

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI RESISTEN LOGAM BERAT DARI EKOSISTEM LIMBAH BATUBARA UNTUK APLIKASI BIOREMEDIASI

Molecular Identification of Heavy Metal–Resistant Bacteria Isolated from Coal Waste Ecosystems for Bioremediation Applications

Nunung Eni Elawati¹⁾, Ika Afifah Nugraheni²⁾

¹⁾Universitas Ivet, Semarang, Jl. Pawiyatan Luhur IV No.17, Bendan Duwur, Kec. Gajahmungkur, Kota Semarang, Jawa Tengah, 50233, Indonesia

²⁾Universitas Aisyiyah Yogyakarta, Jalan Ring Road Barat No. 63 Nogotirto, Gamping, Sleman, Yogyakarta, 55292, Indonesia
Email : nunungenie@gmail.com

Diterima: 12 Agustus 2025, Revisi : 26 Januari 2026, Diterbitkan: Januari 2026
<https://doi.org/10.22487/agrolandnasional.v32i3.2673>

ABSTRACT

The presence of heavy metals in the environment constitutes a critical pollution issue that can cause ecological disruption. Bioremediation is a promising technique for mitigating heavy metal contamination. Biosorption and bioaccumulation mechanisms are known to reduce metal concentrations without adversely affecting bacterial viability. This study aimed to isolate and molecularly identify indigenous bacteria from coal waste with potential capabilities for heavy metal reduction or bioaccumulation. The research methods included the isolation and screening of heavy metal–resistant bacteria, morphological identification, DNA sequence analysis, and evaluation of heavy metal reduction capacity for zinc (Zn), lead (Pb), and cadmium (Cd). The results revealed two selected bacterial isolates at a concentration of 25 ppm. Isolate IF6 demonstrated effective Pb reduction with an efficiency of 90.00%, while isolate IF9 showed high reduction efficiency for Pb (93.29%) and Cd (80.82%). Analysis of 16S rRNA gene sequences indicated that isolate IF6 exhibited 100% similarity to *Kocuria flava*, whereas isolate IF9 showed close similarity to *Fictibacillus nanhaiensis*. These findings highlight the significant potential of indigenous bacteria isolated from coal waste as effective bioremediation agents for heavy metal contamination. The application of such bacteria may contribute to sustainable waste management strategies and environmental protection efforts, particularly in ecosystems impacted by industrial and mining activities.

Keywords : 16S rRNA amplification, Bioaccumulator, *Kocuria flava*, and *Fictibacillus nanhaiensis*.

ABSTRAK

Keberadaan logam berat di lingkungan merupakan masalah pencemaran yang sangat penting yang dapat menimbulkan masalah dan ketidakstabilan dalam ekologi. Bioremediasi merupakan teknik yang dapat digunakan untuk mendegradasi logam limbah. Mekanisme biosorpsi dan bioakumulasi tidak akan mempengaruhi viabilitas bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh dan mengidentifikasi, secara molekuler, bakteri indigenous dari limbah yang berpotensi mereduksi logam berat atau bioakumulasi. Metode yang dilakukan meliputi isolasi dan skrining bakteri resisten logam berat, identifikasi morfologi, dan analisis sekuens DNA, serta uji reduksi logam berat (Zn, Pb, dan Cd). Hasil penelitian menunjukkan dua isolat bakteri terpilih pada konsentrasi 25 ppm yaitu IF6 yang efektif mereduksi logam Pb (90,00%), dan IF9 yang efektif mereduksi logam Pb (93,29%) dan Cd (80,82%). Analisis sekuens 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat IF6 memiliki kesamaan 100% dengan *Kocuria flava*, sedangkan IF9 memiliki kemiripan dengan *Fictibacillus nanhaiensis*. Temuan ini menunjukkan potensi bakteri indigenous dari limbah batubara sebagai agen bioremediasi logam berat yang dapat dimanfaatkan untuk pengelolaan limbah dan perlindungan lingkungan.

Kata Kunci : Amplifikasi 16S rRNA, Bioakumulator, *Kocuria flava*, *Fictibacillus nanhaiensis*.

PENDAHULUAN

Pencemaran logam berat merupakan salah satu masalah lingkungan yang paling menantang secara global, khususnya di wilayah dengan aktivitas industri yang intensif (Das et al., 2023). Akumulasi logam beracun seperti seng (Zn), timbal (Pb), dan kadmium (Cd) dalam ekosistem menimbulkan ancaman yang signifikan tidak hanya terhadap kesehatan lingkungan tetapi juga terhadap kesejahteraan manusia (Mitra et al., 2022). Logam-logam ini, yang dicirikan oleh persistensi dan non-biodegradabilitasnya, dapat memasuki rantai makanan dan terakumulasi dalam jaringan biologis, yang menyebabkan berbagai efek kesehatan yang merugikan, termasuk kerusakan neurologis, gagal ginjal, dan kanker (Briffa et al., 2020). Di antara berbagai sumber pencemaran logam berat, pembangkit listrik tenaga batu bara merupakan kontributor yang signifikan, terutama karena produksi abu batu bara, produk sampingan dari pembakaran batu bara.

Limbah batu bara, yang terdiri dari abu terbang dan abu dasar, biasanya disimpan di tempat penampungan permukaan atau tempat pembuangan akhir yang besar. Metode

penyimpanan ini menimbulkan risiko yang signifikan terhadap pelindian logam berat ke dalam air tanah dan air permukaan (Chen et al., 2024). Menyadari bahaya lingkungan dan kesehatan yang ditimbulkan oleh pembuangan abu batu bara yang tidak tepat, para peneliti dan pembuat kebijakan telah mencari metode yang lebih berkelanjutan dan efektif untuk mengelola dan mengurangi risiko terkait (Briffa et al., 2020). Pendekatan tradisional untuk mengelola kontaminasi logam berat meliputi metode penanganan fisik dan kimia seperti pertukaran ion, presipitasi, dan adsorpsi. Namun, metode ini sering kali memerlukan biaya tinggi, kebutuhan energi yang besar, dan potensi masalah polusi sekunder, sehingga membuatnya kurang diinginkan dari perspektif keberlanjutan (B. Zhou et al., 2023).

