

**LAPORAN
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN HIBAH STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009**

KKC
KK
Lp- 115 / 10
Kur
m



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Judul Penelitian

MEKANISME MOLEKULER INSERSI GEN RESISTEN *STREPTOMYCIN*
PADA *M.tuberculose* DENGAN GEN *Streptomyces sp.* ISOLAT LOKAL
INDONESIA SEBAGAI KONSEP MENDESAIN OBAT BARU YANG LEBIH
POTEN

Ketua Peneliti

Rochmah Kurnijasanti, drh., MSi.

Anggota :

Dr. Wiwin Retnowati, MKes

Prof.S.Agus Sudjarwo, PhD

Tutik Juniasuti, MKes., drh

**Sumber Dana : DIPA/APBN Rupiah Murni Tahun Anggaran 2009
Universitas Airlangga**

LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul Penelitian

MEKANISME MOLEKULER INSERSI
GEN RESISTEN *STREPTOMYCIN*
PADA *M.tuberculosis* DENGAN GEN
Streptomyces sp. ISOLAT LOKAL
INDONESIA SEBAGAI KONSEP
MENDESAIN OBAT BARU YANG
LEBIH POTEN

2. Ketua Penelitian

a. Nama Lengkap	: Rochmah Kurnijasanti, drh., Msi.
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. NIP	: 132 149 439
d. Golongan /Pangkat	: Penata/IIIc
e. Jabatan Fungsional	: Lektor
f. Fakultas /Jurusan	: Kedokteran Hewan
g. Alamat	: Kampus C Unair Jl. Mulyorejo Surabaya
h. Pusat Penelitian /Lab	: ITD Unair
i. Telepon / Fax / E-mail	: 031-5992785
j. Alamat Rumah	: jl. Mulyorejo tengah 47 Surabaya
k. Telepon / Fax.	: 031-5920914

Mengetahui :
Ketua ITD

Surabaya, 11 Desember 2009
Ketua Pelaksana,




(Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI)
NIP. 140 159 073



(Rochmah Kurnijasanti., drh.)
NIP. 132 149 439

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat




Prof. Dr. Bambang Sektiari, MS., drh.
NIP. 131 837 004

LAPORAN
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN HIBAH STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009

Kategori : Tahun :2009
 Univ/Inst/Akademi : Universitas Airlangga Fakultas : Kedokteran Hewan
 Nama Ketua Peneliti : Rochmah Kurnijasanti, drh., MSi.

I. KETERANGAN UMUM

1. Judul : **MEKANISME MOLEKULER INSERSI GEN RESISTEN *STREPTOMYCIN* PADA *M.tuberculose* DENGAN GEN *Streptomyces sp.* ISOLAT LOKAL INDONESIA SEBAGAI KONSEP MENDESAIN OBAT BARU YANG LEBIH POTEN**
2. Dibiayai melalui : **DIPA RUPIAH MURNI UNIVERSITAS AIRLANGGA**
 - Nomor : 319/h3.13/PPd/2009
 - Tanggal : 23 Maret 2009
 (dalam kontrak penelitian)
3. Jumlah biaya penelitian : **Rp. 100.000.000,00(Seratus Juta Rupiah)**
4. Jangka Waktu penelitian : **1 tahun**
5. Personalia penelitian :

NO	NAMA	Asal Fakultas/ Kelembagaan Penelitian	TUGAS
1.	Rochmah Kurnijasanti, drh., MSi	FKH Unair	Isolasi DNA, PCR, Purifikasi
2.	Dr. Wiwin Retnowati, MKes	FK Unair	Uji Aktivitas Antibakteri
3.	Prof.S.Agus Sudjarwo, PhD	FKH Unair	Sekuensing, Analisis Data
4.	Tutik Juniastuti, MKes., drh	FKH Unair	Isolasi DNA, PCR, Purifikasi

6. Lokasi Penelitian :

Lokasi/Laboratorium	Alamat	Pemilik/Pengelola
Mikrobiologi	FKH Unair	FKH Unair
Mikrobiologi TBC dan Hepatitis	Jl. Karang Menjangan Surabaya Jl Mulyorejo Kampus C Unair	PEMDA ITD Unair

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah S.W.T' ata rahmat dan hidayahNya sehingga dapat menyelesaikan penyusunan laporan penelitian dengan judul **Mekanisme Molekuler Inseri Gen Resisten Streptomycin Pada *M.tuberculose* Dengan Gen *Streptomyces* sp Isolat Lokal Indonesia Sebagai Konsep Mendesain Obat Baru Yang Lebih Poten.**

Pada kesempatan ini tidak lupa disampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Fasichul Lisan, MS., Apt., Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Prof. Dr. Bambang Sektiari, MS., drh., yang telah memberi kepercayaan kepada tim pelaksana, Ketua Institute of Tropical Disease, Dr. Nasronuddin, dr., SpPD yang telah memberikan fasilitas untuk penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya yang telah memberi kesempatan untuk mendapatkan media serta Bakteri *M.tuberculase*.

Kritik dan saran yang membangun guna perbaikan laporan penelitian ini sangat penulis harapkan. Semoga laporan penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Desember 2009

Tim Pelaksana

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	2
1.3. Identifikasi Masalah.....	2
II KERANGKA Konseptual.....	4
II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Streptomyces sp.....	5
2.2. Tuberculosis.....	6
2.3. Mekanisme Resistensi Mikroba.....	9
III METODE PELAKSANAAN.....	12
IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
V KESIMPULAN.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	33

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis atau TBC adalah infeksi karena bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat merusak paru-paru tapi dapat juga mengenai sistem saraf sentral (meningitis, sistem lymphatic, sistem sirkulasi (miliary TB), sistem genitourinary, tulang dan sendi. TBC dapat menyerang berbagai organ tubuh, namun kuman ini paling sering menyerang organ Paru. Infeksi Primer terjadi pada individu yang sebelumnya belum memiliki kekebalan tubuh terhadap *M Tuberculosis*. Basil TBC terhisap melalui saluran pernapasan masuk kedalam paru ,kemudian basil masuk lagi ke saluran limfe paru dan dari ini basil TBC menyebar ke seluruh tubuh melalui aliran darah. Melalui aliran darah inilah basil TBC menyebar keberbagai Organ tubuh. Tuberkulosis (TBC) adalah penyakit lama, namun sampai saat ini masih belum bisa dimusnahkan. Jika dilihat secara global, TBC membunuh 2 juta penduduk dunia setiap tahunnya, dimana angka ini melebihi penyakit infeksi lainnya. Indonesia adalah negara terbesar ketiga dengan jumlah pasien TBC terbanyak di dunia, setelah Cina dan India. Setiap tahun muncul 500 ribu kasus baru dan lebih dari 140 ribu lainnya meninggal. Sulitnya memusnahkan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* ini disebabkan oleh beberapa hal. Diantaranya adalah munculnya bakteri yang resisten terhadap obat yang digunakan. Karena itu, upaya penemuan obat baru terus dilakukan. Sebagai buah dari upaya tersebut (Utama A, 2003). Pengobatan bertujuan untuk menyembuhkan, mencegah kematian ,dan kekambuhan. Obat TBC yang utama adalah Isoniazid ,Rifampisin ,pirazinamid ,streptomisin dan etambutol. Sedangkan jenis obat tambahan yang biasa digunakan adalah kanamisi, kuinolon ,makrolid dan amoksisilin di kombinasikan dengan klavulanat.

Antibiotik adalah senyawa kimia yang diproduksi dari hasil metabolisme sel hidup, dalam kadar yang sangat rendah dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan memiliki sasaran molekuler yang spesifik (Joke, 1999). Identifikasi nukleotida 16S rRNA, ternyata penting untuk menentukan spesifikasi antibiotik di ribosom yang mempengaruhi agen antibakteri (Recht, *et al*, 1999, Pfister, P, *et al*, 2003, Walsh, 2000).

Sekuen gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi mikroba sampai tingkat spesies (Anderson and Welington, 2001). *Streptomyces* isolat lokal Indonesia hasil isolasi dari tanah ekosistem mangrove pantai timur Surabaya, berdasarkan uji kuantitatif dengan bioautografi ternyata mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* dan *Candida albicans* (Retnowati, 2007). *Streptomyces* juga mampu menghasilkan antibiotik golongan aminoglikosida antara lain streptomycin. Pemakaian Streptomycin untuk profilaxis dan pengobatan tuberculosis kurang memberikan hasil yang memuaskan, hal ini dimungkinkan karena *M. tuberculose* sudah resisten terhadap Streptomycin karena adanya mutasi gen.

Resistensi mikroba patogen terhadap antibiotik dapat menimbulkan banyak masalah dalam memberantas penyakit infeksi. Oleh karena itu diperlukan suatu tindakan untuk melawan resistensi antibiotik. Penggunaan antibiotik baru mungkin merupakan salah satu alternatif. Eliminasi bentuk resisten dapat dilakukan dengan mengganti antimikroba yang telah lama digunakan dengan antimikroba lain yang lebih peka, sehingga bentuk resisten akan binasa. Resistensi mungkin telah berkembang pada mikroorganisme terhadap antimikroba yang telah digunakan, sehingga masih perlu adanya penemuan anti mikroba baru

Resistensi beberapa bakteri gram negatif terhadap berbagai aminoglikosida juga karena inaktivasi secara enzimatis yaitu fosforilasi, adenilasi dan asetilasi. Fosforilasi terjadi pada streptomisin oleh enzim streptomisin phosphotransferase. Enzim ini hanya bekerja pada streptomisin. Perubahan pada tempat yang peka terhadap antimikroba, juga dapat menyebabkan resistensi mikroba. Contoh mekanisme ini yaitu hilangnya kepekaan ribosom terhadap streptomisin. Perubahan komponen ribosom subunit 30 s, sehingga streptomisin tidak dapat berikatan dalam waktu lama dan akibatnya antibiotik ini tidak dapat mempengaruhi biosintesis protein. Kegiatan antibiotik ini mempengaruhi biosintesis protein pada sel yang peka.

Pada rekayasa genetik, memungkinkan pemanfaatan gen resisten antibiotik untuk meningkatkan produksinya. Menurut Tamehiro *et al.* (2003) ternyata produksi salinomisin oleh *Streptomyces albus* (SAM-X) dapat meningkat : 50% setelah diinsersikan dengan gen resisten streptomisin (*str*), 80% setelah diinsersikan dengan

gen *str* (streptomisin) dan *gen* (gentamisin), dan 125% setelah diinsersikan dengan gen *str* (streptomisin), *gen* (gentamisin), *rif* (rifamisin).

