

KONSORSIA BAKTERI PENGURAI SIANIDA YANG DI ISOLASI DARI BUANGAN INDUSTRI PENGOLAHAN EMAS

Nunik Sulistinah dan Bambang Sunarko

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Cibinong Science Center, Jl Raya Jakarta-Bogor Km 46
Cibinong 16911
E-mail : bsun.biol@indo.ned.id

Abstract

Bacterial consortium capable of growing and utilizing cyanide as a source of nitrogen were isolated from effluent of gold mining industry. The isolation was conducted using liquid enrichment medium with potassium cyanide and glucose as nitrogen and carbon source, respectively. These consortium could tolerate and were able to grow on KCN at concentration of up to 1000 ppm. Bacterial consortium LP3 were also able to degrade potassium cyanide and ammonium as product of the degradation. The degradation rate was 9,0 μ M per minute. The cyanide-degrading bacteria found in this consortium were identified as Bacillus, Corynebacterium, and Serratia.

Keywords: potassium cyanide, nitrogen source, bacterial consortium LP3, degradation

1. PENDAHULUAN

Senyawa sianida, organik maupun inorganik, tersebar luas di lingkungan karena banyak digunakan sebagai prekursor untuk produksi senyawa nitril, nilon, dan plastik. Selain itu, sianida juga digunakan dalam industri pelapisan logam (*electroplating*), industri pertambangan, dan juga industri karet sintetik⁴⁾. Sianida merupakan senyawa yang sangat toksik^{3,7,11)} sehingga berpotensi sebagai pencemar lingkungan. Menurut Akcil (2002), secara global diperkirakan 2,5 juta ton sianida diproduksi setiap tahun⁵⁾.

Sianidasi, yaitu proses pelarutan dan proses pemisahan emas dari larutannya dengan menggunakan senyawa NaCN atau KCN, merupakan proses yang sangat penting dalam industri pertambangan emas

(*gold mining*). Penggunaan sianida dalam industri ini dilaporkan hampir mencapai 90%, suatu prosentase yang relatif cukup tinggi. Sebagai contoh setiap tahun, Turki membutuhkan sekitar 2500 ton sodium sianida untuk mengekstraksi bijih emas dan tembaga⁵⁾. Selain itu, konsentrasi sianida yang cukup tinggi dilaporkan juga dijumpai dalam luaran (*effluent*) dan limbah padat *tailing* dari industri penambangan/pengolahan emas.

Detoksifikasi sianida dapat dilakukan antara lain melalui proses elektrolisis, ultrasonik, fotolitik, maupun proses biologis¹⁵⁾.

Detoksifikasi secara biologis dinilai lebih menguntungkan dibandingkan dengan

metode lain, karena lebih hemat energi dan biaya, detoksifikasi terjadi secara sempurna dan tidak menghasilkan produk yang toksik, sehingga lebih ramah lingkungan¹.

Beberapa mikroba, seperti *Acidovorax facilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, dan *Thiobacillus* dilaporkan mampu mengoksidasi sianida anorganik^{6,19}. Selain sebagai pendegradasi senyawa sianida, sel bakteri juga dilaporkan dapat digunakan sebagai *absorbant* untuk mengikat sianida yang terkandung dalam limbah pengolahan emas. Dalam operasi pertambangan komersial, mikroba juga dimanfaatkan sebagai sarana *bioleaching* bijih tembaga, uranium dan emas¹⁸.

Meskipun demikian, sampai saat ini penelitian yang terkait dengan detoksifikasi sianida masih sangat sedikit dilakukan di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan tumbuh berbagai isolat bakteri yang diisolasi dari *effluent* pengolahan emas. Dari penelitian ini diharapkan diperoleh beberapa isolat yang mampu mendegradasi senyawa sianida, khususnya sianida anorganik, sehingga dapat digunakan sebagai informasi untuk penelitian selanjutnya, khususnya penanganan limbah sianida.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Mikroorganisme

Mikroba yang digunakan dalam penelitian ini berupa konsorsia bakteri LP3 yang diisolasi dari limbah/luaran industri pengolahan emas PT ANTAM di Cikotok-Banten. Genus bakteri yang ditemukan dalam konsorsia tersebut adalah *Corynebacterium*, *Serratia*, and *Bacillus*.

