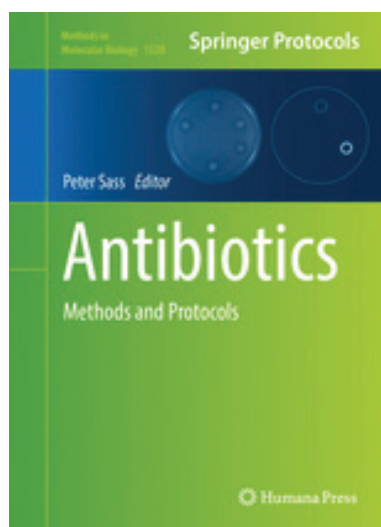


RESENSI SERI *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*

Retno Ardhani

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada



Judul : *Antibiotics: Methods and Protocols*
Editor : Peter Sass (Editor)
ISBN : 978-1-4939-6632-5
ISBN : 978-1-4939-6634-9 (eBook)
DOI : 10.1007/978-1-4939-6634-9
Penerbit : Humana Press

Sejarah telah mencatat andil penelitian dalam menciptakan kehidupan yang lebih baik. Salah satunya penemuan antibiotik pada 1940an yang diawali dari pengamatan Alexander Fleming pada 1928 terhadap fenomena kematian bakteri *Staphylococcus* dalam cawan petri yang juga ditumbuhi jamur. Sebelum ditemukan antibiotik, tidak ada obat untuk pneumonia, gonorrhoea atau demam rematik sehingga rumah sakit dipenuhi pasien sedangkan tidak banyak yang dapat dilakukan dokter

untuk menolong. Tidak mengherankan jika kemudian Alexander Fleming bersama Howard Florey, Ernst Chain yang merupakan tim penemu antibiotik penicillin, dianugerahi Nobel Prize untuk Fisiologi dan Kedokteran pada 1945.

Masa gemilang antibiotik sebagai obat pilihan untuk infeksi bakteri kini semakin meredup seiring dengan merebaknya resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik dapat terjadi karena bakteri memiliki kemampuan adaptasi sehingga dapat mengurangi efektivitas kerja obat, bahan kimia, atau agen lain yang didesain untuk menyembuhkan atau mencegah infeksi. Dikarenakan bahwa kemampuan ini, bakteri justru dapat terus memperbanyak diri dan menyebabkan penyakit lebih lanjut. Kemampuan resistensi bakteri tampaknya berkembang seiring pengembangan antibiotik sehingga saat ini dunia dihadapkan pada

teror infeksi *multi-drugs resistance*. Hal ini menggarisbawahi makin kuatnya kebutuhan pengembangan antibiotik dengan mekanisme aksi yang baru serta memiliki karakteristik yang dapat mencegah terjadinya resistensi.

Edisi *Antibiotic Research Protocols* dari seri *Springer Methods in Molecular Biology* merupakan buku yang dapat dijadikan alternatif referensi oleh para penggiat penelitian bidang pengembangan obat, khususnya antibiotik. Kontributor *Antibiotic Research Protocols* mayoritas berasal dari universitas di Jerman dan sebagian dari Italia, Inggris, Portugal, Amerika Serikat, Jepang, dan Arab Saudi sedangkan editor Peter Sass merupakan peneliti dari *Interfaculty Institute for Microbiology and Infection Medicine, Microbial Bioactive Compounds, University of Tübingen, Jerman*. Buku yang dibagi menjadi tiga tema utama ini ditulis untuk memberikan gambaran *state-*

of-the-art dan metode-metode terkini untuk melakukan isolasi dan purifikasi antibiotik, identifikasi mekanisme antimikroba, juga metode analisis serta deteksi strategi adaptasi yang dimiliki oleh mikroba.

