



Deteksi Mutasi Gen *Gyrase A* *Porphyromonas Gingivalis* Resisten terhadap Ciprofloxacin berdasarkan teknik *Polymerase Chain Reaction*

Detection of Gyrase A Mutation of Porphyromonas Gingivalis gene resistant to Ciprofloxacin by using Polymerase Chain Reaction Technique

Irene E.Rieuwpassa¹, Mochammad Hatta²

¹Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Hasanuddin University

²Department of Microbiology, Molecular Biology and Immunology Laboratory, Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar

KEYWORDS *gyrase A; Porphyromonas gingivalis; ciprofloxacin*

ABSTRACT *One of resistance mechanisms to ciprofloxacin shown by bacterium Porphyromonas gingivalis isolated from periodontitis patients is mutations of genes through changes in DNA topoisomerase. Ciprofloxacin is an effective antimicrobial for Gram-negative bacteria effectively used for clinical infections treatment. The purpose of this research was to determine the gene mutation of P. gingivalis on periodontitis patients in relation to the resistance to ciprofloxacin by using disc diffusion and, followed by RFLP-PCR on P.gingivalis samples. Based on sensitivity tests by diffusion method, it was shown that the sensitive samples (n =13) had the highest inhibition zone diameter (mean= 25 mm), while the intermediate samples (n=1) was 19 mm. Examination using RFLP-PCR for 14 samples did not reveal any mutation of gyrase A gene.*

Akumulasi metabolisme bakteri pada permukaan jaringan keras mulut dianggap sebagai penyebab primer periodontitis. Lebih dari 400 spesies telah diisolasi dan ditandai dalam plak gigi. Akumulasi bakteri pada gigi merangsang respon inflamasi secara reversibel pada jaringan gingiva. Bagian yang mengalami inflamasi pada akhirnya dapat menyebabkan destruksi jaringan secara permanen pada daerah lokalisasi sejumlah organisme patogen yang potensial. Spesies subgingival tertentu kebanyakan terdiri dari bakteri Gram-negatif yang dihubungkan dengan etiologi penyakit periodontal destruktif seperti: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella Intermedia* dan beberapa spesies bakteroid lainnya. (Ronderos *et al.*, 2000; Ting *et al.*, 2000). Walaupun demikian *Porphyromonas gingivalis* dengan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ter-

deteksi sebesar 75% dari semua periopato-gen dalam plak (Kasuga *et al.*, 2000) dan dengan titer antibodi dan deteksi mikroba diperoleh 70% *P. gingivalis* (Morinoshi *et al.*, 2000).

Porphyromonas gingivalis adalah salah satu bakteri Gram-negatif anaerob yang berperan penting pada patogenesis *periodontitis*. Pengobatan dengan antibiotik sangat ditentukan oleh spesies penyebab *periodontitis*. Biasanya digunakan antibiotik seperti *metronidazole*, *doxycycline* dan *clindamycin*. Sejak dikembangkannya *fluoroquinolon*, *gatifloxacin* dan *moxifloxacin* antibiotik tadi memperlihatkan tingkat

Correspondence:

Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD, SpMK(K), Department of Microbiology, Molecular Biology and Immunology Laboratory, Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar, Jalan Perintis Kemerdekaan, Kampus Tamalanrea Km.10, Makassar 90245, Telephone/Facsimile: 0411-586971

aktivitas perlawanan terhadap bakteri anaerob. Beberapa penelitian dilakukan untuk melihat aktivitas antibakteri dari fluoroquinolon melawan strain *P. gingivalis* secara in vitro (Eick *et al.*, 2004).

Fluoroquinolon pada awalnya dikembangkan karena kehebatan aktivitasnya terhadap bakteri aerobik Gram-negatif, sementara aktivitasnya terhadap organisme Gram-positif terbatas. *Ciprofloxacin*, *enofloxacin*, *lomefloxacin*, *levofloxacin*, *ofloxacin* merupakan agen-agen yang memiliki aktivitas Gram-negatif yang baik dan aktivitas dari sedang hingga baik terhadap bakteri Gram-positif. Dalam kelompok ini, *ciprofloxacin* adalah agen yang paling aktif terhadap Gram-negatif, (Katzung, 2004).

Ciprofloxacin merupakan agen generasi kedua, salah satu obat sintetik derivat *quinolon*. Mekanisme kerjanya adalah menghambat aktivitas DNA *gyrase* bakteri, bersifat bakterisidal dengan spektrum luas terhadap bakteri Gram-positif maupun negatif. *Ciprofloxacin* efektif digunakan untuk infeksi saluran kemih, uretritis, demam tifoid dan paratifoid, infeksi saluran napas, infeksi jaringan lunak serta osteomielitis (Brooks *et al.*, 2001; Qarah, 1992).

