



**ISOLASI DAN SELEKSI BAKTERI ENDOFIT TUMBUHAN *Pontederia crassipes*
SEBAGAI KANDIDAT AGEN BIOREDUKSI Cr(VI)**

Rayi Kuni Isti'anah^{1*}, Bernadetta Octavia¹

¹Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Yogyakarta

*Corresponding author: rayikuni.2021@student.uny.ac.id

Abstrak. Industri penyamakan kulit di Kawasan Industri Piyungan (KIP), Yogyakarta, menghasilkan limbah cair dengan kandungan kromium heksavalen [Cr(VI)] dalam jumlah signifikan yang bersifat toksik dan karsinogenik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengevaluasi bakteri endofit dari tumbuhan *Pontederia crassipes* (eceng gondok) sebagai agen bioremediasi Cr(VI). Sebanyak tujuh isolat diperoleh dari bagian akar, batang, dan daun, kemudian diseleksi berdasarkan kemampuan resistensi terhadap Cr(VI) melalui uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Tiga isolat terpilih (PCr5, PCr6, dan PCr7) menunjukkan resistensi tertinggi hingga 2100 mg/L Cr dan bersifat non-patogen berdasarkan uji hemolisis, hipermukoviskositas, virulensi, dan gelatinase. Identifikasi molekuler menunjukkan bahwa ketiga isolat tergolong genus *Pediococcus* sp. Karakterisasi fisiologi dan biokimia menunjukkan isolat bersifat gram positif, kokus, non-motil, dan fakultatif anaerob. Profil pertumbuhan menunjukkan penurunan laju pertumbuhan pada media yang tersuplementasi Cr yang mengindikasikan efek toksik kromium. Uji bioreduksi menunjukkan bahwa ketiga isolat mampu mereduksi Cr(VI) dengan efektivitas tertinggi pada konsentrasi 50 mg/L, yaitu 54.29%–67.18%.

Kata Kunci: Bakteri Endofit, Bioreduksi, Kromium Heksavalen, *Pediococcus* sp., *Pontederia crassipes*.

ISOLATION AND SELECTION OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM *Pontederia crassipes* AS CANDIDATES FOR Cr(VI) BIOREDUCTION

Abstract. The leather tanning industry in the Piyungan Industrial Area (KIP), Yogyakarta, generates liquid waste containing significant amounts of hexavalent chromium [Cr(VI)], which is toxic and carcinogenic. This study aims to isolate and evaluate endophytic bacteria from *Pontederia crassipes* (water hyacinth) as potential agents for Cr(VI) bioremediation. A total of seven isolates were obtained from the plant's roots, stems, and leaves, and were screened for Cr(VI) resistance using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test. Three selected isolates (PCr5, PCr6, and PCr7) exhibited the highest resistance, tolerating up to 2100 mg/L of Cr, and were confirmed to be non-pathogenic based on hemolysis, hypermucoviscosity, virulence, and gelatinase tests. Molecular identification revealed that the three isolates belong to the genus *Pediococcus*. Physiological and biochemical characterization showed that the isolates are gram-positive, cocci-shaped, non-motile, and facultative anaerobes. Growth profile analysis indicated a reduced growth rate in Cr-supplemented media, suggesting a toxic effect of chromium. Bioreduction assays demonstrated that all three isolates were capable of reducing Cr(VI), with the highest reduction efficiency observed at a concentration of 50 mg/L, ranging from 54.29% to 67.18%.

Keywords: Endophytic Bacteria, Bioreduction, Hexavalent Chromium, *Pediococcus* sp., *Pontederia crassipes*.

PENDAHULUAN

Kawasan Industri Piyungan (KIP) merupakan kawasan yang diperuntukkan sebagai lokasi sentra industri yang terletak di Kecamatan Piyungan, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Pada tahun 2021, terdapat setidaknya 12 industri yang beroperasi di Kawasan Industri Piyungan dengan 10 diantaranya adalah industri penyamakan kulit (Rahardjo & Prasetyaningsih, 2021). Industri penyamakan kulit merupakan industri yang mengolah kulit mentah menjadi kulit tersamak (*leather*) (Hasyiyati, Hartati, & Djaenudin, 2020). Proses penyamakan 1 ton kulit mentah menghasilkan air limbah sebanyak 30-35 m³ (Kuncoro & Soedjono, 2022). Hal ini menyebabkan industri penyamakan kulit menjadi salah satu industri yang menghasilkan limbah cair dengan kuantitas besar.

Kromium merupakan bahan yang paling banyak digunakan dalam proses penyamakan kulit. Proses penyamakan kulit hanya mampu menyerap larutan kromium sulfat (CrSO₄) sebanyak 60%-70% sedangkan sisanya sekitar 30-40% akan terbawa dalam limbah cair yang dihasilkan, sehingga limbah kromium termasuk dalam limbah yang paling banyak dihasilkan dari proses penyamakan kulit (Rahayu, Syauqi, & Islami, 2021). Kromium pada limbah cair penyamakan kulit, umumnya berbentuk kromium heksavalen [Cr(VI)] (Solihah & Suwerda, 2020). Kromium heksavalen memiliki tingkat toksisitas yang jauh lebih tinggi dari bentuk lainnya seperti kromium trivalen [Cr(III)], baik untuk paparan akut maupun kronis disebabkan karena kelarutan dan mobilitasnya tinggi (Murti & Sugihartono, 2020).

