

## Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri Menggunakan Metode 16SrRNA terhadap Plak Gigi pada Pasien Pengguna Tumpatan Amalgam

<sup>1</sup>Christofel A. N. Tanumihardja

<sup>2</sup>Billy Kepel

<sup>2</sup>Widhi Bodhi

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

<sup>2</sup>Bagian Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi

Email: christari98@gmail.com

**Abstract:** Amalgam is a popular dental filling due to its cheaper price than other dental fillings. Basically, amalgam is an alloy, consists of two or more metals; one of them is mercury. The unfavorable thing about this alloy is that its vapor in the oral cavity can trigger the development of mercury-resistant bacteria. This type of bacteria has an enzyme called mercury reductase that can reduce  $Hg^{2+}$  to  $Hg^0$ . 16SsRNA is a gene that contains important information to describe the prokaryotic type. This study was aimed to identify the type of mercury-resistant bacteria from dental plaque of patients with amalgam fillings. Samples were taken from the dental plaques. Isolation of DNA, sequencing of 16SsRNA gene by using PCR, and online BLAST through GenBank NCBI, and finally looking for the closest relative using a phylogenetic tree were performed in the Pharmacy Laboratory, Faculty of Mathematics and Science. The result of BLAST showed 4 types of bacteria, and the closest relative is *B. thuringiensis*. **Conclusion:** The type of mercury-resistant bacteria found in dental plaques was *Bacillus thuringiensis*.

**Keyword:** amalgam, mercury resistant bacteria, dental plaques, 16SsRNA, PCR

**Abstrak:** Amalgam adalah suatu logam campuran yang terdiri dari dua atau beberapa logam yang salah satunya adalah merkuri atau air raksa. Amalgam sebagai bahan tumpatan sampai saat ini masih banyak digunakan oleh dokter gigi karena harganya yang relatif murah. Namun penggunaan amalgam ini dapat melepaskan uap merkuri selama berada di dalam rongga mulut. Penggunaan amalgam ini memicu munculnya bakteri yang resisten terhadap merkuri dimana bakteri dapat mereduksi  $Hg^{2+}$  menjadi  $Hg^0$  melalui enzim yang menginduksi merkuri reduktase. 16SsRNA adalah gen yang menampung informasi-informasi penting agar mendeskripsikan jenis-jenis prokariotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri resisten merkuri pada plak gigi pasien pengguna tumpatan amalgam menggunakan metode PCR. Jenis penelitian ialah deskriptif observatif. Sampel diambil dari plak gigi pasien pengguna tumpatan amalgam di Laboratorium Farmasi Fakultas MIPA. Dilakukan langkah-langkah untuk isolasi DNA, sekuensing gen 16SsRNA menggunakan PCR, kemudian dilakukan BLAST secara online melalui GenBank NCBI lalu dicari kekerabatannya menggunakan pohon filogenetik. Hasil BLAST mendapatkan 4 jenis bakteri, dan kekerabatan terdekatnya ialah *Bacillus thuringiensis*. **Simpulan:** Jenis bakteri resisten terhadap merkuri pada plak gigi ialah *Bacillus thuringiensis*.

**Kata kunci:** amalgam, bakteri resisten merkuri, plak gigi, 16SsRNA, PCR

Merkuri adalah logam berat yang beracun, terdapat secara luas di alam. Umumnya manusia terpapar merkuri yang berasal dari ikan yang dimakan, atau penggunaan

tumpatan amalgam.<sup>1</sup> Merkuri sering digunakan sebagai komponen pada baterai, tambalan amalgam, termometer, barometer, dan saklar listrik.<sup>2</sup> Bahaya dari merkuri

antara lain: sindroma nefrotik, kerusakan sistem saraf, tremor, iritabilitas, dll.<sup>3</sup>

Amalgam adalah campuran dari dua atau beberapa logam yang salah satunya ialah merkuri atau air raksa, dapat berbentuk padat maupun cair tergantung jumlah air raksa yang digunakan. Umumnya amalgam digunakan untuk menambal gigi yang berlubang. Penggunaan amalgam sampai sekarang masih menjadi kontroversi mulai dari pertama kali diperkenalkan ke publik karena kandungan merkurnya.<sup>4</sup>