2.2. Media kultivasi mikroba pengurai sianida

Media yang digunakan untuk menumbuhkan konsorsia bakteri LP3 adalah

media mineral^{16,17}. Sebagai sumber karbon digunakan 50 mM glukosa dan sebagai sumber nitrogen digunakan 600 ppm KCN.

2.3. Penentuan pertumbuhan konsorsia bakteri LP3.

Pola pertumbuhan konsorsia bakteri LP3 dilakukan dengan menumbuhkan konsorsia tersebut dalam 100 ml Erlenmeyer berisi 50 ml media mineral yang mengandung 600 ppm KCN. Kultur mikroba selanjutnya diinkubasi di atas mesin pengocok (*shaker*) pada suhu kamar (28 °C) selama 72 jam. Pertumbuhan ditentukan dengan menggunakan satuan kerapatan optik pada panjang gelombang 436 nm.

2.4. Pengaruh konsentrasi KCN terhadap pertumbuhan konsorsia bakteri LP3

Pengujian pengaruh konsentrasi KCN terhadap pertumbuhan isolat bakteri LP3 dilakukan dengan cara menumbuhkan konsorsia tersebut pada media mineral yang mengandung KCN dalam berbagai konsentrasi (0, 400, 600, 800, dan 1000 ppm). Pertumbuhan diamati dengan mengukur kerapatan optik kultur pada panjang gelombang 436 nm.

2.5. Penentuan konsentrasi sianida.

Penentuan konsentrasi sianida selama proses pertumbuhan bakteri dilakukan secara kolorimetri⁹. Konsentrasi sianida dalam supernatan sampel dihitung berdasarkan kurva standar.

2.6. Penentuan konsentrasi amonium

Konsentrasi amonium ditentukan secara kolorimetri dengan menggunakan metode Nessler⁹. Konsentrasi amonium dalam supernatan sampel dihitung berdasarkan kurva standar.

2.7. Penentuan pola degradasi KCN oleh konsorsia bakteri LP3

Penentuan pola degradasi KCN dilakukan dengan cara menumbuhkan konsorsia bakteri LP3 pada media mineral yang mengandung 600 ppm KCN (sebagai sumber nitrogen) dan 50 mM glukosa (sebagai sumber karbon). Dalam selang waktu 24 jam, 10 ml sampel diambil untuk penentuan konsentrasi KCN dan pH selama pertumbuhan.

2.8. Produksi biomassa sel

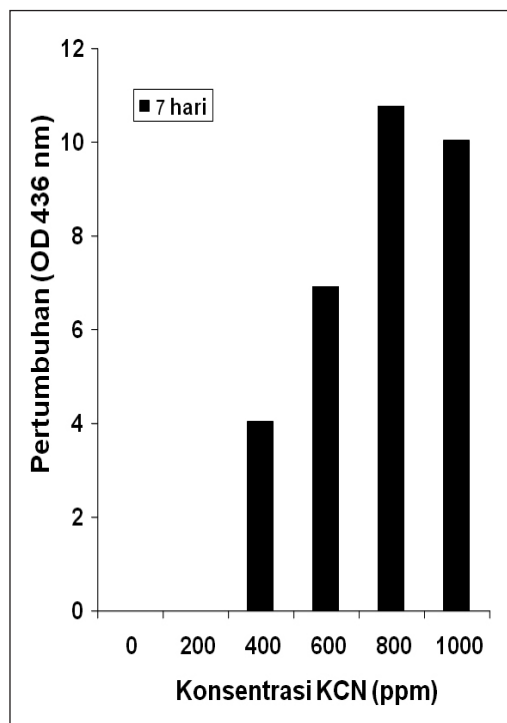
Biomassa sel diproduksi dalam Erlenmeyer (1000 ml), berisi 500 ml media pertumbuhan yang mengandung 600 ppm KCN dan diinkubasi pada suhu kamar (± 28 °C). Sel dipanen pada waktu pertumbuhan optimum (72 jam) dengan cara mensentrifuse kultur tersebut dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 15 menit pada suhu 4 °C. Pelet yang diperoleh dicuci dengan 50 mM Tris/buffer HCL (pH 8,5) sebanyak 2 kali, supernatan kemudian dibuang dan pelet dikumpulkan. Pelet yang diperoleh digunakan untuk penentuan karakteristik enzim dalam sel utuh.

