

## IDENTIFIKASI MIKROBIOLOGI DAN ANALISIS GEN 16S rRNA BAKTERI RESISTEN MERKURI ISOLAT S3.2.2 YANG DIPEROLEH DARI LIMBAH TAMBANG RAKYAT

**Fatimawali<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

### ABSTRACT

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan spesies atau genus dari kultur bakteri resisten merkuri yang telah diisolasi dari perairan tercemar merkuri. Kultur S3.2.2 yang resisten dilakukan identifikasi secara mikrobiologi yaitu uji morfologi, fisiologi dan uji biokimia, kemudian dilakukan analisis secara molekuler dengan mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR menggunakan primer universal Bact- F1 forward /Uni-B1 Reverse, hasil amplifikasi dielektroforesis dengan agarose 1,5% dan selanjutnya dilakukan sekuensing terhadap gen 16SrRNA.

Hasil identifikasi dengan uji morfologi, fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa kultur S3.2.2 adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang, nonmotil, katalase (+), sitrat (+), H<sub>2</sub>S (-), fermentase (+), indol (+) dan Lisin (+). Hasil blast terhadap urutan nukleotida gen 16S rRNA mempunyai kesamaan 99% dengan *Klebsiella pneumoniae*.

Key words : Bakteri resisten merkuri, gen 16S rRNA, limbah

### ABSTRAK

The objective of this research was to determine the species or genus of mercury resistant bacteria culture from mercury polluted waters. Microbiology identification of culture S3.2.2 was done with morphology, physiology and biochemistry test. Molecular analysis was done by amplifying 16S rRNA gene using PCR method. Universal Bact- F1 forward/Uni-B1 Reverse was using as primer. Amplification result was electrophorize with agarose 1,5%, furthermore sequencing was done against 16SrRNA gene.

The result shows that culture S3.2.2 were negative grams bacteria, rod shaped, nonmotil, catalase (+), citrat (+), H<sub>2</sub>S (-), fermentase (+), indol (+) and lisin (+). Blast analysis against nucleotide sequence of 16S rRNA gene possesses 99% similarities with *Klebsiella pneumoniae*.

Kata kunci : Bakteri resisten merkuri, gen 16S rRNA, limbah

## PENDAHULUAN

Kegiatan pertambangan melahirkan keuntungan ekonomi yang sangat besar, namun dilain pihak juga mengancam akan kelestarian lingkungan. Proses penambangan dipercayai memiliki potensi daya ubah lingkungan yang tinggi karena dianggap sebagai pengrusakan alam dan lingkungan. Indonesia merupakan salah satu negara dengan cadangan bahan tambang emas yang banyak terdapat pada batuan di gunung ataupun pasir di sungai. Kegiatan eksplorasi penambangan emas semakin banyak dilakukan baik secara perseorangan maupun berkelompok. Keberadaan bijih emas tersebut dimanfaatkan oleh masyarakat sekitarnya sebagai sumber penghasilan sehingga berkembanglah kegiatan pertambangan emas rakyat yang dikenal dengan istilah Penambangan Emas Tanpa Izin (PETI) dan paling banyak PETI ini menggunakan merkuri (Hg) sebagai media pengikat emas ( Inswiasri, 2008)

Pencemaran logam berat merkuri pada tanah dan air sangat membahayakan lingkungan dan kesehatan manusia. Senyawa merkuri dalam bentuk Hg(II) dapat terikat pada residu sistem protein/enzim manusia/binatang sehingga protein/enzim kehilangan aktivitasnya. Selain Hg(II), senyawa merkuri paling berbahaya bagi kesehatan manusia adalah senyawa organomercuri, khususnya metilmerkuri dan fenilmerkuri. Senyawa ini bersifat sangat reaktif dan mempunyai mobilitas tinggi dibanding dengan Hg(O) atau Hg(II). Hal ini disebabkan gastrointestinal manusia dapat menyerap sekitar 95% senyawa metilmerkuri, dan senyawa ini juga dapat menyerang syaraf manusia melalui peredaran darah. Pada lingkungan perairan (aquatic) atau laut (marine), senyawa metilmerkuri mengalami biomagnifications melalui jaringan makanan, khususnya untuk jaringan makanan di air.

