

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI TOLERAN LOGAM BERAT Pb (TIMBAL)  
DAN Cu (TEMBAGA) DARI SEDIMEN MANGROVE DI MANGROVE TAPAK,  
SEMARANG**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA TOLERANT TO HEAVY METALS Pb (LEAD)  
AND Cu (COPPER) FROM MANGROVE SEDIMENTS AT MANGROVE TAPAK, SEMARANG**

**Achmad Baharudin\*, Niniek Widyorini, dan Diah Ayuningrum**

Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Departemen Sumberdaya Akuatik  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof Soedarto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah

\*Corresponden author email: achmadbaharudin84@gmail.com

Submitted: 12 August 2022 / Revised: 01 November 2022 / Accepted: 01 November 2022

<http://doi.org/10.21107/juvenil.v3i3.16368>

**ABSTRAK**

Ekosistem mangrove memiliki fungsi sebagai sedimen trap yang sering kali mengendapkan logam berat pada sedimen. Logam berat yang sering ditemukan pada sedimen mangrove yaitu logam Pb dan Cu. Logam ini juga ditemukan di ekosistem mangrove Tapak, Semarang. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui bakteri toleran pada logam berat dengan mengisolasi bakteri dari sedimen mangrove, melakukan uji logam berat dan melakukan uji molekuler. Sedimen diambil dari ekosistem mangrove Tapak, pada 3 titik menggunakan metode coring modifikasi. Metode yang digunakan saat pengambilan sedimen adalah metode purpose sampling. Penanaman bakteri dilakukan dengan metode pour plate dan streak plate. Isolasi dilakukan hingga didapatkan isolat tunggal murni. Isolat bakteri diidentifikasi dengan gen 16S rRNA menggunakan metode PCR. Hasil yang didapatkan 18 isolat bakteri dan terdapat 2 bakteri paling toleran logam berat, A1-b dan C1-a. Semua isolat bakteri merupakan gram positif dengan bentuk basil. Hasil identifikasi menunjukkan isolat A1.b memiliki kekerabatan terdekat dengan *Bacillus tropicus*. Hasil yang didapatkan ini selanjutnya dapat dilakukan penelitian untuk masa depan mengenai dapat yang ada terhadap kehidupan bakteri pada sedimen mangrove di kawasan mangrove Tapak.

**Kata kunci:** Bakteri, Isolasi, Mangrove, Logam Berat.

**ABSTRACT**

The mangrove ecosystem has a function as a sediment trap which often deposits heavy metals in the sediment. Heavy metals that are often found in mangrove sediments are Pb and Cu. This metal is also found in the Tapak mangrove ecosystem, Semarang. The purpose of this study was to determine the tolerant bacteria to heavy metals by isolating bacteria from mangrove sediments, conducting heavy metal tests and conducting molecular tests. Sediment was taken from the Tapak mangrove ecosystem, at 3 points using the modified coring method. The method used when taking sediment is a purpose sampling method. Bacterial cultivation was carried out by pour plate and streak plate methods. Isolation was carried out until a single pure isolate was obtained. Bacterial isolates were identified by the 16S rRNA gene using the PCR method. The results obtained were 18 isolates of bacteria and there were 2 bacteria that were the most tolerant of heavy metals, A1-b and C1-a. All bacterial isolates were gram positive with bacilli form. The identification results showed that isolate A1.b had the closest relationship with *Bacillus tropicus*. The results obtained can then be carried out for future research regarding the presence of bacteria in mangrove sediments in the Tapak mangrove area.

**Keywords:** Bacteria, Isolation, Mangroves, Heavy Metals.

**PENDAHULUAN**

Ekosistem mangrove merupakan ekosistem yang sangat dipengaruhi oleh pasang surut air

laut dan aliran sungai. Ekosistem mangrove memiliki keunikan sifat biologi dan fisik. Ekosistem mangrove merupakan habitat

penting bagi organisme laut (Karimah, 2017). Kondisi ekosistem mangrove yang merupakan keunikannya yaitu bersalinitas tinggi, tanah yang berlumpur, daerah pasang surut, kelembapan tinggi dan kondisi anaerobik. Produktivitas tinggi pada ekosistem mangrove dibanding dengan ekosistem lainnya memiliki kemampuan dekomposisi bahan organik yang tinggi dan menjadikan mata rantai ekologis sangat penting bagi kehidupan makhluk hidup yang berada pada ekosistem mangrove (Ilham dan Effendi, 2016).