Kromium heksavalen bersifat toksik bagi hewan dan manusia, selain itu kromium juga dapat menyebabkan gangguan hematologi dan respon kekebalan tubuh pada ikan air tawar (Vitasari *et al*, 2020). Paparan inhalasi kronis kromium heksavalen berefek pada saluran pernapasan dengan perforasi dan ulserasi septum, bronkitis, penurunan fungsi paru, *pneumonia*, gatal, dan nyeri pada hidung. Paparan kronis kromium heksavalen tingkat tinggi melalui inhalasi atau paparan oral dapat menyebabkan gangguan pernapasan parah, kardiovaskuler, pencernaan, hematologi, hati, ginjal, gastrointestinal, sistem kekebalan tubuh, berpengaruh pada darah dan efek neurologis yang dapat menyebabkan kematian pada pasien yang sedang pada masa perawatan medis (Murti & Sugihartono, 2020; Vitasari *et al*, 2020; Rahardjo, 2023). Kromium heksavalen juga memiliki kapasitas oksidatif kuat yang berkaitan erat dengan toksisitasnya, sehingga dapat menyebabkan kematian pada sel (Murti & Sugihartono, 2020). Kromium heksavalen oleh *Agency of Toxic Substances and Diseases Registry* (ATSDR) dimasukkan ke dalam daftar prioritas zat berbahaya karena dapat mengancam kehidupan manusia dan mencemari lingkungan, bersifat toksik, karsinogenik, dan

mutagenik pada organisme hidup, serta teratogenik pada binatang menyusui termasuk manusia (Murti & Sugihartono, 2020).

Metode yang dapat digunakan untuk mengatasi limbah cair yang dihasilkan proses penyamakan kulit diantaranya adalah adsorpsi, *wetland*, reagen fenton, filtrasi, kimia, fisika, koagulasi, reverse osmosis, dan presipitasi (Rahayu *et al*, 2021). Namun, beberapa metode ini memiliki banyak keterbatasan seperti biaya energi dan pemeliharaan yang tinggi, serta munculnya produk sampingan yang beracun. Di sisi lain, penggunaan agen biologis seperti mikroorganisme menawarkan metode yang mudah, ramah lingkungan, dan efisien untuk remediasi limbah kromium (Isnaeni *et al*, 2024). Penggunaan mikroorganisme seperti bakteri endofit banyak digunakan sebagai agen bioremediasi untuk mengurangi kadar logam berat pada lingkungan karena prosesnya yang hemat biaya dan sangat aman bagi lingkungan (Lejri *et al*, 2024). Bakteri endofit ditemukan di dalam jaringan tumbuhan, salah satunya tumbuhan eceng gondok (*Pontederia crassipes*) dimana tumbuhan ini dipilih karena banyak tumbuh di lokasi yang tercemar kromium. Hal ini, menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut berpotensi mengandung bakteri endofit yang memiliki kemampuan resistensi terhadap kromium.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini penting dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh isolat bakteri endofit dari tumbuhan *Pontederia crassipes*, mengetahui kemampuan resistensi terhadap kromium heksavalen, mengetahui patogenitas isolate yang diperoleh, mengetahui identitas bakteri yang diperoleh, profil pertumbuhannya, dan kemampuan bioeduksinya.

METODE

Pengambilan dan preparasi sampel tumbuhan *Pontederia crassipes*

Pengambilan sampel dilakukan di pinggir Sungai Opak yang dekat dengan Kawasan Industri Piyungan, Kabupaten Bantul, Yogyakarta tepatnya pada koordinat 7°50'39"S 110°26'40"E. Sampel yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam plastik *ziplock* steril.

Isolasi, *Enrichment*, dan Purifikasi

Tumbuhan *Pontederia crassipes* dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih, lalu setiap bagian tumbuhan akar, batang dan daun dipotong kecil-kecil (1 cm x 1 cm), kemudian dilakukan sterilisasi permukaan tumbuhan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) menggunakan larutan 0,05% tween 20 (30 detik), 75% EtOH (60 detik), 5% NaOCl dan H₂O₂ 30% (15 detik), lalu dicuci menggunakan aquadest steril sebanyak 3 kali. Setelah itu, dilakukan

evaluasi sterilisasi dengan menanam 100 µL aquadest pada pencucian terakhir pada medium TSA (10%) (Yuliana, 2018).

Setelah itu, tumbuhan dihaluskan menggunakan mortar lalu ditambahkan 0,85% NaCl sebanyak 5 ml, kemudian ekstrak tumbuhan diambil sebanyak 100 µL dan diinokulasikan pada media TSA + 50 mg/L Cr (Pratiwi & Asri, 2022) dan diambil sebanyak 2.5 ml untuk diinokulasikan pada media TSB + 50 mg/L Cr lalu dishaker dengan kecepatan 200 rpm selama 5 hari. Setelah 5 hari, diambil 100 µL sampel lalu diinokulasikan pada medium TSA + 50 mg/L Cr. Selain itu, diambil juga sebanyak 2.5 ml untuk diinokulasikan pada media TSB + 75 mg/L Cr kemudian dilakukan seperti sebelumnya. Hal ini dilakukan hingga konsentrasi 500 mg/L Cr (Plestenjak *et al*, 2022). Bakteri yang tumbuh pada konsentrasi tertinggi (500 mg/L Cr) kemudian di purifikasi menggunakan media TSA + 500 mg/L dengan metode streak kuadran 4, lalu koloni yang tumbuh di goreskan pada media TSA 10%.

Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) merupakan konsentrasi minimum yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Uji MIC dilakukan menggunakan media TSA dengan konsentrasi yang terus meningkat dari konsentrasi 500-2500 mg/L menggunakan metode *strak plate*. Setelah itu, diamati pertumbuhannya selama 24-72 jam. (Assauqi *et al*. 2023).

Uji Patogenitas dan Virulensi

Uji patogenitas merupakan uji yang dilakukan apakah suatu bakteri memiliki kemampuan dalam menimbulkan suatu penyakit atau kerusakan pada suatu individu (Muna, 2021). Virulensi bakteri merupakan faktor utama yang akan mempengaruhi tingkat keparahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Uji patogenitas bakteri dilakukan melalui uji hemolisis menggunakan media *Blood Agar Plate* (Muna, 2021), uji hipermukoviskositas melalui *string test* (Huang *et al*, 2023), uji virulensi menggunakan media TSA + *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) 0,01% (Podar *et al*, 2021), dan uji gelatinase menggunakan media TSA + 3% gelatin.

Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi bakteri merupakan proses yang bertujuan untuk menggambarkan dan mengidentifikasi ciri-ciri spesifik dari bakteri, baik secara molekuler maupun secara tradisional melalui uji morfologi, fisiologi, biokimia. Identifikasi molekuler dilakukan oleh PT. Genetika Science Indonesia, Cipondoh, Tangerang City, Banten 15147. Karakterisasi morfologi terdiri dari pewarnaan gram, pewarnaan endospora, dan uji motilitas, sedangkan karakterisasi fisiologi terdiri dari uji ketahanan terhadap variasi suhu, salinitas, pH, motilitas bakteri dan kebutuhan

oksigen. Uji biokimia terdiri dari uji fermentasi karbohidrat, simmon's sitrat, uji katalase, methyl red, voges proskauer, dan uji indol (Amaliah *et al*, 2018).

Pengukuran Profil Pertumbuhan Bakteri

Pengukuran profil pertumbuhan bakteri diawali dengan menumbuhkan isolat pada media TSB kemudian dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam untuk memperoleh kultur induk. Selanjutnya, diambil 10% (2.5 ml) isolat dari kultur induk untuk diinokulasikan pada media TSB murni dan TSB dengan penambahan Cr 50 mg/L dan 100 mg/L dimana masing-masing isolat dilakukan sebanyak 3 kali ulangan, kemudian di shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 48 jam. Kemudian dilakukan pengukuran kurva pertumbuhan bakteri dengan mengukur nilai absorbannya menggunakan spektroskopi UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm. Pengukuran dilakukan dengan cara membuat blank dari media TSB. Media TSB murni diambil sebanyak 1 ml kemudian dituang ke dalam kuvet, lalu diukur nilai absorbansinya kemudian di-*measure blank*. Setelah itu, diukur nilai absorbansi sampel dengan cara mengambil 1 ml setiap sampel kemudian dimasukkan ke dalam kuvet, lalu diukur nilai absorbansinya. Hal ini dilakukan pada semua sampel setiap 3 jam sekali (Rosmania & Yanti, 2020).

Uji Bioreduksi Isolat Terpilih Terhadap Kromium

Uji bioreduksi diawali dengan menumbuhkan isolat pada media TSB kemudian dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam sebagai kultur induk. Selanjutnya, diambil 10% (2.5 ml) isolat dari kultur induk untuk diinokulasikan pada media TSB dengan penambahan Cr 50 mg/L dan 100 mg/L dimana masing-masing isolat dilakukan sebanyak 3 kali ulangan, kemudian di shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Pada jam ke-24 jam dilakukan uji bioreduksi dengan cara membuat larutan DPC dengan cara melarutkan 250 mg 1,5-diphenylcarbazine ke dalam 50 ml aseton, lalu disimpan di dalam wadah tertutup dan terhindar dari cahaya. Selanjutnya disiapkan larutan H_2SO_4 6 M dengan cara memasukkan larutan stock sebanyak 84.3 ml lalu ditambahkan aquadest hingga total volumenya menjadi 250 ml (Kaushik & Raza, 2019).

Masing-masing sampel diambil sebanyak 1000 μl kemudian dimasukkan ke dalam PCR tube kemudian disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, aquades steril sebanyak 9.270 μl dimasukkan ke dalam tabung ulir steril, lalu ditambahkan sampel sebanyak 200 μl ke dalam tabung ulir, kemudian ditambahkan H_2SO_4 6 M sebanyak 330 μl , lalu ditambahkan larutan DPC sebanyak 400 μl dan ditunggu selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 1000 μl lalu diuji menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Persentase bioeduksi dihitung dengan rumus persentase reduksi Cr(VI), yaitu: $((\text{OD Awal} - \text{OD Akhir}) / \text{OD Awal}) \times 100\%$ (Akkurt & Alkan, 2022).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil dari isolasi dan *enrichment* diperoleh sebanyak 7 isolat dapat dilihat pada Tabel 1. yang terdiri dari 3 isolat dari akar, 1 isolat dari daun, dan 3 isolat dari batang.

Tabel 1. Hasil Isolasi Bakteri Endofit

Hasil Isolasi Bakteri Endofit	Sumber
PCr1	Akar <i>Pontederia crassipes</i>
PCr2	Akar <i>Pontederia crassipes</i>
PCr3	Akar <i>Pontederia crassipes</i>
PCr4	Daun <i>Pontederia crassipes</i>
PCr5	Batang <i>Pontederia crassipes</i>
PCr6	Batang <i>Pontederia crassipes</i>
PCr7	Batang <i>Pontederia crassipes</i>

Hasil uji MIC isolat PCr1, PCr2, PCr3, PCr3, dan PCr4 resisten terhadap logam berat kromium hingga konsentrasi 500 mg/L sehingga nilai MIC keempat isolat tersebut sebesar 600 mg/L, sedangkan isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 resisten terhadap kromium yang lebih tinggi hingga konsentrasi 2000 mg/L sehingga nilai MIC ketiga isolat tersebut sebesar 2100 mg/L. Hal ini didasarkan pada pernyataan Assauqi *et al.* (2023) yang menyatakan nilai MIC ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah dalam perlakuan dimana bakteri menunjukkan ketidakmampuan bakteri tumbuh pada media setelah inkubasi. Hasil uji MIC (Tabel 2) diketahui bahwa isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 memiliki resistensi terhadap kromium paling tinggi yaitu 2100 mg/L Cr, sedangkan isolat lain memiliki Tingkat resistensi terhadap kromium sebesar 600 mg/L Cr.

