Implementasi Penguatan Mikrobiologi Molekuler dalam bidang Kedokteran

Mieke Hemiawati Satari

Bagian Oral Biologi/ Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran

Kata Pengantar

Puji syukur ke hadirat Allah SWT serta dorongan Prof .Dr. Eky S.Soeria Soemantri, drg.,Sp Ort, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran dan Drg Murnisari Darjan.,M Kes selaku Kepala bagian Oral Biologi yang memberi kesempatan penulis untuk membawakan makalah dengan judul " Implementasi Penguatan Mikrobiologi Molekuler dalam bidang Kedokteran pada "Lokakarya Penguatan Implementasi Materi Biomolekuler Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran" yang diselenggarakan pada tanggal 19-20 Oktober 2011 .

Semoga Allah SWT memberikan ridho dan manfaat dari naskah makalah ini bagi semua staf akademik baik di Fakultas Kedokteran Gigi Unpad maupun Fakultas Kedokteran Unpad.

Bandung , Oktober 2011

Dr . Mieke Hemiawati Satari, drg., MS

DAFTAR ISI

		hal
Kata Pengantar		i
Daftar Isi		ii
Daftar Gambar		ii
Abstrak		1
Abstract		2
Bab I	Pendahuluan	3
Bab II	Ekstra Kromosomal yang dikenal sebagai Plasmid	5
Bab III	Mutasi	7
Bab IV	Transfer genetik	12
Bab V	Mekanisme kerja Antibiotik dan Mekanisme resistensi Antibiotik pada Tingkat Molekuler	16
Kesimpulan		19
Daftar Pustaka		

DAFTAR GAMBAR

		hal
Gambar 1	Pembentukan Supercoiled	3
Gambar 2	Sel Prokaryote	4
Gambar 3	Sel Eukaryote	4
Gambar 4	High Copy Number Plasmid dan Low Copy Number	6
Gambar 5	Kromosom dan Plasmid	6
Gambar 6	Plasmid yang mengkode gen yang resisten terhadap ampisilin dan kanamisin	6
Gambar 7	Mutasi adalah perubahan basa nukleotida pada suatu gen ...	7
Gambar 8	Jenis Mutasi	8
Gambar 9	Mutasi menyebabkan perubahan kerangka baca	8
Gambar 10	Mutasi menyebabkan perubahan rangka baca	9
Gambar 11	Insersi T	10
Gambar 12	a) Mutasi Delesi; b) Mutasi Insersi; c) Mutasi rearrangement	11
Gambar 13	Konyugasi	12
Gambar 14	Transformasi	13
Gambar 15	Transformasi	14
Gambar 16	Proses Tranduksi	15
Gambar 17	Aktifitas antibiotik yang menganggu sel bakteri	17

Implementasi Penguatan Mikrobiologi Molekuler dalam bidang Kedokteran

Mieke Hemiawati Satari

Bagian Oral Biologi/ Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran

Abstrak

Mikrobiologi molekuler saat ini merupakan ilmu yang diperlukan untuk menunjang ilmu Kedokteran. Mikroba saat ini sering digunakan untuk mengembangankan tehnik DNA rekombinan terutama plasmid. Disamping itu dengan pengetahuan Mikrobiologi Molekuler maka akan diketahui sifat dari mikroba secara molekuler terutama pada proses terbentuknya bakteri resisten terhadap antibiotik yang menyebabkan terjadinya pengobatan terhadap suatu infeksi menjadi lebih sukar dan mahal.

Bakteri ini disamping kromosom memiliki pula plasmid yang biasanya sebagai ekstra kromosomal yang digunakan sebagai vektor untuk DNA Rekombinan.Selain hal tersebut bakteri ini bisa menjebabkan kerugian bagi mahluk Eukaryote, namun kadang kadang Prokaryote ini dapat dimanfaatkan sebagai perantara untuk produksi sesuatu protein yang diperlukan Eukaryote.

Tujuan penulisan makalah ini adalah untuk lebih memperkenalkan dunia mikroba terutama bakteri ditinjau secara molekuler.

Kata kunci : Antibiotik, Mutasi,Prokaryote,Transfer genetik.

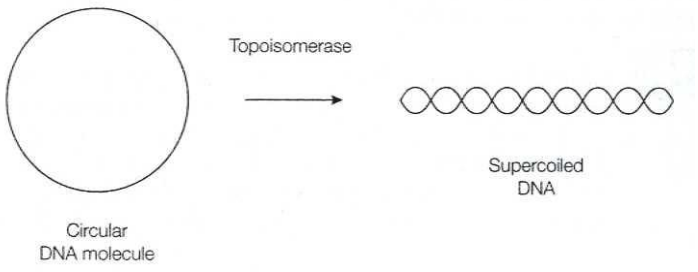
Abstrack

Bab I
Pendahuluan

Organisasi sel hidup di mulai oleh suatu bentuk yang sangat sederhana yang kemudian mengalami evolusi sehingga membentuk suatu stuktur sel yang dikenal sebagai prokaryote yang ahirnya berkembang menjadi struktur yang yang lebih kompleks yang dikenal sebagai eukaryote. [1]

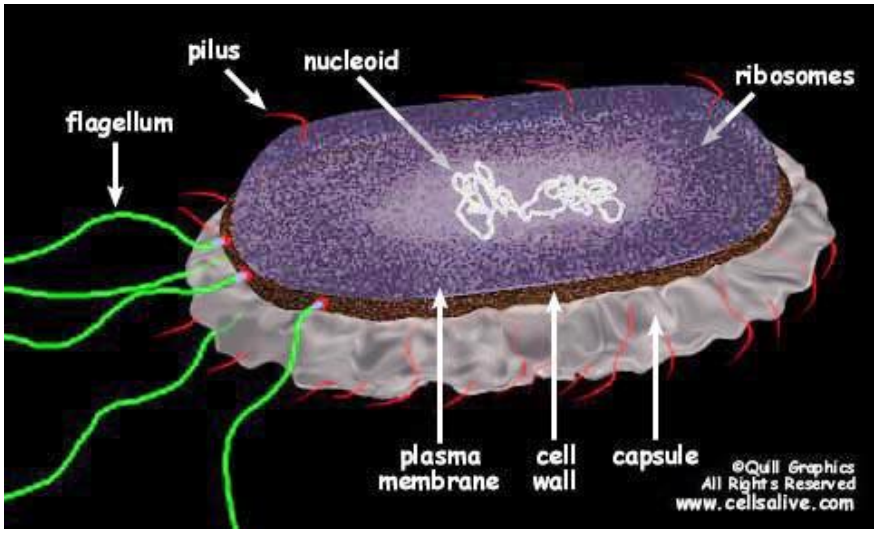
Perbedaan Utama antara Sel Prokaryote dan Eukaryote yaitu pada lokasi DNA. DNA Prokaryote tidak dibatasi membrane inti, karena tidak memiliki inti sehingga proses replikasi, transkripsi dan translasi berlangsung dalam sitoplasma.[2,3]