Penelitian ini bertujuan mengungkap interaksi antara gen *Streptomyces* sp. isolat lokal Indonesia penghasil antibiotik dengan gen resisten antibiotik aminoglikosida dengan harapan terjadi peningkatan produksi antibiotik dan akan diperoleh dengan tepat jenis antibiotik yang dihasilkan yang akan mendorong kearah konsep untuk mendesain obat baru.

Metode yang digunakan adalah (1) Isolasi DNA streptomyces isolat lokal, dilanjutkan PCR, Elektroforesis dan purifikasi (2) sekuensing, untuk mengetahui urutan nukleotida *Streptomyces* isolat lokal Indonesia, (3) kloning *Streptomyces* sp. Dalam *E.coli* dengan menggunakan gen *str*, *rif*, *aph* (3)'1a-1b, dan *aph*, untuk mengetahui tempat terjadinya resistensi antibiotik dan interaksi terhadap ribosom bakteri (4) uji aktivitas antibakteri. Kegiatan 1 dan 2 akan dilaksanakan pada tahap pertama, kegiatan 3 dan 4 dilakukan pada tahap kedua.

1.2 TUJUAN KHUSUS

- Mengetahui profil antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. Isolat lokal Indonesia terhadap bakteri dengan harapan ditemukan antibiotik yang potensial, sehingga dapat digunakan sebagai obat alternatif untuk pengobatan penyakit tuberculosis
- Mengetahui perbedaan profil sekuen DNA 16S rRNA *Streptomyces* sp sehingga spesies yang ditemukan diharapkan merupakan spesies baru.
- Mengetahui mekanisme molekuler pada tempat terjadinya resistensi antibiotik
- Mengetahui aktifitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculose* penyebab penyakit tuberculosis

1.3 Identifikasi Masalah

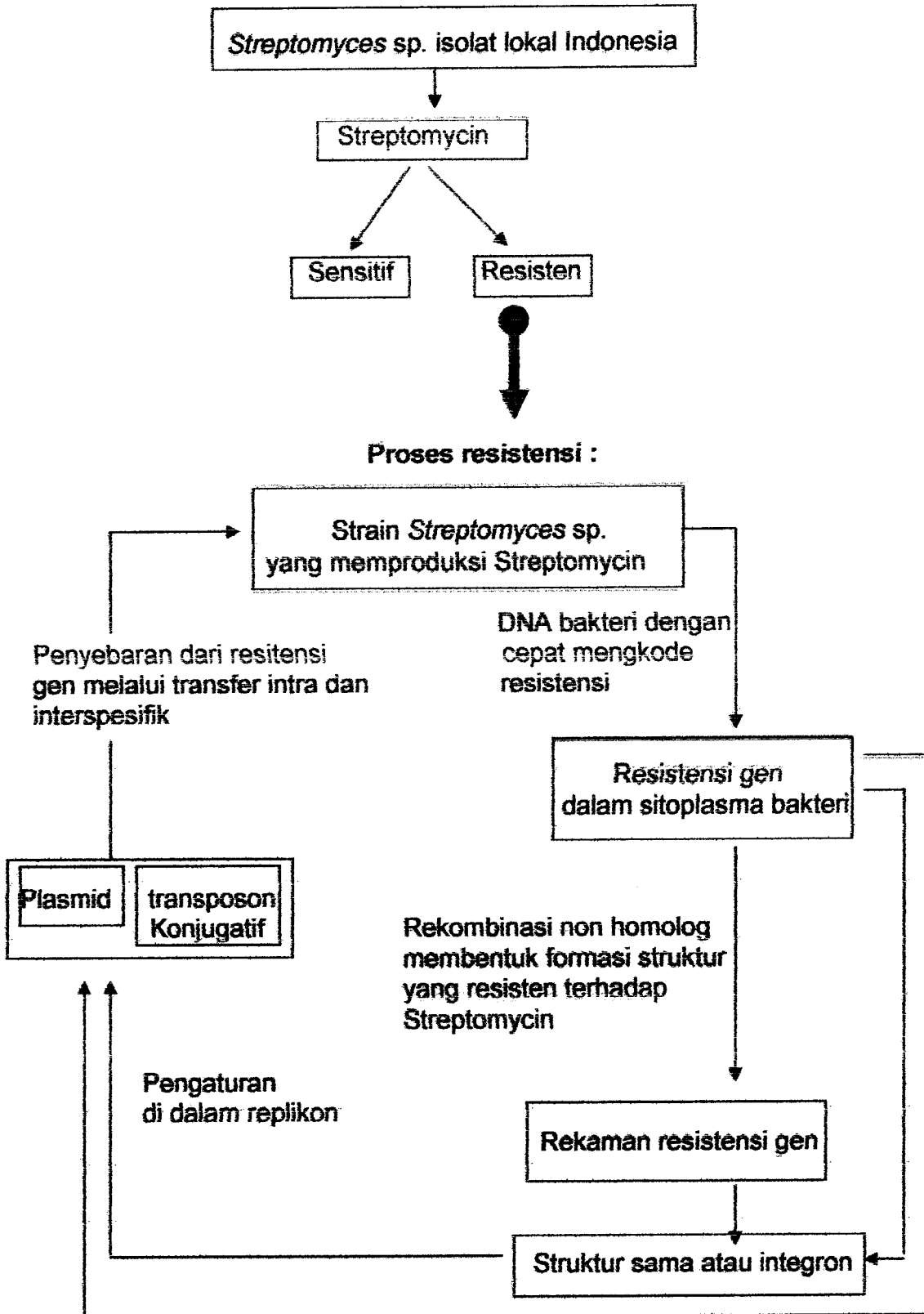
Sampel penelitian adalah *Streptomyces* lokal Indonesia yang merupakan hasil isolasi dari tanah ekosistem mangrove pantai timur Surabaya yang mampu menghambat *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, dan *Candida albicans*. *Streptomyces* juga

mampu menghasilkan antibiotik golongan aminoglikosida antara lain Streptomycin. Pemakaian Streptomycin untuk pengobatan tuberculosis kurang memberikan hasil yang memuaskan, hal ini dimungkinkan karena *Mycobacterium tuberculose* sudah resisten terhadap Streptomycin karena adanya mutasi gen.

Antibiotik ini merupakan antibiotik bakterisidal yang mengikat secara langsung pada 16S rRNA di lokasi yang mampu memecahkan kode resistensi antibiotik (Woodcock et al., 1991). Di ribosom bakteri, antibiotik tersebut akan mempengaruhi kesalahan baca pada kodon dan menghambat translokation secara in vitro dan in vivo.

Penelitian ini bertujuan mengungkap interaksi antara gen *Streptomyces* sp. isolat lokal Indonesia penghasil antibiotik dengan gen resisten antibiotik aminoglikosida dengan harapan terjadi peningkatan produksi antibiotik dan akan diperoleh dengan tepat jenis antibiotik yang dihasilkan yang akan mendorong kearah konsep untuk mendesain obat baru.

BAB 2 KERANGKA KONSEPTUAL



BAB 3 TINJAUAN PUSTAKA

3.1 *Streptomyces* sp.

Streptomyces adalah bakteri tanah Gram positif (Zhang, *et al.*, 2003) yang berperan penting dalam bidang bioteknologi, karena mampu memproduksi beberapa bioaktif metabolit sekunder yaitu antibiotik yang digunakan sebagai obat antimikroba, antivirus, antitumor, antiparasitik, dan immunosupresif. Selain itu, *Streptomyces* sering digunakan untuk pengawetan pakan, kesehatan hewan, dan sebagai alat bantu dalam bidang biokimia dan biologi molekuler (Watve, *et al.*, 2001).

Sampel penelitian adalah *Streptomyces* lokal Indonesia yang merupakan hasil isolasi dari tanah ekosistem mangrove pantai timur Surabaya yang mampu menghambat *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, dan *Candida albicans* (Retnowati, 2007).

Menurut Hoopwood (1999) bahwa *Streptomyces* dapat menghasilkan lebih dari 3000 antibiotik, sedangkan satu spesies *Streptomyces* dapat menghasilkan lebih dari 2-3 antibiotik yang diperoleh secara alami. Jenis antibiotik yang diproduksi oleh *Streptomyces* antara lain : (1) aminoglikosida (streptomisin, neomisin, kanamisin, lividomisin, paramomisin, ribostamisin, butirosin, amikasin, isepamisin, sepamisin, gentamisin, tobramisin, netilmisin, dibekasin, dan spektinomisin), (2) makrolida (nistatin, amphoteterisin B, tetrasiklin, antrasiklin, heterosiklin (polioksin), dan lain-lain), (3) alisiklik, (4) polipeptida (viomisin, aktinomisin, dan lain-lain), dan beberapa jenis lainnya. Berdasarkan uji kualitatif dengan bioautografi, ternyata *Streptomyces* lokal Indonesia tersebut mampu menghasilkan metabolit sekunder antibiotik (Retnowati, 2007).

Terdapat tiga kelompok aminoglikosida yaitu (1) fosfotransferase yang meliputi (APH(3') I, II, III, IV, V, VI, VII; APH(2'')-1a, -1b, -1c, -1d; APH(3'')-1a, -1b; APH(4)-1a, -1b; APH(6)-1a, -1b, -1c, -1d; APH(7'')1a dan APH(9)-1a, -1b, (2) asetiltransferase, meliputi AAC(6') I, II; AAC(3)-1a, -1b, -IIa, -IIb, -IIc, -IIIa, -IIIb, -IIIc; IV, VII, dan (3) nukleotidiltransferase, yang meliputi ANT(2'')-I, ANT(3')-I, ANT(4')-Ia, ANT(4)-IIa, ANT(6)-I, dan ANT(9)-I (Vakulenko, S.B, 2003).

Di dalam vektor bakteri, Streptomycin terikat pada ribosomal sub unit 30S bakteri yang berperan penting dalam translasi materi genetik karena menghalangi proses sintesis protein. Selama sintesis protein, ribosom memecahkan kode informasi dan menyebabkan kesalahan katalisasi satu atau lebih asam amino dari ± 3000 rantai polipeptida sehingga terjadi perubahan konformasi ribosom pada bakteri (Davies, 1994).

