

KEANEKARAGAMAN GENETIK BAKTERI RESISTEN URANIUM DAN STRATEGI BIOREMEDIASI URANIUM

Bernadetta Octavia⁽¹⁾, Siti Umniyatie⁽¹⁾, Aris Bastianudin⁽²⁾ dan L. Sembiring⁽³⁾

⁽¹⁾ Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta
Jl. Colombo No. 1 Yogyakarta 55281

⁽²⁾ BATAN Yogyakarta
Jl. Babarsari Yogyakarta

⁽³⁾ Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gadjah Mada
Bulaksumur, Yogyakarta

Abstrak

Penelitian tentang keanekaragaman genetik bakteri resisten uranium yang berpotensi dalam strategi bioremediasi uranium telah dilakukan. Pada tahun pertama penelitian multi tahun ini telah berhasil memperoleh 4 isolat bakteri resisten uranium dari limbah uranium fasa organik TBP- kerosin yang berasal dari reaktor riset "Kartini" BATAN Yogyakarta.

Metode isolasi diawali dengan metode enrichment dalam medium Glukosa cair dengan penggojokan yang dimaksudkan untuk mengaktifkan kembali metabolisme bakteri aerob dalam sampel limbah uranium. Selanjutnya dilakukan isolasi selektif dengan Quadrant streak method pada medium Nutrien agar yang mengandung uranium dalam bentuk garam uranium yaitu uranyl nitrat sebesar 20 ppm. Isolat-isolat bakteri resisten uranium yang diperoleh diseleksi berdasarkan pola pertumbuhan dan pola resistensinya dalam variasi konsentrasi uranium 20, 40, 60, 80, 100 ppm, pada interval waktu 24 jam dengan mengukur *optical density* masing-masing kultur bakteri pada panjang gelombang 620 nm menggunakan spektrofotometer. Karakterisasi dan identifikasi fenotip dilakukan berdasarkan pengujian karakter morfologi koloni, morfologi sel, sifat fisiologis dan sifat biokimiawi masing-masing isolat bakteri. Hasil karakterisasi dan identifikasi fenotip dianalisis dengan sistematik numerik-fenetik untuk melihat kemiripan di antara isolat bakteri resisten uranium dan genus bakteri acuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ke 4 isolat bakteri resisten uranium memiliki perbedaan yang cukup signifikan dengan ke 4 genus bakteri acuan karena hanya memiliki level kemiripan 60%. Sedangkan ke 4 isolat bakteri resisten uranium juga menunjukkan perbedaan meskipun memiliki level kemiripan 90%, dan ini berarti bahwa terdapat keanekaragaman isolat bakteri resisten uranium yang diisolasi dari limbah uranium fase organik TBP- kerosin. Berdasarkan pola pertumbuhan dan pola resistensinya maka ke 4 isolat bakteri ini berpotensi untuk dikembangkan dalam program bioremediasi uranium, setelah ditumbuhkan selama 48 jam.

Kata kunci: keanekaragaman genetic, resistensi, uranium, bioremediasi

Abstract

In effort to develop uranium-waste bioremedial strategy, genetic diversity of uranium-resistant bacteria isolated from TBP kerosene organic phase-uranium waste of Research Reactor "Kartini BATAN" Yogyakarta was studied. The first year of the multi-years

research was aimed obtaining potential uranium-resistant bacterial isolates from TBP kerosene organic phase-uranium waste. Bacteria were selectively isolated from samples by enrichment technique with glucose broth, and then inoculated in Nutrien Agar containing uranium salt as uranyl nitrate (20 ppm) by Quadrant streaked method. Four bacterial isolates were obtained (X2, X3, X4, and X5), and their resistance pattern towards uranium was further studied by growing them in nutrien broth containing uranium of 20, 40, 60, 80, and 100 ppm for 24. The growth level was determined spectrophotometrically at 620 nm. The uranium resistant-bacterial isolates were further characterized and identified by the application of Numerical-fenetic Systematics based on 34 phenotypic characters, including colonial morphological characters, cell morphology, physiological, and biochemical characteristics. The results of study showed that all four isolates were highly tolerable to uranium since they could grow very well at the highest concentration of uranium, namely 100 ppm after incubation for 48 h. Characterization and identification clearly showed that the 4 isolates belong to the family Enterobacteriaceae based on the isolates characteristics of gram negative rod, motility, catalase negative, and oxidase negative. Numerical systematic analysis indicated that all the isolates formed a distinct cluster at the S_{SM} level of >70% and at the S_{SM} level of 60% separated them with all reference genera (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Serratia*) belong to the family Enterobacteriaceae. However, at the S_{SM} level of almost 90%, the isolates were different to each other since they also separated into two distinct sub-clusters, namely X2, X4 within one sub-cluster, and X3 and X5 within the other sub-cluster. Therefore, it is reasonable to conclude that potential uranium resistant-bacteria could be selectively isolated from uranium waste, and the 4 uranium resistant bacterial isolates obtained may belong to the same species although they are different in terms of genetic diversity.

Key words: genetic diversity, resistance, uranium, bioremediation

PENDAHULUAN

Pengolahan limbah toksik yang membahayakan dan mengancam kesehatan manusia, hewan dan ekosistem, khususnya limbah yang mengandung logam berat dan radionuklida merupakan tantangan lingkungan yang selain berbiaya tinggi (besar) juga membutuhkan strategi pengolahan yang cepat dan tepat. Pembuangan limbah radioaktif secara konvensional dilakukan dengan membuat tangki-tangki penyimpanan senyawa radioaktif di bawah tanah atau membuat parit-parit dangkal di tanah untuk mengubur senyawa radioaktif dengan tanah (Kotegov *et al*, 1968; Suzuki & Banfield, 1999).

Pembuangan dengan cara ini menimbulkan risiko bagi lingkungan dan organisme apabila terjadi kebocoran pada tangki penyimpanan. Oleh karena itu banyak negara maju melakukan pembuangan (*disposal*) limbah radioaktif seperti *disposal* limbah radioaktif dengan meroketkan limbah radioaktif ke angkasa luar, ditimbun dalam timbunan es di kutub, dibuang dalam lubang yang sangat dalam, dibuang di dasar samudera, dibuang dalam batuan geologi stabil atau dibakar kembali dalam reaktor dan diubah menjadi isotop stabil (Mulyanto, 1997). Rangkuman beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa biopresipitasi radionuklida dan logam-logam

secara mikrobiologis yaitu dengan menggunakan mikroba (bakteri) memberikan harapan besar bagi remediasi tanah, air tanah dan limbah cair yang terkontaminasi radionuklida (Lovley and Coats, 1999; Stephen and Macnaughton, 1999; Gadd, 2000; Barkay and Schaefer, 2001). Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa limbah cair uranium dihuni oleh berbagai macam mikroorganisme dengan karakter dan strategi bioremediasi uranium yang berbeda. Mikroorganisme tersebut antara lain *Rhizopus arrhizus* yang menunjukkan kemampuan melakukan biosorpsi, *Clostridium* dan *Desulfovibrio desulfuricans* mempunyai kemampuan mereduksi U (VI) menjadi U (IV), sedangkan *Deinococcus radiodurans* dan *Arthrobacter ilicis* mampu mengakumulasi uranium ekstraselular dan intraselular berturut-turut (Alexander, 1999; Suzuki & Banfield, 2004).

Proses bioremediasi dengan memanfaatkan bakteri untuk remediasi logam sedang bertumbuh dan berkembang pesat serta berperan dalam siklus logam global karena berkaitan dengan pemanfaatan kembali logam-logam yang berhasil diunduh/dipungut oleh komunitas bakteri dalam limbah (Smith *et al.*, 1994). Keuntungan penggunaan bakteri untuk bioremediasi antara lain (1) bakteri untuk bioremediasi dapat diisolasi dari alam ataupun dari limbah yang bersangkutan (2) bioremediasi merupakan

proses remediasi yang relatif murah dibandingkan dengan proses remediasi yang lain (3) bakteri memiliki waktu generasi pendek dan aktivitas hidup bakteri dapat diatur sehingga mempermudah penyediaannya apabila diperlukan untuk *treatment* limbah dalam volume besar (4) mikroba lebih efektif untuk mengurangi logam berat pada konsentrasi yang cukup rendah untuk remediasi secara kimiawi ataupun fisikawi (5) mikroba mempunyai daya seleksi tinggi dalam bioremediasi artinya hanya melakukan *removal* dan *recovery* terhadap logam-logam spesifik dalam limbah (logam target bioremediasi) dan (6) bioremediasi bersifat ramah lingkungan (McEldowney *et al.* 1993; Patel *et al.* 2006; Perry *et al.* 2002 dan Willey *et al.* 2009).

Berdasarkan uraian di atas maka pencarian bakteri resisten uranium dari alam khususnya dari limbah uranium cair dan mekanisme proteksi diri terhadap efek toksiknya dapat menjadi salah satu alternatif untuk bioremediasi uranium. Di samping itu, bakteri resisten uranium *indigenous* Indonesia yang telah dikarakterisasi fenotip dan genotipnya dapat memberikan kepastian penemuan isolat baru yang berbeda dengan isolat bakteri resisten uranium yang telah dikenal sebelumnya.

