

## Larut-Lesap Biologi Kaolin menggunakan Siderofor daripada *Bacillus aryabhatai* dan *Bacillus megaterium* (Bioleaching of Kaolin with Siderophores from *Bacillus aryabhatai* and *Bacillus megaterium*)

HUSNA ALYA MOHD RANI<sup>1</sup>, ADNAN AZMI<sup>1</sup>, MUHAMMAD AHMAD ZAN<sup>1</sup>, MONISHA RAJAMOCHAN<sup>2</sup>, KUAN SENG HOW<sup>2,3</sup> & SYLVIA CHIENG<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Jabatan Kejuruteraan Mekanikal dan Bahan, Fakulti Kejuruteraan dan Sains Lee Kong Chian, Universiti Tunku Abdul Rahman, Kampus Sg Long, 43000 Kajang, Selangor, Malaysia

<sup>3</sup>Pusat Penyelidikan Bahan Termaju dan Mampan, Universiti Tunku Abdul Rahman, Kampus Sg Long, 43000 Kajang, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 30 April 2024/Diterima: 26 Jun 2024

### ABSTRAK

Kehadiran cecair besi di dalam kaolin secara signifikan mengurangkan nilai komersialnya, kerana besi memberi kesan negatif terhadap indeks keputihan dan sifat refraktori kaolin tersebut. Walaupun kaedah penulenan kaolin secara fizikal dan kimia adalah berkesan, tetapi kaedah ini mempunyai beberapa kelemahan seperti kos yang tinggi dan pencemaran alam sekitar. Oleh itu, penyelidikan ini dijalankan untuk mencadangkan kaedah baharu yang mesra alam serta boleh diaplikasi dalam skala yang lebih besar dalam industri bagi penulenan kaolin. Dalam kajian ini, siderofor *Bacillus aryabhatai* dan *Bacillus megaterium* yang dituliskan secara separa digunakan untuk proses larut-lesap kaolin. Hasil kajian mendapati bahawa kedua-dua siderofor mampu mengeluarkan cecair besi daripada sampel tanah liat kaolin. Melalui analisis spektroskopi sinar-X serakan tenaga (EDX), peratus berat besi di dalam kaolin telah menunjukkan penurunan sebanyak 48.2% bagi siderofor *B. aryabhatai* dan 50.6% bagi siderofor *B. megaterium*. Selain itu, analisis mikroskop elektron pengimbas (SEM) pula menunjukkan struktur lapisan kaolin kelihatan masih terpelihara dan menyamai morfologi kaolin mentah. Hasil kajian ini menunjukkan keberkesanan proses larut-lesap menggunakan siderofor *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* dalam mengurangkan cecair besi daripada kaolin.

Kata kunci: *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus megaterium*; kaolin; larut-lesap; siderofor

### ABSTRACT

The presence of iron impurities in kaolin significantly diminishes its commercial value, owing to the adverse effects of iron on both the whiteness index and refractory properties of the kaolin. While physical and chemical methods for kaolin purification are known to be effective, they come with notable drawbacks such as high costs and environmental pollution. Consequently, this study was undertaken to propose a novel, environmentally sustainable method capable of large-scale implementation in the industry for refinement of kaolin. In this study, partially purified siderophores from *Bacillus aryabhatai* and *Bacillus megaterium* were used in the bioleaching process of kaolin. Results showed that both siderophores were able to remove iron impurities from the kaolin clay samples. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) analysis showed a reduction in the weight percentage of iron in the kaolin by 48.2% for *B. aryabhatai* siderophore and 50.6% for *B. megaterium* siderophore. Additionally, Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis confirmed the preservation of the layered structure of kaolin, resembling the morphology of raw kaolin. These findings underscore the efficacy of bioleaching utilizing siderophores from *B. aryabhatai* and *B. megaterium* in effectively reducing iron impurities from kaolin.

Keywords: *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus megaterium*; bioleaching; kaolin; siderophore

### PENGENALAN

Kaolin merupakan sejenis tanah liat berwarna putih yang digunakan secara meluas dalam pelbagai industri dalam

negara. Mineral tanah liat ini merupakan sebahagian daripada unsur penting dalam tanah yang boleh dijumpai pada endapan batu seperti syal, batu lumpur dan batu lodak.

Kehadiran mineral tanah liat utama di dalam kaolin iaitu kaolinit pula boleh digunakan sebagai bahan mentah untuk kegunaan industri pembuatan kosmetik, seramik, kertas, plastik dan juga tekstil (Kawanishi et al. 2020). Selain daripada kaolinit, terdapat beberapa cecairan utama seperti kuarza, feldspar, biotit dan oksida besi. Sebatian kimia ini bertindak sebagai pigmen dengan memberi warna keperangan kepada kaolin (Hajihoseini & Fakharpour 2019). Walaupun kandungan mineral besi dalam kaolin adalah serendah 4%, cecairan ini tetap mempengaruhi sifat kaolin, seperti nilai keputihan dan refraktori, yang penting untuk aplikasi industri (Sánchez-Palencia et al. 2022).

Pelbagai kaedah fizikal dan kimia telah digunakan bagi mengurangkan cecairan besi di dalam kaolin. Kaedah fizikal yang konvensional seperti pemisahan graviti dan pemisahan magnetik tidak dapat mengeluarkan zarah halus seperti besi oksida dan titanium oksida yang memberikan pigmen kepada kaolin (Cuadros 2017). Selain itu, bahan kimia juga sering digunakan untuk menuliskan kaolin melalui proses pengklorinan dan pelarutan menggunakan asid (Jing et al. 2021). Penggunaan bahan kimia ini memerlukan kos tinggi dan tenaga yang banyak kerana efluen yang dihasilkan memerlukan rawatan kimia sebelum dilupuskan (Yong et al. 2023; Zegeye et al. 2013).

