

IDENTIFIKASI SECARA BIOMOLEKULER DAN UJI DAYA REDUKSI BAKTERI RESISTEN MERKURI YANG DIISOLASI DARI AIR DI WILAYAH BEKAS TAMBANG EMAS RAKYAT DESA TANOYAN UTARA

Wanti Tandi Payung¹⁾, Fatimawali¹⁾, Novel S. Kojong²⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

²⁾Program Studi Farmasi FMIPA UKI Tomohon

ABSTRACT

Contamination of heavy metal such as mercury (Hg) in the water is very harmful to the environment and human health. Many gold miners used mercury to extracting gold and dispose the mercury waste freely into the environment causing contamination to the water. Mercury-resistant bacteria can reduce inorganic mercury and organic mercury into volatile and less toxic form of mercury. This study aims to isolate, and to identify microbiologically also to carry out biomolecular identification using the 16S rRNA gene of the mercury resistant bacteria, and analyze its ability to reduce mercury. The sample was isolated from the river water in the villagers' gold mine area in North Tanoyan which were then be tested the bacteria reducing power to HgCl₂ and phenyl mercury, microbiology identification including Gram staining, motility test, H₂S test, carbohydrate fermentation test, citrate test, lysine test, indole test and catalase test, biomolecular identification using 16S rRNA gene as well as mercury reduction test of mercury resistant bacteria using CV-AAS method. The result of this study shows that there are 2 isolates of mercury resistant bacteria that could live on medium containing HgCl₂ and phenyl mercury with concentration of 40 mg/L, Gram negative bacteria with bacil form based on microbiology identification is a member of Enterobacteriaceae family, and based on biomolecular identification using 16S rRNA gene isolate 1.A is Proteus mirabilis bacteria, that capable of reducing HgCl₂ and phenyl mercury by 22.7% and 0.2% within 12 hours, 52.2% and 52.7% within 24 hours, respectively.

Keywords: Mercury-Resistant Bacteria, Gen 16S rRNA, HgCl₂, Phenyl Mercury, Mercury-Reduction Test.

ABSTRAK

Pencemaran logam berat merkuri (Hg) pada air sangat membahayakan lingkungan dan kesehatan manusia. Banyak penambang emas yang menggunakan merkuri untuk mengekstrak emas dan membuang limbah merkuri secara bebas ke lingkungan sehingga air dapat terkontaminasi. Bakteri resisten merkuri dapat mereduksi merkuri anorganik maupun merkuri organik menjadi logam merkuri yang mudah menguap dan kurang toksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi bakteri resisten merkuri secara mikrobiologi dan biomolekuler menggunakan gen 16S rRNA serta menganalisis kemampuannya dalam mereduksi merkuri. Sampel diisolasi dari air sungai di wilayah tambang emas rakyat desa Tanoyan Utara yang selanjutnya dilakukan uji resistensi bakteri terhadap HgCl₂ dan fenil merkuri, identifikasi secara mikrobiologi meliputi pewarnaan gram, uji motilitas, uji H₂S, uji fermentasi karbohidrat, uji sitrat, uji lisin, uji indol dan uji katalase, identifikasi secara biomolekuler menggunakan gen 16S rRNA serta uji daya reduksi bakteri resisten merkuri dengan metode CV-AAS. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat 2 isolat bakteri resisten merkuri tinggi yang dapat hidup pada media yang mengandung HgCl₂ dan fenil merkuri dengan konsentrasi 40 mg/L, bakteri Gram negatif dengan bentuk basil, berdasarkan identifikasi secara mikrobiologi termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan berdasarkan identifikasi secara biomolekuler menggunakan gen 16S rRNA isolat 1.A merupakan bakteri spesies *Proteus mirabilis*, yang mampu mereduksi HgCl₂

dan fenil merkuri berturut-turut 22,7% dan 0,2% dalam waktu 12 jam, 52,2% dan 52,7% dalam waktu 24 jam.

Kata kunci: Bakteri Resisten Merkuri, Gen 16S rRNA, HgCl₂, Fenil Merkuri, Daya Reduksi Mekuri

PENDAHULUAN

Merkuri merupakan unsur logam yang sangat berbahaya dan beracun. Merkuri dapat menimbulkan masalah serius bagi kesehatan manusia, seperti bioakumulasi merkuri dalam otak dan ginjal yang pada akhirnya mengarah pada penyakit neurologis serta dapat menyebabkan kematian (Selid *et al.*, 2009).

