

Kloning gen dari mutan - mutan *Klebsiellae pneumoniae* yang resisten terhadap BRL-41897A (Mutan KSL)

Cloning of mutant genes of *Klebsiellae pneumoniae* resistant against BRL 41897A (KSL Mutants)

M. Kuswandi.

Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

Abstrak

Penelitian terdahulu untuk identifikasi mutan-mutan *Klebsiellae pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotika BRL 41897A (mutan KSL) baik dengan metode Southern blot maupun SDS-PAGE menunjukkan bahwa ada variasi dalam jumlah copy *TnphoA* dari setiap mutan yang diperiksa dan perbedaan profil membran luar sel (OM dan IROMP) dari beberapa mutan. Dalam usaha melakukan kloning gen yang disisipi *TnphoA* dari mutan KSL, fragmen DNA dari kromosom mutan dimasukkan ke dalam vektor pUC18 selanjutnya ditransformasikan ke dalam sel inang *E. coli*. Selanjutnya transforman-transforman yang positif membawa *TnphoA* dibaca rangkaian basa DNA nya dengan *Cycle sequencing*. Melalui beberapa percobaan telah berhasil dilakukan kloning fragmen fragmen DNA yang membawa sebagian gen yang diinginkan dan bagian sebelah kanan *TnphoA* dari mutan KSL19, KSL38 dan KSL62. Hasil *sequencing* menunjukkan bahwa rangkaian DNA dari sebagian gen gen yang disisipi *TnphoA* dari ketiga mutan berbeda urutannya satu sama lain atau merupakan bagian dari gen gen yang berlainan.

Kata kunci : mutan *K.pneumoniae*-resisten terhadap BRL41897A,klon,sequencing.

Abstract

Previous observations to identify *Klebsiellae pneumoniae* mutants (KSL) resistant to BRL41897A antibiotic (Kuswandi, 2002), using Southern blot dan SDS-PAGE analysis, showed that there were variation of *TnphoA* copy in each mutant and differentiation of outer membrane (OM and IROMP) of several mutants cell wall. In order to clone the gene which carries *TnphoA* from the KSL mutants, the chromosomal DNA fragments that had been ligated to pUC18 plasmid was transformed into *E.coli* host cells. The positive transformants of different mutants (KSL 19, KSL38 and KSL62) carrying *TnphoA* has been sequenced. The results showed that the three different transformants of the mutants had different genes inserted *TnphoA*.

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

Pendahuluan

Antibiotika BRL 41897A adalah antibiotika yang dirancang oleh para peneliti Smith-Kline Beecham untuk memperbaiki kerja Sefalosporin (Basker dkk, 1984 dan 1986). Antibiotika ini masuk ke dalam sel bakteri memakai sistem transport Fe yaitu sistem *tonB* yang terekspresi bila ditumbuhkan diatas media

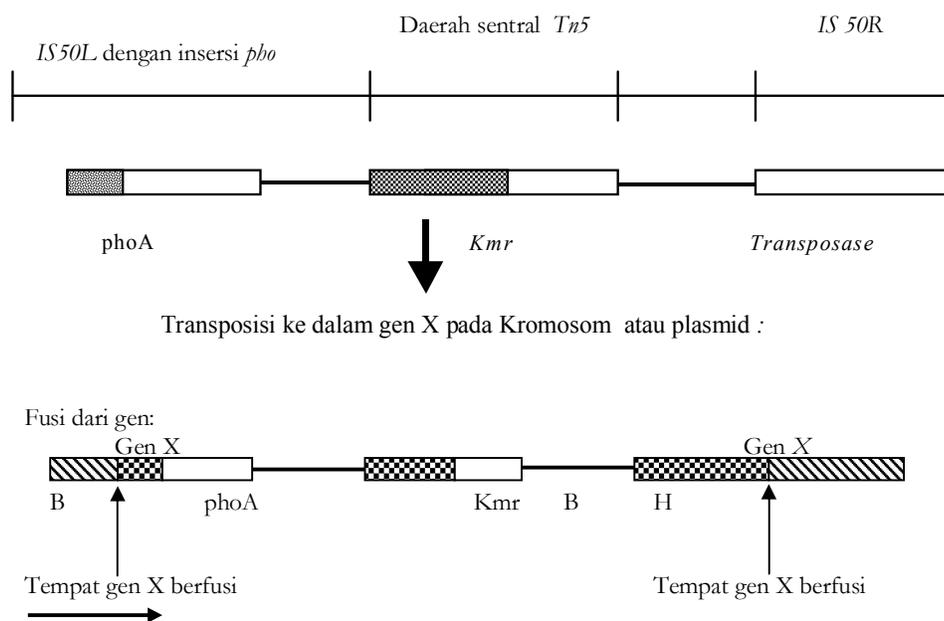
yang kekurangan Fe (Watanabe dkk, 1987; Critchley dkk, 1991; Kuswandi dan Lambert, 1997). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa BRL 41897A mempunyai aktivitas tinggi terhadap bakteri Gram negatif seperti *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *K. pneumoniae*, termasuk terhadap *K.pneumoniae* yang telah resisten terhadap beberapa antibiotika lain, terutama kelompok