METODE PENELITIAN

1. Pengambilan sampel dan pengujian sifat fisikawi dan kimiawi limbah uranium fase organik TBP (*TriButyl phosphate*)- Kerosin:

Sampel limbah uranium diambil dari BATAN Yogyakarta dengan menggunakan botol sampel yang telah disediakan oleh pihak BATAN. Parameter fisikawi yang diukur adalah warna dan temperatur limbah sedangkan parameter kimiawi yang diukur adalah pH dan kandungan uranium dalam limbah.

2. Isolasi dan purifikasi isolat bakteri resisten uranium

a. Metode *enrichment culture* bakteri resisten uranium

Kondisi fisis dan khemis limbah uranium fase organik TBP- kerosin telah menjadi inhibitor bagi bakteri yang tidak resisten uranium. Metode *enrichment culture* dilakukan untuk meningkatkan kecepatan pertumbuhan bakteri-bakteri resisten uranium dalam limbah. Dalam hal ini digunakan medium glukosa cair sebagai donor elektron dengan melakukan penggojogan sehingga kondisi pertumbuhan bersifat aerob. Metode ini dilakukan dengan cara: diambil 10% limbah uranium (v/v), dimasukkan ke dalam medium glukosa cair dalam erlenmeyer, dan dilakukan penggojogan (± 100 rpm) dalam shaker selama 48 jam atau sampai timbul

kekeruhan (artinya bakteri tumbuh) pada suhu kamar ($\pm 28^\circ\text{C}$)

b. Isolasi selektif dan purifikasi bakteri resisten uranium

Isolasi selektif dilakukan dengan menggunakan medium Nutrien Agar yang mengandung uranium dalam bentuk garam uranium yaitu uranyl nitrat ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$) 20 ppm. Isolasi dilakukan dengan metode goresan (*streak plate method*), dengan cara: Diambil satu ose kultur bakteri dari enrichment culture (± 48 jam) dan diinokulasikan pada medium Nutrien Agar plate dengan menggunakan metode *Quadrant streak method*, selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar ($\pm 28^\circ\text{C}$) sampai tumbuh koloni-koloni bakteri. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh terpisah diisolasi sebagai biakan murni isolat bakteri resisten uranium (20 ppm) dan selanjutnya masuk dalam tahapan skrining.

c. Skrining isolat bakteri resisten uranium

Skrining isolat bakteri resisten uranium dianalisis dengan dua pendekatan yaitu pengukuran pertumbuhan bakteri dengan spektrofotometer dan penentuan pola resistensi dalam berbagai variasi konsentrasi uranium. Hasil skrining adalah isolat-isolat bakteri yang berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut dalam program bioremediasi uranium. Prosedur skrining dilakukan dengan urutan langkah kerja adalah:

- 1) Biakan murni bakteri resisten uranium yang diperoleh ditumbuhkan dalam medium Nutrien cair dengan konsentrasi uranium 20 ppm, diinkubasi dengan digojog (± 100 rpm) dalam suhu kamar ($\pm 28^\circ\text{C}$), selama 48 jam atau sampai keruh (ada pertumbuhan bakteri).
- 2) Kultur cair murni bakteri resisten uranium ini dihitung kerapatan selnya per ml dengan hemocytometer. Apabila jumlah sel bakteri sudah mencapai 10^6 /ml (Atlas and Bartha, 1998) maka diinokulasikan sebanyak 10% (v/v) ke dalam medium Nutrien cair dengan variasi konsentrasi uranium 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm dan medium Nutrien cair tanpa uranium sebagai kontrol.
- 3) Kultur bakteri dalam medium Nutrien cair dengan berbagai variasi konsentrasi uranium ini selanjutnya diinkubasikan dengan digojog pada suhu kamar. Pertumbuhan ditentukan dengan mengukur kekeruhan atau nilai OD (*optical density*) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm, dengan interval waktu 24 jam sampai jam ke 144.
- 4) Data nilai OD masing-masing isolat bakteri resisten uranium dalam berbagai variasi konsentrasi uranium dengan interval waktu 24 jam itu digunakan sebagai dasar skrining isolat bakteri.

d. Pemeliharaan dan preservasi isolat bakteri resisten uranium

Isolat bakteri resisten uranium hasil skrining ada yang dipelihara dalam medium nutrien agar miring dan diremajakan secara periodik untuk tahapan penelitian selanjutnya serta ada pula yang dipreservasi sebagai *stock culture* dalam larutan gliserol 15 % dan disimpan pada suhu -20°C .

e. Karakterisasi dan Identifikasi Fenotipik isolat bakteri resisten uranium (Sistematika Numerik-fenetik).

Tahap karakterisasi fenotipik ini terdiri dari 4 bagian yaitu:

1) Pengamatan morfologi koloni

Isolat bakteri uji diinokulasikan dengan metode titik pada medium Nutrien agar plate dan diinkubasi serta diamati morfologi koloni bakteri yang tumbuh. Ciri-ciri yang diamati yaitu bentuk, warna, elevasi, tepi, dan struktur dalam.

2) Pengamatan morfologi sel

Dilakukan pengecatan Gram terhadap isolat bakteri uji dan diamati bentuk sel serta sifat Gram.

3) Pengujian sifat fisiologis

Ciri-ciri yang diamati yaitu kebutuhan akan oksigen dan motilitas. Kebutuhan akan oksigen diketahui dengan menginokulasikan isolat bakteri ke dalam medium Nutrien cair dalam tabung; sedangkan motilitas diamati dengan menginokulasikan isolat bakteri dengan model tusukan ke dalam medium

Nutrien agar tegak (juga pada medium SIM). Selanjutnya diinkubasi dan diamati model pertumbuhan bakteri dalam medium Nutrien cair dan Nutrien agar tegak (dan medium SIM).

4) Pengujian sifat biokimia

Ciri-ciri yang diamati: uji oksidase; kemampuan memfermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa dan laktosa); kemampuan menggunakan citrate sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi (medium simmon citrate); reduksi metilen blue; uji katalase; hidrolisis amilum; produksi H₂S.

Prosedur kerja yang dilakukan untuk pengamatan karakter biokimia:

- 1) Uji oksidase dilakukan dengan *Filter Paper Method*. Kertas saring Whatman no. 2 ditetesi dengan reagen uji oksidase, kemudian satu ose bakteri uji dioleskan di atas kertas saring tersebut dan dibiarkan 10–15 detik. Apabila terjadi perubahan warna menjadi hitam berarti hasil uji oksidase positif. Uji oksidase ini merupakan uji yang paling signifikan untuk membedakan antara kelompok bakteri Enterobacteriaceae (uji oksidase negatif) dan kelompok non-Enterobacteriaceae (uji oksidase positif)
- 2) Untuk mengetahui kemampuan memfermentasi karbohidrat yaitu dengan menginokulasikan isolat bakteri uji ke dalam medium glukosa cair, laktosa cair dan sukrosa cair dalam tabung reaksi, diinkubasi dan diamati perubahan warna medium yang terjadi (kuning= asam; merah muda= basa) dan pembentukan gas dalam tabung durham
- 3) Untuk mengetahui kemampuan menggunakan citrate sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi yaitu dengan menginokulasikan isolat bakteri uji secara tusukan dan goresan pada medium agar miring Simmon Citrate, diinkubasi dan diamati perubahan warna yang terjadi (biru = positif, menggunakan citrate; hijau = negatif)
- 4) Untuk mengetahui kemampuan mereduksi metilen blue maka isolat bakteri uji diinokulasikan secara tusukan pada medium Nutrien agar tegak, diinkubasi dan setelah ada pertumbuhan digenangi dengan metilen blue dan dibiarkan selama 6 jam untuk mengetahui kemampuan mereduksi metilen blue yang ditandai dengan hilangnya warna biru (*colorless*).
- 5) Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri memecah hidrogen peroksida dengan enzim katalase. Pengujian dilakukan dengan mengoleskan isolat bakteri pada gelas benda dan meneteskan dengan larutan H₂O₂. Apabila terbentuk gelembung-gelembung kecil pada olesan bakteri berarti isolat

bakteri uji mempunyai enzim katalase (positif)

- 6) Untuk mengetahui kemampuan menghidrolisis amilum maka bakteri uji diinokulasikan dengan metode goresan tunggal pada medium pati agar plate, diinkubasi dan setelah tumbuh koloni bakteri kemudian ditetesi dengan larutan iodine, setelah ± 30 detik akan terbentuk zona jernih di sekeliling koloni bakteri apabila isolat bakteri tersebut mampu menghidrolisis amilum (pati).
- 7) Untuk mengetahui produksi H₂S maka bakteri uji diinokulasikan secara tusukan pada medium SIM. Apabila setelah inkubasi terbentuk endapan hitam pada medium berarti isolat tersebut memproduksi H₂S (positif). Dengan medium SIM juga dapat diketahui motilitas sel bakteri yaitu apabila terjadi difusi pertumbuhan keluar dari bekas tusukan maka menunjukkan sel bakteri tersebut motil.