Pencemaran logam berat merkuri pada air sangat membahayakan lingkungan dan kesehatan manusia. Senyawa merkuri dalam bentuk Hg^{2+} dapat terikat pada residu sistein protein manusia sehingga protein akan kehilangan aktivitasnya. Selain Hg^{2+} , senyawa merkuri yang paling berbahaya bagi kesehatan manusia adalah senyawa merkuri organik, khususnya metil merkuri dan fenil merkuri. Senyawa ini sangat reaktif dan mempunyai mobilitas yang tinggi jika dibandingkan dengan Hg^0 dan Hg^{2+} . Selain itu, senyawa ini juga dapat menyerang saraf manusia melalui peredaran darah (Rasmussen *et al.*, 2008).

Pencemaran merkuri dapat berasal dari aktivitas manusia seperti pembakaran batubara, jenis-jenis produk minyak bumi, penggunaan fungisida, katalisator merkuri dan penambangan emas yang menggunakan merkuri sebagai bahan pengekstraksi emas (Fatimawali *et al.*, 2011).

Detoksifikasi merkuri merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi pencemaran merkuri. Detoksifikasi ini dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme resisten merkuri seperti bakteri resisten merkuri. Penelitian yang dilakukan Fatimawali *et al.* (2011) menyatakan bahwa bakteri yang diketahui resisten terhadap merkuri yaitu

Klebsiella pneumoniae, yang mampu mereduksi HgCl_2 75% dalam waktu 1 jam, 92% dalam waktu 12 jam dan 99,4% dalam waktu 24 jam. Apabila bakteri tersebut dapat beradaptasi pada lingkungan dengan tingkat kontaminasi logam berat yang tinggi, maka penggunaan bakteri tersebut sangat efektif dalam meningkatkan reduksi logam berat (Pratiwi, 2012). Merkuri anorganik dapat didetoksifikasi menggunakan gen merkuri reduktase (*merA*). Tetapi karena terbatas untuk detoksifikasi merkuri anorganik oleh sebab itu, organomercuri liase (*merB*) diperlukan untuk melengkapi proses detoksifikasi untuk mengubah merkuri anorganik dan organik menjadi bentuk yang mudah menguap. Dalam penelitian yang dilakukan Fatimawali *et al.* (2017) menyatakan bahwa protein *merA* yang diisolasi dari bakteri resisten merkuri *K. pneumonia* dapat mendetoksifikasi merkuri anorganik.

Metode analisis yang dikenal untuk analisis logam berat merkuri adalah *Cold Vapor-Atomic Absorption Spectrophotometry* (CV-AAS). Metode analisis merkuri dengan CV-AAS merupakan metode analisis merkuri yang sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI). Metode CV-AAS ini memiliki beberapa keunggulan yaitu memiliki selektivitas dan sensitivitas yang tinggi untuk analisis merkuri total dalam sampel. Pada analisis merkuri dengan CV-AAS, ion Hg^{2+} dalam sampel direduksi menjadi uap Hg^0 (Kristianingrum, 2009).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yaitu dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini digunakan untuk menelaah profil DNA gen 16S rRNA. Identifikasi bakteri dengan

gen 16S rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekuler universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies (Rychlic, 1995). Identifikasi dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA dinilai memberikan hasil yang sangat akurat dan dapat dijadikan sebagai metode diagnosis dalam aplikasi klinis. Analisis sekuensing dapat menjawab berbagai permasalahan yang berkaitan dengan identifikasi berbasis mikrobiologi konvensional, diantaranya yaitu dapat digunakan pada mikroorganisme yang tidak dapat dikultur serta menunjukkan hasil yang dapat digolongkan pada genus atau spesies tertentu (Clarridge, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi bakteri resisten merkuri secara mikrobiologi dan identifikasi secara biomolekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA serta menguji daya reduksi bakteri resisten merkuri dengan metode CV-AAS.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Januari - Maret 2018, di Laboratorium Mikrobiologi di Program Studi Farmasi dan Laboratorium Bioteknologi di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi.

Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksploratif untuk menemukan ada atau tidaknya bakteri resisten merkuri pada air sungai di wilayah tambang emas rakyat kemudian mendeskripsikannya.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu : Sarung tangan steril,

erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik, batang pengaduk, cawan petri, jarum ose, lampu spritus, tabung *ependorf*, inkubator (*Incucell*), *laminar air flow* (*Biotek*), autoklaf (ALP), mikropipet (*Ecopipette*), mikroskop (*Olympus*), kertas label, plastik *wrap*, *aluminium foil*, kapas, kasa, seperangkat alat PCR (*Biometra T-Personal*) dan elektroforesis (*Biometra T-Personal*), dan alat fotografi.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian : Sampel air, aquades, natrium klorida (NaCl), *nutrient broth*, *yeast extract*, *tryptone*, agar *bacteriological*, *triple iron agar* (TSIA), *nutrient agar*, *Simmon's citrate agar*, *lysine iron agar*, reagen *covac's*, fenil merkuri, merkuri klorida (HgCl₂), hidrogen peroksida (H₂O₂), asam sulfat (H₂SO₄), alkohol 70%, kit isolasi DNA bakteri (Geneaid), primer set (untuk bakteri), 2x Master Mix (Taq Polimerase, MgCl₂, dNTPS) untuk amplifikasi DNA (Bioline), ddH₂O, *gel agarosa*, dan bufer TBE 0,5X.

Uji Resistensi Bakteri Terhadap Merkuri

Pengujian resistensi bakteri terhadap HgCl₂ dan fenil merkuri pada media cair *nutrient broth* dengan masing-masing konsentrasi yaitu 0, 10, 20, dan 40 mg/L.

Identifikasi Bakteri Secara Morfologi, Fisiologi dan Biokimia

Uji morfologi dilakukan dengan pewarnaan Gram, sedangkan uji fisiologi dilakukan dengan uji motilitas. Identifikasi bakteri secara biokimia dilakukan dengan uji H₂S, uji fermentasi karbohidrat, uji sitrat, uji lisin, uji indol dan uji katalase.

Isolasi DNA Genomik

Isolasi DNA Genomik dari kultur bakteri dilakukan dengan metode *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid). Sampel kultur bakteri diambil dari media miring kemudian disuspensikan ke dalam tabung *Eppendorf*.

Amplifikasi gen 16S rRNA dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (*Biometra T-Personal*). Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu pasangan primer BKXF (*forward*) dan BKXR (*reverse*). Cetakan yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA yaitu DNA genomik bakteri yang telah diisolasi.

Elektroforesis dan Visualisasi

DNA yang telah diamplifikasi kemudian diseparasi dengan *elektroforesis gel agarosa* 1% di dalam larutan bufer TBE 0,5X (*Tris-Boric EDTA*). Visualisasi dilakukan dengan sinar UV pada UV-transiluminator. Hasil deteksi didokumentasikan.

Sekuensing gen 16S rRNA

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR dan terdeteksi dari hasil visualisasi DNA menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Hasil PCR dan primer dikirim ke 1st BASE Malaysia. Hasil sekuensing DNA dibuka dengan menggunakan aplikasi Geneious kemudian dianalisis menggunakan metode BLAST melalui media online Gen Bank (NCBI), untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies bakteri resisten merkuri.

Uji Daya Reduksi Bakteri Resistensi Merkuri

Diambil masing-masing bakteri resisten merkuri tinggi dari media agar miring. Selanjutnya ditanam dalam media *nutrient broth* yang mengandung 400 µL HgCl₂ dan fenil merkuri dengan konsentrasi 40 mg/L. Diinkubasi pada suhu 35-36 °C selama 12 jam dan 24 jam. Pada akhir inkubasi, ditambahkan asam sulfat (H₂SO₄) pekat 2 tetes untuk membunuh bakteri. Sampel dikirim ke Balai Riset dan Standarisasi (BARISTAND), Manado untuk dianalisis kadar merkurnya dengan metode analisis CV-AAS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Uji Resistensi Bakteri Terhadap Merkuri

Sampel air diambil dari sungai di wilayah tambang emas rakyat desa Tanoyan Utara, Kecamatan Lolayan, Kabupaten Bolaang Mongondow, pada kedalaman 5 cm dari dasar sungai. Isolat ditumbuhkan pada media *nutrient broth* yang mengandung HgCl₂ dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0, 10, 20 dan 40 mg/L. Masing-masing suspensi bakteri diinokulasi ke dalam media *luria bertani* (LB) *agar plate* untuk menumbuhkan bakteri. Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan menginokulasi bakteri yang tumbuh pada media LB dengan cara digores zig-zag dan terbagi dalam tiga kuadran. Hal ini dilakukan untuk memisahkan bakteri yang satu dengan bakteri lainnya agar didapatkan isolat bakteri murni yang akan digunakan untuk pengujian selanjutnya. Dari hasil pemurnian didapatkan 2 isolat bakteri yang tumbuh pada konsentrasi 40 mg/L. Hasil isolasi bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Bentuk Koloni, Permukaan dan Warna

