

Original Research

# *Stenotrophomonas maltophilia*, Bakteri Resisten Merkuri pada Limbah Pertambangan Logam

Mangihot Tua Gultom<sup>1\*</sup>, Shienen Sisilia<sup>1</sup>, Mariana Wahjudi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya-Indonesia

\* corresponding author: [ihot\\_gultom@staff.ubaya.ac.id](mailto:ihot_gultom@staff.ubaya.ac.id)

**Abstract**—Mercuric-resistant bacterium isolate coded 22 was previously obtained from metal mining (tailing) wastewater samples. From the total 24 bacteria which had been isolated, isolate 22 exhibited the highest resistance toward high concentration of Hg. In this paper it is reported results of 16S rDNA-based identification of isolate 22 as well as its growth and resistance characteristics when growing on Mercuric containing Nutrient Broth medium. Isolate 22 is closely related to the bacterium, *Stenotrophomonas maltophilia* (identity 99% and query covered 90%). Isolate 22 grew very well in the NB-Hg medium containing Hg concentration of 50 and 100 ppm. Increasing Hg concentration clearly lengthened lag phase although cell quantity (culture turbidity, OD600) at the initial phase were the same.

**Keywords:** isolate22, Hg, identification, sequencing, 16S rRNA gene

**Abstrak**—Isolat 22 adalah kode isolat bakteri resisten logam Merkuri (Hg) yang didapatkan pada sampel air limbah pertambangan logam (tailing). Isolat 22 adalah isolat yang paling berdaya tahan tinggi terhadap Hg, dari total 24 isolat yang berhasil diisolasi. Pada paper ini akan dilaporkan hasil identifikasi spesies bakteri isolat 22 menggunakan teknik PCR - sekuensing gen 16S rRNA dan karakter pertumbuhan dan resistensi isolat 22 terhadap Hg. Dari hasil sekuensing 16S rRNA, diketahui bahwa isolat 22 sangat dekat kekerabatannya dengan spesies *Stenotrophomonas maltophilia* (identity 99% dan query covered 90%). Isolat 22 tumbuh dengan baik pada medium NB-Hg dengan kadar Hg 50 dan 100 ppm. Semakin tinggi kadar Hg dalam medium, semakin lama fase lag, walaupun jumlah sel pada medium di fase awal sama.

**Kata kunci:** isolat 22, hg, identifikasi, sekuensing, gen 16S rRNA

## PENDAHULUAN

Keanekaragaman mikroba pada habitat ekstrim selalu menarik untuk dipelajari. Beberapa contoh habitat ekstrim yang hingga kini tetap dieksplorasi misalnya lingkungan bertemperatur dan bertekanan tinggi, habitat anoksik, dan habitat tercemar polutan. Habitat tercemar polutan tetap dihuni oleh mikroba aktif meskipun kadar polutan tinggi. Mikroba aktif tersebut biasanya adalah kelompok Archaea atau Bacteria (Barkay et al., 2003).

Kehidupan bakteri dan detoksifikasi senyawa polutan sangat berkaitan erat. Peran berbagai bakteri dalam detoksifikasi polutan sudah banyak dilaporkan dalam bentuk artikel tinjauan (review), baik untuk polutan logam berat maupun senyawa organik. Mekanisme seluler bakteri dalam menghadapi logam berat dapat dengan cara resistensi atau dengan cara biomineralisasi, sedangkan untuk polutan organik adalah dengan biodegradasi (Wang et al., 2020). Seringkali kemampuan detoksifikasi logam berat dan biodegradasi senyawa organik muncul bersama dari suatu sel bakteri, khususnya apabila di habitat bakteri tersebut tercemar logam berat dan senyawa organik secara bersamaan. Mendapatkan isolat bakteri-bakteri seperti ini sangat menguntungkan dari sudut pandang bioremediasi lingkungan (Gregoire et al., 2021).

