

Analisis sekuen seluruh DNA dari gen salah satu mutan *Klebsiela pneumoniae* yang resisten terhadap BRL-41897A (Mutan KSL 19)

Sequencing analysis of the hole DNA of a mutant gene of *Klebsiela pneumoniae* resistant against BRL 41897A (KSL 19 Mutant)

M. Kuswandi

Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

Abstrak

Artikel terdahulu melaporkan bahwa hasil *sequencing* dari gen – gen yang disisipi *TnphoA* dari ketiga mutan (KSL19, KSL38, KSL62) menunjukkan bahwa ketiga gen tersebut adalah gen yang berbeda satu sama lain. Melanjutkan penelitian tersebut, dipilih mutan KSL19 untuk dibaca seluruh basa dari DNA gennya yang disisipi oleh *TnphoA* dengan cara mengklon fragmen kromosom M10 ke dalam *pUC18* kemudian DNA rekombinan dianalisis dengan elektroforesis gel dan *Southern blotting* menggunakan fragmen *Hind III* dari K1H19 sebagai *probe*. Klon yang dihasilkan disebut M19 yang membawa seluruh gen yang mempunyai peran penting atas terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik BRL 41897A.

Memakai analisis *sequencing* menggunakan primer dari fragmen K1H19 telah didapat data bahwa ORF gen dimaksud (*ks119*) mempunyai 324 basa dengan didahului oleh rangkaian signal sekuen. Untuk karakterisasi klon M19 telah dilakukan analisis komplementasi dengan cara menstransformasi plasmid M19 ke dalam sel mutan KSL19 yang disebut T19, kemudian dicek dengan elektroforesis gel dan uji sensitifitas. Hasil analisis menunjukkan bahwa setelah mutan KSL19 yang telah ditransformasi oleh plasmid M19 (sebesar 7 kb fragmen DNA yang membawa gen *ks119*) atau strain T19 terbukti menjadi sensitif kembali terhadap antibiotik BRL 41897A.

Kata kunci : gen *ks119*, mutan *K.pneumoniae*KSL19, resisten terhadap BRL41897A, *sequencing*.

Abstract

Previous article reported that three positive transformants of different *K.pneumoniae* resistant mutants against BRL 41897A (KSL 19, KSL38 and KSL62) carrying *TnphoA* was sequenced. The results showed that the three different transformants of the mutants had different genes inserted *TnphoA*. Subsequently, we then cloned the wild type M10 chromosome fragments into *pUC18* and recombinants analysed by gel electrophoresis and Southern blotting using *HindIII* fragment from KIH 19 as a probe. The clones were designated M19 carrying the hole gene which had an important role in the antibiotic resistance. The plasmid DNA of positive clone was isolated, analysed by Southern blotting, and sequenced using primers based on sequencing data from KIH19. Sequencing data of KIH19 confirmed the sequence of M19 and the point of insertion of transposon. The amino acid sequence at the N-terminus of disrupted gene *ks119* showed the characteristics of features of signal peptide structure. In order to characterise the M19 clone, further complementation analysis was carried out, by transformation of M19 plasmid into KSL19 mutant cell, designated T19, and

then checked by gel electrophoresis and sensitivity test. The complementation studies showed that sensitivity to BRL 41897A was restored on transformation of a large (7 kb) fragment of DNA carrying *ks19* gene

Key words: Resistant *K.pneumoniae* KSL19 mutants -BRL41897A, sequencing.

Pendahuluan

Tujuan akhir penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis protein produk dari gen-gen yang bertanggungjawab terhadap terjadinya resistensi terhadap antibiotika BRL 41897A, selanjutnya dengan hasil tersebut dilakukan usaha untuk mendesain antibiotika baru turunan dari BRL 41897A yang diharapkan dapat mencegah munculnya jenis bakteri bakteri baru yang resisten terhadap antibiotika turunan BRL 41897A tersebut. Langkah pertama adalah dengan cara membuat bakteri resisten terhadap antibiotika BRL41897A, kemudian mempelajari gen gen yang bertanggung jawab terhadap resistensi tersebut, dan dengan melihat rangkaian asam amino dapat dicari protein analog yang telah ada dalam database. Langkah selanjutnya adalah melakukan modifikasi BRL 41897A untuk menciptakan antibiotika baru yang tidak menimbulkan resistensi pada bakteri.

