

Amplifikasi Gen Resistensi Tembaga (Cu^r) pada Bakteri yang Diisolasi dari Limbah Industri di Surabaya

Amplification of Copper-Resistance Gene in Bacteria Isolated from An Industrial Sewage in Surabaya

WAHYU IRAWATI

Departemen Pendidikan Biologi, Universitas Pelita Harapan
M.H. Thamrin Boulevard 1100, Lippo Karawaci, Tangerang 15811, Banten, Indonesia
Email: w.irawati3@gmail.com

ABSTRACT

*Copper pollution is one of the serious environmental problems in Indonesia. Higher concentration of copper is toxic so that threat living organism. Bio-remediation using copper resistant bacteria is effective for solving heavy metals pollution because the bacteria adapt easily when applied in environment. Using bacteria containing gene encoded copper resistance could help effort of copper bio-remediation. The purpose of this research is to isolate and characterize copper resistant bacteria from industrial sewage in Surabaya also to amplification of gene encoded resistance to copper (Cu^r). Bacteria was grown on Salts Base Solution medium with addition of appropriate concentration of copper. Resistance to copper was determined based on Minimum Inhibitory Concentration of CuSO₄. Molecular characterization was done based on 16S rDNA gene analysis using universal primer. Amplification of Cu^r gene was done using specific primer of gene orf3, orf4, orf5 from *Lactococcus lactis*. Three highly copper resistant bacteria have been isolated with the MIC of 2.5-7.5 mM CuSO₄ encoded IrC1, IrC2, and IrC4. Isolate IrC4 is the highest copper resistant bacteria with the MIC of 7.5 mM. Resistance mechanism may be through accumulation copper inside the cells with the total of 371 mg/g dry weight of cells. The three bacteria have plasmid with the size of 21 kb. Isolate IrC4 have 96.99% similarity with *Cupriavidus pauculus*. Amplification of copper-resistance (Cu^r) gene demonstrated that a single band of 0.9 kb was obtained from isolate C4. The finding of indigenous resistant bacteria encoded Cu^r gene may give better solution for pollution problem in Indonesia.*

Keywords: *bacteria, copper, Isolate IrC4, Lactococcus lactis, resistant*

ABSTRAK

Pencemaran tembaga di Indonesia merupakan salah satu masalah lingkungan yang serius sehingga perlu diatasi. Tembaga pada konsentrasi yang tinggi bersifat toksik sehingga mengancam kehidupan organisme. Bioremediasi menggunakan bakteri resisten tembaga yang diisolasi dari lingkungan tercemar terbukti efektif mengatasi pencemaran logam berat karena lebih mudah beradaptasi ketika diterapkan di lingkungan. Pemanfaatan bakteri yang mengandung gen penyandi resistensi tembaga dapat menunjang keberhasilan usaha bioremediasi tembaga. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri resisten tembaga dari limbah industri di Surabaya serta melakukan amplifikasi gen yang menyandi resistensi bakteri tersebut terhadap tembaga (Cu^r). Isolasi bakteri dilakukan menggunakan medium *Salt Base Solution* dengan penambahan CuSO₄. Uji resistensi ditentukan berdasarkan nilai *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* terhadap CuSO₄. Karakterisasi molekular dilakukan berdasarkan analisis gen 16S rDNA menggunakan primer universal. Amplifikasi gen Cu^r dilakukan dengan menggunakan primer yang spesifik terhadap gen orf3, orf4, orf5 dari gen Cu^r pada *Lactobacillus lactis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat tiga isolat bakteri yang paling resisten dengan nilai MIC= 6.5-7.5 mM, yaitu isolat IrC1, IrC2, dan IrC4. isolat IrC4 merupakan isolat bakteri yang paling resisten dengan nilai MIC sebesar 7.5 mM. Mekanisme resistensi isolat IrC4 adalah dengan cara mengakumulasi tembaga di dalam sel selitar 371 mg/g berat kering sel. Ketiga isolat memiliki plasmid berukuran sekitar 21 kb. Analisis gen 16S rDNA menunjukkan bahwa isolat IrC4 memiliki kemiripan 96,99% dengan *Cupriavidus pauculus*. Gen Cu^r pada isolat IrC4 sepanjang 0.9 kb berhasil diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik gen orf3 yang menyandikan pengikatan tembaga. Penemuan bakteri indigen indonesia yang menyandikan gen resisten tembaga diharapkan dapat menunjang keberhasilan penanganan masalah pencemaran tembaga di Indonesia.

Kata kunci: bakteri, isolat IrC4, *Lactobacillus lactis*, resisten, tembaga.

