

PERANAN BAKTERI DALAM MENGUBAH ARSEN ANORGANIK MENJADI ARSEN ORGANIK DI PERAIRAN

The Roles of Bacteria in Modifying Inorganic Arsen to Organic Arsen in Waters

Eko Sugiharto

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

E-mail: ekosugiharto@jogjamedianet.com

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui peranan bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas sp.* dalam mengubah spesies arsen. Arsenik dikenal sebagai salah satu unsur kimia yang mempunyai toksisitas tinggi. Analisis mengenai spesiasi arsen yang terkandung dalam perairan dilakukan dengan metode gabungan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Spektrometri Serapan Atom (HPLC-AAS). Untuk mengetahui peranan bakteri *E. coli* dan *Pseudomonas sp.* maka dilakukan tiga perlakuan, yaitu perlakuan dengan variasi media pertumbuhan, variasi pH, dan variasi suhu inkubasi. Media pertumbuhan yang digunakan yaitu air, l – metionin, *nutrient broth*, *czapek dox*, dan garam mineral. Variasi pH dilakukan pada pH 4, 5, 6, 7, 8, dan 9, sedangkan variasi suhu dilakukan pada 25°C sampai dengan 35°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada peningkatan persentase jumlah As (V) yang tereduksi menjadi As (III) dalam media garam mineral pH 7 dengan suhu optimum 35°C. Enzim yang dihasilkan *Pseudomonas sp.* dapat mereduksi As (V) menjadi As (III) pada media garam mineral pH 8 dan optimum pada semua variasi suhu. Keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* dan *Pseudomonas sp.* dapat meningkatkan toksisitas arsen di perairan karena kedua bakteri dapat mereduksi As (V) menjadi As (III) pada pH dan temperatur optimum.

Kata kunci : spesies arsen, bakteri, HPLC-AAS

Abstract

The aim of this research was to know the roles of Escherichia coli and Pseudomonas sp. in arsenic speciation. Arsenic has been known as highly toxic chemical element. The analysis towards arsenic speciation which is contained in waters was done by using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) – Atomic Absorption Spectrometry (AAS) coupling method. The observation towards the roles of E. coli and Pseudomonas sp. was done by varying the growth medium, pH and incubation temperature. The growth medium used in this observation were water, l – metionin, nutrient broth, czapek dox and mineral salt. The variation of pH was carried out at pH of 4, 5, 6, 7, 8, and 9. The variation of incubation temperatures was done from 25°C to 35°C. The result showed that there was increasing percentage of As (V) reduced to As (III) by E. coli in mineral salt medium pH of 7 and its optimum incubation temperature was 35°C. The observation towards Pseudomonas sp. showed that the activity of enzyme produced from Pseudomonas sp. can reduce As (V) to As (III) optimum in mineral salt medium pH of 8 and in all variation of temperatures. The results above showed that E. coli and Pseudomonas sp. can increase the toxicity of arsenic in waters because both bacteria are able to reduce As (V) to As (III) carried out at pH and temperature of its growth.

Key words : arsenic species, bacteria, HPLC-AAS

PENDAHULUAN

Arsenik yang ditemukan oleh Albertus Magnus pada tahun 1250, telah diketahui sebagai unsur yang mempunyai toksisitas relatif tinggi. Di alam, arsenik akan mengalami transformasi spesies karena terjadinya proses bio-metilasi (Wood, 1974). Spesies yang paling sering dijumpai pada perairan (disajikan pada gambar 1) adalah arsen (III), arsen (V), monometilarsen (MMA), dan dimetilarsen (DMA). Dua spesies lain yang ditemukan dalam beberapa jenis udang dan beberapa jenis *crustacea* adalah arsenokolin dan arsenobetain (Francesconi, 1977). Morrison (1989) menyatakan urutan toksisitas spesies arsen adalah R_3As ($R=H, CH_3, Cl$) > arsen (III) > arsen (V) > dimetilarsen > monometilarsen. Sedangkan spesies arsenobetain dan arsenokolin samasekali tidak toksik.

