

**PENCARIAN INHIBITOR BETALAKTAMASE
DARI MIKROBA TANAH BEBERAPA DAERAH DI KABUPATEN
BANDUNG**

**USULAN PENELITIAN
PENELITI MUDA (LITMUD) UNIVERSITAS PADJADJARAN
TAHUN ANGGARAN 2007**

Oleh:

Ketua : Irma Melyani Puspitasari, S Si., Apt.

**Anggota : 1. Sri Agung Fitri Kusuma, S. Si, M Si., Apt
2. Tina Rostinawati, S.Si., M Si., Apt**

**LEMBAGA PENELITIAN
UNIVERSITAS PADJADJARAN**



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS PADJADJARAN
TAHUN 2006**

ABSTRAK

Pencarian Inhibitor Betalaktamase Dari Mikroba Tanah Beberapa Daerah di Kabupaten Bandung

(Irma Melyani Puspitasari, Sri Agung Fitri Kusuma, Tina Rostinawati)

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif enterik yang termasuk anggota flora normal usus. *E. coli* menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan infeksi pada saluran urin, sepsis, meningitis dan diare.

Salah satu obat pilihan yang digunakan untuk mengobati infeksi saluran urin yang disebabkan oleh *E. coli* adalah kombinasi antibiotik betalaktam dan inhibitor betalaktamase. Namun *E. coli* dilaporkan telah resisten terhadap kombinasi obat tersebut. Penyebab utama resistensi *E. coli* terhadap kombinasi antibiotik betalaktam dan inhibitor betalaktamase tersebut adalah enzim betalaktamase. Sebanyak 90 % patogen saluran urin menghasilkan betalaktamase, sebanyak 94,8 % adalah *E. coli*.

Oleh karena itu perlu dilakukan pencarian inhibitor betalaktamase dari mikroba tanah. Mengingat Indonesia merupakan salah satu negara tropis yang dikenal sebagai negara yang kaya akan keanekaragaman hayati (*Mega biodiversity*) sehingga kita dapat menggali potensi tersebut untuk menemukan inhibitor betalaktamase.

Berdasarkan hasil pengujian produk ekstrasel mikroba tanah menggunakan metode difusi agar, diketahui beberapa koloni memiliki aktivitas sebagai inhibitor betalaktamase, yaitu koloni nomor 1, 2, 4, 5, 7, 9, 14, 15, 19, 20, 22, dan 23.

Kata kunci : inhibitor betalaktamase, mikroba tanah, *E. coli*

ABSTRACT

Screening Betalactamase Inhibitor From Soil Microbes in Bandung Regency Areas

(Irma Melyani Puspitasari, Sri Agung Fitri Kusuma, Tina Rostinawati)

Escherichia coli is one of the enteric negative bacteria which included as intestine normal flora. *E. coli* produces enterotoxin which causes infection on urination vascular, sepsis, meningitis, and diarrhea.

One of the choosen drugs used to cure infected urination vascular, which caused by *E. coli*, is the combination between betalactam antibiotic and betalactamase inhibitor. However, *E. coli* reported to be resistant of that drug combination. The main cause *E. coli* to be resistant of those betalactam antibiotic and betalactamase inhibitor combination is betalactamase enzyme. 90% urination vascular patogen produced betalactamase, 94.8% of it is *E. coli*.

Therefore, researches on screeening inhibitor betalactamase from soil microbe is needed. Considering that Indonesia is one of tropical country, which is known for the biological richness (Mega biodiversity), we could explore more on that potentiality to find betalactamase inhibitor.

Based on the experiment extracell product of soil microbe using agar diffusion method, showed that some colonies had act as betalactamase inhibitor, which are number 1, 2, 4, 5, 7, 9, 14, 15, 19, 20, 22, and 23.

Key words : *betalactamase inhibitor, E. coli and soil microbes*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT berkat rahmat dan karunia-Nya maka , sehingga kami dapat menyusun dan menyelesaikan laporan akhir penelitian dana DIPA yang berjudul **Pencarian Inhibitor Betalaktamase Dari Mikroba Tanah Beberapa Daerah di Kabupaten Bandung.**

Kami mengucapkan banyak terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu selama proses penelitian, terutama kepada pengelola dana DIPA yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melaksanakan penelitian. Kami berharap penelitian ini dapat dikembangkan pada kesempatan yang akan datang.

Kami menyadari bahwa dalam penulisan laporan akhir ini masih terdapat kekurangan,karena itu kami mengharapakan kritik dan saran yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

Bandung, 11 November 2007

Penyusun

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.1 Morfologi.....	5
2.1.2 Manfaat dan Patogenesitas.....	5
2.1.3 Pengobatan.....	8
2.2 Mekanisme Kerja Ampisilin.....	9
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1 Tujuan Penelitian	10
3.2 Manfaat penelitian.....	10

BAB IV METODE PENELITIAN.....	11
4.1 Pemeriksaan adanya enzim betalaktamase pada <i>E. coli</i> Amp ^R	11
4.2 Pembuatan <i>master plate</i> <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> sensitif ampisilin (<i>E. coli</i> Amp ^S).....	11
4.3 Pengujian ekstrak mikroba tanah terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S dibandingkan dengan kontrol.....	12
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	14
5.1 Pemeriksaan adanya enzim betalaktamase pada <i>E. coli</i> Amp ^R	14
5.2 Pengujian mikroba tanah terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S dibandingkan dengan kontrol.....	14
5.3 Perbandingan Hasil Produk Ekstrasel dan Intrasel.....	17
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	18
6.1 Kesimpulan.....	18
6.2 Saran.....	18
DAFTAR PUSTAKA.....	19
LAMPIRAN	21

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil pengujian produk ekstrasel dan intrasel.....	17

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>E. coli</i>	5
Gambar 2.2 Struktur ampisilin.....	8
Gambar 2.3 Mekanisme kerja ampisilin.....	9
Gambar 4.1 Koloni tunggal berbagai mikroba tanah.....	21
Gambar 5.1 Zona bening <i>E. coli</i> Amp ^R	14
Gambar 5.2 Produk ekstrasel dan intrasel koloni tunggal mikroba tanah.....	15
Gambar 5.3 Zona hambat hasil sentrifugasi pada 4000 rpm, 5 menit terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	22
Gambar 5.4 Zona hambat hasil sentrifugasi pada 8000 rpm, 5 menit terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	22
Gambar 5.5 Zona hambat ko-amoxiclav terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	23
Gambar 5.6 Zona hambat produk ekstrasel mikroba tanah terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	24
Gambar 5.7 Zona hambat produk ekstrasel mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	25
Gambar 5.8 Zona hambat produk intrasel dengan pelarut kloroform dan zona hambat pelarut kloroform terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan	

<i>E. coli</i> Amp ^S	26
Gambar 5.9 Zona hambat produk intrasel dengan pelarut n-heksan dan zona hambat pelarut n-heksan terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	27
Gambar 5.10 Zona hambat produk intrasel dengan pelarut aseton dan zona hambat pelarut aseton terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	28
Gambar 5.11 Zona hambat produk intrasel dengan pelarut etil asetat dan zona hambat pelarut etil asetat terhadap <i>E. coli</i> Amp ^R dan <i>E. coli</i> Amp ^S	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pertumbuhan Koloni Mikroba Tanah.....	21
Lampiran 2. Pengaruh Kecepatan Sentrifugasi.....	22
Lampiran 3. Zona Hambat Ko-amosiklav.....	23
Lampiran 4. Hasil Pengujian Produk Ekstrasel.....	24
Lampiran 5. Zona Hambat Produk Ekstrasel Mikroba Tanah Penghasil Inhibitor Betalaktamase.....	25
Lampiran 6. Hasil pengujian terhadap produk intrasel pada volume bakteri uji 10 μ L menggunakan berbagai pelarut organik seperti kloroform, aseton, n-heksan dan etil asetat.....	26

BAB I

PENDAHULUAN

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif enterik yang termasuk anggota flora normal usus. *E. coli* dapat menjadi patogen jika jumlahnya meningkat atau berada di luar usus. Berdasarkan sifat virulensinya, *E. coli* dikelompokkan menjadi *E. coli* enteropatogenik (EPEC), *E. coli* enterotoksigenik (ETEC), *E. coli* enterohemoragik (EHEC), *E. coli* enteroinvasif (EIEC). *E. coli* dapat menyebabkan infeksi pada saluran urin, sepsis, meningitis dan diare (Jawetz *et al.*, 1995).

Infeksi saluran urin akut (sistitis akut) merupakan salah satu masalah utama bagi wanita yang membutuhkan perhatian karena tingginya faktor kematian dan mahal nya biaya pengobatan. Diperkirakan 11% wanita pertahun terkena infeksi saluran urin dan kemungkinan wanita terkena infeksi ini sebesar 60% (Manges *et al.*, 2001). Dilaporkan bahwa sampel urin pada pasien wanita penderita sistitis mengandung *E. coli* yang telah resisten terhadap trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicilin, dan siprofloksacin (Johnson *et al.*, 2005). Resistensi *E. coli* terhadap ampicilin disebabkan karena adanya enzim betalaktamase. Enzim betalaktamase membuka cincin betalaktam dari ampicilin dan menghilangkan daya anti mikrobanya (Jawetz *et al.*, 1995).

