

PENGARUH PEMBERIAN TIMBAL (Pb) TERHADAP FASE LAG KURVA PERTUMBUHAN dan ZONA DAYA HAMBAT *S. aureus* PADA BEBERAPA JENIS ANTIBIOTIK

Kevin Althamena, Rio Risandiansyah*, Doti Wahyuningsih
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA)

ABSTRAK

Pendahuluan: Timbal (Pb) adalah polutan yang diketahui dapat menyebabkan stres oksidatif pada organisme yang terpapar, yang berpotensi menyebabkan kerusakan DNA. Bakteri memiliki mekanisme adaptif terhadap kerusakan DNA melalui pengaktifan sistem DNA Repair yang *error-prone*, yang dapat mempengaruhi kurva pertumbuhan bakteri dan menyebabkan mutasi acak. Penelitian ini akan melihat pengaruh Pb pada kurva pertumbuhan dan menguji mutasi yang muncul melalui uji sensitivitas antibiotik.

Metode: Penelitian ini menggunakan metode *in vitro* dengan melakukan pemaparan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan tujuh dosis Pb berseri 125 ppm hingga 1,95 ppm untuk kemudian dilihat kurva pertumbuhan melalui absorbansinya dengan spektrofotometri selama 24 jam pada suhu 37° C. Nilai *Lag extension (LE)* didapatkan dengan membagi waktu fase lag kontrol dengan fase lag paparan. Bakteri yang mengalami pemanjangan fase lag dilakukan uji sensitivitas menggunakan metode *disc-diffusion* pada antibiotik *Amoxicillin*, *Trimetropim Sulfathomexazole*, *Tetrasiklin*, *Meropenem* dan *Kloramfenikol*, yang diukur pada 24 jam dan 48jam. Analisis statistik data menggunakan aplikasi R Studio 1.2.5033 dengan uji *Kruskal wallis* dan *post hoc*.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan Pb dengan dosis 7,8 ppm, 3,9 ppm dan 1,95 ppm secara signifikan ($p < 0,05$) menyebabkan pemanjangan fase lag dengan nilai *LE* 2,3, 2 dan 2 secara berturut-turut, dibandingkan dengan kontrol. Uji sensitivitas menunjukkan terjadinya penurunan zona hambat pada salah satu pengulangan paparan Pb 7,8 ppm terhadap antibiotik *Amoxicillin* dan *Meropenem*, 3,9 ppm terhadap *Kloramfenikol* dan *Tetrasiklin*, dan 1,95 ppm terhadap *Tetrasiklin* dibandingkan dengan kontrol. Dosis Pb 7,8 ppm menyebabkan toleransi di semua antibiotik uji kecuali *Amoxicillin* sedangkan pada dosis 3,9 ppm terjadi pada *Kloramfenikol*, *Tetrasiklin* dan *Trimetropim Sulfathomexazole* ($p > 0,05$). Pemaparan logam berat pada dosis lain menyebabkan bakteri tetap pada fase *lag* selama 24 jam sehingga tidak dilakukan pengujian sensitivitas antibiotik.

Kesimpulan: Paparan Pb pada *S. aureus* menyebabkan pemanjangan fase lag pada dosis 7,8 ppm, 3,9 ppm, 1,95 ppm dan penurunan sensitivitas antibiotik atau toleransi secara acak pada beberapa ulangan terhadap beberapa jenis antibiotik.

Kata Kunci: Resistensi Antibiotik, Fase lag, Polusi timbal, *Staphylococcus aureus*.

*Korespondensi Penulis :

Rio Risandiansyah

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

Alamat : Jl. MT Hayono 193, Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

Email: riorisandiansyah@unisma.ac.id

THE EFFECT OF LEAD (Pb) ADMINISTRATION ON THE LAG PHASE OF THE GROWTH CURVE and THE INHIBITORY ZONE of *S.aureus* in SEVERAL ANTIBIOTICS

Kevin Althamena, Rio Risandiansyah*, Doti Wahyuningsih
Faculty of Medicine Universitas Islam Malang (UNISMA)

ABSTRACT

Introduction: Lead (Pb) is a pollutant known to cause oxidative stress in organisms, resulting in DNA damage. Bacteria has an adaptive mechanisms against DNA damage through the activation of an error-prone DNA repair system, however, this process could cause random mutations and is suspected to cause changes in its growth curve, particularly, during the lag phase. This study examines Pb exposure on bacterial growth curve and examine its effects using an antibiotic sensitivity test.

Method: This study was an experimental *in vitro* method which treated *Staphylococcus aureus* with serial dilution of Pb (125 ppm to 1.95 ppm) and measured its growth curve using *spectrophotometry* for 24 hours at 37°C. *Lag Extension (LE)* value is obtained by dividing the time of the control lag phase and treatment lag phase. Bacteria showing extended lag phase were tested for antibiotic sensitivity using the *disc-diffusion* method against several antibiotics like *Amoxicillin*, *Trimetropim Sulfathomexazole*, *Tetracycline*, *Meropenem* and *Chloramfenicol*, measured at 24 hours and 48 hours. Statistical analysis of the data used the R Studio 1.2.5033 application with *Kruskal Wallis* and *post hoc tests*.

Result: The results showed that exposure to Pb at a dose of 7.8 ppm, 3.9 ppm and 1.95 ppm significantly ($p < 0.05$) had LE values of 3, 2, and 2, respectively. The sensitivity test showed a reduction in zone of inhibition on one sample against *Amoxicillin* and *Meropenem* after Pb exposure at 7.8 ppm; *Chloramphenicol* and *Tetracycline* after Pb

exposure at 3.9 ppm; and *Tetracycline* after Pb exposure at 1.95 ppm. Exposure of Pb at 7.8 ppm caused tolerance in all tested antibiotics except Amoxicillin, while 3.9 ppm showed tolerance in *Chloramphenicol*, *Tetracycline* and *Trimethoprim Sulfamethoxazole* ($p > 0.05$).

Conclusion: Pb exposure of *S. aureus* at doses 7.8 ppm, 3.9 ppm, and 1.95 ppm caused lag phase extension and a decrease in antibiotic sensitivity or random tolerance in several replications against several antibiotics.