Pada tahun 1960, pertama kali dilaporkan resistensi bakteri terhadap

senyawa merkuri dalam suatu isolasi klinis *Staphylococcus aureus*. Pada lingkungan tercemar merkuri pada umumnya dijumpai komunitas bakteri resisten merkuri sehingga resisten merkuri berjalan dengan cepat. Semua bakteri resisten merkuri yang diisolasi dari tanah maupun air tercemar merkuri memiliki mekanisme dasar biokimia detoksifikasi senyawa merkuri yang sama yaitu semuanya menghasilkan enzim merkuri reduktase. Mikroorganisme yang hidup pada daerah tercemar merkuri mempunyai peran yang sangat penting untuk detoksifikasi merkuri. Dengan adanya bakteri yang mampu hidup dalam daerah tercemar merkuri dengan jumlah yang tinggi, dapat mengatasi masalah pencemaran merkuri. Bakteri ini adalah *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus Sp*. Peran bakteri ini kemudian dimanfaatkan para ahli biomolekular untuk memadukan fungsi gen beberapa bakteri sehingga menghasilkan strain unggul yang mampu mengatasi pencemaran merkuri secara tepat dan efektif.

Sulawesi Utara memiliki beberapa lokasi yang dijadikan sebagai tambang emas yang menggunakan merkuri sebagai senyawa untuk mengekstraksi emas. Telah diperoleh kultur bakteri resisten tinggi yang diisolasi dari limbah tambang rakyat kultur S.3.2.2 oleh *Fatimawali dan Billy Kepel* (tidak dipublikasikan) . Bakteri resisten tinggi ini, diduga mempunyai gen merkuri reduktase, yang dapat dijadikan sebagai sumber enzim merkuri reduktase yang dapat digunakan untuk detoksifikasi merkuri anorganik di perairan. Dari latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui genus atau spesies dari kultur bakteri resisten merkuri dengan mendeterminasi jenis bakteri secara konvensional menggunakan *Bergey's Manual* dan mengkaraktisasinya menggunakan metode modern secara biomolekuler dengan menganalisis 16SrRNA. Mengidentifikasi secara mikrobiologi

kultur bakteri resisten merkuri S.3.2.2 dengan menggunakan uji pewarnaan gram, uji fisiologi, dan uji biokimia.

Mengidentifikasi jenis bakteri melalui analisis gen 16SrRNA dari kultur bakteri resisten merkuri S.3.2.2.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan

Bahan : aquades, alkohol, *nutrient agar*, *nutrient broth*, NaCl, *yeast* ekstrak, peptone, safranin, kristal violet, kaldu karbohidrat/*fenol red* (maltosa, glukosa, laktosa), *motility test medium*, *simon citrate agar*, *Triple Sugar Iron (TSI) agar*, MT-3 agar. Kit isolasi DNA bakteri, Primer set (untuk bakteri), Ready to Go (RTG) PCR beads untuk amplifikasi DNA, Isopropanol dan Genomicprep untuk isolasi DNA, miliQ water steril, Gel agarosa, 1x TAE buffer, loading dye, etidium bromide, alcohol 70%.

### Alat

Alat : pH meter, termometer, autoklaf, inkubator, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, erlenmeyer, gelas ukur, *beker glass*, spatula, timbangan analitik, pipet ukur, pipet tetes, kaca slide/objek, mikroskop, lampu spritus, tabung durham, tabung hush, aluminium foil, plastik wrap, mikropipet, mesin PCR, MUPID-like Electrophoresis Simple Unit, UV transiluminator, BioDoc Digital Compact, Simplicity Water Purification System, pellet pestle, tabung ependorf, sarung tangan dan hotplate.

