

# IDENTIFIKASI MIKROBA LAUT DAN MIKROBA TANAH PENGHASIL INHIBITOR BETALAKTAMASE

Indah Laily Hilmi

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai identifikasi mikroba tanah dan mikroba laut penghasil inhibitor betalaktamase menggunakan serangkaian uji biokimia dan metode PCR. Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa genus penghasil inhibitor enzim betalaktam adalah *Micrococcus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Alcaligenes* dan *Staphylococcus*. PCR dilakukan terhadap 9 mikroba tersebut menggunakan primer *16s rDNA*. Hasil analisis urutan nukleotida gen *16s rDNA* menunjukkan bahwa genus bakteri tersebut adalah *Alcaligenes sp.*, *Staphylococcus sp.*, dan *Salmonella typhi*.

Kata Kunci : Mikroba laut, mikroba tanah, inhibitor betalaktamase

## ABSTRACT

*Identification of soil and marine microbe producing betalactamase inhibitor using biochemistry methode and PCR methode. Result showed biochemistry methode that bacteria from genus Micrococcus, Salmonella, Escherichia, Alcaligenes dan Staphylococcus. PCR methode applied to 9 microbe using primer 16s rDNA. Result nucleotide gen 16s rDNA alignment showed that bacteria genus from Alcaligenes sp., Staphylococcus sp., and Salmonella typhi.*

Keywords : Soil Microbe, marine microbe, betalaktamase inhibitor

## 1. PENDAHULUAN

Infeksi saluran urin akut (sistitis akut) merupakan salah satu masalah utama bagi wanita, yang membutuhkan perhatian karena tingginya faktor kematian dan mahalanya 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, ampisilin, dan siprofloksacin (Johnson *et al.*, 2005). Berdasarkan database USA dari tahun 1995 hingga tahun 2001, kasus resistensi *E. coli* terhadap ampisilin (36 sampai 37 % per tahunnya), trimethoprim-sulfamethoxazol (14,8 sampai 17 %), siprofloksacin (0,7 sampai 2,5 %), dan nitrofurantoin (0,4 sampai 0,8 %) (Karlowsky *et al.*, 2002).

Salah satu obat pilihan yang digunakan untuk mengobati infeksi saluran urin yang disebabkan oleh *E. coli* adalah ampisilin. Namun sejak tahun 1975 resistensi *E. coli* terhadap ampisilin sudah 80%. Penyebab utama resistensi *E. coli* terhadap ampisilin adalah dihasilkannya enzim betalaktamase. Enzim tersebut membuka cincin betalaktam dari ampisilin sehingga menghilangkan daya anti mikrobanya (Jawetz *et al.*, 1995).

Salah satu cara untuk mengatasi resistensi *E. coli* terhadap obat-obat anti mikroba yang selama ini digunakan yaitu dengan pemberian kombinasi antibiotik betalaktam dengan inhibitor betalaktamase. Inhibitor betalaktamase yang telah digunakan dalam pengobatan infeksi *E. coli*

adalah asam klavulanat, sulbaktam, dan tazobaktam. Namun telah banyak dilaporkan terjadi resistensi *E. coli* terhadap kombinasi antibiotik betalaktam-inhibitor betalaktamase tersebut karena produksi enzim inhibitor resisten TEM (IRT) (Oliver *et al.*, 1999).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pencarian inhibitor betalaktamase dari mikroba tanah dan mikroba laut terhadap *E. coli* yang resisten terhadap ampisilin (*E. coli* Amp<sup>R</sup>). Pada produk ekstrasel (supernatan) ditemukan empat mikroba laut penghasil inhibitor betalaktamase yaitu dari daerah Bl 6, Stla 1, Sn16 , dan Mksb 3 (Anggraeni, 2006). Ditemukan pula 12 mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase yaitu dari daerah Jajaway 4, Bcd 3, Bdg 4, Cijeruk Lembang 3, Vila roro 1.3, Vila roro 2.3, Bcd 3.2, Cijeruk lembang 3.3, Cijeruk lembang 3.1, Cijeruk, lembang 3.2, Vila roro 1.1, dan Seskau 3.1 (Rahayu, 2006).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi mikroba laut dan mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase tersebut

## **2. BAHAN ALAT DAN METODE PENELITIAN**

### **2.1 Bahan**

#### **2.1.1 Mikroba Uji**

1. Mikroba tanah dan laut penghasil inhibitor betalaktamase.

2. *E. coli* Amp<sup>R</sup> (Hasil isolat klinis dari penderita sistitis di Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung).