Keywords: *Antibiotic resistance, Lag phase, Lead pollution, Staphylococcus aureus.*

*Corresponding author:

Rio Risandiansyah

Faculty of Medicine, Universitas Islam Malang

Address: 193 MT Haryono St., Malang, East Java, Indonesia, 65145

email: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Polusi timbal saat ini sedang mengalami kenaikan di dunia salah satunya di Indonesia¹. Salah satu sumber terbanyak polusi oleh timbal adalah dari kendaraan bermotor di Indonesia sendiri data tentang kenaikan penggunaan bahan bakar diproyeksikan akan naik sembilan kali lipat pada tahun 2020 dibandingkan pada tahun 1990, dimana tingginya penggunaan bahan bakar ini diikuti dengan pencemaran polusi udara yakni *total suspended particulate matter* dan timbal. Selain itu peningkatan polusi timbal di dunia juga terjadi sebanyak seribu kali dalam kurun waktu tiga abad terakhir entah itu dari tanah, air dan udara¹. Polusi tersebut dapat mengenai beberapa bagian tubuh manusia seperti paru paru, pembuluh darah serta mata dan kulit dimana tubuh manusia yang banyak mengandung normal flora bakteri¹. Salah satunya adalah *Staphylococcus aureus*.

Bakteri ini adalah bakteri kokus Gram positif yang dalam banyak kasus ditemukan menyebabkan infeksi di permukaan kulit maupun di dalam paru-paru. Polusi timbal di alam tidak hanya berpengaruh pada manusia itu sendiri, namun juga pada bakteri normal flora yang hidup secara simbiosis dengan manusia². Oleh karena itu *Staphylococcus aureus* yang hidup di alam atau dikulit manusia rawan terhadap paparan polusi timbal dan rawan terjadi mutasi yang menyebabkan resistensi, oleh karena itu adalah alasan mengapa bakteri tersebut dipilih.

Paparan logam berat diketahui dapat menyebabkan terjadinya kerusakan DNA (DNA damage) yang oleh bakteri akan direspon dengan diaktifkannya *SOS-response*³. *SOS-response* ini akan menyebabkan terjadinya mutasi via aktivasi dari *DNA polymerase VI* yang bersifat *error-prone*⁴. Sehingga banyak terjadi *missense* dari susunan basa nukleotida pada DNA. Hal ini diduga merupakan bagian dari adaptasi bakteri terhadap bahan toksik yang dapat berpengaruh terhadap fase lag pertumbuhan dari bakteri⁵.

Adaptasi dari bakteri dapat dilihat dari perubahan-perubahan fase pertumbuhan khususnya fase lag, dimana dalam hal ini fase lag diduga berpengaruh terhadap tingkat resistensi atau toleransi terhadap antibiotik⁶. Fase lag sendiri adalah tahap paling awal dari siklus pertumbuhan bakteri dan dapat menentukan pada kinetika pertumbuhan bakteri⁷. Adaptasi dari lingkungan baru akan disertai perubahan atau pemanjangan fase lag. Terjadinya suatu pemanjangan fase lag dapat menunjukkan bahwa bakteri tersebut mengalami suatu masa adaptasi, yakni dengan cara bermutasi. Dimana mutasi merupakan salah satu cara penyebab dari resistensi antibiotika⁸.

Kemudian fase lag yang memanjang ini juga

diyakini terlibat dalam degradasi bahan yang bersifat toksik pada bakteri dan hal lain yang dapat mengganggu pembelahan bakteri yang dipengaruhi oleh banyak faktor⁹. Namun, perubahan fase lag pada paparan timbal masih belum pernah dilakukan.

Penelitian akan melihat apakah bakteri-bakteri yang tersebut akan memiliki resistensi atau toleransi terhadap antibiotik-antibiotik dari berbagai golongan atau dengan mekanisme kerja yang bervariasi. Dengan cara memaparkan bakteri tersebut dengan logam timbal kemudian pada bakteri yang resisten terhadap timbal dan mengalami pemanjangan fase lag. Hal ini dilakukan dengan paparan terhadap antibiotik, antibiotik tersebut antara lain *Amoxicillin*, *Chloramphenicol*, *Tetrasiklin*, *Trimetrophim sulfamethoxzole*, dan *Meropenem*.

Antibiotik tersebut dipilih karena memiliki tempat kerja yang berbeda-beda, yakni di dinding sel, di ribosom, dan metabolisme pada sintesis DNA. Selain itu antibiotik-antibiotik diatas juga sering dipakai dalam mengobati infeksi *Staphylococcus aureus* dan dalam beberapa waktu kebelakang ini dikhawatirkan terjadi resistensi pada jenis jenis antibiotik tersebut.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk eksperimental dengan metode *in vitro*, dengan menguji apakah bakteri yang mengalami pemanjangan fase lag akan terjadi *cross resistance* terhadap antibiotik. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, pada bulan Maret 2021

Sampel Penelitian

Sampel yang akan diuji adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapatkan pada laboratorium mikrobiologi FK UNISMA dan logam timbal nitrat yang dibeli pada FMIPA UIN Malang

Inokulasi Bakteri untuk Stok

Bakteri diambil dari isolasi 3-4 koloni, lalu dicampurkan dengan 2 ml *Normal Saline* pada tabung reaksi dan dilakukan sentrifugasi kedalam hingga menjadi suspensi lembut. Lalu dibandingkan dengan 0,5 *standard Mc Farland*, jika terlalu keruh maka ditambah *Normal Saline*, jika terlalu jernih ditambah bakterinya. Jika sudah didapatkan sesuai standar maka sudah didapat bakteri sejumlah 10^8 CFU/ml. Kemudian dilanjutkan dengan pengenceran 1:10 sebanyak 4 kali hingga didapatkan sampel 10^4 CFU/ml.

Preparasi Logam Berat ke *Wellplate*

Logam berat Pb konsentrasi 1000 ppm sebanyak 5 ml disiapkan, kemudian dilanjutkan dengan disiapkan tabung reaksi steril lain berisi aquabidest 3 ml untuk dilakukan pengenceran. Pengenceran dilakukan dengan cara diambil 3 ml logam timbal dan di masukkan pada tabung reaksi yang berisi aquabidest lalu di vortex. Dari situ didapatkan stok logam berat 500 ppm sejumlah 6 ml. Kemudian diencerkan sampai didapatkan 6 dosis bertingkat mulai dari yang tertinggi ke terendah yakni 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,6 ppm, 7,8 ppm, 3,9 ppm, 1,95 ppm.

