

**PENGARUH STREPTOMYCIN DAN CLINDAMYCIN
TERHADAP AKTIVITAS DNASE I PADA
KUALITAS DNA ASAL SALIVA**

SKRIPSI



**HAMIMATUR ROHMAH
1808260144**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
MEDAN
2022**

**PENGARUH STREPTOMYCIN DAN CLINDAMYCIN
TERHADAP AKTIVITAS DNASE I PADA
KUALITAS DNA ASAL SALIVA**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran**



UMSU

Unggul | Cerdas | Terpercaya

HAMIMATUR ROHMAH

1808260144

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
MEDAN
2022**

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber, baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Hamimatur Rohmah
NPM : 1808260144
Judul : Pengaruh Streptomycin dan Clindamycin Terhadap
Aktivitas DNase I pada Kualitas DNA Asal Saliva

Demikianlah pernyataan ini saya perbuat, untuk dapat dipergunakan sebgaimana mestinya.

Medan, 19 Januari 2022





**MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN**

Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext. 20 Fax. (061)
7363488 Website : www.umsu.ac.id E-mail : rektor@umsu.ac.id

HALAMAN PENGESAHAN


Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Hamimatur Rohmah
NPM : 1808260144
Judul : Pengaruh Streptomycin dan Clindamycin Terhadap Aktivitas
DNase I pada Kualitas DNA Asal Saliva

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima
sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana
kedokteran Fakultas kedokteran Universitas Muhammadiyah sumatera utara

DEWAN PENGUJI


Pembimbing,


(dr. Zulham, M.Biomed., PhD)
NIDN : 0002077403

Penguji 1


(dr. Isra Thristy, M. Biomed)

Penguji 2



(Dr. dr. Nurfadly, MKT)




(dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL (K))
NIDN: 0106098201

Mengetahui,

Ketua Program Studi
Pendidikan Dokter FK
UMSU


(dr. Desi Isnayanti, M.Pd.Ked)
NIDN: 0112098605

Ditetapkan di : Medan

Tanggal : 23 Februari 2022

PENGANTAR

Puji syukur saya ucapkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* karena berkat rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi ini dibuat dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- 1) dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
- 2) dr. Desi Isnayanti, M.Pd. Ked selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
- 3) dr. Zulham, M.Biomed., PhD selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- 4) dr. Isra Thristy, M.Biomed selaku penguji yang memberikan banyak masukan dalam skripsi ini.
- 5) Dr. dr. Nurfadly, MKT selaku dosen penguji yang memberikan banyak masukan dalam skripsi ini.
- 6) Orang tua saya, Bapak H. Mursidi dan Ibu Suliyah serta keluarga saya yang selalu memberikan doa, kasih sayang, juga dukungan, baik material maupun moral.
- 7) Saudara saya kak Isma dan kak Rina yang telah membantu dan memberikan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
- 8) Teman-teman seperjuangan, Mutia Haliza Karo Karo, Ifadatul Fatihin, Yulia Ananda Putri Rangkuti, Rinda Ayudya, Erliani, Firda Syakirina Purwoko, Basrah Bee, Mutia'atikah Hanif, Marwah Armaya, Rahmatul Al-khoriyah, Yusmawati Yusran, serta Aida Muayyadah, Ika, Chairunnisa, dan Rifki yang telah menyemangati, membantu saya dan memberikan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.

9) Teman satu penelitian, Siti Chairani yang telah membantu dan memberikan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.

10) Seluruh teman seangkatan 2018 yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Saya menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu kritik dan saran demi kesempurnaan tulisan ini sangat saya harapkan. Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas kebaikan semua pihak yang telah membantu saya. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Medan, 19 Januari 2022

Penulis

Hamimatur Rohmah

**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara,
saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hamimatur Rohmah

NPM : 1808260144

Fakultas : Kedokteran

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas skripsi saya yang berjudul **“Pengaruh Streptomycin dan Clindamycin Terhadap Aktivitas DNase I pada Kualitas DNA Asal Saliva”**.

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta, dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Medan

Pada tanggal :

Yang Menyatakan

Hamimatur Rohmah

ABSTRAK

Pendahuluan: *Deoxyribonucleic acid* (DNA) mengandung materi genetik yang berisi segala informasi identitas suatu individu. Saliva berpotensi menjadi sumber DNA manusia yang baik. Jika dibandingkan dengan pengambilan sampel darah, saliva mudah dikumpulkan dan pengumpulannya tidak invasif. Namun, DNA manusia yang dikumpulkan dari saliva berpotensi mengalami kerusakan karena aktivitas *deoxyribonuclease* (DNase) dalam saliva. Aktivitas DNase dapat dihambat oleh antibiotik, seperti antibiotik golongan aminoglikosida dan turunan lincomycin. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan menilai pengaruh streptomycin dan clindamycin terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva. **Metodologi:** Teknik pengambilan sampel adalah sampel dikumpulkan dari 9 subjek dengan setiap subjek mengalirkan ke pot saliva. Sebelum pengumpulan saliva, subjek diminta untuk berkumur-kumur dengan larutan *chlorhexidine gargle* (Listerin™) selama 30 detik, kemudian sampel dibagi menjadi empat kelompok. **Hasil Penelitian:** Rata-rata konsentrasi DNA hasil ekstraksi metode *spin-column* adalah 32,91 µg/mL (7,10-99,45 µg/mL) sementara rata-rata kemurnian adalah 1,813 µg/mL (1,639-2,043 µg/mL). Dengan perlakuan clindamycin, PCR dapat mengamplifikasikan gen *human NOTCH2* (~704 bp) sementara streptomycin menghasilkan band ~100 bp. **Kesimpulan:** Kadar 3,2 mM clindamycin efektif menghambat aktivitas DNase I dan dapat mengamplifikasikan gen *human NOTCH2* sementara streptomycin tidak dapat melindungi.

Kata Kunci: Clindamycin, DNase, DNA saliva, Streptomycin, Preservasi

ABSTRACT

Introduction: Deoxyribonucleic acid (DNA) contains genetic material that has all the information of an individual. Saliva has the potential to be a good source of human DNA. When compared to blood sampling, saliva is easier to collect and the collection process is non-invasive. However, human DNA collected from saliva has the potential to be degraded due to deoxyribonuclease (DNase) activity in saliva. DNase activity can be inhibited by antibiotics, such as aminoglycoside antibiotics and lincomycin derivatives. **Objective:** This study aimed to determine the effect of streptomycin and clindamycin on DNase I activity against the quality of human genomic DNA from saliva. **Methodology.** The sampling technique was that samples were collected from 9 subjects with each subject flowing into a saliva pot. Prior to saliva collection, subjects were asked to rinse their mouth with a solution of chlorhexidine gargle (Listerin™) for 30 seconds, then the samples were divided into four groups. **Results:** The average concentration of DNA extracted from the spin-column method was 32.91 g/mL (7.10-99.45 g/mL) while the average purity was 1.813 g/mL (1.639-2.043 g/mL). With clindamycin treatment, PCR was able to amplify the human NOTCH2 gene (~704 bp) while various concentrations of streptomycin produced multiple bands of ~100 bp. **Conclusion:** Concentration of 3.2 mM clindamycin effectively inhibit DNase I activity and can amplify the human NOTCH2 gene while streptomycin cannot protect.

Keywords: Clindamycin, DNase, salivary DNA, Streptomycin, Preservation

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN ORISINALITAS	Error! Bookmark not defined.
PENGANTAR	iv
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 LATAR BELAKANG	1
1.2 RUMUSAN MASALAH	3
1.3 TUJUAN PENELITIAN	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	3
1.5 HIPOTESIS	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 STREPTOMYCIN	4
2.2 CLINDAMYCIN	5
2.3 DEOXYRIBONUCLEASE	7
2.3.1 Inhibitor DNase	10
2.4 EKSTRAKSI DNA	11
2.5 POLYMERASE CHAIN REACTION	12
2.6 GEN <i>HUMAN NOTCH2</i>	13
2.7 KERANGKA TEORI	14
2.8 KERANGKA KONSEP	14

BAB III METODOLOGI PENELITIAN	15
3.1 DEFINISI OPERASIONAL	15
3.2 RANCANGAN PENELITIAN.....	15
3.3 TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN.....	16
3.4 SAMPEL PENELITIAN.....	16
3.5 BESAR SAMPEL	16
3.6 VARIABEL PENELITIAN	16
3.7 PENGUMPULAN SAMPEL PENELITIAN	16
3.8 EKSTRAKSI DNA ASAL SALIVA.....	16
3.9 ASAI PERLINDUNGAN TERHADAP DNase I	17
3.10 PENENTUAN KUANTITAS DNA	18
3.11 PENENTUAN KUALITAS DNA	18
3.11.1 Primer.....	18
3.11.2 PCR dan VISUALISASI BAND	18
3.12 ANALISIS DATA	19
3.13 KERANGKA KERJA.....	20
BAB IV	21
HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 HASIL PENELITIAN.....	21
4.1.1 Hasil Ekstraksi DNA Asal Saliva	21
4.1.2 <i>DNA Degradation Assay</i>	21
4.1.3 Pengaruh Streptomycin Terhadap Kualitas DNA Asal Saliva.....	22
4.1.4 Pengaruh Clindamycin Terhadap Kualitas DNA Asal Saliva.....	23
4.2 PEMBAHASAN	25
4.2.1 Kemurnian DNA Hasil Ekstraksi Metode Spin-column.....	25
4.2.2 Efek Aminoglikosida dalam Menghambat Aktivitas DNase I.....	25
B AB V KESIMPULAN DAN SARAN	27
5.1 KESIMPULAN	27
5.2 SARAN	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN.....	30
Lampiran 1 Lembar Penjelasan Kepada Subjek Penelitian	31

Lampiran 2 <i>Informed Consent</i>	32
Lampiran 3 Ethical Clearance	33
Lampiran 4 Protokol Ekstraksi DNA Spin-Column	34
Lampiran 5 Stoikiometri	36
Lampiran 6 Surat izin penelitian	42
Lampiran 7 Dokumentasi	43
Lampiran 8 Daftar Riwayat Hidup.....	44

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur streptomycin	3
Gambar 2.2 Streptomycin-DNAse I protection assay	4
Gambar 2.3 Struktur clindamycin	5
Gambar 4.1 <i>DNA degradation assay</i>	21
Gambar 4.2 Hasil elektroforesis <i>Streptomycin-DNAse I protection assay</i>	23
Gambar 4.3 Hasil elektroforesis dari PCR <i>gen human NOTCH2</i>	23
Gambar 4.4 Pengaruh clindamycin terhadap aktivitas DNAse I	24
Gambar 4.5 Hasil Elektroforesis PCR <i>gen Human NOTCH2</i>	24

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Definisi operasional	13
Tabel 3.2 Perlakuan sampel saliva	14
Tabel 4.1 Kemurnian dan Konsentrasi DNA Asal Saliva	21

DAFTAR SINGKATAN

Ca ²⁺	Ion Kalsium
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNase	<i>Deoxyribonuclease</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
Mg ²⁺	Ion Magnesium
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
pH	<i>Power of Hydrogen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
TAE	<i>Tris Acetate EDTA</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Deoxyribonucleic acid (DNA) mengandung materi genetik yang berisi segala informasi identitas suatu individu.¹ DNA berada di dalam nukleus sel eukaryota dan didapati hampir di seluruh sel individu. Bagian-bagian tubuh manusia seperti saliva, darah, sperma, sel kulit, rambut, urin, keringat, dan lain-lain dapat menjadi sumber DNA.^{2,3}

Saliva berpotensi menjadi sumber DNA manusia yang baik. Jika dibandingkan dengan pengambilan sampel darah, saliva mudah dikumpulkan dan pengumpulannya tidak invasif.^{4,5} Saliva diproduksi dan disekresikan oleh kelenjar ludah sebagai suatu cairan yang kompleks dengan 99% saliva terdiri dari air, zat organik dan anorganik.³ Selain itu, saliva juga mengandung flora normal, enzim, sel, cairan elektrolit, mikroorganisme, sel-sel epitel, hormon, imonoglobulin dan lain sebagainya.^{6,7,8} Sel epitel di mukosa mulut yang dilepaskan bersamaan saliva berpotensi menjadi sumber DNA untuk kepentingan diagnostik. Akan tetapi, kontaminan dalam saliva dapat merusak DNA.⁵

DNA manusia yang dikumpulkan dari saliva berpotensi mengalami kerusakan karena aktivitas *deoxyribonuclease* (DNase) dalam saliva.⁵ DNase adalah enzim yang mampu mengurai asam nukleat.⁹ Termasuk ke dalam kelas enzim yang heterogen, DNase mengkatalisis hidrolisis DNA dan akhirnya mendegradasinya. Dua jenis utama DNase adalah DNase I dan DNase II.¹⁰ DNase II dikenal sebagai DNase asam karena aktivitas optimalnya berada pada lingkungan pH rendah dari lisosom.¹¹

Aktivitas DNase dapat dihambat oleh antibiotik, seperti antibiotik golongan aminoglikosida dan turunan lincomycin (lincosamides).^{10,12} Aminoglikosida adalah antibakteria yang dihasilkan oleh *Streptomyces* atau fungi lainnya. Sejak tahun 1943, berbagai derivat aminoglikosida telah dikembangkan. Contoh obat golongan aminoglikosida adalah streptomycin, neomycin, kanamycin, gentamicin, amikacin, dan tobramycin.¹³ Aminoglikosida dengan

akhiran “mycin” (streptomycin, neomycin, kanamycin, paromomycin dan tobramycin) berasal dari *Streptomyces*; aminoglikosida yang berakhiran “micin” (gentamicin, netilmicin, dan amikacin) berasal dari *Micromonospora*.¹⁴

Istilah lincomycin berasal dari Lincoln, Nebraska (Amerika Serikat), daerah dimana jenis antibiotik ini pertama kali diisolasi dari *Streptomyces lincolnensis* dalam sampel tanah.¹² Lincosamide merupakan kelas antibiotik yang relatif kecil dengan struktur kimia yang terdiri dari asam amino dan gula. Anggota kelompok antibiotik yang terbentuk secara alami dari lincosamide adalah lincomycin dan celesticetin. Banyak semisintetik turunan lincomycin telah disintesis. Dari jenis tersebut, hanya clindamycin yang efektif. Lincosamide diproduksi oleh beberapa spesies *Streptomyces* terutama *S. lincolnensis*, *S. roseolusand*, *S. Caelestetis*, dan *Micromonospora halophytica*. Secara luas lincosamide aktif melawan bakteri anaerob.¹²

Potensi antibiotik golongan aminoglikosida terhadap aktivitas DNase tampaknya bervariasi. Clindamycin, suatu turunan lincomycin yang dihasilkan oleh *Streptomyces lincolnensis*, menunjukkan aktivitas terhadap bakteri, terutama bakteri Gram positif dan protozoa. Antibiotika ini bersifat bakteristatik, menghambat sintesis protein pada bakteri yang sensitif, dan umumnya pada konsentrasi yang lebih tinggi bisa bersifat bakterisida. Clindamycin lebih efektif daripada lincomycin dalam pengobatan infeksi bakteri, khususnya yang disebabkan oleh spesies anaerob. Selain itu, clindamycin efektif menghambat aktivitas DNase pada lesi tikus dengan *necrotizing fasciitis* pada dosis tinggi yaitu 100 µg/tikus dua kali sehari secara intraperitoneal, meskipun tidak jelas perannya dalam menghambat degradasi DNA^{15,16,12}

Preservasi DNA manusia asal saliva dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik golongan aminoglikosida dan turunan lincomycin. Streptomycin dan clindamycin, selain dapat menghambat aktivitas DNase, juga mudah didapatkan dengan harga yang murah. Penilaian atas keberhasilan preservasi DNA manusia asal saliva bersandar pada penghambatan aktivitas DNase dan dapat dinilai secara kualitas dan kuantitas. Penelitian ini bertujuan

untuk menilai pengaruh streptomycin dan clindamycin terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva.

