

Isolasi, karakterisasi, dan uji resistensi bakteri dari Sungai Matras, Bangka, Indonesia terhadap timbal dan tembaga

Resistance test of bacterial isolates from Matras River, Bangka, Indonesia to lead and copper

Wahyu Irawati^{1*}, Alya Leonita Lamonta¹, Cantika Dela Kurnia Zendrato¹, Thesalonika Liony Pangemanan¹, Deokward F. Ruga¹, Nicolas Tunggul Adhigandewa¹, Geoffrey Darrien Fideli²

¹⁾ Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Ilmu Pendidikan, Universitas Pelita Harapan

Jl. M.H. Thamrin Boulevard 1100, Kelapa Dua, Kec. Kelapa Dua, Kabupaten Tangerang, Banten 15811, Indonesia

²⁾ Program Studi Biologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Pelita Harapan

Jl. M.H. Thamrin Boulevard 1100, Kelapa Dua, Kec. Kelapa Dua, Kabupaten Tangerang, Banten 15811, Indonesia

*Email: wahyu.irawati@uph.edu

Diterima

4 Oktober 2025

Disetujui

26 Desember 2025

INTISARI

Aktivitas pertambangan di sekitar Sungai Matras mengakibatkan terjadinya pencemaran logam berat terutama timbal dan tembaga. Timbal merupakan logam berat yang bersifat toksik sementara itu tembaga konsentrasi tinggi juga membahayakan kesehatan lingkungan. Bioremediasi dengan menggunakan bakteri *indigenus* yang multiresisten tembaga dan timbal merupakan solusi yang mudah, murah, dan ramah lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri yang resisten terhadap timbal dari sungai matras serta menguji resistensi bakteri tersebut terhadap tembaga. Bakteri diisolasi dengan metode tebar dari sampel air Sungai Matras yang diencerkan secara seri. Medium yang digunakan adalah Luria Bertani agar dengan penambahan $Pb(NO_3)_2$ untuk memperoleh bakteri resisten timbal. Isolat bakteri dilakukan karakterisasi morfologi koloni serta pemurnian sehingga menghasilkan biakan murni. Karakterisasi fisiologis dilakukan dengan pewarnaan Gram dan pengamatan morfologi koloni, sedangkan secara molekuler dengan pengurutan gen 16SrDNA. Uji resistensi terhadap $CuSO_4$ dilakukan pada bakteri yang paling unggul dengan metode gores untuk memperoleh nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Hasil penelitian menunjukkan terdapat 19 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dengan nilai MIC berkisar 6-16 mM. Sebanyak 16 isolat bersifat Gram negatif dan 3 isolat bersifat Gram positif. Isolat B63 dan B64 adalah bakteri yang paling resisten terhadap timbal dan tembaga dengan MIC sebesar 16 mM, sehingga berpotensi sebagai agen bioremediasi. Hasil pengurutan gen 16s rDNA dan pohon filogeni menunjukkan bahwa isolat B54, B56, B61, dan B62 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*, sedangkan isolat B63 dan B64 teridentifikasi sebagai *Pseudomonas aeruginosa*.

Kata kunci: Isolasi, karakterisasi, resisten, timbal, tembaga

ABSTRACT

Mining activities around the Matras River have resulted in heavy metal contamination, particularly by lead and copper. Lead is a highly toxic heavy metal, while copper at high concentrations also poses serious risks to environmental health. Bioremediation using indigenous bacteria with multiple resistance to lead and copper offers a simple, low-cost, and environmentally friendly solution. This study aimed to isolate and characterize lead-resistant bacteria from the Matras River and to evaluate their resistance to copper. Bacteria were isolated using the spread plate method from serially diluted river water samples. Luria-Bertani agar supplemented with $Pb(NO_3)_2$ was used to obtain lead-resistant bacteria. The isolates were purified and characterized based on colony morphology. Physiological characterization was

conducted using Gram staining and observation of colony morphology, while molecular identification was performed through 16S rDNA gene sequencing. Copper resistance was evaluated for selected isolates using the streak plate method on CuSO₄-containing media to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The results showed that 19 bacterial isolates were successfully obtained, with MIC values ranging from 6 to 16 mM. Among these isolates, 16 were Gram-negative and 3 were Gram-positive. Isolates B63 and B64 exhibited the highest resistance to both lead and copper, with MIC values of 16 mM, so it has the potential to be a bioremediation agent. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences identified isolates B54, B56, B61, and B62 as *Bacillus cereus*, while isolates B63 and B64 were identified as *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Isolation, characterization, resistant, lead, copper

PENDAHULUAN

Aktivitas pertambangan timah di Sungai Matras, Bangka, telah menyebabkan pencemaran logam berat, terutama timbal (Pb) dan tembaga (Cu), yang terakumulasi dalam sedimen perairan. Konsentrasi logam berat Pb dalam sedimen tercatat berkisar antara 0,02 hingga 0,06 mg/kg, sedangkan Cu berkisar antara 0,12 hingga 0,18 mg/kg. Meskipun indeks kontaminasi menunjukkan tingkat pencemaran rendah, nilai faktor pengayaan (FP) yang melebihi 1,5 menunjukkan adanya pengaruh signifikan dari aktivitas manusia, terutama pertambangan timah (Nugraha et al., 2022). Kondisi ini menyebabkan penurunan kualitas air, seperti perubahan warna menjadi keruh dan munculnya bau tidak sedap.

