

Penapisan Inhibitor β -laktamase Dari Bakteri Simbion *Sponge Axinella* sp.***Screening inhibitors of β -lactamase Axinella Sponge Symbion Bacteria sp.*****Asadatun Abdullah*, Linawati Hardjito, Ernawati, Fatimah Abdillah****Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Institut Pertanian Bogor, Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680**

Diterima April 2007/ Disetujui Maret 2008

Abstrak

Salah satu jenis antibiotik yang umum digunakan dalam pengobatan adalah antibiotik β -laktam. Saat ini banyak terdapat bakteri patogen pada manusia yang resisten terhadap antibiotik β -laktam. Bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik β -laktam adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim β -laktamase. Tujuan penelitian ini adalah menapis produk natural inhibitor β -laktamase dari mikroorganisme simbion *Axinella* sp. Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya, telah diisolasi dan diidentifikasi secara biokimia 7 isolat bakteri simbion *sponge Axinella* sp. Penapisan inhibitor β -laktamase dilakukan dengan metode agar difusi menggunakan bakteri target *E.coli*^R dan *S.aureus*^R resisten ampisilin koleksi Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan. Pengukuran resistensi terhadap *E.coli*^R dan *S.aureus*^R dilakukan pada konsentrasi ampisilin >32 μ g/ml. Dari 7 isolat bakteri simbion yang ditapis secara intraseluler dan ekstraseluler, 4 isolat pada ekstraselulernya positif menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E.coli*^R dan *S.aureus*^R. 4 bakteri simbion tersebut adalah *Bacillus* sp., *Halomonas* sp., *Alteromonas* sp1 dan *Alteromonas* sp2. Identifikasi molekuler bakteri simbion dan karakterisasi golongan senyawa inibitor β -laktamase sedang dalam proses penelitian.

Keywords : bakteri simbion *Axinella* sp., inhibitor β -laktamase, *E.coli*^R dan *S.aureus*^R**PENDAHULUAN**

Salah satu invertebrata laut yang merupakan sumber potensial penghasil komponen bioaktif adalah *sponge*. Aktivitas biologis dari komponen bioaktif yang terdapat dalam *sponge* antara lain adalah *cytotoxic*, *antifungal*, *cell division inhibitors*, *antitumor*, *antiviral*, *anti-inflammatory*, *antimicrobial* dan aktivitas penghambatan enzim (*enzyme inhibitor*). *Sponge* juga merupakan tempat hidup untuk berbagai mikroorganisme yang bersimbiosis dengannya. Mikroorganisme yang bersimbiosis dengan *sponge* dapat menjadi sumber untuk berbagai produk alam dari laut. Metabolit yang terkandung dalam *sponge* sangat terkait dengan metabolit yang disintesis oleh mikroorganisme simbiotiknya (Lee *et al.*, 2001).

Isu semakin meningkatnya resistensi berbagai spesies bakteri patogen terhadap antibiotik telah menjadi kepedulian banyak peneliti di seluruh dunia dewasa ini. Secara umum resiko yang ditimbulkan dari bakteri patogen yang resisten pada pasien adalah meningkatnya jumlah dosis pemakaian antibiotik. Salah satu jenis antibiotik yang

* Korespondensi: telp/fax (022) 91574358, E-mail: sasa@yahoo.com

umum digunakan dalam pengobatan adalah antibiotik β -laktam. Bakteri patogen yang resisten terhadap β -laktam adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim β -laktamase. β -laktamase adalah enzim *serine-dependent* yang diproduksi oleh bakteri sebagai pertahanan dalam melawan seluruh kelas antibiotik β -laktam, seperti *penicillin*, *cephalosporins*, *carbapenem*, dan *monobactam* (Venkatesan *et al.*, 2004). Teridentifikasi lebih dari 340 enzim β -laktamase yang spesifik terhadap β -laktam telah menciptakan tantangan baru yang signifikan bagi pengobatan akibat infeksi bakteri patogen yang resisten.

Berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan, *sponge Axinella* sp. positif mengandung *cytotoxic antiovarian cancer cell lines A 2780* (Hardjito, 2004), diisolasi 12 isolat mikroorganisme simbiosis *sponge Axinella* sp. yang terdiri dari 7 isolat bakteri, 3 isolat mikrofungal, dan 2 isolat *yeast*. (Abdullah, 2005) dan dari hasil penapisan 2 isolat bakteri simbiosis *Axinella* sp. salah satu isolat berpotensi positif menghasilkan senyawa antibakteri (Abdullah dan Hardjito, 2006). Untuk itu penelitian mengenai penapisan inhibitor β -laktamase dari bakteri simbiosis *sponge Axinella* sp. menjadi penting untuk dilakukan sebagai tindak lanjut pencarian bahan aktif lain terkait yang dikandung oleh bakteri simbiosis *Axinella* sp.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menapis produk natural inhibitor β -laktamase dari bakteri simbiosis *Axinella* sp. Manfaat dari dilakukannya penelitian ini adalah dihasilkannya inhibitor β -laktamase yang memiliki spektrum daya hambat β -laktamase luas.

METODOLOGI

Marine sponge yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Axinella* sp. atau nama daerahnya adalah *sponge* Jengger. *Marine sponge* di ambil dari perairan Kepulauan Seribu. Selanjutnya *marine sponge Axinella* sp. dibersihkan dari kotoran yang menempel dan disimpan dalam air laut steril sebelum diisolasi mikrobanya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Abdullah (2005), maka telah berhasil didapatkan 7 isolat bakteri simbiosis *Axinella* sp. Pada penelitian ini dilakukan penapisan inhibitor β -laktamase yang akan diperoleh dari 7 isolat bakteri simbiosis *sponge Axinella* sp.

Alat dan Bahan.

Alat-alat yang digunakan meliputi: autoklaf, lemari es, oven, timbangan analitik, magnetik stirer, *waterbath shaker*, mikroskop cahaya elektrik, inkubator, mikropipet, vorteks, *mini mikrocentrifuge*, kertas pH, *pH-meter*, bulb, pipet volumetrik, tabung reaksi, *beaker glass*, sarung tangan steril, *paper disk* steril, serta beberapa alat gelas lainnya.

Bahan yang digunakan adalah media-media yang diperlukan untuk menumbuhkan dan pengayaan mikroba, yaitu media *marine broth* (MB), *marine agar* (MA), media selektif *eosin methylen blue* (EMB), agar Mueller Hinton, berbagai antibiotik golongan β -laktam, agar bakto (*bacto agar*), *tips* untuk *micropipet*, rak *tips*, *paper disk*, larutan buffer, *sodium chloride*, *glucose*, etil asetat PA dan metanol PA.

Metode Penelitian

Penapisan dilakukan dengan menggunakan metode agar difusi dengan bakteri target *E.coli*^R dan *S.aureus*^R yang telah diuji sifat resistensinya pada konsentrasi ampicilin > 32 μ g/ml. Penapisan dilakukan pada 3 variasi umur kultivasi yaitu 4 hari, 7 hari dan 10 hari. Kultivasi dilakukan dengan menggunakan *waterbath shaker* yang diatur suhunya pada 25°C.

Pengujian Resistensi Bakteri Target Terhadap Antibiotik β -laktam. Pengujian resistensi bakteri target pada penelitian ini adalah melihat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus* koleksi pribadi Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan dengan penambahan konsentrasi ampicilin 32 μ g/ml ke dalam media pertumbuhannya.

