

# PEMBERIAN NIKEL MEMPERPANJANG FASE LAG KURVA PERTUMBUHAN NAMUN TIDAK MENURUNKAN SENSITIVITAS *S. aureus* PADA ANTIBIOTIK

Iva Nurdiani, Noer Aini, Rio Risandiansyah\*  
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

## ABSTRAK

**Pendahuluan:** Penggunaan nikel berpotensi mengontaminasi lingkungan dan berpengaruh pada populasi bakteri di alam. Nikel pada dosis tertentu masih digunakan oleh bakteri, namun akan bersifat toksik dan dapat menyebabkan kerusakan DNA yang berpotensi mempengaruhi resistensi antibiotik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dan menguji hubungan antara paparan nikel dan sensitifitas *S.aureus* terhadap antibiotik.

**Metode:** Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental *in vitro* menggunakan bakteri *S.aureus* ( $10^4$  CFU) yang dipaparkan dengan nikel dosis bertingkat yakni 1.95; 3.9; 7.8; 15.6; 31.25; dan 125 ppm selama 24 jam. Fase lag kurva pertumbuhan bakteri dinilai melalui pengukuran tingkat kekeruhan dengan spektrofotometri dengan panjang gelombang OD600nm secara berkala selama 24 jam. Uji sensitivitas antibiotik dilakukan dengan metode *disk diffusion* pada antibiotik standar selama 24 jam (n=3). Hasil dianalisa dengan *Kruskal wallis*, dan *Spearman test* dengan  $p<0,05$  dianggap signifikan.

**Hasil:** Fase lag kurva pertumbuhan bakteri *S.aureus* dipresentasikan dalam bentuk grafik dan dalam pengamatan didapatkan pemanjangan fase lag setelah jam ke 10, 12, dan 14 pada dosis nikel 1,95; 3,9; dan 7,8 ppm. Uji sensitivitas antibiotik trimethoprim, amoxicillin, kloramfenikol, tetrasiklin, dan meropenem tidak didapatkan perubahan yang signifikan. Hal ini diduga terjadi karena tidak semua mutasi dapat menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik.

**Kesimpulan:** Bakteri *S.aureus* mengalami pemanjangan fase lag pada kurva pertumbuhan, namun tidak terjadi penurunan sensitivitas antibiotik.

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

\*Korespondensi:

Rio Risandiansyah

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

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

email: riorisandiansyah@unisma.ac.id

## NICKEL EXPOSURE LENGTHENS THE LAG PHASE OF *S.aureus* GROWTH CURVE BUT WITHOUT DECREASING THE SENSITIVITY OF *S.aureus* TO ANTIBIOTICS

Iva Nurdiani, Noer Aini, Rio Risandiansyah\*  
Faculty of Medicine Universitas Islam Malang

## ABSTRACT

**Introduction:** The use of nickel has the potential to contaminate the environment and affect the bacterial population in nature. Nickel at a certain dose is still used by bacteria, but will be toxic and can cause DNA damage that has a potential to affect antibiotic resistance. The study was conducted to determine and examine the correlation between nickel exposure and the sensitivity of *S.aureus* to antibiotics.

**Method:** This is an *in vitro* experimental study using ( $10^4$  CFU) *S. aureus* bacteria exposed to graded doses of nickel of 1.95; 3.9; 7.8; 15.6; 31.25; and 125 ppm. The lag phase of the growth curve was obtained by measuring bacterial turbidity using a spectrophotometer with a wavelength of OD600nm periodically for 24 hours. Antibiotic sensitivity test was conducted by disk diffusion method against standard antibiotics after 24 hours (n=3). The results were analyzed using the *Kruskal wallis* test and *Spearman test* dan  $p<0.05$  was considered significant.

**Result:** The lag phase of the growth curve of *S. aureus* bacteria was presented in graphical form and it was observed that the lengthening of lag phase was found after 10, 12, and 14 hours of nickel at a dose of 1.95.; 3.9; and 7.8 ppm. The sensitivity test of trimethoprim, amoxicillin, chloramphenicol, tetracycline, and meropenem did not show any significant changes. This is presumably because not all mutations can cause antibiotic resistance.

**Conclusion:** *S.aureus* has a prolong lag phase, but it doesn't decrease the antibiotic sensitivity.

**Keywords:** Antibiotic resistance., Lag phase., Nickel., *Staphylococcus aureus*..

\* Correspondent:

Rio Risandiansyah

Faculty of Medicine, Universitas Islam Malang

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

email: [riorisandiansyah@unisma.ac.id](mailto:riorisandiansyah@unisma.ac.id)

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan penghasil nikel terbesar nomor 2 di dunia, pemanfaatan nikel diberbagai aspek kehidupan membuat manusia rentan terhadap paparan nikel. Nikel dikenal sebagai logam berat yang bersifat karsinogenik, diketahui bahwa kanker paru paru merupakan kanker yang paling banyak diderita baik laki laki maupun perempuan di dunia<sup>1</sup>. Pada tahun 2020, terdapat 2.2 juta kasus baru, dengan negara hungaria sebagai penderita kanker paru paru terbanyak. Kanker paru paru menempati posisi ketiga sebagai kanker yang banyak diderita di Indonesia, dengan jumlah 34.633 (9.2%) kasus. WHO menyatakan bahwa insiden kanker paru paru adalah 12.8%, dengan tingkat mortalitas 11.4%<sup>2</sup>.

