

**PERAN METALLOTHIONEIN TERHADAP KEMAMPUAN
RESISTENSI LOGAM BERAT PADA BAKTERI**

SKRIPSI

OLEH:

Azmi Zaki Waliudin Althaf

175100501111002

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Bioteknologi**



**JURUSAN TEKNOLOGI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2020

HALAMAN PERSETUJUAN

Judul : Peran Metallothionein Terhadap Kemampuan Resistensi Logam Berat Pada Bakteri
Nama Mahasiswa : Azmi Zaki Waliudin Althaf
NIM : 175100501111002
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian



Dosen Pembimbing,

Ir. Aji Sutrisno M. Sc, Ph. D

NIP. 196802231993031002

Tanggal Persetujuan: 29 Juli 2021



HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Peran Metallothionein Terhadap Kemampuan Resistensi Logam Berat Pada Bakteri
Nama Mahasiswa : Azmi Zaki Waliudin Althaf
NIM : 175100501111002
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I,

Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.si
NIP. 196206121987031031

Dosen Penguji II,

Agustin Krisna Wardani, Ph. D
NIP. 196908071997022001

Dosen Pembimbing,

Ir. Aji Sutrisno M. Sc, Ph. D
NIP. 196802231993031002

Ketua Jurusan,



Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP., MP
NIP. 197005041999032002

Tanggal Lulus: 28 Juli 2021



HALAMAN RIWAYAT HIDUP

Azmi Zaki Waliudin Althaf lahir di Jombang, 29 Desember 1998 dari pasangan Ibunda Anis Satus Syarifah dan Ayahanda Supriyanto. Penulis adalah anak terakhir dari dua bersaudara. Kakak penulis bernama Iklil Rif'at Rifdah Mardhiyah. Penulis saat ini tinggal di Dusun Butuh Desa Panwangi Kecamatan Diwek Kabupaten Jombang. Penulis telah menyelesaikan jenjang pendidikan Taman Kanak-Kanak (TK) Ar-Rahman pada tahun 2005, Sekolah Dasar Islam (SDI) Roushon Fikr pada 2006-2011, Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 3 Peterongan pada 2011-2014, dan Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 2 Jombang pada 2014-2017.

Penulis melanjutkan studi pada tahun 2017 di Universitas Brawijaya melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) sebagai mahasiswa Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Program Studi Bioteknologi. Selama berkuliah di Universitas Brawijaya penulis aktif berorganisasi di *Agritech Business Center* (ABC), *English for Specific Purposes* (ESP), dan Dewan Perwakilan Mahasiswa Fakultas Teknologi Pertanian. Penulis pernah menjadi Ketua Pelaksana Pemilihan Ketua Himpunan 2018, *Steering Committee* Orientasi Pengenalan Jurusan dan Himpunan Teknologi Hasil Pertanian 2019, dan Ketua Dewan Perwakilan Mahasiswa FTP UB 2020. Penulis juga pernah menjadi finalis *Entrepreneurs Days 2018* yang diadakan oleh Universitas Darussalam Gontor.

AZMI ZAKI WALIUDIN ALTHAF. 17510050111002. PERAN METALLOTHIONEIN TERHADAP KEMAMPUAN RESISTENSI LOGAM BERAT PADA BAKTERI

RINGKASAN

Saat ini pencemaran lingkungan yang terjadi mencapai tahap yang mengkhawatirkan. Industri merupakan salah satu faktor yang menyumbang polusi dan mengakibatkan pencemaran di dunia. Salah satu polusi berbahaya yang mencemari lingkungan adalah logam berat. Pencemaran logam berat dapat diatasi dengan bioremediasi. Bioremediasi sangat bergantung terhadap bioremediator yang resisten terhadap zat pencemar. Salah satu agen bioremediasi yang memiliki kemampuan khusus terhadap resistensi logam berat adalah bakteri.

Bakteri mampu hidup di hampir seluruh jenis lingkungan termasuk di lingkungan yang tercemar. Bakteri yang dapat hidup dan berkembang di lingkungan tercemar memiliki kemampuan khusus yang membuatnya tahan terhadap paparan logam, kemampuan tersebut didukung oleh protein-protein khusus yang dimiliki oleh bakteri. Salah satu protein khusus yang dimiliki bakteri untuk mempertahankan resistensinya terhadap logam berat adalah metallothionein. Metallothionein mampu mengikat logam sehingga tidak logam jadi tidak membahayakan bagi bakteri. *Literatur review* ini mengkaji mengenai struktur, fungsi, mekanisme metallothionein dalam resistensi terhadap logam berat, mekanisme ekspresi metallothionein oleh bakteri, dan faktor-faktor yang memengaruhi produksi metallothionein oleh bakteri. *Literatur review* yang dilakukan dengan mencari dan mengolah berbagai jurnal serta penelitian yang ada untuk mendapatkan gambaran mengenai suatu topik.

Hasil *literatur review* ini adalah terdapat bakteri yang resisten logam berat, terutama bakteri gram positif. Bakteri-bakteri tersebut memiliki tingkat resistensi yang berbeda-beda. Kemunculan bakteri resisten bisa disebabkan oleh dua faktor yaitu faktor lingkungan dan genetik. Lingkungan berperan sebagai *environmental pressure* yang menyeleksi makhluk hidup yang mampu bertahan hidup. Faktor genetik terjadi karena adanya mutasi bakteri dan transfer gen horizontal. Interaksi antara faktor lingkungan dan faktor genetik yang cocok bisa menentukan resistensi suatu bakteri.

Salah satu protein yang berperan dalam resistensi terhadap logam adalah protein metallothionein. Metallothionein adalah protein yang kaya akan asam amino sistein yang memiliki kemampuan untuk mengikat ion logam berat. Bakteri yang memproduksi metallothionein memiliki kemampuan resistensi lebih besar terhadap logam berat daripada bakteri yang tidak memproduksi metallothionein. Gugus thiol pada asam amino sistein yang merupakan salah satu asam amino penyusun metallothionein akan mengikat ion logam berat sehingga ion logam terperangkap dan menjadi kurang reaktif. Metallothionein pada

Cyanobacteria dikode oleh *smt* operon. Gen yang bertanggung jawab terhadap ekspresi metallothionein adalah *smtB*. Saat tidak terdapat ion logam berat, *smtB* akan terikat dengan operator sehingga RNA polymerase tidak dapat mentranskripsi kodon sehingga metallothionein tidak bisa diproduksi. Saat terdapat ion logam berat maka ion logam akan berikatan dengan *smtB* sehingga konformasi *smtB* berubah. *smtB* kemudian akan terlepas sehingga RNA polymerase dapat melakukan transkripsi dan metallothionein bisa diproduksi oleh bakteri. Produksi metallothionein oleh bakteri dapat diinduksi oleh beberapa hal yaitu konsentrasi kontaminan, lama inkubasi, dan jenis metallothionein.

Kata Kunci : logam berat, metallothionein, dan bakteri



KATA PENGANTAR

Puji syukur dihaturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan kasih sayang yang tiada terkira sehingga bisa menyelesaikan proposal tugas akhir skripsi dengan judul "Peran Metallothionein Terhadap Kemampuan Resistensi Logam Berat Pada Bakteri". Selanjutnya, terimakasih juga disampaikan kepada seluruh pihak yang telah membantu dan membimbing dalam penyusunan laporan ini, terutama kepada:

1. Dr. Widya Dwi Rukmi, STP., MP selaku ketua jurusan Teknologi Hasil Pertanian (THP)
2. Tunjung Mahatmanto, STP., M. Si., Ph.D selaku ketua program studi Bioteknologi
3. Dr. Ir. Aji Sutrisno, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi
4. Ibunda Anis Satus Syarifah dan Ayahanda Supriyanto selaku orang tua yang telah memberi dukungan baik secara langsung maupun tidak langsung
5. Keluarga *Steering Committee* OPJH THP 2019 yang telah memberikan dukungan moral selama proses pengerjaan skripsi.

Semoga laporan proposal tugas akhir skripsi ini dapat memberikan penjelasan yang lengkap tentang peran metallothionein terhadap kemampuan resistensi bakteri, sehingga dapat bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 01 Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSETUJUAN	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN RIWAYAT HIDUP	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	ii
HALAMAN RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah	2
1.3. Tujuan.....	2
1.4. Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Logam Berat	4
2.1.1. Dampak Logam Berat Terhadap Manusia.....	5
2.1.2 Dampak Logam Berat Terhadap Lingkungan.....	7
2.2 Bioremediasi	9
2.2.1 Klasifikasi Bioremediasi	9
2.2 Bakteri	13
BAB III METODE PELAKSANAAN	16
3.1 Waktu Pelaksanaan.....	16
3.2 Metode Penelitian	16
3.2.1 Pencarian Literatur.....	16
3.2.2 Pemilihan Literatur	16
3.3.3 Analisis Data.....	17
BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN.....	18
4.1 Bakteri Resisten Logam Berat.....	18
4.1.1 Faktor-Faktor Penentu Resistensi Bakteri Terhadap Logam Berat.....	19
4.1.1.1 Faktor Eksternal.....	19
4.1.1.2 Faktor Internal.....	22
4.2 Metallothionein.....	26
4.2.1 Struktur dan Klasifikasi Metallothionein.....	26
4.2.2 Peran Metallothionein terhadap Resistensi Bakteri.....	32
4.2.3 Mekanisme Metallothionein Mengikat Logam Berat.....	37
4.2.3 Mekanisme Ekspresi Metallothionein.....	42

4.2.4 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Produksi Metallothionein Bakteri.....	47
4.3 Peluang Bakteri Penghasil Metallothionein Sebagai Bioremediator	51
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
5.1 Kesimpulan.....	52
5.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN.....	61



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Toksisitas nikel (Ni) terhadap tanaman..... 8

Gambar 2.1. Tingkat kematian *Daphnia magna* yang diberi pakan yang telah dicampur logam berat..... 9

Gambar 3.1. Tahapan pemilihan literatur..... 17

Gambar 4.1. Hasil pengujian PCR plasmid bakteri *Pseudomonas aeruginosa* WI-1 22

Gambar 4.2. Hasil pengujian plasmid pada bakteri *Enterococcus faecalis* yang diisolasi dari Sungai Kizilimark 23

Gambar 4.3. Siklus litik dan lisogenik dari *bakteriophage* 25

Gambar 4.4. Profil asam amino berbagai jenis metallothionein 27

Gambar 4.5. Struktur metallothionein..... 28

Gambar 4.6. Struktur 3D metallothionein 28

Gambar 4.7. Sekuens asam amino dari seluruh famili metallothionein 31

Gambar 4.8. Susunan asam amino dari berbagai metallothionein 32

Gambar 4.9. Berbagai mekanisme resistensi bakteri terhadap logam..... 34

Gambar 4.10. Hasil PCR *Providencia vemicola* strain SJ2A 35

Gambar 4.11. Grafik pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 yang ditambahkan gen penghasil metallothionein di media yang mengandung cadmium (Cd) 36

Gambar 4.12. Grafik pengaruh metallothionein terhadap pertumbuhan bakteri..... 37

Gambar 4.13. Struktur metallothionein tikus mengikat seng (Zn) dan cadmium (Cd) 38

Gambar 4.14. Model molekuler Cd- β hMT 38

Gambar 4.15. Proses metilasi metallothionein kooperatif dan non kooperatif..... 39

Gambar 4.16. Intensitas relatif dari α dan β metallothionein..... 40

Gambar 4.17. Hasil pengukuran massa spektrometri Zn-MT2a 41

Gambar 4.18. Hasil pengukuran massa spektrometri Zn-MT1a 42

Gambar 4.19. Mekanisme kerja berbagai faktor transkripsi 44

Gambar 4.20. Hasil *alignment* protein *smtB* pada beberapa bakteri..... 45

Gambar 4.21. Mekanisme ekspresi *smtA* dan *smtB*..... 46

Gambar 4.22. Ekspresi gen *bmtA* *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 pada berbagai konsentrasi timbal (Pb) 47

Gambar 4.23. Ekspresi gen *bmtA* *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 pada berbagai jenis logam..... 47

Gambar 4.24. Produksi metallothionein oleh bakteri..... 48

Gambar 4.25. Hasil elektroforesis gen bakteri *Anabaena* sp. strain PCC 7120 yang ditumbuhkan dari berbagai media..... 50

Gambar 4.26. Keaktifan gen *smtA* *Syechoccus* sp. IU 625..... 50



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Densitas logam berat 4

Tabel 2.2. Logam berat esensial dan non esensial 6

Tabel 3.1. Kata kunci untuk pencarian literatur 16

Tabel 4.1. Jenis bakteri resisten timbal (Pb) yang diisolasi dari lingkungan industri 18

Tabel 4.2. Komposisi kimia limbah cair dari industri elektronik 19

Tabel 4.3. Hubungan antara jumlah bakteri heterotrof dan kadar logam berat sampel asal bakteri 21

Tabel 4.4. Jenis-jenis *smtB* dan situs pengikatannya 45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Penelusuran literatur 63

Lampiran 2 Jurnal Utama 66



BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Menurut Undang-Undang Nomor 32 tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup, pencemaran lingkungan adalah kontaminasi yang terjadi pada lingkungan akibat kegiatan manusia yang berakibat perubahan kualitas lingkungan hidup. Perubahan kualitas lingkungan ditunjukkan dengan perubahan mutu lingkungan dengan baku mutu lingkungan. Baku mutu lingkungan adalah standar kualitas lingkungan yang berisi kadar atau jumlah berbagai komponen yang ada harus ada dalam lingkungan dan/atau berbagai pencemar yang dapat ditoleransi oleh lingkungan hidup.

Kerusakan lingkungan membawa dampak yang buruk. Salah satu efek kerusakan lingkungan adalah kematian biota-biota yang hidup di dalam suatu lingkungan. Pada tahun 2017 terjadi kematian massal ikan yang dibudidayakan di Waduk Cirata yang terletak di daerah aliran sungai Citarum. 65 ton ikan mati akibat pencemaran lingkungan yang besar, sebesar 390.848 ton limbah dibuang ke perairan tersebut, sehingga kualitas air menurun (Nastiti *et al.*, 2018).

Salah satu limbah yang paling berbahaya adalah limbah bahan berbahaya dan beracun (limbah B3). Menurut Undang-Undang Nomor 32 tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup, limbah B3 adalah limbah yang berasal dari sisa kegiatan manusia yang mengandung bahan berbahaya dan beracun (B3). Contoh limbah B3 yang sering ditemukan di sungai adalah logam berat. Beberapa logam berat yang dapat ditemukan di perairan yang tercemar adalah kadmium (Cd), timbal (Pb), tembaga (Cr), dan lain sebagainya.

Bioakumulasi logam berat pada manusia akan menyebabkan manusia mengalami keracunan. Salah satu peristiwa keracunan logam berat yang terkenal adalah peristiwa Minamata pada tahun 1953 – 1975. Masyarakat di Teluk Minamata, Jepang mengalami keracunan akibat memakan ikan yang telah tercemar limbah logam berat yaitu merkuri (Hg). Peristiwa keracunan logam berat juga pernah terjadi di Indonesia pada tahun 2004 di Teluk Buyat Sulawesi Utara. Masyarakat mengalami penyakit aneh seperti benjolan pada tubuh yang berisi nanah karena memakan ikan yang berasal dari perairan yang telah tercemar merkuri (Hg) (Agustina, 2014).

Sudah banyak metode yang dilakukan oleh manusia untuk mengatasi pencemaran logam berat, salah satu metode yang dilakukan adalah bioremediasi. Bioremediasi lebih dipilih untuk meremediasi logam berat dibandingkan metode remediasi logam berat yang lain karena lebih murah, cepat, dan efektif (Gupta dan Walther, 2014).

Agen bioremediasi yang sering digunakan adalah bakteri karena bakteri lebih mudah pengembangbiakannya dibandingkan organisme lain. Bakteri dikenal sebagai makhluk

hidup bisa hidup di hampir semua tempat di bumi, termasuk dalam sungai yang tercemar logam berat. Bakteri yang hidup di lingkungan yang tercemar logam berat akan beradaptasi dengan mengembangkan kemampuan-kemampuan khusus agar mampu bertahan hidup. Kemampuan khusus yang dikembangkan oleh bakteri tersebut adalah kemampuan meremediasi logam berat. Kemampuan meremediasi logam berat pada bakteri bisa dimanfaatkan untuk bioremediasi logam berat. Beberapa contoh bakteri yang hidup di lingkungan tercemar dan mampu meremediasi logam berat di antaranya *Exiguobacterium aestuarii* yang bisa meremediasi cadmium (Cd) sebanyak 99% (Bhakta *et al.*, 2014) dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang bisa meremediasi timbal (Pb) sebanyak 0,15 ppm saat diinkubasi di media yang mengandung timbal (Pb) 1 ppm selama 72 jam (Citra, 2015).

Bakteri-bakteri yang mampu hidup di lingkungan tercemar memiliki kemampuan resistensi khusus yang membuatnya resisten terhadap logam berat. Salah satu mekanisme khusus tersebut adalah metallothionein. Metallothionein adalah protein yang mampu mengikat ion logam berat dalam tubuh organisme prokariotik maupun eukariotik.

Penelitian mengenai mekanisme metallothionein terhadap resistensi organisme telah banyak dilakukan, baik resistensi terhadap H_2O_2 ataupun agen ion logam berat. Namun terdapat beberapa topik dalam banyak *literatur review* yang belum dibahas, yaitu mengenai faktor-faktor yang memengaruhi produksi metallothionein pada bakteri. Oleh karena itu *literatur review* ini akan membahas mengenai peran metallothionein terhadap resistensi bakteri dan faktor-faktor yang memengaruhi produksi metallothionein oleh bakteri serta peluang bakteri penghasil metallothionein sebagai bioremediator.

1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikemukakan dalam *literatur review* ini adalah:

- a. Faktor-faktor apa yang menentukan resistensi bakteri terhadap logam berat?
- b. Bagaimana struktur dan klasifikasi metallothionein?
- c. Bagaimana pengaruh metallothionein terhadap resistensi bakteri?
- d. Bagaimana metallothionein mengikat logam berat?
- e. Bagaimana mekanisme ekspresi metallothionein?
- f. Faktor-faktor apa yang memengaruhi produksi metallothionein pada bakteri?

1.3. Tujuan

Tujuan yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui faktor-faktor yang menentukan resistensi bakteri terhadap logam berat.
- b. Mengetahui struktur dan klasifikasi metallothionein.

- c. Mengetahui pengaruh metallothionein terhadap resistensi bakteri
- d. Mengetahui mekanisme metallothionein mengikat logam berat.
- e. Mengetahui mekanisme ekspresi metallothionein.
- f. Mengetahui faktor-faktor yang memengaruhi produksi metallothionein pada bakteri.

1.4. Manfaat

Manfaat yang didapatkan setelah penelitian ini adalah menambah informasi mengenai potensi-potensi metallothionein sebagai protein yang memicu kemampuan resistensi bakteri sehingga bisa semakin dimanfaatkan dan dikembangkan.



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Logam Berat

Secara umum unsur di dalam tabel periodik dibagi menjadi golongan logam dan non logam. Logam memiliki sifat utama mudah menghantarkan panas dan listrik dibandingkan unsur kimia lain dalam tabel periodik. Selain itu, logam juga memiliki ciri-ciri mengkilat jika dilihat dengan mata (Rosihan dan Husaini, 2017).

Berdasarkan densitas atau massa jenis, logam dapat dibagi menjadi dua yaitu logam berat dan logam ringan. Logam ringan adalah logam yang memiliki densitas kurang dari sama dengan 5 g/cm^3 , sedangkan logam berat adalah logam yang memiliki densitas lebih dari 5 g/cm^3 (Koller dan Saleh, 2018). Pada Tabel 2.1 ditunjukkan contoh logam berat beserta densitas atau massa jenisnya. Logam berat digolongkan sebagai unsur yang berbahaya karena beberapa hal yaitu sulit didegradasi, mudah terakumulasi di tubuh suatu organisme, dan mudah terakumulasi di sedimen. Selain itu, logam berat juga memiliki banyak efek negatif baik bagi manusia ataupun lingkungan.

Tabel 2.1. Densitas logam berat

Logam Berat	Densitas	Sumber
Merkuri (Hg)	$13,534 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021c)
Timbal (Pb)	$11,34 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021h)
Tembaga (Cu)	$8,94 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021f)
Nikel (Ni)	$8,908 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021j)
Cobalt (Co)	$8,9 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021a)
Cadmium (Cd)	$8,69 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021d)
Besi (Fe)	$7,87 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021b)
Chromium (Cr)	$7,14 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021e)
Seng (Zn)	$7,133 \text{ gram/cm}^3$	(National Center for Biotechnology Information, 2021g)

Arsenik (As) 5,778 gram/cm³ (National Center for Biotechnology Information, 2021i)

Saat ini terjadi peningkatan logam berat secara signifikan di lingkungan. Hal ini terjadi akibat aktivitas manusia seperti pertambangan, penggunaan zat-zat berbahaya untuk peralatan sehari-hari, dan lain sebagainya. Secara alami logam berat sudah ada di bumi, tetapi berada di dalam bumi. Saat terjadi letusan gunung berapi, berbagai logam berat keluar dari bumi. Namun, efek letusan gunung berapi terhadap keberadaan logam berat di bumi tidak terlalu besar jika dibandingkan efek kegiatan manusia terhadap adanya logam berat di lingkungan.

Logam berat secara umum dipisahkan menjadi dua yaitu logam berat yang esensial dan non esensial. Logam berat esensial adalah logam berat yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit untuk metabolisme makhluk hidup tetapi berbahaya jika jumlahnya besar, sedangkan logam berat non esensial adalah logam berat yang sampai saat ini belum ditemukan manfaatnya bagi manusia sehingga dianggap sangat beracun bagi manusia walaupun dalam jumlah sedikit. Contoh logam berat esensial dan non esensial ditunjukkan pada Tabel 2.2 (Rosihan dan Husaini, 2017).

Tabel 2.2. Logam berat esensial dan non esensial (Rosihan dan Husaini, 2017)

Logam berat esensial	Logam berat non esensial
Tembaga (Cu)	Timbal (Pb)
Selenium (Se)	Merkuri (Hg)
Besi (Fe)	Arsenik (As)
Seng (Zn)	Cadmium (Cd)

2.1.1. Dampak Logam Berat Terhadap Manusia

Logam berat merupakan logam yang berbahaya karena memiliki banyak efek samping bagi manusia. Logam berat yang digolongkan sebagai logam berat non esensial memiliki efek negatif bagi manusia walaupun dalam jumlah sedikit. Logam berat yang terakumulasi dalam tubuh akan menimbulkan dampak negatif bagi berbagai sistem yang ada dalam tubuh seperti sistem saraf, sistem peredaran darah, dan sistem ekskresi.

Salah satu logam berat yang memiliki dampak negatif cukup besar yaitu timbal (Pb). Timbal (Pb) dapat meningkatkan radikal bebas pada manusia. Peningkatan radikal bebas yang disebabkan oleh timbal (Pb) terjadi karena terdapat ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan yang terbentuk dengan jumlah radikal bebas yang ada. Ketidakseimbangan antara antioksidan yang terbentuk dengan radikal bebas yang ada dinamakan stres



oksidatif. Stres oksidatif yang terjadi akan menimbulkan reaksi berantai pada sel yang ada dalam tubuh manusia sehingga akan menimbulkan banyak penyakit (Bhat, 2019).

Manusia memiliki antioksidan alami yaitu *Glutathione* (GSH). GSH adalah tripeptida γ -L-glutamyl-L-gliserine yang bertugas menangkal radikal bebas baik yang berasal dari luar tubuh manusia atau dari dalam tubuh manusia. Pada kondisi normal GSH akan merubah radikal bebas yaitu $O_2^{\cdot-}$ menjadi H_2O_2 dan O_2 dengan cara mendonorkan elektronnya sehingga GSH teroksidasi menjadi GSSG. Reaksi tersebut dikatalisis oleh enzim GSH peroksidase (GPx). Reaksi GSH menjadi GSSG adalah reaksi yang timbal balik di mana setelah GSH menjadi GSSG kemudian GSSG akan berubah menjadi GSH kembali oleh enzim GSSG reduktase H_2O_2 kemudian akan dirubah menjadi H_2O dan O_2 oleh enzim katalase (Lu, 2013).

Timbal (Pb) dapat menghambat proses penetralan $O_2^{\cdot-}$ dengan cara berikatan dengan GSH. Salah satu struktur GSH adalah gugus thiol. Jika terdapat Pb^{2+} maka gugus thiol akan berikatan dengan Pb^{2+} sehingga GSH tidak dapat mengikat $O_2^{\cdot-}$ (Debnath *et al.*, 2019). Hal itu akan menimbulkan reaksi berantai yang bisa berakibat pada kerusakan sel karena terjadi peroksidasi lipid di membran sel. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang menyatakan bahwa kadar GSH dalam tubuh berbanding terbalik dengan kadar *Blood Lead Level* (BLL) (Jangid *et al.*, 2016).

Gangguan lain yang disebabkan oleh logam berat banyak disebabkan karena sifatnya yang reaktif, terutama saat berada dalam bentuk ion bivalen positif. Ion bivalen positif adalah ion logam yang memiliki kelebihan dua proton atau kekurangan dua elektron sehingga akan berusaha bereaksi dengan ion lain yang memiliki muatan negatif. Beberapa contoh ion logam bivalen positif adalah Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , dan Pb^{2+} . Salah satu reaksi negatif yang ditimbulkan akibat adanya ion logam bivalen positif dalam tubuh manusia adalah adanya kompetisi antar ion logam dalam tubuh untuk berikatan dengan enzim. Pada keadaan normal, manusia memiliki banyak enzim yang membutuhkan kofaktor berupa ion-ion tertentu yang digunakan untuk mengaktifkan enzim seperti kalsium (Ca^{2+}) dan besi (Fe^{2+}). Jika dalam tubuh manusia terdapat banyak ion logam lain seperti ion timbal (Pb) maka kemungkinan ion-ion yang seharusnya berikatan dengan enzim menjadi tidak bisa berikatan dengan enzim karena dikalahkan oleh ion timbal. Enzim yang berikatan dengan kofaktor yang tidak sesuai dengan kofaktor asli enzim akan membuat struktur enzim berubah, perubahan struktur pada enzim tersebut menyebabkan enzim menjadi tidak aktif bahkan bisa merusak enzim (Flora *et al.*, 2012).