Penentuan kandungan arsenik selama ini selalu ditentukan kandungan totalnya dengan metode Spektrofotometri Serapan Atom Pembentukan Hidrida (HG-AAS). Cara yang telah banyak dilakukan ini, tidak dapat menentukan tingkat toksisitas yang disebabkan karena arsenik. Sebagai contoh apabila dalam sampel air dan udang mengandung arsenobetain atau arsenokolin, dengan metode HG-AAS yang terhitung adalah sebagai arsen saja, karena HG-AAS hanya mampu mendeteksi adanya arsen total. Padahal, mengingat toksisitas spesies arsen tergantung pada spesiesnya, maka penentuan kandungan total tidak dapat dipergunakan sebagai ukuran kontaminasi arsen terhadap suatu lingkungan. Analisis spesiasi arsenik telah dimulai oleh Pacey dan Ford (1981) yang melakukan spesiasi arsenik dengan resin penukar kation dan penukar anion (Dowex 50 W X-8 dan AG 1 X-8), kemudian setiap fraksi ditentukan kuantitatifnya secara AAS dengan tanur grafit. Cara ini hanya dapat memisahkan As (V), DMA dan MMA, sedangkan As (III) dihitung dengan cara pengurangan kandungan total terhadap tiga spesies di atas dan ternyata interferensi serta kontaminasinya cukup besar. Penelitian lainnya

terus berkembang, antara lain dengan cara kromatografi gas, dimana setiap spesies arsenik diderivatisasi dengan 2,3-dimercaptopropanol (BAL), kemudian diekstrak ke dalam benzen dan deteksi dilakukan dengan menggunakan detektor fotometri nyala. Limit deteksi yang diperoleh 0,02 mg untuk As (III) dan As (V) sedangkan untuk MMA 0,04 mg. Sedangkan DMA tidak dapat dipisahkan dengan cara ini (Fukui dkk, 1983). Dengan cara ini mutlak memerlukan langkah derivatisasi terlebih dahulu.

Eko Sugiharto dkk (1990) telah mengembangkan metode penentuan arsen pembentukan hidrida dengan $NaBH_4$ sistem kontinu, dimana reaksi pembentukan hidrida terjadi dalam *coil* kemudian hidrida yang terjadi dipisahkan pada separator. Dengan cara ini diperoleh limit deteksi yang baik dan waktu analisis yang singkat, serta ketelitian yang tinggi.

Selanjutnya, dengan mendapatkan dana dari Lembaga Penelitian UGM (dana *Loan Basic Science*), telah berhasil dikembangkan oleh Eko Sugiharto dkk (1991) penggabungan secara langsung HPLC-AAS untuk memisahkan spesies arsenik. Campuran As (III), As (V), MMA, dan DMA dapat dipisahkan langsung dengan HPLC-AAS menggunakan kolom penukar anion Hamilton PRP-X 100 dan diperoleh limit deteksi berturut-turut 1 ppb As (III); 1,3 ppb As (V); 1,5 ppb MMA dan 5 ppb DMA. Kemudian dengan dana PAU Pangan dan Gizi (1992/1993) telah ditemukan terjadinya spesies monometilarsen dan dimetilarsen di dalam air tempat pemeliharaan udang (akuarium). Bak tempat pemeliharaan udang tersebut diberi pakan arsen trioksida yang dicampur dengan makanan udang, dan di dalam air mengandung plankton dan bakteri.

Pada penelitian ini dipelajari peranan bakteri yang dapat mengubah spesies arsen anorganik yang toksik menjadi arsen organik yang tidak toksik.

Selain itu juga dipelajari adanya spesies arsenik yang lain yang terdapat dalam air bak tempat pemeliharaan udang dengan metode penggabungan HPLC-AAS yang telah berhasil

dikembangkan menggunakan kolom penukar kation jenis sulfonat (SO_3H).

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan untuk perlakuan sampel penelitian adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas sp.* yang diisolasi dari sungai Code Yogyakarta, dinatrium arsenat ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck) sebagai spesies arsen anorganik dan dimetilarsenat ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$) (Sigma) sebagai arsen organik, air sumur diperoleh dari PAU Pangan dan Gizi UGM, l-metionin ($\text{HO}_2\text{C}_2\text{H}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$) (Merck), media *nutrient broth* (Oxoid), media *Czapek dox* (Oxoid), dan larutan garam mineral modifikasi Shariatpanahi dkk. (1981).