Mikroba di habitat tercemar, khususnya bakteri, mampu beradaptasi menghadapi senyawa pencemar. Bahkan bakteri-bakteri merupakan sumber daya alami untuk membersihkan lingkungan tercemar. Identifikasi dan karakterisasi sifat-sifat bakteri-bakteri tersebut diperlukan agar upaya remediasi mikrobial dapat dioptimalkan (Setiabudi, 2005; Widiyanti et al., 2011). Strategi identifikasi bakteri dengan mensekuen gen 16S rRNA saat ini merupakan metode standar namun karakterisasi sifat-sifat unggul bakteri tetap hanya dapat dilakukan dengan metode kultivasi (Devereux & Wilkinson, 2004). Pada penelitian sebelumnya telah berhasil didapatkan 24 isolat bakteri dari limbah pertambangan logam (tailing), dari 24 isolat tersebut ditemukan bahwa isolat dengan kode 22 mampu bertahan hidup pada medium

dengan kadar Merkuri (Hg) sebesar 100 ppm (Wiyono, 2015). Artikel ini melaporkan hasil identifikasi isolat 22 dengan metode PCR dan sekuensing gen 16S rRNA.

## METODE

### Pertumbuhan dan Resistensi Merkuri Isolat 22

Secara aseptik isolat 22 ditumbuhkan dan disubkultur pada *Nutrient Agar* dengan kadar Hg ( $\text{HgCl}_2$ , Merck) 100 ppm dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-72 jam. Koloni tunggal isolat 22 yang mampu tumbuh pada medium NA-Hg (*Nutrient Agar*, Himedia) lalu diuji pertumbuhan dan resistensinya di medium NB 20 ml (*Nutrient Broth*, Himedia, 8 gram per L) dengan kadar Hg ( $\text{HgCl}_2$ ) 100 ppm dan medium yang sama tanpa Hg sebagai kontrol. Isolat 22 diamati pola pertumbuhannya (peningkatan kekeruhan sel pada OD600) dan diukur laju pertumbuhan selnya. Botol pertumbuhan diinkubasi pada suhu 37°C pada *shaker inkubator* dengan kecepatan putaran 150 rpm.

Pengambilan sampel dilakukan tiap satu jam sekali untuk kontrol dan dua jam sekali untuk sampel pada NB yang mengandung Hg, hingga absorbansi densitas sel tidak menunjukkan kenaikan signifikan yang menunjukkan sel berada pada fase stasioner. Kultur dipanen sebanyak 150  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur *microplate* untuk diukur OD-nya pada panjang gelombang 600 nm dengan *microplate reader*. Data yang didapat berupa absorbansi, yang kemudian dapat dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x adalah waktu inkubasi dan sumbu y adalah absorbansi. Selain itu juga dihitung laju pertumbuhan spesifik isolat 22 pada media pertumbuhan masing-masing.

### Identifikasi Spesies Isolat 22

Isolat bakteri terpilih diekstraksi DNA kromosom-nya (*Wizard Genomic DNA Purification Kit*, Promega) dan dicek hasil isolasinya secara elektroforesis pada agarose 1% (Amresco) yang mengandung Etidium Bromida (Roche), kemudian dilakukan amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer universal gen 16S rRNA (reverse 5'-GTGAAGCTTACGGYTAGCTTGTACGACTT-3' dan forward 5'-CACGGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG-3', First Base). Volume reaksi PCR sebesar 50  $\mu\text{l}$  yang terdiri dari 25  $\mu\text{l}$  *GoTaq Green* (Promega) Master Mix 2X, 5  $\mu\text{l}$  primer Forward 16S 10  $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  primer Reverse 16S 10  $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ , 2,5  $\mu\text{l}$  DMSO (Sigma-Aldrich), DNA template (0,5 ng/  $\mu\text{l}$ ), dan ddH<sub>2</sub>O yang dicampur di dalam tabung PCR, lalu diresuspensi agar homogen. Kontrol negatif dibuat dengan mencampurkan semua reagen yang digunakan kecuali DNA template. Amplikon dipurifikasi (PCR Cleanup Promega) dan dicek secara elektroforesis dengan menyertakan Marker DNA 1 Kb (*Hyperladder Biotek*) ketika elektroforesis.

