

## Studi Mekanisme Mutasi Gen Penyebab Resistensi Obat Antibiotik Menggunakan Bakteri *Listeria monocytogenes*

---

### ABSTRAK

Telah dilakukan uji resistensi dari 10 kultur *Listeria monocytogenes* yang telah diisolasi dari daging ayam terhadap 8 antibiotik dan profil plasmidnya. Uji resistensi antibiotik dilakukan dengan metoda difusi (Hinton & Linton, 1983), sedangkan isolasi plasmid dan analisa profilnya dengan metoda Macrina dkk (1978). Uji resistensi antibiotik menunjukkan bahwa seluruh kultur resisten terhadap dua atau lebih antibiotik, namun tidak satupun kultur yang resisten terhadap antibiotik gentamisin dan kloramfenikol. Lima kultur ditemukan mempunyai plasmid dengan bobot 2,7 kilobases (kb) hingga 54 kb dan terdiri dari 4 profil plasmid, yaitu : 1 kultur dengan plasmid 2,7 kb dan 3 kb, 2 kultur dengan plasmid 54 kb, 1 kultur dengan plasmid 3 kb dan 54 kb serta 1 kultur dengan plasmid 3 kb.

### I. PENDAHULUAN

*Listeria monocytogenes* termasuk suatu kelompok mikroorganisme yang bertanggung jawab terhadap jenis penyakit penting dalam bidang kedokteran dan peternakan. Infeksi yang disebabkan oleh *L. monocytogenes* dapat menyerang hewan dan manusia sehingga menimbulkan listeriosis yang mempunyai gejala meningitis, septicemia, aborsi sebelum tri-semester pertama dan kematian bayi setelah kelahiran.

Pemberian terapi antibiotik terhadap penyakit yang disebabkan oleh *Listeria monocytogenes* bertujuan untuk melawan serangannya. Konsep dasar dari antibakteri adalah kemampuan untuk mengganggu metabolisme sel, menghambat sintesa dinding sel, mengganggu permeabilitas membran sel, menghambat sintesa protein sel, dan menghambat sintesa atau merusak asam nukleat sel bakteri.

*Listeria monocytogenes* diduga rentan terhadap antibiotik-antibiotik yang aktif terhadap bakteri gram positif. Dugaan ini perlu ditinjau kembali, setelah ada informasi mengenai resiko infeksi yang disebabkan oleh makanan yang menjadi tempat biakan *Listeria monocytogenes* yang multiresisten.

Silvana Barbuti melaporkan adanya hubungan antara resistensi antibiotik dengan profil plasmid dari kultur *Listeria monocytogenes* yang diisolasi dari daging dan produk olahannya. Resistensi antibiotik seringkali disebabkan dan ditentukan oleh informasi genetik yang ada pada plasmid.

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian resistensi antibiotik dan profil plasmid dari *Listeria monocytogenes* yang diisolasi dari daging ayam. Uji resistensi antibiotik dilakukan dengan metode Hinton dan Linton, sedangkan isolasi plasmid dilakukan dengan metode Meyers yang dimodifikasi dan analisa profil plasmid dengan metode Macrina.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

Bakteri seringkali dipakai dalam percobaan genetik karena ukurannya yang sangat kecil, sehingga tidak memerlukan tempat yang luas waktu mengerjakannya. Selain itu perkembangannya sangat cepat memungulkan untuk bekerja dalam waktu yang relatif singkat.

Proses pemindahan gen dari suatu bakteri ke bakteri lain terjadi melalui tiga cara, yaitu secara transformasi, konyugasi dan transduksi. Cara transformasi adalah pemindahan DNA telanjang yang langsung masuk ke dalam sel resipien yang kompeten; cara konyugasi adalah pemindahan gen dengan bantuan bakteriofag serta cara transduksi adalah proses pemindahan gen melalui kontak antara satu sel bakteri dengan sel bakteri yang lain.

Selain mempunyai DNA kromosom, bakteri juga mempunyai DNA ekstrakromosomal yang dikenal dengan plasmid. Plasmid dapat bereplikasi sendiri dan tidak berintegrasi ke dalam kromosom. Plasmid diduga bertanggung jawab pada resistensi antibiotik. Plasmid yang tidak mempunyai kemampuan untuk berkonyugasi tidak memiliki kemampuan untuk memindahkan gen. Jika dilakukan pengamatan terhadap profil suatu plasmid, akan diketahui apakah proses pemindahan gen terjadi dari sel donor ke sel resipien.