3.2 Tuberculosis

Tuberkulosis atau TBC adalah infeksi karena bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat merusak paru-paru tapi dapat juga mengenai sistem saraf sentral (meningitis, sistem lymphatic, sistem sirkulasi (miliary TB), sistem genitourinary, tulang dan sendi. TBC dapat menyerang berbagai organ tubuh, namun kuman ini paling sering menyerang organ Paru. Infeksi Primer terjadi pada individu yang sebelumnya belum memiliki kekebalan tubuh terhadap *M Tuberculosis*. Basil TBC terhisap melalui saluran pernapasan masuk kedalam paru ,kemudian basil masuk lagi ke saluran limfe paru dan dari ini basil TBC menyebar ke seluruh tubuh melalui aliran darah. Melalui aliran darah inilah basil TBC menyebar keberbagai Organ tubuh. Tuberkulosis (TBC) adalah penyakit lama, namun sampai saat ini masih belum bisa dimusnahkan. Jika dilihat secara global, TBC membunuh 2 juta penduduk dunia setiap tahunnya, dimana angka ini melebihi penyakit infeksi lainnya. Indonesia adalah negara terbesar ketiga dengan jumlah pasien TBC terbanyak di dunia, setelah Cina dan India. Setiap tahun muncul 500 ribu kasus baru dan lebih dari 140 ribu lainnya meninggal. Sulitnya memusnahkan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* ini disebabkan oleh beberapa hal. Diantaranya adalah munculnya bakteri yang resisten terhadap obat yang digunakan. Karena itu, upaya penemuan obat baru terus dilakukan. Sebagai buah dari upaya tersebut (Utama A, 2003). Pengobatan bertujuan untuk menyembuhkan, mencegah kematian ,dan kekambuhan. Obat TBC yang utama adalah Isoniazid ,Rifampisin ,pirazinamid ,streptomisin dan etambutol. Sedangkan jenis obat tambahan yang biasa digunakan adalah kanamisi, kuinolon ,makroloid dan amoksisilin di kombinasikan dengan klavulanat.

3.3 MEKANISME RESISTENSI MIKROBA

Antibiotik yang efektif dan aman telah berkembang sangat pesat sehingga dapat mengurangi mortalitas akibat penyakit infeksi. Akan tetapi muncul *strain-strain* mikroba yang mampu membentuk pertahanan terhadap antibiotik tertentu. Hal ini dimungkinkan karena organisme hidup selalu beradaptasi dengan lingkungannya. Oleh karena itu adaptasi mikroorganisme terhadap antibiotik menyebabkan resistensi mikroba terhadap antibiotik menyebar luas dan dapat menjadi ancaman keberhasilan memberantas penyakit infeksi. Sifat resistensi atau kepekaan mikroorganisme terhadap antibiotik terdapat pada gen, yang disebut resistensi ekstrakromosomal. Adapula resistensi non genetik yaitu bakteri pada stadium istirahat, sehingga mereka tidak peka terhadap antibiotik. Sifat genetik yang menentukan suatu mikroorganisme sejak awal tidak peka terhadap antibiotik, dikenal sebagai resistensi inheren. Selain itu organisme yang semula peka terhadap suatu antibiotik, pada suatu saat dapat berubah sifat genetiknya menjadi tidak peka atau memerlukan konsentrasi lebih besar. Perubahan ini karena gen mendapatkan elemen genetik yang membawa sifat resistensi. Resistensi ini dikenal sebagai resistensi *acquired*. Pada prinsipnya ada tiga macam pola kepekaan mikroorganisme terhadap antibiotik; yaitu mikroba belum pernah terjadi resistensi, mikroba berubah sifat dari peka menjadi kurang peka dan mikroba resisten terhadap antibiotik. Resistensi mikroba juga dapat terjadi secara silang yaitu resistensi mikroorganisme terhadap antibiotik tertentu juga memperlihatkan resistensi terhadap antibiotik lain. Resistensi silang biasanya terjadi di antara antibiotik yang mempunyai struktur kimia hampir sama seperti derivat penisilin, tetapi juga dapat terjadi pada antibiotik dengan struktur sangat berbeda. Berkembangnya resistensi mikroba terhadap antibiotik meliputi perubahan genetik, sehingga resistensi tersebut dapat diturunkan dari generasi ke generasi. Ada banyak hal yang dapat menyebabkan resistensi; mutasi merupakan penyebab yang sering dijumpai, selain itu resistensi juga dapat diperoleh melalui transfer bahan genetik dari bakteri resisten seperti transduksi, transformasi atau konjugasi. Mutasi gen dapat terjadi secara spontan tanpa adanya antibiotik yang bersangkutan dan mikroorganisme tersebut dapat berubah menjadi resisten. Mutasi selain dapat menimbulkan resistensi, juga dapat menyebabkan perubahan virulensi dan patogenisitas mikroba tersebut; bisa berkurang atau meningkat. Transduksi terjadi dengan perantaraan bakteriofag. Intervensi bakteriofag menyebabkan DNA

bakteri masuk ke bakteri lain; jika bahan genetik tersebut membawa gen yang menimbulkan sifat resistensi, maka sel bakteri yang terinfeksi tersebut akan menjadi resisten terhadap antibiotik tertentu. Transduksi banyak dilaporkan sebagai cara pemindahan sifat resistensi antibiotik yang sering terjadi di antara *strain Staphylococcus aureus*, dimana phage dapat membawa plasmid (DNA ekstra kromosom) pengkode penisilinase. Konjugasi merupakan pemindahan gen resisten dari satu sel ke sel lain dengan kontak langsung melalui *sexpilus*. Mekanisme ini sangat penting sebagai salah satu cara penyebaran gen resisten antibiotik, terutama *bacilli* gram negatip. Di antara mikroorganisme yang diketahui mampu memindahkangen resisten ke bakteri peka dengan cara ini antara lain *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Vibrio cholerae* dan *Pseudomonas*. Berkembangnya resistensi mikroba dengan cara ini antara lain terjadi pada aminoglikosida, tetrasiklin, kloramphenikol dan penisilin. Penyebaran resistensi dengan konjugasi pada bakteri gram negatip yang terdapat pada binatang dan manusia, merupakan ancaman untuk membasmi penyakit infeksi yang disebabkan oleh organisme gram negatip. Bakteri gram negatip dapat memindahkan sifat resistensi, tidak hanya ke spesies yang sama tetapi juga ke dikenal resistensi kromosomal spesies atau genus berbeda. Transfomasi mungkin juga merupakan mekanisme terjadinya resistensi. Di samping itu fusi antara dua sel mungkin juga menjadi cara berkembangnya resistensi. Fusi mungkin dapat terjadi antara dua spesies yang berbeda, bergabung membentuk struktur tunggal dan sel baru mengandung DNA dari kedua sel induk. Dari cara-cara tersebut, transduksi dan konjugasi merupakan cara yang paling lazim sebagai penyebab penyebaran mikroba resisten; namun potensi gen resisten juga dipengaruhi oleh lokasi gen dalam bakteri. Jika gen merupakan bagian dari plasmid, maka pemindahan sifat resisten akan lebih mungkin terjadi daripada apabila gen ada dalam kromosom.

Mekanisme terjadinya resistensi terhadap senyawa antimikroba antara lain :

- 1) Mikroba mensintesis enzim yang dapat mengubah zat aktif menjadi tidak aktif.
- 2) Terjadinya perubahan pada tempat yang peka terhadap anti mikroba.
- 3) Hilangnya permeabilitas sel terhadap antimikroba.
- 4) Meningkatnya konsentrasi metabolit yang antagonis kompetitif dengan penghambat.
- 5) Mikroba membuat jalan metabolisme baru.

Contoh resistensi yang terjadi akibat mikroba mensintesis enzim yaitu resistensi mikroba terhadap penisilin. Organisme tersebut menghasilkan enzim penisilinase yang mampu memecah cincin beta-laktam penisilin menjadi *penicilloic acid* yang tidak aktif. Demikian pula sefalosporin juga didegradasi oleh beta-laktamase. Banyak bakteri yang mampu memproduksi beta laktamase, meliputi bakteri gram positif dan negatif. Enzim ini mempunyai peranan besar dalam menyebabkan resistensi bakteri gram positif terhadap penisilin dan sefalosporin. Fisiologi produksi beta-laktamase kebanyakan bakteri gram negatif berbeda dari bakteri gram positif. Bakteri gram negatif umumnya menghasilkan beta-laktamase lebih sedikit dibanding gram positif dalam keadaan diinduksi, kecuali *Enterobacter* dan *Proteus* yang mempunyai beta laktamase *inducible* sehingga dapat memproduksi enzim cukup banyak. Pada gram negatif umumnya enzim ini terikat sel dan tidak dilepas ke lingkungan sekitarnya. Pada organisme gram positif, beta laktamase merupakan enzim *inducible*. Dengan adanya penisilin atau sefalosporin, produksinya meningkat. Biasanya pada bakteri gram positif, enzim ini dilepas dari sel dan merusak antibiotik yang ada di sekitarnya. Saat ini telah banyak dikembangkan derivat penisilin yang mempunyai rantai samping berbeda dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri penghasil beta laktamase yang resisten terhadap benzil penisilin, misalnya methicillin dan carbenicillin. Terhadap *S. aureus* yang tidak memproduksi beta laktamase, methicillin kurang aktif dibanding benzil penisilin, tetapi aktif terhadap penghasil beta laktamase. Oleh karena itu antibiotik ini berguna melawan infeksi yang disebabkan bakteri gram positif resisten benzil penisilin. Carbenicillin sedikit aktif terhadap bakteri gram positif, aktivitasnya meningkat terhadap gram negatif, terutama berguna melawan *Pseudomonas*. Resistensi beberapa strain bakteri gram positif dan negatif terhadap kloramphenikol juga terjadi, karena asetilasi menjadi senyawa tidak aktif. Strain resisten ini memproduksi kloram-phenikol asetiltransferase yang merupakan enzim *inducible* pada *S. aureus*. Resistensi beberapa bakteri gram negatif terhadap berbagai aminoglikosida juga karena inaktivasi secara enzimatis yaitu fosforilasi, adenilasi dan asetilasi. Fosforilasi terjadi pada streptomisin oleh enzim streptomisin phosphotransferase. Enzim ini hanya bekerja pada streptomisin. Neomisin, kanamisin dan paromomisin mengalami fosporilasi dengan adanya enzim neomisin-kanamisin phosphotransferase. Adenilasi juga dapat terjadi pada streptomisin, menjadi derivat adenil

oleh enzim streptomisin-spektinomisin adeniltransferase. Enzim gentamisin adeniltransferase dapat merubah gentamisin c, kanamisin dan tobramisin menjadi derivat adenil. Asetilasi, misalnya enzim kanamisin asetiltransferase mengasetilasi kanamisin, juga neomisin, gentamisin atau aminoglikosida lain.

Perubahan pada tempat yang peka terhadap antimikroba, juga dapat menyebabkan resistensi mikroba. Contoh mekanisme ini yaitu hilangnya kepekaan ribosom terhadap streptomisin. Disini terjadi perubahan komponen ribosom subunit 30s, sehingga streptomisin tidak dapat berikatan dalam waktu lama dan akibatnya antibiotik ini tidak dapat mempengaruhi biosintesis protein. Padahal kegiatan antibiotik ini mempengaruhi biosintesis protein pada sel yang peka. Contoh lain yaitu resistensi terhadap eritromisin yang terjadi karena perubahan protein ribosom subunit 50 s pada *S. aureus*.

