

ARTIKEL PENELITIAN

Uji Kepekaan Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik terhadap Antibiotik Kanamisin, Oleandomisin, dan Polimiksin B

Lismayana Hansur,^{1*} Dara Ugi,¹ Hilmi Hambali²

¹Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Makassar, Makassar, Indonesia

²Fakultas Biologi, Universitas Muhammadiyah Makassar, Makassar, Indonesia

*Corresponding author: nadiyahhansur@gmail.com

Diterima 24 Oktober 2017; Disetujui 1 April 2019

DOI: 10.23886/ejki.7.8476.

Abstrak

Bakteri probiotik utama adalah strain yang berasal dari genera *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*. Bakteri asam laktat (BAL) sensitif terhadap antibiotik beta laktam, kecuali penisilin. Beberapa BAL seperti *Lactobacillus* dan *Lactococcus* resisten terhadap tetrasiklin dan eritromisin. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kepekaan bakteri asam laktat kandidat probiotik terhadap antibiotik kanamisin, oleandomisin, dan polimiksin B. Penelitian dilakukan di Bagian Mikrobiologi Klinik, Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Sulawesi Selatan, pada bulan Mei-September 2017. Isolat bakteri berasal dari hasil isolasi pisang kemudian dilakukan uji sensitivitas dan resistensi bakteri terhadap antibiotik kanamisin, oleandomisin, dan polimiksin menggunakan VITEK 2 Compact biomereux clinical diagnostics (USA). Hasil uji resistensi dari tujuh sampel isolat bakteri asam laktat (BAL) kandidat probiotik menunjukkan tingkat sensitivitas paling tinggi terhadap antibiotik kanamisin dan oleandomisin terdapat pada tiga isolat yaitu 1C, 1E, dan 5D; hanya satu bakteri yang sensitif pada polimiksin B yaitu isolat 5D. Isolat bakteri asam laktat dari hasil isolasi pisang dapat diuji lebih lanjut sebagai kandidat probiotik.

Kata kunci: sensitivitas, resistensi, kanamisin, oleandomisin, polimiksin B.

Sensitivity and Resistance of Antibiotic Kanamycin, Oleandomycin and Polymyxin B on Lactid Acid Bacteria as Probiotic Candidate

Abstract

Probiotics are living microorganisms which, in sufficient quantities, could affect their hosts to be healthier. The main probiotic bacteria are strains originating from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. The purpose of this study was to determine the sensitivity of candidate probiotic lactic acid bacteria to kanamycin, oleandomycin, and polymyxin B. Bacterial isolates originated from banana and the sensitivity and resistance of these bacteria were then tested to kanamycin, oleandomycin, and polymyxin B antibiotics using VITEK 2 Compact biomereux clinical diagnostics (USA). The resistance test results from seven samples of lactic acid bacteria isolates of probiotic candidates showed the highest level of sensitivity to kanamycin and oleandomisin antibiotics found in three isolates namely 1C, 1E, and 5D; only one bacterium that was sensitive to polymyxin B is the 5D isolate. Isolates of lactic acid bacteria can be further tested as probiotic candidates.

Keywords: sensitivity, resistance, kanamycin, oleandomycin, polymyxin B.

Pendahuluan

Probiotik berfungsi melindungi saluran cerna dari bakteri patogen. Perubahan komposisi atau modulasi mikrobiota usus memiliki peran penting dalam proses inflamasi terkait obesitas dan diabetes.¹ Probiotik mampu menghasilkan inhibitor terhadap alfa dan beta glukosidase sehingga dapat membantu mengatur kadar gula pada penderita diabetes tipe 2.^{2,3} Yeh et al⁴ memberikan probiotik melalui metode *transplantasi mikrobiota fecal* (FMT) pada pasien sesudah operasi besar dengan tujuan menghalangi kolonisasi usus oleh organisme patogen dan mencegah respons imun maladaptif.