1.2 RUMUSAN MASALAH

Permasalahan penelitian ini adalah apakah streptomycin dan clindamycin berpengaruh terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva.

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh streptomycin dan clindamycin terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA manusia asal saliva.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Menentukan dosis streptomycin dan clindamycin yang efektif untuk menghambat aktivitas DNase I pada DNA genom manusia asal saliva.
2. Menentukan efek perlindungan streptomycin dan clindamycin terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva, melalui amplifikasi gen *human NOTCH2*.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

Sebagai bahan rujukan untuk peneliti-peneliti selanjutnya dan institusi dapat mengembangkan hasil penelitian ini pada tingkat yang lebih tinggi dengan meneliti pengaruh pemberian jenis antibiotik dan bahan lainnya terhadap penghambatan aktivitas DNase pada kualitas DNA manusia asal saliva.

1.5 HIPOTESIS

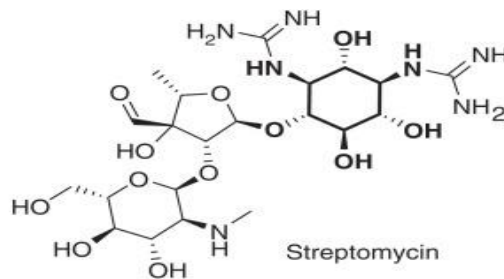
Streptomycin dan clindamycin mampu menghambat aktivitas DNase I dan mempreservasi DNA genom manusia asal saliva.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

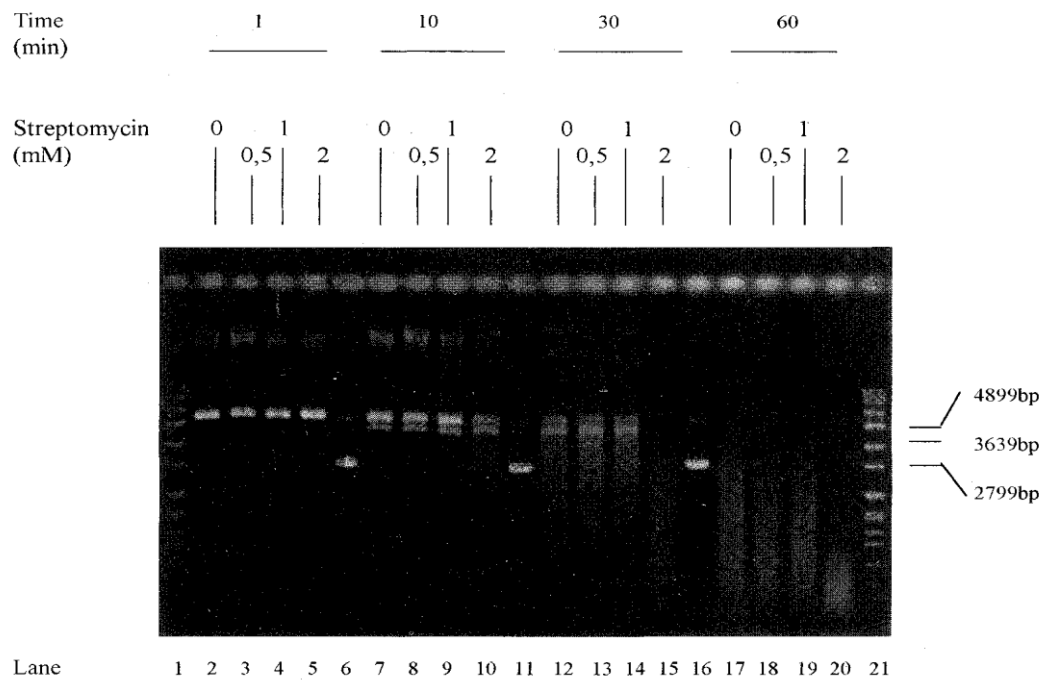
2.1 STREPTOMYCIN

Streptomycin (Gambar 2.1) diekstraksi dari bakteri *Streptomyces griseus* dan menjadi antibiotik golongan aminoglikosida yang pertama kali ditemukan.¹⁷ Seperti jenis aminoglikosida yang lain, streptomycin bersifat bakterisidal dan memberikan efek pada sintesis protein/peptida ribosom. s dengan sisi 16S RNA yang terletak pada komponen 30S, streptomycin menghambat dan menghentikan sintesis protein dengan membentuk ikatan peptida. Streptomycin efektif pada bakteri gram negatif aerob.¹⁸ Streptomycin memberikan efek pada sintesis protein (Gambar 2.1).¹⁹



Gambar 2.1 Struktur streptomycin

Sumber: ¹⁵



Gambar 2.2. Streptomycin-DNAse I protection assay

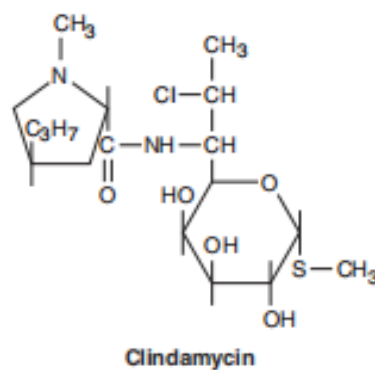
Tidak ada perlindungan degradasi DNA yang terdeteksi (jalur 14, 15, 19, 20). Konsentrasi streptomycin yang tinggi tampaknya mempercepat degradasi DNA (jalur 15, 20). Konsentrasi streptomycin adalah: 0 mM (jalur 2, 7, 12, 17), 0.5 mM (jalur 3, 8, 13, 18,), 1 mM (jalur 4, 9, 14, 19) dan 2 mM (jalur 5, 10, 15, 20). Masa inkubasi: 1 menit (jalur 2-5); 10 menit (jalur 7-10); 30 menit (jalur 12-15); 60 menit (jalur: 17 dan 20). Penanda berat molekul DNA: jalur 1,21. DNA plasmid EGF, tidak diberikan perlakuan: jalur 6, 11, dan 16.¹⁹

Sumber:¹⁹

2.2 CLINDAMYCIN

Clindamycin adalah suatu turunan lincomycin tersubstitusi chlorin, suatu antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces lincolnensis*. Clindamycin, menghambat sintesis protein dengan mengganggu pembentukan kompleks inisiasi dan reaksi-reaksi translokasi aminoasil. Clindamycin lebih efektif dari lincomycin khususnya yang disebabkan oleh bakteri anaerob. Streptokokus, stafilokokus, dan pneumokokus dihambat oleh clindamycin pada dosis 0,5-5 mcg/mL. Enterokokus

dan organisme aerob gram negatif biasanya resisten terhadap clindamycin. Resistensi terhadap clindamycin, yang umumnya menghasilkan resistensi silang terhadap makrolid, disebabkan oleh (1) mutasi tempat pengikatan ribosom, (2) modifikasi reseptor oleh metilasi yang diekspresikan secara konstitutif, dan inaktivasi clindamycin oleh enzim. Spesies-spesies aerob gram negatif secara intrinsik menjadi resisten terhadap clindamycin karena rendahnya permeabilitas membran luar mereka.¹⁷



Gambar 2.3 struktur clindamycin

Sumber: ¹⁷

Dalam sampel jaringan manusia, aktivitas DNase benar-benar hilang setelah dua hari pengobatan tambahan dengan clindamycin, meskipun konsentrasi bakteri yang tinggi tetap ada. Pengobatan dengan clindamycin mengurangi aktivitas DNase ekstraseluler *in vivo*, sedangkan konsentrasi clindamycin subinhibitor menginduksi ekspresi dan aktivitas DNase.¹⁵

2.3 DEOXYRIBONUCLEASE

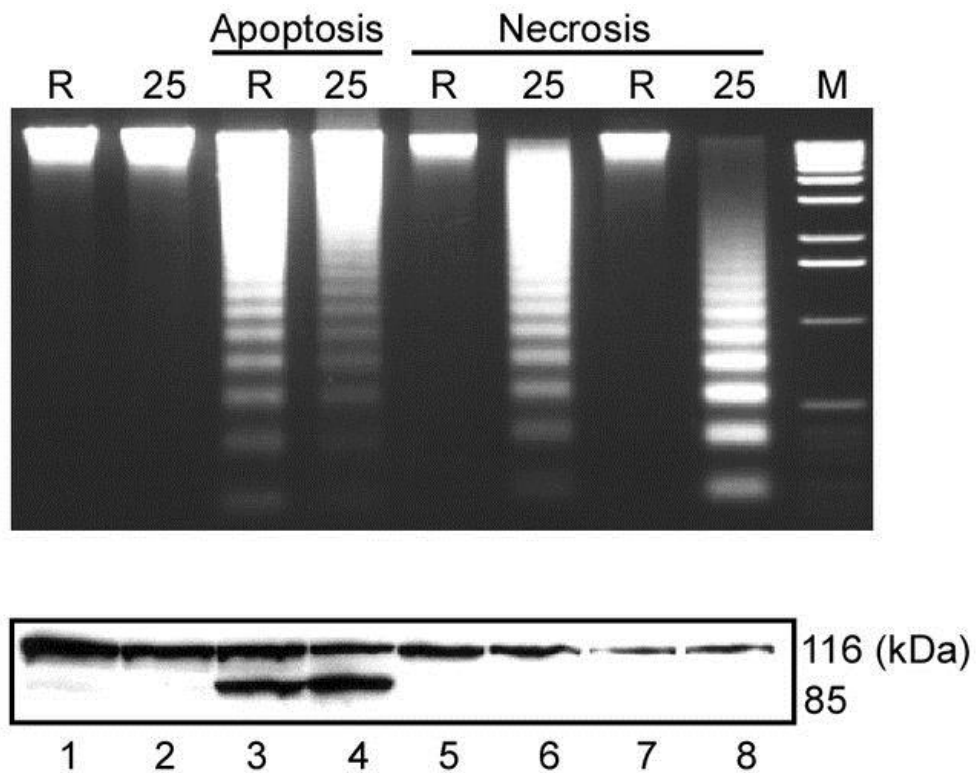
Deoxyribonuclease (DNase) merupakan enzim yang mampu menghidrolisis ikatan fosfodiester molekul DNA. Berdasarkan sifat biokimia dan biologinya DNase dibagi menjadi dua keluarga DNase I dan DNase II. Kemampuan untuk menghidrolisis DNA adalah umum untuk keduanya. DNase dikodekan oleh beberapa gen dan diekpresikan dalam banyak jaringan. Beberapa DNase disekresikan oleh sel ke ekstraseluler, sehingga DNase dapat mencerna DNA intraseluler dan ekstraseluler.²⁰

Beberapa nuklease dapat menguraikan DNA. Golongan ini termasuk enzim-enzim yang mampu memecahkan ikatan fosfodister internal untuk menghasilkan terminal 3'-hidroksil dan 5'-fosforil atau terminal 5'-hidroksil dan 3'fosfiril. Enzim-enzim ini disebut endonuklease. Terdapat golongan endonuklease yang mampu mengenali sekuens spesifik dalam DNA; sebagian besar enzim ini adalah endonuklease restriksi yang menjadi perangkat penting dalam genetika molekuler dan ilmu kedokteran.⁹ Dua jenis utama DNase adalah Dnase I dan DNase II, kedua endonuklease ini masing-masing menghasilkan 3'- oligonukleotida dan 5'oligonukleotida. DNase berperan penting dalam patogenesis berbagai penyakit dan apoptosis.^{10,20}

DNase I diekpresikan oleh sel eksokrin di saluran pencernaan, pada manusia dikodekan oleh DNASE1 yang terletak pada kromosom 16 p13.3. Gen ini panjangnya 3,2 kb dan terdiri dari sembilan akson dan delapan intron. DNase ini pada manusia mengandung empat DNase yang berbeda. DNase I, DNase X, DNase Ψ , dan DNAS1L2. DNase I, DNase X, DNase Ψ adalah endonuklease netral yang menunjukkan aktivitas maksimumnya masing-masing pada pH netral (6.8-7.2), sedangkan DNAS1L2 merupakan endonuklease yang bersifat asam yang menunjukkan aktivitas maksimumnya pada asam pH (5.6). Berdasarkan struktur kimianya, semua DNase I adalah glikoprotein. Berdasarkan distribusi jaringan terdapat tiga jenis DNase I yang berbeda pada mamalia. Jenis pertama terdapat pada manusia dan babi dengan aktivitas tertinggi terdapat pada pankreas; lebih sensitif pada pH rendah dan disebut tipe pankreas. Jenis kedua terdapat pada tikus, dengan aktivitas tertinggi terdapat pada kelenjar parotid dan disebut tipe parotid.

Jenis ketiga terdapat pada sapi dan kelinci dengan aktivitas tertinggi terdapat pada kelenjer parotid dan pankreas (disebut tipe campuran). Selain itu DNase I juga terdapat pada ginjal, hati, lambung, usus kecil, usus besar limpa, jantung, tetapi aktivitas pada jaringan sedang atau lebih rendah.¹⁰ Mekanisme enzim DNase I dalam memotong untaian tunggal dan untaian ganda membutuhkan ion logam divalen dalam menghidrolisis DNA untuk menghasilkan 3'-hidroksil dan produk 5'-fosforilasi.^{11,20}

DNase II family mengandung DNase yang sangat homolog dengan distribusi di berbagai jaringan, berlokalisasi di lisosom, dan fungsi optimalnya pada pH asam tanpa adanya kation divalen. DNase II sering disebut sebagai DNase asam karena memiliki pH optimum (pH 4,8-5,2). Peningkatan pH lingkungan merupakan kemampuan DNase II untuk membelah DNA lebih dari 100 kali. DNase ini berperan penting dalam mediasi penghancuran DNA sebagai mekanisme utama untuk perkembangan dan homeostasis.¹⁰ Enzim DNase II berperan dalam menghidrolisis DNA pada pH rendah untuk menghasilkan 3'-fosforilasi dan 5'-hidroksil produk. DNase II tidak memerlukan ion logam divalen untuk katalisis. Meskipun enzim DNase II didistribusikan secara luas dalam jaringan mamalia, tetapi lebih sering ditemukan dalam lisosom dan fagolisosom.¹¹ Keluarga DNase II mencakup dua enzim dalam hal keturunan: DNase II α dan DNase II β .²⁰



Gambar 2.4 Perbandingan langsung DNase c-dependence dari fragmentasi DNA pada apoptosis dan nekrosis.

