ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ANTIBIOTIK INHIBITOR β –LAKTAMASE TIPE TEM-1 DARI EKOSISTEM AIR HITAM

Liswara Neneng

Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Palangka Raya
Jl. Yos Sudarso, Tunjung Nyaho, Palangkaraya, 73112
e-mail: liswara.neneng@yahoo.com

Abstract: β-lactamase inhibitor antibiotic is highly required to prevent the increasing of bacterial resistance towards β lactam antibiotics. This study was aimed to isolate and characterize of bacteria producing TEM-1 β lactamase inhibitor antibiotic. Sample of study was Black Water Ecosystem, selected from 65 areas in Central Kalimantan. An agar diffusion method was applied to select the isolate, based on its potential to inhibit the growth of *Escherichia coli* 35218 that produce TEM-1 β lactamase enzyme. Based on the large of inhibitor zone, one of Gram negative bacteria selected as a potential isolate. It can inhibit *E. coli* 35218 growth in average 14 mm. This isolate with ICBB 1171 coding is a single cell, rod shaped arranged in pairs or chain, in length between 4.0 µm to 4.2 µm, and diameter is average 1.7 µm. The colony form is circular, with cream to pink colors. This isolate can be mixed with glucose, sucrose and mannitol as a source of carbon. Its optimal growth is on 300 °C and pH 7.0. The exponential phase is achieved for 32 hours.

Kata kunci: produksi antibiotik bakteri, inhibitor β-laktamase antibiotik.

Antibiotik yang stabil terhadap aktivitas enzim β-laktamase, sangat dibutuhkan untuk mengatasi permasalahan meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik dari golongan β-laktam, seperti antibiotik penisilin, ampisilin, amoksilin, dan antibiotik β-laktam yang lain. Enzim β-laktamase dihasilkan oleh bakteri Gram positif dan Gram negatif. Enzim ini bekerja memotong cincin β-laktam, sehingga aktivitas antibakterinya hilang (Abraham, 1983).

Enzim β-laktamase jenis TEM-1 merupakan enzim yang paling luas penyebarannya dibandingkan jenis yang lain (Bryan, 1983). Enzim ini menyebabkan resistensi bakteri terhadap amoksilin dan antibiotik lain yang sensitif terhadap enzim β-laktamase dari *Escherichia coli* (Wiedemann *dkk.,* 1989), juga terhadap inhibitor β-laktamase seperti asam klavulanik dan tazobaktam.

Hingga saat ini, mikroorganisme yang banyak menghasilkan antibiotik inhibitor β-laktamase berasal dari genus *Streptomyces* sp. (Doran *dkk.,* 1990). Mikroorganisme ini merupakan bakteri tanah Gram positif yang mengalami diferensiasi selular dan membentuk spora selama siklus hidupnya (Kim & Lee, 1994). Sejumlah inhibitor β-laktamase yang berasal dari bakteri *Streptomyces,* adalah inhibitor penisilinase yang dihasilkan *S. gedanensis* (Hata *dkk*., 1972); asam klavunalik, dihasilkan *S. clavuligerus* (Reading & Cole, 1977); asam olivanik, dihasilkan *Streptomyces* sp. (Bufferworth *dkk.,* 1979); thienamisin, dihasilkan *S. cattelya* (Doran *dkk*., 1990); dan β-laktamase Inhibitor Protein (BLIP), dihasilkan *S. exfoliates* (Kim & Lee, 1994). Inhibitor β-laktamase ini kebanyakan berupa protein ekstraselular (Doran *dkk*., 1990).