Sebaliknya, kaedah larut-lesap biologi menggunakan mikroorganisma menawarkan satu kaedah alternatif yang berkesan untuk mengurangkan cecairan logam, sama ada secara langsung melalui tindakan mikrob atau secara tidak langsung melalui metabolisme mikroorganisma (Vardanyan & Vyrides 2019). Kaedah ini lebih berkesan daripada segi kos dan memerlukan kurang tenaga berbanding dengan proses konvensional seperti pemisahan magnetik (Zhao et al. 2019). Tambahan pula, kaedah ini adalah mesra alam kerana ia tidak menghasilkan produk sisa berbahaya seperti sulfat yang biasanya dihasilkan dalam penulenan secara kimia menggunakan natrium ditionit dan aluminium sulfat (Hosseini & Ahmadi 2015). Beberapa kajian telah menunjukkan keupayaan pelbagai jenis mikrob dalam mengurangkan cecairan besi daripada kaolin. Kajian oleh Hajihoseini dan Fakharpour (2019) mendapati bahawa sebanyak 47.7% daripada kandungan besi telah berjaya dikurangkan daripada kaolin selepas dilarut-lesap dengan *Aspergillus niger* selama 28 hari. Dalam Yong et al. (2023), *Bacillus* sp. (*B. cereus* UKMCC1150, *B. aryabhatai* UKM1151, *B. megaterium* UKM1152) berupaya menghasilkan asid organik semasa proses larut-lesap yang menyebabkan penyingkiran besi daripada kaolin. Kecekapan penyingkiran besi ketiga-tiga spesies *Bacillus* tersebut adalah sehingga 65.3% dan peningkatan dalam indeks keputihan sehingga 13.6%.

Walaupun teknik larut-lesap kaolin menggunakan mikroorganisma adalah berpotensi, namun ia berdepan

dengan beberapa cabaran yang menghalang perindustrian. Antaranya adalah, mekanisme interaksi antara mikroorganisma dan mineral semasa proses penulenan adalah kompleks dan kinetik pengekstrakan mineral adalah perlahan dan dipengaruhi oleh pelbagai keadaan uji kaji (Gao et al. 2021). Selain itu, mikroorganisma mungkin boleh mengalami mutasi atau ketidakstabilan genetik dari semasa ke semasa, yang boleh menjejaskan keupayaan larut-lesap mikrob tersebut (Navarrete et al. 2020).

Untuk menangani cabaran tersebut, penggunaan sistem bebas sel sebagai alternatif kepada sel mikrob hidup dicadangkan. Sistem bebas sel merujuk kepada suatu sistem yang mana proses biokimia atau kimia berlaku tanpa kehadiran sel yang hidup. Hal ini boleh melibatkan penggunaan enzim, sebatian atau komponen biologi tertentu yang diekstrak daripada sel untuk diaplikasikan ke dalam pengekstrakan atau pemprosesan mineral (Vilkhovoy et al. 2020). Kelebihan sistem ini terletak pada kebolehannya untuk memanfaatkan aktiviti biologi yang khusus tanpa melibatkan kekompleksan yang berkaitan dengan sel hidup. Dengan ini, aplikasi yang lebih terkawal dan bersasar boleh dijalankan dan seterusnya berpotensi untuk meningkatkan keefisienan dalam teknik pemprosesan mineral (Claassens et al. 2019).

Dalam konteks ini, salah satu sebatian biologi yang mempunyai potensi untuk diaplikasikan ke dalam bidang pemprosesan mineral ialah siderofor. Siderofor merupakan agen pengkelat besi yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan apabila mikroorganisma berada dalam keadaan kekurangan besi (Yu et al. 2017). Di dalam bakteria, siderofor boleh dibahagikan kepada tiga kumpulan yang berbeza, iaitu katekolat, hidroksimat dan karboksilat, dengan pembahagian kumpulan tersebut adalah berdasarkan ligan bidentat atau kumpulan berfungsi yang digunakan dalam interaksi dengan ion Fe(III) (Khasheii, Mahmoodi & Mohammadzadeh 2021). Siderofor boleh digunakan dalam pelbagai aplikasi seperti terapi kanser dan penghantaran ubat, serta bioremediasi logam berat disebabkan sifat kimianya yang serba-boleh (Khan, Singh & Srivastava 2018).

Dalam bidang pemprosesan mineral pula, siderofor mempunyai potensi untuk pengekstrakan dan penemuan bahan mentah daripada sumber mineral yang mampan. Kajian terkini telah menunjukkan keupayaan siderofor untuk mengeluarkan logam daripada pelbagai sumber seperti serat asbestos, hematit dan sisa kromit (Williamson et al. 2021), serta mengekstrak unsur nadir bumi daripada fosforit (Osman et al. 2019). Walau bagaimanapun, kajian terhadap keupayaan siderofor untuk mengeluarkan cecairan besi daripada kaolin masih kurang mendapat perhatian. Oleh itu, penyelidikan ini telah dijalankan dengan objektif untuk menuliskan

siderofor yang diekstrak daripada dua spesies *Bacillus* pencilan tempatan iaitu *B. aryabhatai* UKMCC1151 dan *B. megaterium* UKMCC1152 serta mengkaji keefisienan siderofor tersebut dalam penulenan kaolin. Kedua-dua pencilan ini dipilih kerana kemampuannya dalam penurunan cecair besi daripada kaolin dalam proses larut-lesap biologi (Yong et al. 2023), serta berupaya untuk menghasilkan siderofor dalam kuantiti yang tinggi dalam keadaan terhad besi (Lee et al. 2022).

## BAHAN DAN KAEDAH

### KAOLIN

Sampel kaolin yang digunakan dalam kajian ini diperolehi dari lombong kaolin di Bidor, Perak, Malaysia. Kaolin tersebut mempunyai pH 4.0-5.5 dengan nilai kecerahan 76-80% dan purata saiz zarah 2.5-3.5  $\mu\text{m}$ . Kek kaolin yang diperolehi telah digiling sehingga menjadi serbuk halus dan dicampur sekata, sebelum disimpan di tempat yang kering untuk kajian selanjutnya.