Kanker dapat terjadi salah satunya dikarenakan adanya agen karsinogenik yang dapat memicu timbulnya kerusakan DNA yang menginduksi adanya mutasi. Kerusakan DNA pada manusia akan diperbaiki oleh mekanisme *DNA repair system*, namun kerusakan DNA yang diinduksi oleh nikel ini dapat menghambat *DNA repair pathway* yang berakibat pada akumulasi dari DNA yang rusak. Hal ini mengakibatkan adanya penurunan sifat dari DNA rusak ke pada *daughter cell* yang dikenal sebagai mutasi, sehingga berkontribusi terhadap potensi karsinogenesis<sup>1</sup>.

Paparan nikel juga berpengaruh terhadap populasi bakteri di alam, karena dapat menginduksi adaptasi dari bakteri dan mutasi sehingga memiliki kemungkinan memiliki sifat resisten terhadap logam dan antibiotik. Pada penelitian ini, logam berat yang digunakan adalah nikel. Hal ini dikarenakan tidak seperti logam berat lain yang bersifat toksik, nikel masih dibutuhkan dalam kadar tertentu oleh mikroorganisme, namun jika terjadi kegagalan homeostasis akan bersifat toksik. Nikel dapat mempengaruhi fase adaptasi dari bakteri yang dapat tercermin pada fase lag kurva pertumbuhan bakteri. Fase adaptasi ini berkaitan dengan ketahanan bakteri terhadap perubahan lingkungan seperti antibiotik dan logam berat, sehingga penelitian ini berfokus pada fase lag kurva pertumbuhan bakteri *S.aureus*.

Bakteri *S.aureus* merupakan bakteri gram positif yang dapat dijumpai baik di tanah ataupun di air. Pada jurnal yang ditulis oleh Rafiq, dikatakan bahwa bakteri gram positif memiliki sifat tahan terhadap paparan logam berat 94% dibandingkan dengan bakteri gram negatif<sup>5</sup>. Penelitian mengenai efek nikel terhadap fase lag telah dilakukan sebelumnya, namun pada jenis bakteri lain yakni *wild-type E.coli*<sup>6</sup>. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dan menguji hubungan antara paparan nikel dan sensitifitas *S.aureus* terhadap antibiotik. Uji sensitivitas dilakukan untuk mengathui apakah adaptasi bakteri oleh paparan nikel mempengaruhi kinerja antibiotik dengan target yang berbeda-beda ini.

## METODE PENELITIAN

### Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian secara ekspreimental *in vitro* menggunakan bakteri *S. aureus* yang dilakukan pada bulan Maret – April 2021 di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) FK UNISMA.

### Sampel dan Bahan Penelitian

*S. aureus non-pathogenic* dengan strain VT00324 didapatkan dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran FK UNISMA. Sampel Nikel(II)Nitrat MERCK didapatkan dalam bentuk larutan 1000 ppm. Cakram antibiotik Oxoid United Kingdom yakni, kloramfenikol, amoksisilin, meropenem, tetrasiklin, dan trimethoprim didapat dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) FK UNISMA.

### Persiapan Bakteri dan Stok Larutan Kimiawi

Stok bakteri dibuat dengan mengambil koloni bakteri *S.aureus* sebanyak 3 – 4 koloni, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisikan 2 ml NS dan dibandingkan dengan standart McFarland 0,5 sehingga diperoleh bakteri sejumlah 10<sup>8</sup> CFU/ml. Pengenceran bertingkat dilakukan untuk mendapatkan stok bakteri hingga 10<sup>4</sup> CFU/ml<sup>8</sup>. Nikel(II) nitrat dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan sehingga terdapat 7 konsentrasi yakni 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; 31,25 ppm; 15,625 ppm; dan 7,825 ppm ppm<sup>9</sup>. *Mueller Hinton Agar* (MHA) adalah media yang digunakan pada cawan petri, dibuat dengan konsentrasi 15 gram/liter dan dilarutkan dalam aquabides. Media pada *well-plate* menggunakan *Luria Bertani* (LB) dengan konsentrasi 13 gram/liter yang dilarutkan dalam aquabides sebanyak 250 ml<sup>7</sup>.

### Pengukuran Kurva Pertumbuhan

Bakteri, media LB dan nikel diletakkan pada *well-plate* dengan empat pola. Kelompok negatif (1) terdiri dari 50 ul 4xLB dan 150 ul aquabides, kontrol negatif (2) 50 ul 4x LB dan 150 ul nikel, kontrol positif 50 ul 4xLB dan 150 ul bakteri, kelompok perlakuan 50 ul 4x LB , 100 ul bakteri dan 50 ul nikel. Dosis sesuai dengan *serial delusion* dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometri OD 600 nm pada menit ke 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, jam ke 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, dan 24. Nilai rata rata absorbansi tiap jamnya diplotkan dalam bentuk kurva pada Microsoft Excel<sup>8</sup>.