Logam berat yang mencemari perairan dapat masuk ke rantai makanan melalui biota akuatik. Akumulasi logam dalam tubuh organisme dikenal dengan istilah bioakumulasi, yaitu peningkatan konsentrasi bahan kimia dalam tubuh organisme dibandingkan dengan konsentrasi di lingkungannya (Armijn & Soegianto, 2020). Bioakumulasi logam berat seperti timbal dan tembaga dapat membahayakan kesehatan manusia. Timbal dapat menyebabkan gangguan sistem saraf, anemia, dan kerusakan ginjal (Das et al., 2016). Sementara itu, tembaga merupakan logam esensial bagi tubuh, tetapi dalam konsentrasi tinggi bersifat toksik dan sulit dikeluarkan dari tubuh (Dewa et al., 2015). Pencemaran logam berat tidak hanya merusak ekosistem, tetapi juga mengganggu keseimbangan mikroorganisme alami di perairan. Konsentrasi logam berat yang tinggi dapat menghambat aktivitas mikroba yang berperan dalam daur ulang nutrisi (Williams et al., 2016). Interaksi antara logam berat dengan partikel organik juga menyebabkan logam menjadi lebih sulit terurai (Husen, 2025).

Teknologi pengolahan limbah secara konvensional sering kali tidak efektif dan memerlukan biaya tinggi sehingga perlu dilakukan metode yang ekonomis dan ramah lingkungan. Pendekatan bioremediasi berbasis bakteri dinilai ramah lingkungan dan berpotensi mengurangi konsentrasi logam berat di lingkungan tercemar (Nurchayani et al., 2024). Beberapa mikroorganisme diketahui memiliki kemampuan bertahan hidup di lingkungan tercemar logam berat. Mikroorganisme tersebut melakukan adaptasi melalui mekanisme fisiologis tertentu (Fahrudin & Tanjung, 2019). Mekanisme yang umum digunakan oleh bakteri dalam menghadapi logam berat meliputi biosorpsi dan bioakumulasi (Ratnawati et al., 2010). Biosorpsi adalah proses pengikatan ion logam oleh dinding sel bakteri tanpa melibatkan metabolisme aktif (Zapotoczny et al., 2007).

Bakteri indigen atau bakteri lokal yang berasal dari lingkungan tercemar memiliki keunggulan karena telah beradaptasi terhadap kondisi ekstrem. Penggunaan bakteri lokal dari limbah industri telah terbukti efektif dalam proses bioremediasi logam berat (Fidiastuti et al., 2017). Bakteri yang ditemukan di

lingkungan tercemar mampu tumbuh dalam kondisi yang mengandung Cu dan Pb, serta menunjukkan aktivitas penguraian logam yang tinggi dalam dinding selnya. Bakteri yang resisten terhadap logam disebabkan oleh adanya protein polifosfat di dalam sel yang mampu mengikat logam berat seperti timbal (Anggraeni & Triajie, 2021). Salah satu contoh adalah *Acinetobacter sp.* yang mampu mengakumulasi logam berat secara signifikan (Irawati et al., 2020).

Beberapa spesies bakteri lain juga menunjukkan potensi tinggi dalam proses bioremediasi. *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus sp.* yang diisolasi dari lingkungan tercemar logam berat menunjukkan kemampuan resistensi terhadap logam berat. *P. aeruginosa* memiliki nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 500 ppm untuk Cu dan 400 ppm untuk Pb. Sementara itu, *Bacillus sp.* memiliki MIC sebesar 600 ppm untuk Cu dan 500 ppm untuk Pb. Proses biosorpsi oleh *Pseudomonas aeruginosa* mampu menyerap Cu hingga 92,17% (Irawati et al., 2019).

Bakteri indigen yang diisolasi dari lingkungan tercemar biasanya memiliki resistensi yang tinggi serta berpotensi dijadikan sebagai agen Bioremediasi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi, karakterisasi, dan identifikasi melalui analisa 16s rRNA bakteri indigen dari lokasi tercemar di Sungai Matras serta menguji resistensinya terhadap tembaga dan timbal. Diharapkan penemuan bakteri resisten tembaga dan timbal ini merupakan awal penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensinya sebagai agen bioremediasi.

MATERI DAN METODE

Pembuatan Medium

Medium yang digunakan untuk isolat bakteri dari Sungai Matras di Kepulauan Bangka adalah Luria Bertani Agar (LBA) sebagai media pemeliharaan isolat. Medium merupakan nutrisi yang menunjang pertumbuhan bakteri (Masrurotun et al., 2014). Luria Bertani (LB) mengandung sumber karbon dan nitrogen dari *yeast extract* serta memiliki kandungan sodium klorida (Macwilliams & Liao, 2006), sehingga dapat menunjang kebutuhan pertumbuhan bakteri. Medium yang digunakan adalah Luria Bertani Agar (Himedia M1151-500g). Media LB agar ditimbang terlebih dahulu sebanyak 4g menggunakan timbangan analitik kemudian dilakukan pelarutan dengan aquades sebanyak 100 mL dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Media LB agar akan diberi perlakuan berbeda dengan menambahkan PbNO₃ dan CuSO₄ dari konsentrasi terendah hingga paling tinggi kemudian dituang secara aseptis ke dalam cawan petri dan ditunggu selama 1 jam sampai media memadat.

