

DETEKSI GEN BAKTERI RESISTEN TEMBAGA ASAL TAILING PTFI

Maria Massora ¹⁾, Erni Martani ²⁾, Eko Sugiharto ³⁾, Roberth Sarwom ⁴⁾ Tumpal Sinaga ⁴⁾ Jance Murdjani Supit ⁵⁾ Maria Justina Sadsoeitoeboen ¹⁾ Sartji Taberima ⁶⁾

¹⁾ Prodi Biologi FMIPA Unipa; email: m.massora@unipa.ac.id

²⁾ Fakultas Pertanian UGM

³⁾ Fakultas MIPA UGM

⁴⁾ Departement Environmental PTFI

⁵⁾ Fakultas Teknik Pertambangan dan Perminnyakan Unipa

⁶⁾ Fakultas Pertanian Unipa

ABSTRAK

Gen yang mengkode resistansi tembaga pada bakteri sering terdapat pada plasmid dan diorganisasikan dalam operon. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi DNA plasmid dan mendeteksi gen yang mengkode resistensi bakteri terhadap tembaga. Amplifikasi gen resisten menggunakan primer CopA. Gen *CopA* berhasil diamplifikasi dalam plasmid Isolat EC38, Isolat FC40, Isolat HC43, dan Isolat CC53 ini menunjukkan bahwa salah satu penentuan resistensi tembaga isolat bakteri uji diduga dikodekan dalam plasmid.

Kata kunci: Bakteri resisten tembaga, Gen, Primer CopA, Amplifikasi, Tailing

PENDAHULUAN

Mekanisme resistensi oleh empat isolat unggul bakteri resisten tembaga pembentuk biofilm yang diisolasi dari *tailing* PT Freeport Indonesia adalah mekanisme akumulasi tembaga di dalam sel, dan pengikatan tembaga di luar sel. Mekanisme akumulasi di dalam sel yaitu dengan mengakumulasi tembaga pada sitoplasma dan mekanisme pengikatan tembaga di luar sel yaitu dengan

mengikat tembaga pada dinding sel dan biofilm. Kemampuan isolat bakteri resisten tembaga pembentuk biofilm dalam mengakumulasi tembaga pada sitoplasma, dinding sel dan biofilm tertinggi pada isolat CC53 adalah 77,47% (Massora *et al.*, 2017a; Massora *et al.*, 2017b).

Isolasi DNA plasmid dan deteksi gen yang mengkode resistensi bakteri terhadap tembaga dilakukan pada

penelitian ini. Amplifikasi gen resisten menggunakan primer CopA. Deteksi Plasmid Bakteri Resistensi Tembaga, pernah dilakukan pada isolat dari Lumpur Aktif Pengolahan Limbah Industri Rungkut, Surabaya (Irawaty *et al.*, 2016). Penelitian tentang isolasi plasmid, deteksi gen resistensi tembaga dan uji kemampuan akumulasi tembaga oleh isolat bakteri asal *tailing* PTFI belum pernah dilakukan.

METODE

Isolasi DNA Plasmid

Isolasi plasmid dilakukan dengan *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit*. Kultur 5 mL dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm. Pelet sel yang diperoleh diresuspensi dengan 250µL *Resuspension Buffer* (R3) dan RNase sampai homogen. Ditambahkan 250µL *Lysis Buffer* (L7), dihomogenkan, lalu ditambahkan 350µL *Precipitation Buffer* (N4), dihomogenkan lagi. Setelah homogen dilakukan sentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke *spin column* dalam *microtube* 2 mL. Dilakukan sentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Setelah supernatan dibuang,

spin column ditempatkan dalam *microtube* 2 mL ditambahkan dengan 700µL *Wash Buffer* (W9) dan etanol. Disentrifuse lagi, Supernatan dibuang kemudian *spin column* dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL. Tambahkan 75µL *Buffer TE*, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit kemudian sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Setelah sentrifus *spin column* dibuang dan plasmid yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C atau 20°C untuk penyimpanan dalam waktu yang lama.

Amplifikasi Gen Resistensi Tembaga

Primer yang digunakan dalam amplifikasi ini adalah daerah gen resistensi tembaga pada *Acinetobacter* sp (Irawati *et al.*, 2016). Primer *forward* memiliki urutan basa CopA (5'-TAG AGC AGA TGG CAA TGA ATC GCC CAT-3') dan untuk Primer *Reverse* memiliki urutan basa CopA (5'- AGT TGG AAG AGG GGG ATG AAG CTG TTA TTC- 3'). Campuran reaksi PCR (25µL) terdiri dari *Ready To Go Mixture*, DNA cetakan (1µL) primer *Forward* (1µL), Primer *Reverse* (1µL), dan ddH₂O (22µL).