### Uji Sensitivitas Antibiotik

Bakteri yang diduga mengalami pemanjangan fase lag akan diambil dan disetarakan konsentrasinya menjadi 0,1 Au (absorbance unit) dengan menambahkan media LB, kemudian diinokulasikan ke media MHA. Lima cakram

antibiotik yakni amoxicillin, meropenem, tetrasiklin, trimethoprim, dan kloramfenikol diletakkan pada cawan petri. Setelah diinkubasi selama 24 jam, dilakukan pengukuran zona bening (*clear zone*) pada setiap antibiotik menggunakan jangka sorong dengan satuan millimeter (mm) <sup>8</sup>.

### Teknik Analisa Data

Data diperoleh dari nilai absorbansi yang diplotkan ke dalam Ms.Excel yang di uji dengan *Kruskal Wallis* dan *Spearman test* ( $p < 0.05$ ) menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

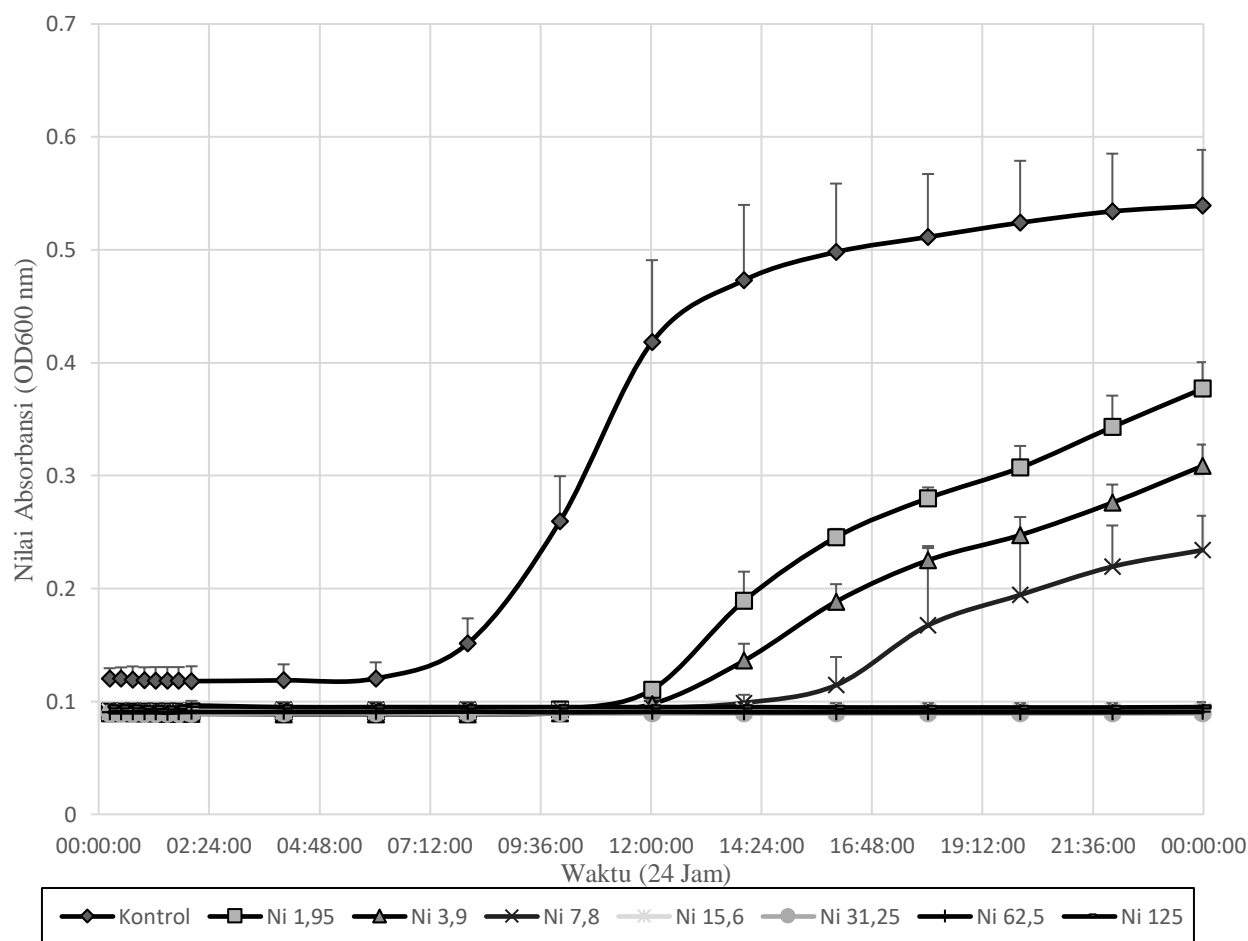
## HASIL DAN ANALISIS DATA

### Hasil Pengujian Pemaparan Logam Berat Nikel (Ni) pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

Kurva pertumbuhan *S.aureus* dapat dilihat pada **Gambar 1** yang terdiri dari fase lag, fase

eksponensial dan peralihan fase stasioner. Pada kelompok kontrol, bakteri *S.aureus* mengalami fase lag 6 jam, fase log berlangsung kurang lebih 4 jam yang dimulai dari jam ke 8 hingga jam ke 12 dan dilanjutkan dengan peralihan ke fase stasioner selama 10 jam. Pada bakteri *S.aureus* dengan pemaparan nikel dosis 1,95 ppm; 3,9 ppm; 7,8 ppm didapatkan pemanjangan berturut turut 4 jam, 6 jam dan 8 jam dibandingkan pada fase lag kelompok kontrol. *S.aureus* mengalami kematian pada dosis nikel 15,6 ppm; 31,25 ppm; 62,5 ppm; dan 125 ppm