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Resistan Timbal

Isolasi bakteri resistensi logam dilakukan dengan metode sebar. *Spread plate* atau metode sebar merupakan metode yang dilakukan dengan penuangan suspensi bakteri ke atas medium agar kemudian disebarkan menggunakan drigalski atau L *glass* secara merata (Mikdarullah & Nugraha, 2017). Perlakuan isolasi terhadap sampel sungai Matras dilakukan dengan menambahkan timbal (Pb) sebanyak 3 mM ke dalam medium LBA dan diratakan menggunakan batang gelas sampai air limbah meresap ke dalam medium kemudian akan di inkubasi pada 37°C selama 24 jam di dalam inkubator.

Bakteri yang tumbuh kemudian dikarakterisasi secara makroskopis yaitu dengan pengamatan bentuk, tepi, dan warna dari koloni dan secara mikroskopis dengan mengidentifikasi morfologi (bentuk sel) dan fisiologi (dinding sel penyusun) berdasarkan pewarnaan Gram (Hefdiyah and & Shovitri, 2014).

Koloni pada bakteri yang dikarakterisasi merupakan koloni tunggal atau biasa disebut dengan *single colony*. Hal ini dilakukan dengan meyakini bahwa *single colony* tersebut adalah bakteri murni yang tidak terkontaminasi dengan koloni bakteri lain. Pada metode mikroskopis dengan melakukan pewarnaan Gram yang merupakan salah satu cara yang dipakai dalam menggolongkan bakteri terdapat bakteri Gram negatif ditandai dengan warna merah muda dan Gram positif dengan warna ungu (Wahyu et al., 2020).

Uji resistensi bakteri terhadap timbal dan tembaga

Uji Resistensi bakteri yang diisolasi dari Sungai Matras diukur dengan menggunakan konsentrasi logam berat tertinggi yakni nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (Irawati et al., 2020). MIC merupakan sebuah metode pengukuran yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari obat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Munfaati et al., 2015). Bakteri yang sudah dibiakkan di agar miring, dilakukan pengambilan satu ose dan diinokulasikan ke dalam tiap medium agar yang mengandung 3 mM sampai 15 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Uji resistensi dilakukan dengan menggunakan metode gores kemudian inkubasikan pada suhu 37°C. Pengamatan pertumbuhan koloni bakteri dilakukan selama 1-2 hari untuk menentukan resistensi bakteri. Pengujian resistensi dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi timbal hingga bakteri tidak lagi menunjukkan adanya pertumbuhan. Uji resistensi tembaga dilakukan dengan metode yang sama.

Analisis Sekuensing Gen 16S rRNA

Isolat bakteri diidentifikasi menggunakan sekuensing gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) oleh PT Genetika Science Indonesia. Sekuens bakteri yang dihasilkan dianalisis menggunakan Clustal Omega. Multiple sequence alignment dilakukan untuk menilai kesamaan sekuens 16S rRNA isolat terhadap sekuens pembanding yang diunduh dari basis data NCBI. Analisis filogenetik dilakukan menggunakan Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan model substitusi Kimura 2-Parameter (K2P). Uji topologi pohon filogeni dilakukan melalui analisis *bootstrap* dengan 1.000 replikasi. Pohon filogeni yang dihasilkan divisualisasikan menggunakan iTOL (<https://itol.embl.de/>) untuk memfasilitasi dan mengonfirmasi hubungan genetik antar isolat bakteri.

HASIL

Bakteri resisten timbal merupakan bakteri yang di isolasi dari lingkungan tercemar terhadap timbal sehingga diharapkan memiliki kemampuan untuk mendetoksifikasi pengaruh logam berat. Untuk mengetahui jenis bakteri dan uji resistensi bakteri limbah air terhadap timbal maka dilakukan isolasi bakteri dengan menggunakan LBA ditambah konsentrasi Pb sebanyak 3 mM. Pengamatan pada hasil isolasi ditemukan berbagai jenis koloni bakteri yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil pengamatan, ditemukan 19 isolat bakteri. Beberapa jenis bakteri yang memiliki ketahanan hidup terhadap lingkungan sekitar akan membentuk suatu komunitas bakteri yang resisten terhadap timbal. Isolat bakteri murni yang diperoleh kemudian dikarakterisasi berdasarkan 5 aspek yaitu warna, bentuk, tepi, optik dan pewarnaan gram bakteri. Hasil karakterisasi morfologi isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji resistensi isolat bakteri terhadap timbal diukur dengan nilai MIC (Tabel 2). Terdapat 1 bakteri dengan nilai MIC 6 mM dan 7 mM, masing-masing

adalah isolat A23 dan B55. Terdapat 2 bakteri yang memiliki nilai MIC 9 mM, yaitu isolat A34 dan A2, sedangkan bakteri yang memiliki nilai MIC 10 mM ada 1, yaitu A34. Sebagian besar isolat bakteri memiliki nilai MIC 13 mM, yaitu sebanyak 6 isolat, yaitu B51, B53, B54, B56, B61, dan B62. Dua isolat bakteri yang paling resisten adalah Isolat B63 dan B64 dengan nilai MIC sebesar 16 mM.

