

**PENGARUH GENTAMISIN DAN NEOMYCIN+BACITRACIN  
TERHADAP AKTIVITAS DEOKSIRIBONUKLEASE I PADA  
KUALITAS DNA MANUSIA ASAL SALIVA**

**SKRIPSI**



**SITI CHAIRANI**

**1808260105**

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

**PENGARUH GENTAMISIN DAN NEOMYCIN+BACITRACIN  
TERHADAP AKTIVITAS DEOKSIRIBONUKLEASE I PADA  
KUALITAS DNA MANUSIA ASAL SALIVA**

**Skripsi ini Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**SITI CHAIRANI**

**1808260105**

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

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Siti Chairani

NPM : 1808260105

Judul Skripsi : Pengaruh Gentamisin dan Neomycin+Bacitracin Terhadap Aktivitas Deoksiribonuklease I pada Kualitas DNA Manusia Asal Saliva

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

Medan, 23 Februari 2022



Siti Chairani



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.umhsu.ac.id](http://www.umhsu.ac.id) E-mail : [rektor@umhsu.ac.id](mailto:rektor@umhsu.ac.id)  
Bankir : Bank Syariah Mandiri, Bank Bukopin, Bank Mandiri, Bank BPD 1946, Bank Sumut

**HALAMAN PENGESAHAN**

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Siti Chairani

NPM : 1808260105

Judul : Pengaruh Gentamisin Dan Neomycin + Bacitracin Terhadap Aktifitas  
Deoksiribonuklease I Pada Kualitas Dna Manusia 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)

Penguji 1

(dr. Isra Thristy M. Biomed)

Penguji 2

(dr. Rahmanita Sinaga, M.Ked (OG), Sp. OG)

Dekan FK-UMSU

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

Ketua Prodi Studi  
Pendidikan Dokter FK UMSU

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

Ditetapkan di : Medan  
Tanggal : 23 Februari 2022

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya ucapkan kepada Allah *Subhanahu wa ta'ala* karena berkat rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat 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. Terutama dan teristimewa kepada kedua orang tua saya, surga saya, dan pengabdian kepada Ayahanda H.M. Thaib Arifin dan Ibunda Hj. Susilawati yang telah membesarkan, mendidik, membimbing dengan penuh kasih sayang dan cinta tak henti-hentinya mendo'akan penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan lancar dan tepat waktu.
2. Bapak dr. Zulham, M. Biomed, PhD selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
3. Ibu dr. Isra Thristy M. Biomed selaku penguji 1 yang telah memberikan petunjuk-petunjuk serta nasihat dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Ibu dr. Rahmanita Sinaga, M.Ked (OG), Sp.OG selaku penguji 2 yang telah memberikan petunjuk-petunjuk serta nasihat dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Kakanda dan abangda dr. Ismatul Fauziah Rambe, Fithriani, Siti Aisyah, Irfandi, Muhammad Fajar, dan Luqman Al-Hakim yang telah mendukung dan membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Teman-teman saya Astri Novia Rizqi, Chairunnisa Karim Chan, Hamimatur Rohmah, Firra Syahfitri, Mutiara Putri, Ainun Jariah Hanum, Citra Prian dini, Aisyah Umi Ramadhani, Wardah Tsaniah yang telah mendukung dan membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Saya menyadari bahwa penulisan 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 segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Medan, 23 Februari 2022

Siti Chairani  
1808260105

## **PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Siti Chairani

NPM : 1808260105

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 Gentamisin dan Neomycin+Bacitracin Terhadap Aktivitas Deoksiribonuklease I pada Kualitas DNA Manusia Asal Saliva

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan 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 : 23 Februari 2022

Yang menyatakan

Siti Chairani

## ABSTRAK

**Pendahuluan:** Deoxyribonucleic acid (DNA) dapat ditemukan pada saliva dan berbagai sumber lainnya. Saliva mengandung sel-sel epitel dan leukosit yang dilepaskan ke rongga mulut. Sel-sel dalam saliva berpotensi sebagai sumber DNA untuk kepentingan diagnostik. DNA dalam saliva dapat menjadi rusak karena aktivitas deoksiribonuklease (DNase), enzim yang mampu mengkatalisis hidrolisis DNA. DNase I diekspresikan oleh sel eksokrin dan DNase II diekspresikan oleh sel makrofag. Penghambatan aktivitas DNase akan mempreservasi DNA. Selain mampu membunuh bakteri, aminoglikosida (gentamisin dan neomisin) mempunyai kemampuan menghambat DNase.

**Metode:** Saliva dikumpulkan dari 8 subjek. Selanjutnya, sampel saliva dari masing-masing subjek dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (K1), kontrol positif (K2), Gentamisin (K3), Neomycin + Bacitracin (K4). DNA diekstraksi dari saliva dengan metode spin column. DNA dari kelompok K3 dan K4 ditambahi 1 mg/mL gentamisin dan 20 mM neomycin + bacitracin, masing-masingnya, sebelum penambahan 2,5 µg/mL DNase I (*DNA degradation assay*). Kualitas DNA genom manusia asal saliva ditentukan dengan keberadaan amplicon gen *NOTCH2* (~704 bp). DNA diseparasi dengan elektroforesis agarose gel 1% dan direkam dengan *gel documentation system*.

**Hasil:** Ekstraksi DNA dari saliva dengan metode spin column memberikan rerata konsentrasi  $26,49 \pm 30,70$  ng/mL dan rerata kemurnian  $1,819 \pm 0,122$ . Pemberian akuades sebagai kontrol negatif pada *DNA degradation assay* menunjukkan tidak ada DNA yang tercerna. Gentamisin menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I pada konsentrasi 35 µg/mL sementara neomycin + bacitracin dapat menghambat pada konsentrasi 0,8 mM.

**Kesimpulan:** Kadar tertentu gentamisin dan neomycin + bacitracin menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I dan mempertahankan kualitas DNA genom manusia asal saliva.

**Kata kunci:** deoxyribonucleic acid, deoksiribonuklease, gentamisin, neomycin, saliva

## ABSTRACK

**Introduction:** Deoxyribonucleic acid (DNA) can be found in saliva and various other sources. Saliva contains epithelial cells and leukocytes that are released into the oral cavity. Cells in saliva are potential sources of DNA for diagnostic purposes. DNA in saliva can be degraded due to the activity of deoxyribonuclease (DNase), an enzyme that catalyzes the hydrolysis of DNA. DNase I is expressed in exocrine cells while DNase II is expressed in macrophages. Inhibition of DNase activity will preserve DNA. Besides being able to kill bacteria, aminoglycosides (i. e. gentamicin and neomycin) have the ability to inhibit DNase. **Methods:** Saliva was collected from 8 subjects. Furthermore, saliva samples from each subject were divided into 4 groups, namely negative control (K1), positive control (K2), gentamicin (K3), neomycin + bacitracin (K4). DNA was extracted from saliva using spin column method. DNA from groups K3 and K4 were added 1 mg/mL gentamicin and 20 mM neomycin + bacitracin, respectively, before adding 2.5 g/mL DNase I (DNA degradation assay). The quality of human genomic DNA from saliva was determined by the presence of the NOTCH2 gene amplicons (~704 bp). DNA was separated by 1% agarose gel electrophoresis and recorded using the gel documentation system. **Results:** The DNA extracted from saliva using spin column method had an average concentration of  $26.49 \pm 30.70$  ng/mL and an average purity of  $1.819 + 0.122$ . The administration of distilled water as a negative control in the DNA degradation assay showed that no DNA was digested. Gentamicin inhibited the activity of 2.5 mg/mL of DNase I at a concentration of 35 g/mL while neomycin + bacitracin inhibited it at a concentration of 0.8 mM. **Conclusion:** Certain levels of gentamicin and neomycin + bacitracin can inhibited the activity of 2.5 mg/mL DNase I and maintained the quality of human genomic DNA from saliva.

**Keywords:** deoxyribonucleic acid, deoxyribonuclease, gentamicin, neomycin, saliva



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACK.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.3.1 Tujuan Umum.....	2
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
1.4.1 Bagi peneliti dan institusi .....	3
1.4.2 Manfaat dunia medis .....	3
1.5 Hipotesis Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 AMINOGLIKOSIDA .....	4
2.1.1 Gentamisin.....	4
2.1.2 Neomycin + Bacitracin.....	5
2.2 Inhibitor DNase.....	6
2.3 Isolasi DNA .....	9
2.4 PCR.....	10
2.5 Gen <i>NOTCH2</i> .....	10
2.6 Kerangka Teori .....	11
2.7 Kerangka Konsep.....	11
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>12</b>
3.1 Definisi Operasional .....	12
3.2 Jenis Penelitian.....	13
3.3 Waktu Dan Tempat Penelitian .....	13
3.3.1 Waktu penelitian.....	13
3.3.2 Tempat penelitian .....	13

1.4 Sampel Penelitian.....	13
3.5 Besar Sampel .....	13
3.6 Cara Kerja .....	13
3.6.1 Pengumpulan saliva.....	13
3.6.2 Isolasi DNA .....	14
3.6.3 <i>DNA Degradation Assay</i> dan Inhibisi DNase I .....	14
3.7 PCR Dan Kualitas DNA .....	16
3.7.1 Primer .....	16
3.7.2 PCR.....	16
3.8 Analisis Data.....	16
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>17</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	17
4.1.1 Pengaruh DNase terhadap DNA ( <i>DNA degradation assay</i> ).....	17
4.1.3 Pengaruh Gentamisin Terhadap Kualitas DNA Manusia Asal Saliva ..	18
4.1.4 Pengaruh Neomycin + Bacitracin (Nebacetin®) Terhadap Kualitas DNA Manusia Asal Saliva .....	19
4.2 Pembahasan.....	20
4.2.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA saliva hasil ekstraksi metode <i>spin- column</i> .....	20
4.2.2 Inhibisi Aktivitas DNase I oleh Aminoglikosida .....	21
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>24</b>
5.1 KESIMPULAN .....	24
5.2 SARAN .....	24
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>25</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>28</b>
Lampiran 1. Ethical Clearance .....	28
Lampiran 2. Surat Izin Penelitian.....	29
Lampiran 3. Stoikiometri DNA .....	30
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian .....	34
Lampiran 5. Daftar Riwayat Hidup.....	37

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia Gentamisin .....	5
Gambar 2.2 Struktur Kimia Neomycin .....	6
Gambar 2.3 Struktur Kimia Bacitracin .....	6
Gambar 4.1 <i>DNA degradation assay</i> .....	17
Gambar 4.2 Pengaruh gentamisin dalam <i>DNA degradation assay</i> .....	18
Gambar 4.3 Gen <i>human NOTCH2</i> dengan pengaruh preservasi DNA Dengan penambahan gentamisin dalam <i>DNA degradation assay</i> .....	19
Gambar 4.4 Pengaruh neomycin dalam <i>DNA degradation assay</i> .....	19
Gambar 4.5 Gen <i>human NOTCH2</i> dengan pengaruh preservasi DNA Dengan penambahan neomycin dalam <i>DNA degradation assay</i> .....	20

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.2 Hubungan Penyakit dengan DNase.....	8
Tabel 3.1 Definisi operasional .....	12
Tabel 3.2 <i>DNA Degradation Assay</i> dan Inhibisi DNase I.....	15
Tabel 4.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Asal Saliva.....	17

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Deoxyribonucleic acid* (DNA) merupakan makromolekul yang berbentuk polimer linier tersusun atas monomer nukleotida. Proses transkripsi dan translasi DNA menghasilkan produk berupa protein. DNA dapat ditemukan pada saliva, kulit, keringat, darah, gigi, rambut, lendir, sperma, dan cairan vagina.<sup>1</sup>

Saliva merupakan cairan oral yang bersifat asam (pH 6-7). Tiga kelenjar mayor dan ribuan kelenjar minor saliva dalam rongga mulut merupakan komponen utama peyumbang saliva.<sup>2</sup> Saliva terdiri dari 99% air dan sisanya berupa protein, zat anorganik, dan organik. Cairan krevikular gingiva, debris sel, plak, bakteri, sekresi hidung, sel epitel, darah, dan zat eksogen juga terdapat dalam saliva. Sejumlah mikrobiota oral terdapat dalam saliva dan terdiri dari bakteri, arkae, jamur<sup>3</sup>, protozoa<sup>4</sup>, dan virus<sup>5</sup>. Sebagian besar organisme dalam mikrobiota saliva dapat ditemukan hampir di semua individu sebagai flora normal. Flora normal ini terdiri dari *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*, *Prevotella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Porphyromonia*, *Haemophilus*, dan *Porphyromonas* spesies.<sup>6</sup> Dalam saliva dapat ditemukan sel-sel epitel yang dilepaskan mukosa rongga mulut.<sup>7</sup>

