

OPTIMASI VOLUME DNA MARKER DAN VOLUME DNA HASIL AMPLIFIKASI GEN *tetL* RESISTENSI ANTIBIOTIK TETRASIKLIN DARI BAKTERI *Bacillus cereus* PADA PASIEN ULKUS DIABETIK

Suri Tilawah¹, Rafika Sari², Pratiwi Apridamayanti³

Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Untan Pontianak

Email : Suritilawah2808@student.untan.ac.id

Abstrak

Masalah utama yang menyebabkan lamanya penyembuhan luka ulkus diabetik adalah terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Bakteri *Bacillus cereus* dilaporkan telah resisten terhadap antibiotik tetrasiklin sebesar 64,10%. Gen *tetL* merupakan gen pengkode resistensi antibiotik tetrasiklin pada bakteri *Bacillus cereus*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah DNA bakteri *B.cereus* dari isolat pasien ulkus diabetik berhasil diekstraksi menggunakan metode ekstraksi kit dan untuk mengetahui apakah primer spesifik forward 5'-TCGTTAGCGTGCTGTCATTC-3' dan reverse 5'-GTATCCCACCAATGTAGCCG-3' berhasil mengidentifikasi gen *tetL*. Metode yang digunakan adalah secara *in vitro* dengan mengekstraksi DNA menggunakan DNA ekstraksi kit kemudian amplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* serta dideteksi panjang basa dengan elektroforesis gel agarosa sebagai penentu spesifitas amplifikasi gen yang sesuai dengan target yang akan dideteksi. Hasil yang didapat yaitu Gen berhasil terdeteksi dengan memperlihatkan penampakan pita DNA yang berada sesuai dengan *marker* yang digunakan. Besar Gen *tetL* 267 bp dengan ukuran Gen *tetL Bacillus cereus* yang sesuai dengan NCBI (*genBank: NC_001705.1*). DNA Bakteri *B.cereus* berhasil diekstraksi menggunakan ekstraksi kit, dibuktikan dengan terjadinya amplifikasi pada proses PCR dan Gen *tetL* berhasil diidentifikasi menggunakan metode PCR konvensional, dengan primer spesifik menghasilkan amplifikasi pada ukuran 267 bp.

Kata Kunci : *Bacillus Cereus*, Gen *tetL*, PCR, Tetrasiklin, Ulkus Diabetik

PENDAHULUAN

Bakteri golongan *Proteus*, *Pseudomonas*, *Stafilokokus*, *Klebsiella*, *Bacillus* dan *E.coli* merupakan beberapa bakteri yang sering menginfeksi pada luka diabetes.⁽¹⁾ Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chellakkannu *et al* (2016) ditemukan bakteri patogen diantaranya *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus sp.* pada ulkus diabetik sebanyak 70%.⁽²⁾ Hasil penelitian dari Shubba KS (2013) ditemukan *bacillus sp* sebanyak 16.6% dari isolat pasien ulkus kaki diabetik.⁽³⁾ Tetrasiklin

merupakan salah satu antibiotik yang digunakan untuk pengobatan infeksi ulkus diabetik.^(4,5) Berdasarkan penelitian yang dilakukan Saeed 2018 di Iraq Bakteri *Bacillus cereus* telah resisten terhadap antibiotik tetrasiklin sebesar 64,10%.⁽⁶⁾ Laporan resistensi pada bakteri *Bacillus cereus* terhadap Tetrasiklin dari Amerika Serikat dan Eropa menunjukkan perkembangan resistensi lebih lanjut.⁽⁷⁾

Gen *tetL* merupakan gen pengkode resistensi antibiotik tetrasiklin. Gen ini telah terdeteksi pada berbagai bakteri gram positif. Gen *tetL* terdapat pada bakteri *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* dan *Enterococcus* dengan ukuran yang berbeda-beda.⁽⁸⁾ Berdasarkan penelitian Saeed 2018 menunjukkan bahwa terdapat 11 isolat bakteri *Bacillus cereus* yang terdeteksi membawa gen *tetL* dari 25 isolat bakteri (44%). Bakteri *Bacillus cereus* pada sampel makanan telah terbukti membawa gen *tetL* dengan ukuran basa nukleotida *tetL* sebesar 267 bp (*basepair*).⁽⁶⁾ Identifikasi dan isolasi DNA bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dan elektroforesis menggunakan gel agarosa sebagai penentu spesifitas amplifikasi gen yang sesuai dengan target yang akan dideteksi.⁽⁹⁾ Rapid test PCR merupakan teknik cepat untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik secara *in vitro* dengan menggunakan 2 primer untai tunggal pendek. Dengan teknik ini sejumlah kecil fragmen DNA yang diinginkan akan diamplifikasi secara eksponensial sampai jutaan kali dalam beberapa jam.⁽¹⁰⁾

Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya pita yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan potongan jumlah pasang basa (*basepair*).⁽¹¹⁾ Faktor yang mempengaruhi elektroforesis salah satunya yaitu volume sampel hasil amplifikasi dan volume DNA marker. Volume DNA hasil amplifikasi mempengaruhi hasil visualisasi pada elektroforesis. Hasil pita DNA yang baik memudahkan dalam penentuan ukuran DNA hasil amplifikasi.⁽¹²⁾ Berat molekul dari suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi

fragmen-fragmen DNA yang telah diketahui ukurannya sebagai penanda (*DNA marker* atau *DNA ladder*).⁽¹³⁾ Kendala dalam penggunaan *DNA marker* yang ditemui dalam elektroforesis adalah separasi fragmen yang kurang baik, fragmen yang tipis atau kurang tegas dan bentuk fragmen yang tidak lurus (*smile effect*), sehingga menyulitkan pembacaan hasil elektroforesis. Hasil fragmen *DNA marker* yang baik akan memudahkan pembacaan hasil fragmen DNA yang diamplifikasi. Oleh karena itu, dilakukan penelitian ini untuk mengetahui volume DNA hasil amplifikasi dan volume DNA marker yang menghasilkan visualisasi fragmen yang optimum.

Metode

Penelitian ini menggunakan metode molekuler secara *in vitro* yaitu *Polymerase Chain Reaction (PCR)* konvensional dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur bakteri *Bacillus cereus*, primer spesifik forward 5'-TCGTTAGCGTGCTGTCATTC-3' dan reverse 5'-GTATCCCACCAATGTAGCCG-3', *GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit*, *Gel Agarose*, *DNA Ladder 50-500bp*, *DNA Ladder 100-10000 bp*, *Loading dye*, *Red Gel*, *Quantinova SYBR PCR Kit*, *Mueller Hinton Agar*, *Nutrien Broth*, *Aquades*, *Etanol Absolut*, *Buffer TAE*. Tahapan penelitian yang dilakukan diantaranya isolasi bakteri *Bacillus cereus*, Ekstraksi DNA, Amplifikasi gen *tetL* dan Analisis hasil amplifikasi dengan elektroforesis agarosa.

1. Isolasi Bakteri *Bacillus cereus*

Isolasi bakteri *Bacillus cereus* menggunakan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dan media cair NB (*Nutrient Broth*). Pembuatan media MHA dilakukan dengan mencampurkan MHA dengan aquadest kemudian

dipanaskan hingga mendidih. Media tersebut kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Media kemudian dituang ke cawan petri dan dituang ke dalam tabung untuk media agar miring. Media dibiarkan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) hingga ± 1 jam hingga mengeras, kemudian digoreskan bakteri pada petri. Media yang telah digoreskan bakteri kemudian didiamkan selama 30 menit, lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Tahap selanjutnya yaitu peremajaan bakteri, diambil kultur tunggal *Bacillus cereus* pada cawan petri dan digoreskan pada media agar miring, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Tahap selanjutnya yaitu menumbuhkan bakteri pada media cair NB, dengan cara menambahkan media NB dilarutkan dengan aquades lalu dipanaskan hingga mendidih, didinginkan dan disterilisasi. Selanjutnya diambil bakteri pada agar miring lalu dipindahkan pada media cair kemudian dihomogenkan, diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

2. Ekstraksi Bakteri

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit*. Kultur bakteri yang digunakan adalah kultur bakteri *Bacillus cereus* dalam media cair. Diambil dan dimasukkan ke dalam tube dan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Diambil *Pellet* hasil sentrifugasi dan ditambahkan buffer R1. Kemudian ditambahkan *proteinase K* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan buffer R2 serta ditambahkan *proteinase K*. Diinkubasi dengan suhu 65°C selama 20 menit dan digojog setiap 5 menit. Kemudian ditambahkan buffer BG dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, ditambahkan

etanol absolut. Dipindahkan sampel ke kolom kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan wash buffer dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit, dibuang sisa buffer yang tertampung. Disentrifugasi kembali kolom dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Dibuang kembali sisa buffer yang tertampung pada kolom. Dipindahkan kolom ke dalam mikrotube dan ditambahkan elution buffer. Disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Disimpan hasil ekstraksi dalam suhu -20°C.