Pada penelitian lain, 90% patogen saluran urin menghasilkan betalaktamase, sebanyak 94,8% adalah *E. coli* (Orrett and Shurland., 1996). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan isolat bakteri *E. coli* yang diambil dari sampel urin penderita sistitis pada salah satu rumah sakit di Bandung yang telah

diisolasi oleh peneliti sebelumnya. Peneliti ini telah mendeteksi adanya gen resistensi ampisilin (gen *bla*) menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Bonar, 2005). Enzim betalaktamase dalam bakteri gram negatif terdiri dari empat kelas, enzim kelas A (TEM dan SHV), enzim kelas B, enzim kelas C biasanya disebut AmpC resisten, dan enzim kelas D yaitu enzim OXA. Enzim kelas A merupakan enzim betalaktamase yang banyak ditemukan, enzim kelas B merupakan enzim yang mengandung zink, enzim kelas C mengandung betalaktamase yang terletak pada kromosom dari bakteri famili *Enterobacteriaceae* termasuk bakteri *E. coli*, dan enzim kelas D merupakan enzim yang belum banyak diketahui (Teale, 1995).

Salah satu obat pilihan yang digunakan untuk mengobati infeksi saluran urin yang disebabkan oleh *E. coli* adalah ampisilin. Namun *E. coli* dilaporkan telah resisten terhadap ampisilin sehingga tidak digunakan lagi. Untuk menanggulangi terjadinya resistensi pada ampisilin maka diperlukan pengobatan antimikroba yang lain seperti trimethoprim-sulfamethoxazol (TMP-SMZ), siprofloxacin, norfloxacin, nitrofurantoin, dan fluoroquinolon. Dilaporkan pada tahun 1995 sampai 2001 terjadi kecenderungan resistensi antimikroba terhadap isolat *E. coli* dalam infeksi saluran urin pada pasien wanita di Amerika Serikat, 14,8-17% pertahun resisten terhadap trimethoprim-sulfametoxazol, 0,7-2,5% pertahun resisten terhadap siprofloxacin, 0,4-0,8% pertahun resisten terhadap nitrofurantoin, dan 36-37,4% per tahun resisten terhadap ampisilin, nilai presentase tersebut bervariasi dalam setiap tahunnya (Karlowsky *et al.*, 2002).

Cara lain untuk mengatasi resistensi *E. coli* terhadap obat-obat antimikroba yang selama ini digunakan yaitu dengan pemberian kombinasi ampisilin dan inhibitor betalaktamase yang dapat menghambat kerja enzim betalaktamase. Pemberian inhibitor betalaktamase dalam keadaan tunggal tidak memberikan aktivitas antibakteri sehingga perlu adanya kombinasi dengan antibiotik betalaktam. Inhibitor betalaktamase yang telah digunakan dalam pengobatan adalah asam klavulanat dan sulbaktam (Ganiswarna, 1995). Dilaporkan pada penelitian lain bahwa 62 % galur *E. coli* yang diteliti resisten terhadap penisilin, cephalotin, atau beberapa kombinasi betalaktam dan inhibitor betalaktamase (Vanjak *et al.*, 1995). Pada penelitian lain, ditemukan kasus mutasi pada gen enzim betalaktamase kelas A, yaitu mutasi yang menyebabkan Arginin-244 (Arg-244) berubah menjadi Serin-244 (Ser-244) pada TEM-1. Hal ini mengakibatkan resistensi terhadap asam klavulanat pada galur *E. coli* yang memproduksi enzim mutan tersebut (Saves *et al.*, 1995). Enzim TEM mutan tersebut disebut inhibitor resisten TEM (IRT). Dilaporkan resistensi tersebut terjadi karena seringnya penggunaan inhibitor betalaktamase dalam setiap pengobatan sehingga enzim TEM-1 betalaktamase diproduksi secara berlebihan. Resistensi terhadap asam klavulanat juga bisa disebabkan karena adanya produksi enzim OXA, dan betalaktamase-AmpC yang berlebihan, serta adanya modifikasi permeabilitas membran protein luar (Oliver *et al.*, 1999).

Oleh karena itu akan dilakukan pencarian inhibitor betalaktamase baru yang dapat menanggulangi resistensi *E. coli* terhadap obat-obat yang selama ini digunakan. Pada penelitian ini digunakan sampel tanah sebagai bahan

penelitiannya. Sampel tanah merupakan sumber paling populer untuk skrining mikroorganisme yang secara umum bertujuan untuk mencari mikroba penghasil metabolit yang dapat dimanfaatkan oleh manusia, misalnya antibiotik, antitumor, atau substansi bioaktif lainnya. Tanah dapat berasal dari pegunungan, hutan, dataran rendah, pantai atau daerah terpencil, biasanya sampel tersebut diambil dari daerah yang masih terisolir dan belum banyak dijamah peradaban manusia, dengan harapan sampel tersebut mengandung mikroorganisme dan menghasilkan antibiotik baru atau senyawa yang memiliki bioaktivitas lain (Suwandi, 1993).

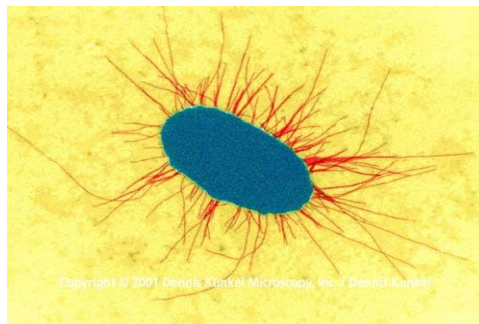
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri *Escherichia coli*

2.1.1. Morfologi

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4-0,7 μm dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Smith-Keary, 1988 ; Jawetz *et al.*, 1995).

E. coli dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. *E. coli*

2.1.2. Manfaat dan Patogenesitas

E. coli adalah anggota flora normal usus. *E. coli* berperan penting dalam sintesis vitamin K, konversi pigmen-pigmen empedu, asam-asam empedu dan penyerapan zat-zat makanan. *E. coli* termasuk ke dalam bakteri heterotrof yang memperoleh makanan berupa zat organik dari lingkungannya karena tidak dapat menyusun sendiri zat organik yang dibutuhkannya. Zat organik diperoleh dari sisa organisme lain. Bakteri ini menguraikan zat organik dalam makanan menjadi zat anorganik, yaitu CO_2 , H_2O , energi, dan mineral. Di dalam lingkungan, bakteri

pembusuk ini berfungsi sebagai pengurai dan penyedia nutrisi bagi tumbuhan (Ganiswarna, 1995).

E. coli menjadi patogen jika jumlah bakteri ini dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus. *E. coli* menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan beberapa kasus diare. *E. coli* berasosiasi dengan enteropatogenik menghasilkan enterotoksin pada sel epitel (Jawetz *et al.*, 1995).

Manifestasi klinik infeksi oleh *E. coli* bergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain (Jawetz *et al.*, 1995). Penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* yaitu :

1. Infeksi saluran kemih

E. coli merupakan penyebab infeksi saluran kemih pada kira-kira 90 % wanita muda. Gejala dan tandatandanya antara lain sering kencing, disuria, hematuria, dan piuria. Nyeri pinggang berhubungan dengan infeksi saluran kemih bagian atas.

2. Diare

E. coli yang menyebabkan diare banyak ditemukan di seluruh dunia. *E. coli* diklasifikasikan oleh ciri khas sifat-sifat virulensinya, dan setiap kelompok menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda. Ada lima kelompok galur *E. coli* yang patogen, yaitu :

- a. ***E. coli* Enteropatogenik (EPEC)**

EPEC penyebab penting diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC sebelumnya dikaitkan dengan wabah diare pada anak-anak di negara maju. EPEC melekat pada sel mukosa usus kecil.

b. *E. coli* Enterotoksigenik (ETEC)

ETEC penyebab yang sering dari “diare wisatawan” dan penyebab diare pada bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk manusia menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil.

c. *E. coli* Enteroinvasif (EIEC)

EIEC menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan shigelosis. Penyakit yang paling sering pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju negara tersebut. Galur EIEC bersifat non-laktosa atau melakukan fermentasi laktosa dengan lambat serta bersifat tidak dapat bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus.

d. *E. coli* Enterohemoragik (EHEK)

EHEK menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksiknya pada sel Vero, suatu ginjal dari monyet hijau Afrika.

e. *E. coli* Enteroagregatif (EAEC)

EAEC menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang.

3. Sepsis

Bila pertahanan inang normal tidak mencukupi, *E. coli* dapat memasuki aliran darah dan menyebabkan sepsis.

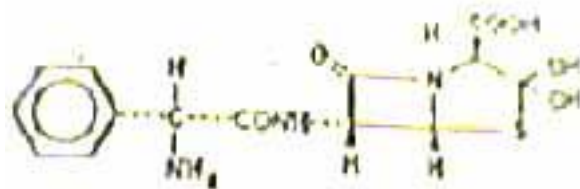
4. Meningitis

E. coli dan *Streptokokus* adalah penyebab utama meningitis pada bayi. *E. coli* merupakan penyebab pada sekitar 40% kasus meningitis neonatal (Jawetz *et al.*, 1996).