Amalgam sebagai bahan tumpatan sampai saat ini masih banyak digunakan oleh dokter gigi atas permintaan pasien, karena harganya relatif murah.<sup>5</sup> Paparan dari tumpatan amalgam biasanya terjadi karena menghirup uap merkuri dari isian amalgam. Penyerapan uap merkuri terjadi melalui paru-paru, kemudian didistribusikan oleh darah. Merkuri bisa masuk dan menetap dalam beberapa jaringan, seperti susunan saraf pusat dan ginjal untuk kurun waktu yang lama.<sup>6</sup>

Plak adalah endapan lunak yang menutupi dan melekat erat pada permukaan gigi, terdiri atas sejenis bahan berekat yang dihuni beraneka ragam bakteri.<sup>7</sup>

Mikroorganisme terdapat dimana-mana dan dapat beradaptasi dimanapun. Dari semua jenis mikroorganisme, bakteri menunjukkan mekanisme pertahanan yang berbeda terhadap logam berat. Beberapa interaksi bakteri dengan logam berat dapat menghasilkan efek yang berguna untuk menghilangkan racun dari lingkungan.<sup>8</sup>

Terdapat beberapa bakteri memiliki gen resisten yang mengubah bentuk ion merkuri menjadi bentuk yang tidak stabil melalui suatu enzim. Dikenal dua enzim yang berperan dalam perubahan ini yakni *organomercurial lyase* dan *mercurial reductase* yang bekerja secara berurutan. *Organomercurial lyase* memotong rantai karbon-merkuri kemudian *mercurial reductase* mengubah bentuk ion yang larut dalam air ( $Hg^{++}$ ) menjadi merkuri metalik yang tidak dapat dilarutkan ( $Hg^0$ ).<sup>9</sup> Bakteri yang hanya memiliki gen merkuri reduktase (*merA*) disebut bakteri resisten merkuri spektrum sempit, sedangkan bakteri yang

memiliki selain gen *merA*, juga gen *merB* maka bakteri tersebut disebut bakteri resisten merkuri spektrum luas.<sup>10</sup>

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri ialah *Polymerase Chain Reaction* (PCR).<sup>11</sup> Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polimerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi.<sup>12</sup>

Pada penelitian ini, gen yang dilakukan sekuensing ialah gen 16SrRNA. Gen ini digunakan untuk mempelajari spesies bakteri, dengan alasan bahwa: 1) gen 16SrRNA terdapat di dalam semua sel bakteri, sering sebagai kelompok multigen atau operon; 2) fungsi gen 16SrRNA dalam waktu yang lama tidak berubah tergantung jarak evolusinya; dan 3) gen 16SrRNA cukup panjang yaitu 1500 bp.<sup>13</sup> Metode pemeriksaan yang dilakukan untuk gen 16SrRNA dinamakan *polymerase chain reaction* (PCR). Banyak bakteri yang sebelumnya tidak teridentifikasi dapat teridentifikasi menggunakan metode ini.<sup>14</sup> Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri resisten merkuri pada plak gigi pasien pengguna tambalan amalgam dengan metode PCR

## METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini ialah deskriptif-eksploratif yang dilaksanakan di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi pada bulan Oktober-November 2017. Populasi penelitian ialah bakteri yang terdapat pada plak gigi pasien dengan tumpatan amalgam. Sampel penelitian ini ialah seluruh populasi bakteri resisten merkuri. Tahap-tahap penelitian ialah: isolasi bakteri resisten merkuri dari plak gigi, isolasi DNA, amplifikasi gen 16SrRNA dengan teknik PCR, elektroforesis dan visualisasi gen 16SrRNA, dan sekuensing gen 16SrRNA.

### **Isolasi Bakteri Resisten Merkuri**

Langkah pertama yang dilakukan adalah isolasi bakteri resisten merkuri, tujuannya adalah mengisolasi bakteri-bakteri resisten merkuri yang ada pada sampel spesimen. Prosedur kerjanya adalah: sedimen dilarutkan dalam aquades steril lalu dipipet 100 µl kedalam media nutrisi Broth (NB) 10 ml yang sudah steril. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur ditumbuhkan pada media nutrisi agar (NA) untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni ditumbuhkan pada media nutrisi Broth dengan penambahan HgCl<sub>2</sub> 20 ppm dan 40 ppm. Koloni yang tumbuh pada media dengan kadar HgCl<sub>2</sub> ≥20 ppm adalah koloni bakteri resisten merkuri tinggi, selanjutnya diseleksi dan ditumbuhkan pada media agar miring dengan kadar HgCl<sub>2</sub> 20 dan 40 ppm untuk pengujian selanjutnya.