Tabel 2. Hasil Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Isolat	PCr1	PCr2	PCr3	PCr4	PCr5	PCr6	PCr7
Nilai MIC (mg/L)	600	600	600	600	2100	2100	2100

Berdasarkan hasil evaluasi patogenitas (Tabel 3) dapat diketahui bahwa isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 menunjukkan hasil non patogen (γ -hemolisis), sedangkan PCr1, PCr2, PCr3, dan PCr3 bersifat patogen (β -hemolisis) dan PCr4 menunjukkan hasil α -hemolisis, tetapi semua isolat tersebut menunjukkan negatif pada uji hipermukoviskositas, uji virulensi, dan uji gelatinase. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 menjadi

isolat yang paling aman karena bersifat non patogen dan tidak memiliki faktor virulensi, sedangkan isolate lain bersifat non patogen tetapi tidak memiliki faktor virulensi (tidak bersifat ganas).

Tabel 3. Hasil Evaluasi Patogenitas

Isolat	Uji Hemolisis	Uji Hipermuskoviskositas	Uji Virulensi	Uji Gelatinase
PCr1	β -hemolisis	negatif	negatif	negatif
PCr2	β -hemolisis	negatif	negatif	negatif
PCr3	β -hemolisis	negatif	negatif	negatif
PCr4	α -hemolisis	negatif	negatif	negatif
PCr5	γ -hemolisis	negatif	negatif	negatif
PCr6	γ -hemolisis	negatif	negatif	negatif
PCr7	γ -hemolisis	negatif	negatif	negatif

Hasil identifikasi molekuler, ketiga isolat bakteri terpilih yaitu PCr5, PCr6, dan PCr7 teridentifikasi sebagai *Pediococcuss* sp. Hasil tersebut juga didukung oleh data karakterisasi mikroskopik (Tabel 4) dan karakterisasi fisiologi dan biokimia (Tabel 5).

Tabel 4. Karakter Mikroskopik Sel Isolat Bakteri Terpilih

Isolat Bakteri	Pewarnaan Gram	Pengecatan Endospora	Bentuk Sel
PCr5	Positif	Negatif	Coccus
PCr6	Positif	Negatif	Coccus
PCr7	Positif	Negatif	Coccus

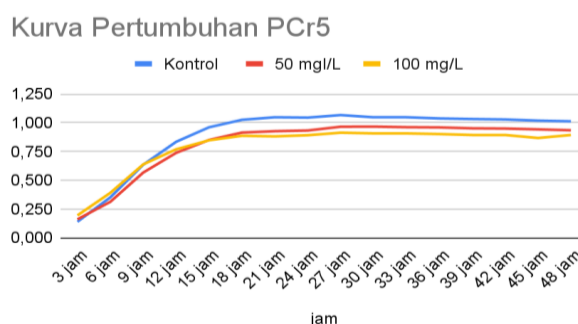
Tabel 5. Karakteristik Fisiologi dan Biokimia Isolat Bakteri Endofit

Karakteristik Fisiologi	Isolat Bakteri		
	PCr5	PCr6	PCr7
Suhu 15°C	+	+	+
Suhu 35°C	+	+	+
Suhu 40°C	+	+	+
Suhu 50°C	+	+	+
Salinitas 0%	+	+	+
Salinitas 0,85%	+	+	+
Salinitas 5%	+	+	+
pH 2	-	-	-
pH 3	+	+	+
pH 4	+	+	+
pH 5	+	+	+
pH 6	+	+	+
pH 7	+	+	+
pH 8	+	+	+
pH 9	+	+	+
Motilitas	non motil	non motil	non motil
Kebutuhan Oksigen	Fakultatif Anaerob	Fakultatif Anaerob	Fakultatif Anaerob

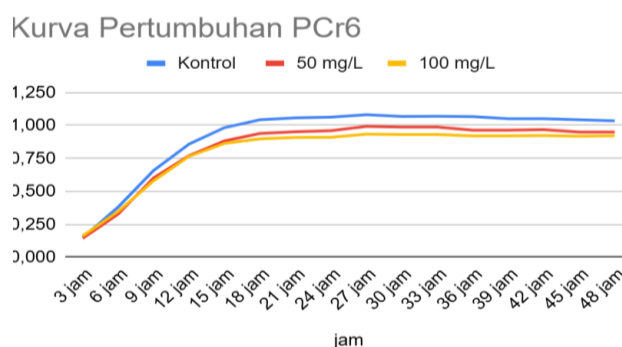
Karakteristik Fisiologi	Isolat Bakteri		
	PCr5	PCr6	PCr7
Glukosa	+	+	+
Galaktosa	+	+	+
Laktosa	-	-	-
Maltosa	+	+	+
Sukrosa	+	+	+
Simmon's Sitrat	-	-	-
Katalase	-	-	-
Methyl Red	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-
Uji Indol	-	-	-

Keterangan: tanda (+) menunjukkan hasil uji positif dan tanda (-) menunjukkan hasil uji negatif

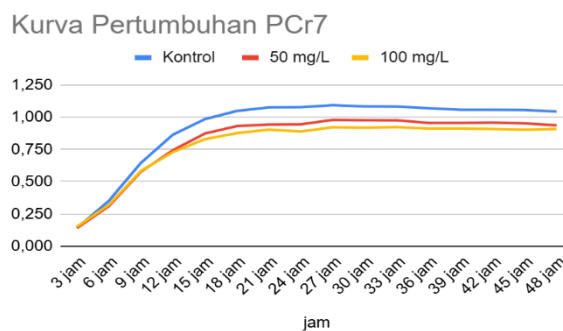
Kurva pertumbuhan ketiga isolat PCr5 (**Gambar 1.**), PCr6 (**Gambar 2.**), dan PCr7 (**Gambar 3.**) memiliki kesamaan dimana grafik ketiganya memiliki nilai OD tertinggi pada isolat yang tumbuh pada media TSB murni, kemudian dibawahnya isolat yang tumbuh pada media TSB yang tersuplementasi 50 mg/L kromium, dan nilai OD terendah ada pada isolat yang tumbuh pada media TSB yang tersuplementasi 100 mg/L kromium.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Isolat PCr5



