

# Penentuan Cepat Toksisitas Logam Perak Menggunakan Bioluminesen Bakteri Laut *Aliivibrio fischeri*, Beijerinck, 1889 (Gammaproteobacteria: Vibrionaceae)

Dedi Futra<sup>1\*</sup>, Lee Yook Heng<sup>2</sup> dan Asmat Ahmad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Kimia, Universitas Riau  
Kampus Binawidya KM 12,5, Pekanbaru, Riau 28293 Indonesia

<sup>2</sup>Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia  
Bangi, Selangor, 43600 Malaysia  
Email: dedifutra@lecturer.unri.ac.id

## Abstract

### Rapid Determination of Silver Metal Toxicity Using Bioluminescent Marine Bacteria *Aliivibrio fischeri* Beijerinck, 1889 (Gammaproteobacteria: Vibrionaceae)

Rapid determination of toxicity based on changes in the bioluminescent signal of marine bacterium *Aliivibrio fischeri* (*A. fischeri*) to evaluate toxicity of Ag(I) has been successfully developed. Assessment of toxicity was designed using inhibition of bioluminescent signal from *A. fischeri* bacteria, which was exposed with toxic material of Ag(I). This metal ion was utilized as a model of toxic material to evaluate the effects of cytotoxicity on bacteria cell. Measurement of bioluminescent were taken based on differences in bacterial cell signals before and after exposure to Ag(I) ion at an emission wavelength of  $488\pm 2$  nm. The concentration of bacterial cell was used to assess the toxicity of Ag(I) at optical density (OD<sub>600 nm</sub>) of 0.78 Abs. The results found that the linear response of Ag toxicity was in the range of 0.05–10 mg/L, with EC<sub>50%</sub> of 8.42 mg/L for 4 minutes. The repeatability value within the relative standard deviation (RSD) was 2.5–4.7% (n=8). The results demonstrated that the marine bacteria of *A. fischeri* have good potential to evaluate toxicity of toxic material in environmental samples.

**Keywords:** Toxicity, Ag(I) metal, Bioluminescent, bioassay testing, *Aliivibrio fischeri*,

## Abstrak

Penentuan cepat toksisitas berdasarkan perubahan sinyal bioluminesen bakteri laut *Aliivibrio fischeri* (*A. fischeri*) untuk mengevaluasi toksisitas logam perak (Ag(I)) telah sukses dikembangkan. Penilaian toksisitas didesain berdasarkan penghambatan sinyal bioluminesen bakteri *A. fischeri* oleh bahan toksik. Ion logam Ag(I) digunakan sebagai model bahan toksik untuk menilai efek sitotoksitas pada sel bakteri. Pengukuran bioluminesen diambil berdasarkan perbedaan sinyal sel bakteri sebelum dan sesudah diekspos pada ion logam Ag(I) pada panjang gelombang emisi  $488\pm 2$  nm. Konsentrasi sel bakteri yang digunakan untuk menilai toksisitas Ag(I) pada optikal densitas 600 (OD<sub>600 nm</sub>) = 0.78 Abs. Hasil kajian ditemukan bahwa respons linear toksisitas Ag(I) pada rentang 0.05–10 mg/L, dengan nilai EC<sub>50%</sub> sebesar 8.42 mg/L pada waktu respons 4 menit dan nilai repeatibilitas toksisitas diperoleh sebesar 2.5–4.7 % RSD (relatif standar deviasi, n=8). Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri laut *A. fischeri* memiliki potensi yang baik untuk menilai toksisitas bahan toksik dalam sampel lingkungan.

**Kata Kunci:** Toksisitas, logam Ag(I), bioluminesen, pengujian bioasai, *Aliivibrio fischeri*,

## PENDAHULUAN

Kandungan perak dalam lingkungan telah mengalami peningkatan dari hari ke

hari, hal ini sesuai dengan peningkatan penggunaan perak dalam bidang industri, kedokteran dan teknologi. Logam perak sering digunakan dalam pengobatan karena

memiliki aktivitas antimikroba yang dihasilkan dari sifat kimiawi dalam bentuk ionisasi, Ag(I) (Franci *et al.*, 2015). Misalnya, senyawa perak digunakan dalam perawatan gigi dan farmasi (Bondarenko *et al.*, 2013; Franci *et al.*, 2015). Selain itu, logam perak memiliki potensi untuk dijadikan logam yang sangat murni dan digunakan dalam perangkat alat elektronik. Secara luas Ag(I) digunakan dalam industri fotografi dan pencitraan (Li *et al.*, 2014). Dengan mempertimbangkan penggunaan logam perak yang luas dalam bindan industri, ini menyebabkan pem-buangan limbah yang mengandung logam perak ke lingkungan juga meningkat. Hal ini dapat menyebabkan organisme akuatik terkontaminasi oleh logam perak. Toksisitas perak terhadap organisme akuatik tergantung pada bentuk peraknya. Logam perak dalam bentuk ion sangat beracun terhadap berbagai organisme akuatik karena sifat kimiawi logam perak terionisasi dalam lingkungan akuatik. Sedangkan bentuk logam perak selain perak ionik secara signifikan sedikit toksik terhadap organisme akuatik (Li *et al.*, 2014; Bondarenko *et al.*, 2014). Dengan berpa-tokan pada efek negatif yang ditimbulkan oleh ion logam perak terhadap organisme, maka penentuan toksisitas ion logam perak dalam sampel lingkungan sangat penting untuk dilakukan.