### PENGKULTURAN DAN PENYIMPANAN BAKTERIA

Bakteria *Bacillus aryabhatai* UKMCC1151 dan *Bacillus megaterium* UKMCC1152 diperolehi hasil pencilan daripada tanah liat jenis kaolin (Yap et al. 2020). Untuk penyimpanan jangka pendek, bakteria dikulturkan di atas agar Luria Bertaini (LB) dan pengsubkulturkan kultur di atas agar media segar dijalankan setiap 2 minggu. Untuk penyimpanan jangka panjang, bakteria dikultur dalam kaldu LB ditambahkan dengan 30% (v/v) gliserol yang steril dan disimpan pada suhu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Lee et al. 2022).

Untuk pengkulturan bakteria bagi tujuan pengasaian dan penulenan, satu koloni bakteria daripada piring agar LB diinokulasikan ke dalam kaldu LB dengan teknik aseptik dan diikuti dengan penderaman pada  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 16 jam. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  kultur semalaman bakteria ( $9 \times 10^8$  cfu/mL) diinokulasikan ke dalam 100 mL kaldu media M9 yang mengandungi 6.4 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25 g/L  $\text{NaCl}$ , 0.5 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  dan 2% (v/v) maltosa sebagai sumber karbon dan dieramkan di dalam penggoncang putar pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  dengan kelajuan 250 rpm. Selepas eraman, kultur sel diempar selama 13,000 rpm selama 10 minit untuk mendapatkan supernatan bebas sel.

### PENENTUAN PENGHASILAN SIDEROFOR

Asai cecair krom azurol S (CAS) telah dilakukan menggunakan protokol Payne (1994) yang telah diubah suai (Lee et al. 2022). Sebelum melakukan pengasaian, alat radas kaca dicuci dengan menggunakan 3 M HCl dan

dibilas dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  untuk mengelakkan pencemaran. Sebanyak 10 mL larutan Fe(III) yang mengandungi 1 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan 10 mM HCl disediakan. Sebanyak 0.0121 g CAS dilarutkan di dalam air suling untuk menyediakan 10 mL larutan CAS. Seterusnya, 30 mL larutan piperazina disediakan dengan cara melarutkan 4.307 g piperazina dengan air suling dan ditambah 6.75 mL 12 M HCl untuk mendapatkan pH 5.6. Selepas itu, 0.0219 g heksadesiltrimetilammonium bromida (HDTMA) pula dilarutkan bersama air suling untuk menyediakan larutan HDTMA sebanyak 50 mL. Larutan dikacau secara perlahan-lahan bagi mengelakkan pembentukan buih semasa penyediaan larutan HDTMA. Akhir sekali, bagi menyediakan 100 mL larutan campuran CAS, 1.5 mL larutan Fe(III), 7.5 mL larutan CAS, 30 mL larutan piperazina, 50 mL larutan HDTMA berserta air suling dicampur bersama.

Seterusnya, 0.5 mL supernatan bebas sel ditambah dengan 0.5 mL reagen CAS dan divorteks. Larutan campuran ini dibiarkan selama 3 jam dalam keadaan yang gelap dan pada suhu bilik sebelum dibaca penyerapan pada 630 nm menggunakan spektrofotometer *NanoDrop<sup>TM</sup> 2000c*. 1 M pirokatekol digunakan sebagai kawalan positif. Kaldu media M9 tanpa inokulasi digunakan sebagai bacaan pengosong manakala campuran 0.5 mL kaldu media M9 dan 0.5 mL reagen CAS digunakan sebagai bacaan rujukan ( $A_r$ ). Asai dilakukan sebanyak tiga replikat. Pengiraan penghasilan siderofor dilakukan menggunakan formula % unit siderofor =  $[(A_r - A_s)/A_r] \times 100\%$  unit (Payne 1994).  $A_s$  merujuk kepada bacaan penyerapan campuran supernatan dan reagen CAS pada 630 nm, manakala  $A_r$  merujuk kepada bacaan rujukan.

### PENULENAN SEPARA SIDEROFOR

Daripada kultur bakteria yang telah ditumbuhkan di dalam medium kekurangan besi, siderofor yang dihasilkan di dalam keadaan tersebut diekstrak menggunakan kaedah fenol-kloroform (Meyer & Abdallah 1978). Sebanyak 0.5 g/L  $\text{FeCl}_3$  ditambahkan ke dalam supernatan untuk menjadikan siderofor lebih stabil dan boleh dilihat semasa proses penulenan. Sebanyak 300 g/L  $\text{NaCl}$  ditambahkan untuk menyingkirkan sebarang bendasing kultur terutama sekali protein. Selepas pengemparan selama 20 minit pada 6000 rpm, supernatan dicampurkan dengan isi padu yang sama dengan larutan fenol-kloroform bernisbah 1:1 dan lapisan organik yang terkumpul diekstrak selanjutnya dengan dua isi padu dietil eter dan separuh isi padu air ternyahion ( $\text{DI-H}_2\text{O}$ ). Kemudian, fasa akueus dikumpulkan dan dikeringkan pada  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Selepas itu, Fe(III) disingkirkan daripada siderofor dengan menggunakan kaedah kloroform-

hidroksikuinolina (Gupta et al. 2008). Serbuk yang telah dikeringkan dilarutkan di dalam 30 mL air berasid yang disediakan terlebih dahulu dengan menambahkan asid asetik ke dalam air suling sehingga mencapai pH 4.0 dan kemudian, campuran ditambahkan dengan 8-hidroksikuinolina. Bagi menyediakan larutan 3% 8-hidroksikuinolina, sebanyak 3 g 8-hidroksikuinolina telah ditambahkan 100 mL kloroform. Selepas 20 minit, fasa akues yang terbentuk dikumpulkan dan dikeringkan dengan menggunakan proses pengeringan beku. Sampel siderofor yang telah dikering beku kemudiannya disimpan pada suhu 4 °C untuk kajian selanjutnya.

