

Isolasi, Identifikasi dan Karakteristik *Antimicrobial Resistance Staphylococcus cohnii* Dari Perairan Semarang

Siti Nur Kholishah(1,2), Diah Permata Wijayanti(1), Mada Triandala Sibero(1,2*)

1Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Jawa Tengah
2Laboratorium Natural Product, UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Jawa Tengah

sitinurkholishah@students.undip.ac.id (1), diahpermata@lecturer.undip.ac.id (2),
madatriandalasibero@lecturer.undip.ac.id (Ca*)

ABSTRAK

Resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan salah satu masalah utama di bidang kesehatan saat ini, salah satunya adalah bakteri *Staphylococcus cohnii*. Bakteri tersebut dapat hidup di berbagai habitat termasuk lingkungan perairan. Cemaran antibiotik di lingkungan perairan adalah salah satu faktor yang meningkatkan resistensi bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil resistensi bakteri *Staphylococcus cohnii* dari perairan Semarang. Isolat didapat dari koleksi Laboratorium Natural Product Universitas Diponegoro. Isolat kemudian dikarakterisasi secara morfologi dan diidentifikasi secara molekuler. Selanjutnya resistensi isolat terhadap antibiotik diuji dengan metode *Antimicrobial Susceptibility Test* (AST). Diameter zona bening kemudian diukur setelah 24 jam dan disesuaikan dengan standar CLSI 2021. Karakteristik morfologi koloni ATL.215 yaitu berbentuk cicular atau bulat dengan elevasi convex atau cembung di bagian tengah dan margin entire atau tepian yang halus. Warna isolat pada kedua media adalah putih. Isolat diidentifikasi sebagai *Staphylococcus cohnii* berdasarkan identifikasi molekuler sekuens 16s rRNA dengan percent identity 99,93% dan query cover 100%. Berdasarkan hasil AST, isolat menunjukkan resistensi terhadap satu dari delapan antibiotik yaitu chloramphenicol dengan diameter zona bening 8,55 mm. Sedangkan pada tujuh antibiotik lain diameter zona bening yang didapatkan termasuk dalam kriteria susceptible.

Kata Kunci: antibiotik, resistensi, *Staphylococcus cohnii*

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is one of the main problems in the health sector today, *Staphylococcus cohnii* is one of them. These bacteria can live in various habitats including aquatic environments. Antibiotic contamination in the aquatic environment is one of the factors that increase bacterial resistance. This study aims to determine the resistance profile of *Staphylococcus cohnii* bacteria from Semarang waters. The isolates were obtained from the collection of the Diponegoro University Natural Products Laboratory. The isolates were then characterized morphologically and identified molecularly. Furthermore, resistance to antibiotics was tested using the *Antimicrobial Susceptibility Test* (AST) method. The diameter of the zone was then measured after 24 hours and adjusted to the 2021 CLSI standard. The morphological characteristics of the ATL.215 colony were cicular or round in shape with convex or convex elevation in the center and smooth margins throughout the edges. The color of the isolate in both media was white. The isolate was identified as *Staphylococcus cohnii* based on the molecular 16s rRNA sequence with 99.93% identity percent and 100% query cover. Based on AST, isolates showed resistance to one of eight antibiotics, namely chloramphenicol with a clear zone diameter of 8.55 mm. Meanwhile, for the other seven antibiotics, the diameter of the clear zone was included in the susceptible criteria.