3. *E. coli* Amp<sup>S</sup> (ATCC 25922)

### **2.1.2 Bahan Kimia**

*Nutrient agar*, *nutrien broth*, Ko-amoxiclav, Natrium klorida, Kalium Klorida, Natrium Hidrophosphat, Kalium Hidrophosphat, Air suling, Agarosa, primer *forward* (5'GGTTAC(G/C)TTGTACGACTT3'), dan primer *reverse* (5'AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3'), deoksinukleotida trifosfat (dNTP), *Taq* DNA polimerase, Marka 100 bp. *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, etanol absolut, etanol 70%, air suling, air suling ganda, Tris- basa 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0, magnesium klorida, dapar *loading* (sukrosa dan 0,25 % bromfenol biru), etidium bromida, dan medium Luria Bertani (LB).

### **2.2 Alat**

Spatel, timbangan analitik, oven, inkubator, otoklaf, ose, mikropipet volume 10-200 µL, mikropipet volume 20-200 µL, alat sentrifugasi, tabung eppendorf 1.5 mL, cakram kertas 11 mm, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, dan Dna Thermal Cycle.

## 2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dengan tahapan, yaitu :

### 2.3.1 Penentuan Pengaruh Konsentrasi Produk Ekstrasel Terhadap Diameter Hambat

Stok gliserol koloni mikroba laut dan mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase masing-masing diambil satu ose dan disuspensikan ke dalam media *nutrien broth (NB)*. Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu kamar. Setelah itu, suspensi bakteri tersebut disentrifugasi sehingga akan terpisah supernatan dan endapan. Kemudian supernatan diambil dan dipekatkan menggunakan *freeze dryer* sehingga menjadi serbuk. Serbuk tersebut disuspensikan dalam *fosfat buffer salin (PBS)* steril dan dibuat dengan konsentrasi yang berbeda-beda dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Kemudian disentrifugasi kembali sehingga akan terpisah supernatan dan endapan. Masing-masing produk ekstrasel koloni bakteri tersebut diteteskan pada cakram kertas kosong steril. Cakram kertas tersebut diletakkan pada media *nutrien agar (NA)* yang telah mengandung suspensi *E. coli* Amp<sup>R</sup> dan *E. coli* Amp<sup>S</sup>, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati dan dibandingkan dengan kontrol. Adanya zona hambat pada *E. coli* Amp<sup>R</sup> namun tidak pada *E. coli* Amp<sup>S</sup>, menandakan adanya inhibitor betalaktamase.

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

### **2.3.2 Identifikasi Mikroba Tanah Dan Mikroba Laut Penghasil Inhibitor Betalaktamase.**

#### **Isolasi Mikroba Tanah Dan Mikroba Laut Dengan Menggunakan Cawan Gores.**

Tiap single koloni mikroba digoreskan pada media yang mengandung NA kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 18-24 jam.

#### **Pengamatan Morfologi Koloni Mikroba dan Bentuk Koloni Secara Visual.**

Morfologi koloni diamati berdasarkan warna dan bentuk

#### **Pengamatan Morfologi Sel Mikroba Secara Mikroskopik**

Koloni yang akan diidentifikasi diambil menggunakan ose. Koloni tersebut disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril. Kemudian suspensi mikroba tersebut dioleskan di atas kaca objek yang bersih. Olesan mikroba digenangi dengan pewarna karbol gentian violet dibiarkan satu menit. Zat warna yang berlebih dibuang lalu dibilas dengan air mengalir. Kemudian olesan mikroba digenangi dengan larutan lugol dan dibiarkan satu menit.