#### LARUT-LESAP KAOLIN MENGGUNAKAN SIDEROFOR SEPARA TULEN

Sebanyak 0.1 g serbuk siderofor separa tertulen telah diperoleh dan dilarutkan bersama 10 mL air suling ternyahion untuk mendapatkan kepekatan 1% (b/i). Seterusnya, 3 mL larutan siderofor ditambah dengan 97 mL air suling ternyahion. Bagi setiap 100 mL larutan siderofor, sebanyak 10 g tanah liat kaolin yang telah diautoklaf dimasukkan. Campuran dieram pada 30 °C, selama 5 hari pada kelajuan 250 rpm. Sebanyak 3 replikasi dilakukan. Kaolin bersama air suling ternyahion turut diperlakukan seperti sampel kaolin terawat bertindak sebagai kawalan abiotik. Campuran yang terhasil dituras menggunakan kertas Whatman No. 1 dan dikeringkan menggunakan ketuhar pengering pada 80 °C selama 24 jam untuk mengeluarkan kesemua air.

#### ANALISIS KAOLIN YANG TELAH DILARUT-LESAP *Analisis struktur kaolin*

Morfologi permukaan sampel kaolin dianalisis menggunakan mikroskop elektron imbasan pelbagai tekanan (VPSEM). Analisis ini digunakan untuk membandingkan perbezaan permukaan struktur kaolin sebelum dan selepas dilarut-lesap menggunakan siderofor separa tulen daripada *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*.

#### *Analisis unsur dalam kaolin*

Peratus berat bagi unsur yang terdapat pada kaolin ditentukan menggunakan analisis sinar-X serakan tenaga (EDX). Pengiraan ke atas kadar pengeluaran cemar besi daripada kaolin turut dilakukan menggunakan formula (1).

$$\text{Kadar pengeluaran Fe (III) (\%)} = |X_i - X_f| / X_i \times 100\% \quad (1)$$

dengan  $X_i$  ialah peratus berat permulaan (%) dan  $X_f$  ialah peratus berat akhir (%)

#### *Analisis indeks keputihan kaolin*

Analisis bagi sifat keputihan sampel kaolin sebelum dan selepas dilarut-lesap dilakukan menggunakan Chroma Meter (Minolta, CR-400) dengan saiz apertur 8 mm dan julat paparan Y:0.01 ke 160.00% (pemantulan). Sistem ini dikalibrasi menggunakan kertas piawai yang tersedia sebelum digunakan. Ukuran diambil sebanyak 3 kali bagi mendapatkan nilai purata bagi  $L^*$ ,  $a^*$  dan  $b^*$ . Indeks keputihan dihitung menggunakan persamaan Stenby,  $WI = L^* - 3b^* + 3a^*$  (Alfonso et al 2022). Ketiga-tiga  $L^*$ ,  $a^*$  dan  $b^*$  merupakan parameter CIELAB.  $L^*$  merupakan ukuran bagi kecerahan yang bermula daripada 0 (hitam) sehingga 100 (putih). Nilai  $a^*$  dan  $b^*$  pula menunjukkan koordinat kromatik dengan  $+a^*$  menandakan paksi kemerahan,  $-a^*$  menandakan paksi kehijauan,  $+b^*$  menandakan paksi kekuningan dan  $-b^*$  menandakan paksi kebiruan (Yong et al. 2023).

#### ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik ujian-T berpasangan dan tidak berpasangan dilakukan menggunakan perisian Microsoft Excel.

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

##### PENGHASILAN DAN PENULENAN SEPARA SIDEROFOR

Kompleks CAS-HDTMA-Fe yang berwarna biru mampu dikesan pada panjang gelombang 630 nm dan bacaan penyerapan akan menurun dengan peningkatan unit siderofor. Hal ini kerana siderofor mempunyai afiniti yang lebih tinggi terhadap Fe(III) dan bersaing dengan CAS untuk pengikatan besi. Apabila CAS tidak lagi terikat kepada Fe(III), CAS yang terbebas akan bertukar ke warna asal iaitu jingga-merah (Srimathi & Suji 2018). Apabila siderofor yang dihasilkan oleh *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* mengambil ion Fe(III) daripada kompleks tersebut, warna biru larutan diperhatikan menjadi semakin pudar atau berkurang. Penghasilan unit siderofor oleh *B. aryabhatai* ialah sebanyak  $61.10 \pm 6.28\%$  unit, manakala *B. megaterium* hanya menghasilkan sebanyak  $33.24 \pm 2.29\%$  unit apabila dikulturkan selama 48 jam dalam media M9 yang mengandungi maltosa sebagai sumber karbon (Rajah 1).

Jumlah siderofor yang dihasilkan adalah rendah jika dibandingkan dengan pemerhatian yang dilaporkan oleh Lee et al. (2022) yang mendapati penghasilan siderofor oleh *B. aryabhatai* ialah sebanyak  $70.54 \pm 0.9\%$  unit dan *B. megaterium* sebanyak  $67.86 \pm 0.36\%$  unit siderofor. Perbezaan ini mungkin disebabkan oleh degradasi siderofor jenis hidroksamat yang terdapat

dalam supernatan melalui proses hidrolisis untuk membentuk hidroksilamin. Apabila siderofor mengalami degradasi, kurang siderofor yang dapat mengikat kepada Fe(III) yang terdapat pada kompleks CAS-HDTMA (Timofeeva, Galyamova & Sedykh 2022).

