



Isolasi dan Karakterisasi Gen *merB* pada Bakteri *Pseudomonas sp.* Sebagai Gen Resistensi Merkuri Organik

Isolation and Characterization of merB Gene in Pseudomonas sp. Bacterium as Organic Mercury-Resistant Gene

Billy J. Kepel^{1,2}, Fatimawali^{1,2}, Irawan Yusuf¹, Rosdiana Natsir¹, Fatmawati Badaruddin¹

¹Postgraduate School of Medical Sciences, Faculty of Medicine Unhas, Makassar;

²Department of Chemistry, Faculty of Medicine, Unsrat, Manado

KATA KUNCI *merB*; *Pseudomonas sp.*; Merkuri Organik
KEYWORDS *merB*; *Pseudomonas sp.*; Organic Mercury

ABSTRAK Patogenesis penyakit dimana merkuri sebagai agen penyebab akan melewati komponen lingkungan sebagai media transmisi sebelum sampai pada manusia. Terdapat beberapa lokasi pertambangan emas rakyat di Sulawesi Utara yang menggunakan merkuri. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi jenis bakteri yang hidup pada sedimen tanah tercemar merkuri, mengisolasi dan mengidentifikasi karakter gen *merB* pada bakteri tersebut. Dilakukan uji resistensi pada fenil merkuri, identifikasi Gram dan 16S rRNA, amplifikasi dan sekuensing gen *merB*, pensejajaran dan pembuatan pohon filogenetik gen *merB* pada isolat bakteri resisten fenil merkuri. Terdapat 2 isolat bakteri *Pseudomonas sp.* yang resisten terhadap fenil merkuri. Gen *merB* pada bakteri ini mempunyai homologi sebesar 98-100% dibandingkan dengan gen *merB* pada bakteri yang terdapat pada GenBank. Sisi aktif enzim organomerkuri liase (*MerB*) yang dikode oleh gen *merB* pada posisi Cys-96, Cys-159 dan Asp-99 tetap dipertahankan oleh gen *merB* kedua isolat bakteri hasil penelitian. Terdapat 3 tempat perbedaan nukleotida *merB* antara kedua isolat hasil penelitian dengan *P. aeruginosa* galur ARY1. Terjadi mutasi substitusi transisi pada *merB* posisi Val-124 (GTC→GTT) dan Val-136 (GTT→GTC) maupun Glu-132 (GAG) → Gly-132 (GGG) dimana isolat 2B.2 dan 4B.2 *Pseudomonas sp.* sama dengan *Klebsiella sp.* ND3 tapi berbeda dengan *P. aeruginosa* galur ARY1 walaupun genus yang sama. Walaupun asam amino glutamat diganti oleh glisin yang berbeda sifat polaritas tapi tidak berpengaruh pada aktifitas bioremediasi karena tempat tersebut bukan merupakan sisi aktif. Gen *merB* terdapat pada isolat bakteri lokal, *Pseudomonas sp.*, di Sulawesi Utara. Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk menghasilkan kloning enzim *MerB* (organomerkuri liase) dalam mengatasi masalah pencemaran merkuri.

ABSTRACT Pathogenesis of a disease which mercury as an agent will pass through environment before reach to the human. There are some local gold minings that uses mercury in North Sulawesi. The study aims to identify bacteria in soil

sediment of mercury-polluted land, to isolate dan characterize merB gene in the bacteria. Phenyl mercury-resistant test, Gram and 16S rRNA identification, merB gene amplification and sequencing, merB gene alignment and phylogenetic tree construction, were carried out on the phenyl mercury-resistant isolates. There were two Pseudomonas sp. isolates that were resistance to phenyl mercury. The merB gene in the bacteria has 98-100% homology compared to merB gene in the GenBank bacteria. Active sites of organomercury enzyme (MerB) that was coded for by merB gene at Cys-96, Cys-159 dan Asp-99 were conserved in the microbe isolates. Different nucleotides in three locations of merB were observed among the two isolates and P. aeruginosa strain ARY1. Mutations of substitution transition existed in the merB position of Val-124 (GTC→GTT) and Val-136 (GTT→GTC), and also Glu-132 (GAG) → Gly-132 (GGG) in which the 2B.2 dan 4B.2 Pseudomonas sp. were similar with Klebsiella sp. ND3 but were different with P. aeruginosa strain ARY1 despite the same genus. Glutamate was replaced by glisin which was different in polarity, however bioremediation activity was not affected due to its location was a non active site of the enzyme. The existence of merB gene in the local bacterium isolates, Pseudomonas sp., in North Sulawesi was interesting. Further studies are still required, particularly to generate MerB (organomercury liase) clone which might be of useful later to overcome mercury pollution problem.

Merkuri organik merupakan unsur yang paling toksik diantara bentuk merkuri yang ada. Patogenesis penyakit berbasis lingkungan dengan merkuri sebagai agen penyakit akan melewati komponen lingkungan (air, tanah, ikan) sebagai media transmisi sebelum sampai pada manusia (Achmadi, 2005). Dalam media transmisi lingkungan ini terjadi proses oksidasi dan reduksi merkuri yang banyak diperankan oleh mikroorganisme lingkungan (Barkay dan Wagner-Dobler, 2005). Merkuri organik akan didegradasi menjadi bentuk ion merkuri (Hg^{2+}), dan selanjutnya Hg^{2+} ini akan didetoksikasi menjadi Hg^0 yang kurang toksik dan mudah menguap (Gupta *et al.*, 1999).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa habitat yang mengandung kontaminasi merkuri dalam konsentrasi tinggi selama bertahun-tahun tetap mempunyai populasi dan aktifitas mikroba, walaupun populasi dan aktifitas mikroba lebih rendah di-

bandingkan dengan populasi dan aktifitas mikroba di habitat yang tidak terkontaminasi (Cursino *et al.*, 1999; von Canstein *et al.*, 2002; Nofiani dan Gusrizal, 2004). Hal ini menunjukkan suatu kondisi ekstrim yang dapat diadaptasi oleh mikroba tersebut, sehingga diasumsikan bahwa bakteri dapat hidup pada lingkungan yang terkontaminasi merkuri dengan mekanisme pertahanan spesifik yang dimilikinya (Konopka *et al.*, 1999; Summers, 2005).

