

Tema 3: Pangan, Gizi dan Kesehatan

**AKTIVITAS PENGHAMBATAN BAKTERIOSIN *Bifidobacterium* spp.
TERHADAP BAKTERI MULTI DRUGS RESISTANT (MDR)
Escherichia coli DAN *Klasiella pneumonia***

Oleh

Oedjijono¹, Dyah Fitri Kusharyati², Pancrasia Maria Hendrati³

¹⁾ **Laboratory of Microbiology, Faculty of Biology, Universitas Jenderal Soedirman
Jl. Dr. Soeparno No. 63, Karangwangkal, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia
Email: oedjijono@gmail.com**

ABSTRAK

Bifidobacterium spp. merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, *nonmotile*, katalase negatif, anaerob, dan merupakan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang mempunyai kemampuan memproduksi senyawa antibakteri seperti bakteriosin. Bakteriosin adalah peptida antinikrobayang disintesis secara ribosomal, diproduksi oleh bakteri dan mempunyai aktivitas melawan bakteri lain dalam satu genera (spektrum sempit) ataupun antar genera (spektrum luas). Bakteriosin mempunyai kemampuan yang digunakan sebagai antibakteri yang menghambat bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR), yaitu tipe bakteri yang tahan terhadap beberapa jenis antibiotika. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antimikroba tanpa penetralan pH dari isolat *Bifidobacterium*BBP6, mampu menghambat bakteri MDR *E.coli* dan *K. Pneumoniae*. Antimikroba dengan penetralan pH dari isolat *Bifidobacterium* BBP1 mampu menghambat bakteri MDR *E.coli*.

Kata kunci : *asam laktat, bakteriosin, Bifidobacterium* spp., *bakterimultidrug – resistant*.

ABSTRACT

Bifidobacterium spp. is a Gram-positive bacterium, does not form spores, non motile, negative catalase, anaerobes, and belongs to Lactic Acid Bacteria (LAB) that have the ability to produce antibacterial compound such as bacteriocin. Bacteriocin is a ribosomally synthesized antimicrobial peptide that was produced by bacteria and has activity against other bacteria that included in genera (narrow spectrum) or between genera (broad spectrum). Bacteriocin has the potential to be used as a antibacterial against the Multi Drug Resistant bacteria (MDR) which is a type of bacteria that has resistance to several kinds of antibiotics. The result shows that antimicrobial without pH neutralization of *Bifidobacterium* BPP6 isolate, capable to inhibit the growth of *E.coli* and *K.pneumoniae* MDR. Antimicrobial with pH neutralization of *Bifidobacterium* BPP1 capable to inhibit the growth of *E.coli* MDR.

Keywords: *bacteriocin, Bifidobacterium bifidum, lactic acid, Multidrug-Resistant*

PENDAHULUAN

Bifidobacterium merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, *non-motile*, negatif katalase, bersifat anaerob, dan termasuk ke dalam filum Actinobacteria. Bakteri ini mampu memfermentasi glukosa menjadi asam laktat dan asetat melalui jalur metabolisme yang ditandai dengan kehadiran enzim fruktosa-6-fosfat fosfoketolase (F6PPK). *Bifidobacterium* dideskripsikan sebagai batang pleomorfik dengan bentuk berbeda – beda, termasuk bentuk kurva, pendek, dan *bifurcated* Y. Beberapa strains *Bifidobacterium* memiliki sifat yang membuat mereka dapat digunakan sebagai probiotik. *Bifidobacterium* memiliki kemampuan menghasilkan beberapa macam antimikroba seperti asam organik dan juga bakteriosin (Martines *et al.*, 2013).

Bakteriosin merupakan peptida antimikroba yang dihasilkan secara ribosomal oleh bakteri dan memiliki aktivitas melawan bakteri lain yang satu spesies (*narrow spectrum*) maupun antar genera (*broad spectrum*). Bakteri yang menghasilkan bakteriosin tersebut memiliki imunitas tersendiri terhadap bakteriosin yang dihasilkannya dengan sistem protein imunitas yang spesifik. (Martinez *et al.*, 2013). Produksi bakteriosin dari suatu bakteri terjadi pada akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner pertumbuhan bakteri penghasil yang dipengaruhi oleh *quorum sensing* dan sinyal stres (Riley and Chavan, 2007). Menurut Dobson *et.al* (2012), bakteriosin dapat menjadi probiotik yang berkontribusi menekan patogen pada saluran pencernaan. Bakteriosin dapat digunakan sebagai bahan pengawet makanan alami atau dapat disebut sebagai agen biopreservatif. Bakteri yang dapat menghasilkan bakteriosin adalah golongan bakteri asam laktat, salah satunya adalah *Bifidobacterium* (Martines *et al.*, 2013).