3. Amplifikasi Gen *tetL*

Amplifikasi gen *tetL* dengan PCR menggunakan kit PCR dengan merk SYBR Green PCR Mastermix. Tahap pertama dilakukan dengan mencampurkan primer *forward* dan primer *reverse*, *template* DNA, dan *deionized water*. Primer *forward* yang digunakan untuk gen *tetL* 5'-TCGTTAGCGTGCTGTCATTC-3' dan *reverse* 5'-GTATCCCACCAATGTAGCCG-3'. Proses amplifikasi dilakukan dengan tahapan awal diatur suhu 95°C dalam waktu 2 menit, kemudian dilanjutkan dengan 37 siklus untuk 3 tahapan yaitu tahapan denaturasi dengan suhu 95°C dalam waktu 5 detik, tahap annealing dengan suhu 60°C dalam waktu 10 detik, tahap ekstensi dengan suhu 60°C dengan waktu 10 detik. Kondisi penyimpanan dengan suhu 4°C selama ∞.

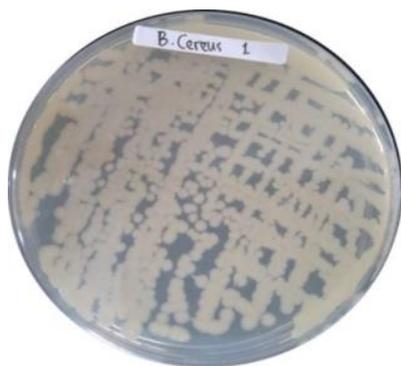
4. Analisis Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Agarosa

Dibuat agarosa dengan konsentrasi 1,5% dengan cara ditimbang agarosa bubuk dan dilarutkan dengan buffer TAE 1X yang dibuat melalui pengenceran TAE 50X. Dicampurkan dan dipanaskan hingga agarosa larut. Kemudian ditambahkan pewarna gel

red. Dituang larutan agarosa kedalam *tray* elektroforesis yang telah disiapkan dan dipasang sisir elektroforesis. Dibiarkan agarosa dingin dan mengeras. Setelah agarosa mengeras diambil sisiran pada gel dan putar sisi gel. Dituang buffer TAE hingga tanda batas pada elektroforesis. Disiapkan hasil amplifikasi DNA sebanyak 3 μ l dan 5 μ l kemudian masing-masing ditambahkan loading buffer. Dimasukkan hasil amplifikasi DNA yang sudah ditambahkan loading buffer kedalam sumur yang terbentuk dengan hati-hati dan perlahan. Ditambahkan DNA *ladder* kappa dan Norgen pada bagian tepi kanan dan kiri sebanyak 0,5 μ l dan 0,75 μ l. Kemudian dihubungkan alat elektroforesis dengan power supply yang telah diatur dengan voltase 90 volt selama 1 jam. Diamati pita-pita yang terbentuk dengan menggunakan lampu UV 254 nm dan ditentukan ukuran gen yang diperoleh dengan cara dibandingkan dengan DNA *ladder*.⁽⁴⁹⁾

Hasil dan Pembahasan

Hasil dari isolasi bakteri *b.cereus* adalah sebagai berikut :



Gambar 1. Koloni bakteri *b.cereus*

Bakteri yang telah diisolasi berbentuk bulat dan berwarna putih kekuningan. Bakteri kemudian diekstraksi dengan diawali dengan pemecahan dinding sel bakteri menggunakan *buffer* R1 dan *buffer* R2, setelah itu ditambahkan dengan