Bakteri dikatakan mengalami pemanjangan fase lag jika nilai LE (*Lag Extension*) melebihi 1. Nilai *lag extension* ini didapatkan dengan membagi waktu bakteri yang terpapar logam nikel ( $\lambda_c$ ) berbanding dengan bakteri kontrol ( $\lambda_0$ ) (Li et al., 2016). Perhitungan LE dapat dilihat pada **Tabel 1**. Pada tabel tersebut dapat diketahui bahwa bakteri mengalami pemanjangan fase lag pada semua dosis.



**Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri *S.aureus* dengan Nikel**

**Keterangan :** Perbandingan fase lag antara bakteri kontrol dengan bakteri perlakuan dengan dosis paparan nikel 1,95 ppm (A), 3,9 ppm (B), 7,8 ppm (C), 15,6 ppm; 31,25 ppm; 62,5 ppm; dan 125 ppm (D).

**Tabel 1 Nilai Lag Extension**

Dosis (ppm)	$\lambda c / \lambda 0$ (jam)	LE (jam)
Ni 1,95	10/6	1,6
Ni 3,9	12/6	2
Ni 7,8	14/6	23
Ni 15,6	24/6	4
Ni 31,25	24/6	4
Ni 62,5	24/6	4
Ni 125	24/6	4

**Keterangan:** Bakteri dapat dikatakan mengalami pemanjangan fase lag jika nilai LE (Lag Extension) melebihi 1.

### Hasil Uji Komparasi Sensitivitas *S.aureus* yang Terpapar Nikel pada Antibiotik Standar

Uji sensitivitas *S.aureus* dilakukan dengan mengambil sampel 1,95 ppm; 3,9 ppm; dan 7,8 ppm yang mengalami fase lag, kemudian ditumbuhkan pada media di cawan petri. Uji sensitivitas ini menggunakan lima antibiotik yakni amoxicillin, kloramfenikol, tetrasiklin, meropenem, dan trimethoprim, dilakukan selama 24 jam kemudian diukur diameter ZOI dengan pengulangan tiga kali. Hasil ZOI dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Hasil uji statistik *Kruskal wallis* dan *Wilcoxon test* tidak ditemukan adanya perbedaan

**Tabel 2 Hasil Uji Komparasi Sensitivitas Bakteri *S.aureus* yang Terpapar Nikel pada Antibiotik Standar**

Antibiotik	Kontrol (mm)	1,95 ppm (mm)	3,9 ppm (mm)	7,8 ppm (mm)	<i>p-value</i>
Amoxicillin	40.1 ± 1.4	41.0 ± 3.2	35.5 ± 0.9	34.9 ± 2.6	0.06
Kloramfenikol	25.1 ± 1.7	25.7 ± 0.9	21.2 ± 1.1	22.0 ± 1.2	0.05
Trimetoprim	21.1 ± 0.9	23.8 ± 0.7	23.4 ± 2.2	23.7 ± 0.9	0.1
Tetrasiklin	29.0 ± 0.8	26.2 ± 3.8	29.1 ± 2.8	30.5 ± 2.6	0.4
Meropenem	34.4 ± 1.3	32.6 ± 1.3	29.4 ± 1.1	28.2 ± 9.5	0.09

**Keterangan :** Data telah diuji dengan *Kruskal wallis*,  $p < 0.05$  menunjukkan tidak didapatkan adanya perbedaan yang signifikan, namun didapatkan adanya kecenderungan penurunan diameter ZOI

signifikan antara bakteri yang terpapar nikel dibandingkan dengan kontrol pada semua antibiotik. Namun, pada hasil pengukuran didapatkan kecenderungan penurunan diameter zona bening pada antibiotik amoxicillin, kloramfenikol dan meropenem. Penyempitan diameter zona bening terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi yang ditemukan pada paparan nikel dengan dosis 3,9 ppm dan 7,8 ppm pada antibiotik kloramfenikol, nikel dengan dosis 1,95 ppm; 3,9 ppm; dan 7,8 ppm pada antibiotik amoxicillin dan meropenem.

### Hasil Uji Korelasi Pertumbuhan Bakteri *S.aureus* yang Terpapar Logam Nikel terhadap Sensitivitas Antibiotik

Uji korelasi pertumbuhan bakteri *S.aureus* yang terpapar logam nikel terhadap sensitivitas antibiotik menggunakan *spearman test correlation* dengan nilai signifikansi 0,05 ditunjukkan pada **Tabel 3**. Hasil uji statistik korelasi pertumbuhan bakteri terhadap daya hambat antibiotik memiliki nilai  $p = 0.013$  dan  $r = 0.692$  pada antibiotik amoxicillin dan nilai  $p = 0.026$  dan  $r = 0.636$  pada antibiotik kloramfenikol. Berdasarkan kedua nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa adanya hubungan antara pertumbuhan bakteri dan daya hambat bakteri terhadap antibiotik. Nilai  $r = 0.692$  dan  $r = 0.636$  menandakan korelasi kuat dan positif, sehingga semakin rendah pertumbuhan maksimal bakteri maka semakin rendah daya hambat antibiotik terhadap bakteri atau sebaliknya.