Klebsiella pneumoniae merupakan salah satu bakteri gram negative, bakteri yang non motil (tidak melakukan pergerakan secara sel), merupakan bakteri fakultatif an aerob, bakteri ini dapat memfermentasikan laktosa. *Klebsiellapneumoniae* terdapat dalam feses dan saluran napas sebanyak 5% pada orang normal. *Klebsiella pneumonia* dapat menyebabkan pneumonia dan juga menjadi salah satu bakteri yang menyebabkan penyakit bronchitis (Elfidasari, 2013).

Escherichia coli adalah salah satu bakteri Gram negatif patogen yang paling umum menyebabkan infeksi pada masyarakat. Sejak meningkatnya strain resisten antibiotik dari *E. coli* mengakibatkan meningkatnya kebutuhan senyawa antibakteri baru (Ganapathy *et al.*, 2016). Multi drugs resistant (MDR) *E. coli* menjadi perhatian besar karena insiden peningkatan resistensi pada spektrum luas dari antimikroba β -laktam dan grup lainnya Peralta *et al.*, 2007).

Bakteri *multi drugs resistant* (MDR) merupakan beberapa strain bakteri yang memiliki kekebalan terhadap beberapa jenis antibiotik seperti methicilin dan vancomisin (Pringgenis *et al.*, 2015). Beberapa bakteri MDR yang saat ini telah ditemukan adalah *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus sp.*, dan *Escherichia coli*, dan lainnya.

Berdasarkan penjelasan di atas, *Bifidobacterium* memiliki potensi untuk menghasilkan bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *multi drugs resistant*. Bakteri *multi drugs resistant* tersebut diantaranya adalah bakteri *multi drugs resistant E. coli* dan *K. pneumoniae* yang menjadi patogen pada manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas penghambatan bakteriosin *Bifidobacterium* terhadap bakteri *multi drugs resistant E. coli* dan *K. pneumoniae*.

METODE PENELITIAN

A. Aktivasi Isolat *Bifidobacterium* spp.

Isolat *Bifidobacterium* spp. yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirmayang diisolasi dari feses bayi oleh Kusharyati *et al.* (2010). Kode isolat yang digunakan adalah BBP1, BBP6, BC4, BC7, BC13, BCC5, BCC6, dan BCC8.

Inokulasi satu ose isolat *Bifidobacterium* spp. masing – masing ke dalam 10 ml medium MRS Broth. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C pada *jar* anaerob. Setelah inkubasi, didapatkan kultur aktif masing- masing isolat bakteri *Bifidobacterium* spp. pada medium MRS Broth yang ditandai oleh kekeruhan yang terbentuk pada kultur cair kemudian dilakukan pewarnaan Gram.

Uji Aktivitas Supernatan Bebas Sel *Bifidobacterium* sp. terhadap Bakteri uji MDR *E.coli* dan *K. pneumoniae*

Bifidobacterium sp. dibiakkan pada medium MRS Broth dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Biakan *Bifidobacterium* spp. kemudian disentrifugasi selama 10 menit kecepatan 10.000 rpm untuk mendapatkan supernatan bebas sel *Bifidobacterium* spp. Supernatan bebas sel yang didapatkan kemudian dibagi menjadi dua yakni supernatan bebas sel yang dinetralkan pHnya dan supernatan yang tidak dinetralkan dan selanjutnya diujikan dengan bakteri uji MDR *E. coli* dan *K. pneumoniae* menggunakan metode Kirby's bauer. Diamati zona hambat supernatan bebas sel *Bifidobacterium* spp. terhadap bakteri uji.

Produksi Bakteriosin dari *Bifidobacterium* sp. Menggunakan Metode Amonium sulphate precipitation

Kultur bakteri *Bifidobacterium* spp. diinokulasikan 1 ose ke dalam MRS Broth 10 mL, kemudian diinkubasi selama 18 jam, pada suhu 37 °C. Inokulum 1% (1 ml) dimasukkan dalam medium produksi MRS Broth 100 mL, kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 37 °C, 150 rpm selama 24 jam. Kultur berumur 24 jam disentrifuse 10000 rpm, 10 menit, 4 °C. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dengan metode *salting out* dengan menambahkan amonium sulfat.

