LAPORAN AKHIR
PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

KEMAMPUAN ANTI-β-LAKTAMASE *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 SEBAGAI SENYAWA PENDUKUNG β-LAKTAM PENGHAMBAT SINTESIS DINDING SEL EPEC K1-1

BIDANG KEGIATAN :

PKMP (Penelitian)

Oleh

Haryo Tejo Prakoso	**G34104033/2004**
Aneta Priliani	**G34104049/2004**
Nicho Nurdebyandaru	**G34104066/2004**
Sylvia Novita Palupi	**G34050562/2005**

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah
Program Kreativitas Mahasiswa
Nomor 001/BAP.DP2M/II/2008 tanggal 26 Februari 2008

1. Judul Kegiatan : Kemampuan Anti-β-laktamase *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 sebagai Senyawa Pendukung β-laktam Penghambat Sintesis Dinding Sel EPEC K1-1.
2. Bidang Kegiatan : PKMP
3. Bidang Ilmu : MIPA
4. Ketua Pelaksana Kegiatan
   a. Nama Lengkap : Haryo Tejo Prakoso
   b. NRP : G34104033
   c. Departemen : Biologi
   d. Universitas/Institut/Politeknik : Institut Pertanian Bogor
   e. Alamat Rumah/Telp./Fax : Komp.Pengairan Jl. Chairil Anwar Blok F No. 3 Bekasi Timur 17113. 021-8801615/08568873267
5. Anggota Pelaksana Kegiatan : 3 orang
6. Dosen Pembimbing
   a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Ir. Yulin Lestari
   b. NIP : 131 779 515
7. Biaya Kegiatan Total : Rp. 5.440.000 ,-
   DIKTI : Rp. 5.440.000,-
   Sumber lain (Biaya pribadi) : -
8. Jangka Waktu Pelaksanaan : 4 bulan

Bogor, 7 Juli 2008

Menyetujui

Ketua Departemen Biologi	Ketua Pelaksana Kegiatan
an	
Prof. Dr. Ir. Alex Hartana	Haryo Tejo Prakoso
NIP. 130 516 351	NRP. G34104033

Wakil Rektor Bidang Akademik dan Kemahasiswaan	Dosen Pendamping
Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS	Dr. Ir. Yulin Lestari
NIP. 131 473 999	NIP. 131 779 515

ABSTRAK

HARYO TEJO PRAKOSO, ANETA PRILIANI, NICHO NURDEBYANDARU, SYLVIA NOVITA PALUPI. Kemampuan Anti-β-laktamase *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 sebagai Senyawa Pendukung β-laktam Penghambat Sintesis Dinding Sel EPEC K1-1. dibimbing oleh **Yulin lestari**.

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) merupakan bakteri yang dapat menyebabkan diare karena mampu menempel pada membran plasma apikal sel usus. Penggunaan antibiotik β-laktam secara luas untuk menanggulangi pertumbuhan bakteri ini telah menimbulkan resistensi terhadap antibiotik tersebut melalui pembentukan enzim β-laktamase. *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 diketahui memiliki senyawa anti-β-laktamase yang terdiri dari βLIP *(β-lactamase Inhibitory Protein)* dan asam klavulanat sehingga dapat digunakan sebagai senyawa pendukung antibiotik β-laktam dalam mengendalikan EPEC yang resisten β-laktam.

Pengendapan βLIP dengan menggunakan aseton 70% memiliki zona bening yang lebih besar dibandingkan dengan menggunakan amonium sulfat. Zona bening βLIP dengan pengendapan aseton 70% juga lebih besar dibandingkan dengan zona bening asam klavulanat. Kombinasi antara βLIP dan asam klavulanat memberikan efek penghambatan terbesar terhadap pertumbuhan bakteri EPEC. Hal ini dibuktikan melalui pengukuran OD (*Optical Density*) melalui metode spektrofotometri.

A. JUDUL PENELITIAN:

KEMAMPUAN ANTI-B-LAKTAMASE *STREPTOMYCES LAVENDULAE* IVNF1-1 SEBAGAI SENYAWA PENDUKUNG β-LAKTAM PENGHAMBAT SINTESIS DINDING SEL EPEC K1-1

LATAR BELAKANG

Diare merupakan penyakit yang sering menyebabkan Kondisi Luar Biasa (KLB) dengan tingkat kematian yang tinggi di beberapa negara berkembang, termasuk Indonesia. Wabah diare dapat terjangkit dengan waktu yang relatif singkat sehingga sulit untuk diatasi. Departemen Kesehatan RI melaporkan bahwa di beberapa kabupaten tercatat ribuan kasus diare (PPM & PLP Depkes RI 2004). Infeksi mikroba merupakan salah satu penyebab timbulnya diare. Salah satu mikroba penyebab penyakit ini adalah *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC).