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Koloni Isolat Bakteri Resisten Timbal

No	Kode Isolat	Warna	Bentuk	Tepi	Optik	Gram
1.	A21	Putih kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
2.	A22	Kuning Muda	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
3.	A23	Kuning muda	<i>Irregular</i>	<i>Filiform</i>	<i>Opaque</i>	Negatif
4.	A24	Kuning keputihan	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
5.	A25	Putih buram	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Positif
6.	A31	Kuning keputihan	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
7.	A33	Putih buram	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
8.	A34	Kuning keputihan	<i>Road</i>	<i>Filiform</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
9.	A35	Kuning keputihan	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
10.	A36	Putih buram	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
11.	B51	Kuning muda	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Positif
12.	B53	Putih buram	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
13.	B54	Kuning keputihan	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
14.	B55	Kuning tua	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
15.	B56	Putih buram	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
16.	B61	Kuning keputihan	<i>Irregular</i>	<i>Filiform</i>	<i>Translucent</i>	Positif
17.	B62	Putih buram	<i>Irregular</i>	<i>Filiform</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
18.	B63	Kuning muda	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif
19.	B64	Kuning muda	<i>Road</i>	<i>Entire</i>	<i>Translucent</i>	Negatif

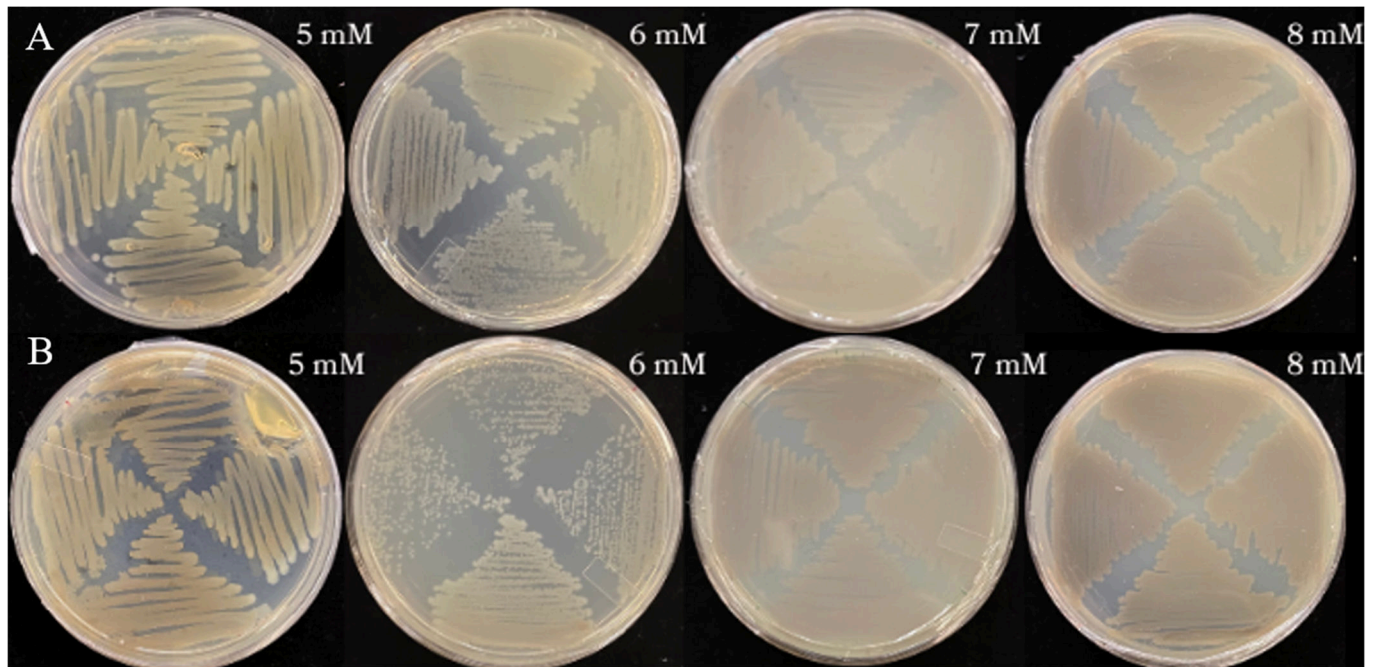
Tabel 2. Hasil Uji Resistensi Isolat Bakteri terhadap Timbal berdasarkan nilai MIC

No	Kode isolat	Uji Resistensi terhadap Pb (mM)												
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.	A21	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2.	A23	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	A24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4.	A34	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5.	B51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6.	B53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7.	B54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8.	B55	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	B56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10.	B61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
11.	B62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
12.	B63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.	B64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tanda positif (+) pada tabel menunjukkan bahwa isolat bakteri masih mampu tumbuh pada konsentrasi Pb tertentu, sehingga dikategorikan resisten terhadap logam tersebut. Sebaliknya, tanda negatif (-) menandakan bahwa isolat bakteri tidak lagi menunjukkan pertumbuhan pada konsentrasi Pb tersebut, sehingga dianggap tidak resisten atau telah mengalami hambatan pertumbuhan. Identifikasi dilakukan dengan melihat intensitas koloni yang tetap tumbuh setiap media yang mengandung Pb dengan konsentrasi meningkat. Konsentrasi tertinggi yang masih menunjukkan pertumbuhan (+) merupakan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), yaitu batas maksimum konsentrasi Pb yang

masih dapat ditoleransi oleh isolat. Apabila pada suatu konsentrasi bakteri tidak lagi menunjukkan pertumbuhan (–), maka konsentrasi tersebut dianggap berada di atas kemampuan toleransi bakteri.

Hasil uji resistensi bakteri dengan kode isolate B63 dan B64 pada gambar 1 menunjukkan bahwa isolat bakteri B63 dan B64 memiliki tingkat resistensi yang paling tinggi diantara seluruh isolat yang diuji, karena dapat bertahan pada konsentrasi Pb maksimum yang diujikan.