Sifat fenotipik yang diperoleh dari uji tiap karakter dikonversikan dengan nilai positif (+) atau nilai negatif (-). Data tersebut kemudian disajikan dalam matriks $n \times t$, dengan ketentuan n adalah jumlah isolat (*strain*) bakteri resisten uranium dan strain acuan yang dianalisis sedangkan t adalah jumlah karakter fenotipik. Data yang memiliki nilai (+) diubah menjadi (1) dan nilai (-) menjadi (0). Data ini ditata dengan

program PFE (*The Programmer File Editor*). Data yang telah tersusun dalam program PFE kemudian dianalisis dengan menggunakan program MVSP versi 3.1 (*Multivariate Statistical Package*) (Kovach, 1990). Untuk menentukan similaritas diantara isolat-isolat digunakan koefisien S_{SM} (*Simple Matching Coefficient*) dengan rumus sebagai berikut:

$$S_{SM} = \frac{(a + d) \times 100\%}{(a + b + c + d)}$$

Keterangan:

a = jumlah karakter yang (+) untuk kedua isolat

b = jumlah karakter yang (+) untuk isolat pertama dan (-) untuk isolat kedua

c = jumlah karakter yang (-) untuk isolat pertama dan (+) untuk isolat kedua

d = jumlah karakter yang (-) untuk kedua isolat

Pengelompokkan dilakukan dengan menggunakan algoritma UPGMA (*Unweighted Paired Group Method With Arithmetic Averages*), dalam bentuk Dendrogram menurut Sneath and Sokal (1973) *cit.* Sembiring (2002).

Dendrogram yang dihasilkan digunakan sebagai dasar untuk mengetahui keanekaragaman isolat, kemiripan antar isolat maupun identifikasi isolat berdasarkan strain acuan yang digunakan dalam klasifikasi dan identifikasi numerik-fenetik

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Fisikawi Dan Kimiawi Limbah Uranium Fase Organik TBP-Kerosin

Limbah uranium fase organik TBP-kerosin adalah limbah yang dihasilkan oleh Laboratorium Teknologi Proses pada reaktor

riset "Kartini" BATAN Yogyakarta. Limbah ini disimpan dalam beberapa *container* (drum) dan diletakkan dalam ruangan khusus. Pengukuran terhadap karakteristik fisikawi dan kimiawi limbah disajikan pada tabel di bawah ini (Tabel 1):

Tabel 1. Karakteristik fisikawi dan kimiawi limbah uranium fase organik TBP- kerosin

No	Karakteristik fisikawi- kimiawi limbah	Hasil pengukuran yang diperoleh
1	Warna limbah	Coklat pekat
2	pH	7,5
3	Temperatur	29°C
4	Kadar uranium	90 – 100 ppm
5	Aktivitas radionuklida uranium U ²³⁸	1,23 x 10 ³ Bq/L

Hasil pengukuran karakteristik limbah uranium fase organik TBP – kerosin menunjukkan tingkat aktivitas radionuklida uranium U²³⁸ masih diatas batas tertinggi yang diijinkan bagi lingkungan. Batas tertinggi tingkat radioaktivitas di lingkungan adalah 1 x 10³ Bq/L berdasarkan Surat Keputusan Ka-BAPETEN No. 02/Ka-BAPETEN/V-99 Tentang Baku Tingkat Radioaktivitas di Lingkungan. Pengolahan limbah secara fisikawi-kimiawi untuk limbah dengan kadar uranium < 100 ppm kurang efektif dan efisien karena berbiaya tinggi sehingga bioremediasi dengan memanfaatkan bakteri menjadi alternatif yang dewasa ini banyak dikembangkan melalui berbagai penelitian.

Beberapa foto dokumentasi di bawah ini menunjukkan kondisi tempat penyimpanan

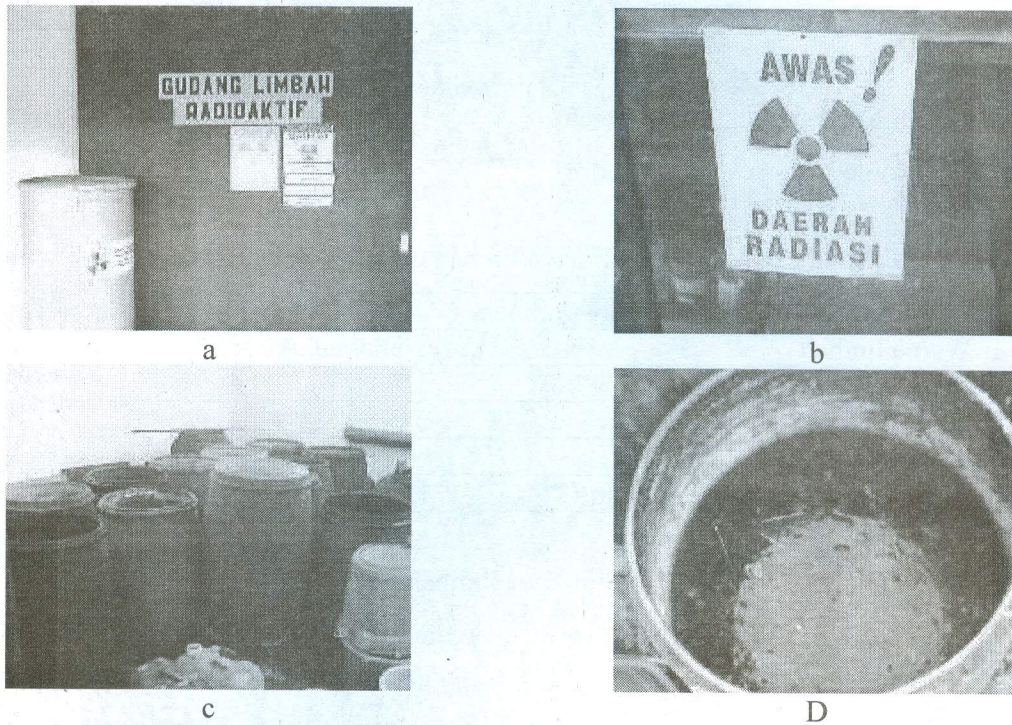
limbah dan warna limbah uranium fase organik TBP-kerosin yang digunakan dalam penelitian ini.

2. Isolasi Selektif Bakteri Resisten Uranium

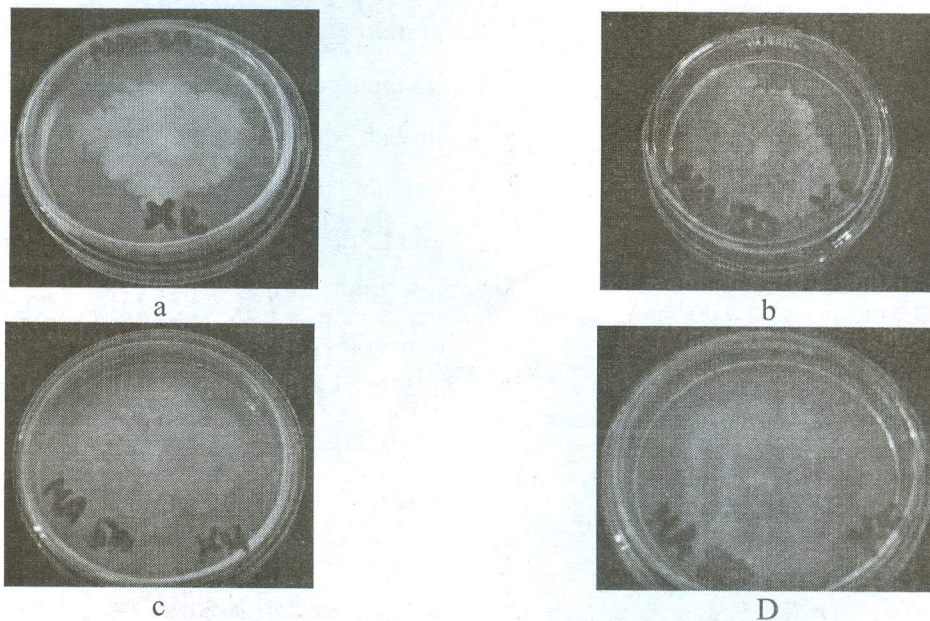
Pada penelitian ini bakteri resisten uranium yang diisolasi adalah bakteri yang tumbuh pada kondisi aerob karena treatment limbah dengan kandungan bahan organik rendah (bukan jenis polisakarida) lebih efektif dengan *aerobic treatment* (Madigan *et al.* 2009). Oleh karena itu isolasi bakteri resisten uranium dari limbah uranium fase organik TBP- kerosin yang berasal dari reaktor riset "Kartini" BATAN Yogyakarta diawali dengan metode *enrichment* yaitu dengan menggunakan medium glukosa cair sebagai donor elektron dan diinkubasi dengan digojog untuk membuat keadaan aerob.

Dengan metode *enrichment* ini maka bakteri-bakteri aerob dalam limbah yang kemungkinan dalam fase istirahat (metabolisme tidak

aktif) dapat menjadi aktif kembali dan masuk pada fase pertumbuhan (fase eksponensial).