penisilin (Nikaido dan Rosenberg,1990; Kuswandi dan 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 *TnphoA* (Brown, 1993; Kuswandi, 1997). Tujuan akhir penelitian ini setelah mengetahui jenis protein produk dari gen-gen yang bertanggungjawab terhadap terjadinya resistensi adalah untuk mendesain antibiotika baru turunan dari BRL 41897A yang diharapkan dapat mencegah munculnya jenis bakteri baru yang resisten terhadap antibiotika turunan BRL 41897A tersebut.

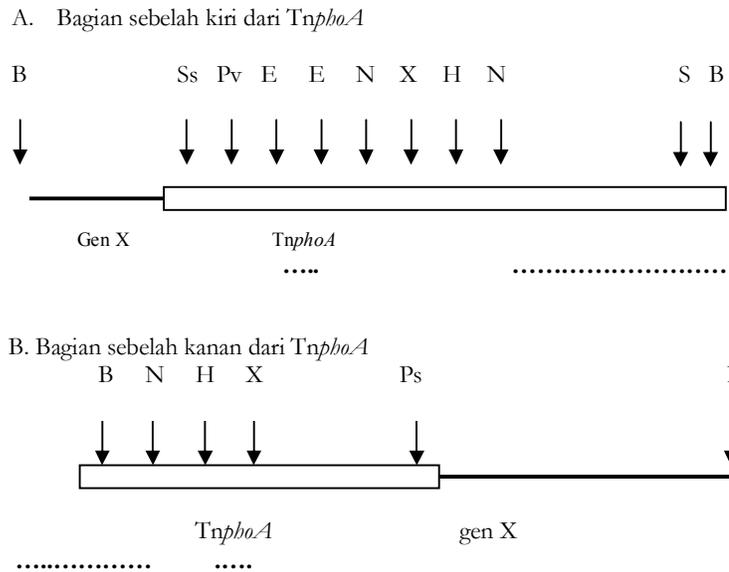
Transposon *TnphoA* dipilih untuk pembuatan mutan karena dua alasan utama yakni: pertama; sifat transposon sendiri yang cenderung mudah menyisip di sembarang tempat dalam kromosom, kedua; dengan adanya gen *phoA* dalam transposon akan memudahkan identifikasi koloni yang mengandung transposon, sebab koloni tersebut akan berwarna biru tua yang merupakan hasil reaksi

antara enzim *fosfatase A*, produk dari gen *phoA*, 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 dkk, 1989; Manoil dan Beckwith, 1985).

Identifikasi OM dan IROMP dari beberapa mutan KSL dengan SDS-PAGE telah dilaporkan (Kuswandi, 2003). 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 (Kuswandi,2002) memperlihatkan minimal satu mutan KSL19 membawa hanya satu kopi transposon, dan sedikitnya 2 mutan yakni KSL38 dan KSL52 membawa 2 kopi transposon. Dalam makalah ini dilaporkan kerja selanjutnya yakni melakukan kloning fragmen DNA dari beberapa mutan KSL yakni KSL19, KSL38 dan KSL62 ke dalam bakteri inang *E.coli* kemudian dibaca rangkaian DNA nya dengan memakai



Gambar 1. Fusi dari gen *phoA* aktif memakai transposon *TnphoA*. (Taylor *et al.*, 1989).



