



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

Analysis of 16SrRNA Gene and Mercury Reduction Ability of Mercury Resistant Bacteria Isolated from Feces of Patient with Mercury Amalgam at Puskesmas Bahu in Manado

Billy Kepel¹, Fatimawali²

Faculty of Medicine, University of Sam Ratulangi, Manado

KATA KUNCI *Bakteri resisten merkuri; Gen 16SrRNA; reduksi merkuri; CV-AAS*

KEYWORDS *Mercury resistant bacteria; 16SrRNA gene; Mercury reduction; CV-AAS*

ABSTRAK *Paparan merkuri secara kontinyu dalam saluran pencernaan, dapat menyebabkan kresistensi bakteri terhadap merkuri. Bakteri resisten merkuri bermanfaat pada proses detoksifikasi merkuri anorganik dengan mereduksinya menjadi logam merkuri yang tidak toksik. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis gen 16SrRNA dan menguji daya reduksinya terhadap merkuri HgCl₂ dari bakteri resisten merkuri anorganik Isolat F2.1 dan F2.2 yang diisolasi dari feses pasien dengan tambalan amalgam gigi di Puskesmas Bahu Manado. Analisis Gen 16SrRNA menggunakan metode Polymerase chain reaction (PCR) dan kadar merkuri dianalisis dengan menggunakan metode Cold-Vapor Atomic Absorption Spectrophotometry (CV-AAS). Hasil BLAST urutan nukleotida gen 16SrRNA menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri tersebut mempunyai kemiripan 100% terhadap gen 16SrRNA bakteri Escherichia coli yang terdapat pada GenBank. Hasil analisis daya reduksi merkuri diperoleh bahwa dalam waktu 1, 12, dan 24 jam dapat menurunkan kadar merkuri dalam media berturut-turut untuk isolat F2.1: 82,2%, 87,1% dan 99,2% dan untuk isolat F2.2: 79,5%, 89,2% dan 99,3%.*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri isolat F2.1 dan F2.2 yang diisolasi dari feses ialah bakteri Escherichia coli dan dapat mereduksikan HgCl₂ hampir 100% dalam waktu 24 jam sehingga bakteri tersebut dapat digunakan pada penelitian

selanjutnya untuk proses detoksifikasi merkuri anorganik.

ABSTRACT

Continuous exposure to mercury in the digestive tract, can cause mercury-resistance bacteria. Mercury resistance bacteria are useful in detoxifying processes of inorganic mercury to the reduct form of non toxic metallic mercury.

This study aims to analyze 16SrRNA gene and test for mercury reduction ability of inorganic mercury resistant bacteria isolates F2.1 and F2.2, isolated from feces of patients with tooth amalgam at Puskesmas Bahu in Manado. 16SrRNA gene analysis was done using polymerase chain reaction (PCR) and mercury levels were analyzed by using the method of Cold - Vapor Atomic Absorption Spectrophotometry (CV - AAS). BLAST results of nucleotide sequence of 16SrRNA gene showed that both the bacterial isolates had 100% similarity to the 16SrRNA gene of Escherichia coli bacteria found in GenBank. The results of the analysis showed that the reduction ability of mercury in 1, 12, and 24 hours can reduce levels of mercury in a row for a media F2.1 isolates: 82.2%, 87.1% and 99.2% and for isolates F2.2: 79.5%, 89.2% and 99.3%. The results showed that the bacterial isolates F2.1 and F2.2 isolated from fecal is Escherichia coli bacteria and may reduce the HgCl₂ almost 100% within 24 hours so that the bacteria can be used in future studies to inorganic mercury detoxification process.

Puskesmas Bahu merupakan Puskesmas yang memiliki layanan klinik gigi dimana penambalan amalgam masih dilakukan, walaupun dari data beberapa bulan terakhir jumlah pasien penambalan gigi lebih berkurang, akan tetapi pasien yang datang untuk melakukan kontrol gigi dengan tambalan amalgam lebih banyak.

