

Profil Sensitivitas Antibiotik dan Identifikasi Patogen Oportunistik *Pantoea agglomerans* Dari Perairan Pekalongan, Jawa Tengah

Yolanda Christia S(1,2), Subagiyo(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

yolandachristias@students.undip.ac.id (1), Subagiyo@lecturer.undip.ac.id (2),
madatriandalasibero@lecturer.undip.ac.id (Ca*)

ABSTRAK

Peningkatan jumlah konsumsi antibiotik serta pencemarannya yang bersumber dari pemukiman penduduk, kegiatan sektor industri perikanan, peternakan, hingga kesehatan memicu terjadinya peningkatan resistensi bakteri patogen oportunistik di lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil sensitivitas antibiotik dan identifikasi isolat bakteri koleksi Laboratorium *Natural Product* Universitas Diponegoro yang sebelumnya diisolasi dari Perairan Slamaran, Pekalongan. Isolat dikarakterisasi dengan pewarnaan gram dan uji biokimia, serta diidentifikasi secara molekuler. Selanjutnya sensitivitas antibiotik isolat diuji dengan metode standar CLSI 2017. Dua isolat yang berkode G dan J teridentifikasi sebagai bakteri gram negatif, memiliki kemampuan untuk memfermentasi glukosa, bersifat motil, dan memiliki kemampuan untuk mengubah urease menjadi amoniak. Kedua isolat diidentifikasi sebagai *Pantoea agglomerans* berdasarkan identifikasi molekuler sekuens 16s rRNA dengan *percent identity* 99,79% untuk isolat G, dan 98,18% untuk isolat J serta *query cover* sebesar 100% untuk isolat G dan 98% untuk isolat J. Hasil AST isolat menunjukkan bahwa kedua isolat termasuk dalam kriteria *susceptible* terhadap delapan antibiotik yang digunakan..

Kata Kunci : Antibiotik, *Pantoea agglomerans*, Pekalongan, Resisten

ABSTRACT

The increase in the consumption of antibiotics and their pollution originating from residential areas, the activities of the fishing industry, livestock, and health have led to an increase in the resistance of opportunistic pathogenic bacteria in the environment. This study aims to determine the antibiotic sensitivity profile and identify bacterial isolates from the Natural Product Laboratory of Diponegoro University collection which were previously isolated from Slamaran Waters, Pekalongan. The isolates were characterized by gram staining and biochemical tests, and identified molecularly. Furthermore, the antibiotic sensitivity of the isolates was tested using the 2017 CLSI standard method. Two isolates coded G and J were identified as gram-negative bacteria, had the ability to ferment glucose, were motile, and had the ability to convert urease into ammonia. Both isolates were identified as *Pantoea agglomerans* based on molecular identification of 16s rRNA sequences with a percent identity of 99.79% for isolate G, and 98.18% for isolate J and a query cover of 100% for isolate G and 98% for isolate J. AST results for isolates showed that both isolates were included in the susceptible criteria for the eight antibiotics used.