Strain bakteri yang resisten merkuri memiliki satu set gen yang disebut *mer* operon, yang biasanya terdapat pada plasmid (Benison *et al.*, 2004). Mekanisme bioremediasi merkuri oleh gen-gen ini salah satunya melibatkan gen *merB* yang akan mengkode

Correspondence:

Billy J. Kepel, Department of Chemistry, Faculty of Medicine, Unsrat, Manado, Bahu, Manado 95115, Telephone 085242777822, 08124435152, E-mail: billy.kepel@yahoo.com

pembentukan protein enzim *MerB* (organo-merkuri liase) yang akan mengkata-lisa pemutusan ikatan C-Hg pada merkuri organik (Miller, 1999), untuk menghasilkan karbon yang tereduksi dan ion merkuri (Benison *et al.*, 2004).

Beberapa lokasi pertambangan emas rakyat di Sulawesi Utara telah atau sementara memakai merkuri. Salah satu efek negatif akibat kegiatan pertambangan ini yaitu adanya kandungan merkuri pada permukaan tanah dan rumput sekitar buangan limbah, serta kandungan merkuri pada rambut pekerja tambang di atas nilai ambang yang ditetapkan (Limbong, 2010), serta terdapatnya bakteri resisten merkuri yang berasal dari sumber air minum, urine dan feses masyarakat tersebut (Dempata *et al.*, 2010).

Masalah dalam penelitian ini ialah bahwa merkuri merupakan logam berat yang tidak mempunyai manfaat apapun dalam tubuh manusia, tetapi bisa terdapat sekitar kita baik dalam konsentrasi yang aman ataupun di atas nilai ambang aman, sehingga bisa mengakibatkan gangguan kesehatan. Merkuri organik merupakan jenis merkuri yang paling toksik, tetapi terdapat bakteri di alam sekitar kita yang bisa mendetoksifikasi merkuri organik termasuk bakteri resisten merkuri organik yang dapat hidup pada lokasi tercemar merkuri. Bakteri ini dapat melakukan detoksifikasi merkuri organik secara enzimatik yang dikode oleh gen *merB*. Sejauh ini belum ada penelitian gen *merB* pada bakteri yang hidup di lokasi pertambangan rakyat yang menggunakan merkuri di Sulawesi Utara, sehingga perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi gen *merB* pada bakteri tersebut.

Berdasarkan latar belakang ini maka dikemukakan pertanyaan penelitian yaitu: bakteri resisten merkuri organik apakah yang hidup pada sedimen tanah tercemar merkuri?

Apakah terdapat gen *merB* dan bagaimana urutan nukleotida gen *merB* pada bakteri tersebut? Apakah terdapat mutasi pada gen *merB* tersebut? Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi jenis bakteri yang hidup pada sedimen tanah tercemar merkuri, mengisolasi dan mengidentifikasi karakter gen *merB* pada bakteri tersebut, sehingga isolasi dan karakterisasi gen *merB* yang bertanggung jawab terhadap bioremediasi merkuri organik ini sangat berguna untuk dasar penelitian bioteknologi dalam mengatasi masalah kesehatan lingkungan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Desain Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian survey (deskriptif eksploratif) dengan mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri resisten merkuri organik, serta mengisolasi dan mengkarakterisasi gen resisten merkuri organik (*merB*) pada bakteri sedimen tanah tercemar merkuri.

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel sedimen tanah pada buangan limbah pertambangan emas rakyat di Desa Tatelu, Kabupaten Minahasa Utara, Sulawesi Utara. Isolasi bakteri dan amplifikasi gen *merB* dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas MIPA Unsrat, Manado. Identifikasi bakteri secara 16S rRNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Sekolah Farmasi ITB, Bandung. Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan di Macrogen, Korea, dan sekuensing gen *merB* dilakukan di *First BASE Laboratories*, Malaysia. Waktu penelitian dimulai dari pengambilan sampel spesimen tanah dilakukan pada Juni 2011 sampai dengan selesainya seluruh pekerjaan laboratorium pada akhir Pebruari 2012.

Populasi dan Sampel

Populasi penelitian yaitu populasi bakteri pada daerah-daerah pertambangan emas rakyat yang menggunakan merkuri, serta membuangnya langsung pada lingkungan sekitar. Sampel yaitu seluruh populasi bakteri resisten merkuri organik yang ditemukan pada sampel sedimen daerah pertambangan emas rakyat di Desa Tatelu, Minahasa Utara, Propinsi Sulawesi Utara, dengan kriteria inklusi adalah bakteri pada sampel sedimen yang tumbuh pada media *nutrient Broth* (NB) yang mengandung fenil merkuri 10 ppm atau lebih. Uji resistensi dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media tersebut yang masing-masing mengandung fenil merkuri 5 ppm, 10 ppm, dan 20 ppm. Koloni bakteri yang tetap hidup tersebut kemudian dipindahkan ke media agar padat dengan konsentrasi fenil merkuri 10 ppm.

Identifikasi Bakteri, Amplifikasi dan Analisis Gen 16S rRNA

Sedimen tanah pada pertambangan emas rakyat dijadikan sebagai bahan untuk mengisolasi bakteri resisten merkuri organik dalam media *nutrient Broth* (NB) yang mengandung fenil merkuri dengan variasi konsentrasi 1, 5 dan 10 mg/l. Isolat bakteri yang tumbuh paling baik pada masing-masing titik pengambilan dilakukan pemeriksaan morfologi dengan pewarnaan Gram, kemudian dilakukan amplifikasi PCR dan identifikasi 16S rRNA. Amplifikasi PCR 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Combi Block* (Whatman Biometra, Germany). Primer yang digunakan untuk proses PCR yaitu pasangan *primer universal Bact-FI* 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CIC AG -3' (*forward*) dan Uni-B1 5'-GGT TAC STT GTT ACG ACT T -3' (*reverse*). Cetakan (*template*) yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA adalah DNA genomik bakteri yang telah diisolasi. Amplifikasi dengan teknik

PCR dilakukan dengan variasi komposisi reagen (untuk 1 tabung PCR) : ddH₂O 15,8 µl, bufer PCR 10× 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 Bac F1* 30 pmol/µl 1,0 µl, *Taq* DNA polimerase (5 U/ µl) 0,2 µl, cetakan (pengenceran 10×) 1,0 µl, sehingga total 25 µl. Tabung PCR yang telah berisi campuran reaksi dimasukkan ke dalam mesin PCR yang diprogram sebagai berikut: denaturasi awal dan denaturasi masing-masing 94°C 3 dan 1 menit, penempelan (*annealing*) 62 °C 1 menit 30 detik, polimerisasi 72°C 1 menit 30 detik, pemantapan 72°C 10 menit, dengan 30 siklus reaksi.