Permasalahan resistensi bakteri yang disebabkan oleh aktivitas enzim β-laktamase, dapat dikurangi dengan mencari antibiotik yang mampu menghambat aktivitas enzim tersebut. Antibiotik banyak dihasilkan dari mikroorganisme yang berasal dari lingkungan yang cukup ekstrim, karena kebanyakan produksi antibiotik lebih banyak dipacu pada saat kondisi kekurangan nutrisi optimal, dan pada fase stasioner. Ekosistem Air Hitam yang meliputi sungai, danau, dan rawa, dengan perairan berwarna kehitaman, yang banyak terdapat di wila-

yah Kalimantan Tengah, merupakan salah satu sumber alam yang potensial untuk mendapatkan mikroorganisme penghasil metabolit sekunder. Karakteristik lingkungan ini sangat dipengaruhi oleh lahan gambut. Kondisi pH pada perairan maupun sedimen berkisar antara 3–4, kandungan senyawa toksik cukup tinggi, seperti H_2S 1000 kali dan fenol 300 kali baku mutu air yang dipersyaratkan untuk biota air. Konsentrasi logam berat (Mn, Cu, dan Pb) 3–30 kali lipat di atas baku mutu air (Tim AMDAL IPB dalam Santosa *dkk*., 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi bakteri dari sampel air dan sedimen Ekosistem Air Hitam, Kalimantan Tengah, yang mampu menghasilkan antibiotik inhibitor enzim β-laktamase, dan melakukan karakterisasi morfologi dan biokimiawi terhadap isolat bakteri potensial.

METODE

Pengambilan Sampel

Sampel penelitian diambil dari beberapa lokasi di wilayah Ekosistem Air Hitam, Kalimantan Tengah, yakni danau Mayun, danau Begantung, sungai Purun, danau Buntal, danau Naning, sungai Ahas, saluran Induk Primer, outlet Mentaya, danau Geritik, sungai Mentangai, danau Rantau Bujur, danau Balida, dan sungai Kapuas.

Bahan

Dua ratus empat puluh isolat bakteri dari Ekosistem Air Hitam, Kalimantan Tengah, *Escherichia coli* ATCC 35218. Antibiotik ampisilin, nistatin, *griseofulvin*, *trimetofrim*, asam *nalidiksilat* (Sigma Chemical Co.). Media Yeast Malt Agar (YMA), Luria Agar (LA), Luria Broth (LB), Nutrient Agar (NA), Media β-laktamase Inhibitor (BLI), Media glukosa, sukrosa dan mannitol. Bahan kimia berupa pelarut dimetil formamid (DMF), H2S, alkohol, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, garam fisiologis 0,85%, kristal violet, yodium, etanol 95%, dan safranin.

Prosedur Kerja

Sampel tanah dan air yang diambil dari 65 lokasi, masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram, diencerkan menggunakan garam fisiologis hingga pengenceran 10-1, 10-2, 10-3, dan 10-4. Sebanyak 100 µl diambil dari tiap tingkat pengenceran, masing-masing disebar pada media YMA yang mengandung antibiotik griseofulvin, nistatin, asam nalidiksilat, dan trimetofrim dengan konsentrasi 10 µg/ml media. Inkubasi pada suhu 30 °C selama 2 hari. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri yang terpisah, kemudian digores pada cawan YMA yang baru.

Uji daya hambat terhadap bakteri target, yakni *E. coli* ATCC 35218 yang menghasilkan β-laktamase tipe TEM-1, menggunakan metode difusi, pada media LA. Media uji dipersiapkan dengan metode tuang (Hadioetomo, 1993). Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter hambatan pertumbuhan, yang ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling koloni bakteri yang diuji. Isolat bakteri yang memberikan daya hambat terbesar kemudian diperbanyak di media cair.

Media cair yang digunakan adalah Beta Laktamase Inhibitor (BLI). Sebanyak 1 ose Isolat ditumbuhkan pada 50 ml media cair BLI pH 7.0, sebagai starter. Inkubasi dilakukan selama 2 hari, pada suhu 30 °C, dengan pengocokan 150 rpm.

