

A. Judul Penelitian dan Nama Peneliti

a. Judul Penelitian :

KARAKTERISTIK MOLEKULER BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus*
DARI SAMPEL AIR LAUT DAN UJI RESISTENSI ANTIBIOTIKNYA

b. Nama Peneliti : Marlina

c. Tahun Penulisan Laporan :

Laporan penelitian ini berjumlah 10 halaman. Penelitian dan penulisan laporan dilakukan pada tahun 2004

d. ABSTRAK

Dua puluh delapan kultur *Vibrio parahaemolyticus* yang telah diisolasi dari air laut, diuji resistensinya terhadap 8 antibiotik (Penisilin G, Sefuroksim, Kanamisin, Gentamisin, Streptomisin, Tetrasiklin, Asam Nalidiksat, Sulfametoksazol) dan diisolasi plasmidnya. Uji resistensi antibiotik dilakukan dengan metode difusi (Hinton & Linton, 1983), sedangkan isolasi plasmid dan analisa profilnya dilakukan dengan metode Macrina dkk (1978). Hasil uji resistensi antibiotik menunjukkan bahwa 21 kultur resisten terhadap antibiotik, enam kultur masing-masing resisten terhadap satu antibiotik, sedangkan yang lain resisten terhadap dua atau lebih antibiotik dan tidak satupun kultur yang resisten terhadap Gentamisin dan Asam Nalidikat. Delapan kultur ditemukan mempunyai plasmid dengan bobot 2.7 kilobase (kb) hingga 7.3 kb dan terdiri 8 profil plasmid yaitu, kultur VpEP27PK dengan plasmid 2.7 kb, kultur VpEP12PK dengan plasmid 5.6 kb, kultur VpEP6PK dengan plasmid 7.3 kb, kultur VpEP7PK dengan plasmid 5.6 kb dan 7.3 kb, kultur

¹Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Dosen Muda Nomor : 092/P4T/DPPM/DM. SKW, SOSAG/III/2004 tanggal 25 Maret 2004

²Penulis adalah dosen Fakultas MIPA Jurusan Farmasi Universitas Andalas

VpEP9PK dengan plasmid 5.6 kb, kultur VpEP11PK dengan plasmid 3 kb, 4 kb, 5.1 kb dan 5.6 kb, kultur VpEP3PK dengan plasmid 3 kb, 4 kb dan 5.6 kb serta kultur VpEP13PK dengan plasmid 5.6 kb. Jumlah plasmid dan profilnya memiliki hubungan yang sinergis dengan peningkatan resiko resistensinya terhadap antibiotik.

ABSTRACT

Twenty eight cultures of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from sea water were examined for resistance to 8 antibiotics (Penicilin G, Cefuroxim, Kanamycin, Gentamycin, Streptomycin, Tetracycline, Nalidixic Acid, Sulfametoxazol) and for occurrence of plasmid. Antibiotic resistance was tested by diffusion method (Hinton and Linton, 1983). Plasmid were isolated and analysed by method of Macrina et al (1978). The result of antibiotics resistance testing indicated that 21 cultures were resistant to antibiotics, six of them was resistant to one antibiotic and the other were resistant to two or more antibiotics but no cultures were resistant to Gentamycin and Nalidixic Acid. Six cultures of *Vibrio parahaemolyticus* contained plasmid for 2.7 kilobase (kb) until 7.3 kb with 8 profiles that are, culture VpEP27PK contained 2.7 kb, culture VpEP12PK contained 5.6 kb, culture VpEP6PK contained 7.3 kb, culture VpEP7PK contained 5.6 kb and 7.3 kb, culture VpEP9PK contained 5.6 kb, culture VpEP11PK contained 3 kb, 4 kb, 5.1 kb, 5.6 kb, culture VpEP3PK contained 3 kb, 4kb, 5.6 kb and culture VpEP13PK contained 5.6 kb. Large amount of plasmid and its profiles influence their resistance to antibiotic.

I. PENDAHULUAN

Laut secara umum terdiri atas dua zona yaitu zona pantai dan zona laut dalam. Zona pantai mencakup hingga kedalaman 200 meter dibawah permukaan laut. Sinar matahari yang masih bisa menembus hingga kedalaman tersebut memungkinkan tumbuhnya organisme fotosintetik yang akan dimanfaatkan oleh organisme laut lain seperti ikan, kerang, tiram, kepiting dan lain - lain..