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. Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan di Macrogen, Korea. Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan metode BLAST melalui media online NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Amplifikasi dan Analisis Gen merB

Gen *merB* diamplifikasi dengan menggunakan sepasang primer yang dirujuk dari Liebert *et al.* (1997) dan Rojas *et al.* (2011), yaitu : B1 F (*forward*): 5'- TCG CCC CAT ATA TTT TAG AAC -3' dan B2 R (*reverse*): 5'- GTC GGG ACA GAT GCA AAG AAA -3'. Cetakan yang digunakan adalah DNA koloni bakteri. Komposisi reagen dan program PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen *merB* sesuai prosedur Liebert *et al.* (1997) yang kemudian dilakukan optimasi dengan variasi komposisi reagen dan kondisi reaksi PCR. Komposisi 1 tabung PCR (tube 0,2 ml): *Vivantis Master Mix* 2× (Buffer 2×; dNTPs 0,4 mM; *Taq* DNA polimerase 0,05 Unit/µl) 25 µl, MgCl₂ 50 mM (konsentrasi akhir menjadi 3 mM/reaksi) 1,5 µl, primer B1 F (10 pmol/ul) 1,0 µl, primer

B2R (10 pmol/ul) 1,0 µl, cetakan DNA (koloni) 2 µl, H₂O 19,5 µl sehingga total 50 µl. Kondisi reaksi adalah denaturasi awal dan denaturasi 94°C 5 menit dan 45 detik, penempelan 50 °C 45 detik, polimerisasi 72°C 45 detik, dan pemantapan 72°C 5 menit. Reaksi dilakukan dalam 40 siklus.

Elektroforesis gen *merB* dengan gel agarosa 1,5% dan visualisasi di bawah sinar UV. Sekuensing hasil amplifikasi gen *merB* dilakukan di *First BASE Laboratories*, Malaysia. Urutan nukleotida gen *merB* dilakukan BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) serta melihat hubungan kekerabatan gen *merB* dan dengan membuat pohon filogenik. Terjemahan urutan asam amino gen *merB* dilakukan dengan menggunakan media online <http://web.expasy.org/translate/>, kemudian dianalisis hubungan kekerabatan protein *MerB* (organomerkuri liase) dengan menggunakan media online <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

HASIL

Analisis Kadar Merkuri pada Sampel Sedimen

Hasil analisis kadar merkuri pada lokasi buangan limbah pertambangan emas rakyat yang menggunakan merkuri di Desa Tatelu, Minahasa Utara, menunjukkan kandungan merkuri melebihi dari kadar yang diperbolehkan untuk limbah B3 sesuai PP No. 18 Tahun 1999 Tentang Pengelolaan Limbah B3, yaitu konsentrasi merkuri > 0,01 mg/l. Pada lokasi tersebut dipilih 2 saluran pembuangan secara purposif yang masing-masing berasal dari 10 unit tromol pengolahan emas yang menggunakan merkuri. Pada kedua saluran pembuangan tersebut berturut-turut terdiri dari 2 titik pengambilan

sampel sedimen, sehingga jumlah sampel sedimen sebanyak 4 kantong dengan berat masing-masing sedimen tanah sekitar 200 gram, dengan kondisi suhu dan pH sampel saat itu berturut-turut adalah 25-30 °C dan 6,5-7,0. Kadar merkuri pada keempat titik tersebut berturut-turut adalah 0,0402 - 0,0355 - 0,0390 - dan 0,0361 mg/L.

Identifikasi Bakteri, Amplifikasi dan Analisis Gen 16S rRNA

Terdapat total 17 isolat bakteri sedimen dimana pada titik 1 terdapat 5 isolat dan pada titik 2 sampai 4 masing-masing terdapat 4 isolat. Masing-masing titik sedimen terdapat 1 isolat bakteri yang bertahan hidup dan tumbuh paling baik sampai pada konsentrasi 10 ppm, yaitu isolat 1A.2 (titik 1), isolat 2B.2 (titik 2), isolat 3A.1 (titik 3), dan isolat 4B.2 (titik 4). Berdasarkan identifikasi morfologi pewarnaan Gram maka didapatkan hasilnya yaitu bakteri batang positif Gram pada isolat 1A.2 (titik 1) dan 3A.1 (titik 3), dan bakteri batang negatif Gram pada isolat 2B.2 (titik 2) dan 4B.2 (titik 4). Hasil BLAST terhadap amplifikasi PCR dan kemudian analisis gen 16S rRNA keempat isolat bakteri terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa isolat 1A.1 dan 3A.1 100% mempunyai kesamaan dengan *Bacillus cereus* dan secara filogenetik paling dekat dengan spesies bakteri tersebut, serta demikian juga isolat 2B.2 dan 4B.2 mempunyai 100% kesamaan dengan *Pseudomonas* sp.

Amplifikasi, Elektroforesis, dan Visualisasi Gen merB Bakteri

Primer ini dapat mengamplifikasi gen *merB* dengan ukuran 500 bp dari bakteri. Hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarose 1,5% dan divisualisasi dengan sinar UV, ditampilkan pada

Gambar 1. Optimasi terhadap kondisi PCR yaitu suhu penempelan telah dilakukan berulang kali. Kondisi optimum tercapai pada pengaturan suhu denaturasi pada 94°C, penempelan primer pada 50°C, dan pemanjangan DNA pada 72°C. Waktu tiap langkah tersebut digunakan masing-masing 45 detik dengan 40 kali siklus. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa fragmen gen *merB* dengan 500 bp berhasil diperoleh dari amplifikasi dengan cetakan DNA koloni isolat isolat 1A.2, 2B.2, dan 4B.2, sedangkan isolat 3A.1 tidak berhasil diamplifikasi.