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tembaga merupakan salah satu polutan yang banyak terdapat di alam akibat aktivitas industri. Tembaga pada konsentrasi yang tinggi bersifat toksik karena membentuk ion yang mudah diserap organisme. Tembaga tidak dapat didegradasi sehingga terakumulasi di alam dan melalui rantai makanan dapat dikonsumsi oleh organisme laut dan manusia⁽¹⁾. Beberapa lokasi perairan di Indonesia telah tercemar tembaga yang melebihi ambang batas sehingga menyebabkan kematian organisme di laut dan berdampak pada timbulnya penyakit pada manusia⁽²⁾.

Bakteri diciptakan dengan struktur yang mendukung fungsinya agar dapat digunakan sebagai agen bioremediasi tembaga. Bakteri dapat diisolasi dari alam dan digunakan berulang kali untuk mengatasi pencemaran lingkungan. Struktur bakteri diperlengkapi sedemikian rupa sehingga dapat bertahan hidup di lingkungan tercemar dengan melakukan akumulasi tembaga sehingga kondisi ini dapat dimanfaatkan sebagai biosorben tembaga⁽³⁾. Bakteri resisten tembaga dapat diisolasi dari lingkungan tercemar dan sangat potensial diterapkan sebagai agen bioremediasi tembaga⁽⁴⁾.

Beberapa bakteri alami Indonesia berhasil diisolasi dari daerah tercemar dan memiliki kemampuan akumulasi tembaga. Bakteri ini dapat bertindak sebagai biosorben sehingga dapat menyisihkan tembaga dari lingkungan⁽⁵⁾. Populasi bakteri di daerah yang tercemar logam berat akan mengembangkan suatu proses adaptasi untuk menjadi resisten terhadap logam berat. Salah satu mekanisme resistensi yang dilakukan oleh bakteri terhadap logam berat adalah dengan cara mengakumulasi baik secara aktif (bioakumulasi) maupun secara pasif (biosorpsi) sehingga terjadi penurunan konsentrasi logam berat di lingkungan⁽⁶⁾. Kemampuan bakteri dalam mengakumulasi maupun melakukan biosorpsi tembaga merupakan bentuk resistensi bakteri yang dikendalikan oleh gen pada kromosom maupun plasmid⁽⁷⁾.

Resistensi bakteri terhadap tembaga banyak dijelaskan pada *Escherichia coli*⁽⁸⁾, *Pseudomonas syringae*⁽⁹⁾, *Xanthomonas campestris*, *Lactococcus lactis*⁽¹⁰⁾, dan *Acinetobacter* sp. IrC1⁽⁷⁾. Resistensi *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* disandikan oleh gen yang berada di plasmid⁽⁹⁾. Sistem resistensi tersebut terdiri atas empat gen, yaitu *copA*, *copB*, *copC*, dan *copD*, yang terorganisasi dalam operon *cop*⁽¹²⁾. Sistem resistensi tembaga pada *X. campestris* pv. *juglandis* berada di kromosom, terdiri atas empat *open reading frame* (ORF), yaitu *ORF1*, *ORF2*,

ORF3, dan *ORF4*⁽⁹⁾. Resistensi *Escherichia coli* dikendalikan oleh plasmid konjugatif pRJ1004 yang tersusun atas enam gen struktural, yaitu *pcoA*, *pcoB*, *pcoC*, *pcoD*, *pcoR*, dan *pcoS*⁽¹³⁾. Resistensi *L. lactis* dikendalikan oleh plasmid yang terdiri dari tiga gen struktural, yaitu *orf3*, *orf4*, dan *orf5*⁽¹⁴⁾. Sistem resistensi antar bakteri tersebut mempunyai keserupaan satu dengan yang lain pada tingkat asam amino maupun DNA sehingga mengakibatkan gen Cu^r suatu bakteri dapat dideteksi dengan menggunakan metode hibridisasi maupun PCR⁽¹⁵⁾.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri resisten tembaga dari limbah industri di Surabaya dan melakukan amplifikasi gen yang menyandi resistensi bakteri tersebut terhadap tembaga (Cu^r).

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

2.1.1 Medium Salt Base Solution (SBS)

Medium SBS terdiri atas : K_2HPO_4 (1,5 g), KH_2PO_4 (0,5 g), $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 g), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (0,2 g), dan ekstrak khamir (5 g), dilarutkan dalam 1000 ml akuades. Medium padat dibuat dengan menambahkan 1,5 % agar oxoid. Medium disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit. Suplemen medium berupa $CuSO_4$, dibuat dengan konsentrasi 1 M, dan disterilkan dengan membran 0,2 μm ⁽¹⁶⁾.