Penggunaan antibiotik menimbulkan fenomena baru dengan munculnya resistensi, terutama pada pemakaian antibiotik yang tidak sesuai prosedur. Selama pengobatan dengan *fluoroquinolon*, munculnya organisme yang resisten yaitu *Pseudomona*, *Staphylococcus* dan patogen lain telah ditemukan. Dari hasil pengujian terhadap resistensi antibiotik telah terjadi resistensi terhadap *ciprofloxacin* (Brooks *et al.*, 2001).

Berdasarkan hasil studi tentang mekanisme dan epidemiologi dari resistensi antibiotik, telah nyata bahwa bakteri memiliki seperangkat cara untuk beradaptasi terhadap lingkungan yang mengandung antibiotik. Mekanisme resistensi pada bakteri meliputi mutasi, penghambatan aktivitas antibiotik secara enzimatis, perubahan protein yang merupakan target antibiotik, perubahan jalur metabolik, *effluks* antibiotik, perubahan pada porin channel dan perubahan permeabilitas membran. Resistensi terhadap *ciprofloxacin*

termasuk resistensi kromosom yang timbul akibat mutasi. Salah satu dari dua mekanisme berikut ini, yaitu perubahan pada subunit A enzim sasaran (*DNA gyrase*) atau perubahan permeabilitas selaput luar, menyebabkan terjadi penurunan akumulasi obat pada bakteri (Naim, 2003 dan Brooks *et al.*, 2001).

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel swab untuk mendeteksi adanya *P. gingivalis* sebagai koloni tunggal, Nutrien agar (NA), kapas lidi, pewarna Gram, Blood agar, SIM (Sulfide Indol Motility), *Paper disc* yang mengandung *ciprofloxacin*, HCl, *high purity analytical grade celite* (Diatoms) (Jansen Chimica, Beerse, Belgium 10. 846.79), *Pure distilled water*, GuSCN (Guanidium thiocyanate) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switserlan, catalog No. 50990), Tris HCl, EDTA, NaOH, Triton X-100 (Roche, 789704), etanol 70%, aseton, TE buffer, MgCl₂, Gelatin, dNTP, Tag DNA polymerase, agarose, TBE buffer, etidium bromida, *loading buffer*.

Primer yang digunakan yaitu *gyrase A*:

forward 5' -TGATCGTCTCCAGAGCTTTG- 3',
reverse 5'-CCTTATCTATGTCCTGAAGC-3',

Strain *Streptomyces lividans* membawa gen *Sac II* bersumber dari *Streptomyces achrogen*. Aktivitas enzim *Sac II* dalam NEbuffer I sebesar 25%, NEbuffer 2 sebesar 75%, NEbuffer 3 sebesar 10% dan NEbuffer 4 sebesar 100%. Tidak aktif pada suhu 65°C selama 20 menit (Biolabs, 2007). ▽

Enzim *Sac II* 5' ...CCGC GG...3'
3' ...GG CGCC ...5' ▽

Alat

Alat-alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, *micro pipet* (*single channel* 5-25 µl, 25-50 µl, 50-100 µl ; *multichannel* 25-50 µl, 50-150 µl), *micro shaker*, autoklaf, inkubator, ose, bunsen, tabung *eppendorf*, *vortex shaker*, *gyrotary shaker*, rak tabung *eppendorf*,

sentrifus, *Erlenmeyer*, neraca analitik, gelas ukur, botol reagen, tips untuk pipet, *refrigerator*, *freezer*, *water bath* atau *dry block heater*, *biohazard (safety cabinet)*, *thermocycler*, *electrophoresis*, perangkat UV dan kamera digital.

Cara kerja

Identifikasi *P. gingivalis*

Spesimen pus atau cairan gingival, diambil menggunakan kapas lidi diusapkan. Kemudian kapas lidi dimasukkan dalam media transport.

Spesimen diinokulasikan ke dalam media Blood Agar dan diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Hasil koloni dilakukan uji pewarnaan Gram untuk menemukan bakteri Gram-negatif basil. Hasil bakteri Gram-negatif basil dilanjutkan dengan uji SIM untuk melihat ada tidaknya pergerakan.

Uji *Disc Diffusion*

a. Media dan reagen

Media yang digunakan adalah; agar Muller Hinton (dengan ketebalan agar 4 mm); Strain kontrol *P. gingivalis* (ATCC 33277). Reagen yang digunakan adalah larutan standar NaCl fisiologis steril; larutan hipoklorit 2% dan standar kekeruhan Mc Farland 0,5.

b. Prosedur pemeriksaan

Inokulum disiapkan dengan menggunakan kapas lidi steril atau sengkeli. Diambil 3-5 koloni *P. gingivalis* hasil isolasi specimen klinik dan disuspensikan ke dalam tabung berisi larutan NaCl fisiologis steril 5 ml, kemudian kapas lidi bekas pakai dibuang dalam larutan hipoklorit 2%. Hasil suspensi bakteri dibandingkan dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5.