Pada proses pemindahan gen ada suatu kompleks gen yang bertanggung jawab yang dikenal dengan RTF (resistance transfer factor). RTF kadangkala terletak secara terpisah pada plasmid yang lain, dan ini berarti bahwa pemindahan gen dapat berlangsung pada plasmid non konyugatif, bila dibantu oleh plasmid lainnya yang memiliki faktor pemindah ini. Klasifikasi dari faktor R terutama didasarkan pada kompatibilitas, homologi DNA dan pola kerja endonuklease. Ciri-ciri lain yang digunakan dalam pemilahan ini ialah pemindahan termosensitivita, restriksi fag, tingkatan resistensi dan macam pilus.

Pemberian dosis rendah antibiotik seperti tetrasiklin dan penisilin pada unggas untuk memacu pertumbuhannya mengakibatkan terjadinya peningkatan resistensi terhadap antibiotika. Jika manusia mengkonsumsi hewan atau unggas ini, terutama ayam, maka peningkatan resistensi ini juga akan berpengaruh terhadap manusia, sehingga akan menyulitkan pada saat terapi dengan antibiotika, karena dosis lazimnya tidak berefek lagi.

## III. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Alat dan Bahan

Alat-alat : cawan petri, jarum ose, botol bijou, pinset, kapas lidi steril, jangka sorong, pipet mikro, eppendorf, vortexer, autoklaf, inkubator, inkubator shaker, sentrifugator, perangkat elektroforesa, alat pengamat plasmid dengan sinar UV.

Bahan : kultur *Listeria monocytogenes* yang telah diisolasi dari daging ayam, medium Palcam Agar (Merck), medium Mueller Hinton Agar (Oxoid), medium Luria Burtani (LB) Broth, aquadest steril, disk antibiotik (Oxoid), glukosa-EDTA-tris HCl (GET) buffer, lisozim, sodium dodesil sulfat (SDS) 4 %, natrium hidroksida (NaOH) 0,4 N, kalium asetat 3 M, isopropanol, etanol, agarose gel, tris base-asam borat-EDTA (TBE) buffer, ethidium bromida.



### 3.2. Penyiapan media percobaan

1. Pembuatan Media Luria Burtani (LB) Broth  
Dibuat dengan melarutkan 5 g yeast ekstrak (Oxoid), 10 g NaCl (Merek), 10 g tripton (Oxoid) dalam 1 liter aquadest. Kemudian dipanaskan sampai homogen dan disterilkan.
2. Pembuatan Media Palcam Agar (Merek)  
Dibuat dengan melarutkan 34,4 g Palcam ( pepton 23 g ; starch 1 g ; NaCl 5 g ; agar-agar 13 g ; D(-) manitol 10 g ; besi (III) ammonium sitrat 0,5 g ; lithium klorida 15 g ; merah fenol 0,08 g ) dalam 500 ml aquadest. Kemudian dipanaskan sampai homogen. Setelah disterilkan, dituangkan ke dalam cawan petri 15 ml.
3. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (Oxoid)  
Dibuat dengan melarutkan 19 g Mueller Hinton ( beef, dehydrated infusion from 300 g ; casein hydrolysate 17,5 g ; starch 1,5 g ; agar 17,0 g ) dalam 500 ml aquadest. Kemudian dipanaskan sampai homogen. Setelah disterilkan, dituangkan ke dalam cawan petri 15 ml.

### 3.3. Penyiapan disk antibiotik

Disk antibiotik yang digunakan didapatkan dari Oxoid UK, dengan konsentrasi yang telah ditetapkan sebagai berikut :

No	Antibiotik	Golongan	konsentrasi
1	Penisilin G	B-laktam	10 U
2	Spektinomisin	Spektinomisin	10 µg
3	Gentamisin	Aminoglikosida	10 µg
4	Sefuroksim	Sefalosporin	30 µg
5	Tetrasiklin	Tetrasiklin	30 µg
6	Kloramfenikol	Kloramfenikol	30 µg
7	Sulfametizol	Sulfonamida	0,25 mg
8	Novobiosin	Novobiosin	5 µg

### 3.4. Pembiakan bakteri *Listeria monocytogenes* murni

Biakan atau kultur murni *Listeria monocytogenes* yang digunakan adalah hasil isolasi dari daging ayam yang dipelihara dalam eppendorf yang mengandung 25 % gliserol dalam Listeria Enrichment Broth (LEB) dan disimpan pada suhu - 20°C. Biakan murni ini dipipet 100 µl dan ditanam pada LB broth dalam botol bijou yang telah disterilkan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator shaker selama 24-48 jam.