Hilangnya permeabilitas sel terhadap antibiotik, diduga juga merupakan salah satu cara terbentuknya mikroba resisten. Jika sel menjadi tidak permeabel, maka antibiotik tidak dapat menembus ke dalam sel. Untuk itu perlu tipe antibiotik baru yang dapat menembus sel dengan cara lain misalnya dengan difusi. Permeabilitas sel berubah karena beberapa hal antara lain sintesis barier permeabilitas dan perubahan mekanisme transport. Bakteri gram negatif relatif lebih resisten dibandingkan gram terhadap antibiotik tertentu, mungkin disebabkan oleh barier permeabilitas yaitu adanya lapisan lipoprotein dan lipopolisakarida pada gram negatif. Sebagai contoh, mutan *E. coli* telah meningkatkan resistensinya terhadap ampisilin dan berkaitan dengan perubahan polisakarida. Beberapa pneumokoki resisten terhadap streptomisin dan eritromisin mungkin juga karena mengembangkan barier permeabilitasnya. Perubahan mekanisme transport antibiotik mungkin juga menyebabkan hilangnya permeabilitas sel terhadap antibiotik. Antibiotik memasuki sel dengan mekanisme transport spesifik. Pada beberapa sel resisten, antimikroba gagal memasuki sel karena ada perubahan beberapa komponen yang menyebabkan hilangnya fungsi transport. Misalnya pada mutan *E. coli* yang resisten terhadap D-sikloserin; path sel yang peka, akumulasi antibiotik ini terjadi dengan sistem transport yang secara normal membawa D-alanin atau glisin. Pada mutan, fungsi transport ini berkurang dan resistensi terhadap sikloserin meningkat. Resistensi dapat terjadi dengan cara meningkatkan sintesis metabolis yang antagonis kompetitif terhadap antimikroba. Bila senyawa antimikroba menghambat pertumbuhan dengan cara antagonis

kompetitif terhadap metabolit normal, maka resistensi terhadap antimikroba ini mungkin karena meningkatnya produksi metabolit tersebut. Secara kompetitif antimikroba digantikan dari tempat ikatannya. Sebagai contoh mutan resisten terhadap sulphonamid. Pada sel ini konsentrasi *para aminobenzoic acid* lebih tinggi daripada sel yang peka terhadap sulphonamid. Dengan cara ini mikroorganisme resisten dapat mempertahankan metabolismenya bagi kelangsungan hidupnya. Di samping itu, dalam mempertahankan kelangsungan hidupnya, mikroba dapat membuat jalan metabolisme baru atau lain, untuk menghindari penghambatan antimikroba terhadap jalan metabolisme yang normal, misalnya reaksi baru pada metabolisme nukleotida purin dan pirimidin. Reaksi ini terjadi karena mikroorganisme tersebut menghindari metabolisme normal yang dihambat oleh antimikroba. Sebagai contoh mutan *E. coli* resisten dapat membentuk jalan metabolisme baru dalam mensintesis THFA (asam tetrahidrofolat) karena adanya sulfatiazol.

Resistensi mikroba patogen terhadap antibiotik dapat menimbulkan banyak masalah dalam memberantas penyakit infeksi. Oleh karena itu diperlukan suatu tindakan untuk melawan resistensi antibiotik. Penggunaan antibiotik baru mungkin merupakan salah satu alternatif. Eliminasi bentuk resisten dapat dilakukan dengan mengganti antimikroba yang telah lama digunakan dengan antimikroba lain yang lebih peka, sehingga bentuk resisten akan binasa. Resistensi mungkin telah berkembang pada mikroorganisme terhadap antimikroba yang telah digunakan, sehingga masih perlu adanya penemuan anti mikroba baru

BAB 4 METODE PENELITIAN**Tahun I****a. Preparasi kultur dan bakteri**

Dipilih *Streptomyces* sp. isolat lokal Indonesia hasil isolasi dari tanah ekosistem mangrove pantai timur Surabaya yang ditumbuhkan pada media ISP-4.

b. Pembuatan Inokulum *Streptomyces* sp.

Dipilih *Streptomyces* sp. isolat lokal Indonesia hasil isolasi dari tanah ekosistem mangrove pantai timur Surabaya ditanam pada media ISP-4 padat pada cawan petri, dan diinkubasikan selama 4 hari pada suhu 28°C. Setelah *Streptomyces* sp. tumbuh, kemudian dipindahkan pada media ISP-4 Agar miring. Untuk proses selanjutnya menurut Davelos *et al.*, (2004) bahwa isolat *Streptomyces* sp. harus disimpan pada media ISP-4 cair yang mengandung gliserol 20% dengan suhu -80°C agar isolat tidak mengalami perubahan morfologi dan fisiologi.

c. Isolasi DNA genom *Streptomyces*

Diambil 1 ose biakan *Streptomyces* sp. dari Agar miring dan dipindahkan pada media ISP-4 cair 10 mL, kemudian dikocok menggunakan *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (*Rotation per minute*) pada suhu 30°C selama 4 hari. Kemudian diambil 2,5 mL dengan mikropipet dan dipindahkan pada 25 mL media ISP-4 cair, kemudian dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C. Setelah 24 jam diambil 1 mL supernatan *Streptomyces*.

Isolasi DNA *Streptomyces* dilakukan dengan menggunakan *BIO 101 G NOME* (Qiagen). 1 mL *Streptomyces* dimasukkan ke dalam *cell suspension solution* kit dengan volume akhir 1,85 mL dan dihomogenkan. Ditambahkan sebanyak 50 µL *RNase mix kit* dan dipipet hati-hati agar tercampur, kemudian ditambahkan 100 µL *cell lysis kit* dan diinversi 2-5 kali. Diinkubasikan pada suhu 55°C selama 15 menit. Ditambahkan 25 µL *protease mixx* dan dicampur merata yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 55°C selama 30-120 menit. Ditambahkan 500 µL *salt-out mixture kit*, didinginkan selama 10 menit pada suhu 4°C dan dimikrosentrifus pada kecepatan 10.000

rpm selama 10 menit. Secara hati-hati pelet dibuang kemudian supernatan dimasukkan pada tabung konikal steril 15 mL. Menambahkan 2 mL dapar TE dan 8 mL ethanol absolut pada supernatan. Dicampur dan inversi tabung sampai terlihat benang halus DNA. Disentrifugasikan pada 10.000 rpm selama 2 menit dan etanol dibuang dengan hati-hati. Tabung dikeringkan pada konsentrator, atau dibalikkan pada *tissue* bersih selama 10-15 menit. kemudian melarutkan DNA genom di dalam TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA). DNA disimpan pada suhu 2-8°C. Sebelum digunakan jika di dalam cairan stok terdapat endapan, maka dipanaskan pada suhu 60°C agar melarut.

d. Amplifikasi PCR 16S rRNA

Primer yang digunakan adalah Sigma Proligo dengan urutan :

forward pA 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

dan *reverse* pH 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

(Davelos, A.L., *et al.*, (2004)

Amplifikasi dilakukan dengan campuran *reagen* sebagai berikut : 25 μ L *master mix kit*, primer *forward* 2 μ L, primer *reverse* 2 μ L, *destilated water* 11 μ L, DNA 10 μ L sehingga didapatkan total reaksi 50 μ L. Denaturasi awal 95°C selama 5 menit. Melakukan amplifikasi sebanyak 35 daur : denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 1 menit, *elongasi* 72°C selama 1 menit. Pada putaran yang ke 35 *post elongasi* 72°C selama 10 menit.

e. Elektroforesis Produk PCR

Dilarutkan sejumlah 0,4 Gram agarose (Gibco BRL, no. cat 15510-019) dalam 20 mL TBE 0,5X untuk mendapatkan gel agarose 2%. Larutan agarose dipanaskan sampai mendidih, sementara itu cetakan disiapkan. Sisir elektroforesis ditempatkan untuk membentuk sumur gel. Setelah mendidih, larutan agarose didiamkan sampai suhu 60°C kemudian ditambahkan 0,5 μ L/mL larutan EtBr (*ethidium bromide*). Larutan agarose dituang ke cetakan yang sudah disiapkan dan dibiarkan hingga membeku. Setelah membeku, penutup cetakan dan sisirnya diangkat. Cetakan ditempatkan pada wadah elektroforesis yang telah berisi dapar TBE 0,5X. 8 μ L larutan produk PCR dimasukkan dan ditambahkan 2 μ L dapar *loading* ke dalam sumur elektroforesis. DNA *marker* juga

<p>MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA</p>
--

dimasukkan ke dalam salah satu sumur. Elektroforesis dijalankan pada 100 V selama 20 menit dan hasil elektroforesis dilihat dibawah sinar UV.

f. Purifikasi DNA

Produk PCR dipurifikasi dengan *QIA quick PCR Purification Kit*. Sebelum digunakan menambahkan ET-OH 96% pada dapar PE. Kemudian ditambahkan dapar PB (5 X volume) ke dalam hasil produk PCR. Sampel diletakkan pada *QIA Quick spin column* (2 mL *coolect tube*) dan disentrifus 30-60 detik (untuk mengikat DNA). Setelah *flow through* dibuang, dilakukan sentrifus dengan kecepatan maksimal 15.000 rpm selama 1 menit. Bagian atas diambil dan pindahkan ke tabung 1,5 mL steril. Ditambahkan bufer EB pada bagian sentral membran dan dibiarkan selama 1 menit kemudian disentrifus selama 1 menit.

g. Sekuensing DNA

Templat untuk sekuensing adalah DNA produk PCR yang telah dimurnikan. Sekuensing dilakukan dengan metode Sanger menggunakan sekuenser *ABI Prism 310*. Dilakukan pelabelan dengan *big dye*. Volume yang digunakan adalah 150 μ L dengan konsentrasi 200 ng/mL. Untuk pembacaan hasil, sampel *diloading* dalam semua sumuran pada mesin *Sequencer ABI Prism 310* dengan volume 1,5 μ L. Hasil sekuensing dapat dilihat dalam beberapa jam melalui monitor dalam bentuk grafik alogram dan hasilnya dapat dicetak. Untuk analisis sekuens DNA dan translasi asam amino dilakukan dengan menggunakan *software computer Genetic Mac Version 8,0*. Homologi sekuens antar isolat lokal berdasarkan referensi dari *Gen Bank*.