Tempat hidup sebagian besar komunitas mikroba termasuk bakteri, jamur, dan protozoa yaitu ekosistem mangrove. Ekosistem mangrove memiliki keragaman yang tinggi dengan berbagai hewan, tanaman dan mikroorganisme yang ada. Keragaman yang tinggi menyebabkan kebutuhan nutrisi yang tinggi sehingga mikroorganisme bertanggung jawab terhadap proses degradasi dan pembentukan senyawa penting (Waluyo, 2018). Mikroorganisme mangrove memegang peran penting dalam membantu daur ulang dan transformasi berbagai nutrisi yang mempengaruhi ekosistem mangrove lebih produktif (Ratnakomala *et al.*, 2016).

Logam berat banyak ditemukan pada sedimen mangrove seperti logam berat timbal (Pb) dan tembaga (Cu). Sumber timbal (Pb) yang ada di perairan berasal dari industri baterai, industri kimia dan akibat pembakaran bahan bakar kendaraan (Sudarmaji *et al.*, 2006). Sumber tembaga (Cu) yang ditemukan di perairan berasal dari limbah cairan pembersih lantai, galangan kapal dan industri dan sumber alami Cu yang ada di alam berasal dari pengikisan Logam berat yang ada pada sedimen mangrove mengakibatkan matinya beberapa jenis-jenis mikroorganisme yang ada pada sedimen. Mikroorganisme memiliki kemampuan untuk mengasimilasi metabolit yang dapat mendegradasi polutan kompleks menjadi senyawa sederhana, mikroorganisme yang tahan terhadap racun logam berat yang ada di lingkungan karena sudah memiliki sifat resistensi (Thassitou dan Arvanitoyannis, 2001). Penelitian ini akan dilakukan uji kemampuan toleransi bakteri dari sedimen terhadap logam berat Pb dan Cu yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai agen hayati dalam degradasi logam berat dari ekosistem yang tercemar.

## MATERI DAN METODE

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2021 – Juli 2022. Tempat

pengambilan sampel sedimen mangrove di kawasan Ekowisata Mangrove Tapak, Tugurejo, Semarang dan inokulasi bakteri dilakukan di Laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu akuades, air laut steril, alkohol, media MA (*Marine Agar*), peptone, yeast extract, agar, agarose, primer universal meliputi primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') serta primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), (Weisburg, *et al.*, 1991). mix PCR (GoTaq Green Master Mix), ddH<sub>2</sub>O, TBE buffer, dan EtBr.

### Prosedur Penelitian Pengambilan Sampel

Sampel sedimen mangrove yang digunakan diambil dari sedimen mangrove Tapak, Kecamatan Tugurejo, Semarang. Pengambilan sedimen mangrove menggunakan pipa paralon modifikasi pada kedalaman 10 cm atau pada lapisan *top soil* yang memiliki bagian jumlah koloni bakteri yang lebih banyak (Pattolo *et al.*, 2020). Sampel diambil pada 3 stasiun dengan masing-masing stasiun memiliki 3 titik yang sudah ditentukan menggunakan teknik *purposive sampling* yang didasarkan keperluan dan pertimbangan tertentu oleh peneliti (Rosidanto *et al.*, 2017).

Sampel yang didapatkan selanjutnya dilakukan pengenceran 3 tingkat dengan akuades steril. Dilakukan dengan memasukan 9 ml air laut sterilisasi ke 3 tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mg sedimen sampel pada tabung pertama dan dihomogenisasi. Kemudian dari tabung pertama diambil 1 ml untuk dilakukan pengenceran ke tabung kedua dan untuk tabung ketiga perlakuan yang sama (Yunita, 2015).

### Isolasi Bakteri

Pembiakan bakteri dengan teknik *pour plate* dimana 1 ml sampel dimasukan ke cawan petri steril yang kemudian dituangkan media peptone yeast agar. Kemudian diinkubasi selama 1x24 pada suhu 29°C. Bakteri yang sudah tumbuh dilakukan purifikasi bakteri berulang sampai mendapatkan koloni tunggal dengan teknik gores (*streak plate method*) (Pamaya *et al.*, 2018)

### Skrining bakteri toleran logam berat

Skrining bakteri toleran logam berat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media peptone yeast agar yang ditambahkan logam berat sebanyak 70 ppm Pb dan medium agar lainnya dengan penambahan 30 ppm Cu. Penentuan konsentrasi logam berat ini didapat dari uji nilai kandungan logam berat Cu dan Pb yang ada di lapangan. Diamati setelah terinkubasi apakah bakteri masih bisa tumbuh di media yang berlogam berat bila masih dilakukan penanaman kembali ke media dengan konsentrasi 2 kali dari sebelumnya, hal tersebut terus dilakukan sampai mendapat konsentrasi logam berat tertentu yang mengakibatkan bakteri terdegradasi. Nilai tersebut nantinya menjadi konsentrasi paling rendah yang dapat menghambat pertumbuhan koloni atau disebut nilai MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) (Abidin et al., 2019).

### Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan identifikasi molekuler. Tahap awal melakukan ekstraksi DNA menggunakan metode Chelex (Sutrisno et al., 2013). Microtube steril yang telah disiapkan ditambahkan dengan 2-3 ose kultur bakteri berumur 24 jam. Microtube yang sudah diisi dengan isolate bakteri selanjutnya ditambahkan chelex 200 µL dan divortex selama 20 detik, kemudian disentrifugasi dalam kecepatan 13.000 rpm selama 20 detik. Microtube tersebut selanjutnya dimasukkan ke heating block dengan suhu 95°C selama 45 menit. Kemudian divortex kembali selama 20 detik. Suspensi bakteri selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Tahap terakhir yaitu memisahkan supernatan yang sudah terpisah dan dimasukkan microtube steril baru. Tahap kedua yaitu dilakukannya amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume sebanyak 25 µL. Komposisi bahan yang digunakan yaitu 1 µL *downstream* primer, 1 µL *upstream* primer, 2 µL DNA *template*, 12,5 µL GoTaq Green Master Mix dan 8,5 µL ddH<sub>2</sub>O. Proses PCR dilakukan dengan menargetkan gen 16S rRNA, menggunakan primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') serta primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Dos Santos et al., 2019). Siklus dalam melakukan PCR yaitu, *initial denaturation* pada suhu 95°C selama 2 menit, 30 kali *denaturation* pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, *extention* pada suhu 72°C

selama 1 menit, *final extention* pada suhu 72°C selama 5 menit, dengan suhu akhir 4°C. Tahap ketiga yaitu melakukan visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis. Hasil PCR sebanyak 3 µL dicampurkan dengan 2 µL *loading dye* kemudian diletakkan dalam sumur gel agarose 1%. Elektroforesis dilakukan dengan 100 voltase selama 30 menit. Proses selanjutnya yaitu melakukan perendaman gel agarose dalam ethidium bromide selama 30 menit untuk mewarnai pita DNA yang terperangkap di dalamnya. Pita DNA kemudian dapat dilihat dengan sinar UV pada Geldoc (Sutrisno et al., 2013).

### Analisis Data

Produk hasil PCR yang telah didapatkan kemudian dikirimkan ke PT Genetika Science (Jakarta, Indonesia) untuk menentukan sekuens gen 16S rRNA. Sekuens gen 16S rRNA yang telah diperoleh dilakukan pengeditan dengan pensejajaran sekuens dengan Clustal-W menggunakan software MEGA X. Sekuens yang memiliki banyak kemiripan dipotong pada ujung 5', ujung 3' atau keduanya (Anafarida dan Badruzsaufar, 2020). Sekuens yang telah sejajar, disamakan dengan data sekuens yang terdapat pada Gen Bank menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Benson et al., 1999).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi bakteri dari sedimen mangrove

Isolasi dilakukan menggunakan metode *pour plate* dengan media *peptone yeast agar* (peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, agar 15 g/L, agguades 1 L) (De Fretes et al., 2019). Sampel selanjutnya diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruangan (27°C) dan dilakukan pengamatan. Purifikasi dilakukan pada media *peptone yeast agar* yang berbeda hingga mendapatkan isolat tunggal murni.

### Penapisan Bakteri Toleran Logam Berat

Penapisan bakteri dilakukan dengan menggunakan media pepton yeast agar yang ditambahkan dengan garam logam berat Pb dan Cu. Penambahan garam logam Pb dimulai dari 70 ppm dan penambahan logam berat Cu dimulai dari 30 ppm. Penambahan dilakukan 2 kali lipat dari sebelumnya jika masih ada bakteri yang tumbuh hingga terdegradasi didapatkan yang toleran pada logam berat. Hasil penapisan logam berat pada **Tabel 1** menunjukkan isolat bakteri yang sedimen mangrove memiliki batasan nilai 70-560 ppm untuk Pb dan 30-120 ppm untuk Cu.

Tabel 1. Nilai Batasan Logam Berat terhadap Isolat

No.	Isolat Bakteri	Nilai Batasan Logam Berat (ppm)	
		Pb	Cu
1	A1.A	280	120
2	A1.B	560	120
3	A2.A	280	60
4	A2.B	-	-
5	A3.A	70	30
6	A3.B	140	60
7	B1.A	280	30
8	B1.B	280	-
9	B2.A	-	30
10	B2.B	280	60
11	B3.A	280	60
12	B3.B	280	30
13	C1.A	560	60
14	C1.B	280	60
15	C2.A	280	30
16	C2.B	280	60
17	C3.A	280	30
18	C3.B	280	60

Hasil isolasi bakteri dari sampel sedimen mangrove yang diperoleh sebanyak 18 isolat yang dapat tumbuh pada media *peptone yeast agar* dengan ditambahkan 280 ppm logam pb.