Genom berbentuk sirkuler kemudian di padatkan hingga membentuk suatu supercoiled dengan bantuan enzim topoisomerase yang ahirnya terbentuk double helix. Walaupun prokaryote ini seolah olah tidak memiliki membran inti namun sekitar kromosom terlihat daerah yang lebih gelap yang disebut nukleoid dan sekitar sisi luar nukleoid dalah sitoplasma. DNA prokaryote ini memiliki sentral inti protein. DNA prokaryote ini 90% terdiri dari gen dan 10% merupakan intergenik DNA yang memiliki fungsi yang istimewa yaitu sebagai Origin of replication.[3-5]

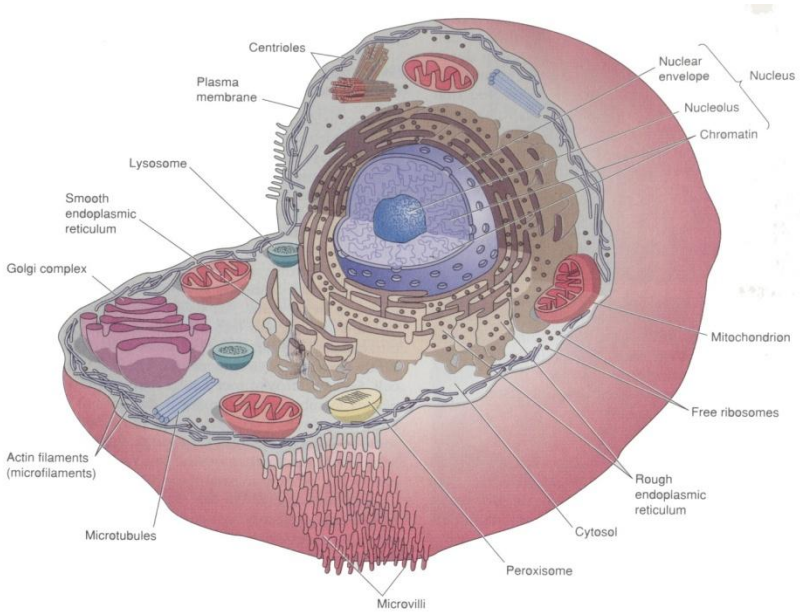


Gambar 1. Pembentukan Supercoiled.[2]

Perbedaan mendasar dengan DNA Eukaryote yaitu DNA nya berada dalam inti hingga proses replikasi, transkripsi berlangsung dalam inti sedangkan proses translasi terjadi dalam sitoplasma. DNA Eukaryote berbentuk linier dan memiliki sejumlah DNA sirkuler dalam sitoplasma seperti Mitochondria [2-6]



Gambar 2. Sel Prokaryote [4]



Gambar 3. Sel Eukaryote [4]

Bab II

Ekstra kromosomal yang dikenal sebagai Plasmid

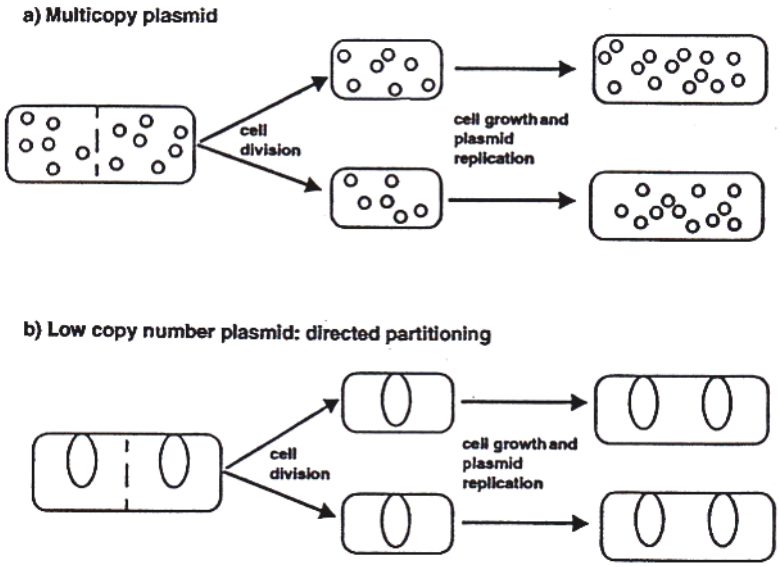
Disamping Kromosom, bakteri ini memiliki suatu ekstra kromosomal gen yang disebut plasmid berbentuk sirkuler dengan ukuran yang lebih kecil. Plasmid ini mengkode beberapa protein yang kadang kadang tidak dikode oleh kromosom. Plasmid ini memiliki Origin of replication sendiri dan mampu melakukan proses sintesis protein sendiri. [5,6]

Saat ini ada 5 tipe plasmid:[5,6]

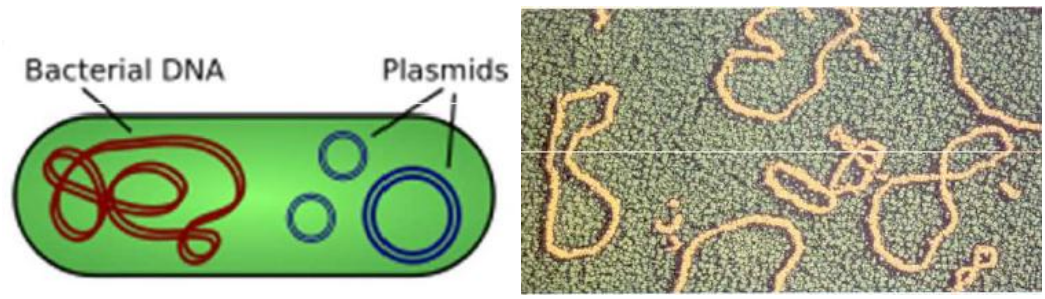
1. Plasmid R yang mengkode gen resistensi misalnya membawa sifat resitensi terhadap ampislin, tetrasiklin, chloramphenicol atau terhadap betalaktamase inhibitor.
2. Plasmid F (fertilitas) mengkode gen yang berfungsi sebagai gen untuk proses konyugasi yang kemudian di kenal sebagai gen sex pillus yang mengkode gen yang mengekpresikan gen yang berbentuk seperti tabung yang mampu mentransferkan f plasmid dari satu bakteri ke bakteri lain.
3. Plasmid col. Plasmid ini mengkode protein yang disebut collicins yang mampu membunuh bakteri lain.
4. Degradatif plasmid. Menginduksi bakteri lain untuk menghasilan zat-zat yang tidak biasanya misalnya asam salisilat.
5. Plasmid Virulensi. Menginduksi terjadinya penyakit pada bakteri lain.