**Tabel 3 Hasil Uji Korelasi Pertumbuhan Maksimal Bakteri *S.aureus* yang Terpapar Logam Nikel terhadap Diameter Zona Hambat Antibiotik**

Diameter Zona Hambat	Pertumbuhan Bakteri	
Amoxicillin	Correlation	0.692
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	0.013
Kloramfenikol	Correlation	0.636
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	0.026
Trimethoprim	Correlation	-0.53
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	0.071
Tetrasiklin	Correlation	-0.34
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	0.269
Meropenem	Correlation	-0.18
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	0.455

**Keterangan:** Uji korelasi dengan nilai signifikansi  $p < 0.05$  dilakukan pada data pertumbuhan maksimal bakteri dan pengukuran diameter ZOI.

## PEMBAHASAN

### Pengaruh Paparan Logam Nikel pada Fase Lag *S. aureus*

Pada penelitian ini didapatkan adanya pemanjangan fase lag bakteri *S.aureus* pada paparan nikel 1,95 ppm; 3,9 ppm; dan 7,8 ppm. Fase lag adalah proses adaptasi dari bakteri ketika terjadi perubahan lingkungan. Faktor-faktor yang diduga mempengaruhi pemanjangan fase lag adalah suhu, pH, dan toksikan<sup>10</sup>. Penelitian yang dilakukan oleh Francois melaporkan bahwa bakteri gram positif *Listeria monocytogenes* mengalami pemanjangan fase lag karena terjadi perubahan temperatur dari 30°C menjadi 14°C dan dalam keadaan asam (pH 5,8). Pada temperatur rendah *Listeria monocytogenes* mengalami proses adaptasi dengan mengubah komposisi membran sel, selain itu keadaan asam membuat bakteri memiliki jumlah proton yang lebih banyak, sehingga membutuhkan waktu untuk mengeluarkan proton agar mencapai pH yang sesuai untuk pertumbuhan (pH 7)<sup>11</sup>. Penelitian mengenai paparan nikel sebagai toksikan terhadap fase lag kurva pertumbuhan bakteri *S.aureus* belum dilakukan.

Pada penelitian ini, bakteri *S.aureus* yang dipaparkan nikel dengan dosis 1,95 ppm; 3,8 ppm; dan 7,8 ppm mengalami pemanjangan fase lag. Hal ini diduga karena nikel sebagai toksikan dapat mempengaruhi adaptasi bakteri dengan cara pengekspresian gen terkait pengambilan fosfat dan Fe, perlambatan siklus sel, dan merubah bentuk nikel menjadi bentuk yang tidak toksik<sup>12</sup>. Pada fase lag, bakteri mengalami peningkatan gen untuk *uptake* fosfat, gen *phoBR* akan mengatur *uptake* fosfat melalui *ATP-binding cassette (ABC) transporter*, yang akan digunakan sebagai komponen membran fosfolipid dan asam nukleat<sup>13</sup>. Sehubungan dengan hal tersebut, *ABC transporter* juga berperan dalam *uptake* dari nikel. Selain itu, bakteri mengendalikan *iron starvation* dengan meningkatkan gen yang berperan terhadap pengambilan zat besi (*fepA* gene) dan *iron-sulfur (sufA* gene), sebagai respon dari jumlah Fe yang menurun karena nikel akan menggantikan ikatan antara Fe dengan beberapa enzim, seperti enzim *aconitase* yang berperan terhadap perubahan sitrat menjadi isositrat pada siklus *tricarboxylic acid*.<sup>6</sup>. Namun, untuk membuktikan hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Alarmone (p)ppGpp merupakan nukleotida *guanosine pentaphosphate and tetrachosphate* yang merupakan efektor ketika terjadi penurunan Fe. (P)ppGpp berkaitan dengan siklus sel pada bakteri pada saat replikasi kromosom yang dapat menghambat transkripsi dari DnaA, sehingga DnaA tidak dapat berikatan dengan *oriC*. Dengan demikian proses inisiasi dan elongasi replikasi tidak dapat dilanjutkan yang berakibat pada penghambatan segregasi kromosom<sup>10</sup>. Tujuan dari penghambatan siklus sel adalah untuk mempersiapkan bakteri terhadap perubahan lingkungan dengan mengatur kembali metabolisme. Hal ini menyebabkan pemanjangan pada fase lag kurva pertumbuhan bakteri<sup>14</sup>.

Bakteri mengubah nikel di luar sel menjadi bentuk nikel sulfida seperti bakteri gram positif *Desulfotomaculum* sehingga dapat menghilangkan toksisitas logam nikel. Sehubungan dengan hal tersebut bakteri *S. aureus* juga dapat memproduksi sulfida, sehingga bakteri berkemungkinan memakai mekanisme ini untuk mengurangi efek toksik dari nikel<sup>15</sup>.