Antibiotika BRL 41897A adalah antibiotika yang dirancang oleh para peneliti Smith-Kline Beecham untuk memperbaiki kerja Sefalosporin (Basker *et al.*, 1984 dan 1986). Antibiotika ini masuk ke dalam sel bakteri memakai sistem transport Fe yaitu sistem *tonB* yang terekspresi bila ditumbuhkan diatas media yang kekurangan Fe (Watanabe *et al.*, 1987; Critchley *et al.*, 1991; Kuswandi and Lambert, 1997). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa BRL 41897A mempunyai aktivitas tinggi terhadap bakteri Gram negatif seperti *E. coli*, *P.aeruginosa* dan *K.pneumoniae*, termasuk terhadap *K.pneumoniae* yang telah resisten terhadap beberapa antibiotika lain, terutama kelompok penisilin (Nikaido and Rosenberg, 1990; Kuswandi and Lambert, 1997). Dalam rangka untuk mengantisipasi munculnya bakteri yang resisten terhadap antibiotika tersebut telah dibuat mutan-mutan *K.pneumoniae* dengan nama KSL yang resisten terhadap antibiotika BRL 41897A yang merupakan hasil mutagenesis *K.pneumoniae* M10 sensitif terhadap BRL 41897A, dengan menggunakan transposon *Tnp_hoA* (Brown, 1993; Kuswandi, 1997).

Transposon *Tnp_hoA* dipilih untuk pembuatan mutan karena dua alasan utama

adalah: pertama; sifat transposon sendiri yang cenderung mudah menyisip di sembarang tempat dalam kromosom, kedua; dengan adanya gen *p_hoA* dalam transposon akan memudahkan identifikasi koloni yang mengandung transposon, sebab koloni tersebut akan berwarna biru tua yang merupakan hasil reaksi antara enzim *fosfatase A*, produk dari gen *p_hoA*, dengan substrat. Oleh karena itu diharapkan dengan cara ini dapat menghasilkan mutan yang banyak dan mudah didalam menyeleksi serta mengidentifikasi mutan, terutama mutan yang mengalami gangguan pada gen yang memproduksi protein penyusun membran, membran luar (OM) atau periplasmik (Taylor *et al.*, 1989; Manoil and Beckwith, 1985). Mutan-mutan resisten terhadap antibiotika yang dihasilkan telah diidentifikasi dengan metoda Southern Blot (Kuswandi, 2002).

Demikian juga telah dilakukan identifikasi OM dan IROMP dari beberapa mutan. Hasil analisis tersebut menunjukkan terjadi perubahan pada satu atau lebih produksi protein membran luar, baik pada media CAA + Fe maupun CAA-Fe (disebut Iron Regulated Outer Membrane protein / IROM). Hasil analisis dengan metoda Southern Blot memperlihatkan minimal satu mutan KSL19 membawa hanya satu kopi transposon, dan sedikitnya 2 mutan yaitu KSL38 dan KSL52 membawa 2 kopi transposon (Kuswandi, 2003).

Kemudian telah dilakukan kloning fragmen DNA dari beberapa mutan KSL yaitu KSL19, KSL38 dan KSL62 ke dalam bakteri inang *E.coli* kemudian dibaca rangkaian DNA nya dengan memakai primer bagian ujung dari *Tnp_hoA*. Hasil sequencing menunjukkan bahwa fragmen ketiga mutan yang diperiksa (KSL19, KSL38 dan KSL62) mengandung gen yang disisipi transposon berbeda satu sama lain walaupun ketiganya mempunyai peran dalam perubahan sensitivitas bakteri terhadap BRL41897A (Kuswandi, 2004).

Kami tertarik untuk melanjutkan penelitian tersebut untuk mengetahui rangkaian seluruh basa dari gen (ORF) yang disisipi oleh transposon, dan dipilih mutan KSL19 karena

mutan ini membawa hanya satu fragmen yang membawa transposon.

Dalam usaha untuk membaca seluruh basa dari gen utuh, pertama adalah mengambil fragmen dari *K.pneumoniae* induk, M10, dimasukkan kedalam plasmid, baru dilakukan sequencing dengan menggunakan primer dari fragmen mutan KSL19 yang telah dibaca biasanya, plasmid KIH19. Disamping itu untuk membuktikan bahwa gen tersebut mempunyai peran pada resistensi, maka plasmid yang mengandung gen utuh, M19, ditransformasi kedalam sel mutan *K.pneumoniae* KSL19, kemudian dilanjutkan dengan uji sensitivitas. Apabila plasmid M19 dapat mengubah sifat resistensi mutan KSL19 menjadi lebih sensitif terhadap BRL 41897A maka berarti gen tersebut ikut berperan dalam proses resistensi tersebut.