2.9. Degradasi KCN dengan menggunakan konsorsia bakteri LP3

Degradasi KCN dilakukan dengan cara menambahkan 5% (b/v) sel kedalam 50 mM buffer Tris HCl (pH 8,5) yang mengandung 1000 ppm KCN. Campuran reaksi tersebut kemudian diinkubasi di atas mesin pengocok pada suhu kamar (± 28 °C). Dalam interval waktu tertentu, contoh diambil dan kemudian disentrifuse. Kadar NH_4^+ dalam supernatan ditentukan dengan metode Nessler¹²⁾, sedangkan konsentrasi sianida ditentukan dengan metode kolorimetri.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara umum dapat ditunjukkan bahwa, konsorsia bakteri LP3 mampu tumbuh dan memanfaatkan KCN sebagai sumber nitrogen, hingga mencapai konsentrasi 1000 ppm (± 15 mM) (Gambar 1). Dibandingkan *Bulkholderia cepacia* C-3, pertumbuhan LP3 relatif lebih rendah, karena *B. cepacia* C-3 mampu tumbuh pada KCN hingga konsentrasi 25 mM²⁾. Selain pada KCN, isolat bakteri ini juga mampu memanfaatkan potasium sianat, potasium tiosianat, linamarin, alifatik dan aromatik nitril sebagai substrat pertumbuhannya.



Gambar 1. Pertumbuhan Konsorsia Bakteri LP3 Pada Berbagai Konsentrasi KCN

Dari Gambar 1 tampak bahwa pertumbuhan konsorsia bakteri LP3 semakin baik dengan meningkatnya konsentrasi KCN. Pertumbuhan tertinggi dicapai pada konsentrasi 800 ppm. Namun demikian, LP3 hanya mampu tumbuh bila senyawa KCN digunakan sebagai sumber nitrogen saja.

Bila KCN digunakan sebagai satu-satunya sumber karbon, energi dan nitrogen, LP3 tak mampu tumbuh dalam senyawa tersebut (data tidak ditampilkan).

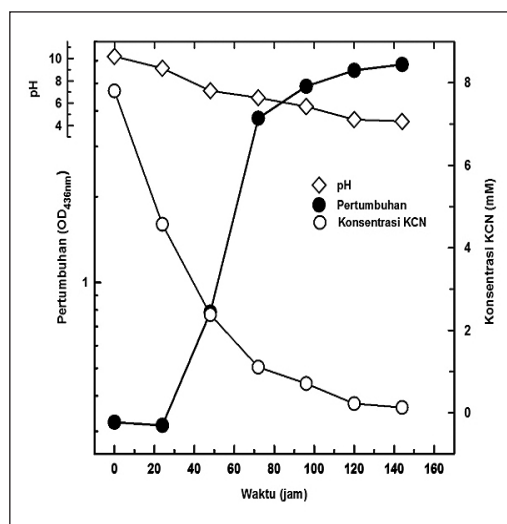
Kemampuan tumbuh konsorsia bakteri LP3 pada KCN merupakan indikasi awal, bahwa LP3 mampu mensintesis enzim sianidase, yaitu enzim yang mampu mendegradasi sianida menjadi amonia dan asam format^{14,20}. Kemampuan yang sama juga ditunjukkan oleh *Pseudomonas* sp, yang diisolasi dari limbah kilang minyak. Namun, dibandingkan dengan *Pseudomonas* ini, pertumbuhan konsorsia bakteri LP3 pada KCN relatif lebih baik. Beberapa spesies *Pseudomonas* dilaporkan juga mampu mengoksidasi sianida dan thiosianat^{6,13}. Dalam mendegradasi senyawa sianida, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* melibatkan beberapa enzim pendegradasi sianida, seperti oksigenase, sianida nitrilase, dan sianida hidratase (Kao *et al.*, 2003).