Besarnya plasmid bervariasi dari ukuran 1kb sampai 250kb. Ada beberapa tipe plasmid yang hampir ditemukan pada banyak bakteri, tapi ada pula yang hanya dimiliki oleh beberapa bakteri.

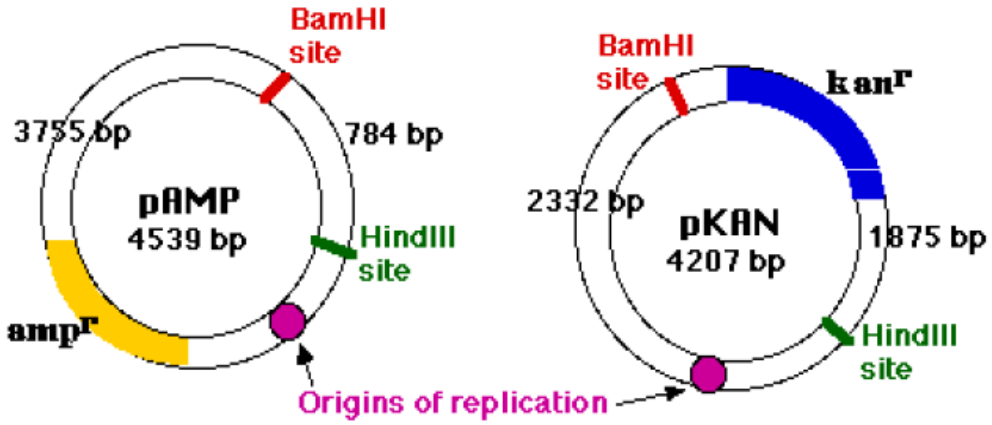
Adanya beberapa bakteri yang memilki satu atau dua plasmid yang kemudian disebut *low copy number*. Ada yang memiliki lebih dari 10 yang kemudian disebut *high copy number*.[5-7]



Gambar 4. High Copy Number Plasmid dan Low Copy Number Plasmid[5]



Gambar 5. Kromosom dan Plasmid [5]



Gambar 6. Plasmid yang mengkode gen yang resisten terhadap ampisilin dan kanamisin [4]

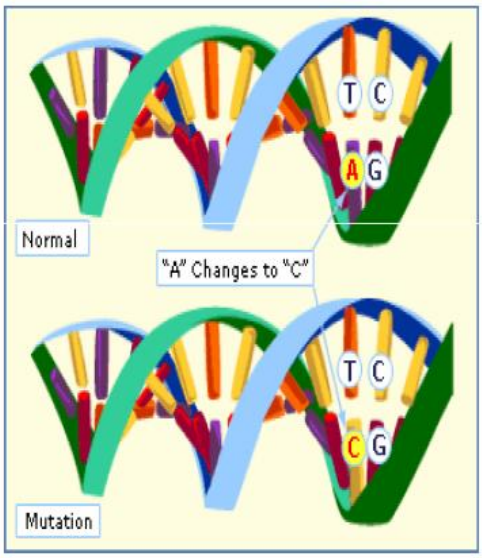
Bab III
MUTASI.

Mutasi adalah suatu perubahan yang terjadi pada suatu sekuen DNA dari suatu organisme. Mutasi dapat terjadi karena adanya rangsangan suatu agen kimia maupun agen fisika atau adanya kesalahan pada saat DNA replikasi. Mutasi Titik (*point mutation*) atau mutasi dalam sekuan yang besar (*gross mutation*) pada daerah *coding region* dari gen yang akan menyebabkan perubahan fungsi dari suatu protein. [2-4,8,9]

Jenis Mutasi [2-3,7-9]

Perubahan Pasang Basa
- Mutasi Missense
- Mutasi Nonsense
- Sifat :
  - Leaky : Suatu mutasi tetap ada tetapi produk gen tetap mempunyai aktifitas
  - Reversi : Suatu urutan yang termutasi kembali keurutan awal (urutan alami, wild type)

Perubahan Kerangka Baca
- Penyebab
- Sifat : Tidak Leaky & Dapat Reversi



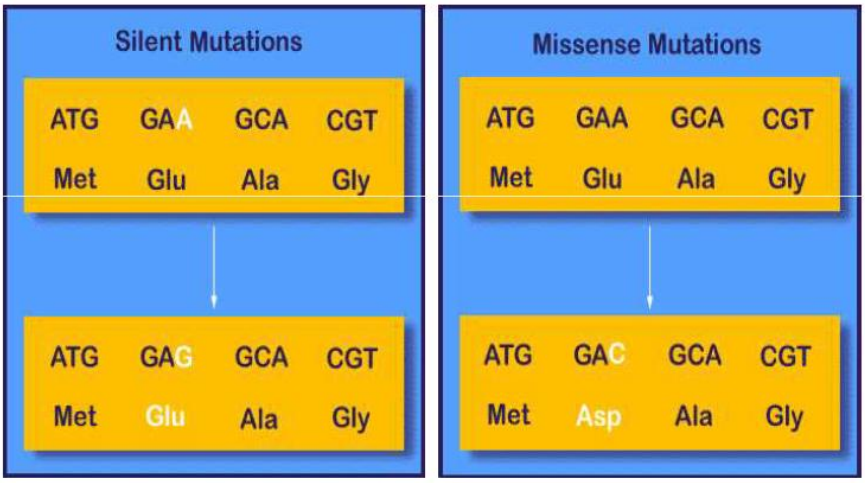
Gambar 7. Mutasi adalah perubahan basa nukleotida pada suatu gen [4]

Konsekuensi Perubahan Pasangan Basa [2-4]