### Pengaruh Paparan Nikel Terhadap Sensitivitas Antibiotik

Hasil uji sensitivitas antibiotik pada bakteri *S.aureus* setelah paparan nikel adalah adanya kecenderungan penurunan diameter zona bening yang terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi pada paparan nikel dengan dosis 3,9 ppm dan 7,8 ppm pada antibiotik kloramfenikol, nikel dengan dosis 1,95 ppm; 3,9 ppm; dan 7,8 ppm pada antibiotik amoxicillin dan meropenem. Hal ini kemungkinan terjadi karena bakteri *S.aureus* mengalami penurunan sensitivitas

tidak signifikan yang diduga mengarah pada resistensi terhadap antibiotik, meskipun hasil pengukuran ZOI belum mencapai standar yang sesuai dengan kategori resisten berdasarkan CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)<sup>16</sup>.

Pada nikel dosis 15,6 ppm; 31,25 ppm; 62,5 ppm; dan 125 ppm bakteri *S.aureus* mengalami kematian. Nikel diduga dapat menginduksi kerusakan DNA yang dapat diperbaiki melalui mekanisme *SOS Response*. Hal ini terjadi karena paparan nikel yang meningkat dapat merusak DNA bakteri. *Dna damage* disebabkan oleh nikel dengan aktivasi ROS (*Reactive Oxygen Species*) melalui mekanisme reaksi fenton. Reaksi fenton terjadi ketika logam<sup>2+</sup> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> berubah menjadi logam<sup>3+</sup> dan OH<sup>-</sup>. Nikel akan berkompetisi dengan Fe karena memiliki elektron valensi yang sama, mekanisme ini juga dikenal sebagai *molecular mimicry*<sup>17</sup>. Dengan demikian Ni<sup>2+</sup> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan menjadi Ni<sup>3+</sup>, OH<sup>-</sup> dan OH<sup>0</sup>, OH<sup>0</sup> inilah yang memiliki sifat radikal. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa *marker oxidative stress* berupa 8-*oxo-dG* (8-hydroxy-20 deoxyguanosine) ditemukan pada bakteri *Bacillus subtilis* setelah terpapar logam berat nikel<sup>18</sup>. Adanya ROS menyebabkan terjadinya kerusakan DNA yang dicirikan dengan terjadinya *double stranded break*<sup>19</sup>.

Usaha bakteri untuk mencegah terjadinya kerusakan DNA melalui pembentukan biofilm, pengekspresian *efflux pump* dan perbaikan DNA dengan *homolog recombination* melalui *SOS response*<sup>19</sup>. Biofilm merupakan kumpulan dari bakteri yang hidup dalam suatu matriks polimerik ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri dan dapat melekat pada suatu permukaan. Nikel diketahui dapat menstimulasi terbentuknya *extracellular polymeric substances* (EPS) dalam jumlah yang banyak untuk mempertahankan dirinya. EPS dapat berikatan dengan logam berat, sehingga dengan terbentuknya biofilm bakteri tetap bertahan dari perubahan kondisi yang terjadi<sup>20</sup>. Proses adaptasi bakteri juga dilakukan dengan memompa logam nikel melalui *efflux pump*. Sebelum dikeluarkan, nikel akan masuk ke dalam bakteri dengan peran *ATP binding cassette* (ABC) *system* salah satunya adalah *NikABCDE* dan merupakan bagian dari *nikel/cobalt transporter family* (NiCoT) yang ditemukan juga pada bakteri *S.aureus*. Nik B dan Nik C merupakan protein transmembran yang dapat membentuk *nickel pore*<sup>21</sup>.

Terjadinya peningkatan jumlah nikel yang masuk dapat merusak DNA bakteri. Kerusakan DNA berkaitan dengan fase lag karena pada fase ini identik dengan fase perbaikan pada komponen subseluler yang mengalami kerusakan dengan menggunakan "*repair program*". Terjadinya *repair program* diinduksi oleh gen yang terkait dengan DNA *repair*<sup>10</sup>. DNA yang mengalami kerusakan akan mengaktifkan *SOS response* yang dipicu ssDNA ketika terjadi *double stranded break*, sehingga terjadi ikatan dengan gen

RecA yang bertindak sebagai induktor untuk membentuk kompleks nukleoprotein. Hal ini akan menyebabkan terjadinya aktivasi dari 50 gen SOS yang kemudian akan memperbaiki kerusakan pada DNA. Ketika kerusakan DNA telah diperbaiki maka gen RecA akan diinaktifkan<sup>22</sup>.

Adanya ekspresi gen-gen dalam *SOS response* ini membantu perbaikan dari *double stranded break* yang diinduksi oleh paparan nikel. Salah satu gen yang berperan adalah RuvA. Ketika terjadi kerusakan pada untai ganda, maka akan diperbaiki dengan *homolog recombination* dengan membentuk formasi DNA baru yang dinamakan *Holliday junction*. Sehubungan dengan hal tersebut, penelitian yang terdahulu menyebutkan bahwa bakteri gram positif *Bacillus subtilis* dan bakteri gram negatif *Shewanella oneidensis* memiliki mekanisme yang sama dalam memperbaiki kerusakan DNA oleh karena paparan nikel yakni dengan *Holliday junction*. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya *upregulasi* dari gen *ruvC/recU* dan *ruvA* yang bertanggung jawab terhadap terjadinya *holliday junction*<sup>19</sup>. Namun mekanisme tersebut belum ditemukan pada bakteri *S.aureus*.