Pola pertumbuhan konsorsia bakteri LP3, perubahan pH dan konsentrasi substrat (KCN) selama pertumbuhan ditampilkan pada Gambar 2A. Dalam gambar tersebut tampak, bahwa selama pertumbuhan LP3, konsentrasi substrat (KCN) dan pH terus menurun. Walaupun dalam kontrol (Gambar 2B) terjadi pula penurunan konsentrasi substrat (KCN), namun penurunannya tidak sebesar dalam media pertumbuhan (Gambar 2A). Selain itu, nilai pH medium dalam kontrol tidak mengalami perubahan yang berarti, selama masa inkubasi. Atas dasar ini, maka penurunan pH medium dan konsentrasi substrat selama pertumbuhan konsorsia bakteri LP3 dapat dilihat sebagai indikasi terjadinya proses degradasi KCN oleh LP3 dan/atau aktivitas enzim pendegradasi senyawa tersebut.

Selama inkubasi (± 140 jam), konsentrasi substrat (KCN) turun sebesar 0,127 mM ($\pm 98\%$), sedangkan dalam kontrol, dalam waktu yang sama, konsentrasi substrat menurun sebesar 1,517 mM ($\pm 80\%$). Ini berarti, penurunan konsentrasi KCN akibat aktivitas

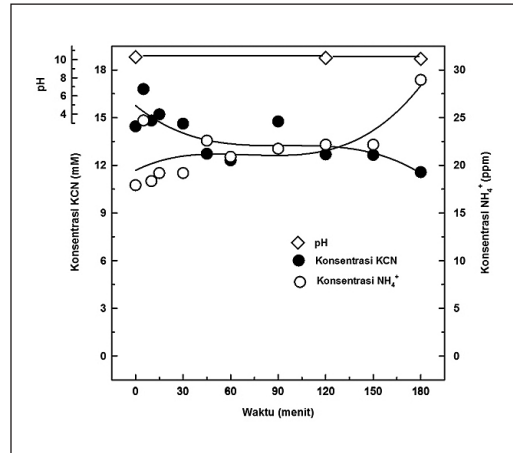
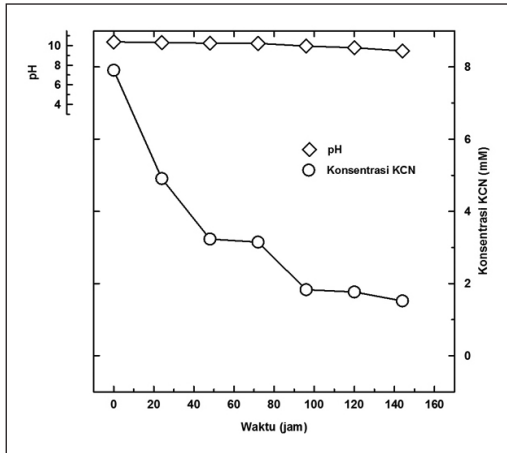
biologis adalah sebesar 1,39 mM, dengan laju degradasi sebesar 0,0096 mM/jam.