Gambar 1. (a,b). Ruang penyimpanan limbah radioaktif BATAN Yogyakarta (c) container limbah (d) limbah uranium fase organik TBP- kerosin



Gambar 2. Morfologi koloni isolat bakteri X2 (a) , X3 (b), X4 (c), dan X5 (d)

Hasil isolasi dengan medium Nutrien cair yang mengandung uranium (uranil nitrat) 20 ppm memperoleh 4 isolat bakteri resisten uranium. Morfologi koloni keempat isolat bakteri tersebut ditampilkan pada gambar 2.

3. Karakterisasi Dan Identifikasi Fenotipik Isolat Bakteri Resistensi Uranium

Karakterisasi dan identifikasi isolat bakteri resisten uranium dilakukan berdasarkan sifat fenotipik sebanyak 34 karakter yang meliputi sifat morfologi koloni dan morfologi sel, sifat fisiologis dan sifat biokimiawi (Tabel 2).

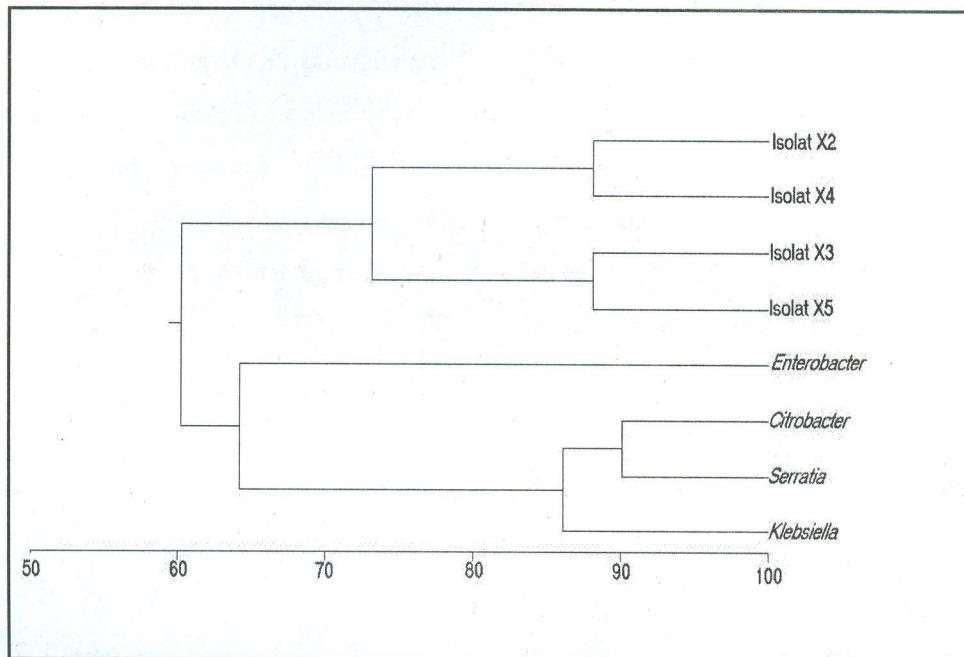
Berdasarkan hasil karakterisasi dan identifikasi yang dilakukan ke 4 isolat bakteri resisten uranium diduga kuat merupakan anggota familia *Enterobacteriaceae* karena memiliki karakter: sel berbentuk batang, gram negatif, motil, oksidase negatif, dan katalase negatif. Berdasarkan identifikasi dengan menggunakan 34 karakter fenotipik yang meliputi morfologi koloni, morfologi sel, sifat fisiologis dan sifat biokimiawi dengan pendekatan metode profile matching ditemukan bahwa ke 4 isolat tersebut paling mirip dengan genus *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* dan *Klebsiella*, diantara 29 genus dalam familia *Enterobacteriaceae*. Hasil analisis sistematik numerik terhadap karakter isolat uji dan karakter kunci ke 4

genus acuan tersebut disajikan dalam bentuk dendrogram (Gambar 3).

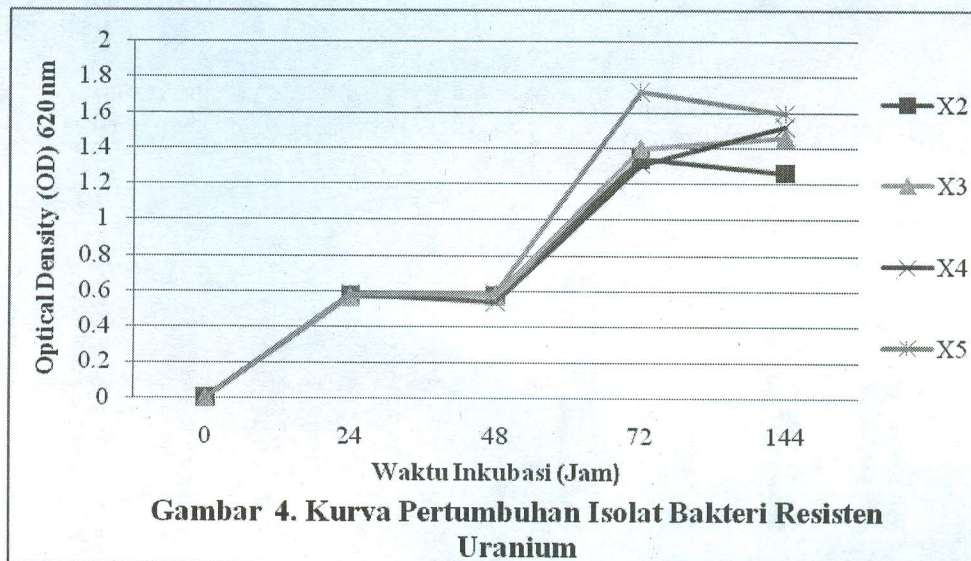
Dendrogram menunjukkan bahwa pada level kemiripan S_{SM} 60 %, keempat genus acuan (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, dan *Serratia*) dan isolat uji (X2, X3, X4, dan X5) mengelompok ke dalam 2 kluster. Kluster pertama terdiri dari keempat isolat bakteri resisten uranium sedangkan kluster kedua terdiri dari keempat genus acuan. Hal ini menunjukkan bahwa di satu sisi meskipun isolat tersebut paling mirip dengan keempat genus acuan di dalam familia *Enterobacteriaceae* tetapi ternyata semua isolat memiliki perbedaan yang cukup signifikan. Di sisi lain di antara ke 4 isolat uji pun terdapat perbedaan yang cukup jelas yaitu pada level kemiripan di atas 70 % mengelompok menjadi 2 sub-kluster yaitu sub-kluster pertama terdiri dari isolat X2 dan X4, sedangkan sub-kluster kedua terdiri dari X3 dan X5. Apabila dianalisis lebih jauh ternyata bahwa masing-masing isolat dalam masing-masing sub-klusternya pun masih memiliki perbedaan karena berdasarkan nilai S_{SM} , masing-masing tingkat kemiripannya hanya mendekati 90%. Artinya, berdasarkan *taxospecies concept* keempat dapat digolongkan ke dalam satu spesies meskipun secara genetik mereka cukup beranekaragam.

Tabel 2. Karakter fenotipik isolat bakteri resisten uranium dan genus bakteri acuan.

No	Karakter	Isolat X 2	Isolat X 3	Isolat X 4	Isolat X 5	Enterobacter	Citrobacter	Serratia	Klebsiella
Morfologi koloni: Configuration									
1	Round	-	-	-	-	-	+	+	+
2	Round with raised margin	-	+	-	-	-	-	-	=
3	Wrinkled	-	-	-	+	+	-	-	-
4	Irregular and spreading	+	-	+	-	-	-	-	-
Morfologi koloni: Margin									
5	Smooth	-	-	-	-	-	+	+	+
6	Wavy	-	+	+	+	-	-	-	-
7	Lobate	-	-	-	-	+	-	-	-
8	Irregular								
Morfologi koloni: Elevation									
9	Convex	-	-	-	-	+	+	-	-
10	Flat	-	-	-	-	-	-	+	+
11	Raised	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Umbonate	-	+	+	+	-	-	-	-
Morfologi koloni: Warna									
13	Putih	+	+	+	+	-	+	+	-
14	Merah-kuning	-	-	-	-	+	-	-	-
Pertumbuhan pada agar miring:									
15	Filiform	+	+	+	+	-	-	-	-
16	Effuse	-	-	-	-	+	-	-	-
17	Rhizoid	-	-	-	-	-	+	+	+
Pertumbuhan pada media cair:									
18	Keruh halus	+	-	+	+	+	-	-	-
19	Keruh	-	-	-	-	-	+	+	+
20	Membentuk gumpalan	-	+	-	-	-	-	-	-
Kebutuhan oksigen:									
21	Aerob	+	+	+	+	+	+	+	+
Morfologi sel:									
22	Gram negatif	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Batang pendek	+	+	+	+	+	+	+	+
Sifat fisiologi dan biokimiawi:									
24	Enzim katalase	-	-	-	-	+	+	+	+
25	Produksi gas H ₂ S	-	+	-	+	-	-	-	-
26	Tidak produksi gas H ₂ S	+	-	+	-	+	+	+	+
27	Reduksi metilen blue	-	+	-	+	-	+	+	-
28	Motil	-	+	-	+	+	+	+	-
29	Tidak motil	+	-	+	-	-	-	-	+
30	Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+
31	Sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+
32	Laktosa	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Simmon citrate	+	+	+	+	+	+	+	+
34	Uji oksidase	-	-	-	-	-	-	-	-