*SOS response* dapat memperbaiki kerusakan DNA, namun *SOS response* ini juga dapat menginduksi perbaikan DNA yang bersifat mutagenik dengan melibatkan *DNA polymerase*. *DNA polymerase* akan aktif hanya ketika terjadi paparan persisten yang menyebabkan kerusakan DNA. Pada jurnal yang dituliskan oleh Qiu, disebutkan bahwa ekspresi gen *umuC* (*DNA polymerase IV*) mengalami peningkatan setelah terpapar oleh logam nikel<sup>19</sup>. Respon ini memungkinkan terjadinya mutasi sehingga dapat menurunkan *nickel pore*, meningkatkan ekspresi *efflux pump* dan juga biofilm. Adanya mutasi pada gen RcnA dapat menyebabkan penurunan ekspresi *nickel import system NikABCDE* yang berakibat pada penurunan *nickel pore* sehingga nikel yang masuk juga menurun<sup>23</sup>. Selain itu mutasi dapat meningkatkan jumlah *efflux pump* golongan MFS (*major facilitator superfamily*) sehingga bakteri terhindar dari efek toksik nikel.

Mekanisme perbaikan DNA dengan *homolog recombination* melalui *SOS response*, pembentukan biofilm, dan pengekspresian *efflux pump* kemungkinan dipakai sebagai proses adaptasi bakteri *S. aureus* ketika ada paparan nikel pada penelitian ini. Proses adaptasi bakteri *S.aureus* terjadi pada paparan nikel dosis 1,95 ppm; 3,8 ppm; dan 7,8 ppm sehingga bakteri membutuhkan waktu yang lebih lama untuk melewati fase lag dibandingkan dengan bakteri kontrol. Pada nikel dengan dosis 15,6 ppm; 31,25 ppm; 62,5 ppm; dan 125 ppm bakteri *S.aureus* mengalami kematian kemungkinan dikarenakan efek toksisitas nikel melalui ROS.

Sensitifitas antibiotik juga dapat dipengaruhi oleh *inoculum effect*, beberapa penelitian menunjukkan bahwa jumlah inokulum mempengaruhi

efektifitas konsentrasi antimikroba. Bakteri *E.coli* dengan jumlah ( $10^5$ CFU/ml) lebih sensitif terhadap antibiotik, namun akan terjadi resistensi jika jumlah inokulum meningkat<sup>24</sup>.

### Hubungan Antara Pemanjangan Fase Lag Terhadap Sensitivitas Antibiotik pada Bakteri *Staphylococcus aureus* Setelah Paparan Logam Nikel

Berdasarkan data pertumbuhan bakteri dan diameter zona bening, dapat diamati bahwa semakin rendah pertumbuhan maksimal (yang menandakan panjangnya fase lag) menunjukkan adanya penurunan sensitivitas pada antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bing Li<sup>7</sup>. Hasil uji korelasi menunjukkan adanya hubungan pertumbuhan maksimal bakteri terhadap sensitivitas antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol ( $p < 0.05$ ). Pada penelitian ini bakteri *S.aureus* mengalami pemanjangan fase lag pada nikel dosis 1,95; 3,9; dan 7,8 ppm. Pemanjangan fase lag pada penelitian ini tidak menimbulkan penurunan sensitivitas dikarenakan tidak setiap mutasi pada gen terkait dapat menimbulkan resisten. Berbagai macam gen dapat terlibat pada resistensi antibiotik, sehingga ketika mutasi hanya terjadi pada satu gen atau beberapa gen maka menghasilkan resistensi dengan tingkat rendah<sup>28</sup>. Oleh karena itu, antibiotik dapat bekerja sesuai mekanisme yang dimiliki dan menyebabkan kematian pada bakteri.

Untuk dapat membunuh bakteri, antibiotik harus masuk ke dalam sel dan bekerja sesuai dengan mekanisme kerja dari antibiotik tersebut. Amoxicillin memiliki mekanisme kerja dengan mengikat *penicillin binding protein* (PBP) yang terletak pada dinding sel bakteri. Amoxicillin akan membuka cincin laktam yang mengakibatkan terganggunya ikatan silang (*cross-link*) pada proses sintesis dinding sel, selain itu sel akan lisis karena aktifnya enzim autolitik seperti autolisin<sup>25</sup>. Mekanisme kerja kloramfenikol adalah dengan berikatan dengan *A site* dari PTC sehingga menghambat *peptidyl transferase center* (PTC)<sup>26</sup>. *Peptidyl transferase center* merupakan bagian dari subunit ribosom 50S yang memiliki fungsi utama yakni menghubungkan asam amino melalui ikatan peptida menjadi polipeptida. Reaksi kimia lain yang berlangsung di PTC adalah hidrolisis dari tRNA yang diperlukan untuk terminasi translasi dan pelepasan polipeptida dari ribosom<sup>27</sup>.

### KESIMPULAN

1. Bakteri *S.aureus* yang terpapar nikel dengan dosis 1,95 ppm; 3,9 ppm; dan 7,9 ppm mengalami pemanjangan fase lag pada kurva pertumbuhan bakteri *S.aureus*.

2. Pemanjangan fase lag pada bakteri *S. aureus* tidak menimbulkan penurunan sensitivitas pada antibiotik amoxicillin, meropenem, dan kloramfenikol.