Sebagai respons terhadap keterbatasan teknik remediasi konvensional, bioremediasi muncul sebagai alternatif yang menjanjikan. Pendekatan biologis ini memanfaatkan proses alami mikroorganisme untuk menyerap atau mengubah polutan menjadi bentuk yang kurang berbahaya (Raklami et al., 2022). Secara khusus, bidang bioremediasi telah menunjukkan bahwa bakteri tertentu memiliki

mekanisme alami, seperti biosorpsi dan bioakumulasi, yang memungkinkan mereka mengikat logam berat, sehingga mengurangi mobilitas dan ketersediaan hayati mereka di lingkungan. Keuntungan bioremediasi meliputi biaya yang lebih rendah, gangguan lingkungan yang minimal, dan potensi untuk aplikasi in-situ, menjadikannya solusi ramah lingkungan untuk polusi (Padmavathi & Jayalakshmi, 2024).

Penerapan bioremediasi dalam mengelola kontaminasi logam berat, khususnya dalam konteks abu batu bara, bukannya tanpa tantangan. Sebagian besar penelitian yang ada telah dibatasi pada pengaturan laboratorium yang terkontrol, dan skalabilitas teknik biologis ini terhadap kondisi lapangan masih belum dieksplorasi (Padmavathi & Jayalakshmi, 2024). Selain itu, dampak ekologis dari pengenalan mikroorganisme asing atau yang dimodifikasi secara genetika ke dalam lingkungan baru belum sepenuhnya dipahami, sehingga menimbulkan kekhawatiran tentang potensi konsekuensi yang tidak diinginkan (Haghizadeh et al., 2024).

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi kelayakan penggunaan bakteri asli yang diisolasi dari limbah batu bara untuk bioremediasi logam berat. Dengan berfokus pada mikroorganisme yang secara alami menghuni lingkungan limbah batu bara, kami mengurangi risiko yang terkait dengan pengenalan spesies non-asli dan memanfaatkan organisme yang telah beradaptasi dengan kondisi keras di lokasi yang mengandung logam berat. Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengisolasi bakteri yang mampu tumbuh subur dalam konsentrasi tinggi Zn, Pb, dan Cd, mengidentifikasi jalur genetik dan biokimia mereka yang terkait dengan resistensi dan akumulasi logam, dan mengevaluasi potensi mereka untuk mengurangi konsentrasi logam di lokasi yang terkontaminasi.

Penelitian ini tidak hanya akan berkontribusi pada pemahaman kita tentang kemampuan bakteri asli limbah batu bara dalam bioremediasi tetapi juga mengeksplorasi aspek praktis penerapan organisme ini dalam skala yang lebih besar

METODE PENELITIAN

Sampel limbah batubara diperoleh dari PLTU Tanjung Jati B Jepara, Jawa Tengah. Preparasi sampel dan pengujian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah.

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri dari sampel limbah batubara menggunakan metode dilusi, bertingkat, dan spread plate, secara aseptis. Satu gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril, kemudian di vortex (pengenceran 10^{-1}), selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat hingga dengan 10^6 . Dari pengenceran 10^3 - 10^6 diambil masing-masing 100 μ l, dan diteteskan ke dalam media padat Nutrient Agar (NA) dengan metode spread plate, kemudian inokulum diratakan dan diinkubasi pada suhu 37 °C. Setelah ± 24 jam, diamati koloni yang tumbuh.

Pemurnian Bakteri

Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil satu koloni isolat bakteri diambil secara aseptik dengan ose dan diinokulasikan ke permukaan media padat NA dengan metode streak plate dan diinkubasi pada suhu 37 °C ± 24 jam. Satu koloni yang tumbuh diambil lagi dan kemudian dipindahkan ke media NA baru dengan metode streak plate. Pemindahan isolat dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh kultur murni.

Identifikasi Morfologi

Identifikasi morfologi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi morfologi makroskopis dilakukan secara langsung, sedangkan identifikasi morfologi mikroskopis menggunakan mikroskop. Sebelum dilakukan proses identifikasi morfologi, 10 isolat yang diperoleh dari pemurnian sebelumnya kemudian dipindahkan ke dalam media cair Nutrient Broth (NB) untuk dilakukan pengolahan lebih lanjut. Pengamatan makroskopis dilakukan secara langsung menggunakan metode Benson.

Parameter yang diamati untuk identifikasi morfologi yaitu: bentuk koloni bakteri, bentuk

tepi, warna, elevasi, dan sifat koloni jika diamati di bawah cahaya (mengkilap atau suram). Ciri-ciri mikroskopis diketahui dengan metode identifikasi bentuk bakteri yang ditemukan serta dengan pewarnaan gram. Hasil pengamatan pewarnaan dilakukan pada perbesaran 1000x menggunakan mikroskop dengan perendaman terlebih dahulu agar lebih jelas.

Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA mengikuti protokol ekstraksi ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit. Untuk konsentrasi dan pemurnian gDNA, absorbansi spektrofotometri pada A260/A280 nm diamati menggunakan spektrofotometer Nanodrop™ 1000 dan fluorometer Qubit pada A230/A260 nm.