Sel Ramos (R) dan cRamos25 (25, satu transforman yang mengekspresikan human DNase γ secara berlebihan) sel diinduksi untuk apoptosis dengan staurosporine (jalur 3 dan 4) atau nekrosis dengan beku-cair (jalur 5 dan 6) atau saponin (jalur 7 dan 8). Fragmentasi DNA dianalisis dengan elektroforesis gel agarose (panel atas). Pembelahan PARP (dari 116 kDa menjadi 85 kDa) dianalisis dengan *Western blot* (panel bawah). DNA (panel atas) dan protein kontrol (panel bawah) dari sel yang tidak diberikan perlakuan berada pada jalur 1 dan 2. M = penanda tangga DNA 1 kb.

Sumber:²¹

2.3.1 Inhibitor DNase

Inhibitor DNase adalah senyawa yang dapat mengontrol atau memodifikasi aktivitas DNA. Fragmentasi DNA nukleosomal adalah karakteristik utama dari apoptosis yang melibatkan tiga endonuklease utama yaitu *caspase-activated DNase* (CAD), endonuklease G, dan DNase γ .¹⁰ Beberapa inhibitor DNase telah diisolasi dari berbagai sumber alami, seperti manusia, hewan (sapi, kelinci, tikus), tanaman (*Nicotiana tabacum*), dan beberapa *Streptomyces* dan species adenovirus, *Micromonospora echinospora* dan *Escherichia coli*, sementara yang lain dapat diperoleh dari sintesis kimia.

Terdapat beberapa jenis inhibitor DNase diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Natural DNase inhibitors

- a. *Natural DNase inhibitors* telah diisolasi dari berbagai sumber: manusia (somatostatin, kolesterol sulfat bersamaan dengan asam empedu, inhibitor dalam eosinofil, dan protein dari sel KB, hewan (aktin, anti sera anti-DNase, protein dari limfa, dan timus), mikroorganisme: antibiotik yang diisolasi dari bakteri genus *streptomyces* (actinomycin D, nogalamycin, daunomycin, neomycin B dan paromomycin), dan metabolit dari *Micromonospora echinospora*, protein dari sel *Nicotina tabacum*.
- b. *Natural DNase II inhibitors*: suatu protein yang ditemukan pada jaringan hewan dan beberapa senyawa nukleotida dan metabolit mikroorganisme.
- c. *Natural DFF40/CAD inhibitors*: Beberapa senyawa yang terbentuk secara alami seperti DFF45/ICAD, DFF35/ICADS, kompleks Akt/Ebp1, kompleks Akt/Ebp1 dan pigmen alami curcumin, mampu menghambat DFF40/CAD dan dengan demikian mencegah fragmentasi DNA selama apoptosis.
- d. *Natural DNase inhibitors* lainnya: Berbagai senyawa dari mikroorganisme menunjukkan efek penghambatan terhadap *DNases* dan beberapa vitamin juga dapat menghambat aktivitas DNase.

2. Synthetic DNase inhibitors

- a. *Synthetic DNase I inhibitors*: Beberapa turunan asam 2-nitro-5-thiobenzoic, hydroxybiphenyls, nitrogen mustard, ditemukan bertindak sebagai inhibitor DNase I.
- b. *Synthetic DNase γ inhibitors*: Berbagai turunan triazine menunjukkan efek menghambat terhadap DNase γ .
- c. *Synthetic DNase II inhibitors*: Beberapa polielektrolit anionik (PES, HEMA dan etilen maleat anhidrida) dalam jumlah 10 mg mampu sepenuhnya menghambat aktivitas DNase II pada nilai optimalnya (pH 5.0).
- d. *Synthetic DFF40/CAD inhibitors*: Aktivitas CAD dapat dipengaruhi oleh sodium nitroprusside (SNP) dan peroxy nitrite.

3. Inorganic DNase inhibitors

Inorganic DNase inhibitors: Bersumber dari ion emas Au (III) menunjukkan efek penghambatan terhadap aktivitas DNase I pada pH netral. Aktivitas DNase I dihambat oleh 10 ekuivalen Au III dan diikuti oleh perubahan konformasi molekul enzim.¹⁰

2.4 EKSTRAKSI DNA

Ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses pemisahan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. DNA dapat diekstraksi dari berbagai organisme sebagai sumber DNA, yang dimulai dari kelompok sel eukariot, seperti: manusia, hewan dan tumbuhan, juga sampai ke sel prokariot seperti bakteri, dan juga virus. Pada manusia dan hewan terdapat dua bentuk DNA yaitu DNA kromosom yang berlokasi di nukleus dan DNA mitokondria yang berlokasi di mitokondria, sedangkan pada tanaman terdapat bentuk tambahan DNA lainnya yaitu DNA kloroplas yang terdapat di organel kloroplas. Pada bakteri terdapat dua bentuk DNA yaitu DNA kromosom dan DNA plasmid.²²

Ekstraksi DNA merupakan tahapan pekerjaan awal yang harus dilakukan dalam berbagai pemeriksaan/analisis DNA. Keberhasilan proses ekstraksi DNA seringkali sangat menentukan hasil pekerjaan selanjutnya.

DNA hasil ekstraksi harus terbebas dari berbagai kontaminan seperti protein, lipid, dan RNA yang dapat mengganggu berlangsungnya proses PCR untuk DNA. Oleh karena itu, metode ekstraksi DNA yang tepat sangat diperlukan untuk mendapatkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik.²³

Pada dasarnya, ekstraksi DNA pada organisme eukariot dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel, penghilangan protein dan RNA, pengendapan DNA, dan pemanenan. Ekstraksi DNA menjadi lebih mudah dengan teknik ekstraksi dalam bentuk kit. Berbagai teknik ekstraksi DNA telah dikembangkan dari prinsip dasar sehingga saat ini muncul berbagai teknik ekstraksi dan purifikasi DNA dalam bentuk kit yang prosesnya akan lebih mudah, cepat, dan sederhana.²³

Penentuan kuantitas dan kualitas DNA hasil ekstraksi dilakukan untuk melihat konsentrasi dan kemurnian menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis gel. Pengukuran kuantitas DNA dilakukan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kemurnian DNA ditentukan dengan menghitung rasio absorbansi pada A260 dengan A280 (Rasio A260:280). Molekul DNA dikatakan murni jika rasio absorbansinya berkisaran antara 1,8-2,0. Uji kualitas DNA dilakukan dengan horizontal elektroforesis, pengecekan hasil isolasi DNA pada gel agarose.²⁴ Informasi mengenai konsentrasi dan kemurnian DNA sangat diperlukan untuk mengetahui derajat kontaminasi suatu sampel sebagai satu pertimbangan-untuk digunakan pada tahap selanjutnya.²⁴

2.5 POLYMERASE CHAIN REACTION

Masalah utama dalam analisis gen adalah sulitnya mendapatkan molekul DNA spesifik yang menjadi target, terutama dari mamalia, dalam jumlah yang memadai untuk dideteksi/dikuantisasi. Sebelum ditemukannya teknologi *polymerase chain reaction* (PCR), untuk memperbanyak (menyalin) molekul DNA, para peneliti harus menunggu hasil kloning selama berhari-hari. Dengan menggunakan teknik PCR, proses fotokopi DNA hanya memerlukan waktu beberapa jam.²⁵ PCR digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi, oleh berbagai mikroorganisme (virus, bakteri, jamur/fungi, parasit), *genetic profiling in*

forensic, legal and bio-diversity applications, biologi evaluasi, *Site-directed mutagenesis of genes* dan *mRNA quantitation* pada sel ataupun jaringan.²⁵

Reaksi polimerase berantai merupakan suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Teknik replikasi DNA menggunakan PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA menjadi ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 . Kali. Setiap urutan basa nukleotida yang amplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target.²⁵

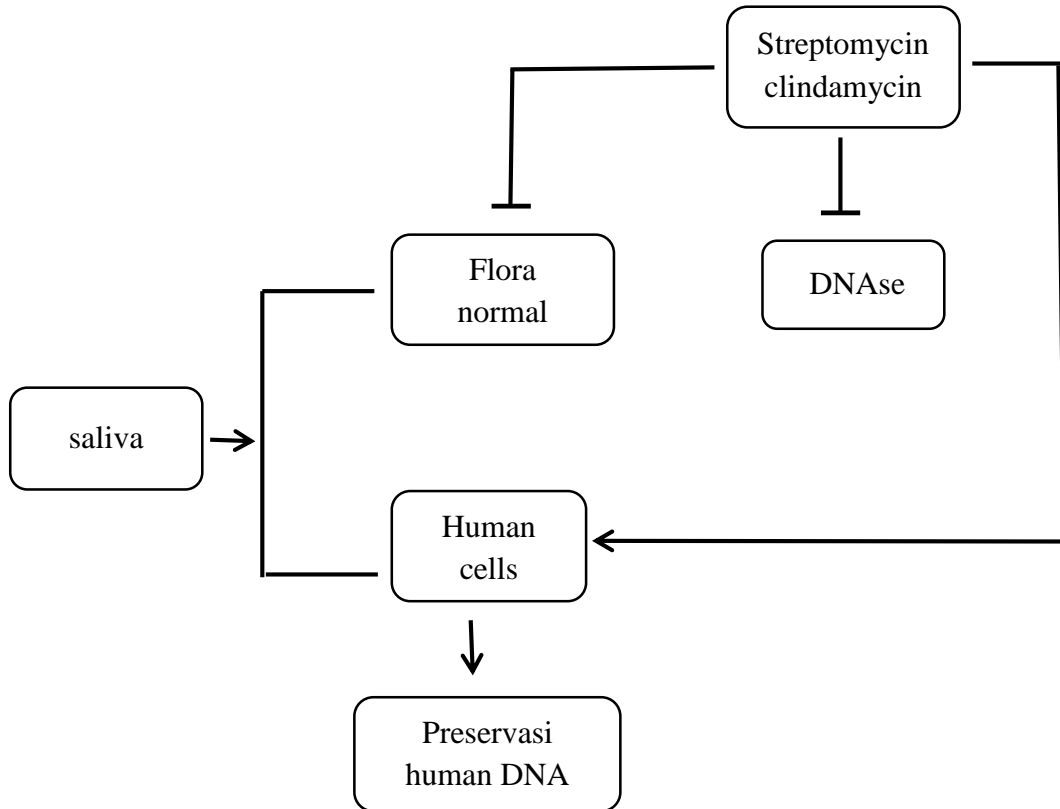
Dalam proses PCR, untai DNA hasil isolasi suatu organisme, direaksikan dengan komponen-komponen PCR yang terdiri dari enzim DNA *polymerase*, *deoxynucleoside triphosphate* (dNTPs), $MgCl_2$, dan primer (potongan pendek DNA untai tunggal) yang mengawali sintesis DNA.²⁵

2.6 GEN HUMAN NOTCH2

Gen *human NOTCH2* (reseptor NOTCH) merupakan gen pengkode protein pada manusia dan berperan banyak selama proses perkembangan dan homeostasis jaringan dewasa. Gen ini terletak pada kromosom 1.²⁶

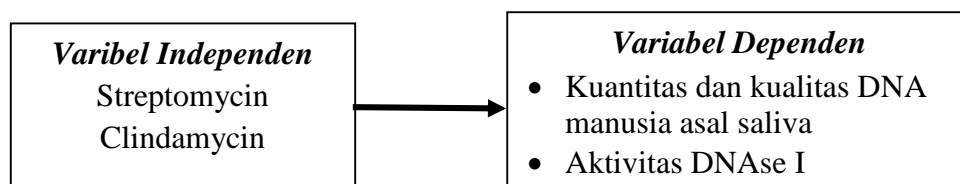
Gen ini menyandi protein transmembran tipe 1 dengan jumlah akson 34. Gen ini diekspresikan secara luas dalam jaringan manusia yang sedang berkembang dan normal.²⁶ Protein ini berfungsi sebagai reseptor untuk ligan terikat membran, dan juga berperan dalam perkembangan vaskular, ginjal, dan hati.²⁶

2.6 KERANGKA TEORI



Gambar 2.5 Kerangka Teori

2.7 KERANGKA KONSEP



Gambar 2.5 Kerangka Konsep

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 DEFINISI OPERASIONAL

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Hasil ukur	Skala Ukur
Kuantitas DNA manusia asal saliva	Konsentrasi dsDNA pada A260 nm	Spektrofotometer	µg/mL	Rasio
Kualitas DNA manusia asal saliva	Penentuan kualitas DNA pada gen <i>human NOTCH2</i>	PCR dan elektroforesis gel agarose 1%	Band 704 bp	Nominal
Aktivitas DNase	Aktivitas enzim yang mencerna DNA menjadi oligonukleotida	Elektroforesis gel agarose 1%	Fragmentasi DNA atau <i>smear</i> DNA	Nominal
Streptomycin	Antibiotik yang dihasilkan oleh <i>Streptomyces</i>	Timbangan dan <i>Volumetric flask</i>	mM	Rasio
Clindamycin	Antibiotik golongan lincomycin	Timbangan dan <i>Volumetric flask</i>	mM	Rasio

DNA= deoxyribonucleic acid; mM = millimolar; PCR = polymerase chain reaction.

3.2 RANCANGAN PENELITIAN

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental murni dengan desain *pretest posttest*.

3.3 TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara. Penelitian berlangsung pada Desember 2021-Januari 2022.

3.4 SAMPEL PENELITIAN

Sampel penelitian yang digunakan adalah saliva dan DNA asal saliva.

3.5 BESAR SAMPEL

Sampel saliva dikoleksi dari subjek penelitian yang ditetapkan jumlahnya sebanyak 9 orang.

3.6 VARIABEL PENELITIAN

Variabel dependen: Kuantitas DNA manusia asal saliva, kualitas DNA manusia asal saliva, dan Aktivitas DNase I.

Variabel independen: Streptomycin, Clindamycin

3.7 PENGUMPULAN SAMPEL PENELITIAN

Saliva dikumpulkan dari masing-masing subjek. Sebelum pengumpulan saliva, subjek diminta untuk berkumur-kumur dengan larutan *chlorhexidine gargle* (Listerin™) selama 30 detik dan aquades steril. Kriteria inklusi dan eksklusi tidak diperlukan. Sebanyak 15 mL saliva bersih dikumpulkan dari setiap subjek dengan setiap subjek mengalirkan ke pot saliva bersih.