### 3.5. Uji Resistensi Antibiotik

Uji resistensi antibiotik ini dilakukan terhadap 10 kultur *Listeria monocytogenes* yang telah diisolasi dari daging ayam. Diambil biakan yang telah diremajakan dalam botol bijou dengan kapas lidi steril dan ditanam pada media Mueller Hinton Agar dan Palcam Agar dengan cara mengoleskan secara merata pada permukaan media. Disk antibiotik ditaruh hati-hati diatas biakan bakteri tersebut dan ditekan perlahan dengan pinset steril agar benar-benar kontak dengan bakteri. Jarak disk dengan tepi cawan petri 15 mm dan jarak antar disk 24 mm. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Karakterisasi dengan mengukur dan



membandingkan diameter daerah hambatannya terhadap tabel standar. Sensitif (S) dan Resisten (R) terhadap antibiotik disimpulkan berdasarkan diameter daerah bening hambatan di sekitar disk antibiotik tersebut.

### 3.6. Isolasi Plasmid dari Kultur *Listeria monocytogenes*

Diambil 1,5 ml biakan bakteri yang ada dalam botol bijou dan dimasukkan dalam eppendorf, kemudian sel-sel dijadikan pellet dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 1 menit. Pellet-pellet sel yang dihasilkan disuspensikan kembali dalam 200 µl GET buffer dan ditambahkan 30 mg/ml lisozim. Kemudian divortex dan diinkubasi dalam inkubator shaker selama 2 jam pada suhu 37°C. Ke dalam suspensi ini ditambahkan 200 µl SDS 4% dan 200 µl NaOH 0,4 N, dikocok, diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar dan 5 menit pada suhu -20°C. Kemudian ditambahkan 300 µl kalium asetat 3 M dingin, dikocok, diinkubasi 5 menit pada suhu kamar dan 5 menit pada suhu -20°C. Selanjutnya disentrifus pada 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke dalam eppendorf baru yang steril dan ditambahkan 650 µl isopropanol dingin kemudian disentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit. Plasmid yang dihasilkan kemudian dicuci dengan 500 µl etanol dingin, disentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit kemudian etanolnya dibuang dan dibiarkan kering. Selanjutnya pellet plasmid disuspensikan kembali dalam 50 µl aquadest steril. Agarose gel 0,8 % dibuat dengan cara melarutkan 0,8 g agarose base dalam 100 ml TBE buffer yang berkekuatan 1 x, dipanaskan dalam oven hingga mendidih kemudian dituang dalam wadah yang dilengkapi dengan *comb* dan dibiarkan dingin. Selanjutnya *comb* diangkat hingga terbentuk lobang-lobang pada agarose gel. Suspensi plasmid dalam aquadest yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam agarose gel kemudian dielektroforesis terhadap agarose gel pada 300 Volt selama 15 menit dan dilanjutkan pada 150 Volt selama 60 menit. Setelah dielektroforesis, agarose gel direndam selama 5-10 menit dalam larutan ethidium bromid 100 µl dalam 500 ml aquadest. Selanjutnya diamati dengan UV. Bobot molekul plasmid ditentukan dengan perkiraan melalui perbandingan terhadap ukuran bobot molekul dari *Escherichia coli* V 517 yang telah diketahui.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil

Uji resistensi antibiotik yang dilakukan terhadap 10 kultur *Listeria monocytogenes* dengan 8 antibiotik dan isolasi plasmidnya memberikan data persentase (%) resistensi untuk tiap-tiap antibiotik, yaitu : penisilin G 100 %, spektinomisin 70 %, gentamisin 0 %, sefuroksim 90 %, tetrasiklin 60 %, kloramfenikol 0 %, sulfametizol 100% dan novobiosin 80 %. Indeks multipel resisten (ARI) yang diperoleh adalah 0,62.

Kultur *Listeria monocytogenes* yang ditemukan memiliki plasmid adalah 50 %. Hasil isolasi plasmid dan analisa profilnya memperlihatkan bahwa ditemukan 4 profil plasmid yang dapat dihubungkan dengan pola resistensinya, yaitu : 1 kultur dengan plasmid 2,7 kilobase (kb) dan 3 kb yang resisten terhadap penisilin G, sefuroksim, novobiosin dan sulfametizol; 2 kultur dengan plasmid 54 kb yang resisten terhadap penisilin G, sefuroksim dan sulfametizol ; 1 kultur dengan plasmid 3 kb dan 54 kb yang resisten terhadap penisilin G, spektinomisin, sefuroksim dan



sulfametizol ; 1 kultur dengan plasmid 3 kb yang resisten terhadap penisilin G, spektinomisin, sefuroksim, tetrasiklin, sulfametizol dan novobiosin.