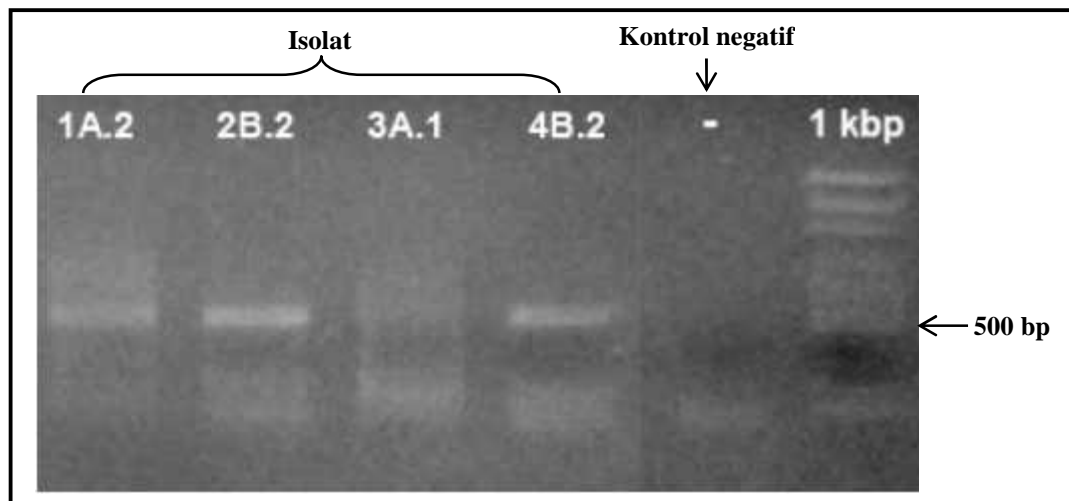
Sekuensing Gen *merB*

Empat isolat bakteri yang berhasil dilakukan isolasi dan identifikasi dan keempat bakteri ini bisa tumbuh pada

media nutrient agar yang mengandung 10 ppm fenil merkuri menunjukkan terdapat aktifitas bioremediasi merkuri organik. Namun hanya 2 dari 3 isolat bakteri ini yang berhasil dilakukan amplifikasi gen *merB* dengan PCR, dan selanjutnya sekuensing gen *merB* hanya berhasil dilakukan pada 2 isolat, yaitu isolat 2B.2 dan 4B.2 sebagai *Pseudomonas* sp. Terdapat kesamaan gen *merB* antara isolat 2B.2 dan 4B.2 sebagai *Pseudomonas* sp. dengan *Klebsiella* sp. galur ND3 *MerB*, complete cds ([JN188358.1](#)) dan *Pseudomonas aeruginosa* galur ARY1 organomercurial lyase (*merB*) gene, complete cds ([FJ613641.1](#)) yang terdapat pada

Tabel 1. Hasil Blast Gen 16S rRNA Isolat Bakteri 1A.2, 2B.2, 3A.1 dan 4B.2

Isolat Bakteri	Deskripsi Spesies / Genus	Maximum Identity (%)	Coverage (%)
1A.2	<i>Bacillus cereus</i>	100	100
2B.2	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99
3A.1	<i>Bacillus cereus</i>	100	100
4B.2	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	100

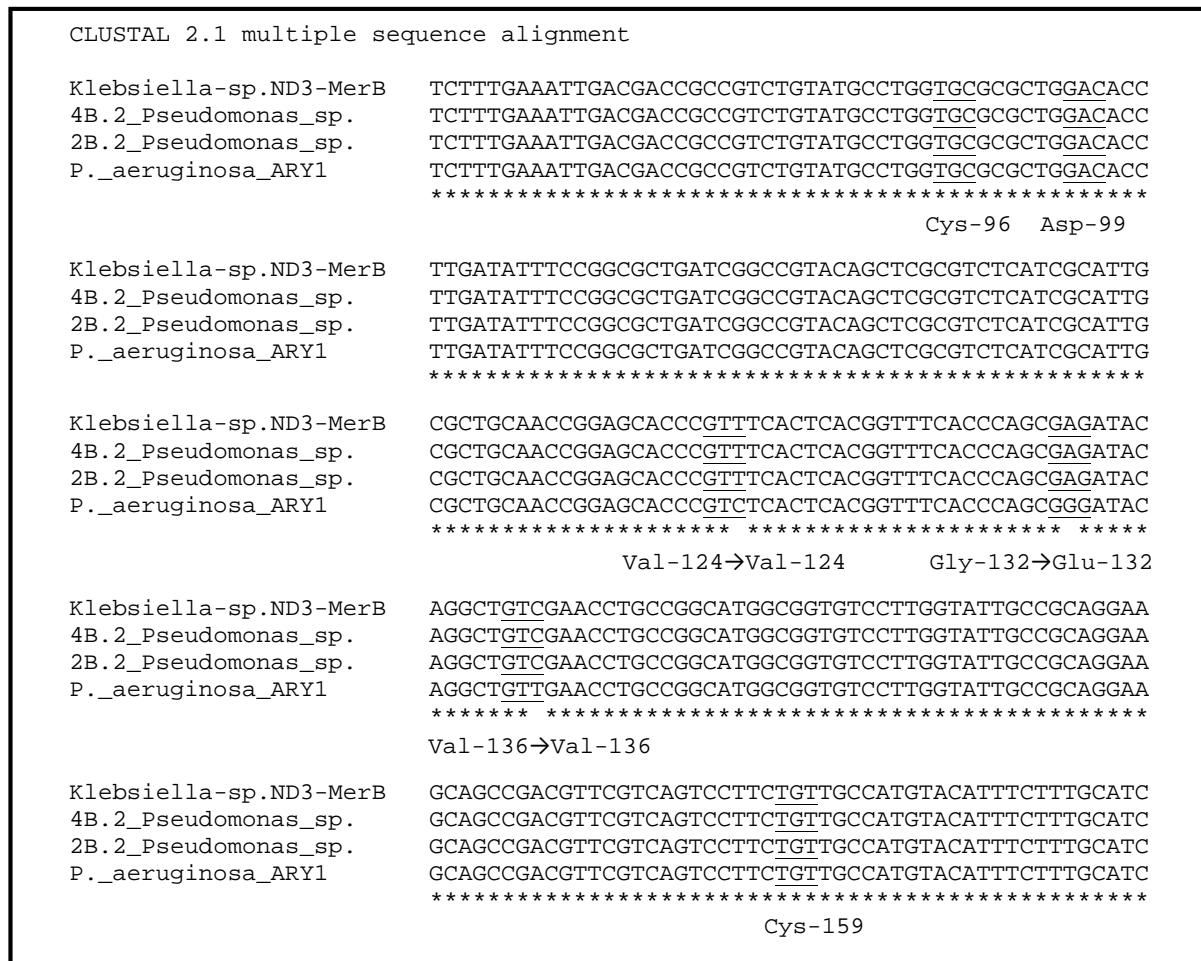


Gambar 1. Elektroforegram fragmen gen *merB* hasil amplifikasi koloni bakteri dengan PCR. Isolat bakteri : 1A2 (*Bacillus cereus*), 2B.2 (*Pseudomonas* sp.), 3A.1 (*Bacillus cereus*), 4B.2 (*Pseudomonas* sp.) kbp (kilo base pair), bp (base pair)