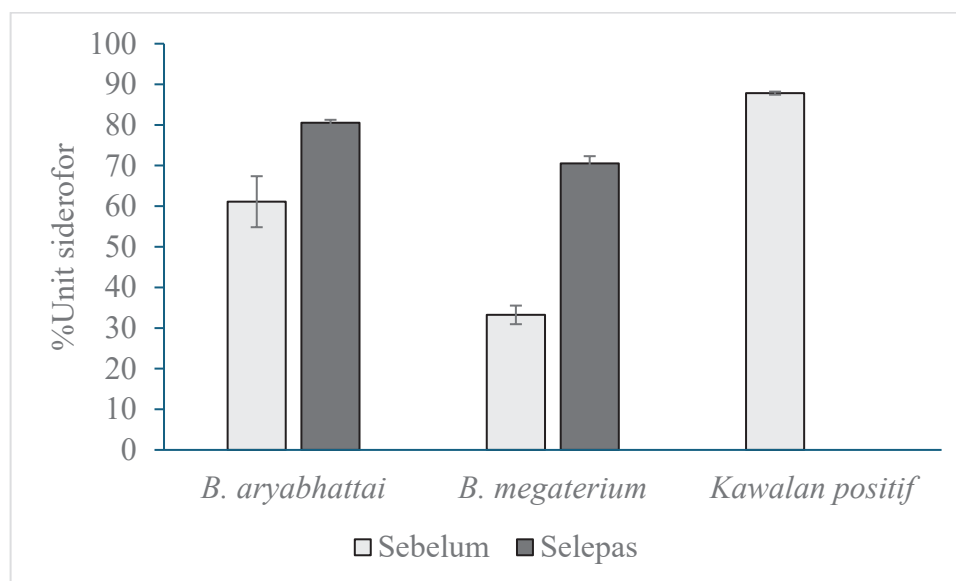
Setelah siderofor dituliskan secara separa, asai cecair CAS dilakukan ke atas larutan siderofor yang diperoleh untuk menentukan unit siderofor yang hadir setelah melalui proses penulenan sebelum digunakan untuk proses larut lesap bersama kaolin. Unit siderofor yang diperoleh ialah sebanyak  $80.54 \pm 0.72\%$  unit bagi *B. aryabhatai* dan  $70.54 \pm 1.77\%$  unit bagi *B. megaterium* (Rajah 1). Peningkatan dalam unit siderofor yang dihasilkan oleh kedua-dua bakteria ini berkemungkinan disebabkan oleh peningkatan skala kultur menyebabkan lebih banyak kehadiran bakteria yang mensintesis siderofor semasa dieram bersama media M9 dan maltosa. Di samping itu, semasa proses penulenan, penambahan  $\text{FeCl}_3$  membantu dalam menstabilkan siderofor dengan membentuk kompleks Fe(III)-siderofor yang dapat mengelakkan proses degradasi daripada berlaku kerana sebahagian siderofor bersifat fotoreaktif dalam ketiadaan Fe (Osman et al. 2019; Timofeeva, Galyamova & Sedykh 2022). Pertambahan NaCl pula dapat mengasingkan siderofor daripada cecair seperti protein daripada sel yang mengganggu ketulenan siderofor (Osman et al. 2019). Oleh itu, jelas bahawa proses penulenan siderofor secara separa berjaya meningkatkan unit siderofor yang telah diperoleh.

#### KESAN LARUT-LESAP MENGGUNAKAN SIDEROFOR KE ATAS KAOLIN

##### *Analisis mineralogi kaolin*

Dari segi struktur, kaolinit terdiri daripada gabungan lapisan silikat ( $\text{Si}_2\text{O}_5$ ) dan lapisan aluminium oksida atau hidroksida ( $\text{Al}_2(\text{OH})_4$ ) yang membentuk  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$  (Yap et al. 2020). Melalui penggunaan analisis SEM, morfologi permukaan zarah kaolin sebelum dan selepas larut-lesap diperhatikan. Rajah 2(a) dan 2(b) menunjukkan morfologi kaolin mentah dan kawalan abiotik dengan zarah kaolin menunjukkan struktur berlapis dengan ketebalan yang berbeza dan mempunyai permukaan yang rata serta sisi yang licin dan membulat. Bagi kaolin yang telah dilarut-lesap menggunakan siderofor bakteria (Rajah 2(c) dan 2(d)), permukaan kaolin boleh dilihat masih kelihatan berlapis tetapi terdapat pecahan kecil yang membentuk ruang kosong antara lapisan tersebut. Sisi zarah kaolin adalah membulat dan tidak tajam dengan permukaan yang agak licin. Hal ini menunjukkan tindakan siderofor yang telah dituliskan secara separa ke atas kaolin menyebabkan perubahan morfologi yang tidak ketara atau minimum apabila dibandingkan dengan kaolin mentah atau kawalan abiotik.

Pemerhatian ini adalah berbeza dengan pemerhatian yang dilaporkan oleh Yong et al. (2023), apabila permukaan kaolin yang dilarut-lesap dengan sel bakteria *Bacillus* sp. memperlihatkan sisi zarah yang tajam dan mengalami sedikit kerosakan atau pecah. Perbezaan morfologi permukaan yang diperhatikan mencadangkan