Kapas lidi dicelupkan ke dalam suspensi bakteri dan diputar beberapa kali kemudian ditekantekan pada dinding tabung untuk membuang kelebihan inokulum. Kapas lidi yang mengandung inokulum dihapuskan secara merata pada permukaan agar Mueller

Hinton, kemudian cawan petri ditutup dan dibiarkan selama 3-5 menit.

Cakram kertas (paper disc) yang berisi *ciprofloxacin* diletakkan pada permukaan agar Mueller Hinton dan sedikit ditekan agar melekat sempurna dan tidak bergeser. Kemudian didiamkan selama 15 menit. Setelah itu diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 16-20 jam dalam posisi cawan terbalik.

Hasil diperoleh dengan mengukur zona hambatan yang terbentuk pada agar dan lebar zona hambat dibandingkan dengan tabel standar NCCLS tahun 1997, untuk menentukan hasil isolat bakteri *P. gingivalis* yang resisten, intermediat dan sensitif.

UJI PCR

a. Preparasi sampel

Metode ekstraksi DNA menggunakan prosedur celite dan guanidium thyocyanate (Hatta dan Smits, 2007).

Reagen

Suspensi diatom dibuat dengan cara menambahkan 50 ml H₂O dan 500 ml dari 32% (w/v) HCl (atau 445 µl dari 36% HCl) ke dalam 10 gram dari "High purity analytical grade celite" (diatom) yang diperoleh dari Jansen Chimica (Beerse, Belgium 10.864.79). Suspensi diatom dibagi dalam beberapa tube steril kapasitas 2 ml, di mana setiap bagian terdiri dari 0,5 ml. Tube hasil aliquots ditutup rapat dan disimpan dalam box pada ruangan steril (mix room), 20 µl dari suspensi ini akan dapat bergabung dengan 10 µg DNA bakteri (10⁻⁵ gram DNA bakteri = 10⁹ sel bakteri). Peningkatan jumlah volume diatoms akan meningkatkan hasil ekstraksi DNA. Diatom tidak perlu disterilisasi karena HCl yang terdapat dalam larutan diatom sudah dapat merusak DNA sel bakteri.

Larutan L6 (*buffer lisis*), dibuat dengan cara melarutkan 120 gram GuSCN (Fluka Cehmie AG, Buchs, Switzerland, catalog no 50990) ke dalam 100 ml Tris HCl 0,1 M, pH 6,4. Kemudian larutan dipanaskan pada suhu 60°C untuk

melarutkan GuSCN. Volume akhir dari larutan tersebut adalah 200 ml. Larutan EDTA 0,2 M, pH 8,0 sebanyak 22 ml ditambahkan. pH tersebut dicocokkan dengan larutan NaOH dan 2,6 ml Triton -X 100 (Roche, 789704). Konsentrasi terakhir dari larutan L6 tersebut adalah 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA 0,1%. Larutan yang sudah siap disimpan dalam tempat yang gelap dalam ruangan steril (mix room).

Larutan L2 (buffer pencuci), dibuat dengan cara melarutkan 120 gram GuSCN dalam 100 ml Tris HCl 0,1 M, pH 6,4. Larutan L2 disimpan dalam tempat di ruangan steril (mix room). TE buffer elusi dibuat dengan cara melarutkan 1 mM EDTA dalam 10 ml Tris HCl pH 8 dari larutan stok dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

b. Cara kerja ekstraksi DNA

Larutan buffer L6, larutan buffer L2 dan aseton diambil secukupnya, hanya untuk keperluan pada hari yang sama. Pipet dengan tip yang mempunyai lapisan *cotton* sebagai filter dan dihindari kontak antar tip dengan vial. Tip digunakan untuk setiap larutan yang diambil.

Larutan buffer lisis L6 900 μ l dimasukkan ke dalam 1,5 tube yang mempunyai penutup berupa sekrup dan ditambahkan sampel sebanyak 100 μ l, sedimen sampel yang telah dipekatkan ini dihomogenkan selama 30 menit. Suspensi diatom 20 μ l ditambahkan ke dalam tube, suspensi diatom harus selalu *divortex* sebelum digunakan untuk mencegah terjadinya penggumpalan pada saat pipetting. Campuran tersebut *divortex* dan diaduk dengan menggunakan *gyrotary shaker*, kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Tidak menambahkan diatom saat sebelum sampel diisi, karena HCl dalam suspensi diatom akan merusak DNA bakteri yang telah diekstraksi. Campuran *divortex* kembali menggunakan sentrifus dalam mikrosentrifus

ependorf pada kecepatan 12.000 \times g selama 15 detik.