2.1.2 Primer 16S rDNA

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rDNA adalah posisi 1482 sampai 1507 gen 16S rRNA *Escherichia coli*⁽¹⁷⁾. Primer *forward* (F) memiliki urutan basa 5' TGGCTCAGAACGAACG CTGGCGGC-3' (posisi 20 sampai 43 gen 16S rRNA dan primer *reverse* (R) memiliki urutan basa 5'-TACCTTGTTACGACTTCACCC CAGTC-3'. Konsentrasi primer dalam larutan adalah 10 μM , sedangkan konsentrasi akhir per reaksi adalah 0,4 μM .

2.1.3 Primer gen Cu^r

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen Cu^r terdiri atas : *orf3F* (5' CTC CCC TAT TGT GGT TCA TTG G 3'), *orf3R* (5' GCA TAG GGA GCG ATA GAG G 3'), *orf4F* (5' ACT ATG GAC AAG TTA TCG G 3'), *orf4R* (5' GGA CCT ATC GGC TTA ATC G 3'), *orf5F* (5' CAT AAC GAT TAA GCC GAT AG 3'), dan *orf5R* (5' ACT TCT CCA TTG ATC ATC TC 3'). Primer tersebut dapat mengamplifikasi gen Cu^r pada *L. lactis*⁽¹⁴⁾. Campuran reaksi PCR (25 μl) terdiri dari DNA cetakan (100 ng), primer *Forward*

(0,4 μ M), primer *Reverse* (0,4 μ M), dNTP (200 μ M), 1X bufer PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 50 mM KCl ; 0,1% gelatin dan 3,5 mM $MgCl_2$), ddH₂O, dan enzim *Taq* DNA polimease (5 U/ μ l).

2.2 Metode

2.2.1 Isolasi dan karakterisasi Bakteri resisten tembaga

Bakteri resisten tembaga diisolasi dari lumpur aktif pusat pengolahan limbah industri di Surabaya. Sampel sebanyak 1 gram masing-masing diinokulasikan kedalam 100 ml medium SBS cair yang diberi $CuSO_4$ dengan konsentrasi yang bervariasi, yaitu 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, dan 6 mM. Sampel diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 hari dengan penggojogan 175 rpm kemudian diinokulasikan secara tuang permukaan ke dalam medium padat yang mengandung $CuSO_4$. Koloni bakteri yang tumbuh diseleksi, dan masing-masing koloni tunggal disub-kultur pada medium yang mengandung $CuSO_4$ hingga menjadi isolat murni⁽¹⁶⁾.

2.2.2 Pertumbuhan bakteri dan kemampuan akumulasi tembaga

Kultur bakteri diamati tiap jam dengan mengukur kekeruhan sel (*optical density/OD*), menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Kultur bakteri dipanen dengan sentrifugasi pada 13.800 x g, 4°C selama 20 menit. Sel dicuci beberapa kali dengan bufer fosfat pH 7. Sel yang telah diketahui berat keringnya, didestruksi dengan HNO_3 , dan konsentrasi tembaga yang diikat oleh sel dianalisis dengan *atomic absorption spectrophotometer* pada panjang gelombang 324,9 nm.

2.2.3 Uji resistensi

Resistensi bakteri terhadap tembaga ditentukan berdasarkan nilai MIC. Koloni bakteri diinokulasikan ke dalam medium LB padat yang diberi $CuSO_4$ konsentrasi tertentu kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama dua hari. Koloni yang tumbuh diuji lagi pada konsentrasi $CuSO_4$ yang lebih tinggi hingga isolat bakteri tidak mampu tumbuh⁽⁵⁾. Bakteri yang paling resisten dipilih dan digunakan untuk isolasi plasmid dan analisis gen 16s rDNA.

2.2.4 Isolasi plasmid

Isolasi plasmid dilakukan dengan metode lisis SDS⁽¹⁸⁾. Sel (500 ml kultur) dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 4550 g (TL-100 Beckman J-6B) selama 30 menit pada suhu 4°C kemudian dicuci dengan 100 ml larutan STE (0,1 M NaCl, 10mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH 8). Sel diresuspensi dengan 10 ml 10% sukrosa

dingin, ditambah dengan 2 ml lisozim (10mg/ml), dan 8 ml 0,25 M EDTA kemudian diinkubasikan dalam es selama 10 menit. Suspensi ditambah dengan 4 ml 10% SDS, dicampur perlahan kemudian ditambah dengan 6 ml 5M NaCl dan diinkubasikan dalam es selama 60 menit. Pecahan sel dan kromosom diendapkan dengan ultra sentrifugasi pada kecepatan 35.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C kemudian supernatan dipindah ke tabung baru. Purifikasi DNA dilakukan dengan mengekstraksi supernatan dengan 1 volume phenol: kloroform (1:1), dilanjutkan dengan 1 volume kloroform. DNA dilarutkan dalam dengan 1-3 ml TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 dan 0,1 mM EDTA) dan disimpan pada suhu 4°C. Analisis DNA dilakukan dengan elektroforesis pada 0,8% gel agarose.