Gambar 1. Pertumbuhan Isolat Bakteri A). B63 dan B). B64 pada Media Mengandung Pb dengan Variasi Konsentrasi (5–8 mM)

Kemampuan isolat B63 dan B64 untuk menunjukkan warna coklat yang semakin intens pada konsentrasi Pb yang tinggi mendukung hipotesis bahwa kedua isolat ini tidak hanya tahan terhadap logam berat, tetapi juga aktif dalam mengakumulasi atau memodifikasi Pb, menjadikannya kandidat potensial untuk aplikasi bioremediasi timbal di lingkungan tercemar. Isolat B63 dan B64 sebagai bakteri yang paling unggul selanjutnya dilakukan uji resistensi terhadap tembaga. Hasil uji resistensi terhadap tembaga menunjukkan bahwa kedua isolat ini juga resisten terhadap tembaga dengan nilai MIC 16 mM sehingga dapat disimpulkan bahwa keduanya memiliki sifat multiresistensi terhadap timbal dan tembaga. Hasil penelitian ini membuka peluang penelitian lebih lanjut tentang potensi kedua isolat tersebut sebagai agen bioremediasi timbal dan tembaga.

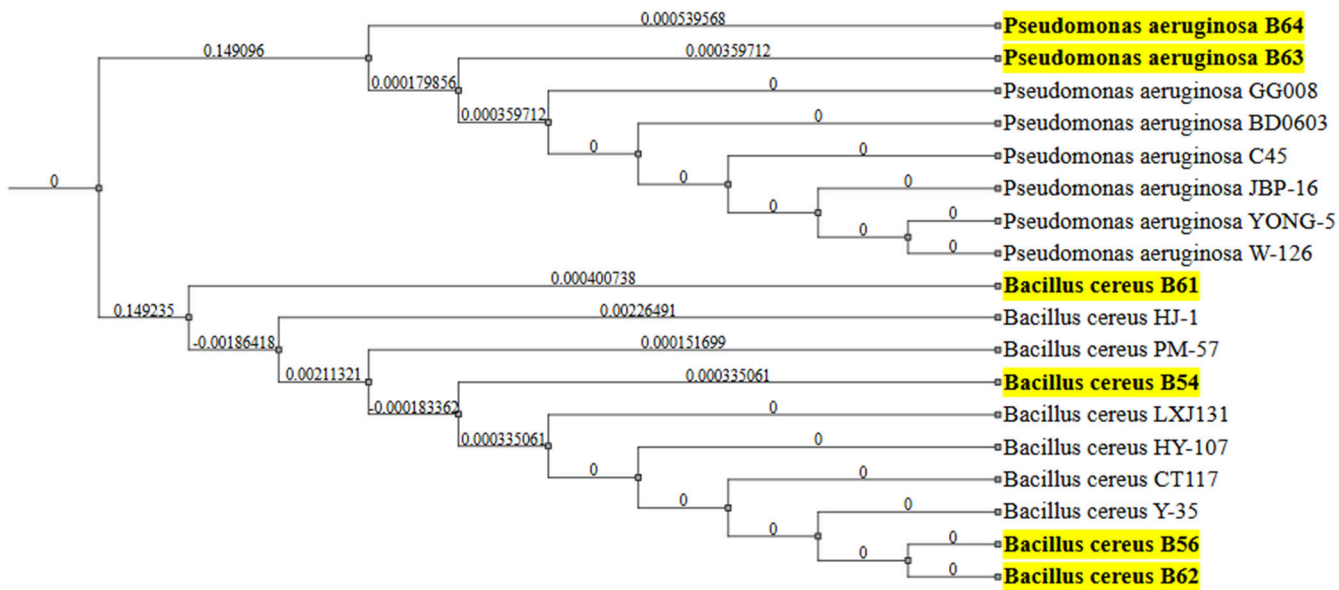
Berdasarkan hasil identifikasi isolat bakteri berdasarkan metode 16s rRNA pada Tabel 3. Empat isolat yakni B54, B56, B61, dan B62 menunjukkan kemiripan sebesar 99.93-100% dengan *Bacillus cereus*. Sementara kedua isolat lainnya yaitu B63, dan B64 menunjukkan kemiripan sebesar 99.93% terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Tingginya nilai kedekatan sekuens-sekuens tersebut mengonfirmasi bahwa isolat-isolat tersebut dapat diklasifikasi ke dalam taksonomi *Bacillus* dan *Pseudomonas*.

Hasil pohon filogenetik *Neighbor-Joining* pada Gambar 2 menunjukkan bahwa 4 isolat (B54, B56, B61, dan B62) terletak dekat dengan kluster *B. cereus* yang mengindikasikan bahwa keempat isolat tersebut memiliki tingkat kemiripan yang tinggi dengan *B. cereus*. Sedangkan 2 isolat (B63 dan B64) terletak pada kluster *P. aeruginosa* yang juga mengindikasikan bahwa kedua isolat tersebut

memiliki kemiripan tinggi dengan *P. aeruginosa*. Secara keseluruhan, hasil tersebut mendukung klasifikasi isolat-isolat ke dalam genus tersebut.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Berdasarkan 16s rRNA

No	Kode Isolat	Accession Number	Panjang (bp)	Spesies Terdekat	Sequence Similarity (%)
1	B54	PX688064	1399	<i>Bacillus cereus</i>	100
2	B56	PX688063	1405	<i>Bacillus cereus</i>	100
3	B61	PX688062	1405	<i>Bacillus cereus</i>	99.93
4	B62	PX688061	1404	<i>Bacillus cereus</i>	100
5	B63	PX688059	1390	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,93
6	B64	PX688060	1393	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,93