Tahun II

h. Prosedur ekspresi molekul DNA yang diklon *E. coli*

h.1 Deteksi DNA dengan celupan asam nukleat spesifik

Volume cairan DNA atau antibiotik yang digunakan adalah sama dan celupan Yo-Pro-1 benzoxazolium-4-quinolinium [Y-3603]; Probe molekular diencerkan di dalam 10 mM Tris (pH 7.4)-2 mM NaCl-1 mM EDTA (TNE). Hasil fluorescence diukur dengan

filter emisi dan eksitasi pada 485 dan 530 nm dengan Perkin-Elmer LS50 spektrometer luminesensi. Digunakan kontrol dengan larutan TNE.

h.2 Pengujian PCR dan primer

Primer yang digunakan :

Nama	5'Primer	3'Primer	Hasil produk (bp)
S16S1	5'-CTGCGAGGTTTCGAAAGCTCCGG-3'	5'-CACCAGGATTCCGATCTCCCC-3'	470
S16S2	5'-GTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG-3'	5'-CACCAGGATTCCGATCTCCCC-3'	577
S16S3	5'-GTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG-3'	5'CTACCAAGGCGACGACGGGTAGC-3'	201
otrA	5'-GAACAAGCTGAATCTGGGCATCC-3'	5'-GACGAAGACCAAGCGTGGGAATG-3'	378
gaph	5'-GGCCGTCACCGCGGGCGAATCG-3'	5'-GCAGAGATCACCGTGGCAGACG-3'	510

Reaksi PCR dalam 50 µl reaksi campuran yang terdiri dari 20 mM Tris (pH 8.3 pada 22°C), 1.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 0.05% Tween 20, 100 µg gelati/ ml, 10% gliserol, 5% formamide, 1 mM deoxyribonucleoside triphosphates (masing-dari masing 0.25 mM), dan 2 µM primer (1 µM 5' primer, 1 µM 3' primer). Lima dari lima belas microliters cairan DNA atau cairan antibiotik ditambahkan ke dalam reaksi tersebut. PCR dilakukan dengan awal denaturasi pada 95°C selama 2 menit. Dan selanjutnya dilakukan 25 siklus denaturasi (95°C untuk 15 detik), annealing (55°C untuk 30 detik), dan extension (72°C, 90 detik); dan ditambahkan 1.25 U Taq polymerase untuk pengulangan lebih lanjut sebanyak 12 siklus (total 62 siklus). Reaksi dihentikan pada 15 atau - 20°C. Sebanyak 12 µl volume masing-masing reaksi dimasukkan ke dalam 1.5% agarose 'gel', dielectroforesis dengan ethidium bromida. Semua dilaksanakan di dalam suatu Laminary flow dengan kondisi streil untuk setiap cairan.

h.3 Ekstraksi Premix

Sebanyak 700-mg sampel premix diekstraksi di dalam 6 ml 50/10 buffer (0.05 M Tris, 0.01 M EDTA [pH 8]) dan disentrifugsi pada 5,900 x g selama 5 menit. Supernatant diekstraksi sebanyak dua kali dengan phenol-chloroform, dipresipitasi dengan ethanol dan resuspensi dalam 0.6 ml 50/10 buffer. Menambahkan tiga volume Bio-Rad Prep-A-Gene yang mengikat buffer dan larutan sebanyak 30 µl volume Prep-A gen di dalam 0.6

ml aliquots sebagai berikut: campuran dishaker pada 250 rpm dengan suhu 25°C selama 10 menit dan disentrifus. Supernatant dibuang. Setelah penyerapan, dicuci tiga kali dengan 0.25 ml 4 M sodium perchlorate dan empat kali dengan pencuci buffer Prep-A-Gene. Matriks dielusi dengan volum akhir 70 µl.

h.4 Uji Potensi Antimikroba

Pembiakan *Streptomyces* sp.

Diambil 1 Ōse biakan *Streptomyces* sp. dari Agar miring dan dipindahkan pada media ISP-4 cair 25 mL, kemudian dikocok menggunakan *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (*Rotation per minute*) pada suhu 30°C selama 2-4 hari. Kemudian diambil 2,5 mL dengan mikropipet dan dipindahkan pada 25 mL media ISP-4 cair dan dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C. Setelah 6 jam diambil 2 mL dan dicampur dengan media ISP-4 Agar 20 mL yang telah dicairkan pada suhu 45°C, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C. Dari media yang telah berisi *Streptomyces* sp. dicetak dengan diameter 1,07 cm dan diambil setiap periode 24 jam selama 10 hari untuk diletakkan di atas media uji untuk uji potensi.

Penanaman mikroba uji

Masing-masing sebanyak 1 Ōse koloni *M. tbc* dibiakkan dalam 10 mL kultur media *Nutrien Agar* miring dan diinkubasikan pada suhu 30-35°C selama 3 hari.

Penyiapan inokulum mikroba uji

Mikroba uji yang telah diinkubasi pada suhu 30-35 °C selama 3 hari ditambahkan 10 mL larutan steril dapar fosfat pH 7 kemudian dikocok sampai seluruh koloni di permukaan Agar lepas dan tersuspensi dalam larutan dapar fosfat pH 7. Inokulum tersebut selanjutnya diukur transmittannya pada panjang gelombang 580 nm dengan *Spectronic 20*. Transmittan suspensi diatur agar mencapai transmittan 25%. Apabila transmittan menunjukkan kurang dari 25% maka suspensi diencerkan dengan menambahkan larutan bufer fosfat dan apabila transmittan menunjukkan lebih dari 25% maka ditambahkan lagi koloni *Streptomyces* sp.

Penyiapan media uji

Disiapkan cawan petri dengan menambahkan media *Nutrien Agar* 15 mL sebagai *base layer*. Selanjutnya diambil masing-masing 7 μ L inokulum *Bacillus anthracis* UM 23-C12, (*Bacillus subtilis* 168, *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus cereus* sebagai pembanding) yang mempunyai T = 25% dan dimasukkan pada 10 mL media *Nutrien Agar* sebagai *sheed layer*.

Menyiapkan cawan petri yang berisi media PDA 15 mL sebagai *based layer*. Selanjutnya diambil 7 μ L inokulum *Candida albicans* yang mempunyai T = 25% dan dimasukkan pada 10 mL media PDA sebagai *sheed layer*.

Uji potensi antimikroba yang dihasilkan *Streptomyces* (Demain dan Nadine, 1986)

Uji potensi dilakukan dengan menempelkan hasil cetakan Agar yang ditumbuhi *Streptomyces* sp. pada media yang telah diinokulasi dengan bakteri uji, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, diukur zona hambatan yang terbentuk di sekitar koloni biakan dengan jangka sorong. Sebagai kontrol untuk mikroba uji adalah *Bacillus anthracis* UM 23-C12, (*Bacillus subtilis* 168, *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus cereus* sebagai pembanding) Sebagai kontrol digunakan 5 μ L Penicillin 250 ppm yang diletakkan dalam sumur (diameter 1,07; tinggi 1,0 cm) pada bakteri uji. Hasil positif ditandai adanya zona hambatan di sekitar koloni biakan pada cawan petri yang berarti bahwa isolat *Streptomyces* mampu menghasilkan antibiotik sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba.

Analisis data uji potensi antimikroba yang dihasilkan *Streptomyces* sp.

Diameter zona hambatan (mm) yang dihasilkan selama 10 hari dengan interval waktu 24 jam, dibuat kurva yang menyatakan hubungan antara waktu inkubasi *Streptomyces* sp. dengan diameter zona hambatan (mm). Dari kurva tersebut dapat diketahui waktu awal (*onset of action*), aktivitas produksi antimikroba, dan lama produksi antimikroba.

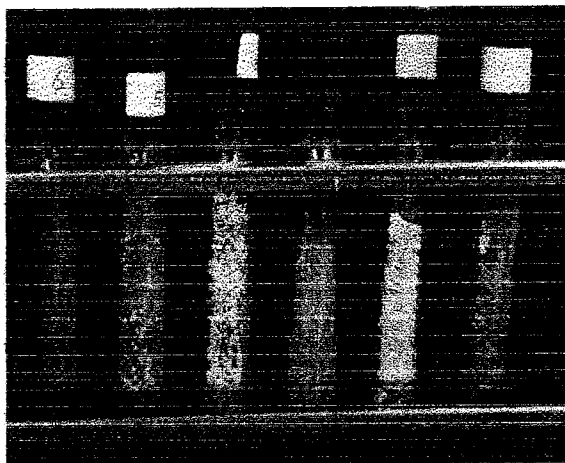
Kromatografi Streptomycin

Larutan Streptomycin (Sigma) sebanyak 300 mg /2 ml TE (10 mM Tris [pH 8], 1 mM EDTA) dibagi menjadi dua, dan DNase pankreas pada konsentrasi akhir 4 U/ml ditambahkan untuk 1,5. Dua sampel diimpan pada 4°C selama kurang lebih 24 jam dan kemudian diloading ke dalam kolom (5 ml) pada resin cationic AGSOWX8 (Bio-Rad) dan dielusi dengan air, fraksi (1 ml) dikumpulkan dan diuji dengan aktivitas antibiotic, dengan OD 260 nm dan DNase untuk zat pembunuh kuman aktivitas, rapat optis pada 260 nm, dan aktivitas DNase dan melakukan perbanyakan/amplifikasi PCR. Chromatography dilaksanakan di laminar flow.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Inokulum *Streptomyces* sp pada Media ISP-4

Dipilih *Streptomyces* sp. isolat lokal Indonesia hasil isolasi dari tanah ekosistem *mangrove* pantai timur Surabaya ditanam pada media ISP-4 padat pada cawan petri, dan diinkubasikan selama 4 hari pada suhu 28⁰C. Setelah *Streptomyces* sp. tumbuh, kemudian dipindahkan pada media ISP-4 Agar miring. (Hasil terlampir)



Gambar 1. Hasil Kultur *Streptomyces* sp pada media ISP-4

Uji Aktivitas Anti Mikroba (Pra Perlakuan)

Pembiakan *Streptomyces* sp.

Diambil 1 ose biakan *Streptomyces* sp. dari Agar miring dan dipindahkan pada media ISP-4 cair 25 mL, kemudian dikocok menggunakan *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (*Rotation per minute*) pada suhu 30⁰C selama 2-4 hari. Kemudian diambil 2,5 mL dengan mikropipet dan dipindahkan pada 25 mL media ISP-4 cair dan dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30⁰C. Setelah 6 jam diambil 2 mL dan dicampur dengan media ISP-4 Agar 20 mL yang telah dicairkan pada suhu 45⁰C, kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C. Dari media yang telah berisi *Streptomyces* sp. dicetak dengan diameter 1,07 cm dan diambil setiap periode 24 jam selama 10 hari untuk diletakkan di atas media uji untuk uji potensi.

Penanaman mikroba uji

Masing-masing sebanyak 1 Ose koloni *M.tuberculosis* dibiakkan dalam 10 mL kultur media L. Jensen. Pada medium ini mengandung telur, gliserol, garam-garam mineral, hijau malakhit. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2-3 minggu.