Beberapa teknik analitik telah digunakan untuk menentukan logam ion Ag(I) dalam sampel lingkungan seperti spektroskopi serapan atom (Ghaedi *et al.*, 2009), ekstraksi fase pada kolorimetrik (Mashhadizadeh dan Karami, 2011; Yang *et al.*, 2009), spektrometri massa plasma digabungkan secara induktif (ICP-MS) (Laborda *et al.*, 2011) dan spektrometri emisi optik digabungkan plasma secara induktif (ICP-OES) (Mashhadizadeh dan Karami, 2011). Teknik pengujian ini, biasanya digunakan untuk mengukur ion logam di laboratorium, tidak sesuai untuk evaluasi dan pemantauan secara *in situ*, dan memerlukan keahlian untuk mengoperasikannya.

Kekiniian, penentuan toksisitas logam berat Ag(I) dalam sampel lingkungan populer menggunakan pengujian secara bioasai yaitu menggunakan organisme hidup untuk menentukan ketoksikan suatu bahan toksik (Ag(I)). Kelebihan metode ini adalah dapat membedakan antara bahan kimia yang

berpotensi berbahaya dan tidak berbahaya terhadap mikro-organisme dalam waktu respon yang cepat. Bioasai toksisitas memanfaatkan Mikrotokks / Lumistokks komersial yang mengandung kultur kering-beku bakteri *Vibrio fischeri* untuk menilai toksisitas logam berat dari sampel lingkungan (Hsieh *et al.*, 2004; Cukurluoglu dan Muezzinoglu, 2013). Bioasai Mikrotoks sangat efektif menentukan toksisitas logam dalam sampel lingkungan, walau bagaimanapun metode Mikrotoks ini memiliki sensitivitas rendah, waktu respon yang lama (15 menit hingga Jam). Hsieh *et al.*, (2004) telah mengembangkan pengujian ketoksikan logam Cu, Pb, Sb, Ag, Ti, Zn, Be, Hg dan Ni dalam sampel lingkungan menggunakan pereaksi Mikrotoks-*Vibrio fischeri*. Kajian toksisitas Mikrotoks ini menunjukkan waktu respon yang lama 48 jam.

Pengujian toksistas bahan beracun lainnya telah dilaporkan menggunakan bioasai berbasis organisme hidup seperti bakteri *Escherichia coli* dimodifikasi dengan p-benzoquinone untuk menentukan ketoksikan logam Ag(I) (Yu *et al.*, 2013), remis *Perna viridis* untuk menilai ketoksikan logam Ag (I) (Vijayavel, 2010), ikan *Capoeta fusca* untuk memantau ketoksikan logam Hg(II) dan Ag(II) (Mansouri *et al.*, 2011), algae *Ulva pertusa* untuk menganalisis ketoksikan logam Ag(II), As(III), Cd(II), Co(II), Cr(VI) dan Cu(II) (Han *et al.*, 2009), copepod laut *Acartia tonsa* untuk menilai ketoksikan Ag(I) (Pedrosa *et al.*, 2007) dan *Pseudokirchneriella subcapitata* dan *Chlamydomonas rein-hardtii* untuk mengevaluasi ketoksikan Ag(I) (Hiriart-Baer *et al.*, 2006). Bioasai toksisitas ini telah berhasil menentukan ketoksikan dalam sampel lingkungan, tetapi waktu inkubasi antara organisme dan bahan toksik Ag(I) memerlukan waktu respons yang lama 6-96 jam. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan toksisitas ion logam perak menggunakan bakteri laut *Allivibrio fischeri*. Alasan pemilihan bakteri ini sebagai bahan biologi untuk mengevaluasi toksisitas logam Ag(I) kerana sel bakteri ini secara alami memiliki cahaya bioluminesen yang stabil.