Kode Bakteri	Bentuk Koloni	Permukaan Koloni	Warna Koloni
1.A	Bulat	Licin	Putih Kekuningan
2.A	Bulat	Licin	Putih

Suatu bakteri digolongkan bakteri resisten merkuri apabila bakteri tersebut dapat bertahan pada konsentrasi merkuri 10 mg/L atau lebih (Anne, 2006). Bakteri yang dapat hidup atau bertahan pada kadar merkuri ≥ 20 ppm, digolongkan sebagai bakteri resisten merkuri tinggi (Rehman *et al.*, 2007). Bakteri resisten merkuri anorganik ($HgCl_2$), diuji resistensinya terhadap merkuri organik (fenil merkuri) dengan cara isolat bakteri murni ditumbuhkan pada media *nutrient broth* yang mengandung fenil merkuri dengan

konsentrasi berbeda yaitu 0, 10, 20, dan 40 mg/L dan diperoleh hasil seperti pada Tabel 2. Bakteri resisten merkuri anorganik juga resisten terhadap merkuri organik karena bakteri dapat bertahan pada konsentrasi merkuri sampai dengan 40 mg/L. Hal ini berarti bakteri tersebut memiliki gen merkuri reduktase (*merA*) dan juga organomerkuri liase (*merB*) sehingga dapat resisten baik terhadap merkuri anorganik maupun merkuri organik.

Tabel 2. Hasil Uji Resistensi Bakteri Terhadap Fenil Merkuri

Kode Bakteri	Konsentrasi Fenil Merkuri (mg/L)			
	0	10	20	40
1.A	+	+	+	+
2.A	+	+	+	+

Uji Morfologi dan Fisiologi

Uji morfologi, uji fisiologi dan uji biokimia merupakan kriteria efektif untuk mengidentifikasi bakteri. Pengenalan bentuk mikroba (morfologi), harus dilakukan pewarnaan Gram terlebih dahulu agar dapat diamati dengan jelas. Tujuan dari pewarnaan Gram ialah untuk mempermudah pengamatan bentuk sel bakteri, memperluas ukuran bakteri, mengamati struktur dalam dan luar sel bakteri, dan melihat reaksi bakteri terhadap pewarna yang diberikan sehingga sifat fisik atau kimia bakteri dapat diketahui (Hadioetomo, 1990). Dalam uji pewarnaan Gram, bakteri Gram positif akan berwarna ungu disebabkan kompleks zat berwarna kristal violet tetap terikat pada dinding sel bakteri meskipun diberi

alkohol, sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena kompleks tersebut larut sewaktu pemberian alkohol dan kemudian menyerap zat warna safranin yang berwarna merah. Perbedaan hasil pewarnaan ini disebabkan karena adanya perbedaan struktur dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipida yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri Gram positif sehingga lipida ini akan larut dalam alkohol, jadi pori-pori dinding sel membesar dan meningkatkan daya larut kompleks kristal violet pada bakteri Gram negatif (MacFaddin, 2000), dalam penelitian ini ditemukan bakteri dengan Gram negatif. Bakteri terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu bentuk bulat atau kokus, bentuk batang atau basil, dan

bentuk spiral (Dwidjoseputro, 1985), dalam penelitian ini ditemukan 1 bentuk bakteri yaitu bentuk batang atau basil.

Hasil uji morfologi dan uji fisiologi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Morfologi dan Uji Fisiologi

Kode Isolat	Uji Morfologi		Uji Fisiologi
	Pewarnaan Gram		Uji Motilitas (+)/(-)
	Bentuk	Gram (+)/(-)	
1.A	Basil	-	-
2.A	Basil	-	-

Data uji biokimia, uji morfologi dan uji fisiologi yang diperoleh dibandingkan dengan buku *Bergey's*

Manual Determinative of Bacteriology. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Biokimia

Kode Isolat	Uji Biokimia						Uji Katalase	
	Uji H ₂ S	Uji Fermentasi Karbohidrat			Uji Sitrat	Uji Lisin		Uji Indol
		Glu	Lak	Gas				
1.A	+	-	-	-	+	+	-	-
2.A	+	-	-	-	+	+	-	-

Dari Tabel 3. dan Tabel 4. Isolat bakteri 1. A dan 2. A menunjukkan bakteri yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp.,