Kerusakan enzim yang diakibatkan oleh pengikatan enzim dengan ion timbal akan menimbulkan gangguan pada kerja enzim. Salah satu contoh gangguan kerja enzim yang diakibatkan oleh ion timbal terjadi pada enzim *Delta Aminolevulinic Dehydrase* (ALAD) yang bertanggung jawab terhadap pembentukan hemoglobin dalam darah. Gangguan pada

ALAD akan membuat produksi hemoglobin menurun. Penurunan hemoglobin akan membuat seseorang terserang anemia atau penyakit kekurangan darah merah. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan tahun 2010 dengan 60 responden anak-anak. Penelitian itu menyatakan bahwa terdapat hubungan antara kadar timbal yang tinggi dengan penyakit anemia yang terjadi (Hegazy *et al.*, 2010).

Logam berat alumunium terbukti membawa dampak yang buruk yaitu mengurangi kecerdasan. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa alumunium klorida ($AlCl_3$) yang masuk ke tubuh makhluk hidup, terutama mamalia bisa mengurangi sambungan-sambungan antar sel otak dan meningkatkan terjadinya neuroinflamasi. Efek dari pengurangan sambungan-sambungan antar sel otak adalah berkurangnya kecerdasan dan daya ingat terhadap sesuatu (Cao *et al.*, 2016).

Orang yang banyak memakan makanan yang telah terkontaminasi oleh logam berat, tubuhnya akan terakumulasi dengan logam berat. Suatu penelitian di daerah Cina menyebutkan bahwa anak-anak yang lebih sering memakan ikan yang berasal dari sungai yang tercemar memiliki kadar merkuri lebih tinggi dibandingkan dengan anak-anak yang lebih jarang memakan ikan dari sungai yang tercemar (Gao *et al.*, 2018). Akumulasi merkuri dalam tubuh memiliki banyak dampak negatif seperti gangguan pada saraf, darah, dan ginjal.

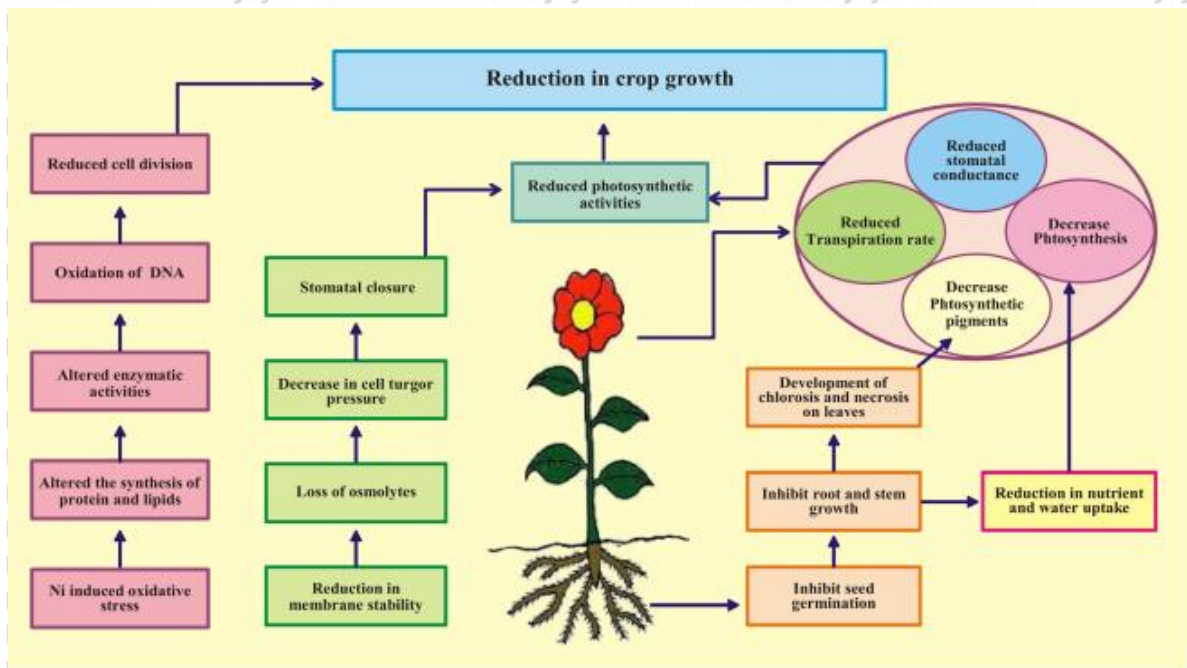
Merkuri (Hg) memiliki dampak yang buruk bagi ibu hamil. Merkuri yang tertelan (masuk melalui mulut) akan diserap oleh saluran cerna kemudian akan diikat oleh darah. Merkuri (Hg) akan membentuk ikatan dengan hemoglobin dan ikut mengalir ke dalam tubuh. Merkuri (Hg) lalu akan masuk melalui plasenta yang menghubungkan antara ibu dan janin. Merkuri (Hg) yang masuk dan berikatan dengan protein tubulin. Ikatan antara merkuri (Hg) dan tubulin inilah yang akan menyebabkan banyak pembelahan sel yang dialami oleh janin menjadi tidak normal (Andreoli dan Sprovieri, 2017).

2.1.2. Dampak Logam Berat Terhadap Lingkungan

Logam berat yang terakumulasi di lingkungan memiliki pengaruh buruk baik bagi tanaman maupun hewan. Logam akan terakumulasi di lingkungan, baik tanah, air, maupun udara. Akumulasi logam di lingkungan akan menyebabkan berbagai gangguan jika masuk ke dalam tubuh hewan dan tumbuhan. Hewan dan manusia akan mengalami kecacatan jika terkena paparan logam berat berbahaya dalam jumlah besar atau waktu yang lama. Keduanya dapat mengalami keracunan logam berat jika ia berada di lingkungan yang tercemar logam berat (Boldyrev, 2018).

Nikel (Ni) merupakan salah satu logam berat esensial, tetapi jika jumlah nikel (Ni) terlalu banyak maka akan timbul banyak dampak negatif. Beberapa dampak negatif pemberian nikel (Ni) yang berlebihan adalah penghambatan terhadap perkecambahan biji,

mengurangi stabilitas membran sel tanaman, dan meningkatkan stres oksidatif. Dampak negatif nikel (Ni) terhadap tanaman dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Hassan *et al.*, 2019).



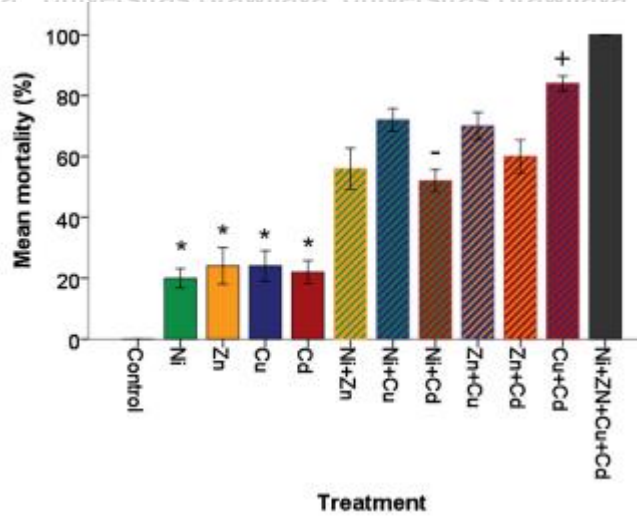
Gambar 2.1. Toksisitas nikel (Ni) terhadap tanaman (Hassan *et al.*, 2019)

Toksisitas logam berat, yaitu merkuri (Hg) pernah terjadi di Cina pada tahun 2018. Ikan-ikan yang berada di Sungai Yangtze Cina mengalami bioakumulasi merkuri. Sungai Yangtze merupakan sungai di daerah selatan Cina yang banyak terpolusi oleh limbah dari pabrik-pabrik yang ada di sekitarnya. Ikan-ikan tersebut mengandung merkuri dalam bentuk MeHg sebesar 0,1-199 ng/g. Pada penelitian itu juga disebutkan bahwa daging ikan merupakan bagian yang paling banyak mengandung merkuri (Q. Xu *et al.*, 2018).

Penelitian lain menyebutkan bahwa timbal (Pb) juga berdampak pada hewan. Keracunan timbal (Pb) pada hewan akan mengakibatkan banyak efek negatif. Salah satu efek negatif timbal pada hewan adalah kerusakan ginjal berupa peradangan dan nekrosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya penelitian yang dilakukan pada sapi yang ada di hidup di tempat yang memiliki kadar timbal tinggi pada lingkungan baik di air maupun makanan sapi. Penelitian tersebut menghasilkan kesimpulan berupa terjadinya kerusakan ginjal pada sapi yang terkena paparan timbal yang lama (Janardani *et al.*, 2018). Penelitian lain menunjukkan bahwa terdapat efek penumpukan timbal dalam darah mencit yang diberi minuman berupa larutan timbal (II) asetat ($Pb(C_2H_3O_2)_2$) dengan kadar 50 ppm dan 100 ppm selama 10 minggu (Setiawan, 2012).

Selain timbal, logam berat lain juga berdampak buruk bagi hewan. *Daphnia magna* atau kutu air yang diberi makanan yang telah dicampur berbagai logam berat menunjukkan tingkat kematian yang tinggi. *Daphnia magna* yang diberi pakan mengandung campuran logam berat lebih tinggi tingkat kematiannya daripada yang pakannya dicampur satu jenis

logam berat saja (Gambar 2.2). Hal tersebut menunjukkan bahwa logam berat berpengaruh negatif terhadap hewan (Lari *et al.*, 2017).



Gambar 2.2. Tingkat kematian *Daphnia magna* yang diberi pakan yang telah dicampur logam berat (Lari *et al.*, 2017)

2.2. Bioremediasi

Bioremediasi adalah pemanfaatan mekanisme-mekanisme biologis yang dimiliki oleh makhluk hidup baik mikroorganisme atau makroorganisme untuk mengubah dan/atau menghilangkan kontaminan berbahaya menjadi tidak berbahaya atau kurang berbahaya dari sebelumnya (Aktaş, 2013). Proses penghilangan kontaminan telah ada sebelumnya baik kontaminan dalam tanah maupun air. Proses remediasi polutan secara konvensional seperti insinerasi (pembakaran) dan *landfill* (penimbunan kontaminan dalam tanah) (Goswami *et al.*, 2018). Bioremediasi memiliki keunggulan dibandingkan metode remediasi lainnya yaitu lebih murah dan mudah diterima masyarakat karena tidak menimbulkan limbah kontaminan baru yang berbahaya. Namun selain memiliki kelebihan bioremediasi juga memiliki kelemahan yaitu remediasi yang dilakukan terbatas pada beberapa jenis polutan yang sesuai dengan bioremediator yang meremediasi polutan (Atif *et al.*, 2009). Contoh makhluk hidup yang bertindak sebagai bioremediator (agen bioremediasi) adalah *Pseudomonasi aeruginosa* yang mampu meremediasi timbal (Pb) (Citra, 2015) dan *Actinobacteria* yang meremediasi logam timbal (Pb), tembaga (Cu), seng (Zn), cadmium (Cd), dan chromium (Cr) (El Baz *et al.*, 2015).

2.2.1. Klasifikasi Bioremediasi

Bioremediasi memiliki banyak jenis dan teknik. Masing-masing jenis dan teknik tersebut dapat diklasifikasikan berdasarkan tempat bioremediasi berlangsung dan strategi

bioremediasi (Azubuiké *et al.*, 2016). Tujuan klasifikasi bioremediasi adalah untuk mempermudah orang dalam mempelajari dan mengkaji mengenai bioremediasi karena masing-masing bioremediasi memiliki teknik dan mekanisme yang berbeda.

Berdasarkan lokasi bioremediasi berlangsung, bioremediasi dibedakan menjadi dua yaitu bioremediasi insitu dan eksitu. Bioremediasi insitu adalah bioremediasi yang dilakukan di lokasi yang terpolusi (Hazen, 2010). Bioremediasi insitu dilakukan tanpa proses penggalian (ekskavasi) untuk merediasi tanah terpolusi atau memompa air tanah yang terpolusi. Prinsip utama bioremediasi insitu adalah memaksimalkan potensi biologis yang ada di lingkungan yang terpolusi berupa aktivitas biologis yang makhluk hidup yang mampu meremiasi lingkungan sekitarnya (Laitinen, 2006). Bioremediasi eksitu adalah bioremediasi yang dilakukan tidak di tempat yang terpolusi. Tanah atau air tanah yang terkontaminasi akan digali atau dipompa lalu dibawa ke tempat lain untuk diremediasi (Tomei dan Daugulis, 2013).

Terdapat tiga faktor utama yang mempengaruhi bioremediasi insitu yaitu jenis polutan, bioremediator, dan lingkungan (Sharma, 2019). Makhluk hidup indigen yang mampu hidup di lingkungan yang tercemar memiliki daya resistensi dan remediasi polutan yang baik. Hal tersebut disebabkan karena terjadi tekanan evolusi (*evolution pressure*) dari lingkungan sekitar sehingga hanya makhluk hidup yang memiliki daya resistensi saja yang bisa hidup (Silva *et al.*, 2012). Polutan yang ada di lingkungan sangat mempengaruhi bioremediasi insitu karena tidak semua polutan bisa diremediasi dengan waktu yang sama. Lingkungan sekitar lokasi polutan seperti pH, suhu, kelembaban, nutrisi yang tersedia merupakan faktor kunci keberhasilan bioremediasi insitu karena tanpa lingkungan yang sesuai makhluk hidup tidak bisa melakukan bioremediasi secara maksimal.

Bioremediasi insitu sangat bergantung pada makhluk hidup yang hidup di lingkungan yang terpolusi. Penggunaan makhluk hidup indigen untuk bioremediasi dilakukan karena makhluk hidup indigen sudah beradaptasi dengan lingkungan yang ada sehingga memiliki ketahanan dengan kondisi sekitar. Bioremediasi insitu tidak memerlukan biaya tambahan untuk melakukan penggalian (tanah) atau pemompaan (air) dan membawa polutan ke tempat lain untuk diremediasi. Hal tersebut membuat bioremediasi insitu menjadi lebih murah (Sharma, 2019).

Bioremediasi insitu memiliki durasi remediasi yang lebih lama daripada bioremediasi eksitu. Hal itu karena bioremediasi insitu sangat mengandalkan bioremediator lingkungan sekitar yang memiliki banyak variabel yang tidak bisa dikontrol sehingga membuat bioremediator tidak bisa bekerja secara optimal. Selain itu proses pengawasan atau monitoring bioremediasi insitu lebih susah daripada monitoring bioremediasi eksitu (Azubuiké *et al.*, 2016).

Lokasi untuk bioremediasi eksitu memiliki spesifikasi tertentu yang sudah diatur sebelumnya. Pengaturan spesifikasi tersebut menjadikan bioremediasi eksitu menjadi lebih terkontrol. Pengontrolan lingkungan bioremediasi akan membuat bioremediator bekerja secara maksimal untuk meremediasi polutan sehingga bioremediasi menjadi lebih cepat. Bioremediasi eksitu juga lebih cocok digunakan untuk beragam polutan karena spesifikasi bioremediasi eksitu bisa disesuaikan dengan polutan yang akan diremediasi (Khoei *et al.*, 2013).

Bioremediasi eksitu membutuhkan tempat baik berupa bioreaktor atau tanah lapang yang luas untuk meremediasi polutan. Selain itu bioremediasi eksitu juga membutuhkan biaya untuk melakukan penggalian dan transportasi untuk membawa tanah atau air yang terpolusi ke tempat remediasi. Hal tersebut membuat bioremediasi eksitu menjadi lebih mahal daripada bioremediasi insitu. Bioremediasi eksitu memiliki resiko penyebaran polutan dari satu tempat ke tempat lain terutama saat membawa polutan dari tempat asal ke tempat lain (Sharma, 2021).

Berdasarkan strategi bioremediasi yang digunakan maka bioremediasi dibedakan menjadi tiga yaitu *natural attenuation*, bioaugmentasi, dan biostimulasi (Azubuikwe *et al.*, 2016). Masing-masing strategi memiliki teknik-teknik yang berbeda. Pembagian strategi bioremediasi ini bukanlah pembagian yang baku. Pada kenyataan di lapangan masing-masing strategi bisa digunakan secara bergantian maupun bersamaan untuk meningkatkan efisiensi bioremediasi. Hal itu dilakukan dengan memodifikasi teknik-teknik yang dilakukan pada setiap strategi.

Natural attenuation adalah strategi bioremediasi yang dilakukan tanpa campur tangan manusia. Bioremediasi dengan strategi ini terjadi secara alami di mana terjadi interaksi antara komponen biotik dan abiotik di alam yang bisa mengurangi tingkat toksisitas kontaminan, mengurangi kontaminan, dan mengurangi bioavailabilitas kontaminan tanpa ada intervensi dari manusia. Strategi ini memerlukan waktu yang sangat lama karena hanya mengandalkan bioremediasi oleh alam saja. Walaupun memerlukan waktu yang sangat lama strategi ini merupakan strategi bioremediasi yang paling murah (Scow dan Hicks, 2005).

Biostimulasi adalah proses bioremediasi dengan memodifikasi lingkungan yang bertujuan untuk menstimulasi bioremediator sehingga bisa meremediasi kontaminan dengan cepat. Modifikasi lingkungan bisa dilakukan dengan penambahan nutrisi, oksigen, atau yang lainnya. Modifikasi lingkungan yang dilakukan harus memerhatikan kondisi sekitar karena jika modifikasi lingkungan kurang tepat maka bisa mengurangi keefektifan bioremediasi bahkan berdampak buruk pada lingkungan (Adams *et al.*, 2015).

Bioremediator dari biostimulasi berasal dari makhluk hidup yang telah ada di lingkungan tersebut. Makhluk hidup yang telah ada lingkungan tersebut telah mampu

beradaptasi dengan kondisi lingkungan seperti pH, suhu, dan kadar air lingkungan sehingga bisa lebih efektif dan aman digunakan. Makhluk hidup indigen tersebut secara alami mampu meremediasi polutan yang ada karena telah beradaptasi dengan lingkungan yang terkontaminasi. Namun, kemampuan remediasi makhluk hidup indigen tersebut masih kurang sehingga perlu dilakukan stimulasi-stimulasi untuk meningkatkan kemampuan bioremediator indigen (Hazen, 2009).

Efektivitas biostimulasi bergantung pada beberapa faktor seperti kadar kontaminan, kondisi lingkungan, jenis bioremediator, dan stimulasi yang dilakukan. Kadar kontaminan yang terlalu tinggi bisa meningkatkan efek toksik polutan pada bioremediator sehingga tidak bisa bekerja dengan maksimal, sebaliknya jika kadar kontaminan terlalu sedikit maka membuat bioremediator tidak bisa mengeluarkan enzim-enzim untuk meremediasi polutan (Adams *et al.*, 2015). Jenis bioremediator indigen yang ada berpengaruh terhadap kecepatan bioremediasi karena masing-masing bioremediator memiliki mekanisme yang berbeda dalam meremediasi polutan sehingga mempengaruhi kecepatan dan kemampuan remediasi bioremediator. Stimulasi yang dilakukan sangat bergantung pada kondisi lingkungan. Hal itu karena biostimulasi hanya menambahkan zat-zat yang kurang atau tidak ada di lingkungan agar bioremediasi terjadi lebih cepat sehingga setiap tempat membutuhkan teknik biostimulasi yang berbeda-beda. Stimulasi bisa berupa nutrisi atau aseptor elektron seperti oksigen. Kondisi lingkungan yang mempengaruhi bioremediasi adalah pH, suhu, kadar air, dan nutrisi yang ada di lingkungan (Abdulsalam dan Omale, 2009).

Kelebihan utama biostimulasi adalah pemanfaatan mikroorganisme indigen sebagai bioremediator. Mikroorganisme indigen telah beradaptasi dengan kondisi yang serta tidak memiliki potensi yang membahayakan bagi ekosistem lingkungan. Hal itu membuat biostimulasi memiliki resiko kecil dalam hal kontaminasi mikroorganisme eksogen yang membahayakan ekosistem (Tyagi *et al.*, 2011).

Kekurangan biostimulasi adalah adanya resiko kerusakan lingkungan saat memberi stimulasi pada lingkungan tertentu. Pemberian stimulasi yang tidak tepat bisa membahayakan lingkungan seperti pemberian nutrisi NPK yang terlalu banyak akan menimbulkan eutrofikasi pada ekosistem perairan yang membahayakan makhluk hidup di sana. Oleh karena itu sebelum melakukan biostimulasi diperlukan kajian yang mendalam tentang lingkungan yang akan diremediasi (Tyagi *et al.*, 2011).

Bioaugmentasi adalah pemanfaatan mikroorganisme indigen yang telah dipre-treatment atau eksogen atau *Genetic Modified Organism* (GMO) baik berupa *single strain* atau konsorsium mikroorganisme yang ditambahkan di tempat yang terkontaminasi untuk meremediasi tempat yang terkontaminasi. Pada biostimulasi penambahan yang dilakukan ke situs yang terkontaminasi berupa stimulan seperti nutrisi dan oksigen sedangkan pada

bioaugmentasi penambahannya berupa bioremediator. Bioaugmentasi dilakukan di tempat yang tidak bisa diremediasi menggunakan biostimulasi karena kurangnya populasi bioremediator atau jenis kontaminan yang terlalu kompleks dan membutuhkan multiproses bioremediasi. Pada beberapa tempat, pemberian stimulasi berupa nutrisi dan oksigen masih belum cukup sehingga membutuhkan penambahan bioremediator (Mrozik dan Piotrowska-Seget, 2010).

Bioremediator merupakan faktor penting dalam bioaugmentasi. Bioremediator untuk bioaugmentasi bisa didapat dari isolasi mikroba indigen yang telah di-*pretreatment* di laboratorium terlebih dahulu atau isolasi dari tempat lain yang memiliki kontaminan sama atau *genetic modified organism* (GMO). Terdapat tiga syarat utama bioremediator untuk bioaugmentasi yaitu memiliki ketahanan terhadap lingkungan seperti perubahan suhu dan pH maupun ketahanan terhadap kompetisi antar komponen biotik di lingkungan tersebut, memiliki tingkat toleransi terhadap kontaminan, dan memiliki kemampuan remediasi yang baik (Thompson *et al.*, 2005).

Salah satu tantangan bioaugmentasi adalah untuk mempertahankan jumlah bioremediator yang ditambahkan. Mayoritas bioremediator akan semakin berkurang jumlahnya setelah ditambahkan seiring berjalannya waktu karena terjadi stres. Stres yang terjadi diakibatkan perubahan suhu, pH, kekurangan nutrisi, terifeksi dengan *bakteriofag* yang membuat bakteri menjadi lisis dan mati, dan kompetisi dengan mikroorganisme lain. Tantangan lain yang dari bioaugmentasi adalah kecocokan bioremediator dengan lingkungan yang akan diremediasi. Kecocokan ini tidak hanya mencakup kecocokan bioremediator dengan komponen abiotik seperti suhu, pH, dan nutrisi melainkan juga kecocokan dengan komponen biotik yang sudah ada di lingkungan tersebut. Efek negatif yang timbul jika terjadi ketidakcocokan adalah kerusakan ekosistem seperti *protozoan grazing* yaitu pertumbuhan protozoa yang meningkat drastis karena penambahan mikroorganisme eksogen. Meningkat atau menurunnya suatu komponen biotik dalam suatu ekosistem bisa merusak ekosistem tersebut (Nzila *et al.*, 2016).

2.3. Bakteri

Makhluk hidup di bumi secara garis besar dapat dibedakan menjadi dua jenis yaitu eukariotik dan prokariotik. Eukariotik adalah makhluk hidup yang memiliki membran inti sel sehingga materi genetik terpisah dari organel-organel lain (materi genetik terletak dalam nukleus). Contoh eukariotik adalah fungi, animal, plantae. Prokariotik adalah makhluk hidup yang tidak memiliki membran inti sel. Materi genetik pada prokariotik tidak terpisah dengan organel-organel lain dalam sel. Contoh makhluk hidup prokariotik adalah bakteri (Al-mohanna dan Quine, 2016).

Bakteri merupakan makhluk hidup tertua di bumi, diperkirakan bakteri telah muncul dua milyar tahun lebih awal daripada makhluk hidup eukariotik. Fosil bakteri tertua yang pernah ditemukan diperkirakan berasal dari 3,5-3,8 miliar tahun yang lalu. Pada awal sejarah bumi, salah satu jenis bakteri yaitu *Cyanobacteria* menjadi penghasil oksigen pertama. Makhluk hidup aerobik yang lain muncul setelah bumi terisi dengan oksigen yang dihasilkan oleh fermentasi *Cyanobacteria* (Al-mohanna dan Quine, 2016).

Bakteri termasuk makhluk hidup mikroskopis, yaitu makhluk hidup yang hanya bisa dilihat melalui mikroskop. Diameter bakteri sekitar 0,2-1,5 μm dan panjangnya sekitar 3-5 μm (Al-mohanna dan Quine, 2016). Terdapat tiga bentuk utama bakteri yaitu basil, kokus, dan spiral. Bakteri berbentuk basil disebut *Bacillus*. Bakteri berbentuk basil (*Bacillus*) memiliki bentuk lurus seperti lingkaran yang lonjong. Bakteri berbentuk kokus disebut *Coccus* atau *Cocci* jika berjumlah satu. Bakteri *Coccus* memiliki bentuk lingkaran-lingkaran atau bulatan-bulatan yang saling bergandengan. Bakteri berbentuk spiral disebut *Spirilus* (Al-mohanna dan Quine, 2016).

Berdasarkan keberadaan peptidoglikan pada dinding sel bakteri, maka bakteri dibedakan menjadi bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif memiliki peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri gram negatif memiliki peptidoglikan yang tipis. Peptidoglikan adalah lapisan pada dinding sel bakteri (*bacterial cell wall*) yang terdiri dari molekul polisakarida yang dihubungkan atau diikat dengan polipeptida (Nurhayati dan Darmawati, 2017).