Amplifikasi Gen 16s rRNA

Metode PCR yang digunakan adalah gen 16S rRNA sebagai target menggunakan primer 16S rRNA spesifik, yaitu primer 27F dan 1492R untuk mengidentifikasi bakteri yang belum diketahui sebagaimana dijelaskan. Amplifikasi PCR dilakukan dengan tahap pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 40 detik, annealing pada suhu 55°C selama 40 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap ekstensi terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit dengan total 30 siklus. Hasil amplifikasi kemudian dibandingkan dengan kontrol negatif. Produk PCR dianalisis menggunakan gel agarosa 1% yang ditambahkan dengan Gelred. Sebanyak 4 μ l produk PCR dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit dengan tegangan 100 volt. Observasi migrasi DNA dilakukan dengan menggunakan lampu UV transilluminator.

Analisis Sekuens DNA

Urutan yang diperoleh dianalisis dengan urutan nukleotida yang selaras dengan urutan yang diduga ada di Genbank menggunakan program MEGA 6.0, kemudian kesamaan urutan area yang ditunjukkan dianalisis kembali menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui

persentase kesamaan basa pasangan dengan referensi isolat yang ditemukan di Genbank.

Persiapan Larutan Logam

Larutan logam berat Pb, Zn, dan Cd dibuat dalam bentuk larutan stok pekat. Masing-masing larutan stok dibuat dengan melarutkan $PbCl_2$, $ZnCl_2$ dan $CdCl_2$ dalam akuades hingga diperoleh konsentrasi 1.000 ppm. Seluruh larutan stok logam disterilkan menggunakan filtrasi membran 0,22 μ m.

Larutan kerja logam Pb, Zn, dan Cd dengan konsentrasi 10, 15, 20, dan 25 ppm dibuat dari larutan stok pekat menggunakan rumus pengenceran ($M_1 V_1 = M_2 V_2$) dan digunakan pada tahap skrining serta uji reduksi logam berat.

Skrining Bakteri Resisten Logam Berat

Skrining bakteri resisten logam berat dilakukan menggunakan metode *streak plate* pada media NA yang diperkaya logam Pb, Zn, dan Cd dengan konsentrasi 10, 15, 20, dan 25 ppm. Isolat bakteri digoreskan pada permukaan media dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat yang mampu tumbuh pada media yang mengandung logam berat dibandingkan dengan media kontrol negatif dinyatakan sebagai isolat resisten.

Isolat yang tumbuh kemudian diinokulasi ke dalam media cair Nutrient Broth (NB) yang mengandung logam berat sesuai perlakuan dan diinkubasi selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri diukur berdasarkan nilai Optical Density (OD) pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer. Semakin tinggi nilai OD yang terukur pada berbagai konsentrasi, semakin tinggi pula kepadatan bakteri, yang menunjukkan jumlah bakteri yang semakin banyak serta kemampuan bakteri untuk bertahan pada konsentrasi logam berat tertentu. Setelah itu, setiap isolat pada setiap perlakuan kembali diukur nilai OD pada panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui tingkat kepadatan bakteri. Setelah ditentukan isolat yang tahan hidup terhadap logam berat berdasarkan tingkat kepadatannya, kemudian

dilanjutkan ke tahap uji penurunan kadar masing-masing logam berat.

Analisis Reduksi Logam Berat

Isolat yang telah dipilih dan tahan terhadap logam berat kemudian diuji lebih lanjut untuk analisis logam berat, agar dapat melihat kemampuannya dalam mereduksi logam berat menggunakan alat AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). Konsentrasi 25 ppm dipilih sebagai konsentrasi larutan kerja untuk tahap uji reduksi.

Uji reduksi logam berat dilakukan terhadap dua isolat terpilih yang menunjukkan kemampuan pertumbuhan terbaik pada tahap skrining. Pengujian dilakukan dalam media cair Nutrient Broth (NB) dengan komposisi 100 mL NB, 10 mL suspensi bakteri, dan 40 mL larutan logam Pb, Zn, atau Cd dengan konsentrasi stok 25 ppm, sehingga volume total uji menjadi 150 mL.

Seluruh perlakuan diinkubasi menggunakan inkubator shaker pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Setelah itu, sampel di-centrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan cairan supernatant.

Analisis kadar logam berat Pb, Zn, dan Cd dilakukan menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS)* oleh laboratorium Chem-Mix Pratama, Yogyakarta. Preparasi sampel dan pengukuran dilakukan sesuai prosedur operasional standar laboratorium yang mengacu pada metode baku analisis logam berat. Penurunan konsentrasi logam berat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Penurunan logam (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100$$

Keterangan:

C_0 = konsentrasi awal logam (ppm)

C_t = konsentrasi akhir logam (ppm)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Asal Limbah Batubara

Tahap awal isolasi dilakukan dengan mengencerkan sampel limbah batubara dalam akuades steril secara bertingkat mulai

dari pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-6} . Pengenceran 10^{-3} - 10^{-6} selanjutnya ditanam pada media Nutrient Agar dan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, selanjutnya diamati koloni bakteri yang tumbuh pada media tersebut.

Identifikasi Morfologi

Hasil isolasi sampel bakteri, limbah batubara, dengan inkubasi selama 24 jam menunjukkan adanya koloni bakteri yang tumbuh pada media NA. Hasil pengamatan: koloni bakteri meliputi warna, bentuk, tepi, dan elevasi koloni. Ditemukan 10 koloni bakteri yang berbeda dengan morfologi yang khas, seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Isolat Limbah Batubara

Isolat	Karakteristik Morfologi	Gram
IF1	Putih susu, cembung, bergelombang, tidak teratur, dan kering	Positif
IF2	Merah, cembung, bergelombang, tidak teratur, dan kering	Positif
IF3	Coklat muda, cembung, bergelombang, tidak beraturan, dan kering	Positif
IF4	Kuning jingga, cembung, bergelombang, melingkar, dan lembab	Positif
IF5	kuning, berbentuk payung, bergelombang, tidak teratur, dan kering	Positif
IF6	kuning, cembung, bergelombang, tidak teratur, dan lembab	Positif
IF7	Putih, kuning, tepi menonjol, bergelombang, tidak beraturan, dan kering	Positif
IF8	Putih, kuning, tepi menonjol, bergelombang, tidak beraturan, dan kering	Positif
IF9	kuning, datar, utuh, melingkar, dan halus	Positif
IF10	Coklat tua, cembung, bergelombang, tidak beraturan, dan kering	Positif