Pembuatan LB 4x, MHA dan LB 1x

MHA media terbaik untuk pemeriksaan sensitivitas tes salah satunya pada bakteri. Dalam hal ini dibuat sesuai dosis yang tertera sebanyak 38 g dalam 1 liter *aquadest*. Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri adalah media LB (Lactose brooth) dan dibuat sesuai dengan petunjuk dari produsen, yakni sebanyak 13 g/L. Untuk pertumbuhan bakteri dengan paparan logam berat digunakan LB 4x (LB 52 g/L). Media dibuat dengan menimbang serbuk dan ditambahkan *aquadest* kemudian dipanaskan dengan *hotplate* hingga larut, dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses pemanasan selesai LB 4x, LB 1x disimpan dan digunakan untuk *plating* pada *wellplate* dan MHA untuk cawan petri.

Proses *Plating* ke Dalam *Wellplate*

Media LB 4x sebanyak 50 µl dimasukkan keseluruhan sumuran *wellplate*. Akan dibuat 4 kelompok yakni:

- Kelompok 1 adalah kontrol media (50 µl media dan 150 µl aquabidest)
- Kelompok 2 adalah kontrol logam Pb (50 µl media dan 150 µl logam Pb berbagai dosis)
- Kelompok 3 adalah kontrol bakteri (50 µl media dan 150 µl bakteri *S.aureus*)
- Kelompok 4 adalah kelompok percobaan (50 µl media, 50 µl logam Pb berbagai dosis dan 100 µl bakteri)
- Dimasukkan logam Pb dan bakteri sesuai dengan ketentuan kelompok diatas menggunakan mikropipet 50-200 µl.

Pengambilan Data Pada Spektrofotometri

Wellplate yang telah berisi campuran bakteri dan logam berat Pb dengan konsentrasi tertentu dibaca pada 600nm dengan spektrofotometri dalam menit ke 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, jam ke 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, dan 24. Dilakukan pengulangan 3 kali dalam pembacaan 600nm dengan menggunakan spektrofotometri.

Inokulasi Bakteri pada Media Agar

Hasil dari spektrofotometri pada bakteri yang mengalami pemanjangan fase *lag* dilakukan penyetaraan dengan penambahan LB untuk membuat

penyetaraan konsentrasi 0,1 dalam *efendoff* untuk kemudian di vortex.

Pemberian Cakram Antibiotik

Cakram antibiotik *Amoxicillin*, *Trimetropim sulfathomexazole*, *Tetrasiklin*, *Meropenem*, dan *Kloramfenikol* ditaruh dalam cawan petri, setelah itu diinkubasi selama 24 jam, ditetaskan LB 1x sebanyak 20-50 µl tepat diatas masing-masing antibiotik untuk nutrisi dari bakteri pada hari kedua.

Pengambilan Data ZOI

Diukur diameter dari zona inhibisi dari masing-masing antibiotik dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan centimeter untuk mengambil data pada 24 jam dan 48 jam setelah pemaparan antibiotik untuk selanjutnya di proses datanya menggunakan *Saphiro wilk* untuk mengetahui normalitas dan homogenitas. Jika data normal dan homogen dilanjutkan dengan *Anova oneway* dengan *SPSS*, apabila data yang didapatkan tidak homogen maka akan dilakukan uji non parametrik dengan menggunakan *Kruskal wallis*

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Hasil Pengujian Pemaparan Logam Timbal (Pb) pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pemaparan logam timbal dengan beberapa konsentrasi Pb yang berbeda pada bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan pada *wellplate*, diinkubasi pada suhu 37° C dan dilakukan pengamatan pertumbuhan secara tidak langsung menggunakan *spektrofotometri* dengan panjang gelombang 600 selama 24 jam. Absorbansi dari bakteri dilakukan pencatatan pada menit ke 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 dan jam ke 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, dan 24. Sehingga didapatkan kurva pertumbuhan pada bakteri dengan dan tanpa perlakuan yang dapat dilihat pada gambar 1.

Hasil absorbansi *Staphylococcus aureus* tanpa paparan logam Pb menghasilkan kurva pertumbuhan normal, yang terdiri dari fase *lag*, *log* dan stasioner, sedangkan fase *death* atau fase kematian tidak didapatkan. Bakteri kontrol memiliki absorbansi awal sebesar $0,12 \pm 0,012$. Bakteri kontrol mengalami fase *lag* hingga 6 jam, kemudian masuk ke fase *log* (dengan kriteria absorbansi di atas 0,15) dari jam ke 8 hingga jam ke 12. Selanjutnya, bakteri tersebut akan mengalami fase stasioner. Absorbansi maksimal pada bakteri kontrol adalah $0,596 \pm 0,05$ yang dicapai pada jam ke 24.

Kurva pertumbuhan pada pemaparan logam Pb tiga dosis terendah, yakni dosis 1,95 ppm, 3,9 ppm dan 7,8 ppm, mengalami pemanjangan fase *lag* hingga 12-14 jam. Pada paparan Pb dengan dosis 7,8 ppm, fase *log* dimasuki setelah jam ke 14 dan mencapai fase stasioner pada jam ke 18 hingga 20 jam. Absorbansi maksimal adalah $0,325 \pm 0,02$, yang dicapai pada jam ke 24. Pada dosis 3,9 ppm dan 1,95 ppm, fase *log* terjadi diatas jam ke 12 hingga 16 – 18 jam, dan kemudian memasuki fase