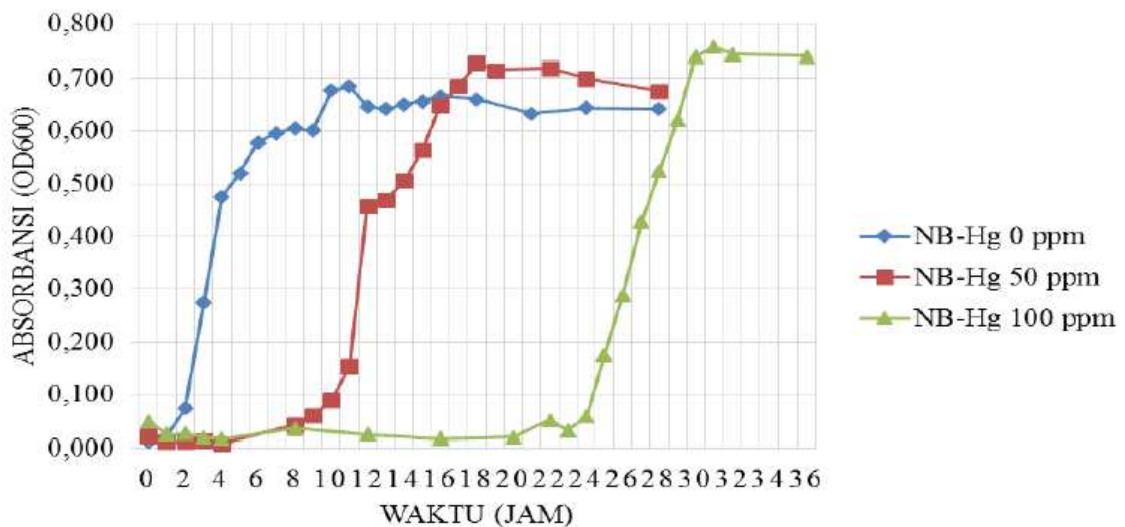
Amplikon gen 16S rRNA yang didapat dikirim ke Macrogen Inc., Korea untuk proses sekuensing. Sekuen yang didapatkan dari hasil sekuensing dibandingkan dengan database DNA pada NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) menggunakan *nucleotide* BLAST dan membuat pohon filogenetik untuk mengetahui kekerabatan dengan bakteri lainnya.

## HASIL

### Pertumbuhan dan Resistensi Merkuri Isolat 22

Pada kurva pertumbuhan (Gambar 1) dapat dilihat bahwa semakin besar kadar Hg pada media maka semakin panjang fase lag bakteri isolat 22. Dari kurva pertumbuhan, juga dapat dihitung laju pertumbuhan spesifik isolat 22. Secara umum waktu yang dibutuhkan isolat 22 untuk tumbuh pada media Hg adalah antara 24-36 jam. Pertumbuhan pada medium tanpa Hg dengan pada medium Hg berkadar 50 ppm berpola hampir sama. Hal ini berbeda dengan pertumbuhan Hg berkadar 100 ppm yang menunjukkan pola waktu adaptasi yang cukup lama.

Nilai laju pertumbuhan isolat 22 ketika tumbuh pada medium tanpa Hg berbeda dengan ketika tumbuh pada medium dengan Hg. Laju pertumbuhan tertinggi tercapai ketika isolat 22 ditumbuhkan pada medium tanpa penambahan Hg. Laju pertumbuhan menurun ketika Hg ditambahkan dengan kadar 50 ppm dan 100 ppm.



Gambar 1. Pola pertumbuhan isolat 22 pada medium NB dengan konsentrasi Hg berbeda (kondisi aerob, suhu 37°C, kecepatan putaran 150 rpm).

Dari Tabel 1 dapat dikatakan bahwa semakin besar konsentrasi Hg dalam media, maka semakin turun laju pertumbuhan spesifik isolat 22. Dengan kata lain, waktu untuk mencapai fase eksponensial semakin panjang dan pertumbuhan bakteri tersebut terhambat (Dash & Dash, 2012; Wiyono, 2015).

Tabel 1

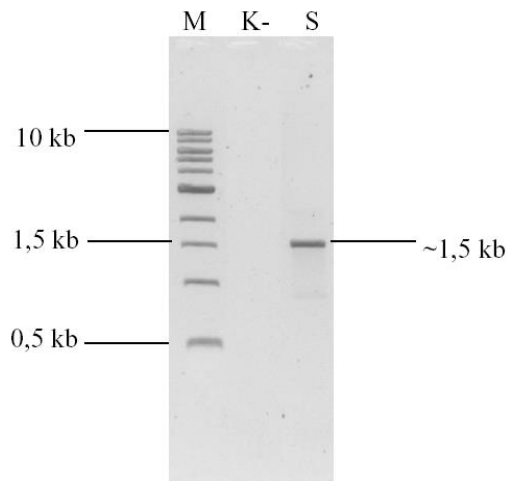
Laju Pertumbuhan Isolat 22 Pada Medium NB-Hg 0, 50, 100 ppm (Kondisi Aerob, Suhu 37°C, Kecepatan Putaran 150 rpm)

| No | Konsentrasi Hg<br>(ppm) | Laju<br>Pertumbuhan,<br>$\mu$ (jam <sup>-1</sup> ) |
|----|-------------------------|----------------------------------------------------|
| 1  | 0                       | 18                                                 |
| 2  | 50                      | 13                                                 |
| 3  | 100                     | 12                                                 |