Supernatan dari setiap vial dipisahkan dengan menggunakan pengisap yang terbuat dari pipet Pasteur plastik tanpa balon udara dan dihubungkan dengan *vacum pump*, untuk mencegah hilangnya diatom dalam suspensi tadi, sehingga sekitar 10 μ l dari suspensi tersebut disisakan.

Supernatan dicuci sebanyak 2 (dua) kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2. Buffer pencuci L2 ditambahkan sebanyak 1 ml *divortex* dan sentrifus selama 15 detik, kemudian supernatan diisap. Supernatan dicuci kembali dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 (dua) kali, *divortex* dan disentrifus selama 15 detik. Supernatan 1 (satu) kali dengan 1 ml aseton kemudian dihomogenkan, disentrifus selama 30 detik.

Aseton yang ada dalam supernatan dipisahkan dengan cara membuka penutup vial dan dipanaskan pada suhu 56°C dalam *water bath* atau dengan menggunakan *dry block heater* selama 10 menit. TE buffer elusi ditambahkan 60 ml, kemudian *divortex* secara merata sehingga sedimen dari suspensi tersebut dapat larut. Kemudian vial diinkubasi dalam *water bath* selama 10 menit pada suhu 56°C.

Vial disentrifus dengan kecepatan 12.000 \times g selama 30 detik dan diambil secara hati-hati sekitar 40-50 μ l dari supernatan dan dimasukkan ke dalam vial baru, dengan tip dari pipet tidak menyentuh sedimen dari suspensi tersebut. Ditambahkan ulang 40 μ l TE buffer elusi ke dalam sedimen diatom dan *divortex* kembali sehingga sedimen akan larut dalam TE buffer elusi. Vial diinkubasi kembali dalam *water bath* selama 10 menit pada suhu 65°C.

Vial disentrifuse lagi dengan kecepatan 12.000 \times g selama 30 detik dan diambil secara hati-hati sekitar 40-50 μ l dari supernatan dan dimasukkan ke dalam vial pertama, jangan sampai tip dari pipet menyentuh sedimen dari suspensi tersebut.

Pada akhir dari prosedur Boom akan didapatkan sejumlah kecil diatom (sekitar 1 µl suspensi diatom dalam 100 ml TE buffer elusi), jumlah ini tidak akan berpengaruh pada hasil PCR sampel. Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu -20°C atau suhu -80°C.

c. Proses amplifikasi pada mesin PCR

PCR diselidiki dalam volume akhir dari 25 µL dengan 2 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,1 µg DNA ekstraksi; 1 µM dari primer, 1 unit *Tag DNA Polymerase* (AmpI Taq GOLD, Applied Biosystems, USA).

Amplifikasi pada mesin PCR sebanyak 32 siklus, tiap siklus dilakukan denaturasi selama 1 menit dengan suhu 94°C, annealing selama 1,5 menit pada suhu 59°C untuk *gyrase A* dan extension selama 2 menit pada suhu 72°C.

RFLP-PCR

Dianalisis *gyrase A* dalam *topoisomerase II*, untuk mengetahui adanya mutasi. Mutasi **Ser-83** menjadi **Phe** dalam *gyrase A* yang diketahui berhubungan dengan resistensi obat terhadap *fluoroquinolon*. Amplifikasi DNA digunakan untuk *RFLP*, menggunakan enzim restriksi *Sac II*. Masukkan 22,5 µl *PCR mix* ditambahkan primer 2,5 µl dan 2,5 µl ekstraksi DNA dengan volume akhir 25 µl, masukkan parafin untuk mencegah penguapan, diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C. Hasil amplifikasi dianalisis dengan menggunakan *elektroforesis*.

Elektroforesis

Setelah amplifikasi, 5 µl hasil amplifikasi PCR dan 2 µl loading buffer dicampur dan dimasukkan ke dalam cetakan gel agarose 1,5% yang sudah diberi Etidium Bromida. Agar gel direndam pada wadah yang berisi buffer TBE. Selanjutnya elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 80 Volt.

HASIL

Telah dilakukan penelitian deteksi mutasi gen *gyrase A* *Porphyromonas gingivalis* resisten terhadap ciprofloxacin berdasarkan teknik PCR menggunakan metode *disc diffusion* yang akan dilanjutkan dengan RFLP-PCR terhadap sampel penderita periodontitis.