Sel-sel epitel yang dilepaskan ke saliva berpotensi digunakan sebagai sumber DNA untuk kepentingan diagnostik menggunakan sumber asam nukleat. Saliva mudah dikumpulkan karena tidak invasif dan jumlahnya banyak.<sup>7</sup> Sayangnya, upaya mendapatkan DNA manusia asal saliva menjadi tidak mudah karena kontaminan dalam saliva berpotensi merusak DNA manusia. Flora normal, enzim, hormon, imunoglobulin dan biomolekul lain yang disekresikan dalam saliva berpotensi segera merusak DNA manusia dalam saliva.<sup>7</sup>

Deoksiribonuklease (DNase) adalah enzim yang mampu mengkatalisis DNA.<sup>8</sup> Ada 2 jenis DNase. DNase I diekspresikan oleh sel eksokrin di saluran pencernaan. DNase II diekspresikan oleh sel makrofag yang berada di seluruh jaringan.<sup>9</sup> Penghambatan aktivitas DNase dapat menggunakan aminoglikosida.<sup>10</sup>

Penggunaan aminoglikosida dalam upaya mengawetkan DNA manusia asal saliva akan menguntungkan karena aminoglikosida menghambat aktivitas DNase sekaligus bersifat bakterisidal yang membunuh bakteri dalam saliva.<sup>8,11</sup> Aminoglikosida menghambat sintesis protein bakteri dengan cara menghalangi proses inisiasi atau dengan mengubah konformasi asam amino.<sup>12</sup> Selain itu, aminoglikosida dapat masuk ke dalam sel bakteri lalu meningkatkan permeabilitas membran dengan melibatkan pengikatan elektrostatis dari aminoglikosida polikationik ke komponen bermuatan negatif, seperti fosfolipid, asam teikoat bakteri Gram-positif, dan fosfolipid dan lipopolisakarida bakteri Gram-negatif.<sup>12</sup>

Aminoglikosida yang digunakan berupa gentamisin dan neomycin + bacitracin merupakan jenis aminoglikosida yang dapat dibeli dengan harga murah dan juga mudah didapatkan. Selain itu gentamisin bekerja sebagai antibiotika dan inhibitor DNase.

Preservasi DNA manusia asal saliva mungkin dilakukan dengan menggunakan aminoglikosida. Penilaian atas keberhasilan preservasi dapat dinilai secara kuantitas dan kualitas. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh aminoglikosida terhadap aktivitas DNase pada kualitas DNA manusia asal saliva.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Permasalahan penelitian ini adalah apakah antibiotik jenis gentamisin dan neomycin + bacitracin berpengaruh terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA manusia asal saliva.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh antibiotika jenis aminoglikosida terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA manusia asal saliva.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengetahui pengaruh gentamisin dan neomycin + bacitracin terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA utuh genom manusia asal saliva
2. Mengetahui pengaruh gentamisin dan neomycin + bacitracin terhadap aktivitas DNase I pada gen *human NOTCH2*.
3. Menentukan dosis minimal dari gentamisin dan neomycin + bacitracin dalam penghambatan aktivitas DNase I pada DNA genom manusia asal saliva.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Bagi peneliti dan institusi**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi rujukan bagi peneliti-peneliti dan institusi riset lain dalam mengembangkan hasil penelitian ini seperti pemanfaatan antibiotika dari jenis aminoglikosida untuk preservasi DNA genom manusia asal saliva.

### **1.4.2 Manfaat dunia medis**

Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mendukung penggunaan saliva sebagai alternatif sumber biologis untuk pemeriksaan *genotyping* manusia.

## **1.5 Hipotesis Penelitian**

**H<sub>0</sub>** : Gentamisin dan Neomycin + Bacitracin tidak berperan dalam menghambat aktivitas DNase I dan mempreservasi DNA asal saliva.

**H<sub>a</sub>** : Gentamisin dan Neomycin + Bacitracin berperan dalam menghambat aktivitas DNase I dan mempreservasi DNA asal saliva.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 AMINOGLIKOSIDA**

Aminoglikosida adalah antibiotik alami atau semisintetik yang berasal dari aktinomisetes.<sup>10</sup> Selain bekerja sebagai inhibitor irreversibel pada sintesis protein bakteri, aminoglikosida juga meningkatkan kesalahan translasi dengan menginduksi kesalahan pembacaan kodon mRNA yang telah ditranskripsi. Beberapa aminoglikosida juga dapat mempengaruhi sintesis protein dengan menghalangi inisiasi ataupun menghambat secara langsung proses inisiasi tersebut. Aminoglikosida diklasifikasikan ke dalam empat subkelas berdasarkan identitas gugus<sup>10</sup> :

1. *Non-deoxystreptamine*, contoh: Streptomycin
2. *Mono substituted deoxystreptamine ring*, contoh: Apramycin
3. *4,5-di-substituted deoxystreptamine ring*, contoh: Neomycin, Kanamycin
4. *4,6-di-substituted deoxystreptamine ring*, contoh: gentamycin, plazomycin

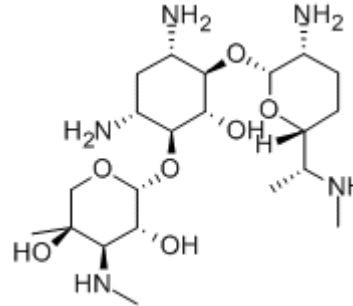
##### **2.1.1 Gentamisin**

Gentamisin adalah suatu aminoglikosida yang diisolasi dari bakteri *Micromonospora purpurea*. Obat ini efektif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif.<sup>13</sup> Gentamisin memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri bahkan mampu membunuh bakteri serta sebagai inhibitor alami DNase I.<sup>8,11</sup> Proses translasi RNA dan DNA akan diganggu oleh gentamisin sehingga biosintesis protein bakteri teracukan. Untuk menembus dinding sel bakteri dan mencapai ribosom, aminoglikosida yang bermuatan kation positif akan berikatan secara pasif dengan membran luar dinding bakteri Gram negatif yang bermuatan kation negatif. Reaksi kation antibiotik ini menimbulkan potensial listrik transmembran sehingga membuka celah pada membran luar dinding sel bakteri.<sup>11</sup>

Gentamisin memiliki kemampuan yang sangat baik dalam menghadapi *Klebsiella*, *Proteus*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *Enterobacter*, *Serratia*, dan



mayoritas infeksi *Staphylococcus*.<sup>14</sup> Penghambatan DNase terbukti pada konsentrasi Gentamisin >35 µg/mL.<sup>15</sup>

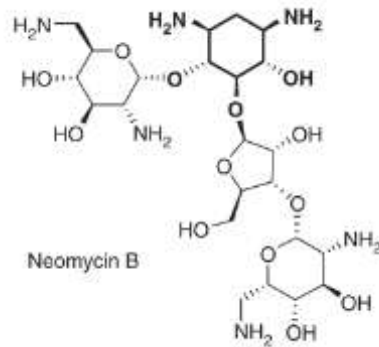


Gambar 2.1. Struktur Kimia Gentamisin<sup>10</sup>

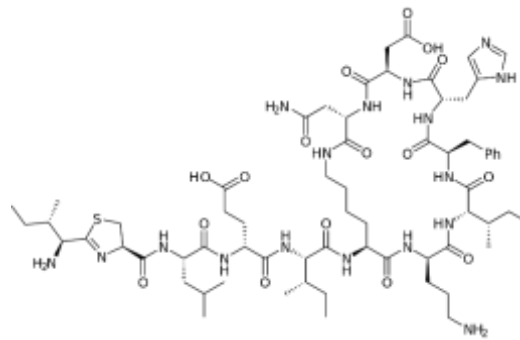
### 2.1.2 Neomycin + Bacitracin

Neomycin sulfat adalah antibiotik spektrum luas yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme anaerob dengan memblokir jalur selektif dan translokasi aminoacyltransfers (aa-tRNA) serta mengikat 23 S Subunit ribosome.<sup>16</sup> Penggunaan Neomycin mampu menghambat aktivitas DNase dan sering digunakan sebagai terapi pada infeksi superfisial. Neomycin dapat menghambat *Staphylococcus* dan basil gram negatif, baik sendiri atau dikombinasi dengan bacitracin, chlorhexidine, atau polymyxin. Antibiotik ini juga telah digunakan secara oral pada pasien sebelum melakukan operasi abdominal atau pada mereka yang berisiko khusus dari infeksi oportunistik dengan bakteri gastrointestinal.<sup>17</sup> Nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) terhadap *Staphylococcus* adalah 9,76 µg/mL dan *E.coli* sebesar 2,44 µg/mL.<sup>18</sup>

Antibiotik bacitracin dapat menghambat pembentukan dinding sel bakteri sedangkan neomycin menghancurkan kode genetik dan sintesis protein bakteri. Nebacetin merupakan bagian dari obat antibiotik dalam bentuk bubuk. Kombinasi antara neomycin dan bacitracin berguna untuk mencegah infeksi luka dan membran mukosa.<sup>19</sup>



Gambar 2.2. Struktur Kimia Neomycin<sup>10</sup>



Gambar 2.3. Struktur Kimia Bacitracin<sup>20</sup>

## 2.2 Inhibitor DNase

Kesehatan dan perkembangan janin hingga dewasa atau proses differensiasi dari *stem cell* menjadi *differentiated cell* pada manusia, mencit maupun organisme lain membutuhkan 2 kelas endonuklease yang memiliki target ke DNA disebut sebagai deoksiribonuklease (DNase).<sup>9</sup> DNase adalah kelas enzim yang mampu mengkatalisis hidrolisis dari DNA.<sup>8</sup> Kedua kelas tersebut, baik DNase1 dan DNase2, memiliki peran penting dalam hal perkembangan dan penyakit.

Aktivitas DNase1 membutuhkan kation divalen ( $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$ ), tertinggi pada kondisi pH netral, dan menghasilkan 5'-fosfat pasca degradasi DNA. Sebaliknya, aktivitas DNase2 tidak membutuhkan kation divalen, tertinggi pada kondisi pH asam, dan menghasilkan 3'-fosfat pasca degradasi DNA. Pada awalnya DNase memiliki nama yang bervariasi tetapi sekarang nama tersebut

telah diganti menjadi DNase1, DNase1L1, DNase1L2, DNase1L3, DNase2a, DNase2b, dan L-DNaseII (Tabel 2.1).<sup>9</sup>

Tabel 2.1 Sifat biokimia DNase<sup>9</sup>

Anggota DNase	Nama lain	pH Maksimal	Produk Pembelahan	Ketergantungan $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$	Inhibitor
<b>DNase1</b>	Dornase alfa	Netral	3'OH 5'P	$\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$	G-actin, $\text{Zn}^{2+}$
<b>DNase1L1</b>	DNase1L1	Netral	3'OH 5'P	$\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$	G-actin, $\text{Zn}^{2+}$
<b>DNase1L2</b>		Asam	3'OH 5'P	$\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
<b>DNase1L3</b>	DNase1L3	Netral	3'OH 5'P	$\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$ , FCA, PV, DR396
<b>DNase2a</b>	DNase2	Asam	3'P 5'OH	No	$\text{Mg}^{2+}$ , nitroprusside, RNA
<b>DNase2b</b>	DNase2b	Asam	3'P 5'OH	No	$\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$
<b>L-DNase2</b>	(SerpineB1/ MNEI/LEI), Acidic	Asam	3'P 5'OH	No	
<b>CAD</b>	DFF40, DFFB	Netral	3'OH 5'P	$\text{Mg}^{2+}$	ICAD
<b>EndoG</b>	Endonuclease G	Netral, acidic	3'OH 5'P	$\text{Mg}^{2+}$	EndoGI, $\text{Zn}^{2+}$

FCA = Freund's Complete Adjuvant, PV = Pontacyl Violet, DR396 = Benzoat Acid, CAD = Caspase-activated DNase, ICAD = Inhibitor Caspase 3- activated DNase, MNEI = Monosit/Neutrofil Elastase Inhibitor, LEI = Leukosit Elastase Inhibitor, EndoG = Endonuklease G, DFF40 = DNA Fragmentation Factor, 40kDa, DFFB = DNA Fragmentation Factor Beta.