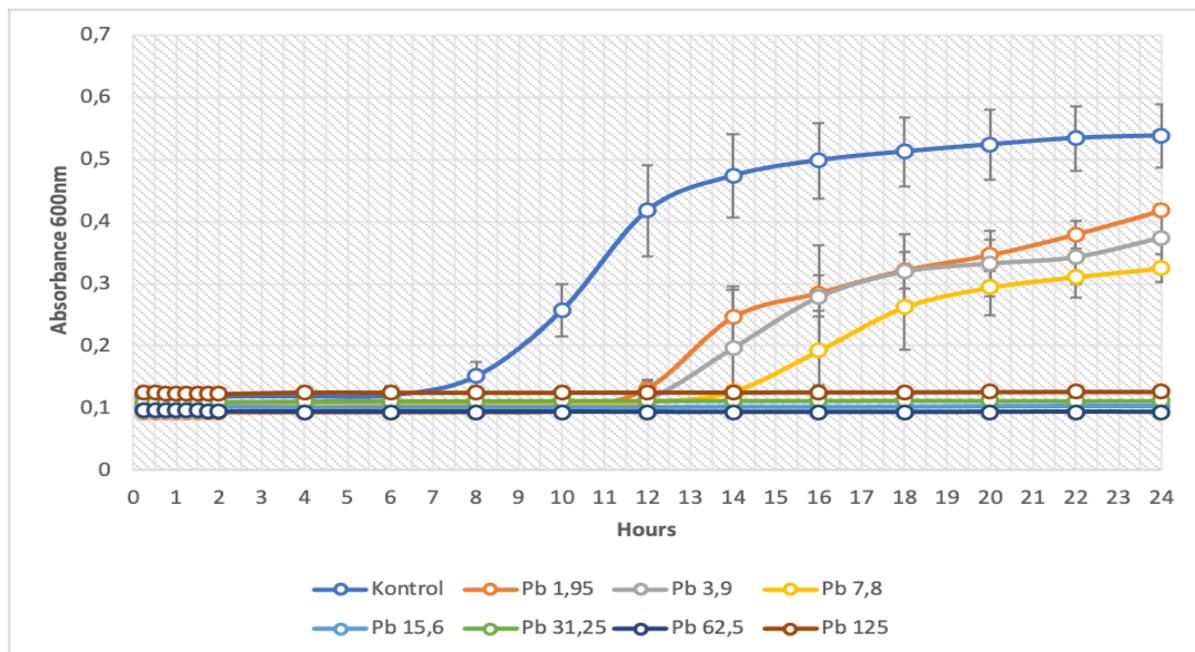
stasioner. Absorbansi maksimal untuk dosis 3,9 ppm adalah $0,374 \pm 0,05$, dan untuk dosis 1,95 ppm adalah $0,410 \pm 0,004$, keduanya dicapai pada jam ke 24 dapat dilihat pada gambar 2.

Hasil statistik yang dilakukan pada uji Non parametrik *Kruskal wallis* didapatkan hasil yakni pada jam ke 8 yang dilihat pada masing-masing dosis terdapat abnormalitas dengan *p-value* kurang dari alfa (0,05) mulai dari jam ke 8 sampai jam ke 24, abnormalitas ini berasal dari kelompok kelompok bakteri dengan paparan logam Pb dibandingkan dengan bakteri kontrol.

Sementara, pada bakteri yang terpapar logam berat Pb pada dosis 15,6, 31,25, 62,5, dan 125 ppm

diindikasikan mengalami kematian karena tidak menunjukkan kurva pertumbuhan yang normal, dimana tidak didapatkan kurva fase log maupun fase stasioner dengan tingkat absorbansi yang relatif tetap selama 24 jam. Pada dosis Pb tersebut, bakteri tidak mengalami peningkatan pertumbuhan yang dilihat dari tidak berubahnya absorbansi dari absorbansi awal, yakni 0,097 – 0,12.

Pada paparan Pb 1,95 menunjukkan angka *LE* (*Lag Ekstension*) sebesar 1,5. Pada Pb 3,9 dan 7,8 ppm menunjukkan angka 1,75 dan 2, sedangkan pada dosis selanjutnya menunjukkan angka 3 dapat dilihat pada tabel 1.



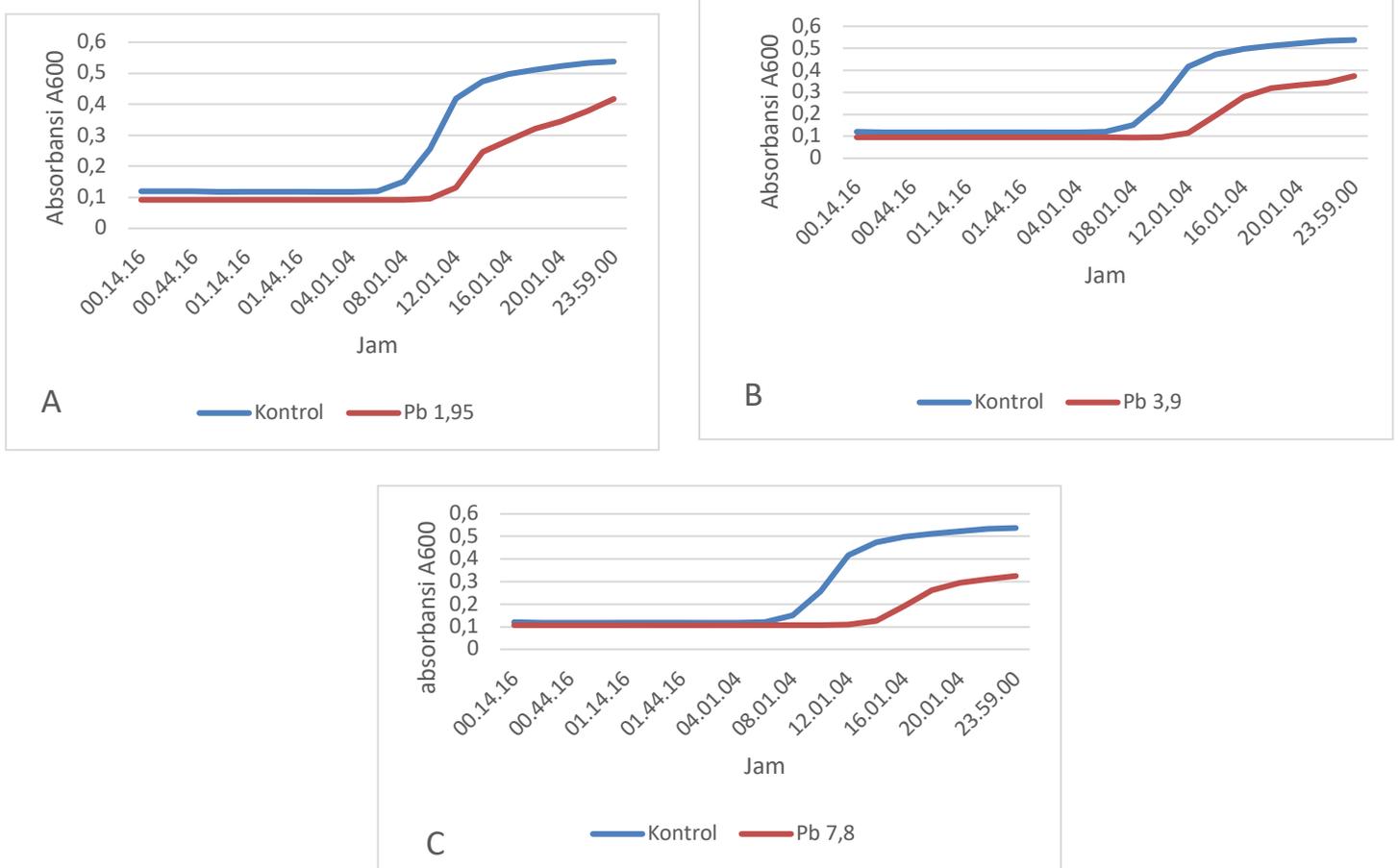
Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Kontrol dan Perlakuan *Staphylococcus aureus*