## MATERI DAN METODE

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah kualitas analisis tanpa

dilakukan pemurnian dan air akuades yang dimurni [(*deionized water* (dH<sub>2</sub>O))] digunakan untuk persiapan larutan. Larutan stok Ag<sup>+</sup> 500 mg/L disiapkan dengan melarutkan garam nitrat (BDH, Radnor, USA) dalam dH<sub>2</sub>O. Larutan stok etanol 70% disediakan dengan mencairkan etanol 96 % (Merk, Jerman) dengan air murni dH<sub>2</sub>O. Larutan stok nutrient agar (NA) 28 g/L (Scharlau, Spanyol), dan nutrient broth (NB) 13 g/L (Oxoid, UK) yang masing-masing mengandung 3 % NaCl (Sigma, US) disiapkan dengan pelarut dH<sub>2</sub>O dan disterilkan dengan cara autoklap pada suhu 121 °C, tekanan 5 psi. selama 20 menit, serta larutan penyangga Hepes. Stok kultur bakteri *A. fischeri* dalam 15 % gliserol diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universiti Kebangsaan Malaysia) dan dijaga pada suhu -80 °C. Sementara itu, peralatan yang digunakan seperti, *laminar air flow cabinet* (Gelman Sciences. LTD), cawan petri, jarum inokulum, mikro pipet, sentrifugasi, tabung sentrifugasi (10 mL), Erlenmeyer (250 mL), inkubator bakteri, shaker, autoklap, Spektrofotometer dan spektrofлуорimeter, Perkin Elmer (Waltham, USA).

Penghasilan kultur bakteri sel *A. fischeri* mengikut metode yang dimodifikasi dari Futra *et al.*, (2014). Secara ringkasnya; sebanyak 20 mL stok bakteri *A. fischeri* dalam 15% gliserol ditumbuhkan dalam 20 mL NA pada suhu ruang selama 16 jam. Koloni tunggal bakteri ini diisolasi dan ditumbuhkan dalam 4 mL *nutrient broth* segar yang mengandung NaCl dalam keadaan di-shaker dengan kecepatan 250 rpm pada suhu ruang (27°C) selama 16 jam, hasil kultur ini digunakan sebagai stok pre-kultur. Sebanyak 0.5 mL stok pre-kultur selanjutnya ditumbuhkan dalam *nutrient broth* segar yang mengandung NaCl selama 6 jam pada kondisi yang sama. Sel bakteri diambil dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit dan sel bakteri disuspensi dalam 10 mL larutan penyangga Hepes 5 mM, pada pH 7.

Bakteri luat *A. fischeri* ditumbuhkan dalam *nutrient broth* yang mengandung NaCl selama 24 jam. Penentuan konsentrasi sel bakteri diukur pada OD 600 nm (Abs) dengan cara kultur bakteri diambil sebanyak dua mL setiap periode waktu 1 jam selama 24 jam pertumbuhan. Konsentrasi sel bakteri

ditentukan dengan alat spektrofotometer (Spectronic<sup>®</sup> 20 genesys<sup>™</sup>).

Efek konsenstrasi sel bakteri dianalisis dengan menggunakan beberapa seri konsentrasi sel *A. fischeri* yaitu pada OD 600 nm 0.15, 0.45 0.78, 1.10, 1.22 Abs. Sel bakteri ini disuspensi dalam larutan 10 mL penyangga Hepes 5 mM pada pH 7 dan diukur response bioluminesennya dengan alat spektrofлуорimeter.

Studi efek waktu respons dilakukan kepada sel bakteri *A. fischeri* pada umur pertumbuhan 6 jam atau OD 600 nm 0.78 Abs. Analisis toksisitas dijalankan pada sel bakteri yang telah disuspensi dalam larutan penyangga Hepes. Konsentrasi bahan toksik Ag(I) digunakan untuk melihat inhibisi sel bakteri *A. fischeri* ialah 7 mg/L dan 10 mg/L. Kontrol digunakan sebagai pembanding respons bioluminesen ialah dH<sub>2</sub>O. Respons toksisitas bioasai diukur setiap interval waktu inkubasi 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0 menit, dengan pengulangan tiga kali.

Sebanyak 1.5 mL kultur bakter *A. fischeri* dalam suspensi larutan penyanggaHepes dimasukan ke dalam quartzs (2 mL) spektrofлуорimeter. Respons toksisitas diambil pada penambahan 40 µL air murni dH<sub>2</sub>O sebagai kontrol dan volume yang sama ditambahkan ke atas suspensi sel *A. fischeri* yang mengandung bahan toksik Ag(I). Seri konsentrasi bahan toksik Ag(I) yang ditambahkan pada suspensi sel bakteri *A. fischeri* sebesar 0.01–70 mg/L. Sinyal intensitas bioluminesen bakteri *A. fischeri* diukur pada panjang gelombang eksitasi dan emisi masing-masing 285 ± 2 nm dan 488 ± 2 nm. Penilaian inhibisi sel *A. fischeri* dianalisis berdasarkan persamaan persentase relatif luminesen unit (% RLU) ditunjukkan seperti pada Persamaan 1 (Futra *et al.*, 2014). Semua eksperimen dijalankan minimal tiga kali ulangan pada suhu ruang (25 ± 2) °C. Waktu respons ketoksikan bakteri *A. fischeri* diukur pada waktu inkubasi dengan bahan toksik selama 4 menit. Dimana A adalah intensitas bioluminesen mangandung bahan toksik dan B adalah intensitas bioluminesen tanpa bahan toksik.