Escherichia coli, *Salmonella* dan *Citrobacter* termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* (Carrol *et al.*, 2004; Harti, 2012). Bakteri yang teridentifikasi dapat dilihat dalam Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Identifikasi Bakteri Secara Mikrobiologi

Kode Bakteri	Famili
1.A	<i>Enterobacteriaceae</i>
2.A	<i>Enterobacteriaceae</i>

Identifikasi Bakteri dengan Gen 16S rRNA

Berdasarkan identifikasi secara mikrobiologi, isolat 1.A dan 2.A termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Oleh sebab itu, dipilih salah satu dari kedua isolat tersebut dan yang dipilih untuk identifikasi bakteri dengan menggunakan gen 16S rRNA adalah isolat 1. A.

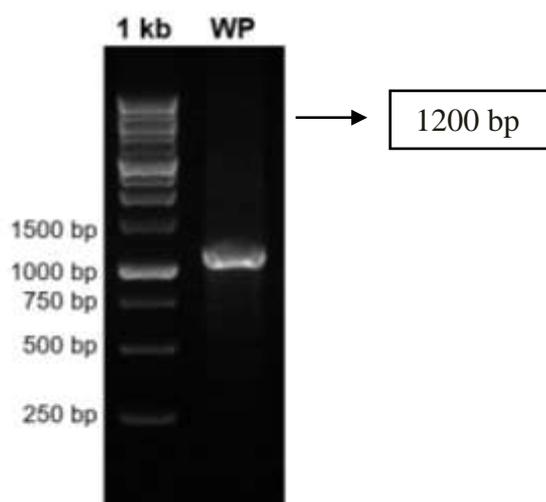
Identifikasi bakteri dilakukan dengan mengekstraksi DNA bakteri dengan metode *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid) yang telah dimodifikasi.

Hasil ekstraksi DNA bakteri dianalisis dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer BKXF (*forward*) 5'-

GCYTAAYACATGCAAGTCG-3' dan BKXR (reverse) 5'-TTGACGTCATCCCCACCTTCC-3' yang dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA sepanjang 1200 bp (Kolondam in Press).

DNA yang telah teramplifikasi kemudian dielektroforesis dengan gel agarose 1% dan divisualisasi dengan sinar UV, terlihat pada Gambar 1. Proses

elektroforesis merupakan uji kualitatif untuk mengukur konsentrasi DNA yang diperoleh. Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen DNA standar (marka DNA) (Rahayu dan Nugroho, 2015). Hasil menunjukkan adanya pita gen 16S rRNA pada 1200 bp.



Gambar 1. Elektroforegram Fragmen Gen 16S rRNA Hasil Amplifikasi DNA dengan PCR.

Untuk melihat spesies bakteri, maka dilakukan proses sekuensing. Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi yang teramplifikasi dalam proses PCR. Proses sekuensing dilakukan dengan mengirim hasil PCR dan primer ke 1st BASE Malaysia. Data hasil sekuensing dibuka dengan menggunakan aplikasi Geneious. Tampilan pick kromatogram yang diperoleh dari hasil sekuensing memperlihatkan urutan basa nukleotida dari produk PCR. Kualitas kromatogram diperlihatkan oleh tingginya peak

kromatogram. Semakin tinggi peak maka semakin baik kualitas kromatogram.

Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian disalin untuk diproses dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang diakses secara online melalui: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasil BLAST menunjukkan kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat yang diperoleh dengan urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang ada pada Gen Bank yaitu mempunyai kesamaan 99% dengan *Proteus mirabilis* dan secara filogenetik paling dekat dengan spesies bakteri tersebut. Bakteri ini berbentuk batang atau basil dan merupakan bakteri

Gram negatif yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Hasil identifikasi ini sesuai dengan hasil identifikasi yang dilakukan secara mikrobiologi. Bakteri ini dapat ditemukan bebas di air atau tanah. Berdasarkan penelitian Utari *et al.* (2015)

bakteri *Proteus mirabilis* berhasil diisolasi dari tanah pada industri tekstil dan bakteri tersebut berperan dalam pengolahan air limbah. Hasil BLAST ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Spesies Bakteri yang Diperoleh dari Identifikasi dengan Gen 16S rRNA

Kode Isolat Bakteri	Deskripsi Spesies	Max. Identity	Query Cover
1.A	<i>Proteus mirabilis</i>	99%	100%