Bahan lain yang digunakan untuk optimasi metode analisis HPLC-AAS terdiri dari arsen trioksida (As_2O_3) (Prolab), natrium arsenat ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck), monometilarsenat ($\text{CH}_3\text{AsO}(\text{ONa}) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (ICN Pharmaceuticals), dan dimetilarsenat ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$) (Sigma). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gabungan HPLC-HGAAS untuk analisis spesies arsen.

Sebelum dilakukan analisa spesies arsen dengan penggabungan HPLC-HGAAS, terlebih dahulu ditentukan kondisi optimum AAS pembentukan hidrida dan kondisi optimum pemisahan yang meliputi : laju alir eluen, kekuatan ion eluen, dan pH eluen. Diamati tiga perlakuan terhadap sampel penelitian, yaitu : perlakuan pengaruh media terhadap perubahan

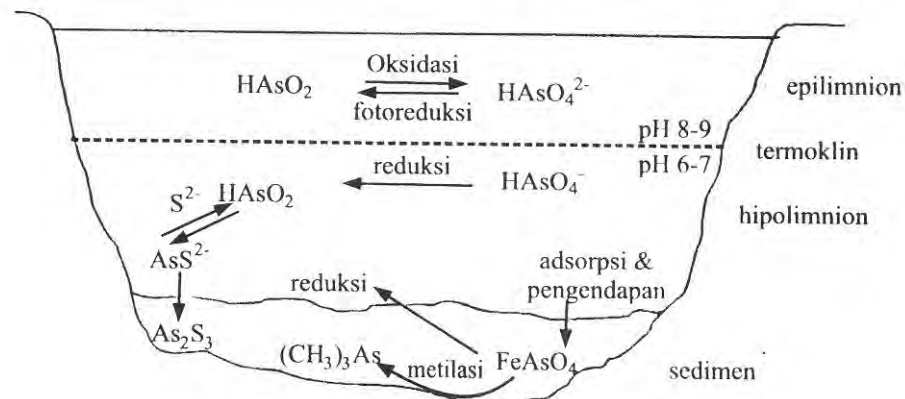
spesies arsen oleh bakteri, perlakuan pengaruh pH terhadap perubahan spesies arsen oleh bakteri, dan perlakuan pengaruh suhu terhadap perubahan spesies arsen oleh bakteri. Pengambilan sampel untuk masing-masing perlakuan dilakukan pada tiap interval waktu tertentu, masing-masing pada hari pertama, kedua, keempat, ketujuh, dan kesebelas. Sampel kemudian disaring dengan filter membran ukuran $0,45 \mu\text{m}$, untuk selanjutnya dianalisis menggunakan alat gabungan HPLC-HGAAS pada kondisi optimum. Hasil yang diperoleh secara kualitatif dan kuantitatif dibandingkan terhadap larutan yang mengandung empat spesies arsen, yaitu As (III), As (V), MMA, dan DMA dalam media percobaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

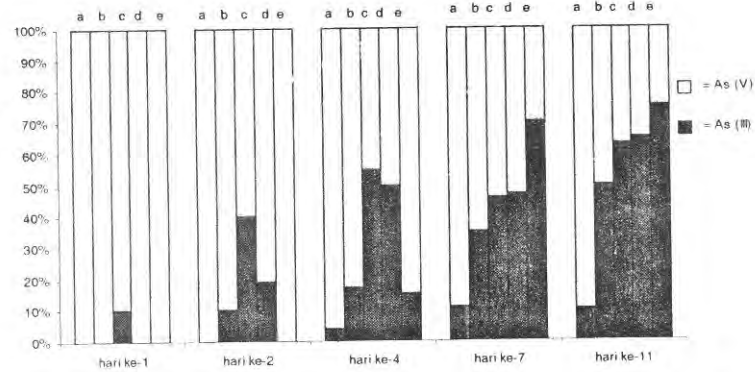
Agar diperoleh hasil yang optimal, maka diperlukan pengaturan kondisi yang optimum. Dari hasil optimasi metode, diperoleh kondisi optimum yaitu konsentrasi HCl optimum yang diperlukan adalah 1,5 M, kekuatan eluen optimum untuk mengalirkan spesies arsen adalah 0,0032 M, dan pH eluen optimum adalah pH 5,8.