Keywords : antibiotic, resistance, *Staphylococcus cohnii*

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Staphylococcus cohnii merupakan bakteri patogen yang bersifat oportunistik. Bakteri ini adalah salah satu mikroflora yang terdapat pada kulit manusia. Namun pada kondisi tertentu juga dapat menyebabkan penyakit seperti infeksi pada aliran darah, endokarditis dan meningitis. Penelitian sebelumnya yang mengisolasi *Staphylococcus cohnii* dari manusia menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki gen penyandi resistensi antibiotik (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2017). Selain pada manusia, *Staphylococcus cohnii* juga banyak ditemukan di lingkungan termasuk perairan. Penelitian Basso *et al.* (2014) menunjukkan bahwa *Staphylococcus cohnii* merupakan spesies yang paling banyak diisolasi dari perairan yang tercemar di Brazil. *Staphylococcus cohnii* yang diisolasi menunjukkan resistensi terhadap tiga antibiotik. Resistensi antibiotik merupakan salah satu ancaman utama dalam dunia kesehatan saat ini. Resistensi terhadap antibiotik dipicu oleh beberapa faktor seperti peningkatan dan penyalahgunaan dalam konsumsi antibiotik, paparan antibiotik serta penyebaran gen resistensi di lingkungan. Keberadaan bakteri dan gen resisten antibiotik di lingkungan diperkuat oleh penelitian-penelitian sebelumnya mengenai profil resistensi antibiotik pada bakteri lingkungan. Muara merupakan lingkungan perairan yang berpotensi menjadi reservoir gen resistensi antibiotik karena tingginya paparan limbah domestik yang juga mengandung antibiotik (Hanna *et al.*, 2020). Perairan utara Kota Semarang adalah muara yang berbatasan langsung dengan kawasan pantai utara Pulau Jawa. Perairan ini menerima masukan limbah domestik maupun industri dari berbagai wilayah di sekitarnya sehingga terjadi akumulasi yang meningkatkan potensi pencemaran (Harahap *et al.*, 2020). Limbah domestik merupakan salah satu perantara masuknya antibiotik ke perairan. Perairan utara Kota Semarang juga tergolong tercemar ringan hingga sedang berdasarkan kandungan BOD, COD dan total coliform yang melebihi baku mutu (Kurnianti, 2020) dan (Pratiwi *et al.*, 2019). Hal-hal tersebut meningkatkan kemungkinan terjadinya paparan antibiotik di lingkungan perairan utara Kota Semarang. Selain itu, kajian mengenai profil resistensi bakteri di Perairan Semarang belum pernah dilakukan sebelumnya. Hal ini melatarbelakangi urgensi untuk pelaksanaan penelitian ini di Perairan Semarang.

2. Perumusan Masalah

Resistensi bakteri merupakan masalah utama dalam bidang kesehatan saat ini. *Staphylococcus cohnii* adalah salah satu spesies bakteri yang telah menunjukkan perkembangan resistensi. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa bakteri ini dapat bertahan hidup di berbagai lingkungan termasuk perairan tercemar. Perairan Semarang yang dinyatakan tercemar berdasarkan penelitian sebelumnya diduga dapat menjadi reservoir bagi resistensi bakteri termasuk *Staphylococcus cohnii*. Oleh karena itu, penelitian mengenai profil resistensi *Staphylococcus cohnii* di perairan Semarang perlu dilakukan.

3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian yaitu :

1. Mengidentifikasi *Staphylococcus cohnii* dari perairan Semarang
2. Mengetahui profil resistensi antibiotik *Staphylococcus cohnii* dari perairan Semarang

4. Manfaat Penelitian

Memberikan informasi dalam bidang mikrobiologi mengenai karakteristik dan profil resistensi antibiotik *Staphylococcus cohnii* dari perairan Semarang.

II. METODE

Tempat dan Waktu

Pengambilan sampel dilakukan di perairan Tambak Lorok, Semarang pada bulan April 2021. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Natural Product, UPT Laboratorium Terpadu UNDIP dan Tropical Marine Biotechnology, FPIK UNDIP, pada bulan April-Desember 2021.

Bahan dan Peralatan

Sampel air, Cawan Petri, Larutan NaCl 0,85%, *Hektoen Enteric Agar*, *Mueller Hinton Agar*, *Nutrient Broth*, Saponin, Larutan PBS, Primer 27F dan 1492R, Agarose, Ethidium Bromide, Cotton Swab, Gentamicin 10 µg, Kanamycin 10 µg, Streptomycin 10 µg, Ampicillin 10 µg, Ceftriaxone 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Tetracycline 30 µg, Chloramphenicol 30 µg, 0,5 McFarland Standard, Thermal Cycler, Elektroforesis Chamber, UV Gel Doc.