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Isolat PCr6



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Isolat PCr7

Kurva pertumbuhan isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 fase lag terjadi pada jam ke-1 hingga jam ke-3, fase eksponensial terjadi pada jam ke-3 hingga jam ke-18, fase stasioner terjadi pada jam ke-18-jam ke-36, dan fase kematian dimulai dari jam ke-36. Berdasarkan uji bioreduksi (Tabel 6), nilai efektivitas bioreduksi kromium tertinggi pada konsentrasi 50 mg/L yang berada pada rentang 64.29% - 67,18% dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar 3 isolat yang digunakan, namun terdapat perbedaan yang signifikan kemampuan bioreduksi kromium pada 3 konsentrasi yang berbeda dimana semakin tinggi konsentrasi kromium, semakin rendah pula persentase bioreduksi yang terjadi.

Tabel 6. Persentase Bioreduksi Isolat Bakteri Endofit Terhadap Beberapa Konsentrasi Kromium

Konsentrasi Kromium	Persentase Efektivitas Bioreduksi (%)		
	PCr5	PCr6	PCr7
0 mg/L	0	0	0
50 mg/L	65.88±4.51	67.18±4.31	54.29±0,80
100 mg/L	57.46±1.63	57.14±2.29	57.66±4.19

Pembahasan

Isolasi dan *enrichment* bakteri endofit *Pontederia crassipes* diperoleh sebanyak 7 isolat yang terdiri dari 3 isolat dari akar, 1 isolat dari daun, dan 3 isolat dari batang. Ketujuh isolat tersebut dipilih berdasarkan sumber diperolehnya isolat tersebut dari bagian tumbuhan meliputi akar, batang, dan daun. Isolat dipilih berdasarkan kenampakan morfologi yang berbeda. Pada penelitian sebelumnya, Nurmalasari *et al* (2020) berhasil mengisolasi 8 isolat bakteri endofit dari akar eceng gondok yang tumbuh di lokasi tercemar logam berat kromium di TPA Dusun 5, Bojongsari, Purbalingga.

Ketujuh isolat bakteri endofit yang sudah diperoleh kemudian dilakukan uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) untuk menganalisis isolat yang diperoleh. Hasilnya menunjukkan bahwa isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 memiliki nilai resistensi terhadap kromium

tertinggi yaitu 2100 mg/L. Kemampuan resistensi ini lebih tinggi dibandingkan penelitian yang sudah ada. Penelitian yang dilakukan oleh Rosariastuti *et al* (2012) memperoleh isolat yang resisten terhadap kromium hingga konsentrasi 300 mg/L, Imron & Purwati (2016) menyebutkan *Azotobacter* sp. S8 dan *Bacillus subtilis* resisten terhadap kromium hingga konsentrasi 50 mg/L, Maysitha *et al*, (2024) menyatakan bahwa *C. vulgaris* dapat tumbuh hingga konsentrasi 40 mg/L kromium dan tumbuh optimal pada konsentrasi 5 mg/L kromium. Penelitian yang dilakukan oleh Larashati (2004) berhasil mengisolasi *Bacillus* yang tahan terhadap kromium hingga konsentrasi 500 mg/L, sementara Abou-Shanab *et al* (2007) melaporkan bahwa *Pseudomonas* memiliki resistensi mencapai 200 mg/L kromium, dan penelitian oleh Nurmalasari *et al* (2020) menyebutkan bahwa *Bacillus* dan *Pseudomonas* resisten terhadap kromium hingga konsentrasi 750 mg/L.

Kemampuan mikroorganisme untuk hidup di lingkungan yang terkontaminasi logam berat disebabkan oleh sejumlah mekanisme pertahanan yang dikembangkan oleh mikroorganisme tersebut dalam mengatasi toksisitas logam berat (Nurmalasari *et al*, 2020). Mikroorganisme pada lingkungan yang terkontaminasi logam berat mengembangkan beberapa mekanisme toleransi terhadap logam berat, yaitu dengan cara efflux, kompleksasi atau reduksi logam berat atau menggunakan logam berat sebagai penerima terakhir elektron pada respirasi anaerob (Ginting *et al*, 2022). Mekanisme resistensi bakteri terhadap kromium diatur oleh operon *chrA1* dan *gen chrA* (Sharma & Shukla, 2021) yang diduga merupakan transpoter Cr(VI). Operon *chrA1* dan *gen chrA* telah diketahui merupakan *inducible genes* yaitu gen yang akan terekspresi dalam kondisi tertentu. Adanya penambahan Cr ke medium pertumbuhan menyebabkan aktifnya *gen chrA*. Ekspresi dari gen tersebut adalah suatu protein transpoter (*chrA1*) yang dapat mengeluarkan kromat dari dalam sel menggunakan *proton-motive force* sehingga *chrA1* bertanggung jawab terhadap resistensi bakteri terhadap Cr (Sari, 2016).

Berdasarkan hasil uji hemolisis, dapat diketahui bahwa isolat PCr1, PCr2, dan PCr3 memiliki zona bening pada media *Blood Agar*, sehingga termasuk dalam β -hemolisis. Hal ini didasarkan pada pernyataan Fajriani *et al* (2018) yang menyatakan bahwa hasil β -hemolisis ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Terbentuknya zona bening menunjukkan bahwa isolat tersebut dapat melisis sel darah merah, artinya bakteri tersebut bersifat patogen. Proses lisis yang sempurna ditunjukkan dari zona bening yang benar-benar jernih disekitar koloni (Hikmawati *et al*, 2019).

Isolat PCr4 tidak menunjukkan adanya zona bening di sekitar koloni yang tumbuh, namun terjadi perubahan warna menjadi sedikit kehijauan (*greenish*) pada media di sekitar

koloni, sehingga termasuk dalam golongan α -hemolisis. Hal ini didasarkan pada pernyataan Firmani *et al*, (2024) α -hemolisis ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada media *Blood Agar* di sekitar koloni menjadi sedikit kehijauan yang artinya terjadi hemolisis pada sebagian sel darah.

Isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 menunjukkan hasil tidak terbentuknya zona bening dan tidak terjadi perubahan warna pada media *Blood Agar* menjadi sedikit kehijauan di sekitar koloni, sehingga isolat tersebut termasuk dalam golongan γ -hemolisis. Golongan γ -hemolisis tidak memiliki kemampuan dalam melisiskan sel darah, artinya isolat tersebut tidak bersifat patogen (Muna, 2021).

Hasil uji hipermukoviskositas melalui *string test* tidak menunjukkan adanya lendir pada koloni bakteri yang tumbuh pada media *Blood Agar* saat ditarik menggunakan ose kolong steril yang artinya negative. Bakteri mampu menghasilkan lendir atau kapsul disebabkan oleh produksi polisakarida kapsular yang berlebihan. Kapsul yang membungkus bakteri ini terbuat dari polisakarida berfungsi untuk meningkatkan kemampuan bakteri dalam menyebabkan penyakit (patogenitas). Kapsul yang tebal dan berlendir ini memiliki daya tahan lebih kuat terhadap sistem kekebalan tubuh dibandingkan kapsul biasa karena mengandung eksopolisakarida dengan viskositas tinggi. Hal ini menyebabkan bakteri lebih tahan terhadap fagositosis, lebih resisten terhadap antibiotik, dan mampu menyebabkan infeksi yang serius (Huang *et al*, 2023).

Virulensi bakteri merupakan faktor utama yang akan mempengaruhi tingkat keparahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Sarwoska *et al*, 2019). Pada uji ini, isolat bakteri digoreskan pada media TSA + *Coomassie Brilliant Blue* 0.01%. Berdasarkan hasil uji yang dilakukan, isolat yang tumbuh pada media tersebut tidak menyerap zat warna *Coomassie Brilliant Blue*, dimana koloni yang tumbuh berwarna putih, sehingga dapat disimpulkan bahwa semua isolat menunjukkan hasil negatif. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Poddar *et al*, (2021) yang menyatakan bahwa koloni berwarna putih menunjukkan tidak adanya lapisan protein pelindung (A layer) di luar dinding sel bakteri, sedangkan koloni berwarna biru mengindikasikan bahwa bakteri tersebut memiliki lapisan protein pelindung (A layer) di luar dinding sel. Keberadaan lapisan pelindung ini merupakan ciri khas dari strain bakteri yang bersifat virulen (Poddar *et al*, 2021). Faktor virulensi adalah molekul yang membantu bakteri menyerang inang pada tingkat sel (Sharma *et al*., 2017). Bakteri yang memiliki lapisan protein pelindung ditemukan di bakteri gram negatif yang bersifat patogen (Suloi & Nurmiati, 2024).

Coomassie Brilliant Blue memiliki kecenderungan untuk membentuk ikatan kimia dengan protein terutama melalui interaksi hidrofobik dengan asam amino nonpolar (seperti Phe, Trp, Tyr) dan ikatan elektrostatik dengan asam amino bermuatan positif (seperti Arg, Lys, His). Bakteri virulen memproduksi protein seperti enzim protease, hemolisin, atau toksin protein lain yang diekskresikan atau berada di permukaan koloni bakteri. Saat protein virulen diproduksi, CBB di sekitar koloni akan mengikat protein tersebut, sehingga terbentuk kompleks CBB-protein dan menghasilkan warna biru pada koloni yang tumbuh. Sedangkan koloni yang tidak menghasilkan protein virulen, tidak akan membentuk kompleks ini sehingga koloni yang tumbuh tidak berwarna biru (Georgiou *et al*, 2008).

Uji gelatinase merupakan metode yang digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim gelatinase yang dapat menghidrolisis gelatin menjadi asam amino (Nuryanti *et al*, 2021). Berdasarkan hasil uji yang dilakukan, ketujuh isolat yang diperoleh menunjukkan menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak adanya zona bening di sekitar koloni yang tumbuh pada media. Gelatinase diidentifikasi sebagai faktor virulensi utama dalam pembentukan infeksi melalui perlekatan bakteri dan pembentukan biofilm. Kontribusi gelatinase terhadap virulensi sebagian disebabkan oleh perannya dalam regulasi *autolysin*. Autolysin merupakan enzim yang berfungsi untuk memecah dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan sel tersebut lisis atau pecah (Puspo, 2020).

Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, ketiga isolat bakteri PCr5, PCr6, dan PCr7 memiliki kemiripan dengan spesies *Pediococcus* sp. Hasil tersebut didukung oleh data karakteristik mikroskopik, fisiologi, dan biokimia dimana hasil yang diperoleh sesuai dengan genus tersebut. Dalam buku *Bergey* dijelaskan bahwa bakteri ini termasuk dalam golongan bakteri asam laktat (BAL) gram positif, berbentuk kokus, dan sering ditemukan berpasangan atau dalam kelompok empat (tetrad). Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif, homofermentatif, tidak motil, tidak berspora dan negatif katalase. Bakteri ini mampu memfermentasikan karbohidrat tetapi tidak memproduksi gas pada berbagai jenis gula kecuali laktosa. Bakteri ini tumbuh baik pada suhu 25°C-40°C dan bersifat non-patogen baik bagi tumbuhan maupun hewan.