Lugol berlebih dibuang, olesan dicuci dengan pemucat alkohol 95% sampai zat warna larut lalu bilas dengan air. Kemudian olesan digenangi air fukhsin dan dibiarkan satu menit. Zat warna berlebih dibuang lalu dibilas dengan air dan dikeringkan menggunakan kertas saring. Olesan tersebut ditetesi minyak emersi lalu diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 x. Bentuk sel mikroba diamati. Bakteri gram negatif akan berwarna merah dan bakteri gram positif akan berwarna ungu.

**Uji Biokimia**, meliputi :Uji Fermentasi Karbohidrat ,Uji Motil Indol Urea ( MIU ),Uji Sitrat,Uji Metil Red ( MR ) , Uji *Voges – Proskauer* ( VP )

### **Metode Molekuler**

#### **Isolasi DNA Total Mikroba Tanah Dan Mikroba Laut Penghasil**

##### **Inhibitor Betalaktamase.**

Mikroba laut dan mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase. ditumbuhkan dalam 5 mL media cair Luria Bertani (LB) lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 16 jam . Sebanyak 1,5 mL biakan bakteri untuk disentrifugasi pada kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 2 menit. Endapan sel disuspensikan kembali dengan larutan EDTA 50 mM pH 8 sampai volume akhir 480  $\mu$ L, lalu ditambah lizozim. Suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30-60 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang, endapan sel disuspensikan dengan 600  $\mu$ L larutan pelisis inti, lalu

diinkubasi pada suhu 80 °C selama 5 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, ditambahkan 3 µL larutan RNase, lalu tabung dibolak-balik 2-5 kali. Larutan diinkubasi pada 37 °C selama 15-60 menit, lalu didinginkan pada suhu kamar. Larutan ditambahkan 200 µL larutan pengendap protein, lalu divortex pada kecepatan maksimal selama 20 detik. Larutan diinkubasi di dalam es selama lima menit dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf baru berisi 600 µL isopropanol pada suhu kamar, lalu dibolak-balik supaya homogen. Larutan disentrifugasi 13.000-16.000 rpm selama 2 menit, kemudian supernatan dibuang. Tabung berisi endapan dibalikkan diatas kertas saring, lalu ditambahkan 600 µL etanol 70% untuk membersihkan sisa-sisa protein. Tabung disentrifugasi 13.000-16.000 rpm selama dua menit, lalu endapan dikeringkan.

### **Amplifikasi gen 16s rDNA Mikroba Tanah Dan Mikroba Laut Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

PCR dilakukan terhadap koloni mikroba tanah dan mikroba laut menggunakan sepasang primer 16s rRNA yaitu primer *forward* (5'GGTTAC(G/C)TTGTTACGAC TT3') dan primer *reverse* (5'AGAGTTTG ATC(A/C)TGGCTCAG3').Komponen-komponen yang diperlukan dalam proses PCR dicampurkan dalam *Eppendorf* dengan total volume 50 µL. Campuran terdiri dari : 1 µL templat DNA, sepasang primer *forward* 16s

*rRNA* dan *reverse 16s rRNA* masing-masing 20 pmol sebanyak 2  $\mu\text{L}$ , 10 mM dNTP sebanyak 1  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  dapar PCR, 25 mM  $\text{Mg}^{2+}$  sebanyak 5  $\mu\text{L}$ , 5 unit/  $\mu\text{L}$  *Taq polymerase* sebanyak 0,4  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan air suling ganda hingga 50  $\mu\text{L}$ . Proses amplifikasi menggunakan DNA *thermal cycler*.

PCR dilakukan dengan tahap denaturasi awal 94 °C selama dua menit; siklus yang terdiri dari denaturasi pada 94 °C selama satu menit, penempelan (*annealing*) pada suhu 48 °C selama satu menit, dan pemanjangan fragmen DNA oleh *Taq polimerase* (polimerisasi) pada 72 °C selama satu menit, reaksi dilakukan sebanyak 30 siklus. Pemanjangan fragmen DNA akhir pada 72 °C selama 10 menit.

Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1 %b/v dalam dapar TAE 1X, pada tegangan 100 volt, kekuatan arus 400 mA, selama 45 menit. Sebagai marka DNA digunakan 100 bp. Hasil elektroforesis dilihat di bawah sinar UV  $\lambda$  312 nm menggunakan alat *transilluminator* UV (Cole-Palmer) dan sebagai penampak bercak digunakan *ethidium bromida*.50

### **Analisis Urutan Nukleotida Produk PCR**

Analisis ini dilakukan untuk mengetahui urutan nukleotida produk PCR. Urutan nukleotida tersebut kemudian disejajarkan dan dibandingkan dengan nukleotida *16s rRNA* yang terdapat pada data base

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penentuan pengaruh konsentrasi produk ekstrasel pada *NA* yang telah mengandung suspensi *E. coli* Amp<sup>S</sup> tidak terdapat zona hambat sedangkan pada *NA* yang mengandung *E. coli* Amp<sup>R</sup> terdapat zona hambat.

Hasil diameter zona hambat pengaruh konsentrasi produk ekstrasel dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% terhadap bakteri uji *E. coli* Amp<sup>R</sup> dapat di lihat pada tabel 4.1. Hasil diameter zona hambat produk ekstrasel dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% seperti yang tertera pada Tabel 4.1 Kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan metode Desain Acak Sempurna .

Tabel 4.1. Hasil uji pengaruh konsentrasi produk ekstrasel

No	Nama mikroba	Diameter zona hambat (mm)				
		20%	40%	60%	80%	100%
1.	Vila roro 1.3	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8
2.	Seskau 3.1	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8
3.	Cijeruk lembang 3	11.9	11.8	11.8	11.8	11.8
4.	Bcd 3	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7
5.	Stla 1	11.6	11.5	11.6	11.5	11.5
6.	Mksb 3	11.5	11.6	11.5	11.5	11.5
7.	Bdg 4	11.6	11.6	11.6	11.6	11.6
8.	Sn 16	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7
10.	Bl 6	11.6	11.6	11.6	11.6	11.6
11.	Jajaway 4	11.4	11.4	11.4	11.5	11.4

Tabel 4.2. Daftar ANAVA pengaruh konsentrasi produk ekstrak sel

Sumber variasi	Dk	JK	KT	F hit
Rata-rata	1	6783.79	6783.79	
Perlakuan (konsentrasi)	4	0.008	0.002	0.1
Kekeliruan	45	0.902	0.020	
Jumlah	50	6784		

Dari daftar di atas dengan taraf  $p = 5\%$  maka diperoleh harga  $F$  tabel  $(4,45) = 2.575$  yang berarti  $F_{hitung} < F_{tabel}$ . Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa perbedaan konsentrasi produk ekstrak sel terhadap *E.coli* Amp<sup>R</sup> tidak mempengaruhi zona hambat.

### 3.1 Identifikasi Mikroba Tanah Dan Mikroba Laut Penghasil Inhibitor

#### Betalaktamase

##### 3.1.1 Pengamatan Morfologi Sel Mikroba Secara Mikroskopik

Pengamatan morfologi dilakukan dengan pengamatan bentuk visual dan tes pewarnaan gram yang diperiksa menggunakan mikroskopik. Pada pewarnaan Gram, Gram negatif akan berwarna merah hal ini disebabkan karena warna ungu dari pereaksi carbol gentian violet akan hilang dan akan digantikan oleh warna tandingan yaitu air fuksin yang berwarna merah. Sedangkan Gram positif akan berwarna ungu karena warna ungu dapat tertahan walaupun sudah diberi pemucat alcohol. Hasil pewarnaan Gram pada mikroba Jajaway 4, Bdg 4, Cijeruk Lembang 3, BI 6, dan Mksb

3 dikategorikan bakteri Gram negatif. Hasil pewarnaan Gram pada mikroba Sn 16, Bcd 3, Vila roro 1.3, Seskau 3.1 dan Stla 1 dikategorikan bakteri Gram positif .