GenBank. Homologi urutan nukleotida *merB* pada keempat bakteri tersebut sangat tinggi yaitu 98-100%. Sisi aktif enzim organomercuri liase (*MerB*) yang merupakan hasil translasi gen *merB* pada posisi Cys-96 dan Cys-159, yang merupakan *conserved cystein*, dan Asp-99 tetap dipertahankan oleh gen *merB* kedua isolat bakteri hasil penelitian.

Walaupun urutan nukleotida gen *merB* ini tidak banyak berbeda tapi teridentifikasi adanya 3 tempat dimana terdapat

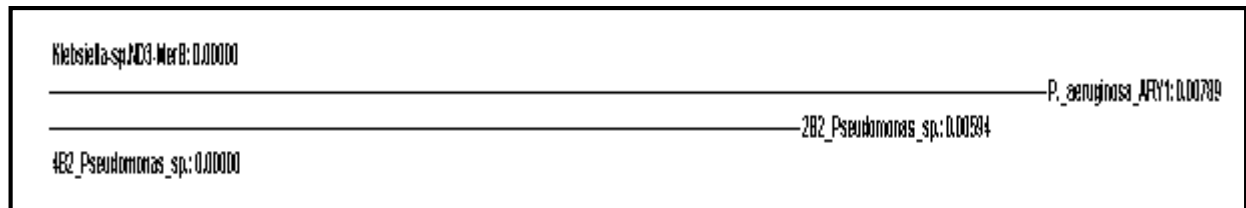
basa berbeda antara *Klebsiella* sp. ND3-*MerB*, isolat 2B.2 *Pseudomonas* sp., dan isolat 4B.F *Pseudomonas* sp. galur S2 di satu pihak, dengan *Pseudomonas aeruginosa* galur ARY1 organomercurial lyase (*merB*) gene di lain pihak (Gambar 2). Tempat pertama yang berbeda terlihat pada posisi Val-124 ketiga bakteri pertama - termasuk isolat 2B.F *Pseudomonas* sp. dan isolat 4B.F *Pseudomonas* sp. sebagai produk dari penelitian ini - pada basa GTT posisi Val-124 diganti dengan GTC (T→C)



Gambar 2. Hasil penjejajaran gen *merB* isolat bakteri 2B.2 dan 4B.2 *Pseudomonas* sp. dengan *Klebsiella* sp. ND3-*MerB* dan *P. aeruginosa* ARY1 pada *GenBank*. Cys-96 dan Cys-159 : asam amino sistein pada urutan ke 96 dan ke 159; Val-124 dan Val-136 : asam amino valin pada urutan ke 124 dan ke 136; Gly-132 : asam amino glisin pada urutan ke 132; Glu-132 : asam amino asam glutamat pada urutan ke 132; Val-124→Val-124 dan Val-136→Val-136 : terdapat pergantian basa nukleotida pada urutan asam amino valin ke 124 dan ke 136, tetapi tidak merubah hasil translasi asam amino; Gly-132→Glu-132 : terdapat pergantian basa nukleotida dengan merubah hasil translasi asam amino ke 132, yaitu glisin menjadi asam glutamat.

pada proses transkripsi GTT menjadi GUU yang akan mengkode asam amino valin. Walaupun posisi basa DNA yang akhirnya pada proses translasi RNA ke protein akan mengkode Val-124 ketiga bakteri pertama berbeda pada basa terakhir (T→C), tetapi tetap menghasilkan asam amino yang sama yaitu valin. Hal yang hampir sama terjadi juga pada posisi Val-136 dimana basa GTC pada tiga bakteri pertama menjadi GTT pada *P. aeruginosa* strain ARY1, karena tetap

menghasilkan asam amino yang sama yaitu valin. Posisi Glu-132 (asam glutamat) dengan basa GAG pada ketiga bakteri pertama diganti menjadi GGG (A→G) pada bakteri *P. aeruginosa* strain ARY1 sehingga akhir dari proses translasi akan menjadi asam amino glisin (Gly-132). Gambar 3 menunjukkan hubungan filogenetik gen *merB* isolat bakteri 2B.2 dan 4B.2 *Pseudomonas* sp. dengan *Klebsiella* sp. ND3-MerB dan *P. aeruginosa* ARY1 pada *GenBank*.



Gambar 3. Hubungan filogenetik gen *merB* isolat bakteri 2B.2 dan 4B.2 *Pseudomonas* sp. dengan *Klebsiella* sp. ND3-MerB dan *P. aeruginosa* ARY1 pada *GenBank*

PEMBAHASAN

Bakteri resistensi merkuri organik pada penelitian ini berasal dari sedimen tanah limbah buangan pertambangan emas rakyat. Pertambangan emas rakyat ini biasanya dikelola dengan kurang memperhatikan aspek kesehatan lingkungan karena para petambang kadang-kadang menggunakan merkuri. Hasil buangan limbah merkuri tersedimentasi dan mencemari tanah buangan limbah pertambangan emas rakyat (Appleton *et al.* 1999; Silbergeld *et al.*, 2002; Appleton *et al.*, 2006). Berdasarkan PP No. 18 Tahun 1999, maka kadar merkuri sedimen tanah buangan limbah telah melebihi batas ambang yang ditentukan. Lokasi sedimen tanah hasil buangan limbah merkuri hanya diolah secara sederhana dan hasil akhir hanya dibuang di lingkungan.