Perubahan Spesies Arsen oleh Bakteri E. coli

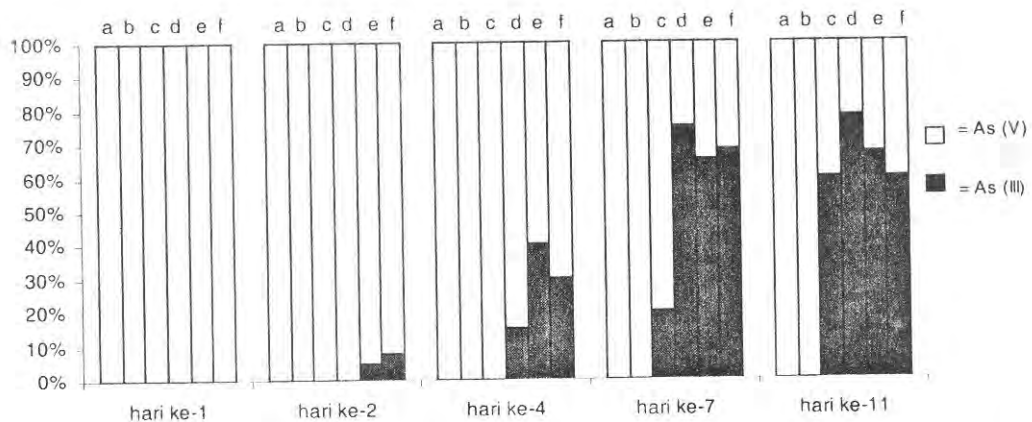
Pemilihan media didasarkan atas kandungan nutrisi pertumbuhan untuk bakteri dan ketersediaan media yang ada di laboratorium. Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : air, l-metionin, *nutrient broth*, *czapek dox*, dan



Gambar 1. Spesies arsen di perairan



Gambar 2. Histogram perubahan spesies As (V) menjadi As (III) oleh *E. coli*, dalam media : a. air, b. metionin, c. *nutrient broth*, d. *czapek dox*, e. garam mineral



Gambar 3. Histogram perubahan spesies As (V) menjadi As (III) oleh *E. coli* dalam media garam mineral : a. pH 4; b. pH 5; c. pH 6; d. pH 7; e. pH 8; f. pH 9

larutan garam mineral. Selanjutnya dilakukan pengamatan pengaruh media percobaan terhadap perubahan spesies arsenat atau As (V).

Dari hasil percobaan seperti yang disajikan pada gambar 3, terlihat bahwa reduksi As (V) menjadi As (III) oleh enzim yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* pada berbagai media pertumbuhan menunjukkan suatu pola persentase yang meningkat dari hari pertama hingga hari kesebelas. Pada hari kesebelas inkubasi, persentase reduksi As (V) menjadi As (III) paling tinggi terdapat pada media larutan garam mineral.

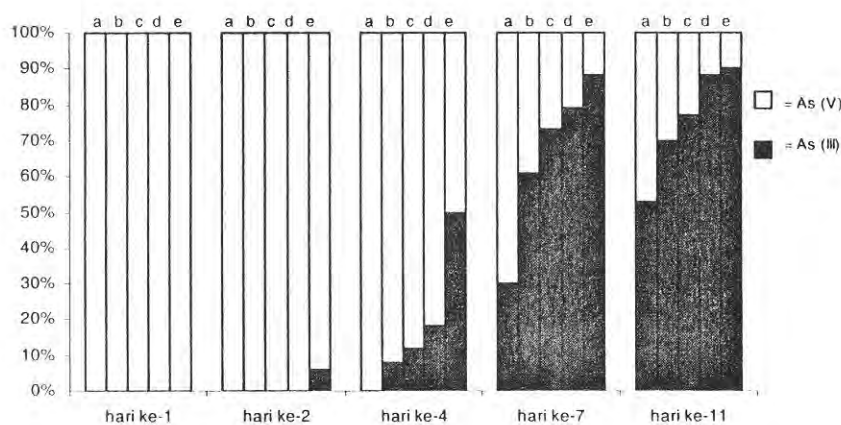
Menurut Aurand (1987), adanya kation seperti K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} dan Co^{2+} didalam media dapat mengaktifkan kerja suatu enzim. Pernyataan ini dapat mendukung hasil