Tabel 4.3 Hasil Pewarnaan Gram Mikroba Tanah dan Mikroba laut Penghasil Inhibitor Betalaktamase

No.	Kode	Bentuk	Keterangan	Warna koloni
1.	Jajaway 4	batang	Gram (-)	Putih susu
2.	Bdg 4	batang	Gram (-)	Putih susu
3.	Cijeruk lembang3	batang	Gram (-)	Putih susu
4.	Bcd 3	Bulat	Gram (+)	Putih susu
5.	Slta 1	Bulat	Gram (+)	Putih susu
6.	Sn 16	Bulat	Gram (+)	Putih susu
7.	Vilaroro 1.3	bulat	Gram (+)	Putih susu
8.	Bl 6	bulat	Gram (-)	Putih susu
9.	Seskau 3.1	bulat	Gram (+)	Putih susu
10.	Mksb 3	batang	Gram (-)	Putih susu

### 3.1.2 Uji Biokimia

Identifikasi bakteri penghasil inhibitor betalaktam dilakukan pula menggunakan serangkaian uji biokimia. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada tabel 4.4.

- Tes fermentasi karbohidrat menunjukkan 6 mikroba Jajaway 4, Bcd 3, Bdg 4, Cijeruk Lembang 3, Vila roro 1.3 dan Seskau 3.1 mampu melakukan fermentasi karbohidrat dengan substrat glukosa, maltosa, dan sukrosa. Pada mikroba Bcd 3, Bdg 4, Seskau 3.1 mampu melakukan fermentasi karbohidrat dengan substrat manitol. Pada mikroba Jajaway 4, Bdg 4, Cijeruk Lembang 3 mampu melakukan fermentasi karbohidrat dengan substrat laktosa. Kemampuan bakteri

melakukan fermentasi karbohidrat ditandai dengan adanya produksi asam organik dan gas (cappuccino & sherman 1983). Produksi asam organik menyebabkan pH media fermentasi menurun sehingga indikator fenol merah yang terdapat pada media berubah dari merah menjadi kuning.

- Tes motilitas bakteri dilakukan pada media semipadat motil indol urea (MIU) menunjukkan 8 mikroba adalah motil dan 2 mikroba adalah tidak motil. Motilitas mikroba disebabkan karena sel bakteri memiliki flagela. Produksi indol bakteri bertujuan untuk memeriksa kemampuan bakteri mendegradasi asam amino esensial triptopan (cappuccino & sherman 1983). Enzim yang berperan dalam proses ini adalah triptonase. Produk metabolit triptopan adalah indol, asam piruvat dan amonia. Keberadaan indol dideteksi dengan kovac reagent yang terbentuknya warna merah. Sepuluh mikroba menunjukkan mikroba tersebut tidak mampu mendegradasi triptopan atau tes negatif. Urease merupakan suatu enzim pemecah ikatan karbondan nitrogen pada senyawa amida yang dapat digunakan untuk tes urease adalah urea (cappuccino & sherman 1983). Urea dengan adanya enzime urease akan dirubah menjadi karbon dioksida dan amoniak. Keberadaan enzime dideteksi dengan berubah warna media menjadi merah. Hasil tes urease untuk 10 mikroba menunjukkan 7 mikroba yaitu mikroba Jajaway 4, Bcd 3, Cijeruk lembang 3, Vila roro 1.3, BI 6, Seskau 3.1 memiliki enzime

urease tes positif dan 3 mikroba yaitu mikroba Bdg 4, Sn 16, Mksb 3, Stla 1 tidak memiliki urease atau tes negatif.