#### 4.2. Pembahasan

Pada pelaksanaan uji resistensi antibiotik, digunakan 8 jenis antibiotik. Uji resistensi antibiotik ini dilakukan dengan menggunakan medium Palcam Agar dan Mueller Hinton Agar. Mueller Hinton Agar memberikan hasil yang lebih baik. Hal ini dikarenakan medium Palcam Agar berwarna merah sehingga daerah bening diameter hambatan tidak dapat terlihat jelas, sedangkan medium Mueller Hinton Agar yang bening memberikan daerah bening diameter hambatan yang jelas sehingga dapat diamati dan diukur dengan lebih baik.

Hasil uji resistensi antibiotik menunjukkan bahwa seluruh kultur resisten terhadap penisilin G dan tidak satupun kultur yang resisten terhadap gentamisin dan kloramfenikol. Setiap kultur yang diuji memperlihatkan resistensinya terhadap dua atau lebih antibiotik.

Plasmid merupakan suatu elemen genetik ( DNA-plasmid ) yang terpisah dari DNA-kromosom. Plasmid mengandung faktor resisten ( faktor R ) yang terdiri dari segmen RTF ( Resistensi Transfer Factor ) dan determinan-r ( unit-r ). Segmen RTF memungkinkan terjadinya perpindahan faktor R dan menularkan sifat resistensinya pada sel lain jika plasmid mempunyai bobot molekul yang cukup besar. Sedangkan masing-masing unit-r membawa sifat resistensi terhadap satu antibiotik. Dengan demikian berbagai unit-r pada satu plasmid membawa sifat resistensi terhadap berbagai antibiotik sekaligus. Oleh karena itu, satu kultur memungkinkan untuk resisten terhadap lebih dari satu antibiotik dan kultur yang lain juga memungkinkan untuk hal yang sama dengan antibiotik yang berbeda, seperti yang terlihat dari hasil penelitian ini.

Terjadinya resistensi dari seluruh kultur terhadap penisilin G mengandung arti bahwa resistensi tersebut disebabkan bukan hanya oleh plasmid. Resistensi terhadap penisilin G dari kultur *Listeria monocytogenes* yang bersifat sebagai bakteri gram positif terjadi karena bakteri mensekresikan enzim  $\beta$ -laktamase. Enzim ini menginaktivasi penisilin G dengan membuka cincin  $\beta$ -laktam sehingga kerja antibakterinya akan hilang.

Lebih dari lima puluh persen kultur *Listeria monocytogenes* menunjukkan resistensinya terhadap spektinomisin, novobiosin, sefuroksim, tetrasiklin dan sulfametizol. Hal ini berarti bahwa antibiotik-antibiotik tersebut tidak tepat diberikan sebagai obat pilihan untuk mengatasi kasus listeriosis.

Faktor R plasmid yang membawa sifat resistensi terhadap spektinomisin bekerja melalui dua mekanisme, yaitu : pembentukan enzim dan perubahan permeabilitas sel. Plasmid menyebabkan produksi enzim yang akan menginaktivasi spektinomisin dengan asetilasi gugus amino atau fosforilasi gugus hidroksil (11). Struktur sefuroksim yang hampir sama dengan penisilin G sangat memungkinkan untuk terjadinya resistensi silang, artinya kultur yang resisten terhadap penisilin G mungkin juga akan resisten terhadap sefuroksim. Mekanisme resistensi terhadap novobiosin secara spesifik belum diketahui. Sedangkan resistensi terhadap sulfametizol mungkin disebabkan oleh plasmid yang memicu peningkatan produksi PABA ( p-aminobenzoic acid ) untuk membentuk asam folat yang digunakan pada sintesa purin dan asam-asam nukleat sel bakteri atau mengubah struktur molekul enzim yang berperan dalam sintesa asam folat sehingga afinitasnya terhadap

sulfametizol menurun. Plasmid yang menyebabkan resistensi tetrasiklin mempunyai informasi genetik untuk sejumlah protein hingga dapat mempengaruhi transpor tetrasiklin untuk masuk ke dalam sel bakteri.