Gambar 2. Enzim restriksi diujung kiri dan kanan *TnpA*

Keterangan:

B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; X: *Xba*I; Ps: *Pst*I; Pv: *Pvu*II; S: *Sal*I; N: *Nco*I; Ss: *Sst*I.

Enzim Restriksi seperti *Xba*I, *Kpn*I dan *Eco*RV tidak memotong dalam *TnpA*.

Garis titik-titik (...) adalah fragmen yang dipakai sebagai "probe".

primer bagian ujung dari *TnpA*. Hasil yang diperoleh akan menjawab pertanyaan antara lain apakah gen yang mengalami mutasi merupakan gen yang sama atau berbeda satu sama lain dan apakah gen tersebut mengkode suatu protein yang sudah diketahui atau belum (masuk dalam *database*).

Berdasarkan teori, kloning dapat dilakukan dengan tiga kemungkinan: pertama dengan membawa seluruh transposon bersama bagian kecil dari gen, kedua; bagian kiri transposon bersama bagian kecil dari gen atau ketiga; bagian kanan transposon bersama bagian kecil gen yang disisipi transposon tersebut.

Dalam rangka melakukan kloning fragmen kromosom yang membawa *TnpA*, kromosom mutan dipotong dengan enzim yang dipakai dalam analisis dengan Southern Blot, dimasukkan ke dalam vektor plasmid, kemudian dipindahkan ke dalam sel inang *E.coli*. Menggunakan hibridisasi *Dot blot* maka dapat dideteksi transforman dengan memakai *probe* fragmen *Nco*I (Gambar 2). Koloni koloni yang memberikan reaksi positif dengan *probe*

selanjutnya diisolasi, dan DNA plasmidnya diambil untuk diuji kembali dengan *probe* yang sama. Kemudian DNA plasmid yang murni di *cycle sequenced* menggunakan primer dari rangkaian basa *TnpA* ujung

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 dan Sutherland, 1976) dan menghasilkan siderofor dan IROMP (Iron Regulated Outer Membrane Protein) (Williams dkk., 1983). Dalam penelitian ini *K. pneumoniae* M10 merupakan *strain* Wild Type (WT).

Mutan-mutan *Klebsiella pneumoniae* M10 yang resisten terhadap BRL 41897 yang dipakai pada penelitian ini yaitu mutan KSL19, KSL38, KSL62.

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 lizozim 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 - Digoksinin (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 2 µl campuran heksanukleotida, 2 µl 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 (200°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

Klon fragmen gen yang membawa seluruh *TnphoA* di dalamnya.

Oleh karena dengan analisis *Southern Blot* menunjukkan bahwa hanya satu fragmen kromosom yang dipotong dengan *KpnI* pada mutan KSL19 dan KSL62 memakai probe fragmen *NcoI* (Gambar 2, mulai N sebelah kiri sampai N sebelah kanan *TnphoA*), maka kemudian dilakukan kloning fragmen tersebut (panjang 21 kb) ke dalam vektor Bluescript (pKS+). Namun ternyata tidak dapat dihasilkan klon dari fragmen yang dipotong dengan enzim *KpnI*.

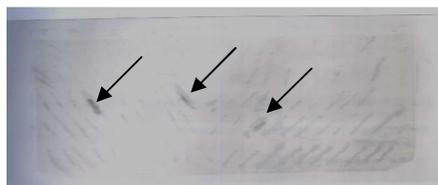
Klon fragmen gen yang membawa bagian sebelah kiri *TnphoA*.