Logam merkuri yang merupakan kandungan utama amalgam tidak larut dalam air, akan tetapi bakteri dalam mulut dapat mengubah logam merkuri menjadi ion Hg²⁺ yang larut dalam air. Ion merkuri (Hg²⁺) yang terlepas dari amalgam bisa terekspos ke dalam cairan mulut, kemudian masuk kedalam saluran pencernaan dan diekskresikan melalui feses. Bakteri

normal saluran pencernaan pada pasien dengan tambalan amalgam tentunya mengalami paparan terus menerus dari merkuri yang berasal dari amalgam, sehingga diasumsikan bahwa bakteri tersebut bersifat resistens terhadap merkuri.

Bakteri resisten merkuri berperan utama dalam detoksifikasi merkuri, oleh karena itu usaha untuk detoksifikasi merkuri dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri resisten merkuri ini.

Correspondence:

Dr. Dra. Fatimawali, M.Si., Apt., Faculty of Medicine, University of Sam Ratulangi, Manado, Jalan Kampus Unsrat Kleak Manado 95115, Tel./Fax (0431)-853715 E-mail: fatimawali_umar@yahoo.com, fatimawali12@gmail.com

Detoksifikasi merkuri oleh bakteri resisten merkuri dapat terjadi, karena bakteri tersebut memiliki gen resisten merkuri, operon *mer* dimana struktur operon *mer* berbeda untuk setiap jenis bakteri (Silver and Phung, 1998). Gen resisten merkuri sering ditemukan dalam plasmid atau transposon (Ravel *et al.*, 2000; Nascimento and Chartone-Souza, 2003). Mekanisme detoksifikasi ion merkuri oleh prokariotik berlangsung dengan mereduksi ion merkuri Hg²⁺ menjadi logam merkuri Hg⁰ yang sangat volatil, dan keluar sel dengan berdifusi lewat membran sel. Proses ini dimediasi secara intrasel oleh protein merkuri reduktase (MerA). Ion merkuri yang ditranspor dari luar sel oleh protein pentranspor merkuri MerP atau merC (Iohara *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2005) merupakan protein ekstrasel yang mengikat ion merkuri. Di dalam sel, ion Hg²⁺ akan terikat melalui proses reaksi pertukaran ligan menuju sisi aktif flavin disulfida oksido-reduktase dari merkuri reduktase MerA (Ravel *et al.*, 2000). Gen *merA* yang menyandi protein MerA mengkatalisis reduksi Hg²⁺ menjadi Hg⁰ yang volatil dan sedikit reaktif (Nascimento and Chartone-Souza, 2003).

Spesies bakteri resisten merkuri telah banyak dipelajari, gen 16SrRNA 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 (Janda and Abbot, 2007).

Data urutan basa gen penyandi 16SrRNA memungkinkan digunakan untuk mengkonstruksi pohon

filogenetik yang dapat menunjukkan nenek moyang dan hubungan kekerabatan organisme. Organisme yang sekerabat atau identik berdasarkan parameter ini belum tentu memiliki kesamaan secara fisiologi (Hackl *et al.*, 2004). Hal ini disebabkan karena gen penyandi 16SrRNA bukan merupakan suatu gen fungsional untuk kelangsungan hidup dan adaptasi prokariota pada lingkungan tertentu (Jill, 2004).

Dewasa ini, salah satu metode analisis merkuri yang telah banyak dilakukan oleh para peneliti yaitu metode CV-AAS atau disebut juga metode pembentukan uap dingin. Metode CV-AAS ini hanya dapat digunakan khusus untuk atomisasi merkuri dan mempunyai keunggulan dalam hal selektivitas dan sensitivitas yang cukup baik untuk analisis merkuri total dalam sampel (Suheryanto, 2001).