### **Isolasi DNA**

Sampel bakteri dari agar miring diambil satu ose ke dalam tabung reaksi berisi media LB cair, di inkubasi selama 1x24 jam. Sampel di ambil 2 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung Ependorf.

Langkah berikutnya dilakukan sentrifus sampel dengan kecepatan 7500 rpm selama 10 menit, kemudian buang supernatant lalu tambahkan 200 µl TLS dan 20 µl PK, kemudian vortex selama 5 detik. setelah itu inkubasi dengan suhu 50°C kemudian tambahkan 200 µl TBS, kemudian vortex, setelah itu tambahkan tabung spin filter ke tabung penerima, kemudian tambahkan sampel ke tabung penerima, setelah itu disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit berikutnya tambahkan 400 µl HS kemudian sentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 30 detik, kemudian tambahkan 750 µl MS, lalu sentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik kemudian buang filtrat, lalu tambahkan tabung spin filter yang baru ke tabung penerima, lalu sentrifus dengan kecepatan maksimal selama 2 menit dan terakhir tambahkan tabung spin filter ke dalam tabung elusi,

kemudian tambahkan 50-100 µl buffer elusi, lalu lakukan inkubasi selama 1 menit dalam suhu ruangan, kemudian sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit

### **Amplifikasi gen 16SrRNA**

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan kit innuprep DNA Micro-kit (Biometra). Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu pasangan primer universal Bact F1 (*forward*) dan Uni B1(*reverse*). Cetakan yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA adalah DNA genomik bakteri yang telah diisolasi. Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan dengan variasi komposisi reagen dan kondisi reaksi PCR di bawah ini:

Komposisi reagen untuk PCR 16S rRNA untuk 1 Tabung PCR :

• ddH <sub>2</sub> O	15,8µl
• Buffer PCR 10x	2,5 µl
• MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3,0 µl
• dNTP 10mM	0,5 µl
• Primer UniBI 30 pmol/ µl	1,0 µl
• Primer BactFI 30 pmol/ µl	1,0 µl
• Taq DNA Pol (5U/ µl)	0,2 µl
• Templat	1,0 µl
Total	25 µl

Tabung PCR yang telah berisi campuran reaksi dimasukkan ke dalam mesin PCR yang telah terprogram pada kondisi optimum, sebagai contoh kondisi optimum pada amplifikasi berikut

Kondisi reaksi PCR gen 16SrRNA :

- Denaturasi awal 95°C 3'
- Denaturasi 95°C 30"
- Annealing 50°C 30'
- Polimerisasi 72°C 1' 30"
- Pemantapan 72°C 1'

Amplifikasi ini dilakukan hingga 35 siklus

### **Elektroforesis dan Visualisasi gen 16SrRNA**

DNA yang telah diamplifikasi, diseparasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%, selanjutnya dilakukan visualisasi menggunakan pewarna etidium bromida dan dideteksi dengan sinar UV pada UV-transiluminator.

### Pembuatan gel agarose 1%

Bubuk agarose ditimbang, dilarutkan dalam TAE buffer 1 kali, dididihkan sampai larut selama 4 menit. Gel didinginkan sampai 60°C pada suhu kamar. Gel dituang ke dalam loyang yang sudah dipasang sisir, setelah itu didinginkan

### Prosedur elektroforesis

Sampel hasil PCR 5µl, dicampur dengan loading dye 2 µl di atas kertas parafilm. Campuran sampel dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 1% ke dalam chamber elektroforesis yang terendam larutan buffer TAE. Salah satu sumur diisi dengan marker NA 10.000 pb sebanyak 7 µl. Power supply dinyalakan selama 60 menit, 100 volt. Hasil elektroforesis dilihat dengan menggunakan Gel Doc., foto dibawah sinar UV. Pola ditentukan dari hasil foto.

### Sekuensing gen 16SrRNA

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Proses sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia.

### HASIL PENELITIAN

Hasil isolasi DNA dari isolat FUG29 kemudian dianalisis dengan metode PCR untuk mengamplifikasi gen 16SrRNA menggunakan primer universal untuk gen 16SrRNA Bact F1:5' AGAGTTTGATCM TGGCTCAG3/Uni B1 5'GGT TACSTT GTTACGACTT3' (Eurogenetic AIT) yang mampu mengamplifikasi gen 16SrRNA sepanjang 1500 bp. Hasil amplifikasi kemudian dilakukan elektroforesis dengan agarose 1% lalu dilakukan foto dibawah sinar UV.

