ISOLASI BAKTERI ANTIBIOTIK INHIBITOR β-LAKTAMASE DARI LIMBAH PABRIK TAHU

ISOLATION OF BACTERIA ANTIBIOTICS B-LACTAMASE INHIBITORS FACTORY FROM TOFU WASTE

Vina Juliana Anggraeni

Sekolah Tinggi Farmasi Bandung

E-mail: vina.juliana@stfb.ac.id

Abstrak
Resistensi terhadap antibiotik golongan beta laktam saat ini banyak terjadi. Hal ini dapat dikurangi dengan menggunakan inhibitor terhadap aktivitis enzim β-laktamase. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri yang memproduksi inhibitor antibiotik β lactamase. Sampel diambil dari pabrik tahu dari daerah tanjungsari. Hasil Isolasi didapat beberapa isolat tunggal yang berpotensi menghasilkan inhibitor beta laktamase. Isolat tersebut di uji daya hambat terhadap bakteri target golongan β-laktamase. Isolat yang menghasilkan zona bening ketika uji merupakan isolat dengan potensi. Dari isolat terpilih didapat 2 bakteri kandidat yang memiliki potensi untuk menghasilkan inhibitor beta laktamase AC2 dan AC3.

Kata kunci: isolasi bakteri, beta laktamase, inhibitor beta laktamase

PENDAHULUAN

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. Limbah pabrik tahu, merupakan salah satu sumber alam yang potensial untuk mendapatkan mikroorganisme penghasil metabolit sekunder. Limbah prabrik tahu seringkali menjadi problem bagi lingkungan sekitar, namun dibalik problem tersebut kita dapat menemukan potensi baru dari bakteri yang mampu hidup di dalamnya. Kondisi limbah yang ekstrim dapat menumbuhkan bakteri yang dapat bertahan hidup pada kondisi tersebut menghasilkan metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai antibiotik.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi bakteri dari sampel limbah prabrik tahu di daerah Tanjungsari, Sumedang, Jawa Barat, yang mampu menghasilkan antibiotik inhibitor enzim β-laktamase, dan melakukan identifikasi terhadap bakteri tersebut.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini meliputi beberapa tahapan, yaitu:

Pengambilan Sampel

Sampel penelitian diambil dari pabrik tahu di sekitar Tanjung sari, Sumedang, Jawa Barat.

Bahan

Isolat bakteri dari limbah prabrik tahu,bakteri ICBB 267, Antibiotik amoxilin, L, Muller Hinton Broth (MHB), dan Nutrient Agar (NA).

Prosedur Kerja

Sampel limbah yang diambil, 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 amoxilin 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, Metode yang digunakan adalah metode “direct antagonism” dengan “stab inoculation” menggunakan strain indikator bakteri penguji (strain yang secara philogenik dekat). Untuk tujuan skrining, uji ini dilakukan pada media padat dan meliputi deteksi penghambatan pertumbuhan yang disebabkan oleh strain produktor. Media uji dipersiapkan dengan metode cawan tuang. Dan bakteri yang diuji lewat media kertas caktram. Adanya senyawa aktivitas inhibisi yang dihasilkan oleh bakteri ditandai dengan zona bening di sekitar stab inocula. Isolat yang menghasilkan zona hambatan terluas (diukur dalam satuan mm) dipakai sebagai bakteri penghasil inhibitor beta laktamase. (Garver dan Muriana, 1993; Wiryawan et al., 2003). Bakteri yang mampu memberi zona bening paling besar akan dilakukan identifikasi dan karakterisasi jika memungkinkan.

Identifikasi Bakteri yang menghasilkan diameter zona bening paling luas selanjutnya diisolasi dan diidentifikasi. Penentuan species bakteri dilakukan dengan menggunakan S andard Analytical P ofile Index (API) 50 CHL Kit (bio Meriueux, Marcy l’Etoile, France,

2006). Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif, untuk selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel atau gambar (Gaspersz, 1991; Steel dan Torrie, 1995).

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pengambilan Sampel

Proses pengambilan sampel diawali dengan survei pabrik tahu dan tempat pembuangan limbah pabrik tahu. Dari hasil survei dipilih satu pabrik tahu sumedang di Tanjungsari kemudian sampel diambil dari pabrik tersebut. Sampel yang diambil berupa limbah padat dan filtrat hasil penyaringan kedelai yang akan dijadikan tahu atau disebut dengan acian. Pemilihan sampel limbah dipilih limbah padat, limbah cair tidak dipilih. Menurut pemaparan pekerja pada saat survei, limbah cair hanya berupa sisa air yang ditambahkan saat proses pembuatan tahu dan langsung dibuang ke sungai. Oleh sebab itu dipilih hanya limbah padat, limbah padat atau yang disebut dage biasa digunakan untuk pakan ternak. Untuk pemilihan sampel dari acian dikarenakan acian merupakan sari dari kedelai yang banyak mengandung protein pada proses acian pun diberi cuka untuk menjadikan acian tersebut padat atau menjadi tahu yang kita inginkan. Proses ini menjadi menarik karena pada acian ini akan tumbuh beberapa bakteri yang hidup pada lingkungan ekstrem dari segi pH dan kandungan nutrisi, sehingga diharapkan pada sampel ini ada bakteri yang mampu untuk menghasilkan inhibitor beta laktamase.