$$\% RLU = \frac{A}{B} \times 100 \%$$

Pengujian repeatabilitas dilakukan kepada sel bakteri *A. fischeri* dengan menggunakan delapan (8) konsentrasi sama sel bakteri pada OD 600 nm = 0.78 Abs yang telah disuspensi dalam larutan penyangga Hepes. Konsentrasi bahan toksik Ag(I) yang diujikan kepada sel bakteri untuk melihat kemampuan inhibisi bahan toksik tersebut adalah 2 mg/L dan 5 mg/L. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang (25±2 °C).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik respons bioluminesen bioasai toksisitas bakteri laut *A. fischeri* sebelum dan sesudah diekspos pada bahan toksik dan spectrum emisi dari bakteri *Escherichia coli* dan *A. fishceri* diautoklaf ditunjukkan pada Gambar 1. Dalam keadaan tanpa bahan toksik diberikan pada pada suspensi sel bakteri *A. fischeri* ditemukan intensitas luminesen sangat tinggi pada puncak 488±2 nm. Respons intensitas bioluminesen diperoleh menurun setelah diinkubasi selama 4 menit dengan ion Ag(I) 20 mg/L. Ini dikontibusi oleh adanya reaksi antara bahan toksik dengan gugus fungsi asam karboksilat (-COOH) dalam bakteri sel, dengan demikian, menghambat proses metabolisme sel (Futra *et al.*, 2014). Tidak ada sinyal luminesen ditemukan pada bakteri *Escherichia coli* dan *A. fisheri* autoklaf, untuk sel bakteri *A. fischeri* autoklaf sudah mengalami pensterilan dan penghancuran sel.

Profil pertumbuhan sel bakteri *A. fischeri* dalam medium cair yang diukur selama 24 jam dilukiskan pada Gambar 2. Pada awal inkubasi sel bakteri diperoleh pertumbuhan lambat atau fase pertumbuhan awal untuk selama 0–3 jam. Hal ini disebabkan sel bakteri mengalami adaptasi dengan lingkungannya yang baru dan sel bakteri mulai menggandakan selnya (Prescott *et al.*, 2002). Selanjutnya pertumbuhan bakteri dilanjutkan pada waktu 3–9 jam diperoleh fase pertumbuhan cepat atau fase pertumbuhan eksponen. Pertumbuhan cepat ini disumbangkan oleh aktivitas metabolisme sel untuk menghasilkan protein, DNA dan RNA berjalan dengan cepat dan progresif, sehingga kemampuan mikroba untuk

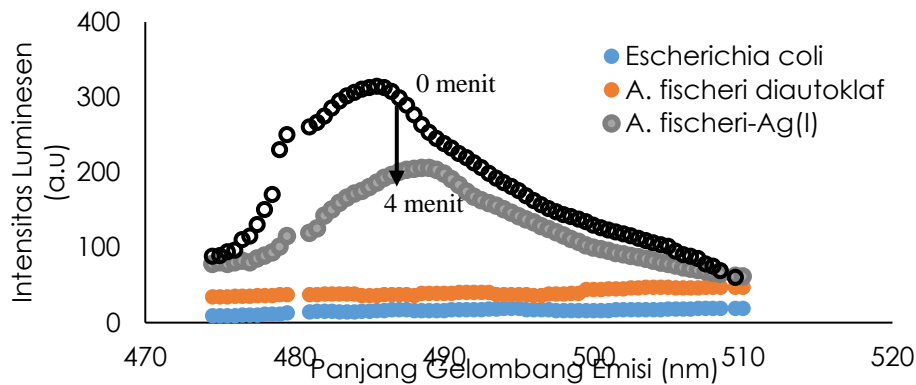
menggandakan selnya berjalan dengan cepat karena didukung oleh ketersediaan sumber nutrisi untuk pertumbuhan sel yang mencukupi (McCall *et al.*, 2001). Sementara itu, pertumbuhan bakteri terjadi secara statik atau fase pertumbuhan stationari untuk waktu pertumbuhan 9 – 24 jam. Ini dikontibusi oleh jumlah sel yang hidup sama dengan jumlah sel yang mati, karena terjadinya persaingan sel mikroba untuk mendapatkan sumber nutrisi yang tidak mencukupi untuk pertumbuhan sel (Prescott *et al.*, 2001). Untuk penelitian selanjutnya digunakan fase pertumbuhan eksponen untuk menilai toksisitas bahan toksik. Perubahan respons intensitas bioluminesen terhadap berbagai konsentrasi sel bakteri *A. fischeri* diilustrasikan pada Gambar 3. Sinyal intensitas bioluminesen diperoleh meningkat dengan penambahan sel mikroba pada konsentrasi 0.15–0.78 abs, ini dikaitkan dengan jumlah sel yang meningkat sehingga menghasilkan sinyal bioluminesen yang tinggi. Di samping itu, ketersediaan dan penyebaran oksigen dalam medium cair untuk pernapasan sel juga mencukupi, sehingga proses metabolisme sel tidak terganggu. Jika konsentrasi sel bakteri ditingkatkan dari 0.78 abs menjadi 1.22 abs diperoleh respons intensitas bioluminesen menurun. Hal ini dihubungkan dengan jumlah sel yang padat yang menyebabkan ketersediaan dan penyebaran oksigen untuk pernapasan sel tidak mencukupi sehingga aktivitas reaksi oksidasi dalam sel terganggu (Gil *et al.*, 2000). Di samping itu, konsentrasi sel yang tinggi menyumbang kepada terjadinya sinyal bioluminesen mengalami *quenching*, dimana sinyal bioluminesen suatu sel bakteri serap oleh sel bakteri lainnya yang tidak memiliki cahaya pancaran bioluminesen, sehingga cahaya bioluminesen yang dihasilkan tidak optimum (Kim dan Gu, 2003). Untuk kajian berikutnya konsentrasi sel *A. fischeri* yang digunakan pada konsentrasi 0.78 abs.