## Prosedur Penelitian

### Identifikasi Bakteri

Pada tahap awal, dilakukan uji morfologi dan fisiologi terhadap koloni bakteri. Uji morfologi dilakukan dengan pewarnaan gram, sedangkan uji fisiologi dilakukan untuk menentukan ada tidaknya pergerakan (motilitas) bakteri menggunakan media semi padat (Holt et. al., 1994). Selanjutnya dilakukan tes

biokimia meliputi tes katalase, uji fermentasi karbohidrat, sitrat, uji H<sub>2</sub>S, uji indol dan uji lisin.

### Isolasi DNA Genomik

Isolasi DNA Genomik dari kultur bakteri: kultur S.3.2.2 dilakukan dengan metode *Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Larutan DNA genom disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya digunakan pada tahap amplifikasi gen 16SrRNA.

### Amplifikasi 16SrRNA dengan Teknik PCR

Templat yang digunakan untuk amplifikasi gen 16SrRNA adalah DNA genomik dari kelima koloni bakteri. Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan dengan variasi komposisi reagen dan kondisi reaksi PCR seperti dibawah ini.

### Elektroforesis dan Visualisasi

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

### Sekuensing

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 dikirim ke Macrogen Korea..

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Hasil Uji morfologi dan Fisiologi Bakteri

Hasil pewarnaan gram dari kultur S3.2.2 yang diperiksa dengan mikroskop, menunjukkan sel bakteri berwarna ungu menunjukkan bahwa gram negative, berbentuk batang dan tidak ada pergerakan, ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Isolasi, Uji Morfologi dan Fisiologi Bakteri**

| Kode isolat | Uji morfologi  |            | Uji fisiologi |
|-------------|----------------|------------|---------------|
|             | Pewarnaan gram | Bentuk sel | Motilitas     |
| S3.2.2      | Negatif        | Batang     | Nonmotil      |

**Hasil Uji Biokimia dan Identifikasi Jenis Bakteri**

Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa pada uji fermentasi KH uji glukosa, laktosa dan maltosa semua isolat

menghasilkan gas-asam, positif pada uji pembentukan indole, uji sitrat negative, uji pembentukan H<sub>2</sub>S negative, katalase positif, dan uji lysine positif, ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Uji Biokimia dan Identifikasi bakteri**

| Kode Isolat | Uji Biokimia  |     |     |             |            |                  |                |              |           | Identifikasi Jenis           |
|-------------|---------------|-----|-----|-------------|------------|------------------|----------------|--------------|-----------|------------------------------|
|             | Fermentasi KH |     |     | Pemb. Indol | Uji sitrat | H <sub>2</sub> S | Uji Fermentasi | Uji Katalase | Uji Lysin |                              |
|             | Glu           | Lak | Mal |             |            |                  |                |              |           |                              |
| S.3.2.2     | AG            | AG  | AG  | +           | +          | -                | +              | +            | +         | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |

Keterangan : A = positif asam      AG = positif asam dan gas

Identifikasi spesies dari kultur bakteri dilakukan dengan cara mencocokkan hasil uji morfologi, uji fisiologi dan uji biokimia dengan tabel uji morfologi, uji fisiologi dan uji biokimia spesies yang terdapat pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hasil menunjukkan bahwa kultur bakteri S.3.2.2 adalah jenis *Klebsiella pneumoniae*.

**Amplifikasi Gen 16S rRNA**

DNA genomik yang telah diisolasi dan diekstraksi dari isolat S3.2.2 kemudian dianalisis dengan metode PCR untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA

menggunakan primer universal untuk gen 16S rRNA Bact-F1: 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' /Uni-B1 5'GGTTACSTTGTTACGACTT3' (Eurogentec AIT) yang dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA sepanjang 1500 bp. Hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarose 1% dan divisualisasi dengan sinar UV.

Untuk melihat spesies bakteri, maka hasil amplifikasi dilakukan proses sekuensing. Urutan nukleotida hasil sekuensing ditunjukkan pada Gambar 1.