yang diperoleh, yaitu media garam mineral mengandung banyak senyawa anorganik, yang dapat berfungsi sebagai pengaktif enzim yang dapat mereduksi As (V) menjadi As (III).

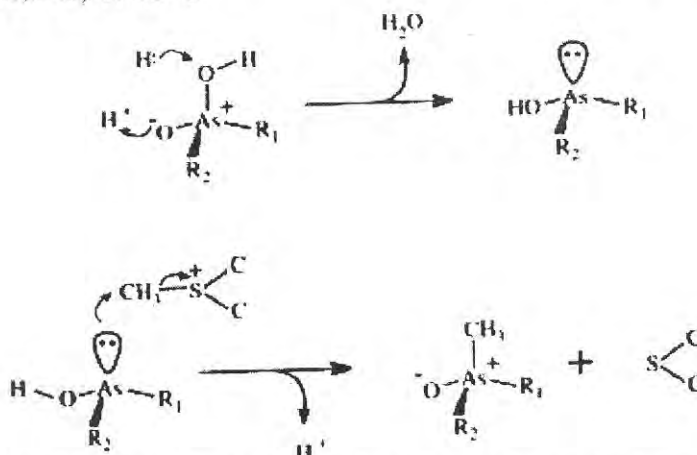
Pengaruh pH dan Suhu

Pengamatan pengaruh variasi pH terhadap perubahan spesies arsenat atau As (V) oleh bakteri *E. coli* menunjukkan bahwa reduksi As (V) tertinggi terjadi dalam media dengan pH 7. pH optimum enzim spesifik yang dihasilkan *E. coli*, yang dapat menjadi katalis reduksi As (V) menjadi As (III), berada pada pH 6 – 9. Sedangkan pertumbuhan optimal untuk *E. coli* berada pada pH 7.

Pengamatan perlakuan variasi suhu terhadap perubahan spesies As (V) oleh bakteri



Gambar 4. Histogram perubahan spesies As (V°) menjadi As (III) oleh *E. coli* dalam media garam mineral dengan suhu inkubasi : a. 25°C; b. 27,5°C; c. 30°C; d. 32,5°C; e. 35°C



Gambar 5. Mekanisme dasar spesiasi arsen dan metilasi dengan adanya bakteri

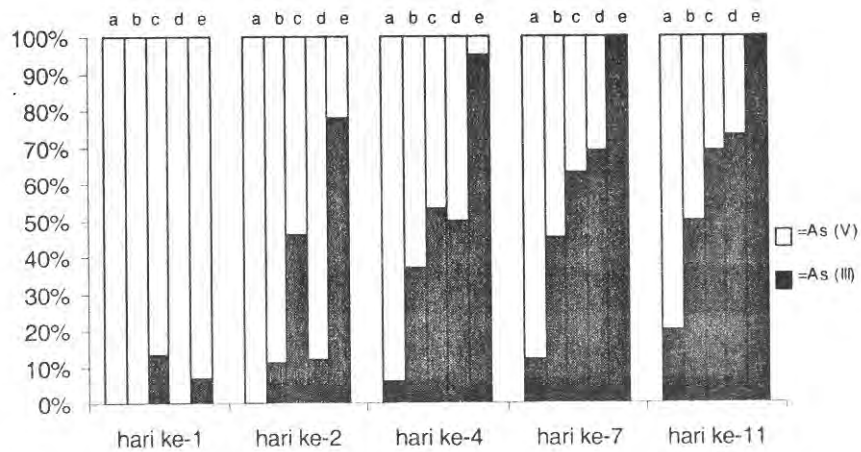
E. coli menunjukkan bahwa As (III) yang terbentuk paling banyak dalam media dengan suhu inkubasi 35°C. Pengamatan dilakukan dengan variasi suhu antara 25°C; 27,5°C; 30°C; 32,5°C; dan 35°C. Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *E. coli* yang dapat menjadi katalis terjadinya reduksi As (V°) menjadi As (III) berada pada suhu optimum 35°C.