Campuran reaksi tersebut diamplifikasi dengan mesin PCR dengan kondisi pre-denaturasi PCR suhu 95°C selama 10 menit, denaturasi suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* suhu 64°C selama 1,5 menit, *extention* suhu 72°C selama 1 menit. *Post extention* selama 2 menit suhu 72°C dan *cooling* suhu 4°C, dengan total 35 siklus. Setelah reaksi PCR selesai dilakukan, gen CopA dielektroforesis pada agarose 1% dan menggunakan marker λ DNA/HindIII.

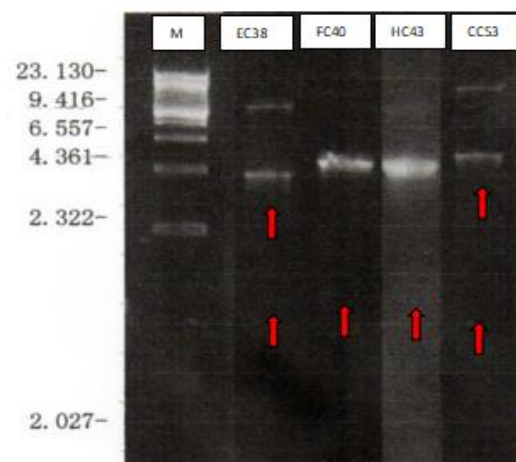
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA Plasmid

Plasmid adalah DNA ekstrakromosomal yang dijumpai pada mikroba (Madigan *et al.*, 2000). Plasmid umumnya, mengkode gen-gen yang diperlukan agar dapat bertahan pada kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan. Plasmid juga membantu bakteri untuk mendapatkan mekanisme toleransi dan ketahanan terhadap logam berat atau zat beracun lainnya di lingkungan. Penelitian tentang plasmid memberikan informasi tentang ekologi plasmid dan kontribusinya terhadap adaptasi genetik mikroba dalam lingkungan

(Zolgharnein, *et al.*, 2007). Pada penelitian ini diduga gen penyandi resistensi terhadap Cu pada isolat terpilih terdapat dalam plasmid bakteri terkait.

Bakteri yang diisolasi dari *tailing* PTFI yang telah di uji kemampuan resistensinya terhadap tembaga, dan mempunyai kemampuan membentuk biofilm sedang dan kuat, selanjutnya dilakukan isolasi plasmid. Hasil elektroforesis profil plasmid terhadap 4 isolat: Isolat EC38, FC40, HC43, dan CC53 (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil isolasi DNA plasmid.
Keterangan: ↑ Pita DNA plasmid

Hasil visualisasi plasmid pada agarose (Gambar 1), menunjukkan bahwa ukuran molekul DNA plasmid isolat EC38 yang berhasil diisolasi ada 2 pita yang berukuran sekitar 4 dan 9 kb. Isolat FC40 dan HC43 memiliki 1 pita dengan ukuran yang

sama sekitar 4 kb, sedang isolat CC53 juga memiliki 2 pita dengan ukuran sekitar 5 dan 10 kb. Hasil tersebut ditunjukkan oleh pendaran pita DNA pada gel agarose. Menurut Zholgharnein *et al.* (2007), dalam satu sel, dapat ditemukan lebih dari satu plasmid dengan ukuran yang sangat bervariasi.

Kehadiran plasmid diduga terkait dengan kemampuan Isolat EC38, FC40, HC43 dan CC53 yang mampu tumbuh pada medium yang mengandung CuSO_4 400-500 mg/L. Menurut Orell *et al.* (2010), nilai konsentrasi penghambatan minimum untuk logam bergantung pada media pertumbuhan dan metodologi yang digunakan, selain itu juga tergantung pada sumber isolat. Isolat yang diisolasi dari lingkungan pertambangan memiliki nilai yang tinggi. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* DSM 9293 yang diisolasi dari lingkungan pertambangan mampu hidup pada 300 mM Cu (Watkin *et al.*, 2008).