Dari hasil penelitian diperoleh gambaran sebagai berikut:

1. Pada Uji Disc Diffusion

Hasil tes resistensi *P. gingivalis* terhadap *ciprofloxacin* setelah diinkubasi selama 1x24 jam diperoleh gambaran pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 didapatkan 14 sampel *P. gingivalis*. Berdasarkan tes sensitivitas melalui metode difusi, terdapat 1 sampel yang intermediat (7%) dan 13 sampel yang sensitif (93%) terhadap *ciprofloxacin*.

Metode *Disc diffusion* berdasarkan *Kirby Bauer Method* digunakan untuk mengetahui resistensi atau kepekaan kuman terhadap antibiotik tertentu. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah lebar zona hambatan yang terbentuk dari masing-masing disk antibiotik dan zona hambat tersebut dibandingkan dengan lebar zona hambat standar menurut *oxoid* yang mengacu pada *National Committee for Clinical Laboratory Standarts* (NCCLS). Disk 5 µg dengan kategori kuman resisten, intermediat dan kuman sensitif. Resistensi ≤ 15, Intermediat 16-20, Sensitif ≥ 21.

Tabel 1. Hasil Tes Sensitifitas *P. gingivalis* terhadap *Ciprofloxacin*

	Frekwensi	Persen
Intermediat	1	7
Sensitif	13	93
Total	14	100

Hasil sampel yang sensitif (13 sampel) mempunyai nilai diameter zona hambatan rata-rata 25 mm sedangkan sampel yang intermediat (1 sampel) diameter zona hambatannya 19 mm (Gambar 1).

2. Pada uji PCR

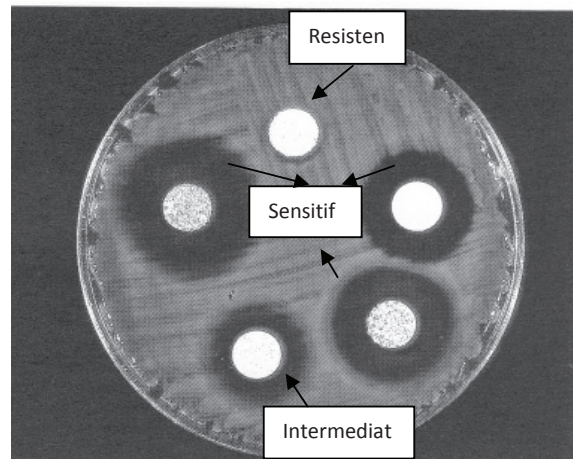
Uji PCR dilakukan pada 14 sampel *P.gingivalis* dengan 13 sampel sensitif terhadap *ciprofloxacin* dan 1 sampel intermediat terhadap *ciprofloxacin* berdasarkan uji *disc diffusion*. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2 sebagai gambaran hasil elektroforesis pada sampel resisten dan

sensitif sebelum dan sesudah restriksi dengan enzim *Sac II*.

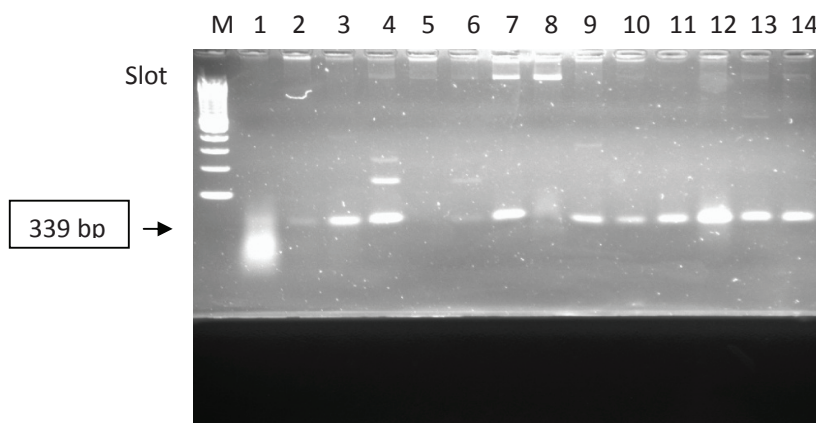
Hasil uji PCR diperlihatkan pada Gambar 2 sebelum direstriksi dengan adanya pita pada tiap slot pada posisi 339 bp. Slot 1-8 dan slot 10-14 berasal dari sampel yang sensitif terhadap ciprofloxacin dan slot 9 berasal dari sampel yang intermediat terhadap ciprofloxacin.

3. Pada pemeriksaan dengan RFLP-PCR

Telah dilakukan pemeriksaan dengan RFLP-PCR menggunakan enzim restriksi *Sac II* untuk mempelajari mutasi yang terjadi pada sampel yang ada.