Fragmen fragmen yang dicoba pada percobaan ini adalah fragmen DNA hasil pemotongan kromosom mutan dengan enzim restriksi *BamHI*, *XhoI* dan *HindIII*. Namun

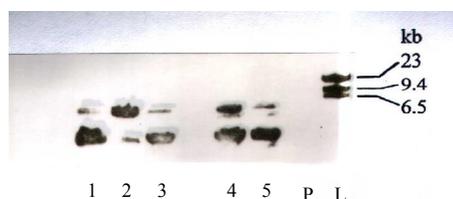
ternyata juga tidak dapat dihasilkan klon seperti yang diinginkan.

Klon fragmen gen yang membawa bagian sebelah kanan *TnphoA*.

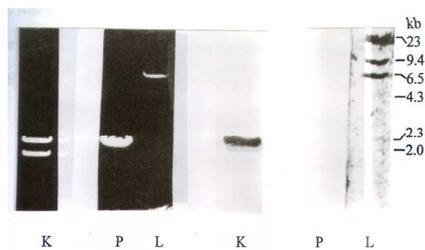
Klon fragmen DNA disini memakai enzim *HindIII* (Gambar 2, fragmen dari H sebelah kanan sampai H didalam gen X) dengan memakai probe fragmen *HindIII-XhoI*.



Gambar 3. Colony blot dari KIH62



Gambar 4. Analisis dengan *Southern blot* KIH62 menggunakan probe fragmen *HindIII-XhoI* dari *TnphoA*. P= plasmid pUC18. 1, 2, 3, 4, 5 = Klon KIH62, L= Lamda dipotong dengan *HindIII* sebagai penanda



Gambar 6. Analisis *Southern blot* dari fragmen KIH38 yang dipotong dengan *HindIII* memakai probe fragmen *HindIII-XhoI* dari *TnphoA* (Gambar 2). K: KIH38; P: PUC18; L: Lamda dipotong dengan *HindIII* sebagai penanda

```

=====
31  AAGGCGCAGA  GGTGAAAAAT  GAGAATACTG  AAATGGAAAA
71  GGACCATAAA  AAAAAAGCAA  ATGAGTTTAA  AGGTGATTAT
111 AATGAAAGAA  AGAGTAAGGT  GAAATCTCTT  ACCAGGAGCT
151 GACTCGCCTA  CTGCGCTAGG  GCAAGCGTCG  TATTCAAAAG
191 ATTATCTTTGA  TGCTAAAGGT  AAATGATGAT  TAGCACAAC
231 ACTATTAGGA  GTGAGACT.

```

Gambar 5. Rangkaian DNA dari KIH62, = = = TnpbA

```

=====
31  ACCACTCCAG  CTGCCGGGCA  TCCTGATAAA  TCATCACCCG
71  TGCAAATGAG  CAGGGAATTA  AGTCCTGTGG  TCATCTACAG
111 CGCATAAAAC  GGAGTCTCTC  ATGGGAATAA  TCAGAACAGT
151 GGTATACGTG  GGTATCATTG  GAGGCATCTT  TGCTATAATT
191 CTTCAACACA  CCTTCGAAGC  AGCCATATTC  TATCAATCTG
231 ACTATCATAA  CGATCTTCGT

```

Gambar 7. Rangkaian DNA dari KIH38. = = = TnpbA.

```

=====
31  CAGGCTATTC  TTAGTTTCTT  AACGGAAATA  TTCAGTCAAC
71  CCGAATTTTT  AATGGGGCTT  ATCGCCTTTA  TTGGTTAGTT
111 GGCCTGCGC  TCCCCTGGCA  ATAAACTGCT  TACCGGCACA
151 TTGAAGCCGA  TTTTAGGCTA  TTTGATGTTG  AGCGCTGGGA
191 AGGCGTTATC  GTTGCATCTC  ATC

```

Gambar 9. Rangkaian DNA dari KIH 19. = = = TnpbA

a. Klon mutan KSL62.

Setelah memberikan hasil positif pada *Colony Blotting* dari klon fragmen kromosom KSL62 yang dipotong dengan *HindIII* dalam pUC18, diberi nama KIH62 (Gambar 3), plasmid diperiksa dengan elektroforesis dan analisis Southern blot dengan memakai probe fragmen *HindIII-XbaI* dari TnpbA (Gambar 4).