Keamanan probiotik menjadi pertimbangan penting yaitu keamanan sifat mikroba, dampak terhadap aktivitas metabolik, patogenisitas atau toksogenisitas, dan kehadiran gen resistensi antibiotik yang dapat dipindahkan pada mikroba usus yang patogen. Penilaian juga dilakukan berdasarkan karakteristik genus dan spesies.⁵ Kemampuan transfer gen resisten adalah faktor penentu resistensi antibiotik dari strain probiotik ke mikrobiota komensal sehingga resistensi merupakan komponen penting dalam penilaian keamanan bakteri probiotik.⁶ Resistensi antibiotik terjadi melalui mutasi gen atau transfer gen resisten antar bakteri. Bakteri probiotik mengandung unsur genetik yang dapat memberikan resistensi terhadap antibiotik. Jumlah probiotik yang tinggi dalam suplemen makanan dapat membentuk reservoir gen resisten antibiotik di usus.⁷

Bakteri asam laktat (BAL) sensitif terhadap kloramfenikol, tetrasiklin, ampicilin, amoksisilin/asam klavulanat, sefalotin, dan imipenem serta resisten terhadap vankomisin, rifampisin, streptomisin, basitrasin, eritromisin, siprofloksasin, amikasin, trimetoprim/sulphamethoksazol, dan gentamisin.⁸ Penelitian mengenai resistensi antibiotik terhadap 115 strain yang diisolasi dari susu fermentasi di Turki diketahui bahwa bakteri tersebut resisten terhadap linkomisin (27,8%), tetrasiklin (20%), ampicilin (13,9%), meropenem (11,3%), gentamisin (10,4%), eritromisin (7,8%), siprofloksasin (6,1%), kloramfenikol (3,4%), vankomisin (0,87%).⁹ BAL umumnya sensitif terhadap antibiotik betalaktam, kecuali penisilin. Beberapa BAL seperti *Lactobacillus* dan *Lactococcus* resisten terhadap tetrasiklin dan eritromisin.¹⁰ Penelitian ini bertujuan mengetahui kepekaan BAL kandidat probiotik terhadap antibiotik kanamisin, oleandomisin, dan polimiksin B.

Metode

Penelitian ini dilakukan di Bagian Mikrobiologi Klinik, Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK)

Sulawesi Selatan, pada bulan Mei sampai September 2017. Digunakan isolat bakteri yang berasal dari hasil isolasi pisang yang telah difermentasi. Sebanyak 100-200 gram pisang dikupas dan diiris tipis-tipis, kemudian ditambahkan akuades steril dengan perbandingan 1:4 dan pisang dihaluskan. Pisang disimpan dalam wadah kaca yang tertutup, diinkubasi pada suhu 25-37°C selama 7 hari. Untuk mendapatkan isolat BAL dilakukan kultur di media agar MRS yang ditambahkan CaCO_3 . Kultur dilakukan sebanyak tujuh tabung reaksi (tabung A-G) selama lima hari. Isolat BAL yang dipilih untuk uji kepekaan terhadap antibiotik kanamisin, oleandomisin, dan polimiksin B adalah isolat yang memiliki zona hambat terluas pada hari ke-1 dan ke-5. Pada uji kepekaan, isolat diremajakan terlebih dahulu untuk mendapatkan koloni murni. Sebanyak 1 ose kultur stok ditumbuhkan pada 10 ml MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan untuk mengamati kemurnian bakteri menggunakan pulasan yang diwarnai gram.