Sebanyak 100 mL supernatan kultur ditambahkan amonium sulfat (50%) secara perlahan dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* hingga akhir saturasi. Protein bakteriosin akan

mengendap seiring ditambahkannya amonium sulfat secara perlahan. Endapan protein dipisahkan dari cairannya dengan sentrifugasi kecepatan 10000 rpm, selama 15 menit, dan pada suhu 4 °C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam 0,1 M buffer fosfat pH 5,3 dengan volume $\pm$ 2 mL dan hasilnya merupakan larutan bakteriosin. Masing-masing larutan bakteriosin diuji aktivitas penghambatan pada bakteri uji.

Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap Bakteri MDR Uji

Kultur bakteri MDR *E. coli* dan *K. pneumoniae* dikultivasi pada medium *Nutrient Broth* (NB) diinkubasi selama 8 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, diinokulasikan ke dalam medium *Nutrient Agar* (NA) secara *spread plate*. Kertas cakram yang telah ditetesi larutan bakteriosin sebanyak 20 μ l diletakkan ke dalam medium NA yang telah diinokulasikan bakteri MDR *E. coli* maupun *K. pneumoniae*. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati dan dihitung zona hambat yang terbentuk dengan cara perhitungan :

$$D \text{ (mm)} = \frac{D1+D2}{2}$$

Keterangan

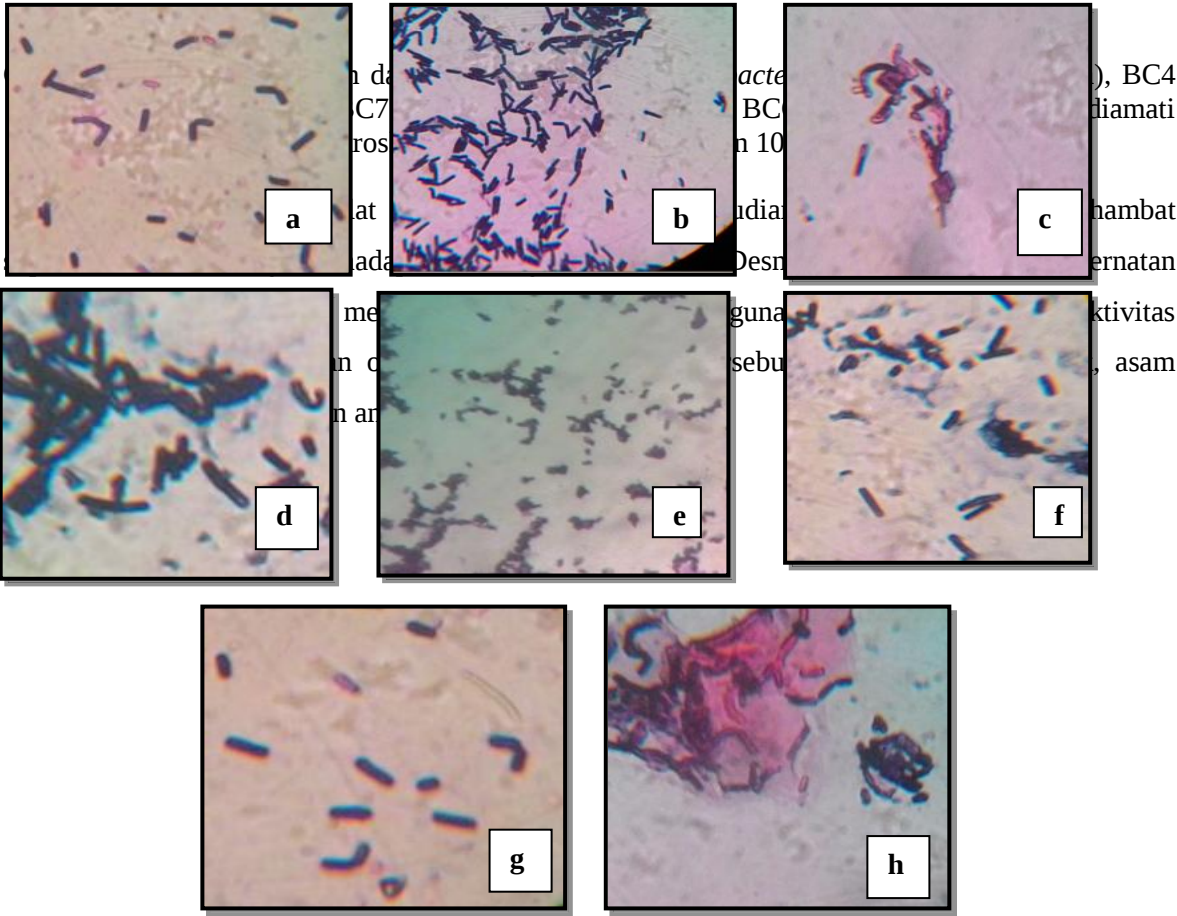
D = total diameter zona hambat

D1 = diameter vertikal zona hambat

D2 = diameter horisontal zona hambat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak delapan isolat *Bifidobacterium* spp. berhasil diremajakan yaitu isolat kode BBP6, BBP1, BC7, BC13, BC4, BCC5, BCC6, dan BCC8. Hasil pengujian sifat Gram dan bentuk sel menunjukkan bahwa kedelapan isolat memiliki sifat khas *Bifidobacterium* spp. Hasil dari pengecekan Gram dan bentuk sel menunjukkan isolat yang berhasil diaktivasi merupakan bakteri Gram positif dan beberapa sel menunjukkan bentuk *bifurcated* Y, batang pendek, dan *curve* (melengkung) seperti ditunjukkan Gambar 1. Karakteristik tersebut merupakan karakteristik dari bakteri *Bifidobacterium* spp. Berdasarkan Martinez F.A.C (2013), *Bifidobacterium* spp. merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, memiliki beberapa bentuk sel yaitu batang pendek, *bifurcated* Y, dan *curve*.