Sampel saliva dari masing-masing subjek segera dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (K1), kontrol positif (K2), Streptomycin (K3), dan Clindamycin (K4).

3.8 EKSTRAKSI DNA ASAL SALIVA

Sebanyak 10 mL saliva dari masing-masing kelompok disentrifugasi dengan 1300 g selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan larutan resuspensi. DNA diekstraksi menggunakan kit

ekstraksi DNA (GIN170, Sigma) dengan modifikasi dari petunjuk *manufacturer*. Kuantitas DNA hasil ekstraksi ditentukan dengan spektrofotometri menggunakan NanoDrop ND-1000 (Implen).

3.9 ASAI PERLINDUNGAN TERHADAP DNase I

Buffer uji standar mengandung 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10mM CaCl₂, dan MgCl₂. Kelompok K1 dibuat dengan 1 µg saliva DNA ditambahkan ke microtube namun tidak memberikan 2,5 mg/mL DNase I (DN25, Sigma) sedangkan K2 dibuat dengan memberikan 2,5 mg/mL DNase I (Tabel 3.1). Sebanyak 1 µg saliva DNA ditambahkan ke *microtube* dan dipreinkubasi dengan berbagai konsentrasi (masing-masing tabung berisi 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM, 1,6 mM, 2,0 mM, 3,2 mM) dari masing-masing antibiotik (K3, K4) selama 30 menit di atas es (Tabel 3.2). Tabung dipindahkan ke suhu ruang dan 2,5 µg/mL DNase I ditambahkan ke semua sampel secara bersamaan. Volume reaksi adalah total 100 µL. Larutan stok aminoglikosida (250 mM dan 12,5 mM) disiapkan dalam H₂O dan disimpan pada suhu -20°C¹⁹.

Tabel 3.1 Perlakuan sampel saliva

	Kelompok	
	K1	K2
DNA saliva	+	+
DNase I	-	+

Tabel 3.2 Perlakuan sampel saliva

	Kelompok													
	K3 (Streptomycin (mM))							K4 (Clindamycin (mM))						
	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	2,0	3,2	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	2,0	3,2
DNA saliva	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNase I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.10 PENENTUAN KUANTITAS DNA

Untuk menentukan kuantitas DNA dan perkembangan degradasi, 10 μ L aliquot diambil dari masing-masing sampel setelah 30 dan 60 menit inkubasi. Reaksi dihentikan dengan 5 μ l 0,5 M EDTA di atas es. Aliquot dianalisis pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1X) yang diwarnai dengan etidium bromida setelah gel dijalankan¹⁹. Selain itu, konsentrasi DNA pasca uji ini ditentukan menggunakan 0,5 μ L aliquot yang diperiksa dengan kaidah spektrofotometri (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific USA).

3.11 PENENTUAN KUALITAS DNA

3.11.1 Primer

Penentuan kualitas DNA menggunakan primer dan PCR. Primer yang digunakan adalah primer gen *human NOTCH2* (*Gene Bank Accession Number* NG_008163.1) dengan *forward primer* CCCATTTGGGCTGGAGGAAT dan *reverse primer* GCCTGTAAACGAGGGTGACA. Panjang amplicon diperkirakan 704 bp.

3.11.2 PCR dan VISUALISASI BAND

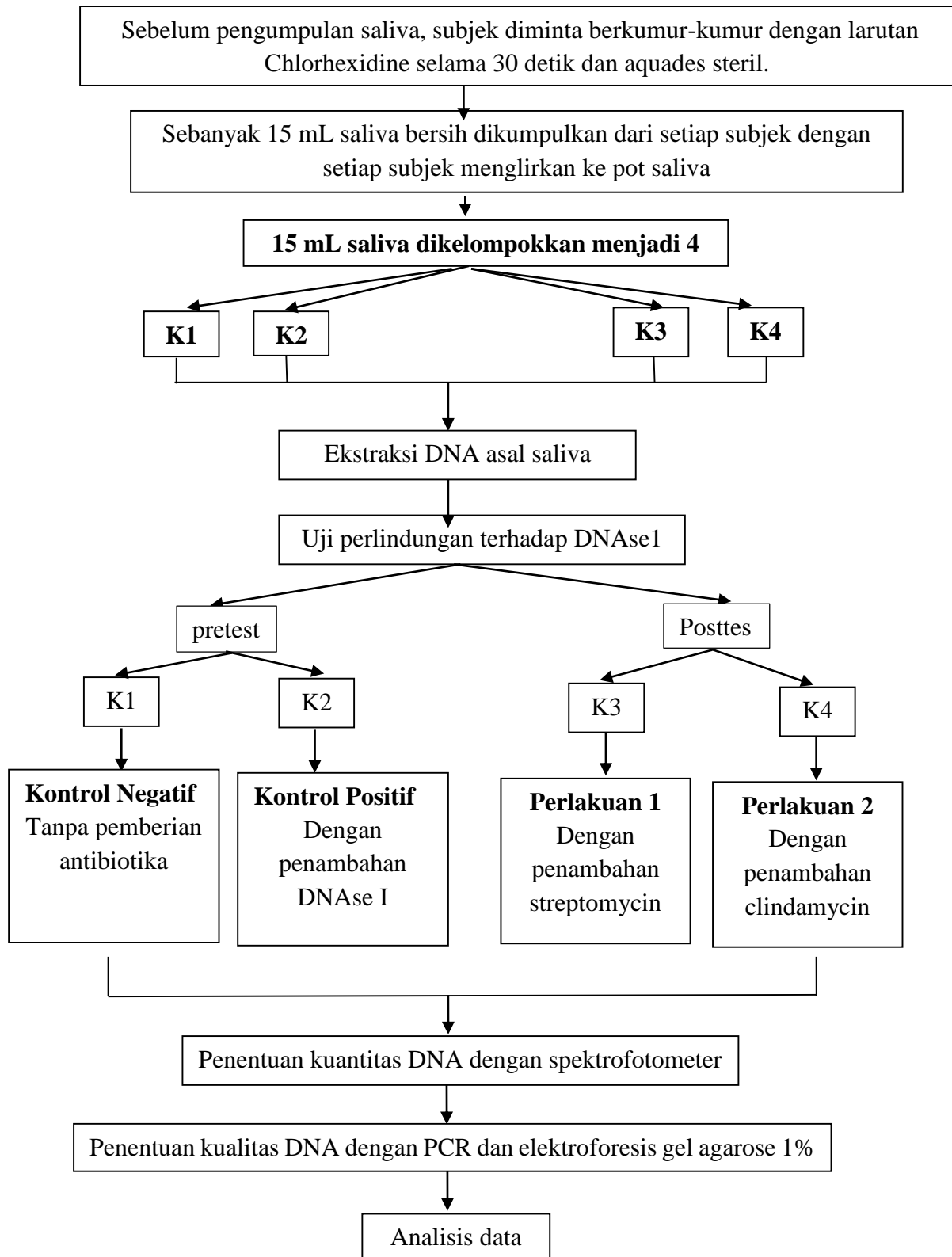
PCR dijalankan menggunakan 25 μ L campuran reaksi PCR yang mengandung 5 μ L *DNA template*, 1 μ M untuk setiap primer, 200 μ M untuk setiap dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 5 μ L 5X dapat penyangga PCR dan juga 5 U/ μ L Taq polimerase DNA dalam *PCR mastermix* Kapa2G Fast ReadyMix (2GFRMKB, Merck). Untuk mengetahui kualitas DNA setelah asai perlindungan terhadap DNase I, metode PCR dijalankan dengan menggunakan primer yang sudah didesain (3.11.1).

Kualitas DNA manusia asal saliva seterusnya dinilai melalui elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) dan divisualisasi di bawah cahaya UV dalam *chamber gel documentation system* (Uvitec, France) setelah pewarnaan etidium bromida (EtBr).

3.12 ANALISIS DATA

Analisis data dilakukan dengan univariat berupa rerata dan standar deviasi untuk konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi. Aktivitas DNase I terhadap ekstraksi DNA dari saliva dinilai secara kualitatif melalui pengamatan pada hasil elektroforesis gel agarose 1%. Penilaian hasil PCR untuk gen *human NOTCH2* dari hasil asai inhibisi DNase I oleh antibiotika, dilakukan menggunakan pendekatan deskriptif dengan pengamatan pada hasil elektroforesis gel agarose 1%. Hasil pada elektroforesis gel agarose 1% yang diharapkan adalah keberadaan *expected amplicon length* (~704 bp).

3.13 KERANGKA KERJA



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 HASIL PENELITIAN

4.1.1 Hasil Ekstraksi DNA Asal Saliva

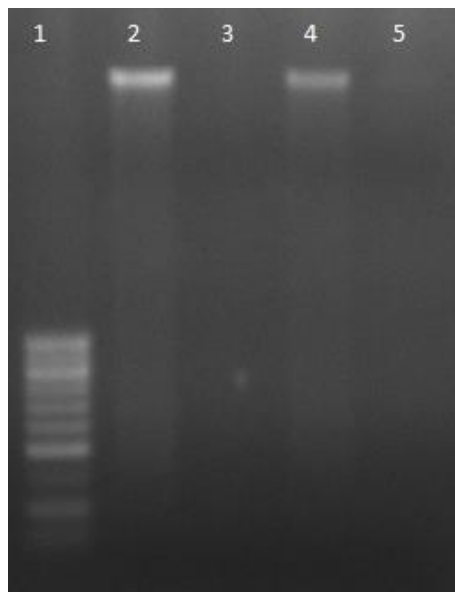
Sembilan sampel DNA yang diperoleh telah berhasil diekstraksi dengan metode spin column. Konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh, bervariasi pada setiap sampel (Tabel 4.1). Rata-rata konsentrasi DNA adalah 32,91 µg/mL dalam rentang 7,10-99,45 µg/mL. Rata-rata kemurnian hasil ekstraksi adalah 1,813 µg/mL dalam rentang 1,639-2,043 µg/mL.

Tabel 4.1 Kemurnian dan Konsentrasi DNA Asal Saliva

Sampel	Konsentrasi (ng/uL)	Kemurnian
1	13,25	1,791
2	7,10	2,043
3	20,05	1,759
4	20,10	1,803
5	7,95	1,639
6	10,60	1,927
7	33,45	1,848
8	99,45	1,742
9	84,25	1,761
Rata-rata	32,91	1,813
Rentang (Minimum-Maximum)	7,10-99,45	1,639-2,043

4.1.2 DNA Degradation Assay

Pengujian degradasi DNA dilakukan untuk menentukan aktivitas DNase I terhadap ekstrak DNA asal saliva dan divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarose 1%. DNase I mendegradasi sampel DNA asal saliva (Gambar 4.1).



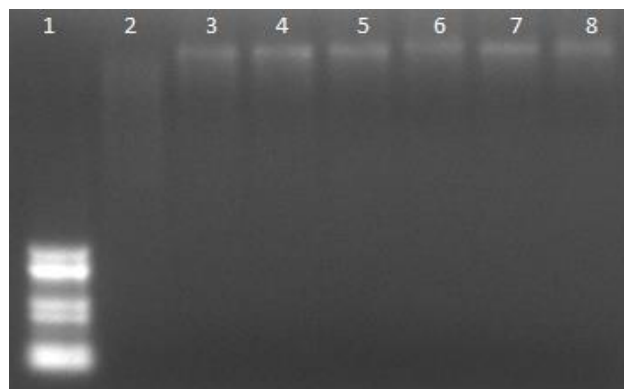
Gambar 4.1 *DNA degradation assay*

Lane 2 dan *lane 4* (10 μ L dan 5 μ L ekstrak DNA saliva) sebagai kontrol positif uji degradasi DNA, menunjukkan DNA asal saliva yang utuh. Penambahan DNase I terhadap sampel DNA asal saliva (*lane 3* dan *5* (10 μ L dan 5 μ L ekstrak DNA saliva) menunjukkan *lane 3* dan *5* kosong dan tidak menunjukkan keberadaan DNA. Tidak ada *smear DNA* atau fragmentasi DNA di *lane 3* dan *5*.

4.1.3 Pengaruh Streptomycin Terhadap Kualitas DNA Asal Saliva

Elektroforesis gel agarose 1% dilakukan untuk visualisasi DNA setelah penambahan berbagai konsentrasi streptomycin sebagai inhibitor DNase I. Meskipun pada konsentrasi 0,1 M streptomycin tidak mampu menghambat, aktivitas DNase I tampak terhambat dengan penambahan konsentrasi streptomycin (Gambar 4.2). Konsentrasi streptomycin sebesar 0,2 mM dapat mempertahankan keutuhan 1 μ g DNA dari aktivitas 2,5 mg/mL DNase I (Gambar 4.2).

Pendekatan PCR tidak dapat menunjukkan *amplicon length* gen *NOTCH2* seperti yang diharapkan (~704 bp). Sebagai gantinya, *amplicon length* yang terbentuk berukuran sekitar 100 bp (Gambar 4.3).



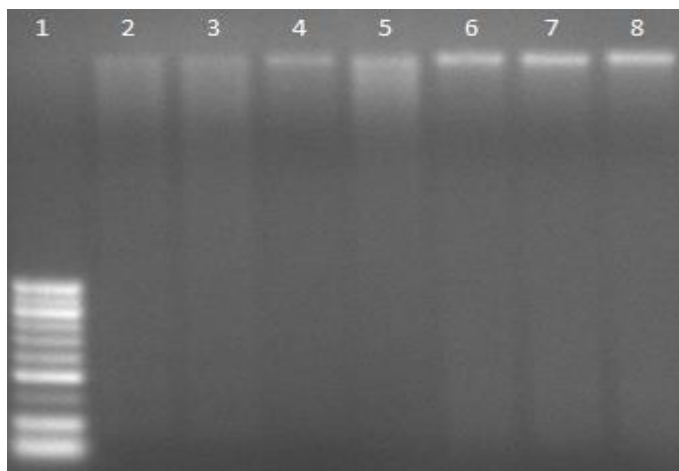
Gambar 4.2 Hasil elektroforesis *Streptomycin-DNase I protection assay*. Terdapat perlindungan dari degradasi DNA oleh DNase I pada *lane* 3, 4, 5, 6, 7, dan 8. Pada konsentrasi streptomycin 0,1 mM (*lane* 2), terdapat *smear DNA*. Peningkatan konsentrasi streptomycin menjadi 0,2 mM (*lane* 3), 0,4 mM (*lane* 4), 0,8 mM (*lane* 5), 1,6 mM (*lane* 6), 2,0 mM (*lane* 7), 3,2 mM (*lane* 8) menunjukkan streptomycin dapat mempertahankan band *whole DNA* dari aktivitas DNase I.