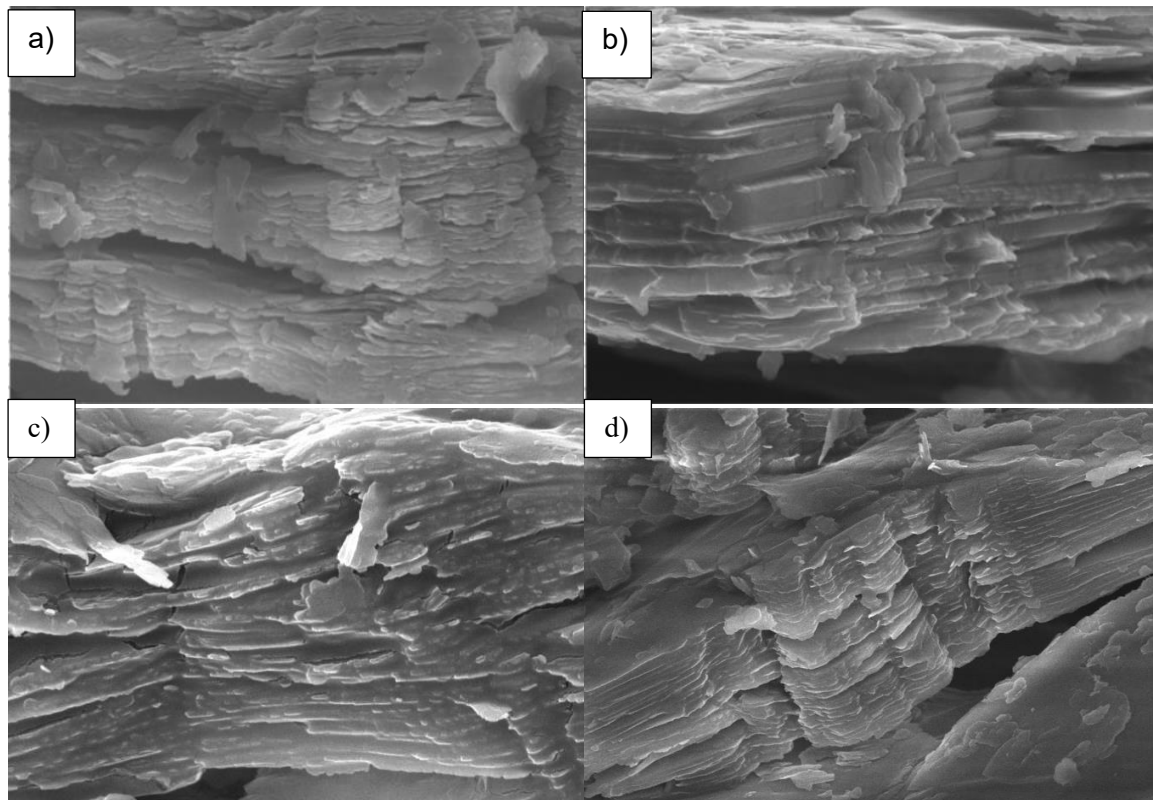
RAJAH 1. Penghasilan siderofor dalam % sebelum dan selepas proses penulenan separa siderofor. Palang ralat yang ditunjukkan dalam carta bar merupakan ralat piawai dalam pengiraan purata peratusan unit siderofor untuk tiga replikasi

bahawa perubahan pada morfologi permukaan kaolin adalah disebabkan oleh kehadiran bakteria dan interaksinya dengan permukaan kaolin. Berbanding dengan penggunaan siderofor tanpa kehadiran sel hidup, morfologi zarah kaolin tidak mengalami sebarang perubahan yang ketara. Hal ini disebabkan sifat keafinan siderofor yang sangat tinggi dan khusus terhadap besi, menyebabkan sebatian organik ini berupaya untuk mengkelat besi yang wujud di dalam bentuk besi ferik ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) yang tidak larut daripada permukaan kaolin secara berkesan, sambil mengekalkan integriti struktur dalam kaolin (Řezanka et al. 2019).

Selain itu, hasil analisis komposisi kimia menggunakan EDX menunjukkan bahawa larut-lesap menggunakan siderofor tidak menyebabkan perubahan yang ketara ke atas komposisi kimia kaolin, kecuali terdapat penurunan ketara dalam komposisi Fe (Jadual 1). Berbanding dengan sampel kaolin yang tidak dirawat, kaolin yang dirawat dengan siderofor *B. aryabhatai* menunjukkan pengurangan dalam komposisi Fe daripada 1.66 kepada 0.86%, manakala untuk siderofor *B. megaterium*, komposisi Fe berkurang

daripada 1.66% kepada 0.82%. Kecekapan penyingkiran Fe daripada kaolin adalah sebanyak 48.2% untuk siderofor *B. aryabhatai* dan sebanyak 50.6% bagi siderofor *B. megaterium*.

Keefisienan penyingkiran besi ini boleh dibandingkan dengan kajian lepas yang menggunakan kedua-dua bakteria tersebut untuk melarut-lesap kaolin mentah. Dalam kajian oleh Yong et al. (2023), keefisienan penurunan besi sebanyak 65.3% dilaporkan untuk penggunaan sel hidup *B. aryabhatai* dalam larut-lesap kaolin, manakala 56.2% untuk *B. megaterium*. Keefisienan penyingkiran besi daripada kaolin menggunakan sel hidup *Bacillus* sp. adalah lebih tinggi secara signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding penggunaan siderofor *Bacillus* sp. Hal ini mungkin disebabkan terdapat komponen lain yang dirembeskan oleh sel bakteria hidup, seperti asid organik yang berupaya untuk menurunkan Fe(III) (Yong et al. 2022). Bakteria juga mampu membentuk biofilem untuk meningkatkan luas permukaan yang menyentuh permukaan zarah kaolin, sekali gus membantu dalam meningkatkan kadar penurunan Fe(III) kepada Fe(II) (Jing et al. 2022).



RAJAH 2. Imej SEM zarah kaolin sebelum dan selepas proses larut-lesap di bawah pembesaran 20000 $\times$ . a) Kaolin mentah sebelum larut-lesap, b) kawalan abiotik selepas larut-lesap, c) kaolin yang dilarut-lesap dengan siderofor *B. aryabhatai*, d) kaolin yang dilarut-lesap dengan siderofor *B. megaterium*

### Analisis indeks keputihan

Kaolin tulen adalah berwarna putih, namun kehadiran cemaran walaupun pada kuantiti yang kecil boleh menyebabkan pewarnaan pada kaolin. Kehadiran cemaran ini bukan sahaja menjejaskan keputihan kaolin, tetapi turut memberi kesan negatif kepada sifat termal dan optik kaolin yang merupakan parameter penting dalam penentuan kualiti kaolin (Raji, Qaiss & Bouhfid 2020). Untuk mengkaji keberkesanan proses larut-lesap menggunakan siderofor *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* dalam memutihkan sampel kaolin, nilai indeks keputihan telah diukur. Indeks keputihan bagi sampel kaolin yang tidak dirawat dan yang dirawat dengan siderofor bakteria ditunjukkan pada Jadual 2.