Tabel 1. Diameter Zona Hambat Supernatan Bebas Sel *Bifidobacterium* spp. tanpa Penetralkan pH terhadap bakteri MDR *E. coli* dan *K. pneumoniae*

Kode Isolat	Diameter Zona Hambat Supernatan tanpa Penetralkan (mm)		Diameter Zona Hambat Supernatan dengan Penetralkan (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
BCC8	6	6	6	6
BBP6	8	8	6	6
BC4	6,5	7	7	6
BCC5	6	6	6,5	6
BBP1	6	7	8	6
BC13	6,5	7	7	6
BCC6	6	6	6	6
BC7	6	8	7	6



Gambar 2. Diameter Zona Hambat Supernatan Bebas Sel *Bifidobacterium* spp. tanpa penetralkan pH terhadap bakteri MDR *E. coli* (a) dan *K. pneumoniae* (b).



Gambar 3. Diameter Zona Hambat Supernatan Bebas Sel *Bifidobacterium* spp. dengan penetralkan pH terhadap bakteri MDR *E. coli*

Hasil daya hambat supernatan bebas sel *Bifidobacterium* spp. terhadap bakteri uji menunjukkan supernatan bebas sel kode isolat BBP6 merupakan supernatan tanpa penetralkan pH dengan penghambatan terbesar terhadap bakteri MDR *K. pneumoniae* dan *E. coli*. Supernatan bebas sel dengan penetralkan pH menunjukkan isolat BBP1 menghasilkan hambatan terbesar terhadap bakteri MDR *E. coli* dibandingkan dengan isolat lain. Bakteri MDR *K. pneumoniae* menunjukkan tidak adanya hambatan oleh supernatan bebas sel dengan penetralkan pH seperti tercantum pada Tabel 1. Hambatan supernatan bebas sel *Bifidobacterium* spp. terhadap bakteri uji sesuai dengan pernyataan Martinez *et al.* (2013), bahwa *Bifidobacteria* merupakan bakteri yang

dapat menghasilkan senyawa antimikroba berupa asam organik yang diproduksi secara heterofermentatif dan peptida bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain. Senyawa antimikroba yang dihasilkan *Bifidobacteria* mampu melawan bakteri patogen.