Gambar 3. Dendrogram yang menunjukkan simlartitas antara 4 isolat bakteri resisten uranium, dengan 4 genus anggota Familia *Enterobacteriaceae* yang didasarkan ats analisis S_{SM} dan algoritme UPGMA



Gambar 4. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Resisten Uranium

4. Pola Pertumbuhan Dan Pola Resistensi Isolat Bakteri Resisten Uranium

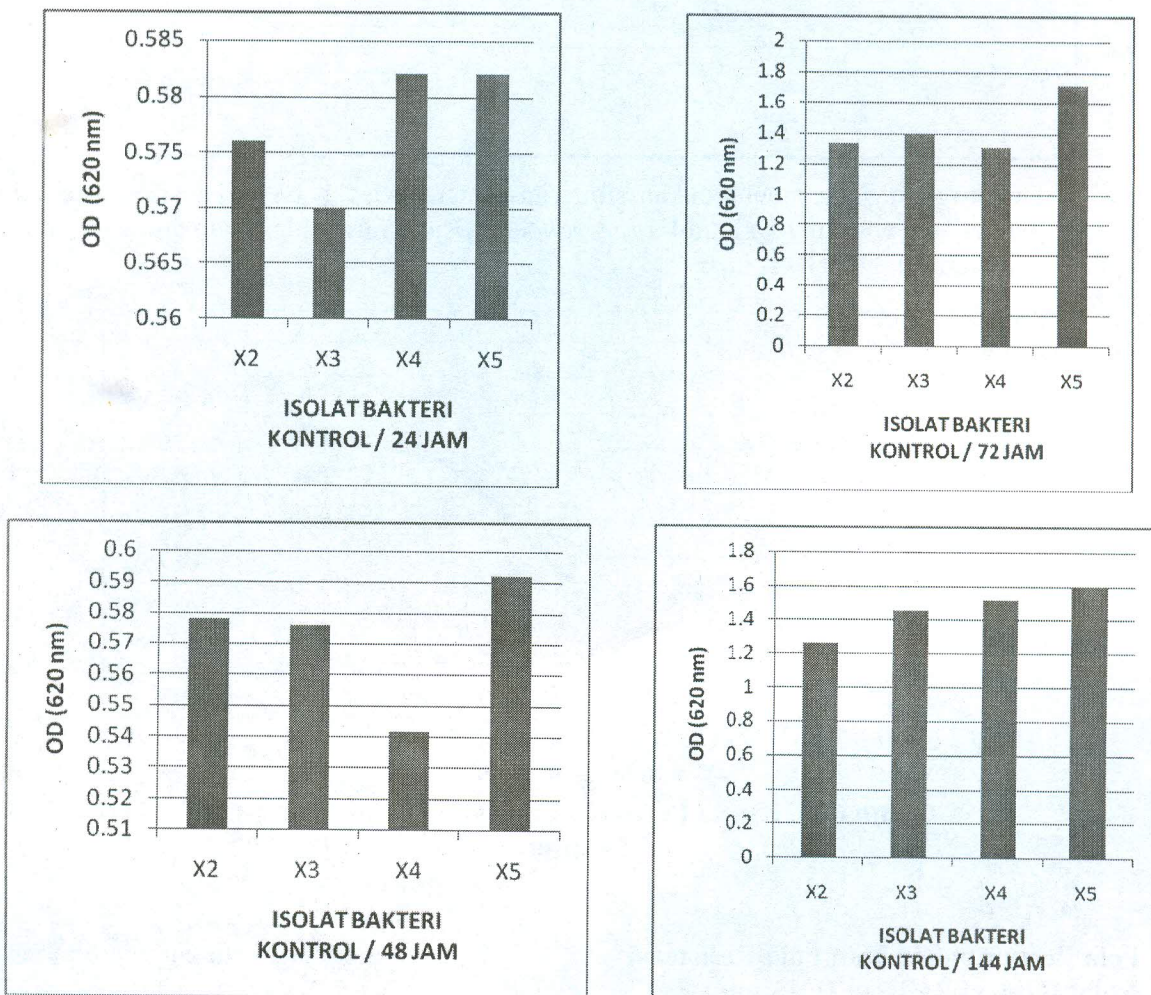
Ke 4 isolat bakteri yang ditumbuhkan dalam medium Nutrien cair dengan variasi konsentrasi uranium 20, 40, 60, 80 dan

100 ppm. Selanjutnya diukur pertumbuhannya berdasarkan nilai kekeruhan (*optical density*) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm. Pertumbuhan diukur dengan interval waktu

24 jam. Kurva pertumbuhan ke 4 isolat bakteri resisten uranium dalam medium Nutrien cair dengan uranium konsentrasi 20 ppm ditampilkan pada Gambar 4. Berdasarkan kurva pertumbuhan ini nampak bahwa sampai pada jam ke 48 maka ke 4 isolat menunjukkan pola pertumbuhan yang identik dan masih berada pada fase lag akhir. Namun demikian setelah jam ke 48 maka ke 4 isolat bakteri memasuki fase eksponensial yang

ditandai dengan kenaikan signifikan nilai OD masing-masing kultur isolat.

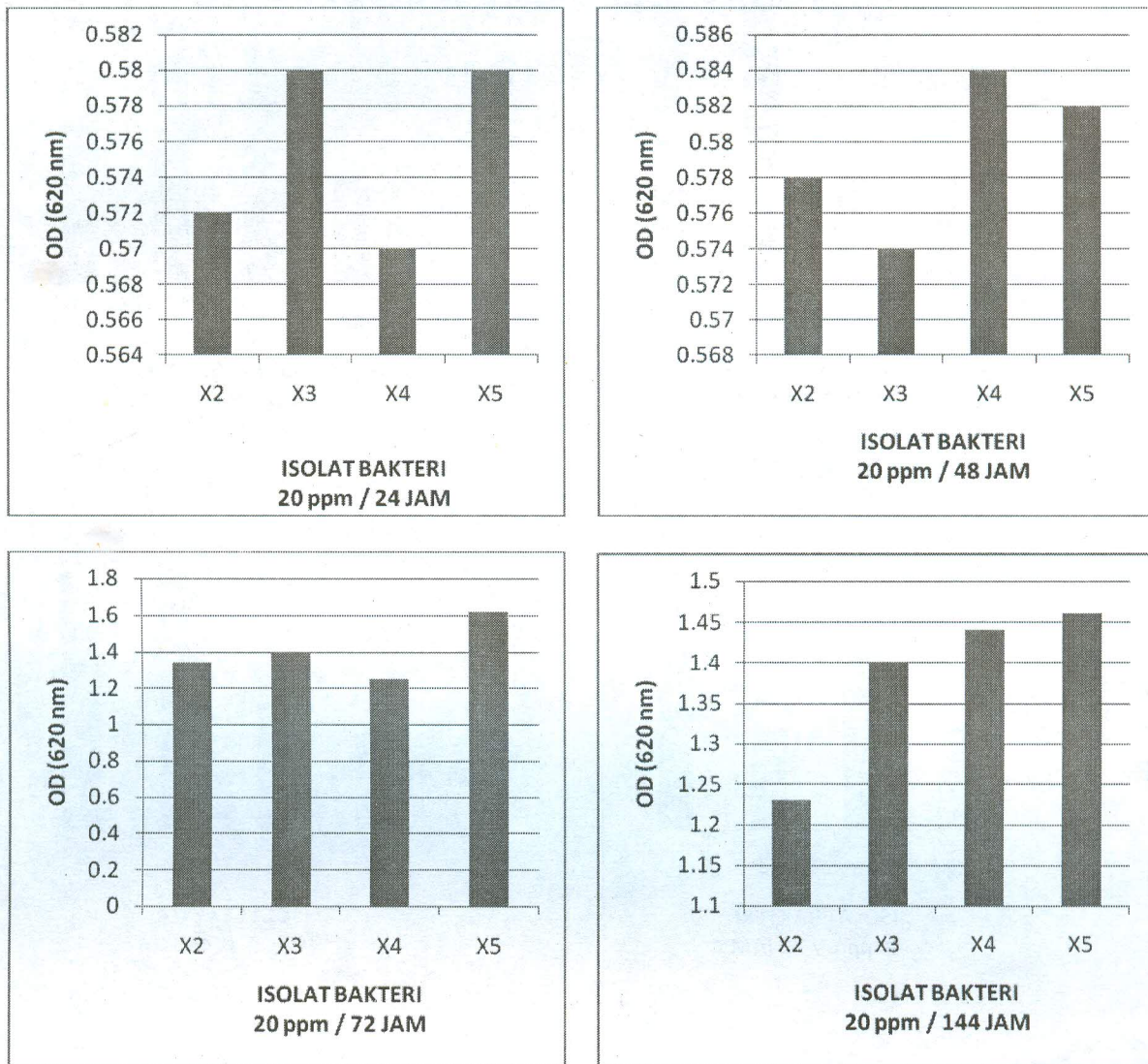
Selain dibuat kurva pertumbuhan berdasarkan pola pertumbuhan pada konsentrasi uranium 20 ppm maka dibuat pula pola resistensi dengan mengukur *optical density* (OD) ke 4 isolat pada berbagai konsentrasi uranium dan waktu inkubasi yang ditampilkan mulai Gambar 5, 6, 7, 8, dan 9.