2.1.3 Pengobatan

Infeksi oleh *E. coli* dapat diobati menggunakan sulfonamida, ampisilin, sefalosporin, kloramfenikol, tetrasiklin dan aminoglikosida. Aminoglikosida kurang baik diserap oleh gastrointestinal, dan mempunyai efek beracun pada ginjal. Jenis antibiotik yang paling sering digunakan adalah ampisilin.

Ampisilin adalah asam organik yang terdiri dari satu inti siklik dengan satu rantai samping. Inti siklik terdiri dari cincin tiazolidin dan cincin betalaktam, sedangkan rantai sampingnya merupakan gugus amino bebas yang mengikat satu atom H (Ganiswarna, 1995). Struktur ampisilin dapat dilihat pada gambar 2.2.

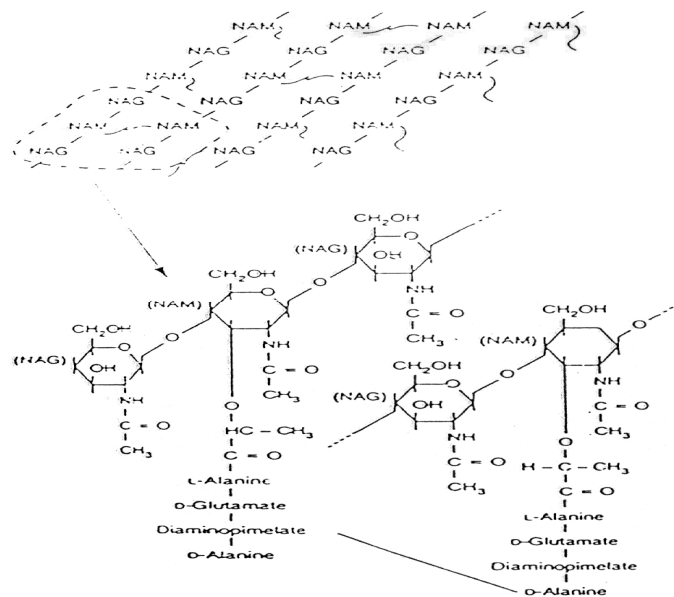


Gambar 2.2. Struktur kimia ampisilin (Farmakope IV, 1995)

Ampisilin memiliki spektrum kerja yang luas terhadap bakteri Gram negatif, misalnya *E. coli*, *H. Influenzae*, *Salmonella*, dan beberapa genus *Proteus*. Namun ampisilin tidak aktif terhadap *Pseudomonas*, *Klebsiella*, dan *Enterococci* (Setiabudy dalam Ganiswarna, 1995). Ampisilin banyak digunakan untuk mengatasi berbagai infeksi saluran pernafasan, saluran cerna dan saluran kemih (Tan Hoan Tjay dan Raharja, 2002).

2.2. Mekanisme Kerja Ampisilin

Mekanisme kerja dari antibiotik ampisilin adalah dengan menghambat pembentukan ikatan silang pada biosintesis peptidoglikan yang melibatkan *penicillin-binding protein* (PBP). Pada *E. coli*, PBP1-3 merupakan enzim bifungsi yang mengkatalisis reaksi transglukosilase dan transpeptidase serta PBP3-6 mengkatalisis reaksi karboksipeptidasi (Chopra dalam D. S. Retnoningrum, 1998). Mekanisme kerja ampisilin dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3. Mekanisme kerja ampisilin

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan inhibitor betalaktamase dalam mikroba tanah.

3.2 Manfaat Penelitian

Dalam jangka panjang, penelitian ini diharapkan dapat memperoleh inhibitor betalaktamase terhadap *E. coli* dari mikroba tanah.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Pemeriksaan adanya enzim betalaktamase pada *E. coli* Amp^R

Pemeriksaan ini dilakukan untuk memastikan adanya enzim betalaktamase pada *E. coli* Amp^R. Satu koloni tunggal bakteri *E. coli* Amp^R disuspensikan dalam media *NB* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Satu ose suspensi bakteri digoreskan pada media agar yang mengandung kanji, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam dan direndam dengan dapar salin fosfat yang mengandung kalium iodida, iodine dan penisilin secara merata. Zona bening yang terbentuk diamati. Keberadaan zona bening mengelilingi pertumbuhan bakteri menandakan adanya produksi enzim betalaktamase. Perubahan cincin betalaktam penisilin menjadi asam penisilat yang mereduksi iodine menjadi iodida dilihat dari perubahan warna kompleks kanji iodine.

4.2 Pembuatan *master plate* *E. coli* Amp^R dan *E. coli* sensitif ampisilin (*E. coli* Amp^S)

Pembuatan *master plate* *E. coli* Amp^R

Satu koloni tunggal bakteri *E. coli* Amp^R digoreskan pada media yang mengandung *NA* dan ampisilin kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

Pembuatan *master plate* *E. coli* Amp^S

Satu koloni tunggal bakteri *E. coli* Amp^S digoreskan pada media yang mengandung *NA* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

Pembuatan master plate mikroba tanah

Tiap koloni tunggal dari sampel mikroba tanah dipindahkan ke media *NA*. Sebanyak 25 koloni tunggal diisolasi dan ditumbuhkan sebagai *master plate*.

4.3 Pengujian ekstrak mikroba tanah terhadap *E. coli* Amp^R dan *E. coli* Amp^S dibandingkan dengan kontrol

Pemisahan produk ekstrasel dan produk intrasel

Tiap koloni tunggal bakteri dari *master plate* tersebut diambil satu ose dan disuspensikan ke dalam media *NB*. Suspensi tersebut kemudian disentrifugasi. Kecepatan sentrifugasi dapat mempengaruhi kesempurnaan pemisahan produk ekstrasel dan intrasel. Oleh karena itu dilakukan orientasi variasi kecepatan sentrifugasi, yaitu pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit dan 8000 rpm selama 10 menit.

Pengujian kombinasi amoksilin-asam klavulanat (Ko-amoxiclav) sebagai kontrol

Larutan Ko-amoxiclav diteteskan pada cakram kertas kosong steril. Cakram kertas tersebut diletakkan pada media *NA* yang telah mengandung suspensi *E. coli* Amp^R dan *E. coli* Amp^S, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati.

Pengujian produk ekstrasel (supernatan)

Masing-masing produk ekstrasel dari tiap koloni tunggal mikroba tanah diteteskan pada cakram kertas kosong steril. Cakram kertas tersebut diletakkan pada media *NA* yang telah mengandung suspensi *E. coli* Amp^R dan *E. coli* Amp^S, kemudian

diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati.

Pengujian produk intrasel (pelet sel)

Produk intrasel berupa endapan sel dari masing-masing mikroba tanah ditarik dengan beberapa pelarut organik, seperti aseton, etil asetat, n-heksan dan kloroform. Kemudian pelarut tersebut diuapkan. Residu ekstrak yang didapat disuspensikan dalam PBS steril. Suspensi ekstrak tersebut diteteskan pada cakram kertas kosong steril. Cakram kertas tersebut diletakkan pada media NA yang telah mengandung suspensi *E. coli* Amp^R dan *E. coli* Amp^S kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati.

Pembuatan blanko

Pelarut organik diteteskan pada cakram kertas kosong steril. Setelah pelarut organik diuapkan, cakram kertas tersebut diletakkan pada media NA yang telah mengandung suspensi *E. coli* Amp^R dan *E. coli* Amp^S kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pemeriksaan adanya enzim betalaktamase pada *E. coli* Amp^R

Pemeriksaan ini dilakukan untuk memastikan adanya enzim betalaktamase pada *E. coli* Amp^R. Hasil pemeriksaan menunjukkan terdapatnya perubahan warna dari ungu menjadi bening yang menandakan terdapatnya enzim betalaktamase pada *E. coli* Amp^R. Hasil tersebut dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1. Zona bening *E. coli* Amp^R

Perubahan warna terjadi karena cincin betalaktam penisilin berubah menjadi asam penisilat yang mereduksi iodine menjadi iodida, dilihat dari perubahan warna kompleks kanji iodine.

5.2 Pengujian mikroba tanah terhadap *E. coli* Amp^R dan *E. coli* Amp^S dibandingkan dengan kontrol

Pemisahan produk ekstrasel dan produk intrasel

Hasil dari pemisahan dengan metoda sentrifugasi berupa produk ekstrasel (lapisan atas) dan intrasel (lapisan bawah). Hasil sentrifugasi dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Produk ekstrasel dan intrasel koloni tunggal mikroba tanah

Pemilihan kecepatan sentrifugasi dapat mempengaruhi kesempurnaan pemisahan antara produk ekstrasel dan intrasel. Pemisahan yang tidak sempurna pada produk ekstrasel akan mengakibatkan tumbuhnya koloni yang dapat mengganggu pengamatan zona hambat yang terbentuk. Oleh karena itu dilakukan orientasi kecepatan sentrifugasi, yaitu digunakan kecepatan sentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit dan 4000 rpm selama 5 menit. Dengan kecepatan sentrifugasi 4000 rpm selama 5 menit menyebabkan adanya pertumbuhan mikroba pada zona hambat. Oleh karena itu sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit.