Cara membedakan bakteri gram positif dan negatif dilakukan melalui metode pewarnaan gram yang ditemukan oleh Hans Christian Gram pada 1884. Hasil pewarnaan gram akan menunjukkan perbedaan kedua jenis bakteri, bakteri gram positif akan berwarna keunguan dan bakteri gram negatif akan berwarna kemerahan. Contoh bakteri gram positif adalah *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecialis*, dan *Clostridium botulinum*. Contoh bakteri gram negatif adalah *Eschericia coli*, *Enterobacter aerogenes*, dan *Kleibsel pneumoniae* (United States Departement of Agriculture Food Safety and Inspection Service, 2012).

Berdasarkan kebutuhan akan oksigen, bakteri dibedakan menjadi lima yaitu aerob obligat, anaerob obligat, anaerob fakultatif, mikroaerofilik, dan anaerob toleran. Aerob obligat adalah bakteri yang membutuhkan oksigen, bakteri ini akan mati jika tidak ada oksigen. Hal ini karena oksigen digunakan oleh bakteri untuk melakukan metabolisme, terutama respirasi aerob. Saat bakteri ini diletakkan dalam tabung reaksi yang berisi media cair maka ia akan mengumpul di bagian atas tabung reaksi. Contoh bakteri ini adalah *Pseudomonas sp.* Bakteri anaerob obligat adalah bakteri yang tidak tahan oksigen, bakteri ini akan mati saat ada oksigen karena oksigen dianggap sebagai zat toksik. Saat berada dalam tabung reaksi yang berisi media cair maka ia akan mengumpul di bagian bawah

tabung karena pada bagian bawah tabung tidak terdapat oksigen. Contoh bakteri anaerob obligat adalah *Clostridium botulinum* (Prayitno dan Hidayati, 2017).

Bakteri anaerob fakultatif adalah bakteri yang dapat hidup pada tempat yang terdapat oksigen maupun tidak. Saat berada di tempat yang penuh oksigen maka ia akan melakukan respirasi aerob sedangkan jika ia berada di tempat yang tidak terdapat oksigen maka ia akan melakukan fermentasi atau respirasi anaerob. Bakteri anaerob fakultatif akan menyebar saat ada dalam tabung berisi media cair, tetapi bakteri anaerob fakultatif akan cenderung berkumpul di atas tabung karena bakteri lebih mudah berkembang biak jika melakukan respirasi aerob, sebab akan menghasilkan ATP lebih banyak dibandingkan respirasi anaerob atau fermentasi. Contoh bakteri anaerob fakultatif adalah *Eschericia coli* (Prayitno dan Hidayati, 2017).

Bakteri mikroaerofilik adalah bakteri yang membutuhkan oksigen tetapi dalam jumlah yang sedikit karena bakteri mikroerofilik akan mati jika terkena kadar oksigen tinggi tetapi tidak bisa melakukan fermentasi atau respirasi anaerob. Contoh bakteri mikroaerofilik adalah *Campylobacter*. Bakteri mikroaerofilik akan cenderung mendekati permukaan tabung reaksi tetapi tidak terlalu dekat dengan tabung reaksi jika diletakkan pada media cair dalam tabung reaksi. Bakteri aerotoleran adalah bakteri yang bisa hidup pada tempat yang memiliki oksigen atau tidak memiliki oksigen tetapi saat ia berada di tempat yang memiliki oksigen ia tidak menggunakan oksigen untuk metabolismenya. Contoh bakteri mikroaerofilik adalah *Lactobacillus sp* (Prayitno dan Hidayati, 2017).

BAB III. METODE PELAKSANAAN

3.1. Waktu Pelaksanaan

Pengerjaan tugas akhir dilaksanakan pada bulan Januari – Juli 2021.

3.2. Metode Pelaksanaan

Tugas akhir dilakukan dengan metode *literatur review*. Metode ini dilakukan dengan mengumpulkan, memilih, menganalisis, dan menginterpretasikan berbagai literatur (jurnal, thesis, disertasi, buku, dll.) yang berhubungan dengan topik tugas akhir. Litetur-literatur yang telah didapatkan akan dianalisis dengan cara mencari kesamaan (*compare*) dan perbedaan (*contrast*) serta membandingkan (*synthesize*) untuk mendapatkan gambaran yang komprehensif mengenai topik bahasan tugas akhir ini.

3.2.1. Pencarian Literatur

Data dikumpulkan dari sumber-sumber sekunder, yakni hasil penelitian yang dilaporkan dalam berbagai literatur yang berhubungan dengan topik tugas akhir. Literatur-literatur tersebut dicari dari situs-situ website yang memuat *database* hasil penelitian yaitu Pubmed, ScienceDirect, American Society of Microbiology, dan Research gate. Pencarian dilakukan menggunakan kata kunci yang berhubungan dengan topik bahasan. Kata kunci untuk pencarian literature disajikan dalam Tabel 3.1.

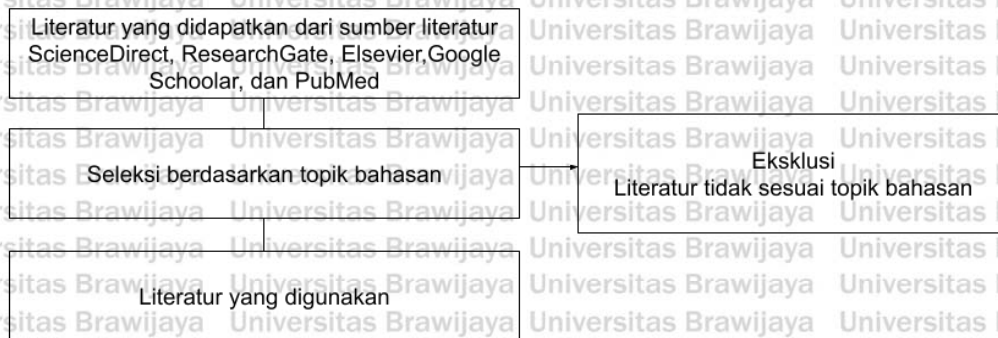
Tabel 3.1. Kata kunci untuk pencarian literatur

Metal	Bacteria	Metallothionein
OR	OR	
Heavy Metal	Metal	
	Resistance	
	Bacteria	
	OR	
	Bioremediator	

3.2.2. Pemilihan Literatur

Literatur yang telah didapat dipilih dan diseleksi berdasarkan beberapa kriteria yaitu topik yang dibahas dalam literatur. Topik literatur yang tidak sesuai dengan topik bahasan tugas akhir tidak digunakan (eksklusi) sedangkan topik literatur yang sesuai dengan topik

bahasan tugas akhir digunakan (inklusi) dalam literatur review. Tahapan pemilihan literatur dapat dilihat dalam Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Tahapan pemilihan literatur

3.2.3. Analisis Data

Informasi-informasi penting yang ada di dalam literatur yang telah dipilih akan dianalisis dan diinterpretasi. Data akan dibandingkan dan dicari keterkaitannya satu sama lain. Setelah itu, data akan diinterpretasikan lalu disimpulkan. Proses analisis dan interpretasi data hanya dilakukan pada literatur-literatur yang telah terpilih. Analisis dan interpretasi data digunakan untuk menjawab rumusan masalah. Hasil analisis akan ditampilkan di bab 4.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Bakteri Resisten Logam Berat

Bakteri merupakan makhluk yang sangat mudah beradaptasi dengan lingkungan. Saat bakteri hidup di lingkungan yang mengandung logam berat maka ia akan mengembangkan kemampuan agar bisa hidup di tempat yang terkontaminasi logam berat. Hal tersebut dibuktikan dengan penelitian-penelitian mengenai isolasi bakteri resisten logam berat dari lingkungan tercemar, salah satunya berasal dari industri. Pada Tabel 4.1 ditunjukkan beberapa bakteri resisten timbal (Pb) yang berasal dari lingkungan industri yang banyak tercemar logam berat, khususnya timbal (Pb).

Tabel 4.1. Bakteri resisten timbal (Pb) yang diisolasi dari lingkungan industri

No.	Bakteri	Jenis Bakteri	Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	Referensi
1.	<i>Pseudomonas putida</i>	Gram negatif	1600 ppm	(Nokman <i>et al.</i> , 2019)
3.	<i>Bacillus safensis</i> MK210556	Gram positif	600 ppm	(Nazir <i>et al.</i> , 2020)
4.	<i>Bacillus thuringensis</i> MK426618	Gram positif	900 ppm	(Nazir <i>et al.</i> , 2020)
5.	<i>Staphylococcus warneri</i> MK214733	Gram positif	500 ppm	(Nazir <i>et al.</i> , 2020)
7.	<i>Gemella sp.</i>	Gram positif	1900 ppm	(Marzan <i>et al.</i> , 2017)
8.	<i>Micrococcus sp.</i>	Gram positif	1800 ppm	(Marzan <i>et al.</i> , 2017)
9.	<i>Bacillus thuringensis</i> OSM 29	Gram positif	1500 ppm	(Oves <i>et al.</i> , 2013)
10.	<i>Halomonas clone TV-G01-52</i>	Gram negatif	200 ppm	(Tibrewal <i>et al.</i> , 2018)

4.1.1. Faktor-Faktor Penentu Resistensi Bakteri Terhadap Logam Berat

Terdapat dua faktor yang menentukan keragaman bakteri di suatu lingkungan yaitu faktor eksternal dan faktor internal (Chen *et al.*, 2019).

4.1.1.1. Faktor Eksternal

Faktor eksternal adalah faktor yang berada di luar bakteri. Faktor eksternal akan berperan sebagai *environmental pressure*, yaitu mekanisme alami dari lingkungan untuk menyeleksi makhluk hidup yang mampu hidup di dalamnya sehingga hanya makhluk hidup yang memiliki kemampuan adaptasi dengan lingkungan saja yang bisa bertahan.

Environmental pressure yang terjadi secara terus menerus akan mengubah biodiversitas makhluk hidup yang hidup di dalam suatu lingkungan.

Berdasarkan data yang telah didapatkan dari sebuah penelitian menunjukkan bahwa bakteri resisten timbal dapat diisolasi dari lingkungan yang tercemar oleh logam berat (Tibrewal *et al.*, 2018). Hal itu dapat dibuktikan dengan melihat Tabel 4.2 mengenai komposisi kimia dari lingkungan asal bakteri resisten timbal yang diperoleh dari limbah cair yang diperoleh dari industri elektronik.

Tabel 4.2. Komposisi kimia limbah cair dari industri elektronik (Tibrewal *et al.*, 2018)

Parameter	Nilai
pH	12,0
Seng (Zn)	4,0 ppm
Cadmium (Cd)	1,0 ppm
Nikel (Ni)	22,5 ppm
Magnesium (Mg)	5,5 ppm
Timbal (Pb)	2,5 ppm
Calcium	49,1 ppm
Sulfat	3,28 gm/l
Chlorine	0,16%
BOD	27,39 ppm
COD	437,21 ppm

Pada Tabel 4.2 terlihat bahwa lingkungan asal bakteri, yaitu limbah cair industri elektronik, memiliki kadar timbal yang tinggi yaitu 2,5 ppm. Selain kadar timbal yang tinggi, limbah tersebut juga memiliki kadar logam berat lain yang tinggi seperti magnesium, chromium, nikel, cadmium, dan seng. Logam-logam berat yang di air limbah tersebut akan memengaruhi komposisi bakteri yang hidup di dalamnya.

Pada Tabel 4.1 ditunjukkan hasil mengenai bakteri yang berhasil diisolasi dari lingkungan industri. Jenis bakteri nomor 10 berasal dari limbah cair industri elektronik. Di mana komposisi sampel limbah cair tempat asal bakteri ditunjukkan pada tabel 4.2 dan pada tabel 4.1 ditunjukkan bahwa bakteri yang berasal dari lingkungan yang mengandung banyak logam berat memiliki kemampuan resistensi terhadap timbal sebesar 200 ppm. Hal itu menunjukkan bukti bahwa bakteri resisten logam berat bisa hidup di lingkungan tercemar logam berat.

Terdapat dua faktor yang memengaruhi komunitas bakteri, yaitu nutrisi yang ada di lingkungan bakteri dan polutan yang ada di lingkungan bakteri. Kedua faktor tersebut saling berinteraksi menjadi *environmental pressure* yang bertanggung jawab terhadap komunitas bakteri yang ada di suatu lingkungan (Chao *et al.*, 2016). Suatu komunitas bakteri bisa berubah atau terjadi suksesi (*succession of bacterial community*) saat terdapat *environmental pressure* yang kuat. Suatu penelitian menyebutkan bahwa terjadi suksesi mikroba, baik berupa bakteri ataupun fungi, pada tanah pertambangan sebelum dan setelah dilakukan pertambangan sehingga komunitas mikroba, khususnya bakteri, akan berubah. Saat dilakukan restorasi lingkungan di tanah pertambangan maka akan susah untuk mengembalikan komunitas bakteri yang ada sebelum dilakukan pertambangan. Hal itu karena telah terjadi suksesi mikroba atau perubahan komunitas mikroba yang ada (Chao *et al.*, 2016).

Faktor nutrisi sebagai salah satu kekuatan dari *environmental pressure* telah dilaporkan pada penelitian tahun 2016. Peneliti melaporkan bahwa terjadi perubahan komunitas bakteri di lahan perkebunan tembakau saat dilakukan rotasi tanaman. Rotasi tanaman atau penanaman tanaman yang berbeda di suatu lahan akan mengubah komunitas bakteri tanah karena setiap akar tanaman akan mengeluarkan dan memproses zat-zat tertentu seperti asam organik, lactam, gliserol, dan nikotin yang berbeda-beda. Setiap zat yang dikeluarkan (*exudate*) digunakan oleh bakteri sebagai nutrisi. Jika tanaman yang ditanam berbeda maka nutrisi yang ada dalam tanah pun berbeda sehingga komunitas bakteri yang hidup di dalamnya juga berbeda (Niu *et al.*, 2016).

Peneliti lain juga merilis hasil yang sama, walaupun dilakukan di lingkungan yang berbeda. Penelitian dilakukan di lingkungan air tepatnya di Bohai Bay, Cina. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa komunitas bakteri yang ada di lingkungan air sangat bergantung dengan jenis vegetasi atau tanaman yang ada di lingkungan tersebut. Hal itu karena terjadi *environmental pressure* berupa perubahan nutrisi yang ada di lingkungan air (Cong *et al.*, 2014).

Penelitian mengenai faktor polutan sebagai *environmental pressure* pernah dilakukan dengan menggunakan sampel tanah yang diberi logam berat merkuri (Hg), seng (Zn), Nikel (Ni) dengan kadar berbeda-beda, mulai 50 ug/g hingga 500 ug/g kemudian diinkubasi

selama 28 hari. Setelah itu bakteri yang ada di tanah diisolasi dan dibandingkan setiap 7 hari sekali. Hasil isolasi dan perhitungan jumlah bakteri menunjukkan bahwa jumlah bakteri berbanding terbaik dengan kenaikan kadar logam berat yang diberikan sehingga jumlah bakteri semakin menurun saat kadar logam yang diberikan semakin ditingkatkan. Selain itu jumlah bakteri pada tanah yang terkontaminasi logam berat >50 ppm semakin berkurang saat sampel tanah diisolasi dengan ditambahkan logam berat dalam waktu yang semakin lama. Hal itu menunjukkan bahwa lingkungan sangat berpengaruh terhadap jumlah bakteri (Anyanwu *et al.*, 2011).

Penelitian serupa juga pernah dilakukan, di mana sampel tanah yang diambil dari sebuah taman dicampur dengan berbagai logam berat yaitu timbal (Pb), perak (Ag), dan seng (Zn). Dilakukan tiga perlakuan yaitu pemberian masing-masing logam berat sebesar 10, 25, dan 50 mM. Setelah itu tanah diinkubasi selama 15 hari. Kemudian bakteri yang terdapat pada masing-masing sampel tanah tersebut diisolasi dan dibandingkan jumlah serta jenisnya dengan sampel tanah yang diisolasi tanpa penambahan logam berat. Hasil dari penelitian itu ditunjukkan pada Tabel 4.3. Tabel tersebut memperlihatkan jumlah bakteri berbanding terbalik dengan jumlah logam berat yang ditambahkan atau dengan kata lain bahwa jumlah bakteri semakin berkurang saat sampel tanah diberi logam berat yang semakin banyak (Ashraf dan Ali, 2007). Hal itu karena banyak bakteri yang mati karena terkena efek toksik dari logam berat. Semakin banyak logam berat yang ada pada sampel maka semakin besar efek toksik yang ditimbulkan. Bakteri yang mampu hidup di sampel tanah yang diberi logam berat adalah bakteri yang resisten terhadap logam berat.

Tabel 4.3. Hubungan antara jumlah bakteri heterotrof dan kadar logam berat sampel asal bakteri (Ashraf dan Ali, 2007)

Logam berat	Jumlah bakteri heterotrof (CFU/g)			
	0 Mm (kontrol)	10 mM	25 mM	50 mM
Zn	$(4,489 \pm 0,1) \times 10^8$	$(6,71 \pm 0,14) \times 10^8$	$(8,033 \pm 0,13) \times 10^8$	$(8,575 \pm 0,14) \times 10^8$
Pb	$(4,489 \pm 0,1) \times 10^8$	$(2,278 \pm 2,0) \times 10^8$	$(1,784 \pm 2,7) \times 10^8$	$(1,095 \pm 1,8) \times 10^8$
Ag	$(4,489 \pm 0,1) \times 10^8$	$(2,038 \pm 2,3) \times 10^8$	$(1,203 \pm 1,9) \times 10^8$	$(8,32 \pm 1,8) \times 10^7$

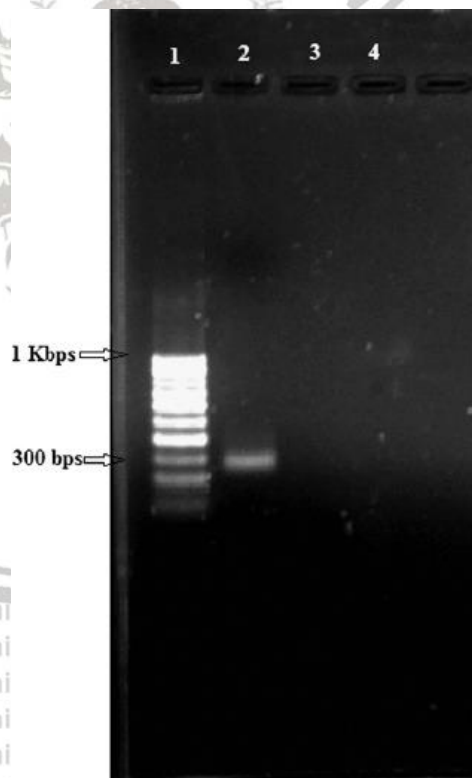
Peneliti lain yang mengisolasi bakteri dari tanah yang ditambahkan logam berat cadmium (Cd), seng (Zn), nikel (Ni), dan timbal (Pb) kemudian diinkubasi selama 30 hari menunjukkan perbedaan jumlah dan jenis bakteri yang mampu tumbuh di tanah tersebut. Jumlah bakteri yang berhasil diisolasi berbanding terbalik dengan kadar logam berat yang ditambahkan pada masing-masing tanah. Hal itu karena logam berat bersifat toksik sehingga akan membunuh bakteri sensitif logam berat. Jenis bakteri yang berhasil tumbuh di tanah yang diberi satu jenis logam berat (*single heavy metal*) berbeda dengan jenis bakteri yang tumbuh di tanah yang diberi banyak logam berat (*multi heavy metals*). Hal

tersebut menunjukkan bahwa komunitas bakteri akan berubah jika terdapat *environmental pressure* berupa polutan logam berat di dalamnya (Abd et al., 2013).

Pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa bakteri yang hidup di lingkungan yang memiliki kadar logam berat tinggi memiliki kemampuan resisten terhadap logam berat. Suatu penelitian pernah membuktikan hal ini bahwa bakteri yang ditumbuhkan di tanah yang dicampur dengan timbal (Pb) dalam jumlah besar akan membentuk agregat dan endospora (Ashraf dan Ali, 2007). Pembentukan agregat dan endospora tersebut menunjukkan mekanisme resistensi terhadap logam, khususnya timbal (Pb) oleh bakteri.

4.1.1.2. Faktor Internal

Faktor internal adalah faktor yang berada dalam diri bakteri. Faktor internal berkaitan dengan gen yang dimiliki oleh bakteri. Bakteri yang memiliki kemampuan resistensi tinggi terhadap logam berat memiliki gen khusus yang mengkode protein-protein yang berhubungan dengan kemampuan bakteri tersebut. Gen resisten logam berat yang dimiliki oleh bakteri bisa berada di plasmid atau pun di kromosom bakteri.



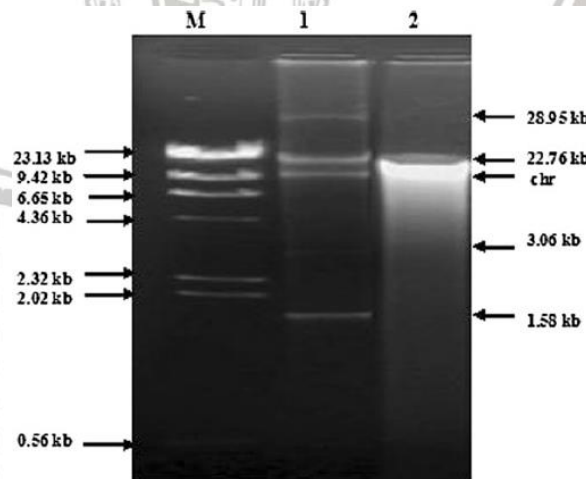
Gambar 4.1. Hasil pengujian PCR plasmid bakteri *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1. 1: marker; 2: *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1; 3 dan 4: bakteri sensitif logam berat *E. coli* HB101 (Naik et al., 2012)

Salah satu contoh bakteri resisten timbal (Pb) adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1. Bakteri tersebut memiliki gen yang mengkode mekanisme

resistensi logam berat, yaitu menggunakan metallothionein (*bmtA*). Gen tersebut berada di plasmid bakteri karena saat dilakukan pengujian PCR dan membandingkan hasilnya dengan bakteri kontrol sensitif logam terlihat jelas pita DNA pada *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 saat dielektroforesis (Gambar 4.1) (Naik *et al.*, 2012).

Tidak semua bakteri yang memiliki kemampuan resistensi terhadap logam berat, khususnya timbal memiliki plasmid yang mengkode kemampuan resistensinya. Banyak bakteri yang kemampuan resistensi terhadap logam berat yang dimilikinya dikode oleh gen yang ada di kromosomnya. Salah satunya adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang diisolasi dari sungai Kizilirmark. Bakteri *Enterococcus faecalis* diketahui memiliki kemampuan resisten terhadap timbal, hal ini dibuktikan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa bakteri *Enterococcus faecalis* resisten terhadap timbal hingga 1200 ppm (Aktan *et al.*, 2012).

Pengujian terhadap plasmid yang dimiliki oleh bakteri *Enterococcus faecalis* (Gambar 4.2) menunjukkan bahwa bakteri yang hidup di lingkungan mengandung timbal memiliki 4 plasmid yang berukuran berbeda yaitu 1,58 kb; 3,06 kb; 22,76 kb; dan 28,95 kb, sedangkan bakteri yang tidak ditumbuhkan pada lingkungan mengandung timbal tidak menunjukkan ada plasmid yang terlihat. Bakteri kemudian diteliti lebih lanjut dengan melakukan *plasmid curing*, yaitu teknik untuk menghilangkan plasmid dari bakteri menggunakan ethidium bromida. Setelah plasmid dihilangkan, kemudian bakteri ditumbuhkan kembali ke lingkungan yang mengandung timbal (Pb). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri yang telah dihilangkan plasmidnya tetap bisa hidup di lingkungan yang mengandung timbal. Hal tersebut berarti gen yang mengkode resisten bakteri terhadap timbal (Pb) tidak terletak di plasmid melainkan di kromosom (Aktan *et al.*, 2012).



Gambar 4.2. Hasil pengujian plasmid pada bakteri *Enterococcus faecalis* yang diisolasi dari Sungai Kizilirmark. M: marker; 1: *Enterococcus faecalis* yang ditumbuhkan di lingkungan mengandung timbal; 2: *Enterococcus faecalis* yang ditumbuhkan di lingkungan yang tidak mengandung timbal (Aktan *et al.*, 2012)

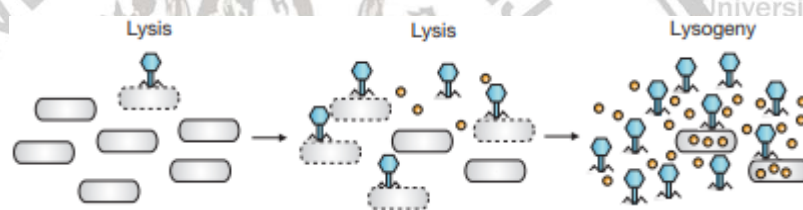
Kemunculan gen resisten logam berat di bakteri bisa terjadi karena dua hal yaitu mutasi dan transfer gen horizontal antar bakteri (Stokes and Gillings, 2011). Mutasi adalah perubahan pada susunan DNA karena terjadi perubahan pada urutan atau susunan basa nitrogen di DNA. Perubahan itu akan mengubah sifat genetik bakteri. Hal itu karena DNA akan mengkode pembentukan protein di bakteri sehingga jika urutannya berubah maka protein yang dibentuk juga berubah. Sifat genetik yang menguntungkan bakteri akan diwariskan dari generasi ke generasi sehingga jumlah bakteri yang memiliki sifat genetik menguntungkan akan bertambah banyak. Pertumbuhan bakteri yang memiliki sifat unggul akan membuat bakteri yang tidak memiliki sifat unggul tersingkir sehingga mayoritas bakteri yang bertahan hidup adalah bakteri yang memiliki sifat unggul.