Tingginya tingkat ketahanan terhadap logam mencerminkan respons adaptif terhadap kehadiran unsur beracun di lingkungan. Gen

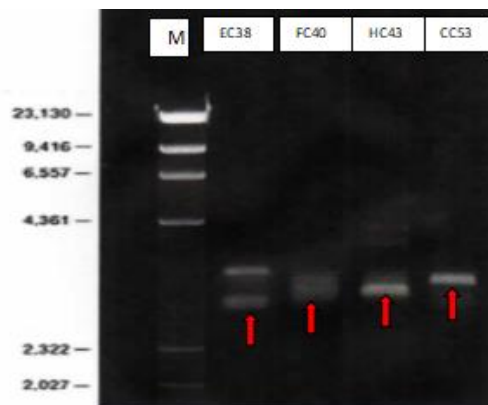
resistensi tembaga sering ditemukan pada plasmid dan transposon (Li *et al.*, 2015). Ini bisa dijadikan indikator untuk mengetahui aktivitas bakteri dalam menghilangkan kontaminasi tembaga dari lingkungan (Roosa *et al.*, 2014).

Bakteri mampu menyerap tembaga dan mendetoksifikasi ion tembaga yang ada dalam limbah industri, oleh karena itu bakteri berpotensi sebagai agen bioremediasi lingkungan. Spesies bakteri seperti *Pseudomonas*, telah terbukti relatif efisien dalam bioakumulasi uranium, tembaga, timbal, dan ion logam lainnya dari limbah tercemar (Zolgharnein *et al.*, 2007). Satu jenis bakteri bisa memiliki lebih dari satu mekanisme resistensi. Hal ini memungkinkan bakteri untuk bertahan hidup dalam lingkungan pertambangan yang memiliki kandungan logam berat yang tinggi (Orell *et al.*, 2010).

Amplifikasi gen *CopA*

Gen yang mengkode resistansi tembaga pada bakteri sering terdapat pada plasmid dan diorganisasikan dalam operon. Gen *CopA* berhasil diamplifikasi dalam plasmid Isolat EC38, Isolat FC40, Isolat HC43, dan

Isolat CC53 (Gambar 2), ini menunjukkan bahwa pita tunggal pada isolat FC40, HC43 dan CC53 dengan ukuran molekul kira-kira 3 kb, sedang pada isolat EC38 ada 2 pita dengan ukuran molekul berbeda yaitu sekitar 3 dan 4 kb (Gambar 2).



Gambar 2 DNA plasmid setelah diamplifikasi dengan primer Cop A
Keterangan: ↑Pita Gen CopA

Sebagian besar bakteri yang menunjukkan kemampuan resistensi terhadap Hg, Pb, Cu, Cd memiliki plasmid dengan ukuran molekul berbeda (Zolgharnein *et al.*, 2007 ; Zaman *et al.*, 2010). Salah satu penentuan resistensi tembaga isolat bakteri uji diduga dikodekan dalam plasmid.

Zolgharnein *et al.* (2007) berhasil mengisolasi 35 isolat bakteri resisten logam berat daerah industri.

Plasmid yang terisolasi dari 35 isolat tersebut dibagi menjadi tiga ukuran yaitu plasmid ukuran kecil (2-4 kb), sedang (10-16 kb) dan besar (38-62 kb). Dengan demikian plasmid bakteri resisten tembaga yang diisolasi dari *tailing* termasuk dalam kategori plasmid berukuran kecil.

Kehadiran Gen *CopA* dalam plasmid memungkinkan Isolat EC38, Isolat FC40, HC43 dan CC53 mampu tumbuh pada konsentrasi CuSO_4 400 - 500 mg/L (Tabel 4.5). Sebelumnya dilaporkan bahwa mekanisme resistansi tembaga pada plasmid isolat *Acinetobacter sp. IrC* berhasil diamplifikasi dengan menggunakan gen *CopA* (Irawati *et al.*, 2016). Gen *CopA* hasil amplifikasi ini mirip dengan gen *CopA* pada *P. syringae* pv. Tomato (Cha dan Cooksey, 1992).

Gen *CopA* mengkodekan protein periplasma kaya metionin yang mampu mengikat hingga 11 atom tembaga di *P. syringae* pv. Tomato (Cha dan Cooksey, 1991). Menurut Solioz *et al.* (2010) *CopA* pada *P. aeruginosa* berfungsi mencegah akumulasi tembaga pada sitoplasma dengan memanfaatkan energi yang berasal dari hidrolisis ATP untuk

memompa Cu (I) melintasi sel membran. Pada bakteri Gram-positif, tembaga diekspor ke seluruh plasma membran sedangkan pada bakteri Gram-negatif, tembaga diekspor ke bagian dalam membran ke ruang periplasmik (Arguello, 2011).