Selain pancaran sinar matahari yang cukup, jumlah zat organik dan anorganik dari daratan juga menunjang kehidupan di perairan pantai termasuk kehidupan mikroorganisme seperti bakteri. Jika dibandingkan dengan laut bagian tengah, maka jumlah bakteri di perairan pantai lebih banyak dan bervariasi. Banyak bakteri patogen yang terdapat di perairan pantai, salah satunya adalah bakteri dari genus *Vibrio*.

Genus *Vibrio* terdiri dari 28 spesies antara lain *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. costicola*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. metchnikovii*, *V. sputigenum*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. damsela*. Diantara 28 spesies itu yang dikenal patogen adalah *Vibrio cholera*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* dan *V. parahaemolyticus*. *Vibrio parahaemolyticus* adalah bakteri gram negatif dengan sel berbentuk batang berlekuk (koma), mempunyai flagel polar dan bersifat anaerob fakultatif.

Studi mengenai kasus keracunan makanan laut yang terjadi tiap tahun di Jepang dan Amerika Serikat menunjukkan bahwa penyebab keracunan adalah bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* yang berasal dari makanan laut

"seafood" yang setengah dimasak atau kurang sempurna dimasak dan makanan lain yang terkontaminasi dengan makanan tersebut. Infeksi karena *V. parahaemolyticus* ini mengakibatkan gastroenteritis dengan gejala diare berdarah, sakit kepala, demam, vomiting dan nausea .

Terapi dengan antibiotik terhadap infeksi yang disebabkan oleh genus *Vibrio* baru dilakukan terhadap *Vibrio cholerae* yaitu dengan memberikan Siprofloksazin, Loperamid, atau kombinasi Trimetoprim dan Sulfametoksazol, sedangkan terapi infeksi karena *Vibrio parahaemolyticus* belum ada rekomendasi tentang penggunaan antibiotik, karena masyarakat khawatir terhadap efek samping dan peningkatan resiko resistensinya .

Untuk menguji sifat resistensi tersebut, maka dilakukan penelitian resistensi antibiotik dan profil plasmid dari *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari air laut. Uji resistensi antibiotik dilakukan dengan metoda Krumberman , sedangkan isolasi plasmid dilakukan dengan metode Meyers, dkk yang dimodifikasi dan analisa profil plasmid memakai metode Macrina, dkk.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri

Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme yang dapat menimbulkan berbagai perubahan pada substansi yang ditumbuhinya. Bakteri dapat hidup di semua tempat yang memungkinkan terjadinya kehidupan seperti udara, tanah, air dan makanan. Bakteri dalam ekosistem berperan sebagai "decomposer", yaitu pemecah produk-produk organik yang kompleks membentuk komponen yang lebih sederhana. Bakteri dapat bersimbiosis dengan organisme lain di alam dimana simbiosis ini dapat bersifat mutualisme, komensalisme dan parasitisme. Sifat parasitisme beberapa jenis bakteri menimbulkan penyakit pada tumbuhan, hewan dan manusia .

2.1.1 Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Pada tahun 1950 - an pertama kali terungkap kasus keracunan makanan laut di Jepang, diduga penyebabnya adalah suatu bakteri patogen yaitu *Vibrio parahaemolyticus* yang hidup dalam makanan laut "seafood" itu. Dugaan ini didasarkan karena kebiasaan orang Jepang yang memakan ikan dan makanan laut lain secara mentah dan setengah masak .Kasus serupa juga pertama kali dilaporkan tahun 1970 - an di daerah perairan pantai Amerika Serikat . Tiap tahun kasus seperti ini selalu terjadi secara sporadis di berbagai kawasan di dunia .

Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* termasuk ke dalam genus *Vibrio*. Bakteri ini pertama kali diidentifikasi oleh Kanagawa, seorang ilmuwan Jepang sekitar tahun 1950 . Bakteri ini tergolong bakteri halofilik. *V. parahaemolyticus* dapat hidup bersimbiosis dengan organisme laut lain seperti ikan, kerang, tiram, kepiting dan lain - lain..