Penapisan Inhibitor β -laktamase. Tahapan pertama untuk menapis inhibitor β -laktamase adalah bakteri simbion dikultivasi dalam media *Marine Broth* (MB). Kultivasi dihentikan pada fase stasioner dari pertumbuhan bakteri simbion. Setelah kultur bakteri siap untuk ditapis, tahapan selanjutnya adalah masing-masing isolat disentrifugasi untuk memisahkan bagian intraseluler dan ekstraseluler. Pelet yang didapatkan kemudian dilisiskan selnya untuk digunakan dalam proses penapisan secara intraseluler. Filtrat kultur (bagian ekstraseluler) yang didapatkan dari pemisahan dengan peletnya (intraseluler) diekstrak dengan menggunakan pelarut etil asetat dan metanol. Ekstrak kasar yang didapatkan ditapis inhibitor β -laktamasenya dengan menggunakan metode agar difusi. Setelah inkubasi selama 24 jam dapat diamati zona bening yang

terbentuk, untuk selanjutnya dilakukan pengukuran zona hambat β -laktamase. Daya hambat terhadap enzim β -laktamase akan diukur dari diameter zona bening yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian terdahulu telah diperoleh pendugaan nama genus untuk 7 isolat bakteri simbiosis yang diisolasi dari *Axinella* sp. yaitu *Alteromonas*, *Bacillus*, dan *Halomonas*. 7 bakteri simbiosis tersebut merupakan bakteri yang akan ditapis inhibitor β -laktamasenya pada kajian penelitian ini. Hal tersebut penting dilakukan karena pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya 2 isolat bakteri yaitu K41B (*Bacillus* sp.) dan K43 (*Alteromonas* sp.) berpotensi menghasilkan senyawa antibakteri.

Resistensi Bakteri Target Terhadap Antibiotik β -laktam.

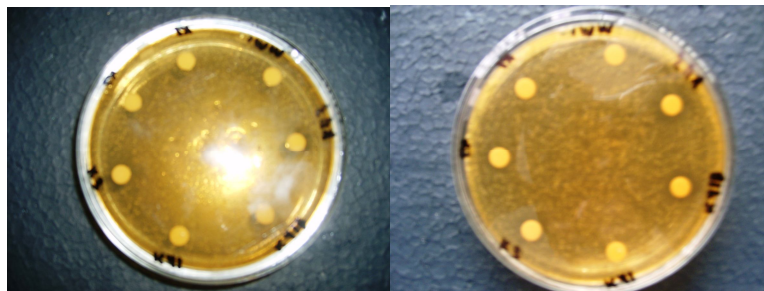
Pengujian resistensi mengacu pada standar NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standard*). Konsentrasi ampisilin yang umum digunakan sebagai obat menurut NCCLS untuk bakteri *E.coli* adalah 8 μ g/ml dan untuk bakteri *S.aureus* adalah 0,25 μ g/ml. Hasil pengujian menunjukkan bakteri *E.coli* dan *S.aureus* koleksi Lab Bioteknologi HP dapat dihambat pertumbuhannya oleh ampisilin pada konsentrasi diatas standar NCCLS yaitu > 32 μ g/ml (Gambar 1).



Gambar 1. Pengujian resistensi bakteri target

Penapisan Inhibitor β -laktamase.

Dari 7 isolat bakteri simbiosis yang ditapis inhibitor β -laktamasenya secara intraseluler dan ekstraseluler terhadap *E.coli*^R dan *S.aureus*^R didapatkan hasil 4 isolat positif pada ekstraseluler-nya yaitu, isolat bakteri simbiosis K2, K3, K43 dan K41B (Gambar 2). Pendugaan nama genus untuk 4 bakteri simbiosis yang positif menghambat bakteri patogen resisten β -laktam tersebut berdasarkan hasil penelitian terdahulu adalah *Bacillus* sp., *Halomonas* sp., *Alteromonas* sp1 dan *Alteromonas* sp2.