Anggota family DNase1 dan DNase2 biasanya diekspresikan di berbagai jaringan. Anggota family DNase1 yang paling banyak diekspresikan adalah DNase1. DNase1 diekspresikan terutama dalam sel eksokrin di saluran pencernaan. Namun, DNase1 juga terdapat dalam darah meskipun terutama diekspresikan oleh sel-sel myeloid. Sel-sel myeloid dari hepar dan lien merupakan salah satu sumber utama DNase1L3 yang disebut "DNase hati-limpa" atau LS-DNase. Di dalam hati dan limpa, DNase1L3 diekspresikan oleh sel dendritik dan makrofag. DNase1L3 juga dapat dideteksi pada tipe sel lain, seperti neuron meskipun perannya belum diketahui.<sup>8</sup> Berbeda dengan DNase1 dan DNase1L3,

ekspresi DNase1L1 terbatas pada otot rangka dan kardiomyosit. Demikian juga dengan DNase1L2 yang terbatas pada keratinosit pada kulit. Secara keseluruhan, anggota DNase1 biasanya menunjukkan lokasi ekspresi yang terbatas.<sup>8</sup>

Pada anggota DNase2, DNase2a lebih banyak diekspresikan di seluruh jaringan. Ini disebabkan karena sebagian tingkat ekspresinya yang tinggi dalam makrofag. L-DNase2 diekspresikan dalam makrofag, tetapi juga terdapat dalam neutrofil karena perannya sebagai SerpinB1. Berbeda dengan DNase2a dan L-DNase2, DNase2b diekspresikan lebih sedikit yaitu hanya pada lensa mata, kelenjar saliva, dan paru-paru. Semua DNase ini akan bekerja sesuai lokasi organ sasaran yang membutuhkannya. Secara keseluruhan, tidak adanya anggota dari kedua DNase tersebut akan menyebabkan berbagai macam penyakit. Berikut beberapa penyakit yang dapat disebabkan karena adanya DNase (Tabel 2.2).<sup>8</sup>

Tabel 2.2 Hubungan Penyakit dengan DNase<sup>9</sup>

Enzim DNase	Penyakit	Ekspresi jaringan	Tipe Sel utama	Lokasi
<b>DNase1</b>	SLE	Kelenjar Saliva, Ginjal, Usus	Sel eksokrin, Sel Paneth	Sekret
<b>DNase1L1</b>	Penyakit Pompe	Rangka dan otot jantung	Myosit	Lisosom
<b>DNase1L2</b>	Parakeratosis, Psoriasis	Epidermis	Keratinosit	Retikulum Endoplasm a
<b>DNase1L3</b>	Pediatric-onset SLE	Limpa, Hati	Makrofag, Sel dendritik	Sekret, Nukleus
<b>DNase2a</b>	RA, Lupus Nephritis	Jaringan, Sumsum Tulang	Makrofag	Lisosom
<b>DNase2b</b>	Katarak	Lensa, Kelenjar Saliva, Paru-paru	Sel Fiber	Lisosom
<b>L-DNase2</b>	Pseudomonas Sensitivity	Sumsum Tulang	Neutrofil	Nukleus
<b>CAD</b>	Kanker	Berbagai tempat	Berbagai tempat	Nukleus
<b>EndoG</b>	Cardiac Hypertrophy	Berbagai tempat	Berbagai tempat	Mitokondria, Nukleus

CAD = Caspase-activated DNase, EndoG = Endonuclease G

Sementara DNase sangat berperan dalam fungsi sel, inhibitor DNase berfungsi sebagai pusat kontrol dan modifikasi aktivitas DNase. Beberapa inhibitor DNase telah ditemukan dari berbagai sumber alami seperti manusia, hewan (sapi, kelinci, tikus), tanaman (*Nicotiana tabacum*), dan mikroorganisme (*Streptomyces* dan jenis adenovirus, *Micromonospora echinospora* dan *Eschericia coli*), dan inhibitor DNase yang diperoleh dari sintesis kimia. Mereka memiliki perbedaan yang dapat dilihat dari struktur kimia (protein, nukleotida, antibiotik antrasiklin, dan aminoglikosida) dan mekanisme kerja (membentuk kompleks DNase dan DNA). Inhibitor DNase dapat digunakan sebagai obat untuk mencegah, memantau dan mengobati berbagai penyakit.<sup>8</sup> Aminoglikosida merupakan salah satu inhibitor DNase alami yang efektif dalam melawan degradasi DNA. Molekul dari golongan antibiotik ini akan menghambat pengikatan DNA sel.<sup>9</sup>

### **2.3 Isolasi DNA**

Prinsip dasar isolasi DNA/RNA dari jaringan adalah dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak sel yang terdiri dari DNA, RNA, dan substansi dasar lainnya. Ekstrak sel tersebut kemudian akan dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung DNA/RNA total.

Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: isolasi sel, lisis dinding dan membran sel, ekstraksi dalam larutan, purifikasi, dan presipitasi. Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada dua, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul. Dengan menjalankan prosedur yang benar maka DNA kromosom dan plasmid akan diperoleh dengan kemurnian yang cukup tinggi, dapat dilihat dari penampakan hasil elektroforesis yang baik. Teknik sentrifugasi dilakukan dalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, misalnya 2500 *rotation per minute* (rpm) atau 3000 rpm.<sup>21</sup>

## 2.4 PCR

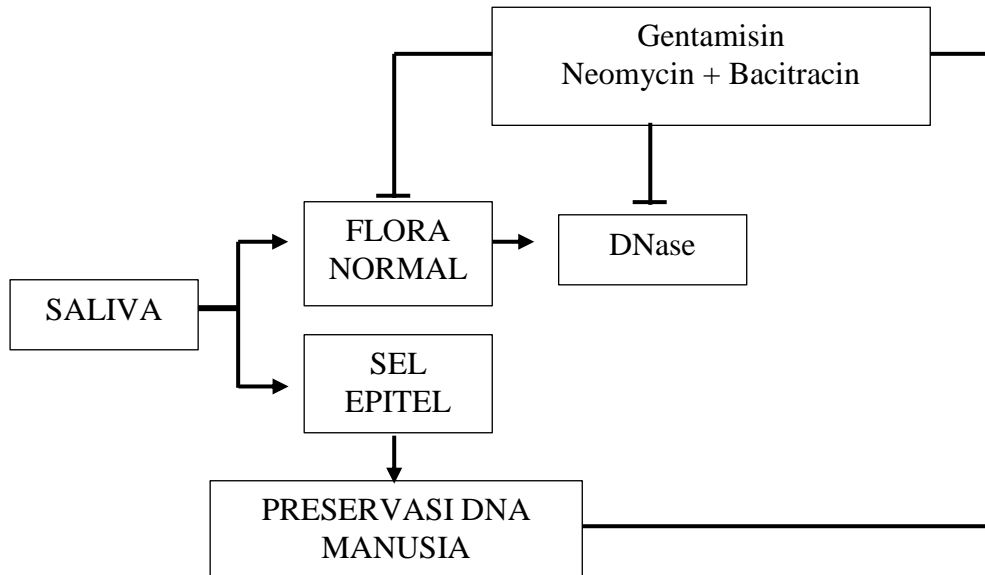
Teknik PCR merupakan suatu cara yang sederhana, praktis, dan cepat untuk memperbanyak sekuen DNA spesifik yang diinginkan dengan ukuran tertentu dengan mekanisme perubahan suhu. Prinsip dasar metode ini adalah amplifikasi materi genetik yang terkandung dalam setiap organisme hidup. PCR dapat dilakukan dalam waktu kurang dari satu hari dan jutaan DNA dapat dihasilkan.<sup>22</sup>

Proses PCR memerlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA cetakan, oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), enzim DNA polimerase, dan komponen pendukung lain yaitu larutan buffer. Proses PCR menggunakan alat *Thermalcycler*. *Thermalcycler* ialah sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk mengatur suhu tabung reaksi untuk tiap tahapan reaksi. Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat yaitu denaturasi, *annealing*, dan pemanjangan untaian DNA (elongasi). Dengan menggunakan metode PCR, jumlah segmen DNA akan meningkat ribuan hingga jutaan kali dari jumlah semula.<sup>23</sup>

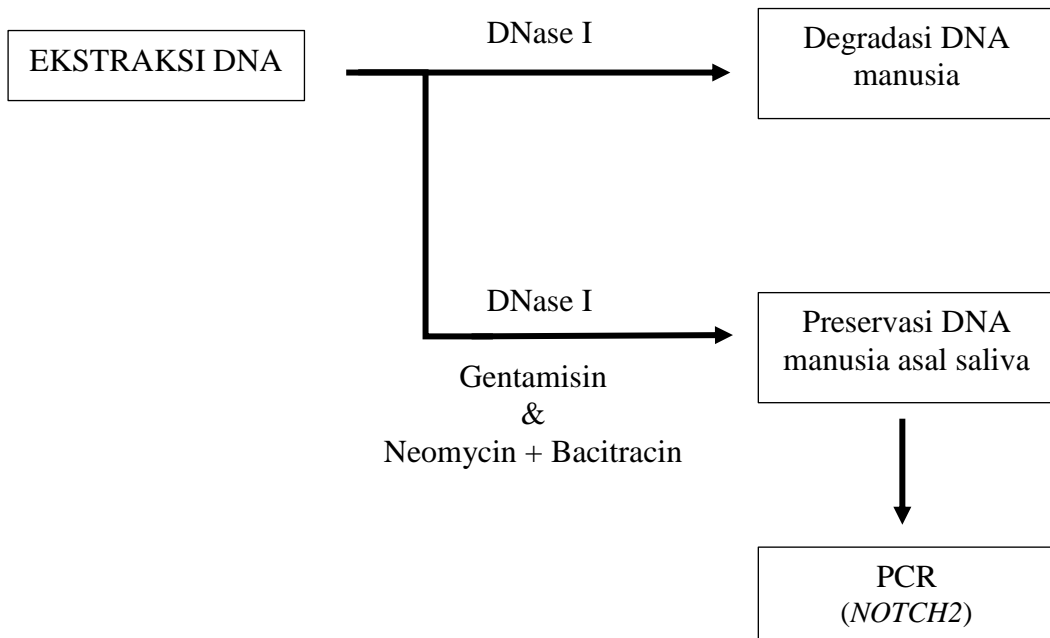
## 2.5 Gen *NOTCH2*

Gen human *NOTCH 2* (AGS2, HJCYS, hN2, Notch-2, notch 2, notch receptor 2) merupakan reseptor notch yang terletak dilengan pendek kromosom 1 manusia. Gen *human NOTCH 2* mempunyai panjang 1,2 kb, terdiri atas 34 ekson, dan terletak pada band kromosom 1p12. Gen ini diekspresikan sejak lahir yaitu pada jantung, hati, ginjal, gigi, tulang, dan struktur lain dalam embrio yang sedang tumbuh.<sup>24</sup> Jalur pensinyalan Notch diketahui mengatur sel punca dan homeostasis sel epitel di jaringan gastrointestinal. Pensinyalan NOTCH2 mendorong proliferasi sel progenitor dalam korpus lambung manusia.

## 2.6 Kerangka Teori



## 2.7 Kerangka Konsep



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
<b>Gentamisin</b>	Antibiotika golongan aminoglikosida yang bekerja melawan infeksi.	Timbangan dan <i>volumetric flask</i>	mM	Rasio
<b>Neomycin + Bacitracin</b>	Antibiotika golongan aminoglikosida yang bekerja menghentikan pertumbuhan bakteri di usus dan infeksi superfisial serta berbentuk tepung dengan nama brand Nebacetin	Timbangan dan <i>volumetric flask</i>	mM	Rasio
<b>Aktivitas DNase</b>	Aktivitas enzim yang memotong DNA menjadi oligonukleotida	Elektroforesis gel agarose 1%	Fragmentasi DNA atau <i>DNA smear</i> atau hilangnya <i>whole DNA</i> pada elektroforesis gel agarose 1%	Nominal
<b>Kualitas DNA manusia asal saliva</b>	Kualitas amplifikasi gen <i>human NOTCH 2</i>	PCR dan elektroforesis gel agarose 1%	Band 704 bp pada elektroforesis gel agarose 1% hasil PCR	Nominal



### **3.2 Jenis Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental murni dengan desain *pretest posttest* untuk *DNA degradation assay* dan *posttest with control group* untuk penentuan dosis aminoglikosida untuk inhibisi aktivitas DNase I.