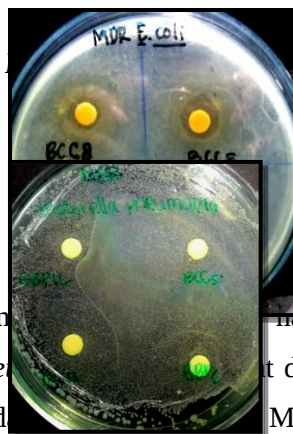
Bakteriosin diproduksi dengan metode amonium sulfat presipitasi. Bakteriosin yang didapatkan diuji aktivitasnya terhadap bakteri uji MDR *K. pneumoniae* dan *E. coli* menggunakan metode Kirby Bauer. Hasil uji aktivitas bakteriosin ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter Zona Hambat Bakteriosin *Bifidobacterium* spp. terhadap bakteri MDR *E. coli* dan *K. Pnumoniae*

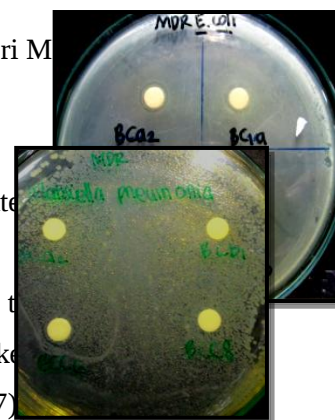
Kode Isolat	Diameter Zona HambatBakteriosin (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumonia</i>
BCC8	9,5	6
BBP6	12	7
BC4	9	6,5
BCC5	12,5	6
BBP1	6	6,5
BC13	9,5	6,5
BCC6	6	6
BC7	9	6,5

Hasil uji aktivitas bakteriosin menunjukkan bahwa bakteriosin dari isolat BCC5 merupakan bakteriosin yang paling potensial menghambat pertumbuhan bakteri MDR *E. coli* sedangkan bakteriosin BBP6 paling potensila menghambat MDR *K. pneumoniae*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh *Bifidobacterium* spp. memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan terhadap bakteri MDR sesuai dengan pernyataan Martinez *et al.* (2013), bahwa bakteriosin dari *Bifidobacterium lactis* dan *Bifidobacterium longum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, dan *S. typhii*. Selain itu, berdasarkan pernyataan Perez *et al.* (2014) bakteriosin dapat menjadi alternatif dari antibiotik yang mampu melawan bakteri klinik bahkan bakteri yang termasuk ke dalam bakteri *Multi Drugs Resistant*.

Gambar 4. Diameter Zona Hambat Bakteriosin terhadap bakteri MDR *E. coli*



Gambar 5. Diameter Zona Hambat Bakteriosin terhadap bakteri MDR *K. pneumoniae*



Bakteriosin *Bifidobacterium* spp. memiliki aktivitas menghambat yang tinggi terhadap bakteri MDR *E. coli* dan *K. pneumoniae* dikarenakan kedua bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif. Berdasarkan penelitian Marwati (2007) bakteri Gram negatif oleh aktivitas antibakteri bakteriosin lebih tinggi dibandingkan dengan Gram

positif, karena struktur dinding selnya memiliki komposisi lipopolisakarida (LPS), lipoprotein, dan fosfolipid yang lebih tinggi dibandingkan Gram positif. Struktur dinding sel bakteri Gram positif yang lebih sederhana memudahkan aktivitas bakteriosin.

Aktivitas bakteriosin terhadap Gram negatif tampak pada saat integritas membran luar bakteri terganggu misalnya oleh tekanan osmotik, pH rendah, adanya deterjen, agen pengkelat, getaran listrik, dan tekanan tinggi. Hal ini karena membran luar bakteri Gram negatif bersifat lebih protektif mencegah lintasan molekul-molekul yang berukuran melebihi 700 Da, sehingga nisin yang berukuran 3353 Da tidak mampu mencapai tempat aksinya kecuali dengan perlakuan pendahuluan secara mekanis (tekanan osmotik, tegangan listrik, dan tekanan tinggi). Aktivitas hambat bakteriosin *Lactobacillus* sp. kemungkinan karena adanya sisi aktif bakteriosin yang bersifat sangat hidrofobik (bermuatan negatif) sehingga mampu mengikatkan diri pada membran luar *E. coli* atau kemampuannya mengikat Mg^{2+} pada membran luar *E. coli* seperti halnya agen pengkelat logam EDTA. Terikatnya ion-ion Mg^{2+} menghilangkan integritas lapisan lipopolisakarida dan kerusakan membran luar bakteri tersebut. Tagg et al. (1976) menyatakan bahwa mekanisme bakteriosin cenderung melawan kelompok bakteri Gram positif, yakni adanya pengaruh dari molekul reseptor atau pelepasan bakteriosin dari sel penghasil ditingkatkan oleh pengaruh lisin atau bakteriosin yang dilepas dalam bentuk protein. Potensi letal bakteriosin asal bakteri Gram positif terhadap bakteri tergantung pada kecocokan antara permukaan serangan dan interaksi molekul hidrofobik.