Sitotoksitas bakteri *A. fischeri* yang diekspos dengan bahan toksik Ag(I) pada waktu inkubasi selama 0.5–15.0 menit ditunjukkan pada Gambar 4. Tanpa ion logam Ag(I) yang ditambahkan pada sel bakteri *A. fischeri* diperoleh respons relatif luminesen stabil tinggi. Apabila sel bakteri dieksposkan dengan bahan toksik dan diinkubasi selama 0.5–4.0 menit ditemukan sinyal relatif

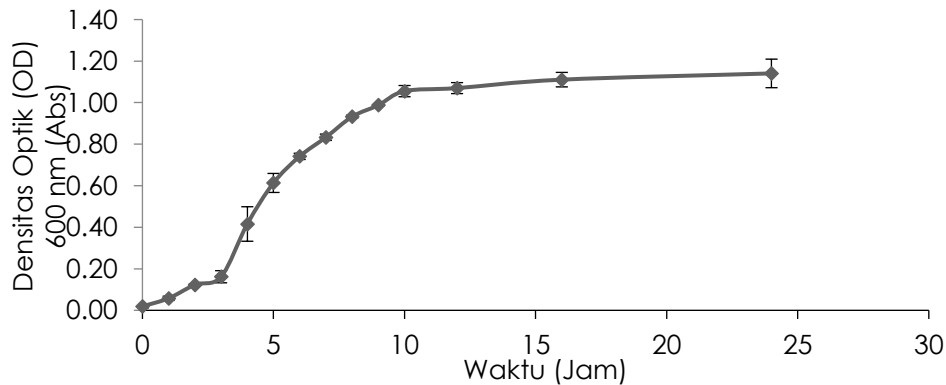
luminesen menurun secara agresif. Hal ini disumbangkan oleh sudah terjadinya reaksi antara bahan toksik dengan gugus fungsi karboksilat pada sel bakteri. Jika waktu inkubasi dilanjutkan selama 4.0–15.0 menit diperoleh sinyal toksisitas stabil rendah dan tidak terdapat penurunan secara signifikan. Ini dikontribusikan oleh reaksi kompleks gugus fungsi karboksilat sudah sepenuhnya bereaksi dengan bahan toksik Ag(I), sehingga pada penambahan waktu inkubasi tidak berpengaruh lagi terhadap respons sitotoksitas. Untuk kajian selanjutnya digunakan waktu respons 4 menit untuk menilai toksisitas sel *A. fischeri* (Gambar 4).

Profil persentase toksisitas (A) dan linear range (B) sel bakteri *A. fischeri* terhadap berbagai konsentrasi bahan toksik dilukiskan pada Gambar 5. Apabila tanpa bahan toksik ditambahkan pada sel *A. fischeri* didapati