### **3.3 Waktu Dan Tempat Penelitian**

#### **3.3.1 Waktu penelitian**

Penelitian ini berlangsung dari bulan Desember 2021-Januari 2022.

#### **3.3.2 Tempat penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

### **1.4 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 8 orang.

### **3.6 Cara Kerja**

#### **3.6.1 Pengumpulan saliva**

Saliva dikumpulkan dari masing-masing subjek. Kriteria inklusi dan eksklusi tidak diperlukan. Subjek dikumpulkan di satu ruangan pukul 07.00 WIB dan tidak diperbolehkan untuk sikat gigi dan berkumur dengan cairan pembersih mulut. Subjek diinstruksikan untuk tidak makan dan minum selama 90 menit sebelum pengambilan saliva. Selanjutnya subjek diberikan waktu 10 menit untuk proses meludah.<sup>25</sup> Sebanyak 50 mL saliva dikumpulkan dari setiap subjek dengan meludah ke pot saliva bersih.

Sampel saliva dari masing-masing subjek segera dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (K1), kontrol positif (K2), Gentamisin (K3), Neomycin + Bacitracin (K4).

### **3.6.2 Isolasi DNA**

Sebanyak 10 mL saliva dari masing-masing kelompok disentrifugasi pada kecepatan 13000 g. Supernatan dibuang dan pellet di-resuspensi dengan 1 mL PBS pH 7,4. DNA diisolasi menggunakan metode *spin-column* dan kit isolasi DNA (GIN170, Sigma) dengan modifikasi dari petunjuk *manufacturer*. Kuantitas dan kualitas DNA hasil isolasi ditentukan dengan kaidah spektrofotometri (NanoPhotometer<sup>®</sup> /N50, Implen).

Rata-rata konsentrasi (kuantitas) DNA (ng/ $\mu$ L) ditentukan dari nilai bacaan spektrofotometri yaitu pada pembacaan panjang gelombang penyerapan 260 nm. Kualitas DNA juga ditentukan oleh rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm (A260/280) yang menunjukkan perkiraan kemurnian DNA.<sup>26</sup>

### **3.6.3 DNA Degradation Assay dan Inhibisi DNase I**

Sejumlah 1  $\mu$ g DNA saliva diberi perlakuan *DNA degradation assay* dengan penambahan 2,5  $\mu$ g/mL DNase I (DN25, Merck).<sup>15</sup> Larutan assay diinkubasi selama satu jam pada suhu ruangan. Perlakuan ini menghasilkan kelompok K2 (Tabel 3.2). Kelompok K1 berisi DNA yang diberi akuades sehingga menjadi kontrol negatif.

DNA saliva dari kelompok K3 dan K4 ditambahi sejumlah dosis gentamisin dan neomycin+bacitracin sebelum penambahan 2,5  $\mu$ g/mL DNase I (*DNA degradation assay*). Dosis gentamisin dan neomycin + bacitracin ditingkatkan terus sehingga terjadi inhibisi sempurna terhadap aktivitas DNase I yang ditandai dengan keberadaan DNA utuh (*whole DNA*). Selanjutnya larutan assay diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Hasil assay divisualisasi dengan elektroforesis agarose gel 1% dan direkam dengan *gel documentation system* (12 200468, Uvitec, France).

Tabel 3.2 DNA Degradation Assay dan Inhibisi DNase I.

Kelompok	Perlakuan
K1 (kontrol negatif)	1 µg DNA + Aquades
K2 (kontrol positif)	1 µg DNA + 2,5 µg/mL DNase I
K3 (Gentamisin)	1 µg DNA + 0,4 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,42 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 0,76 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,43 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 1,64 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,47 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 3,93 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,56 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 3,93 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,56 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 2,92 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,52 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 4,33 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,58 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 8,20 µL larutan 1 mg/mL gentamisin + 0,73 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 0,1 µL larutan 10 mM neomycin + bacitracin (Nebacetin®) + 0,41 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 0,1 µL larutan 20 mM neomycin + bacitracin (Nebacetin®) + 0,41 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
K4 (neomycin+bacitracin)	1 µg DNA + 0,2 µL larutan 20 mM neomycin + bacitracin (Nebacetin®) + 0,41 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 0,41 µL larutan 20 mM neomycin + bacitracin (Nebacetin®) + 0,42 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 0,82 µL larutan 20 mM neomycin + bacitracin (Nebacetin®) + 0,44 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 1,12 µL larutan 20 mM neomycin + bacitracin (Nebacetin®) + 0,45 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I
	1 µg DNA + 1,92 µL larutan 20 mM neomycin + bacitracin (Nebacetin®) + 0,48 µL larutan 2,5 µg/mL DNase I

### **3.7 PCR Dan Kualitas DNA**

#### **3.7.1 Primer**

Primer gen *human NOTCH 2* (# *Gene Bank Accession* NG\_008163.1) didesain menggunakan primer-BLAST milik ncbi. Primer gen *human NOTCH2* yang akan digunakan adalah *Forward* CCCATTTGGGCTGGAGGAAT dan *Reverse* GCCTGTAAACGAGGGTGACA. Panjang ampikon diperkirakan 704 bp.

#### **3.7.2 PCR**

Metode PCR dijalankan dengan menggunakan 25  $\mu$ L campuran reaksi PCR yang mengandung 1 ng DNA saliva sebagai *template*, 1  $\mu$ M untuk setiap primer, serta 200  $\mu$ M untuk setiap dNTP, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 5  $\mu$ L 5X dapar penyangga PCR dan juga 5 U/ $\mu$ L Taq polimerase DNA dalam *PCR mastermix* (2GFRMKB, Kapa2G Fast ReadyMix, Merck). Untuk mengetahui kualitas gen dari DNA saliva hasil isolasi (K1), pasca *DNA degradation assay* (K2), dan inhibisi DNase I (K3 dan K4), PCR dijalankan dengan menggunakan primer yang sudah didesain (3.7.1).

Kualitas DNA manusia asal saliva, termasuk hasil PCR, seterusnya dinilai melalui elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) dan diikuti dengan visualisasi di bawah cahaya UV setelah pewarnaan etidium bromida (EtBr) dilakukan dengan mempertimbangkan keberadaan hasil PCR berupa satu band berukuran ~704 bp.

### **3.8 Analisis Data**

Analisis data dilakukan dengan univariat berupa rerata dan standar deviasi untuk konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi.. Penilaian hasil PCR untuk gen *human NOTCH2* menggunakan pendekatan deskriptif dengan pengamatan keberadaan *expected amplicon length* (~704 bp) pada hasil elektroforesis gel agarose 1 %.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

#### 4.1.1 Pengaruh DNase terhadap DNA (*DNA degradation assay*)

Ekstraksi DNA dari saliva dengan metode *spin column* memberikan rerata konsentrasi  $26,49 \pm 30,70$  dan rerata kemurnian  $1,819 \pm 0,122$  dengan rentang konsentrasi 7,10-99,45 dan rentang kemurnian  $1,639 \pm 2,04$  (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Asal Saliva

Sampel	Konsentrasi (ng/uL)	Kemurnian DNA
1	13,25	1,79
2	7,10	2,04
3	20,05	1,76
4	20,10	1,80
5	7,95	1,64
6	10,60	1,93
7	33,45	1,85
8	99,45	1,74
Rerata $\pm$ Standar Deviasi	$26,49 \pm 30,70$	$1,819 \pm 0,122$
Rentang (Minimum –Maximum)	$7,10 \pm 99,45$	$1,64 \pm 2,04$

Pemberian akuades pada kelompok kontrol negatif pada *DNA degradation assay* menunjukkan tidak ada DNA yang tercerna, fragmentasi DNA, atau *smear DNA* dengan *whole DNA* tampak utuh. Namun pemberian 2,5 mg/mL DNase I mencerna 1  $\mu$ g DNA sehingga tidak menunjukkan keberadaan DNA pada elektroforesis gel agarose 1% (Gambar 4.1).

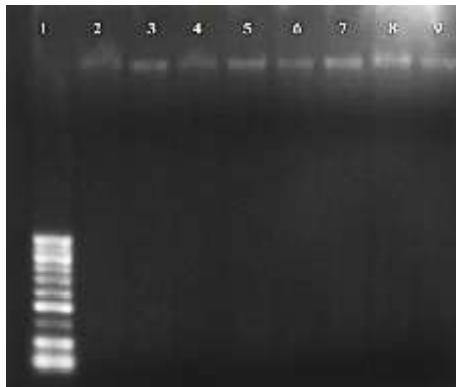


Gambar 4.1 *DNA degradation assay*

Gambar 4.1 adalah perlakuan dengan konsentrasi 10  $\mu$ L. Lane 1 berisi *DNA ladder* 100 bp. Lane 2 adalah kontrol negatif yaitu 1  $\mu$ g DNA + akuades. Lane 3 adalah kontrol positif mengandung 1  $\mu$ g DNA + 2,5  $\mu$ g/mL DNase I.

#### 4.1.3 Pengaruh Gentamisin Terhadap Kualitas DNA Manusia Asal Saliva

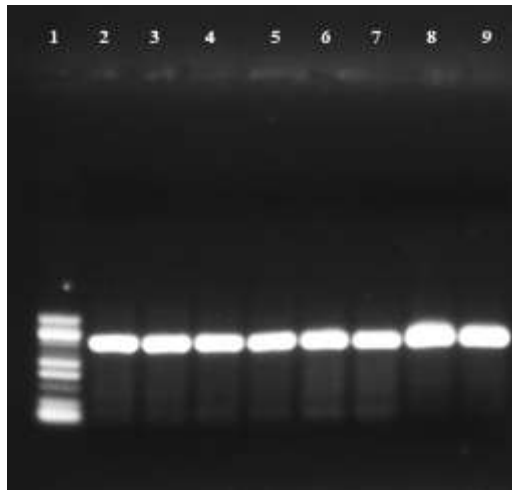
Penambahan gentamisin pada DNA manusia asal saliva menunjukkan adanya pengaruh penghambatan gentamisin terhadap aktivitas DNase I dalam mencerna DNA. Pada hasil elektroforesis gel agarose 1 % dijumpai adanya band di lane 2, lane 3, lane 4, lane 5, lane 6, lane 7, lane 8, dan lane 9 dengan kontras warna yang variatif dikarenakan semakin besar pemberian konsentrasi gentamisin maka semakin besar daya inhibisi gentamisin terhadap DNase I. Konsentrasi 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamisin sudah cukup untuk mencegah pencernaan 1  $\mu\text{g}$  DNA oleh 2,5 mg/mL DNase I (Gambar 4.2). Penambahan konsentrasi gentamisin hingga mencapai 2240  $\mu\text{g}/\text{mL}$  memperkuat efek penghambatan DNase I dengan menghasilkan band DNA utuh yang lebih terang.



Gambar 4.2 Pengaruh gentamisin dalam *DNA degradation assay*.

Keberadaan gentamisin telah mencegah pencernaan DNA oleh DNase I Lane 1 berisi *DNA ladder 100 bp*. Masing-masing lane 2-9 berisi 1  $\mu\text{g}$  DNA yang telah ditambahi gentamisin 35, 70, 140, 280, 560, 1120, 1500, 2240  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , serta mendapat 2,5 mg/mL DNase I. Elektroforesis DNA dilakukan gel agarose 1% dengan kondisi 80 mV, 400 mA, dan 90 menit.

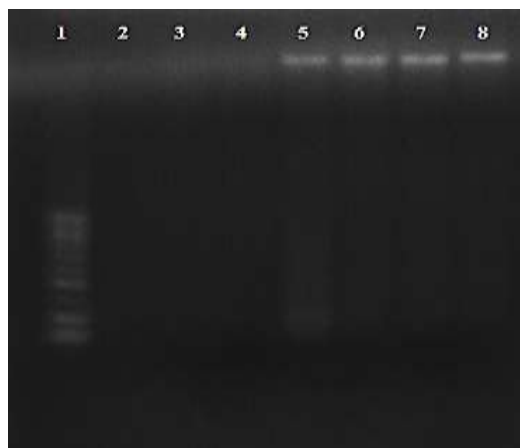
Gen *human NOTCH2* berhasil diamplifikasi dengan PCR dari sampel-sampel DNA kelompok K3 (Gambar 4.3). PCR berhasil mengamplifikasi band berukuran ~704 bp tanpa band lain.