Gambar 5. Pola resistensi Isolat bakteri X2, X3, X4, X5 pada medium Nutrien Cair tanpa uranium (kontrol) pada interval waktu 24 jam

Seperti kurva pertumbuhan, maka ke 4 isolat bakteri resisten uranium dalam medium Nutrien cair tanpa uranium (kontrol) sampai pada jam ke 48 belum menunjukkan pertumbuhan yang signifikan ($OD < 1,0$).

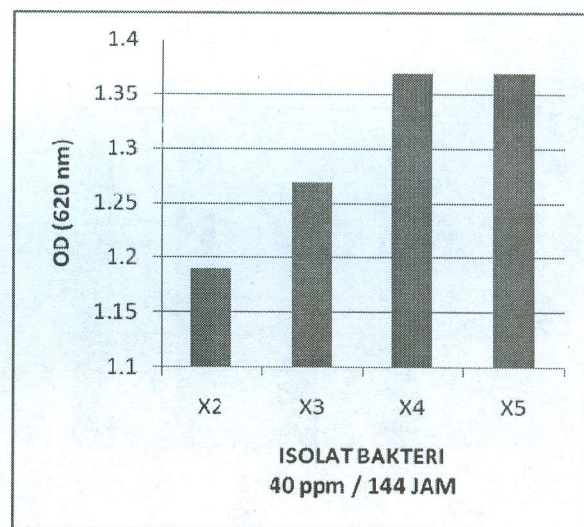
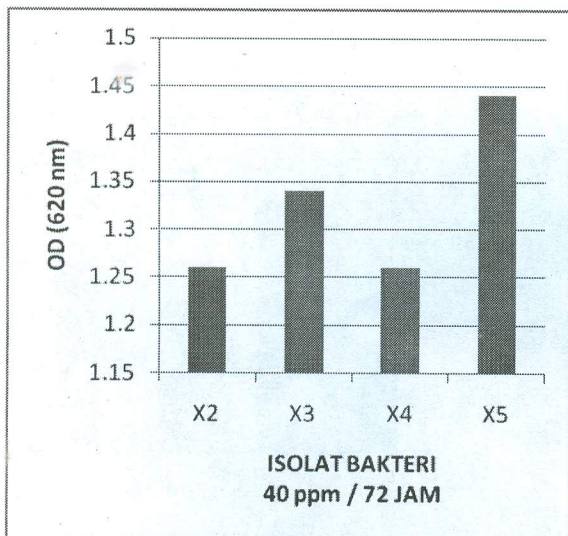
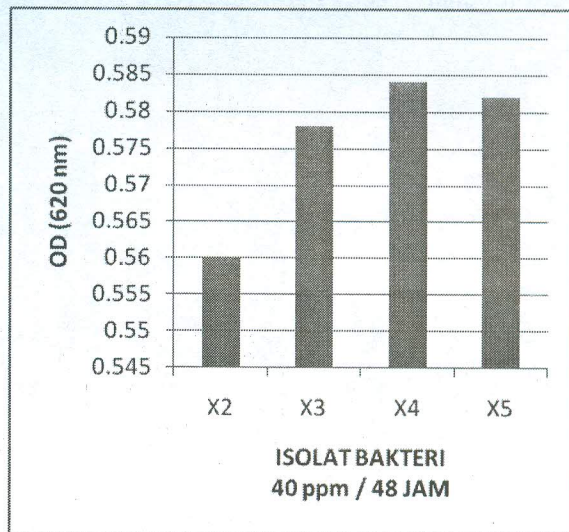
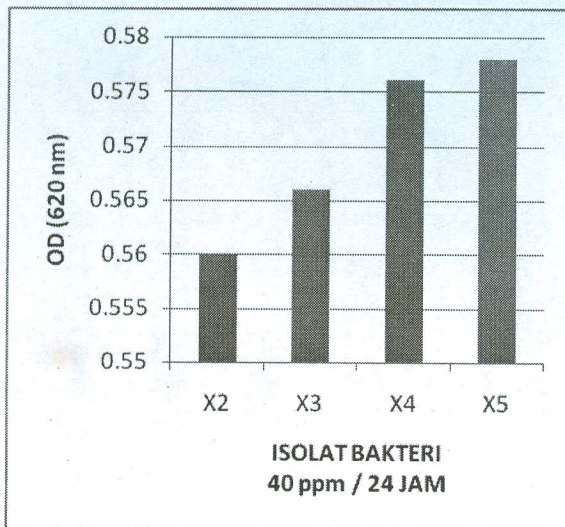
Pertumbuhan yang signifikan dimulai setelah 48 jam. Hal ini juga mengindikasikan bahwa fase lag yang dimiliki oleh ke 4 isolat bakteri ini merupakan sifat genetik yang dimiliki oleh isolat-isolat ini.



Gambar 6. Pola resistensi Isolat bakteri X2, X3, X4, X5 pada medium Nutrien Cair dengan konsentrasi uranium 20 ppm pada interval waktu 24 jam

Pola resistensi 4 isolat bakteri uji pada konsentrasi uranium 20 ppm juga menunjukkan bahwa pada 48 jam pertama (fase lag/adaptasi) belum menunjukkan

pertumbuhan yang signifikan ($OD < 1,0$). Tetapi setelah 48 jam maka ke 4 isolat telah tumbuh signifikan ($OD > 1,0$).



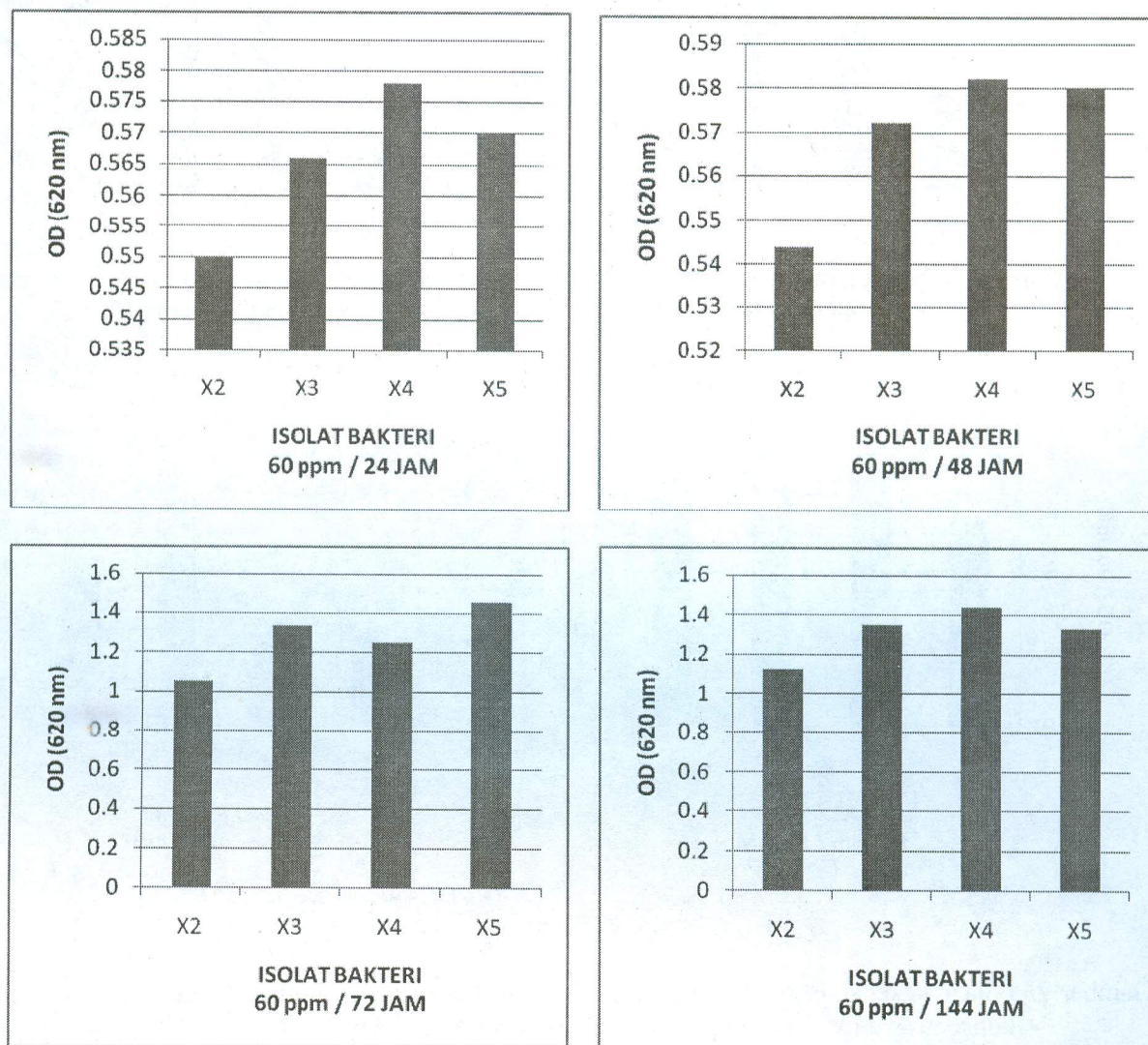
Gambar 7. Pola resistensi Isolat bakteri X2, X3, X4, X5 pada medium Nutrien Cair dengan konsentrasi uranium 40 ppm pada interval waktu 24 jam