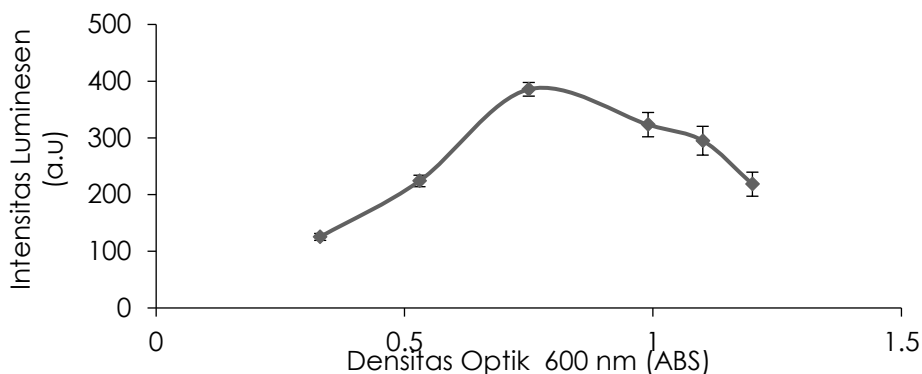
sinyal persentase toksisitas relatif stabil tinggi. Respons ini dijadikan kontrol atau standar untuk dibandingkan dengan respons yang mengandung bahan toksik. Sinyal persentase bioluminesen yang tinggi tanpa bahan toksik disebabkan oleh belum terjadi reaksi antara bahan toksik Ag(I) dengan sisi aktif gugus fungsi karboksilat (RCOOH) sel bakteri, dimana karboksilat rantai panjang memiliki kepekaan yang tinggi terhadap bahan toksik (Girotti et al., 2008). Sinyal relatif bioluminesen diperoleh menurun secara drastis dengan keberadaan bahan toksik Ag(I) pada konsentrasi 0.05–10.00 mg/L. Hal ini disumbangkan telah terjadi reaksi antara bahan toksik Ag(I) dengan bagian aktif gugus fungsi karboksilat. Kompleks yang terbentuk antara gugus fungsi karboksilik dengan kation bahan toksik Ag(I) akan mengganggu aktivitas metabolisme sel untuk menghasilkan energi bioluminesen, sehingga cahaya pancaran bioluminesen yang



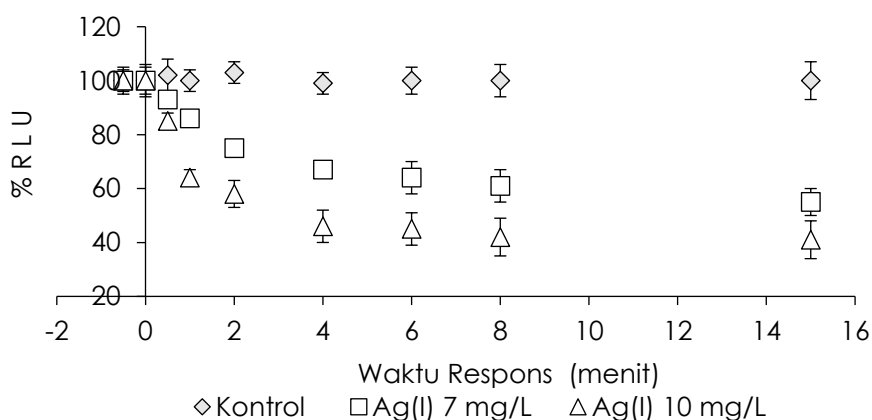
**Gambar 1.** Respons luminesen toksisitas sel mikroorganise sebelum dan sesudah diberikan bahan toksik Ag(I) 10 mg/L dan dibandingkan dengan sinyal bioluminesen bakteri *Escherichia coli* dan *A. fischeri* diautoklaf



**Gambar 2.** Profil pertumbuhan bakteri *A. fischeri* dalam medium cair nutrient broth yang mengandung NaCl yang diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.



**Gambar 3.** Respons intensitas bioluminesen bakteri *A. fischeri* yang diukur pada seri konsentrasi pada OD 600 nm 0.15–1.22 abs.



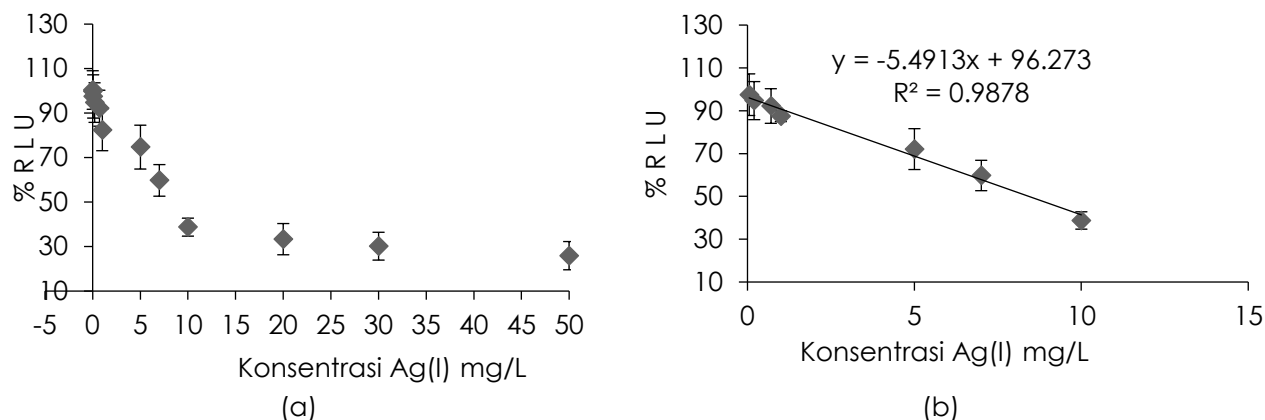
**Gambar 4.** Respons sitotoksitas sel bakteri *A. fischeri* yang dinilai terhadap bahan toksik Ag(I) pada konsentrasi 10 mg/L dan 30 mg/L dengan waktu inkubasi pada 0.5–15 menit.