Pada penelitian Fatimawali *et al.*, 2013, telah ditemukan dua isolat bakteri F2.1 dan F2.2 dari feses pasien dengan tambalan amalgam gigi yang tahan hidup dalam media nutrient broth dengan kandungan HgCl₂ 40 ppm, oleh karena itu dapat dikatakan bahwa kedua isolat bakteri tersebut adalah bakteri resisten merkuri. Bakteri yang telah diketahui spesies dan daya reduksinya, dapat digunakan untuk penelitian lanjutan terhadap gen merkuri reduktase. Gen merkuri reduktase ini dapat diklon untuk memperoleh enzim merkuri reduktase rekombinan yang dapat dijadikan sebagai bahan untuk detoksifikasi merkuri anorganik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis bakteri resisten merkuri isolat F2.1 dan isolat F2.2 melalui analisis gen 16SrRNA dan untuk mengetahui

kemampuan detoksifikasinya terhadap merkuri anorganik melalui analisis daya reduksinya terhadap HgCl₂ menggunakan metode CV-AAS.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian

Kit Ekstraksi Wizard Genomic DNA (Promega): EDTA, *Lytic enzyme*, Larutan *nuclei lysis*, Larutan RNAase, Larutan protein precipitation, isopropanol, etanol 70%, Larutan *DNA-rehydration*.

Primer Bact-F1. 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'/Uni-B1.5'GGTTACSTTGTTACGACTT3' (Eurogentec AIT), agarose (Vivantis), Etidium bromida, *loading dye* (Vivantis), marker (Vivantis), dan HgCl₂.

Isolasi DNA Genomik

Isolasi DNA Genomik dilakukan sesuai dengan metode Wizard Genomic DNA (Promega). Sampel kultur bakteri diambil 1 ose ditambah 1 ml aquades steril dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml, dibiarkan semalam. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, supernatant dibuang ke dalam tabung, ditambahkan 600 µl larutan lisis *nuclei*, dikocok dengan pipet agar sel-sel tersuspensi. Sampel diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit supaya sel menjadi lisis. Kemudian tabung dibolak-balik supaya tercampur. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, didinginkan pada suhu kamar ke dalam sampel ditambahkan 200 µl larutan protein presipitat, divortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik untuk mencampur protein presipitat dengan lisat sel. Sampel diinkubasi selama 5 menit, disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke

dalam tabung mikrosentrifuga. Kemudian pada sampel ditambahkan 600 µl isopropanol, dicampur dengan membolak-balik tabung. Sampel disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit, supernatant dibuang dan tabung dikeringkan dengan membalikkan di atas kertas tissue. Selanjutnya pada sampel ditambahkan 600 µl etanol 70% dan dikocok dengan membolak-balikkan tabung beberapa kali untuk mencuci DNA. Sampel disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit, isi tabung dituang dan dikeringkan di atas kertas tissue, dibiarkan 10-15 menit (kering-anginkan), ditambahkan 100µl larutan DNA rehidrasi ke dalam tabung, diinkubasi pada suhu 40°C semalam. DNA disimpan pada suhu 2-8°C.

Amplifikasi Gen 16SrRNA dengan Teknik PCR

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR Combi Block (Whatman Biometra Germany). 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 seperti dibawah ini.

Komposisi reagen untuk PCR 16SrRNA

Untuk 1 Tabung PCR: ddH₂O 15,8 µl, Bufer PCR 10x 2,5 µl, MgCl₂ 25 mM 3,0 µl, dNTP 10 mM 0,5 µl, Primer Uni B1 30 pmol/µl 1,0 µl, Primer Bact F1 30 pmol/µl 1,0 µl, Taq DNA Pol (5U/µl) 0,2 µl, Templat (pengenceran 10x) 1,0 µl, total 25,0 µl.

Kondisi reaksi PCR gen 16SrRNA

Denaturasi awal 94o 3 menit,
Denaturasi 94o 1 menit, 30 siklus,
Annealing 62o 1 menit 30 detik,
Polimerisasi 72o 1 menit 30 detik,
Pemantapan 72o 10 menit.