Pola resistensi 4 isolat bakteri uji pada konsentrasi uranium 40 ppm juga

menunjukkan bahwa pada 48 jam pertama (fase lag/adaptasi) belum menunjukkan

pertumbuhan yang signifikan. Tetapi setelah 48 jam maka ke 4 isolat telah tumbuh

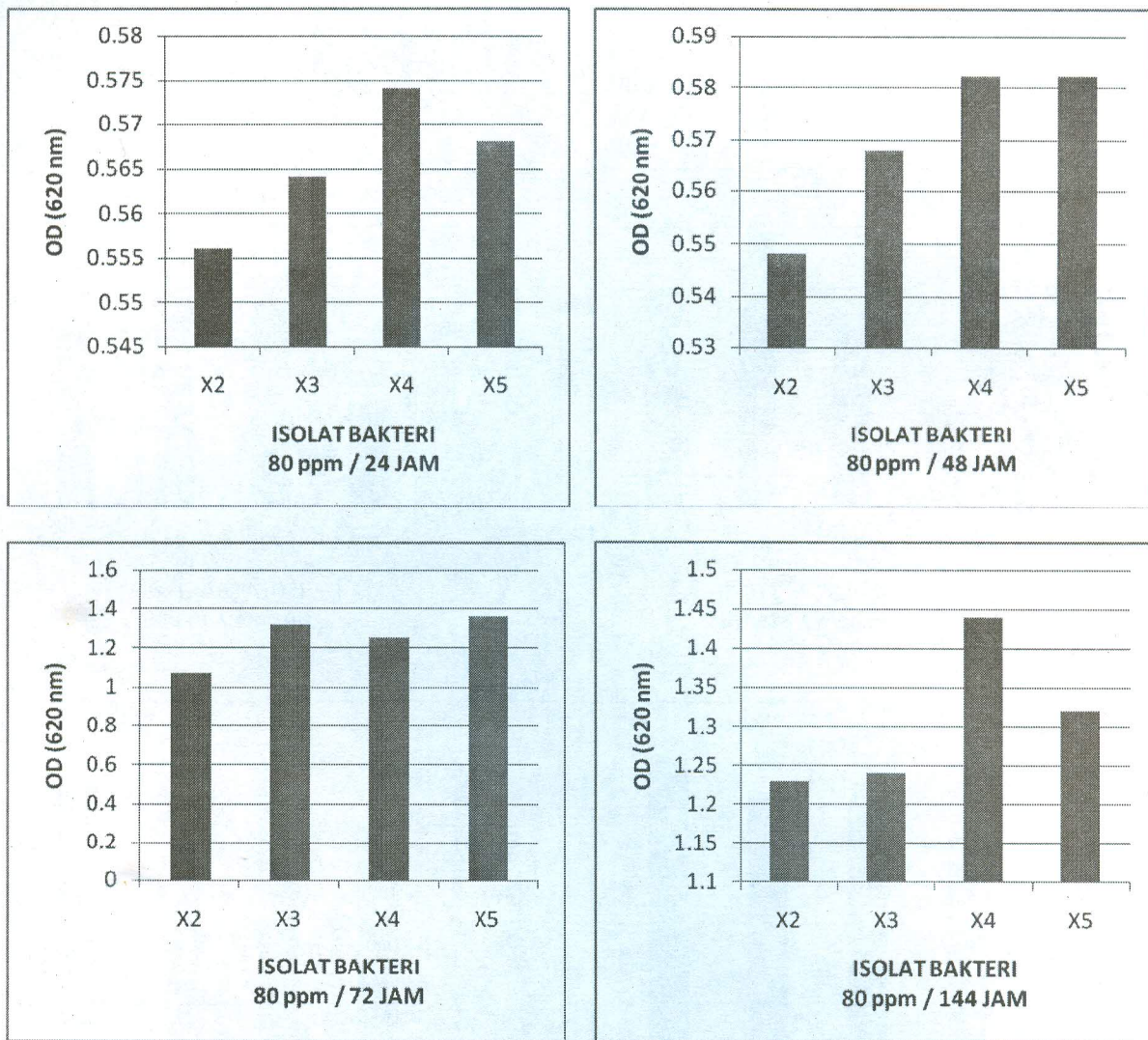
signifikan (pada $OD > 1,0$).



Gambar 8. Pola resistensi Isolat bakteri X2, X3, X4, X5 pada medium Nutrien Cair dengan konsentrasi uranium 60 ppm pada interval waktu 24 jam

Pola resistensi 4 isolat bakteri uji pada konsentrasi uranium 60 ppm juga menunjukkan bahwa pada 48 jam pertama (fase lag/adaptasi) belum menunjukkan

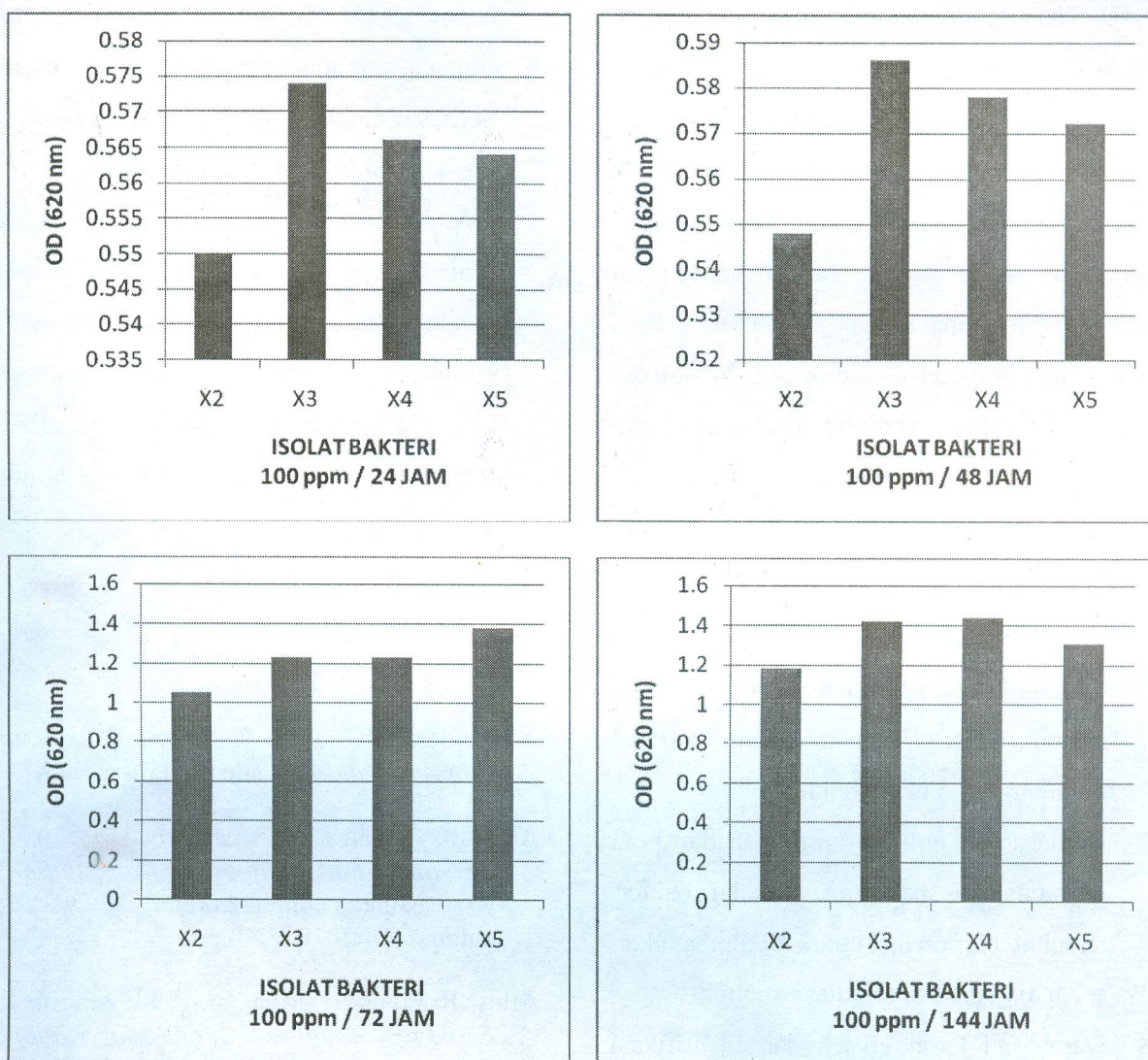
pertumbuhan yang signifikan. Tetapi setelah 48 jam maka ke 4 isolat telah tumbuh signifikan (pada $OD > 1,0$).