Tahapan Penelitian

Identifikasi Morfologi

Isolat berasal dari koleksi Laboratorium Natural Product Universitas Diponegoro. Isolat kemudian dikultur pada media padat Hektoen dan MacConkey Agar. Karakterisasi morfologi koloni dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis pada media. Karakterisasi morfologi meliputi bentuk, margin, elevasi, ukuran, dan warna koloni bakteri (Margarida *et al.*, 2015).

Identifikasi Molekuler

Identifikasi molekuler terdiri dari ekstraksi DNA, amplifikasi, sekuensing dan konstruksi pohon filogenetik. Ekstraksi DNA bakteri menggunakan metode Chelex berdasarkan Ayuningrum *et al.* (2017). Amplifikasi DNA bakteri dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* dengan formulasi dan siklus berdasarkan Ayuningrum *et al.* (2019). Primer yang digunakan untuk amplifikasi adalah 27F(5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) dan 1492R(5'GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Hasil amplifikasi kemudian divisualisasi dengan elektroforesis (Sibero *et al.*, 2018). Produk PCR yang telah divisualisasi dan muncul pada DNA ladder 1500 bp kemudian dikirim untuk proses sekuensing atau penentuan urutan basa nukleotida. Sekuensing dilakukan di Laboratorium 1stBase, Selangor, Malaysia, menggunakan metode Sanger. Sekuens yang didapat kemudian dianalisis dengan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada website NCBI. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan sekuens isolat dan sekuens pembandingan dari database NCBI. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan *software* MEGA X menggunakan metode *maximum likelihood* dan *bootstrap* sebanyak 1000 kali.

Antimicrobial Susceptibility Test

Antibiotic Susceptibility Test (AST) dilakukan dengan metode *disc diffusion* berdasarkan CLSI (2021). Isolat bakteri berusia 24-48 jam diinokulasikan pada media *Nutrient Broth* dan kekeruhan disesuaikan dengan 0,5 McFarland Standard. Kemudian inokulum diratakan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan *cotton swab*. *Disc* antibiotik kemudian diletakkan pada permukaan media menggunakan pinset dengan jumlah 4 antibiotik dalam satu cawan petri. Petri kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk di sekitar *disc* menggunakan jangka sorong. Bakteri digolongkan sebagai *susceptible*, *intermediate*, dan *resistant* berdasarkan ukuran diameter zona hambat masing-masing antibiotik yang disesuaikan dengan standar CLSI 2021.

III. HASIL PENELITIAN

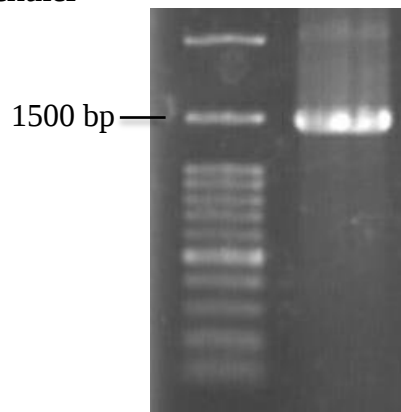
Hasil Identifikasi Morfologi

Tabel 1. Hasil Identifikasi Morfologi

Kode Isolat	Bentuk	Elevasi	Margin	Warna	
				Hektoen	MacConkey
ATL.215	Circular	Convex	Entire	Putih	Putih

Karakterisasi morfologi isolat dilakukan dengan mengamati bentuk, elevasi, margin, serta warna koloni pada media *Hektoen Enteric Agar*. Hasil karakterisasi morfologi isolat dapat dilihat pada Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni ATL.215 yaitu berbentuk circular atau bulat dengan elevasi convex atau cembung di bagian tengah dan margin entire atau tepian yang halus. Warna isolat pada kedua media adalah putih. Media yang digunakan yaitu Hektoen dan MacConkey merupakan media yang dikhususkan untuk bakteri gram negatif, oleh karena itu media ini kurang sesuai untuk isolat *Staphylococcus cohnii* yang merupakan bakteri gram positif.