Pengujian kombinasi amoksilin-asam klavulanat (Ko-amoxiclav) sebagai kontrol

Hasil pengujian Ko-amoxiclav sebagai kontrol menunjukkan adanya zona hambat pada media yang berisi *E. coli* Amp^R maupun *E. coli* Amp^S. Hal ini menandakan bahwa Ko-amoxiclav masih efektif membunuh *E. coli* Amp^R maupun *E. coli* Amp^S terhadap mikroba uji tersebut. Zona hambat Ko-amoxiclav dapat dilihat pada gambar 5.5.

Pengujian produk ekstrasel (supernatan)

Pengujian terhadap produk ekstrasel menggunakan volume bakteri uji 10 μ L menunjukkan adanya aktivitas inhibitor betalaktamase dari beberapa koloni mikroba tanah. Aktivitas inhibitor betalaktamase tersebut ditandai dengan terbentuknya zona hambat terhadap *E. coli* Amp^R, namun tidak terbentuk zona hambat pada *E. coli* Amp^S. Hasil pengujian produk ekstrasel dapat dilihat pada gambar 5.6.

Koloni yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor betalaktamase yaitu koloni mikroba nomor 1, 2, 4, 5, 7, 9, 14, 15, 19, 20, 22, 23. Zona hambat produk ekstrasel dapat dilihat pada gambar 5.7.

Pengujian produk intrasel (pelet sel)

Hasil pengujian terhadap produk intrasel pada volume bakteri uji 10 μ L menggunakan berbagai pelarut organik seperti kloroform, aseton, n-heksan dan etil asetat dapat dilihat pada gambar 5.8, 5.9, 5.10, dan 5.11, Lampiran 6.

Berdasarkan hasil pengujian produk intrasel dengan beberapa pelarut organik dapat disimpulkan bahwa inhibitor betalaktamase tidak terdapat dalam produk intrasel. Hal ini ditandai dengan terbentuknya zona hambat baik pada kontrol maupun terhadap mikroba uji. Diduga zona hambat yang terbentuk tersebut merupakan hasil aktivitas antimikroba dari pelarut organik yang digunakan.

5.3. Perbandingan Hasil Produk Ekstrasel dan Intrasel

Dari 25 sampel mikroba tanah didapatkan 12 mikroba tanah memiliki aktivitas sebagai inhibitor betalaktamase. Hasil pengujian terhadap produk ekstrasel dan intrasel menggunakan volume bakteri uji 10 μ L dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Pengujian Produk Ekstrasel dan Intrasel

No	Nama Mikroba	Aktivitas Inhibitor Betalaktamase	
		Ekstrasel	Intrasel
1	Jajaway 4	+	-
2	BCD 3	+	-
3	Seskau 1	-	-
4	Bandung 4	+	-
5	Cijeruk lembang 3	+	-
6	Vila Roro 2	-	-
7	Vila Roro 1.3	+	-
8	BCD 4	-	-
9	Vila Roro 2.3	+	-
10	Seskau 2	-	-
11	Vila Roro 1.2	-	-
12	Jajaway 4.1	-	-
13	BCD 3.1	-	-
14	BCD 3.2	+	-
15	Cijeruk lembang 3.3	+	-
16	Vila Roro 1	-	-
17	Vila Roro 2.1	-	-
18	Vila Roro 2.2	-	-
19	Cijeruk lembang 3.1	+	-
20	Cijeruk lembang 3.2	+	-
21	Seskau 1.1	-	-
22	Vila Roro 1.1	+	-
23	Seskau 3.1	+	-
24	Seskau 2.2	-	-
25	Bandung 4.1	-	-

Keterangan :

+ = Adanya aktivitas inhibitor betalaktamase

- = Tidak ada aktivitas inhibitor betalaktamase

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Hasil pemeriksaan produk ekstrak menggunakan volume *E. coli* Amp^R 10 µL menghasilkan inhibitor betalaktamase. Hal ini ditunjukkan dengan terdapatnya zona hambat pada media yang berisi *E. coli* Amp^R dan tidak terdapatnya zona hambat pada media yang berisi *E. coli* Amp^S. Koloni yang memiliki aktivitas inhibitor betalaktamase yaitu koloni nomor 1, 2, 4, 5, 7, 9, 14, 15, 19, 20, 22, 23.

6.2. Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis mikroba yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor betalaktamase tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1995, **Farmakope Indonesia**, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, h. 103
- Debbie S. Retnoningrum, 1998, **Mekanisme dan Deteksi Molekul Resistensi Antibiotik pada Bakteri**, Jurusan Farmasi-ITB, Bandung, h. 1-5, 16-21
- Ganiswarna S. G, 1995 **Farmakologi dan Terapi** ed. 4, UIFakultas Kedokteran, Jakarta.
- Jawetz E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, L. N. Ornston, 1995, **Mikrobiologi Kedokteran**, ed. 20, University of California, San Francisco.
- Johnson J. R., M. A. Kuskowsky, T. T. O'Bryan, R. Colodner, and R. Raz, 2005, Virulence Genotype and Phylogenetic Origin in Relation to Antibiotic Resistance Profile among *Escherichia coli* Urine Sample Isolates from Israeli Woman with Acute Uncomplicated Cystitis, **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49(1), 26-31.
- Karlowsky J. A., L. J. Kelly, C. Thornsberry, M. E. Jones, and D. F. Sahn, 2002, Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of *Escherichia coli* from Female Outpatient in the United States, **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46(8), 2540-2545.
- Madigan M.T. *et al.*, 1997. **Biology of Microorganisms**, Eighth Edition. New Jersey, Prentice Hall International.
- Manges A. R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton, and L. W. Riley, 2001, Widespread Distribution of Urinary Tract Infections Caused by A Multidrug Resistance *Escherichia coli* Clonal Group, **N. Engl. J. Med.**, 345(14), 1007-1009.
- MNLH and Konphalindo, 1995, **An Atlas of Biodiversity in Indonesia**.
- Mutschler E., 1991, **Dinamika Obat**, ed.5, Penerbit ITB, Bandung.
- Oliver A., M. Perez-Vazquez, M. Martinez-Ferrer, F. Baquero, L. de Rafael, and R. Canton, 1999, Ampicillin/Sulbactam and Amoxicillin/Clavulanate Susceptibility Testing on *Escherichia coli* of Isolates with Different Beta-Lactam Resistance Phenotypes, **Antimicrob Agents Chemother.**, 43, 862-867.
- Orrett F. and S. M. Shurland, 1996, Production of Betalactamase in Trinidad an Association with Multiple Resistance to Betalactam Antibiotics, **Med Science Research.**, 24(8), 519-522.
- Pelczar M. J. dan E. C. S. Chan, 1988, **Dasar-Dasar Mikrobiologi**, Jilid 2, Terjemahan Ratna Sri Hadioetomo, dkk., Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, h. 449
- Saves I., O. Burletschiltz, P. Swaren, F. Lefevre, J. M. Masson, J. C. Prome, J. P. Samama, 1995, The Asparagine to Aspartic Acid Substitution at Position-276 of

TEM-35 and TEM-36 is Involved in the Betalactamase Resistance to Clavulanic Acid, **J. Bio. Chem.**, 270(31).

Smith-Keary P. F., 1988, **Genetic Elements in *Escherichia coli***, Macmillan Molecular biology series, London, p. 1-9, 49-54

Suwandi U., 1993, Skrining Mikroorganisme Penghasil Antibiotik, **Cermin Dunia Kedokteran.**, 46(89), 48.

Teale C. J., 2005, Detection and Characterisation of Betalactamase Resistance in Gram Negatif Bacteria of Veterinary Significance, **UK National Guidelines for Laboratories**, 102, 1-5.

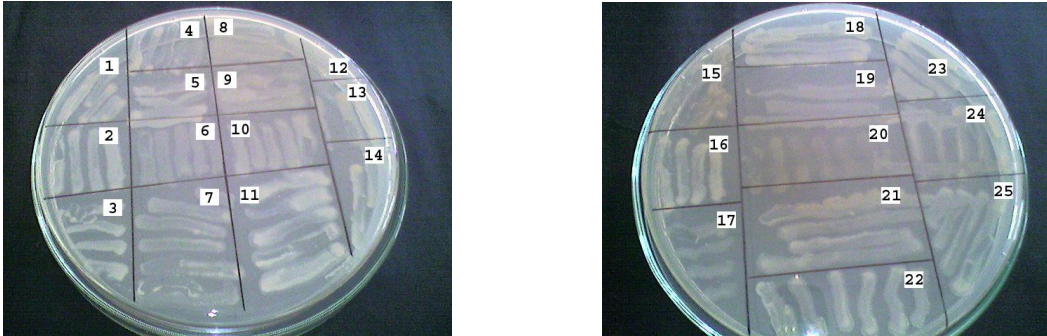
Tjay T. H. dan R. Kirana, 2002, **Obat-Obat Penting**, ed. 5, PT. Elex Media Komputindo, Jakarta.