2.1.2 Taksonomi *Vibrio parahaemolyticus*

“Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” memberikan klasifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* sebagai berikut :Kingdom: Plant, Divisio : Thallophyta, Kelas: Schizomycetes, Ordo : Eubacteriales, Famili: Vibrionaceae, Genus : *Vibrio*, Spesies: *Vibrio parahaemolyticus*

2.1.3 Morfologi *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus adalah bakteri berbentuk spiral (batang berlekuk), gram negatif, tidak menghasilkan spora, mempunyai flagel polar (monotrik) dan bersifat an aerob fakultatif. Bakteri ini memiliki ukuran 2 - 4 μ m.

2.1.4 Patogenitas *Vibrio parahaemolyticus*

Mekanisme patogen *Vibrio parahaemolyticus* belum diketahui, tapi bakteri ini menghasilkan suatu virotoksin yang mengakibatkan lisisnya sel darah merah. Pengujian strain *V. parahaemolyticus* yang patogenik menunjukkan positif tes Kanagawa atau reaksi hemolisis pada daerah hemolisis β dengan menggunakan medium agar darah.

Infeksi karena *Vibrio parahaemolyticus* disebut gastroenteritis dengan gejala diare berdarah, kejang perut, sakit kepala, demam, vomiting dan nausea. Gastroenteritis dapat terjadi jika jumlah *V. parahaemolyticus* yang masuk ke tubuh berkisar 10^6 - 10^8 organisme. Demam karena gastroenteritis ini berlangsung 4 - 10 hari yang disertai dengan gejala klinis diatas. Pada kasus yang berat penyakit ini mengakibatkan kematian karena banyak kehilangan cairan tubuh dan kekurangan darah.

2.2 Laut

Laut adalah bagian terluas yang meliputi kira-kira 2/3 dari luas permukaan bumi. Laut secara umum dibagi atas dua zona yaitu pantai dan laut dalam. Zona pantai mempunyai kedalaman hingga 200 meter dari permukaan laut. Letak yang berbatasan dengan daratan menjadikan zona ini sebagai tempat menumpuknya bahan-bahan organik dan anorganik dari daratan.

Pancaran cahaya matahari yang cukup, memungkinkan tumbuhnya organisme fotosintetik di laut, seperti plankton. Sesuai dengan rantai makanan, organisme tersebut akan dimanfaatkan oleh organisme laut lain seperti ikan, kerang, tiram, kepiting dan lain - lain atau lebih dikenal dengan "seafood". Hasil laut dari perairan pantai menyediakan 1%-2% kalori dan 4,4% protein pertahun untuk seluruh dunia. Sumber protein terbesarnya adalah ikan dan dari seluruh penangkapan ikan di laut, >90% berasal dari perairan pantai.

Kandungan organik yang tinggi dan cahaya matahari yang cukup pada perairan pantai menyebabkan variasi mikroorganisme terutama bakteri. Banyak bakteri patogen yang terdapat di kawasan ini, salah satunya adalah dari genus *Vibrio* yaitu *Vibrio parahaemolyticus*. Bakteri ini dapat hidup dalam suasana kandungan garam tertentu dan bersimbiosis dengan ikan, kerang, tiram, kepiting dan lain - lain. Terjadinya infeksi karena bakteri ini pada manusia adalah jika manusia memakan makanan laut atau "seafood" yang mentah atau tidak dimasak secara sempurna.

2.3 Plasmid dan Resistensi Antibiotik

Plasmid adalah unsur genetik ekstrakromosomal yang terdiri atas DNA berbenang ganda yang melingkar, yang berkisar dari 0,1 hingga 5 persen ukuran

kromosom bakteri. Plasmid dapat mereplikasi sendiri secara otonom dan tersebar bebas dalam sitoplasma bakteri. Plasmid ini mungkin menyandi apa saja dari cakupan luas fungsi bantu, termasuk resistensi obat .

Resistensi antibiotik sering disandi oleh plasmid. Plasmid ini mengandung faktor resisten (faktor R) sehingga disebut plasmid R, yang terdiri dari dua unit yaitu segmen RTF (Resistance Transfer Faktor) dan determinan-r (unit r). Segmen RTF memungkinkan terjadinya perpindahan faktor R, sedangkan masing-masing unit r membawa sifat resistensi terhadap satu antibiotik .

Plasmid R dapat ditransmisikan tidak hanya dari sel ke sel didalam satu jenis tapi juga melintasi garis-garis jenis, misalnya *Escherichia coli* yang bukan patogen sering mengandung plasmid-plasmid R yang memungkinkan bakteri bertahan hidup terhadap dosis tinggi antibiotik yang dimakan inangnya. Plasmid-plasmid R ini dapat ditransfer ke bakteri patogen yang menginfeksi sehingga bakteri patogen itu akan menjadi resisten terhadap antibiotik yang sama .