Berdasarkan kepada Jadual 2, perbezaan yang tidak ketara dapat dicerap antara indeks keputihan kaolin mentah dan juga indeks keputihan kaolin yang telah dilarut-lesap dengan menggunakan siderofor separa tulen. Bagi kaolin yang telah dilarut lesap menggunakan siderofor *B. aryabhatai*, nilai indeks keputihan meningkat dari 53.7% kepada 55.9% (peningkatan sebanyak 4.1%), manakala bagi siderofor *B. megaterium*, nilai indeks keputihan meningkat dari 53.7% kepada 55.4% (peningkatan sebanyak 3.2%). Melalui analisis statistik, didapati perbezaan antara nilai indeks keputihan antara kaolin yang tidak dirawat dengan kaolin yang telah dilarut lesap menggunakan siderofor *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* adalah tidak signifikan ( $p > 0.05$ ).

Hasil indeks keputihan kaolin terawat yang diperoleh dalam kajian ini adalah lebih rendah berbanding dengan keputusan kajian lepas. Dalam Yong et al. (2023), peningkatan indeks keputihan setinggi 13.6% telah diperoleh apabila kaolin dilarut-lesap menggunakan sel hidup *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*. Kajian oleh Zegeye et al. (2013) pula menunjukkan peningkatan sebanyak 22.1% apabila kaolin dilarut-lesap menggunakan *Shewanella* sp. Perbezaan nilai indeks keputihan yang diperoleh dalam

kajian ini berkemungkinan disebabkan oleh pelbagai aspek contohnya seperti keadaan uji kaji seperti pH, suhu, ataupun jangka masa larut-lesap. Perbandingan langsung antara nilai indeks keputihan menjadi lebih rumit akibat pelbagai mekanisme larut-lesap yang mungkin terlibat. Contohnya, kajian ini melibatkan pembentukan kompleks siderofor-besi, manakala kajian Yong et al. (2023) menekankan metabolisma fermentatif (melalui penghasilan asid organik) dan Zegeye et al. (2013) memfokuskan kepada respirasi Fe secara anaerobik (melalui pemindahan elektron). Walaupun terdapat perbezaan, kajian ini telah menunjukkan bahawa siderofor daripada *Bacillus* sp. mampu meningkatkan kualiti kaolin dari segi sifat warna dengan peningkatan indeks keputihan setinggi 4.1%.

### KESIMPULAN

Dalam kajian ini, penghasilan dan penulenan siderofor daripada *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* telah dijalankan. Kedua-dua spesies *Bacillus* tersebut berupaya menghasilkan kuantiti siderofor yang tinggi apabila ditumbuhkan di dalam keadaan terhad besi, menunjukkan potensi bakteria *Bacillus* sp. ini sebagai penghasil siderofor yang cekap. Siderofor yang dihasilkan oleh *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* juga telah dibuktikan berupaya untuk mengkelat dan menyingkirkan cemaran besi daripada kaolin secara berkesan tanpa menjejaskan integriti struktur dalaman kaolin. Walaupun indeks keputihan kaolin selepas dilarut-lesap dengan siderofor *Bacillus* sp. tidak meningkat dengan ketara, hasil kajian ini menunjukkan potensi siderofor sebagai kaedah alternatif yang mampan untuk penulenan kaolin daripada cemaran besi. Pengoptimuman yang selanjutnya boleh dilakukan untuk mengenal pasti kesan faktor lain seperti suhu, pH, kepekatan dan jangka masa terhadap proses larut-lesap kaolin menggunakan siderofor. Hal ini adalah penting untuk membangunkan satu proses larut-lesap yang lestari yang boleh diaplikasikan ke peringkat industri.

JADUAL 1. Analisis EDX bagi kaolin sebelum dan selepas proses larut-lesap menggunakan siderofor *Bacillus* sp.

Sampel	Berat (%)				
	O	Al	Si	K	Fe
Kaolin tidak terawat	43.07	21.87	29.22	4.19	1.66
Kaolin + siderofor <i>B. aryabhatai</i>	49.14	19.81	25.61	4.11	0.86
Kaolin + siderofor <i>B. megaterium</i>	48.68	20.83	26.70	3.54	0.82

JADUAL 2. Analisis warna bagi kaolin sebelum dan selepas proses larut-lesap menggunakan siderofor *Bacillus* sp.

Sampel	L*	a*	b*	%Keputihan
Kaolin tidak terawat	75.01±0.44	-0.38±0.01	6.70±0.28	53.73±1.24
Kaolin + siderofor <i>B. aryabhatai</i>	73.50±1.40	-0.34±0.04	5.73±0.39	55.86±1.99
Kaolin + siderofor <i>B. megaterium</i>	72.42±1.67	-0.33±0.03	5.33±0.12	55.43±1.42

## PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh Kementerian Pengajian Tinggi (MOHE), Malaysia di bawah geran *Fundamental Research Grant Scheme* (FRGS) dengan nombor projek FRGS/1/2022/TK08/UTAR/02/6 yang dianugerahkan kepada K.S.H.