2.2.5 Amplifikasi Cu^r dengan PCR

Amplifikasi gen Cu^r dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (*Mastercycler personal, Eppendorf*), yang diprogram dengan kondisi, yaitu : denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit diikuti dengan 35 siklus yang terdiri atas : denaturasi (1 menit pada suhu 94°C), penempelan primer (1 menit pada suhu 55°C, 57°C, atau 59°C), polimerasi (2 menit pada suhu 72°C); polimerasi akhir (7 menit pada suhu 72°C). Hasil amplifikasi dilihat dengan elektroforesis pada 0,8 % gel agarose dengan penanda DNA lambda yang dipotong dengan *EcoR1* dan *HindIII*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Isolasi dan Karakterisasi bakteri resisten tembaga

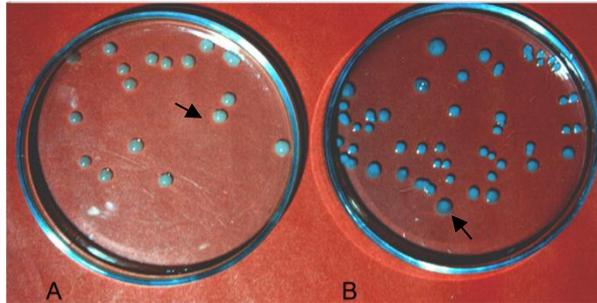
Hasil isolasi dan karakterisasi diperoleh sembilan isolat bakteri resisten tembaga dengan nilai MIC sebesar 2.5-7.5 mM $CuSO_4$. Bakteri yang paling resisten adalah isolat IrC4 dengan nilai MIC sebesar 7.5 mM (Tabel 1). Terdapat tiga kategori bakteri berdasarkan kesensitifan terhadap $CuSO_4$, yaitu : strain sensitif (MIC = 0,4 mM – 0,6 mM), strain resisten (MIC = 1,2 mM), dan strain sangat resisten (MIC = 1,6 mM – 2,0 mM)⁽⁹⁾. Berdasarkan kriteria tersebut maka sembilan isolat yang berhasil diisolasi dari limbah industri di Surabaya termasuk dalam kategori sangat resisten terhadap tembaga.

Hasil analisis gen 16s rDNA menunjukkan bahwa isolat IrC4 memiliki kemiripan 96,99% dengan *Cupriavidus pauculus*. Genus *Cupriavidus* dikenal sebagai genus yang memiliki gen resisten terhadap logam berat⁽¹⁹⁾. *Cupriavidus pauculus* yang diisolasi dari daerah rhizosfer memiliki resistensi terhadap nikel⁽²⁰⁾.

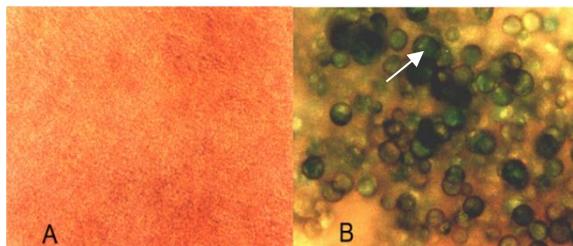
Gambar 1 menunjukkan bahwa isolat IrC4 berwarna putih susu tetapi menjadi berwarna kehijauan ketika ditumbuhkan pada medium yang mengandung tembaga. Pengamatan morfologi

koloni menunjukkan bahwa isolat IrC4 menghasilkan eksopolisakarida.

Eksopolisakarida ini berperan mengikat tembaga di luar sel sebagai bentuk mekanisme resistensi secara pasif untuk melindungi sel terhadap toksisitas tembaga⁽²¹⁾. Koloni isolat IrC4 berubah menjadi kehijauan ketika ditumbuhkan pada medium yang mengandung 5 mM CuSO₄.



Gambar 1. Morfologi koloni isolat IrC4 dalam medium tanpa CuSO₄ dan dengan penambahan 5 mM CuSO₄. A= Medium tanpa CuSO₄, B= Medium dengan penambahan 5 mM CuSO₄. Panah menunjukkan koloni.



Gambar 2. Pengamatan mikroskopis koloni isolat IrC4 dalam medium tanpa CuSO₄ dan dengan penambahan 5 mM CuSO₄. A= Medium tanpa CuSO₄, B= Medium dengan penambahan 5 mM CuSO₄. Pembesaran 2000x. Panah menunjukkan butiran tembaga dalam koloni bakteri.