Pengujian Resistensi Antibiotik Menggunakan VITEK 2

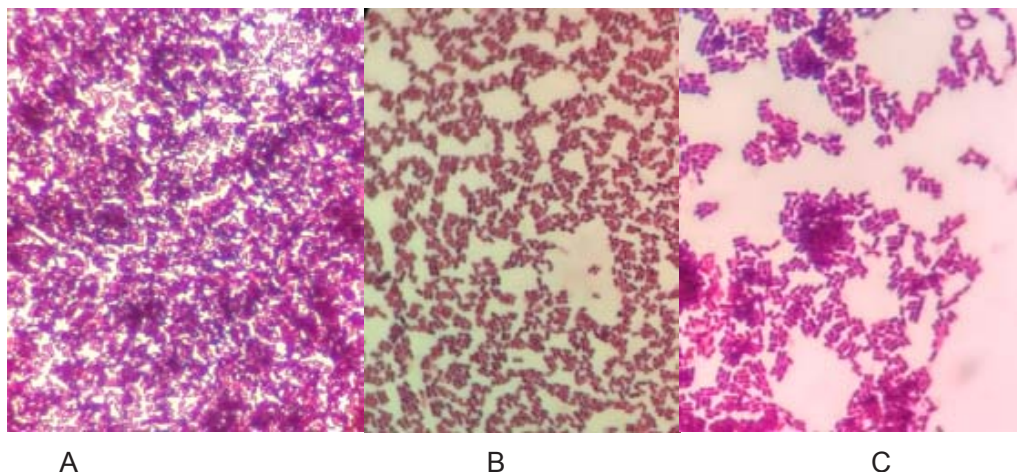
Pengujian menggunakan mesin *VITEK 2 Compact biomereux clinical diagnostic*. Tabung diisi dengan 3 ml NaCl 0,45% pH 5,0. Koloni bakteri yang telah diremajakan disuspensi dengan larutan NaCl kemudian diukur kekeruhan inokulum. Tabung inokulum dimasukkan ke lubang pengukuran di bagian *densicheck* dan diputar 360° selama 2 detik. Angka hasil pengukuran akan muncul dalam satuan McFarland. Rujukan nilai untuk bakteri gram negatif dan positif adalah 0,5–0,63 McFarland. Kekeruhan diatur dan diseimbangkan dengan penambahan koloni bakteri (jika kurang) dan ditambahkan larutan NaCl (jika berlebih). Selanjutnya dilakukan uji sensitivitas antibiotik dengan memindahkan 280 µl bakteri gram positif dari tabung inokulum pertama ke tabung kedua. Uji sensitivitas dengan meletakkan kartu uji vitek di *cassette* (lokus kartu vitek), setelah itu dilakukan *barcode* di setiap kartu uji. Kartu Vitek yang telah di-*barcode* dimasukkan ke dalam alat *VITEK 2 Compact biomereux* untuk dibaca.¹¹ Hasil pembacaan berupa positif dan negatif yang tampak di layar alat. Dikatakan positif apabila BAL kandidat probiotik resisten terhadap antibiotik yang diujikan dan negatif apabila sensitif terhadap antibiotik yang diuji.

Hasil

Dari tujuh tabung kultur, didapatkan isolat yang membentuk zona hambat terluas pada hari ke-1

adalah isolat di tabung 1A, 1C, 1E, dan 1G, sedangkan isolat yang membentuk zona hambat terluas pada hari ke-5 adalah isolat di tabung 5A, 5C, dan

5D. Pewarnaan gram terhadap pulasan isolat BAL hasil isolasi dari fermentasi pisang menunjukkan kemurnian dari bakteri yang akan digunakan untuk uji kepekaan (Gambar 1).



Gambar 1. Pewarnaan Gram BAL Hasil Isolasi dari Fermentasi Pisang. Gambar A (Koloni 1A), B (Koloni 1G), dan C (Koloni 5C). Koloni A, B, dan C Merupakan Bakteri Gram Positif, Batang Panjang (Koloni A) dan Batang Pendek (Koloni B dan C).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa resistensi terhadap antibiotik kanamisin dan oleandomisin yang merupakan antibiotik dari kelas aminoglikosida terjadi pada 4 isolat BAL hasil isolasi fermentasi

pisang (1A, 1G, 5A, dan 5C), sedangkan 3 lainnya (1C, 1E, dan 5D) masih sensitif. Hanya ada satu isolat (5D) yang masih sensitif terhadap antibiotik yang diuji.