EPEC merupakan salah satu galur dari enam galur *Escherichia coli* penyebab diare (Nataro & Kapere 1998). Pada kasus diare yang diderita oleh bayi dan anak kecil (balita), EPEC merupakan penyebab dominan. Dalam penanganannya, antibiotik β-laktam paling sering digunakan untuk menghambat pertumbuhan EPEC sehingga penyakit diare dapat diatasi. Antibiotik tersebut bekerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel dari bakteri target. Harga yang ekonomis, selektivitas yang tinggi, dan toksisitasnya yang rendah mendorong penggunaan β-laktam secara luas dalam dunia medis (Doran *et al.* 1990).

Namun, penggunaan β-laktam secara kontinu memiliki efek samping berupa resistensi terhadap antibiotik tersebut (Kang *et al.* 2000). Mekanisme yang umum terjadi ialah melalui pembentukan enzim β-laktamase. Dengan adanya enzim ini, antibiotik β-laktam menjadi inaktif sehingga sel bakteri target tetap hidup.

Upaya mengatasi resistensi terhadap β-laktam telah banyak dilakukan dalam beberapa tahun terakhir. Di antaranya adalah modifikasi antibiotik β-laktam secara sintetis, pencarian senyawa inhibitor yang memiliki bentuk struktur analog dengan struktur transisi hidrolisis antibiotik β-laktam, dan isolasi senyawa anti-β-laktamase dari bakteri penghasil β-laktamase yang tidak patogen (Kang *et al.* 2000).

Streptomyces ialah bakteri yang berpotensi besar menghasilkan senyawa anti-β-laktamase. Pada beberapa spesies *Streptomyces*, contohnya pada *Streptomyces clavuligerus*, selain dapat menghasilkan β-laktamase, bakteri ini juga diketahui menghasilkan senyawa anti-β-laktamase (Doran *et al.* 2000). *Streptomyces* juga diketahui merupakan penghasil antibiotik terbesar. Lebih dari lima ratus jenis antibiotik dihasilkan oleh *Streptomyces* spp. (Madigan *et al.* 2000). Keragaman *Streptomyces* di Indonesia sangat tinggi sehingga mendorong upaya pencarian senyawa anti-β-laktamase untuk mengatasi resistensi bakteri terhadap antibiotik β-laktam.

Penelitian tentang kemampuan *Streptomyces* spp. isolat lokal sebagai penghasil senyawa penghambat β-laktamase menunjukkan bahwa *Streptomyces* isolat lokal memiliki potènsi untuk dikembangkan lebih lanjut. Desriani (2004) telah melakukan penapisan terhadap beberapa isolat lokal *Streptomyces.* Isolat tersebut diperoleh dari beberapa daerah di Indonesia seperti Bogor, Sukabumi, Kutai, dan Padang. Isolat IVNF1-1 yang merupakan salah satu isolat dari penelitian tersebut berpotensi menghasilkan senyawa anti-β-laktamase karena memiliki aktivitas penghambatan β-laktamase tertinggi yaitu 1.946 x 10^{-4} U/ml sebesar 84.12% (Elsie 2006). Wahyuni (2006) telah melakukan identifikasi senyawa anti-β-laktamase dari isolat IVNF1-1 dan menemukan bahwa selain asam klavulanat juga terdapat protein penghambat β-laktamase (βLIP) berupa asam amino aspartat dan fenilalanin. Optimasi produksi yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu (Fadhilah 2007) dapat meningkatkan aktivitas penghambatan senyawa anti-β-laktamase terhadap EPEC K1-1 hingga tiga kali lipat. Tindak lanjut dari hasil penelitian ini yakni pengkajian sinergisme antara protein βLIP dengan asam klavulanat dalam menghambat EPEC K1-1 perlu dilakukan. Kemampuan senyawa anti-β-laktamase *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 dalam membantu kerja antibiotik β-laktam juga belum dikaji.

PERUMUSAN MASALAH

Senyawa anti-β-laktamase dapat berupa senyawa protein (βLIP) atau senyawa nonprotein (asam klavulanat). Senyawa anti-β-laktamase pada filtrat isolat lokal *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 diketahui menghasilkan kedua senyawa tersebut, yaitu βLIP dan asam klavulanat. Kedua senyawa tersebut diduga dapat membantu kerja antibiotik β-laktam dalam menghambat sintesis dinding sel dengan cara menginaktivasi enzim β-laktamase sehingga antibiotik β-laktam tidak terhidrolisis dan dapat menjalankan fungsinya. Untuk mengetahui hal tersebut, perlu dilakukan pengamatan terhadap daya hidup dan morfologi dinding sel EPEC K1-1 yang dapat menghasilkan β-laktamase setelah diberikan antibiotik golongan β-laktam (ampisilin) yang dikombinasikan penerapannya dengan βLIP dan asam klavulanat. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Apabila dinding sel EPEC tidak terbentuk secara sempurna, maka terbukti bahwa terdapat sinergisme antara βLIP dan asam klavulanat yang diperoleh dari isolat *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 yang dapat menghambat kerja enzim β-laktamase yang dihasilkan dari EPEC K1-1. Kombinasi konsentrasi βLIP dan asam klavulanat akan diuji berdasarkan metode Kirby-Bauer (diacu dalam Madigan *et al.* 2000) untuk mengetahui konsentrasi yang efektif.

TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan mengkaji kemampuan senyawa anti-β-laktamase yang dihasilkan dari *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 dalam membantu kerja antibiotik β-laktam penghambat sintesis dinding sel EPEC K1-1 penyebab diare.

LUARAN YANG DIHARAPKAN

Luaran yang diharapkan dari penelitian ini adalah diperolehnya sebuah artikel ilmiah yang akan dipublikasikan di jurnal terakreditasi dan diperolehnya produk biokontrol EPEC.

KEGUNAAN PENELITIAN

Manfaat dari penelitian ini adalah diperolehnya informasi dasar tentang kemampuan senyawa anti-β-laktamase dari *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 dalam mendukung kerja antibiotik β-laktam penghambat sintesis dinding sel EPEC K1-1 resisten ampisilin.

B. METODE PELAKSANAAN PENELITIAN

Peremajaan Bakteri.

EPEC K1-1 diremajakan pada media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung 100μg/ml ampisilin selama 24 jam pada suhu 37°C. Satu buah koloni tunggal EPEC K1-1 dari media NA diinokulasikan ke dalam media NB + 100 μg/ml ampisilin. Biakan ditumbuhkan pada suhu 37°C dengan kecepatan pengocokan 100 rpm selama kurang lebih 2 jam untuk mendapatkan jumlah sel 10^8 sel/ml.

Isolat IVNF1-1 diremajakan pada media *Yeast Malt Broth* (YMB) dengan komposisi glukosa 4 g, ekstrak ragi 4 g, dan ekstrak malt 10 g per liter media dan diberi antibakteri dan antifungi (grisovulvin dan asam nalidiksat). Isolat tersebut diletakkan di inkubator bergoyang 100 rpm pada suhu ruang (24°C – 36°C). Setelah 7 – 10 hari atau hingga terbentuk miselia, isolat digores pada media *Yeast Malt Agar* (YMA).

Produksi Senyawa Anti-β-Laktamase

Dengan menggunakan sedotan steril berdiameter 6 mm, isolat IVNF1-1 yang telah diremajakan pada media YMA diinokulasikan ke dalam media cair ISP 4 kemudian diinkubasi selama lima hari pada suhu ruang (24°C – 36°C) dengan kecepatan pengocokan 100 rpm. Setelah lima hari, 10 ml isolat diambil dari media ISP 4 kemudian disentrifugasi pada kecepatan 20000 x g pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan mengandung senyawa anti-β-laktamase.

Pengendapan βLIP

Etanol 70% dimasukkan ke filtrat isolat IVNF1-1 sambil diaduk perlahan-lahan dalam kondisi dingin selama 10 – 15 menit. Setelah itu, campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 20000 x g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pellet diresuspensikan kembali ke dalam buffer fosfat.

Ekstraksi Asam Klavulanat

Asam klavulanat diekstraksi dari filtrat isolat IVNF1-1 dalam bentuk garam karboksilat dengan metode *United States Patent* 4140764. Sebanyak satu liter filtrat kultur bakteri IVNF1-1 didinginkan hingga 5^0C. Filtrat dingin tersebut kemudian ditambahkan 0.33 liter n-butanol sambil diaduk selama 15 menit kemudian ditambahkan H_2SO_4 25% hingga pH 2 dan diaduk kembali selama 15 menit. Hasil yang diperoleh berupa fase n-butanol dan fase air. Fase air dibuang dan fase n-butanol ditambahkan 0,5 % norit GSX karbon diaduk selama 15 menit kemudian disaring dengan *diatomaceous earth* hingga dihasilkan fraksi n-butanol. Fraksi n-butanol tersebut ditambahkan 0,25 bagian air deion dan NaOH 20% hingga pH 7 sambil terus diaduk. Suspensi tersebut disentrifugasi hingga didapatkan dua fase, yakni fase n-butanol yang akan dibuang dan fase air yang mengandung asam klavulanat dan disimpan pada suhu 4^0C.

Uji Antagonis βLIP dan Asam Klavulanat Filtrat Isolat IVNF1-1 Terhadap Pertumbuhan EPEC K1-1.