Gambar 4.3 Hasil elektroforesis dari PCR *gen human NOTCH2*. Hasil PCR *gen human NOTCH2* dari sampel DNA saliva pada gel agarose 1% setelah pemberian streptomycin, 2,5 mg/mL DNase I ditambahkan kepada DNA saliva menunjukkan keberadaan band-band berukuran 100 bp pada seluruh *lane* dengan konsentrasi streptomycin 0,1-3,2 mM.

4.1.4 Pengaruh Clindamycin Terhadap Kualitas DNA Asal Saliva

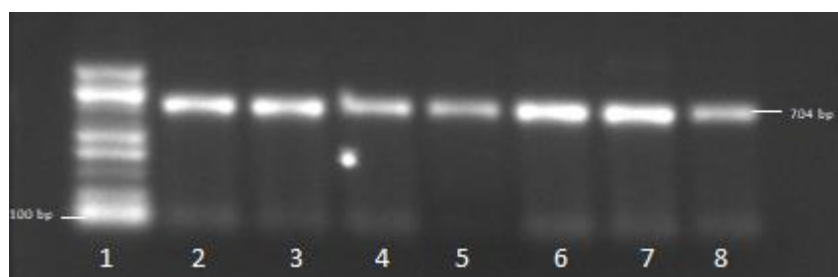
Clindamycin dengan konsentrasi yang berbeda, berpengaruh terhadap presevasi DNA asal saliva (Gambar 4.4). Semakin tinggi konsentrasi clindamycin maka semakin tinggi pula kemampuan preservasinya terhadap DNA asal saliva yang menjalani *DNA degradation assay*. Band DNA tampak lebih jelas pada konsentrasi 3.2 mM (Gambar 4.4). *Smear DNA* masih tampak pada kondisi clindamycin 0,8 mM, menunjukkan kemampuan parsial dari clindamycin dalam mencegah degradasi DNA saliva oleh 2,5 mg/mL DNase I.



Gambar 4.4 Pengaruh clindamycin terhadap aktivitas DNase I

Clindamycin menghambat aktivitas DNase I pada konsentrasi yang berbeda dengan pengaruh yang semakin menguat dengan peningkatan konsentrasi. Konsentrasi clindamycin adalah 0.1 mM (*lane 2*), 0.2 mM (*lane 3*), 0.4 mM (*lane 4*), 0.8 mM (*lane 5*), 1.6 mM (*lane 6*), 2.0 mM (*lane 7*), 3.2 mM (*lane 8*). DNA smear (*lane 2, 3, 4, 5*) menjadi DNA tampak utuh pada (*lane 6, 7, 8*). *Lane 8* menunjukkan DNA utuh dengan sangat jelas dan tebal dengan konsentrasi clindamycin tertinggi (3.2 mM).

Elektroforesis hasil PCR dari gen *human NOTCH2* yang telah diberi beragam konsentrasi clindamycin (0,1-3,8 mM) dan 2,5 mg/dL menunjukkan *single band* pada ~704 bp. *Expected bands* (~704 bp) dari gen *human NOTCH2* tampak pada seluruh konsentrasi clindamycin (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Hasil Elektroforesis PCR gen *Human NOTCH2*

Expected band dari gen *human NOTCH2* (~704 bp) berada pada *lane (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)*. PCR dapat mengamplifikasi gen *human NOTCH2* dari DNA yang diberi clindamycin dalam konsentrasi 0,1-3,2 mM dan 2,5 mg/dL DNase I. Konsentrasi clindamycin adalah 0.1 mM (*lane 2*), 0.2 mM (*lane 3*), 0.4 mM (*lane 4*), 0.8 mM (*lane 5*), 1.6 mM (*lane 6*), 2.0 mM (*lane 7*), 3.2 mM (*lane 8*).

4.2 PEMBAHASAN

4.2.1 Kemurnian DNA Hasil Ekstraksi Metode Spin-column

DNA saliva yang didapatkan dari ekstraksi perlu diamati dalam hal kuantitas dan kualitas. Analisis kuantitas DNA dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA. Kemurnian DNA dapat ditentukan melalui kaidah spektrofotometri dengan rasio A260 nm dan A280 nm. Hasil ekstraksi DNA pada penelitian ini menunjukkan kemurnian yang relatif murni karena rasio A260 nm dan A280 nm berada pada 1.639-2.043 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.1). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, dimana hasil ekstraksi DNA dikatakan murni apabila rasio A260 nm dan A280 nm mencapai 1,8-2,0²⁷ atau hasil ekstraksi juga dianggap murni jika rasio absorbansi antara 1,6 dan 2,0.⁵ Kisaran nilai tersebut menunjukkan bahwa jumlah DNA dalam sampel lebih banyak dari pada protein. Apabila rasio A260/A280 berada $< 1,8$ atau $> 2,0$ maka diindikasikan DNA masih terkontaminasi RNA dan protein.²⁷ Pada penelitian lain rata-rata kemurnian DNA saliva berkisar sekitar 1,8-2,0.³ Jika sampel yang mempunyai hasil rasio sekitar 1,8 atau mendekati 1,8 maka sampel DNA dapat dikatakan relatif murni.⁵

Konsentrasi DNA pada penelitian ini memiliki rentang 7,10–99,45 $\mu\text{g/mL}$ dengan volume saliva 2 mL dan metode *spin column*. Penelitian lain dengan volume 1 mL menggunakan kit Oragene™ menunjukkan konsentrasi DNA lebih rendah yaitu 10 ng/ μL .⁵ Hal ini dapat terjadi karena faktor yang mempengaruhi konsentrasi DNA. Faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi DNA seperti, faktor suhu inkubasi, jenis bahan kimia, dan faktor teknis selama pengerjaan ekstraksi DNA.²⁸

4.2.2 Efek Aminoglikosida dalam Menghambat Aktivitas DNase I

Hasil penelitian ini, pemberian streptomycin memang menunjukkan kemampuan streptomycin dalam mempertahankan DNA berukuran > 1000 bp (Gambar 4.2.). Namun ini tidak menjamin bahwa DNA yang ada berada dalam kondisi utuh. PCR pada NOTCH2 menunjukkan band ~ 100 bp tidak sesuai yang diharapkan ~ 704 bp. Kemungkinan gen NOTCH2 telah turut terdegradasi karena streptomycin tidak mampu menghambat aktivitas DNase.¹⁹ Memang, forward dan reverse primer bekerja dalam reaksi PCR untuk memperbanyak sisa (potongan) gen

NOTCH2 sembari menghasilkan sekuense complementer dari arah reverse dan forward primer.

Sedangkan clindamycin sebagai inhibitor DNase, mampu mempreservasi DNA utuh (*whole DNA*) (Gambar 4.4). Hasil penelitian ini kadar 3,2 mM efektif menghambat aktivitas DNase I pada DNA genom manusia asal saliva dan mampu mempertahankan gen dengan amplifikasi gen *human NOTCH2* seperti perkiraan panjang amplicon (~704 bp) (Gambar 4.5), sementara streptomycin tidak mampu melakukan hal yang sama (Gambar 4.3). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa clindamycin dapat menghambat aktivitas DNase *in vivo* 100 µg/mL.¹⁵ Dalam jaringan manusia, aktivitas DNase benar-benar hilang setelah dua hari pengobatan tambahan dengan clindamycin meskipun konsentrasi bakteri yang tinggi tetap ada.¹⁵

Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Liu Yawen dan kawan-kawan mengenai *DNA preservation* bahwa DNA saliva dapat mengalami kerusakan karena aktivitas DNase dalam saliva sehingga menyebabkan penurunan kualitas dan kuantitas DNA.^{5,29} Oleh karena itu preservasi atau proteksi DNA diperlukan untuk mempertahankan kualitas dan integritas DNA.²⁹ Sebagai satu jenis enzim, aktivitas DNase dapat dipengaruhi bahkan dihilangkan dengan mengatur pH³⁰, cofactor^{30a}, dan suhu³⁰. Dalam studi lain dikatakan bahwa aktivitas DNase menurun secara drastis ketika berada pada suhu di atas atau di bawah suhu optimum kisaran (20-70 °C).²⁰

Salah satu strategi preservasi DNA dari saliva adalah dengan melindungi DNA dari aktivitas DNase dengan memberikan inhibitor DNase. Antibiotik golongan aminoglikosida seperti clindamycin, gentamycin, neomycin dapat bekerja menghambat aktivitas DNase.^{10,15,31} Jenis inhibitor DNase lainnya tersedia sebagai bahan sintetik dan alami.¹⁰

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Clindamycin dapat menghambat aktivitas DNase I sehingga dapat mempertahankan kualitas DNA genom manusia asal saliva.
2. Streptomycin tidak dapat menghambat aktivitas DNase I sehingga tidak dapat mempertahankan kualitas DNA genom manusia asal saliva.
3. Clindamycin 3,2 mM efektif menghambat aktivitas DNase I pada DNA genom manusia asal saliva sementara streptomycin tidak menghambat
4. Kualitas gen manusia asal saliva dapat terlindungi dengan clindamycin 0,1 mM dengan PCR dapat mengamplifikasikan gen *human NOTCH2* sementara streptomycin tidak dapat melindungi.

5.2 SARAN

1. Golongan aminoglikosida lainnya perlu dikaji dalam efek penghambatan aktivitas DNase.

DAFTAR PUSTAKA

1. Syaifiatul H. DNA Sebagai Bukti Untuk Memecahkan Tindakan Kriminal. *Semin Nas Humanira Apl Teknologi Inf.* 2017;2017(Sehati):231.
2. Putri NPPE, Yudianto A. Pengaruh Tanah dan Air Laut Terhadap Kualitas DNA dari Otot PSOAS Jenazah Melalui Metode STR. *J Biosains Pascasarj Vol 18.* 2016;18(3):205.
3. Wahab RMA, Nasri FAM, Abidin IZZ. Kesan Penyimpanan Sampel Air Liur Terhadap Kualiti DNA Genom. *Sains Malaysiana.* 2017;46(6):909-910.
4. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: The Hisayama Study. *Sci Rep.* 2016;6:1.
5. Garbieri TF, Brozoki DT, Dionisio, Thiago Jose, Santos CF, Neves LT das. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3,6 or 12 month using five different protocols. 2017;25(2):147-148.
6. Tiwari M. Science behind human saliva. *J Nat Sci Biol Med.* Published online 2011:1-3.
7. Bibi T, Khurshid Z, Rehman A, Imran E, Srivastava KC, Shrivastava D. Gingival crevicular fluid (GCF): A diagnostic tool for the detection of periodontal health and diseases. *Molecules.* 2021;26(5):1-16.
8. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-5732.
9. Weil AP. *Illustrated Biochemistry Thirtieth Edition.* 30th ed. (Rodwe VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA, eds.). McGraw-Hill; 2015.
10. Kolarevic A, Yancheva D, Kocic G, Smelcerovic A. Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2014;88:1-8.
11. Varela-Ramirez A, Abendroth J, Mejia AA, et al. Structure of acid deoxyribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(10):6217-6222.
12. Spížek J, Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem Pharmacol.* 2017;133:1-2.
13. Yati IH, Vincent H.S. Gan. Aminoglikosida. In: Gunawan SG, Setiabudy R,

- Nafrialdi, eds. *Farmakologi Dan Terapi*. 5th ed. FK UI; 2012:705-717.
14. Fransiska F. Ototoksisitas Aminoglikosida. *KELUWIH J Kesehatan dan Kedokt*. 2019;1(1):37.
 15. Andreoni F, Zörcher C, Tarnutzer A, et al. Clindamycin affects group a streptococcus virulence factors and improves clinical outcome. *J Infect Dis*. 2017;215(2):269-275.
 16. Betram KG. Basic and Clinical Pharmacology. In: 14th ed. McGraw-Hill.
 17. Betram KG. *Basic & Clinical Pharmacology*. 14th ed. McGraw-Hill; 2018.
 18. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(6):1-4.
 19. Woegerbauer M, Burgmann H, Davies J, Graninger W. DNase I induced DNA degradation is inhibited by neomycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 2000;53(3):276-280.
 20. Lauková L, Konečná B, Janovičová L, Vlková B, Celec P. Deoxyribonucleases and their applications in biomedicine. *Biomolecules*. 2020;10(7):1-20.
 21. Mizuta R, Araki S, Furukawa M, et al. DNase γ is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One*. 2013;8(12):2.
 22. Maksum I, Padjadjaran U, Sriwidodo S, Padjadjaran U. *Buku Teknik Biologi Molekular*. 1st ed. Universitas Padjadjaran; 2019.
 23. Betty N, Sri D. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. *Biol dan Mol*. Published online 2017:142-143.
 24. Mustafa H, Rachmawati I, Udin Y. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk Anopheles barbiostris. *J Vektor Penyakit*. 2017;10(1):7-10.
 25. Betty, Nurhayati, Sri D. Biologi Sel Dan Molekuler. *Kementrian Kesehatan Republik Indones*. Published online 2017:142-123.
 26. Jon C. Aster, MD P. NOTCH SIGNALING IN CONTEXT: BASIC AND TRANSLATIONAL IMPLICATIONS. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2020;131:1-2.

27. Murtiyaningsih H. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerabatan Genetik Nanas Menggunakan RAPD. *J Agritop*. 2017;15(1):88-89.
28. Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci*. 2014;6(2):81.
29. Liu Y, Zheng Z, Gong H, et al. DNA preservation in silk. *Biomater Sci*. Published online 2017:1.
30. Mahmudul Huque AKM, So WM, You MK, Shin JS. Phylogenetic analysis and in vitro bifunctional nuclease assay of arabidopsis BBD1 and BBD2. *Molecules*. 2020;25(9):8-9.
31. McGuire AL, Bennett SC, Lansley SM, et al. Preclinical assessment of adjunctive tPA and DNase for peritoneal dialysis associated peritonitis. *PLoS One*. 2015;10(3):9.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Lembar Penjelasan Kepada Subjek Penelitian

Lembar Penjelasan Kepada Subjek Penelitian

Assalamu'alaikum wr.wb

Perkenalkan nama saya Hamimatur Rohmah, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Saya bermaksud melakukan penelitian berjudul **“Pengaruh Streptomycin Dan Clindamycin Terhadap Aktivitas DNase 1 Dan Kualitas DNA Asal Saliva”**. Penelitian ini dilakukan sebagai salah satu kegiatan dalam menyelesaikan studi di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh Streptomycin dan Clindamycin terhadap aktivitas DNase I dan kualitas DNA manusia asal saliva yang dilakukan dengan menggunakan sampel berupa saliva.

Partisipasi dari teman-teman bersifat suka rela tanpa ada paksaan. Untuk penelitian ini tidak dikenakan biaya apapun. Bila teman-teman membutuhkan penjelasan maka dapat hubungi saya :

Nama : Hamimatur Rohmah
Alamat : Jl. Pimpong No. 22
No HP : 082334839376

Terima kasih saya ucapkan kepada teman-teman yang telah bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini. Keikutsertaan dalam penelitian ini akan menyumbangkan sesuatu yang berguna bagi ilmu pengetahuan.