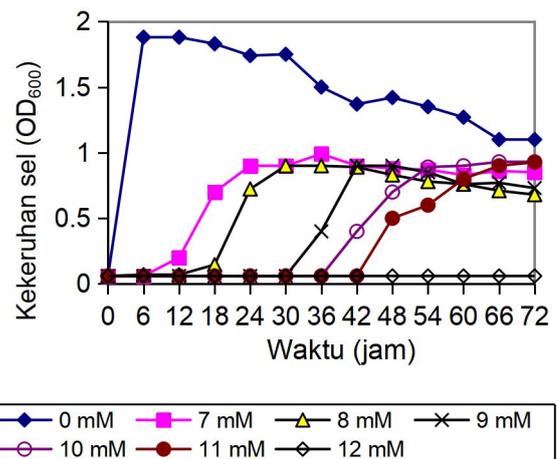
Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa koloni isolat IrC4 pada medium yang mengandung 5 mM CuSO₄, berwarna hijau sedangkan koloni pada medium tanpa CuSO₄ tidak tampak adanya butiran hijau tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa sel mengakumulasi tembaga yang berwarna biru sehingga menghasilkan butiran tembaga di dalam koloni yang berwarna hijau (Gambar 2). Dugaan ini didukung dengan hasil uji kemampuan akumulasi isolat IrC4 pada medium yang mengandung 4 mM hingga 11 mM CuSO₄ (Gambar 4). Hasil penelitian pada *Pseudomonas syringae*, *Burkholderia sp.*, *Alcaligenes sp.*, dan *Methylobacterium sp.* juga menunjukkan hasil yang sama ketika bakteri tersebut ditumbuhkan

pada medium yang mengandung CuSO₄. Bakteri menghasilkan perubahan warna koloni menjadi hijau sebagai bentuk mekanisme resistensi dengan cara mengakumulasi tembaga di dalam sel^(22,23).

Tabel 1. Hasil isolasi dan karakterisasi bakteri resisten tembaga

Isolat	Konsentrasi CuSO ₄ minimum yang menghambat pertumbuhan / MIC (mM)
IrA5	2.5
IrA6	3.5
IrA7	2.5
IrC1	6.5
IrC2	7.0
IrC4	7.5
IrC5	3.5
IrC8	3.5
IrD2	5.5

Gambar 3 menunjukkan bahwa pertumbuhan isolat IrC4 terhambat dengan adanya 4 mM dan 5 mM CuSO₄.



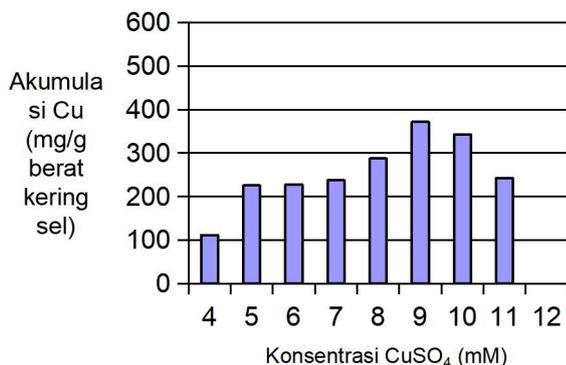
Gambar 3. Pertumbuhan isolat bakteri IrC4 pada medium yang mengandung berbagai konsentrasi CuSO₄

Bakteri mengalami fase lag selama 6 jam ketika ditumbuhkan pada medium yang mengandung 6 mM dan 7 mM CuSO₄. Bakteri mengalami fase lag masing-masing selama 12 jam, 30 jam, 36 jam, dan 42 jam pada medium yang mengandung 8 mM, 9 mM, 10 mM, dan 11 mM CuSO₄. Bakteri tidak menunjukkan adanya aktifitas pertumbuhan ketika ditumbuhkan pada medium yang mengandung 12 mM CuSO₄ (Gambar 3). Tembaga merupakan unsur penting yang dibutuhkan untuk proses metabolisme tetapi pada konsentrasi tinggi yang melebihi kebutuhan akan bersifat toksik sehingga bakteri cenderung mempertahankan tembaga tetap berada pada konsentrasi tertentu yang

dibutuhkan sel⁽²⁴⁾. Pada konsentrasi tinggi tembaga akan mendegradasi dan mengaktivasi protein maupun enzim⁽²⁵⁾.