Tabel 1. Uji Kepekaan BAL dari Isolasi Fermentasi Pisang terhadap Antibiotik Kanamisin, Oleandomisin, dan Polimiksin B

Kode isolat	Kanamisin	Oleandomisin	Polimiksin
1A	R	R	R
1C	S	S	R
1E	S	S	R
1G	R	R	R
5A	R	R	R
5C	R	R	R
5D	S	S	S

R: resisten, S: sensitif

Diskusi

Sensitivitas terhadap antibiotik merupakan faktor paling penting dalam evaluasi keamanan probiotik. Resistensi antibiotik merupakan risiko potensial aplikasi probiotik, karena transfer horisontal gen resistensi antibiotik telah ditunjukkan

antara *Lactobacilli* dan *Enterococcus faecalis* secara *in vivo*.¹²

Penelitian Mater et al¹² secara *in vivo* mendapatkan bahwa gen resisten vankomisin dapat dipindahkan dari strain *Enterococcus* ke *L. acidophilus*, yang membuktikan transformasi dapat

berlangsung di dalam tubuh hewan (*in vivo*). Penelitian Ocana et al¹³ yang menggunakan resistensi sebagai salah satu syarat probiotik, ketahanan terhadap konsentrasi tinggi metronidazol menunjukkan bahwa *Lactobacilli* dapat digunakan bersamaan dengan pengobatan vaginosis bakteri untuk mengembalikan flora normal vagina. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Gueimonde et al¹⁴ yang menyatakan bahwa strain probiotik dengan resistensi antibiotik intrinsik, berguna untuk memulihkan mikrobiota usus setelah menggunakan antibiotik.

Penggunaan antibiotik secara berlebihan dapat menimbulkan tekanan selektif yang mendorong perkembangbiakan mikroorganisme yang resisten. Sebagai contoh bakteri gram positif tidak memiliki membran sel bagian luar (*outer membrane*) sehingga secara intrinsik bersifat resisten terhadap polimiksin. Hal tersebut disebabkan sifat antibiotik polimiksin B yang merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba dan dapat menyebabkan lisis pada bakteri.¹⁵ Pada penelitian ini hampir semua bakteri uji positif kecuali isolat 5D. Hanya dua strain yang sensitif terhadap polimiksin B.

BAL yang di isolasi dari fermentasi daging memperlihatkan semua isolat masih sensitif terhadap tetrasiklin, penisillin, basitrasin, kloramfenikol, sefalekssin, linkomisin, eritromisin, ampicilin, spiramisin dan amoksisilin. Pertumbuhan AB tidak dipengaruhi oleh vankomisin, asam nalidiksik dan metronidazol.¹⁶ BAL yang diisolasi dari pangan sensitif terhadap kloramfenikol dan tetrasiklin.¹⁷ Beberapa bakteri yang masih sensitif terhadap antibiotik, strain PD5 masih sensitif terhadap kanamisin, oleandomisin dan polimiksin B, begitu juga strain 1C dan 1E yang masih sensitif terhadap kanamisin dan oleandomisin.

Gen *msrC*, *vanX*, dan *dfrA* terdeteksi pada strain *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, dan *Lactococcus lactis* yang mengakibatkan bakteri yang diisolasi dari pangan fermentasi supermarket sebagian besar resisten terhadap siprofloksasin, amikasin, trimetoprim, dan gentamisin.⁸ Uji PCR menunjukkan beberapa strain resisten mengandung gen resistensi *tet* (M) dan/atau *erm* (B).¹⁰ Resistensi bakteri pada penelitian ini belum sampai pada identifikasi gen, tetapi berdasarkan penelitian sebelumnya resistensi pada antibiotik tertentu selalu dibuktikan dengan keberadaan gen penyebab resistensi. Gen tersebut dapat berpindah antar organisme. Pola resistensi dipengaruhi banyak hal, salah satunya keberadaan gen resisten.