Secara umum, biodegradasi senyawa sianida dilaporkan melalui satu atau dua tahapan reaksi. Pada satu tahapan reaksi, HCN dikonversi secara langsung menjadi amonia dan asam format sebagai produk akhirnya dengan melibatkan enzim sianidase, sedangkan konversi melalui 2 tahapan reaksi melibatkan enzim sianida hidratase dengan menghasilkan senyawa amida (formamida) sebagai senyawa intermediet. Kemudian formamida dikonversi menjadi amonia dan asam format oleh formamide hidrolase (Reilly&Turner, 2003, Almagro *et al.*, 2005, Huertas *et al.*, 2006). Dilaporkan bahwa strain dari *Alcaligenes denitrificans* mengkonversi senyawa sianida secara langsung menjadi asam format dan amonia (Dumestre *et al.*, 1997).



Gambar 1. (A). Pola pertumbuhan konsorsia bakteri LP3, perubahan pH dan konsentrasi KCN selama pertumbuhan pada 600 ppm KCN; (B). Kontrol (media tumbuh tanpa LP3)

Dalam proses degradasi KCN dengan menggunakan sel utuh konsorsia bakteri LP3 (Gambar 3A) terjadi penurunan substrat (KCN), yang diikuti dengan pembentukan



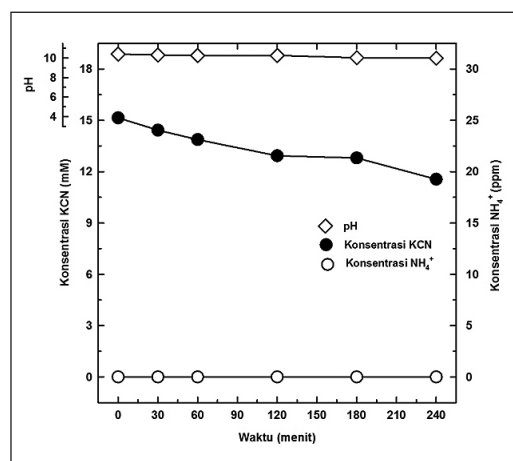
Gambar 2. (A). Pola pertumbuhan konsorsia bakteri LP3, perubahan pH dan konsentrasi KCN selama pertumbuhan pada 600 ppm KCN; (B). Kontrol (media tumbuh tanpa LP3)

produk degradasi (NH_4^+). Walaupun dalam kontrol (Gambar 3B), terjadi pula penurunan substrat (KCN), namun produk degradasi berupa NH_4^+ tidak teridentifikasi. Dari hasil ini dapat diinterpretasikan, bahwa sel LP3 mampu mendegradasi KCN. Ini berarti, LP3 mampu mensintesis enzim pendegradasi sianida.

Selama inkubasi 180 menit, degradasi KCN dengan sel LP3 hanya mampu menurunkan konsentrasi KCN sebesar 2,88 mM ($\pm 20\%$), sedangkan dalam kontrol, dalam waktu yang sama, konsentrasi substrat menurun sebesar 2,34 mM ($\pm 15\%$). Ini berarti, penurunan konsentrasi KCN akibat proses biodegradasi adalah sebesar 0,54 mM, dengan laju degradasi sebesar 0,003 mM/menit. Bila dihitung berdasarkan pembentukan produk degradasinya, laju degradasi KCN adalah sebesar 0,009 mM/menit. Konsorsia bakteri LP3 teridentifikasi sebagai genus *Bacillus*, *Corynebacterium*, dan *Serratia* (Supartono)

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat dibuktikan bahwa konsorsia bakteri LP3 mampu