Sebagain bakteri yang hidup dalam lingkungan terkontaminasi logam berat baik itu pada limbah industri, perairan ataupun tanah menunjukkan sifat resistensi. Mekanisme resistensi tersebut terkait dengan gen yang ada pada kromosom, plasmid dan transposon. Gen itu diantaranya Gen *Cop-operon* untuk resistensi terhadap Cu, *CadA-operon* untuk logam Cd dan Gen *mer-operon* untuk resistensi terhadap Hg (Silver, 1996; Bruins *et al.*, 2000).

Desain primer merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan gen target dalam PCR. Primer yang pendek memberikan spesifitas yang tinggi pada amplifikasi menggunakan template pendek seperti DNA plasmid (Howe, 2007). Tetapi primer yang terlalu pendek juga menyebabkan hibridisasi ke bagian yang bukan target sehingga menghasilkan produk

amplifikasi yang tidak diinginkan (Brown, 2010).

SIMPULAN

Amplifikasi gen *CopA* pada plasmid menunjukkan adanya DNA pita tunggal pada isolat FC40, HC43 dan CC53 dengan ukuran molekul kira-kira 3 kb, sedang pada isolat EC38 ada 2 pita dengan ukuran molekul berbeda yaitu sekitar 3 dan 4 kb. Kehadiran Gen *CopA* dalam plasmid memungkinkan Isolat EC38, Isolat FC40, HC43 dan CC53 mampu tumbuh pada konsentrasi CuSO₄ 400 - 500 mg/L

DAFTAR PUSTAKA

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M., 2017, "Application of microorganisms in bioremediation-review", *Journal of Environmental Microbiology*, 1(1):02-09.
- Alloway, B. J., 1995, *Heavy Metals in Soils*, London : Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, 368 p.
- Arguello, J. M., Gonzalez-Guerrero, M., and Raimunda, D., 2011, "Bacterial transition metal P1B-ATPases: transport mechanism dan roles in virulence," *Biochemistry*, 50: 9940–9949.
- Atlas, R.M., 1995, "*Handbook of Media or Environmental Microbiology*", CRC Press. New York. pp: 63, 211.

- Atlas, R. M., and Bartha, 1998, *Microbial Ecology*, California: Benjamin/ Cummings Science Publishing.
- Bradl, H.B., 2005, *Heavy Metal in The Environment*, Elsevier Academic Press. Oxford.
- Brown, T. A., 2010, *Gene Cloning and DNA Analysis*, 6th Edition. Wiley Blackwell, UK
- Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W, 2000, “Microbial resistance to metals in the environment”, *Ecotoxicol. Environ.*, 45:198-207.
- Cervantes, C., and Gutierrez-Corona, F., 1994, “Copper Resistance Mechanisms in Bacteria and Fungi”, *FEMS Microbiology Reviews*, 14:121-138.
- Cha, J.S., and D.A. Cooksey.,1991, “Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(20): 8915–8919.
- Cha, J.S., and D.A. Cooksey.,1992, “Copper Hipersensitiviy dan Uptake in *Pseudomonas syringae* Contained Cloned Component of The Copper Resistance Operon”, *Appl. Environ. Microb*, 59(5) : 1671-1674.
- Chojnacka, K., 2010, “Biosorption and Bioaccumulation-The Prospects for Practical”, *Applications. Environment International*, 36: 299-307.
- Cokksey, D.A., 1994, “Molecular Mechanisms of Copper Resistance and Accumulation in Bacteria”, *FEMS Microb. Rev.*, 14 : 381-386.
- Cokksey, D.A. dan Azad, H.R., 1992, “Accumulation of Copper dan Other Copper Resistance Plant Patogenic and Saprophytic *Pseudomonas*”, *Appl. Environ. Microb.*, 58(1) : 274 -278.
- Djuuna, I.A.F., Massora, M., and Puradyatmika, P., 2011, “Soil Microorganisms Numbers In The *tailing* Deposition ModADA Areas of Freeport Indonesia, Timika, Papua”, *Biodiversitas*, 12(4): 198-203.
- Howe, C., 2007, *Gene Cloning and Manipulation*, Cambridge Univrsity Prees, New York.
- Irawati, W., Yuwono, T., and Rusli, A., 2016, “Detection of plasmids and curing analysis in copper resistant bacteria *Acinetobacter* sp. IrC1, *Acinetobacter* sp. IrC2, dan *Cupriavidus* sp.”, *Jurnal Biodiversitas*, 17(1): 296-300.
- Ji, G.,and Silver, S., 1995, “Bacterial Resistance Mechanisms for Heavy Metal of Environmental Concern”, *J. Bacteriol*, 145 :1365 – 1373.
- Magnani D., and Solioz, M.2007. “*How Bacteria Handle Copper*”. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 259-285.
- Massora, M., Martani, E., Sugiharto, E., Sarwom, R., and Sinaga, T., 2017a, “Biofilm formation analysis and molecular identification of copper-resistant bacteria isolated from PT Freeport Indonesia’s tailings”, *I. J.Biotech*. 22(1): 6-12.
- Massora, M., Martani, E., Sugiharto, E., Sarwom, R., dan Sinaga, T., 2017b, “Seleksi Material Penempelan Biofilm Isolat Bakteri Resisten Tembaga asal