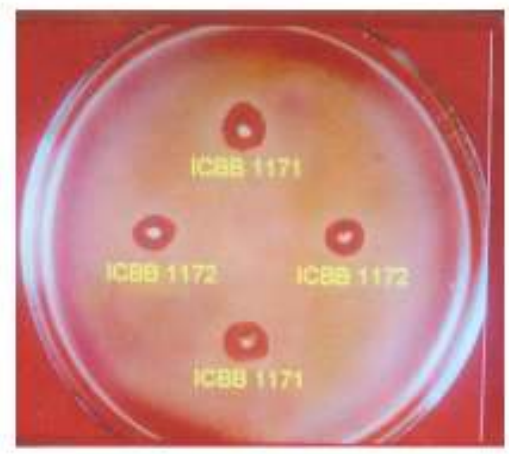
Laju pertumbuhan bakteri diukur dengan cara menumbuhkan 2 ml kultur dari starter dengan kepadatan 10 8 spk/ml ke dalam 100 ml media cair BLI (Kim & Lee, 1994). Biakan diinkubasi pada suhu 30 °C, 150 rpm. Pengamatan dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 ml biakan setiap 8 jam, untuk melihat nilai kerapatan optiknya (OD), pada λ 600 nm dan dihentikan saat laju pertumbuhan menunjukkan penurunan. Tingkat produksi antibiotik juga diamati setiap 8 jam, dengan cara mengambil sebanyak 50 µl supernatan bebas sel dan menguji daya hambatnya terhadap *E. coli* ATCC 35218 pada media LA, menggunakan metode sumur. Aktivitas hambatan yang dimaksudkan adalah ukuran diameter zona bening yang terbentuk di sekeliling sumur agar, dalam satuan mm.

Karakterisasi isolat dilakukan dengan berpedoman pada buku identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *dkk.*, 1994). Beberapa karakteristik yang diamati meliputi morfologi koloni, bentuk sel dan sifat biokimiawi. Pengamatan morfologi koloni dilakukan secara visual, meliputi bentuk dan warna koloni serta keadaan permukaan koloni. Pengamatan bentuk sel dilakukan menggunakan mikroskop. Pengujian biokimiawi meliputi pewarnaan Gram dan uji fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa, dan manitol) dan H_2S, mengikuti prosedur yang terdapat dalam Hadioetomo (1993). Kemampuan tumbuh pada beberapa kondisi perlakuan suhu dan pH juga diamati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dari 65 sampel tanah asal Ekosistem Air Hitam, Kalimantan Tengah, diperoleh sebanyak 240 isolat bakteri murni yang kemudian diuji kemampuan daya hambatnya terhadap bakteri target, yang menghasilkan enzim β-laktamase tipe TEM-1. Hasil uji menunjukkan hanya ada 2 isolat bakteri, yakni ICBB 1171 dan ICBB 1172 yang da-

pat menghambat pertumbuhan bakteri target. Hambatan pertumbuhan dari isolat ICBB 1171 dan ICBB 1172, tampak dari adanya areal zona bening di sekeliling koloni isolat yang diuji. Areal zona bening yang terbentuk dari penghambatan isolat ICBB 1171 rerata berdiameter 14 mm, sedangkan oleh isolat ICBB 1172 rerata berdiameter 12 mm (Gambar 1). Selanjutnya, isolat ICBB 1171 ini dikarakterisasi dan diuji lebih lanjut.



Gambar 1. Daya Hambat Isolat ICBB 1171 dan ICBB 1172 terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 35218

Hasil isolasi dan seleksi bakteri dari Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah, memperlihatkan hanya dua jenis bakteri, yakni ICBB 1171 dan ICBB 1172 yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ATCC 35218. Produksi enzim β-laktamase tipe TEM-1 oleh *E. coli* ATCC 35218, diduga kuat sebagai penyebab sedikitnya jumlah isolat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Bakteri ini menghasilkan enzim â-laktamase secara konstitutif.

Produksi enzim β-laktamase yang melimpah merupakan salah satu penyebab terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik β-laktam (Sanders & Sanders, 1992, Imtiaz *dkk*., 1994). Enzim β-laktamase jenis ini tidak hanya menyebabkan resistensi bakteri terhadap golongan antibiotik penisilin dan ampisilin, tetapi juga terhadap inhibitor β-laktamase yang masih digunakan saat ini seperti asam klavulanik, tazobaktam, dan sulbaktam (Imtiaz *dkk*., 1994; Gold & Mollering, 1996).