Menurut Achmadi (2005) terdapat 4 simpul urutan patogenesis penyakit berbasis

lingkungan, yaitu: simpul 1 adalah sumber atau agen penyakit, simpul 2 adalah komponen lingkungan sebagai media transmisi penyakit, simpul 3 adalah masyarakat dengan berbagai karakteristiknya, dan simpul 4 adalah masyarakat yang sehat atau sakit setelah mengalami interaksi dengan komponen lingkungan sebagai sumber penyakit. Hasil penelitian oleh Limbong (2010) menunjukkan bahwa lokasi pertambangan rakyat ini sudah masuk pada simpul pertama dan kedua serta indikasi masuk ke simpul ketiga, yaitu adanya kandungan merkuri pada permukaan tanah dan rumput sekitar buangan limbah, serta kandungan merkuri rambut pekerja tambang di atas nilai ambang yang ditetapkan. Konteks penelitian ini menunjukkan bahwa agen penyakit yaitu merkuri sebagai limbah pertambangan telah masuk ke lingkungan yaitu tanah sebagai media transmisi merkuri dan kelompok masyarakat penambang yang

menunjukkan indikator paparan merkuri kronis dengan terdeteksinya nilai merkuri di atas ambang batas pada rambut.

Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri Organik

Bakteri genus *Bacillus* merupakan salah satu jenis bakteri positif Gram yang paling banyak dilaporkan sebagai bakteri resisten merkuri organik (Wang *et al.*, 1989; Pahan *et al.*, 1995; Silver dan Phung, 2005). Selain itu juga bakteri *Pseudomonas* teridentifikasi pada isolat 2B.2 dan 4B.1 yang merupakan bakteri Gram negatif. Secara umum bakteri resisten merkuri Gram negatif yang berasal dari lingkungan telah diidentifikasi oleh beberapa peneliti (Bruce, 1997; Silver dan Phung, 2005), bahkan pada bakteri yang berasal dari feses primata yaitu *P. fluorescens* dan *P. aeruginosa* (Liebert *et al.*, 1997). Clark *et al.* (1977) telah mengidentifikasi resistensi merkuri yang ditunjukkan oleh 10 plasmid *P. aeruginosa* dan 1 plasmid *P. putida*, serta Priyadarshini (2011) juga melaporkan resistensi merkuri yang ditunjukkan oleh bakteri *P. marincola* dan *P. borbori*. Beberapa strain *Pseudomonas*, dapat menurunkan kadar merkuri dapat kultur sehingga bisa merupakan bioreaktor dalam proses detoksikasi merkuri (von Canstein *et al.*, 2002; Dávila dan Custodio, 2009). Beberapa temuan ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri yang dapat beradaptasi dengan lingkungan yang mengandung merkuri dimana dapat mengembangkan sistem enzim bioremediasi merkuri yang dikode oleh gen *merB*.

Amplifikasi, Elektroforesis, dan Visualisasi Gen *merB* Bakteri

Perbedaan pengaturan suhu dan siklus dengan yang digunakan oleh Liebert *et al.* (1997) diduga disebabkan oleh perbedaan

mesin PCR (termalcycler), jenis kit PCR, beserta kondisi reaksi masing-masing komponen (konsentrasi enzim polimerase, $MgCl_2$, dan buffer) yang disarankan produsen kit tersebut. Upaya-upaya untuk mengamplifikasi isolat 3A.1 *Bacillus cereus* dan menemukan apakah gen *merB* ini apakah berada di plasmid atau di genom belum berhasil dilakukan. Namun banyak laporan penelitian mendukung bahwa gen *merB* ini berada pada plasmid (Liebert *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1998; Mindlin *et al.*, 2002).

Sekuensing Gen *merB*

Data *GenBank*, gen *merB* bakteri *Klebsiella* sp. ND-3 dan *P. aeruginosa* ARY1 mempunyai urutan nukleotida gen *merB* lengkap sebanyak 639 basa nukleotida. Bakteri *E. coli* R831b yang mempunyai jumlah asam sebanyak 212 buah menunjukkan bahwa bakteri ini mempunyai basa nukleotida sebanyak 212×3 basa nukleotida = 636 + 3 nukleotida sebagai *stop codon* = 639 basa nukleotida, yang berarti jumlah basa nukleotida gen *merB* yang sama dengan bakteri *Klebsiella* sp. ND-3 (Lafrance-Vanesse *et al.*, 2009). Pada penelitian ini, jumlah basa nukleotida yang berhasil dilakukan sekuensing pada isolat 2B.2 dan 4B.2 adalah masing-masing sebanyak 506 dan 496 basa. Hal ini berarti bahwa hampir semua basa nukleotida berhasil dilakukan sekuensing.

Hasil pensejajaran terlihat bahwa urutan nukleotida gen *merB* isolat 2B.2 dan 4B.2 yang merupakan *Pseudomonas* sp. tidak jauh berbeda satu sama lain. Urutan nukleotida pada kedua isolat di atas juga identik dengan urutan nukleotida pada *Klebsiella* sp. ND-3-MerB dan *P. aeruginosa* strain ARY1 yang terdapat pada *GenBank*. Hal ini menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. dan *Klebsiella* sp. yang resisten terhadap merkuri organik mempunyai urutan basa nukleotida yang sama dalam mengkode sintesis protein

enzim *MerB* (organomerkuri liase). Secara bakteriologik, *Klebsiella* sp. dan *Pseudomonas* sp. merupakan jenis bakteri yang banyak dilaporkan resisten terhadap merkuri organik (Schaefer *et al.*, 2004).

Terjadi jenis mutasi substitusi transisi pada Val-124 (GTC→GTT) karena terjadi pergantian basa nukleotida yang sejenis yaitu T→C dimana keduanya adalah golongan pirimidin, seperti juga pada posisi Val-136 (GTT→GTC) (Maloy *et al.*, 1994; Toha, 2009). Menarik untuk disimak bahwa justru gen *merB* kedua isolat penelitian ini *Pseudomonas* sp. sama dengan *Klebsiella* sp. ND3-*MerB* pada ketiga pasang basa DNA untuk Val-124 walaupun genus berbeda, dan sebaliknya berbeda dengan *P. aeruginosa* strain ARY1 walaupun genus yang sama.