Analisis Daya Reduksi Bakteri Resisten Merkuri

Menurut Vetriani *et al.* (2004), bakteri resisten merkuri tinggi mengandung operon *mer* yang menyandi flavoenzim, merkuri reduktase (*merA*) yang dapat mereduksi ion Hg^{2+} menjadi Hg^0 yang kurang toksik. Selain memiliki merkuri reduktase (*merA*), beberapa bakteri resisten merkuri tinggi juga memiliki organomercuri liase (*merB*) yang dapat mengaktalisis pemutusan ikatan merkuri-karbon sehingga dihasilkan senyawa organik dan ion Hg^{2+} (Osborn *et al.*, 1997). Pada penelitian ini telah dilakukan uji daya reduksi bakteri resisten

merkuri tinggi yaitu isolat 1.A. Kultur bakteri ditumbuhkan pada media *nutrient broth* (NB) yang mengandung $HgCl_2$ dan fenil merkuri masing-masing 400 μL dengan konsentrasi 40 mg/L selama 0 jam, 12 jam dan 24 jam. Sampel dikirim ke Balai Riset dan Standarisasi (BARISTAND), Manado untuk dianalisis kadar merkurnya dengan metode analisis CV-AAS.

Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat bakteri resisten merkuri anorganik dan organik 1.A dapat menurunkan kadar Hg dalam waktu 12 dan 24 jam. Hasil analisis daya reduksi merkuri dapat dilihat pada Tabel 7. dan Tabel 8.

Tabel 7. Hasil Analisis Kadar Merkuri dalam $HgCl_2$ dengan Metode CV-AAS

Perlakuan	Kadar Hg dalam $HgCl_2$ (mg/L)					
	0 jam	%	12 jam	%	24 jam	%
Kontrol Media NB	0	0	0	0	0	0
Isolat 1.A	40	100	30,92	77,3	19,12	47,8

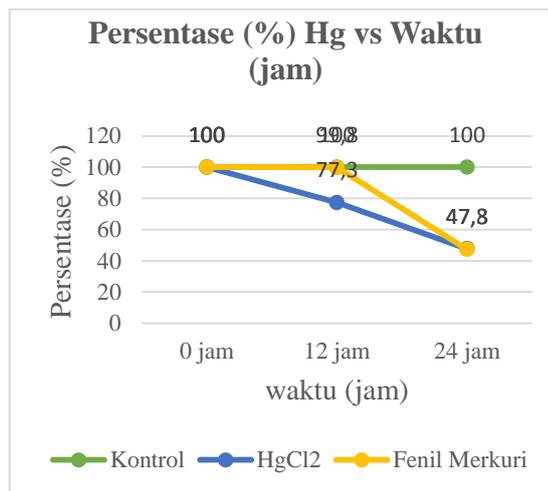
Tabel 8. Hasil Analisis Kadar Merkuri dalam Fenil Merkuri dengan Metode CV-AAS

Perlakuan	Kadar Hg dalam Fenil Merkuri (mg/L)					
	0 jam	%	12 jam	%	24 jam	%
Kontrol Media NB	0	0	0	0	0	0
Isolat 1.A	40	100	39,92	99,8	18,93	47,3

Hasil analisis pada Tabel 7., Tabel 8. dan Gambar 2. menunjukkan bahwa isolat bakteri resisten merkuri dapat menurunkan kadar merkuri dalam merkuri anorganik dan organik dalam waktu 12 dan 24 jam. Persentase merkuri anorganik (HgCl_2) yang tersisa untuk 12 jam dan 24 jam berturut-turut yaitu 77,3% dan 47,8% jadi isolat bakteri resisten merkuri dapat menurunkan kadar merkuri sebesar 22,7% dan 52,2%, sedangkan, persentase merkuri organik (fenil merkuri) yang tersisa untuk 12 jam dan 24 jam berturut-turut yaitu 99,8% dan 47,3% jadi isolat bakteri resisten merkuri dapat menurunkan kadar merkuri sebesar 0,2% dan 52,7%. Pada penelitian ini, penurunan kadar HgCl_2 lebih cepat dibandingkan dengan fenil merkuri. Hal ini disebabkan karena pada merkuri anorganik (HgCl_2) merA yang bertindak sebagai gen merkuri reduktase dengan cepat mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 , sedangkan pada merkuri organik (fenil merkuri), merB terlebih dahulu akan mengkatalisis pemutusan ikatan Hg-C sehingga dihasilkan senyawa organik dan ion Hg^{2+} . Hg^{2+} tersebut akan direduksi oleh gen merA menjadi bentuk yang kurang toksik dan mudah menguap (Osborn *et al.*, 1997).