Setelah memahami berbagai hal yang menyangkut penelitian ini diharapkan teman-teman bersedia mengisi lembar persetujuan yang telah kami siapkan.

Wassalamu'alaikum wr.wb

Peneliti

(Hamimaturr Rohmah

Lampiran 2 *Informed Consent*

(LEMBAR PERSETUJUAN RESPONDEN)

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :

Umur :

Alamat:

No. HP:

Menyatakan bersedia menjadi responden kepada :

Nama : Hamimatur Rohmah

NPM : 1808260144


Instansi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

Untuk melakukan penelitian dengan judul “Pengaruh Streptomycin Dan Clindamycin Terhadap Aktivitas DNase 1 Dan Kualitas DNA Asal Saliva”. Dan setelah mengetahui dan menyadari sepenuhnya risiko yang mungkin terjadi, dengan ini saya menyatakan bersedia dengan sukarela menjadi subjek penelitian tersebut. Jika sewaktu-waktu ingin berhenti, saya berhak untuk tidak melanjutkan keikutsertaan saya terhadap penelitian ini tanpa ada saksi apapun.

Medan, 2021

Responden penelitian

Lampiran 3 Ethical Clearance


UMSU
Unggul | Cerdas | Terpercaya

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL
"ETHICAL APPROVAL"
No : 669KEPK/FKUMSU/2021

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :
The Research protocol proposed by

Peneliti Utama : Hamimatur Rohmah
Principal In Investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
Name of the Institution Faculty of Medicine University of Muhammadiyah Sumatera Utara


Dengan Judul
Title

"PENGARUH STREPTOMYCIN DAN CLINDAMYCIN TERHADAP AKTIVITAS DNASE 1 DAN KUALITAS DNA ASAL SALIVA"
"EFFECT OF STREPTOMYCIN AND CLINDAMYCIN ON ACTIVITY DNASE I AND QUALITY DNA OF SALIVA"

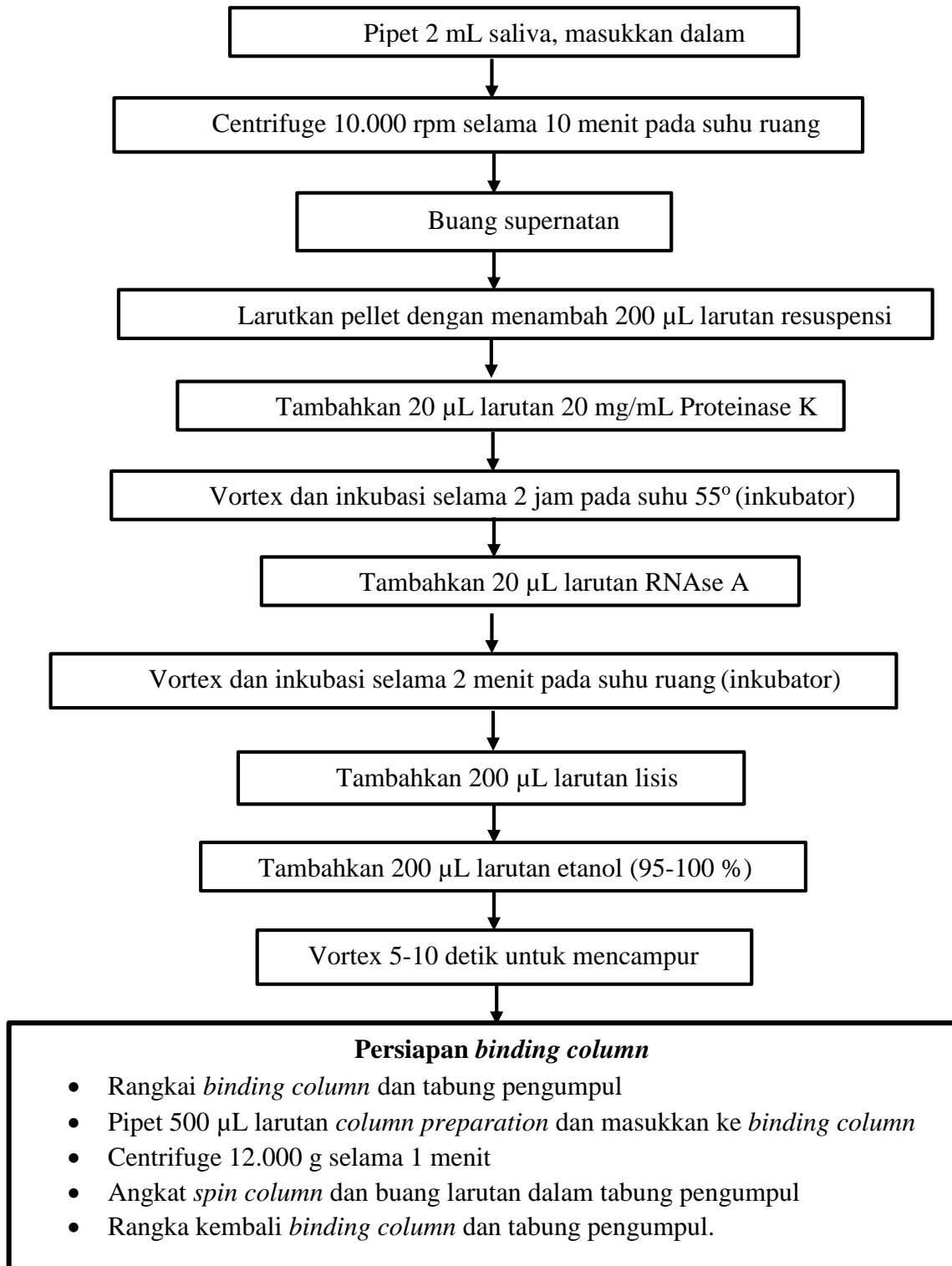
Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Resiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan
7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

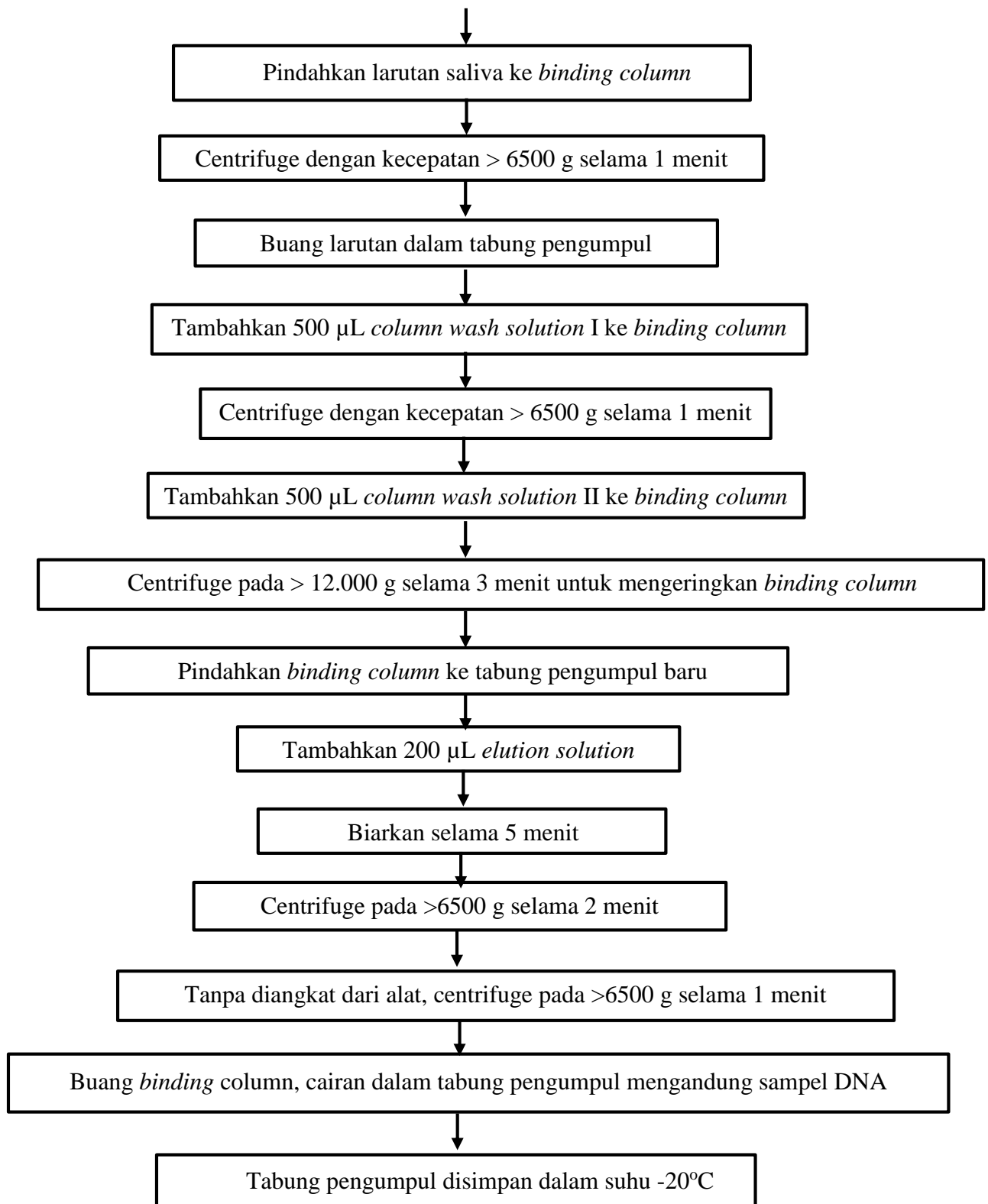
Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assesment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion / Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 30 Oktober 2021 sampai dengan tanggal 30 Oktober 2022
The declaration of ethics applies during the periode October 30 ,2021 until October 30, 2022


Medan, 30 Oktober 2021
Ketua
[Signature]
Dr.dr.Nurfady,MKT

Lampiran 4 Protokol Ekstraksi DNA Spin-Column





Lampiran 5 Stoikiometri

Streptomycin molecular weight: 581.57

1. Buat larutan stock (20 mM) streptomycin
 - a. Timbang 0.0233 g streptomycin
 - b. Larutkan dengan 2 mL aquadest
 - c. *Vortex to homogenize the solution*

2. Buat larutan 10 mM streptomycin
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 5 μL larutan stock (20 mM) streptomycin, taruh dalam PCR tube/di atas parafilm
 - b. Hisap dengan mikropipet sejumlah 5 μL aquadest
 - c. Homogenkan dengan *pipetting*. Sekarang kita memiliki 10 μL larutan 10 mM streptomycin.

3. DNA protection assay (0.1 mM streptomycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.1 μL larutan 10 mM streptomycin.
 - c. Tambahi 0.41 μL larutan DNA 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
4. DNA protection assay (0.2 mM streptomycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.1 μL larutan 20 mM streptomycin.
 - c. Tambahi 0.41 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
5. DNA protection assay (0.4 mM streptomycin)

- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.2 μL larutan 20 mM streptomycin.
 - c. Tambahi 0.41 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
6. DNA protection assay (0.8 mM streptomycin)
- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.41 μL larutan 20 mM streptomycin.
 - c. Tambahi 0.42 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
7. DNA protection assay (1.6 mM streptomycin)
- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.82 μL larutan 20 mM streptomycin.
 - c. Tambahi 0.44 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
8. DNA protection assay (2.0 mM streptomycin)
- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 1.12 μL larutan 20 mM streptomycin.
 - c. Tambahi 0.45 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
9. DNA protection assay (3.2 mM streptomycin)
- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 1.92 μL larutan 20 mM streptomycin.

- c. Tambahi 0.48 μ L larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
-

Stop the DNA protection assay dengan menambahkan 5 μ L 0.5 M EDTA di atas es kepada masing-masing tabung (point 3-9).

10. Buat elektroforesis gel agarose 1% dengan urutan lane (1) DNA ladder, lane (2) point 3, lane (3) point 4, lane (4) point 5, lane (5) point 6, lane (6) point 7, lane (7) point 8, lane (8) point 9. Tujuan kegiatan ini adalah menunjukkan bahwa *whole DNA* mengalami preservasi dengan penambahan streptomycin (kalau streptomycin bisa menghambat aktivitas DNase I). Kalau Streptomycin tidak dapat menghambat aktivitas DNase I maka kita akan menemui lane tanpa *whole DNA*.
11. Buat PCR dengan gen HBB untuk sampel-sampel dari point 3, point 4, point 5, point 6, point 7, point 8, point 9.
12. Buat elektroforesis hasil PCR gen HBB pada gel agarose 1% dengan urutan lane (1) DNA ladder, lane (2) point 3, lane (3) point 4, lane (4) point 5, lane (5) point 6, lane (6) point 7, lane (7) point 8, lane (8) point 9.

Clindamycin molecular weight: 461.44

1. Buat larutan stock (20 mM) Clindamycin
 - a. Timbang 0.0185 g
 - b. Larutkan dengan 2 mL aquadest
 - c. *Vortex to homogenize the solution*

2. Buat larutan 10 mM clindamycin
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 5 μL larutan stock (20 mM) clindamycin, taruh dalam PCR tube/di atas parafilm
 - b. Hisap dengan mikropipet sejumlah 5 μL aquadest
 - c. Homogenkan dengan *pipetting*. Sekarang kita memiliki 10 μL larutan 10 mM clindamycin.

3. DNA protection assay (0.1 mM clindamycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.1 μL larutan 10 mM clindamycin.
 - c. Tambahi 0.41 μL larutan DNA 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
4. DNA protection assay (0.2 mM clindamycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.1 μL larutan 20 mM clindamycin.
 - c. Tambahi 0.41 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
5. DNA protection assay (0.4 mM clindamycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.2 μL larutan 20 mM clindamycin.

- c. Tambahi 0.41 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
6. DNA protection assay (0.8 mM clindamycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.41 μL larutan 20 mM clindamycin.
 - c. Tambahi 0.42 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
7. DNA protection assay (1.6 mM clindamycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 0.82 μL larutan 20 mM clindamycin.
 - c. Tambahi 0.44 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
8. DNA protection assay (2.0 mM clindamycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 1.12 μL larutan 20 mM clindamycin.
 - c. Tambahi 0.45 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
9. DNA protection assay (3.2 mM clindamycin)
 - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1 μL (1 μg larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1 μL = 1 μg DNA)
 - b. Tambahi 1.92 μL larutan 20 mM clindamycin.
 - c. Tambahi 0.48 μL larutan DNase I 25 mg/dL
 - d. Homogenkan dengan pipet mikro
 - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit

Stop the DNA protection assay dengan menambahkan 5 μ L 0.5 M EDTA di atas es kepada masing-masing tabung (point 3-9).