Hal yang sangat menarik di sini bahwa terjadi perbedaan basa DNA yang menyebabkan perbedaan produk asam amino yang mempunyai sifat polaritas yang berbeda dan ini kembali terjadi antara *Klebsiella* sp. ND3-*MerB*, *complete cds*, isolat 2B2.F *Pseudomonas* sp., dan isolat 4B.2F *Pseudomonas* sp., dengan *P. aeruginosa* strain ARY1 *organomercurial lyase (merB) gene, complete cds*. Posisi Glu-132 (asam glutamat) dengan basa GAG pada ketiga bakteri pertama diganti menjadi GGG (A→G) pada bakteri *P. aeruginosa* strain ARY1 sehingga akhir dari proses translasi akan menjadi asam amino glisin (Gly-132). Jenis mutasi ini disebut substitusi transisi karena terjadi pergantian basa nukleotida yang sejenis yaitu A→G dimana keduanya adalah golongan purin (Maloy *et al.*, 1994; Toha, 2009).

Asam glutamat merupakan asam amino yang bersifat polar bermuatan negatif karena rantai sampingnya (gugus R) mempunyai gugus karboksil pada yang akan menjadi donor atau akseptor proton tergantung pada perubahan pH lingkungan dan akan membentuk ikatan ionik yang kuat

dengan asam amino bermuatan positif (lisin, arginin atau arginin). Sebaliknya asam amino glisin merupakan asam amino non-polar alifatik karena rantai sampingnya hanya terdiri dari atom hidrogen dan cenderung berinteraksi dengan asam amino non-polar lainnya (Nelson dan Cox, 2004). Perbedaan karakteristik kedua asam amino pada protein enzim organomerkuri liase bisa mengalami perubahan konformasi protein tersebut yang selanjutnya bisa menyebabkan perubahan aktifitas proses katalitik yang dilakukan enzim tersebut pada substrat merkuri organik. Akan tetapi perbedaan asam amino ini nampaknya bukan suatu *critical point* bagi enzim ini karena tidak berpengaruh pada proses bioremediasi sebagai ekspresi fenotip katalisis enzim organomerkuri liase, karena kedua isolat bakteri hasil penelitian tetap tumbuh pada media kultur yang mengandung fenil merkuri 10 ppm. Hal ini bisa terjadi karena mutasi yang terjadi bukan pada sisi aktif dari enzim organomerkuri liase.

Organomerkuri liase (*MerB*) merupakan protein enzim yang hanya mempunyai satu unit protomer atau protein monomer yang bisa mengkatalisis bioremediasi berbagai bentuk merkuri organik seperti metil merkuri dan fenil merkuri (Benison *et al.*, 2004; Silver dan Phung, 2005). Jadi walaupun metil merkuri yang terbanyak dibioremediasi di alam karena merupakan bentuk merkuri organik terbanyak di alam (Barkay *et al.*, 2003), fenil merkuri yang dipakai dalam memantau ada tidaknya proses bioremediasi ini juga berlaku seperti halnya proses bioremediasi merkuri organik di alam bebas. Pada urutan asam amino isolat 2B.2 dan 4B.2 ini, sisi aktif protein enzim organomerkuri liase (*MerB*) berhasil diidentifikasi pada urutan asam amino Cys-96 dan Cys-159 yang juga merupakan *conserved cysteines*. Cys-96 dan Cys-159 ini memegang peran penting

dalam pengikatan substrat, pemutusan ikatan karbon-merkuri (C-Hg), dan kontrol terhadap pelepasan produk ion merkuri hasil bioremediasi. Selain itu terdapat asam amino aspartat (Asp-99) pada sisi aktif *MerB* isolat ini yang juga turut berperan pada tahap transfer proton untuk pemutusan ikatan karbon-merkuri (Lafrance-Vanesse *et al.*, 2009; Parks *et al.*, 2009).

Bagian sisi aktif Cys-96, Cys-159 dan Asp-99 pada protein *MerB* isolat 2B.2 dan 4B.2 ini identik dengan protein *MerB* pada penelitian oleh Benison *et al.* (2004). Simpulan penelitian dari Benison *et al.* (2004) yang menunjukkan terjadinya transfer langsung secara difusi bebas pada ion merkuri sebagai hasil bioremediasi merkuri organik menjadi ion merkuri oleh protein *MerB*, mengindikasikan bahwa aktifitas bioremediasi enzim organomercuri liase pada kedua isolat ini sama dengan aktifitas bioremediasi enzim tersebut pada penelitian ini.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Gen *merB* yang mengkode sintesis protein enzim organomercuri liase terdapat pada isolat bakteri lokal, *Pseudomonas* sp., di Sulawesi Utara. Gen *merB* pada bakteri ini tetap mempertahankan sisi aktifnya untuk melaksanakan fungsi bioremediasi pada merkuri organik, walaupun terdapat sedikit perbedaan nukleotida dibandingkan dengan gen *merB* pada bakteri pembanding pada *GenBank*. Perbedaan nukleotida ini bukan terjadi pada sisi aktif fungsi enzim dan tidak merubah konformasi protein enzim tersebut.

Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan sampai pada tahap menghasilkan kloning enzim *MerB* (organomercuri liase) dalam mengatasi masalah pencemaran merkuri yang

berbahaya terhadap kesehatan lingkungan masyarakat sekitar.

KEPUSTAKAAN

- Achmadi UF 2005. Manajemen penyakit berbasis wilayah. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.
- Appleton JD, Williams TM, Breward N, Apostol A, Miguel J, Miranda C 1999. Mercury contamination associated with artisanal gold mining on the island of Mindanao, the Philippines. *Sci Total Environ.* 228: 95-109.
- Appleton JD, Weeks TJM, Calvez JPS, Beinhoff C 2006. Impacts of mercury contaminated mining waste on soil quality, crops, bivalves, and fish in the Naboc River area, Mindanao, Philippines. *Sci Total Environ.* 354: 198-211.
- Barkay T, Miller SM, Summers AO 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 27: 355-384.
- Barkay T, Wagner-Dobler I 2005. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. *Adv Appl Microbiol.* 57
- Benison GC, Di Lello P, Shokes JE, Cosper NJ, Scott RA, Legault P, Omichinski JG 2004. A stable mercury-containing complex of the organomercurial lyase *MerB*: catalysis, product release, and direct transfer to *MerA*. *Biochemistry.* 43(26): 8333-45.
- Bruce KD 1997. Analysis of *mer* Gene Subclasses within Bacterial Communities in Soils and Sediments Resolved by Fluorescent-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Appl Environ Microbiol.* 63(12): 4914-4919.
- Clark DL, Weiss AA, Silver S 1977. Mercury and Organomercurial Resistances Determined by Plasmids in *Pseudomonas*. *J Bacteriol.* 132(1): 186-196.
- Cursino L, Oberda SM, Cecilio R, Moreira RM, Chartone-Souza E, Nascimento AMA 1999. Mercury concentration in the sediment at different gold prospecting sites along the Carmo stream, Minas Gerais, Brazil, and frequency of resistant bacteria in the respective aquatic communities. *Hydrobiol.* 394: 5-12.
- Dávila JS, Custodio JH 2009. Mercury reduction by bacteria isolated from informal mining zones. *Advanced Materials Research Vols, 71-73:* 637-640.
- Dempata NA, Mala KJ, Tuange VC, Kingfree T, Kepel BJ 2010. Identifikasi bakteri resisten merkuri di Desa Talawaan, Kabupaten Minahasa Utara. Laporan Penelitian: Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Sam Ratulangi.