Gambar 2. Pohon Filogenetik Isolat Bakteri *B. cereus* B54, *B. cereus* B56, *B. cereus* B61, *B. cereus* B62, *P.aeruginosa* B63, dan *P. aeruginosa* B64

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi pada Tabel 1, terdapat 16 bakteri Gram negatif dan 3 bakteri Gram positif. Pewarnaan Gram yang menghasilkan Gram negatif berwarna merah muda dan Gram positif yang berwarna ungu disebabkan karena kedua jenis bakteri tersebut memiliki perbedaan struktur pada dinding sel (Fitri & Yasmin, 2020). Jumlah bakteri dengan Gram negatif lebih dominan dibanding bakteri dengan Gram positif. Bakteri Gram negatif dan Gram positif memiliki kadar peptidoglikan yang berbeda. Kadar peptidoglikan pada bakteri Gram positif cukup tinggi dengan ketebalan 20-30 nm dan terdapat asam teikoat yang memiliki kandungan fosfodiester. Asam teikoat berfungsi dalam membantu proses pertukaran ion melalui penyediaan muatan negatif pada bakteri. Kadar bakteri Gram negatif memiliki kadar peptidoglikan yang lebih rendah, terdapat lipoposakarida yang berfungsi untuk memberikan kontribusi pada mekanisme biosorpsi saat dicampurkan dengan tembaga (Farida & Dalya, 2016). Adapun pada bakteri dengan kode isolat B54 memiliki kasus yang berbeda. Pada pengulangan 2 memiliki Gram negatif, namun pada pengulangan

3 berubah menjadi Gram negatif. Bakteri pada waktu tertentu dapat berubah dari yang awalnya merupakan Gram positif mengalami perubahan menjadi Gram negatif. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri Gram variabel atau bakteri Gram negatif. Jenis bakteri ini dapat melakukan penyerapan pada warna merah dan memiliki lapisan struktur dinding sel yang tidak tebal, berada pada ruang periplasmik antara membran plasma dan membran luar (Kusumarini et al., 2021).

Sebagian besar bakteri resisten terhadap timbal (Pb) yang berhasil diisolasi berasal dari kelompok Gram negatif karena struktur dinding sel mereka yang lebih kompleks dan adaptif terhadap lingkungan yang terkontaminasi logam berat. Bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan tipis di dinding sel dan mengandung lipopolisakarida (LPS) di membran luar. Lapisan luar lipopolisakarida (LPS) pada bakteri Gram negatif berperan sebagai pelindung terhadap masuknya ion logam toksik, serta memiliki porin yang mengatur difusi selektif logam ke dalam sel (Afifah et al., 2024). Selain itu, bakteri Gram negatif umumnya membawa lebih banyak gen resistensi logam berat, seperti *pbr*, *znt*, atau *czc*, yang berperan dalam mekanisme *efflux*, transformasi, atau penjerapan ion logam (Huang et al., 2022). Kemampuan membentuk biofilm dan metabolisme yang fleksibel juga memperkuat dominasi bakteri Gram negatif di lingkungan tercemar, termasuk pada habitat tanah atau air limbah yang terpapar Pb (Sharma et al., 2020).

Persamaan ciri morfologi yang diamati pada isolat bakteri resisten timbal menunjukkan bahwa sebagian besar koloni memiliki optik *translucent*, dan hanya satu isolat yang menunjukkan optik buram. Sebagian besar isolat menunjukkan bentuk koloni *irregular*, sedangkan sisanya berbentuk *rod*. Perbedaan utama terdapat pada bentuk tepi koloni, dengan isolat A21 dan A31 memiliki tepi *undulate*, A23, A34, B61, dan B62 memiliki tepi filiform, serta isolat A22, A25, A33, A36, B51, B53, B55, B56, B63, dan B64 memiliki tepi *entire*. Warna koloni juga bervariasi, dengan isolat A22, A23, B51, B63, dan B64 berwarna kuning muda; A24, A31, A34, A35, B54, dan B61 berwarna kuning keputihan; A25, A33, A36, B53, B56, dan B62 berwarna putih buram; sedangkan A21 berwarna putih kekuningan. Ciri-ciri morfologi tersebut, terutama warna dan bentuk koloni, merupakan karakter fenotipik dasar yang digunakan dalam identifikasi awal bakteri. Warna koloni yang muncul disebabkan oleh adanya pigmentasi yang diproduksi oleh bakteri sebagai hasil metabolisme sekunder, yang dapat memiliki fungsi protektif terhadap stres lingkungan, termasuk paparan logam berat (Irawati, et al., 2020). Selain itu, bentuk tepi dan optik koloni sering kali dipengaruhi oleh struktur dinding sel, kecepatan pertumbuhan, dan media tempat bakteri tumbuh (Arnaouteli et al., 2017).