CCATGCAGTCGAGCGGTA<sub>g</sub>CaCaGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGC  
 GGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA  
 CTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA<sub>t</sub>AATGTTCG<sub>Ca</sub>GACCAAAGTGGGGGAC  
 CTTTCGGGCCTC<sub>a</sub>TGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT<sub>a</sub>GGTG  
 GGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC  
 CAGCCACACTGGA<sub>ACT</sub>GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
 GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG  
 TGTGAAGAACGCCTTCGGGTTGTAAAGCA<sub>c</sub>TTTCAGCGGGGAGGAAGGCG  
 TTAAGGTTAATAACCT<sub>t</sub>G<sub>g</sub>CGATTGACGTTACCCGCAGAA<sub>g</sub>AAGCACCGGC  
 TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG  
 GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGA  
 AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAAGGCTAGAG  
 TC<sub>t</sub>TGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
 TCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG  
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTC  
 CACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT  
 CCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT  
 AAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG  
 TTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGA  
 ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGC  
 ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG  
 AGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGG  
 AGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC  
 ATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAG  
 AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTTCGTAGTCC  
 GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG  
 TAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC  
 CGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCG  
 GGAGGGCGT

**Gambar 1. Hasil Sekuensing rangkaian gen 16S rRNA isolat S3.2.2**

Hasil sekuensing ini menghasilkan urutan nukleotida gen 16S rRNA. Terhadap urutan nukleotida gen 16S rRNA diBlast secara online melalui : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . Hasil blast menunjukkan kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat yang diperoleh dengan urutan nukleotida gen

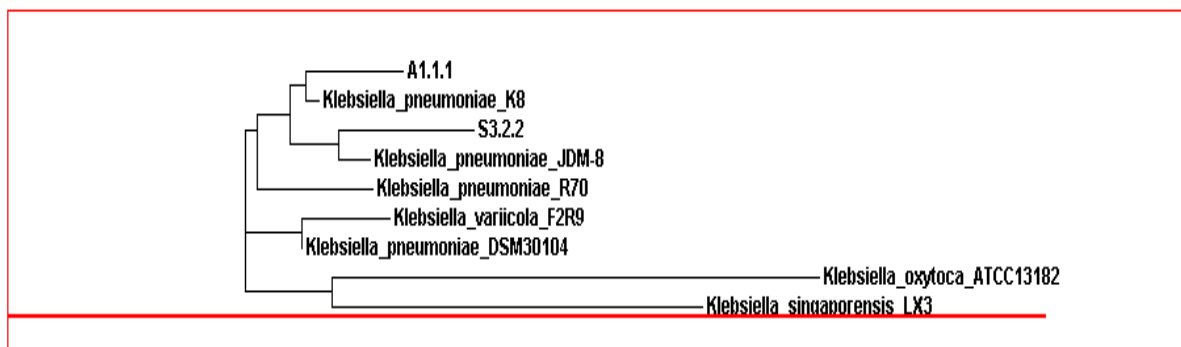
16S rRNA bakteri yang ada pada GenBank. Hasil blast ditunjukkan pada tabel 3. Selanjutnya untuk melihat hubungan kekerabatan tiap-tiap isolat dengan beberapa bakteri yang mempunyai kesamaan gen 16S rRNA 99%, maka dilakukan pensejajaran secara on line melalui <http://expasy.org/tools/>

Tabel 3. Hasil Blast Gen 16S rRNA Isolat Bakteri.

| No. | Isolat bakteri | Deskripsi spesies                        | Max. identity | % Coverage |
|-----|----------------|--|---------------|------------|
| 1.  | S3.2.2         | <i>Klebsiella pneumoniae</i> galur JDM-8 | 99%           | 99         |

Hasil analisis gen 16S rRNA isolat S3.2.2 pada gambar 2 mempunyai kesamaan 99% dengan *Klebsiella pneumoniae*. Pohon filogenik yang menggambarkan hubungan kekerabatan

S3.2.2 dengan *Klebsiella* lain yang ada pada GenBank, ditunjukkan pada Gambar 2. Terlihat bahwa isolat S3.2.2 berkerabat dekat dengan *Klebsiella pneumoniae* galur JDM 8.