Tingkat resistensi bakteri ini lebih tinggi daripada yang ditemukan oleh Amelia *et al.* (2016), yang menemukan 1 isolat bakteri resisten merkuri yaitu bakteri spesies *Bacillus subtilis* dari air

sungai Musi. Bakteri ini hanya dapat hidup pada HgCl_2 dengan konsentrasi 0,2 mg/L. Selain itu, Fatimawali *et al.* (2011) yang mengisolasi bakteri *Klebsiella pneumonia* dari air sungai Sario, yang dapat tumbuh pada HgCl_2 dengan konsentrasi 20 mg/L. Perbedaan resistensi ini juga berhubungan dengan mekanisme respon terhadap merkuri. Terdapat 3 mekanisme respon terhadap merkuri yaitu pertama, dengan cara menghambat metabolisme sel sehingga pertumbuhan sel lambat atau sel mati. Kedua, menginduksi sistem operon resisten merkuri untuk bekerja sehingga sel tetap hidup walau dalam kondisi stres. Ketiga, adanya plasmid yang mengandung gen resisten merkuri yang masuk ke dalam sel. Isolat bakteri yang dapat hidup pada media dengan kadar merkuri 10 mg/L, 20 mg/L dan 40 mg/L kemungkinan menggunakan mekanisme respon yang kedua bahkan yang ketiga sehingga bakteri dapat hidup pada media dengan kadar merkuri yang tinggi. Selain itu, faktor lain yang berpengaruh terhadap penurunan konsentrasi merkuri dalam kultur yaitu perbedaan jumlah sel bakteri yang tumbuh dalam media, perbedaan jumlah sel ini dapat disebabkan karena adanya perbedaan kondisi pertumbuhan optimum seperti pH dan suhu dari setiap jenis bakteri (Smit *et al.*, 2004 dalam Fatimawali, 2016).



Gambar 2. Grafik Hubungan konsentrasi Hg dalam media vs waktu.

Bakteri resisten merkuri sejauh ini telah digunakan untuk bioremediasi. Sistem detoksifikasi bakteri resisten merkuri terhadap merkuri sangat efektif pada limbah kloalkil dan tingkat penghilangan merkuri dapat mencapai 98% (Canstein *et al.*, 2002). Isolat bakteri resisten merkuri yang diperoleh pada penelitian ini dapat digunakan untuk detoksifikasi merkuri karena walaupun kurang cepat dalam merespon penurunan merkuri tetapi dalam waktu 24 jam lebih dari 50% merkuri hilang dari media.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa diperoleh 2 isolat bakteri resisten merkuri yaitu isolat 1.A dan 2.A yang diisolasi dari air sungai di wilayah tambang emas rakyat desa Tanoyan Utara. Berdasarkan hasil identifikasi secara mikrobiologi bakteri resisten merkuri isolat 1.A dan 2.A termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* dan berdasarkan analisis gen 16S rRNA, bakteri resisten merkuri isolat 1.A adalah bakteri spesies *Proteus mirabilis*. Bakteri spesies *Proteus mirabilis* dapat mereduksi HgCl₂ sebanyak 22,7% dalam waktu 12 jam, 52,2% dalam waktu 24 jam, dan dapat mereduksi fenil merkuri sebanyak

0,2% dalam waktu 12 jam, 52,7% dalam waktu 24 jam. Bakteri yang teridentifikasi dapat digunakan untuk detoksifikasi merkuri sehingga dapat mengurangi efek berbahaya yang ditimbulkan oleh merkuri pada air sekitar pertambangan.

SARAN

Dengan hasil penelitian ini perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk analisis gen yang bertanggungjawab terhadap reduksi merkuri yaitu gen *merA* dan *merB* untuk mendapatkan enzim yang dapat digunakan dalam proses detoksifikasi merkuri.

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, T. F., Ace, B., Herpandi. 2016. Aktivitas Reduksi Merkuri pada Bakteri yang Diisolasi dari Air dan Sedimen di Sungai Musi. *Jurnal Teknologi Hasil perikanan*. **5(1)**:94-106.
- Anne, O. 2006. *Interaction of Human Commensal Bacteria with Amalgam-Derived Mercury: The Science and Its Implications for Infectious Disease and Neurotoxicology*. Georgia University, Athens (GA).