Metodologi

Bakteri yang dipakai

Klebsiella pneumoniae M10 adalah strain yang kehilangan polisakarida pada kapsul tetapi mempunyai lipopolisakarida (LPS) tipe O₂. Strain ini derivat dari strain NCTC5055 (kapsul tipe K₂, LPS tipe O₂) dengan cara mutagenesis kimia (Poxton and Sutherland, 1976) dan menghasilkan siderofor dan IROMP (Iron Regulated Outer Membrane Protein) (Williams *et al.*, 1983). Dalam penelitian ini *K.pneumoniae* M10 merupakan strain Wild Type (WT).

Mutan KSL19 adalah salah satu mutan *Klebsiella pneumoniae* M10 yang resisten terhadap BRL 41897 yang dipakai pada penelitian ini.

Isolasi DNA kromosom

Bakteri ditumbuhkan dalam LB yang berisi 0,5 % b/v glukosa semalam. Sel dipanen dengan cara disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit. Sel kemudian disuspensi dalam 4 mL buffer (15 % sukrosa, 50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA pH 7,5), yang berisi 10 mg lisozim padat (SIGMA), diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya ditambah dengan 2 mL TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 dan 1 mM EDTA) berisi 10 % b/v SDS, campur pelan-pelan, inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambah dengan fenol/kloroform sama banyak dan dicampur hati-hati selama 5 menit, lalu disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas yang jernih dipindahkan ke dalam tabung Universal 30 mL, ditambah 0,1 mL volume Na-asetat 3 N dan 2 volume etanol, lalu dicampur secara hati-hati. DNA segera diambil dengan menggunakan pipet pastur yang ujungnya dibengkokkan. DNA yang diperoleh

dimasukkan ke dalam etanol 70 % dan dicuci dengan hati-hati. DNA diambil dan dilarutkan kembali ke dalam buffer TE 0,5 mL, diekstraksi dengan fenol/kloroform dan dilanjutkan dengan presipitasi etanol, akhirnya dilarutkan dalam 300 µL TE.

Isolasi DNA plasmid

Isolasi DNA plasmid dikerjakan menurut Sambrook and Fritsch (1989).

Colony blot

Filter nilon diletakkan pada permukaan media agar yang mengandung antibiotika. Koloni yang berwarna putih dari hasil transformasi digoreskan pada filter nilon tersebut dan pada media agar yang lain sebagai *master*. Kemudian keduanya diinkubasikan pada suhu 37°C semalam. Filter nilon tersebut diambil, diletakkan di atas kertas 3 MM yang telah direndam dalam SDS 10 % b/v, selama 5 menit. Selanjutnya filter diletakkan selama 5 menit di atas kertas 3 MM yang telah dibasahi dengan larutan denaturasi (0,6 M NaCl, 0,2 M NaOH). Kemudian filter diletakkan selama 5 menit di atas kertas 3 MM yang telah dibasahi dengan larutan penetral (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris HCl, pH 7,0). Setelah itu, filter diletakkan selama 5 menit pada kertas 3 MM yang mengandung 2X SSC dan akhirnya filter dikeringkan dengan meletakkannya di atas kertas 3 MM yang kering. Setelah kering, filter disinari dengan sinar UV (permukaan yang ada koloninya menghadap ke UV) selama 3 menit.

Analisis Southern Blot

DNA yang telah dipotong dipindahkan dari gel agarose ke membran nilon (Boehringer Mannheim) seperti dipaparkan oleh Southern (1975). Secara singkat, DNA pada gel agarose didenaturasi dengan NaCl 0,6 M, NaOH 0,2 M, selama 30 menit. Fragmen-fragmen di blot dengan cara memindahkan memakai kapiler 20 X dapar SSC (3M NaCl, 0,3 M Natrium sitrat, pH= 7,0) pada suhu 20°C semalam.