Tortora G. *et al.*, 1998. *Microbiology an Introductio*. Sixth Edition. California, Addison Wesley Longman Inc.

Vanjak D., C. Muller-Serieys, B. Picard, E. Bergogne-Berezin, and N. Lambert-Zechovsky, 1995, Activity of Betalactamas Inhibitor Combinations on *Escherichia coli* Isolates Exhibiting Various Patterns of Resistance to Beta-lactam Agents, **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 14(11), 972-978.

LAMPIRAN 1

Pertumbuhan Koloni Mikroba Tanah



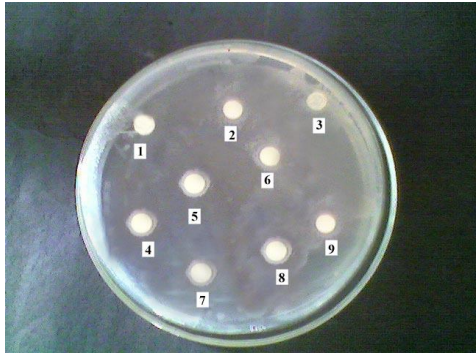
Gambar 5.1. Koloni tunggal berbagai mikroba tanah

Keterangan :

No	Nama Mikroba	No	Nama Mikroba
1	Jajaway 4	14	BCD 3.2
2	BCD 3	15	Cijeruk lembang 3.3
3	Seskau 1	16	Vila Roro 1
4	Bandung 4	17	Vila Roro 2.1
5	Cijeruk lembang 3	18	Vila Roro 2.2
6	Vila Roro 2	19	Cijeruk lembang 3.1
7	Vila Roro 1.3	20	Cijeruk lembang 3.2
8	BCD 4	21	Seskau 1.1
9	Vila Roro 2.3	22	Vila Roro 1.1
10	Seskau 2	23	Seskau 3.1
11	Vila Roro 1.2	24	Seskau 2.2
12	Jajaway 4.1	25	Bandung 4.1
13	BCD 3.1		

LAMPIRAN 2

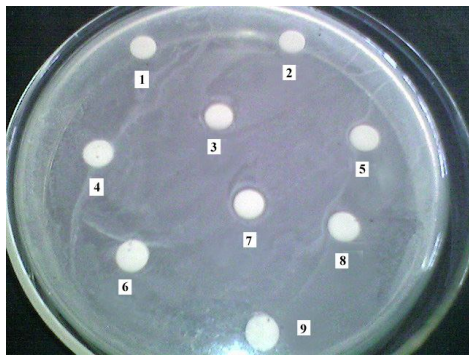
Pengaruh Kecepatan Sentrifugasi



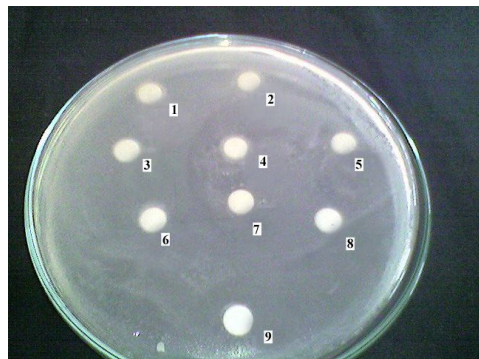
5.3.a. Zona hambat produk ekstrasel hasil sentrifugasi pada 4000 rpm, 5 menit terhadap *E. coli* Amp^R



5.3.b. Zona hambat produk ekstrasel hasil sentrifugasi pada 4000 rpm, 5 menit terhadap *E. coli* Amp^S



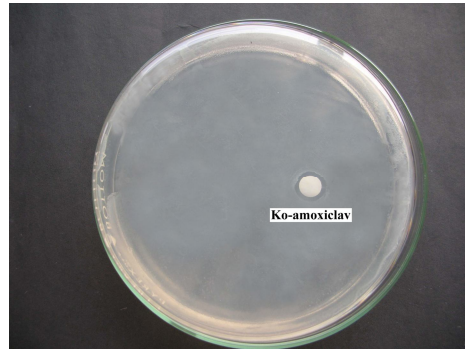
5.4.a. Zona hambat produk ekstrasel hasil sentrifugasi pada 8000 rpm, 10 menit terhadap *E. coli* Amp^R



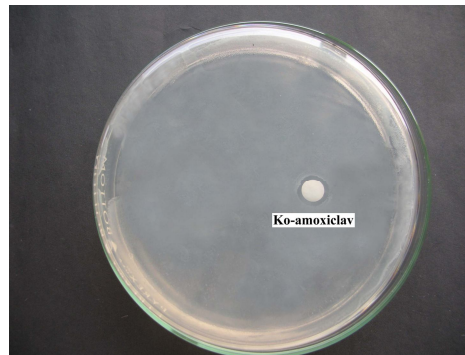
5.4.b. Zona hambat produk ekstrasel hasil sentrifugasi pada 8000 rpm, 10 menit terhadap *E. coli* Amp^S