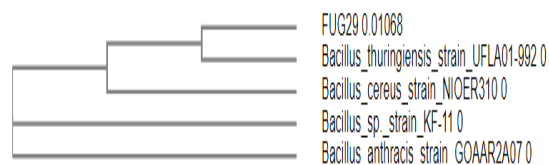
Pada hasil sekuensing gen 16SrRNA pada isolat FUG29, dilakukan BLAST secara online melalui <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Ditemukanlah hasil BLAST yang memiliki *ident* sebesar 99% dan *coverage* sebesar 100% pada sampel FUG29 yaitu *Bacillus cereus* dengan

accession number MG206020, *Bacillus* sp. dengan accession number MG430181, *Bacillus anthracis* dengan accession number MG491523, *Bacillus thuringiensis* dengan accession number KY820828. Untuk hasil dari BLAST dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil BLAST gen 16SrRNA isolat FUG29

No.	Isolat bakteri	Ident (%)	Coverage (%)
1.	<i>Bacillus cereus</i>	99	100
2.	<i>Bacillus sp.</i>	99	100
3.	<i>Bacillus anthracis</i>	99	100
4.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	100

Langkah selanjutnya dilakukan pencarian kekerabatan antara sampel dengan gen bakteri lain secara online melalui <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Hasil kekerabatan ini ditampilkan melalui pohon filogenetik. Hasil pohon filogenetik ditampilkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil Filogenetik isolat FUG29

### BAHASAN

Berdasarkan hasil BLAST, urutan gen 16SrRNA pada isolat FUG29 memiliki *ident* 99% dan *coverage* 100% dengan beberapa bakteri yang terdapat pada GenBank yaitu *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus anthracis*, dan *Bacillus thuringiensis*.

Berdasarkan penelitian Kaligis et al.<sup>15</sup> jenis bakteri yang teridentifikasi dari isolat plak gigi pasien pengguna amalgam di Puskesmas Bahu Manado ialah jenis/genus bakteri *Bacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Veillonella* sp, dan *Lactobacillus* sp.

Suatu bakteri dikatakan sebagai bakteri

resisten merkuri jika bakteri tersebut dapat hidup dalam kadar merkuri (HgCl<sub>2</sub>) 5ppm (mg 1-1) pada media nutrient agar. Banyak dari bakteri ini mampu hidup di lingkungan yang mengandung merkuri (HgCl<sub>2</sub>) dengan kadar 20 ppm atau lebih, digolongkan dalam bakteri resisten merkuri tinggi.<sup>16</sup>

Untuk menentukan kedekatan atau kekerabatan dari sampel dengan hasil bakteri yang didapatkan dari BLAST, dilakukanlah pembuatan pohon filogenetika. Berdasarkan pohon filogenetik yang terdapat pada hasil penelitian, dapat dilihat kekerabatan terdekat dari sampel adalah *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus cereus* juga memiliki kekerabatan dengan isolat FUG29, namun tidak sedekat *Bacillus thuringiensis*. Hal yang sama juga terdapat pada *Bacillus* sp. dan *Bacillus anthracis*. Hal ini menunjukkan bahwa sampel FUG29 kemungkinan besar ialah bakteri *Bacillus thuringiensis*.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Hassen et al.<sup>17</sup> ditemukan bahwa pada *B. thuringiensis*, merkuri memberikan persentase penyerapan tertinggi, diikuti oleh tembaga. Kadmium dan kromium memberikan yang terendah persentase penyerapan.

Penelitian oleh Dash et al.<sup>18</sup> melaporkan bahwa *Bacillus thuringiensis* memiliki kemampuan untuk tumbuh pada medium yang terdapat kandungan merkuri sebesar 50pp, bahkan didapatkan kemampuan resisten yang lebih tinggi terhadap merkuri dan antibiotik dari bakteri lain seperti *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Aeromonas* sp., *Enterobacteriaceae*, dan *Xanthomonas* sp.

*Bacillus thuringiensis* memiliki mer operon sebagai determinan apakah resisten merkuri atau tidak seperti yang terdapat pada bakteri resisten merkuri yang lain. Mer operon pada bakteri ini terletak pada plasmid sedangkan pada bakteri lain, kebanyakan mer operon terdapat pada genomik DNA atau transposons. Oleh karena mer operon ini terdapat pada plasmid, bakteri ini lebih bagus untuk melakukan bioremediasi karena plasmid pada genotip yang resisten dapat di transfer secara mudah dari satu ke lain dengan

menggunakan konjugasi simpel untuk menyebarkan genotip yang resisten.<sup>18</sup>

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri resisten terhadap merkuri yang diisolasi dari plak gigi pasien pengguna tumpatan amalgam ialah bakteri *Bacillus thuringiensis*.