Uji resistensi terhadap logam timbal (Pb) pada isolat bakteri dari Sungai Matras menunjukkan variasi tingkat toleransi yang cukup luas, dengan nilai MIC berkisar antara 6 mM hingga 16 mM. Nilai MIC ini mencerminkan kemampuan masing-masing isolat dalam bertahan dan beradaptasi di lingkungan dengan paparan logam berat. Isolat A23 dan B55 menunjukkan nilai MIC terendah, yaitu 6 mM dan 7 mM, yang menandakan kemampuan toleransi yang rendah terhadap timbal. Sebaliknya, isolat A34 dan A2 memiliki nilai MIC 9–10 mM, menandakan tingkat toleransi menengah. Kategori ini sejalan dengan klasifikasi yang dikemukakan oleh Malik, et al. (2004) dan diperkuat oleh Huang, et al. (2021), bahwa isolat bakteri dengan MIC logam berat antara 1–5 mM dikategorikan sebagai resistensi rendah, 6–10 mM sebagai resistensi sedang, dan di atas 10 mM sebagai resistensi tinggi. Rentang MIC yang lebih tinggi

mengindikasikan bahwa bakteri tersebut memiliki mekanisme fisiologis dan genetik yang lebih baik dalam menghadapi stres akibat paparan ion logam, seperti aktivasi sistem efflux, pengikatan intraseluler, atau enzim detoksifikasi logam (Borthakur et al., 2022).

Sebagian besar isolat, yaitu B51, B53, B54, B56, B61, dan B62, memiliki nilai MIC 13 mM, menunjukkan bahwa isolat ini telah mengalami adaptasi lingkungan yang cukup kuat terhadap keberadaan Pb. Dua isolat yang paling resisten, yaitu B63 dan B64, memiliki MIC sebesar 16 mM, mengindikasikan potensi tinggi dalam toleransi terhadap logam berat. Kemampuan resistensi ini diduga berkaitan dengan keberadaan mekanisme pertahanan seperti sistem efflux, pengendapan ion logam di luar sel, dan keberadaan gen resistensi spesifik seperti *pbrA* atau *czcA* (Huang, et al., 2021). Lingkungan tercemar logam berat mendorong seleksi alami terhadap mikroorganisme yang memiliki mekanisme adaptif dan detoksifikasi (Aznur et al., 2022). Oleh karena itu bakteri dengan MIC tinggi kemungkinan telah mengalami tekanan selektif tersebut (Sharma, et al., 2020).

Bakteri dengan MIC tinggi seperti isolat B63 dan B64 berpotensi besar untuk digunakan dalam strategi bioremediasi logam berat karena kemampuannya dalam bertahan hidup pada konsentrasi Pb yang tinggi. Morfologi koloni kedua isolat bakteri tersebut menunjukkan warna coklat mengindikasikan adanya akumulasi Pb di dalam sel (Gambar 1). Warna koloni bakteri resisten Pb seperti isolat B63 dan B64 yang tampak coklat diduga berkaitan erat dengan mekanisme akumulasi dan transformasi ion logam di dalam maupun di sekitar sel bakteri. Warna tersebut muncul seiring peningkatan konsentrasi Pb dalam medium, dan dapat menjadi indikator visual akumulasi logam. Beberapa bakteri memiliki kemampuan menyerap atau mengendapkan ion logam berat seperti Pb dalam bentuk kompleks tidak larut, misalnya PbS atau PbO, baik di dalam sitoplasma maupun di permukaan dinding sel (Huang, et al., 2021). Endapan logam yang terakumulasi ini dapat memunculkan perubahan warna koloni, tergantung pada jenis logam dan bentuk senyawa yang terbentuk. Selain itu, beberapa bakteri juga memproduksi pigmen atau senyawa fenolik sebagai respons terhadap stres logam berat, yang juga dapat berkontribusi pada perubahan warna menjadi coklat atau gelap (Marta et al., 2023). Fenomena ini menunjukkan bahwa warna koloni bukan sekadar sifat morfologi, tetapi bisa menjadi indikator aktivitas fisiologis dan mekanisme resistensi.

Analisis BLAST NCBI dan pohon filogenetik menunjukkan bahwa keenam isolat terbagi ke dalam dua kelompok yaitu *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Isolat B54, B56, B61, dan B62 memiliki tingkat kemiripan tinggi dengan *B. cereus* yakni berkisar antara 99,93-100%. Keempat isolat tersebut juga terletak dekat dengan klaster *B. cereus* dengan *strain* referensi seperti HJ-1, PM-57, LXJ131, HY-107, dan CT117. Sedangkan isolat B63 dan B64 masing-masing tingkat kemiripan sebesar 99.93% dengan *P. aeruginosa*. Kedua isolat tersebut juga terletak pada klaster *P. aeruginosa* dengan *strain* referensi seperti GG008, BDO603, C45, JBP-16, dan YONG-5. Konsistensi hasil BLAST dengan pohon filogenetik memperkuat validitas identifikasi keenam isolat tersebut.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat 19 isolat bakteri resisten tembaga yang berhasil diisolasi dari Sungai Matras. Sebanyak 16 isolat bakteri bersifat Gram negatif sedangkan 3 isolat bakteri bersifat Gram positif. Terdapat 1 bakteri dengan nilai MIC 6 mM dan 7 mM, masing-masing

adalah isolat A23 dan B55. Terdapat 2 bakteri yang memiliki nilai MIC 9 mM, yaitu isolat A34 dan A2, sedangkan bakteri yang memiliki nilai MIC 10 mM ada 1, yaitu A34. Sebagian besar isolat bakteri memiliki nilai MIC 13 mM, yaitu sebanyak 6 isolat, yaitu B51, B53, B54, B56, B61, dan B62. Dua isolat bakteri yang paling resisten adalah Isolat B63 dan B64 dengan nilai MIC sebesar 16 mM. Isolat bakteri B63 dan B64 memiliki multiresistensi terhadap timbal dan tembaga dengan nilai MIC 16 mM, yaitu tergolong resistensi tinggi. Hasil BLAST 16s rRNA dan pohon filogeni menunjukkan bahwa isolat B54, B56, B61, dan B62 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*, sedangkan isolat B63 dan B64 teridentifikasi sebagai *Pseudomonas aeruginosa*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh LPPM Universitas Pelita Harapan Tahun Anggaran 2022/2023 dengan nomor kontrak P-111-FIP/1/2023. Terima kasih kepada Jessica Marcelie mahasiswa Program Studi Bioteknologi Fakultas Sains dan Teknologi atas pemberian sampel air Sungai Matras.