Elektroforesis dan Visualisasi gen 16S rRNA

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

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 Macrogen Korea. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan metode BLAST melalui media Online NCBI, untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16SrRNA dalam menentukan spesies bakteri resisten merkuri anorganik yang diisolasi dari feses pasien dengan tambalan amalgam merkuri.

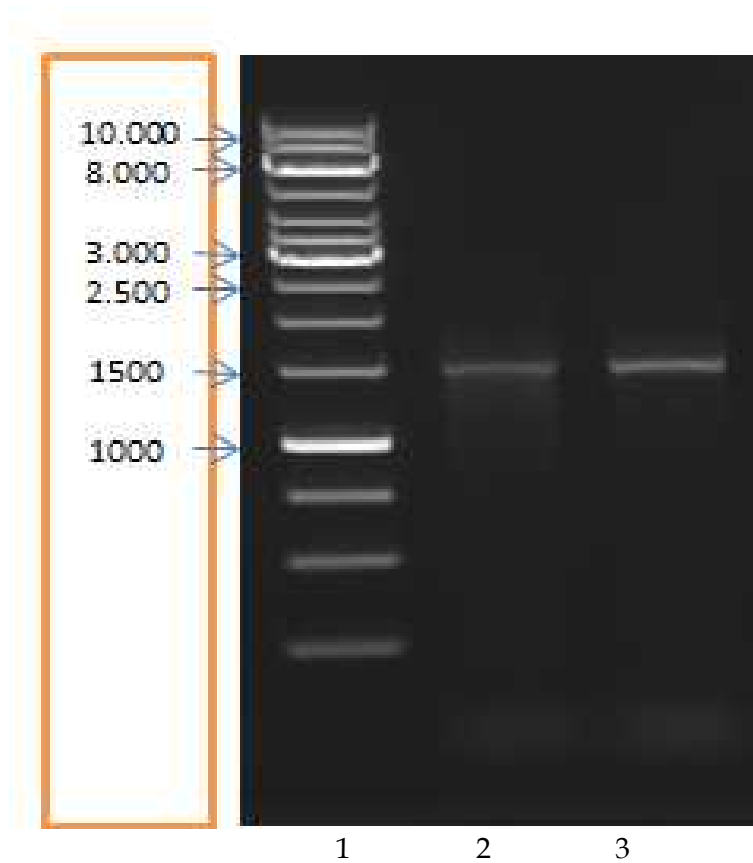
Uji Daya Reduksi Merkuri dari Bakteri Resisten Merkuri

Diambil masing-masing 1 ose bakteri isolat F2.1 dan F2.2 dari media agar miring, kemudian ditanam dalam media nutrient broth yang mengandung 10 ppm HgCl₂. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37oC selama 1 jam, 12 jam dan 24 jam. Pada akhir inkubasi, ditambahkan H₂SO₄ pekat 2 tetes untuk membunuh bakteri. Selanjutnya kadar merkuri dianalisis dengan metode analisis CV-AAS dan dilakukan analisis blanko di LIPI Bandung.

HASIL

Hasil Amplifikasi Gen 16SrRNA

DNA genomik yang telah diisolasi dan diekstraksi dari isolat F2.1 dan F2.2 kemudian dianalisis dengan metode PCR untuk mengamplifikasi gen 16SrRNA menggunakan primer universal untuk gen 16SrRNA Bact F1:5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'/ Uni B1 5'GGT TACSTTGTTACGACTT3' (Eurogentec AIT) yang dapat mengamplifikasi gen 16SrRNA sepanjang 1500 bp. Hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarose 1% dan divisualisasi dengan sinar UV. Hasil visualisasi ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram Lane 1. Marker; lane 2. Isolat F2.1; Lane 3. Isolat F2.2

>1st_BASE_1234709_F2.1

```
AGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG
AAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAC
CGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCC
ATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAA
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTA
AAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAG
CTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACG
```