Materi genetik dan plasmid dapat ditransfer melalui beberapa mekanisme, yaitu :

- a. Transduksi, DNA plasmid dibungkus dalam bakteriofage atau virus bakteri dan plasmid itu ditransfer ke bakteri lain dari spesies yang sama.
- b. Transformasi. Fragmen DNA bebas dapat melewati dinding sel dan kemudian bersatu dalam genom sel sehingga mengubah genotipnya. Hal ini dilakukan melalui rekayasa genetika atau teknologi rekombinan DNA yang dapat terjadi secara spontan meskipun dalam frekuensi yang kecil.

- c. Konyugasi, Transfer unilateral dari materi genetik antara bakteri sejenis maupun dengan jenis lain dapat terjadi melalui proses perkawinan atau konyugasi. Hal ini memungkinkan karena adanya faktor F yang menentukan seks pili. Bakteri yang mempunyai seks pili disebut bakteri F+. Materi genetik dari sel donor (F+) termasuk DNA-plasmid dapat berpindah ke dalam sel resipien melalui pili tersebut, sehingga gen-gen tertentu yang membawa sifat resistensi pada antibiotik dapat berpindah dari populasi bakteri resisten ke bakteri yang sensitif. Melalui mekanisme inilah sebagian besar sifat resisten antibiotik tersebar dalam populasi bakteri dan menimbulkan multiresistensi terhadap antibiotik.
- d. Transposisi, yaitu suatu pertukaran rangkaian DNA pendek (transposon) antara satu plasmid ke plasmid lain atau dari kromosom ke plasmid dalam sel bakteri.

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari air laut.

3.2 Manfaat Penelitian

- a. *Vibrio parahaemolyticus* yang telah diisolasi dari air laut ditentukan resistensinya untuk pemilihan antibiotik yang akan digunakan untuk bakteri ini.
- b. Dengan karakteristik secara molekuler yaitu mengisolasi plasmid dari bakteri ini dapat ditentukan profil plasmidnya, sehingga dapat dilakukan antisipasi penggunaan antibiotik untuk penanganan bakteri ini.

IV. METODE PENELITIAN

4.1 Pembuatan Media

a. Pembuatan Media Luria Burtani (LB) Broth

Dibuat dengan melarutkan 5 g yeast ekstrak, 10 g NaCl, 10 g tripton dalam 1 liter aquadest, kemudian dipanaskan sampai homogen, dimasukkan 5 ml pada botol universal dan disterilkan .

b. Pembuatan media Thiosulfat Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar

Komposisi media dibuat dalam g/l yaitu pepton dari casein 5.0, pepton dari daging 5.0, yeast ekstrak 5.0, natrium sitrat 10.0, natrium thiosulfat 10.0, oxbile dried 5.0, natrium kholat 3.0, sukrosa 20.0, NaCl 10.0, besi (III) sitrat 1.0, biru bromtimol 0.04, agar 14.0.

Media ditimbang 88 g kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril dalam tabung erlenmeyer steril, dipanaskan hingga homogen dan dicek pada pH 8.6 suhu 25°C, lalu tuangkan pada cawan petri 15 ml tanpa disterilkan .

c. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar

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, disterilkan, lalu dituangkan ke dalam cawan petri 15 ml.

4.2 Penyiapan Disk Antibiotik

Disk antibiotik yang digunakan mempunyai konsentrasi yang telah ditetapkan sebagai berikut :

Tabel I. Daftar Antibiotik yang digunakan untuk Uji Resistensi Antibiotik dari *Vibrio parahaemolyticus*

No	Golongan	Antibiotik	Konsentrasi	Produksi
1	β -laktam	Penisilin G Sefuroksim	10 U 30 μ g	Oxoid
2	Aminoglikosida	Kanamisin Gentamisin Streptomisin	30 μ g 10 μ g 10 μ g	Oxoid
3	Tetrasiklin	Tetrasiklin	30 μ g	Oxoid
4	Quinolon / Inhibitor girase	Asam Nalidiksat	30 μ g	Oxoid
5	Sulfonamida	Sulfametoksazol	25 μ g	Oxoid

4.2.1 Peremajaan Kultur *Vibrio parahaemolyticus* murni

Biakan atau kultur murni *Vibrio parahaemolyticus* yang digunakan adalah hasil isolasi dari air laut, dipelihara dalam eppendorf yang mengandung 25 % gliserol dalam Alkali Pepton Water (APW) dan disimpan pada suhu -20°C .