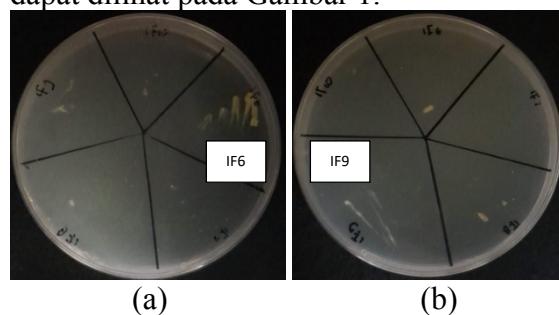
Identifikasi morfologi isolat yang diperoleh berwarna putih, kuning, berbentuk cembung, bergelombang, dan gram positif.

Perbedaan gram tersebut bergantung pada warna yang dapat dipertahankan oleh bakteri. Komposisi kimia dinding sel bakteri gram positif terdiri dari peptidoglikan dan non-peptidoglikan, sedangkan komposisi kimia dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks, dimana terdapat membran pelindung luar berupa peptidoglikan (Rohde, 2019). Bentuk dari setiap isolat basil berbeda-beda dari bakteri yang ada diantaranya, monobasilus, diplobasilus, dan streptobasil.

Menurut Fajriani et al., (2018), bakteri gram positif bersifat toleran terhadap toksisitas logam berat serta mampu membuang logam berat dari lingkungan dengan kemampuan menyerap logam berat. Bakteri gram positif, berbentuk batang, aerob dan aerob fakultatif, dan umumnya terdapat di dalam tanah (Hardiansyah et al., 2020). Berdasarkan hasil pengamatan, bakteri hasil isolasi mikroskopis yang diperoleh umumnya berbentuk basil dan gram positif sesuai dengan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Skrining Bakteri yang Tahan terhadap Logam Berat

Hasil pengamatan skrining bakteri yang tahan terhadap logam dan logam berat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil pengamatan skrining bakteri yang resisten terhadap logam pada konsentrasi 25 ppm (a=isolat IF6), (b=isolat IF9)

Berdasarkan Gambar 1 terlihat bahwa bakteri yang tumbuh resisten terhadap logam berat sampai dengan konsentrasi tertinggi yaitu 25 ppm masih tumbuh isolat yaitu IF6 dan IF9. Beberapa bakteri menunjukkan

resistensi terhadap logam berat di lingkungan, air, tanah, atau limbah industri. Resistensi berkaitan dengan gen pada kromosom, plasmid, atau transposon yang mengatur mekanisme tersebut. Gen tersebut meliputi, gen operon untuk resistensi terhadap Hg, cadA-operon untuk Cd, cop-operon untuk Cu, dan transpor aktif yang melibatkan ATP untuk Pb (Yusuf Fardami et al., 2023).

Pengukuran *optical density* (OD) dilakukan untuk membantu menemukan isolat terbaik. Berdasarkan pengukuran berulang menunjukkan bahwa dua isolat memiliki nilai OD tertinggi. Isolat IF6 dan IF9 memiliki nilai OD yang lebih tinggi daripada yang lain. Nilai OD yang lebih tinggi disebabkan oleh seberapa banyak bakteri tumbuh. Bakteri tumbuh lebih banyak ketika lingkungannya baik, terdapat cukup makanan, dan mereka tumbuh dengan cepat. Rahadi et al (2019), menyatakan bahwa hasil OD menunjukkan seberapa padat bakteri tersebut, artinya isolat dengan nilai OD yang lebih tinggi cenderung lebih tahan dan mampu menangani logam.

Reduksi Logam Berat

Uji reduksi logam berat dilakukan terhadap dua isolat terpilih yang menunjukkan kemampuan pertumbuhan terbaik pada tahap skrining. Hitung jumlah reduksi bakteri menjadi berat menggunakan spektrofotometer serapan atom (SSA). Perlakuan disentrifugasi menggunakan sentrifus berpendingin. Hasilnya akan berupa media cair yang mengandung logam berat setelah proses inkubasi, dan pada bagian dasar tabung terdapat endapan dari bakteri. Hanya isolat terpilih yang kemudian diuji penyerapan dayanya pada tingkat atom. Penurunan kadar logam berat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengukuran spektrofotometer uji penurunan kadar logam berat

Isolat	Jenis Logam Berat	Konsentrasi Awal (ppm)	Konsentrasi Akhir (ppm)	Total Reduksi (ppm)	Penurunan Logam (%)
IF6	Zn	25,00	8,5164	16,4836	65,93
	Pb	25,00	2,4836	22,5164	90,00
	Cd	25,00	7,3411	17,6589	70,62
IF9	Zn	25,00	7,1113	17,8887	71,55
	Pb	25,00	1,6769	23,3231	93,29
	Cd	25,00	4,7949	20,2051	80,82

Hasil penelitian menunjukkan kemampuan isolat terhadap logam berat, isolat IF6 menunjukkan menunjukkan kemampuan reduksi tertinggi terhadap logam Pb dengan persentase penurunan sebesar 90,00%, diikuti oleh Cd (70,62%) dan Zn (65,93%). Isolat IF6 efisien dalam menurunkan logam Pb hal tersebut mengindikasikan bahwa IF6 memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap Pb, yang kemungkinan berkaitan dengan karakteristik dinding sel bakteri gram positif dari kelompok Actinobacteria yang kaya akan gugus bermuatan negatif, seperti gugus karboksil dan fosfat pada lapisan peptidoglikan dan asam teikoat. Gugus-gugus tersebut diketahui berperan penting dalam proses pengikatan ion logam berat, terutama Pb²⁺(Abidin et al., 2019).