Gambar 1. Hasil uji disc diffusion dengan antibiotik ciprofloxacin

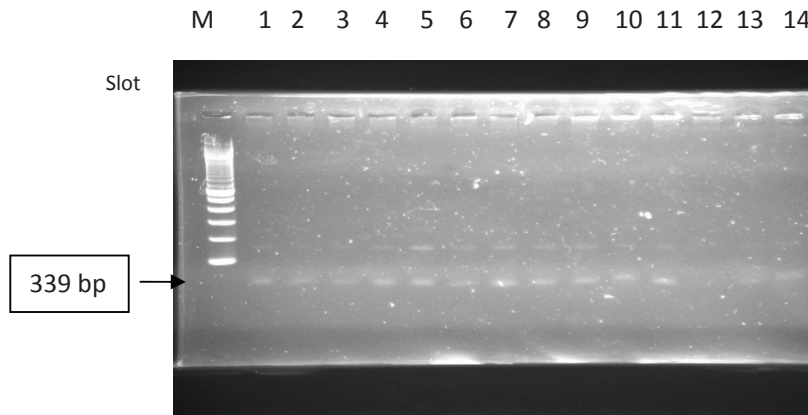


Gambar 2. Hasil Elektroforesis Sampel sebelum restriksi
Keterangan gambar : M= marker, 1,2,3-14= nomor sampel

Gambar 3 merupakan gambaran hasil PCR pada sampel setelah direstriksi menggunakan enzim *Sac II*. Terdapat satu fragmen pada tiap slot dari 14 sampel yang ada. Slot 1-8 dan 10-14 berasal dari sampel yang sensitif terhadap ciprofloxacin dan

sampel 9 berasal dari sampel yang intermediat terhadap ciprofloxacin.

Sebagaimana terlihat pada Tabel 2, tidak ada satupun dari hasil koloni yang menunjukkan adanya mutasi.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis Sampel Sensitif sesudah restriksi
Keterangan gambar : M= marker, 1,2,3-14= nomor sampel

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan dengan RFLP-PCR

	Frekwensi	Persen
Mutasi	0	0.00
Tidak Mutasi	14	100
Total	14	100

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pengujian hubungan antara mutasi gen *topoisomerase II (gyrase A)* dengan tes resistensi ciprofloxacin pada *P.gingivalis*. Pengujian ini dilakukan dengan uji *disc diffusion* yang akan dilanjutkan dengan RFLP-PCR terhadap sampel yang disebabkan oleh *P. gingivalis*.

Sebelum uji *disc diffusion* dilakukan, pertama-tama dilakukan identifikasi *P.gingivalis*. Dari hasil identifikasi *P. gingivalis* diperoleh 14 sampel yang teridentifikasi sebagai *P. gingivalis*. Metode *disc diffusion* adalah metode umum yang digunakan untuk mengetahui resistensi dan sensitifitas kuman terhadap penggunaan obat, dan lama waktu uji yang diperlukan

adalah kurang lebih satu minggu. Metode ini dilakukan untuk mengetahui adanya zona hambatan yang terbentuk. Hasil pengukuran diameter zona hambatan menunjukkan apakah kuman resisten atau sensitif terhadap suatu antibiotik tertentu. Zona hambatan yang terbentuk (dalam mm) dibandingkan dengan table standar NCCLS, disk 5 µl dengan kategori resisten, intermediat dan sensitif. Jika strain *P. gingivalis* tidak mengalami mutasi pada target kerja obat maka strain ini akan sensitif terhadap antibiotik.

Pada pengujian sensitifitas dengan metode *disc diffusion* akan terlihat zona hambatan disekitar *paper disc* yang mengandung *ciprofloxacin*. Zona bening yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan obat terhadap

organisme yang diperiksa. Hasil pengukuran diameter zona hambatan menunjukkan sampel yang sensitif terhadap *ciprofloxacin* sebanyak 14 sampel dengan rata-rata diameter zona hambatan 25 mm dan yang intermediat sebanyak 1 dengan diameter zona hambatan 19 mm.

Pada penelitian ini zona bening terjadi karena *ciprofloxacin* bekerja pada target yang sesuai dan juga menghambat pertumbuhan *P.gingivalis*. Target obat pada *topoisomerase* II (*gyrase* A) sebagai target utama dan merupakan mekanisme kerja dari *ciprofloxacin*. *Ciprofloxacin* menyekat sintesis DNA bakteri dengan jalan menghambat *topoisomerase* II pada bakteri. Penghambatan DNA *gyrase* akan mencegah relaksasi *supercoiled* DNA secara positif yang dibutuhkan untuk transkripsi dan replikasi normal (Katzung, 2004; Khodursky dan Cozzarelli, 1998).