Keywords : Antibiotics, *Pantoea agglomerans*, Pekalongan, Resistant

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Antibiotik merupakan obat yang digunakan untuk mengobati penyakit yang diakibatkan oleh infeksi bakteri (Lucien *et al.*, 2021). Namun, konsumsi antibiotik berlebih dan tidak bertanggungjawab dapat menimbulkan ternyata resistensi terhadap berbagai golongan antibiotik pada bakteri (Usman *et al.*, 2020). Peningkatan resistensi antibiotik pada bakteri patogen menyebabkan masalah kesehatan yang lebih serius seperti menurunnya efektivitas dan pilihan obat yang dapat digunakan, penurunan angka kesembuhan dan perpanjangan waktu kesembuhan, hingga meningkatkan angka kematian (Mathers *et al.*, 2015). Laporan WHO mengenai peningkatan jumlah sensitivitas bakteri berada pada tingkat yang mengkhawatirkan. Sejumlah negara melaporkan tingkat resistensi bakteri terhadap antibiotik yang biasa digunakan untuk mengobati infeksi umum yang cukup tinggi. Resistensi bakteri yang dilaporkan umumnya dari kelas Enterobacterales dengan genus *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Pantoea* (Fasugba *et al.*, 2015). Resistensi antibiotik berhubungan erat dengan banyaknya akumulasi dari limbah antibiotik. Limbah antibiotik yang tersebar di lingkungan khususnya perairan berbentuk senyawa yang terbawa oleh air yang berasal dari limbah domestik dan limbah klinis yang berasal dari fasilitas kesehatan (Falgenhauer *et al.*, 2019). Senyawa limbah antibiotik yang tidak terdegradasi selanjutnya dilepaskan ke perairan dan terakumulasi di muara atau hilir. Limbah antibiotik yang terus meningkat dan terakumulasi di hilir dapat menimbulkan beberapa dampak salah satunya peningkatan resistensi bakteri perairan terhadap antibiotik (Ben *et al.*, 2019). Perairan Slamaran, Pekalongan merupakan salah satu muara atau hilir di kota Pekalongan yang berbatasan langsung laut utara Jawa. Perairan Slamaran juga berperan dalam mengalirkan limbah kota Pekalongan yang dialirkan dari sungai hingga muara di perairan Slamaran (Mratihayani dan Susilowati, 2013). Adanya akumulasi limbah di perairan Slamaran, Pekalongan mengakibatkan munculnya probabilitas terjadinya dampak tingginya tingkat sensitivitas antibiotik bakteri di perairan Slamaran (Raharjo *et al.*, 2016).

2. Perumusan Masalah

Perumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana hasil uji profil sensitivitas antibiotik dan identifikasi patogen oportunistik *Pantoea agglomerans* dari perairan Pekalongan Jawa Tengah?.

3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengidentifikasi isolat bakteri G dan J yang diisolasi dari perairan Slamaran, Pekalongan
2. Mengetahui profil resistensi antibiotik isolat bakteri G dan J yang diisolasi dari perairan Slamaran, Pekalongan

4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat bermanfaat memberikan informasi dalam bidang mikrobiologi mengenai karakteristik dan profil resistensi antibiotik dua isolat bakteri dari perairan Slamaran, Pekalongan.

II. METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei hingga Desember 2021 secara *ex situ* di Laboratorium Teknik Lingkungan Universitas Diponegoro dan Laboratorium Terpadu

Universitas Diponegoro. Isolat menggunakan koleksi dari isolasi bakteri air dan sedimen Perairan Slamaran, Pekalongan.

1. Pewarnaan gram

Isolat usia 1 x 24 jam diinokulasikan pada kaca preparat lalu difiksasi dengan api bunsen. Isolat pada kaca preparat ditetesi merata dengan *Crystal violet* dan didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir.

2. Uji Biokimia

2.1. Uji TSIA

Uji glukosa, sukrosa, dan laktosa dilakukan dengan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) miring dalam tabung reaksi. Isolat kemudian diinokulasikan dengan jarum ose. Jarum ose yang diinokulasikan ke dalam media kemudian dilakukan *streak* pada bagian miring media.

2.2 Uji SIM

Uji motilitas, *indole*, dan H₂S dilakukan dengan menginokulasikan isolat kedalam tabung reaksi yang berisikan media *Sulfide Indole Motility* (media SIM) dengan menggunakan jarum ose.

2.3 Uji Sitrat

Isolat diinokulasikan kedalam tabung reaksi yang berisikan media miring *Simmon Citrate Agar* (media SCA).

2.4 Uji Urease

Uji urease dilakukan dengan menginokulasikan isolat ke dalam media *urea base agar*.

3. Identifikasi Molekuler

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode *Chelex* dengan modifikasi prosedur. Koloni isolat yang berusia 1 x 24 jam dimasukkan ke dalam 50-100µl ddH₂O dan 1 ml saponin 0,5% dalam *Phosphate Buffer Saline Solution* (PBS) lalu didiamkan selama satu malam di suhu 4°C.