Keterangan: Abnormalitas *p-value* dimulai pada jam ke 8 pada bakteri perlakuan

Tabel 1. Perhitungan *Lag Extension* (LE) Berdasarkan Rumus Li et al, 2016

Dosis (ppm)	λ_c (jam)	λ_0 (jam)	LE= λ_c/λ_0
Pb 1,95	12	6	2
Pb 3,9	12	6	2
Pb 7,8	14	6	2,3
Pb 15,6	24	6	4
Pb 31,25	24	6	4
Pb 62,5	24	6	4
Pb 125	24	6	4

Keterangan: λ_c Fase lag bakteri perlakuan, λ_0 Fase lag bakteri kontrol



Gambar 2. Kurva pertumbuhan Perbandingan Fase Lag Bakteri Perlakuan dan Kontrol

Keterangan: Selain 3 dosis diatas bakteri tidak mengalami pemanjangan fase lag dan diindikasikan ma

Uji Sensitivitas Antibiotik terhadap *Amoxicillin*, *Kloramfenikol*, *Meropenem*, *Tetrasiklin*, dan *Trimetropim* pada Bakteri yang Terpapar Dosis Pb

Pada bakteri yang telah mengalami pemanjangan fase lag, yakni pada paparan tiga dosis Pb terendah 7,8 ppm, 3,9 ppm, 1,95 ppm, dilakukan inokulasi pada cawan petri untuk diuji sensitivitasnya terhadap beberapa jenis antibiotik, yakni *Amoxicillin*, *Kloramfenikol*, *Meropenem*, *Tetrasiklin*, dan *Trimetropim sulfathometoxazole*. Uji yang sama

dilakukan pada bakteri kontrol sebagai pembandingan. Kemudian perbandingan terakhir dilakukan pada bakteri perlakuan dengan dosis yang sama dengan antibiotik yang sama pada inkubasi 24 dan 48 jam. dengan pengukuran dalam milimeter yang diukur diameter dari masing masing dari ke 5 antibiotik tersebut dengan jangka sorong, yang kemudian hasil dari pengukuran masing masing sensitivitas antara bakteri perlakuan dan bakteri kontrol tersebut dapat dilihat hasilnya pada tabel 2.

Tabel 2. Uji Sensitivitas Antibiotik Amoxicillin, Kloramfenikol, Meropenem, Tetrasiklin dan Trimetrophim Sulfamethoxazole pada bakteri *S. aureus* yang dipaparkan dengan dosis Pb 7,8, 3,9, dan 1,95 ppm. Setelah inkubasi 24 dan 48 Jam

Hari 1	Amoxicillin (mm)	Kloramfenikol (mm)	Trimetrophim Sulfamethoxazole (mm)	Tetrasiklin (mm)	Meropenem (mm)
Kontrol	39,1 ± 1,1	23,8 ± 3,2	23,7 ± 1,7	31,16 ± 0,8	33,5 ± 2,2
7,8 ppm	35,9 ± 6,2	24,16 ± 3,5 *	23,6 ± 1,5 *	29,87 ± 0,5 *	36,7 ± 4,4 *
3,9 ppm	27,8 ± 1,4 *	21,7 ± 3,2	23,13 ± 2,01	25,6 ± 5,4	33,3 ± 3,9
1,9 5ppm	30,3 ± 2,08 *	21,1 ± 1,5 *	21,6 ± 1,7	30,8 ± 4,2	32,6 ± 2,9 *

Hari 2	Amoxicillin (mm)	Kloramfenikol (mm)	Trimetrophim Sulfamethoxazole (mm)	Tetrasiklin (mm)	Meropenem (mm)
Kontrol	40,9 ± 5,2	21,13 ± 3,3	18,7 ± 4,9	29,6 ± 8,5	31,4 ± 1,3
7,8 ppm	38,2 ± 5,3	11,8 ± 3,14 *	13,4 ± 4,13 *	22,5 ± 2,4 *	30,6 ± 0,5 *
3,9 ppm	42,4 ± 1,2 *	17,9 ± 8,05	16,8 ± 6	20,3 ± 1,5	32,7 ± 4,04
1,95 ppm	51,4 ± 5,3 *	29,8 ± 5,4 *	27,06 ± 6,1	35,2 ± 7,8	31,4 ± 1,3 *

Keterangan : pengulangan dilakukan 3 kali dan ditulis dalam rata-rata, (*) merupakan hasil dari Wilcoxon test dengan hasil $p\text{-value} \leq 0,1$ pada bakteri perlakuan dengan dosis yang sama dan antibiotik yang sama pada inokulasi 24 dan 48 jam

Pada bakteri dengan paparan logam timbal 7,8 ppm, 3,9 ppm dan 1,95 ppm tidak ada perbedaan signifikan ($p > 0,5$) antara masing masing antibiotik dibandingkan dengan kontrol, akan tetapi dalam beberapa kasus yang terjadi di bakteri perlakuan dengan dosis paparan 7,8 ppm pada antibiotik seperti *Amoxicillin*, *Kloramfenikol* dan *Meropenem* kemudian *Tetrasiklin* pada dosis 3,9 dan 1,95 ppm memiliki standart deviasi yang lebih dari 10 % yang diakibatkan penurunan sensitivitas yang signifikan yang mengarah pada resistensi antibiotik pada salah satu pengulangannya, meskipun hasil dari statistiknya menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan.