Gambar 4.3 Hasil PCR gen *human NOTCH2* dari sampel DNA yang mendapat penambahan berbagai konsentrasi gentamisin dan 2,5 mg/mL DNase I. Gen *human NOTCH2* (~704 bp) berhasil diamplifikasi dari semua sampel DNA. Lane 1 berisi *DNA ladder 100 bp*. Masing-masing lane 2-9 berisi 1 µg DNA yang telah ditambahi gentamisin 35, 70, 140, 280, 560, 1120, 1500, 2240 µg/mL, serta mendapat 2,5 mg/mL DNase I. Elektroforesis DNA dilakukan gel agarose 1% dengan kondisi 80 mV, 400 mA, dan 90 menit.

#### 4.1.4 Pengaruh Neomycin + Bacitracin Terhadap Kualitas DNA Manusia Asal Saliva

Konsentrasi 0,1-0,4 mM neomycin tidak mampu menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I sehingga tidak ada band *whole DNA* yang dapat divisualisasi. Namun, penggunaan neomycin + bacitracin dengan konsentrasi 0,8-2,0 mM sudah cukup dalam mencegah pencernaan 1 µg DNA oleh 2,5 mg/mL DNase I (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Pengaruh neomycin dalam *DNA degradation assay*. Konsentrasi neomycin menentukan pencernaan DNA oleh DNase I. Konsentrasi 0,8 mM telah memberikan penghambatan minimal terhadap aktivitas 2,5 mg/mL DNase I. Lane 1 berisi *DNA ladder 100 bp*. Masing-masing lane 2-8 berisi 1 µg DNA yang telah

ditambahi Nebacetin® 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 mM, serta mendapat 2,5 mg/mL DNase I. Elektroforesis DNA dilakukan gel agarose 1% dengan kondisi 80 mV, 400 mA, dan 90 menit.

Gen *human NOTCH2* berhasil diamplifikasi dengan PCR dari sampel-sampel DNA kelompok K4 (Gambar 4.5). PCR berhasil mengamplifikasi band berukuran ~704 bp tanpa band lain. Konsentrasi 0,1-0,4 mM neomycin tidak menunjukkan hasil amplifikasi gen *human NOTCH2* sedangkan konsentrasi > 0,8 mM neomycin mampu mencegah pencernaan 1 ug DNA oleh 2,5 mg/mL DNase I sekaligus menunjukkan amplifikasi gen *human NOTCH2*.



Gambar 4.5 Gen *human NOTCH2* dengan pengaruh preservasi DNA dengan penambahan neomycin dalam *DNA degradation assay*.

Keberadaan gen *human NOTCH2* (~704 bp) pada elektroforesis gel agarose 1%. Lane 1 berisi *DNA ladder* 100 bp, Lane 2 berisi nebacetin 0,1 mM, Lane 3 berisi nebacetin 0,2 mM, Lane 4 berisi nebacetin 0,4 mM, Lane 5 berisi nebacetin 0,8 mM, Lane 6 berisi nebacetin 1,6 mM, Lane 7 berisi nebacetin 2,0 mM, Lane 8 berisi 3,2 mM.

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA saliva hasil ekstraksi metode *spin-column*

Kualitas DNA dapat ditentukan dengan spektrofotometri dan elektroforesis setelah dilakukannya isolasi DNA.<sup>27</sup> Spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Metode spektrofotometri adalah metode yang memberikan cara sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil.<sup>28</sup>



Ada berbagai macam metode dan dengan berbagai jenis reagen yang dapat digunakan untuk proses ekstraksi DNA. Masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Di antara metode ekstraksi DNA adalah *spin-column* dengan penggunaan silika untuk merangkap DNA yang telah keluar dari sel. Penelitian ini menggunakan metode *spin-column* dan menentukan kemurnian DNA dengan spektrofotometri UV-Vis melalui kalkulasi nilai absorbansi 260 nm yang dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm (A260/A280). Nilai kemurnian DNA yang ideal berkisar 1,8-2,0.<sup>29</sup>

Selain metode *spin-column*, metode *salting out* menggunakan *phenol chloroform* ditentukan dengan mengambil kepadatan optik (OD) dari sampel pada 280 nm untuk konsentrasi protein dan pada 260 nm untuk konsentrasi DNA. Rasio (OD260/OD280) telah dihitung dan sampel DNA dalam kisaran 1,6- 2.0 dianggap sebagai murni.<sup>30</sup>

Metode lain seperti MagCore® Super (RBC Bioscience Corp., Taiwan) with the MagCore® Genomic DNA Tissue Kit, cartridge code 40 memperoleh DNA konsentrasi dengan pembacaan kepadatan optik (OD) pada 260 nm dan rasio OD pada 260nm/280nm adalah digunakan untuk memperkirakan kemurnian DNA. Secara umum nilai 1,7-2,0 rasio OD 260nm/280nm merupakan indikasi untuk kemurnian DNA.<sup>31</sup> Ekstraksi DNA dengan metode *spin column* dalam studi ini sudah mencapai standar rerata kemurnian yaitu 1,8-2,0.

#### **4.2.2 Inhibisi Aktivitas DNase I oleh Aminoglikosida**

Mekanisme kerja atau aktivitas enzim sebagai biokatalisator berstruktur protein dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pH, suhu, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan kehadiran aktivator atau inhibitor.<sup>32</sup> Pada kondisi optimum, enzim memiliki suhu 30°C dengan pH 6,0. Peningkatan suhu 10-55°C akan menghidrolisis enzim.<sup>33</sup>

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Reaksi-reaksi biokimia yang dikatalisis oleh enzim dipengaruhi oleh jumlah substrat. Jika melakukan pengujian konsentrasi substrat dari konsentrasi rendah ke tinggi terhadap kecepatan reaksi enzimatik, maka pada

awalnya akan diperoleh hubungan kesebandingan yang menyatakan kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, namun kemudian akan diperoleh data yang menyatakan pada konsentrasi substrat tinggi tertentu kecepatan reaksi tidak lagi bertambah. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.<sup>32</sup>

DNase merupakan enzim endonuclease yang diklasifikasikan dalam DNase I dan DNase II. DNase I (EC 3.1.21.1) bekerja optimal pada pH netral dan membutuhkan kation  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$ . Sementara DNase II (EC 3.1.22.1) menghidrolisis DNA pada pH asam dan tanpa kation  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$ .<sup>34</sup> Aktivitas DNase I akan meningkat pada buffer yang mengandung satu jenis kation divalen ( $Ca^{2+}$ ). Tanpa adanya kation divalen, aktivitas DNase I hampir dapat diabaikan. Kehadiran  $Mg^{2+}$  berpartisipasi dalam hidrolisis DNA atau untuk menstabilkan gugus fosfat DNA.<sup>35</sup>

Aktivitas DNase akan terhenti dengan adanya inhibitor DNase seperti, *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA). EDTA merupakan  $Mg^{2+}$  ion chelator dan inhibitor DNase karena DNase membutuhkan ion  $Mg^{2+}$  sebagai aktivator untuk aktivitasnya. Adanya EDTA di dalam buffer menghambat enzim yang aktifitasnya tergantung logam.<sup>36</sup>

Suhu optimum DNase I adalah  $50^{\circ}C$  dengan pH optimum 6,5-7,0. pH optimum untuk DNase II dari *Euglena gracilis* dan pankreas babi adalah asam yaitu 5.3 dan 4.6. DNase II stabil selama 15 menit inkubasi pada  $60^{\circ}C$  dan aktivitasnya menghilang setelah 15 menit inkubasi pada  $80^{\circ}C$ .<sup>34</sup>

Penelitian ini mendapati gentamisin dengan konsentrasi 35  $\mu g/mL$  mampu mencegah pencernaan 1  $\mu g$  DNA oleh 2,5  $mg/mL$  DNase I. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian McGuire (2015) yang juga menggunakan gentamisin untuk menghambat aktivitas DNase. McGuire (2015) mendapati gentamisin pada konsentrasi  $>35 \mu g/mL$  dapat menghambat 2,5  $mg/mL$  DNase I.<sup>15</sup> Selain itu, Alipour (2009) menyatakan bahwa kombinasi antara DNase dan gentamisin dapat meningkatkan kerja gentamisin dengan minimal konsentrasi sebesar 64  $\mu g/mL$ .<sup>27</sup>

Neomycin dapat menghambat aktivitas DNase I pada konsentrasi 2 mM.<sup>37</sup> Pada penelitian ini, neomycin + bacitracin dengan konsentrasi 0,8-2,0 mM sudah cukup dalam mencegah pencernaan 1 µg DNA oleh 2,5 mg/mL DNase I. Penggunaan antibiotik berupa neomycin + bacitracin juga dilakukan oleh Kolarevic (2014) dan Woegerbauer (2000) yang menyatakan neomycin dapat menghambat aktivitas DNase I pada konsentrasi neomycin 2 mM.<sup>28,29</sup> Bacitracin tidak memiliki pengaruh besar terhadap DNase I. Ciesiolka (2014) menyatakan bahwa bacitracin menginduksi degradasi DNA meskipun bacitracin untuk menginduksi degradasi DNA harus cukup besar konsentrasinya karena konsentrasi 23 mM tidak mengubah migrasi DNA plasmid dalam gel agarose 1%. Oleh karena itu dalam studi ini, neomycin jauh lebih kuat berperan dibanding bacitracin.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 KESIMPULAN**

1. Gentamisin dan neomycin + bacitracin dapat menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I sehingga mempertahankan kualitas DNA utuh genom manusia asal saliva.
2. Gentamisin dan neomycin + bacitracin menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I sehingga mempertahankan gen *NOTCH2* (704 bp)
3. Gentamisin dapat menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva pada konsentrasi 35 µg/mL sementara neomycin + bacitracin menghambat pada konsentrasi 0,8 mM.

#### **5.2 SARAN**

1. Pada konsentrasi 35 µg/mL, gentamisin menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I sementara 0,8 mM neomycin + bacitracin dapat pula bekerja sama efektifnya dengan gentamisin. Efek inhibisi singergistik dari kombinasi gentamisin dan neomycin, atau dengan jenis aminoglikosida lainnya mungkin lebih baik dan menurunkan konsentrasi hambat terhadap aktivitas DNase I.
2. Penghambatan aktivitas DNase I juga dilakukan dengan menghilangkan peran  $Mg^{2+}$  sebagai kofaktor enzim. EDTA berperang mengkelat ion-ion dan berpotensi menghambat aktivitas DNase I. Kombinasi jenis aminoglikosida dan EDTA perlu dikaji untuk meningkatkan efektivitas perlindungan DNA terhadap aktivitas DNase I.