- Tes sitrat dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut menggunakan sitrat sebagai sumber energi apabila tidak ada glukosa atau laktosa. Sitrat permease berperan membawa sitrat dari luar sel ke dalam sel. Sitrat yang telah berada didalam sel akan masuk kedalam siklus krebs. Sitrat merupakan intermediet utama siklus krebs, sitrat akan diubah menjadi asam oksaloasetat dan asam asetat dengan bantuan enzim sitrase. Selanjutnya asam oksaloasetat dan asam asetat dirubah menjadi asam piruvat dan karbondioksida. Karbondioksida bereaksi dengan air dan natrium yang terdapat pada media simmons citrate agar sehingga membentuk natrium bikarbonat. Keberadaan natrium bikarbonat mengakibatkan media bersifat basa sehingga merubah warna indikator bromthymol biru dari hijau menjadi biru. Hasil tes penggunaan sitrat menunjukkan bahwa 7 mikroba yaitu mikroba Jajaway 4, Bcd 3, Bdg 4, Cijeruk Lembang 3, BI 6 , Seskau 3.1 ,Vila roro 1.3 memiliki enzim sitrat permease atau tes positif. Sedangkan 3 isolat mikroba yaitu mikroba Sn 16, Mksb 3, Stla 1 tidak memiliki enzim sitrat permease atau tes negatif.
- Tes Metil red dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut merupakan bakteri mixed acid fermenter (peragian asam campuran). Pada uji ini akumulasi asam-asam dapat menurunkan pH sampai 5.0. Bila indikator metil merah ditambahkan pada biakan tersebut dengan

pH serendah itu maka indikator tersebut menjadi merah. Hal ini menandakan bahwa organisme yang bersangkutan adalah peragian asam campuran. Pada umumnya organisme ini adalah penghasil gas yang istimewa karena menghasilkan enzim format hidrogenliase yang memecahkan asam format menjadi karbon dioksida dan air dalam jumlah sebanding. Bila pengujian metil merah menunjukkan hasil negatif, maka organisme uji tidak menghasilkan asam melainkan 2,3-butanadiol dan etanol. Senyawa 2,3-butanadiol tidak dapat dideteksi dengan pereaksi biasa. Tetapi, prekursor untuk senyawa ini yaitu *asetoin* (asetil-metil dan karbinol) dapat dideteksi dengan pereaksi *Barrit*. Pereaksi ini terdiri dari  $\alpha$ -naftol dan KOH yang dapat mengakibatkan adanya perubahan warna menjadi merah muda jika terdapat prekursor yang selalu bersama-sama senyawa 2,3-butanadiol yaitu *asetoin*. Metode ini sering disebut metode tak langsung Voges-Proskauer (Brown Alfred, 2005). Hasil tes metil red menunjukkan bahwa 6 mikroba yaitu mikroba Jajaway 4, Bcd 3, Bdg 4, Cijeruk Lembang 3, Seskau 3.1, Vila roro 1.3 merupakan bakteri mixed acid fermenter atau tes positif dan 4 mikroba yaitu mikroba BI 6, Sn 16, Stla 1, dan Mksb 3 bukan bakteri mixed acid fermenter atau tes negatif. Sedangkan semua isolat mikroba bukan penghasil senyawa 2,3-butanadiol.

Identifikasi dari 10 bakteri penghasil inhibitor betalaktamase dilakukan dengan cara membandingkan karakteristik morfologi dan biokimia

bakteri tersebut terhadap pustaka *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*.

Hasil identifikasi 10 bakteri penghasil inhibitor betalaktamase menunjukkan bahwa mikroba Seskau 3.1, Bcd 3 dan Vila roro 1.3 diduga adalah jenis bakteri dari genus *Micrococcus*. Mikroba Bdg 4 diduga adalah jenis bakteri dari genus *Salmonella*. Mikroba Cijeruk Lembang 3 diduga adalah jenis bakteri dari genus *Escherichia*. Mikroba BI 6, Mksb 3, Jajaway 4 diduga adalah jenis bakteri dari genus *Alcaligenes*. Sedangkan mikroba Stla1 dan Sn 16 diduga adalah jenis bakteri dari genus *Stapylococcus*.