4. Antibiotic Susceptibility Test (AST)

Antibiotic Susceptibility Test dilakukan dengan metode *disc diffusion*. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media *Natrium Broth* dan dengan menggunakan standar McFarland untuk menentukan kekeruhan inokulum 0,5.

III. HASIL PENELITIAN

1. Sumber dan Morfologi

Hasil pengamatan karakterisasi morfologi isolat G dan J yang tumbuh pada media dalam waktu 1 x 24 jam. Isolat yang tumbuh kemudian diamati untuk mengidentifikasi bentuk, elevasi, dan margin dari tiap koloni yang tumbuh pada media.

Tabel 1. Sumber dan morfologi isolat

No.	Kode	Sumber	Bentuk	Elevasi	Margin
1.	G	Air	<i>circular</i>	<i>convex</i>	<i>entire</i>
2.	J	Sedimen	<i>circular</i>	<i>convex</i>	<i>entire</i>

2. Pewarnaan dan Uji Biokimia

Hasil uji biokimia yang diperoleh berdasarkan uji gram bakteri, motilitas, indole, sitrate, H₂S, dan fermentasi gula. Masing masing isolat menunjukkan hasil uji biokimia yang serupa, sehingga isolat-isolat tersebut diduga memiliki spesies yang sama.

Tabel 2. Hasil pewarnaan gram dan uji biokimia (TSIA, SIM, Sitrat, dan Urease)

Isolat	Gram	TSIA			Motility	Indole	H ₂ S	Sitrat	Urease
		Glukosa	Laktosa	Sukrosa					

G	Negatif	+	-	-	+	-	-	+	+
J	Negatif	+	-	-	+	-	-	+	+

3. Identifikasi molekuler

Gen 16S rRNA dari isolat G dan J diamplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil dari PCR yang telah disequens yang kemudian ditentukan spesies yang berdekatan dengan menggunakan BLAST.

Tabel 3. Hasil Identifikasi molekuler

Isolat	Closest Simalirity	Similarity	Query cover	Accession
G	<i>Pantoea agglomerans</i>	99.79%	100%	NR111998.1
J	<i>Pantoea agglomerans</i>	98.18%	98%	NR111998.1

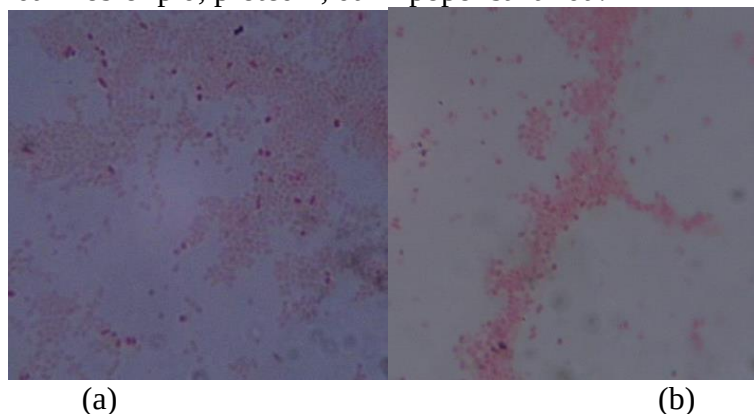
4.AST

Isolat yang telah diidentifikasi molekuler kemudian dilakukan *Antibiotic Susceptibility Test* untuk melihat tingkat resistensi isolat terhadap antibiotik. Hasil diameter zona hambat didapat setelah dilakukannya inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C.