Transfer gen horizontal atau *Horizontal Transfer Gene* (HGT) atau *Lateral Transfer Gene* (LTG) adalah mekanisme transfer materi genetik antar bakteri tanpa proses pembelahan sel. Secara umum suatu makhluk hidup akan mendapat gen yang diwariskan oleh orang tuanya. Pewarisan sifat secara turun temurun ini membuat makhluk hidup memiliki kemiripan sifat dengan orang tuanya. Namun, terkadang terjadi persilangan gen antar makhluk hidup, khususnya antar bakteri tanpa adanya hubungan keturunan. Percampuran gen tersebut bisa memunculkan sifat genotip dan fenotip baru yang tidak dimiliki oleh generasi sebelumnya (Soucy *et al.*, 2015).

HGT memiliki tiga mekanisme utama untuk mentransfer materi genetik antar bakteri yaitu transformasi, konjugasi, dan transduksi. Transformasi adalah perpindahan DNA baik berupa plasmid atau kromosom melalui pemasukan materi genetik ke bakteri lain secara langsung. Transformasi sangat jarang terjadi di alam. Hal ini karena transformasi membutuhkan dua syarat utama yaitu DNA donor merupakan DNA yang kompatibel dengan bakteri yang menerimanya dan bakteri resipien harus berupa sel kompeten. Sel kompeten adalah sel yang telah mengalami perubahan fisiologi sehingga sel mampu mengambil DNA asing dari bakteri donor. Perubahan fisiologis sel terutama berkaitan dengan permeabilitas membran sel, di mana permeabilitas membran sel resipien akan berubah sehingga DNA asing mudah masuk ke dalam sel. Kecocokan DNA donor dengan sel bakteri resipien sangat penting karena jika DNA donor tidak cocok dengan sel maka sifat genotip tidak akan terekspresi menjadi sifat fenotip. Konjugasi adalah perpindahan DNA antar bakteri dengan bantuan pili (jamak: pilus). Pili adalah 'jembatan' yang terbentuk antara dua bakteri dan menghubungkan keduanya sehingga DNA, terutama plasmid, akan berpindah. Jika DNA dari bakteri donor cocok dengan bakteri resipien maka DNA tersebut bisa diekspresikan oleh bakteri (Thomas dan Nielsen, 2005).

Transduksi adalah perpindahan DNA antar bakteri dengan bantuan bakteriofag. Bakteriofag memiliki siklus litik dan lisogenik (Gambar 4.3). Saat bakteriofag menginfeksi bakteri maka materi genetik virus akan masuk ke dalam bakteri. Kemudian materi genetik

tersebut akan bergabung dengan materi genetik bakteri. Penggabungan materi genetik virus dan bakteri tersebut disebut sebagai siklus lisogenik. Saat bakteri melakukan reproduksi dengan cara membelah diri maka materi genetik tersebut akan ikut bereplikasi. Oleh karena itu materi genetik dari virus yang sudah masuk ke dalam bakteri akan ikut tersebar ke bakteri yang lain. Siklus litik terjadi saat virus menginfeksi bakteri tetapi materi genetik virus tidak bergabung dengan bakteri, melainkan bereplikasi dan membentuk bakteriofag-bakteriofag baru di dalam bakteri. Setelah itu bakteriofag akan memecah sel bakteri sehingga bakteri mengalami lisis. Bakteriofag yang telah terlepas keluar bakteri akan menginfeksi bakteri lain (Erez *et al.*, 2017). Saat bakteriofag menginfeksi bakteri yang memiliki gen resisten logam berat maka terdapat kemungkinan gen tersebut ikut masuk ke dalam bakteriofag yang baru dibentuk di dalam sel bakteri, sehingga bakteriofag tidak hanya mengandung materi genetik aslinya saja melainkan juga membawa membawa materi genetik dari sel bakteri, berupa potongan gen yang mengatur resistensi logam berat. Saat bakteriofag menginfeksi bakteri lain maka materi genetik pengkode resisten logam berat juga akan ikut masuk dan bergabung dengan materi genetik bakteri yang baru diinfeksi.



Gambar 4.3. Siklus litik dan lisogenik dari *bakteriofag* (Erez *et al.*, 2017)

Mekanisme transfer gen horizontal bisa meningkat seiring peningkatan kadar logam berat, khususnya timbal (Pb). Suatu penelitian yang dilakukan dengan menumbuhkan bakteri *E. coli* K12 yang sudah diberikan plasmid RP4 di media yang mengandung beberapa logam berat, yaitu tembaga (Cu), cadmium (Cd), timbal (Pb), dan seng (Zn), pada konsentrasi 0-200 µg/l melaporkan bahwa transfer gen horizontal yang terjadi berbanding lurus dengan jumlah logam berat yang ada di lingkungan, kecuali pada bakteri yang ditumbuhkan di media mengandung cadmium (Cd). Hal itu membuktikan bahwa mayoritas logam berat berperan dalam meningkatkan transfer gen horizontal (Wang *et al.*, 2020).

Secara umum mekanisme mutasi dan transfer gen antar bakteri bersifat netral, artinya tidak menguntungkan atau merugikan bakteri. Bakteri yang mengalami mutasi dan transfer gen horizontal tidak selalu bisa mengekspresikan perubahan atau penambahan basa nitrogen di DNA yang terjadi. Hal itu karena ekspresi suatu gen dalam bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor. Gen yang berubah atau bertambah karena mutasi dan transfer gen horizontal bisa menjadi gen yang menguntungkan jika bakteri mampu mengekspresikannya dan terdapat lingkungan yang mendukung untuk mengekspresikan

gen tersebut. Hal ini juga berlaku pada bakteri resisten logam berat, di mana ekspresi resistensi logam berat yang dimiliki oleh bakteri bisa terlihat karena bakteri berada di lingkungan yang cocok dan gen resistensi timbal berat yang dimiliki kompatibel dengan bakteri.

4.2. Metallothionein

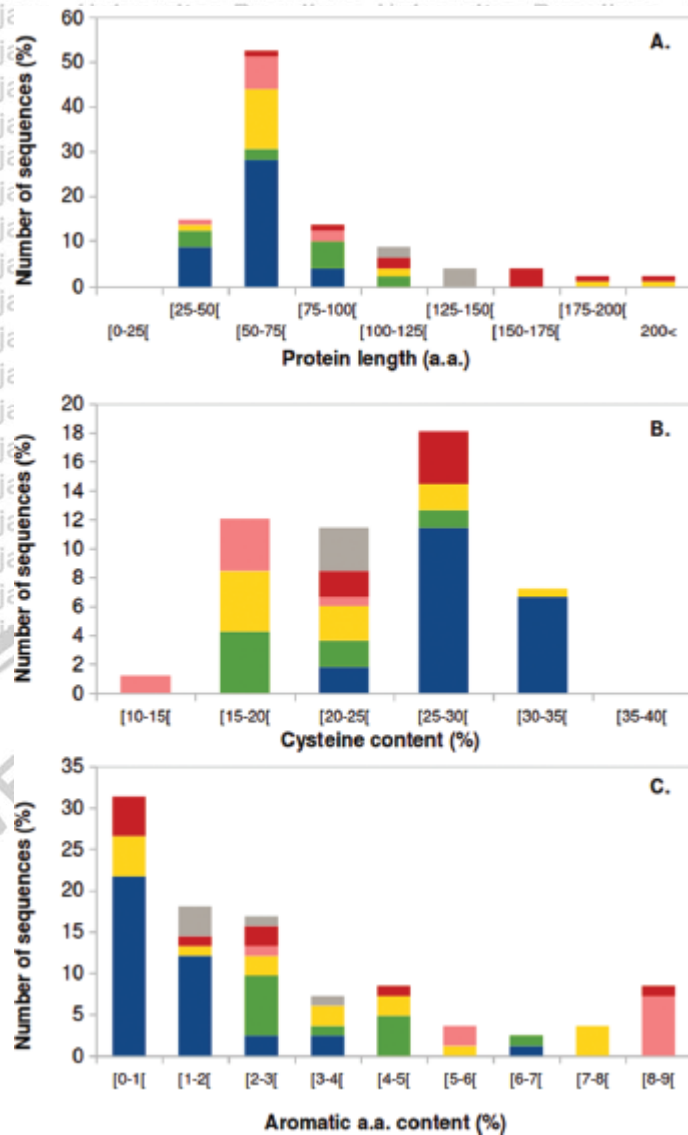
Bakteri memiliki banyak mekanisme resistensi terhadap logam berat. Salah satu mekanisme resistensi yang dimiliki oleh bakteri adalah mekanisme resistensi menggunakan metallothionein. Metallothionein adalah protein yang mengandung banyak asam amino sistein yang berfungsi sebagai penjaga homeostosis dalam sel. Metallothionein merupakan protein yang unik, karena protein ini dimiliki oleh hampir semua organisme, baik prokariotik ataupun eukariotik.

4.2.1. Struktur dan Klasifikasi Metallothionein

Metallothionein adalah protein pendek yang memiliki banyak asam amino sistein (Cys). Metallothionein bakteri memiliki sekitar 10-35% sistein. Jika dibandingkan dengan protein lain akan maka jumlah sistein metallothionein terlihat jauh lebih banyak karena jumlah sistein di protein lain hanya sekitar 2%. Asam amino sistein yang dimiliki oleh metallothionein membuatnya mudah sekali mengikat ion logam. Hal itu karena sistein memiliki gugus thiol yang mudah bereaksi dengan logam (Gutiérrez *et al.*, 2019).

Salah satu keunikan metallothionein sekaligus menjadi ciri dari metallothionein adalah adanya gugus asimetri yang unik. Gugus asimetri adalah rasio atau perbandingan antar asam amino dalam suatu protein yang tidak seimbang antar satu jenis asam amino dengan asam amino yang lain tetapi malah menjadi ciri khas dan keunikan suatu protein. Beberapa gugus asimetri yang dimiliki oleh mayoritas metallothionein bakteri adalah lysin > arginin, leusin > isoleusin, threonine > serin atau serin < threonine. Namun, hingga saat ini kegunaan gugus asimetri tersebut pada metallothionein masih belum diketahui (Gutiérrez *et al.*, 2019).

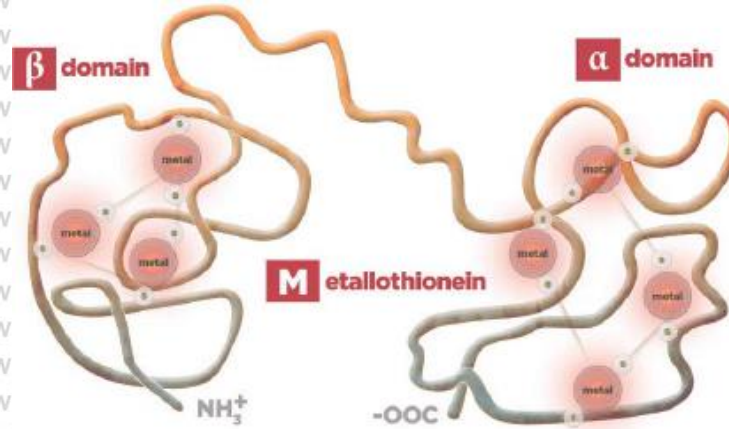
Salah satu jurnal meneliti mengenai profil berbagai metallothionein yang telah ditemukan (Gambar 4.4). Setiap jenis metallothionein memiliki panjang asam amino yang berbeda. Mayoritas panjang asam amino yang ada di berbagai metallothionein adalah 50-70 asam amino. Jumlah sistein pada setiap jenis metallothionein juga berbeda, metallothionein yang telah ditemukan memiliki 10-35% sistein. Namun, mayoritas memiliki 25-30% sistein dalam setiap proteinnya. Salah satu keunikan dari metallothionein adalah jarang memiliki asam amino aromatik seperti tiroso, triptofan, fenilalanin, leusin, dan isoleusin (Ziller dan Fraissinet-Tachet, 2018).



Gambar 4.4. Profil asam amino berbagai jenis metallothionein (Ziller dan Fraissinet-Tachet, 2018): A: panjang asam amino metallothionein; B: kandungan sistein metallothionein; C: kandungan asam amino aromatik; warna merah muda: metallothionein bakteri; warna biru: metazoan; warna hijau: tanaman; warna kuning: fungi; warna merah: eukariot; abu-abu: organisme belum diketahui.

Metallothionein organisme tingkat tinggi, seperti mamalia dan ikan memiliki 2 domain utama yaitu domain α dan domain β yang dihubungkan oleh polipeptida yang tersusun atas banyak asam amino non sistein (Gambar 4.5). Domain α terletak pada C-terminal sedangkan domain β berada di N-terminal. Kedua domain ini mengikat jumlah logam yang berbeda di mana. Pada metallothionein mamalia domain α mengikat 4 ion logam divalen sedangkan domain β mengikat 3 ion logam divalen. sehingga 1 molekul metallothionein mamalia dapat mengikat 7 ion logam divalen. Metallothionein bakteri tidak memiliki dua domain. Hal ini berkaitan dengan evolusi dari metallothionein. Metallothionein yang dimiliki

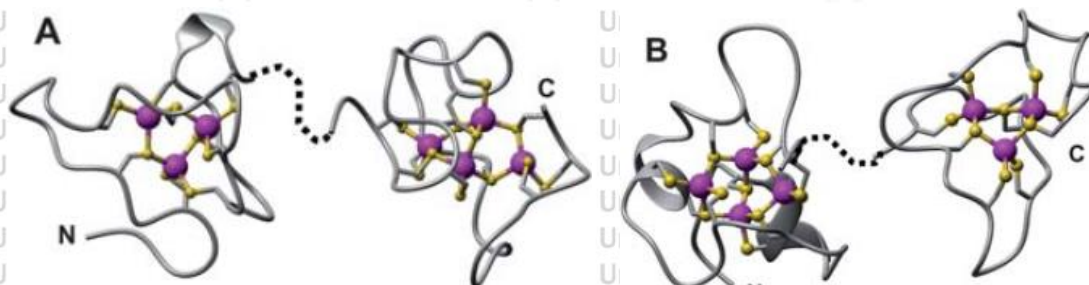
oleh organisme tingkat tinggi seperti hewan dan tumbuhan kebanyakan memiliki dua domain metallothionein. Dua domain metallothionein bisa mengikat logam lebih banyak daripada satu domain (Comes Orpinell, 2017).



Gambar 4.5. Struktur metallothionein (Comes Orpinell, 2017)

Mayoritas metallothionein hanya memiliki struktur primer dan tidak memiliki struktur sekunder atau tersier (Blindauer dan Leszczyszyn, 2010). Struktur primer adalah struktur protein berdasarkan asam amino yang menyusunnya. Struktur sekunder adalah struktur atau gambaran asam amino saat berinteraksi dengan atom hidrogen. Struktur tersier adalah struktur protein saat berikatan dengan sesama struktur sekunder. Metallothionein hanya memiliki struktur primer karena struktur sekunder dari metallothionein hanya akan terbentuk jika metallothionein berikatan dengan logam, terutama seng (Zn) dan tembaga (Cu) (Calvo *et al.*, 2017).

Kebergantungan metallothionein terhadap logam yaitu seng (Zn) dan tembaga (Cu) menyebabkan hampir setiap metallothionein memiliki *zinc finger* (Gambar 4.6). *Zinc finger* ikatan metallothionein dengan Zn. Selain membentuk struktur sekunder dan tersier, ikatan dengan seng (Zn) juga berfungsi untuk menstabilkan metallothionein agar tidak mudah berubah bentuk (Blindauer dan Leszczyszyn, 2010). Hal itu karena perubahan struktur suatu protein akan mengubah fungsi dari protein tersebut.



Gambar 4.6. Struktur 3D metallothionein (Blindauer dan Leszczyszyn, 2010). A: Metallothionein dari hati tikus Cd₇-MT-2; B: Metallothionein dari *Strongylocentrotus*

purpureus Cd-MTA. Warna ungu: atom seng (Zn); warna kuning: atom sulfur (S); warna abu-abu: asam amino

Klasifikasi protein, termasuk metallothionein, didasarkan atas kemiripan sekuens asam amino yang dimiliki oleh protein. Berdasarkan hal tersebut maka para ilmuwan melakukan klasifikasi metallothionein. Pada klasifikasi metallothionein yang pertama metallothionein dibagi menjadi tiga kelas. Kelas I adalah metallothionein yang memiliki kemiripan dengan metallothionein kuda. Kelas II adalah metallothionein yang tidak memiliki kemiripan sekuens asam amino dengan metallothionein kuda. Kelas III adalah fitokelatin, polipeptida tanaman yang berasal dari polimerisasi glutathionein. Seiring berjalannya waktu, banyak ditemukan metallothionein baru yang berasal dari banyak makhluk hidup. Penemuan metallothionein yang semakin banyak tersebut membuat klasifikasi berdasarkan kemiripan sekuens asam amino metallothionein dengan sekuens asam amino metallothionein kuda menjadi tidak relevan. Hal tersebut karena banyaknya metallothionein yang dimasukkan ke dalam kelas II sehingga membuat ilmuwan menjadi bingung (Capdevila dan Atrian, 2011).

Klasifikasi kedua dilakukan dengan mengelompokkan metallothionein menjadi 15 famili. Pengelompokan metallothionein menjadi 15 famili ini berdasarkan atas kemiripan sekuens asam amino antar metallothionein dan hubungan filogenik antar organisme yang umum menghasilkan metallothionein tersebut. Setiap organisme mampu menghasilkan metallothionein yang berbeda-beda. Perbedaan itu disebabkan oleh faktor evolusi dari masing-masing organisme beserta evolusi dari metallothionein sendiri (Capdevila dan Atrian, 2011). Pada Gambar 4.7 terlihat bahwa terdapat kemiripan asam amino pada setiap famili, walaupun berada dalam sub famili yang berbeda. Pengelompokan metallothionein berdasarkan kesamaan sekuens antar metallothionein dan hubungan filogenik organisme asal memproduksi metallothionein membuat ilmuwan lebih mudah untuk melacak hubungan antar metallothionein beserta mekanisme kerjanya.

Pengelompokan metallothionein menjadi 15 famili masih digunakan menjadi semakin berkembang dengan penambahan-penambahan sub-sub famili baru pada masing-masing metallothionein. Masih terdapat beberapa kesamaan dan perbedaan yang terjadi dalam satu famili. Oleh karena itu ilmuwan menambahkan klasifikasi berupa sub famili pada metallothionein yang berada dalam satu famili (Ziller dan Fraissinet-Tachet, 2018).

Keragaman Metallothionein tidak hanya disebabkan karena metallothionein memiliki banyak famili dan sub famili, melainkan juga karena metallothionein memiliki banyak isoform. Isoform adalah protein yang memiliki kemiripan sekuens asam amino satu sama lain. Satu sub famili biasanya memiliki banyak isoform (Shamsi dan Fatima, 2014). Salah satu contohnya adalah sub famili MT-1 yang tergolong famili metallothionein vertebrata

memiliki beberapa isoform seperti MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H, MT-1X, dan MT-12A) (Somji *et al.*, 2001). Isoform-isoform dari metallothionein tersebut bisa dikode oleh satu atau lebih gen.

1. Vertebrate (60-68 aa)

M. musculus MT1 MDPN-**CSCTTGGSCACAGSCKCKECKCTSCCK--CCSCCPVGCACAKAQQCVCKGSS-----EKCRCCA** (P02802)
M. musculus MT2 MDPN-**CSCASDGSCSACAGACKCKQCKCTSCCKSCSCSCCPVGCACAKSQQCICKEAS-----DKCSCCA** (P02798)
M. musculus MT3 MDPET**CPCTGGSCCTCSDKCKCKGCKCTNCKS--CCSCCPAGCCKCAKDCVCKGEEGAKAEAEKCSCCQ** (P28184)
M. musculus MT4 MDPGE**CTCMSGGICICGDNCKCTTCSCKTCRKSCKCCPPGCAKARGCICCKGSS-----DKCSCCP** (P47945)

2. Mollusca (64-75 aa)

Bivalve

*M. edulis*10MTIV MPAP**NCIETNVCI**CDT**GC**SGEG**CR**CGD**ACKCSGADCKCSGCKVVKCSGSCACEGGCTGPSTCKCAPGCSCK** (P80249)
*M. edulis*20MTI MPGP**NCIETNVCI**CGT**GC**SGG**CC**RCGD**ACKCASG-CGCSGCKVVKCSGTCKCKGCDCTGPTNCKCESGCSCK** (P80251)

Gastropoda

H. pomatia CdMT MSGK**GKGEKCT**SAC**RSEPCQCGSKCQCGEGCTCAACTCNCTSDGCKGCKECTGPDSCCKGSSCSCK** (P33187)
H. pomatia Cd-CuMT MSGK**GS--NCAGSCNSNPFCSGDDCKCGAGCSVQCHSCQCNNDTCKCGNQCSAGSKCG--SGCK** (DILLZJ8)
H. pomatia Cu MT MSGR**GK--NCGGACNSNPFCSGDDCKCGAGCNCDCRSCSHCSNDCKCGSQCTGSGSKCSGACGCK** (P55947)

3. Crustacea (58-60 aa)

C. sapidus CdMT1 MPGP**CCNDKCVCEGGCKAGCQCTSCRCSPQKCTSGCKCATKBECSKTC**TKPC**SCCPK** (Q548Y3)
C. sapidus CdMT2 MPD**PCNDKCECKE**GECK**TGCKCKS**CRPP**DKCSSECKCTSK**EECSK**TC**SKPC**SCCP** (Q548Y2)
C. sapidus CuMT MP**CGCGTSCKCGSGKCCCGSTCNCTT**CP**SKQCS**CNDG**AGCSAQCKTSCCGADCKCS**PC**PMK** (Q9U620)

4. Equinoderma (64-67 aa)

S. purpuratus SpMTA MPDV**KVCCKEGKECAC**FG**QDCC**T**GECC**KG**TCC-GICTNAACK-CANGCKCGSGCSCTEGNCAC** (P04734)
S. purpuratus SpMTB MPDV**KVCCKEGNECAC**KG**QDCC**T**GECC**KG**TCCGKCSNAACKT**CAD**GCKCGSGCSCTEGNCP** (Q27287)

5. Diptera (40-43 aa)

D. melanogaster MtnA M**PCP-CGSGCKCASQATKGS**CN**CGSDCKC--GGDKSACGCSK** (P04357)
D. melanogaster MtnB M**VCKGCGTNCQCSAQKCGDNAC**KN**DCQCVCK**NGPK**DQCCSNK** (P11956)
D. melanogaster MtnC M**VCKGCGTNCQCSAQKCGDNAC**Q**DKCVC**KN**PKDQCCSK** (Q9VDN2)
D. melanogaster MtnD M**GCKACGTCNCQCSATKCGDNAC**S**QCCQCSCK**NGPK**DKCCSTKN** (Q819B4)
D. melanogaster MtnE M**PCKGGNNCQCSAGKCGGN**CAGNS**QCCAAKTGA-KCCQAK** (*)

6. Nematoda (62-74 aa)

C. elegans MT1 M**ACKDCKNKQCKC--GDK-CBCSGDKCEKYE**CEE**EASEKKCCPAGCKGDKCANCHCAEQKQCGDKTHQHQTAAAH** (P17511)
C. elegans MT2 M**VCKDCKNQNC**SCNT**GT**K**DCD**SD**AKCCEQYCCPTASEKKCKKSGCAGGCKCANCB**CA**Q-----AAH** (P17512)

7. Ciliata (107-168 aa)

T. thermophila MTT1 MDK**VNNCCCCGENAKPCC**TD**PN**SG**CCCV**SET**NNCK**SD**DKK**CC**TGTGEGCKWTGCKCQ**PA**KS**GC**CCGDK** (Q8T6B3)
 AK**ACCTDP**NS**GGCCS**SK**TNK**CD**STNKTECKTCECK**
T. thermophila MTT2 MD**TQTQTKVT**VG**CS**NP**CKQPLCKCGT**TA**ANCQP**EN**CDP**CS**NPCK**GV**TESCG**NP**CKCAE**CK**CGS**
 H**TEKTSACK**NP**CA**NP**CGS**TS**SNCK**NP**CKCAE**CK
T. thermophila MTT3 ME**KINNSCC**GEN**TKICCTDLNRQ**C**NCACK**TD**NCCK**P**ETNECC**TD**TL**EG**CK**CV**DKCCK**SH**VTCC**H**GVNVK**
 S**CLDP**NS**GYQC**AS**KTDNCC**KS**DTKECC**T**GTQ**EG**CK**CT**NCQCYKQAQ**Q**CCCGDKKACCTDP**NS**GGCCS**
 NN**KANKCC**D**ATS**SK**KECQV**C**QCK**
T. thermophila MTT4 MD**TQTQTKVT**VG**CS**NP**CKQPLCKCGT**TA**ANCQP**EN**CDP**CS**NPCK**GV**TESCG**NP**CKCAE**CK**CGS**
 H**TEKTSACK**NP**CA**NP**CGS**TS**SNCK**NP**CKCAE**CK
T. thermophila MTT5 MD**KISG**EST**KIC**SK**TBEK**W**CCCP**SET**QNC**NS**DDKQ**CV**GS**GE**GCIYV**CC**CKCK**Q**VAE**CK**CGP**NA**KYCCI** (Q5EGE0)
 DP**NTGNCC**V**CKTK**FK**CS**KS**DS**KE**CCPGG**SC

8. to 13. Fungae and yeasts			
Family 8 (25-27 aa)			
<i>N. crassa</i>	MT	MGDCGCSGASSCNCGSGCSCSNCGSK	(P02807)
Family 9 (63 aa)			
<i>C. glabrata</i>	MT1	MANDCKCPNGCSCPCANGGCQCGDKCECKKQKQCHGCGEQCKCGSHGSSCHGSCGCGDKCECK	(P15113)
Family 10 (52 aa)			
<i>C. glabrata</i>	MT2	MPEQVNCQYDCHCSNCACENTCNCCKAKPACACTNSASNECSCQTCCKQTCCK	(P15114)
Family 11 (54-55 aa)			
<i>Y. lipolytica</i>	MT3	MEFTTAMLGLASLISPTSTQSKHNLVNNCCSSSTSESSMPASCACCTKCGCKTCKC	(P41927)
Family 12 (61 aa)			
<i>S. cerevisiae</i>	CUP1	MFSELINFQNEGHECQCQCGSCKNNEQCQKSCSCTPGCNSDDKCPGCKSEETKKSCSGK	(P07215)
Family 13 (69 aa)			
<i>S. cerevisiae</i>	CRS5	TVKICDCEGECECKKDSCHGSTCLPSCSGGKCKCDHSTGSPQCKSCGEKCKCETTCTCEKSKCCKEKC	(P41902)
14. Prokariota (53-56 aa)			
<i>Synechococcus</i>	SmtA (Zn)	MTVTQMKCACPHCLCIVSLNDAIMVDGKPYCSEVCANGTCKENSGCGHAGCGGSA	(P30331)
<i>Mycobacterium</i>	MymT (Cu)	MRVIRMTNYEAGTLLTCSHEGCGCRVRIEVPCHCAGAGDAYRCTCGDELAPVK	(P06128)
15. Plants (4 types)			
Type 1 (45 aa)			
<i>A. thaliana</i>	MT1	MADSNCGCGSSCKCGDSCSCEKNYNKCDNCSCGSNCSCGSNCNC	(P43392)
Type 2 (81 aa)			
<i>A. thaliana</i>	MT2	MSCCGGNCGCGSGCKCGNGCGGCKMYPDLGFSGETPTTTFVFLGVAPAMKNQYEASGESNNAENDACKCGSDCKCDPCTCK	(P25860)
Type 3 (69 aa)			
<i>A. thaliana</i>	MT3	MSSNCGSCDCADKTQCCKVKGTSYTFDQVETQESYKEAMIMDVGAENNANCKCKCGSSCSCVNCCTCCPN	(O22433)
Type 4 (or EC) (69 aa)			
<i>A. thaliana</i>	MT4	MADTCKGSSVAGCNDSCGCPSPCGGNSCRCRMREASAGDQGHMVCPCGEHCNCNCPKQTQTSARKCTCGEGCTCASCAT	(P93746)

Gambar 4.7. Sekuens asam amino dari seluruh famili metallothionein (Capdevila dan Atrian, 2011)

Selain dipisahkan berdasarkan familinya, metallothionein juga bisa diklasifikasikan berdasarkan susunan asam amino sistein dalam strukturnya serta hubungannya dengan asam amino lain. Saat berbagai metallothionein di-alignment maka akan terlihat susunan asam amino sistein yang unik. Terdapat 9 jenis susunan sistenin dalam berbagai metallothionein yang telah ditemukan yaitu xxCxx, CxC, xCCx, CxCxC, CxCC, CCxC, CCC, CxCxCxC, dan CCxCC. Kode C menunjukkan sistein sedangkan kode x menunjukkan asam amino lain. Klasifikasi berdasarkan susunan sistein tidak terlalu kaku. Hal itu karena biasanya dalam satu metallothionein memiliki banyak jenis susunan sistein. Salah satu contohnya adalah metallothionein *Saccharomyces cerevisiae* Cup1 yang memiliki susunan sistein dalam metallothionein berupa CxCC, CxC, dan xxCxx (Ziller dan Fraissinet-Tachet, 2018).