Penentuan resistensi bakteri terhadap antibiotik hampir semua menggunakan cara *disc diffusion*, untuk melakukan pengujian ini, terlebih dahulu bakteri harus diisolasi, dimurnikan dan selanjutnya dipaparkan pada antibiotik. Cara konvensional yang mencari fenotip bakteri diatas mempunyai kelemahan, khususnya dalam hal lamanya waktu untuk mendapatkan hasil. Karena itu dicoba kembangkan cara lain, khususnya cara mencari faktor genotipnya.

Gen yang dicari tersebut berupa segmen DNA atau RNA, karena jumlah *copy* asam nukleat sasaran tersebut biasanya sedikit maka biasanya terlebih dahulu dilakukan amplifikasi DNA bakteri langsung dari bahan pemeriksaan (sampel) dengan teknik PCR. Cara lain yang digunakan dengan terlebih dahulu membiakkan bakteri tersebut secara konvensional dan selanjutnya asam nukleatnya diekstraksi seperti penelitian yang dilakukan ini.

Konfirmasi amplikon dengan elektroforesis saat ini merupakan cara terbanyak yang dipakai untuk mengidentifikasi gen penyandi resisten. Untuk konfirmasi dengan cara RFLP-PCR, sebelum dilakukan elektroforesis, amplikon terlebih dahulu difragmentasi atau

direstriksi dengan enzim endonuklease restriksi (enzim restriksi) yaitu suatu enzim yang hanya memecah DNA pada tempat spesifik. Untuk memilih jenis enzim, diperlukan data rangkaian basa penyusunan sasaran amplifikasi. Pita-pita (fragmen) hasil pemotongan DNA yang terlihat pada elektroforesis, selanjutnya dibandingkan dengan hasil sebelum dilakukan ekstraksi.

Penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Eick *et al.*, 2004 pada *Porphyromonas gingivalis* yang diisolasi dari plak subgingival pasien periodontitis memperlihatkan penurunan sensitifitas fluoroquinolon dari yang seharusnya yaitu perubahan pada GyrA (Glu-72 dan Glu-124), GyrB (Gly-331, Arg-340, Pro-347, Thr-374, Lys-398 dan Cys-458) dan ParC (Glu-22, Val-29, Ala-33, Ile-55, Glu-57, Gly-66 dan Met-78). *Porphyromonas gingivalis* dari sampel periodontitis memperlihatkan bahwa mutasi gen *gyrase* A merupakan target utama dari quinolon, sedangkan gen *gyrase* B dan *par C* hanya mutasi diam tanpa merubah asam-asam amino.

Hasil pemeriksaan PCR sebelum menggunakan enzim restriksi *Sac* II, pada 14 sampel yang sensitif memperlihatkan satu fragmen. Demikian pula pada 1 sampel yang intermediat terlihat satu fragmen dengan panjang urutan nukleotida 339 bp. Fragmen ini terlihat dari pembacaan dengan elektroforesis.

Dari gambar hasil uji RFLP-PCR dengan menggunakan enzim restriksi *Sac* II memperlihatkan jumlah fragmen yang sama sebelum dan sesudah restriksi. Semua sampel *P. gingivalis* yang sensitif terhadap *ciprofloxacin* memperlihatkan 1 fragmen setelah mengalami restriksi pada tempat pemotongan DNA sesuai dengan enzim restriksi yang digunakan yaitu *Sac* II. Enzim restriksi *Sac* II akan merestriksi untaian nukleotida pada sekuen spesifik yaitu CCGT//GG. Dengan menggunakan enzim restriksi *Sac* II maka untaian DNA akan terpotong bila bermutasi pada posisi nukleotida 204 dan 135 bp. Apabila tidak terjadi perubahan urutan nukleotida (tidak terjadi mutasi), tidak akan terjadi restriksi pada urutan nukleotida CCGT//GG dan

hanya terbentuk satu fragmen dengan panjang nukleotida 339 bp.

Hasil penelitian uji RFLP-PCR pada sampel yang sensitif terhadap *ciprofloxacin* memperlihatkan 13 sampel sensitif dan 1 sampel intermediat tidak mengalami perubahan urutan nukleotida (tidak bermutasi). Terlihat satu fragmen sebelum menggunakan enzim restriksi dan setelah dilakukan restriksi. Hasilnya terlihat pada gambar elektroforesis Gambar 2 sebelum restriksi, Gambar 3 setelah direstriksi. Hal ini menunjukkan bahwa urutan nukleotida dapat dikenali oleh enzim restriksi yang digunakan sehingga tidak terjadi restriksi pada sekuen spesifik tempat enzim *Sac II* bekerja.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

Terdapat *P. gingivalis* yang intermediat terhadap *ciprofloxacin* sebanyak 1 dari 14 sampel yang dikumpulkan.

Tidak terlihat adanya mutasi pada gen *topoisomerase II (gyrase A)* dengan menggunakan teknik RFLP-PCR.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan antara resistensi dan mutasi yang terjadi dengan menggunakan sampel yang lebih besar untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat.