## DAFTAR PUSTAKA


1. Syaifiatul H. DNA Sebagai Bukti Untuk Memecahkan Tindakan Kriminal. *Semin Nas Humanira Apl Teknologi Inf.* 2017;(1):231.
2. Carreras-presas CM. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp Biol Med.* 2017;1:459-472.
3. Valentijn-benz M, Nazmi K. Growth of *Candida albicans* in human saliva is supported by low-molecular-mass compounds. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(1):1-8.
4. Khairnar K, Parija SC. Detection of *Entamoeba histolytica* DNA in the saliva of amoebic liver abscess patients who received prior treatment with metronidazole. *J Heal Popul Nutr.* 2008;26(4):418-425.
5. Samaranayake L. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem Oral ecology Oral microbiome Dental plaque biofilms Saliva. *Dent Clin N Am.* 2017;61:199-215.
6. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci.* 2017;59(2):201-206.
7. Brozoski DT, Santos CF. Human DNA extraction from whole saliva. *J Applied Oral Sci.* 2017;25:147-158.
8. Kolarevic A, Yancheva D. Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2014;88(30):1-11.
9. Keyel PA. Dnases in health and disease. *Dev Biol.* 2017;429(1):1-11.
10. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides : An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(1):1-19.
11. Kandou PRD. Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih. *Pharmacon J Ilm Farm.* 2016;5:123-129.
12. Krause KM, Serio AW. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(1):1-19.
13. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. In: Katzung BG, ed. *Farmakologi Dasar Klinik.* 14th ed. Mc-Graw Hill; 2018:844-846.
14. Fransiska F. Ototoksisitas Aminoglikosida. *KELUWIH J Kesehat dan Kedokt.* 2019;1(1):37-47.
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):1-15.
16. Arbid MS, Koriem KMM, Asaad GF, Megahed HA. Effect of the antibiotic neomycin on the toxicity of the glycoside vicine in rats. *J Toxicol.* 2013;2013(1):1-8.
17. O'Donnell JA. Neomycin. *xPharm.* 2017;7:1.
18. Leite TR, da Silva MAP, Dos Santos ACB, Coutinho HDM, Duarte AE, da Costa JGM. Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *croton limae*. *Pharm Biol.* 2017;55(1):2015-2019.
19. Sampe SA. Pengaruh Penggunaan Nebacetin Bubuk Terhadap Terjadinya Plebitis Di Rumah Sakit Stella Maris Makassar. *J Keperawatan Florence Nightingale.* 2018;1(1):54-59.
20. Zhu Z, Schnell L, Müller B, Müller M, Papatheodorou P, Barth H. The

- Antibiotic Bacitracin Protects Human Intestinal Epithelial Cells and Stem Cell-Derived Intestinal Organoids from *Clostridium difficile* Toxin TcdB. *Stem Cells Int.* 2019;2019:8.
21. Faatih M. Isolation and Digestion of Chromosomal DNA. *J Penelit Sains Teknol.* 2009;10(1):61-67.
  22. Erviani AE. Analisis Multidrug Resistensi Terhadap Antibiotik Pada *Salmonella typhi* Dengan Teknik Multiplex PCR. *JOPS (Journal Pharm Sci.* 2013;1(1):51-60.
  23. Hasibuan E. Peranan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) Terhadap Perkembangan Ilmu Pengetahuan. 2015;1.
  24. Bertrand FE, Eckfeldt CE, Lysholm AS, LeBien TW. Notch-1 and Notch-2 exhibit unique patterns of expression in human B-lineage cells. *Leukemia.* 2000;14(12):2095-2102.
  25. Kasuma N. Fisiologi dan Patologi Saliva. *Andalas Univ Press.* Published online 2015:54. <http://repo.unand.ac.id/3650/1/01.Buku-Fisiologi-dan-Patologi-Saliva.pdf>
  26. Hue NT. Modified DNA Extraction Method for the Detection of *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Parasiticus* in Dried Foods. *IFMBE Proc.* 2015;46(1):1-8.
  27. Harahap MR. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT J Ilm Pendidik Tek Elektro.* 2018;2(1):21-26.
  28. Hasibuan E. Karya tulis ilmiah ini telah disetujui oleh Kepala Laboratorium Terpadu Kultur Sel dan Jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. *Karya tulis Ilm ini telah disetujui oleh Kepala Lab Kult Sel dan Jar Fak Kedokt Univ Sumatera Utara.* Published online 2015:1-17.
  29. Ratnasari YA, Faridah IN. Otimasi Metode Isolasi Dna Sampel Fta Cards Menggunakan Purelink ® Genomic Dna Kits Dan Chelex-100 Optimization of Fta Cards Sample Dna Isolation Method Using Purelink ® Genomic Dna Kits and. *Bachelor Thesis.* 2019;1(1):1-13.
  30. 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.
  31. Solomon SM, Matei MN, Badescu AC, et al. Evaluation of DNA extraction methods from saliva as a source of PCR - Amplifiable genomic DNA. *Rev Chim.* 2015;66(12):2101-2103.
  32. Yunita silvia P. Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri Dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan. *Perpust Univ Airlangga.* 2012;1:1-21.
  33. Dutta TK, Malabendu J, Pahari PR, Bhattacharya T. The effect of temperature, pH, and salt on amylase in *Heliodyptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida). *Turkish J Zool.* 2006;30(2):187-195.
  34. Abdel-Gany SS, El-Badry MO, Fahmy AS, Mohamed SA. Purification and characterization of deoxyribonuclease from small intestine of camel *Camelus dromedarius*. *J Genet Eng Biotechnol.* 2017;15(2):463-467.
  35. Guérout M, Picot D, Abi-Ghanem J, Hartmann B, Baaden M. How cations can assist dnase i in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol.*

- 2010;6(11):1-11.
36. Yulianti E. Pengembangan Teknik Isolasi DNA Tumbuhan Menggunakan Detergen Komersial. *Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA serta Peranannya dalam Peningkatan Keprofesionalan Pendidik dan Tenaga Kependidikan*. 2006;1:71-85.
  37. Woegerbauer M, Burgmann H, Davies J, Graninger W. DNase I induced DNA degradation is inhibited by neomycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 2000;53(3):276-285.
  38. Ciesiolka J, Jezowska-Bojczuk M, Wrzesiński J, et al. Antibiotic bacitracin induces hydrolytic degradation of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2014;1840(6):1782-1789.

# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Ethical Clearance

  
**UMSU**  
Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

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 : 604/KEPK/FKUMSU/2021

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :  
*The Research protocol proposed by*

Peneliti Utama : Siti Chairani  
*Principal in Investigator*

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

Dengan Judul  
*Title*

**"PENGARUH GENTAMISIN DAN NEOMYCIN+BACITRACIN TERHADAP AKTIVITAS DEOKSIRIBONUKLEASE I PAD KUALITAS DNA MANUSIA ASAL SALIVA"**


**"EFFECT OF GENTAMICIN AND NEOMYCIN + BACITRACIN ON ACTIVITY DEOXYRIBONUCLEASE I ON THE QUALITY OF HUMAN 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 Assessment 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 08 September 2021 sampai dengan tanggal 08 September 2022  
*The declaration of ethics applies during the periode September 08, 2021 until September 08, 2022*

Medan, 08 September 2021  
Ketua

  
Dr. dr. Nurfadly, MKT



## Lampiran 2. Surat Izin Penelitian



*Original Cerdas & Terpercaya*

Isi menjawab surat ini agar ditubuhkan  
mas dan tanggapnya

MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI  
**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**

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](mailto:fk@umsu.ac.id)

Nomor : 1685/II.3-AU/UMSU-08/F/2021  
Lamp. : -  
Hal : **Mohon Izin Penelitian**

Medan, 11 Jumadil Awwal 1443 H  
15 November 2021 M

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 : Siti Chairani  
NPM : 1808260105  
Semester : VII ( Tujuh )  
Fakultas : Kedokteran  
Jurusan : Pendidikan Dokter  
Judul : Pengaruh Gentamisin dan Neomycin+Bacitracin Terhadap Aktivitas Deoksiribonuklease I Pada Kualitas DNA Manusia 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 Masliana Siregar, Sp.THT-KL(K)**  
NIDN : 0106098201

Tembusan :  
1. Wakil Rektor I UMSU  
2. Ketua Skripsi FK UMSU  
3. Pertinggal

### Lampiran 3. Stoikiometri DNA

#### 1. GENTAMISIN

Gentamisin injection dari pabrik memiliki konsentrasi 40 mg/mL. Gentamisin disediakan dalam volume akhir 35, 70, 140, 280, 560, 1120, 1500, 2240 µg/mL (8 konsentrasi berbeda).

---

1. Dilusi (encerkan gentamycin 40 mg/mL menjadi gentamycin 5 mg/mL)
    - a. Sejumlah 62.5 µL gentamycin 40 mg/mL dihisap dengan micropipette, ditaruh ke 1.5 mL Eppendorf tube,
    - b. Tambahi 437.5 µL aquadest kepada *ependrof tube*.
    - c. Vortex (*spin down*) untuk homogenasi.
  2. Dilusi (encerkan gentamycin 5 mg/mL menjadi gentamycin 1 mg/mL)
    - d. Sejumlah 20 µL gentamycin 5 mg/mL dihisap dengan micropipette, ditaruh ke 1.5 mL PCR tube,
    - e. Tambahi 80 µL aquadest kepada *ependrof tube*.
    - f. Vortex (*spin down*) untuk homogenasi.
  3. Dilusi (encerkan gentamycin 5 mg/mL menjadi gentamycin 2 mg/mL)
    - g. Sejumlah 50 µL gentamycin 5 mg/mL dihisap dengan micropipette, ditaruh ke 1.5 mL Eppendorf tube,
    - h. Tambahi 75 µL aquadest kepada *ependrof tube*.
    - i. Vortex (*spin down*) untuk homogenasi.
- 
4. DNA protection assay (35 µg/mL gentamycin)
    - 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 0.4 µL larutan 1 mg/mL gentamycin.
    - c. Tambahi 0.42 µL larutan DNase 1 25 mg/dL
    - d. Homogenkan dengan pipet mikro
    - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
  5. DNA protection assay (70 µg/mL gentamycin)
    - 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 0.76 µL larutan 1 mg/mL gentamycin.
    - c. Tambahi 0.43 µL larutan DNase 1 25 mg/dL
    - d. Homogenkan dengan pipet mikro
    - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
  6. DNA protection assay (140 µg/mL gentamycin)
    - 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 1.64 µL larutan 1 mg/mL gentamycin.
    - c. Tambahi 0.47 µL larutan DNase 1 25 mg/dL

- d. Homogenkan dengan pipet mikro
  - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
7. DNA protection assay (280 µg/mL gentamycin)
- 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 3.93 µL larutan 1 mg/mL gentamycin.
  - c. Tambahi 0.56 µL larutan DNase 1 25 mg/dL
  - d. Homogenkan dengan pipet mikro
  - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
8. DNA protection assay (560 µg/mL gentamycin)
- 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 3.93 µL larutan 2 mg/mL gentamycin.
  - c. Tambahi 0.56 µL larutan DNase 1 25 mg/dL
  - d. Homogenkan dengan pipet mikro
  - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
9. DNA protection assay (1120 µg/mL gentamycin)
- 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 2.92 µL larutan 5 mg/mL gentamycin.
  - c. Tambahi 0.52 µL larutan DNase 1 25 mg/dL
  - d. Homogenkan dengan pipet mikro
  - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
10. DNA protection assay (1500 µg/mL gentamycin)
- 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 4.33 µL larutan 5 mg/mL gentamycin.
  - c. Tambahi 0.58 µL larutan DNase 1 25 mg/dL
  - d. Homogenkan dengan pipet mikro
  - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
11. DNA protection assay (2240 µg/mL gentamycin)
- 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 8.20 µL larutan 1 mg/mL gentamycin.
  - c. Tambahi 0.73 µL larutan DNase 1 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 µL 0.5 M EDTA di atas es kepada masing-masing tabung (point 4-11).

---

## 2. NEOMYCIN + BACITRACIN

**Neomycin molecular weight: 461.44**

Neomycin disediakan dalam 0, 0.1, 0.5, dan 2.0 mM

---

1. Buat larutan stock (20 mM) Neomycin (Nebacetin)
  - a. Timbang 0.0123 g Nebacetin
  - b. Larutkan dengan 1 mL aquadest
  - c. *Vortex to homogenize the solution*

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

---
3. DNA protection assay (0.1 mM neomycin)
  - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1  $\mu$ L (1  $\mu$ g larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1  $\mu$ L = 1  $\mu$ g DNA)
  - b. Tambahi 0.1  $\mu$ L larutan 10 mM neomycin.
  - c. Tambahi 0.41  $\mu$ L 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 neomycin)
  - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1  $\mu$ L (1  $\mu$ g larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1  $\mu$ L = 1  $\mu$ g DNA)
  - b. Tambahi 0.1  $\mu$ L larutan 20 mM neomycin.
  - c. Tambahi 0.41  $\mu$ L 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 neomycin)
  - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1  $\mu$ L (1  $\mu$ g larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1  $\mu$ L = 1  $\mu$ g DNA)
  - b. Tambahi 0.2  $\mu$ L larutan 20 mM neomycin.
  - c. Tambahi 0.41  $\mu$ L 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 neomycin)
  - a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1  $\mu$ L (1  $\mu$ g larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1  $\mu$ L = 1  $\mu$ g DNA)