Penyiapan inokulum mikroba uji

Mikroba uji yang telah diinkubasi pada suhu 37 °C (Suhu Kamar) selama 2-3 minggu ditambahkan 10 mL larutan steril dapar fosfat pH 7 kemudian dikocok sampai seluruh koloni di permukaan Agar lepas dan tersuspensi dalam larutan dapar fosfat pH 7. Inokulum tersebut selanjutnya diukur transmittannya pada panjang gelombang 580 nm dengan *Spectronic 20*. Transmittan suspensi diatur agar mencapai transmittan 25%. Apabila transmittan menunjukkan kurang dari 25% maka suspensi diencerkan dengan menambahkan larutan bufer fosfat dan apabila transmittan menunjukkan lebih dari 25% maka ditambahkan lagi koloni *Streptomyces* sp.

Penyiapan media uji

Disiapkan cawan petri dengan menambahkan media *L.Jensen* 15 mL sebagai *base layer*. Selanjutnya diambil masing-masing 7 µL inokulum *M.tuberculosis* yang mempunyai T = 25% dan dimasukkan pada 10 mL media *L.Jensen* sebagai *sheed layer*.

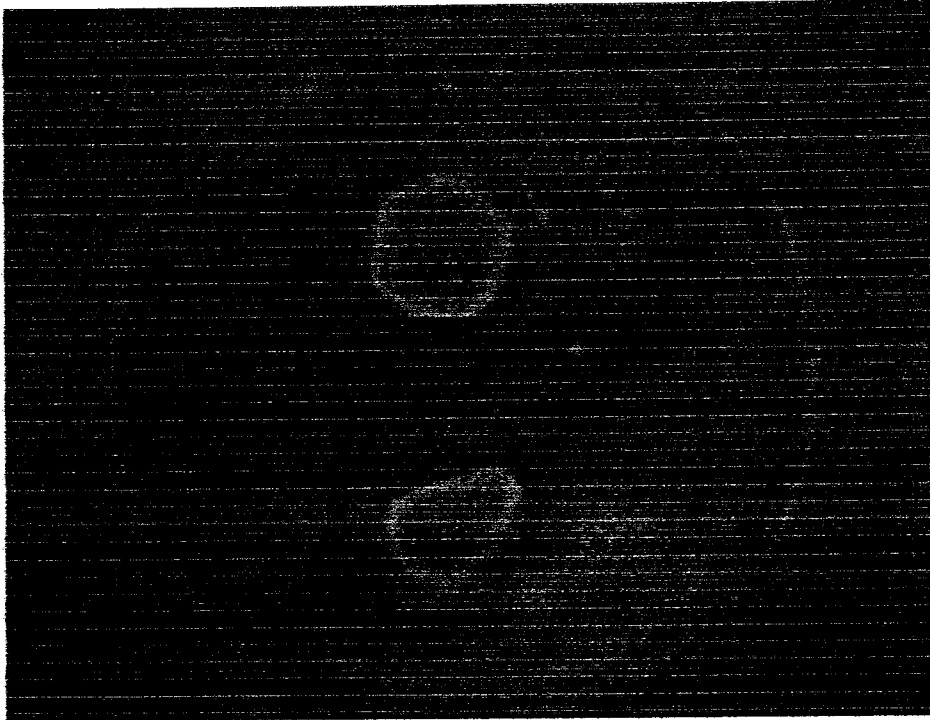
Uji potensi antimikroba yang dihasilkan *Streptomyces* (Demain dan Nadine, 1986)

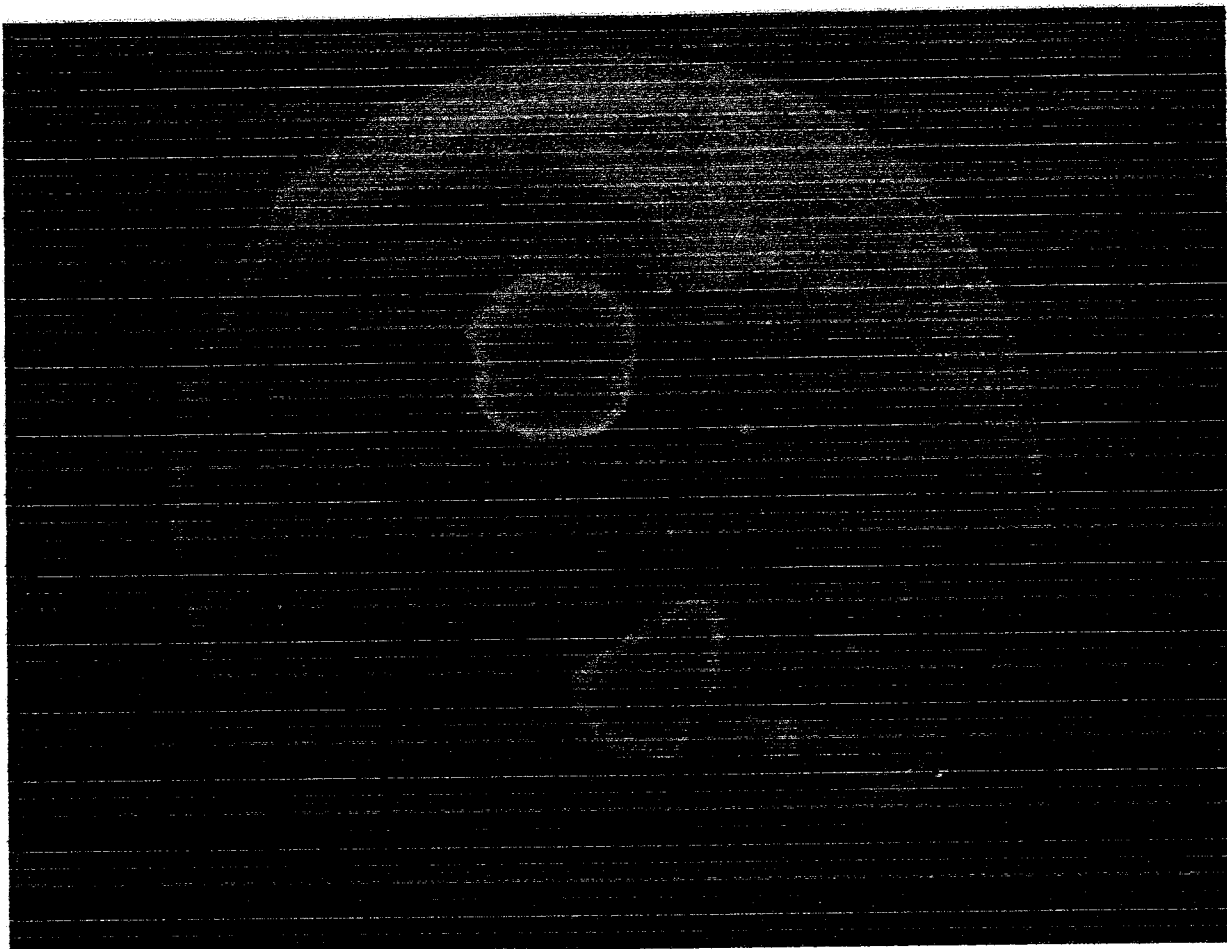
Uji potensi dilakukan dengan menempelkan hasil cetakan Agar yang ditumbuhi *Streptomyces* sp. pada media perbenihan bakteri uji, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, diukur zona hambatan yang terbentuk di sekitar koloni biakan dengan jangka sorong. Sebagai kontrol digunakan 5 µL Streptomisin 250 ppm yang diletakkan dalam sumur (diameter 1,07; tinggi 1,0 cm) pada bakteri uji. Hasil positif ditandai adanya zona hambatan di sekitar koloni biakan pada cawan petri yang berarti bahwa isolat *Streptomyces* mampu menghasilkan antibiotik sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba.

Analisis data uji potensi antimikroba yang dihasilkan *Streptomyces* sp.

Diameter zona hambatan (mm) yang dihasilkan selama 10 hari dengan interval waktu 24 jam, dibuat kurva yang menyatakan hubungan antara waktu inkubasi *Streptomyces* sp. dengan diameter zona hambatan (mm).

Dari kurva tersebut dapat diketahui waktu awal (*onset of action*), aktivitas produksi antimikroba, dan lama produksi antimikroba.





Isolasi DNA genom *Streptomyces* (Hasil Terlampir)

Diambil 1 ose biakan *Streptomyces* sp. dari Agar miring dan dipindahkan pada media ISP-4 cair 10 mL, kemudian dikocok menggunakan *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (*Rotation per minute*) pada suhu 30°C selama 4 hari. Kemudian diambil 2,5 mL dengan mikropipet dan dipindahkan pada 25 mL media ISP-4 cair, kemudian dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C. Setelah 24 jam diambil 1 mL supernatan *Streptomyces*.

Isolasi DNA *Streptomyces* dilakukan dengan menggunakan *BIO 101 G NOME* (Qiagen). 1 mL *Streptomyces* dimasukkan ke dalam *cell suspension solution* kit dengan volume akhir 1,85 mL dan dihomogenkan. Ditambahkan sebanyak 50 µL *RNase mix kit* dan dipipet hati-hati agar tercampur, kemudian ditambahkan 100 µL *cell lysis kit* dan diinversi 2-5 kali. Diinkubasikan pada suhu 55°C selama 15 menit. Ditambahkan 25 µL *protease mixx* dan dicampur merata yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 55°C selama 30-120 menit. Ditambahkan 500 µL *salt-out mixture kit*,

didinginkan selama 10 menit pada suhu 4°C dan dimikrosentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Secara hati-hati pelet dibuang kemudian supernatan dimasukkan pada tabung konikal steril 15 mL. Menambahkan 2 mL dapar TE dan 8 mL ethanol absolut pada supernatan. Dicampur dan inversi tabung sampai terlihat benang halus DNA. Disentrifugasikan pada 10.000 rpm selama 2 menit dan etanol dibuang dengan hati-hati. Tabung dikeringkan pada konsentrator, atau dibalikkan pada *tissue* bersih selama 10-15 menit. kemudian melarutkan DNA genom di dalam TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA). DNA disimpan pada suhu 2-8°C. Sebelum digunakan jika di dalam cairan stok terdapat endapan, maka dipanaskan pada suhu 60°C agar melarut.