Kemampuan isolat ICBB 1171 dan ICBB 1172 untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* ATCC 35218 ini, diduga karena antibiotik yang dihasilkan oleh kedua isolat tersebut stabil terhadap aktivitas degradasi oleh enzim β-laktamase yang dihasilkan. Isolat ICBB 1171 digunakan untuk uji selanjutnya, karena menunjukkan daya hambat yang lebih besar terhadap *E. coli* ATCC 35218 dibandingkan ICBB 1172. Selain itu, isolat ini menunjukkan pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan ICBB 1172.

Kurva pertumbuhan dan produksi antibiotik oleh ICBB 1171 yang dinyatakan dalam aktivitas hambatan pertumbuhan, seperti tampak pada Gambar 2, memperlihatkan pola bifasik. Fase pertumbuhan eksponensial sudah terjadi pada 8 jam pertama dan mencapai puncaknya pada umur 32 jam. Produksi antibiotik dimulai pada akhir fase eksponensial dan mencapai puncaknya pada umur 64 jam. Antibiotik dari ICBB 1171 diproduksi pada fase stasioner. Berdasarkan waktu produksinya, antibiotik yang dihasilkan tersebut dapat digolongkan ke dalam metabolit sekunder. Selama pertumbuhan, tidak banyak terjadi penurunan pH, sedangkan pH terendah berkisar 6,0.

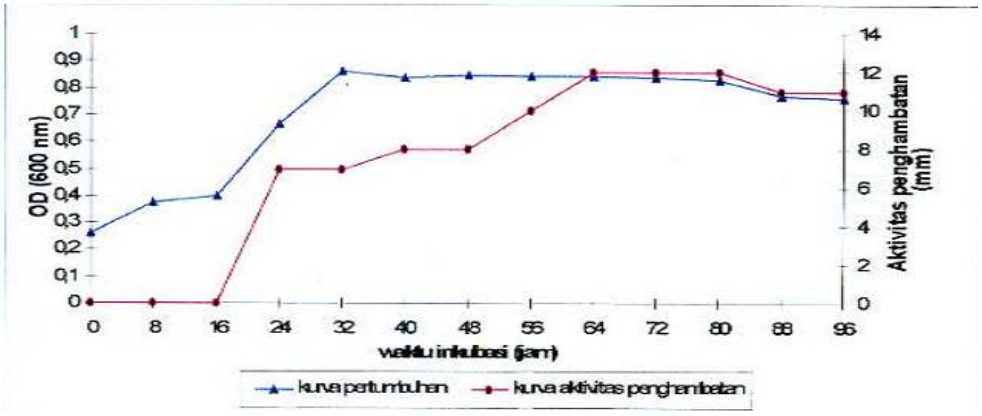
Pengujian Biokimiawi Isolat ICBB 1171. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat ICBB 1171 merupakan bakteri tanah Gram negatif. Hasil uji biokimiawi isolat ICBB 1171 tampak pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Biokimiawi Isolat ICBB 1171