LAMPIRAN 3

Zona Hambat Ko-amosiklav

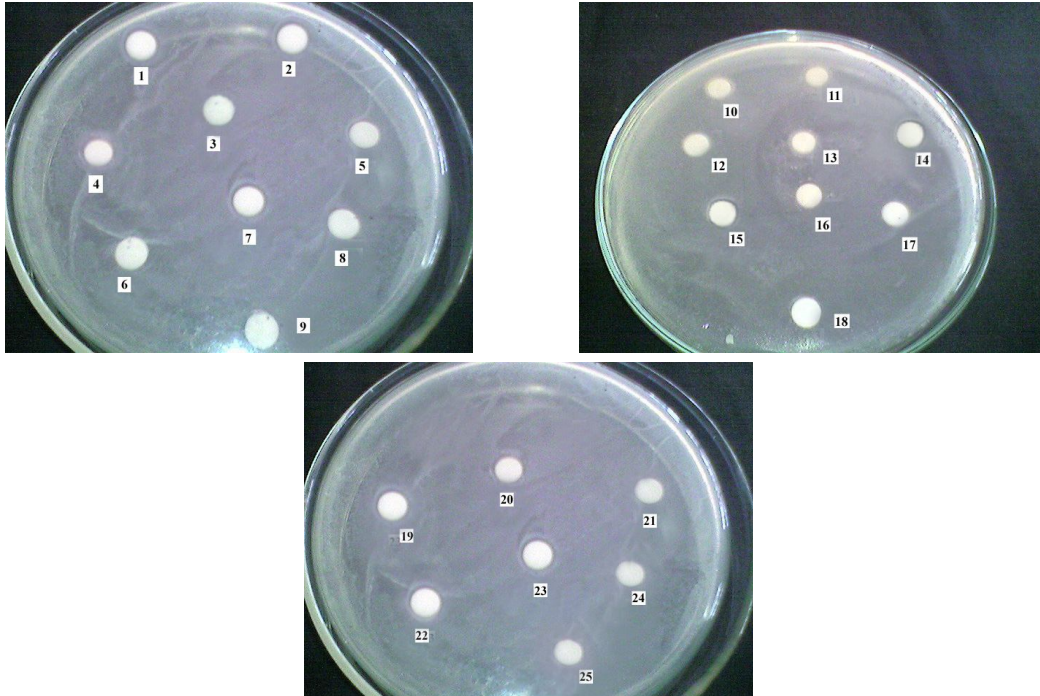


5.5.a. Zona hambat Ko-amoxiclav terhadap *E. coli* Amp^R

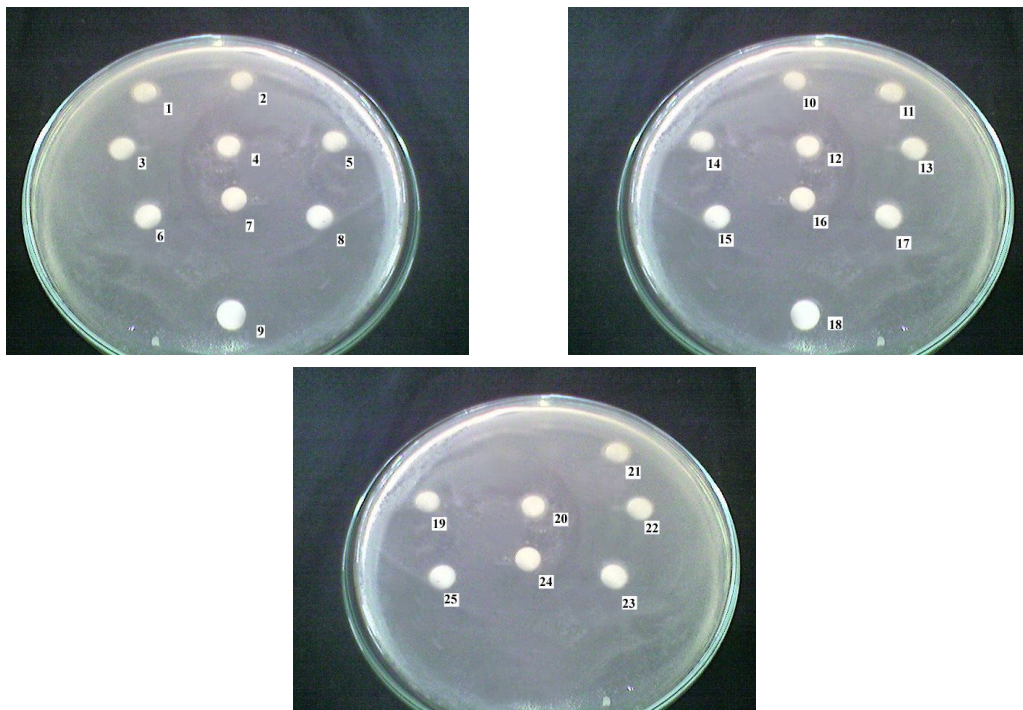


5.5.b. Zona hambat Ko-amoxiclav terhadap *E. coli* Amp^S

LAMPIRAN 4
Hasil Pengujian Produk Ekstrasel



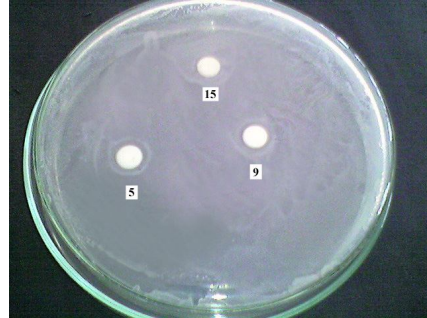
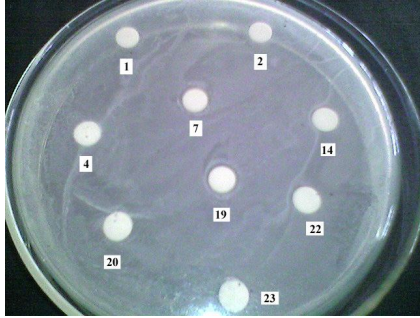
5.6.a. Zona hambat produk ekstrasel mikroba tanah terhadap *E. coli* Amd^R



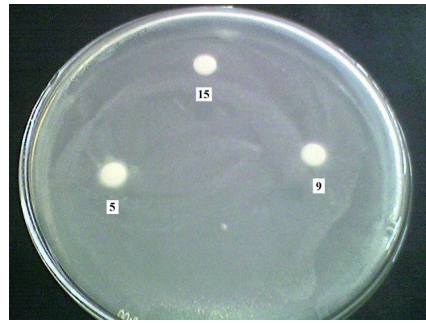
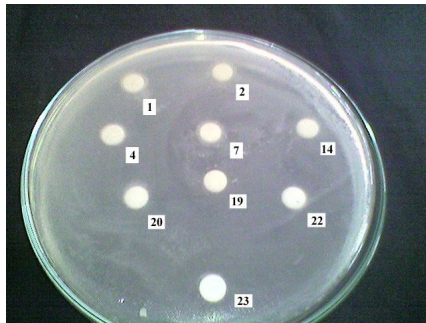
5.6.b. Zona hambat produk ekstrasel mikroba tanah terhadap *E. coli* Amd^S

LAMPIRAN 5

Zona Hambat Produk Ekstrasel Mikroba Tanah Penghasil Inhibitor Betalaktamase



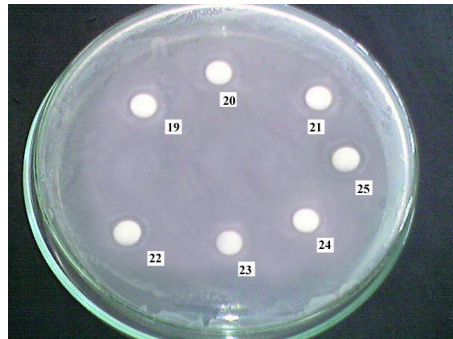
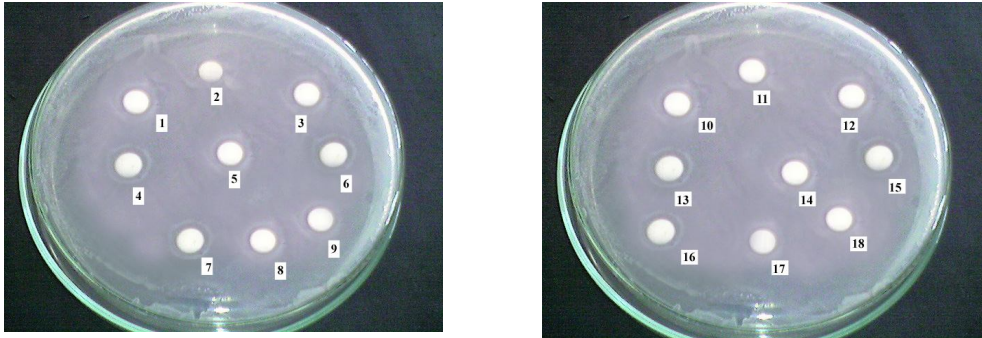
5.7.a. Zona hambat produk ekstrasel mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase terhadap *E. coli* Amp^R



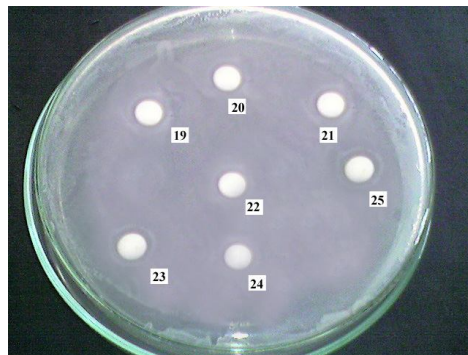
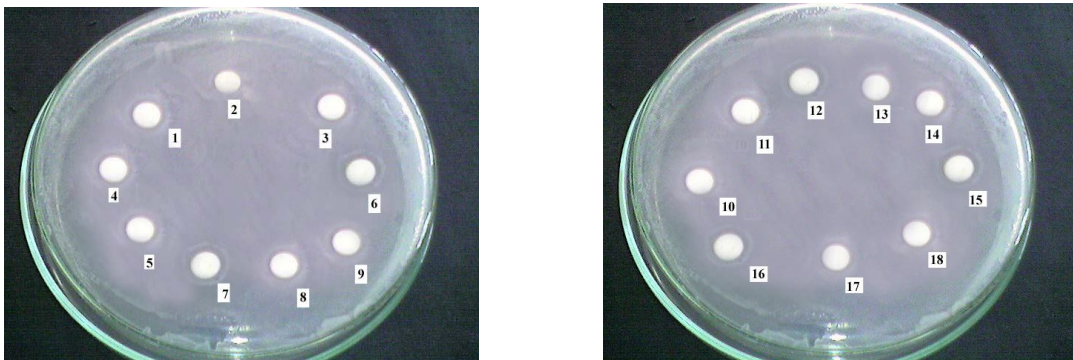
5.7.b. Zona hambat produk ekstrasel mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase terhadap *E. coli* Amp^S

LAMPIRAN 6

Hasil pengujian terhadap produk intrasel pada volume bakteri uji 10 μ L menggunakan berbagai pelarut organik seperti kloroform, aseton, n-heksan dan etil asetat



5.8.a. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut kloroform terhadap *E. coli* Amp^R



5.8.b. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut kloroform terhadap *E. coli* Amp^S

LAMPIRAN 6

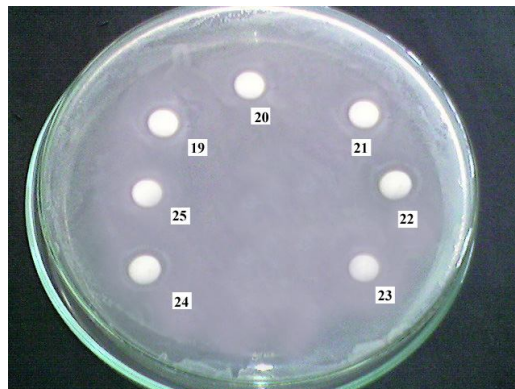
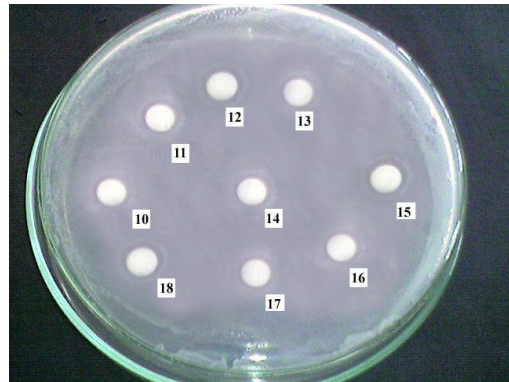
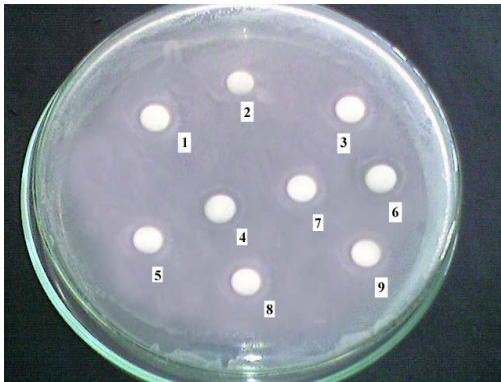
(Lanjutan)