## RUJUKAN

- Alfonso, P., Penedo, L.A., García-Valles, M., Martínez, S., Martínez, A. & Trujillo, J.E. 2022. Thermal behaviour of kaolinitic raw materials from San José (Oruro, Bolivia). *J. Therm. Anal. Calorim.* 147(9): 5413-5421.
- Claassens, N.J., Burgener, S., Vigeli, B., Erb, T.J. & Bar-Even, A. 2019. A critical comparison of cellular and cell-free bioproduction systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 60: 221-229.
- Cuadros, J. 2017. Clay minerals interaction with microorganisms: A review. *Clay Miner.* 52: 235-261.
- Gao, X., Jiang, L., Mao, Y., Yao, B. & Jiang, P. 2021. Progress, challenges, and perspectives of bioleaching for recovering heavy metals from mine tailings. *Adsorpt. Sci. Technol.* 2021: 9941979.
- Gupta, V., Saharan, K., Kumar, L., Gupta, R., Sahai, V. & Mittal, A. 2008. Spectrophotometric ferric ion biosensor from *Pseudomonas fluorescens* culture. *Biotechnol. Bioeng.* 100(2): 284-296.
- Hajihoseini, J. & Fakharpour, M. 2019. Effect of temperature on bioleaching of iron impurities from kaolin by *Aspergillus niger* fungal. *J. Asian Ceram. Soc.* 7(1): 82-89.
- Hosseini, M.R. & Ahmadi, A. 2015. Biological beneficiation of kaolin: A review on iron removal. *Appl. Clay Sci.* 107: 238-245.
- Jing, H., Liu, Z., Kuan, S.H., Chieng, S. & Ho, C.L. 2021. Elucidation of Gram-positive bacterial iron(III) reduction for kaolinite clay refinement. *Molecules* 26(11): 3084.
- Kawanishi, M., Yoneda, R., Totsuka, Y. & Yagi, T. 2020. Genotoxicity of micro- and nanoparticles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42: 16.
- Khan, A., Singh, P. & Srivastava, A. 2018. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: A review. *Microbiol. Res.* 212: 103-111.
- Khasheii, B., Mahmoodi, P. & Mohammadzadeh, A. 2021. Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol. Res.* 250: 126790.
- Lee, S.Y., Yong, S.N., Kuan, S.H. & Chieng, S. 2022. Perbandingan penghasilan siderofor daripada *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus megaterium* dan *Bacillus cereus*. *Sains Malaysiana* 51(9): 3069-3079.
- Meyer, J.M. & Abdallah, M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107(2): 319-328.
- Navarrete, C., Jacobson, I.H., Martinezz, J.L. & Procentese, A. 2020. Cell factories for industrial production processes: current issues and emerging solutions. *Processes* 8(7): 768.
- Osman, Y., Gebrell, A., Mowafy, A.M., Anan, T.I. & Hamed, S.M. 2019. Characterization of *Aspergillus niger* siderophore that mediates bioleaching of rare earth elements from phosphorites. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35: 93.
- Payne, S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.* 235: 329-344.
- Raji, M., Qaiss, A.K. & Bouhfid, R. 2020. Effects of bleaching and functionalization of kaolinite on the mechanical and thermal properties of polyamide 6 nanocomposites. *RSC Adv.* 10: 4916-4926.
- Řezanka, T., Palyzová, A., Faltýšková, H. & Sigler, K. 2019. Siderophores: Amazing metabolites of microorganisms. *Studies in Natural Products Chemistry* 60: 157-188.
- Sánchez-Palencia, Y., Bolonio, D., Ortega, M.F., García-Martínez, M.J., Ortiz, J.E., Rayo, F., Arregui, L., Serrano, S., Llamas, J.F. & Canoira, L. 2022. Iron removal from kaolin waste dumps by chemical (oxalic and citric acids) and biological (*Bacillus* strain) leaching. *Clays and Clay Miner.* 70(3): 386-404.
- Srimathi, K. & Suji, H.A. 2018. Siderophores detection by using blue agar CAS assay methods. *Int. J. Sci. Res. Biol. Sci.* 5(6): 180-185.
- Timofeeva, A.M., Galyamova, M.R. & Sedykh, S.E. 2022. Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants (Basel)* 11(22): 3065.
- Vardanyan, A. & Vyrides, I. 2019. Acidophilic bioleaching at high dissolved organic compounds: Inhibition and strategies to counteract this. *Miner. Eng.* 143: 105943.
- Vilkhovoy, M., Adhikari, A., Vadhin, S. & Varner, J.D. 2020. The evolution of cell free biomanufacturing. *Processes* 8(6): 675.



- Williamson, A.J., Folens, K., Matthijs, S., Cortes, Y.P., Varia, J., Laing, G.D., Boon, N. & Hennebel, T. 2021. Selective metal extraction by biologically produced siderophores during bioleaching from low-grade primary and secondary mineral resources. *Miner. Eng.* 163: 106774.
- Yap, H.J., Yong, S.N., Cheah, W.Q., Chieng, S. & Kuan, S.H. 2020. Bioleaching of kaolin with *Bacillus cereus*: Effect of bacteria source and concentration on iron removal. *J. Sustain. Sci. Manage* 15(4): 91-99.
- Yong, S.N., Lim, S., Ho, C.L., Chieng, S. & Kuan, S.H. 2022. Mechanisms of microbial-based iron reduction of clay minerals: Current understanding and latest developments. *Appl. Clay Sci.* 228: 106653.
- Yong, S.N., Lee, W.S., Chieng, S., Lim, S. & Kuan, S.H. 2023. Impact of *Bacillus* species on Fe reduction of kaolin in bioleaching: Surface, structural, and chemical studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 107: 4789-4801.
- Yu, S., Teng, C., Bai, X., Liang, J., Song, T., Dong, L., Jin, Y. & Qu, J. 2017. Optimization of siderophore production by *Bacillus* sp. PZ-1 and its potential enhancement of phytoextraction of PB from soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(8): 1500-1512.
- Zegeye, A., Yahaya, S., Fialips, C.I., White, M.L., Gray, N.D. & Manning, D.A.C. 2013. Refinement of industrial kaolin by microbial removal of iron-bearing impurities. *Appl. Clay Sci.* 86(1): 47-53.
- Zhao, H., Zhang, Y., Zhang, X., Qian, L., Sun, M., Yang, Y., Zhang, Y., Wang, J., Kim, H. & Qiu, G. 2019. The dissolution and passivation mechanism of chalcopyrite in bioleaching: An overview. *Miner. Eng.* 136: 140-154.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: sylvia@ukm.edu.my