Kanamisin adalah antibiotik golongan aminoglikosida; mekanisme kerjanya adalah terikat pada sub-unit 30 S dari ribosom sehingga sub-unit 70 S tidak terbentuk yang menyebabkan inhibisi sintesis protein. Pada umumnya antibiotik golongan aminoglikosida memiliki spektrum aktivitas antimikroba luas dan enzim penginaktivasi aminoglikosida relatif aktif melawan sebagian besar basilus aerob gram-negatif.¹⁸ BAL merupakan bakteri gram positif, pada penelitian ini terdapat 3 strain yang sensitif terhadap kanamisin yaitu strain 1C, 1D, dan 5E, sedangkan bakteri yang resisten adalah 1A, 1G, 5A, dan 5C. Resistensi bakteri gram positif disebabkan modifikasi gen yang dilakukan bakteri target⁹ dan mutasi gen target di membran sel bakteri yang berakibat pada gangguan transportasi antar sel.²⁰ Selain itu ditemukan gen *bifunctional aac(6')Ie-aph(2'')Ia*; keberadaan gen tersebut menyebabkan resistensi hampir semua aminoglikosida kecuali streptomisin.²¹

Oleandomisin termasuk golongan makrolida. Mekanisme kerjanya menghambat sintesis protein ribosomal 50s dengan berikatan secara reversibel yang mengakibatkan tidak terjadi pemanjangan rantai peptida. Bakteri yang memiliki gen tersebut menyebabkan antibiotik menjadi resisten. Gen *ermB* and *mefA* telah menjadi gen penentu resistensi pada bakteri.²² Pada penelitian ini bakteri yang resisten adalah 1A, 1G, 5A, dan 5C; gen resisten tersebut bisa saja terdapat pada strain tersebut, namun masih perlu diuji.

Polimiksin B termasuk golongan *polymyxins*; membunuh sel bakteri dengan menyerang membran sel. Jenis antibiotik ini adalah lipopeptida *pentacationic* yang juga berinteraksi dengan molekul lipopolisakarida (LPS) dengan mengganggu permeabilitas membran terluar kemudian merusak membran sitoplasma pada bakteri gram negatif. Bakteri gram positif, mikroba eukariotik dan sel mamalia biasanya resisten.²³ Tidak banyak penelitian yang membahas resistensi BAL terhadap antibiotik jenis ini, salah satu laporan tentang BAL yang dilaporkan resisten adalah *Bifidobacterium*.²⁴ Hal tersebut mungkin menjadi penyebab lima BAL pada penelitian ini resisten, hanya strain D5 yang masih sensitif, sedangkan pada dua antibiotik lain hanya 4 strain yang resisten.

Untuk mengurangi resistensi, pemberian antibiotik harus berdasarkan pola bakteri penyebab infeksi dan kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Penggunaan antibiotik secara berlebihan mengakibatkan flora normal terpajan konsentrasi tertentu berdasarkan lama pemberian antibiotik.

Pemakaian antibiotik, khususnya bila digunakan tanpa aturan yang jelas dapat mengakibatkan resistensi. Di Indonesia, data prevalensi resistensi antibiotik masih sedikit ditemukan. Kurangnya fasilitas laboratorium merupakan kendala besar dalam pengembangan surveilans yang efektif. Untuk mempertahankan efektifitas antibiotik, khususnya di negara berkembang, perlu dilakukan perbaikan sistem surveilans untuk memantau timbulnya resistensi antibiotik, perbaikan akses laboratorium, peraturan penggunaan antibiotik yang lebih baik, dan pendidikan masyarakat.⁶

Kesimpulan

Isolat 1A, 1G, 5A, dan 5C resisten terhadap antibiotik kanamisin, oleandomisin, dan polimiksin B, sehingga bakteri tersebut tidak boleh digunakan sebagai probiotik. Isolat 5D masih sensitif terhadap kanamisin, oleandomisin, dan polimiksin B sehingga dapat diuji ke tahap selanjutnya untuk kelayakan sebagai kandidat probiotik.