**Gambar 2. Pohon Filogenik Hasil Penjajaran 16S rRNA kultur S3.2.2**

Dari hasil analisis gen 16S rRNA menunjukkan hasil yang sama dengan hasil analisis secara mikrobiologi yaitu *Klebsiella pneumoniae*. Hasil ini menunjukkan kesamaan kedua metode, baik secara mikrobiologi, maupun dengan analisis gen 16S rRNA. Dengan demikian bakteri resisten merkuri anorganik HgCl<sub>2</sub> yang diperoleh dari limbah tambang rakyat

di Sulawesi Utara adalah jenis bakteri gram negative, *Klebsiella pneumoniae*. Bakteri ini kemungkinan mengandung gen *merA* yang mengkode protein MerA yang dapat digunakan untuk remediasi merkuri anorganik pada limbah atau perairan tercemar merkuri anorganik.

## PENUTUP

### Kesimpulan

Bakteri resisten merkuri anorganik yang diisolasi dari limbah tambang rakyat di Sulawesi Utara Kultur S3.2.2., merupakan bakteri jenis *Klebsiella pneumoniae*.

## DAFTAR PUSTAKA

Abdul Rehman, Ashfaq Ali, Bushra Muneer and Abdul Rauf Shakoori, 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.

Alexandre J. Poulain, Sinead M. Ni Chadhain, Parisa A Ariya, marc Amyot, Edenise Garcia, Peter G. C. Campbell, Gerben J. Zylstra, and tamar Barkay, 2007, Potential for Mercury Reduction by Microbes in the High Arctic, Applied and environmental Microbiology, American Society for Microbiology.

Fatimawali dan Billy Kepel, 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri resisten merkuri pada sediment tanah buangan limbah pertambangan emas rakyat di Tanoyan, Bolaang Mongondow. FK-Unsrat : Hasil penelitian, belum dipublikasikan.

Inswiasri. (2008), "Paradigma Kejadian Penyakit Pajanan Merkuri (Hg)," *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 7(2): 775-778.

- 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: 239-262.
- Perisa Keramati, Mehran Hoodaji and Arezoo Tahmourespour, 2011, Multi-metal Resistance Study of bacteria Highly resistant to Mercury Isolated from Dental Clinic Effluent, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(7) pp.831-837.
- Rasmussen L. D., Zawadsky C., Binnerup S. J., Oregaard G., Serensen S. J., and Kroer N., 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, Denmark, *Applied and Environmental Microbiology*.
- Simon Silver and Le T. Phung, 1996, Bacterial Heavy Metal Resistance : New Surprises, *Annual Review of Microbiology*.
- Sinead M. Ni Chadhain, Jeffra K. Schaefer, Sharron Crane, Gerben J. Zylstra and tamar Barkay, 2006, Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment, Department of Biochemistry and Microbiology, Biotechnology Centre for Agriculture and the Environment, Rutgers University, New Brunswick, NJ 08901, USA, *Environmental Microbiology*.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846-849.
- Tamar Barkay and Irene Wagner-Dobler, 2005, Microbial Transformation of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment, department of Biochemistry and Microbiology Cook College, Rutgers University New Brunswick, New Jersey 08901. *Advances in Applied Microbiology*.
- Tamar Barkay, Susan M. Miller, Anne O. Summers, 2003, Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems, Department of Biochemistry and Microbiology, Cook College, Rutgers University, New Brunswick, USA, *FEMS Microbiology Reviews*, Elsevier.
- Tomonobu Kusano, Guangyong Ji, Chihiro Inoue, and Simon Silver, 1990, Constitutive Synthesis of a Transport Function Encoded by the *Thiobacillus ferrooxidans merC* gene Cloned in *Escherichia coli*.
- World Health Organization (1976); *Environmental Health Criteria* 1, Mercury.
- Xianzhen Li, Daohai Zhang, Feng Chen, Jie Ma, Yihu Dong and Lianhui Zhang, 2004, *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium, *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, American Society for Microbiology.
- Zeroual Y., Moutaouakkil A., Dzairi F. Z., Talbi M., Chung P.U., Lee K., Blaghen M., 2003, Purification and Characterization of Cytosolic mercuric reductase from *Klebsiella pneumoniae*, laboratory of Microbiology, Biotechnology, and Environment, Faculty of Sciences University Hassan II Marocco. *Annals of Microbiology*.