Uji antagonis βLIP dan asam klavulanat filtrat isolat IVNF1-1 terhadap pertumbuhan EPEC K1-1 menggunakan metode Kirby-Bauer. Pengujian dilakukan terhadap konsentrasi efektif dari βLIP, asam klavulanat, dan gabungan keduanya. Konsentrasi yang diujikan adalah 0, 25, 50, 75, 100 ppm untuk setiap faktor yang diujikan. Untuk konsentrasi gabungan asam klavulanat dan βLIP, digunakan perbandingan 1:1. Media NA semisolid berisi 100 µl biakan EPEC K1-1 (konsentrasi minimal 10^6 sel/ml) yang ditambahkan 100 µg/ml ampisilin dituang ke atas cawan berisi media NA yang telah memadat. Setelah media memadat, cakram kertas berdiameter 8 mm diletakkan ke atas media. Konsentrasi yang akan diujikan diteteskan sebanyak 15 μl ke cakram kertas tersebut. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diamati kemampuannya dalam membentuk zona bening. Zona bening yang paling besar menandakan salah satu konsentrasi dari ketiga faktor tersebut merupakan konsentrasi efektif dalam menghambat pertumbuhan EPEC K1-1. Ulangan dibuat sebanyak tiga kali.

Pengamatan Daya Hidup dan Morfologi Sel EPEC K1-1

Konsentrasi yang didapat dari hasil uji antagonis dicobakan terhadap EPEC K1-1 pada masa pertumbuhannya. EPEC K1-1 diinokulasikan ke media NB + 100μg/ml ampisilin dan ditambahkan konsentrasi efektif dari hasil uji antagonis. Inkubasi dilakukan selama lima jam dengan pengocokan 100 rpm. Pengambilan sampel untuk diamati pada SEM dilakukan tiap jam. Kontrol dibuat dengan tidak mencampurkan senyawa anti-β-laktamase hasil uji antagonis. Pengamatan terhadap daya hidup mikrob dilakukan dengan metode cawan tuang (diacu dalam Hadioetomo 1993). Sampel diambil tiap jam untuk diencerkan serial sampai dengan 10^{-6}. Sebanyak 1 ml biakan sampel EPEC K1-1 dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan garam fisiologis dan kemudian dihomogenkan. Setelah homogen, diambil 1 ml biakan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain yang berisi 9 ml larutan garam fisiologis begitu seterusnya sampai konsentrasi 10^{-6}. Konsentrasi 10^{-4}, 10^{-5}, dan 10^{-6} kemudian dicawankan. Sebanyak 1 ml biakan dari setiap konsentrasi dimasukkan masing-masing ke dalam 12 ml media NB yang sudah disterilisasi. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang terbentuk diamati dan dihitung jumlahnya.

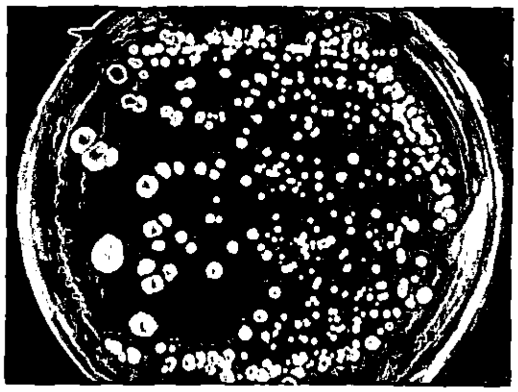
C. HAL YANG TELAH DILAKUKAN

Waktu dan tempat

Penelitian dimulai dari bulan Maret 2008, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA IPB.

Peremajaan Bakteri.

Peremajaan *Streptomyces lavendulae* IVNF1-1 pada media YMA berhasil dilakukan. Setelah masa inkubasi selama tujuh hari, banyak koloni tunggal yang muncul. Pada umumnya koloni yang muncul memiliki morfologi dengan warna putih di permukaan atas media dan berwarna coklat gelap di permukaan yang menghadap media. Apabila koloni telah dewasa, akan terbentuk warna merah muda menggantikan warna putih pada permukaan atas koloni. Warna putih pada permukaan atas koloni disebabkan adanya spora sedangkan warna merah muda disebabkan oleh pigmen yang dihasilkan *S. lavendulae* IVNF1-1.



Gambar 1. Koloni IVNF1-1 pada media YMA inkubasi 10 hari pada suhu ruang.

Peremajaan EPEC K1-1 pada media NA yang ditambahkan 100μg/ml ampisilin berhasil dilakukan. Pertumbuhan EPEC K1-1 sangat cepat. Fase eksponensial dapat dicapai dalam waktu empat jam (Fadhilah 2007). Morfologi koloni tunggal EPEC K1-1 berbentuk bulat, permukaan licin, dan warnanya putih susu. EPEC K1-1 dapat tumbuh pada media NA yang telah diberi antibiotik ampisilin karena EPEC K1-1 menghasilkan enzim β-laktamase yang dapat menginaktifkan cincin β-laktam ampisilin.