13. Buat elektroforesis gel agarose 1% dengan urutan lane (1) DNA ladder, lane (2) point 3, lane (3) point 4, lane (4) point 5, lane (5) point 6, lane (6) point 7, lane (7) point 8, lane (8) point 9. Tujuan kegiatan ini adalah menunjukkan bahwa *whole DNA* mengalami preservasi dengan penambahan streptomycin (kalau clindamycin bisa menghambat aktivitas DNase I). Kalau clindamycin tidak dapat menghambat aktivitas DNase I maka kita akan menemui lane tanpa *whole DNA*.
14. Buat PCR dengan gen HBB untuk sampel-sampel dari point 3, point 4, point 5, point 6, point 7, point 8, point 9.
15. Buat elektroforesis hasil PCR gen HBB pada gel agarose 1% dengan urutan lane (1) DNA ladder, lane (2) point 3, lane (3) point 4, lane (4) point 5, lane (5) point 6, lane (6) point 7, lane (7) point 8, lane (8) point 9.

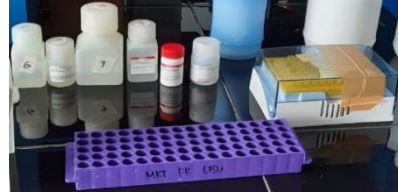
Lampiran 6 Surat izin penelitian

 <small>Empati Cerdas Terpercaya</small> <small>Bila menjawab surat ini agar disebutkan nomor dan tanggalnya</small>	MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA FAKULTAS KEDOKTERAN	
	<small>Jalan Gedung Arca No. 53 Medan, 20217 Telp. 061 - 7350163, 7333162, Fax. 061 - 7363488 Website : http://www.fk.umsu.ac.id E-mail : fk@umsu.ac.id</small>	
Nomor	: 1695/IL3-AU/UMSU-08/F/2021	Medan, 12 <u>Jumadil Awwal 1443 H</u>
Lamp.	: -	16 Desember 2021 M
Hal	: Mohon Izin Penelitian	
 Kepada : Yth. Kepala Laboratorium Terpadu USU Fakultas Kedokteran USU Medan		
 Assalamu'alaikum Wr. Wb. Dengan hormat, dalam rangka penyusunan Skripsi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara (FK UMSU) Medan, maka kami mohon bantuan Bapak/Ibu untuk memberikan informasi, data dan fasilitas seperlunya kepada mahasiswa kami yang akan mengadakan penelitian sebagai berikut :		
N a m a	: Hamimatur Rohmah	
NPM	: 1808260144	
Semester	: VII (Tujuh)	
Fakultas	: Kedokteran	
Jurusan	: Pendidikan Dokter	
Judul	: Pengaruh Streptomycin Dan Clindamycin Terhadap Aktivitas DNASE 1 Dan Kualitas DNA Asal Saliva	
 Demikianlah hal ini kami sampaikan, atas kerjasama yang baik kami ucapkan terima kasih. Semoga amal kebaikan kita diridhai oleh Allah SWT. Amin.		
Wassalamu'alaikum Wr. Wb		
		
 Hormat kami, Dekan,		
 Dr. Siti Mastiana Siregar, Sp.THT-KL(K) NIDN : 0106098201		
 Tembusan :		
1. Wakil Rektor I UMSU		
2. Ketua Skripsi FK UMSU		
3. Pertinggal		

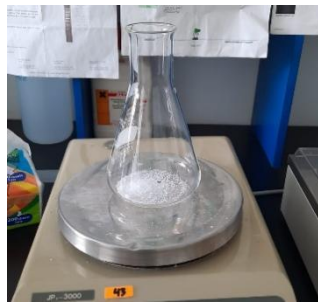
Lampiran 7 Dokumentasi



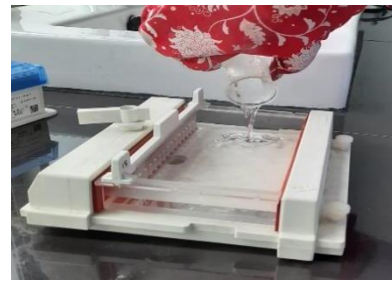
Sampel saliva



Ekstraksi DNA saliva



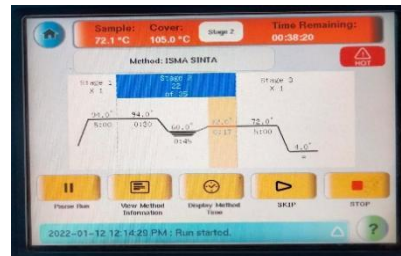
Penimbangan agarose 1%



Proses pengeringan gel agarose



Peletakan sampel dalam PCR



PCR *gen Human NOTCH2*

**PENGARUH STREPTOMYCIN DAN CLINDAMYCIN TERHADAP
AKTIVITAS DNASE I PADA
KUALITAS DNA ASAL SALIVA**

Hamimatur Rohmah¹, Zulham²

¹Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

²Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah
Sumatera Utara

Email: dr_zulham@yahoo.com

Abstract

Background: Deoxyribonucleic acid (DNA) contains genetic material that has all the information of an individual. Saliva has the potential to be a good source of human DNA. When compared to blood sampling, saliva is easier to collect and the collection process is non-invasive. However, human DNA collected from saliva has the potential to be degraded due to deoxyribonuclease (DNase) activity in saliva. DNase activity can be inhibited by antibiotics, such as aminoglycoside antibiotics and lincomycin derivatives. **Objective:** This study aimed to determine the effect of streptomycin and clindamycin on DNase I activity against the quality of human genomic DNA from saliva. **Methodology.** The sampling technique was that samples were collected from 9 subjects with each subject flowing into a saliva pot. Prior to saliva collection, subjects were asked to rinse their mouth with a solution of chlorhexidine gargle (Listerin™) for 30 seconds, then the samples were divided into four groups. **Results:** The average concentration of DNA extracted from the spin-column method was 32.91 g/mL (7.10-99.45 g/mL) while the average purity was 1.813 g/mL (1.639-2.043 g/mL). With clindamycin treatment, PCR was able to amplify the human NOTCH2 gene (~704 bp) while various concentrations of streptomycin produced multiple bands of ~100 bp. **Conclusion:** Concentration of 3.2 mM clindamycin effectively inhibit DNase I activity and can amplify the human NOTCH2 gene while streptomycin cannot protect.

Keywords: Clindamycin, DNase, salivary DNA, Streptomycin, Preservation

ABSTRAK

Pendahuluan: *Deoxyribonucleic acid* (DNA) mengandung materi genetik yang berisi segala informasi identitas suatu individu. Saliva berpotensi menjadi sumber DNA manusia yang baik. Jika dibandingkan dengan pengambilan sampel darah, saliva mudah dikumpulkan dan pengumpulannya tidak invasif. Namun, DNA manusia yang dikumpulkan dari saliva berpotensi mengalami kerusakan karena aktivitas *deoxyribonuclease* (DNase) dalam saliva. Aktivitas DNase dapat dihambat oleh antibiotik, seperti antibiotik golongan aminoglikosida dan turunan lincomycin. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan menilai pengaruh streptomycin dan clindamycin terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva. **Metodologi:** Teknik pengambilan sampel adalah sampel dikumpulkan dari 9 subjek dengan setiap subjek mengalirkan ke pot saliva. Sebelum pengumpulan saliva, subjek diminta untuk berkumur-kumur dengan larutan *chlorhexidine gargle* (Listerin™) selama 30 detik, kemudian sampel dibagi menjadi empat kelompok. **Hasil Penelitian:** Rata-rata konsentrasi DNA hasil ekstraksi metode *spin-column* adalah 32,91 µg/mL (7,10-99,45 µg/mL) sementara rata-rata kemurnian adalah 1,813 µg/mL (1,639-2,043 µg/mL). Dengan perlakuan clindamycin, PCR dapat mengamplifikasikan gen *human NOTCH2* (~704 bp) sementara streptomycin menghasilkan band ~100 bp. **Kesimpulan:** Kadar 3,2 mM clindamycin efektif menghambat aktivitas DNase I dan dapat mengamplifikasikan gen *human NOTCH2* sementara streptomycin tidak dapat melindungi.

Kata Kunci: Clindamycin, DNase, DNA saliva, Streptomycin, Preservasi

PENDAHULUAN

Deoxyribonucleic acid (DNA) mengandung materi genetik yang berisi segala informasi identitas suatu individu.¹ DNA berada di dalam nukleus sel eukaryota dan didapati hampir di seluruh sel individu. Bagian-bagian tubuh manusia seperti saliva, darah, sperma, sel kulit, rambut, urin, keringat, dan lain-lain dapat menjadi sumber DNA.²

Saliva berpotensi menjadi sumber DNA manusia yang baik. Jika dibandingkan dengan pengambilan sampel darah, saliva mudah dikumpulkan dan pengumpulannya tidak invasif.³ Saliva diproduksi dan disekresikan oleh kelenjar ludah sebagai suatu cairan yang kompleks dengan 99% saliva terdiri dari air, zat organik dan anorganik.³ Selain itu, saliva juga mengandung flora normal, enzim, sel, cairan elektrolit, mikroorganisme, sel-sel epitel, hormon, imonoglobulin dan lain sebagainya. Sel epitel di mukosa mulut yang dilepaskan bersamaan saliva berpotensi menjadi sumber DNA untuk kepentingan diagnostik. Akan tetapi, kontaminan dalam saliva dapat merusak DNA.³

DNA manusia yang dikumpulkan dari saliva berpotensi mengalami kerusakan karena aktivitas *deoxyribonuclease* (DNase) dalam saliva.³ DNase adalah enzim yang mampu mengurai asam nukleat.⁴ Termasuk ke dalam kelas enzim yang heterogen, DNase mengkatalisis hidrolisis DNA dan akhirnya mendegradasinya. Dua jenis utama DNase adalah DNase I dan DNase II.⁵ DNase II dikenal sebagai DNase asam karena aktivitas optimalnya berada pada lingkungan pH rendah dari lisosom.⁶

Aktivitas DNase dapat dihambat oleh antibiotik, seperti antibiotik golongan aminoglikosida dan turunan lincomycin (lincosamides).^{5,7} Aminoglikosida adalah antibakteria yang dihasilkan oleh *Streptomyces* atau fungi lainnya. Sejak tahun 1943, berbagai derivat aminoglikosida telah dikembangkan. Contoh obat golongan aminoglikosida adalah streptomycin, neomycin, kanamycin, gentamicin, amikacin, dan tobramycin.⁷ Aminoglikosida dengan akhiran "mycin" (streptomycin, neomycin, kanamycin, paromomycin dan tobramycin) berasal dari *Streptomyces*; aminoglikosida yang berakhiran "micin" (gentamicin, netilmicin, dan amikacin) berasal dari *Micromonospora*.⁷

Istilah lincomycin berasal dari Lincoln, Nebraska (Amerika Serikat), daerah dimana jenis antibiotik ini pertama kali diisolasi dari *Streptomyces lincolnensis* dalam sampel tanah. Lincosamide merupakan kelas antibiotik yang relatif kecil dengan struktur kimia yang terdiri dari asam amino dan gula. Anggota kelompok antibiotik yang terbentuk secara alami dari lincosamide adalah lincomycin dan celesticetin. Banyak semisintetik turunan lincomycin telah disintesis. Dari jenis tersebut, hanya clindamycin yang efektif. Lincosamide diproduksi oleh beberapa spesies *Streptomyces* terutama *S. lincolnensis*, *S. roseolusand*, *S. Caelestetis*, dan *Micromonospora halophytica*. Secara luas lincosamide aktif melawan bakteri anaerob.⁷

Potensi antibiotik golongan aminoglikosida terhadap aktivitas DNase tampaknya bervariasi. Clindamycin, suatu turunan lincomycin yang dihasilkan oleh *Streptomyces lincolnensis*, menunjukkan aktivitas terhadap bakteri, terutama bakteri Gram positif dan protozoa. Antibiotika ini bersifat bakterostatik, menghambat sintesis protein pada bakteri yang sensitif, dan umumnya pada konsentrasi yang lebih tinggi bisa bersifat bakterisida. Clindamycin lebih efektif daripada lincomycin dalam pengobatan infeksi bakteri, khususnya yang disebabkan oleh spesies anaerob. Selain itu, clindamycin efektif menghambat aktivitas DNase pada lesi tikus dengan necrotizing fasciitis pada dosis tinggi yaitu 100 µg/tikus dua kali sehari secara intraperitoneal, meskipun tidak jelas perannya dalam menghambat degradasi DNA.⁷

Preservasi DNA manusia asal saliva dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik golongan aminoglikosida dan turunan lincomycin. Streptomycin dan clindamycin, selain dapat menghambat aktivitas DNase, juga mudah didapatkan dengan harga yang murah. Penilaian atas keberhasilan preservasi DNA manusia asal saliva bersandar pada penghambatan aktivitas DNase dan dapat dinilai secara kualitas dan kuantitas. Penelitian ini bertujuan untuk menilai pengaruh streptomycin dan clindamycin terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah menggunakan penelitian eksperimental murni dengan desain pretest posttest. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara (USU). Penelitian ini berlangsung pada Desember 2021-Januari 2022. Pada penelitian ini saliva dikumpulkan dari masing-masing subjek. Sebelum pengumpulan saliva, subjek diminta untuk berkumur-kumur dengan larutan chlorhexidine gargle (Listerin™) selama 30 detik dan aquades steril. Kriteria inklusi dan eksklusi tidak diperlukan. Sebanyak 15 mL saliva bersih dikumpulkan dari setiap subjek dengan setiap subjek mengalirkan ke pot saliva bersih.

Sampel saliva dari masing-masing subjek segera dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (K1), kontrol positif (K2), Streptomycin (K3), dan Clindamycin (K4). Analisis data dilakukan dengan univariat berupa rerata dan standar deviasi untuk konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi. Aktivitas DNase I terhadap ekstraksi DNA dari saliva dinilai secara kualitatif melalui pengamatan pada hasil elektroforesis gel agarose 1%. Penilaian hasil PCR untuk gen human NOTCH2 dari hasil asai inhibisi DNase I oleh antibiotika, dilakukan menggunakan pendekatan deskriptif dengan pengamatan pada hasil elektroforesis gel agarose 1%. Hasil pada elektroforesis gel agarose 1% yang diharapkan adalah keberadaan expected amplicon length (~704 bp).