Susunan sistein ini tidak berdampak pada kemampuan pengikatan logam dari metallothionein. Salah satu contohnya ialah yang metallothionein *Tetrahymena* spp. CU-

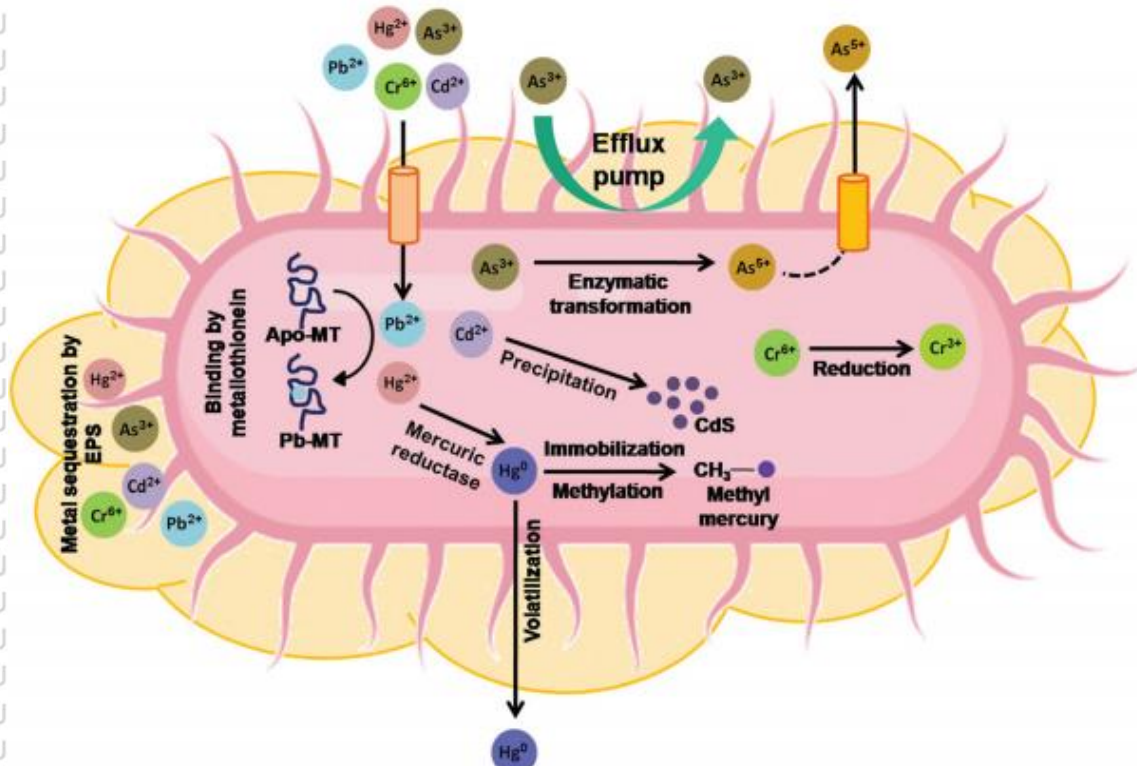
Mekanisme-mekanisme tersebut akan bekerja di saat bakteri berada di lingkungan yang mengandung ion logam.

Pada Gambar 4.9 ditunjukkan bermacam-macam mekanisme resistensi bakteri terhadap logam berat. Bakteri memiliki mekanisme pompa efflux yang berfungsi untuk mengeluarkan ion logam yang masuk ke dalam sel bakteri. Prinsip pompa efflux adalah mengeluarkan ion logam berat yang telah masuk ke dalam sel bakteri menggunakan protein transporter dengan melibatkan ATP. Mekanisme pompa efflux ini dilakukan oleh protein transporter, yaitu protein yang berfungsi untuk memindahkan suatu zat dari satu bagian ke bagian lain. Terdapat lima jenis protein transporter yang berfungsi dalam mekanisme pompa efflux yaitu *Resistance Nodulation Division (RND)*, *ATP Binding Cassette (ABC)*, *Multidrug and Toxin Extrusion (MATE)*, *Small Multidrug Resistance (SMR)*, dan *Major Facilitator Super (MFS)*. Salah satu contoh bakteri yang memiliki mekanisme pompa efflux adalah *S. aureus* yang memiliki mekanisme pompa efflux terhadap logam Cd (Abbas *et al.*, 2018).

Selain mekanisme pompa efflux, bakteri juga memiliki mekanisme pertahanan diri terhadap logam berat yang lain, yaitu presipitasi. Presipitasi adalah proses pembentukan presipitat. Bakteri akan mengeluarkan *Extra Polysaccharide (EPS)* untuk mempresipitasi ion logam. EPS adalah eksopolisakarida kompleks yang memiliki banyak gugus fungsi negatif sehingga bisa mengikat ion logam bivalen positif. Gugus fungsi yang dimiliki oleh EPS adalah karboksil, fosfat, amin, dan hidroksil (Zhu dan Dittrich, 2016). Ion logam berat yang telah terikat pada EPS tidak akan membahayakan bakteri lagi karena kereaktifan dari ion logam telah berkurang. Contoh bakteri yang memiliki kemampuan presipitasi ion logam menggunakan EPS adalah *Klebsiella michiganensis* yang mempresipitasi ion timbal (Pb^{2+}), tembaga (Cu^{2+}), nikel (Ni^{2+}), mangan (Mn^{2+}), seng (Zn^{2+}), dan cadmium (Cd^{2+}) (Bowman *et al.*, 2018).

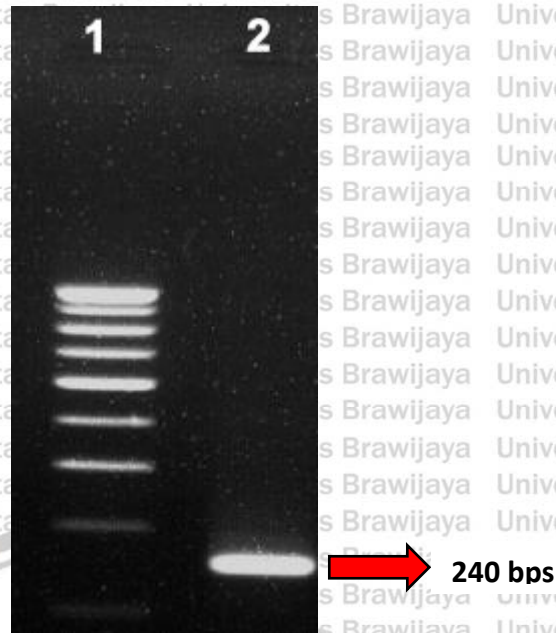
Bakteri memiliki mekanisme lainnya juga yaitu volatilisasi. Volatilisasi adalah pengubahan ion logam berat menjadi bentuk volatil atau gas. Volatilisasi bisa terjadi pada merkuri (Hg) dengan cara mereduksi ion logam merkuri inorganik (Hg^{2+}) menjadi merkuri elemental (Hg^0) yang berbentuk gas dengan bantuan enzim merkuri reduktase (Gambar 4.9). Contoh bakteri yang memiliki kemampuan volatilisasi adalah *Pseudoxanthomonas sp.* Bakteri *Pseudomonas sp.* memiliki gen *merA* yang mengkode enzim merkuri reduktase. Enzim merkuri reduktase akan mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 dengan memanfaatkan NADH sebagai elektron donor (Mahbub *et al.*, 2016). Selain merkuri (Hg), logam berat lain yang bisa mengalami volatilisasi adalah arsenik (As). *Clostridium glycolicum* adalah contoh bakteri yang mampu melakukan volatilisasi arsenik (As) dalam kondisi anaerob, sedangkan kelompok bakteri dari *Flavobacterium-Cytophaga* adalah contoh bakteri yang melakukan volatilisasi arsenik (As) dalam kondisi aerob (Wang *et al.*, 2014).

Pada Gambar 4.9 diperlihatkan bahwa metallothionein sebagai salah satu komponen (protein) yang menjaga bakteri dari ion logam akan menangkap ion logam dengan merubah dirinya dari apo metallothionein menjadi logam-metallothionein. Mekanisme metallothionein dalam menangkap ion logam termasuk mekanisme *metal sequestration*. Secara normal metallothionein akan mengikat ion seng (Zn), namun jika terdapat ion lain yang lebih melimpah maka metallothionein akan ganti mengikat ion tersebut (Chatterjee *et al.*, 2020).



Gambar 4.9 Berbagai mekanisme resistensi bakteri terhadap logam (Chatterjee *et al.*, 2020)

Salah satu penelitian melaporkan bahwa bakteri *Providencia vemicola* strain SJ2A memiliki ketahanan terhadap logam berat timbal (Pb) yang tinggi. Bakteri tersebut menyimpan logam berat yang di dalam membran periplasma, hal itu dibuktikan dengan foto membran periplasma bakteri yang menghitam saat ditumbuhkan di lingkungan mengandung timbal. Penelitian selanjutnya mengungkapkan bahwa bakteri tersebut memiliki plasmid berukuran 240 bps (Gambar 4.10). Plasmid tersebut sama dengan plasmid bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang mengandung gen *bmtA*. Gen *bmtA* adalah gen yang mengkode produksi metallothionein di bakteri. Hal tersebut mengindikasikan bahwa bakteri *Providencia vemicola* strain SJ2A memiliki menghasilkan metallothionein saat berada di lingkungan yang mengandung timbal (Pb) (Sharma *et al.*, 2017).



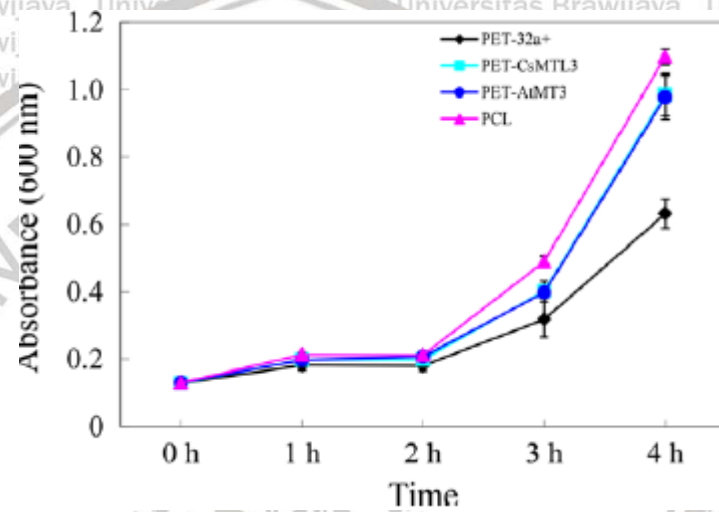
Gambar 4.10. Hasil PCR *Providencia vemicola* strain SJ2A. 1: marker; 2: pita DNA dari gen *bmtA* *Pseudomonas aeruginosa* yang sudah dimasukkan ke dalam *Providencia vemicola* strain SJ2A (Sharma *et al.*, 2017)

Penelitian lain mengungkapkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 memiliki kemampuan untuk resisten terhadap timbal (Pb) hingga 800 ppm. *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 juga diketahui memiliki plasmid berukuran 270 bps yang mengandung gen *bmtA* saat dilakukan PCR. Hal tersebut mengindikasikan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metallothionein sebagai mekanisme resistensi terhadap timbal (Pb) (Kumari dan Das, 2019).

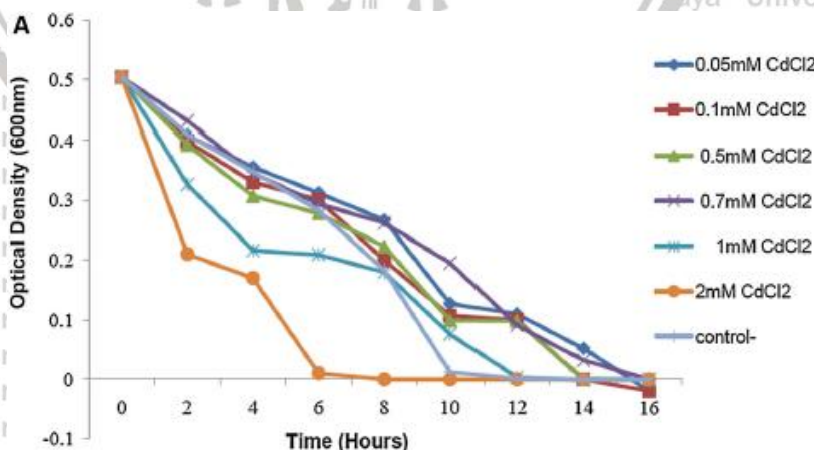
Pengaruh metallothionein terhadap kemampuan resistensi bakteri dapat dilihat dengan mengamati pertumbuhan bakteri. Suatu penelitian yang dilakukan dengan mentransformasikan gen *smtA* yang mengkode metallothionein dari *Synechococcus* PCC 7942 ke *E. coli* BL21 mengungkapkan bahwa metallothionein berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan *E. coli* BL21 non transformasi lebih rendah daripada *E. coli* yang tertransformasi saat ditumbuhkan selama 16 jam di media yang mengandung cadmium (Cd) berbagai konsentrasi (Gambar 4.11) (Seifipour *et al.*, 2017). Hal ini mengungkapkan bahwa metallothionein berpengaruh positif terhadap pertumbuhan bakteri saat bakteri berada di lingkungan yang mengandung cadmium (Cd) tinggi karena bisa memproteksi bakteri sehingga bakteri menjadi resisten terhadap logam berat dan bakteri bisa tumbuh dengan baik.

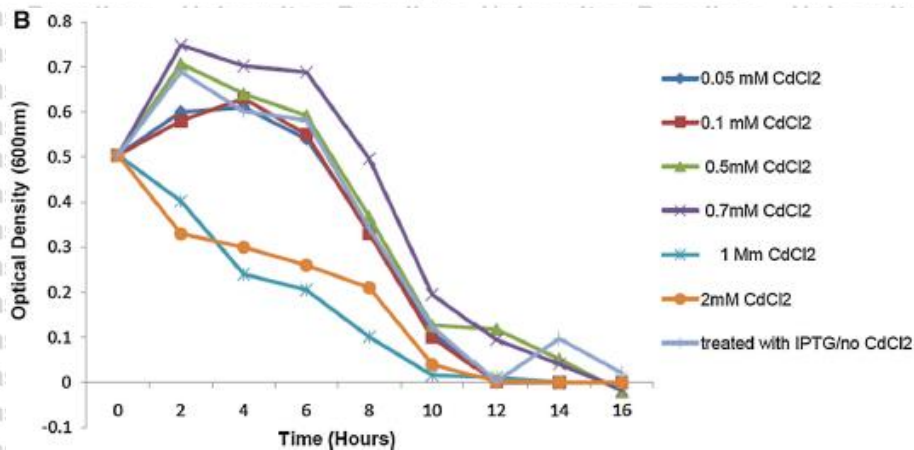
Penelitian lain mengungkapkan hal yang sama. Vektor plasmid pET32a (+) dimasukkan ke dalam *E. coli* BL21. Penelitian dilakukan dengan tiga beberapa variasi perlakuan yaitu *E. coli* BL21 + pET32a (+) sebagai kontrol yang tidak diberi gen penghasil

metallothionein, *E. coli* BL21 + pET32a-CsMTL3 yang diberi gen penghasil metallothionein dari tanaman *C. sativus* L. Cs0301, *E. coli* BL21 + pET32a-AtMT3 yang diberi gen penghasil metallothionein dari tanaman *A. thaliana*, dan *E. coli* BL21 + pET32a yang diberi gen phytoceletin. Keempat bakteri tersebut ditumbuhkan di dua jenis media yang berbeda yaitu media yang mengandung $CdCl_2$ 3 mM lalu diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan bakteri yang tidak diberi gen penghasil metallothionein mengalami pertumbuhan yang lebih lambat daripada bakteri yang ditransformasi dengan gen penghasil metallothionein di media yang mengandung cadmium (Cd) (Gambar 4.12). Hal ini mendukung pernyataan sebelumnya bahwa metallothionein berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri (X. Xu *et al.*, 2018).



Gambar 4.11. Grafik pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 yang ditambahkan gen penghasil metallothionein di media yang mengandung cadmium (Cd) (X. Xu *et al.*, 2018).



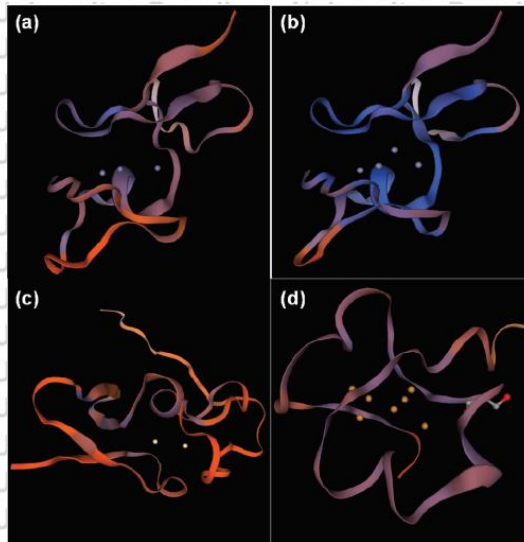


Gambar 4.12. Grafik pengaruh metallothionein terhadap pertumbuhan bakteri. A: grafik pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 non transformasi; B: grafik pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 yang mengandung gen *smtA* dari *Syenochooccus* PCC 7942 (Seifipour *et al.*, 2017)

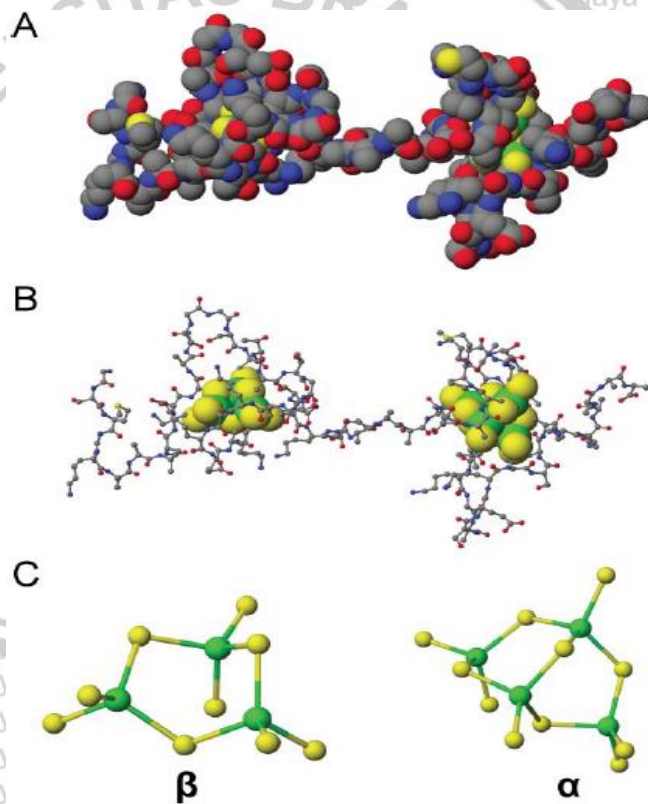
4.2.3. Mekanisme Metallothionein Mengikat Logam Berat

Metallothionein memiliki asam amino sistein yang banyak dibandingkan dengan protein lain. Sistein memiliki gugus thiol (S-H) di ujungnya. Gugus thiol merupakan gugus kimia yang mampu mengikat logam. Gugus thiol akan melepaskan ion hidrogen (H) lalu mengikat ion logam berat membentuk ikatan antara sulfur (S) dengan S-logam. Ion logam berat yang telah menjadi S-logam akan kehilangan sifat reaktifnya sehingga tidak akan bereaksi dengan zat lain. Secara umum ion logam memiliki rumus M^{2+} seperti Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , dan Cd^{2+} . Oleh karena itu biasanya satu ion logam tidak hanya diikat oleh satu jenis gugus thiol saja melainkan juga diikat oleh beberapa gugus thiol (Gambar 4.13) (Ngu dan Stillman, 2009).

Mekanisme kerja metallothionein dapat dibagi menjadi dua yaitu metilasi dan dimetilasi. Metilasi adalah mekanisme pengikatan apo-metallothionein (metalothionein yang belum diikat dengan ion logam) dengan ion logam atau substitusi metallothionein yang sudah mengikat logam dengan ion logam lain agar strukturnya menjadi lebih kuat dan stabil, sedangkan dimetilasi adalah mekanisme melepaskan ikatan ion logam dengan metallothionein. Logam yang terikat pada metallothionein biasanya terletak di tengah-tengah metallothionein dengan diikat dengan beberapa ikatan. Pada gambar 4.14 terlihat bahwa Cd^{2+} diikat oleh sejumlah gugus sitein menggunakan gugus thiol yang ada di ujungnya (Ngu dan Stillman, 2009).



Gambar 4.13. Struktur metallothionein mikroorganisme mengikat seng (Zn) (Chatterjee et al., 2020). A: *Methylobacterium sp.*; B: *Oscillatoria brevis*; C: *Anabaena sp.*; D: *Saccharomyces cerevisiae*

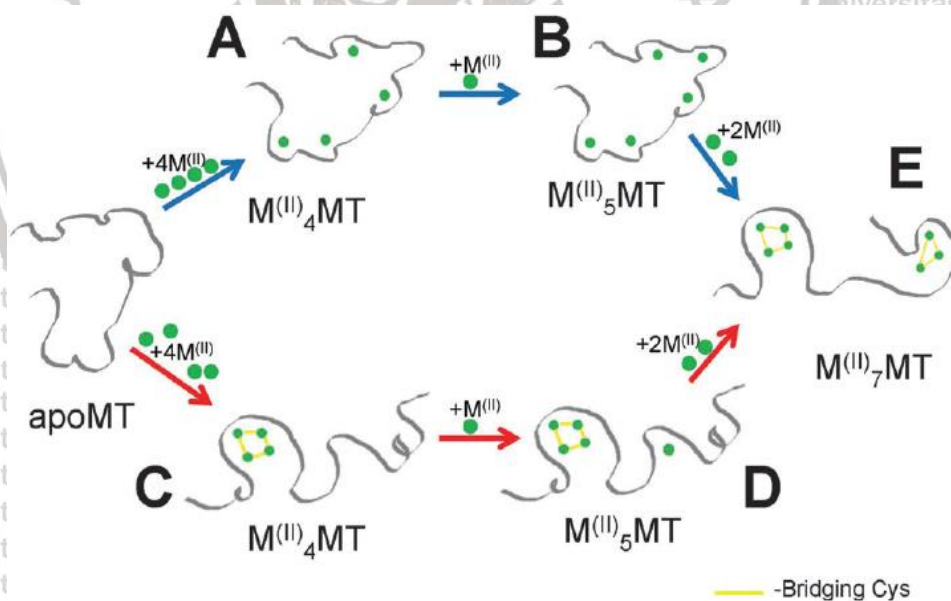


Gambar 4.14. Model molekuler Cd_7 - β hMT (Ngu dan Stillman, 2009). A: model *space filling*; B: model *ball stick* tetapi ikatan antara logam dengan gugus thiol berbentuk *space filling*; C: model *ball stick* jika domain α dan β dipisah

Metilasi oleh metallothionein dibagi menjadi dua yaitu pengikatan logam secara kooperatif (*cooperative metal binding*) dan non kooperatif (*non cooperative metal binding*). Metilasi secara kooperatif adalah pengikatan logam yang dilakukan oleh metallothionein

secara total. Pada metilasi kooperatif ion-ion logam yang berikatan dengan metallothionein akan berkumpul jadi satu sehingga akan membentuk metallothionein termetilasi, oleh karena itu pada metilasi kooperatif metallothionein hanya bisa berada dalam fase apo metallothionein dan termetilasi. Sedangkan metilasi non kooperatif adalah pengikatan logam secara bertahap, di mana metallothionein bisa mengikat ion logam secara beruntun dan bertahap. Pada metilasi non kooperatif ion-ion logam tidak langsung berkumpul jadi satu, melainkan bisa menyebar ke seluruh bagian dari metallothionein sehingga akan menimbulkan metallothionein setengah termetilasi karena tidak hanya ada dalam fase apo metallothionein dan metallothionein termetilasi. Metallothionein yang setengah termetilasi mampu untuk mengikat ion logam lagi (Ngu dan Stillman, 2009).