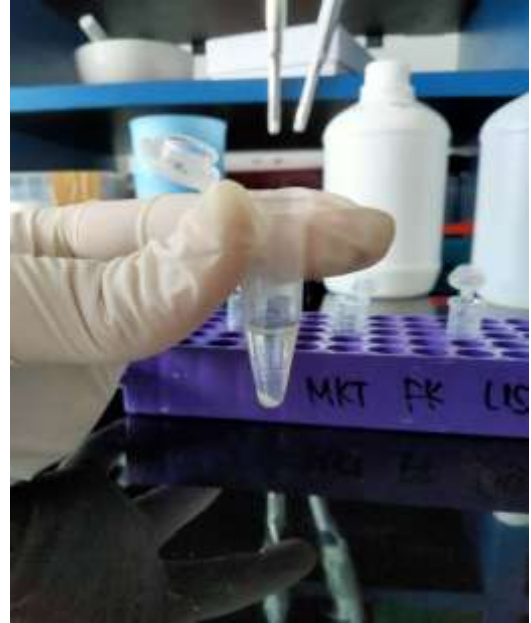
- b. Tambahi 0.41  $\mu\text{L}$  larutan 20 mM neomycin.
  - c. Tambahi 0.42  $\mu\text{L}$  larutan DNase I 25 mg/dL
  - d. Homogenkan dengan pipet mikro
  - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit
7. DNA protection assay (1.6 mM neomycin)
- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}$  larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1  $\mu\text{L}$  = 1  $\mu\text{g}$  DNA)
  - b. Tambahi 0.82  $\mu\text{L}$  larutan 20 mM neomycin.
  - c. Tambahi 0.44  $\mu\text{L}$  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 neomycin)
- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}$  larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1  $\mu\text{L}$  = 1  $\mu\text{g}$  DNA)
  - b. Tambahi 1.12  $\mu\text{L}$  larutan 20 mM neomycin.
  - c. Tambahi 0.45  $\mu\text{L}$  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 neomycin)
- a. Hisap dengan mikropipet sejumlah 10.1  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}$  larutan DNA stock, lihat file excel untuk sampel yang 10.1  $\mu\text{L}$  = 1  $\mu\text{g}$  DNA)
  - b. Tambahi 1.92  $\mu\text{L}$  larutan 20 mM neomycin.
  - c. Tambahi 0.48  $\mu\text{L}$  larutan DNase I 25 mg/dL
  - d. Homogenkan dengan pipet mikro
  - e. Inkubasi di suhu 37°C selama 10 menit

---

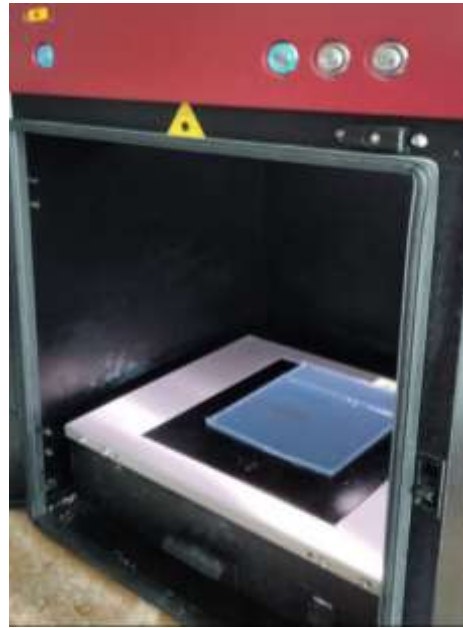
Stop the DNA protection assay dengan menambahkan 5  $\mu\text{L}$  0.5 M EDTA di atas es kepada masing-masing tabung (point 3-9).

---

## Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian









## Lampiran 6. Artikel Publikasi

### PENGARUH GENTAMISIN DAN NEOMYCIN+BACITRACIN TERHADAP AKTIVITAS DEOKSIRIBONUKLEASE I PADA KUALITAS DNA MANUSIA ASAL SALIVA

Siti Chairani<sup>1)</sup>, Zulham<sup>2)</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Medicine, Muhammadiyah University of Sumatera Utara*

<sup>2</sup>*Departement of Parasitology, Muhammadiyah University of Sumatera Utara*

*Corresponding Author : Zulham*

*Muhammadiyah University of Sumatera Utara*

[stchairaniarf@gmail.com](mailto:stchairaniarf@gmail.com)<sup>1)</sup>, [dr\\_zulham@yahoo.com](mailto:dr_zulham@yahoo.com)<sup>2)</sup>

#### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Deoxyribonucleic acid (DNA) dapat ditemukan pada saliva dan berbagai sumber lainnya. Saliva mengandung sel-sel epitel dan leukosit yang dilepaskan ke rongga mulut. Sel-sel dalam saliva berpotensi sebagai sumber DNA untuk kepentingan diagnostik. DNA dalam saliva dapat menjadi rusak karena aktivitas deoksiribonuklease (DNase), enzim yang mampu mengkatalisis hidrolisis DNA. DNase I diekspresikan oleh sel eksokrin dan DNase II diekspresikan oleh sel makrofag. Penghambatan aktivitas DNase akan mempreservasi DNA. Selain mampu membunuh bakteri, aminoglikosida (gentamisin dan neomisin) mempunyai kemampuan menghambat DNase. **Metode:** Saliva dikumpulkan dari 8 subjek. Selanjutnya, sampel saliva dari masing-masing subjek dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (K1), kontrol positif (K2), Gentamisin (K3), Neomycin + Bacitracin (K4). DNA diekstraksi dari saliva dengan metode spin column. DNA dari kelompok K3 dan K4 ditambahi 1 mg/mL gentamisin dan 20 mM neomycin + bacitracin, masing-masingnya, sebelum penambahan 2,5 µg/mL DNase I (*DNA degradation assay*). Kualitas DNA genom manusia asal saliva ditentukan dengan keberadaan amplicon gen *NOTCH2* (~704 bp). DNA diseparasi dengan elektroforesis agarose gel 1% dan direkam dengan *gel documentation system*. **Hasil:** Ekstraksi DNA dari saliva dengan metode spin column memberikan rerata konsentrasi 26,49 ± 30,70 ng/mL dan rerata kemurnian 1,819 ± 0,122. Pemberian akuades sebagai kontrol negatif pada *DNA degradation assay* menunjukkan tidak ada DNA yang tercerna. Gentamisin menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I pada konsentrasi 35 µg/mL sementara neomycin + bacitracin menghambat pada konsentrasi 0,8 mM. **Kesimpulan:** Kadar tertentu gentamisin dan neomycin + bacitracin menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I dan mempertahankan kualitas DNA genom manusia asal saliva.

**Kata kunci:** deoxyribonucleic acid, deoksiribonuklease, gentamisin, neomycin, saliva

## **Abstrack**

**Introduction:** Deoxyribonucleic acid (DNA) can be found in saliva and various other sources. Saliva contains epithelial cells and leukocytes that are released into the oral cavity. Cells in saliva are potential sources of DNA for diagnostic purposes. DNA in saliva can be degraded due to the activity of deoxyribonuclease (DNase), an enzyme that catalyzes the hydrolysis of DNA. DNase I is expressed in exocrine cells while DNase II is expressed in macrophages. Inhibition of DNase activity will preserve DNA. Besides being able to kill bacteria, aminoglycosides (i. e. gentamicin and neomycin) have the ability to inhibit DNase. **Methods:** Saliva was collected from 8 subjects. Furthermore, saliva samples from each subject were divided into 4 groups, namely negative control (K1), positive control (K2), gentamicin (K3), neomycin + bacitracin (K4). DNA was extracted from saliva using spin column method. DNA from groups K3 and K4 were added 1 mg/mL gentamicin and 20 mM neomycin + bacitracin, respectively, before adding 2.5 g/mL DNase I (DNA degradation assay). The quality of human genomic DNA from saliva was determined by the presence of the NOTCH2 gene amplicons (~704 bp). DNA was separated by 1% agarose gel electrophoresis and recorded using the gel documentation system. **Results:** The DNA extracted from saliva using spin column method had an average concentration of  $26.49 \pm 30.70$  ng/mL and an average purity of  $1.819 + 0.122$ . The administration of distilled water as a negative control in the DNA degradation assay showed that no DNA was digested. Gentamicin inhibited the activity of 2.5 mg/mL of DNase I at a concentration of 35 g/mL while neomycin + bacitracin inhibited it at a concentration of 0.8 mM. **Conclusion:** Certain levels of gentamicin and neomycin + bacitracin inhibited the activity of 2.5 mg/mL DNase I and maintained the quality of human genomic DNA from saliva.

**Keywords:** deoxyribonucleic acid, deoxyribonuclease, gentamicin, neomycin, saliva

## **PENDAHULUAN**

Deoxyribonucleic acid (DNA) merupakan makromolekul yang berbentuk polimer linier tersusun atas monomer nukleotida. Proses transkripsi dan translasi DNA menghasilkan produk berupa protein. DNA dapat ditemukan pada saliva, kulit, keringat, darah, gigi, rambut, lendir, sperma, dan cairan vagina.<sup>1</sup>

Saliva merupakan cairan oral yang bersifat asam (pH 6-7). Tiga

kelenjar mayor dan ribuan kelenjar minor saliva dalam rongga mulut merupakan komponen utama peyumbang saliva.<sup>2</sup> Saliva terdiri dari 99% air dan sisanya berupa protein, zat anorganik, dan organik. Cairan krevikular gingiva, debris sel, plak, bakteri, sekresi hidung, sel epitel, darah, dan zat eksogen juga terdapat dalam saliva. Sejumlah mikrobiota oral terdapat dalam saliva dan terdiri dari bakteri, arkae, jamur<sup>3</sup>, protozoa<sup>4</sup>, dan virus<sup>5</sup>. Sebagian besar

organisme dalam mikrobiota saliva dapat ditemukan hampir di semua individu sebagai flora normal. Flora normal ini terdiri dari Streptococcus, Neisseria, Rothia, Prevotella, Actinomyces, Granulicatella, Porphyromonia, Haemophilus, dan Porphyromonas spesies.<sup>6</sup> Dalam saliva dapat ditemukan sel-sel epitel yang dilepaskan mukosa rongga mulut.<sup>7</sup>

Sel-sel epitel yang dilepaskan ke saliva berpotensi digunakan sebagai sumber DNA untuk kepentingan diagnostik menggunakan sumber asam nukleat. Saliva mudah dikumpulkan karena tidak invasif dan jumlahnya banyak.<sup>7</sup> Sayangnya, upaya mendapatkan DNA manusia asal saliva menjadi tidak mudah karena kontaminan dalam saliva berpotensi merusak DNA manusia. Flora normal, enzim, hormon, imunoglobulin dan biomolekul lain yang disekresikan dalam saliva berpotensi segera merusak DNA manusia dalam saliva.<sup>7</sup>

Deoksiribonuklease (DNase) adalah enzim yang mampu mengkatalisis DNA.<sup>8</sup> Ada 2 jenis DNase. DNase I diekspresikan oleh sel eksokrin di saluran pencernaan. DNase II diekspresikan oleh sel makrofag yang berada di seluruh jaringan.<sup>9</sup> Penghambatan aktivitas DNase dapat menggunakan aminoglikosida.<sup>10</sup>

Penggunaan aminoglikosida dalam upaya mengawetkan DNA manusia asal saliva akan menguntungkan karena aminoglikosida menghambat aktivitas DNase sekaligus bersifat bakterisidal yang membunuh bakteri dalam saliva.<sup>8,11</sup> Aminoglikosida menghambat sintesis protein bakteri

dengan cara menghalangi proses inisiasi atau dengan mengubah konformasi asam amino.<sup>12</sup> Selain itu, aminoglikosida dapat masuk ke dalam sel bakteri lalu meningkatkan permeabilitas membran dengan melibatkan pengikatan elektrostatis dari aminoglikosida polikationik ke komponen bermuatan negatif, seperti fosfolipid, asam teikoat bakteri Gram-positif, dan fosfolipid dan lipopolisakarida bakteri Gram-negatif.<sup>12</sup>

Aminoglikosida yang digunakan berupa gentamisin dan neomycin + bacitracin merupakan jenis aminoglikosida yang dapat dibeli dengan harga murah dan juga mudah didapatkan. Selain itu gentamisin bekerja sebagai antibiotika dan inhibitor DNase.

Preservasi DNA manusia asal saliva mungkin dilakukan dengan menggunakan aminoglikosida. Penilaian atas keberhasilan preservasi dapat dinilai secara kuantitas dan kualitas. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh aminoglikosida terhadap aktivitas DNase pada kualitas DNA manusia asal saliva.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Penelitian dilakukan dari bulan Desember 2021 sampai Januari 2022. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Penelitian ini menggunakan saliva dan DNA saliva dari 8 subjek. Saliva dibagi dalam empat kelompok masing-masing terdiri atas : Kontrol negatif (K1) yang diberi Aquades, Kontrol positif (K2) yang diberi DNase I,

Kelompok perlakuan 1 yang diberi gentamisin (K3) dan Kelompok perlakuan 2 yang diberi neomycin + bacitracin (K4).