#### Identifikasi Spesies Isolat 22

Amplifikasi gen 16S rRNA dari DNA genom bakteri dilakukan dengan PCR menggunakan primer universal untuk gen 16S rRNA. Hasil amplikon yang didapatkan kemudian dielektroforesis dan didapatkan pita berukuran sekitar 1.5 kb (Gambar 2).

Dari hasil sekuensing yang dilakukan pada amplikon PCR gen 16S rRNA isolat 22, didapatkan hasil urutan sekuen sepanjang 1485 bp (Gambar 3). Dari hasil BLAST pada NCBI dan pohon filogenetiknya (Gambar 4), diketahui bahwa isolat 22 berkerabat dekat dengan *Stenotrophomonas maltophilia* strain G7 dengan nilai *query cover* sebesar 90%, nilai *identity* sebesar 99% dan *E value* = 0. Berdasarkan dari hasil BLAST dapat dikatakan bahwa isolat bakteri 22 kemungkinan besar merupakan *Stenotrophomonas maltophilia*.



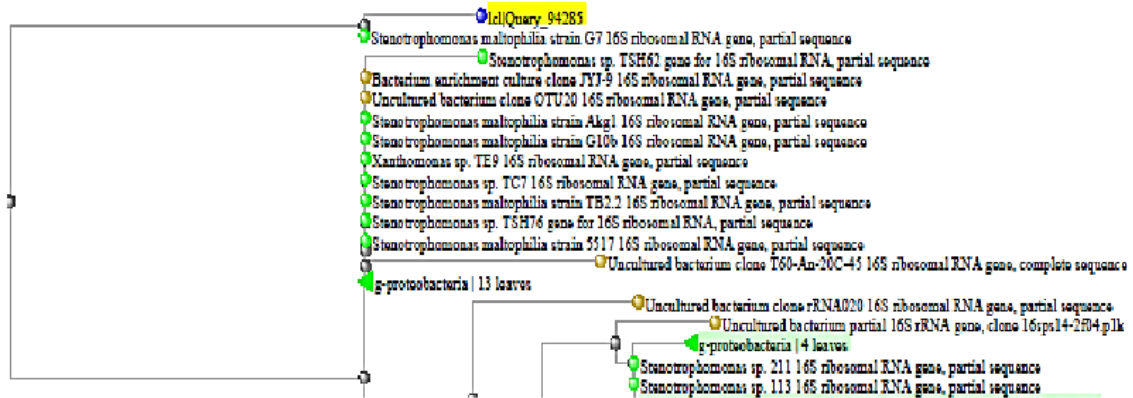
**Gambar 2.** Hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat 22 dengan ukuran amplicon 1.5 kb.

```

1   TTCACCCAG TCATCGCCA CACCGTGGCA AGCGCCCTCC CGAAGGTTAG GCTACCTGCT
61  TCTGGTGCAA CAAACTCCCA TGGTGTGACG GGCGGTGTGT ACAAGGCCCG GGAACGTATT
121 CACCGCAGCA ATGCTGATCT GCGATTACTA GCGATTCCGA CTTGATGGAG TCGAGTTGCA
181 GACTCCAATC CGGACTGAGA TAGGGTTTCT GGGATTGGCT TACCGTCGCC GGCTTGACGC
241 CCTCTGTCCC TACCATTGTA GTACGTGTGT AGCCCTGGCC GTAAGGGCCA TGATGACTTG
301 ACGTCATCCC CACCTTCCTC CGGTTTGTCA CCGGCGGTCT CCTAGAGTT CCCACCATT
361 CGTGCTGGCA ACTAAGGACA AGGGTTGCGC TCGTTGCGGG ACTTAACCCA ACATCTCACG
421 ACACGAGCTG ACGACAGCCA TGCAGCACCT GTGTTGAGT TCCCGAAGGC ACCAATCCAT
481 CTCTGGAAAG TTCTCGACAT GTCAAGGCCA GGTAAAGTTC TTCGCGTTGC ATCGAATTAA
541 ACCACATACT CCACCGCTTG TGGGGGCCCC CGTCAATTCC TTTGAGTTTC AGTCTTGCGA
601 CCGTACTCCC CAGGGGCGCA ACTTAACGCG TTAGCTTCGA TACTGCGTGC CAAATTGCAC
661 CCAACATCCA GTTCGCATCG TTTAGGGCGT GGAATACAG GGTATCTAAT CCTGTTTGCT
721 CCCACGCTT TCGTGCTCA GTGTCAATGT TGGTCCAGGT AGCTGCCTTC GCCATGGATG
781 TTCCTCCTGA TCTCTACGCA TTTCACTGCT ACACCAGGAA TTCGCTACC CTCTACCACA
841 TTCTAGTCGC TCAGTATCCA CTGCAGTTCC CAGGTTGAGC CCAGGGCTTT CACAACGGAC
901 TTAAACGACC ACCTACGCAC GCTTTACGCC CAGTAATTCC GAGTAACGCT TGCAACCTTC
961 GTATTACGCG GGCTGCTGGC ACGAAGTTAG CCGGTGCTTA TTCTTTGGT ACCGTCATCC
1021 CAACCGGGTA TTAACGAGCT GGATTCTTT CCCAACAAAA GGGCTTTACA ACCCGAAGGC
1081 CTTCTTCACC CACGCGGTAT GGCTGGATCA GGCTTGCGCC CATTGTCCAA TATTCCTCAC
1141 TGCTGCCTCC CGTAGGAGTC TGGACCGTGT CTCAGTTCCA GTGTGGCTGA TCATCCTCTC
1201 AGACCAGCTA CGGATCGTCC CTTGGTGGG CCTTTACCCC GCCAACTAGC TAATCCGAAA
1261 TCGGGTCATT CAATCGCGCA AGGGCCGAAA ATCCCTGCT TTTACCCGA GGGGCCGAA
1321 GCCGGTATAG CGGAAAGTTG CCTCCTTTT CCCACCCACC AGAAGATCTG CAGGATTTCT
1381 ACCCTGTCGG CTCATGCCCC CACAGAACAT CTTCTTTGT TGGTTGCAA CTAGTATGTT
1441 GGCCTCCCTA CGTTCCTTGG CTAGAAAAAA ACGTGTGCTT GATAT