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

```
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTGACTTGGAGGTTGTGCC  
CTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA  
CCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTC  
GGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTG  
AAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGC  
CAGCGGTCC
```

>1st_BASE_1234711_F2.2

```
ACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGG  
GTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG  
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGAC  
CTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTTGG  
TGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA  
TGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA  
TGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGG  
GGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCA  
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCG  
GTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTCA  
TCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG  
GCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCG  
ACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTA  
AGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAA  
TTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGC  
AACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAG  
ATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC  
GTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA  
CCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACT  
GCCAGTGATAAACTGGAAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG  
GCCCTTACGACCAGGGCTAC
```

Gambar 2. Hasil Sekuensing Rangkaian Gen 16SrRNA Isolat F2.1 dan F2.2

Untuk melihat spesies bakteri, maka hasil amplifikasi dilakukan proses sekuensing. Urutan nukleotida hasil sekuensing ditunjukkan pada Gambar 2. Hasil sekuensing ini menghasilkan urutan nukleotida gen

16SrRNA seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Terhadap urutan nukleotida gen 16SrRNA dilakukan BLAST secara online melalui: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasil BLAST menunjukkan kesamaan

100% urutan nukleotida gen 16SrRNA isolat F2.1 dan F2.2 yang diperoleh dengan urutan nukleotida gen 16SrRNA beberapa bakteri *Escherichia coli* yang terdapat pada *GenBank*, isolat F2.1 antara lain dengan accession number: KJ803883.1, KJ803862.1, KF109929.1, KF109728.1 dan KF109724.1. Sedangkan isolat F2.2 dengan accession number : CP008805.1, CP008801., CP007136.1, KF991484.1, KF991480.1 dan KF991477.1. Hasil BLAST ditunjukkan pada Tabel 1.

Dengan demikian bakteri resisten merkuri anorganik HgCl₂ yang diperoleh dari feses adalah jenis bakteri Gram negatif, *Escherichia coli*. Bakteri ini kemungkinan mengandung gen *merA* yang menyandi protein MerA yang dapat digunakan untuk detoksifikasi merkuri anorganik.

Hasil Uji Daya Reduksi Merkuri dari Bakteri Isolat F2.1 dan F2.2

Menurut Vetriani *et al.*, (2004), bakteri resisten merkuri tinggi mengandung operon *mer* yang menyandi flavoenzim, merkuri reduktase yang dapat mereduksi ion Hg²⁺ menjadi Hg⁰ yang kurang toksik. Pada penelitian ini telah dilakukan uji daya reduksi merkuri bakteri yang resisten merkuri tinggi yaitu F2.1 dan F2.2. Kultur ditumbuhkan dalam media nutrisi broth yang mengandung HgCl₂ 10 ppm selama 1 jam, 12 jam dan 24 jam dan dilakukan juga analisis kontrol HgCl₂ dan media. Analisis dilakukan dengan metode analisis CV-AAS. Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat bakteri resisten merkuri anorganik A1.1.1 dapat menurunkan kadar Hg dalam waktu 1, 12 dan 24 jam. Hasil pengukuran konsentrasi merkuri terlihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil BLAST Gen 16SrRNA Isolat Bakteri F2.1 dan F2.2

No.	Isolat bakteri	Deskripsi spesies	Max. identity	% Coverage
1.	F2.1	<i>Escherichia coli</i>	100%	100
2.	F2.2	<i>Escherichia coli</i>	99%	100

Tabel 2. Hasil Analisis Kadar Merkuri dengan CV-AAS

No.	Perlakuan	Penurunan Kadar Hg (%)			
		0 jam	1 jam	12 jam	24 jam
1.	Kontrol media NB	0	0	0	0
2.	Kontrol HgCl ₂	0	0	0	0
3.	Isolat F2.1	0	82,2	87,1	99,2
4.	Isolat F2.2	0	79,5	89,2	99,3