Perlu adanya penelitian untuk melihat mutasi lain dengan sasaran gen yang berbeda, mengingat teknik ini walaupun mampu mendeteksi gen penyandi resisten, secara klinis belum tentu relevan, khususnya untuk gen yang tingkat ekspresinya rendah dengan melakukan penelitian pada *efflux pumps* dan juga pada tingkat *sekuensing*.

KEPUSTAKAAN

Ansabel F, Donald MC *et al.*, 1995. Short Protocols in Molecular Biology: The Polymerase Chain Reaction, third edition, John Wiley and Sons, Inc, USA.

- Bachrach G, Altman H, Kolenbrander PE *et al.*, 2007. Resistance of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 to Direct Killing by Antimicrobial Peptides is Protease Independent. Institute of Dental Sciences, The Hebrew University-Hadassah School of Dental Medicine, Jerusalem, Israel.
- BioLabs, Restriction Endonucleases, New England Biolabs. Diakses 28 Januari 2007.
- Brooks GF, Butel SJ dan Morse SA 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Penerjemah dan Editor. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika, Jakarta.
- Buhlin Kare, Gustafsson Anders, Pockley AG, Frostegard Johan Klinge Bjorn 2003. Risk Factors for Cardiovascular Disease in Patients with Periodontitis, *European Heart J.*24: 2099-2107
- Burt BA 1996. Epidemiology of Periodontal Disease. *J.Periodontol.*67:935-945.
- Burton GRW, Engelkirk 2004. Microbiology for the Health Sciences. Seventh Edition. Lippincott William & Wilkins, USA.
- Collins CH 1995. Collins and Lyne's, Microbiological Methods. Seventh Edition. Butterworth Heinemann, Oxford London.
- Corbert EF, Wong MCM, Lin HC 1997. Periodontal Attachment Loss in Adult in Guangdong RRC, *J.Dent.Res.*5:1176-50.
- Depkes RI 2000. Standar Operating Prosedur (SOP) in Microbiology, Laboratorium Kesehatan Departemen Kesehatan, Jakarta.
- Eick S, Schmitt A, Sachse S *et al.*, 2004. In vitro antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*54(2):553-556.
- Enersen M, Olsen I *et al.*, 2005. Multilocus Sequence Typing of *Porphyromonas gingivalis* Strains from Different Geographic Origins. Institute of Oral Biology, Dental Faculty, University of Oslo, Department of Oral Microbiology, Academic Center for Dentistry Amsterdam, The Netherlands.
- Fishman Stuart L 2000. Summary of Brush Up in Wellness Symposium, Meeting Summary. *J. Periodontol.*71:679-682.
- Gabastou JM *et al.*, 1995. Phenotypes of resistance to antibiotics of the most frequently isolated strains in five specialized hospital centers. Multicenter study. *PubMed - indexed for MEDLINE*, vol 43 (4), Apr, hal 320-323, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list>, diakses 31 Mei 2006.
- Grkovic S, Brown MH and Skurray RA 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol., Rev* 66:671 - 701.
- Haake SK 1993. Microbiology of Dental Plaque. California Continuing Education.
- Han XY and Andrade RA 2004. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. Section of Clinical Microbiology, The University of Texas.

- Hatta M and Smits L, Henk 2007. Detection of *Salmonella typhi* by Nested Polymerase Chain Reaction in blood, urine and stool samples. *American J. Tropical Medicine Hygiene*. Vol: 76;139-143.
- Hooper DC, Wolfson JS, Bozza MA and Ng EY 2002. Genetics and regulation of outer membrane protein expression by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *cfxB*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 36:1151 – 1154.
- Izadi Shima Mahdavi 1998. Periodontal Disease, Oral Health and Cardiovascular Disease Among Females in Sweden. *J.Dental Ed*.395-404.
- Kasuga Y, Ishihara K, Okuda K 2000. Significance of Detecting *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in Periodontal Pockets. *Bull Tokyo DENT. Coll*. 41(3):109-117.
- Morinushi T, Lopatin DE, Poperin NV *et al.*, 2000. The Relationship Between Gingivitis and Colonization by *Porphyromonas gingivitis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Children. *J.Periodontol*.71:403-409.
- Naim R 2003. Cara Kerja dan Mekanisme Resistensi Antibiotik. *Harian Kompas*. Kompas Online.
- Qarah SMD 1992. *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Dermatology Online Journal*. May-Jun; 18(3): 187-121.
- Ronderos M, Michalowicz B, Camara R, Contreras A 2000. Bacterial and Viral Risk Markers for Juvenile Periodontitis. *J.Periodontol*.71.1208.