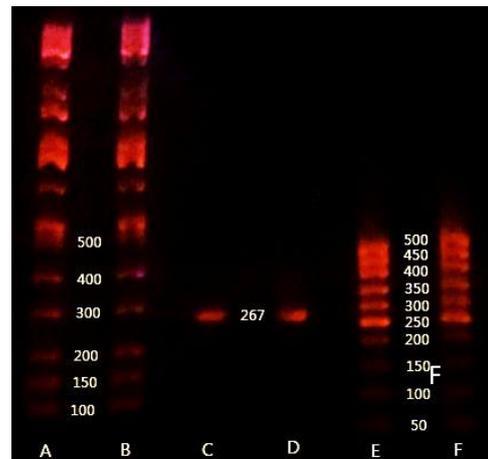
proteinase K yang berfungsi memotong atau memutus ikatan peptida protein pada sel bakteri tersebut, kemudian campuran tersebut digojog menggunakan vortex agar pemutusan ikatan peptida tersebut lebih cepat terjadi. Langkah selanjutnya yaitu dilakukan sentrifugasi yang berfungsi untuk memisahkan DNA dari pengotor dan zat-zat lain sehingga DNA akan mengendap dibagian bawah tabung *effendorf*. Pelet yang diperoleh kemudian diresuspensi menggunakan buffer BG dan etanol yang berfungsi untuk mendenaturasi protein. Hasil resuspensi kemudian dipindahkan ke kolom lalu dilakukan *sentrifuge* untuk memisahkan antara DNA dari *buffer* dan pengotor. Langkah selanjutnya yaitu dilakukan penghilangan etanol menggunakan *wash buffer* untuk menghilangkan etanol karena apabila etanol masih tersisa akan merusak DNA. Tahap akhir dalam pemurnian DNA yaitu pemberian *elution buffer* yang berfungsi untuk mengelusi DNA sehingga DNA dapat menyatu pada bagian bawah tube.

Hasil ekstraksi DNA bakteri *B.cereus* diamplifikasi menggunakan PCR dengan PCR kit dengan merk dagang *Quantinova SYBR PCR Kit* dimana terdiri dari beberapa bahan atau komponen yang diperlukan untuk PCR seperti dNTPs, enzim polimerase, $MgCl_2$ yang terdapat dalam *PCR master mix*. Primer yang digunakan yaitu primer spesifik *tetL forward* 5'-TCGTTAGCGTGCTGTCATTC-3' dan *reverse* 5'-GTATCCCACCAATGTAGCCG-3'.

Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Proses PCR dimulai dengan pemasukan master mix ke dalam tube PCR sebanyak 25 μ L, primer *forward* dan primer *reverse* masing-

masing sebanyak 3 μL , *template* DNA sebanyak 5 μL , dan *deionized water* 14 μL . Pada metode PCR, ada empat tahapan yaitu pradenaturasi, denaturasi, penempelan primer (*annealing*) dan pemanjangan untai DNA hasil amplifikasi (*extension*). Predenaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 2 menit hal ini bertujuan untuk lebih menstabilkan enzim-enzim dalam mastermix agar dapat bekerja secara optimal sebelum proses PCR. Denaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 5 detik, Proses ini membuka untai double helix DNA dengan memecah ikatan hidrogen yang menghubungkan keduanya. Kombinasi *annealing* dan ekstensi pada suhu 60°C selama 10 detik. Suhu *annealing* terbaik biasanya $2-5^{\circ}\text{C}$ di bawah T_m . T_m merupakan suhu pada saat setengah dari molekul DNA mengalami denaturasi. Pada suhu terlalu tinggi menyebabkan penempelan primer spesifik tetapi konsentrasi ampikon yang didapatkan sangat kecil sehingga suhu *annealing* sangat kritis pada proses amplifikasi DNA target. Sedangkan suhu terlalu rendah menyebabkan pita DNA target yang diharapkan hasilnya tidak spesifik.

Hasil dari elektroforesis Visualisasi menggunakan UV dengan panjang gelombang 254 nm. Hasil analisis PCR menggunakan primer spesifik Gen *tetL* menunjukkan terdapat pita DNA yang ditandai dengan munculnya fragmen DNA yang memiliki panjang spesifik 267 bp yang dibandingkan dengan marker. Munculnya gen *tetL* ini menunjukkan bahwa adanya resistensi pada bakteri *B.cereus* terhadap antibiotik Tetrasiklin. Gen *tetL* yang terdapat di ekstra kromosom yakni plasmid menghalangi interaksi antara tetrasiklin dengan ribosom sehingga tetrasiklin menjadi tidak efektif.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis.

A:Marker kappa 0,75 μL , B: Marker kappa 0,5 μL , C: hasil amplifikasi gen *tetL* 3 μL , D: hasil amplifikasi gen *tetL* 5 μL , E: Marker norgen 0,75 μL , F: Marker norgen 0,5 μL .