Pada hari kedua terjadi penurunan sensitivitas antibiotik yang mengarah pada terjadinya toleransi antibiotik dimana hal ini ditandai dengan abnormalitas hasil dari statistik dengan $p\text{ value} \leq 0,1$ pada beberapa jenis antibiotik dan dari beberapa dosis yang berbeda seperti halnya pada dosis 7,8 ppm terjadi penurunan sensitivitas antibiotik pada *Kloramfenikol*, *Trimetrophim sulfamethoxazole* *Tetrasiklin* dan *Meropenem*, hanya *amoxicillin* yang tidak terjadi toleransi antibiotik.

Selanjutnya pada dosis paparan 3,9 ppm timbal yang mana terjadi penurunan sensitivitas antibiotik pada *amoxicillin* dan untuk dosis paparan 1,95 ppm terjadi peningkatan sensitivitas antibiotik pada *Amoxicillin* dan *Kloramfenikol*.

PEMBAHASAN

Fase Pertumbuhan pada Bakteri yang Terpapar dan Tidak Terpapar Timbal

Bakteri diketahui tumbuh dalam beberapa fase. Pertumbuhan bakteri diartikan sebagai peningkatan jumlah sel bakteri melalui pembelahan *binary* sel yang memerlukan reaksi-reaksi biokimiawi¹⁰. Dalam semua pembelahan bakteri terdapat empat fase yaitu fase *lag*, fase *log*, fase *stasioner*, dan fase kematian. Fase lag adalah fase persiapan dari bakteri dimana bakteri tidak mengalami perubahan jumlah. Fase log adalah fase pertumbuhan dari bakteri yang ditandai dengan peningkatan jumlah sel bakteri secara *eksponensial*. Fase *stationary* adalah fasedimana pertumbuhan dan kematian dari bakteri adalah sama. Fase kematian adalah fase yang ditandai dengan turunnya jumlah sel bakteri secara signifikan¹⁰.

Pada fase lag akan terjadi peningkatan ekspresi gen, atau upregulasi dari gen yang akan digunakan untuk replikasi bakteri, sintesis dari membran sel, dan proses *transkripsi* dan *translasi*. Pada beberapa penelitian ditemukan bahwa terjadi peningkatan ekspresi gen-gen yang menyandi protein yang diperlukan untuk replikasi DNA pada 20 menit pertama fase lag, seperti *RNA polymerase*, *biosynthesis Fatty*

acid, *metabolisme nukleotida*, *ribosome*, *LPS Biosynthesis*, dan *metabolisme gula nukleotida*. Bakteri juga melakukan *uptake* fosfat yang esensial untuk bakteri sebagai komponen pembentuk membran *fosfolipid*, *asam nukleat* dan *nukleotida* dari bakteri¹¹.

Selain untuk persiapan pembelahan sel, pada fase lag juga diketahui terjadi peningkatan ekspresi dari gen-gen yang menarik beberapa jenis logam. Pada fase lag beberapa jenis logam ditemukan meningkat konsentrasinya seperti Besi (Fe), Mangan (Mg), dan Kalsium (Ca), yang diperantai oleh *siderofor Fe-S* dan transporter *sitABCD*¹¹. Logam adalah salah satu mikronutrien yang dibutuhkan oleh bakteri, tetapi di sisi lain logam ini harus berada dalam kadar yang sangat rendah, karena pada konsentrasi yang tinggi berubah menjadi radikal bebas pada bakteri dan bersifat toksik¹¹.

Akibat yang dapat muncul dari akumulasi bahan toksik adalah kerusakan dari DNA. Hal ini terutama disebabkan oleh elektron bebas yang ditemukan pada berbagai radikal, yang akan menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA. Logam Pb diketahui akan menginisiasi reaksi rantai dan menghasilkan oksidan, sehingga terjadi peningkatan stres oksidatif dan menyebabkan kerusakan DNA⁴. Pada ada fase lag akan terjadi adaptasi dari bakteri terhadap lingkungan sekitarnya, sebelum bakteri memasuki kurva pertumbuhan fase eksponensial. Pada saat terjadi kerusakan DNA pada fase lag, akan terjadi suatu proses *DNA Repair* yang berupaya untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi⁷.

Kerusakan DNA (*DNA damage*) akan memicu teraktivasinya *SOS-response* melalui ikatan antara fragmen DNA dengan protein *recA*⁴. Aktivasi dari *SOS-response* akan aktifnya 30 – 40 gen yang memiliki fungsi-fungsi tertentu dalam *DNA Repair*, yang akan mengaktifasi beberapa enzim *DNA polymerase* yang bersifat *error-prone* antara lain *DNA polymerase II (polB)*, *IV (dinB)* dan *V (umuC dan umuD)*¹². Peranan dari enzim-enzim ini adalah untuk memperbaiki kerusakan DNA yang terjadi, namun, di sisi lain akan terjadi peningkatan dari *mutation rate* (laju mutasi) yang berakibat terjadi diversitas genetik dan kemampuan bakteri untuk beradaptasi dengan lingkungan yang tidak mendukung pertumbuhannya³.

Hal ini sesuai dengan penemuan pada penelitian ini, dimana terjadi pemanjangan fase lag yang seiring dengan peningkatan dosis dari Pb. Timbal (Pb) adalah suatu logam berat yang tidak diperlukan oleh bakteri, namun akan di *uptake* oleh bakteri pada saat berada di lingkungan karena memiliki elektron valensi²⁺ sama seperti Fe, Mg, Ca yang di *uptake* oleh transporter dan *siderophore* bakteri sebagai akibat dari *molecular mimicry* karena memiliki elektron valensi yang sama¹³.