Tingkat resistensi antibiotik pada *Listeria monocytogenes* dapat dilihat dari perhitungan indeks multipel resisten (ARI). Nilai ARI yang diperoleh (0,62) menunjukkan bahwa tingkat resistensi antibiotik dari *Listeria monocytogenes* cukup tinggi. Berdasarkan hal ini maka dalam pengobatan kasus listeriosis harus lebih berhati-hati untuk memilih antibiotik yang akan digunakan sebagai kemoterapinya.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil penelitian terhadap 10 kultur *Listeria monocytogenes* yang diisolasi dari daging ayam, seluruh kultur resisten terhadap penisilin G, sensitif terhadap gentamisin dan kloramfenikol, lebih dari 50 % resisten terhadap spektinomisin, novobiosin, sefuroksim, sulfametizol dan tetrasiklin.
2. Dari pengujian resistensi kultur *Listeria monocytogenes* terhadap 8 antibiotik diperoleh tingkat resistensi 0,62.
3. Dari seluruh kultur *Listeria monocytogenes* yang diuji, 50 % ditemukan mengandung plasmid dengan bobot 2,7 kb hingga 54 kb yang menyebabkan resistensi antibiotik.

### 5.1.Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melanjutkan penelitian ini dengan studi transfer konyugasi dari plasmid yang mempunyai bobot molekul besar yang menyebabkan resistensi antibiotik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada Ketua Lembaga Penelitian Universitas Andalas yang telah berkenan membiayai penelitian ini, juga kepada seluruh pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Purwati, E., S. Radu, H. Zaiton, G. Rusul, " Antimicrobial Drug Resistance Factor Transfer among *Listeria species* ", *Asian Fisheries Science*, **11**, 1998, 261-270.
2. Ryser, T.E and E.H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, Marcel Dekker Inc, New York, 1991.
3. Power, D.A and P.J. McCuen, *Manual of BBI, Product and Laboratory Procedures*, 6<sup>th</sup> Ed., 1988.
4. Miller, A.J., *Foodborne Listeriosis*, Elsevier Science Publisher B.V, Amsterdam, 1990.
5. Robert, T.A., A.C. Braird-Parker and R.B. Tompkin., *Microorganisms in Food : Microbiological Specifications of Food Pathogens*, 1<sup>st</sup> Ed., Chapman & Hall, London, 1996.
6. Ganiswarna, S.G., R. Setiabudy, F.D. Suyatna, Purwastyastuti, Nafrialdi, *Farmakologi dan Terapi*, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 1995.
7. Mutschler, E., *Dinamika Obat*, Edisi Ke-5, alih bahasa oleh Mathilda B.W., Institut Teknologi Bandung, Bandung, 1991.
8. Gellin, B.G and C.V. Broome, " Listeriosis ", *Journal of American Medical Association*, **261**, 1989, 1313-1320.
9. Roberts, M.C., B. Facinelli, E. Giovanetti and P.E. Varaldo, " Transferable Erythromycin Resistance in *Listeria* spp. Isolated from Food ", *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1996, 269-270.
10. Barbuti, S., A. Maggi and C. Casoli, " Antibiotic Resistance in Strains of *Listeria* spp. From Meat Products ", *Letters in Applied Microbiology*, **15**, 1992, 56-58.
11. Hinton, M. and A.H. Linton., " Antibacterial Drug Resistance among *Escherichia coli* Isolated from Calves Fed on Milk Substitute Diet ", *Veterinary Record*, **112**, 1983, 567-568.
12. Meyers, J.A., D. Sacher, L.P. Elwell and S. Falkow, " Simple Agarose Gel Electrophoresis Method for The Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid ", *Journal of Bacteriology*, **127**, 1976, 1529-1537.
13. Macrina, F.L., D.J. Kopecko, K.R. Jones, D.J. Ayers and S.M.N. McCowan, " A Multiple - Plasmid - Containing *Escherichia coli* Strain : Convenient Source of Size Reference Plasmid Molecules ", *Plasmids*, **1**, 1978, 417-420.
14. Monfort, P., J. Minet, J. Rocout, G. Piolet and M. Cormier, "Incidence of *Listeria* spp. in Breton Live Shellfish", *Letters in Applied Microbiology*, **26**, 1998, 205-208.
15. Purwati, E., "Prevalence of *Listeria* species Isolated From Beef in Malaysia", *Jurnal Peternakan dan Lingkungan*, **5**, 1999, 14-17.
16. Jay, J.M., *Modern Food Microbiology*, Fifth Edition, Chapman & Hall, Las Vegas, 1997.
17. Katzung, B.G., *Farmakologi Dasar dan Klinik*, Edisi IV, alih bahasa oleh Staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 1997.
18. Goodenough, U., *Genetika*, Edisi Ketiga, Jilid I, alih bahasa oleh Soenartono A., Erlangga, Jakarta, 1992.