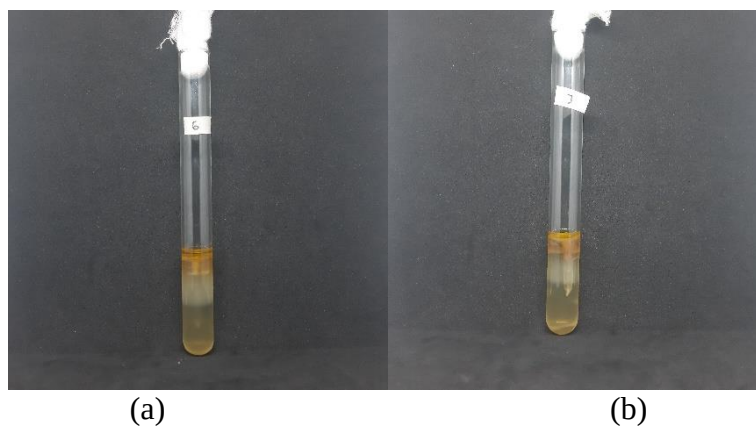
Tabel 4. Hasil pengukuran *breakpoint diameter zona*

Antibiotik	CLSI, 2017			Isolat G	Isolat J
	S	I	R		
Streptomycin	≥15	13-14	≤12	13,35	12,15
Ampicillin	≥15	12-14	≤11	13, 7	16,15
Ceftriaxone	≥23	20-22	≤19	23,35	22,85
Gentamicin	≥15	13-14	≤12	13,1	14,65
Kanamycin	≥18	14-17	≤13	16,15	16
Ciprofloxacin	≥21	16-20	≤15	20,75	15,8
Tetracycline	≥15	12-14	≤11	19,8	21,85
Chloramphenicol	≥18	13-17	≤12	19,6	25,1

Hasil pewarnaan gram pada isolat G dan J menunjukkan hasil bahwa isolat menunjukkan sel berwarna merah. Hal ini mengkategorikan bahwasanya isolat G dan J merupakan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki struktur sel yang kompleks dan membrannya terdiri dari fosfolipid, protedin, dan lipopolisakarida.

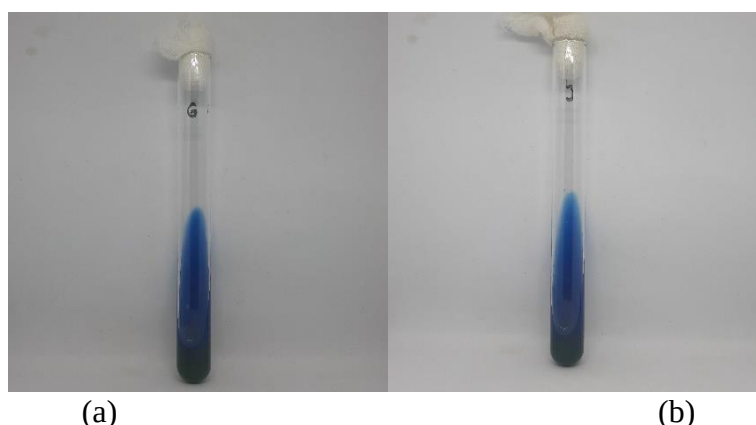


Gambar 1. (a) Gambar isolat G, (b) Gambar isolat J



Gambar 2. (a) Hasil uji SIM isolat G, (b) Hasil uji SIM isolat J

Uji sitrat menunjukkan bahwa kedua isolat dalam uji sitrat mengalami perubahan warna. Hal ini menandakan bahwa seluruh isolat dikatakan positif. Uji sitrat dilakukan untuk mengetahui bakteri yang memiliki kemampuan untuk menggunakan sitrat sebagai sumber energi, khususnya pada bakteri kelompok Enterobacteriaceae. Hal ini memberikan indikasi pada media yaitu *bromothymol blue* yang akan mengubah warna awal yaitu hijau menjadi warna biru (Aytso dan Onyango, 2016).