dihasilkan tidak sesuai dengan yang diharapkan (Girotti *et al.*, 2008). Berdasarkan penurunan sinyal relatif bioluminesen sel *A. fischeri* terhadap toksisitas Ag(I), maka diperoleh nilai *linear range* toksisitas ion Ag(I) sebesar 0.05–10.00 mg/L, batas pendeteksian (LOD) sebesar 0.031 mg/L dan persentase nilai efektif konsentrasi ( $EC_{50\%}$ ) 8.42 mg/L (Tabel 1).

Berdasarkan data pada Tabel 2, prestasi toksisitas bioasai bakteri laut *A. fischeri* yang dibandingkan dengan beberapa pengujian secara bioasai menggunakan berbagai organisme. Toksisitas bioasai menggunakan bakteri *A. fischeri* menunjukkan prestasi yang lebih baik dalam waktu respons jika dibandingkan dengan bioasai menggunakan bakteri (Yu *et al.*, 2013), ikan (Mansouri *et al.*, 2011), ganggan hijau (Han *et al.*, 2009) dan kerang hijau (Vijayavel 2010). Nilai  $EC_{50\%}$  yang hampir sama yang diperoleh dalam

penelitian ini dengan hasil yang dilaporkan menggunakan *E. coli* yang dimodifikasi dengan benzoquinone (Yu *et al.*, 2013). Walaubagimanapun, hasil penelitian ini memiliki nilai  $EC_{50\%}$  lebih tinggi dibandingkan dengan ikan (Mansouri *et al.*, 2011) ganggan hijau (Han *et al.*, 2009) dan kerang hijau (Vijayavel 2010).

Respons toksisitas bioasai dari bakteri *A. fischeri* untuk memonitor bahan toksik dapat diproduksi berdasarkan nilai relative standar deviasi (RSD,  $n=8$ ) yaitu dalam range 3.2–4.2 %. Nilai RSD yang baik ini dikontribusikan bahwa bakteri *A. fischeri* yang memiliki cahaya pancaran luminesen yang stabil, yang dihasilkan secara alami dalam sel bakteri (Girotti *et al.*, 2008). Nilai repeatabilitas yang rendah menunjukkan bioasai memiliki reproduksibilitas yang tinggi untuk digunakan dalam pengujian toksisitas bahan toksik.



**Gambar 5.** Profil respons toksisitas (A) dan linear range (B) yang diperoleh dari berbagai konsentrasi bahan toksik yang ditambahkan pada sel *A. fischeri*.

**Tabel 1.** Perbandingan prestasi toksisitas bioasai bakteri *A. fischeri* dalam menentukan ketoksikan ion logam Ag(I) dengan beberapa penelitian lain.

Bahan biologi	Linear range (mg/L)	LOD (mg/L)	EC <sub>50%</sub> (mg/L)	Waktu respon (menit)	Referensi
<i>A. fischeri</i>	0.05 – 10.00	0.031	8.42	4	Penelitian ini
<i>Escherichia coli</i> - p-benzoquinone	-	-	8.14	60	Yu et al., 2013
<i>Capoeta fusca</i>	-	-	0.014	1440	Mansouri et al., 2011
<i>Ulva pertusa</i>	-	-	0.045	5760	Han et al., 2009
<i>Perna viridis</i>	-	-	3.88	5760	Vijayavel, 2010

**KESIMPULAN**

Toksistas bioasai berdasarkan bakteri laut *A. fischeri* telah sukses dikembangkan untuk mendeteksi ketoksikan bahan toksik Ag(I). Prestasi analitik menunjukkan nilai *linear range* yang luas, batas pendeteksian yang kecil, nilai EC<sub>50%</sub> yang rendah, dan waktu respons yang cepat dalam satuan menit. Di samping itu, toksistas berdasarkan bakteri *A. fischeri* dapat digunakan untuk menilai ketoksikan dengan nilai reproduksi RSD < 5 % n=8. Untuk itu, toksistas biasai yang dikembangkan menggunakan bakteri laut *A. fischeri* memiliki pontensi yang baik untuk mengevaluasi toksistas logam berat dalam sampel lingkungan.