Dari hasil percobaan pengaruh bakteri *E. coli* yang diisolasi dari perairan terhadap perubahan As (V°) pada berbagai media, pH dan suhu, menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* dapat menjadi katalis terjadinya reduksi As (V°) menjadi As (III), tanpa membentuk spesies yang lain atau spesies intermediet.

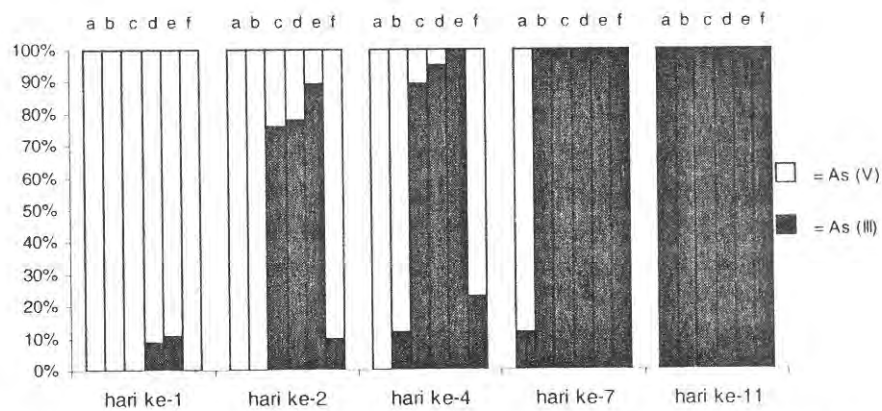
Bakteri ini dapat meningkatkan toksisitas arsen di perairan. Mekanisme dasar spesiasi arsen dan metilasi dengan adanya bakteri disajikan pada gambar 2.

Perubahan Spesies Arsen oleh Bakteri Pseudomonas sp.

Pengamatan dengan perlakuan – perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap bakteri *Pseudomonas sp.* Hasil pengamatan pengaruh berbagai media pertumbuhan terhadap perubahan spesies As (V°) oleh bakteri *Pseudomonas sp.* menunjukkan bahwa reduksi As (V°) menjadi As (III) yang lebih toksik paling banyak terjadi pada media garam mineral.



Gambar 6. Histogram perubahan spesies As (V) menjadi As (III) oleh *Pseudomonas sp.* dalam media : a. air; b. metionin; c. *nutrient broth*; d. *czapek dox*; e. garam mineral



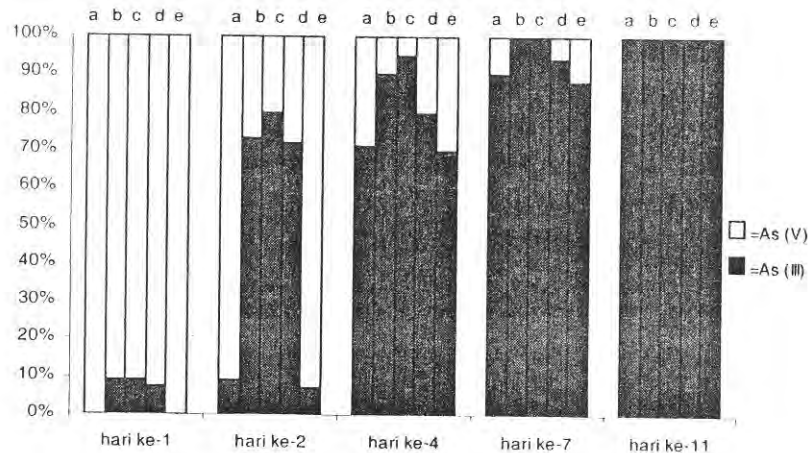
Gambar 7. Histogram perubahan spesies As (V) menjadi As (III) oleh *Pseudomonas sp.* dalam media garam mineral: a. pH 4; b. pH 5; c. pH 6; d. pH 7; e. pH 8; f. pH 9