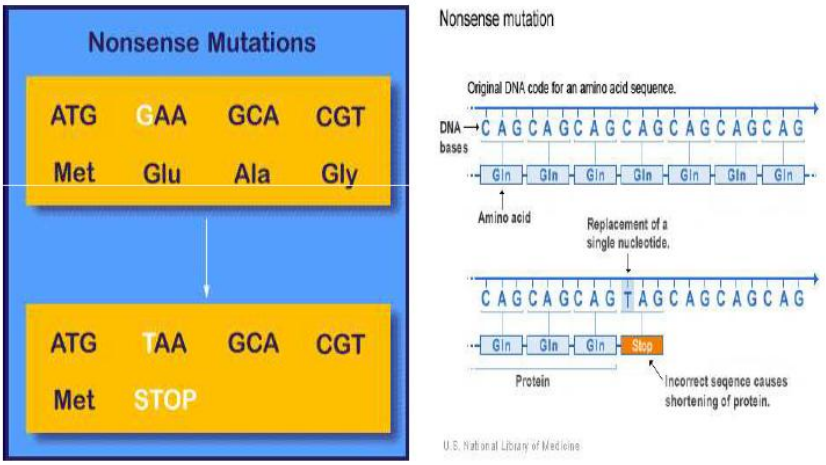
Silent Mutation

Mutasi Missense

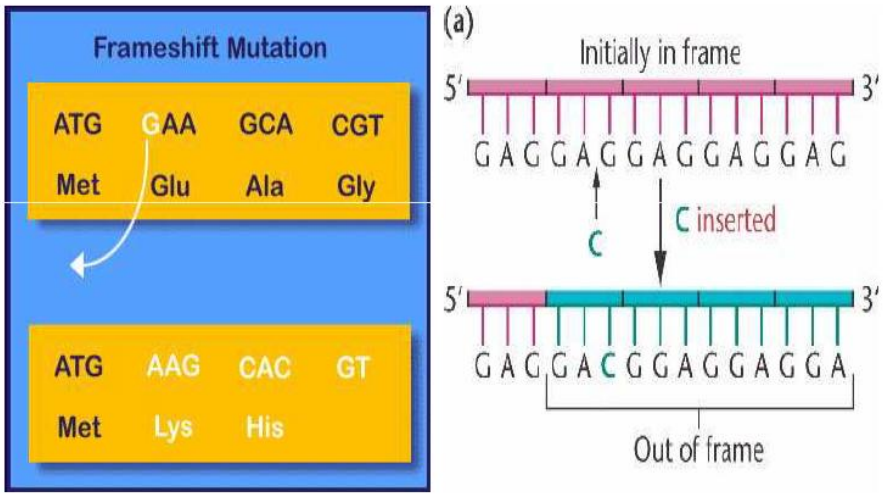
Mutasi Nonsense



Gambar 8. Jenis Mutasi [4]



Gambar 9. Mutasi menyebabkan perubahan kerangka baca [4]



Gambar 10. Mutasi menyebabkan perubahan rangka baca [4]

Tipe Mutasi dan pengaruhnya terhadap aktivitas protein[4]

Perubahan pasangan basa

Mutasi titik (Point mutation) : perubahan asam amino (aa) dengan aa sama atau sejenis (aktivitas biasanya tak berubah)

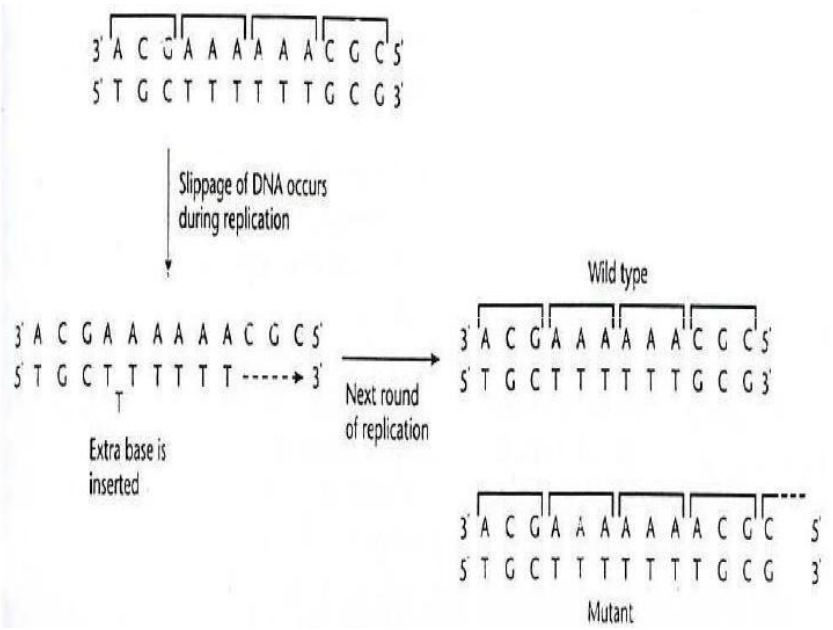
------- ACT -----	------ ACC -------	----- GAT -----	----- GAA -----
------- TGA -----	------ TGG -------	----- CTA -----	----- CTT -----
threonin	threonin	aspartat	glutamat

Mutasi missense : sickle-cell anemia perubahan aa dengan aa sifat berlebihan (aktivitas protein biasanya berubah)

------- GAG -----	------ GTG -------
glutamat	valin (aa6)

Mutasi Nonsense : Kodon sens berubaha menjadi kodon stop. Protein yang dihasilkannya menjadi lebih pendek dan tidak aktif.