Sementara itu pada IF9, kemampuan ditunjukkan untuk Pb (93,29%) dan Cd (80,82%). Hasil ini menunjukkan bahwa IF9 memiliki kapasitas toleransi dan interaksi logam yang lebih luas dibandingkan IF6, meskipun efisiensi tertinggi tetap terlihat pada logam Pb. Menurut Rahadi et al., (2019), mekanisme reduksi logam berat sangat dipengaruhi oleh mikroorganisme yang merupakan bagian penting dari proses pertukaran ion. Mekanisme ini dapat dibagi di atas tiga cara, yaitu berdasarkan metabolisme, sel dibagi atas proses yang berhubungan dengan metabolisme dan

proses yang tidak berhubungan dengan metabolisme sel, sedangkan berdasarkan letaknya, logam berat dapat dibagi atas; akumulasi ekstraseluler (presipitasi), akumulasi intraseluler, dan penyerapan logam oleh permukaan sel. Selama proses metabolisme, logam berat terakumulasi di dalam membran sel (ekstraseluler) dan di dalam sitoplasma (intraseluler). Selama proses bioremediasi, enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme mengubah struktur polutan beracun menjadi kompleks tidak beracun, sehingga menjadi metabolit yang tidak berbahaya (Pande et al., 2022).

Perbedaan tingkat efisiensi reduksi antar logam pada kedua isolat mengindikasikan bahwa meskipun Zn, Pb, dan Cd sama-sama dapat diturunkan, mekanisme interaksi dan tingkat afinitas bakteri terhadap masing-masing logam tidak sama. Zn sebagai unsur esensial bagi metabolisme sel cenderung diatur secara ketat oleh sistem homeostasis bakteri, sehingga meskipun terjadi penurunan konsentrasi, efisiensinya relatif lebih rendah dibandingkan Pb. Sebaliknya, Pb dan Cd yang bersifat non-esensial dan toksik lebih cenderung diikat atau dikeluarkan melalui mekanisme toleransi logam(Chandransu et al., 2019). Hal ini sejalan dengan laporan Ducret et al., (2023) bahwa Zn adalah logam esensial yang diatur ketat melalui sistem homeostasis bakteri, yang mengatur import dan eksport logam untuk mempertahankan konsentrasi internal yang optimal bagi fungsi seluler. Pengaturan ini berbeda dengan logam non-esensial seperti Pb dan Cd, yang lebih cenderung memicu mekanisme resignasi seperti ekspor dan detoxifikasi untuk mengatasi toksisitas.

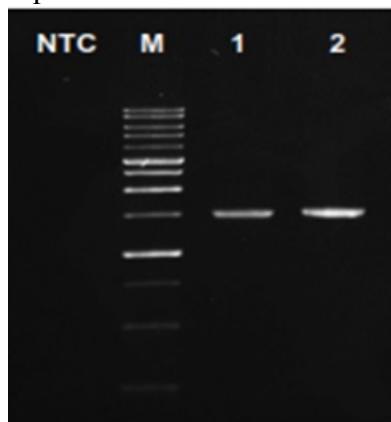
Tingkat penurunan logam yang tinggi pada kedua isolat, mengindikasikan adanya bakteri *indigenous* (lokal) pada limbah batubara. Kemampuan reduksi logam berat yang ditunjukkan oleh kedua isolat ini diduga berkaitan dengan asal lingkungan isolasi yang terpapar limbah batu bara, yang berpotensi menyeleksi mikroorganisme dengan sistem pertahanan dan adaptasi terhadap tekanan logam berat. Bakteri gram positif dari lingkungan tersebut umumnya memiliki struktur dinding sel yang tebal dan

sistem toleransi logam yang mendukung kelangsungan hidup pada kondisi tercemar (Firincă et al., 2024). Selain data penurunan logam, data karakteristik mikroskopik juga bisa digunakan sebagai parameter untuk mengetahui genus bakteri.

Identifikasi Molekuler

Identifikasi secara molekuler mengisolasi IF6 dan IF9 sebagai logam berat yang berpotensi mereduksi dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Tahap pengujian molekuler diawali dengan melakukan isolasi DNA bakteri menggunakan ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit. Hasil isolasi DNA diuji secara kuantitatif dan kualitatif untuk mengetahui tingkat kemurniannya.

Amplifikasi DNA dilakukan pada daerah gen RNA 16S. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan menggunakan dokumentasi gel seperti pada Gambar 2.



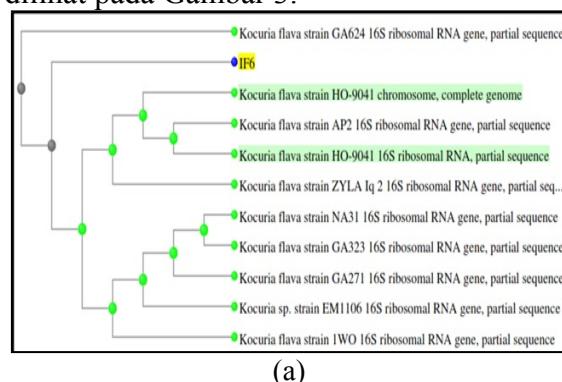
Gambar 2. Visualisasi DNA dengan elektroforesis pada gel agarose 1%

Hasil amplifikasi gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat IF6 dan IF9 menghasilkan fragmen DNA dengan panjang sekitar 1.500 bp. Panjang tersebut sesuai dengan karakteristik gen 16S rRNA bakteri yang umumnya sekitar 1500 bp dan terdiri atas wilayah konservatif serta hipervariabel (V1–V9) yang banyak dimanfaatkan untuk identifikasi dan analisis filogenetik bakteri (Jeong et al., 2022).