5.8.c. Zona hambat pelarut kloroform terhadap *E. coli* Amp^R

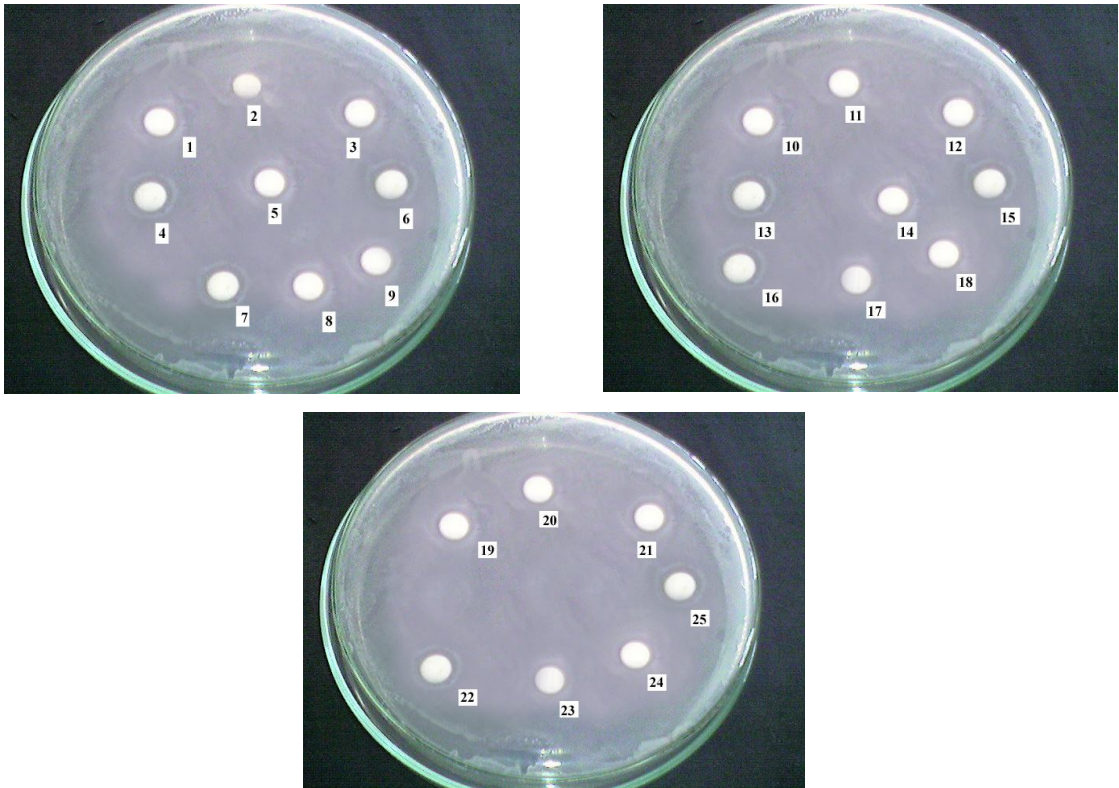


5.8.d. Zona hambat pelarut kloroform terhadap *E. coli* Amp^S



5.9.a. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut n-heksan terhadap *E. coli* Amp^R

LAMPIRAN 6
(Lanjutan)



5.9.b. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut n-heksan terhadap *E. coli* Amp^S

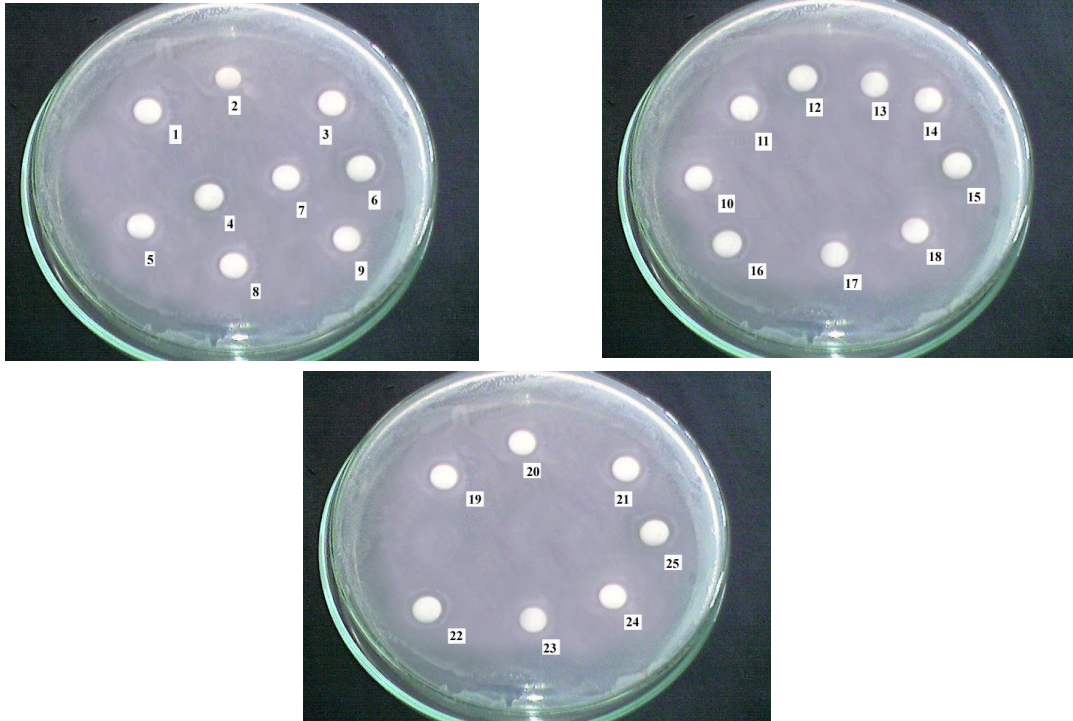


5.9.c. Zona hambat pelarut n-heksan terhadap *E. coli* Amp^R

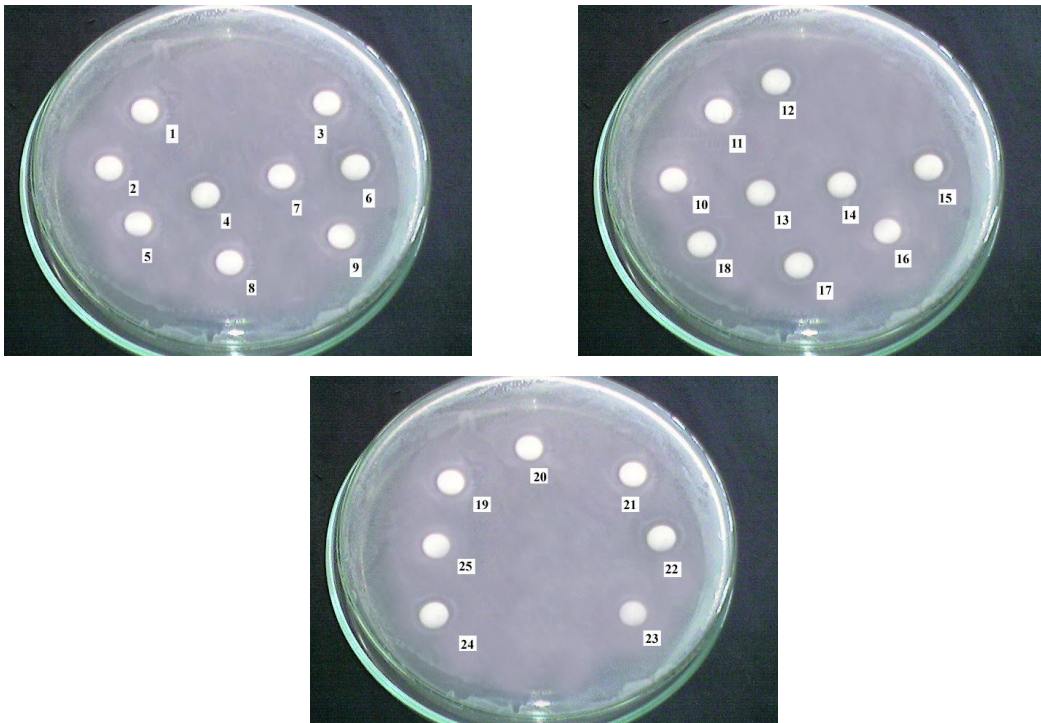


5.9.d. Zona hambat pelarut n-heksan terhadap *E. coli* Amp^S

LAMPIRAN 6
(Lanjutan)



5.10.a. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut aseton terhadap *E. coli* Amp^R



5.10.b. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut aseton terhadap *E. coli* Amp^S