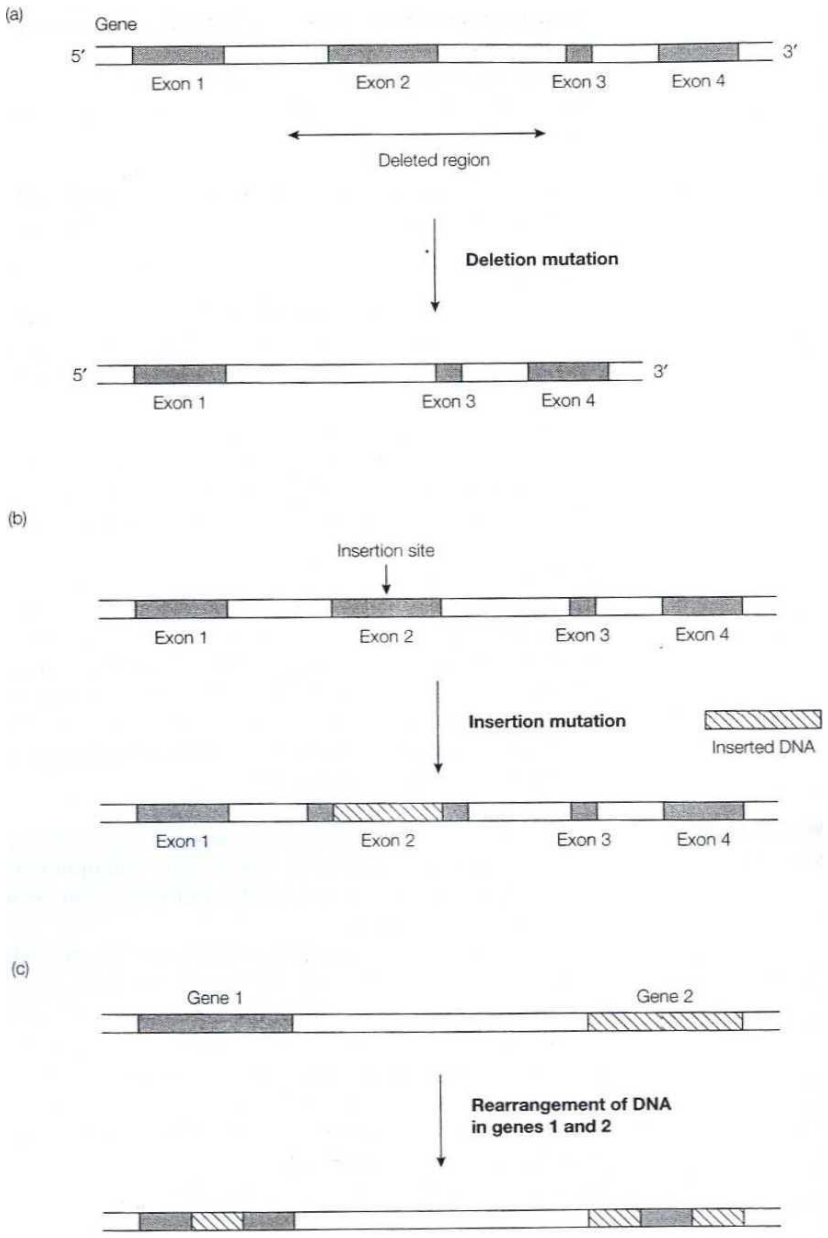
--- TAT CAG ---	--- TAA CAG ---
--- tyr gln ---	--- stop



Gambar 11. Insersi T[4]

Gross mutation [3]

1. Delesi : hilangnya sebagian besar basa nukleotida dari suatu sekuen DNA.
2. Insersi: masuknya satu beberapa nukleotida yang merupakan bagian dari suatu sekuan pada kromosom
3. Rearrangements : terjadi dari suatu segment DNA yang berasal dari DNA itu sendiri atau dari luar gen tersebut.



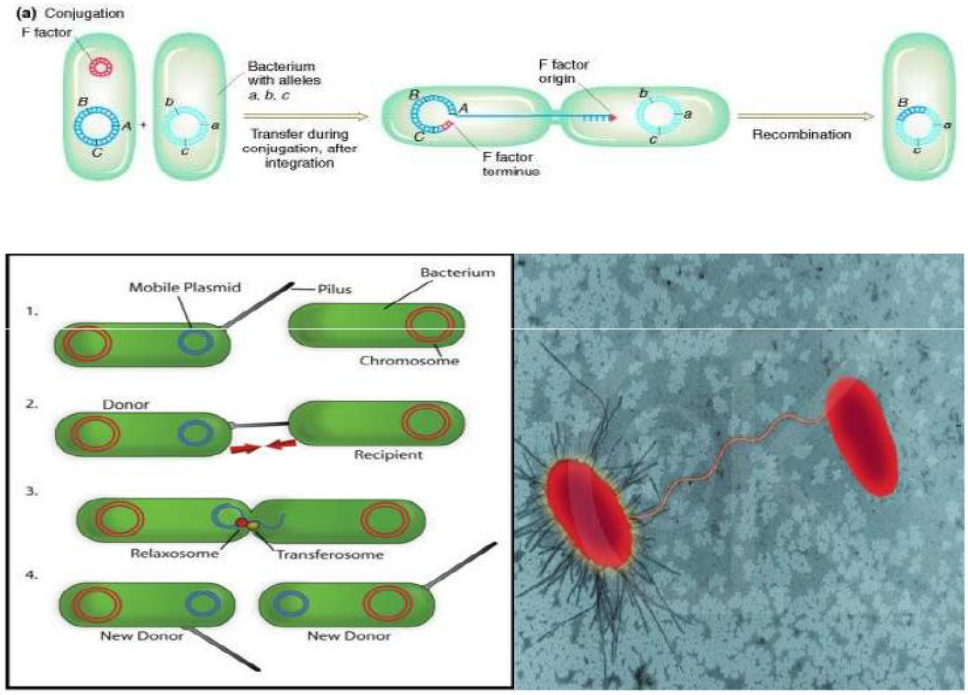
Gambar 12. a) Mutasi Delesi; b) Mutasi Insersi; c) Mutasi rearrangement [3]

Bab IV

TRANSFER GENETIK

Bakteri memperoleh gen baru melalui beberapa proses yaitu [2,4,7,9,11]

1. Konyugasi melibatkan kontak antara sel donor dan sel resipien serta DNA di transfer sebagai bagian dari plasmid ke sel resipien.



Gambar 13. Konyugasi [2,4,12]

Konyugasi merupakan proses transfer genetik yang melibatkan kontak sel. Materi genetik yang ditransfer dapat berupa plasmid atau bagian kromosom yang dibawa plasmid.[5]

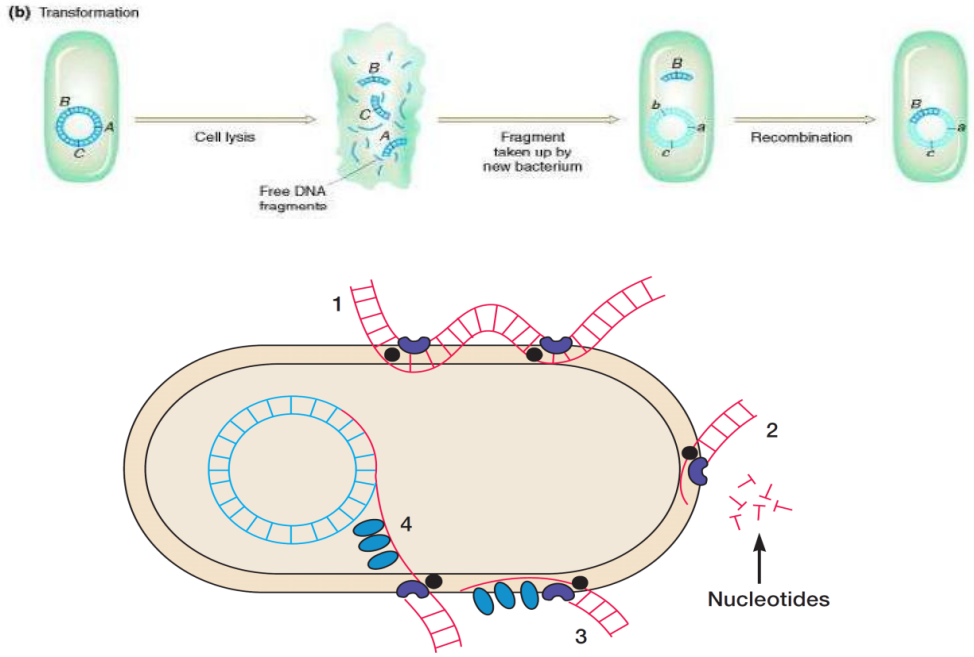
Transfer plasmid F :