Kultur *Vibrio parahaemolyticus* ditumbuhkan kembali pada media TCBS secara spread kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diambil dan ditumbuhkan lagi dalam LB broth pada inkubator "shaker" suhu 37°C selama 24 jam. Kultur murni inilah yang akan digunakan untuk uji resistensi antibiotik dan analisa profil plasmid.

4.2.2 Uji Resistensi Antibiotik

Uji resistensi antibiotik ini dilakukan terhadap 28 kultur *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari air laut. Biakan yang telah diremajakan dalam botol universal diambil dengan kapas lidi steril dan ditanam pada media Mueller Hinton Agar dengan cara mengoleskan secara merata pada permukaan media. Disk antibiotik ditaruh hati-hati diatas biakan bakteri tersebut dan ditekan perlahan dengan pinset steril supaya benar - benar kontak dengan bakteri. Jarak disk dengan tepi cawan petri 15 mm dan jarak antar disk 24 mm. Biakan 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.

4.2.3 Isolasi Plasmid dari Kultur *Vibrio parahaemolyticus*

Biakan bakteri yang ada dalam botol universal diambil 1.5 ml 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 150 µl GET buffer, divorteks kemudian ditambahkan 175 µl NaOH 0,4 N dan 175 µl SDS 4%, dikocok, diinkubasi 5 menit pada suhu kamar dan 5 menit pada suhu -20°C. Selanjutnya ditambahkan 350 µl kalium asetat 3 M dingin, dikocok, diinkubasi 5 menit pada suhu kamar dan 5 menit pada suhu -20°C, kemudian disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan, dipindahkan kedalam eppendorf baru yang steril dan ditambahkan

750 µl isopropanol dingin, lalu disentrifus pada 13.000 rpm selama 5 menit. Plasmid yang dihasilkan dicuci dengan 500 µl etanol dingin dan disentrifus pada 13.000 rpm selama 5 menit, kemudian etanolnya dibuang dan dibiarkan hingga kering. Selanjutnya pellet plasmid disuspensikan kembali dalam 50 µl aquadest steril. Gel Agarosa 0,8% dibuat dengan cara melarutkan 0,8 g agarose base dalam 100 ml TBE buffer berkekuatan 1 x, dipanaskan dalam oven hingga mendidih. Larutan agarosa tersebut didinginkan hingga 50°C dan dituang dalam wadah yang dilengkapi dengan comb. Untuk menghilangkan gelembung udara, gunakan pipet halus. Larutan akan menjadi padat/gel sekitar 10 menit. Gel yang terbentuk berukuran panjang 200 mm, lebar 150 mm dan tebalnya 5 mm, sesuai ukuran wadah. Setelah padat dan dingin angkat comb dengan hati-hati sehingga akan terbentuk lobang dan pengisian suspensi plasmid dapat dilakukan.

Suspensi plasmid dalam aquadest yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam gel agarosa kemudian dielektroforesis 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 bromida 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.

4.2.4 Elektroforesis Gel Agarosa

Bejana elektroforesis diisi dengan larutan elektrolitnya yaitu TBE buffer 1 x. Wadah dipasang ke dalam bejana elektroforesis dengan posisi yaitu lobang-lobang

gel yang telah berisi suspensi plasmid itu berada pada sisi elektroda negatif (katoda), kemudian ditambahkan elektrolit sehingga menutupi seluruh permukaan gel.

Tenaga elektroforesis disuplai oleh alat pembangkit tenaga / power pack (Model Biorad 300, U.S.A). Proses elektroforesis terjadi dari katoda (-) ke anoda (+) dengan voltase konstan (300 V dan 150 V). Gas hidrogen yang bergerak dari katoda dan gas oksigen yang dihasilkan dari anoda merupakan tanda arus bergerak dalam sistem elektroforesis.