Elektroforesis Hasil Isolasi DNA (Hasil Terlampir)

Dilarutkan sejumlah 0,4 Gram agarose (Gibco BRL, no. cat 15510-019) dalam 20 mL TBE 0,5X untuk mendapatkan gel agarose 2%. Larutan agarose dipanaskan sampai mendidih, sementara itu cetakan disiapkan. Sisir elektroforesis ditempatkan untuk membentuk sumur gel. Setelah mendidih, larutan agarose didiamkan sampai suhu 60°C kemudian ditambahkan 0,5 µL/mL larutan EtBr (*ethidium bromide*). Larutan agarose dituang ke cetakan yang sudah disiapkan dan dibiarkan hingga membeku. Setelah membeku, penutup cetakan dan sisirnya diangkat. Cetakan ditempatkan pada wadah elektroforesis yang telah berisi dapar TBE 0,5X. 8 µL larutan produk isolasi DNA dimasukkan dan ditambahkan 2 µL dapar *loading* ke dalam sumur elektroforesis. DNA *marker* juga dimasukkan ke dalam salah satu sumur. Elektroforesis dijalankan pada 100 V selama 20 menit dan hasil elektroforesis dilihat dibawah sinar UV.

PCR

Amplifikasi dilakukan dengan campuran *reagen* sebagai berikut : 25 µL *master mix kit*, primer *forward* 2 µL, primer *reverse* 2 µL, *destilated water* 11 µL, DNA 10 µL sehingga didapatkan total reaksi 50 µL. Denaturasi awal 95°C selama 5 menit. Melakukan amplifikasi sebanyak 35 daur : denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 1 menit, elongasi 72°C selama 1 menit. Pada putaran yang ke 35 *post elongasi* 72°C selama 10 menit.

Purifikasi DNA

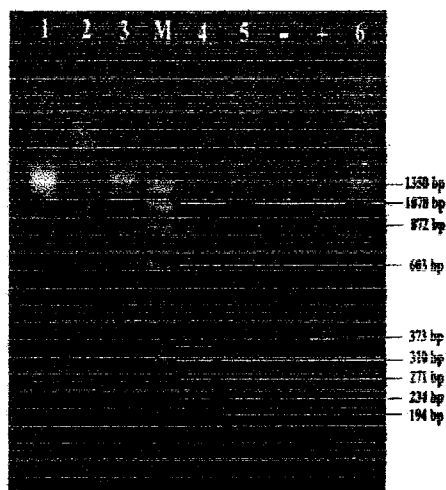
Produk PCR dipurifikasi dengan *QIA quick PCR Purification Kit*. Sebelum digunakan menambahkan ET-OH 96% pada dapar PE. Kemudian ditambahkan dapar PB (5 X volume) ke dalam hasil produk PCR. Sampel diletakkan pada *QIA Quick spin column* (2 mL *coolect tube*) dan disentrifus 30-60 detik (untuk mengikat DNA). Setelah *flow through* dibuang, dilakukan sentrifus dengan kecepatan maksimal 15.000 rpm selama 1 menit. Bagian atas diambil dan pindahkan ke tabung 1,5 mL steril. Ditambahkan bufer EB pada bagian sentral membran dan dibiarkan selama 1 menit kemudian disentrifus selama 1 menit.

Sekuensing DNA (Hasil Terlampir)

Templat untuk sekuensing adalah DNA produk PCR yang telah dimurnikan. Sekuensing dilakukan dengan metode Sanger menggunakan sekuenser *ABI Prism 310*. Dilakukan pelabelan dengan *big dye*. Volume yang digunakan adalah 150 μ L dengan konsentrasi 200 ng/mL. Untuk pembacaan hasil, sampel *diloading* dalam semua sumuran pada mesin *Sequencer ABI Prism 310* dengan volume 1,5 μ L. Hasil sekuensing dapat dilihat dalam beberapa jam melalui monitor dalam bentuk grafik alogram dan hasilnya dapat dicetak. Untuk analisis sekuens DNA dan translasi asam amino dilakukan dengan menggunakan *software computer Genetic Mac Version 8,0*. Homologi sekuens antibiotik yang dihasilkan berdasarkan referensi dari *Gen Bank*.

Hasil PCR isolat *Streptomyces* sp.

Hasil PCR isolat *Streptomyces* sp.-1 sampai *Streptomyces* sp.-6 dengan formulasi PCR yaitu PCR mix kit 25 μ L, akuabides steril 10 μ L, pA (*forward*) 10 pmol 5 μ L, pH (*reverse*) 10 pmol 5 μ L, DNA 5 μ L dan optimasi PCR dengan denaturasi awal 95°C selama 5 menit, amplifikasi sebanyak 35 daur : denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 1 menit, *elongasi* 72°C selama 1 menit dan pada putaran ke 35 *post elongasi* 72°C selama 10 menit, dapat dilihat pada Gambar 5.27.



Gambar 5.27 Hasil PCR isolat *Streptomyces* sp.

Keterangan gambar :

- 1 : *Streptomyces* sp.-1
- 2 : *Streptomyces* sp.-2
- 3 : *Streptomyces* sp.-3
- 4 : *Streptomyces* sp.-4
- 5 : *Streptomyces* sp.-5
- 6 : *Streptomyces* sp.-6
- : Kontrol negatif
- + : Kontrol positif (*Streptomyces griseus* ATCC 10971)
- M : Marker

Dari Gambar 5.27 terlihat bahwa *Streptomyces* sp.-1, sp.-2, sp.-3, sp.-4, sp.-5 dan sp.-6 menghasilkan 1 pita dan selanjutnya disekuensing dengan metode otomatis ABI Prism 310.

Daerah Variabel γ Sekuen 16S rRNA *Streptomyces* sp.

Dari 6 isolat *Streptomyces* penghasil antibiotik pada ekosistem *mangrove* pantai timur Surabaya ternyata hanya 3 isolat yang dapat disekuensing dengan metode otomatis ABI Prism 310 yaitu *Streptomyces* sp.-1, *Streptomyces* sp.-3, dan *Streptomyces* sp.-6.

Panjang urutan nukleotida *Streptomyces* sp.-1 hasil sekuensing adalah 1430 pb dengan daerah variabel γ yang terletak pada nukleotida ke 82-202 yaitu : TCT AAT ACC GGA TAT GAC CAC CGG CCG CAT GGT CTG GTG GTG GAA AGC TCC

GGC GGT GCA GAT GAG CCC GCG GCC TAT CAG CTT GTT GGT GGG GIG
ATG GCC TAC CAA GGC GAC GAC GGG

Panjang urutan nukleotida *Streptomyces* sp.-3 adalah 1416 bp dengan daerah variabel γ yang terletak pada nukleotida ke 80-199 yaitu :

TCT AAT ACC GGA TAT GAC TGT CCA TCG CAT GGT GGA TGG TGT AAA GCT
CCG GCG GTG CAG GAT GAC CCC GCG GCC TAT CAG CTT GTT GGT GAG
GTA GTG GCT CAC CAA GGC GAC GAC GGG

Panjang urutan nukleotida *Streptomyces* sp.-6 adalah 478 bp dengan daerah variabel γ yang terletak pada nukleotida ke 127-255 yaitu :

GCT AAT ACC GGA TAA CTT TTT TCT TCG CAT GAA GGA GAA TTG AAA
GAT GGC TCC GGC TAT CAC TTA CAG ATG GAC CCG CGG CGC ATT AGC
TAG TTG GTG AGG TAA CGG CTC ACC AAG GCG ACG ATG CG

Diagram Pohon Filogenetik *Streptomyces* sp.

Dari urutan gen 16S rRNA *Streptomyces* sp. yang telah diketahui, dibuat diagram pohon filogenetik menggunakan program *Sci Ed Central, Clone Manager Profesional Suite, Scientific and Educational Software* 1994-2000. Ketiga isolat *Streptomyces* sp. hasil isolasi pada ekosistem *mangrove* pantai timur Surabaya dibandingkan dengan 11 isolat *Streptomyces* sp. lokal Indonesia dan 1478 isolat *Streptomyces* sp. dari *Gene Bank*.

Diperoleh hasil bahwa *Streptomyces* sp.-1 sp.-3, sp.-6 ternyata mempunyai kekerabatan lebih dekat dengan *Streptomyces* sp. SWL-9, *Uncultured Streptomyces* sp., *Streptomyces* sp. SUK 1, *Streptomyces* sp. Is BDOE 1, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces Coelicolor NAGA*, *Streptomyces* sp. CK 4412, *Streptomyces thermovoliaceus*, *Streptomyces* sp. E-2248, *Streptomyces* sp. 21-zhy, *Streptomyces* sp. 01-T1-6, *Streptomyces* sp. 34-zhy, *Streptomyces* sp. 6G8, *Streptomyces* sp. SUK 2, *Streptomyces* sp. 6G4, *Streptomyces* sp. 3-97, dan *Streptomyces* sp.6G14, yang dapat dilihat pada Gambar 5.28 dan besarnya persentase perbedaan dari 20 spesies *Streptomyces* sp. tersebut dapat dilihat pada Lampiran 16. Berdasarkan Lampiran 16 diketahui bahwa (1) *Streptomyces* sp.-1 mempunyai persamaan dengan *Streptomyces* sp. 6G8 sebesar 83,4%, *Streptomyces* sp.-3 sebesar 85%, *Streptomyces* sp. SWL-9 sebesar 85,16%, *Streptomyces* sp. 6G4

sebesar 85,39%, dan (2) *Streptomyces* sp.-3 mempunyai persamaan dengan *Uncultured Streptomyces* sp. sebesar 80,3%, *Streptomyces* sp. 6G8 sebesar 85,84%, *Streptomyces* sp. SWL-9 sebesar 86,85%, dan *Streptomyces* sp. 6G4 sebesar 87,37%, (3) *Streptomyces* sp.-6 mempunyai persamaan dengan *Uncultured Streptomyces* sp. sebesar 30,47%, *Streptomyces* sp. 6G4 sebesar 33,18%, *Streptomyces* sp. 6G8 sebesar 33,67%, dan *Streptomyces* sp. SWL-9 sebesar 37,11%. Dapat diketahui bahwa *Streptomyces* sp.-1, *Streptomyces* sp.-3, dan *Streptomyces* sp.-6 hasil isolasi dari tanah ekosistem *mangrove* pantai timur Surabaya adalah isolat lokal baru.

BAB 6 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Dari isolat *Streptomyces* sp. ternyata yang menunjukkan daya hambat terhadap bakteri *M. tuberculose*.
2. Dari enam isolat *Streptomyces* sp. penghasil antibiotik, yang dapat disekuensing adalah *Streptomyces* sp. 1, sp-3, dan sp.-6 yang melalui identifikasi secara makroskopis, mikroskopis, fisiologis, dan urutan gen 16S rRNA, ketiganya merupakan isolat lokal baru.
3. Profil kromatogram dan bioautogram antibiotik menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp.-1, sp.-3, dan sp.-6 mampu menghasilkan antibiotik.