Isolasi Bakteri

Sampel yang diperoleh dari pabrik tahu sumedang di Tanjungsari, ditumbuhkan dalam media agar NA yang telah diberi antibiotik amoxilin yang merupakan antibiotik golongan beta laktam. Penambahan amoxilin dalam media berfungsi sebagai media selektif, bakteri yang mampu hidup dalam media selektif ini merupakan bakteri yang resisten terhadap antibiotik beta laktam, diharapkan bakteri yang mampu tumbuh nii memiliki inhibitor beta laktamase pada saat uji inhibisi menggunakan bakteri uji.

Sampel diberi label, untuk sampel limbah padat diberi Label LP dan untuk Acian diberi label AC. Sampel limbah yang diambil, 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 amoxilin dengan konsentrasi 10 µg/ml media. Inkubasi pada suhu 30 °C selama 2 hari.

Pada tabel 1 dapat dilihat kemampuan tumbuh bakteri yang ada dalam sampel di media dengan penambahan antibitik. Hasil isolasi didapat pada limbah padat, tidak ada bakteri yang mampu tumbuh dalam media selektif. Untuk sampel AC, diperoleh bakteri yang mampu tumbuh pada media selektif. Bakteri yang tumbuh pada media selektif dipilih dari perbedaan kenampakan saja untuk diawal. Bakteri yang dipilih merupakan koloni tunggal yang terpisah dari koloni lainnya. Dipilih 3 bakteri untuk tahap selanjutnya.

Sebelum ke tahap berikutnya dilakukan pemurnian terlebih dahulu. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri yang terpisah, kemudian digores pada cawan NA yang

baru. 3 bakteri yang akan diuji kemudian di labeli dengan insial AC2, AC3, dan AC4.

Tabel 1. Kemampuan Tumbuh Bakteri Sampel dalam Media Selektif (NA + Antibiotik)

No	Sampel	Kemampuan Tumbuh
1	Limbah Padat (LP)	Tidak tumbuh
2	Acian (AC)	Tumbuh

Uji Inhibisi

Dipilih 3 bakteri hasil isolasi untuk uji inhibisi. Uji daya hambat terhadap bakteri target, Metode yang digunakan adalah metode "direct antagonism" dengan "stab inoculation" menggunakan strain indikator bakteri penguji (strain yang secara philogenik dekat). Bakteri uji yang dipilih adalah strain alami yang didapat dari hasil isolasi yang dilakukan oleh Indonesian Center of Biodiversity and Bioteknology (ICBB) Bogor. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim beta laktamase. Isolat yang diambil yaitu *Lycinibacillus Fusiromis* DSMZ 493 atau dengan kode ICBB 267. Isolat ini sudah diuji hidup dalam media ampisilin yang dilakukan di ICBB Bogor.

Untuk tujuan skrining, uji ini dilakukan pada media padat dan meliputi deteksi penghambatan pertumbuhan yang disebabkan oleh strain produktor. Adanya senyawa aktivitas inhibisi yang dihasilkan oleh bakteri ditandai dengan zona bening di sekitar stab inocula. Isolat yang menghasilkan zona hambatan terluas (diukur dalam satuan mm) dipakai sebagai bakteri penghasil inhibitor beta laktamase. (Garver dan Muriana, 1993; Wiryawan et al., 2003).

Sebelum melakukan uji secara duplo untuk menentukan diameter zona bening dilakukan uji pendahuluan dengan melakukan uji pada semua isolat di 1 cawan yang sama. Dari hasil uji pendahuluan didapat AC2, AC3 dan AC4 yang menghasilkan zona bening. Dari hasil uji pendahuluan, ketiga bakteri yang menghasilkan diuji kembali secara duplo. Hasil uji inhibisi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Zona Hambat yang Dihasilkan Isolat

No	Isolat	Diameter Zona Hambat (cm)
1	AC2	0.76
2	AC3	0.73
3	AC4	0.51

Ketiga bakteri menghasilkan zona bening atau zona hambat, dari ketiga bakteri ini dipilih 2 bakteri untuk diidentifikasi lebih lanjut. Isolat yang diidentifikasi yaitu isolat AC2 dan AC3. Pada penelitian tidak dilakukan karakteristik berupa kurva pertumbuhan dan kurva produksi inhibitor dikarenakan melihat hasil uji inhibisi yang tidak terlalu besar maka karakterisasi ini dilewat dan dilanjutkan dengan identifikasi.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Diperoleh 2 kandidat bakteri hasil isolasi yang dapat menghasilkan inhibitor beta laktamase. Kandidat tersebut adalah isolat AC2 dan AC3/

Saran

Perlu dilakukan identifikasi isolat untuk mendapatkan informasi mengenai bakteri hasil isolasi pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

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. s

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.

Garver KI, Muriana PM. 1993. Detection, Identification, and Characterization of Bacteriocin Producing lactic Acid Bacteria from Retail Food Products. Int J Food. Microbiol. 19: 241-258

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 âLactamase 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.