Gambar 3. (A). Pola degradasi KCN dengan menggunakan sel utuh (whole cell) konsorsia bakteri LP3; (B). Kontrol (media tumbuh mengandung KCN, tanpa penambahan sel)

tumbuh dan memanfaatkan potasium sianida (KCN) sebagai sumber nitrogen, sampai dengan konsentrasi 1000 ppm. Selain itu, LP3 terbukti juga mampu mendegradasi KCN, dengan ammonium sebagai salah satu produk degradasinya. Hal ini mengindikasikan, bahwa konsorsia bakteri LP3 mampu mensintesis enzim pendegradasi sianida, meskipun aktivitas enzim tersebut kemungkinannya sangat rendah. Laju degradasi KCN dengan sel utuh sebesar 0,009 mM/menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Penelitian Biologi-LIPI melalui anggaran DIPA 2008 yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Adams, DJ., Komea, JV., Pickett, TM.** 2001. Biological cyanide degradation . in Young, C (Ed.), Cyanide: Social, Industrial and Economic Aspects. The Metal Society, Warrendale, PA., pp. 203-213
2. **Adjei, M.D. & Yoshiyuki, O.**1999. Isolation and characterization of cyanide-utilizing Burkholderia cepacia strain C-3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 15 (6) :
3. **Akcil, A., Karahan, A.G., Ciftci, H & Sagdic, O.** 2003. Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp). *Minerals Engineering* **16** : 643-649
4. **Akcil, A.** 2003. Destruction of cyanide in gold mill effluents : Biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances* **21** : 501-511
5. **Akcil, A.** 2002. First application of cyanidation process in Turkish gold mining and its environmental impacts. *Mineral Engineering* **15** : 695-699
6. **Akcil, A & Mudder, T.** 2003. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining : process review. *Biotechnology Letters* **25** : 445-450
7. **Almagro, VML., Huertas MJ., Luque, MM., Vivian, CM., Roldan, MD., Gil, LJG., Castillo, F., and Blasco, R.** 2005. Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **15**(6) : 940-947
8. **Almagro, VML., Huertas MJ., Luque, MM., Vivian, CM., Roldan, MD., Gil, LJG., Castillo, F., and Blasco, R.** 2005. Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalkaligenes* CECT5344. *Biochemical Society*, Vol. 33 (part 1) : 168-169.
9. **Arnold .** 1992. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater 18th edition
10. **Dumestre, A., Therese, C., Jean-Marie, P., Mylene, G., & Jacques, B.** 1997. Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63(7) : 2729-2734.
11. **Fargundes, EMS., LH. Rosa, NCM. Gomes, MH. Santos, PF. Pimentel.** 2004. Thiocyanate Degradation by Pure and Mixed Cultures of Microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35** : 333-336
12. **Gerhardt, P. & Drew, SW.** 1994. Liquid Culture. In : Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, WA. & Krieg, N.R. (eds). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM., Washington, DC., 248-277
13. **Huertas, M.J., VML. Almagro, M.M. Luque, R. Blascot, CM. Vivian and F. Castillo.** 2006. Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalkaligenes* CECT5344: role of siderophores. *Biochemical Society Transactions*, Vol.34 (part 1) : 152-155.
14. Ingvorsen, K., Hojer-Pedersen, B. & Godtfredsen, SE. 1991. Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes*

- xylosoxidans* subsp. *Denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1783-1789
15. **Kitis, M., Karakaya, E., Yigit, N.O., Civelekoglu, G. & Akcil, A.** 2005. Heterogenous catalytic degradation of cyanide using copper-impregnated and hydrogen peroxide. *Water Research* 39 : 1652-1662.
 16. **Meyer, O & Schlegel HG.** 1983. Biology of Aerobic Carbon Monoxide Oxidizing Bacteria. *Annual Review Microbiology* 37 : 277-310
 17. **Pfennig, N.** 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp.n., A new species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiology* 100 : 197-206
 18. **Rawling, D.E. & Silver, S.** 1995. Mining with Microbes. *Nature Biotechnology*, p :2-5
 19. **Reilly, C.O. & Turner, P.D.** 2003. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes-a comparative study. *Journal of Applied Microbiology* 95 :1161-1174
 20. **Watanabe, A., Kazuyoshi, Y., Kazunori, I. & Isao, K.** 1998. Cyanide hydrolysis in cyanide-degrading bacterium : *Pseudomonas stutzeri* AK61 by cyanidase. *Microbiology*, 144 : 1677-1682