4.2.5 Pewarnaan Menggunakan Ethidium Bromida

Ethidium Bromida adalah paling cepat, sensitif, produktif dan sangat baik untuk mewarnai DNA, tetapi zat ini bersifat mutagen dan karsinogenik (5 mg/ml). Ethidium bromida sensitif dengan cahaya sehingga harus disimpan dalam wadah gelap atau wadah yang dilapisi dengan aluminium foil. Untuk pewarnaan, tambahkan 100 µl dari 5 mg/ml larutan Ethidium bromida kedalam 500 ml aquadest.

4.2.6 Visualisasi Pita DNA dan Fotografinya

Gel diwarnai dalam 0.5 µl ethidium bromida selama 15 menit dan ditampakkan dibawah transluminator UV (Spectroline, λ 320 nm), di foto menggunakan Polaroid film (Type 665) dan proses ini berlangsung selama 15-30 detik.

4.2.7 Penggolongan Berat Molekul Plasmid

Berat molekul plasmid dinyatakan dengan kilobase (kb) dan sebagai pembanding adalah berat molekul plasmid *Escherichia coli* V 517. Pita plasmid dari *Vibrio parahaemolyticus* di plotkan terhadap standar tersebut sehingga

diketahui berat molekul plasmidnya. Ukuran dari berat molekul plasmid *E.coli* V 517 adalah sebagai berikut :

Tabel II. Berat Molekul Plasmid *Escherichia coli* V 517 sebagai Referensi Berat Molekul Plasmid *Vibrio parahaemolyticus*

Nomor Plasmid	Berat Molekul (kb)
1	54
2	7.3
3	5.6
4	5.1
5	4
6	3
7	2.7

4.3 Analisa Data

4.3.1 Perhitungan Persentase Resistensi Antibiotik

Persentase resistensi antibiotik dihitung untuk setiap jenis antibiotik dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Resistensi} = \frac{\text{Jumlah kultur yang resisten}}{\text{Jumlah kultur yang diuji}} \times 100 \%$$

4.3.2 Perhitungan Indeks Multipel Resisten (MAR)

Perhitungan Indeks Multipel Resisten menggunakan rumus Krumperman :

$$\text{MAR} = \frac{X}{Y}$$

MAR = Indeks Multipel Resisten (Multiple Antibiotic Resistance)

X = Jumlah bagian yang resisten terhadap antibiotik dari satu kultur yang digunakan.

Y = Jumlah antibiotik yang digunakan

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil

Uji resistensi antibiotik terhadap 28 kultur *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan 8 antibiotik dengan menggunakan medium Mueller Hinton Agar. Hasil uji resistensi antibiotik tersebut menunjukkan bahwa dari 28 kultur, 20 kultur (71,43%) resisten terhadap Penisilin G, 1 kultur (3,57%) resisten terhadap Streptomisin, 10 kultur (35,71%) resisten terhadap Sefuroksim, 7 kultur (25%) resisten terhadap Sulfametoksazol, 1 kultur (3,57%) resisten terhadap Kanamisin, tidak ada kultur (0%) resisten terhadap Gentamisin, 1 kultur (3,57%) resisten terhadap Tetrasiklin dan tidak ada kultur (0%) resisten terhadap Asam Nalidiksat. Hasil uji resistensi antibiotik ini dapat dilihat pada tabel I, gambar 5 dan 6.

Indeks Multipel Resistensi (MAR) yang diperoleh adalah 0,125, 0,25 dan 0,375. Hasil isolasi plasmid dan analisa profilnya dihubungkan dengan resistensi antibiotiknya serta indeks multipel resistensinya dapat dilihat pada tabel II. Tabel tersebut menunjukkan bahwa terdapat 8 profil plasmid ditinjau dari pola resistensinya, yaitu 1 kultur dengan plasmid 5,6 kilobase (kb) yang resisten terhadap Penisilin G; 1 kultur dengan plasmid 2,7 kb yang resisten terhadap Penisilin G, Sefuroksim; 1 kultur dengan plasmid 7,3 kb yang resistensi terhadap Penisilin G, Sefuroksim; 1 kultur dengan plasmid 5,6 kb dan 7,3 kb yang resisten terhadap Penisilin G dan Sefuroksim; 1 kultur dengan plasmid 5,6 kb yang resisten terhadap Penisilin G, Sefuroksim, Sulfametoksazol; 1 kultur dengan plasmid 3,4,5,1, dan 5,6 kb yang resisten terhadap Penisilin G, Sefuroksim, Sulfametoksazol,

1 kultur dengan plasmid 3,4,5,6 kb yang resisten terhadap Penisilin G, Sefuroksim, Sulfametoksazol dan 1 kultur dengan plasmid 5,6 kb yang resisten terhadap Penisilin G, Kanamisin dan Streptomisin.