Melabel asam nukleat - Digoksigenin (DIG) dan deteksinya

Ke dalam tabung *mikrofuga* 10 µg DNA yang sudah dimurnikan dan linear, serta telah didenaturasi selama 10 menit pada 95°C dan di dinginkan secara cepat di atas es/NaCl selama 3 menit, ditambah 2µL campuran heksanukleotida, 2µL campuran dNTP yang dilabel, air steril sampai dengan 19 µL dan terakhir ditambah 1 µL larutan Klenow (2 unit). Semua reagen disuplai dari *Boehringer Mannheim*.

Tabung kedua disentrifugasi secara cepat untuk mencampur reagen di dalamnya, diinkubasi selama 60 menit pada 37°C. Kemudian 2 µL larutan EDTA 0,2 M, pH 8,0 ditambahkan ke dalamnya

untuk menghentikan reaksi. DNA kemudian diendapkan dengan menambahkan 2,5 µL LiCl 4 M dan 75 µL etanol dingin (-20°C). Tabung disimpan semalam pada -70°C. Selanjutnya tabung disentrifugasi pada 12000 g selama 10 menit dan "pellet" dicuci dengan 50 µL etanol dingin (70 % v/v), disentrifugasi dan pellet dikeringkan dibawah vakum dan dilarutkan dalam 50 µL campuran Tris HCl 10 mM, 1 mM EDTA, pH 8,0 pada 37°C.

Hibridisasi dengan "probe" DIG-DNA

Membran nilon dari *Southern blot* disinari UV selama 3 menit. Filter di prehibridisasi dalam boks plastik dengan ukuran yang cocok, minimal dalam 20 mL larutan hibridisasi setiap 100 cm² filter pada 68°C selama 1 jam dengan digoyang secara hati-hati. Setelah larutan prehibridisasi dibuang, kemudian diganti dengan larutan hibridisasi (5 x SSC, 0,1 % (b/v) N-laurilsarkosinat, Garam Na (Sigma), SDS, 0,02 % (b/v). Kemudian ditambah larutan yang dibuat baru 1 % (b/v) "blocking reagent" (Boehringer Mannheim), yang dibuat 1 jam sebelumnya dengan cara mencairkannya pada suhu 50-70°C yang berisi "probe" DNA yang baru saja dilabel (kurang lebih 2,5 mL larutan setiap 100 cm² filter). Kemudian diinkubasi selama 6 jam pada suhu 68°C dengan goyangan yang hati-hati.

Filter kemudian dicuci dengan cara menginkubasikannya 2 x 5 menit pada temperatur kamar dengan minimal 50 mL campuran 20 x SSC (NaCl 3 M, Na Sitrat 0,3 M, pH 7,0 (20°C) dengan 0,1 % SDS. Filter kemudian digunakan secara langsung untuk deteksi DNA yang telah dihibridisasi pada filter tersebut atau disimpan ditempat yang kering untuk deteksi kemudian.

Deteksi hibrida "probe-target DNA"

Filter-filter hibrida dicuci secara cepat selama 1 menit dalam buffer (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (20°C)) dan diinkubasi selama 30 menit dengan kurang lebih 100 mL buffer 2 (blocking reagent 15 % (b/v) dalam buffer 1, disiapkan 1 jam sebelum dipakai dengan cara mencairkan pada suhu 50-70°C). Filter diinkubasi selama 30 menit dengan kurang lebih 20 mL larutan anti DIG-konjugat encer, yaitu telah diencerkan sampai dengan 150 mU/mL (1 : 5000 dalam buffer 2). Antibodi-konjugat yang tak terikat dibuang dengan cara dicuci dengan 2 x 15 menit dengan 100 mL buffer 1 dan membran diekuilibrasikan dengan 20 mL buffer 3 (Tris HCl 100 mM, NaCl, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5 (20°C) selama 2 menit. Akhirnya filter-filter diinkubasi ditempat gelap dengan kurang lebih 10 mL larutan pewarna-substrat yang dibuat baru dalam boks plastik. Warna akan muncul dalam beberapa menit dan reaksi komplit setelah 12-16 jam. Filter dikeringkan pada temperatur kamar dan disimpan.

Larutan pewarna: larutan NBT (*Nitro Blue Tetrazolium salt*) ditambah 35 µL larutan X-fosfat dan 10 mL buffer 3. Semua inkubasi dilakukan pada temperatur kamar dengan goyangan hati-hati kecuali reaksi pembentukan warna.