- Gupta A, Phung LT, Chakravarty L, Silver S 1999. Mercury Resistance in *Bacillus cereus* RC607: Transcriptional Organization and Two New Open Reading Frames. *J Bacteriol.* 181(22): 7080-7086.
- Konopka A, Zakharova T, Bischoff M, Oliver L, Nakatsu C, Turco RF 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *App Environ Microbiol.* 65(5): 2256-2259.
- Lafrance-Vanasse J, Lefebvre M, Di Lello P, Sygusch J, Omichinski JG 2009. Crystal structures of the organomercurial lyase MerB in its free and mercury-bound forms: insights into the mechanism of methylmercury degradation. *J Biol Chem.* 284(2): 938-944.
- Liebert CA, Wireman J, Smith T, Summers AO 1997. Phylogeny of Mercury Resistance (*mer*) Operons of Gram-Negative Bacteria Isolated from the Fecal Flora of Primates. *Appl Environment Microbiol.* 63(3): 1066-1076.
- Limbong D 2010. Analisis ancaman pencemaran merkuri oleh pertambangan emas skala kecil di Tatalu. Diakses dari : <http://rmpportal.net/library/content/tools/environmental-policy-and-institutional-strengthening-epiq/epiq-environmental-policy-and-institutional-strengthening-cd-vol-1/epiq-cd-1-technical-area-policy-assessment-analysis-and-evaluation-strategic-planning/analisis-ancaman-pencemaran-merkuri-oleh-pertambangan-emas-skala-kecil-di-tatalu> (last modified Dec 19, 2011 02:16 AM)
- Maloy SR, Cronan Jr JE, Freifelder D 1994. *Microbial genetics*, 2nd Ed. Boston : Jones and Barlett Publishers.
- Miller SM 1999. Bacterial detoxification of Hg(II) and organomercurials. *Essay Biochemistry.* 34: 17-30.
- Mindlin VSZ, Bass IA, Bogdanova ES, Gorlenko ZhM, Kalyaeva ES, Petrova MA, Nikiforov VG 2002. Horizontal Transfer of Mercury Resistance Genes in Environmental Bacterial Populations *Mol Biol.* 36 (2), 160-170. (Publikasi diterjemahkan dari *Molekulyarnaya Biologiya.* 36(2), 2002: 216-227).
- Nelson DL, Cox MM 2002. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. W.H. Freeman Publisher.
- Nofiani R, Gusrizal 2004. Bakteri resistensi merkuri sempit dari daerah bekas penambangan emas tanpa izin (PETI) Mandor, Kalimantan Barat. *J Natur Indonesia.* 6(2): 67-74).
- Pahan K, Ghosh DK, Chaudhuri J, Gachhui R, Ray S, Mandal A 1995. Mercury detoxifying enzymes within endospores of a broad-spectrum mercury resistant *Bacillus pasteurii* strain DR₂. *J Bioscience.* 20(1): 83-88.
- Parks JM, Guo H, Momany C, Liang L, Miller SM, Summers AO, Smith JC 2009. Mechanism of Hg-C protonolysis in the organomercurial lyase MerB. *J Am Chem Soc.* 131: 13278-13285.
- Priyadarshini S 2011. Isolation, identification and biochemical analysis of mercury resistant bacteria (MRB) from the effluent water of Rourkela Steel Plant, Orissa. Dissertation: Department of Life Science national Institute of Technology, Rourkela, Orissa.
- Rojas LA, Yanez C, Gonzalez M, Lobos S, Smalla K, Seeger K 2011. Characterization of the Metabolically Modified Heavy Metal-Resistant *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 Generated for Mercury Bioremediation. *PLoS ONE*, www.plosone.org, 6(3): e17555.
- Schaefer JK, Yagi J, Reinfelder JR, Cardona T, Ellickson K, Tel-Or S, Barkay T 2004. Role of the Bacterial Organomercury Lyase (*MerB*) in Controlling Methylmercury Accumulation in Mercury-Contaminated Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 38(16): 4304-4311.
- Silbergeld EK, Nash D, Trevant C, Strickland GTh, de Souza JM, da Silva RSU 2002. Mercury exposure and malaria prevalence among gold miners in Pará, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 35(5): 421-429.
- Silver S, Phung LT 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32(11-12): 587-605.
- Summers AO 2005. Metal resistance loci of bacterial plasmids: a tribute to Stuart B. Levy, in *Frontier in Antimicrobial Resistance* (White DG, Alekshun MN, McDermott PF [eds]). Washington DC: American Society for Microbiology.
- Toha AHA 2009. *Ensiklopedia Biokimia dan Biologi Molekuler*. Jakarta : EGC.
- von Canstein H, Kelly S, Li Y, Wagner-Döbler I 2002. Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury-Reducing Biofilms under Changing Environmental Conditions. *Appl Environment Microbiol.* 68(6): 2829-2837.
- Walsh CT, Distefano MD, Moore MJ, Shewchuk LM, Verdine GL 1998. Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts. *FASEB Journal*, 2(2): 124-130.
- Wang Y, Moore M, Levinson HS, Silver S, Walsh C, Mahler I 1989. Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance determinant from a *Bacillus sp.* With broad-spectrum mercury resistance. *J Bacteriol.* 171: 83-92.