Toksisitas tembaga menyebabkan bakteri mengalami fase lag pada medium yang mengandung CuSO₄ konsentrasi tinggi sekitar 6-11 mM. Lamanya fase lag terjadi seiring dengan tingginya konsentrasi CuSO₄ dalam medium. Pada saat fase lag berlangsung, bakteri melakukan adaptasi dengan mengembangkan mekanisme resistensi. Adanya butiran tembaga dalam koloni (Gambar 2) menunjukkan bahwa mekanisme resistensi bakteri adalah mengakumulasi tembaga di dalam sel.

Hasil analisis akumulasi tembaga menunjukkan bahwa isolat IrC4 mengakumulasi tembaga ketika ditumbuhkan pada medium yang mengandung CuSO₄. Jumlah tembaga yang diakumulasi isolat IrC4 meningkat seiring dengan pertumbuhan bakteri (gambar 4). Akumulasi Cu yang dilakukan isolat bakteri tersebut pada medium yang mengandung 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM dan 11 mM masing-masing adalah sebesar 111,21 mg, 225,32 mg, 227,24 mg, 298,31 mg, 342,76 mg, 371,42 mg, 357,42 mg, dan 242,13 mg Cu per gram berat kering sel.



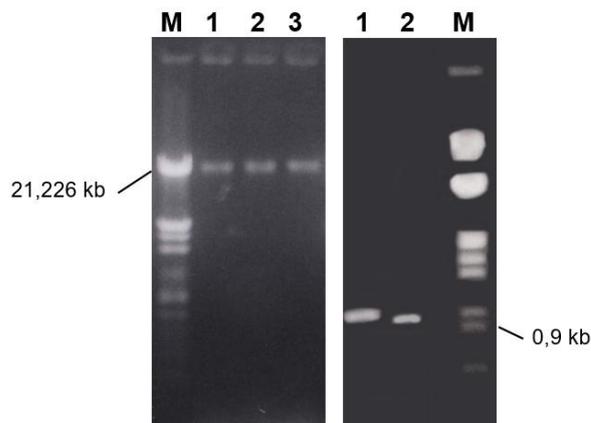
Gambar 4. Kemampuan akumulasi tembaga isolat bakteri IrC4 pada medium yang mengandung berbagai konsentrasi CuSO₄

Kemampuan bakteri untuk tumbuh pada medium CuSO₄ seiring dengan kemampuan akumulasi pada Gambar 3 dan 4 menunjukkan bahwa mekanisme resistensi isolat IrC4 dalam menanggapi tembaga adalah dengan cara mengakumulasi tembaga di dalam sel. Menurut Ahemad et al. (2009)⁽²⁶⁾; Habi dan Daba, (2009)⁽²⁷⁾; Rodrigues (2011)⁽²⁸⁾, konsentrasi logam berat di atas ambang batas menghambat aktivitas metabolisme sehingga bakteri mengembangkan mekanisme resistensi dengan cara mengakumulasi tembaga di dalam sel. Sistem resistensi yang dilakukan bakteri ini dapat dimanfaatkan dalam proses bioremediasi karena

dapat berdampak menyisihkan tembaga dari lingkungan. Kemampuan akumulasi terbesar terjadi pada saat bakteri ditumbuhkan pada medium yang mengandung 9 mM CUSO₄ yaitu sebesar 371 mg/g berat kering sel.

3.2 Isolasi Plasmid dan Amplifikasi Gen Resisten Tembaga

Isolasi plasmid yang dilakukan pada tiga isolat bakteri yang paling resisten menunjukkan bahwa isolat IrC1, IrC2, dan IrC4 memiliki plasmid berukuran sekitar 21 kb. Hasil amplifikasi gen Cu^r dari isolat IrC1, IrC2, dan IrC4 menunjukkan bahwa produk amplifikasi PCR hanya diperoleh dari isolat IrC4 (Gambar 5). Hal ini ditandai dengan dihasilkannya amplicon 0,9 kilobasa yang merupakan hasil amplifikasi gen Cu^r pada isolat IrC4. Amplifikasi gen Cu^r dilakukan dengan menggunakan primer yang spesifik terhadap gen *orf3*, *orf4*, *orf5* dari gen Cu^r pada *L. lactis* karena hasil penelitian pada Gambar 3 dan 4 mengindikasikan adanya keserupaan mekanisme resistensi isolat IrC4 dengan *L. lactis*. Adanya amplicon mengindikasikan adanya sekuens basa nitrogen dari gen Cu^r yang dapat dikenali sebagai cetakan oleh primer *orf3F* dan *orf3R*.