Antibiotika

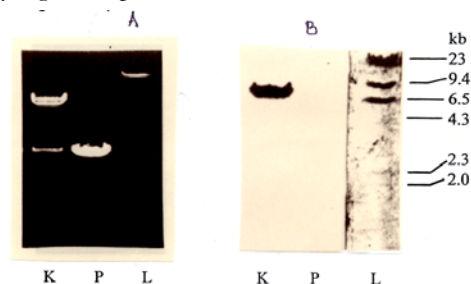
BRL 41897 A dan BRL 42948 A, diperoleh dari kebaikan hati DR. I. Chepron (Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, Brocklan Park, Surrey, UK). Mitomisin, Rifampisin, Gentamisin, Kanamisin dan Tetrasiklin diperoleh dari SIGMA.

Media antibiotika

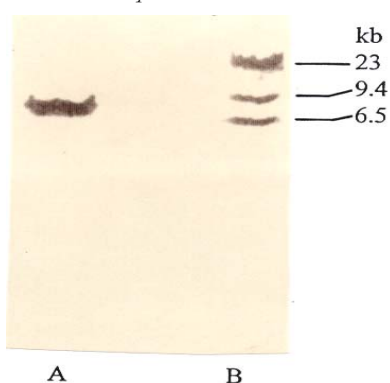
Larutan antibiotika steril (telah difilter) dimasukkan ke dalam media Nutrient Broth atau Luria Broth dengan 1,5 % agar teknik yang telah disiapkan secara aseptis.

Hasil Dan Pembahasan

Laporan terdahulu telah menjelaskan tentang rangkaian DNA dari fragmen KIH 19 (Gambar 1) dalam plasmid yang membawa fragmen DNA sebelah kanan *TnphoA* dari gen yang berperan dalam resistensi mutan



Gambar1. Rangkaian DNA dari KIH19.===== *TnphoA*



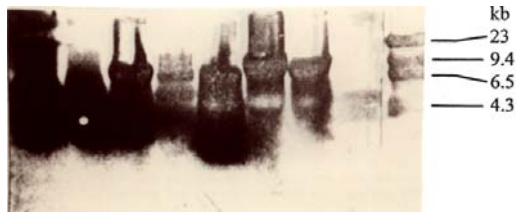
Gambar 2. Kromosom M10 yang dipotong dengan HindIII menggunakan KIH19 sebagai probe.

K.pneumoniae KSL19 terhadap antibiotika BRL 41897A (Kuswandi, 2004).

Plasmid yang berisi klon KIH19 kemudian dipotong dengan enzim HindIII dipakai sebagai probe untuk mendeteksi fragmen yang sama didalam kromosom *K.pneumoniae* M10. Hasil Southern blot dari klon fragmen DNA yang sama dengan KIH19 didalam strain M10 (Gambar 2).

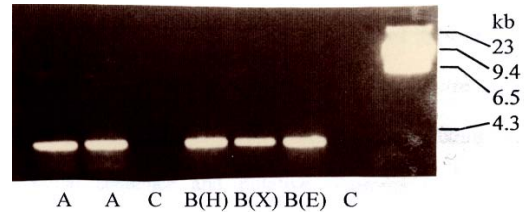
Melakukan kloning fragmen yang membawa gen utuh

Didalam usaha untuk mengklon fragmen yang positif sama dengan KIH19 diatas dari strain *K.pneumoniae* M10, dipakai cara yang sama seperti pembuatan plasmid yang mengandung KIH19, yaitu memasukkan fragmen seperti yang terlihat pada Gambar 2 kedalam plasmid PUC18. Koloni rekombinan yang dihasilkan dianalisa dengan elektroforesis gel dan Southern blot dengan memakai probe fragmen KIH19. Klon yang didapat disebut M19, dimana didalamnya diharapkan membawa sebagian atau seluruh gen yang utuh yang bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi terhadap BRL 41897A. Beberapa klon yang membawa M19 memberikan hasil positif pada analisis Southern blot dengan probe KIH19 (Gambar 3).