## SARAN

Sebaiknya pada penelitian berikutnya, penelitian dilakukan dengan lebih teliti agar hasil sekuensing yang didapatkan lebih murni (misalnya kontaminasi dengan bakteri lain). Selain itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah terdapat jenis bakteri lain yang resisten merkuri pada plak gigi pasien pengguna tambalan amalgam.

Hasil penelitian ini mungkin bisa menjadi pertimbangan bagi para praktisi di bidang kedokteran gigi untuk pemilihan merkuri sebagai bahan dasar amalgam.

Disarankan melakukan penelitian lebih lanjut terhadap kemampuan bakteri *B. thuringiensis* untuk melakukan bioremediasi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Bernhoft RA. Mercury toxicity and treatment: A review of the Literature. *Journal of Environmental and Public Health*. 2012;2012:1-10.
2. Asiah N, Alfian Z, Anwar J, Siregar Y, Bangun D. Pengaruh lama kerja terhadap kadar merkuri (Hg) dalam urin pekerja tambang emas (Studi kasus di Desa Pantan Luas Kecamatan Sawang Kabupaten Aceh Selatan). *Jurnal Pendidikan Kimia*. 2015;7:7-12.
3. BPOM. Merkuri dan dampaknya terhadap kesehatan manusia. [cited 2017Aug28]. Available from: <http://www2.pom.go.id/public/siker/desc/produk/MerKesMan.pdf>
4. Koral SM. The scientific case against amalgam. [cited 2017Aug28];:1-22. Available from: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06n0352/06n-0352-emc0108-05-case-against-amalgam.pdf>
5. Edy S, Samad R. Upaya pencegahan yang

- dilakukan oleh dokter gigi di Makassar terhadap bahaya akibat penggunaan amalgam. *Dentofasial*. 2012;11:79-83.
6. **Varkey IM, Shetty R, Hegde A.** Mercury exposure levels in children with dental amalgam fillings. *International Journal of Clinic Pediatric Dentistry*. 2015;7:180-5.
  7. **Walewangko GVC.** Uji resistensi bakteri *Escherichia coli* yang di isolasi dari plak gigi terhadap merkuri dan ampicilin [Skripsi]. Manado: Universitas Sam Ratulangi; 2015.
  8. **Pepi M, Focardi S, Tarabelli A, Volterrani M, Focardi SE.** Bacterial strains resistant to inorganic and organic forms of mercury isolated from polluted sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their possible use in bioremediation process. *E3S Web of Conferences*. 2013;1. 31002.
  9. **Kannan SK, Krishnamoorthy R.** Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury - A case study in Pulicat Lake North of Chennai, South East India. *Science of The Total Environment*. 2006;367(1):341-53.
  10. **Fatimawali, Badaruddin F, Yusuf I.** Isolasi dan identifikasi bakteri resisten merkuri dari muara sungai sario yang dapat digunakan untuk detoksifikasi limbah merkuri. [cited 2017Sep6]; Available from: <http://download.portalgaruda.org/article.php?article=16700&val=1043>
  11. **Joshi M, Deshpande JD.** Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International J Biomed Res*. 2011;2(1):81-97.
  12. **Yusuf ZK.** *Polymerase Chain Reaction (Pcr)*. Saintek. 2010;5.
  13. **Kepel B, Fatimawali.** Penentuan jenis dengan analisis gen 16SrRNA dan uji daya reduksi bakteri resisten merkuri yang diisolasi dari feses pasien dengan tambalan amalgam merkuri di Puskesmas Bahu Manado. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 2015;23(1):45-55.
  14. **Mietzner TA, Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mitchell TG, et al.** *Jawetz, Melnick & Adelbergs Medical Microbiology (27th ed)*. New York: McGraw-Hill Education, 2016.
  15. **Kaligis FR, Fatimawali, Lolo WA.** Identifikasi bakteri pada plak gigi pasien di Puskesmas Bahu dan uji resistensi terhadap antibiotik kloramfenikol dan linkosamida (klindamisin). *Pharmacon*. 2017;6(3):223-32.
  16. **Fatimawali.** *Buku Ajar Toksikologi Detoksifikasi Merkuri (1st ed)*. Manado: Unsrat Press; 2015.
  17. **Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A.** Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*. 1998;65:73-82.
  18. **Dash HR, Mangwani N, Das S.** Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013;21(4):2642-5