Gambar 9. Pola resistensi Isolat bakteri X2, X3, X4, X5 pada medium Nutrien Cair dengan konsentrasi uranium 80 ppm pada interval waktu 24 jam

Pola resistensi 4 isolat bakteri uji pada konsentrasi uranium 80 ppm juga menunjukkan bahwa pada 48 jam pertama (fase lag/adaptasi) belum menunjukkan

pertumbuhan yang signifikan. Setelah 48 jam maka ke 4 isolat telah tumbuh signifikan (pada $OD > 1,0$).



Gambar 10. Pola resistensi Isolat bakteri X2, X3, X4, X5 pada medium Nutrien Cair dengan konsentrasi uranium 100 ppm pada interval waktu 24 jam

Pola resistensi 4 isolat bakteri uji pada konsentrasi uranium 100 ppm juga menunjukkan bahwa pada 48 jam pertama (fase lag/adaptasi) belum menunjukkan pertumbuhan yang signifikan. Setelah 48 jam maka ke 4 isolat telah tumbuh signifikan (pada OD > 1,0).

Berdasarkan analisis pola resistensi dari ke 4 isolat bakteri uji maka diduga kuat bahwa fase lag yang dialami oleh ke 4 isolat tersebut selama kurang lebih 48 jam pertama merupakan sifat genetik isolat-isolat tersebut sehingga kemungkinan bukan merupakan fase adaptasi, hal ini diperkuat oleh prosedur

kerja yang telah memberikan *pre-treatment* pada semua isolat penelitian dalam medium pertumbuhan dengan konsentrasi uranium 20 ppm. Setelah pertumbuhan 48 jam (pada jam ke 72) maka ke 4 isolat menunjukkan resistensi pada semua variasi konsentrasi uranium yang dipakai. Dengan demikian ke 4 isolat ini berpotensi untuk dikembangkan dalam program bioremediasi uranium, setelah ditumbuhkan selama 48 jam.

KESIMPULAN

1. Usaha pencarian isolat bakteri resisten uranium dari limbah uranium fase organik TBP- kerosin telah berhasil memperoleh 4 isolat bakteri
2. Berdasarkan pola pertumbuhan dan pola resistensinya maka ke 4 isolat bakteri tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen bioremediasi uranium
3. Dari hasil karakterisasi dan identifikasi dengan metode sistematika numerik-fenetik (uji karakter fenotipik) dapat disimpulkan bahwa ke 4 isolat bakteri tersebut berbeda dengan nilai similaritas < 90 %

Dari pengalaman yang diperoleh selama penelitian ini maka dapat disarankan hal-hal berikut:

1. Untuk mendapatkan lebih banyak lagi isolat bakteri yang dapat dimanfaatkan dalam program bioremediasi uranium

maka perlu dilakukan re-isolasi dari limbah uranium dengan menggunakan berbagai macam medium isolasi selektif

2. Ke 4 isolat bakteri resisten uranium yang diperoleh perlu dikarakterisasi dan diidentifikasi lebih lanjut secara kimiawi dan molekular sehingga dapat dilakukan rekayasa genetika untuk meningkatkan keunggulan mereka dalam bioremediasi uranium serta kemungkinan untuk dikembangkan dalam bidang *nano-technology*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, USA
- Anonim. 2009. *Patience pays off with methanol for uranium bioremediation*. www.cameco.com/australia/. Diakses tanggal 3/4/2010, 8:40 pm
- Atlas, R.M. and Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology, Fundamental and Application*. Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park California 94025.
- Barkey, T. and Schaefer, J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation: Issues, considerations and potentials. *Curr Opin Microbiol* 4: 318-323
- Botkin, B.D. and Keller, H. 1997. *Environmental Science Earth as Living Planets*, 2nd edition. USA. pp. 304-310
- Crawfort, L.R. & Crawfort, D.L. 1998. *Bioremediation principles and Application*. Melbourne: Cambridge University Press. pp 312-332

- Gadd, M.G. 1992. *Encyclopedia of Microbiology: Heavy metal Pollutants Environmental and Biotechnological Aspects II*. Academic Press USA. pp. 351-360
- Gadd, G. M. 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol* 11:271-279
- Hoekstra, h.R. and Katz, J. 1954. *The Chemistry of Uranium. Actinida Elements*, 1st edition. McGraw Hill Book Company, New York.
- Kotegov, K.V., Pavlov, O.N. and Shvendov, V.P. 1968. *Technetium*. In: *Advances in inorganic Chemistry and Radiochemistry*. Emelius, H.J., Sharpe, A.G. (Eds.). New York, USA: Academic Press, pp: 1-90
- Kovach, W.L. 1990. MVSP Plus Version 2.0. User Manual.
- Lovley, D.R. and Coates, J.D. 1999. Bioremediation of metal contamination. *Curr Opin Biotechnol* . 8: 285-289
- Martinez. R.J., Beazley, M.J., Tailefert, M., Arakaki, A.K., Skonick, J., and Sobecky, P.A. 2007. Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistent bacteria isolated from radionuclide and metal-contaminated subsurface soils. *Environmental Microbiology*, p. 1-12
- Mulyanto. 1997. Disposal Limbah PLTN untuk kasus Indonesia. *Buletin Limbah Vol. 2. No. 1. hal 10-19.*
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, 12th edition. Benjamin Cummings, USA.
- McEldowney. 1994. Effect of cadmium and zinc on attachment to toxicity of Cu and Fe to *Anabaena dolidum* & *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cell. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 110-114
- Patocha, J., Kassa, J., Stetina, R., Safr, G. and Haver, J. 2004. Review Toxicology aspects of depleted uranium. *Journal of Applied Biomedicine* 2: 37- 42.
- Patel, J.S., Patel, P.C., and Kalia, K. Isolation and Characterization of Nickel uptake by nickel resistant bacterial isolate (NiRBI). 2006. *Biomedical and Environmental Sciences* 19: 297-301
- Perry, J.J., Staley, J.T., and Lory, S. 2002. *Microbial Life*. Sinauer Associate Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Ronodirjo, S. 1994. *Pengolahan limbah radioaktif*. BATAN Yogyakarta. h. 1-21
- Suzuki, Y and Banfield, J.F. 2004. Resistance to and Accumulation of Uranium by Bacteria from a Uranium-Contaminated Site. *Geomorfology Journal Vol. 21, Issue 2 March 2004*, p. 113-121
- Stephen, J.R. and Macnaughton, S.J. 1999. Developments in terrestrial bacterial remediation of metals. *Curr Opin Biotechnol* 10:230-23
- Smith, L.A., B.C. Alleman and L. Copley-Graves. 1994. Biological treatment Options. In: *Emerging Technology For Bioremediation of Metals* (Eds. J.L. Means and R.E. Hinchee. Lewis Publishers. USA, pp: 1-5
- Shumate II, S.E. & Strandberg, G.W. 1985. Accumulation of Metals by Microbial Cells. In *Comprehensive biotechnology, The Principles, Applications and regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine.*, M. Moo-Young (Ed.), Pergamon Press, New York, pp: 235-243

- Sakurai, I., Kawamura, Y.M., Koike, H.M., Inoue, Y., Kosako, Y., Nakase, T., Kondou, Y., and Sakurai, S. 1990. Bacterial Accumulation of Metallic Compounds. *Appl. and Environ. Microbiol.* 56 (8):2580-2583
- Suzuki, Y. and Banfield, J.F. 1999. Geomicrobiology of uranium. Uranium, mineralogy, geochemistry and the environment. *In Reviews in Mineralogy*, Vol 38 Burns, P. Finch, R (Eds.) Washington DC USA; Mineralogy Society of America, pp: 393-424
- Sembiring, L. 2002. *Petunjuk praktikum Sistematika Mikroba S-2*. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.
- Snyder, K. 2009. *Researchers identify problems in the uranium bioremediation avenue.* www.krokoimplants.com. Diakses tanggal 3/4/ 2010: 8.44 pm
- Strandberg, G.W., Shumate II S.E., and Parrot, Jr., J.R. 1981. Microbial Cells as biosorbents of Heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1): 237-245
- Torrowati dan Yudhi, N. 2009. *Pemungutan uranium dalam limbah uranium cair menggunakan ammonium karbonat*. Buletin PTBN BATAN no. 04/ Tahun II Oktober 2009.
- Warhana, W.A. 1995. *Dampak Pencemaran Lingkungan*. Andi Offset Yogyakarta. h. 27, 28, 63.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J. 2009. *Prescott's Principles of Microbiology*. MCGraw Hill Higher Education, New York.