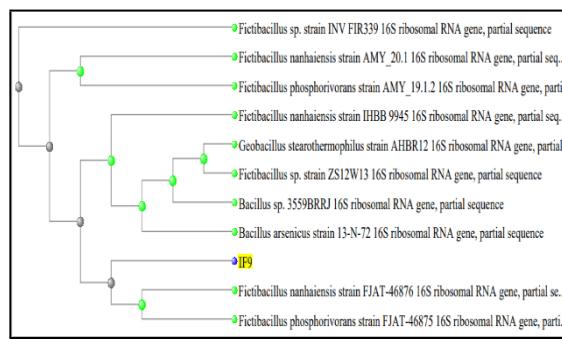
Sekuensing tahap produk PCR dilakukan untuk isolat IF6 dan IF9 yang diketahui urutan basa nukleotidanya. Hasil analisis sekuensing

DNA isolat IF6 dan IF9 menggunakan BLAST diperoleh hasil bahwa isolat IF6 ini memiliki homologi atau tingkat kemiripan sebesar 99% dengan spesies *Kocuria flava* strain HO-9041, yaitu memiliki skor maksimum 2483, skor total 2449, query cover 100%, dan e-value 0,00. Sedangkan IF9 memiliki homologi atau tingkat kemiripan sebesar 99% dengan spesies *Fictibacillus nanhaiensis* strain FJAT-46876, yaitu memiliki skor maksimum 2584, skor total 2584, query cover 100%, dan e-value 0,00.

Pohon filogenetik dibuat untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara isolat IF6 dan IF9 dengan tingkat kesamaan spesies yang diduga berdasarkan urutan basa nukleotida. Filogenetik membandingkan gen-gen yang setara yang berasal dari sejumlah spesies untuk merekonstruksi pohon (silsilah) spesies tersebut dan mengetahui siapa yang berkerabat dengan yang lain. Tujuan filogeni adalah merekonstruksi sejarah kehidupan dan menjelaskan adanya keanekaragaman makhluk hidup. Pohon filogenetik IF6 dan IF9 dapat dilihat pada Gambar 3.



(a)



(b)

Gambar 3. Pohon Filogenetik IF6 (a) dan IF9 (b) berdasarkan perbandingan urutan 16S rRNA

Hasil dari pohon filogenetik yang dibuat berdasarkan perbandingan urutan gen 16S rRNA, menunjukkan bahwa isolat IF6 memiliki tipe yang dekat dengan spesies *Kocuria flava*, dan IF9 memiliki tipe yang dekat dengan spesies *Fictibacillus nanhaiensis*. *K. flava* merupakan salah satu aktinomisetes yang pertama kali dideskripsikan oleh (G. Zhou et al., 2008) sebagai sel berwarna kuning, aerobik, tidak bergerak, dan berbentuk kokoid. Sel ini dapat ditemukan di berbagai lingkungan, seperti udara, tanah, tanaman, akar, sedimen laut, spons, dan alga (Deutsch et al., 2023).

K. flava dikenal karena kemampuannya yang serbaguna, menunjukkan aktivitas katalitik metanol, toleransi termal, aktivitas antifouling, toleransi kromat, induksi pertumbuhan tanaman, dan banyak lagi (Najjar et al., 2021). Penelitian yang sama terhadap penemuan *K. Flava* dilakukan oleh (M. Zhou et al., 2016) di Xinjiang di Tiongkok, bahwa *K. flava* dapat hidup dalam kondisi yang ekstrim: seperti ketersediaan air yang rendah, nutrisi yang buruk, radiasi matahari yang ekstrem, osilasi suhu yang besar, salinitas yang tinggi, dan kadar logam berat yang tinggi. Selain itu, strain tersebut menunjukkan kemampuan menghilangkan logam berat seperti ion Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , dan Co^{2+} .

F. nanhaienses memiliki penting dalam sintesis enzim pendegradasi selulosa dan fenilalanina dehidrogenase, yang sebagian besar diisolasi dari lingkungan sedimen (Li et al., 2024). Genus *Fictibacillus* adalah bakteri gram positif, motil, berbentuk batang, pembentuk endospora (Chen et al., 2020). Penelitian (Li et al., 2024) berhasil mengisolasi *F. nanhaienses* dari ladang minyak Daqing di Tiongkok. Penelitian tersebut mengungkap *F. nanhaienses* memiliki kemampuan sebagai biosurfaktan.

Isolat IF6 yang berasal dari genus *Kocuria* (Actinobacteria) memiliki struktur dinding sel yang tebal dan kaya peptidoglikan, sehingga diduga lebih efektif dalam berinteraksi dan menurunkan konsentrasi Pb dibandingkan logam lainnya. Temuan ini sejalan dengan laporan sebelumnya yang menyebutkan bahwa genus *Kocuria* memiliki toleransi dan kemampuan interaksi yang baik terhadap logam Pb (Hansda et al., 2017).

Genus *Fictibacillus* diketahui mampu beradaptasi pada lingkungan ekstrem melalui mekanisme toleransi logam, seperti pengikatan ion logam pada dinding sel dan regulasi ion logam di dalam sel (Hansda et al., 2017). Rendahnya penurunan Zn pada kedua isolat diduga berkaitan dengan peran Zn sebagai unsur esensial yang diatur secara ketat oleh sel bakteri (Sullivan et al., 2024), sehingga interaksi atau penurunan Zn menjadi lebih terbatas pada konsentrasi yang diuji.

Kemampuan kedua isolat ini juga dapat dikaitkan dengan asal lingkungan isolasi yang terpapar limbah batu bara, yang berpotensi menyeleksi mikroorganisme dengan sistem pertahanan terhadap tekanan logam berat (Firincă et al., 2024). Bakteri gram positif dari lingkungan tersebut cenderung memiliki struktur dinding sel dan mekanisme adaptasi yang mendukung toleransi terhadap logam berat tertentu(Asbchin et al., 2024).