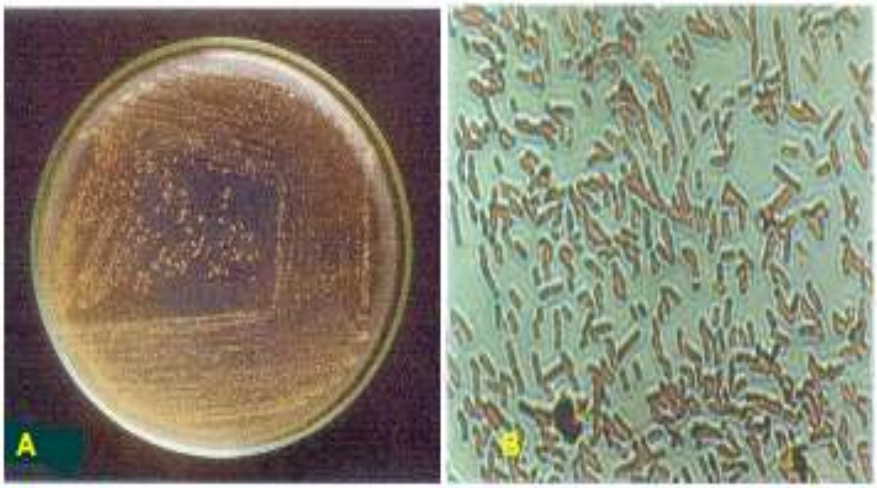
Hasil Uji	Isolat ICBB 1171
1. Pewarnaan Gram	Gram negatif
2. Pembentukan Pigmen	Tidak ada
3. Produksi H2S	Ada
4. Pembentukan asam pada:	
a. Media glukosa	Ada
b. Media sukrosa	Ada
c. Media manitol	Ada

Isolat ICBB 1171 mampu hidup pada rentang suhu 30 hingga 45 °C, juga pada pH 5,0 hingga 9,0. Suhu optimal untuk pertumbuhan 30 °C, sedangkan pH optimal 7,0. Isolat ini resister terhadap antibiotik nistatin, griseofulvin, asam nalidiksilat, dan trimetofrim hingga konsentrasi 50 µg/ml, juga pada ampisilin dengan konsentrasi hingga 100 µg/ml. Isolat ini juga mampu menggunakan glukosa, sukrosa, dan manitol sebagai sumber karbonnya, hal ini tampak dari adanya gelembung udara pada tabung Durham. Kemampuan seperti ini kebanyakan dilakukan oleh bakteri dari golongan Gram negatif.

Bentuk koloni ICBB 1171 bulat, tepian rata dan tidak mengkilat. Warna koloni krem hingga merah muda (Gambar 3A). Isolat ICBB 1171 merupakan sel tunggal, berbentuk batang yang berpasangan hingga batang berantai yang panjang, dengan ukuran panjang sel rata-rata, 4,0 µm hingga 4,2 µm, dan diameter sel rerata berukuran 1,7 µm (Gambar 3B).



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan dan Produksi Antibiotik dari Isolat Bakteri ICBB 1171



Gambar 3. Koloni Isolat Bakteri ICBB 1171 (A), Sel Isolat ICBB 1171 (B)

Senyawa antibiotik yang stabil terhadap aktivitas degradasi oleh enzim β-laktamase, hingga saat ini kebanyakan dihasilkan oleh bakteri Gram positif (Genus *Streptomyces* sp.). Antibiotik β-laktam yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif, hanya dari golongan monobaktam. Bakteri Gram negatif tersebut semua berbentuk batang, yang berasal dari genus *Pseudomonas*, *Agrobacterium,* dan *Acetobacter* (Sykes & Brush, 1982). Berdasarkan ciri-ciri yang terdapat dalam buku identifikasi dari *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994), tidak ada salah satu dari ketiga genus tersebut yang memiliki ciri yang kurang lebih sama dengan isolat ICBB 1171. Karena itu, masih dibutuhkan karakterisasi lebih lanjut mengenai isolat ICBB 1171 untuk memastikan kekerabatan isolat tersebut dengan spesies/strain yang saat ini sudah dikenal.

KESIMPULAN

ICBB 1171 merupakan salah satu bakteri Gram negatif yang telah diisolasi 65 sumber sampel tanah yang berasal dari Ekosistem Air Hitam, Kalimantan Tengah. Hasil seleksi dari sebanyak 240 isolat uji, memperlihatkan bahwa ICBB 1171 mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* ATCC 35218 yang menghasilkan enzim β-laktamase tipe TEM-1. pH dan suhu optimum untuk pertumbuhan isolat ICBB 1171 adalah pH 7,0 dan suhu 30 °C. Fase eksponensial pertumbuhan dicapai pada saat biakan berumur 32 jam, sedangkan antibiotik diproduksi secara maksimum pada saat biakan berumur 64 jam. Bentuk sel isolat ICBB 1171 adalah bentuk batang, tersusun berpasangan atau berantai dengan ukuran panjang antara 4,0 µm hingga 4,2 µm, dan diameter berkisar 1,7 µm.