Berdasarkan Martinez et al. (2014), bakteriosin *Bifidobacterium* mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri Gram negatif dan Gram positif. Akan tetapi, daya kerja bakteriosin terhadap bakteri uji juga dipengaruhi oleh struktur dinding sel dari bakteri uji. Hal ini karena mekanisme kerja bakteriosin dalam menekan pertumbuhan bakteri adalah dengan membentuk pori pada membran atau dinding sel bakteri atau menghambat sintesis dinding sel bakteri seperti dijelaskan oleh Perez et al. (2014). Bakteriosin dapat merusak permeabilitas membran sel bakteri dengan membentuk pori pada sel bakteri sehingga membran sel akan mengalami kebocoran. Terjadinya kebocoran akan menyebabkan terganggunya kestabilan membran sel sehingga pertumbuhan sel bakteri akan terhambat dan sel bakteri akan mengalami kematian (Sari et al., 2012).

KESIMPULAN

Daya hambat terbesar dihasilkan dari supernatan bebas sel *Bifidobacterium* BBP6 terhadap pertumbuhan bakteri MDRE. *coli* dan *K. pneumoniae*. Uji aktivitas bakteriosin dari isolat BCC5 paling potensial menghambat MDR *E. coli*. sedangkan bakteriosin BBP6 paling potensial MDR *K. Pneumoniae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didanai Proyek Penelitian BLU Skim Riset Institusi

DAFTAR PUSTAKA

- Desniar, Rusmana I., A. Suwanto, dan N.R. Mubarik. 2012. Senyawa Antimikroba yang Dihasilkan oleh Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam. *Jurnal Akuatika*. 3(2) : 135-145.
- Dobson A, Cotter PD, Ross RP, dan Hill C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78(1) : 1–6.
- Elfidasari, D. , N. Noriko, A. Mirasaraswati, A. Feroza, S. F. Canadianti. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumonia* pada Beberapa jenis Rokok Konsumsi Masyarakat. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains Dan Teknologi*, 2(1), pp. 41
- Ganapathy, S. Dan Karpagam S.2016.In vitro antibacterial and phytochemical potential of *Aegle marmelos* against multiple drugs resistant (MDR). *Escherichia coli*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(1),pp.253-255.
- Kusharyati, D.F, P.M. Hendrati dan Sukanto.2010. Keragaman *Lactobacilli* Probiotik Lokal pada Jus Tomat dan Potensinya sebagai Functional Food (belum dipublikasikan).Unsoed, Purwokerto.Unsoed. Purwokerto.
- Martinez, F.A.C., Eduardo, M.B., Attilio, C., Paul D. C, dan Ricardo, P.S.O. 2013. Bacteriocin Production By *Bifidobacterium* Spp. A Review. *Biotechnology Advances*, 31, pp. 482-488.
- Peralta, G., M. Blanca Sa´nchez, J. Carlos Garrido, I. D. Benito, M. Eliecer Cano, Luis Marti´nez-Marti´nez, dan M. Pi´a Roiz. 2007. Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with *Escherichia coli* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, pp. 855–863.
- Perez, R.H., T. Zendo, K. Sonomoto. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) : various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(1), pp. 1-13.
- Pringgenis, D., M. Jumiati, dan A. Ridho. 2015. Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Nudibranch Polka-Dot (Jorunna funebris)* (Gastropoda : Moluska) Terhadap Bakteri *Multidrug Resistant* (MDR). *Jurnal Ilmu Kelautan*, 20(4), pp. 195-206.
- Riley M dan Chavan M. 2007. *Bacteriocins: ecology and evolution*. 1st ed. Heidelberg: Springer.
- Sari, R.A., Nofiani, R. , dan P. Ardiningsih. 2012. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Genus *Leuconostoc* dari Pekasam Ale-Ale Hasil Formulasi Skala Laboratorium JKK., 1(1), :14-20.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani, dan L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of GramPositive Bacteria. *Bacteriology Reviews*, 40, pp. 722-756.
- Usmiati, S. dan T. Marwati. 2007. Seleksi Dan Optimasi Proses Produksi Bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. *Jurnal Pascapanen*, 4(1), pp. 27-37.

Prosiding Seminar Nasional dan Call for Papers

"Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan VII" 17-18

November 2017

Purwokerto