Kurva pertumbuhan ketiga isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 memiliki memiliki nilai OD tertinggi pada isolat yang tumbuh pada media TSB murni, kemudian dibawahnya isolat yang tumbuh pada media TSB yang tersuplementasi 50 mg/L kromium, dan nilai OD terendah ada pada isolat yang tumbuh pada media TSB yang tersuplementasi 100 mg/L kromium. Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa adanya penambahan kromium pada media pertumbuhan bakteri dapat menyebabkan terjadinya penurunan OD bakteri yang artinya

pertumbuhan bakteri pada media tersuplementasi kromium lebih rendah dibandingkan pada media yang tidak ditambahkan kromium. Adanya penambahan kromium pada media menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bakteri, dimana semakin tinggi konsentrasi kromium yang ditambahkan, semakin rendah pula pertumbuhan bakteri yang terjadi. Hal ini mengindikasikan efek toksik Cr terhadap pertumbuhan sel yang terjadi selama 48 jam masa inkubasi. Efek toksik tersebut berkaitan dengan adanya perubahan materi genetik dan reaksi fisiologis serta metabolisme isolat yang digunakan (Sari, 2016). Mikroorganisme yang terpapar kromium dalam jangka waktu yang lama dapat menurunkan diversitas mikrobial, populasi, dan aktivitas mikroorganisme tersebut (Basu *et al*, 2014).

Bakteri dapat mereduksi kromium melalui tiga mekanisme yang berbeda yaitu biotransformasi, biosorpsi, dan bioakumulasi (Arishi & Mashhour, 2021). Mekanisme biotransformasi terjadi melalui reduksi oleh bakteri menggunakan gen *chrR* yang tereduksi kemudian dikeluarkan dari sel melalui mekanisme pompa efluks yang dikode oleh gen *chrA* (Arishi & Mashhour, 2021). Contoh bakteri yang dapat mereduksi kromium melalui mekanisme biotransformasi adalah *Bacillus amyloliquifaciens* (Das *et al*, 2014), *Pseudomonas gessardii* LZ-E *Shewanella* (Huang *et al*, 2016), dan *Pediococcus acidilactici* (Lytras *et al*, 2017).

Mekanisme biosorpsi terjadi melalui proses fisika-kimia pasif antara logam berat dan bakteri, dimana bakteri mengikat atau menyerap Cr(VI) dari lingkungan. Pada mekanisme ini tidak diperlukan energi dan proses ini akan terus berlangsung hingga tercapai keseimbangan antara ion yang diserap dengan ion yang masih ada di dalam lingkungan. Contoh bakteri yang mereduksi kromium melalui mekanisme ini adalah *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterococcus casseliflavus* (Arishi & Mashhour, 2021). Mekanisme bioakumulasi Cr(VI) bergantung pada metabolisme sel dan membutuhkan energi untuk transportasi Cr(VI) secara reversibel melintasi membran sel. Oleh karena itu, mekanisme ini hanya bisa dilakukan oleh sel bakteri yang masih hidup karena struktur kimia Cr(VI) mirip dengan ion sulfat tetrahedral (SO_4^{2-}) sehingga ion Cr(VI) dapat masuk ke dalam membran bakteri dengan memanfaatkan jalur transportasi sulfat (Arishi & Mashhour, 2021). Contoh bakteri yang mereduksi kromium melalui mekanisme ini adalah *Staphylococcus* sp. MB371, *Klebsiella pneumoniae* MB361, dan *Tenotrophomonas* sp. MB339 (Aslam *et al*, 2020).

SIMPULAN

Terdapat 7 isolat bakteri endofit dari tumbuhan *Pontederia crassipes*, 4 isolat (PCr1,

PCr2, PCr3, dan PCr4) memiliki nilai MIC sebesar 600 mg/L Cr, sedangkan 3 isolat (PCr5, PCr6, dan PCr7) memiliki nilai MIC 2100 mg/L Cr. Berdasarkan uji patogenitas dan virulensi isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 menunjukkan hasil non patogen dan tidak memiliki faktor virulensi. Hasil identifikasi dan karakterisasi dapat diketahui isolat PCr5, PCr6, dan PCr7 teridentifikasi sebagai *Pediococcus* sp. Pada pengukuran pertumbuhan bakteri, semakin tinggi konsentrasi kromium yang ditambahkan pada media, semakin rendah pula pertumbuhan bakteri yang terjadi dimana pertumbuhan tertinggi ada pada kontrol (tanpa penambahan kromium), kemudian pada konsentrasi 50 mg/L, dan terendah pada konsentrasi 100 mg/L. Nilai efektivitas bioreduksi kromium tertinggi pada konsentrasi 50 mg/L yang berada pada rentang 64.29% - 67,18% dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar 3 isolat yang digunakan, namun terdapat perbedaan yang signifikan kemampuan bioreduksi kromium pada 3 konsentrasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Shanab, R. A. I., Angle, J. S., & Van Berkum, P. (2007). Chromate-tolerant bacteria for enhanced metal uptake by *Eichhornia crassipes* (Mart.). *International Journal of Phytoremediation*, 9(2), 91–105.
- Akkurt, Ş., Oğuz, M., & Alkan Uçkun, A. (2022). Bioreduction and bioremoval of hexavalent chromium by genetically engineered strains (*Escherichia coli* MT2A and *Escherichia coli* MT3). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 45.
- Amaliah, Z. Z. N., Bahri, S., & Amelia, P. (2018). Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari limbah cair rendaman kacang kedelai. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 5(1), 253–257.
- Arishi, A., & Mashhour, I. (2021). Microbial Mechanisms for Remediation of Hexavalent Chromium and their Large-Scale Applications; Current Research and Future Directions. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 15(1).
- Assauqi, N. F., Hafshah, M., & Latifah, R. N. (2023). Penentuan Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun Pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *JC-T (Journal Cis-Trans): Jurnal Kimia dan Terapannya*, 7(1), 1–9.
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., ... & Thatoi, H. (2014). Investigation on mechanism of Cr (VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112–121.
- Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 391–403.