Hasil Identifikasi Molekuler



Gambar 1. Visualisasi hasil elektroforesis

Hasil visualisasi menunjukkan *band* DNA memiliki panjang 1500 bp. Hal ini sesuai dengan penelitian Wang *et al.* (2018) dan Zhang *et al.* (2020) yang mengidentifikasi bakteri menggunakan primer 27F dan 1492R dan menghasilkan DNA dengan panjang 1500 bp. Primer 27F dan 1492R merupakan primer yang paling banyak digunakan dalam amplifikasi region 16s rRNA. Region ini merupakan region konservatif dan dimiliki oleh organisme prokariot sehingga bersifat ideal sebagai penanda genetik dalam identifikasi.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Sekuens 16s rRNA dengan BLAST

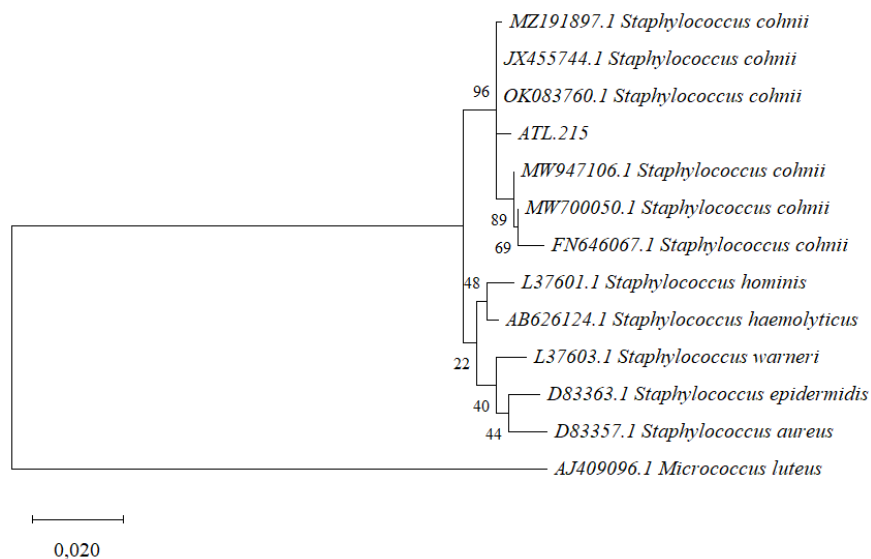
Kode Isolat	Closest Similarity	Query Cover	Percent Identity
ATL.215	<i>Staphylococcus cohnii</i> MH591774.1	100%	99,93%

Hasil identifikasi sekuens 16s rRNA dapat dilihat pada Tabel 2. *Closest similarity* menunjukkan spesies yang memiliki kemiripan sekuens 16s rRNA tertinggi dengan isolat. *Query cover* merupakan persentase panjang sekuens isolat yang selaras dengan sekuens pada database NCBI. *Percent identity* adalah persentase kemiripan sekuens isolat dengan sekuens pada database NCBI. *Staphylococcus cohnii* MH591774.1 merupakan spesies yang memiliki kemiripan tertinggi terhadap isolat ATL.215 dengan nilai *query cover* 100% dan *percent identity* 99,39%. Nilai *percent identity* yang lebih dari 97%

menunjukkan bahwa hasil sekuens dapat dikelompokkan sebagai spesies yang sama dengan sekuens pembandingan (Srinivasan *et al.*, 2015).