5.2 Pembahasan

Vibrio parahaemolyticus adalah bakteri gram negatif dengan dinding sel yang lebih tipis dari gram positif karena hanya mengandung peptidoglikan (5%-10%) dari komposisi dinding sel. Jadi untuk mendestruksi awal dinding selnya hanya dilakukan oleh GET buffer, tidak memerlukan lisozim seperti halnya bakteri gram positif.

Masa inkubasi setelah pemberian GET buffer bertujuan untuk memberikan kesempatan terjadinya destruksi secara maksimal. Pemberian NaOH 0,4 N adalah untuk membuat suasana alkalis karena reaksi pendestruksian dinding sel bakteri ini hanya berlangsung dalam suasana alkalis (basa), kemudian ditambahkan SDS 4% yang bertujuan untuk menyempurnakan pendestruksian sehingga dinding sel bisa lisis selama masa inkubasi. Lisisnya dinding sel adalah langkah penting dalam mengisolasi plasmid bakteri, jika tidak lisis maka isolasi plasmid tidak dapat dilakukan. Sel yang lisis ditandai dengan adanya lendir (benang) ketika eppendorf dibuka setelah penambahan NaOH 0,4 N dan SDS 4% yang diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar dan 5 menit pada suhu -20°C , seperti terlihat pada gambar 8.

Penambahan kalium asetat adalah untuk mengendapkan protein - protein dengan bobot molekul besar yang akan mengganggu analisa plasmid. Selanjutnya

sis - sisa protein lain yang masih akan mengganggu dicuci dengan isopropanol dan etanol sehingga didapatkan plasmid yang bersih dari protein pengganggu .

Elektroforesis pada 300 V selama 15 menit adalah untuk mempercepat keluarnya plasmid dari lobang-lobang gel, kemudian 150 V selama 1 jam bertujuan agar laju pergerakan plasmid dalam larutan elektrolit (TBE buffer) stabil sehingga plasmid dengan bobot molekul kecil tidak hilang .

Plasmid merupakan suatu elemen genetik (DNA - plasmid) yang terpisah dari DNA - kromosom. Plasmid mengandung faktor resisten (faktor R) yang terdiri dari segmen RTF (Resisten Transfer Faktor) dan determinan-r (unit-r). Segmen RTF memungkinkan terjadinya perpindahan faktor R dan menularkan sifat resistensinya pada sel lain. Masing-masing unit r membawa sifat resistensi terhadap satu antibiotik, sehingga berbagai unit r membawa sifat resistensi terhadap berbagai antibiotik sekaligus, dengan demikian 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 terlihat dari hasil penelitian ini .

Indeks multipel resistensi (MAR) yang didapatkan yaitu 0.125, 0.25 dan 0.375. Hal ini menunjukkan bahwa secara umum strain *Vibrio Parahaemolyticus* yang diisolasi pada penelitian ini tidak memiliki resiko resistensi yang tinggi. Resistensi suatu bakteri gram negatif terhadap berbagai antibiotik dikatakan tinggi jika memiliki indeks multipel resisten (MAR) ≥ 0.5 .

Terjadinya resistensi 20 kultur dari 28 kultur (71,43%) terhadap Penisilin G yang dikendalikan plasmid karena *Vibrio parahaemolyticus* mensekresikan enzim β -laktamase. Enzim ini akan menginaktivasi Penisilin G dengan membuka cincin

β -laktam sehingga kerja antibakterinya akan hilang . Tingkat resistensi yang tinggi dari antibiotik ini menunjukkan bahwa antibiotik tersebut bukan pilihan yang baik untuk pengobatan.

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. Kenyataan ini dibuktikan bahwa dari 28 kultur terdapat 10 kultur (35,71%) yang resisten terhadap Sefuroksim.

Resistensi terhadap Sulfametoksazol (25%) 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 Sulfametoksazol menurun .

Dari seluruh kultur yang diuji, 1 kultur resisten terhadap Tetrasiklin, 1 kultur resisten terhadap Kanamisin, 1 kultur resisten terhadap Streptomisin dan tidak satupun kultur yang resisten terhadap Gentamisin dan Asam Nalidiksat. Berarti antibiotik-antibiotik tersebut dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan pada gastroenteritis.