```

**Gambar 3.** Hasil sekuensing gen 16S rRNA isolat 22.



Gambar 4. Pohon kekerabatan sekuen gen 16S rRNA isolat 22 (BLAST-NCBI).

## BAHASAN

*Stenotrophomonas maltophilia* mulai diteliti pada tahun 1966 oleh Stanier *et al.* dan termasuk dalam famili Xanthomonadaceae. Bakteri ini hingga tahun 1992 masih diperdebatkan apakah termasuk dalam genus *Pseudomonas* atau *Xanthomonas*. Akhirnya Palleroni dan Bradbury (1993) menggolongkan bakteri ini dalam genus baru, yaitu *Stenotrophomonas*. Berdasarkan pohon filogenetik isolat 22, *Stenotrophomonas maltophilia* strain G7 terdapat dalam cluster yang 87 sama dengan *Xanthomonas* sp., dan *Pseudomonas* sp. Hal ini membuktikan adanya kemiripan sifat *Stenotrophomonas* sp. dengan *Xanthomonas* sp., dan *Pseudomonas* sp. sehingga para peneliti jaman dahulu memperdebatkan golongan bakteri tersebut. Penelitian oleh Pages *et al.* (2008) menunjukkan bahwa *Stenotrophomonas* sp. sering ditemukan di tanah terutama *rhizosphere* tanaman. Selain itu, bakteri ini memiliki sifat resistensi terhadap beberapa jenis logam berat, yaitu tembaga, platinum, merkuri, emas, kadmium, timbal, kromium, perak, dan garam selenium (Pages *et al.*, 2008).