Meskipun demikian, penelitian ini masih memiliki keterbatasan yaitu uji reduksi logam yang dilakukan dalam media cair *Nutrient Broth* sehingga belum merepresentasikan kondisi lingkungan sebenarnya seperti tanah atau limbah batu bara secara langsung. Selain itu, pengujian reduksi logam hanya dilakukan pada satu tingkat konsentrasi (25 ppm), sehingga belum menggambarkan respons isolat terhadap variasi konsentrasi yang lebih luas. Mekanisme penurunan logam berat oleh isolat bakteri juga belum dikaji secara spesifik, apakah berlangsung melalui proses biosorpsi pada permukaan sel, bioakumulasi intraseluler, atau mekanisme biokimia lainnya. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lanjutan untuk mengungkap mekanisme reduksi logam secara lebih mendalam serta mengevaluasi potensi aplikasinya pada skala lingkungan nyata.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian diperoleh dua isolat bakteri hasil skrining resisten logam berat pada konsentrasi 25 ppm yaitu isolat IF6 dan IF9. IF6 yang efektif mereduksi logam Pb (90,00%), dan IF9 yang efektif mereduksi

logam Pb (93,29%) dan Cd (80,82%). Analisis sekuens 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat IF6 memiliki indeks kesamaan sebesar 100% dengan *Kocuria flava*, dan IF9 memiliki kesamaan dengan spesies *Fictibacillus nanhaiensis*.

Saran

Penelitian mendatang dapat difokuskan pada karakterisasi mekanisme bioremediasi oleh *Kocuria flava* dan *Fictibacillus nanhaiensis*, seperti bioakumulasi, biosorpsi, atau enzim-enzim tertentu yang terlibat dalam reduksi logam.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, A. zainal, Renjana, E., Fatimah, & Ni'matuzahroh. (2019). *Uji Toleransi Logam Berat Bakteri Hidrokarbonoklastik dan Uji Kemampuan Micrococcus sp. LII61 dalam Menurunkan Kromium (Cr VI), Tembaga (Cu II), Seng (Zn II) Heavy Metal Tolerance Determination of Hydrocarbon-Degrading Bacterial Strains and Reducing Abili*. Jurnal Pendidikan Biologi, 12, 66–73. <http://dx.doi.org/10.20961/bioeduka-si-uns.v12i1.27414>.
- Asbchin, S. ahmady, Akbari Nasab, M., & Gerente, C. (2024). *Heavy metals biosorption in unary, binary, and ternary systems onto bacteria in a moving bed biofilm reactor*. Scientific Reports, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70402-w>.
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). *Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans*. *Heliyon*, 6(9), e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>.
- Chandrangs, P., Rensing, C., & Helmann, J. D. (2019). *Metal homeostasis and resistance in bacteria*. Nat Rev Microbiol, 15(6), 338–350. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.03.013>.
- Chen, Y., Fan, Y., Huang, Y., Liao, X., Xu, W., & Zhang, T. (2024). *A comprehensive review of toxicity of coal fly ash and its leachate in the ecosystem*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 269 (August 2023), 115905. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115905>.
- Chen, Y., Wang, W., Zhou, D., Jing, T., Li, K., Zhao, Y., Tang, W., Qi, D., Zhang, M., Zang, X., Luo, Y., & Xie, J. (2020). *Biodegradation of lignocellulosic agricultural residues by a newly isolated Fictibacillus sp. YS-26 improving carbon metabolic properties and functional diversity of the rhizosphere microbial community*. Bioresource Technology, 310(April), 123381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123381>.
- Das, S., Sultana, K. W., Ndhlala, A. R., Mondal, M., & Chandra, I. (2023). *Heavy Metal Pollution in the Environment and Its Impact on Health: Exploring Green Technology for Remediation*. Environmental Health Insights, 17. <https://doi.org/10.1177/11786302231201259>.
- Deutsch, Y., Samara, M., Nasser, A., Berman-Frank, I., & Ezra, D. (2023). *Kocuria flava, a Bacterial Endophyte of the Marine Macroalga Bryopsis plumosa, Emits 8-Nonenoic Acid Which Inhibits the Aquaculture Pathogen Saprolegnia parasitica*. Marine Drugs, 21(9). <https://doi.org/10.3390/md21090476>.
- Ducret, V., Gonzalez, D., & Perron, K.

