitian akan lebih akurat dengan biomassa sel yang cukup besar, sehingga memungkinkan untuk menghitung jumlah berat kering sel. Kesulitan dengan biomassa sel yang besar adalah konsumsi oksigen lebih cepat



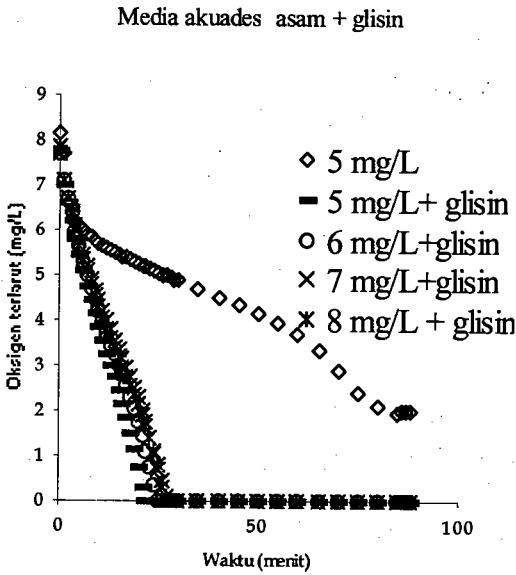
Gambar 2. Profil pertumbuhan isolat St.F pada media NB dengan penambahan glisin pada berbagai konsentrasi Cu

sehingga kondisi anaerobik akan lebih cepat tercapai sehingga metoda akan kurang sensitif. Pengambilan oksigen akan menyebabkan menurunnya oksigen terlarut di dalam larutan. Kecepatan pengambilan oksigen tergantung kepada kecepatan metabolisme sel, terutama siklus respirasi. Absorpsi oksigen oleh sel dipengaruhi oleh konsentrasi ion Cu di dalam larutan. Dari hasil uji pertumbuhan konsentrasi Cu lebih dari 3 mg/L menghambat pertumbuhan bakteri isolat St.F. Dari hasil uji respirasi sebelumnya (Sudiana, 2003, dikirim untuk publikasi) menunjukkan bahwa pada konsentrasi logam dengan pH netral, konsentrasi 6 mg/L sudah menghambat respirasi sel,

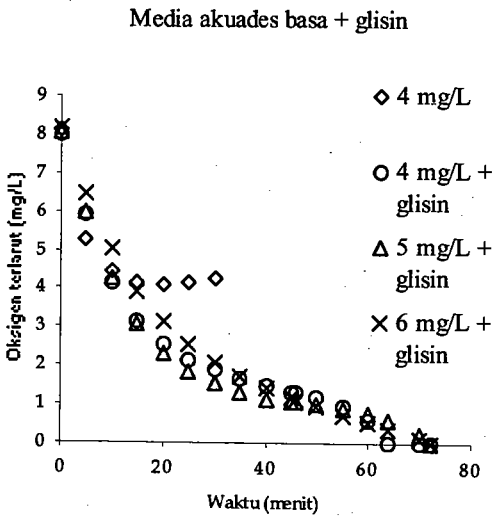
maka 3,2 mM glisin ditambahkan pada media uji akuades. Penambahan glisin memacu aktivitas respirasi seperti ditunjukkan oleh Gambar 3. Pada kondisi asam, konsentrasi Cu 5 mg/L sudah menghambat aktivitas respirasi. Penambahan glisin dapat memacu aktivitas respirasi (Gambar 4.). Ion Cu ternyata lebih toksik pada pH basa. Konsentrasi ion Cu 4 mg/L telah menghambat respirasi sel (Gambar 5.). Seperti halnya penambahan glisin pada pH netral dan asam, penambahan glisin pada pH basa meningkatkan daya adaptasi respirasi sel sampai konsentrasi 6 mg/L (Gambar 5.).