Gambar 2. Penapisan inhibitor β -laktamase

Salah satu upaya untuk mengatasi infeksi yang disebabkan bakteri patogen yang resisten β -laktam adalah dengan menambahkan inhibitor β -laktamase. Inhibitor β -laktamase dalam pemanfaatannya dapat disinergiskan dengan antibiotik jenis β -laktam untuk membunuh bakteri patogen yang resisten. Kombinasi inhibitor β -laktamase dan β -laktam saat ini telah umum digunakan secara klinis. Daya hambat terhadap enzim β -laktamase pada penelitian ini diukur dari zona bening yang terbentuk disekeliling ekstrak ekstraseluler maupun ekstrak intraseluler. Zona bening yang terbentuk tersebut merupakan suatu indikasi adanya senyawa inhibitor β -laktamase yang dihasilkan oleh bakteri simbion.

Hasil pengujian resistensi bakteri target menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri *E.coli* dan *S.aureus* bersifat resisten terhadap ampisilin pada ambang batas konsentrasi 32 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan Gambar 1, yaitu pengujian pada konsentrasi ampisilin 32 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus* lebih resisten daripada bakteri *E.coli*. Kedua isolat bakteri target *E.coli* dan *S.aureus* yang merupakan isolat koleksi pribadi Laboratorium Bioteknologi HP dapat digunakan sebagai bakteri target pada tahapan penelitian selanjutnya yaitu penapisan inhibitor β -laktamase.

Berdasarkan hasil penapisan inhibitor β -laktamase dari 7 genus bakteri simbion *Axinella* sp. secara intraseluler dan ekstraseluler, hanya penapisan dari bagian ekstraseluler bakteri simbion yang mampu membentuk zona bening. Penapisan inhibitor β -laktamase pada umur kultur 4 hari, 7 hari dan 10 hari menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Bakteri simbion *Axinella* sp. yang mampu menghasilkan senyawa inhibitor β -laktamase ekstraseluler adalah *Bacillus* sp., *Halomonas* sp., *Alteromonas* sp1 dan *Alteromonas* sp2.

Aktivitas inhibitor β -laktamase yang ditunjukkan dengan zona bening paling stabil dan paling besar dihasilkan oleh isolat bakteri K41B yang diduga termasuk

golongan genus *Bacillus*. Sedangkan, ketiga bakteri lainnya menunjukkan diameter zona bening yang tidak terlalu berbeda nyata. Hal tersebut mungkin disebabkan oleh respon masing-masing sel bakteri simbion terhadap kondisi lingkungan berbeda, sehingga senyawa aktif yang dihasilkanpun berbeda.

4 isolat bakteri simbion *Axinella* sp. terutama isolat genus *Bacillus* (K41B) merupakan isolat penghasil inhibitor β -laktamase yang perlu dikembangkan lebih lanjut untuk dapat mengatasi permasalahan resistensi terhadap antibiotik β -laktam. Terutama pada kasus bakteri yang mampu menghasilkan enzim β -laktamase.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Kementerian Negara Riset dan Teknologi, pada program Insentif Riset Dasar Tahun Anggaran 2007 a.n. Asadatuln Abdullah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah A. 2005. Isolasi dan Identifikasi Mikroba Simbion Sponge *Axinella* sp. Kumpulan Seminar Hasil-hasil penelitian Dosen Muda IPB tahun anggaran 2004-2005. LPPM-IPB.
- Abdullah A, Hardjito L. 2006. Isolation of Symbiotic Bacteria From Indonesian Marine Sponge *Axinella* sp. And Screening For Their Antimicrobial Activities. *Pre-proceeding International Seminar and Workshop Marine Biodiversity and Their Potential for Developing Bio-Pharmaceutical Industry in Indonesia*. May 17th-18th 2006. Jakarta.
- Hardjito, L. 2004. Bioactive Compounds from Indonesian Marine Invertebrates and Their Sustainable Production through Mariculture. Di dalam: Laporan RUTI Year 2004.
- Lee KY, Lee HJ, Lee HK. 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *The Journal of Microbiology*. Vol. 29: No 4. p(254-264).
- Venkantesan MA et al. 2004. Novel imidazole sustitute 6-methylidene-penems as broad-spectrum β -lactamase inhibitors. *Journal of Bioorganic & Medical Chemistry*. Vol 12. p(5807-5817).