- Canstein, V. H., Li, Y., Leonhauser J., Haase E., Felske A., Deckwer W. D. and Wagner-Dobler. 2002. Spatially Oscillating Activity and Microbial Succession of Mercury-Reducing Biofilms in a Technical-Scale Bioremediation System. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(4)**: 1938-1946.
- Carrol, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. 2004. *Jawetz, E., Melnick & Adelberg's Medical Microbiology 24th edition.* Mc. Graw-Hill Medical, USA.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17(4)**: 840-862.
- Dwidjoseputro, D. 1985. *Pengantar Fisiologi Tumbuhan.* Gramedia, Jakarta.
- Fatimawali, Fatmawaty B., dan Irawan Y. 2011. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri dari Muara Sungai Sario yang Dapat Digunakan Untuk Detoksifikasi Limbah Merkuri. *Jurnal Ilmiah Sains.* **11(2)**: 282-288.
- Fatimawali. 2016. *Buku Ajar Toksikologi: Detoksifikasi Merkuri.* Unsrat Press, Manado.
- Fatimawali, Billy K., Trina T. 2017. Overproduction of Mercuric Reductase Protein Expressed by Synthetic merA gene and reduction of inorganic mercury HgCl₂. *Bioscience Research.* **14(4)**: 1253-1260.
- Hadioetomo. 1990. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek.* PT. Gramedia, Jakarta.
- Harti, A. S. 2012. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Kesehatan.* Nuha Medika, Yogyakarta.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and William, S.T. 1994. *Bergey'S Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition.* William and Wilkins, Baltimore.
- Kristianingrum, S. 2009. *Kajian Berbagai Proses Destruksi Sampel dan Efeknya.* Jurnal Pendidikan dan Penerapan MIPA Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- MacFaddin, F. J. 2000. *Biochemical Test for Identifications of Medical Bacteria, Williams and Wilkins (eds.).* Baltimore, 2nd edition. Pp. 527.
- Osborn, A. M., Bruce, K. D., Strike, P and Ritchie, D. A. 1997. Distribution, Diversity and Evolution of the Bacterial Mercury Resistance (mer) operon. *FEMS Microbiol. Rev.* **19(4)**: 239-262.
- Pratiwi, Arena Yogi. 2012. *Penapisan Bakteri Resisten Terhadap Merkuri Sebagai Agen Bioremediasi Pada Pencemaran Tanah Pertambangan [Skripsi].* IPB, Bogor.
- Rahayu, D. A., dan Nugroho, E. D. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi.* Plantaxia, Yogyakarta.
- Rasmussen, L. D., C. Zawadsky, S. J., Binnerup, G. Oregaard, S. J. Sorensen, and N. Kroer. 2008. Cultivation of Hard-To-Culture Subsurface Mercury-Resistant Bacteria and Discovery of New

- merA Gene Sequences, Department of Environmental Chemistry and Microbiology, National Environmental Research Institute, University of Aarhus, Frederiksborgvej 399, 4000 Roskilde, Denmark, Institute of Biology, University of Copenhagen, Solvgade 83H, 1307 Copenhagen K, Denmark. *App. Environ. Microbiol.* **74(12)** :3795-3803.
- Rehman, A., Ashfaq, A., Bushra M., and Abdul R. S. 2007. Resistance and Biosorption of Mercury by Bacteria Isolated from Industrial Effluents. Department of Microbiology and Molecular Genetics and School of Biological Sciences, University of the Punjab, New Campus, Lahore, Pakistan. *Pakistan Journal Zoology.* **39(3)**: 137-146.
- Rychlic, W. 1995. Selection of Primer for Polymerase Chain Reaction. *Mol. biotechnol.* **3(2)**: 129-134.
- Selid, Paul D., Hanying Xu, Michael Collins, Marla Striped and Julia Z. 2009. Sensing Mercury for Biomedical and Environmental Monitoring. *Journal of Chemistry.* **9(7)**: 5446-5459.
- Utari, S. A. S. T. L., Ida, B. G. D., I Wayan, B. S. 2015. Isolation, Identification and Test Potential Bacteria That Play a Role on Waste Water Treatment Containing Rhodamin B in Plant Biosystem. *Journal Symbiosis.* **3 (1)**: 301-312.
- Vetriani, C., Y. S. Chew, S. M. Miller, J. Yagi, J. Coombs, R. A. Lutz, and T. Barkay. 2004. Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-sea Hydrothermal Vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(1)**: 220-226.