Daftar Pustaka

1. Kootte RS, Vrieze A, Holleman F, Dallinga-TGM, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2012;(14):112-20.
2. Chen P, Zhang Q, Dang H, Liu X, Tian F, Zhao J, et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and alpha glucosidase inhibitory activity. *Food Control*. 2014;(35):65-72.
3. Panwar H, Calderwood D, Grant IR, Grover S, Green BD. Lactobacillus strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential. *Eur J Nutr*. 2014;53(7):1465-74.
4. Yeh A, Morowitz MJ. Probiotics and fecal microbiota transplantation in surgical disorders. *emin Colon Rectal Surg*. 2018;29(1):37-43.
5. Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach JT, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010;(1)3:164-85.
6. Yenny, Herwana Y. Resistensi dari bakteri enteric: aspek global terhadap antimikroba. *Universa Medicina*. 2007;(26)1:46-56.
7. Zheng M, Zhang R, Tian X, Zhou X, Pan X, Wong A. Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2):10-6.
8. Liu C, Yang ZZ, Dong K, Ping YJ, Xiao-Kg. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed Environ Sci*. 2009;(22):401-12.
9. Ozteber M, Başbülbül G. Antibiotic resistance patterns of lactic acid bacteria isolated from different fermented milk products of Turkish origin. *Microbiology Research Journal International*. 2017; 20(4):1-13.
10. Fadl GM, Abdel-Hamid, Farag ZSH. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Braz J Microbiol*. 2014;(45):1-12.
11. Pincus DH. Microbial identification using the biomérieux vitek 2 system. Dalam: Miller MJ, editor. *Encyclopedia of rapid microbiological methods*. volume II. 2006. Diunduh dari: https://store.pda.org/bookstore/Table of Contents/ERMM_V2_Ch01.pdf. VITEK® 2 Systems Product Information. BioMérieux, Inc. 2010.p.23-7.
12. Mater DD, Langella P, Corthier G, Flores MJ. A probiotic Lactobacillus strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;14:123-7.
13. Ocana V, Silva C, Macías MEN. 2006. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;181-2.
14. Gueimonde M, Sánchez B, Clara G, Gavilán DLR, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol*. 2013;(4):202-9.
15. Gillespie S, Bamford K. Medical microbiology and infection. London: Wiley Blackwell publication; 2012.
16. Zdolec N, Filipović I, Cvrtić Fleck Z, Marić A, Jankuloski D, Kozačinski L, et al. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese. *Veterinarski arhiv*. 2011;81(1):133-41.
17. Hana J, Chena D, Lic D, Lia X, Zhoud W, Zhangb B, et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus strains. *Ital J Food Sci*. 2015;27:283-9.
18. Nurmala, Virgandhy IGN, Andriani, Liana DF. Resistensi dan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik di RSUD dr. Soedarso Pontianak Tahun 2011-2013. *eJKI*. 2015;3(1):21-9.
19. Bismuth R, Courvalin P. Aminoglycosides and gram-positive bacteria: antibiogram, 3rd edn. Oregon: ESKA publication; 2010.
20. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010;13:151-71.
21. Jaimee, Halami PM. High level aminoglycoside resistance in Enterococcus, Pediococcus and Lactobacillus species from farm animals and commercial meat products. *Annals of Microbiology*. 2015;66(1):101-10.
22. Motaweq ZY, Al-Dahhan HA, Nahe HS. Detection of macrolide resistance genes ermB and mfa/e in Iraq. *World J Pharm Res*. 2015;4(8):252-65.
23. Vaara M. Novel derivatives of Polymyxins. *J Antimicrob Chemother*. 2014;98(11):1213-9.
24. Moracanian SV, Djukić D, Zdolec N, Milijašević M, Mašković P. Antimicrobial resistance of lactic acid bacteria in fermented food. *JHED*. 2017;18:25-35.