Sampai saat ini, mekanisme resistensi *Stenotrophomonas maltophilia* terhadap Hg masih diteliti dan disebut terkait erat dengan sifat resistensi antibiotiknya. Kemungkinan *Stenotrophomonas* sp. memiliki karakteristik untuk mentransformasi Hg menjadi bentuk yang lebih tidak berbahaya (Pages *et al.*, 2008) yaitu bentuk elemennya ( $Hg^0$ ) oleh *mer* operon yang terdapat pada transposon, plasmid, ataupun kromosom bakteri. Operon ini memiliki banyak fungsi gen disamping gen peregulasinya. *merT* dan *merP* mengkode dua transporter yang bertanggung jawab untuk mengangkut  $Hg^{2+}$  ke dalam sitoplasma dan *merA* (*mercuric ion reductase*) akan mereduksi  $Hg^{2+}$  ke bentuk merkuri yang lebih tidak berbahaya ( $Hg^0$ ) dan nantinya akan terdifusi keluar dari sel melalui membran sel (Stenzler, 2017; Roane & Pepper, 2000).

Menurunnya laju pertumbuhan bakteri yang resisten akan keberadaan logam berat saat berada pada kondisi terpapar oleh logam berat tersebut dikarenakan pada kondisi tersebut sel bakteri menghadapi toksisitas logam Hg dan berusaha mendetoksifikasinya. Medium yang mengandung Hg merupakan kondisi pertumbuhan yang stres bagi sel bakteri yang resisten akan keberadaan Hg (Nascimento *et al.*, 2003; Pages *et al.*, 2008).

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian identifikasi isolat 22 melalui hasil sekuensing gen 16S rRNA, menunjukkan bahwa isolat ini paling dekat kekerabatannya dengan *Stenotrophomonas maltophilia* strain G7 (*identity* 99% dan *query covered* 90%). Profil pertumbuhan isolat 22 pada media dengan kadar logam merkuri (II) 50 dan 100 ppm sangat baik. Semakin tinggi konsentrasi merkuri pada media, semakin lama fase lag/adaptasinya walaupun jumlah sel dalam media tetap.

## PUSTAKA ACUAN

- Barkay, T., Miller, S.M., dan Summers, A.O. 2003. *Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems*. Elsevier. FEMS Microbiology Review 27, 355-384
- Dash, H. R. dan Das, S. 2012. *Bioremediation of Mercury and the Importance of Bacterial mer Genes*. International Journal of Biodeterioration and Biodegradation 75, 207-213.
- Devereux, R., dan Wilkinson, S. S. 2004. *Amplification of Ribosomal RNA Sequences*. Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition 3.01,
- Gregoire, D.S, Janssen, S.E., Lavoie, N.C., Tate, M.T. dan Poulain, A.J. 2021. Stable isotope fractionation reveals similar atomic level control during aerobic and anaerobic microbial Hg transformation pathways. Applied and Environmental Microbiology 87 (18)
- Huang, C. C., Chien, M. F., Lin, K. H. 2010. *Bacterial mercury resistance of TnMER1 and its application in bioremediation*. Environmental Chemistry 3, pp. 23-29.
- Nascimento, A. dan Chartone-Souza, E. 2003. *Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments*. Genetics and Molecular Research 2, 92-101.
- Pages, D., Rose, J, Conrod, S, Cuine, S, Carrier, P, Heulin, T and Achouak, W. 2008. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. PLoS One 3(2): 1539
- Palleroni, N.J and Bradbury, J.F. 1993. International Journal of Systematic Bacteriology 43, 606-609
- Roane, M. T. dan Pepper, I. 2000. *Microorganism and Metal Pollution in Environmental Microbiology*. London: Academic Press.
- Setiabudi, B. T. 2005. *Penyebaran Merkuri Akibat Usaha Pertambangan Emas di Daerah Sangon, Kabupaten Kulon Progo, D. I. Yogyakarta*. Kolokium Hasil Lapangan-DIM.
- Stenzler, B, Hinz, A, Ruuskaden, M. dan Poulain, A.J. 2017. Ionic strength differentially affects the bioavailability of neutral and negatively charged ionic Hg complexes. Environmental Science and Technology 51, 9653-9662
- Wang, Y, Janssen, S.E., Schaefer, J.K, Yee, N, dan Reinfelder, J.R. 2020. Tracing the uptake of Hg(II) in an Iron reducing bacterium using mercury stable isotope. Environmental Science and Technology Letter 7, 573-578
- Widiyanti, A., Maya S., Nengah Dwianita K. 2011. *Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Resistensi Merkuri Di Hilir Kali Mas Surabaya*. Surabaya: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.
- Wiyono, C. D. A. P. 2015. *Isolasi Gen Pengkode Enzim Pereduksi Logam Merkuri*. Skripsi. Universitas Surabaya. Surabaya.