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil BLAST, urutan gen 16SrRNA, isolat F2.1 dan F2.2 mempunyai kesamaan 100% dengan *Escherichia coli* yang terdapat pada GenBank. Bakteri isolat F2.1 dan F2.2 dapat tumbuh dalam media cair NB dengan kadar HgCl₂ 40 ppm (Fatimawali *et al.*, 2013). Zeng *et al.*, (2009) juga menemukan *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari tanah yang dapat hidup pada media padat yang mengandung 60 mg/l Hg²⁺, tapi ketika Hg²⁺ ditambahkan dalam media cair sebanyak 60mg/l, maka bakteri tidak tumbuh. Penggunaan HgCl₂ paling sering digunakan untuk studi eksperimental karena sifatnya yang larut dan bersifat racun (Schelert *et al.*, 2003). Tingkat resistensi bakteri isolat F2.1 dan F2.2 ini lebih tinggi daripada yang ditemukan oleh Risa N. dan Gusrizal, (2004), yang menemukan 2 spesies bakteri yaitu *Enterobacter hafniae* dan *Enterobacter cloacae* dari daerah bekas penambangan rakyat Mandor Kalimantan Barat.

Kedua jenis bakteri ini hanya dapat hidup pada media LB dengan kadar HgCl₂ 10 mg/l. Selain itu Zeyauallah *et al.*, (2010) melaporkan telah mengisolasi bakteri *Escherichia coli* dari lokasi terkontaminasi merkuri di India, yang dapat tumbuh dalam media LB dengan kadar HgCl₂ antara 25-55 mg/l.

Isolat F2.1 dan F2.2 cepat merespon keberadaan merkuri dalam media, dalam waktu 1, 12, dan 24 jam, bakteri tersebut dapat menurunkan kadar merkuri HgCl₂ dalam media berturut-turut untuk isolat F2.1 : 82,2%, 87,1% dan 99,2% dan untuk isolat F2.2: 79,5%, 89,2% dan 99,3%. Kemampuan reduksi ini melebihi kemampuan reduksi dari bakteri *Klebsiella*

pneumoniae yang diisolasi dari limbah industri di Casablanca Morocco yang mempunyai resistensi tinggi terhadap merkuri dengan konsentrasi penghambatan minimal 2400 µM dalam media padat dan cair Muller Hinton. Konsentrasi merkuri tersebut lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Zeroual *et al.*, (2001). *Klebsiella pneumoniae* yang ditemukan menurunkan kadar merkuri secara kontinyu sampai dengan 100% dalam waktu 10 hari, tanpa kehilangan aktifitasnya (Zeroual *et al.*, 2001).

Berdasarkan pada penelitian Zeyauallah *et al.*, (2010), gen resisten merkuri (merOperon) pada *Echerichia coli* terdapat dalam plasmid, sedangkan menurut Zeng *et al.*, (2009), merOperon berlokasi dalam kromosom dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Kloning dan ekspresi *merA* pada sel bakteri kompeten akan menjadi contoh yang sangat bagus untuk proses remediasi merkuri (Rugh *et al.*, 1998).

SIMPULAN

Jenis bakteri resisten merkuri dari kedua isolat F2.1 dan F2.2 yang ditemukan dalam feses pasien dengan tambalan amalgam merkuri adalah *Escherichia coli*. Daya reduksi bakteri *Escherichia coli* terhadap HgCl₂ dalam 1, 12, dan 24 jam dapat menurunkan kadar merkuri HgCl₂ dalam media berturut-turut untuk isolat F2.1: 82,2%, 87,1% dan 99,2% dan untuk isolat F2.2: 79,5%, 89,2% dan 99,3 sehingga kedua isolat tersebut dapat digunakan pada remediasi untuk detoksifikasi merkuri anorganik.