Gambar 5. Hasil isolasi plasmid isolat IrC1, IrC2, dan IrC4. Sumur (1) isolat IrC1, (2) isolat IrC2, (3), isolat IrC4. B. Hasil amplifikasi gen Cu^r dengan menggunakan primer *orf3F* dan *orf3R*. Sumur (1) kontrol positif, *L. lactis*, sumur (2) plasmid dari isolat IrC4. (M) penanda DNA lambda EcoR1/HindIII (M). Elektroforesis dilakukan pada 0,8% gel agarose, 80 Volt

Gen yang paling dominan terhadap sifat resistensi tembaga pada *L. lactis* terdiri atas tiga gen struktural yaitu *orf3*, *orf4*, *orf5*. Hasil analisis protein menunjukkan bahwa gen-gen tersebut masing-masing menyandi pelipatan, sekresi, dan

pengikatan tembaga. Peran pengikatan dan pengambilan tembaga pada *L. lactis* diperankan oleh protein hasil translasi dari gen *orf3*. Sifat resistensi tembaga pada *L. lactis* sangat ditentukan oleh sinergi dari ketiga gen tersebut. Tidak ada gen tunggal yang dominan terhadap sifat resistensi tembaga meskipun *orf4* diduga memegang peranan yang sangat penting⁽¹³⁾.

Keberhasilan amplifikasi sebagian gen Cu^r pada plasmid isolat IrC4 diduga disebabkan adanya keserupaan yang tinggi antara gen Cu^r bakteri tersebut dengan gen *orf3* pada *L. lactis*. Isolat IrC4 diduga melakukan mekanisme resistensi yang serupa dengan *L. lactis* walaupun dugaan ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut. Mekanisme resistensi tembaga pada *L. lactis* adalah dengan pengikatan dan pengambilan tembaga diikuti dengan sekresi tembaga ke dalam medium⁽¹³⁾. Gen Cu^r pada plasmid isolat IrC1 dan IrC2 tidak dapat dideteksi dengan menggunakan primer yang spesifik gen *orf3*, *orf4*, *orf5* diduga disebabkan rendahnya keserupaan antara gen Cu^r pada isolat bakteri tersebut dengan *L. lactis*. Hasil penelitian Irawati⁽⁷⁾ menunjukkan bahwa gen Cu^r pada isolat IrC1 dapat diamplifikasi dengan primer yang memiliki kemiripan dengan *Acinetobacter* sp. namun primer tersebut tidak dapat mengamplifikasi gen Cu^r pada isolat IrC2.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat isolat bakteri resisten tembaga yang berhasil diisolasi dari limbah industri di Surabaya. Isolat IrC4 merupakan bakteri yang paling resisten terhadap tembaga dengan MIC sebesar 7.5 MIC dan mampu mengakumulasi tembaga sebesar 371 mg/g berat kering sel. Isolat IrC4 memiliki plasmid berukuran 21 kb dan amplifikasi gen Cu^r berukuran 0.9 kb yang menyandakan pengikatan tembaga berhasil diisolasi dari isolat IrC4.

PERSANTUNAN

Penelitian ini didanai oleh *Science and Education for Agriculture and Development*, dan Yanbinbang SDM Iptek, the Habibie Center building.

DAFTAR PUSTAKA

1. Das S, Dash HR, Chakraborty J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *App Microbiol Biotechnol*. 100: 2967-2984.
2. Christian S. (2013). Isolation and characterization of yeast isolated from industrial sewage in Rungkut Surabaya. Skripsi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
3. Ratnawati E. (2010). Pengaruh pH, konsentrasi biosorben dan waktu reaksi terhadap penurunan logam berat Pb dengan memanfaatkan limbah industri bir dalam bentuk pelet sebagai biosorben. *Jurnal Kimia dan Kemasan*. 32 (2): 73-78.
4. Zeyaulah Md, Islam B, Ali A. (2010). Isolation, identification, and PCR amplification of *merA* gene from highly mercury polluted Yamuna River. *Afr J of Biotechnol*. 9: 3510-3515.
5. Irawati W, Riak S, Sopiah N, Sulistia S. (2017). Heavy metal tolerance in indigenous bacteria isolated from the industrial sewage in Kemisan River, Tangerang, Banten, Indonesia. *Biodiversitas*. 18 (4): 1481-1486. DOI: 10.13057/biodiv/d180426.
6. Johny RM, Hemambika B, Hemapriya J, Rajeshkannan V. (2010). Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: a biosorption approach. *Glob J Environ. Res* 4(1): 23-30.
7. Irawati W, Yuwono T, Rusli A. (2016). Detection of Plasmids and Curing Analysis in Copper Resistant Bacteria *Acinetobacter* sp. C1, *Acinetobacter* sp. C2, and *Cupriavidus* sp. C4. *Biodiversitas*. 17(1): 296-300 doi: 10.13057/biodiv/d170140
8. Lüthje, F. L., Hasman, H., Aarestrup, F. M., Alwathnan, H. A., & Rensing, C. (2014). Genome sequences of two copper-resistant *Escherichia coli* strains isolated from copper-fed Pigs. *Genome Announcements*, 2(6). doi:10.1128/genomeA.01341-14
9. Gutiérrez-Barranquero, J. A., Vicente, A. d., Carrión, V. J., Sundin, G. W., & Cazorla, F. M. (2012). Recruitment and rearrangement of three different genetic determinants into a conjugative plasmid increase copper resistance in *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 1028 –1033. doi:10.1128/AEM.02644-12
10. Kok, J., Gijtenbeek, L. A., Jong, A. d., Meulen, S. B., Solopova, A., & Kuipers, O. P. (2017). The Evolution of gene regulation research in *Lactococcus lactis*. *Journal Investing in Science: FEMS Microbiology Reviews*, 220–243. doi:10.1093/femsre/fux028