### SARAN

Saran untuk perbaikan penelitian selanjutnya berdasarkan penelitian ini adalah :

1. Melakukan penambahan jumlah ulangan

Saran untuk pengembangan penelitian selanjutnya berdasarkan penelitian ini adalah :

1. Melakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi gen *efflux pump* dan porin pada paparan nikel terhadap bakteri *S.aureus*
2. Melakukan penelitian lebih lanjut mengenai pembentukan biofilm pada bakteri dengan paparan nikel.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang atas pendanaan penelitian dan dr.Rahma Triliana, M.Kes, Ph.D sebagai *Peer Reviewer*

### DAFTAR PUSTAKA

1. Guo H, Liu H, Wu H, et al. Nickel Carcinogenesis Mechanism: DNA Damage. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):1-18. doi:10.3390/ijms20194690
2. Globocan. Cancer Incident in Indonesia. *Int Agency Res Cancer.* 2020;858:1-2. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-fact-sheets.pdf>
3. Lusi EA, Patrissi T, Guarascio P. Nickel-resistant bacteria isolated in human microbiome. *New Microbes New Infect.* 2017;19:67-70. doi:10.1016/j.nmni.2017.06.001
4. Iredell J. Antimicrobial resistance. *Microbiol Aust.* 2019;40(2):55-56. doi:10.1071/MA19016
5. Rafiq M, Hayat M, Anesio AM, et al. Recovery of metallo-tolerant and antibiotic resistant psychrophilic bacteria from Siachen glacier, Pakistan. *PLoS One.* 2017;12(7). doi:10.1371/journal.pone.0178180
6. Washington – Hughes CL, Ford GT, Jones AD, McRae K, Outten FW. Nickel exposure reduces enterobactin production in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen.* 2019;8(4):1-9. doi:10.1002/mbo3.691
7. Li B, Qiu Y, Shi H, Yin H. The importance of

- lag time extension in determining bacterial resistance to antibiotics. *Analyst*. 2016;141(10):3059-3067. doi:10.1039/c5an02649k
8. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *Am Soc Microbiol*. 2012;(December 2009):1-13. <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
  9. Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol*. 2012;3(DEC):1-10. doi:10.3389/fmicb.2012.00399
  10. Bertranda RL. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *J Bacteriol*. 2019;201(7):1-21. doi:10.1128/JB.00697-18
  11. Francois K, Valero A, Geeraerd AH, et al. Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. *Food Microbiol*. 2007;24(1):32-43. doi:10.1016/j.fm.2006.03.011
  12. Vermeersch L, Perez-Samper G, Cerulus B, et al. On the duration of the microbial lag phase. *Curr Genet*. 2019;65(3):721-727. doi:10.1007/s00294-019-00938-2
  13. Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, 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. doi:10.1128/JB.06112-11
  14. Ronneau S, Hallez R. Make and break the alarmone: Regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(4):389-400. doi:10.1093/femsre/fuz009
  15. Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. H<sub>2</sub>S: A universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* (80- ). 2011;334(6058):986-990. doi:10.1126/science.1209855
  16. CLSI. *CLSI M100-ED29: 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition*. Vol 40.; 2020.
  17. Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect*. 2002;110(SUPPL. 5):689-694. doi:10.1289/ehp.02110s5689
  18. Qiu TA, Guidolin V, Hoang KNL, et al. Nanoscale battery cathode materials induce DNA damage in bacteria. *Chem Sci*. 2020;11(41):11244-11258. doi:10.1039/d0sc02987d
  19. Qiu TA, Guidolin V, Hoang KNL, et al. Nanoscale battery cathode materials induce DNA damage in bacteria. *Chem Sci*. 2020;11(41):11244-11258. doi:10.1039/d0sc02987d
  20. Pavlic A, Begic G, Tota M, Abram M, Spalj S, Gobin I. Bacterial Exposure to Nickel: Influence on Adhesion and Biofilm Formation on Orthodontic Archwires and Sensitivity to Antimicrobial Agents. *Materials (Basel)*. 2021;14(16):4603. doi:10.3390/ma14164603
  21. Macomber L, Hausinger RP. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics*. 2011;3(11):1153-1162. doi:10.1039/c1mt00063b
  22. Podlesek Z, Žgur Bertok D. The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. *Front Microbiol*. 2020;11:1-17. doi:10.3389/fmicb.2020.01785
  23. Macomber, Lee and P. Hausinger R. Metal Resistance. In: *Encyclopedia of Metalloproteins*. ; 2013:1377-1377. doi:10.1007/978-1-4614-1533-6\_100764
  24. Li J, Xie S, Ahmed S, et al. Antimicrobial activity and resistance: Influencing factors. *Front Pharmacol*. 2017;8(JUN):1-24. doi:10.3389/fphar.2017.00364
  25. Kaur SP, Rao R, Nanda S. Amoxicillin: A broad spectrum antibiotic. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(3):30-37.
  26. Oong GC, Tadi P. Chloramphenicol. Published online 2021:21-26.
  27. Polacek N, Mankin AS. The ribosomal peptidyl transferase center: Structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2005;40(5):285-311. doi:10.1080/10409230500326334
  28. Baquero F, Martínez JL. MINIREVIEW Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1771-1777.