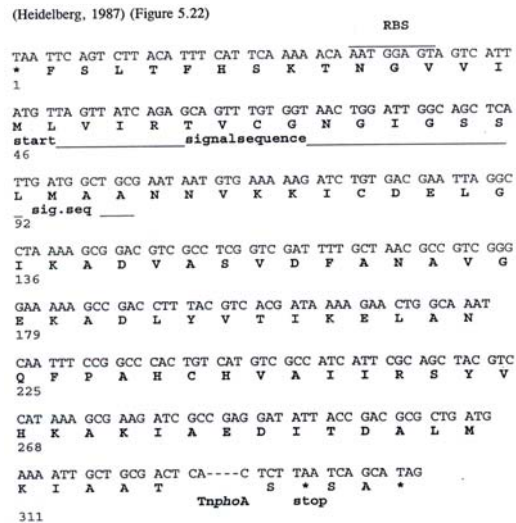


Gambar 3. Hasil analisis Southern blot dari klon M19 yang dipotong dengan HindIII menggunakan probe KIH19 yang dipotong HindIII juga. P adalah pUC18 yang dipotong dengan HindIII.

DNA didalam plasmid yang positif kemudian diisolasi, dianalisis dengan Southern blot kemudian dilakukan sequencing menggunakan primer berasal dari data KIH19. Primer tersebut berdasar data sequencing yang terletak disebelah kiri *TnphoA* adalah **CGAGTCAGATATTGTGACC** dan **AAAGGCGGGTTGAC**, yang terletak 66 pasang basa dari ORF), diperbanyak dengan PCR..



Gambar 4. Produk PCR dari fragmen DNA dalam KIH19 pada sebelah kiri *TnphoA*. A. Kromosom tak dipotong, B : Kromosom dipotong dengan HindIII (H), dengan XhoI (X) dan dengan EcoRI (E) serta C ; tak ada kromosom sebagai kontrol negatif.



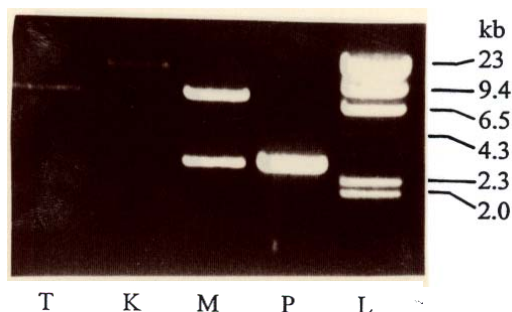
Gambar 5. Rangkaian DNA dari gen *ksl19*, membawa Start Codon, Stop Codon, Signal Sequence dan daerah calon RBS.

Hasil PCR dari fragmen DNA dianalisis dengan elektroforesis gel (Gambar 4).

Rangkaian DNA dari M19 memberikan hasil yang jelas menunjukkan bahwa didalamnya memuat gen yang bertanggung jawab terhadap BRL 41897A, hal tersebut dikonfirmasi dengan rangkaian DNA yang sama dengan rangkaian DNA pada KIH19 dan lokasi titik dimana transposon *TnphoA* menyisip didalam gen tersebut pada mutan KSL19. Gen tersebut, disebut *ksl19*, selain menunjukkan adanya Start Codon dan Stop Codon, juga membawa rangkaian *Signal Sequence* dan daerah yang akan menjadi RBS (*Ribosome Binding Site*) pada mRNA (Gambar 5).

Komplementasi

Dalam usaha untuk meng karakterisasi klon M19 maka dilakukan analisis lebih lanjut. Pertama dilakukan transformasi fragmen M19 kedalam sel *K. pneumoniae* mutan KSL19, hasil transforman disebut T19. Transforman dianalisis dengan elektroforesis gel dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Elektroforesis gel dari transforman T19

Keterangan : T : DNA dari transforman T19, K : DNA strain KSL19, M : DNA dari plasmid pembawa M19, P : pUC18, L : Lamda. Semua DNA dipotong dengan enzim HindIII.

Uji sensitivitas bakteri terhadap BRL 41897A

Setelah diperoleh transforman T9, kemudian dilakukan uji sensitivitas transforman terhadap antibiotika BRL 41897A dibandingkan dengan strain Wild Type M10 dan mutan KSL19.

Hasil uji sensitivitas, pada Tabel, menunjukkan bahwa plasmid M19, dimana didalamnya terdapat gen *ks19*, dapat mengubah mutan KSL19 yang resisten terhadap BRL 41897A menjadi strain baru (transforman T19) yang sensitif terhadap antibiotika tersebut.