- Hasyyati, L., Hartati, E., & Djaenudin, D. (2020). Penyisihan krom pada pengolahan air limbah penyamakan kulit menggunakan metode elektrokoagulasi. *Jurnal Serambi Engineering*, 5(4).
- Hikmawati, F., Susilowati, A., & Setyaningsih, R. (2019). Deteksi jumlah dan uji patogenitas *Vibrio* spp. pada kerang hijau (*Perna viridis*) di kawasan wisata Pantai Yogyakarta.
- Huang, J. M., Sung, K. C., Lin, W. C., Lai, H. Y., & Wang, Y. J. (2023). Enhancement of capsular hypermucoviscosity in *Klebsiella pneumoniae* by *Acanthamoeba*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(8), e0011541.
- Imron, M. F., & Purwati, I. F. (2016). Uji Kemampuan Bakteri *Azotobacter* S8 dan *Bacillus subtilis* untuk menyisihkan Trivalent Chromium (Cr³⁺) pada limbah cair. *Jurnal Teknik ITS*, 5(1), 4–10.
- Isnaeni, I., Calvina, A. B., Ardiana, A. D., Azzahra, C. S., Santosa, N. R., Miladya, N. F., & Anwar, N. Z. (2024). Bioremediasi Cemar Tanah Menggunakan Biostimulant. *Camellia: Clinical, Pharmaceutical, Analytical and Pharmacy Community Journal*, 3(2), 192–204.
- Kaushik, G., & Raza, K. (2019). Potential of novel *Dunaliella salina* from sambhar salt lake, India, for bioremediation of hexavalent chromium from aqueous effluents: An optimized green approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 430–438.
- Kuncoro, Y. M., & Soedjono, E. S. (2022). Studi Pustaka: Teknologi Pengolahan Air Limbah pada Industri Penyamakan Kulit. *Jurnal Teknik ITS*, 11(3), C142–C149.
- Larashati, S. (2004). Reduksi Krom (VI) Secara In Vitro Oleh Kultur Campuran Bakteri Yang Diisolasi Dari Lindi Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Sampah. [Tesis]. Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung.
- Lejri, R., Ellafi, A., Tebar, J. V., Chaieb, M., Mekki, A., Džunková, M., & Younes, S. B. (2024). Phenotypic characterization for bioremediation suitability of isolates from Southern Tunisian tannery effluent. *Microbiological Research*, 285, 127771.
- Murti, R. S., & Sugihartono, S. (2020). Bahaya Kromium Hexavalen (Cr VI) Pada Kulit Dan Produk Kulit Samak Krom Serta Upaya Pencegahannya. *Indonesian Journal of Industrial Research*, 12(2), 241–252.
- Muna, N. (2021). Enumerasi dan Uji Patogenitas *Vibrio* sp. Pada Kerang Hijau (*Perna viridis*) dari Kawasan Krueng Cut Aceh Besar. [Skripsi]. UIN Ar-Raniry.
- Nurmalasari, A., Oedjijono, O., & Lestari, S. (2020). Isolasi dan Uji Resistensi Bakteri Endofit Eceng Gondok terhadap Krom. *Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*, 2(2), 266–272.
- Plestenjak, E., Kraigher, B., Leskovec, S., Mandic Mulec, I., Marković, S., Ščančar, J., & Milačič, R. (2022). Reduction of hexavalent chromium using bacterial isolates and a microbial community enriched from tannery effluent. *Scientific Reports*, 12(1), 20197.
- Podar, K., Padhan, B., Sarkar, D., & Sarkar, A. (2021). Purification and optimization of pink pigment produced by newly isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. PWN1. *SN Applied Sciences*, 3, 1–11.

- Pratiwi, W. M., & Asri, M. T. (2022). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Indigenous Pendegradasi Pestisida Profenofos dan Klorantraniliprol di Jombang Jawa Timur. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(2), 300–309.
- Rahardjo, D. (2023). Analisis Risiko Kesehatan Kromium Yang Terkandung Dalam Beras Dari Area Persawahan Kecamatan Pleret. *Jurnal Sciscitatio*, 4(1), 39–49.
- Rahardjo, D., & Prasetyaningsih, A. (2021). Pengaruh Aktivitas Pembuangan Limbah Cair Industri Kulit Terhadap Profil Pencemar Kromium di Lingkungan serta Moluska, Ikan dan Padi di Sepanjang Aliran Sungai Opak Bagian Hilir. *Prosiding Seminar Nasional UNIMUS*, 4.
- Rahayu, A., Syauqi, R., & Islami, M. K. (2021). Teknologi Pengolahan Kandungan Kromium dalam Limbah Penyamakan Kulit Menggunakan Proses Adsorpsi. *Jurnal Teknik Kimia dan Lingkungan*, 5(1), 90–99.
- Rosariastuti, M. R., Pramono, A., Ngadiman, N., & Prijambada, I. D. (2012). Peran Rhizobakteri Dalam Fitoekstraksi Logam Berat Kromium Pada Tumbuhan Jagung. *Jurnal Penelitian Sosial dan Ekonomi Kehutanan*, 6(1), 38–50.
- Rosmania, R., & Yanti, F. (2020). Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), 76–86.
- Sari, A. P. N. (2016). Viabilitas *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada Medium yang Terpapar Logam Kromium (Cr). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 4(2), 15624.
- Sharma, B., & Shukla, P. (2021). Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123285.
- Suloi, A. F., & Nurmiati, N. F. (2024). [Judul Artikel Tidak Lengkap]. *Agrokompleks*, 24(1), p-ISSN: 1412-811x, e-ISSN: 2775-2321.
- Vitasari, M., Darundiati, Y. H., & Setiani, O. (2020). Biokonsentrasi Faktor Logam Berat Kromium Heksavalen (Cr VI) Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Sungai Tenggang Semarang Timur. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa*, 10(1), 6–9.
- Yuliana, N. (2018). *Optimasi Sterilisasi Eksplan Dan Pengaruhnya Terhadap Kestabilan In Vitro Tunas Vegetatif Tumbuhan Sirsak (Annona muricata L. Var Ratu)*. [Skripsi]. Institut Teknologi Sepuluh Nopember.