Tabel 4.4 Hasil Uji Biokimia Mikroba Tanah dan Mikroba Laut Penghasil Inhibitor  
Betalaktamase

Sampel	Citrat	Motil	Indol	Urea	MR	VP	Glukosa	Maltosa	Sukrosa	Manitol	Laktosa	kesimpulan
Jajaway 4	+	+	-	+	+	-	+/gas	+/gas	+/gas	-	+/gas	Genus : <i>Alcaligenes</i>
Bcd 3	+	+	-	+	+	-	+/gas	+/gas	+/gas	+/gas	-	Genus: <i>Micrococcus</i>
Bdg 4	+	+	-	-	+	-	+/gas	+/gas	+/gas	+/gas	+/gas	Genus : <i>Salmonella</i>
Cijeruk lembang 3	+	+	-	+	+	-	+/gas	+/gas	+/gas	+/gas	+/gas	Genus : <i>Escherichia</i>
Vila roro 1.3	+	+	-	+	+	-	+/gas	+/gas	+/gas	-	-	Genus : <i>micrococcus</i>
Seskau 3.1	+	+	-	+	+	-	+/gas	+/gas	+/gas	+/gas	-	Genus : <i>micrococcus</i>
BI 6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Genus : <i>Alcaligenes</i>
Sn 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Genus : <i>Stapylococcus</i>
Mksb 3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Genus : <i>Alcaligenes</i>
Stla 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Genus : <i>Stapylococcus</i>

### **3.2 Metode Molekuler**

#### **3.2.1 Isolasi DNA Total Mikroba Tanah Dan Mikroba Laut Penghasil Inhibitor Betalaktamase**

Isolasi DNA total dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan lisozim, karena metode ini umumnya lebih banyak menghasilkan DNA dibandingkan secara mekanis.

Penambahan RNase pada proses isolasi DNA bertujuan untuk menguraikan RNA yang terisolasi dalam sel, karena keberadaan RNA dapat mengkontaminasi isolat DNA yang dihasilkan. Protein yang masih terdapat dalam isolat DNA dapat mengganggu amplifikasi. Terutama jika protein tersebut adalah suatu DNase, yang dapat menguraikan DNA. Protein tersebut harus diendapkan dengan penambahan enzim lisostafin, lalu disentrifugasi pada kecepatan maksimum selama beberapa kali. Sedangkan penambahan isopropanol bertujuan untuk mengendapkan protein dan lipid yang masih tersisa dalam larutan DNA. DNA diendapkan dari larutannya menggunakan etanol 70%. Lalu etanol diuapkan, karena etanol juga dapat mengganggu proses PCR. Selanjutnya ditambahkan larutan *DNA Rehydration* untuk merehidrasi DNA, sehingga diperoleh larutan DNA murni.

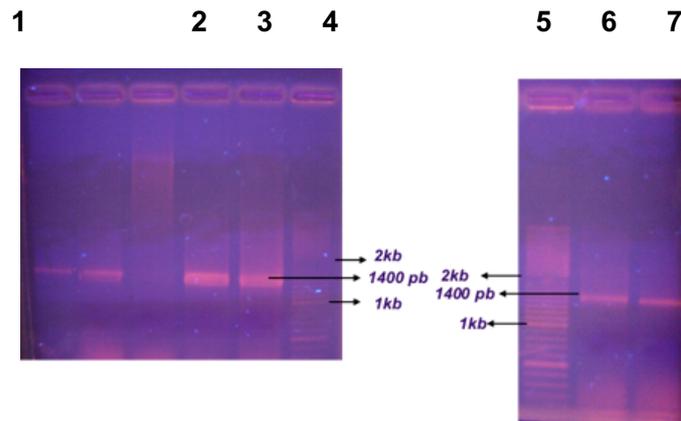
#### **3.2.2 Amplifikasi gen 16s rDNA Mikroba Tanah Dan Mikroba Laut Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Dilakukannya PCR dan sekuensing gen 16s rDNA bertujuan untuk menentukan spesies bakteri. Dimana pada metode mikrobiologi konvensional hanya dapat ditentukan genusnya saja.