- Kebanyakan plasmid pada Gram negatif memiliki kemiripan dengan plasmid F yang merupakan DNA untai ganda seluler, yang mampu bereplikasi sendiri dan mewariskannya pada sel anak pada waktu pembelahan.
- Plasmid F mempunyai kemampuan mentransfer sendiri dari satu sel ke sel lainnya melalui proses konyugasi dan membawa gen yang mengkode protein tertentu untuk konyugasi (gen *tra*).

- Ada plsmid yang tidak dapat melakukan transfer sendiri tetapi dimobilisasi oleh plasmid konyugasi disebut *mobilizable plasmid*, yang dapat mentransmisikan gen resistensi.

Gen pada plasmid mengkode protein mengubah sifat permukaan sel dengan menghasilkan struktur pilus seks. Plamid F menyebabkan tiga perubahan sel yaitu: kemampuan mesintesakan pilus F, memobilisasi DNA untuk transfer ke sel lain, merubah reseptor permukaan sehingga sel tidak berfungsi sebagai sel resipien dalam konyugasi. Struktur pilus ini lebih panjang dan lebih tebal sehingga mudah berkontak dengan sel dengan F- dan membentuk jembatan konyugasi melalui DNA lewat dari sel F+ ke F-. pilus ini dikode oleh gen dalam plasmid F.

2. Transformasi melibatkan pelepasan DNA kelingkungan karena lisis, diikuti dengan penangkapan langsung dan asimilasi DNA telenjang bebas oleh sel resipien. Ini terhadi hanya pada bakteri tertentu.



Gambar 14. Transformasi [2,4]

Transformasi pada bakteri Gram positif [4,11]

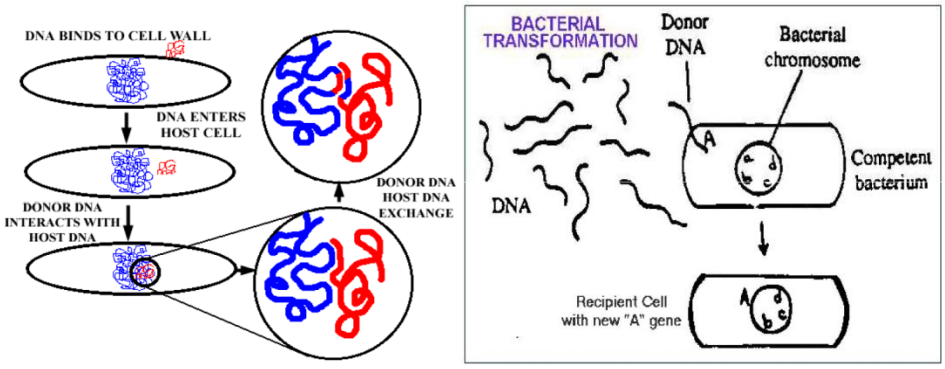
Bakteri yang dapat melakukan transformasi adalah bakteri yang telah mencapai keadaan kompeten yaitu suatu keadaan dimana bakteri mencapai fase akhir pertumbuhan (tahap eksponensial) biasa pertumbuhan bakteri mencapai kepadatan sel 10^7-10^8 / mL. DNA akan difragmentsi menjadi bagian kecil dan hanya satu dari dua untaian DNA yang memasuki sel.

Untai lainnya di degradasi dan dilepas kembali ke dalam media. Untaian tunggal DNA yang masuk kedalam sel berekombinasi dengan genom sel bakteri resipien. Rekombinasi hanya akan terjadi bila gen donor yang masuk ke dalam sel, homolog dengan gen resipien sedang yang tidak homolog tidak akan berintegrasi. 50% rekombinasi DNA homolog yang ditransport akan berintegrasi kedalam kromosom.

Transformasi Pengambilan DNA Telanjang [12]