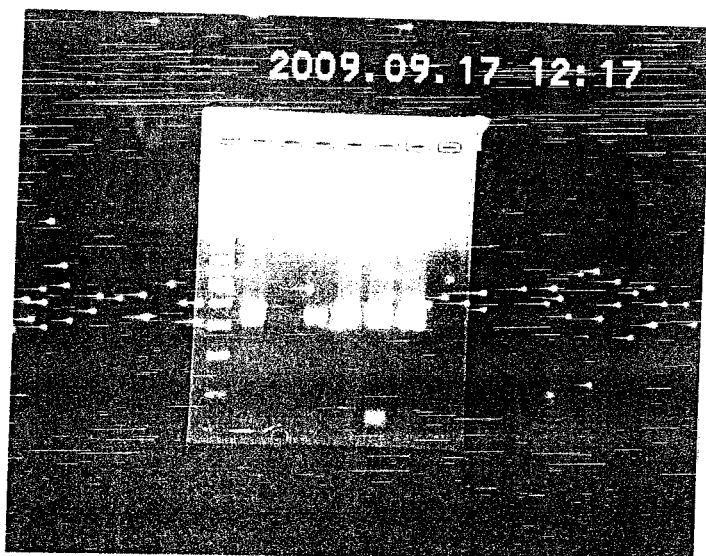
DAFTAR PUSTAKA

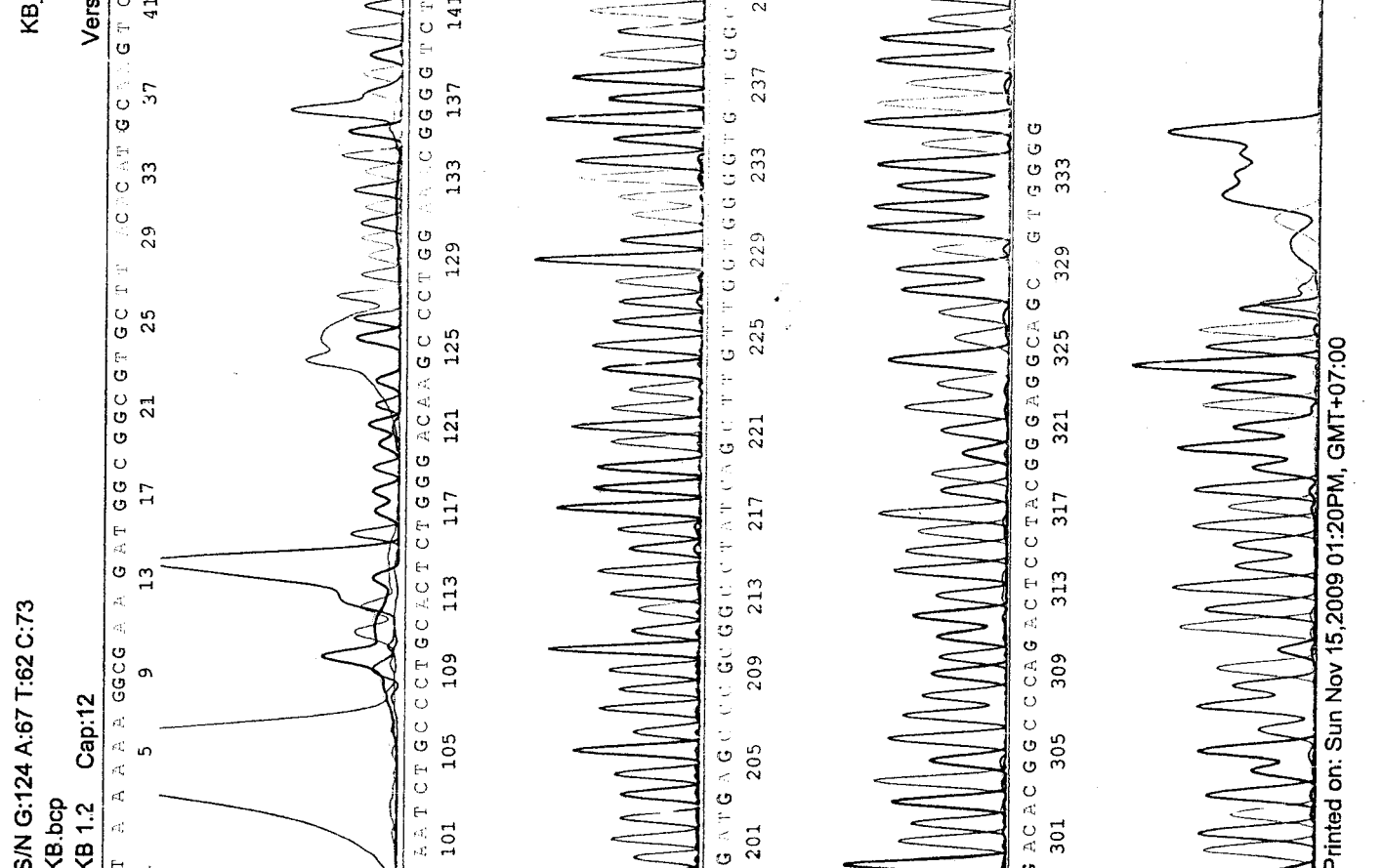
- Anderson, A.S. and Wellington, M.H.E. 2001. *Review Article The Taxonomy of Streptomyces and Related Genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 51. p.797-814.
- Anonim. 2005. *Streptomyces Isolation and Characterization of Streptomyces from Soil*. www.biology.eku.edu/piecece/streptomyces.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., and Sthruel, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. Third Edition. John Wiley & Sons. Inc.
- Bennett, E.P. 2007. *Exo-alpha-N-Acetylgalactosaminidase from Streptomyces coelicolor Specificity*. Cummings Center. Beverly. USA.
- Berghe, V.D.A, Vlietinck, J.A. 1991. *Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plant*. Methods in Plants Biochemistry. London.
- Brower, J.E., Zar, J.H., von Ende, C.N. 1998. *Field and Laboratory Methods for General Ecology*. 4th Edition. McGraw-Hill Companies. Inc. United States of America.
- Brown, TA. 2001. *Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction*. Fourth Edition. Blackwell Publishing.
- Chater, K.F. 1993. *Genetics of Differentiation in Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 47 : 685-713.
- Clarridge, J.E. 2004. *Impact of 16S rRNA Genes Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Disease*. *Clinical Microbiology Review*. October. Vol. 17(4). p. 840-862.
- Demain A. and A.S. Nadine. 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D., Wellington, E.M.H. 1998. *Transfer of Streptomycin Biosynthesis Gene Cluster within Streptomyces Isolated from Soil*. *Applied and Environmental Microbiology*. December. Vol. 64. No. 12. p. 5061-5063.
- Forbes, B.B., Sahm, D.F., Weissfeid A.S. 1998. *Diagnostic Microbiology*. 9th Edition. Mosby Inc. USA.

- Gust, B., Chandra, G., Akimowicz, D.J., Yuqing, T., Bruton, C.J., , and Chater, K.F. 2004. *Red-Mediated Genetic Manipulation of Antibiotic-Producing Streptomyces*. *Advanced in Applied Microbiology*, Vol. 54. Elsevier Inc.
- Healy, F.G., Bukhalid, G.A., Loria, R. 1999. *Characterization of an Insertion Sequence Element Associated with Genetically Diverse Plant Pathogenic Streptomyces spp.* *J. Bacteriology*. March. p 1562-1568.
- Hopwood, D.A. 1999. *Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases*. *Chemical Rev.* Vol. 97. 2465-2497.
- Joke, R., Nelly C.S., Widiyanto B.M., Elin Y.S., Semardji A.A., Anna R.S. 1991. *Farmakodinamika dan Terapi Antibiotika*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Korn F.W. and Jurgen, H.K. 2002. *The Family Streptomycetaceae*. www.biology.eku.edu/piecece/streptomyces. 20 Pebruari 2005.
- Liu, W., Shen, B. 2000. *Genes for Production of the Eneidyne Antitumor Antibiotic C-1027 in Streptomyces globisporous Are Clustered with the cagA Gene That Encodes the C-1027 Apoprotein*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Feb. p. 382-292.
- Madigan, T.M., Martiuko JM., Parker J. 2002. *Biology of Microorganisms*. 9th Edition. Prentice Hall International. London.
- Old R.W., dan S.B. Primose. 1989. *Prinsip-prinsip Manipulasi Gen*. Edisi 4. University Indonesia.
- Oregaard,, G., Sorensen, S.J. 2007. *High Diversity of Bacterial Mercuric Reductase Genes From East Fork Creek Surface and Sub-surface Floodplain Soil (Oak Ridge, Tennessee, USA)*. Department of Microbiology. Institute of Biology. Solvgade. Comppenhagen. Denmark.
- Pfister, P., Risch,M., Brodersen, D.E., Bottger, E.C. 2003. *Role of 16S rRNA Helix 44 in Ribosomal Resistance to Hygromycin B*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. May. p.1496-1502.
- Prammananan, T., Sander, P., Springer, B., Bottger, E.C. 1999. *RecA-Mediated Gene Conversion and Aminoglycoside Resistance in Strain Heterozygous for rRNA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Mar. p.447-453.
- Price B, T. Adamidis, R. Kong, W. Champness. 1999. *A Streptomyces coelicolor Antibiotic Regulatory Gene, absB, Encodes an Rnase III Homolog*. *Journal of Bacteriology*. Oct. p. 6142-6151.

- Rodriquez, C., Lipski, A. 2007. *Taxonomy Diversity and Degree of Susceptibility to Oxytetracycline and Gentamicin of Bacteria from an Agricultural Soil*. Microbiology. Univeristy Osnabrueck. Germany.
- Sambrook J., E. Frisch, T. Maniatis. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. ²nd Edition. Cold Spring Harbour. Laboratory Press. New York.
- Sanger, F., and Coulson, AR. 1975. *A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primer Synthesis with DNA Polymerase*. *J. Mol. Biol.* 94-441.
- Vakulenko S.B., Mobasehery S. 2003. *Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future*. *Clinical Microbiology Review*. July 2003. p. 430-450.
- Wang, Y., Xu, J., Xiao, J., Xie, S. 2007. *16S rRNA Sequences of Actinomycetes Strains Isolated from Mangrove Soil*. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources. Third Institute of Oceanography SOA. China.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. 2001. *How Many Antibiotics Are Produced by the Genus Streptomyces ?*. *Arch. Microbiology*.
- Webb, V. and Davies, J. 1993. *Antibiotic Preparations Contain DNA : A Source of Drug Resistance Genes ?*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Nov. p. 2379-2384.
- Wongsosuputio, S. 1990. *Elektroforesis Gel Protein*. PAU-Bioteknologi UGM.

LAMPIRAN





Pts 883 to 6680 Pk1 Loc: 883
Version 5.2 Patch2 HiSQV Bases: 311