11. Melano, M.A. and D.A. Cooksey. (1988). Nucleotide Sequence and Organization of Copper Resistance Genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J. Bacteriol.* 170(6) : 2879 – 2883.
12. Altimira, F., Yáñez, C., Bravo, G., González, M., Rojas, L. A., & Seeger, M. (2012). Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BioMed Central Microbiology*, 1-12.
13. Widodo. (2001). Molecular Analysis of a plasmid-Borne Copper resistance operon in *Lactococcus lactis*. M.Sc. Thesis. Department of Biotechnology. UNSW-Australia.
14. Williams, J.R., A.G. Morgan, D.A. Rouch, N.L. Brown, B.T.O. Lee. (1993). Copper-Resistant Enteric Bacteria from United Kingdom and Australian Piggeries. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8) : 2531 - 2537
15. Irawati W, Yuwono T, Hartiko H, Soedarsono J. (2012). Molecular and physiological characterization of copper-resistant bacteria isolated from activated sludge in an industrial wastewater treatment plant in Rungkut-Surabaya, Indonesia. *Microbiol J.* 6(3): 107-116. DOI:10.5454/mi.6.3.3
16. Massora, M., Martani, E., Sugiharto, E., Sarwom, R., & Sinaga, T. (2017). Seleksi material penempelan biofilm isolat bakteri resisten tembaga asal PT. Freeport Indonesia. *Biowallacea*, 4(1), 527-532.
17. Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Hardianto, D., Indarto, A., & Sasongko, N. D. (2015). Optimasi metode lisis Alkali untuk meningkatkan konsentrasi plasmid. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 2(2), 60-64.
19. Pal A and Paul AK. (2010). Nickel uptake and intracellular localization in *Cupriavidus pauculus* KPS 201, native to ultramafic ecosystem. *Adv Biosci. Biotech.* 1:276-280. DOI: 10.4236/abb.2010.1403. 6
20. Gonzales AG, Shirokova LS, Porovski OS, Emnova EE, Martinez RE, dan Santana-Casiano JM. 2010. Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: protective role of surface exopolysaccharides. *J. Colloid. Intl. Sci.* 350, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.020>
21. Abdullah, Hakim, L., Fitriandi, E., & Rahmawati. (2018). Deteksi keberadaan bakteri resisten logam merkuri (Hg) pada penambangan emas tanpa izin (PETI) di Simpi, Sekadau, Kalimantan Barat. *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*, 1(2), 56-61.
22. Farisna, S. T., & Zulaika, E. (2015). Resistensi *Bacillus endogenik* Kalimas Surabaya terhadap logam besi (Fe). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 4(2), 84-87.
23. Kunito, T., K. Nagaoka, N. Tada, K. Saeki, K. Senoo, H. Oyaizu and S. Matsumoto. 1997. Characterization of Cu-resistant Bacterial Communities in Cu Contaminated Soils. *Soil Sci. Nutri.* 43(3) : 709 – 717.
24. Bodarczuk K, Piotrowak-Seget Z. 2013. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biol Toxicol* 29 (6): 397-405. DOI: 10.1007/s10565-013-9262-1
25. Macomber L, Imlay JA. 2009. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 106: 8344-8349. DOI: 10.1073/pnas.0812808106.
26. Ahemad M, Malik A. 2012. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriol J* 2(1):12-21.
27. Habi S, Daba H. 2009. Plasmid incidence, antibiotic and metal resistance among enterobacteriaceae isolated from Algerian streams. *Pak J Biol Sci* 12: 1474-1482.
28. Rodrigues DF 2011. Biofilters: a solution for heavy metals removal from water. *J Bioremed Biodegr.* 2: e101. doi: 10.4172/2155-6199.1000e101.