Pada Gambar 4.15 panah merah menunjukkan proses metilasi kooperatif di mana ion logam berkumpul di salah satu bagian metallothionein kemudian membentuk metallothionein yang termetilasi penuh. Saat ada ion logam lain maka ia akan berkumpul di bagian lain dari metallothionein. Panah biru menunjukkan proses metilasi non kooperatif, di mana ion logam terikata secara menyebar dan merata ke seluruh bagian metallothionein. Setiap bagian yang hanya berikatan dengan satu ion logam berada dalam fase setengah termetilasi karena pada bagian tersebut masih bisa berikatan dengan ion logam lain (Irvine *et al.*, 2016).

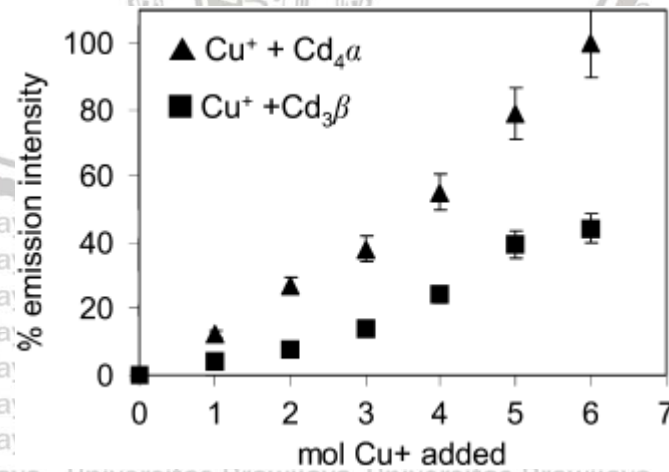


Gambar 4.15 Proses metilasi metallothionein kooperatif dan non kooperatif (Irvine *et al.*, 2016). Panah biru: proses metilasi non kooperatif; panah merah: proses metilasi kooperatif; lingkaran hijau: ion logam

Penelitian-penelitian terbaru menyebutkan bahwa metallothionein yang dimiliki oleh mamalia (metallothionein famili 1) bisa melakukan non kooperatif metal binding. Sebuah penelitian mengenai metallothionein rekombinan manusia (α -rhMT1a) yang dimetilasi

dengan ion cadmium (Cd) membuktikan hal tersebut. α metallothionein rekombinan manusia (α -rhMT1a) diletakkan di lingkungan yang mengandung timbal kemudian diamati proses pengikatannya. Hasil percobaan itu menunjukkan bahwa α -rhMT1a memiliki bentuk metallothionein setengah termetilasi. Apo α -rhMT1a secara bertahap mengikat ion cadmium (Cd) hingga mencapai metilasi penuh. Pengikatan ion cadmium (Cd) secara bertahap akan mengubah bentuk dari molekul metallothionein. Hal itu karena saat metallothionein terikat dengan cadmium (Cd) maka terbentuk ikatan-ikatan baru antara cadmium (Cd) dengan gugus thiol sehingga konformasi metallothionein berubah (Chan et al., 2008).

Perubahan bentuk akibat banyaknya ion logam yang terikat dengan metallothionein juga dijelaskan oleh penelitian lain. Pada penelitian yang diadakan tahun 2004 mengenai kemampuan rekombinan metallothionein dalam mengikat ion cadmium (Cd) dan tembaga (Cu) menunjukkan bahwa intensitas relatif dari metallothionein berubah saat metallothionein berikatan dengan logam. Penelitian itu dilakukan dengan mengukur intensitas relatif dari metallothionein yang sudah berikatan dengan cadmium (Cd) kemudian berikatan lagi dengan tembaga (Cu) pada domain α dan β dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui komposisi kimia dari metallothionein. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak tembaga (Cu) yang berikatan dengan metallothionein maka intensitas relatifnya juga semakin tinggi (gambar 4.16). Hal tersebut menunjukkan bahwa jumlah ikatan antara logam dengan gugus thiol semakin banyak saat jumlah ion tembaga (Cu) yang berikatan semakin banyak. Akibat dari bertambahnya ikatan antara gugus thiol dan metallothionein itu adalah konformasi metallothionein berubah (Salgado dan Stillman, 2004).



Gambar 4.16. Intensitas relatif dari α dan β metallothionein (Salgado dan Stillman, 2004)

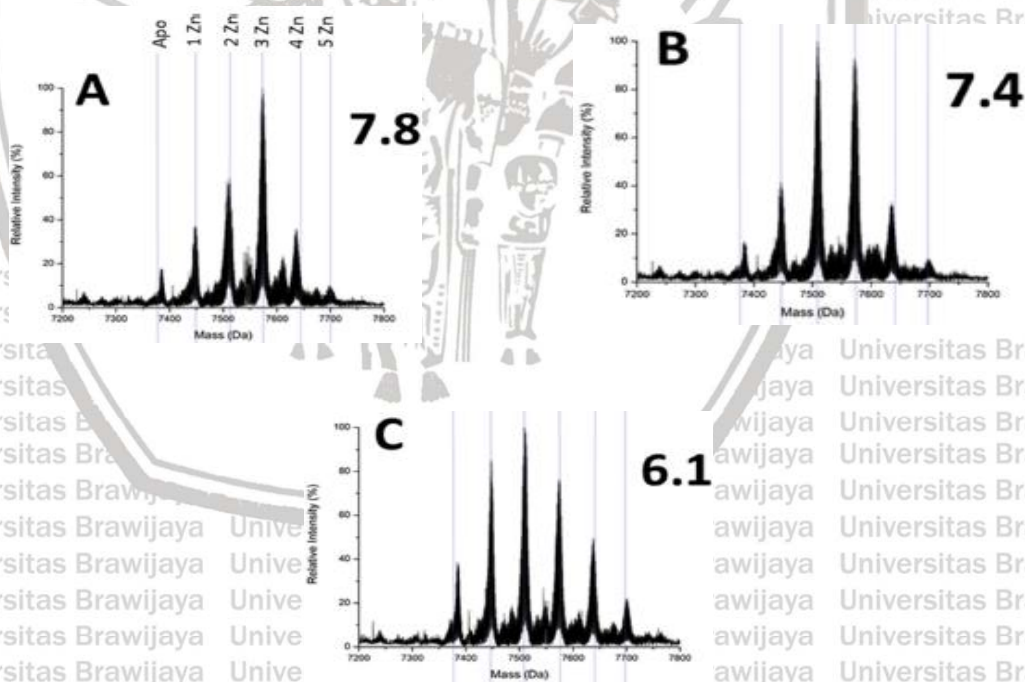
Sebuah metallothionein dapat mengikat beberapa jenis ion dalam satu waktu yang sama. Pada penelitian yang sama dengan penelitian pada paragraf sebelumnya

menunjukkan bahwa metallothionein dapat mengikat ion cadmium (Cd) dan tembaga (Cu) dalam waktu yang sama di domain yang sama pula. Penelitian yang dilakukan pada tahun 2004 tersebut juga mengungkapkan bahwa perbedaan domain yang mengikat ion logam akan memengaruhi ikatan antara gugus thiol dengan ion logam yang terbentuk sehingga akan memengaruhi konformasi metallothionein (Salgado dan Stillman, 2004).

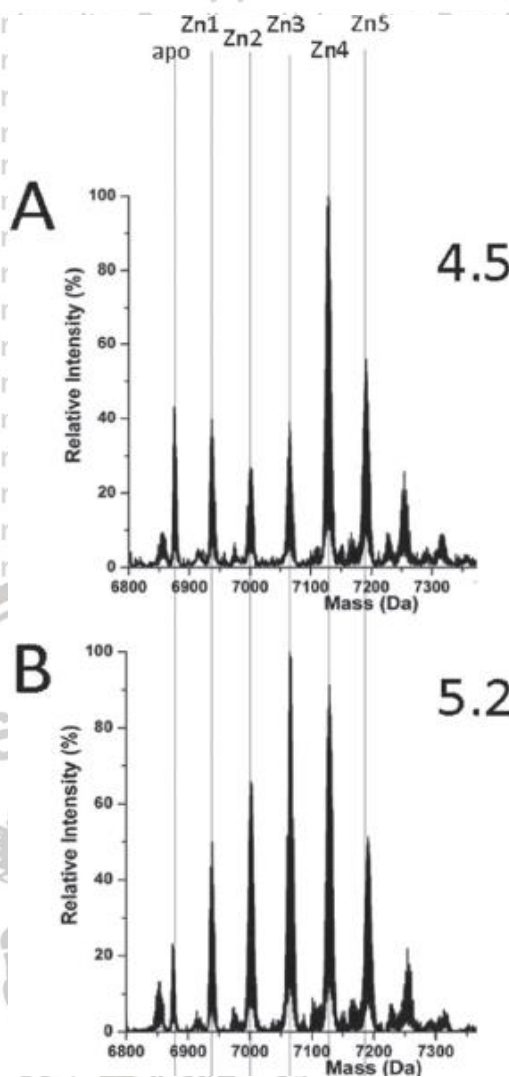
Pengikatan metallothionein secara non kooperatif dipengaruhi oleh pH saat pengikatan terjadi. Struktur pengikatan metallothionein akan berubah saat pH berubah.

Sebuah penelitian dilakukan dengan mengukur intensitas relatif dari Zn-MT2a, saat pH lingkungan diubah, menggunakan spektrometri massa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa intensitas relatif dari metallothionein ikut berubah seiring dengan perubahan pH lingkungan (Gambar 4.18). Perubahan intensitas relatif tersebut menunjukkan bahwa terjadi perubahan dalam struktur dan pengikatan dengan logam (Jayawardena *et al.*, 2017).

Namun, tidak semua pengikatan metallothionein dengan logam terpengaruh dengan pH. Sebuah penelitian menggunakan Zn-MT1a menunjukkan hal yang sebaliknya (Gambar 4.17). Saat Zn-MT1a dititrasi kemudian diukur intensitas relatifnya, tidak terlihat perubahan intensitas relatif yang terjadi. Hal itu berarti pengikatan Zn-MT1a tidak terpengaruh oleh pH (Irvine *et al.*, 2016).



Gambar 4.17. hasil pengukuran massa spektrometri Zn-MT2a. Zn-MT2a dititrasi dan diukur menggunakan massa spektrometri; A: pH 7,8; B: pH 7,4; C: pH 6,1 (Jayawardena *et al.*, 2017)



Gambar 4.18. Hasil pengukuran massa spektrometri Zn-MT1a. Zn-MT1a dititrasi dan diukur menggunakan massa spektrometri; A: pH 4,5 dan B: pH: 5,2 (Irvine *et al.*, 2016)

4.2.4. Mekanisme Ekspresi Metallothionein

Metallothionein pada bakteri dikode oleh *smt* operon. *smt* operon adalah sekumpulan gen yang terdiri dari gen regulator dan struktural gen yang berfungsi untuk mengekspresikan metallothionein pada bakteri, khususnya pada *Cyanobacteria*. Gen regulator adalah asam amino yang mengkode mengenai mekanisme pengaturan ekspresi dari gen struktural, sedangkan gen struktural adalah sekumpulan asam amino yang mengkode suatu protein, pada *smt* operon protein yang dikode adalah metallothionein (Busenlehner *et al.*, 2003).

Unsur utama gen regulator terdiri atas promotor dan operator. Operator adalah tempat RNA polymerase untuk menempel pada DNA. Setelah RNA polymerase menempel maka RNA polymerase akan melakukan transkripsi (mengubah kodon menjadi antikodon). Operator adalah bagian dari gen regulator yang berfungsi untuk mengendalikan proses

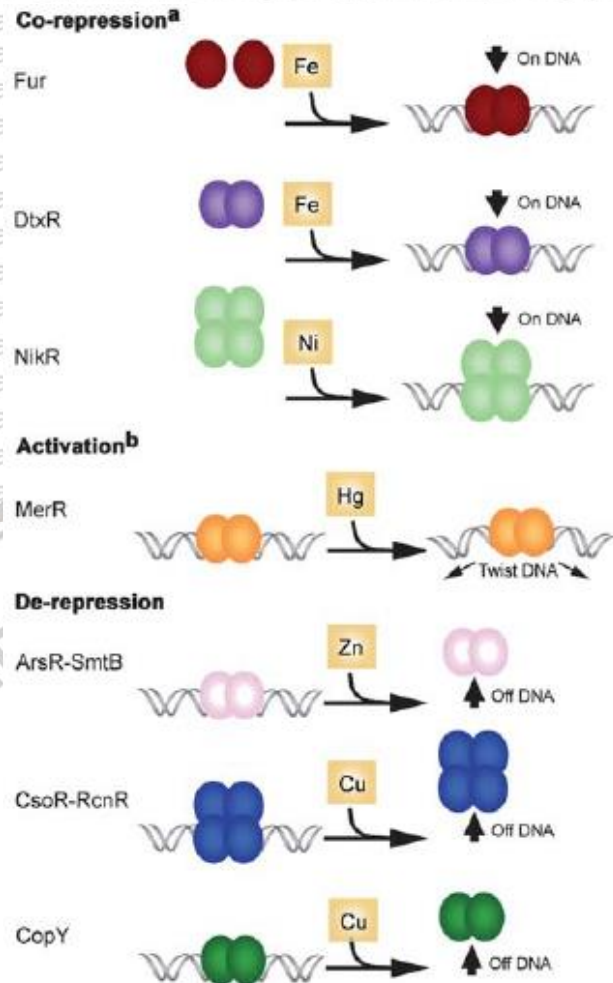
transkripsi. Operator bisa memulai, meningkatkan, menurunkan, dan menghentikan proses transkripsi (Osbourn dan Field, 2009).

Terdapat dua gen yang bertanggung jawab terhadap ekspresi metallothionein, yaitu *smtA* dan *smtB*. *SmtA* berfungsi sebagai gen pengkode metallothionein, sedangkan *smtB* berfungsi sebagai gen regulator yang mengatur laju transkripsi. Kedua gen tersebut dipisahkan oleh sekitar 100 bp nukleotida yang berfungsi sebagai operator dan promoter. Walaupun berada dalam satu operon tetapi laju transkripsi kedua gen tersebut berjalan berkebalikan (*divergen*) (Gambar 4.20) (Blindauer dan Sadler, 2005).

Kerja operator dalam mengatur transkripsi oleh RNA polymerase diatur oleh faktor transkripsi (*transcription factor*). Faktor transkripsi adalah protein yang akan menempel pada operator sehingga operator bisa mengatur laju transkripsi. Faktor transkripsi dibagi menjadi dua jenis yaitu aktivator dan repressor. Aktivator adalah faktor transkripsi yang memicu laju transkripsi, sedangkan repressor adalah faktor transkripsi yang menghambat laju transkripsi. Saat ini telah ditemukan tujuh famili faktor transkripsi yang berfungsi sebagai pendeteksi adanya logam berat (*metal sensing*) yaitu ArsR-SmtB, MerR, CsoR-RcnR, CopY, DtxR, Fur, dan NikR (Osman dan Cavet, 2010). Ketujuh faktor transkripsi tersebut bertanggung jawab atas laju transkripsi protein yang berhubungan dengan mekanisme resistensi bakteri terhadap logam berat.

Prinsip utama mekanisme ketujuh faktor transkripsi *metal sensing* adalah mendeteksi adanya logam kemudian menyampaikannya kepada operon agar operon memproduksi atau menghentikan produksi protein yang berhubungan dengan adanya logam. Berdasarkan mekanisme kerja setiap faktor transkripsi, ketujuh faktor transkripsi dibedakan menjadi tiga jenis yaitu co-repressor, activation, dan de-repression (Gambar 4.19). Activation bekerja untuk meningkatkan produksi protein pengkode resistensi logam. Saat tidak ada logam berat, activation terlepas atau tidak terikat dengan operator. Sedangkan saat ada logam berat, activation akan berikatan dengan ion logam kemudian akan terikat pada operator. Pengikatan activation pada operator akan membuat RNA polymerase bekerja mentranskripsi DNA. MerR termasuk ke dalam activation. Co-repressor dan de-repressor bekerja untuk menghentikan transkripsi. Saat ada logam, co-reseptor akan berikatan dengan logam. Kemudian co-reseptor akan menghentikan produksi protein. Faktor transkripsi yang termasuk co-repressor adalah Fur, DtxR, dan NikR. De-repressor bekerja dengan cara menghalangi RNA polymerase untuk mentranskripsi DNA. Saat tidak ada logam, de-repressor akan terikat pada operon sehingga menghalangi transkripsi RNA polymerase. Sedangkan saat ada logam berat maka logam berat akan berikatan dengan de-repressor kemudian akan mengubah konformasi proteinnya. Perubahan konformasi pada faktor transkripsi tersebut membuat faktor transkripsi terlepas dari operator sehingga RNA polymerase mentranskripsi DNA menjadi protein. Faktor transkripsi yang tergolong

sebagai de-repressor adalah ArsR-SmtB, CsoR-RcnR, dan CopY (Osman dan Cavet, 2010).



Gambar 4.19. Mekanisme kerja berbagai faktor transkripsi (Osman dan Cavet, 2010)

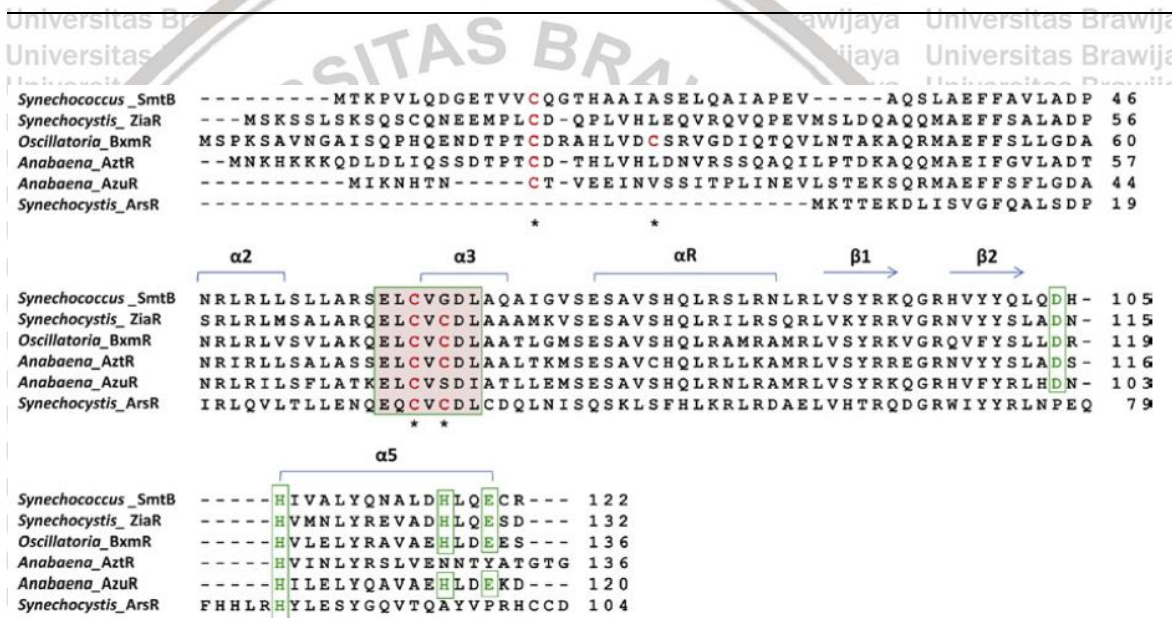
smtB adalah faktor transkripsi di *smt* operon yang dimiliki oleh *Cyanobacteria* yang berfungsi sebagai pendeteksi adanya logam berat sehingga gen metallothionein yang dikode oleh *smt* operon dapat ditranskripsi. *smtB* dapat mengenali banyak logam tetapi dengan kemampuan pengenalan yang berbeda-beda. Beberapa jenis logam yang mampu dikenali oleh *smt* operon adalah $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+}, (Cu^+), > Zn^{2+}$ (Busenlehner et al., 2003).

smtB memiliki susunan asam amino yang khas. Susunan asam amino yang khas tersebut disebut sebagai 'motif'. Motif adalah susunan asam amino khas dari suatu protein yang membedakannya dari protein lain. Motif pada *smtB* dapat dengan mudah diketahui jika kita melakukan *alignment* pada banyak protein *smtB* yang dimiliki oleh bakteri-bakteri. Saat ini telah diketahui 9 jenis motif yang ada pada *smtB* yaitu $\alpha_3, \alpha_3N, \alpha_5, \alpha_3N\alpha_5, \alpha_5C, \alpha_5-3, \alpha_4C, \alpha_3N-2$. Tabel 4.4 menunjukkan jenis-jenis *smtB* beserta situs pengikatannya, setiap *smtB* memiliki satu atau lebih jenis motif-motif tersebut. Motif-motif tersebut adalah

tempat penempelan logam yang pada *smtB*. *Cyanobacteria* memiliki motif $\alpha 3N$, motif ini dicirikan dengan adanya susunan asam amino glutamat, leusin, sistein, valin, sistein, aspartat dan leusin (ELCVCDL) (Gambar 4.20) (Botello-Morte *et al.*, 2013).

Tabel 4.4. Jenis-jenis *smtB* dan situs pengikatannya (Botello-Morte *et al.*, 2013)

Jenis-Jenis <i>smtB</i>	Logam utama yang mampu diikat	Situs pengikatan logam
<i>Synechococcus SmtB</i>	Zn ²⁺	$\alpha 5$
<i>Synechocystis ZiaR</i>	Zn ²⁺	$\alpha 5$ dan $\alpha 3N$
<i>Oscillatoria BxmR</i>	Zn ²⁺ , Cu ⁺ , Ag ⁺ , dan Cd ²⁺	$\alpha 5$ dan $\alpha 3N$
<i>Anabaena AztR</i>	Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , dan Pb ²⁺	$\alpha 3N$
<i>Anabaena AzuR</i>	Zn ²⁺ dan Co ²⁺	$\alpha 5$
<i>Synechocystis ArsR</i>	As ³⁺ dan Sb ³⁺	$\alpha 3$

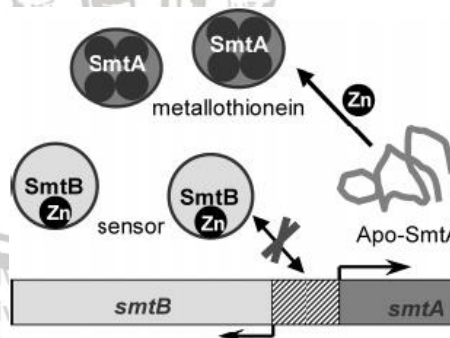


Gambar 4.20. Hasil *alignment* protein *smtB* pada beberapa bakteri (Botello-Morte *et al.*, 2013). Situs $\alpha 3N$ berada dalam merah dan situs $\alpha 5$ berwarna hijau

Motif-motif pada *smtB* sangat unik karena jika terjadi perubahan asam amino pada motif di *smtB* maka *smtB* tidak akan bisa berfungsi. Hal tersebut dibuktikan melalui sebuah penelitian, di mana suatu bakteri direkayasa dengan dimasukkan plasmid baru yang mengandung protein faktor transkripsi yang berbeda. Hasil dari penelitian menghasilkan kesimpulan bahwa perbedaan motif pada faktor transkripsi memengaruhi kinerja dari faktor transkripsi untuk mengatur produksi metallothionein (Pérez *et al.*, 2017).

Mekanisme ekspresi metallothionein pada *Cyanobacteria* dibagi menjadi dua, yaitu saat bakteri berada di lingkungan yang tidak mengandung logam dan saat bakteri berada

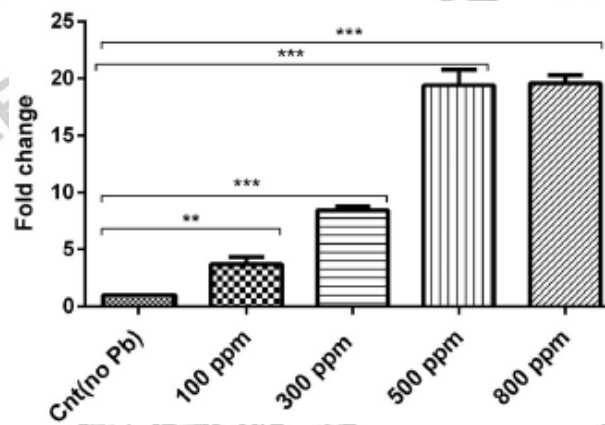
di lingkungan yang mengandung logam. Saat bakteri berada di lingkungan yang tidak mengandung logam, gen *smtB* akan ditranskripsi oleh RNA polymerase untuk membentuk protein *smtB*. Protein *smtB* yang terbentuk akan menjadi faktor transkripsi. Saat bakteri berada di lingkungan yang tidak mengandung logam, protein *smtB* akan menempel pada operator *smt* operon. Protein *smtB* yang menempel pada operator akan menghalangi RNA polymerase untuk mentranskripsikan DNA sehingga metallothionein tidak terbentuk (Busenlehner *et al.*, 2003). Sedangkan saat bakteri berada di lingkungan yang mengandung logam, logam berat berupa ion bivalen positif akan masuk ke dalam sel kemudian menempel pada protein *smtB*, tepatnya di bagian situs penempelan di protein *smtB* yang dimiliki oleh bakteri. Bakteri bisa memiliki satu atau lebih situs pengikatan, saat bakteri memiliki lebih dari satu situs pengikatan maka ia akan mengikat ion logam pada salah satu situs pengikatan. Pada *Cyanobacteria* yang memiliki situs pengikatan berupa $\alpha 3N$ dan $\alpha 5$ logam akan memilih situs pengikatan $\alpha 3N$. Satu molekul *Cyanobacteria* mampu mengikat empat ion logam Zn^{2+} . Dua ion Zn^{2+} diikat pada situs $\alpha 3N$ dan dua ion yang lain diikat pada situs $\alpha 5$. Pengikatan ion logam pada apo *smtB* akan membuat konformasi dari protein *smtB* berubah. Perubahan konformasi dari protein tersebut akan menyebabkan *smtB* terlepas dari operator sehingga RNA polymerase bisa melakukan transkripsi, kemudian hasil transkripsi akan ditranslasi menghasilkan apo metallothionein. Apo metallothionein yang belum memiliki bentuk (hanya memiliki struktur primer) akan mengikat ion logam bivalen positif, khususnya Zn^{2+} . Pengikatan apo metallothionein tersebut dengan ion logam bivalen positif akan membuat ion logam terlokalisasi (Gambar 4.21) (Busenlehner *et al.*, 2003).