Gambar 3. Profil oksigen terlarut pada media akuades pH netral



Gambar 4. Profil oksigen terlarut pada media akuades pH asam



Gambar 5. Profil oksigen terlarut pada media akuades pH basa

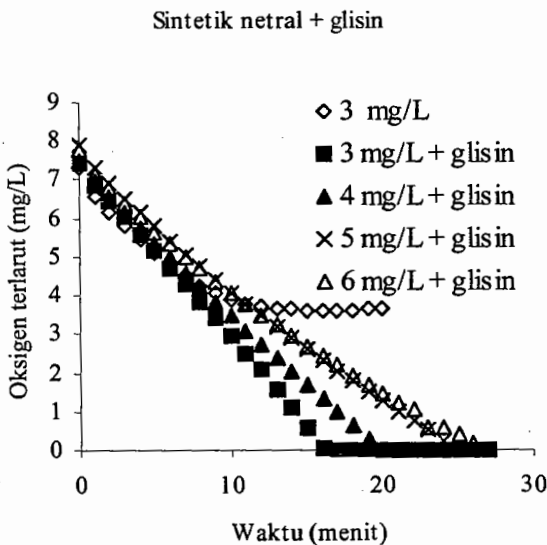
Pengaruh glisin dan keberadaan ion kompetitor

Keberadaan ion kompetitor seperti Pb, Sn, Cd, Fe, Mn, Zn dan As di dalam larutan uji memberikan perilaku yang berbeda terhadap adaptasi daribakteri isolat St.F. Adanya logam lain memberikan efek sinergis terhadap toksisitas logam Cu. Penghambatan respirasi terjadi pada konsentrasi glisin 3 mg/L. Pemberian glisin meningkatkan daya adaptasi respirasi bakteri isolat St.F pada medium sintetik pH netral (Gambar 6.).

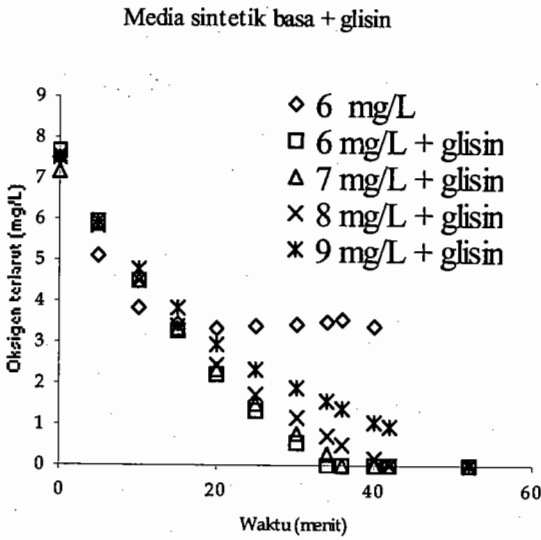
Pada pH basa keberadaan ion kompetitor ternyata tidak meningkatkan daya tahan bakteri isolat St.F terhadap toksisitas logam Cu, terbukti dengan penghambatan respirasi pada konsentrasi

Cu 7 mg/L (Gambar 7.).

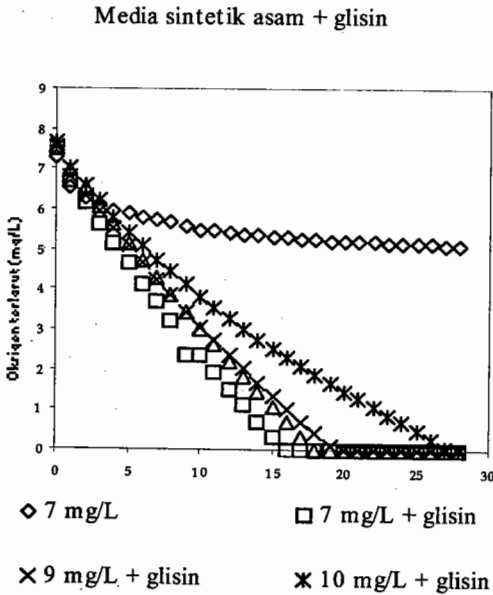
Pada pH asam keberadaan ion kompetitor tidak memperkuat toksisitas logam Cu; penghambatan terjadi pada Cu konsentrasi 7 mg/L. Penambahan glisin meningkatkan kemampuan adaptasi respirasi sel. Glisin membentuk ikatan kompleks dengan ion Cu pada kondisi asam, basa dan netral (Bitton dan Dutka, 1982; De Vos *et al.*, 1992; Kukkola *et al.*, 2000). Senyawa kimia lain yang dapat mereduksi tingkat toksisitas adalah senyawa kimia yang mempunyai gugus fungsi organik seperti amino aromatik, fenoksida, sulfidril dan fosfat (Bitton dan Dutka, 1982; Grill *et al.*, 1988). Di alam, keberadaan senyawa tersebut menguntungkan (Fernandes dan Henriques, 1991; Garcia-Gill *et al.*, 2000) karena