**DAFTAR PUSTAKA**

Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, & M., Kahru, A. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally

relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch. Toxicol*, 87:1181–1200. doi: 10.1007/s00204-013-1079-4

Cukurluoglu, S., & Muezzinoglu, A. 2013. Assessment of toxicity in waters due to heavy metals derived from atmospheric de-position using *Vibrio fischeri*. *J. Environ. Sci.Health A*. 48:57–66. doi: 10.1080/10934529.2012.707840

Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. 2015. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules*, 20: 8856-8874. doi: 10.3390/molecules20058856

Futra, D., Heng, L.Y., Surif, S., Ahmad, A., & Ling. T.L. 2014. Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in Alginate Microspheres for Monitoring Heavy Metal Toxicity in Environmental Waters. *Sensors*, 14:23248-23268. doi: 10.3390/s141223248

Ghaedi, M., Shokrollahi, A., Niknam, K., Niknam, E., Najibi, A., & Soylak, M. 2009. Cloud point extraction and flame atomic

- absorption spectrometric determination of cadmium (II), lead (II), palladium (II) and silver (I) in environmental samples. *J. Hazardous Mater.*, 168: 1022–1027. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.02.130
- Gil, G.C., Mitchell, R.J., Chang, S.T., & Gu, M.B. 2000. A biosensor for the detection of gas toxicity using a recombinant bioluminescent bacterium. *Biosens. Bioelectron.*, 15: 23-30. doi: 10.1016/S0956-5663(99)00074-3
- Girotti, S., Ferri, E.N., Fumo, M.G. & Maiolini, E. 2008. Review Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Acta*, 608:2-29. doi: 10.1016/j.aca.2007.12.008
- Han, Y-S., Kumar, A.S., & Han, T. 2009. Comparison of Metal Toxicity Bioassays Based on Inhibition of Sporulation and Spore Release in *Ulva pertusa*. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.*, 1(1):24-31. doi: 10.1007/BF03216460
- Hiriart-Baer, V.P., Fortin, C., Lee, D-Y., & Campbell, P.G.C. 2006. Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquat. Toxicol.*, 78:136–148. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.02.027
- Hsieh, C.Y., Tsai, M-H., Ryan, D.K., & Pancorbo, O.C. 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox chronic toxicity test. *Sci. Total Environ.*, 320:37-50. doi: 10.1016/S0048-9697(03)00451-0
- Kim, B.C., & Gu, M.B. 2003. A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. *Biosens. Bioelectron.*, 18:1015–1021. doi: 10.1016/S0956-5663(02)00220-8
- Laborda, F., Jimenez-Lamana, J., Bolea, E., & Castillo, J.R. 2011. Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26: 1362–1371. doi: 10.1039/C0JA00098A
- Li, L., Wu, H., Peijnenburg, W.J.G.M., & van Gestel, C.A.M. 2014. Both released silver ions and particulate Ag contribute to the toxicity of AgNPs to earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicol.*, 9(6): 792-801. doi: 10.3109/17435390.2014.976851
- Mansouri, B., Baramaki, R., & Ebrahimipo, M. 2011. Acute toxicity bioassay of mercury and silver on *Capoeta ~~sebae~~ fusca* (black fish). *Toxicol. Ind. Health*, 28(5): 393–398. doi: 10.1177/0748233711413796
- Mashhadizadeh, M.H., & Karami. Z. 2011. Solid phase extraction of trace amounts of Ag, Cd, Cu, and Zn in environmental samples using magnetic nanoparticles coated by 3-(trimethoxysilyl)-1-propanol and modified with 2-amino-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole and their determination by ICP-OES. *J. Hazard.Mater.*, 190:1023–1029. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.04.051
- McCall, D., Stock, D. & Achay, P. 2001. *Introduction to microbiology*. Massachusetts, USA. The Black Science Inc.
- Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.*, 32: 265–268. doi: 10.1016/j.envint.2005.08.022
- Pedroso, M.S., Pinho, G.L.L., Rodrigues, S.C., & Bianchini A. 2007. Mechanism of acute silver toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*. *Aquat. Toxicol.*, 82:173–180. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.02.009
- Prescott, L.M., Harley, J., & Klein, J. 2002 *Microbiology*, fifth Edition. New York. McGraw-Hill Companies
- Vijayavel, K. 2010. Water chemistry influences the toxicity of silver to the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Environ. Monitor. Assessment*, 167:289–295.
- Yang, G., Fen, W., Lei, C., Xiao, W., & Sun, H. 2009. Study on solid phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of nickel, silver, cobalt, copper, cadmium and lead with MCI GEL CHP 20Y as sorbent. *J. Hazard. Mater.*, 162; 44–49. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.05.007
- Yu, D., Zhai, J., Yong, D., & Dong, S. 2013. A rapid and sensitive p-benzoquinone-mediated bioassay for determination of heavy metal toxicity in water. *Analyst*, 138: 3297–3302. doi: 10.1039/C3AN36907B