Hasil Konstruksi Pohon Filogenetik

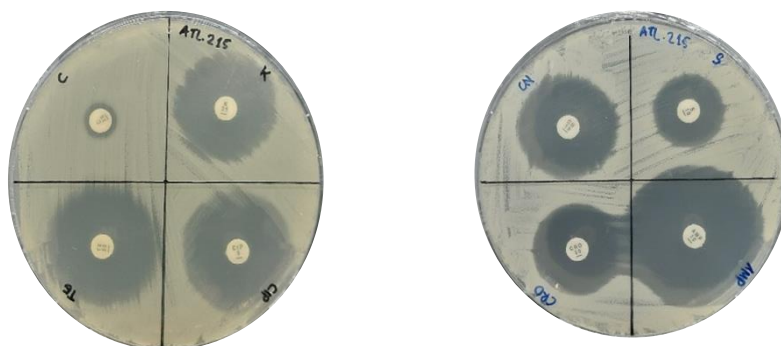
Konstruksi pohon filogenetik bertujuan untuk mengetahui kekerabatan antara isolat dengan spesies pembandingan berdasarkan hubungan evolusi. Hal ini sebagai konfirmasi akhir dalam identifikasi molekuler. Seperti pada gambar, isolat ATL.215 berada pada satu *clade* dengan enam sekuens pembandingan *Staphylococcus cohnii*, dan spesies yang berbeda berada pada *clade* lain. Hal ini mengonfirmasi kemiripan sekuens ATL.215 dengan *Staphylococcus cohnii*. Angka di bagian kiri percabangan *clade* merupakan persentase kecocokan sekuens isolat dengan sekuens pembandingan dalam metode *bootstrap*. Nilai 96 pada *clade* *Staphylococcus cohnii* menunjukkan persentase kecocokan yang tinggi.



Gambar 2. Pohon fiogenetik

Hasil Antimicrobial Susceptibility Test

Berikut ini dokumentasi hasil *Antimicrobial Susceptibility Test* (AST) *Staphylococcus cohnii* pada *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan 8 antibiotik:



Gambar 3. Hasil AST

Keterangan: C: chloramphenicol; K: kanamycin; CIP: ciprofloxacin; TE: tetracycline; CN: gentamicin; S: streptomycin; AMP: ampicillin; CRO: ceftriaxone\

Tabel 3. *Kelas, jenis dan konsentrasi antibiotik berdasarkan CLSI (2021)*

Kelas/ Golongan	Antibiotik	Konsentrasi (µg/disc)	Kategori Interpretatif dan Breakpoint Diameter
-----------------	------------	-----------------------	--

			Zona (mm)		
			S	I	R
Penicillins	Ampicillin	10	≥ 17	14-16	≤ 13
Aminoglycosides	Streptomycin	10	≥ 15	12-14	≤ 11
	Gentamicin	10	≥ 15	13-14	≤ 12
	Kanamycin	30	≥ 18	14-17	≤ 13
Tetracycline	Tetracycline	30	≥ 15	12-14	≤ 11
Cephalosporin	Ceftriaxone	30	≥ 23	20-22	≤ 19
Quinolon	Ciprofloxacin	5	≥ 26	22-25	≤ 21
Phenicol	Chloramphenicol	30	≥ 18	13-17	≤ 12

Keterangan: S: *susceptible*; I: *intermediate*; R: *resistant*

Tabel 4. **Hasil Antimicrobial Susceptibility Test**

Antibiotik	Diameter Zona Bening (mm)	Kategori Interpretatif
Ampicillin 10	38	S
Streptomycin 10	18,55	S
Gentamicin 10	27	S
Kanamycin 30	26	S
Tetracycline 30	30,55	S
Ceftriaxone 30	24,25	S
Ciprofloxacin 5	28,25	S
Chloramphenicol 30	8,55	R