Pengamatan pengaruh variasi pH terhadap perubahan spesies arsen oleh bakteri *E. coli*, yaitu pH 4, 5, 6, 7, 8, dan 9, juga dilakukan pada bakteri *Pseudomonas sp.* Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kecepatan terjadinya reduksi As (V) menjadi As (III) paling tinggi pada media garam mineral dengan pH 8 dan diikuti pH 7, pH 6, pH 5, pH 9, dan pH 4.

Untuk pengamatan pengaruh variasi suhu terhadap reduksi As (V) menjadi As (III) oleh *Pseudomonas sp.*, media yang digunakan adalah garam mineral dengan pH 7. Variasi

suhu inkubasi yang digunakan sama seperti pada penelitian terhadap bakteri *E. coli*, yaitu 25°C; 27,5°C; 30°C; 32,5°C; dan 35°C. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pertumbuhan optimum bakteri terjadi pada suhu 30°C, sedangkan aktivitas enzim yang dihasilkan untuk mereduksi As (V), optimal pada semua variasi suhu percobaan. Berbeda dengan enzim yang dihasilkan oleh *E. coli* yang mempunyai aktivitas terhadap reduksi As (V), optimum pada suhu 35°C.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* dan *Pseudomonas sp.* dapat



Gambar 8. Histogram perubahan spesies As (V) menjadi As (III) oleh *Pseudomonas sp.* dalam media garam mineral dengan suhu inkubasi : a. 25°C; b. 27,5°C; c. 30°C; d. 32,5°C; e. 35°C

meningkatkan toksisitas arsen di perairan karena dapat mereduksi arsenat atau As (V) menjadi arsenit atau As (III) pada kondisi pH dan temperatur pertumbuhannya.

Kesimpulan

1. Bakteri *E. coli* dan *Pseudomonas sp.* mempunyai peranan mengubah spesies arsen di lingkungan perairan.
2. Bakteri *E. coli* dan *Pseudomonas sp.*, dapat meningkatkan toksisitas arsen di perairan karena dapat mereduksi arsenat atau As (V) menjadi arsenit atau As (III) pada kondisi pH dan temperatur pertumbuhannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aurand, L.W., Woods, A.E., Wells, H.R., 1987, *Food Composition and Analysis*, Van Nostrand Reinhold Company, 283-346, New York.
- Aurillo, A.C., Mason, R.P., and Hemond, H.F., 1994, Speciation and Fate of Arsenic in Three Lakes of the Aberjona Watershed, *Environ. Sci. Technol.*, 28, 577 – 585.
- Farey, B.J., dan Nelson, L.A., 1982, *Mater and Effluents*, in Cattle J.E., ed., Atomic Absorption Spectrometry, 81, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Francesconi, K.A., 1985, Quantitative determination of Arsenocholine and Arsenobetain, the major water soluble arsenical in three species crab, using HPLC and ICPE as the arsenic specific detector, *Chemosphere*, 14, 1443-1453.
- Harrison, R.H., and Rapsomanikis, S., 1989, *Environmental Analysis Using Chromatography Interfaced With Atomic Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York.
- Hay, R.W., 1984, *Bio-Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York.
- Hood, R.D., 198. *Toxicology of Prenatal Exposure to Arsenic* in Lederer W.H., and Fensterheim R.J. ed., *Arsenic : Industrial, Biomedical, Environmental Perspectives*, 134. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Manahan. S.E., 1984, *Environmental Chemistry*, 4rd ed., Willardt Grant Press, Boston.
- Shariatpanahi M., Anderson A.C., Abdelgani, A.A., Englande. A.J., Hughes, J. and Wilkinson. 1981, Biotransformasi of the sodium arsenat. *J. Environ. Sci. Health*, 16 (1), 35-47.