Jalur lain yang akan teraktivasi akibat elektron valensi ini berkaitan dengan salah satu mekanisme respons stres yang digunakan oleh beberapa jenis bakteri, yaitu adalah akumulasi dari *alarmone*, yakni *guanosin penta- atau tetra-fosfat* yang biasa disebut

sebagai *(p)ppGpp*¹⁴. Dalam kondisi yang kurang baik atau terjadi *uptake* timbal yang berlebihan menyebabkan bakteri mengalami *iron starvation*¹⁴. Selain Sebagai pengatur pusat respon stres bakteri, *alarmone* juga terlibat dalam pembentukan biofilm, virulensi, toleransi antibiotik dan resistensi pada bakteri¹⁴. *Second messenger* ini akan meregulasi ulang untuk mengatur kembali *metabolisme* dan *fisiologi* dengan memodulasi pertumbuhan seperti *transkripsi*, *translasi*, dan siklus sel secara terkoordinasi yang mengakibatkan pertumbuhan bakteri menjadi terjeda atau terjadi pemanjangan fase lag¹⁴.

Pemanjangan fase lag adalah awal dari mutasi sebuah bakteri, hal ini dikarenakan fase lag yang memanjang mengindikasikan bakteri tersebut terpapar zat toksin ataupun ada kerusakan dari entah itu dari dalam tubuh bakteri atau dari luar bakteri⁶. Berdasarkan dari beberapa literatur disebutkan bahwa logam timbal adalah salah satu zat toksin bagi bakteri. Dimana pada penelitian ini pemaparan logam Pb yang dilakukan pada bakteri *S. aureus* menyebabkan terjadinya perubahan yakni pada dosis 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,6 ppm yang dipaparkan pada *S.aureus* menyebabkan bakteri tersebut diperkirakan mati yang diperkuat dengan kurva pertumbuhan bakteri tersebut stagnan yang dicirikan dengan nilai absorbansi spektrofotometri dari bakteri tidak naik dalam waktu 24 jam¹⁰. Sementara pada dosis 7,8 ppm, 3,9 ppm, 1,95 ppm mengalami pemanjangan fase lag.

Perbandingan pemanjangan fase lag pada penelitian ini menemukan bahwa semakin tinggi dosis timbal maka semakin memanjang pula fase lagnya, atau dengan kata lain semakin tinggi dosis timbal, semakin tinggi *stressor* terhadap bakteri tersebut yang menyebabkan lebih lamanya bakteri dalam melakukan adaptasi dari bakteri terhadap kondisi lingkungan yang memberi tekanan pada bakteri¹⁵.

Aktivasi dari respon SOS akan menyebabkan peningkatan diversitas genetik dari bakteri dan peningkatan kemampuan adaptasi bakteri terhadap lingkungan yang kurang mendukung. Salah satu akibat dari mutasi bakteri adalah munculnya sifat resisten atau toleransi terhadap antibiotik. Hal ini juga ditemukan pada aktivasi dari *alarmone*, dimana *alarmone* tersebut juga akan meregulasi sifat resisten atau toleransi terhadap antibiotik pada bakteri.

Pengaruh Pemanjangan Fase Lag Pada Bakteri yang Terpapar Pb Terhadap Sensitivitas Bakteri Terhadap Antibiotik

Resistensi antibiotik adalah keadaan dimana tidak terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri pada pemberian antibiotik secara sistemik dengan dosis normal yang seharusnya atau kadar hambat minimalnya¹⁶. Timbulnya resistensi terhadap suatu antibiotika terjadi berdasarkan salah satu atau lebih mekanisme seperti, bakteri mensintesis suatu enzim inaktivator atau yang akan mendegradasi antibiotika yang masuk ke dalam sel bakteri atau berada di luar sel bakteri, bakteri akan mengubah permeabilitasnya

terhadap obat, bakteri akan menghasilkan suatu pompa yang akan mengeluarkan antibiotik yang ada di dalam sel, dan bakteri membuat suatu perubahan struktur reseptor yang akan menjadi target dari antibiotik tersebut, menjadi bentuk L ("*L-form*") atau *sferoplas* sehingga bakteri menjadi *impermeabel* terhadap antibiotik. Bakteri mensintesis perubahan jalur metabolik yang langsung dihambat oleh obat. Bakteri mengembangkan perubahan enzim yang tetap dapat melakukan fungsi metabolismenya meskipun tetap di papari oleh obat dari pada enzim pada bakteri yang rentan¹⁶.

Dalam penelitian ini terjadi perubahan sensitivitas dari bakteri terhadap beberapa antibiotik yang dibandingkan dengan kontrol, yang terlihat dari terjadinya penurunan diameter zona hambat. yakni pada salah satu sampel yang diuji dengan pemberian antibiotik *amoksisilin* dan *meropenem* pada bakteri yang terpapar logam timbal dengan dosis 7,8 ppm. Selanjutnya pada salah satu sampel yang diuji dengan *tetrasiklin* dan *kloramfenikol* pada bakteri yang di papara logam Pb dengan dosis 3,9 ppm pemberian *tetrasiklin* pada bakteri yang dipapari logam Pb dengan dosis 1,95 ppm. Penurunan sensitivitas ini tidak terjadi pada semua dosis akan tetapi beberapa dari pengulangan saja, dapat dilihat dari standart deviasi yang cukup tinggi dari beberapa antibiotik seperti yang disebutkan tadi.

Selain ditemukan penurunan sensitivitas yang mengarah pada resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik, juga didapatkan beberapa bakteri mengalami toleransi antibiotik, yang dilihat dari perbandingan zona bening pada inkubasi 24 jam dengan 48 jam. Toleransi antibiotik adalah kemampuan bakteri yang rentan terhadap antibiotik untuk hidup dalam waktu yang lama pada paparan antibiotik¹⁷. Apabila bakteri tidak memiliki toleransi terhadap suatu antibiotik, data zona hambat yang diamati akan mengalami peningkatan dari hari pertama ke hari ke dua¹⁷.