LAMPIRAN 6

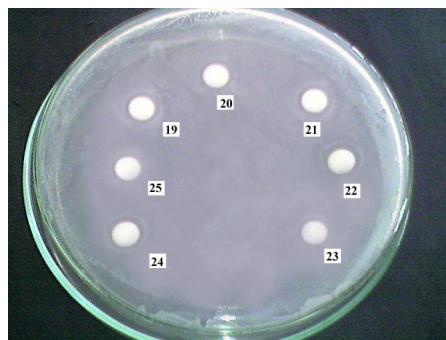
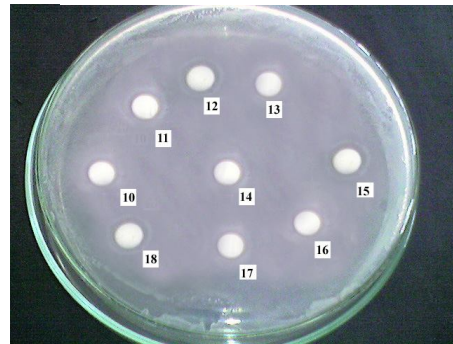
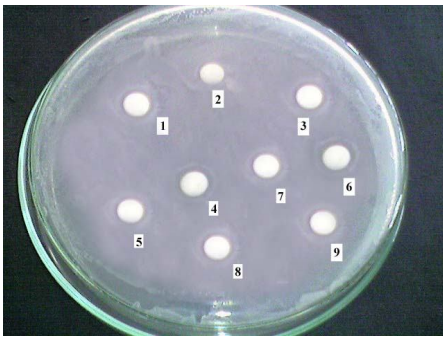
(Lanjutan)



5.10.c. Zona hambat pelarut aseton terhadap *E. coli* Amp^R

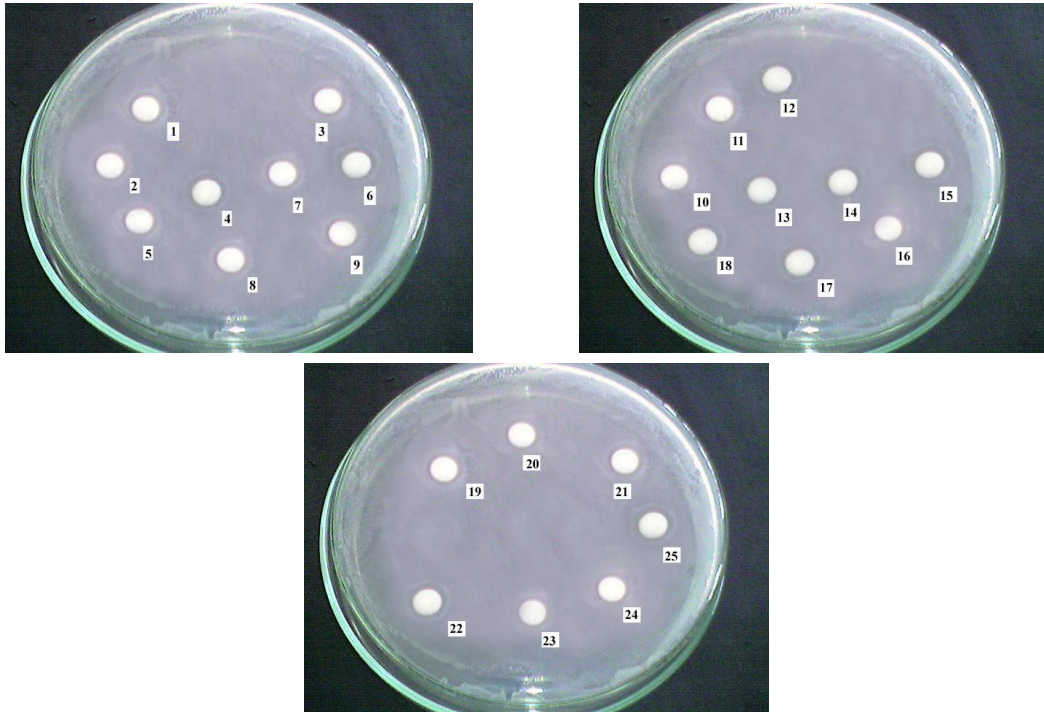


5.10.d. Zona hambat pelarut aseton terhadap *E. coli* Amp^R



5.11.a. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut etil asetat terhadap *E. coli* Amp^R

LAMPIRAN 6
(Lanjutan)



5.11.b. Zona hambat produk intrasel dengan pelarut etil asetat terhadap *E. coli* Amp^R



5.11.c. Zona hambat pelarut etil asetat terhadap *E. coli* Amp^R



5.11.d. Zona hambat pelarut etil asetat terhadap *E. coli* Amp^S

**LAMPIRAN
TENAGA PENELITI**

CURRICULUM VITAE KETUA PENELITI

- 1. Nama lengkap** : Irma Melyani Puspitasari, S.Si., Apt
- 2. NIP** : 132 317 748
- 3. Pangkat/ Golongan** : Penata muda/ IIIb
- 4. Jabatan Fungsional** : -
- 5. Jabatan Struktural** : -
- 6. Unit kerja** : Fakultas Farmasi UNPAD
- 7. Alamat & Tlp. Rumah, HP** : Dusun Awilega Rt03/09 Ds. Kutamandiri
kec. Tanjungsari Kabupaten Sumedang, No.
Hp : 08562269205
- 8. Alamat Kantor** : Jl. Raya Bandung Sumedang Km 21
Jatinangor 45363, No. Telp : (022) 7796200
- 9. Riwayat pendidikan**
 - 1997 – 2002 : Sarjana Farmasi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Padjadjaran Bandung
 - 2002 – 2003 : Profesi Apoteker
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Padjadjaran Bandung
- 10. Riwayat pekerjaan** : Staf pengajar Farmasi UNPAD
- 11. Pengalaman penelitian** :
 - 2004 : Formulasi dan uji aktivitas antibakteri sari
buah mengkudu (*Morinda citrifolia*)

CURRICULUM VITAE ANGGOTA PENELITI

1. **Nama lengkap** : Sri Agung Fitri Kusuma, S.Si., M.Si., Apt
2. **NIP** : 132 300 464
3. **Pangkat/ Golongan** : Penata/ IIIb
4. **Jabatan Fungsional** : Lektor
5. **Jabatan Struktural** : -
6. **Unit kerja** : Fakultas Farmasi UNPAD
7. **Alamat & Tlp. Rumah, HP** : Jl. Ir. H. Juanda Gg. H. Yusuf No. 16/159A
Bandung, No. Hp : 081573923200,
08882231978
8. **Alamat Kantor** : Jl. Raya Bandung Sumedang Km 21
Jatinangor 45363, No. Telp : (022) 7796200
9. **Riwayat pendidikan**
 - 1997 – 2002 : Sarjana Farmasi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Padjadjaran Bandung
 - 2002 – 2003 : Profesi Apoteker
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Padjadjaran Bandung
 - 2003 – 2005 : Magister Mikrobiologi Farmasi
School of Pharmacy
Institut Teknologi Bandung
10. **Riwayat pekerjaan** : Staf pengajar Farmasi UNPAD
11. **Pengalaman penelitian** :
 - 2005 : Regulasi Produksi Ornitin Karbamoyltransferase
Streptococcus pyogenes CS24 Oleh Albumin Serum
Manusia
Laboratorium Biokimia Dan Rekayasa genetika
KPP Bioteknologi ITB
 - 2006 : Deteksi Keberadaan Gen Resistensi Ampisilin
Pada Bakteri *Escherichia coli* Isolat Klinik
Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi
Universitas Padjadjaran Bandung

Publikasi :

R. Ellyasheva, **S.A. Fitri Kusuma**, S.A. Lestari, C. Riani, B. Iskandar, and D. S. Retnoningrum, 2005, Overexpression and Purification of Ornithine Carbamoyl Transferase, a Human Serum Albumin Induced Protein of *Streptococcus pyogenes* CS24, 9th National Congress of Indonesian Society for Microbiology and 3rd Asian Conference for Lactic Acid Bacteria, Denpasar, Indonesia, 25 – 27 August 2005.

CURRICULUM VITAE ANGGOTA PENELITI

1. **Nama lengkap** : Tina Rostinawati, S.Si. M.Si., Apt
2. **NIP** : 132 317 752
3. **Pangkat/ Golongan** : Penata muda/ IIIb
4. **Jabatan Fungsional** : -
5. **Jabatan Struktural** : -
6. **Unit kerja** : Fakultas Farmasi UNPAD
7. **Alamat & Tlp. Rumah, HP** : Jl. Babakan Sumedang No. 40 Komplek Boromeus
Cinunuk Bandung, No. Hp : 081394078173
8. **Alamat Kantor** : Jl. Raya Bandung Smedang Km 21
Jatinangor 45363, No. Telp : (022) 7796200
9. **Riwayat pendidikan**
 - 1992 – 1997 : Sarjana Farmasi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Bandung
 - 1997 – 1998 : Profesi Apoteker
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Bandung
 - 2003 – 2006 : Magister Mikrobiologi Farmasi
School of Pharmacy
Institut Teknologi Bandung
10. **Riwayat pekerjaan** : Staf pengajar Farmasi UNPAD
11. **Pengalaman penelitian** :
 - 2006 : Kloning Fragmen DNA Pengkode S80-180
Galur Alami dan Mutan G145R Virus
Hepatitis B pada *Escherichia coli* BL 21