Keterangan: S: *susceptible*; I: *intermediate*; R: *resistant*

IV. KESIMPULAN

Isolat *Staphylococcus cohnii* yang diisolasi dari Perairan Semarang hanya bersifat resisten terhadap satu antibiotik yaitu chloramphenicol dan bersifat *susceptible* terhadap antibiotik ampicillin, streptomycin, gentamicin, kanamycin, tetracycline, ceftriaxone dan ciprofloxacin.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayuningrum, D., R. Kristiana, M.A. Asagabaldan, A. Sabdono, O.K. Radjasa, H. Nuryadi dan A. Trianto. 2017. Isolation, Characterisation and Antagonistic Activity of Bacteria Symbionts Hardcoral Pavona sp. Isolated from Panjang Island, Jepara Against Infectious Multi-drug Resistant (MDR) Bacteria. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 55(1).
- Ayuningrum, D., Y. Liu, Riyanti, M.T. Sibero, R. Kristiana, M.A. Asagabaldan, Z.G. Wuisan, A. Trianto, O.K. Radjasa, A. Sabdono dan T.F. Schäberle. 2019. Tunicate-associated bacteria show a great potential for the discovery of antimicrobial compounds. PLoS ONE, 14(3): 1–14.
- Basso, A.P., P.D. Martins, G. Nachtigall, S. van der Sand, T.M. de Moura dan A.P.G. Frazzon. 2014. Antibiotic resistance and enterotoxin genes in staphylococcus sp. Isolates from polluted water in southern Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 86(4): 1813–1820.
- Bora, P., P. Datta, V. Gupta, L. Singhal dan J. Chander. 2018. Characterization and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples. Journal of Laboratory Physicians, 10(04): 414–419.
- CLSI. 2021. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31 ed.

Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Hanna, N., M. Purohit, V. Diwan, S.P. Chandran, E. Riggi, V. Parashar, A.J. Tamhankar dan C.S. Lundborg. 2020. Monitoring of water quality, antibiotic residues, and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the Kshipra river in India over a 3-year period. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(21): 1–22.
- Harahap, M.K.A., S. Rudiyanti dan N. Widyorini. 2020. Analisis Kualitas Perairan Berdasarkan Konsentrasi Logam Berat dan Indeks Pencemaran di Sungai. Pasir Laut, 4(2): 108–115. DOI :
- Kurnianti, L.Y. 2020. Analisis Beban Dan Status Pencemaran Bod Dan Cod Di Kali Asin, Semarang. *JFMR-Journal of Fisheries and Marine Research*, 4(3): 379–388.
- Margarida, A., M. Olívia dan A. Lourenço. 2015. MorphoCol: An ontology-based knowledgebase for the characterisation of clinically significant bacterial colony morphologies. *JOURNAL OF BIOMEDICAL INFORMATICS*, 55: 55–63.
- Mendoza-Olazarán, S., J.F. Garcia-Mazcorro, R. Morfín-Otero, L. Villarreal-Treviño, A. Camacho-Ortiz, E. Rodríguez-Noriega, P. Bocanegra-Ibarias, H.J. Maldonado-Garza, S.E. Dowd dan E. Garza-González. 2017. Draft genome sequences of two opportunistic pathogenic strains of *Staphylococcus cohnii* isolated from human patients. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1): 49. DOI:10.1186/s40793-017-0263-1.
- Pratiwi, A.D., N. Widyorini dan A. Rahman. 2019. Analisis Kualitas Perairan Berdasarkan Total Bakteri Coliform Di Sungai Plumbon, Semarang. *Journal of Maquares*, 8(3): 211–220.
- Roberts, M.C. dan S. Schwarz. 2017. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. *Antimicrobial Drug Resistance*, 231–243.
- Sibero, M.T., O.K. Radjasa, A. Sabdono, A. Trianto, D.W. Triningsih dan I.D. Hutagaol. 2018. Antibacterial activity of Indonesian sponge associated fungi against clinical pathogenic multidrug resistant bacteria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(2): 088–094.
- Srinivasan, R., U. Karaoz, M. Volegova, J. MacKichan, M. Kato-Maeda, S. Miller, R. Nadarajan, E.L. Brodie dan S. V. Lynch. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE*, 10(2): 1–22.
- Wang, X., M. Zhang, J. Gao, T. Pu, M. Bilal, Y. Wang dan X. Zhang. 2018. Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. *Biological Control*, 127(June): 78–84.
- Xu, Z., H. V. Mkrtchyan dan R.R. Cutler. 2015. Antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP): 1–6.
- Zhang, W., Y. Chen, Q. Shi, B. Hou dan Q. Yang. 2020. Identification of bacteria associated with periapical abscesses of primary teeth by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *Microbial Pathogenesis*, 141: 103954.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
20 Mei 2022	21 Mei 2022	22 Mei 2022	Ya