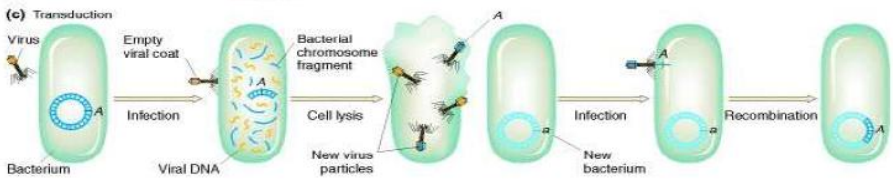
Transformasi Alami

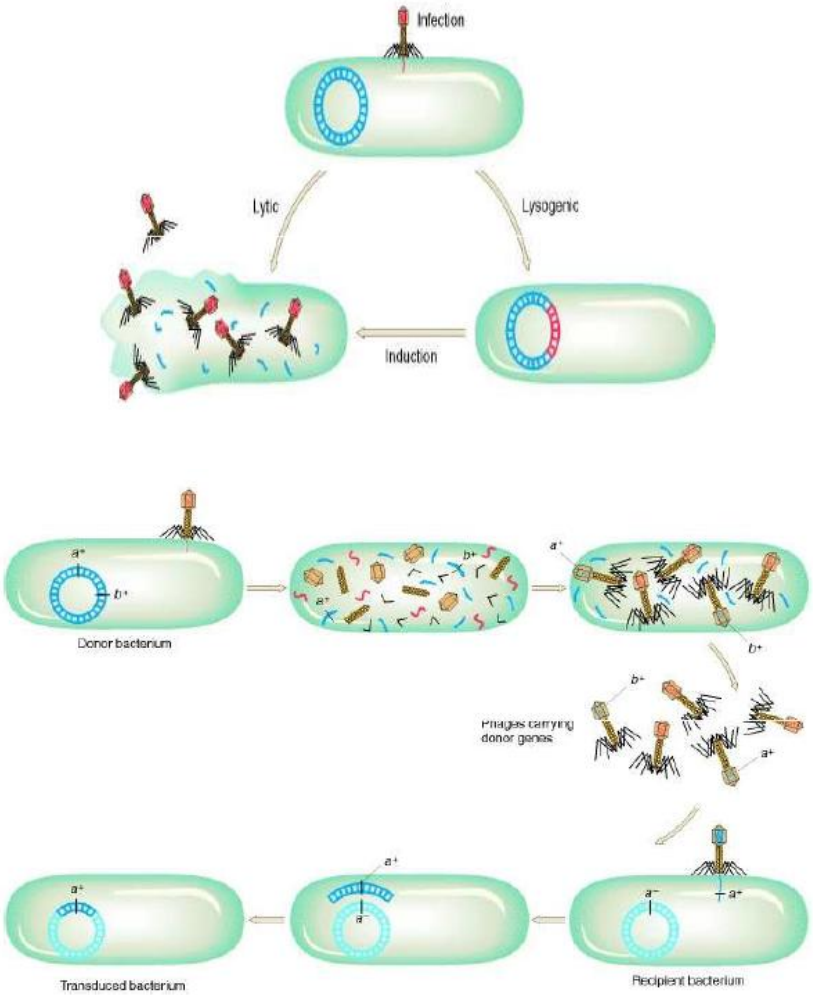
Yang secara alami dapat melakukan transformasi: Gram positif and Gram negative : *Bacillus subtilis, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoea, Streptococcus pneumoniae*



Gambar 15. Transformasi [4]

3. Transduksi bakteriofaga yaitu melibatkan masuknya DNA kedalam sel resipien oleh virus hidup yang berfungsi sebagai vector untuk transmisi gen dan virus bermultiplikasi pada sel donor. [12]





Gambar 16. Proses Tranduksi [4]

- Terjadi pada bakteri Gram positif maupun negatif
- Virus hanya berproduksi dalam sel hidup.
- Virus yang bereplikasi dalam sel membentuk bakteriofaga, proses ini memungkinkan bakteriofaga memindahkan gen bakteri dari satu sel ke sel lainnya.
- Bakteriofaga dapat tumbuh sebagai faga virulen pada setiap sel bakteri hingga menyebabkan sel bakteri terinfeksi dan akhirnya lisis karena sintesis virus baru.
- Faga yang berintegrasi disebut profaga dan bersifat lisogeni

Bab V

Mekanisme Kerja Antibiotik dan Mekanisme Resisten Antibiotik pada Tingkat Molekuler.

Antibiotik dapat menghalangi pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh bakteri (bakterisid) melalui beberapa mekanisme yaitu menginhibisi: Proses replikasi, proses transkripsi,ke duanya merupakan sintesis asam nukleat, proses translasi yang merupakan sintesis protein dan biosintesis peptidoglikan.

Inhibitor sintesis asam nukleat:

1. Mengganggu fungsi template . Dalam hal ini antibiotik ini tidak memiliki efek toksisitas hingga tidak digunakan sebagai obat
2. Menginhibisi proses enzimtik sintesis DNA yaitu terjadi pada proses replikasi, yang dihambat yaitu DNA girase, helikase, primase, DNA polymerase, Endonuklease dan ligase.

   Saat ini antibiotik yang bisa menghambat replikasi yaitu hanya kuinolon. Efeknya terjadi penghambatan terhadap enzim girase hingga terjadi penghambatan pembukaan supercoiled dari DNA
3. Menginhibisi proses enzimatik sintesis RNA. Proses ini di katalis oleh RNA polymerase. Salah satu antibiotik yang berfungsi menghambat sintesis RNA yaitu Rifampin yang memiliki kemampuan mengikat core enzim yang membawa factor sigma sehingga faktor transkripsi tidak terjadi. (Russel Understanding)

Inhibitor yang menginhibisi sintesis protein

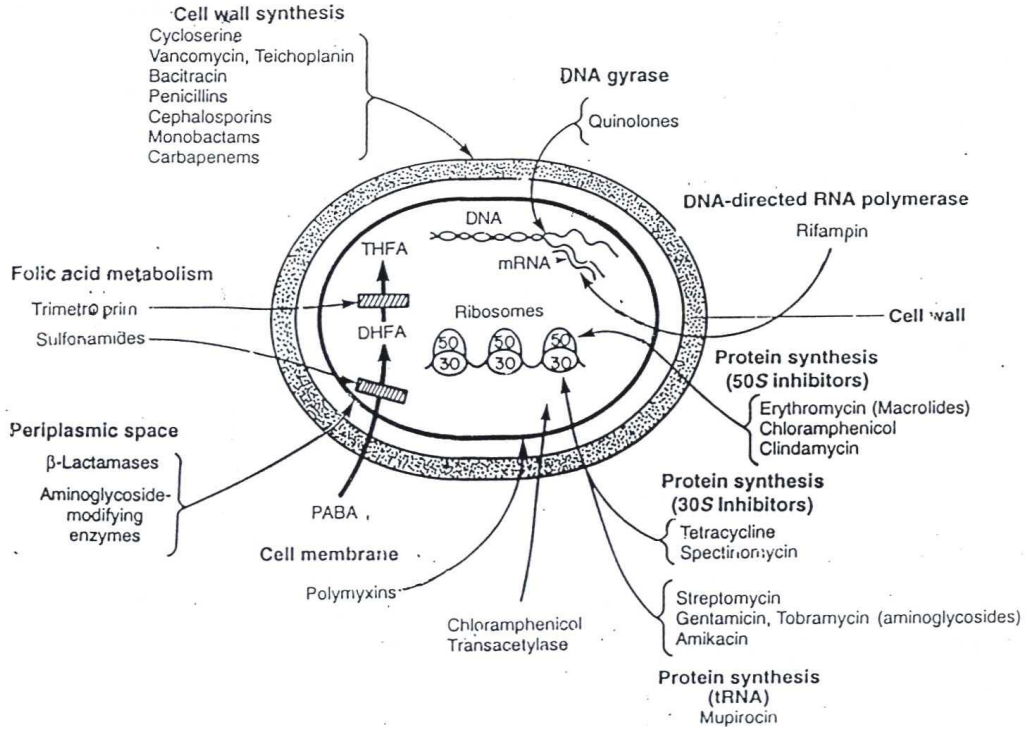
1. Translasi prokariot membutuhkan beberapa protein yaitu faktor inisiasi, t RNA (f Met), ribosom (subunit 30S dan 50S) faktor elongasi dan peptidiltransferase.
2. Menghambat subunit 50S adalah erithromisin, kloramfenikol, klindamisin, linkomisin.