DAFTAR RUJUKAN

Abraham, E.P. 1983. *History of* β-*lactam Antibiotic*s. In Demain A.L. and A. Solomon *(Ed*s.). Antibiotic Containing the â-lactam Structure, Part I. Berlin: Springer-Verlag. 1-14.

Bryan, L.E. 1983. *Bacterial Resistance and Susceptibility to Chemotherapeutic Agent*s. Cambridge: Cambridge University. Press.

Bufferworth, D., Cole, M., Hanscomb, G. & Rolinson, G.N. 1979. Olivanic Acids, a Family of β-Lactam Antibiotics with β-lactamase Inhibitory Properties produced by Streptomyces Species. *J. Antibiot*, 32:287-294.

Doran, J.L., Leskiw, B.K., Aippersbach, S. & Jensen, S.E. 1990. Isolation and Characterization of a â-Llactamase Inhibitory Protein from *Streptomyces clavuligerus* and Cloning and Analysis of the Corresponding Gene. *J. Bacteriol,* 172: 4909-4918.

Gold H.S. & Mollerring, R.D. 1996. Antimicrobial Drug Resistance. *NEJM*. 335:1445-1453.

Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratoriu*m. Jakarta: PT. Gramedia.

Hata, T., Omura, S., Iwaw, Y., Ohno, H., Takeshima, T. & Yamaguchi, N. 1972. Studies on Penicillinase Iinhibitors Produces by Microorganisms. *J. Antibiot*, 25:473-473.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriolog*y. 9th Ed. Baltimore. Philadelphia: Williams & Wilkins.

Imtiaz, U., Manavathu, E.K., Mobarnery, S. & Lerner, S.A. 1994. Reversal of Clavulanate Resistance Confered a Sser 244 Mutant of TEM-1 â-Lactamase as A Result of a Second Mutaion that Enhancer Activity Againts Cefiazidime. *J. Antimicrob. Chemother,* 38:1134-1139.

Kim, M.K. & Lee, K.J. 1994. Characteristic of β-laclamase Inhibiting Proteins from *Streptomyces exfoliatus* SMF 19. *Appl. and Environ. Microbiol*, 60:1029-1032.

Reading, C. & Cole, M. 1977. Clavulanic Acid: a â-Lactamase Inhibiting β-lactam from *Streptomyces clavuligerus. J. Antimicrob. Chemother*, 11:852-857.

Sanders, C.C. & Sanders, W.E.J.R. 1992. β-Lactam Resistance in Gram Negative Bacteria, Global Trends and Clinical Impact. *J. Clin. Infect. Dis*, 15:824-839.

Santosa, D.A., Saraswati, R. & Suwanto, A. 1998. *Ekosistem Air Hitam (Black Water Ecosystem): Biodiversitas Makro dan Mikro, Isolasi DNA in Situ, dan Kloning Shotgun Gen Penyandi Ektremozim. Riset Unggulan Terpadu (RUT) V'2. Tahun Anggaran 1997/199*8. Bogor: PAU Bioteknologi, IPB.

Sykes, R.B. & Brush, K. 1982. Fisiologi, Biokimia dan Inaktivasi β-Laktamase. In Morin, R.B. & Gorman, M. (Eds.). *Kimia dan Biologi Antibiotika β-laktam.* Vol. 3. Penerjemah Mulyani, S. New York: Academic Press.

Wiedemann, B., Kliebe, C. & Kresken, M. 1989. The Epidemilogy of β-Laktamase. *J. Antimicrob. Chemother,* 24:1-22.