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk analisis gen yang bertanggung jawab terhadap reduksi merkuri yaitu gen *merA* untuk mendapatkan enzim MerA yang dapat

digunakan dalam proses detoksifikasi merkuri.

KEPUSTAKAAN

- Fatimawali, Kepel B, Bodhi W, Kolondam B 2013. Bakteri Resisten Merkuri pada Feses Pasien dengan Tumpatan Amalgam Gigi di Puskesmas Bahu Manado, Prosiding Seminar Matematika, Sains dan TI, Unsrat Manado, hal. 217-222.
- Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, Bodrossy L, Sessitsch A 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol* 70: 5057-5065
- Iohara K, Iiyama R, Nakamura K, Silver S, Sakai M, Takeshita M, Furukawa K 2001. The Mer Operon of a Mercury-resistant *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain isolated from Minamata Bay, Japan, *Appl. Microbiology and Biotechnology*.
- Janda MJ, and Abbott SL 2007. 16S rRNA Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory; Pluses, Perils, and Pitfalls, *Microbial Diseases Laboratory, Division of Communicable Disease Control, California department of Public Health, Richmond, California 94804, Journal of Clinical Microbiology*.
- Jill E, Clarrige III 2004. Impact of 16S rRNA gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, department of laboratory Medicine, University of Washington, and Pathology and Laboratory Medicine Service, Veterans Affairs Medical center, seattle, Washington. *Clinical Microbiology review*.
- Nascimento AM and Chartone-Souza E 2003. Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res.*;2(1):92-101.
- Ravel, J, DiRegguiero J, Robb FT, and Hill RT 2000. Cloning and Sequence Analysis of the Mercury Resistance Operon of *Streptomyces* sp. Strain CHR28 Reveals a Novel Putative Second Regulatory Gene. *Journal of Bacteriology.*, 182(8):2345-2349.
- Risa N dan Gusrizal 2004. Bakteri Resisten Merkuri Spektrum Sempit dari Daerah Bekas Penambangan Emas Tanpa Izin (PETI) Mandor, Kalimantan Barat, *Jurnal Natur Indonesia* 6(2): 67-74
- Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA 1998. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology*. **16(10)**, 925-928.
- Sasaki Y, Mibnakawa T, Miyazaki A, Silver S, Kusano T 2005. Functional Dissection of a Mercuric Ion Transporter, MerC, from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Graduate School of Life Science, Tohoku University, Katahira Japan, Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois, South Wolcott Avenue, Chicago, USA, Bioscience, Biotechnology, Biochemistry.
- Schelert J, Divixt V, Hoang Vi, Simbahan J, Drozda M and Blum P 2003. Occurrence and Characterization of Mercury Resistance in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* by Use Gene Disruption. Available from : www.jbacteriol.com
- Silver S and Phung LT 1996. Bacterial Heavy Metal Resistance: New surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 753-789.
- Suheryanto 2001. Spesiasi Metil Merkuri dan Merkuri Anorganik di Perairan Sungai Musi dengan Metode Ekstraksi dan CV-AAS, *Jurnal Kimia Lingkungan*, Vol.2, No.2, p.107-108.
- Vetriani C, Chew YS, Miller SM. 2005. Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Appl. Environ. Microbiol.* January vol. 71 no. 1, 220-226.
- Zeng Xiao-xi, Tagn Jian-xin, Jiang Pei, Liu Hong-wei, Dai Zhi-min, Liu Xue-

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

- duan. 2009. Isolation, characterization and extraction of mer gene of Hg²⁺ resisting strain D2, Elsevier, Science Press.
- Zeroual Y, Moutaouakkil A, Blaghen M. 2001. Volatilization of mercury by immobilized bacteria (*Klebsiella pneumoniae*) in different support by using fluidized bed bioreactor, *Curr Microbiol.* 43(5):322-7
- Zeyauallah MD, Haque S, Nabi G. 2010. Molecular Cloning and Expression of bacterial Mercuric Reductase gene, *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(25), pp. 3714-3718.