- PT. Freeport Indonesia”, *Jurnal BioWallacea* 4(1):527-532.
- Outten, F.W., Outten, C.E., Hale, J.A., and O’Halloran, T.V., 2000, “Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR”, *J. Biol. Chem.*, 275:31024–31029.
- Osredkar J., and Suskar, N., 2011, “Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper / Zinc Imbalance”, *J. Clin. Toxicol.* 3: 1-18.
- Padilla-Benavides T.,Thompson, A. M. G., McEvoy, M. M., and Arguello, J. M., 2014, “Mechanism of ATPase-mediated Cu⁺ export and delivery to periplas chaperones: the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF”, *J. Biol. Chem.*, 289(30) :20492–20501.
- Puig, S., Rees, E.M., and Thiele, D.J., 2002, “The ABCDs of periplasmic copper trafficking”, *Structure*, 10:1292–1295.
- Rademacher, C., and Masepohl, B., 2012, “Copper-responsive gene regulation in bacteria”, *Microbiology*, 158: 2451–2464.
- Roosa, S.,Wattiez,R.,Prygiel,E., Lesven,L., Billon,G., and Gillan, D.C., 2014,“Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sedimen”, *Environmental Pollution*, 189 : 143-151.
- Roy, S., and Ganguly, S., 2015, “Bioremediation Activity of Microorganisms in Soil Environment Contaminated by Heavy Metals”, *J. Biol. Chem. Research*, 32: 323-330.
- Sarma, R. K., Handique, P. J., and Saikia, R., 2014, “Genetic diversity of fluorescent Pseudomonads isolated from green gram rhizosphere”, *Plant Soil* 377 (1-2): 111-126.
- Saxena, D., Joshi, N., and Srivastava, S., 2002, “Mechanism of Copper Resistance in a Copper Mine Isolate *Pseudomonas putida* Strain S4”, *Current Microbiology*, 45: 410-414.
- Seminar Bioteknologi IV: Isolasi dan Seleksi Bakteri Resisten Tembaga dari tailing PT Freeport Indonesia, 2016, Massora, M., Martani, E., Sugiharto, E., Sarwom, R., dan Sinaga, T. Yogyakarta, PS Biotechnology, UGM.
- Silver, S., 1992, “Plasmid Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview”, *Plasmid*. 27 : 1- 3.
- Silver, S., 1996, “Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions- a review ”, *Gene*. 179: 9.
- Silver, S., and Walderhaug, W.,1992, “Gene Regulation of Plasmid and Chromosom Determined Inorganic Ion Transport in Bacteria”, *Microb. Review*. 56 : 195 – 228.
- Smaldone, G. T., and Helmann, J. D., 2007, “CsoR regulates the copper efflux operon copZA in *Bacillus subtilis*”, *Microbiology*, 153:4123–4128.
- Smejkalova, M., Mikanova, O., and Boru°vka, L., 2003, “Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil Microorganisms”, *Plant Soil Environ.*, 49: 321–326.
- Vega, F.A., Covelo, E.F., and Andrade, M., 2006,

- “Competitive sorption dan desorption of heavy metals in mine soils: Influence of mine soil characteristics”, *J. Colloid Interface Sci.* 298:582-592.
- Vieira, R.H., and Volesky, B., 2000, “Biosorption: a solution to pollution”, *Internatl. Microbiol.*,3: 17-24.
- Zolgharnein, H., Azmi, M. L. M., Saad, M. Z., Mutalib, A. R., and Mohamed, C. A. R., 2007. “Detection of plasmid in heavy metal resistance bacteria isolated from the Persian Gulf and enclosed industrial areas”. *Iranian J. Biotech*, 5 (4): 232-239.