- (2023). Zinc homeostasis in *Pseudomonas*. *BioMetals*, 36(4), 729–744.
[https://doi.org/10.1007/s10534-022-00475-5.](https://doi.org/10.1007/s10534-022-00475-5)
- Fajriani, B., Budiharjo, A., & Pujiyanto, S. (2018). Isolasi dan identifikasi molekuler bakteri antagonis terhadap *Vibrio parahaemolyticus* patogen pada udang *Litopenaeus vannamei* dari produk probiotik dan sedimen mangrove di Rembang. *Jurnal Biologi*, 7(1), 52–63.
- Firincă, C., Zamfir, L. G., Constantin, M., Răut, I., Capră, L., Popa, D., Jinga, M. L., Baroi, A. M., Fierăscu, R. C., Corneli, N. O., Postolache, C., Doni, M., Gurban, A. M., Jecu, L., & Șesan, T. E. (2024). Microbial Removal of Heavy Metals from Contaminated Environments Using Metal-Resistant Indigenous Strains. *Journal of Xenobiotics*, 14(1), 51–78.
[https://doi.org/10.3390/jox14010004.](https://doi.org/10.3390/jox14010004)
- Haghhighizadeh, A., Rajabi, O., Nezarat, A., Hajyani, Z., Haghmohammadi, M., Hedayatikhah, S., Asl, S. D., & Aghababai Beni, A. (2024). Comprehensive analysis of heavy metal soil contamination in mining Environments: Impacts, monitoring Techniques, and remediation strategies. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(6), 105777.
[https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105777.](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105777)
- Hansda, A., Kumar, V., & Anshumali. (2017). Cu-resistant *Kocuria* sp. CRB15: a potential PGPR isolated from the dry tailing of Rakha copper mine. *3 Biotech*, 7(2), 1–11.
[https://doi.org/10.1007/s13205-017-0757-y.](https://doi.org/10.1007/s13205-017-0757-y)
- Hardiansyah, M. Y., Musa, Y., & Jaya, A. M. (2020). Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Thorny Bamboo Rhizosphere with 3 % KOH Gram Test and Gram Staining Test. *International Journal of Applied Biology*, 7–17..
- Jeong, J., Mun, S., Oh, Y., Cho, C. S., Yun, K., Ahn, Y., Chung, W. H., Lim, M. Y., Lee, K. E., Hwang, T. S., & Han, K. (2022). A qRT-PCR Method Capable of Quantifying Specific Microorganisms Compared to NGS-Based Metagenome Profiling Data. *Microorganisms*, 10(2), 1–15.
[https://doi.org/10.3390/microorganisms10020324.](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020324)
- Li, J. Y., Liu, Y. F., Zhou, L., Gang, H. Z., Liu, J. F., Sun, G. Z., Wang, W. D., Yang, S. Z., & Mu, B. Z. (2024). A new biosurfactant-producing strain, *Fictibacillus nanhaiensis* ME46, isolated from an oil field in China. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 45(20), 4089–4095.
[https://doi.org/10.1080/09593330.2023.2240947.](https://doi.org/10.1080/09593330.2023.2240947)
- Mitra, S., Chakraborty, A. J., Tareq, A. M., Emran, T. Bin, Nainu, F., Khusro, A., Idris, A. M., Khandaker, M. U., Osman, H., Alhumaydhi, F. A., & Simal-Gandara, J. (2022). Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University - Science*, 34(3), 101865.
[https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865.](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865)
- Najjar, A., Hassan, E. A., Zabermawi, N., Saber, S. H., Bajrai, L. H., Almuhayawi, M. S., Abujamel, T. S., Almasaudi, S. B., Azhar, L. E., Moulay, M., & Harakeh, S. (2021). Optimizing the catalytic activities of methanol and thermotolerant *Kocuria*

- flava lipases for biodiesel production from cooking oil wastes.* Scientific Reports, 11(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93023-z>.
- Padmavathi, S., & Jayalakshmi, G. (2024). *Application of Bioremediation in Mitigation of Heavy Metal Stress on Plants.* International Journal of Advanced Research, 12(04), 509–517.
<https://doi.org/10.21474/ijar01/18576>.
- Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Bhatt, P., & Samant, M. (2022). *Microbial Interventions in Bioremediation of Heavy Metal Contaminants in Agroecosystem.* Frontiers in Microbiology, 13(May), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084>.
- Rahadi, B., Susanawati, L. D., & Agustianingrum, R. (2019). *Bioremediasi Logam Timbal (Pb) Menggunakan Bakteri Indigenous Pada Tanah Tercemar Air Lindi (Leachate).* Jurnal Sumberdaya Alam Dan Lingkungan, 6(3), 11–18.
<https://doi.org/10.21776/ub.jsal.2019.006.03.2>.
- Rahadi, B., Susanawati, L. D., & Agustianingrum, R. (2019). *Bioremediasi Logam Timbal (Pb) Menggunakan Bakteri Indigenous Pada Tanah Tercemar Air Lindi (Leachate).* Jurnal Sumberdaya Alam Dan Lingkungan, 6(3), 11–18.
<https://doi.org/10.21776/ub.jsal.2019.006.03.2>.
- Raklami, A., Meddich, A., & Oufdou, K. (2022). *Plants Microorganisms Based-Bioremediation-for-Heavy-Metal-Cleanup-Recent-Developments-Phytoremediation-Techniques-*
- Regulation-Mechanisms-and-Molecular-Responses International-Journal-of-Molecular-Sciences.pdf.*
- Rohde, M. (2019). *The Gram-Positive Bacterial Cell Wall.* Microbiology Spectrum, 7(3), 1–21.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018.Correspondence>.
- Sullivan, M. J., Terán, I., Goh, K. G. K., & Ulett, G. C. (2024). *Resisting death by metal: metabolism and Cu/Zn homeostasis in bacteria.* Emerging Topics in Life Sciences, 8(1), 45–56.
<https://doi.org/10.1042/ETLS20230115>.
- Yusuf Fardami, A., Balarabe Ibrahim, U., Sabitu, M., Lawal, A., Ahmad Adamu, M., Aliyu, A., Lawal, I., Ibrahim Dalhatu, A., Sanusi Zainab, M., & Farouq, A. A. (2023). *Mechanisms of Bacterial Resistance to Heavy Metals: A Mini Review.* UMYU Scientifica, 2(1), 76–87.
<https://doi.org/10.56919/usci.2123.010>.
- Zhou, B., Zhang, T., & Wang, F. (2023). *Microbial-Based Heavy Metal Bioremediation: Toxicity and Eco-Friendly Approaches to Heavy Metal Decontamination.* Applied Sciences (Switzerland), 13(14).
<https://doi.org/10.3390/app13148439>.
- Zhou, G., Luo, X., Tang, Y., Zhang, L., Yang, Q., Qiu, Y., & Fang, C. X. (2008). *Kocuria flava sp. nov. and Kocuria turfanensis sp. nov., airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(6), 1304–1307.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65323-0>.

- Zhou, M., Zhang, Y., Li, X., Wang, Z., Tang, J., Mu, Y., Fang, C., Chen, X., & Dai, J. (2016). *Complete genome sequence of *Kocuria flava* strain HO-9041, a heavy metal removal bacterium from Xinjiang*. Journal of Biotechnology, 220, 21–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.004>.