DNA plasmid dari klon KIH62 kemudian dibaca rangkaian basanya menggunakan primer dari ujung kanan TnpbA

b. Klon mutan KSL38.

Prosedur analisis yang dipakai untuk mengidentifikasi klon dari fragmen sepanjang 2kb dari kromosom mutan KSL38 ke dalam pUC18 (disebut KIH38) sama dengan prosedur yang dipakai untuk identifikasi KIH62. Hasil

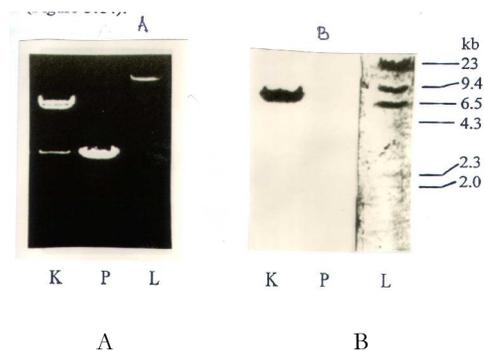
dari sequencing KIH38 dapat dilihat pada Gambar 7 .

c. Klon mutan KSL19.

Prosedur analisis untuk identifikasi KIH19 sama dengan prosedur pada identifikasi KIH62. Hasil analisis dengan elektroforesis kemudian dilanjutkan dengan *Southern blot* (Gambar 8)

Kemudian DNA plasmid KIH19 yang membawa TnpbA bagian sebelah kanan dibaca rangkaian DNAny dengan metoda Cycle Sequencing (Gambar 9).

Sejauh ini belum diketahui mengapa usaha melakukan kloning fragmen yang membawa seluruh TnpbA maupun bagian sebelah kiri transposon tersebut tidak diperoleh hasil seperti yang diinginkan. Namun dengan berhasilnya mengklon gen dari mutan-mutan



Gambar 8. Klon KIH19

A : Elektroforesis.

B : Southern blot menggunakan fragmen *HindIII-XbaI* dari *Tnp_{hoA}* sebagai probe
K: KIH19; P; pUC18; L : Lamda dipotong dengan *HindIII* (penanda).

KSL19, KSL38 dan KSL62, maka akan dapat dilakukan usaha selanjutnya yakni melakukan kloning masing masing gen utuh dari *Wild Type* yang pada mutan gen tersebut disisipi *Tnp_{hoA}*. Hasil sequencing ketiga fragmen DNA disekitar *Tnp_{hoA}* dari mutan KSL19, KSL38 dan KSL62 menunjukkan bahwa gen yang mengalami mutasi (disisipi transposon) atau gen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya

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.
- Curtis, N.A.C., Eisenstandt R.L., East, S.J., Conford, R.J., Walker, L.A and White, A.J. 1988. Iron regulated outer membrane proteins of *E.coli* K12 and mechanism of action of catechol-substitute cephalosporins. *Antimicrob. Ag.Chemother.*, 32:1879-1886.
- 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.
- Kuswandi, M. dan 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.

perubahan dari bakteri yang sensitif terhadap antibiotika BRL41897A menjadi resisten terhadap antibiotika tersebut dari masing-masing mutan adalah gen yang berbeda (Gambar 5,6 dan 7). Hal tersebut mudah difahami karena transposon mempunyai sifat mudah menyisip disembarang tempat dari kromosom WT.

Kesimpulan

Telah didapat hasil kloning fragmen DNA, dari gen mutan KSL19, KSL38, KSL62 pada vektor pUC18 disebut KIH19, KIH38 dan KIH62 (lihat gambar). Hasil Sequencing menunjukkan bahwa ketiga gen dari mutan mutan KSL yang diperiksa berbeda satu sama lain.

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., 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).
- Manoil, C. and Beckwith, J. 1985. *TnpA*: transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:8129-8133.
- Neilands, J.B. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.*, 36 :285-309.
- 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, J.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 *TnpA*: 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.