#### Prosedur penelitian

1. Pengumpulan saliva dari 10 subjek yang telah dikumpulkan di satu ruangan pukul 07.00 WIB dan tidak diperbolehkan untuk sikat gigi dan berkumur dengan cairan pembersih mulut. Subjek diinstruksikan untuk tidak makan dan minum selama 90 menit sebelum pengambilan saliva. Selanjutnya subjek diberikan waktu 10 menit untuk proses meludah di pot saliva.
2. Persiapan Isolasi DNA. Masing-masing saliva sebanyak 2 mL dimasukkan dalam microtube kemudian dilakukan Isolasi DNA menggunakan metode spin column dengan melihat kemurnian DNA dengan spektrofotometri UV-Vis dan dihitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), dan nilai kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0.
3. Kontrol negatif (K1). Sejumlah 1  $\mu\text{g}$  DNA saliva diberi penambahan aquadest.
4. Kontrol positif (K2). Sejumlah 1  $\mu\text{g}$  DNA saliva diberi perlakuan *DNA degradation assay* dengan penambahan 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase I (DN25, Merck).
5. Kelompok perlakuan (K3). Sejumlah 1  $\mu\text{g}$  DNA saliva akan ditambahi 1 mg/mL antibiotika jenis gentamisin dan 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase I (*DNA degradation assay*).
6. Kelompok perlakuan (K4). Sejumlah 1  $\mu\text{g}$  DNA saliva akan ditambahi 20 mM antibiotika

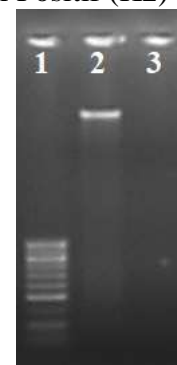
jenis neomycin + bacitracin dan 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase I (*DNA degradation assay*)

7. Pengujian DNA dengan gel agarose 1%. Sebanyak 1,3 g agarose 1% dimasukkan dalam erlenmeyer flask dan diberi 130 mL TAE buffer 1X.
8. Persiapan PCR. Metode PCR dijalankan dengan menggunakan 25  $\mu\text{L}$  campuran reaksi PCR yang mengandung 1 ng DNA saliva sebagai *template*, 1  $\mu\text{M}$  untuk setiap primer, serta 200  $\mu\text{M}$  untuk setiap dNTP, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  5X dapar penyangga PCR dan juga 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq polimerase DNA dalam *PCR mastermix* (2GFRMKB, Kapa2G Fast ReadyMix, Merck).

#### HASIL PENELITIAN

Data hasil penelitian berikut merupakan data yang diperoleh dari 4 kelompok uji yakni kelompok kontrol negatif (K1), kontrol positif (K2), kelompok perlakuan yang diberi gentamisin (K3) dan kelompok perlakuan yang diberi neomycin + bacitracin (K4) yang masing-masing telah diberikan DNA saliva sejumlah 1  $\mu\text{g}$ .

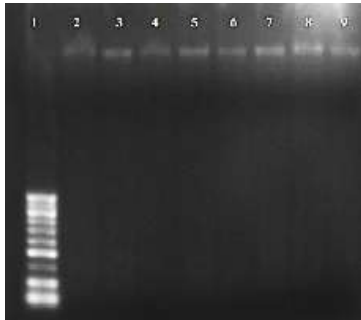
- A. Kontrol Negatif (K1) dan Kontrol Positif (K2)



Gambar 4.1 *DNA degradation assay*  
Gambar 4.1 adalah perlakuan dengan konsentrasi 10  $\mu\text{L}$ . Lane 1 berisi DNA

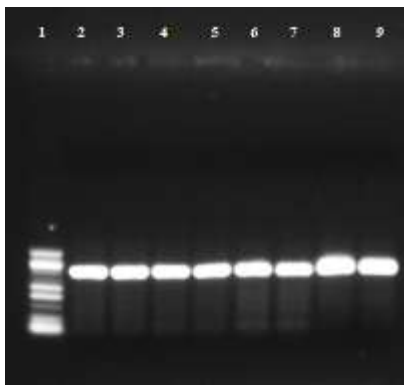
*ladder* 100 bp. Lane 2 adalah kontrol negatif yaitu 1 µg DNA + akuades. Lane 3 adalah kontrol positif mengandung 1 µg DNA + 2,5 µg/mL DNase I.

#### B. Kelompok perlakuan 1 (K3)



Gambar 4.2 Pengaruh gentamisin dalam *DNA degradation assay*.

Keberadaan gentamisin telah mencegah pencernaan DNA oleh DNase I. Lane 1 berisi *DNA ladder* 100 bp. Masing-masing lane 2-9 berisi 1 µg DNA yang telah ditambahi gentamisin 35, 70, 140, 280, 560, 1120, 1500, 2240 µg/mL, serta mendapat 2,5 mg/mL DNase I. Elektroforesis DNA dilakukan gel agarose 1% dengan kondisi 80 mV, 400 mA, dan 90 menit.



Gambar 4.3 Hasil PCR gen *human NOTCH2* dari sampel DNA yang mendapat penambahan berbagai konsentrasi gentamisin dan 2,5 mg/mL DNase I.

Gen *human NOTCH2* (~704 bp) berhasil diamplifikasi dari semua sampel DNA. Lane 1 berisi *DNA ladder* 100 bp. Masing-masing lane 2-9 berisi 1 µg DNA yang telah ditambahi gentamisin

35, 70, 140, 280, 560, 1120, 1500, 2240 µg/mL, serta mendapat 2,5 mg/mL DNase I. Elektroforesis DNA dilakukan gel agarose 1% dengan kondisi 80 mV, 400 mA, dan 90 menit.

#### C. Kelompok perlakuan 2 (K4)



Gambar 4.4 Pengaruh neomycin dalam *DNA degradation assay*.

Konsentrasi neomycin menentukan pencernaan DNA oleh DNase I. Konsentrasi 0,8 mM telah memberikan penghambatan minimal terhadap aktivitas 2,5 mg/mL DNase I. Lane 1 berisi *DNA ladder* 100 bp. Masing-masing lane 2-8 berisi 1 µg DNA yang telah ditambahi Nebacetin® 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 mM, serta mendapat 2,5 mg/mL DNase I. Elektroforesis DNA dilakukan gel agarose 1% dengan kondisi 80 mV, 400 mA, dan 90 menit.



Gambar 4.5 Gen *human NOTCH2* dengan pengaruh preservasi DNA dengan penambahan neomycin dalam *DNA degradation assay*. Keberadaan gen *human NOTCH2* (~704 bp) pada elektroforesis gel agarose 1%. Lane 1 berisi *DNA ladder* 100 bp, Lane

2 berisi nebacetin 0,1 mM, Lane 3 berisi nebacetin 0,2 mM, Lane 4 berisi nebacetin 0,4 mM, Lane 5 berisi nebacetin 0,8 mM, Lane 6 berisi nebacetin 1,6 mM, Lane 7 berisi nebacetin 2.0 mM, Lane 8 berisi 3.2 mM.

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh antibiotika jenis aminoglikosida terhadap aktivitas DNase I pada kualitas DNA manusia asal saliva dengan menggunakan metode spin colum sebagai metode isolasi DNA. Serta mengetahui pengaruh gentamisin dan neomycin + bacitracin terhadap aktivitas DNase I pada gen *human NOTCH2* dan menentukan dosis minimal dari gentamisin dan neomycin + bacitracin dalam penghambatan aktivitas DNase I pada DNA genom manusia asal saliva yang dinilai melalui elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) dan diikuti dengan visualisasi di bawah cahaya UV setelah pewarnaan etidium bromida (EtBr) dilakukan dengan mempertimbangkan keberadaan hasil PCR berupa satu band berukuran ~704 bp.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah disajikan diatas, ekstraksi DNA yang dilakukan dengan metode spin column sudah sesuai dengan kaidah rerata kemurnian yaitu 1,8-2.0. Kemudian penggunaan gentamisin dengan konsentrasi 35 µg/mL sudah cukup untuk mencegah pencernaan 1 µg DNA oleh 2,5 mg/mL DNase I dan penggunaan neomycin + bacitracin dengan konsentrasi 0,8-2,0 mM sudah cukup dalam mencegah pencernaan 1 µg DNA oleh 2,5 mg/mL DNase I.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh McGuire AL pada tahun 2015 menggunakan antibiotik berupa gentamisin. McGuire Al menyatakan pada konsentrasi >35 µg/mL gentamisin dapat menghambat 2,5 mg/mL DNase I.<sup>13</sup> Kemudian pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Misagh Alipour pada tahun 2009 menyatakan kombinasi antara DNase dan gentamisin dapat meningkatkan kerja dari gentamisin dengan minimal konsentrasi sebesar 64 µg/mL.<sup>14</sup>

Penggunaan antibiotik berupa neomycin + bacitracin juga dilakukan oleh Ana Kolarevic pada tahun 2014 dan Markus Woegerbauer pada tahun 2000 yang menyatakan neomycin dapat menghambat aktivitas DNase I pada konsentrasi neomycin 2 mM.<sup>15,16</sup> Sedangkan bacitracin tidak memiliki pengaruh yang besar terhadap DNase I. Hal ini diperkuat dengan penelitian yang dilakuakn oleh Jerzy Ciesiolka pada tahun 2014 yang menyatakan bacitracin dapat menginduksi degradasi DNA. Akan tetapi penggunaan bacitracin dalam menginduksi degradasi DNA harus lebih besar konsentrasinya, bahkan dengan konsentrasi 23 mM tidak mengubah migrasi DNA plasmid dalam gel agarose 1%. Maka dalam studi ini, penggunaan neomycin jauh lebih berperan dibanding bacitracin yang tidak memiliki efek terhadap 2,5 mg/mL DNase I.

## KESIMPULAN

1. Gentamisin dan neomycin + bacitracin dapat menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I sehingga mempertahankan

kualitas DNA utuh genom manusia asal saliva.

2. Gentamisin dan neomycin + bacitracin menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I sehingga mempertahankan gen *NOTCH2* (704 bp)
3. Gentamisin dapat menghambat aktivitas 2,5 mg/mL DNase I pada kualitas DNA genom manusia asal saliva pada konsentrasi 35 µg/mL sementara neomycin + bacitracin menghambat pada konsentrasi 0,8 mM.

#### DAFTAR PUSTAKA

- a. Syaifiatul H. DNA Sebagai Bukti Untuk Memecahkan Tindakan Kriminal. *Semin Nas Humanira Apl Teknologi Inf.* 2017;(1):231.
  - b. Carreras-presas CM. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp Biol Med.* 2017;1:459-472.
  - c. Valentijn-benz M, Nazmi K. Growth of *Candida albicans* in human saliva is supported by low-molecular-mass compounds. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(1):1-8.
  - d. Khairnar K, Parija SC. Detection of *Entamoeba histolytica* DNA in the saliva of amoebic liver abscess patients who received prior treatment with metronidazole. *J Heal Popul Nutr.* 2008;26(4):418-425.
  - e. Samaranayake L. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem Oral ecology Oral microbiome Dental plaque biofilms Saliva. *Dent Clin N Am.* 2017;61:199-215.
  - f. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci.* 2017;59(2):201-206.
  - g. Brozoski DT, Santos CF. Human DNA extraction from whole saliva. *J Applied Oral Sci.* 2017;25:147-158.
  - h. Kolarevic A, Yancheva D. Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2014;88(30):1-11.
  - i. Keyel PA. Dnases in health and disease. *Dev Biol.* 2017;429(1):1-11.
  - j. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides : An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(1):1-19.
  - k. Kandou PRD. Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih. *Pharmacon J Ilm Farm.* 2016;5:123-129.
  - l. Krause KM, Serio AW. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(1):1-19.
  - m. 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):1-15
14. Alipour M, Suntres ZE, Omri A. Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(2):317-325.

15. Kolarevic A, Yancheva D,  
Kocic G, Smelcerovic A.  
Deoxyribonuclease inhibitors.  
*Eur J Med Chem.*  
2014;88(30):1-11.
  
16. Woegerbauer M, Burgmann  
H, Davies J, Graninger W.  
DNase I induced DNA  
degradation is inhibited by  
neomycin. *J Antibiot (Tokyo).*  
2000;53(3):276-285