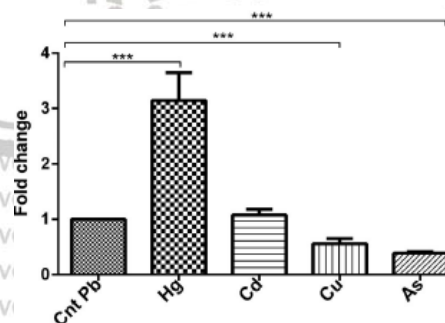
Gambar 4.21. Mekanisme ekspresi *smtA* dan *smtB*. Kotak bergaris hitam-putih: situs operator dan promotor gen *smtA*. Laju transkripsi gen *smtB* dan *smtA* terjadi secara berkebalikan yang digambarkan dengan gambar panah ke arah kanan dan kiri. Protein *smtB* yang sudah ditembeli oleh logam Zn tidak akan menempel pada operator (Blindauer dan Sadler, 2005)

4.2.5. Faktor-Faktor yang Memengaruhi Produksi Metallothionein Pada Bakteri

Produksi metallothionein pada bakteri sangat bergantung pada berbagai faktor seperti jenis metallothionein, jenis polutan yang ada, jumlah polutan, dan waktu inkubasi. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya penelitian pada *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 yang mengalami peningkatan produksi metallothionein saat berada di lingkungan yang mengandung timbal (Pb) tinggi. Hal tersebut dibuktikan dengan melihat keaktifan gen *bmtA* yang semakin meningkat saat berada di lingkungan yang mengandung timbal (Pb) tinggi (Gambar 4.22). Penelitian yang sama mengungkapkan bahwa bakteri mengalami peningkatan produksi metallothionein tertinggi saat berada di lingkungan yang mengandung logam raksa (Hg) dibandingkan jika bakteri berada di lingkungan yang mengandung logam timbal (Pb), raksa (Hg), tembaga (Cu), dan arsenik (As) (Gambar 4.23) (Kumari dan Das, 2019).



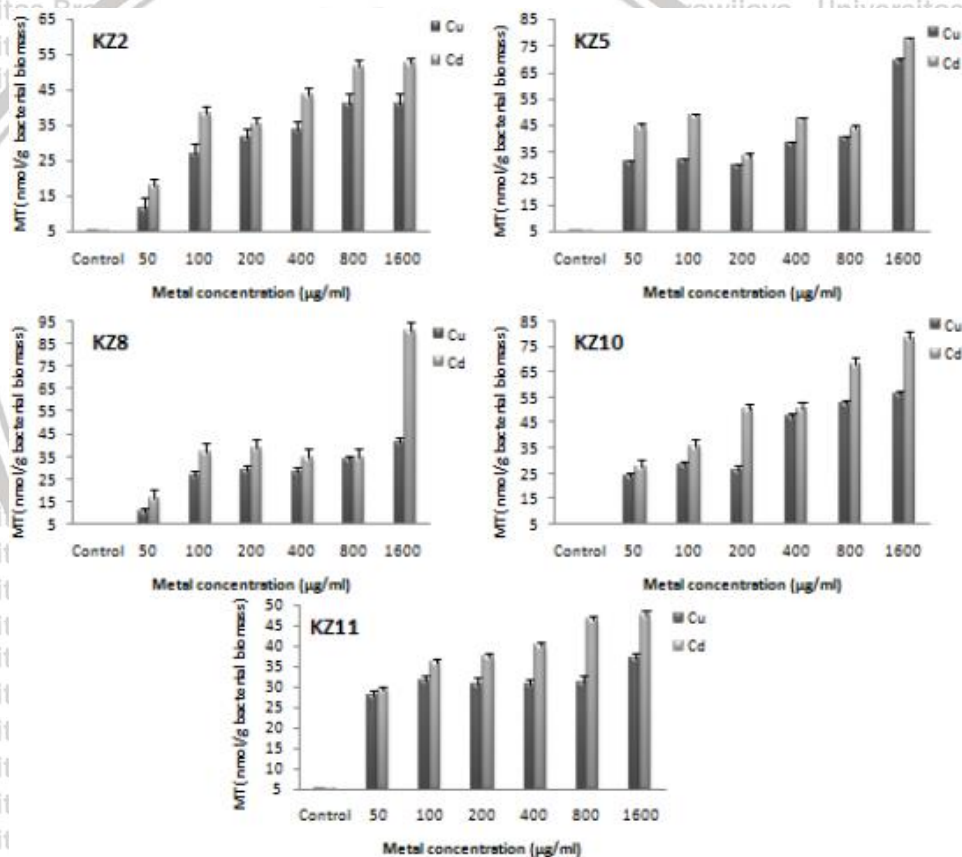
Gambar 4.22. Ekspresi gen *bmtA* *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 pada berbagai konsentrasi timbal (Pb) (Kumari dan Das, 2019)



Gambar 4.23. Ekspresi gen *bmtA* *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 pada berbagai jenis logam (Kumari dan Das, 2019)

Penelitian lain pada beberapa bakteri seperti *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytica*, *Proteus vulgaris*, dan *Salmonella typhimurium* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung cadmium (Cd) dan tembaga (Cu)

mengeluarkan metallothionein. Penelitian lebih lanjut mengungkapkan bahwa semakin besar konsentrasi logam cadmium (Cd) atau tembaga (Cu) maka produksi metallothionein juga semakin tinggi (Gambar 4.24). Selain itu, bakteri yang ditumbuhkan media yang mengandung cadmium (Cd) mengeluarkan metallothionein lebih banyak daripada bakteri yang ditumbuhkan di media yang mengandung tembaga (Cu) (Gambar 4.24). Hal tersebut mengindikasikan bahwa produksi metallothionein bergantung pada jenis logam yang mengkontaminasi lingkungan bakteri. Penelitian mengenai *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) dari kelima bakteri menunjukkan bahwa seluruh bakteri lebih resisten terhadap tembaga (Cu) daripada cadmium (Cd) (Gambar 4.24). Fakta-fakta tersebut menunjukkan bahwa produksi metallothionein pada bakteri akan semakin meningkat saat bakteri berada di lingkungan yang mengandung zat yang lebih toksik. Hal tersebut juga terjadi pada bakteri *Pseudomonas putida* yang menghasilkan metallothionein lebih tinggi di lingkungan yang mengandung logam berat lebih banyak (Benhalima *et al.*, 2020).



Gambar 4.24. Produksi metallothionein oleh bakteri. KZ2: *Citrobacter freundii*; KZ5: *Pseudomonas aeruginosa*; KZ8: *Klebsiella oxytoca*; KZ10: *Proteus vulgaris*; KZ11: *Salmonella typhimurium* (Benhalima *et al.*, 2020)

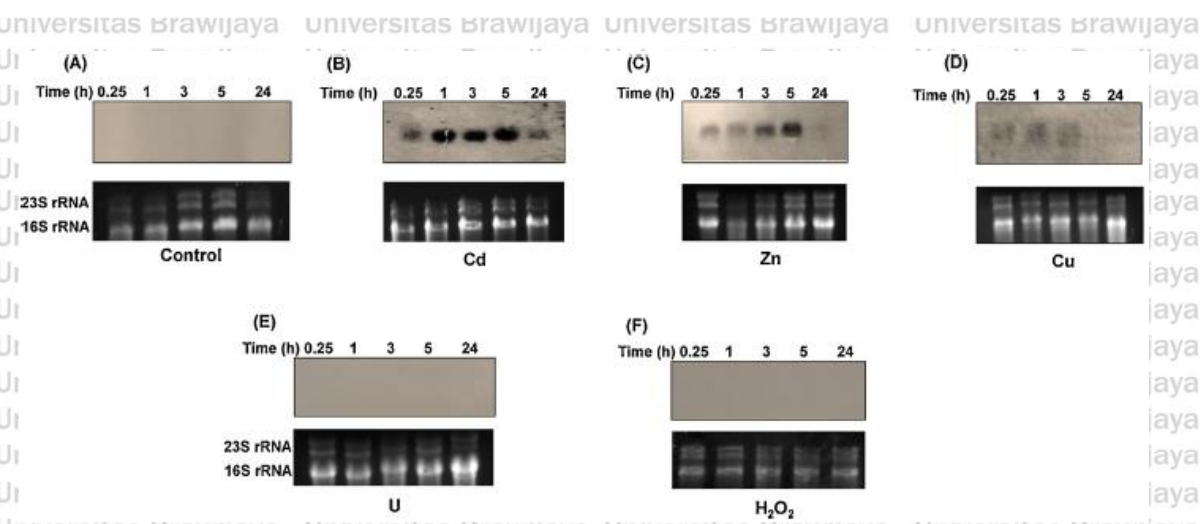
Metallothionein diproduksi saat bakteri mengalami stres karena pengaruh logam berat. Metallothionein juga diproduksi saat bakteri mengalami stres karena hal yang lain, salah satunya karena adanya zat pengoksidasi seperti H₂O₂. Sebuah penelitian yang

menumbuhkan bakteri *E. coli* yang telah dimasuki oleh plasmid pGEX-6p-1 yang mengandung gen *smtA* dari *Pseudomonas aeruginosa* di lingkungan yang mengandung H_2O_2 mengungkapkan bahwa bakteri tersebut mengeluarkan metallothionein. Pertumbuhan bakteri yang telah tertransformasi lebih tinggi daripada bakteri control yang tidak dimasuki oleh plasmid. Hal tersebut menunjukkan bahwa metallothionein yang diproduksi oleh bakteri mampu melindungi bakteri dari stres oksidatif yang terjadi sehingga tidak memengaruhi pertumbuhan bakteri (Davis, 2011).

Saat bakteri *E. coli* yang telah ditransformasi oleh plasmid pGEX-6p-1 ditumbuhkan di media yang mengandung H_2O_2 lebih tinggi maka produksi metallothioneinnya juga meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri peningkatan produksi metallothionein pada konsentrasi yang lebih tinggi tidak hanya terjadi pada stres akibat logam berat saja, melainkan juga stres akibat selain logam berat juga memicu produksi metallothionein meningkat. Selain itu, penelitian ini juga mengamati produksi metallothionein yang lebih tinggi pada bakteri yang ditumbuhkan di lingkungan yang mengandung H_2O_2 dibandingkan bakteri yang ditumbuhkan di lingkungan yang mengandung magrofag. Hal tersebut membuktikan pemicu produksi metallothionein tidak terbatas pada logam saja, melainkan juga bisa dipicu oleh stres akibat non logam (Davis, 2011).

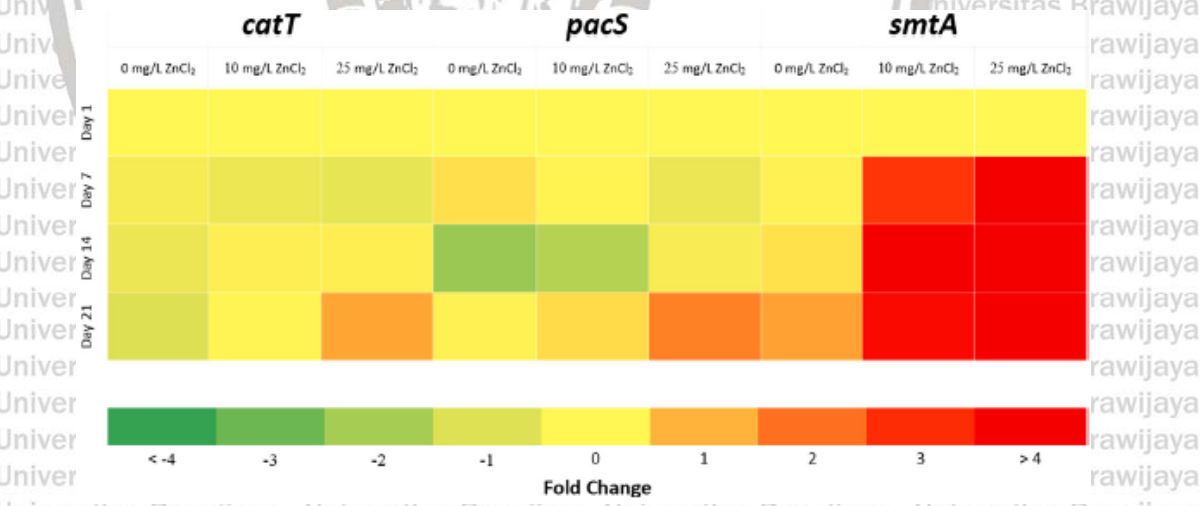
Hasil yang berbeda didapatkan oleh penelitian lain yang meneliti mengenai metallothionein yang dikode oleh gen *nmtA* dari *Anabaena sp.* Strain PCC 7120. Bakteri *Anabaena sp.* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung H_2O_2 selama 24 jam tidak menunjukkan keaktifan gen *nmtA* hal ini mengindikasikan bahwa bakteri tidak memproduksi metallothionein saat ditumbuhkan di media yang mengandung H_2O_2 (Gambar 4.25). Fenomena tersebut berbanding terbalik saat bakteri *Anabaena sp.* Ditumbuhkan di media yang mengandung timbal (Pb). Saat bakteri tersebut ditumbuhkan di media yang mengandung logam berat, gen *nmtA* menjadi lebih aktif, yang ditunjukkan dari terbentuknya *bent* saat dielektroforesis (Gambar 4.25), hal tersebut berarti bakteri memproduksi metallothionein. Fenomena pada metallothionein yang dimiliki oleh bakteri *Anabaena sp.* Strain PCC 7120 menunjukkan bahwa tidak semua metallothionein akan mengalami peningkatan produksi saat ditumbuhkan di media yang mengandung H_2O_2 (Divya *et al.*, 2018).

Produksi MTs juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi bakteri. Semakin lama bakteri berada di media yang mengandung zat pemicu stres oksidatif, terutama logam berat maka produksi MTs akan semakin tinggi. Hal tersebut terjadi pada *Anabaena sp.* Strain PCC 7120 yang mengalami peningkatannya produksi metallothionein seiring lama waktu inkubasi (Divya *et al.*, 2018).



Gambar 4.25. Hasil elektroforesis gen bakteri *Anabaena sp.* strain PCC 7120 yang ditumbuhkan di berbagai media. A: control; B: mengandung cadmium (Cd); C: mengandung seng (Zn); D: mengandung tembaga (Cu); E: mengandung uranium (U); dan F: H₂O₂ (Divya *et al.*, 2018)

Fenomena yang sama terjadi pada bakteri *Synechococcus sp.* IU 625 yang diinkubasi di media yang mengandung seng (Zn). Pada awal masa inkubasi gen yang aktif adalah gen yang mengatur mengenai membrane sel. Kemudian, seiring berjalannya waktu gen yang lebih aktif adalah gen *smtA* yang mengatur metallothionein (Gambar 4.26). Hal tersebut berarti produksi metallothionein dipengaruhi oleh lama waktu inkubasi (Newby *et al.*, 2017).



Gambar 4.26. Keaktifan gen *smtA* *Synechococcus sp.* IU 625. Warna yang semakin merah menunjukkan gen yang semakin aktif (Newby Jr *et al.*, 2017)

4.3. Peluang Bakteri Penghasil Metallothionein Sebagai Bioremediator

Bakteri resisten logam berat memiliki kemampuan khusus untuk menjaga homeostasis logam yang ada dalam selnya. Salah satu kemampuan tersebut adalah *metal sequestration*. *Metal sequestration* atau mekanisme penangkapan ion logam oleh bakteri disebabkan karena bakteri memiliki metallothionein. Metallothionein akan menangkap dan melokalisasi ion logam sehingga ion logam tidak akan membahayakan makhluk hidup yang lain lagi.

Kemampuan bakteri tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bioremediasi. Jika kemampuan *metal sequestration* oleh bakteri yang memiliki metallothionein dapat ditingkatkan maka bisa berpotensi menjadi agen bioremediasi. Saat ini bioremediasi banyak dilakukan menggunakan bakteri mati dengan memanfaatkan mekanisme absorpsi ion logam berat oleh membran sel bakteri. Absorpsi tersebut dapat terjadi baik pada bakteri yang telah mati maupun bakteri yang masih hidup. Pemilihan bakteri yang telah mati untuk bioremediasi dilakukan karena bakteri yang telah mati dianggap lebih tahan terhadap logam berat karena bakteri yang telah mati tidak akan terkena efek toksin dari logam berat. Selain itu, pemilihan bakteri yang telah mati tersebut dilakukan karena perawatan bakteri yang telah mati lebih mudah dan bakteri yang telah mati tidak berpotensi untuk mengubah keseimbangan organisme yang ada di lingkungan.

Peningkatan kemampuan resistensi bakteri hidup menggunakan metallothionein bisa dilakukan dengan merekayasa gen bakteri. Rekayasa bisa dilakukan dengan menyisipkan gen pengkode protein metallothionein ke dalam sel bakteri atau melakukan mutasi terhadap gen pengkode metallothionein yang dimiliki oleh bakteri. Suatu percobaan menyatakan bahwa bakteri *E. coli* yang disisipi oleh gen *mt-1* yang mengkode metallothionein menunjukkan kemampuan resistensi terhadap merkuri (Hg) lebih tinggi daripada bakteri yang tidak disisipi oleh gen *mt-1* (Ruiz *et al.*, 2011). Penelitian lain menunjukkan bahwa bakteri *Klebsiella variicola* yang direndam dalam larutan ethidium bromide dan acridine orange menunjukkan kemampuan resistensi lebih tinggi terhadap logam arsenik (As), cadmium (Cd), dan timbal (Pb) dibandingkan dengan *Klebsiella variicola wild type* (Yetunde *et al.*, 2018). Hal tersebut menunjukkan bahwa mutasi pada bakteri bisa meningkatkan kemampuan resistensinya terhadap logam berat. Penggunaan bakteri hidup hasil rekayasa genetika yang telah ditingkatkan kemampuan resistensinya untuk bioremediasi harus dilakukan dengan hati-hati. Hal tersebut agar efek negatif berupa kerusakan ekosistem akibat infiltrasi bakteri asing tidak terjadi.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil *literatur review* yang telah dilakukan dapat ditarik beberapa kesimpulan yaitu:

- a. terdapat bakteri resisten logam di lingkungan industri dengan kemampuan yang berbeda-beda;
- b. kemunculan bakteri resisten logam terjadi karena faktor lingkungan berupa pencemaran lingkungan dan faktor genetik berupa mutasi dan transfer gen horizontal;
- c. protein yang berperan terhadap resistensi bakteri adalah metallothionein. Metallothionein berperan untuk menjaga homeostasis ion logam di dalam sel bakteri agar bakteri mampu bertahan di lingkungan yang mengandung banyak ion logam;
- d. metallothionein mampu mengikat ion logam berat karena mengandung banyak asam amino sistein yang memiliki banyak gugus thiol. Gugus thiol akan berikatan dengan ion logam bivalen positif sehingga logam tidak membahayakan bakteri;
- e. Saat tidak terdapat logam, protein *smtB* akan menempel pada operator sehingga menghalangi RNA polymerase untuk melakukan transkripsi gen *SmtA* yang membuat metallothionein tidak diproduksi;
- f. Saat terdapat logam, ion logam akan menempel pada protein *smtB* sehingga konformasinya berubah, protein *smtB* lalu lepas dari operator sehingga RNA polymerase bisa melakukan transkripsi gen *smtA* untuk menghasilkan metallothionein;
- g. produksi metallothionein oleh bakteri dipengaruhi oleh faktor jenis logam berat atau zat kontaminan, konsentrasi zat pencemar, lama inkubasi, dan jenis organisme penghasil metallothionein.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat dikemukakan saran yaitu perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai peningkatan kemampuan metallothionein bakteri untuk remediasi logam berat menggunakan rekayasa genetika.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas SZ, Rafatullah M, Hossain K, Ismail N, Tajarudin HA, Khalil HPSA. 2018. A Review on Mechanism and Future Perspectives of Cadmium Resistant Bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 15(1): 243–262.
- Abdulsalam S, Omale A. 2009. Comparison of Biostimulation and Bioaugmentation Techniques for the Remediation of Used Motor Oil Contaminated Soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology - BRAZ ARCH BIOL TECHNOL* 52: 747-754. doi: 10.1590/S1516-89132009000300027.
- Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinomen I. 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: a Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation* 3(1): 28–39.
- Agustina T. 2014. Kontaminasi Logam Berat pada Makanan dan Dampaknya pada Kesehatan. *TEKNOBUGA: Jurnal Teknologi Busana dan Boga* 1(1).
- Aktan Y, Tan S, Içgen B. 2012. Characterization of Lead Resistant River Isolates *Enterococcus faecalis* and Assessment of its Multiple Metal and Antibiotic Resistance. *Environmental Monitoring and Assessment*. 185. doi: 10.1007/s10661-012-2945-x.
- Aktaş F. 2013. Bioremediation Techniques and Strategies on Removal of Polluted Environment. *Journal of Engineering Research and Applied Science*. 2: 107–115.
- Al-mohanna M, Quine H. 2016. Morphology and Classification of Bacteria. *Microbiology*
- Andreoli V, Sprovieri F. 2017. Genetic Aspects of Susceptibility to Mercury Toxicity: an Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14(1): 93.
- Anyanwu CU, Nwankwo SC, Moneke AN. 2011. Soil Bacterial Response to Introduced Metal Stress. *International Journal of Basic & Applied Sciences*. 11(1): 73–76.
- Ashraf R, Ali TA. 2007. Effect of Heavy Metals on Soil Microbial Community and Mung Beans Seed Germination. *Pakistan Journal of Botany*. 39(2): 629.
- Azubuikwe CC, Chikere CB, Okpokwasili GC. 2016. Bioremediation Techniques—Classification Based on Site of Application: Principles, Advantages, Limitations and Prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(11): 1–18.
- Benhalima L, Amri S, Bensouilah M, Ouzrout R. 2020. Heavy Metal Resistance and

- Metallothionein Induction in Bacteria Isolated from Seybouse River, Algeria. *Appl Ecol Environ Res.* 18(1): 1721–1737.
- Bhakta JN, Munekage Y, Ohnishi K, Jana BB, Balcazar JL. 2014. Isolation and Characterization of Cadmium and Arsenic Absorbing Bacteria for Bioremediation. *Water, Air, & Soil Pollution.* 225(10): 2151.
- Bhat SA. 2019. HEAVY METAL TOXICITY AND THEIR HARMFUL EFFECTS ON LIVING ORGANISMS—A REVIEW. *International Journal of Medical Science And Diagnosis Research.* 3(1).
- Blindauer CA, Leszczyszyn OI. 2010. Metallothioneins: Unparalleled Diversity in Structures and Functions for Metal Ion Homeostasis and More. *Natural product reports.* 27(5): 720–741.
- Blindauer CA, Sadler PJ. 2005. How to Hide Zinc in a Small Protein. *Accounts of Chemical Research.* 38(1): 62–69.
- Blindauer CA, Sadler PJ. 2005. How to Hide Zinc in a Small Protein. *Accounts of Chemical Research.* 38(1): 62–69.
- Boldyrev M. 2018. Lead: Properties, History, and Applications. *WikiJournal of Science*, 1(2).
- Botello-Morte L, Gonzalez A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. 2013. Functional Genomics of Metalloregulators in Cyanobacteria. *Advances in Botanical Research.* 65:107–156.
- Bowman N, Patel D, Sanchez A, Xu, Wentao, Alsaffar A, Sonia M, Tiqua-Arashiro. 2018. Lead-resistant Bacteria from Saint Clair River Sediments and Pb Removal in Aqueous Solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 102(5): 2391–2398.
- Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP. 2003. The SmtB/ArsR Family of Metalloregulatory Transcriptional Repressors Structural Insights Into Prokaryotic Metal Resistance. *FEMS Microbiology Reviews.* 27(2–3): 131–143.
- Calvo J, Jung H, Meloni G. 2017. Copper Metallothioneins. *Iubmb Life.* 69(4): 236–245.
- Cao Z, Yang X, Zhang H, Wang H, Huang W, Xu F, Zhuang C, Wang X, Li Y. 2016. Aluminum Chloride Induces Neuroinflammation, Loss of Neuronal Dendritic Spine and Cognition Impairment in Developing Rat. *Chemosphere.* 151: 289–295.
- Capdevila M, Atrian S. 2011. Metallothionein Protein Evolution: a Miniassay. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 16(7): 977–989.
- Chan J, Huang Z, Watt I, Kille P, Stillman M. 2008. Metallobiological Necklaces Mass Spectrometric and Molecular Modeling Study of Metallation in Concatenated Domains of Metallothionein. *Chemistry—A European Journal.* 14(25): 7579–7593.