Pada prinsipnya reaksi PCR yang berlangsung dalam 3 tahap yang berbeda suhu dan waktunya, yaitu tahap *denaturation* (pemisahan untai DNA), *annealing* (penempelan primer dengan untai DNA), dan *extension* (sintesis untai DNA baru). Reaksi tersebut berlangsung di dalam mesin PCR yang telah diatur suhu dan waktunya. Oleh karena *primer* dan enzim polimerase tersedia berlebihan, maka produk dari siklus pertama dapat berfungsi sebagai cetakan untuk siklus berikutnya, begitu seterusnya. Ketiga proses *denaturation*, *annealing* dan *extension* merupakan 1 siklus PCR yang akan menghasilkan 2 kopi (salinan)

DNA. Apabila siklus tersebut digandakan  $n$  kali maka pada akhir proses PCR akan diperoleh salinan DNA sebanyak  $2^n$ .

Hasil PCR *16s rDNA* menunjukkan 9 dari 10 koloni menunjukkan ukuran sekitar 1400 pasang basa. Pita ini sesuai dengan ukuran gen *16s rDNA* teoritis yaitu sekitar 1400 pasang basa.



Keterangan :

- 1 : Produk PCR Vila roro 1.3
- 2 : Produk PCR Sn 16
- 3 : Produk PCR Jajaway 4
- 4 : Marker 100 bp
- 5 : Marker 100 bp
- 6 : Produk PCR Seskau 3.1
- 7 : Produk PCR BI 6

Gambar 3. Elektroforegram hasil PCR

### 3.2.3 Analisis Urutan Nukleotida

Dari ke sembilan isolat yang ditentukan urutan nukleotidanya empat isolat yang menunjukkan hasil elektroforegram yang baik sehingga bisa dihomologikan dan dibandingkan dengan nukleotida *16s rRNA* yang terdapat pada data base. Sedangkan lima isolat hasil elektroforegram yang kurang baik. Hal ini

disebabkan konsentrasi pemurnian produk PCR rendah sehingga puncak nukleotida tidak terbaca.

Tabel 4. Hasil Homologi Analisis Nukleotida

No	Kode	Homologi
1.	Jajaway 4	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
2.	Slta 1	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Streptomyces brasiliensis</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Psychrophilic marine</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>
3.	Sn 16	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Staphylococcus equorum</i>
4.	Bdg 4	<i>Salmonella typhi</i> <i>Citrobacter sp.</i>

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi produk ekstrasel terhadap *E. coli* Amp<sup>R</sup> tidak mempengaruhi zona hambat.

Identifikasi dari 10 bakteri penghasil inhibitor betalaktamase menunjukkan bahwa mikroba laut dan mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase berasal dari genus *Micrococcus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Alcaligenes*, dan *Staphylococcus*.

Hasil PCR *16s rDNA* mikroba tanah dan mikroba laut menunjukkan ukuran sekitar 1400 pasang basa.

Hasil homologi dari data base *16s rRNA* mikroba laut dan mikroba tanah penghasil inhibitor betalaktamase berasal dari *Alcaligenes sp.*, *Staphylococcus sp.*, dan *Salmonella typhi*.

## REFERENSI

- Cappucino, J.G., and N. Sherman. 1983. **Microbiology A Laboratorium Manual**. 6<sup>th</sup> ed. USA: Pearson Education Inc.
- Holtj.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. and Williams, S.T, 1994. **Bergeys Manual Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williamn and Wilkins Baltimore.
- 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.
- Karlowsky J. A., L. J. Kelly, C. Thornsberry, M. E. Jones, and D. F. Sahm, 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.
- Johnson J. R., M. A. Kuskowsky, T. T. O'Bryan, R. Colodner, and R. Raz, 2005, Virulence Genotype an 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.
- 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.
- 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.