Sedangkan, pada bakteri yang mengalami toleransi terhadap antibiotik, zona hambat yang diamati akan mengalami penurunan dari hari pertama ke hari ke dua seperti contohnya yang terjadi pada bakteri pada perlakuan penelitian ini pada dosis 7,8 ppm, 3,9 ppm, 1,95 ppm yang hampir pada semua jenis antibiotik mengalami toleransi entah satu atau beberapa jenis antibiotik.

Pada penelian ini ditemukan bahwa tidak semua dosis ulangan terjadi resistensi, yang dibuktikan pada beberapa dosis paparan logam Pb dengan tiga kali ulangan pada sampel kemungkinan hanya 1 dari 3 sampel atau 2 dari 3 sampel uji yang mengatrah pada resistensi dan toleransi antibiotik. Penyebab hal tersebut dikarenakan mutasi yang terjadi tidak terarah sehingga sifat yang didapatkan juga akan acak, sehingga tidak semua sampel uji tidak akan mendapatkan mutasi yang sama. Hal ini diduga berkaitan erat karena kurangnya pengulangan yang dilakukan, untuk penelitian berikutnya dapat digunakan pengulangan yang lebih banyak dan dosis serta antibiotik yang lebih spesifik

untuk melihat *mutation rate* akibat paparan logam Pb tersebut.

KESIMPULAN

1. Paparan logam Pb dengan dosis 1,95 ppm, 3,9 ppm, 7,9 ppm menyebabkan terjadinya pemanjangan fase lag pada bakteri
2. Hasil dari statistik, bakteri yang mengalami pemanjangan fase lag tidak memiliki perbedaan tingkat sensitivitas yang berbeda dibandingkan bakteri kontrol pada pengujian masing masing antibiotik
3. Paparan logam Pb diduga menyebabkan mutasi acak yang berakibat terjadinya resistensi antibiotik pada salah satu dari tiga pengulangan antibiotik *amoxicillin* dan *meropenem* pada dosis 7,8 ppm, *tetrasiklin* dan *kloramfenikol* pada dosis 3,9 ppm dan *tetrasiklin* pada dosis 1,95 ppm
4. Pengamatan Zona Hambat pada 48 jam pasca pemasangan caktam antibiotik diketahui bahwa terjadi toleransi antibiotik pada dosis 7,8 ppm di semua jenis antibiotik kecuali *amoxicillin*
5. Pengamatan Zona Hambat pada 48 jam pasca pemasangan caktam antibiotik diketahui bahwa terjadi toleransi antibiotik pada dosis 3,9 ppm pada antibiotik *kloramfenikol*, *trimetropim sulfathomethoxazole*, dan *tetrasiklin*

SARAN

1. Pengulangan dilakukan lebih banyak untuk melihat rasio resistensi, toleransi, normal pada Pb 7,8 ppm terhadap antibiotik *meropenem* dan *amoxicillin tetrasiklin* dan *kloramfenikol* pada dosis 3,9 ppm dan *tetrasiklin* pada dosis 1,95 ppm
2. Pada paparan dosis Pb yang mengalami fase lag perlu dilakukan pengamatan zona hambat lebih dari 24 jam, hingga 48 atau 72 jam untuk melihat lebih jauh mengenai tingkat toleransi dari bakteri.
3. Menghitung produksi atau konsentrasi (*pppGpp*) pada bakteri yang terpapar logam berat Pb.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada Kedua orang tua dan teman teman serta dosen pembimbing yang turut andil dalam proses penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA:

1. Gunawan G. Tingkat Pencemaran Udara Debu Dan Timbal Di Lingkungan Gerbang Tol (Air Pollution Levels of Dust and Lead At the Toll Gate). J Kesehat LignKeyungan Pus Litbang Jalan dan Jemb. 2015;3(41):5–13.
2. Chandrangu P, Rensing C, Helmann JD et al. Metal homeostasis and resistance in bacteria. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2017;15(6):338–

50. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>
3. Podlesek Z. The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Aug 4;11:1785. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849403>
 4. Butala M, Klose D, Hodnik V, Rems A, Podlesek Z, Klare JP, et al. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011/05/16. 2011 Aug;39(15):6546–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21576225>
 5. Honsa ES, Cooper VS, Mhaissen MN, Frank M, Shaker J, Iverson A, et al. RelA Mutant *Enterococcus faecium* with Multiantibiotic Tolerance Arising in an Immunocompromised Host. *MBio* [Internet]. 2017 Jan 3;8(1):e02124-16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28049149>
 6. Li X, Gu AZ, Zhang Y, Xie B, Li D, Chen J. Sub-lethal concentrations of heavy metals induce antibiotic resistance via mutagenesis. *J Hazard Mater* [Internet]. 2019;369(September 2018):9–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.006>
 7. F. Brooks M, Karen C. Carrol M, Jahet S. Butel P, Stephen A. Morse P. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 2018. 690-692.e1 p.
 8. Dwiprahasto I. Kebijakan Untuk Meminimalkan Risiko Terjadinya Resistensi. *Jmpk*. 2005;08(04):177–81.
 9. Gikas P, Sengör SS, Ginn T, Moberly J, Peyton B. The effects of heavy metals and temperature on microbial growth and lag. *Glob Nest J*. 2009;11(3):325–32.
 10. Maier RM. Bacterial Growth. 2009;37–54.
 11. Rolfé MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron ADS, et al. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J Bacteriol*. 2012;194(3):686–701.
 12. Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res*. 2011;52(2):115–25.
 13. Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2002 Oct;110 Suppl(Suppl 5):689–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12426113>
 14. Ronneau S, Hallez R. Make and break the alarmone: regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2019 Jul;43(4):389–400.
 15. Azarbad H, van Gestel CAM, Niklińska M, Laskowski R, Röling WFM, van Straalen NM. Resilience of Soil Microbial Communities to Metals and Additional Stressors: DNA-Based Approaches for Assessing “Stress-on-Stress” Responses. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jun 14;17(6):933. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27314330>
 16. Rahayu E, Saintek U, Malik N, Malang I, Jalan G, No, et al. ANTIBIOTIKA, RESISTENSI, DAN RASIONALITAS TERAPI. *J el-Hayah*. 2011 Apr 1;1.
 17. Westblade LF, Errington J, Dörr T. Antibiotic tolerance. *PLoS Pathog*. 2020;16(10):1–7.