Pengujian elektroforesis dilakukan dengan melakukan optimasi jumlah marker dan jumlah sampel yang menghasilkan pemisahan yang optimal. Terdapat dua jenis *DNA Marker* yang digunakan yaitu *Marker kappa* dengan ukuran 100-10000 bp dan *Marker Norgen* dengan ukuran 50-500 bp. Hasil elektroforesis tersebut menunjukkan pada *DNA Marker Kappa* terdapat 18 fragmen, sedangkan *DNA Marker Norgen* terdapat 10 fragmen. Ukuran fragmen DNA tersebut sesuai dengan ukuran fragmen DNA yang disebutkan dalam spesifikasi produknya. Hasil visualisasi proses elektroforesis menunjukkan bahwa volume *DNA Marker kappa* sebanyak 0,5 μL dan 0,75 μL sudah dapat divisualisasikan dan relatif jelas, namun fragmen *DNA Marker* yang muncul masih belum terpisah sempurna pada ukuran 600 hingga 10000 bp. Hal tersebut dapat disebabkan karena ukuran molekulnya yang besar, tetapi waktu yang diberikan untuk proses elektroforesis terlalu singkat, sehingga memengaruhi laju migrasinya (elektromobilitas). Semakin besar ukuran molekul,

elektromobilitasnya semakin kecil. Semakin besar muatan molekul, maka semakin besar pula elektromobilitasnya. Selain besar muatan dan ukuran molekul, topologi atau bentuk molekul juga memengaruhi elektromobilitas suatu molekul. Sedangkan pada *DNA Marker Norgen* pada volume 0,5 μL dan 0,75 μL sudah menghasilkan pemisahan yang baik. Hasil Visualisasi proses elektroforesis menunjukkan bahwa volume *DNA marker* sebanyak 0,5 μL sudah dapat divisualisasikan, namun fragmen DNA yang muncul masih tampak tipis. Volume optimum *DNA marker* yang dapat memvisualisasikan fragmen dengan relatif jelas adalah pada volume 0,75 μL . Sedangkan optimasi sampel DNA amplifikasi dengan volume 3 μL dan 5 μL menunjukkan hasil fragmen yang sama, dengan penggunaan sampel DNA amplifikasi sebesar 3 μL sudah menunjukkan fragmen yang cukup jelas.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa volume DNA hasil amplifikasi pada 3 μL sudah menunjukkan fragmen yang cukup jelas. Performa *DNA marker* yang menunjukkan performa yang baik dan efektif yaitu pada volume 0,75 μL .

Daftar Pustaka

1. Mohamad, N.A., Jusoh, N.A., Htike, Z.Z., Win, S.L. Bacteria identifiaton from microscopic morphology: A review. *International Journal on Soft Computing, Artificial Intelligence and Applications*. 2014 ; 3(2)
2. Chellakkannu M, Revathi V, Panneerselvam T. Bacteriological Study of Diabetic Foot on the Antibiotic and Topikal Ointment Therapy. *Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*. 2016; 2: 259-266.
3. Shubha KS, Hudeda S, Lakshmidivi N. Isolation and Identification of Pathogens from Diabetic Foot Infections from K. R. Hospital Mysore. *International Journal of Development Research*. 2013; 3: 23-26.
4. Mcevoy. *American Hospital Formulary Services Drug Information*. Bathesda : American Society Of Health-System Pharmacist ; 2011.
5. Fortuna S. Studi Penggunaan Antibiotika Pada Pasien Diabetes Melitus dengan Ulkus dan Gangren (Skripsi). Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga ; 2016.
6. Saeed BMS, Abbas BA, Al-Jaadan SAN. Molecular Detection Of Tetracycline Resistance Genes In *Bacillus cereus* Isolated From Food Sources. *Basrah Journal of Veterinary Research*. 2018 ; 17(3) : 1-8.
7. Ash C, Farrow J A E, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins M D. Comparative Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and Related Species on the Basis of Reverse Transcriptase Sequencing of 16s rRNA. *International Journal Of Systematic Bacteriology*. 1991 ; 41(3) : 343-346.
8. Frazzon A P G, Gama B A, Hermes V, Bierhals C G, Pereira R I, Guedes A G, et all. Prevalence Of Antimicrobial Resistance And Molecular Characterization Of Tetracycline Resistance Mediated By Tet(M) And Tet(L) Genes In *Enterococcus* Spp. Isolated From Food In Southern Brazil. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010 ; 26 : 365-370.
9. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr. *Int J Biomed Res* [Internet]. 2010;1(5):81–97. Available from: www.ssjournals.com

10. Ghaaffar, Shabarni. Buku Ajar Bioteknologi Molekul. Bandung : Universitas Padjajaran ; 2007.
11. Klug W S, Hazel p. Analytical Biochemistry. England : Pearson Education limited ; 1998.
12. Harahap M R. Elektroforesis : Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro. 2018 ; 1(2) : 21-26
13. Martin R. Gel Elektrophoresis: Nucleid Acids. Oxford : Bios Scientific Publisher ; 1996