Gambar 6. Profil oksigen terlarut pada media sintetik pH netral



Gambar 7. Profil oksigen terlarut pada media sintetik pH basa



Gambar 8. Profil oksigen terlarut pada media sintetik pH asam

dapat mereduksi toksisitas logam dan sebagian dapat digunakan sebagai sumber nutrisi bagi jasad renik perairan.

KESIMPULAN

Asam amino yang mempunyai gugus fungsional seperti glisin di dalam media dapat mengurangi toksisitas Cu. Hal tersebut ditunjukkan oleh kecepatan pertambahan biomassa sel dan meningkatnya aktivitas respirasi. Proses detoksifikasi ini dapat disebabkan oleh pengomplekan Cu oleh asam amino yang dapat terjadi di dalam dan di luar sel. Perbaikan status nutrisi sel akibat penambahan asam amino dan senyawa organik lain juga merupakan salah satu alasan meningkatnya ketahanan sel terhadap toksisitas logam Cu dalam bentuk ionik. Kesimpulan ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya (Bitton dan Dutka, 1982).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Shigeto Otsuka dari *Tokyo University*, Tokyo, Jepang, yang telah membantu pemetaan 16s rDNA.

PUSTAKA ACUAN

Atlas, R.M., and R. Bartha. 1993. *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*. Addition Wesley, Reading.

- Arduini, I., D.L. Goodbold, and A. Onnis. 1995. Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L., and *Pinus pinaster* Ait, seedlings. *Tree Physiol.* 15: 411-415.
- Barcelo, J., and C.H. Poschenreider. 1990. Plant water relation as affected by heavy metal stress. A review. *J. Plant Nutr.* 13: 1-37.
- Bitton, G., and B.J. Dutka. 1982. *Toxicity testing using microorganism*. Vol. II. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Bitton, G. 1983. Bacterial and biochemical test for assessing chemical toxicity in the aquatic environment: a review, *CRC Critical Reviews Environmental Control*: 13-51.
- Bora, I.P., and B. Bezbaruah. 1999. Rock phosphate solubilizing bacteria from tea (*Camelia sinensis*) soil and their response to certain organophosphorus pesticides. *Tropical Ecology* 40(1): 157-161.
- Cosgrove, D.J. 1977. Metabolism of organic phosphatase in soil. *J. Soil Biol.* 1: 216-228.
- De Vos, C.H.R., M.J. Vonk, H. Vooijs, and H. Sschat. 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes

- oxidative stress in *Silena cucubalus*. *Plant Physiol.* 98: 853-858.
- Diaz-Ravina, M., and E. Baath. 2000. Response of soil bacterial communities pre-exposed to different metals and reinoculated in an unpolluted soil. *Soil Biology dan Biochemistry* 33 : 241-248.
- Dunn G.M, and A.T Bull. 1982. Bioaccumulation of copper by a defined community of activated sludge bacteria. *Eur. J.Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 30.
- Ems, W.H.O., H.J.M. Nelisen, and W.M. Ten Bookum. 1988. Combination toxicology of metal enriched soil: physiological responses of a -Zn and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environmental and Experimental Botany* 43: 55-71.
- Fernandes, J.C., and F.S. Henriques. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Botanical Review.* : 19-79.
- Garcia-Gil, C. Plaza C., P. Soler Rovira, and A. Polo. 2000. Long-term effect of municipal solid waste compost application on soil enzymes activities and microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 32 : 1907-1913.
- Grill, E., E.L. Winnacker, and M.H. Zenk. 1988. Occurrence of heavy metal binding phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experientia* 44: 539-540.
- Haque, M.A., and V. Subramanian. 1982. Copper, lead and zinc pollution of soil environment. *CRC Critical Reviews Environmental Control*: 13-67.
- Kukkola, E., P. Rautio, and S. Huttunen. 2000. Stress indication in copper and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 43: 197-210.
- Kpombekou, K., and M. Tabatabai. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rock. *Soil Science.* 158: 442-449.
- Liu, D., and B.J. Dutka. 1984. *Toxicity Screening Procedure using bacterial systems*. Marcel Dekker, New York.
- Maloy, S.R., J.E.J Cronan, and D. Freifelder. 1994. *Microbial genetic 2nd*. Jones and Barlett Publishers. Boston, London.
- Sudiana, I.M. 2003. Pengaruh Cu pada pH asam, basa dan netral terhadap kecepatan respirasi dan pertumbuhan *Burkholderia cepacia*. (Submitted).

Y = Probabilitas pemilihan moda bus kota ber-AC dibanding kendaraan pribadi

X1 = Perbedaan tingkat pelayanan. 0= jika angkutan pribadi menggunakan AC, 1= jika angkutan pribadi tidak menggunakan AC

X2 = Perbedaan waktu perjalanan.

X3 = Perbedaan biaya perjalanan

2. Dari hasil analisis *Stated Preference* di atas dapat diketahui bahwa kecenderungan siswa sekolah pengguna kendaraan pribadi untuk pindah menggunakan bus kota ber-AC sangat besar. Hal ini dapat diketahui dari persamaan regresi dimana semakin cepat waktu tempuh bus kota ber-AC daripada kendaraan pribadi, maka akan menambah probabilitas menggunakan bus kota ber-AC.

Ucapan Terima Kasih

Penyusun mengucapkan terima kasih kepada QUE Project, Jurusan Teknik Sipil Fakultas Teknik UGM yang telah membantu penyusun dalam melakukan penelitian Dr.Ir.Sigit Priyanto, M.Sc., sebagai pembimbing penelitian ini, dan teman-teman penyusun, yaitu Tommy, Banu, Yuwanti, dan Nico yang telah

membantu penyusun dalam melakukan penelitian.

Daftar Pustaka

- Anonim,UU NO. 14 Tahun 1992, *Lalulintas dan Angkutan Jalan*, Sinar Grafika.
- Anonim, Badan Pusat Statistik, *Daerah Istimewa Yogyakarta dalam Angka*, Daerah Istimewa Yogyakarta.
- Dewanto,A.H, 2003, *Pemilihan Moda Transportasi Siswa Sekolah Untuk Mengurangi Kemacetan Lalulintas*, Tugas Akhir, Jurusan Teknik Sipil Fakultas Teknik Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Hobbs, F.D., 1995, *Perencanaan dan Teknik Lalulintas*, Gadjah MadaUniversity Press, Yogyakarta.
- Parikesit, D., 1993, *Kemungkinan Penggunaan Teknik Stated Preference dalam Perencanaan Angkutan Umum*, (Forum Teknik Sipil No.II/ Agustus 1993), Jurusan Teknik Sipil, Fakultas Teknik, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Tamin, O.Z., 1997, *Perencanaan dan Pemodelan Transportasi*, Institut Teknologi Bandung.
- Pearmin, D., 1990, *Stated Preference: A Guide To Practise*, Steer & Gleave Ltd., London & Hague Consultancy Group, Amsterdam.