Daftar Pustaka

- Basker, M.J., Edmonson, R.A., Knott, S.J., Ponsford, R.J., Slocombe, B. and White, S.S. 1984. *In vitro* antibacterial properties of BRL36650, a novel 6 α - substituted penicillin. *Antimicrob. Ag.Chemother.*, 26:734-740.
- Basker, M.J., Branch, C.L., Finch, S.C., Guest, A.W., Milner, P.H., Pearson, M.J., Ponsford, R.J. and Smak, T.C. 1986. Studies on semi-synthetic 7 α - formamido - cephalosporin. *J.Antibiotics*. 39(12):1788-1791.
- Brown, T.A. 1993. *Recombination. In Genetics molecular approach*. Chapman & Hall. London. :207-212.
- Critchley, I.A., Baker, M.J., Edmondson, R.A. and Knott, S.J. 1991. Uptake of a catecholic cephalosporin by iron transport system of *E.coli*. *J.Antimicrob. Chemother.*, 28:377-388.

Dari berbagai uji diatas kiranya dapat disimpulkan bahwa gen *ks19* adalah gen yang mempunyai peran didalam proses terjadinya resistensi bakteri *K.pneumoniae* terhadap antibiotika BRL 41897A.

Tabel KHM dari BRL 41897A terhadap bakteri M19 ditumbuhkan pada media Fe-CAA.

Strain	MIC of BRL 418974 ($\mu\text{g/mL}$)
M10	0.5
KSL19	2.0
T19	1.0

Kesimpulan

Telah dilakukan pembacaan seluruh basa dari gen (ORF) yang bertanggung jawab terhadap resistensi mutan *K.pneumoniae* KSL19 terhadap BRL41897A dengan panjang 234 basa. Ternyata didepan ORF didahului dengan rangkaian Signal peptida. Hasil transformasi *K.pneumoniae* M10 dengan plasmid yang membawa seluruh gen M19, yaitu T19 mengubah mutan KSL19 menjadi lebih sensitif terhadap antibiotika tersebut.

Ucapan Terima Kasih

Rasa terima kasih sebesar-besarnya atas fasilitas yang diberikan oleh Dr. Peter Lambert dari Aston University, Birmingham, UK dan Dr. Anthony Smith dari Bath University, UK atas segala saran yang telah diberikan, kepada Dr. Triwibowo Yuwono dari PAU Bioteknologi UGM atas bantuan analisis DNA dengan komputer, serta BPPT-Jakarta yang telah membiayai penelitian ini.

- Kuswandi, M. and Lambert, P.L. 1997. Mekanisme uptake dari BRL41897A, suatu derivat sefalosporin yang mengandung katekol oleh *Klebsiella pneumoniae*, *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 8 no.1 : 1 – 11.
- Kuswandi, M. 1997. Isolation of *K.pneumoniae* mutants resistant to the Catecholic Cephalosporin BRL41897A. *Proceeding Indonesian Biotechnology Conference*, Jakarta.
- Kuswandi, M., 2002. Identifikasi mutan-mutan *K. pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotika BRL 41897A dengan metoda Southern Blot, *Majalah Farmasi Indonesia*, 13 (4) : 185 – 192.
- Kuswandi, M., 2003, Identifikasi protein dinding luar (IROMP) dari mutan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotika BRL 41897A dengan metoda SDS-PAGE, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14(2).
- Kuswandi, M, (2004), Kloning gen dari mutan-mutan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap BRL-41897A (Mutan KSL), *Majalah farmasi Indonesia*, 15(4).
- Manoil, C. and Beckwith, J. 1985. Tnp ϕ A: transposon probe for protein export signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 82:8129-8133.
- Nikaido, H, and E.Y. Rosenberg. 1990. Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *E. coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with β -lactam antibiotics containing catechol and analogous group. *J. Bacteriol.*, 172:1361-1367.
- Poxton, I.R. and Sutherland, I.W. 1976. Isolation of rough mutants of *K.aerogenes* and their synthesis of polysaccharide. *J.Gen.Microbiol.*, 96 :195-202.
- Sambrook, J.T. and Fritsch, E.F. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Southern, E.M. 1975. detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517.
- Taylor, R.K., Manoil, C. and Mikalinos, J.J. 1989. Broad-Host range vectors for delivery of Tnp ϕ A: use in genetic analysis of secreted determinants of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, 171:1870-1878.
- Watanabe, N., T. Nagasu, K. Katsu and Kitoh. 1987. E 0702, a new cephalosporin, is incorporated into *E. coli* cells via tonB dependent iron transport system. *Antimicrob. Ag.Chemoter.*, 31:497-504.
- Williams, P. 1983. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *K. aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J.Gen.Microbiol.*, 129 :2181-2191.