Gambar 3. (a) hasil uji sitrat isolat G, (b) hasil uji sitrat isolat G

IV. KESIMPULAN

Kedua isolat memiliki karakteristik biokimia berikut ini: positif pada uji motilitas, sitrat, urease dan fermentasi glukosa. Identifikasi molekuler menkonfirmasi bahwa kedua isolat G dan J adalah *P. agglomerans*. Bakteri ini diketahui tidak resisten terhadap kelas antibiotik yang digunakan namun beberapa diantaranya tercatat sebagai *intermediate* sehingga berpotensi resisten di masa mendatang.

DAFTAR PUSTAKA

- Aytso, A. S., dan Onyango, D. M. 2016. Isolation and Identification by Morphological and Biochemical Methods of Antibiotic Producing Microorganisms from the gut of *Macrotermes michaelseni* in Maseno , Kenya. 4(01), 27–33. <https://doi.org/10.7324/JABB.2016.40105>
- Ben, Y., C. Fu, M. Hu, L. Liu, M. H. Wong, dan C. Zheng. 2019. Human Health Risk Assesment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment. *Environment Research.*, 169: 483 – 493.

- Chakraborty, S. P., S. K. Mahapatra, dan S. Roy. 2011. Biochemical characters and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*. 1(3): 212-216. CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI Supplement M100. 3(1).
- Falgenhauer, L., C. Imirzalioglu, K. Oppong, C. W. Akenten, B. Hogan, R. Krumkamp, S. Poppert, O. Dabo, J. May, dan D. Eibach. 2019. Detection and Characterization of ESBL Producing *Escherichia coli* from Humans and Poultry in Ghana. *Frontiers Microbiology*, 15
- Fasugba, O., A. Gardner, B. G. Mitchell, dan G. Mnatzaganian. 2015. Ciproflaxin Resistance in Community and Hospital Acquired *Escherichia coli* Urinary Infections: a Systematic Review and Meta Analysis of Observational Studies. *BMC Infectious Disease*., 15: 1-16.
- Lucien, M.A.B., Canarie, M.F., Kilgore, P.E., Jean-Denis, G., Fénélon, N., Pierre, M., Cerpa, M., Joseph, G.A., Maki, G., Zervos, M.J. dan Dely, P., 2021. Antibiotics and Antimicrobial Resistance in the COVID-19 Era. *International Journal of Infectious Diseases*.
- Malanovic, N., dan K. Lohner. 2016. Gram-Positive Bacterial Cell Envelopes: The Impact on the Activity of Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*., 1858(5): 936-946.
- Mathers, A. J., G. Peirano, dan J. D. D. Pitout. 2015. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International HighRisk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Review*, 28 (3): 566- 594.
- Mratihayani, A. S., dan I. Susilowati. 2013. Menuju Pengelolaan Sungai Bersih di Kawasan Industri Batik yang Padat Limbah Cair. (Studi Empiris: Watershed Sungai Pekalongan di Kota Pekalongan). *Diponegoro Journal of Economics*., 2(2): 1-12.
- Qamsari, E. M., R. K. Kermanshahi, dan Z.M. Nejad. 2011. Isolation and Identification of a Novel, Lipase-Producing Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iran Journal of Microbiology*., 3(2): 92–98.
- Raharjo, M., Muslim, dan L. Maslukah. 2016. Sebaran Konsentrasi Nitrat, Fosfat, dan Klorofila di Perairan Pantai Slamaran Pekalongan. *Journal of Oceanography*, 5 (4): 462-469.
- Schaffer, J. N., dan M. M. Pearson. 2015. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiology Spectrum Journal*., 3(5): 1-66.
- 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.
- Talaiekhazani, A., N. Jafarzadeh, M.A. Fulazzaky, M. R.Talaie, dan M. Boheshti. 2015. Kinetics of Substrate Utilization and Bacterial Growth of Crude Oil Degraded by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*., 13(64):1-8.
- Usman, M., M. Farooq, dan K. Hanna., 2020. Environmental Side Effects of The Injudicious Use of Antimicrobials in The Era of COVID-19. *Science of The Total Environment*. 745:1-3.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
10 Juni 2022	11 Juni 2022	12 Juni 2022	Ya