3. Menghambat ikatan subunit 30S dengan subunit 50S adalah tetrasiklin, streptomisin, gentamisin, kanamisin, amikain.
4. Menghambat tRNA mupirosin.
5. Menghambat pengikatan 50S dengan peptidiltransferase sehingga elongasi tidak terjadi.
6. Menghambat 30S hingga adanya ketidakmapuan tRNA dengan kodon.

Inhibitor sintesis dinding sel.

Antibiotik gol betalaktam yang meghambat PBP pada akhir sintesis dinding sel. Pengikatan antibiotik betalaktam dengan PBP menginduksi terjadinya autolisin hingga terjadi degradasi peptidoglikan sehingga terjadi lisis bakteri.

Glikopeptida menghambat pembentukkan sintesis peptidoglikan (tidak mengikat PBP salah satunya adalah Vankomisin mengikat struktur pentapeptida.



Gambar 17. Aktifitas antibiotik yang menganggu sel bakteri

Mekanisme resistensi

Syarat utama antibiotik bekerja adalah antibiotik tersebut harus mencapai target, misalnya betalaktam harus mencapai luar membran, sedangkan Tetrasiklin harus mencapai sitolasma.

Pada Gram negatif membran luar membatasi masuknya antibiotic kedalam sitoplasma karena itu obat tersebut harus melalui pori-pori dalam membran luar, dengan adanya mutasi porin maka menghalangi masuknya antibiotik.

Pada Gram positif, dinding selnya sangat rigid. Obat antibiotik yang masuk melalui celah pada peptidoglikan.

Inaktifasi antibiotik secara enzimatik (desertasi)

Salah satu faktor utama resistensi antibiotik terhadap betalaktam adalah enzim betalaktamase. Enzim ini memotong cincin betalaktam pada sisi aktif Serin hingga menjadi tidak aktif. Enzim disekresikan secara ekstraseluler pada ruang periplsma pada Gram negatif dan adanya porin ini menyebabkan kesukaran masuknta antibiotic betalaktam.dan ekstrasel pada Gram positif.

Salah satu penyebab resitensi lainnya adalah terbentuknya protein efflux yaitu suatu protein yang mengembangkan suatu strategi untuk mencegah masuknya antibiotik dengan memompakan antibiotik keluar sel

Modifikasi target antibiotik

Perubahan PBP2 menjadi PBP2a yang kemudian dikenal sebagai MRSA. Proteksi ribosom yaitu adanya protein sitoplasma yang mencegah ikatan tetrasiklin dengan ribosom. Protein ini dikode oleh tetM, tetO dan tetQ. Modifikasi 23SrRNA adanya penambahan gugus metal pada adenin 23SrRNA hingga tidak terjadi ikatan antibiotik dengan ribosom. Perubahan DNA gyrase pada kodon 87-89 sehingga terjadi gangguan replikasi. Perubahan RNA polymerase (subunit beta) dengan terjadinya mutasi rpoB yang mengakibatkan mutasi misense, insersi, delesi pada kodon 507-533. Perubahan pada protein ribosom S12 rpsl yaitu mutasi Lys43 dan Lys 88. Perubahan pada peptiditil tranferase pada gen 23S rRNA yaitu mutasi A -2058-C/G/T.

Kesimpulan

Prokaryote dalam istilah molekuler dikenal sebagai Mikrobiologi molekuler. Prokaryote ini memiliki suatu bentuk kehidupan yang mirip dengan Eukaryote yang memiliki bentuk yang yang lebih kompleks dibandingkan dengan Prokaryote yang memiliki struktur yang sederhana. Prokaryote ini dibentuk oleh DNA yang mengkode asam amino yang diperlukan untuk kelanjutan hidupnya. Prokaryote inipun memiliki daya pertahanan terhadap gangguan dari lingkungan sekitarnya hingga tercapai keseimbanga hidup bagi diri Prokaryote ini sendiri, yang akibatnya justru akan mengganggu kehidupan dari Eukaryote. Kesimbangan ini dimungkinkan dengan adanya mutasi dan transfer genetik.

Disamping itu Prokaryote ini pun sering digunakan sebagai vektor untuk pembuatan suatu protein yang diperlukan oleh mahluk Eukaryote dalam bentuk tehnik DNA rekombinan. Dalam bentuk plasmid yang merupakan suatu bentuk DNA ekstra kromosomal yang mampu bermultipikasi dan melakukan sintesis protein sendiri tanpa bantuan DNA Kromosom dalam inti.

Daftar Pustaka

1. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Rob ert K, Watson JD. The Cell, Garland Publicshing, 1994: p 1223-226, p 291-99
2. Madigan TM, Martinko JM,Parker J. Biology of Microorganisms 8thed., London, Prentice Hall International, Inc.1997: p 539- 76
3. Winter PC, Hickley GI and Fletcher HL: Genetic. Biddles Ltd, UK, 2002, 2nd ed: p75-8;p86-92
4. Retnoningrum DS. Kumpulan kuliah Biologi molekuler. Sekolah Farmasi ITB, Bandung, 2007
5. Dale JW. Moleculer Genetic of Bacteria, John Wiley & Sons. 2nd ed. 1995: p 107-160
6. Brown TN: Gene Cloning & DNA Analysis, New York, Black Well, Publishing, 5th ed, 2006: p 14-19
7. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology, Mc Grow Hill, 2005, 5th ed: p 227-291
8. Glick BR, Pastrenak JJ. Moleculer Biotechnology, ASM Pres, 2003: p 330-77
9. Gelekter TD, Collins FS, Ginburg D. Principles of medical Genetic, William & wilkins, 2002, 2nd ed: p 311-28
10. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic Moleculer Microbiology: Washington DC, ASM Press, 1994 :p 56-78
11. Fischetti VA, Novick FJ, Ferretti DA Rood JI, Gram Positive and Gram negative pathogen, Washington DC, ASM Press, 2004: p 245-79
12. Salyer AA, Whitt. Bacterial Pathogenesis : A moleculer approach, Washington DC, ASM Press, 1994: p 38-69
13. Rusell AD and Chopra A. Understanding antibacterial action and resistance, London, Elles Horwood, 1990: p 45-88 .
14. Lammont RJ, Lantz MS, Burne RA, Leblanc DJ. Oral Microbiology and Immunology ,American society for Microbiology, Washington DC, 53-55,89-109,