Delapan kultur (28,57%) ditemukan mengandung plasmid dengan bobot molekul 2,7 kb hingga 7,3 kb dan terdiri dari 8 profil plasmid, 5 kultur yaitu VpEP12PK, VpEP27PK, VpEP6PK, VpEP9PK dan VpEP13PK masing-masing mempunyai 1 plasmid, sedangkan 3 kultur yaitu VpEP7PK, VpEP11PK dan VpEP3PK mempunyai lebih dari satu plasmid. Tiap kultur mengandung plasmid

dengan profil yang berbeda, ditinjau dari bobot plasmid, pola resistensi dan indeks multipel resistensinya. Jumlah plasmid akan mempengaruhi resiko resistensinya terhadap antibiotik. Semakin banyak plasmid maka kemungkinan penyebaran sifat resistensinya akan semakin luas sehingga menyebabkan peningkatan multiresistensi terhadap antibiotik.

Beberapa kultur yang resisten tapi tidak mengandung plasmid kemungkinannya adalah kultur itu memang tidak mengandung plasmid atau teknis ekstraksi dalam penelitian ini tidak memungkinkan jumlah plasmid yang cukup sehingga tidak terdeteksi.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Dari seluruh kultur *Vibrio parahaemolyticus* yang diuji dapat disimpulkan bahwa 71,43% resisten terhadap Penisilin G, 35,71% resisten terhadap Sefuroksim, 25% resisten terhadap Sulfametoksazol, 3,57% resisten masing - masing terhadap Streptomisin, Tetrasiklin dan Kanamisin dan 0% resisten terhadap Gentamisin dan Asam Nalidiksat.
2. Indeks Multipel resistensi dari *Vibrio parahaemolyticus* yang diuji adalah 0,125, 0,25 dan 0,375 yang berarti resiko resistensinya terhadap antibiotik relatif rendah.
3. Dari 28 kultur *Vibrio parahaemolyticus* yang diuji, 8 kultur (28,57%) di temukan mengandung plasmid.

4. Delapan profil plasmid yang ditemukan menunjukkan bahwa strain *Vibrio parahaemolyticus* yang diuji memiliki keanekaragaman genetik yang tinggi.

6.2 Saran

Disarankan untuk melanjutkan penelitian ini dengan studi transformasi dari plasmid resisten yang menyebabkan resistensi antibiotik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alam, M. J., K. I. Tomochika, S. I. Miyoshi and S. Shinoda. 2002. Environmental Investigation of Potentially Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 208 : 83-87.
2. Radu, S., E. H. Nasreldin H. Zaiton, L. Samuel, G. Rusul and F. Nimita. 1998. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis to Differentiate Isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from Cockles (*Anadara granosa*). *World J. Microbiol. & Biotech.* 14 : 895-901.
3. Kudo, Y. H., K. Sugiyama, M. Nishibuchi, A. Chowdhury, J. Yatsuyanagi, Y. Ohtomo, A. Saito, H. Nagano, T. Nishina, H. Nakagawa, H. Konuma, M. Miyahara and S. Kumagai . 2003. Prevalence of Pandemic Thermostable Direct Hemolysin-Producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7) : 3883-3891.
4. Jaksic, S., S. Uhutil, T. Petrak, D. Bazulic, and L. G. Karolyi. 2002. Occurrence of *Vibrio* spp. In Sea Fish, Shrimps and Bivalve Molluscs Harvested from Adriatic Sea. *Food Control.* 13: 491-493.
5. Okuda, J., E. Hayakawa, M. Nishibuchi and T. Nishino. 1999. Sequence Analysis of the *gyrA* and *parC* Homologues of a Wild-Type Strain of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Fluoroquinolone -Resistant Mutant. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43: 1156-1162.
6. Li, J., J. Yies, R. W. T. Foo, J. M. L. Ling, H. Xus and N. Y. S. Woo. (1999). Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of *Vibrio* Isolates from Cultured Silver Sea Bream, *Sparus Sarba*. *Marine Pollution Bulletin* 39 : 245-249.
7. Davis, B. R., G. R. Fanning, J. M. Madden, A. G. Steigerwalt, H. B. Bradford Jr., H. L. Smith Jr., and D. J. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* 14:631-639.