HASIL

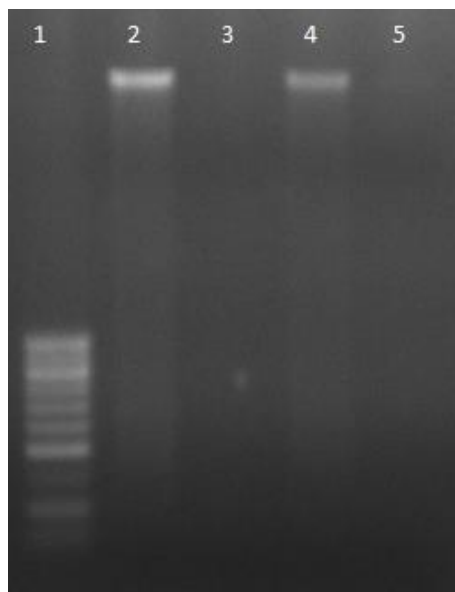
Setelah dilakukan penelitian, data yang telah terkumpulkan adalah

sembilan sampel DNA yang diperoleh telah berhasil diekstraksi dengan metode spin column. Konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh, bervariasi pada setiap sampel (Tabel 4.1). Rata-rata konsentrasi DNA adalah 32,91 µg/mL dalam rentang 7,10-99,45 µg/mL. Rata-rata kemurnian hasil ekstraksi adalah 1,813 µg/mL dalam rentang 1,639-2,043 µg/mL.

Tabel 4.1 Kemurnian dan Konsentrasi DNA Asal Saliva

Sampel	Konsentrasi (ng/uL)	Kemurnian
1	13,25	1,791
2	7,10	2,043
3	20,05	1,759
4	20,10	1,803
5	7,95	1,639
6	10,60	1,927
7	33,45	1,848
8	99,45	1,742
9	84,25	1,761
Rata-rata	32,91	1,813
Rentang (Minimum-Maximum)	7,10-99,45	1,639-2,043

Pengujian degradasi DNA dilakukan untuk menentukan aktivitas DNase I terhadap ekstrak DNA asal saliva dan divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarose 1%. DNase I mendegradasi sampel DNA asal saliva (Gambar 4.1).

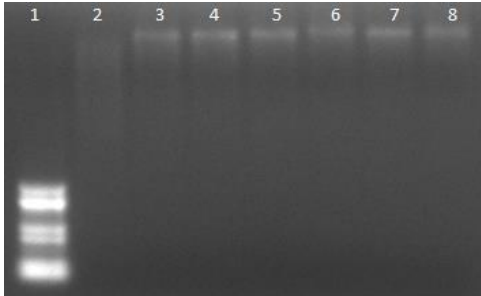


Gambar 4.1 DNA degradation assay Lane 2 dan lane 4 (10µL dan 5µL ekstrak DNA saliva) sebagai kontrol positif uji degradasi DNA, menunjukkan DNA asal saliva yang utuh. Penambahan DNase I terhadap sampel DNA asal saliva (lane 3 dan 5 (10µL dan 5µL ekstrak DNA saliva) menunjukkan lane 3 dan 5 kosong dan tidak menunjukkan keberadaan DNA. Tidak ada smear DNA atau fragmentasi DNA di lane 3 dan 5.

Elektroforesis gel agarose 1% dilakukan untuk visualisasi DNA setelah penambahan berbagai konsentrasi streptomycin sebagai inhibitor DNase I. Meskipun pada konsentrasi 0,1 M streptomycin tidak mampu menghambat, aktivitas DNase I tampak terhambat dengan penambahan konsentrasi streptomycin (Gambar 4.2). Konsentrasi streptomycin sebesar 0,2 mM dapat mempertahankan keutuhan 1 µg DNA dari aktivitas 2,5 mg/mL DNase I (Gambar 4.2).

Pendekatan PCR tidak dapat menunjukkan amplicon length gen NOTCH2 seperti yang diharapkan (~704 bp). Sebagai gantinya,

amplicon length yang terbentuk berukuran sekitar 100 bp (Gambar 4.3).



Gambar 4.2 Hasil elektroforesis Streptomycin-DNase I protection assay.

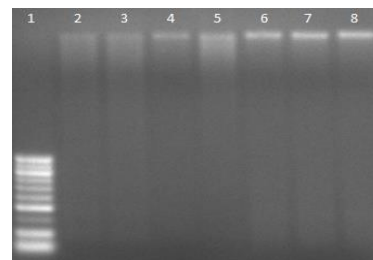
Terdapat perlindungan dari degradasi DNA oleh DNase I pada lane 3, 4, 5, 6, 7, dan 8. Pada konsentrasi streptomycin 0,1 mM (lane 2), terdapat smear DNA. Peningkatan konsentrasi streptomycin menjadi 0,2 mM (lane 3), 0,4 mM (lane 4), 0,8 mM (lane 5), 1,6 mM (lane 6), 2,0 mM (lane 7), 3,2 mM (lane 8) menunjukkan streptomycin dapat mempertahankan band whole DNA dari aktivitas DNase I.



Gambar 4.3 Hasil elektroforesis dari PCR gen human NOTCH2

Hasil PCR gen human NOTCH2 dari sampel DNA saliva pada gel agarose 1% setelah pemberian streptomycin, 2,5 mg/mL DNase I ditambahkan kepada DNA saliva menunjukkan keberadaan band-band berukuran 100 bp pada seluruh lane dengan konsentrasi streptomycin 0,1-3,2 mM.

Clindamycin dengan konsentrasi yang berbeda, berpengaruh terhadap presevasi DNA asal saliva (Gambar 4.4). Semakin tinggi konsentrasi clindamycin maka semakin tinggi pula kemampuan preservasinya terhadap DNA asal saliva yang menjalani DNA degradation assay. Band DNA tampak lebih jelas pada konsentrasi 3.2 mM (Gambar 4.4). Smear DNA masih tampak pada kondisi clindamycin 0,8 mM, menunjukkan kemampuan parsial dari clindamycin dalam mencegah degradasi DNA saliva oleh 2,5 mg/mL DNase I.

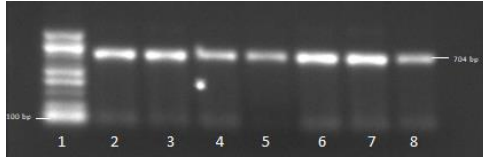


Gambar 4.4 Pengaruh clindamycin terhadap aktivitas DNase I.

Clindamycin menghambat aktivitas DNase I pada konsentrasi yang berbeda dengan pengaruh yang semakin menguat dengan peningkatan konsentrasi. Konsentrasi clindamycin adalah 0.1 mM (lane 2), 0.2 mM (lane 3), 0.4 mM (lane 4), 0.8 mM (lane 5), 1.6 mM (lane 6), 2.0 mM (lane 7), 3.2 mM (lane 8). DNA smear (lane 2, 3, 4, 5) menjadi DNA tanpa utuh pada (lane 6, 7, 8). Lane 8 menunjukkan DNA utuh dengan sangat jelas dan tebal dengan konsentrasi clindamycin tertinggi (3.2 mM).

Elektroforesis hasil PCR dari gen human NOTCH2 yang telah diberi beragam konsentrasi clindamycin (0,1-3,8 mM) dan 2,5 mg/dL menunjukkan single band pada ~704 bp. Expected bands (~704 bp) dari gen human NOTCH2 tampak

pada seluruh konsentrasi clindamycin (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Hasil Elektroforesis PCR gen *Human NOTCH2*

Expected band dari gen *human NOTCH2* (~704 bp) berada pada *lane* (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). PCR dapat mengamplifikasi gen *human NOTCH2* dari DNA yang diberi clindamycin dalam konsentrasi 0,1-3,2 mM dan 2,5 mg/dL DNase I. Konsentrasi clindamycin adalah 0.1 mM (*lane* 2), 0.2 mM (*lane* 3), 0.4 mM (*lane* 4), 0.8 mM (*lane* 5), 1.6 mM (*lane* 6), 2.0 mM (*lane* 7), 3.2 mM (*lane* 8).

PEMBAHASAN

DNA saliva yang didapatkan dari ekstraksi perlu diamati dalam hal kuantitas dan kualitas. Analisis kuantitas DNA dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA. Kemurnian DNA dapat ditentukan melalui kaidah spektrofotometri dengan rasio A260 nm dan A280 nm.

Hasil ekstraksi DNA pada penelitian ini menunjukkan kemurnian yang relatif murni karena rasio A260 nm dan A280 nm berada pada 1.639-2.043 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.1). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, dimana hasil ekstraksi DNA dikatakan murni apabila rasio A260 nm dan A280 nm mencapai 1,8-2,027 atau hasil ekstraksi juga dianggap murni jika rasio absorbansi antara 1,6 dan 2,0.5 Kisaran nilai tersebut menunjukkan bahwa jumlah DNA dalam sampel lebih banyak dari pada protein.

Apabila rasio A260/A280 berada < 1,8 atau > 2,0 maka diindikasikan DNA masih terkontaminasi RNA dan protein.²⁷ Pada penelitian lain rata-rata kemurnian DNA saliva berkisar sekitar 1,8-2,0.³ Jika sampel yang mempunyai hasil rasio sekitar 1,8 atau mendekati 1,8 maka sampel DNA dapat dikatakan relatif murni.⁵

Konsentrasi DNA pada penelitian ini memiliki rentang 7,10–99,45 $\mu\text{g/mL}$ dengan volume saliva 2 mL dan metode spin column. Penelitian lain dengan volume 1 mL menggunakan kit Oragene™ menunjukkan konsentrasi DNA lebih rendah yaitu 10 ng/ μL . Hal ini dapat terjadi karena faktor yang mempengaruhi konsentrasi DNA. Faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi DNA seperti, faktor suhu inkubasi, jenis bahan kimia, dan faktor teknis selama pengerjaan ekstraksi DNA.¹⁰

Hasil penelitian ini, pemberian streptomycin memang menunjukkan kemampuan streptomycin dalam mempertahankan DNA berukuran > 1000 bp (Gambar 4.2.). Namun ini tidak menjamin bahwa DNA yang ada berada dalam kondisi utuh. PCR pada NOTCH2 menunjukkan band ~100 bp tidak sesuai yang diharapkan ~704 bp. Kemungkinan gen NOTCH2 telah turut terdegradasi karena streptomycin tidak mampu menghambat aktivitas DNase. Memang, forward dan reverse primer bekerja dalam reaksi PCR untuk memperbanyak sisa (potongan) gen NOTCH2 sembari menghasilkan sekuense complementer dari arah reverse dan forward primer.

Sedangkan clindamycin sebagai inhibitor DNase, mampu

mempreservasi DNA utuh (whole DNA) (Gambar 4.4). Hasil penelitian ini kadar 3,2 mM efektif menghambat aktivitas DNase I pada DNA genom manusia asal saliva dan mampu mempertahankan gen dengan amplifikasi gen human NOTCH2 seperti perkiraan panjang amplicon (~704 bp) (Gambar 4.5), sementara streptomycin tidak mampu melakukan hal yang sama (Gambar 4.3). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa clindamycin dapat menghambat aktivitas DNase in vivo 100 µg/mL.¹⁰ Dalam jaringan manusia, aktivitas DNase benar-benar hilang setelah dua hari pengobatan tambahan dengan clindamycin meskipun konsentrasi bakteri yang tinggi tetap ada.¹⁰

Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Liu Yawen dan kawan-kawan mengenai DNA preservation bahwa DNA saliva dapat mengalami kerusakan karena aktivitas DNase dalam saliva sehingga menyebabkan penurunan kualitas dan kuantitas DNA.¹³ Oleh karena itu preservasi atau proteksi DNA diperlukan untuk mempertahankan kualitas dan integritas DNA.¹³ Sebagai satu jenis enzim, aktivitas DNase dapat dipengaruhi bahkan dihilangkan dengan mengatur pH, cofactor, dan suhu. Dalam studi lain dikatakan bahwa aktivitas DNase menurun secara drastis ketika berada pada suhu di atas atau di bawah suhu optimum kisaran (20-70 °C).^{8,15}

Salah satu strategi preservasi DNA dari saliva adalah dengan melindungi DNA dari aktivitas DNase dengan memberikan inhibitor DNase. Antibiotik golongan aminoglikosida seperti clindamycin,

gentamycin, neomycin dapat bekerja menghambat aktivitas DNase. Jenis inhibitor DNase lainnya tersedia sebagai bahan sintetik dan alami.¹⁵

KESIMPULAN

1. Clindamycin dapat menghambat aktivitas DNase I sehingga dapat mempertahankan kualitas DNA genom manusia asal saliva.
2. Streptomycin tidak dapat menghambat aktivitas DNase I sehingga tidak dapat mempertahankan kualitas DNA genom manusia asal saliva.
3. Clindamycin 3,2 mM efektif menghambat aktivitas DNase I pada DNA genom manusia asal saliva sementara streptomycin tidak menghambat
4. Kualitas gen manusia asal saliva dapat terlindungi dengan clindamycin 0,1 mM dengan PCR dapat mengamplifikasikan gen human NOTCH2 sementara streptomycin tidak dapat melindungi.

SARAN

Golonganaminoglikosida lainnya perlu dikaji dalam efek penghambatan aktivitas DNase.

DAFTAR PUSTAKA

1. Syaifiatul H. DNA Sebagai Bukti Untuk Memecahkan Tindakan Kriminal. *Semin Nas Humanira Apl Teknologi Inf.* 2017;2017(Sehati):231.
2. Wahab RMA, Nasri FAM, Abidin IZZ. Kesan Penyimpanan Sampel Air Liur Terhadap Kualiti DNA Genom. *Sains Malaysiana.* 2017;46(6):909-910.

3. Garbieri TF, Brozoki DT, Dionisio, Thiago Jose, Santos CF, Neves LT das. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3,6 or 12 month using five different protocols. 2017;25(2):147-148.
4. Tiwari M. Science behind human saliva. *J Nat Sci Biol Med*. Published online 2011:1-3.
5. Weil AP. Illustrated Biochemistry Thirtieth Edition. 30th ed. (Rodwe VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA, eds.). McGraw-Hill; 2015.
6. Kolarevic A, Yancheva D, Kocic G, Smelcerovic A. Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2014;88:1-8.
7. Varela-Ramirez A, Abendroth J, Mejia AA, et al. Structure of acid deoxyribonuclease. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(10):6217-6222.
8. Spížek J, Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem Pharmacol*. 2017;133:1-2.
9. Andreoni F, Zörcher C, Tarnutzer A, et al. Clindamycin affects group a streptococcus virulence factors and improves clinical outcome. *J Infect Dis*. 2017;215(2):269-275.
10. Lauková L, Konečná B, Janovičová L, Vlková B, Celec P. Deoxyribonucleases and their applications in biomedicine. *Biomolecules*. 2020;10(7):1-2
11. Murtiyaningsih H. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerbatan Genetik Nanas Menggunakan RAPD. *J Agritop*. 2017;15(1):88-89.
12. Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci*. 2014;6(2):81.
13. Liu Y, Zheng Z, Gong H, et al. DNA preservation in silk. *Biomater Sci*. Published online 2017:1.
14. Mahmudul Huque AKM, So WM, You MK, Shin JS. Phylogenetic analysis and in vitro bifunctional nuclease assay of arabidopsis BBD1 and BBD2. *Molecules*. 2020;25(9):8-9.
15. McGuire AL, Bennett SC, Lansley SM, et al. Preclinical assessment of adjunctive tPA and DNase for peritoneal dialysis associated peritonitis. *PLoS One*. 2015;10(3):9.