KEPUSTAKAAN

- Afifah SH, Apriliana E, Setiawan G, Berawi KN. 2024. Antibacterial Activity of Green Tea Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Medical Profession Journal of Lampung* **14**(12): 2330-2335.
- Anggraeni A, Triajie H. 2021. Uji Kemampuan Bakteri (*Pseudomonas aeruginosa*) Dalam Proses Biodegradasi Pencemaran Logam Berat Timbal (Pb), di Perairan Timur Kamal Kabupaten Bangkalan. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan* **2**(3): 176–185.
- Armijn A, Soegianto A. 2020. Perbandingan Bioakumulasi Logam Berat Melalui Kontak Lingkungan pada Mangrove, Crustacea (*P. monodon*), dan Bivalvia (*Anadara* sp.) (Studi Kasus: Paparan Bahan Pencemar Lumpur Lapindo). *Paper Ekotoksikologi*: 1–9.
- Arnaouteli S, Ferreira AS, Schor M, Morris RJ, Bromley KM, Jo J, Cortez KL, Sukhodub T, Prescott AR, Dietrich LEP, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. 2017. Bifunctionality of a biofilm matrix protein controlled by redox state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**(30): E6184–E6191.
- Aznur BS, Nisa SK, Septriono WA. 2022. Agen Biologis Potensial untuk Bioremediasi Logam Berat. *Jurnal Maiyah* **1**(4): 186–198.
- Borthakur D, Rani M, Das K, Shah MP, Sharma BK, Kumar A. 2022. Bioremediation: An Alternative Approach for Detoxification of Polymers from the Contaminated Environment. *Letters in Applied Microbiology* **75**(4): 744–758.
- Das S, Dash HR, Chakraborty J. 2016. Genetic Basis and Importance of Metal Resistant Genes in Bacteria for Bioremediation of Contaminated Environments with Toxic Metal Pollutants. *Microbiology and Biotechnology* **100**(7): 2967-84.
- Dewa RP, Hadinoto S, Febry D, Torry R. 2015. Analisa Kandungan Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) pada Air Minum Dalam Kemasan di Kota Ambon. *Majalah Biam* **11**(2): 76–82.
- Fahrudin F, Tanjung RE. 2019. The Study of Bacteria Populations in Phytoremediation of Cadmium Using *Eichhornia crassipes*. *Journal of Physics: Conference Series* **1341**(2): 1–8.
- Farida AN, Dalyla. 2016. Peran Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas putida* dalam Bioremediasi Logam Berat (Fe, Cu, dan Zn) pada Tanah Tercemar Minyak Bumi. *Skripsi* 1–122.
- Fidiastuti HR, Suarsini E. 2017. The Potential of Indigenous Bacteria to Degrade Tanning Waste. *Jurnal* **3**(1): 1–10.
- Fitri L, Yasmin Y. 2020. Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. *Science of the Total Environment* **9**(1): 1–10.
- Hefdiyah, Shovitri M. 2014. Potensi Isolat Bakteri *Edwardsiella* dan *Corynebacterium* dari Pulau Pteran Sumenep sebagai Pelarut Fosfat. *Jurnal Teknik Pomits* **3**(2): E76–E79.
- Huang L, Wu C, Gao H, Xu C, Dai M, Hao H, Wang X, Cheng G. 2022. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics* **11**(4): 520.
- Irawati W, Hasthosaputro A, Kusumawati L. 2020. Multiresistensi dan Akumulasi *Acinetobacter* sp. IrC2 terhadap Logam Berat. *Jurnal Biologi Papua* **12**(2): 114–122.

- Mikdarullah M, Nugraha A. 2017. Teknik Isolasi Bakteri Proteolitik dari Sumber Air Panas Ciwidey, Bandung. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur* **15(1)**: 11–14.
- Nugraha MA, Pamungkas A, Syari IA, et al. 2022. Penilaian Pencemaran Logam Berat Cd, Pb, Cu, dan Zn pada Sedimen Permukaan Perairan Matras, Bangka. *Jurnal Kelautan Tropis* **25(1)**: 70–78.
- Nurcahyani N, Mayasari U, Nasution RA. 2024. Bioremediasi Timbal (Pb) Menggunakan Bakteri Indigenus dari Sungai Tercemar Limbah Pertambangan. *Journal of Biology Education, Science & Technology* **7(1)**: 218–224.
- Ratnawati E, Ernawati R, Naimah S. 2010. Teknologi Biosorpsi oleh Mikroorganisme sebagai Solusi Alternatif untuk Mengurangi Pencemaran Logam Berat. *Jurnal Kimia dan Kemasan* **32(1)**: 34.
- Williams CL, Neu HM, Gilbreath JJ, Michel SLJ, Zurawski DV, Merrell DS. 2016. Copper Resistance of the Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Applied and Environmental Microbiology* **82(20)**: 6174–6188.
- Zapotoczny S, Jurkiewicz A, Tylko G, Anielska T, Turnau K. 2007. Accumulation of Copper by *Acremonium pinkertoniae* Isolated from Industrial Wastes. *Microbiological Research* **162(3)**: 219–228.