Gambar 1. Kemampuan 17 isolat bakteri yang tumbuh pada medium penambahan Pb 280 ppm

#### Identifikasi molekuler bakteri toleran logam berat

Hasil penelitian menunjukkan jika kemampuan mikroba berbeda-beda dalam ketahanan dalam logam berat. Ikhsan *et al.*, (2020) menjelaskan bahwa mikroba yang memiliki daya tahan terhadap logam berat karena

bakteri tersebut sudah mengalami perkembangan mekanisme detoksifikasi dan respirasi yang menggunakan logam berat. Mikroba tersebut merupakan mikroba yang sudah beradaptasi dengan lingkungan terkontam logam berat dengan menghilangkan efek racun dari logam berat yang ada.

Berdasarkan hasil Identifikasi molekuler bakteri toleran logam berat dimulai dari pemilihan sampel yang toleran dengan logam berat Pb dan Cu. Sampel yang didapatkan yaitu A1.B. Uji molekuler yang telah dilakukan hingga tahap analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) pada GenBank. Hasil yang didapatkan spesies *Bacillus tropicus*. Menurut Jamilah dan Amri (2014), bahwa *Bacillus tropicus* merupakan kelompok yang mampu melakukan remediasi logam berat, bakteri lain sebagai contoh yaitu *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, dan *Escherichia coli*. Kapang, contohnya yaitu *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus stolonifer* dan *Aspergillus oryzae*, sementara khamir, contohnya yaitu *Saccharomyces cerevisiae*.

#### KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa jumlah isolat bakteri

terdiri 18 isolat. Isolat bakteri yang toleran pada logam berat memiliki kode isolat A1.B dan C1.A dengan batas nilai konsentrasi logam berat Pb 560 ppm dan logam berat Cu 120 ppm. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat A1.B merupakan bakteri *Bacillus tropicus*.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada LPPM Universitas Diponegoro yang telah membiayai penelitian ini dengan No. Kontrak 185-71/UN7.6.1/PP/2021 skema Riset Publikasi Internasional (RPI).

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, A. Z., Renjana, E., & Fatimah, N. M. 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 Ability of *Micrococcus* sp. LII61 Strain toward. *Bioedukasi: Jurnal Pendidikan Biologi*, 12(1), 66-73.
- de Fretes, C. E., Sutiknowati, L. I., & Falahudin, D. (2019). Isolasi dan identifikasi bakteri toleran logam berat dari sedimen mangrove di Pengudang dan Tanjung Uban, Pulau Bintan, Indonesia. *OLDI (Oseanologi dan Limnologi di Indonesia)*, 4(2), 71-77.
- Imran, A., & Efendi, I. (2016). Inventarisasi mangrove di pesisir pantai cemara Lombok Barat. *JUPE: Jurnal Pendidikan Mandala*, 1(1), 105-112.
- Jamilah, J., & Amri, A. Analisis Bakteri Pengakumulasi Logam Berat Timbal (Pb) di Tanah Pembuangan Limbah Industri Non-Pangan. *Celebes Biodiversitas*, 2(2), 7-13.
- Karimah, K. (2017). Peran Ekosistem Hutan Mangrove sebagai Habitat untuk Organisme Laut. *Jurnal Biologi Tropis*, 51-57.
- Pamaya, D., Muchlissin, S.I., Maharani, E. T. W., Darmawati, S. dan Ethica, S.N. (2018). Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protase *Bacillus Amylolyquefaciens* Irod2 pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 48 Jam. *Jurnal Unimus*, 1(1), 40-46.
- Ratnakomala, S., Apriliana, P., Fahrurrozi, F., Lisdiyanti, P., & Kusharyoto, W. (2016). Aktivitas Antibakteri Aktinomisetes Laut Dari Pulau Enggano. *Jurnal Ilmu-ilmu Hayati*, 15(3), 275-283.
- Rosdianto, H., Murdani, E. dan Hendra. (2017). The implementation of POE (Predict Observe Explain) model to improve student's concept understanding on Newton's law. *Jurnal Pendidikan Fisika*, 6(1), 55-57.
- Sutrisno, I. K., Arundina, I., & Sosiawan, A. (2013). Identifikasi bite marks dengan ekstraksi DNA metode Chelex. *Dental Jurnal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 46(2), 107-112.
- Waluyo, L. (2018). *Bioremediasi Limbah: Limbah* (Vol. 1). UMMPress.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Yunita. S. (2015). *Uji Kemampuan Bakteri Bacillus S1 dan Azotobacter S8 untuk Meremoval Logam Berat Kromium*. (Doctoral dissertation, Institut Teknologi Sepuluh Nopember).