- Chao Y, Liu W, Chen Y, Chen W, Zhao L, Ding Q, Wang S, Tang YT, Zhang T, Qiu RL. 2016. Structure, Variation, and Co-occurrence of Soil Microbial Communities in Abandoned Sites of a Rare Earth Elements Mine. *Environmental science & technology*. 50(21): 11481–11490.
- Chatterjee S, Kumari S, Rath S, Priyadarshee M, Das S. 2020. Diversity, Structure and Regulation of Microbial Metallothionein Metal Resistance and Possible Applications in Sequestration of Toxic Metals. *Metallomics*. 12(11): 1637–1655.
- Chen J, Li J, Zhang H, Shi W, Liu Y. 2019. Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1916. doi: 10.3389/fmicb.2019.01916.
- Citra JA. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Logam Timbal (Pb) yang Bersumber dari Danau Tempe Kabupaten Wajo Sulawesi Selatan. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Comes OG. 2017. Metallothionein Family the Multipurpose Protein, Influence of Mt1 in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Universitat Autònoma de Barcelona*. Cong M, Cao D, Sun J, Shi F. 2014. Soil Microbial Community Structure Evolution along Halophyte Succession in Bohai Bay Wetland. *Journal of Chemistry*.
- Cong M, Cao D, Sun J, Shi F. 2014. Soil Microbial Community Structure Evolution along Halophyte Succession in Bohai Bay Wetland. *Journal of Chemistry*. 2014.
- Davis SR. 2011. Characterizing the Role of the Bacterial Metallothionein, *smtA*, in Mammalian Infection. *University of Connecticut*.
- Debnath B, Singh W, Manna K. 2019. Sources and Toxicological Effects of Lead on Human Health. *Indian Journal of Medical Specialities*. 10:66. doi: 10.4103/INJMS.INJMS_30_18.
- Divya TV, Chandwadkar P, Acharya C. 2018. *nmtA*, a Novel Metallothionein of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 Imparts Protection Against Cadmium Stress but not Oxidative Stress. *Aquatic Toxicology*. 199: 152–161.
- El Baz S, Baz M, Barakate M, Hassani L, Gharmali AE, Imzilin B. 2015. Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas. *The Scientific World Journal*. 2016.
- Erez Z, Levy IS, Shamir M, Doron S, Avihail AS, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, Amitai G, Sorek R. 2017. Communication between Viruses Guides Lysis–Lysogeny Decisions. *Nature*. 541(7638): 488–493.

- Flora G, Gupta D, Tiwari A. 2012. Toxicity of Lead: a Review with Recent Updates. *Interdisciplinary Toxicology*. 5(2): 47–58.
- Gao ZY, Li MM, Wang J, Yan J, Zhou CC, Yan CH. 2018. Blood Mercury Concentration, Fish Consumption and Anthropometry in Chinese Children A National Study. *Environment international*. 110: 14–21.
- Goswami M, Chakraborty P, Mukherjee K, Mitra G, Bhattacharyya P, Dey S, Tribedi P. 2018. Bioaugmentation and Biostimulation: a Potential Strategy for Environmental Remediation. *Journal of Microbiology & Experimentation* 6. doi: 10.15406/jmen.2018.06.00219.
- Gupta DK, Walther C. 2014. *Radionuclide Contamination and Remediation Through Plants*. Springer International Publishing.
- Gutiérrez J, Francisco P, Amaro F, Diaz S, Gonzalez AM. 2019. Structural and Functional Diversity of Microbial Metallothionein Genes. 387–407. doi: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00022-8.
- Hassan MU, Chattha MU, Khan I, Chatta MB, Amer M, Nawaz M, Ali A, Khan MAU, Khan TA. 2019. Nickel Toxicity in Plants Reasons, Toxic Effects, Tolerance Mechanisms, and Remediation Possibilities—A Review. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(13): 12673–12688.
- Hazen T. 2009. Biostimulation. 2583–2596. doi: 10.1007/978-3-540-77587-4_191.
- Hazen T. 2010. In Situ: Groundwater Bioremediation: pp. 2583–2596. doi: 10.1007/978-3-540-77587-4_191.
- Hegazy AA, Zaher MM, El-Hafez MAA, Morsy AA, Saleh RA. 2010. Relation between Anemia and Blood Levels of Lead, Copper, Zinc and Iron among Children. *BMC research notes*. 3(1): 133.
- Irvine GW, Pinter TBJ, Stillman MJ. 2016. Defining the Metal Binding Pathways of Human Metallothionein 1a Balancing Zinc Availability and Cadmium Seclusion. *Metallomics*. 8(1): 71–81.
- Janardani NMK, Berata IK, Kardena IM. 2018. Studi Histopatologi dan Kadar Timbal pada Ginjal Sapi Bali di Tempat Pembuangan Akhir Suwung Denpasar. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(1): 42–50.
- Jangid AP, Shekhawat VPS, Pareek H, Yadav D, Sharma P, John PJ. 2016. Effect of Lead on Human Blood Antioxidant Enzymes and Glutathione. *International Journal of*

Biochemistry Research & Review. 13: 1–9. doi: 10.9734/IJBCRR/2016/26992.

Jayawardena DP, Heinemann IU, Stillman MJ. 2017. Zinc Binds Non-Cooperatively to Human Liver Metallothionein 2a at Physiological pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 493(1): 650–653.

Khoei JK, Farmohammadi S, Noori AS, Padash A. 2013. Bioremediation; a Nature-based Approach Towards having a Healthier Environment. *Annals of Biological Research*. 4(2): 43–46.

Koller M, Saleh HED. 2018. Introductory Chapter: Introducing Heavy Metals', in. doi: 10.5772/intechopen.74783.

Kumari S, Das S. 2019. Expression of Metallothionein Encoding Gene bmtA in Biofilm-Forming Marine Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* N6P6 and Understanding its involvement in Pb(II) Resistance and Bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(28): 28763–28774.

Laitinen J. 2006. In-situ Soil and Groundwater Bioremediation Techniques and Applications.

Lari E, Gauthier P, Mohaddes E, Pyle GG. 2017. Interactive Toxicity of Ni, Zn, Cu, and Cd on *Daphnia magna* at Lethal and Sub Lethal Concentrations. *Journal of Hazardous Materials*. 334: 21–28.

Lu SC. 2013. Glutathione Synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1830(5): 3143–3153.

Mahbub KR, Krishnan K, Naidu R, Megharaj M. 2016. Mercury Resistance and Volatilization by *Pseudoxanthomonas* sp. SE1 Isolated from Soil. *Environmental Technology & Innovation*. 6: 94–104.

Marzan LW, Hossain M, Mina SA, Akter Y, Chowdury AMMA. 2017. Isolation and Biochemical Characterization of Heavy Metal Resistant Bacteria from Tannery Effluent in Chittagong City, Bangladesh Bioremediation Viewpoint. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 43(1): 65–74.

Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. 2010. Bioaugmentation as a Strategy for Cleaning up Soils Contaminated with Aromatic Compounds. *Microbiol. Res*. 182: 2675–2679.

Naik MM, Pandey A, Dubey SK. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi Estuary Possesses Metallothionein to Alleviate Lead Toxicity and Promotes Plant Growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 79: 129–133.

Nastiti AS, Hartati ST, Nugraha B. 2018. ANALISIS DEGRADASI LINGKUNGAN

PERAIRAN DAN KETERKAITANNYA DENGAN KEMATIAN MASSAL IKAN
BUDIDAYA DI WADUK CIRATA, JAWA BARAT. BAWAL Widya Riset Perikanan

Tangkap. 10(2): 99–109.

National Center for Biotechnology Information. 2021a. PubChem Compound Summary for CID104730, Cobalt. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/104730#section=Solubility>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021b. PubChem Compound Summary for CID 23925, Fe. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23925#section=Density>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021c. PubChem Compound Summary for CID 23931, Mercury. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23931>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021d. PubChem Compound Summary for CID23973, Cadmium. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23973#section=Solubility>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021e. PubChem Compound Summary for CID23976, Chromium. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23976#section=Solubility>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021f. PubChem Compound Summary for CID23978, Copper. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23978#section=Density>. Tanggal akses 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021g. PubChem Compound Summary for CID23994, Zinc. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23994#section=Solubility>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021h. PubChem Compound Summary for CID5352425, Lead. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5352425#section=Solubility>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021i. PubChem Compound Summary for CID5359596, Arsenic. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5359596#section=Solubility>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

National Center for Biotechnology Information. 2021j. PubChem Compound Summary for CID 935, Nickel. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/935#section=Density>. Tanggal akses 25 Juli 2021.

- Nazir R, Baqu B Ganai BA, Rahi P, Rehman S, Farooq S, Dar R, Parray JA, Al-Arjani Al-B, Tabassum B, Abd_Allah EF. 2020. MALDI-TOF-MS and 16S rRNA Characterization of Lead Tolerant Metallophile Bacteria Isolated from Saffron Soils of Kashmir for their Sequestration Potential. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27(8): 2047–2053.
- Newby JR, Lee HL, Perez JL, Tao X, Chu T. 2017. Characterization of Zinc Stress Response in *Cyanobacterium Synechococcus* sp. IU 625. *Aquatic Toxicology*. 186: 159–170.
- Ngu TT, Stillman MJ. 2009. Metal Binding Mechanisms in Metallothioneins. *Dalton Transactions*. 28: 5425–5433.
- Niu J, Rang Z, Zhang C, Chen W, Tian F, Yin H, Dai L. 2016. The Succession Pattern of Soil Microbial Communities and Its Relationship with Bobacco Bacterial Wilt. *BMC Microbiology*. 16(1): 1–10.
- Nokman W, Benluvankar V, Packiam SM, Vincent S. 2019. Screening and Molecular Identification of Heavy Metal Resistant *Pseudomonas putida* S4 in Tannery Effluent Wastewater. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 18: 101052.
- Nurhayati B, Darmawati S. 2017. *Biologi Sel dan Molekuler*. Jakarta: Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Nzila A, Razzak SA, Zhu J. 2016. Bioaugmentation: an Emerging Strategy of Industrial Wastewater Treatment for Reuse and Discharge. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13(9): 846.
- Osborn AE, Field B. 2009. Operons. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66(23): 3755–3775.
- Osman D, Cavet JS. 2010. Bacterial Metal Sensing Proteins Exemplified by ArsR-SmtB Family Repressors. *Natural Product Reports*. 27(5): 668–680.
- Oves M, Khan MS, Zaidi A. 2013. Biosorption of Heavy Metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 Originating from Industrial Effluent Contaminated North Indian Soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 20(2): 121–129.
- Pérez AA, Gajewski JP, Ferlez BH, Ludwig M, Baker CS, Golbeck JH, Bryant DA. 2017. Zn Inducible Expression Platform for *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 Based on the *smtA* Promoter/Operator and *smtB* Repressor. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(3): 1-14.
- Prayitno TA, Hidayati N. 2019. *Pengantar Mikrobiologi*. Media Nusa Creative: Malang.

- Rosihan A, Husaini H. 2017. Logam Berat Sekitar Manusia. Pustaka Buana.
- Ruiz ON, Alvarez D, Gonzalez-Ruiz G, Torres C. 2011. Characterization of Mercury Bioremediation by Transgenic Bacteria Expressing Metallothionein and Polyphosphate Kinase. *BMC Biotechnology*. 11(1): 1–8.
- Salgado MT, Stillman MJ. 2004. Cu⁺ Distribution in Metallothionein Fragments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 318(1): 73–80.
- Scow KM, Hicks KA. 2005. Natural Attenuation and Enhanced Bioremediation of Organic Contaminants in Groundwater. *Current Opinion in Biotechnology*. 16(3): 246–253.
- Seifipour M, Emadi-Baygi M, Saffar B, Abolmaali S. 2017. Evaluation of *smtA* Expression and *E. coli* Survival Against Cadmium Ions. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 14(3): 481–486.
- Setiawan AM. 2012. Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) Dosis Kronis Secara Oral terhadap Peningkatan Penanda Kerusakan Organ pada Mencit. *El-Hayah*. 3(1).
- Shamsi T, Fatima S. 2014. METALLOTHIONEIN: CLASSIFICATION, BIOCHEMICAL FEATURES AND CLINICAL APPLICATIONS. *JOURNAL OF PROTEINS AND PROTEOMICS*. 5.
- Sharma I. 2021. Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects. Rijeka: IntechOpen. 12. doi: 10.5772/intechopen.90453.
- Sharma J, Shamim K, Dubey SK, Meena RM. 2017. Metallothionein Assisted Periplasmic Lead Sequestration as Lead Sulfite by *Providencia vermicola* strain SJ2A. *Science of the Total Environment*. 579: 359–365.
- Sharma J. 2019. Advantages and Limitations of In Situ Methods of Bioremediation. *Recent Advances in Biology and Medicine*. 5:1. doi: 10.18639/RABM.2019.955923.
- Silva AAL, Carvalho MAR, Souza SAL, Dias PMT, Filho RGS, Saramago CSM, Bento CAM, Hofer E. 2012. Heavy Metal Tolerance (Cr, Ag, and Hg) in Bacteria Isolated from Sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43: 1620–1631. doi: 10.1590/S1517-838220120004000047.
- Somji S, Sens MA, Lamm DL, Garrett SH, Sens DA. 2001. Metallothionein Isoform 1 and 2 Gene Expression in the Human Bladder: Evidence for Upregulation of MT-1X mRNA in Bladder Cancer. *Cancer Detection and Prevention*. 25(1): 62–75.
- Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. 2015. Horizontal Gene Transfer Buildings the Web of

- Life. *Nature Reviews Genetics*. 16(8): 472–482.
- Stokes H, Gillings M. 2011. Gene Flow, Mobile Genetic Elements and the Recruitment of Antibiotic Resistance Genes into Gram-Negative Pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 35: 790–819. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x.
- The Editors of Encyclopædia Britannica. 2020. Lead. Encyclopædia Britannica. Encyclopædia Britannica, inc.
- Thomas C, Nielsen K. 2005. Mechanisms of and Barriers to Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 711–721. doi: 10.1038/nrmicro1234.
- Thompson IP, Gast CJ, Ciric L, Singer AC. 2005. Bioaugmentation for Bioremediation: the Challenge of Strain Selection. *Environmental Microbiology*. 7: 909–915. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x.
- Tibrewal A, Rajesh N, Rajesh V. 2018. Identification and Characterization of the Microbial Communities Found in Electronic Industrial Effluent and Their Potential for Bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 164: 379–387.
- Tomei M, Daugulis A. 2013. Ex Situ Bioremediation of Contaminated Soils: An Overview of Conventional and Innovative Technologies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 43. doi: 10.1080/10643389.2012.672056.
- Tyagi M, Fonseca M, de Carvalho C. 2011. Bioaugmentation and Biostimulation Strategies to Improve the Effectiveness of Bioremediation Processes. *Biodegradation*. 22: 231–241. doi: 10.1007/s10532-010-9394-4.
- United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. 2012. Introduction to the Microbiology of Food Processing. U.S. Department of Agriculture's (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS).
- Wang Q, Liu L, Hou Z, Wang L, Ma D, Yang G, Guo S, Luo J, Qi L, Luo Y. 2020. Heavy Metal Copper Accelerates the Conjugative Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Freshwater Microcosms. *Science of the Total Environment*. 717: 137055.
- Xu Q, Zhao L, Wag Y, Xie Q, Yin D, Feng X, Wang D. 2018. Bioaccumulation Characteristics of Mercury in Fish in the Three Gorges Reservoir China. *Environmental Pollution*. 243: 115–126.
- Xu X, Duan L, Yu J, Su C, Li J, Chen D, Zhang X, Song H, Pan Y. 2018. Characterization

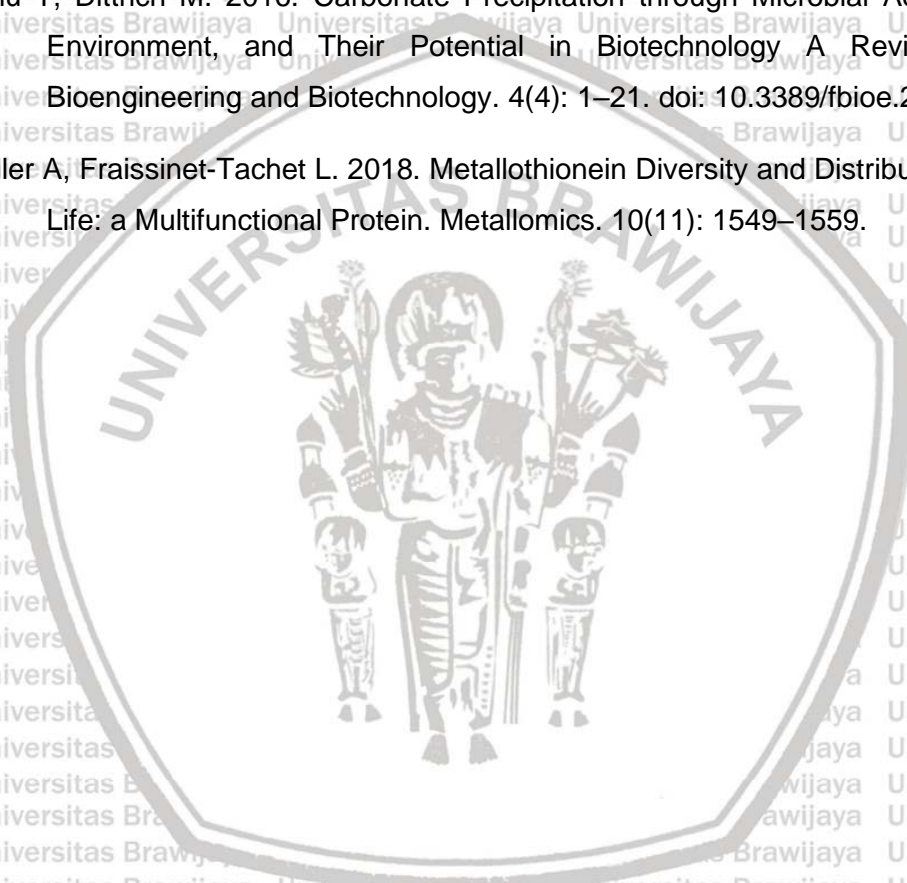
Analysis and Heavy Metal-Binding Properties of CsMTL 3 in *Escherichia coli*. FEBS open bio. 8(11): 1820–1829.

Yetunde MFB, Gbolahan B, Olu O. 2018. A Comparative Study of the Wild and Mutated Heavy Metal Resistant *Klebsiella variicola* Generated for Cadmium Bioremediation. Bioremediation Journal. 22(1–2): 28–42.

Zeyauallah Md, Atif M, Islam B, Abdelkafe AS, Sultan P, ElSaady MA, Ali A. 2009. Bioremediation: A Tool for Environmental Cleaning. African Journal of Microbiology Research. 3.

Zhu T, Dittrich M. 2016. Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural Environment, and Their Potential in Biotechnology A Review. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 4(4): 1–21. doi: 10.3389/fbioe.2016.00004.

Ziller A, Fraissinet-Tachet L. 2018. Metallothionein Diversity and Distribution in the Tree of Life: a Multifunctional Protein. Metallomics. 10(11): 1549–1559.



Lampiran 1. Penelusuran Literatur

The screenshot shows a search on PubMed.gov with the query: "Lead degradation" OR "Lead bioremediation" OR "Lead adsorption" OR "Lead absorpti...". The search results show 29 results. A bar chart displays the number of results by year from 1976 to 2021. The top result is "Biological Manganese Removal by Novel Halotolerant Bacteria Isolated from River Water" by Nguyen VK, Ha MG, Kang HY, Nguyen DD, published in Biomolecules in 2020. The PMID is 32580482 and it is a free PMC article. The abstract snippet states: "In this study, a total of 5 Mn-resistant bacteria were isolated from river water and investigated for Mn".

The screenshot shows a search on ResearchGate with the query: "Lead degradation OR Lead bioremediation OR Lead adsorption OR Lead absorptior". The search results show a list of articles. The top article is "Biosorption of copper, cadmium and lead by copper-resistant bacteria isolated from Mogpog River, Marinduque" by Marilen Balolong, Patricia S Tacata, Christopher Ray, Lorele Trinidad, published in January 2008. The article is full-text available and has 449 reads and 37 citations. The abstract snippet states: "Isolation and selection of copper-resistant bacteria were carried out from a collected water sample of Mogpog River. The sample was analyzed for copper (Cu), Cadmium (Cd) and lead (Pb) content for simulation purposes. The...".

This screenshot shows a Google Scholar search for the terms "Lead degradation" OR "Lead bioremediation" OR "Lead adsorption" OR "Lead". The search results page displays several articles, including "Copper Removal by Enterobacter cloacae strain IrSuk1, Enterobacter cloacae strain IrSuk4a, and Serratia nematodiphila strain IrSuk13 Isolated from Sukolilo River" and "Multiresistensi dan Akumulasi Acinetobacter sp. IrC2 terhadap Logam Berat". The interface includes filters for time range, sorting options, and checkboxes for patents and citations.

This screenshot shows a ScienceDirect search for the same terms. The search results page displays 1,526 results, sorted by relevance. Two articles are visible: "Indigenous bacteria, an excellent reservoir of functional plant growth promoters for enhancing duckweed biomass yield on site" and "Nanostructured Didymosphenia geminata-based membrane for efficient lead adsorption from aqueous solution". The interface includes a "Refine by" section with year filters and a "Feedback" button.

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

natureportfolio View all journals Search Q Login

nature > search

Search

Search articles by subject, keyword or author
lead degradation OR lead bioremediation advanced

Article type Journal Date
Showing 1-29 of 29 results Sort by Relevance

Reviews | 1 December 1994
The Behavior of Bacteria Designed for Biodegradation
Juan L. Ramos, Eduardo Diaz [...], Kenneth N. Timmis
Bio/Technology **12**, 1349-1356

1207-2859-1-PB.pdf Pb Biosorption by...pdf Pseudomonas aer...pdf Show all

6:49 AM 6/13/2021

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Hindawi Journals Publish with us Publishing partnerships About us Blog

lead degradation OR lead bioremediation AND isolated bacteria OR indgenou Search articles

Refine your search by using AND, OR, NOT, (), ""

Hindawi / Search

Results: 38

Sort by

Advanced search Clear

Journal
Enter journal name

Where
 Abstract Only

By clicking "Accept All Cookies", you agree to the storing of cookies on your device to enhance site navigation, analyze site usage, and assist in our marketing efforts. Cookies Settings Accept All Cookies

1207-2859-1-PB.pdf Pb Biosorption by...pdf Pseudomonas aer...pdf Show all

6:55 AM 6/13/2021

BioMed Research International - Special Issue - Volume 2013 - Article ID 463894 - Review Article
Cyanobacterial Toxin Degrading Bacteria: Who Are They?
Konstantinos Ar. Kormas | Despoina S. Lymeropoulou
06 Jun 2013 Download PDF Download citation

Lampiran 2. Jurnal Utama

No.	Judul Artikel	Reputasi Jurnal	Tahun	Referensi
1.	Identification and Characterization of the Microbial Communities Found in Electronic Industrial Effluent and Their Potential for Bioremediation	Q1	2018	(Tibrewal, Rajesh and Rajesh, 2018)
2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain WI-1 from Mandovi Estuary Possesses Metallothionein to Alleviate Lead Toxicity and Promotes Plant Growth	Q1	2012	(Naik, Pandey and Dubey, 2012)
3.	Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China	Q1	2019	(Chen <i>et al.</i> , 2019)
4.	Characterization of Lead Resistant River Isolates <i>Enterococcus faecalis</i> and Assessment of its Multiple Metal and Antibiotic Resistance	Q2	2012	(Aktan, Tan and Içgen, 2012)
5.	Metallothionein Protein Evolution: a Miniassay	Q1	2011	(Capdevila and Atrian, 2011)
6.	Metallothionein Assisted Periplasmic Lead Sequestration as Lead Sulfite by <i>Providencia vermicola</i> strain SJ2A	Q1	2017	(Sharma <i>et al.</i> , 2017)
7.	Expression of Metallothionein Encoding Gene <i>bmtA</i> in Biofilm-Forming Marine Bacterium <i>Pseudomonas</i>	Q2	2019	(Kumari and Das, 2019)

	<i>aeruginosa</i> N6P6 and Understanding its involvement in Pb(II) Resistance and Bioremediation			
8.	Zinc Binds Non-Cooperatively to Human Liver Metallothionein 2a at Physiological pH	Q1	2017	(Jayawardena, Heinemann, and Stillman, 2017)
9.	Defining the Metal Binding Pathways of Human Metallothionein 1a: Balancing Zinc Availability and Cadmium Seclusion	Q1	2016	(Irvine, Pinter and Stillman, 2016)
10.	Bacterial Metal Sensing Proteins Exemplified by ArsR-SmtB Family Repressors	Q1	2010	(Osman and Cavet, 2010)
11.	Heavy Metal Resistance and Metallothionein Induction in Bacteria Isolated from Seybouse River, Algeria	Q3	2020	(Benhalima <i>et al.</i> , 2020)
12.	nmtA, a Novel Metallothionein of <i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120 Imparts Protection Against Cadmium Stress but not Oxidative Stress	Q1	2018	(Divya, Chandwadkar, and Acharya, 2018)
13.	Characterization of Zinc Stress Response in Cyanobacterium <i>Synechococcus</i> sp. IU 625	Q1	2017	(Newby Jr <i>et al.</i> , 2017)
14.	Structure, Variation, and Co-occurrence of Soil Microbial Communities in Abandoned	Q1	2016	(Chao <i>et al.</i> , 2016)

	Sites of a Rare Earth Elements Mine			
15.	The Succession Pattern of Soil Microbial Communities and Its Relationship with Bobacco Bacterial Wilt	Q2	2016	(Niu <i>et al.</i> , 2016)
16.	Soil Microbial Community Structure Evolution along Halophyte Succession in Bohai Bay Wetland	Q2	2014	(Cong <i>et al.</i> , 2014)
17.	Characterization Analysis and Heavy Metal-Binding Properties of CsMTL 3 in <i>Escherichia coli</i>	Q2	2018	(X. Xu <i>et al.</i> , 2018)
18.	Heavy Metal Copper Accelerates the Conjugative Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Freshwater Microcosms	Q1	2020	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
19.	Zn Inducible Expression Platform for <i>Synechococcus</i> sp. Strain PCC 7002 Based on the <i>smtA</i> Promoter/Operator and <i>smtB</i> Repressor	Q1	2017	(Pérez <i>et al.</i> , 2017)
20.	Metallothionein Diversity and Distribution in the Tree of Life: a Multifunctional Protein	Q1	2018	(Ziller and Fraissinet-Tachet, 2018)