Tema pertama adalah *Production and Design*, dibahas dalam enam bab, yaitu *Antibiotics: Precious Good in Changing Times*, *Mining Bacterial Genomes for Secondary Metabolite Gene Clusters*, *Production of Antimicrobial Compounds by Fermentation*, *Structure Elucidation of Antibiotics by NMR Spectroscopy*, *Computer-Aided Drug Design Methods*, dan *Cytotoxicity Assays as Predictors of the Safety and Efficacy of Antimicrobial Agents*. Pada Bab 1(satu) *Antibiotics: Precious Good in Changing Times*, Peter Sass sendiri memberikan kontribusi tulisan yang menjelaskan berbagai antibiotik yang sudah dikembangkan, target kerjanya serta ulasan mengenai inovasi antimikroba terkini yang dikembangkan beserta mekanisme aksi terbaru yang telah ditemukan. Melalui tulisan tersebut, Peter Sass meyakinkan pembaca bahwa area penelitian antibiotik masih luas dan penelitian untuk menemukan strategi mengatasi resistensi antimikroba sangat diperlukan.

Alaminya, berbagai bakteri menghasilkan antibiotik sebagai metabolit sekunder yang digunakan untuk menghadapi musuh alami atau kompetitor yang bersaing memperebutkan sumber makanan. Salah satu strategi yang dapat dipertimbangkan untuk menemukan bahan antibakteri baru adalah dengan mendata genom-genom bakteri yang berperan dalam biosintesis metabolit sekunder seperti dijelaskan dalam Bab 2 (dua) *Mining Bacterial Genomes for Secondary Metabolite Gene Clusters*. Seiring kemajuan teknik *sequencing* dan pengetahuan bahwa mayoritas antibiotik yang digunakan di klinik merupakan metabolit sekunder bakteri, perkembangan penelitian untuk menggali genom bakteri yang mengkode metabolit sekunder semakin banyak dilakukan. Pada Bab 2 (dua), kontributor memberikan panduan praktis untuk melakukan penelitian terkait identifikasi gen berbasis analisis komputasional yang dapat digunakan oleh peneliti untuk menyusun data genom dari

metabolit sekunder sasaran. Metode analisis komputasional yang digunakan diterapkan terhadap *Amycolatopsis orientalis* HCCBI007 dan *Amycolaptosis azura* DSM 43854 sebagai contoh untuk mempermudah pemahaman. Tahap selanjutnya setelah menemukan molekul yang akan dikembangkan menjadi obat antibiotik baru adalah melakukan proses produksi, baik untuk penelitian selanjutnya maupun sebagai dasar pengembangan produksi masal yang akan datang. Bab 3 (tiga) *Production of Antimicrobial Compounds by Fermentation* membahas langkah-langkah umum metode fermentasi pada medium padat dan cair yang dapat diikuti untuk memproduksi calon obat antibiotik dari mikroorganisme.

Analisis struktur merupakan hal penting untuk melakukan karakterisasi calon obat antibiotik. Pada Bab 4 *Structure Elucidation of Antibiotics by NMR Spectroscopy*, kontributor menjelaskan metode spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) yang memang sudah 30 tahun digunakan untuk mengetahui struktur antibiotik alami maupun sintesis. Informasi tentang struktur calon obat antibiotik merupakan dasar untuk melakukan optimasi dan produksi lebih lanjut, misalnya tahap desain obat. Bab 5 (lima) *Computer-Aided Drug Design Methods* memberikan pengetahuan mengenai metode komputasi yang dapat digunakan untuk mendesain obat, yang disebut *computer-aided drug design* (CADD). Terdapat dua jenis CADD, yakni *structure-based drug design* (SBDD) dan *ligand-based drug design* (LBDD). Keduanya dijelaskan pada Bab 5 (lima) dengan menekankan pada aspek metodologi dan target yang secara rutin telah digunakan di laboratorium kontributor dari University of Maryland, Amerika Serikat.

Keamanan agen antibiotik merupakan hal penting yang harus dibuktikan sebelum aplikasi klinis. Metode yang dijelaskan oleh kontributor pada Bab enam *Cytotoxicity Assays as Predictors of the Safety and Efficacy of Antimicrobial Agents* dapat memberikan jawaban atas pertanyaan apakah calon obat antibiotik yang diteliti bersifat toksik terhadap sel eukariotik atau tidak. Metode yang dijelaskan meliputi analisis sitotoksitas, pelepasan enzim laktat

dehidrogenasi, viabilitas sel menggunakan Resazurin, proliferasi sel dengan WST-1, dan uji hemolisis.

Tema kedua yang diangkat para kontributor adalah *Mode of Action* yang dijabarkan menjadi sembilan bab. Pada bagian ini kontributor menjelaskan berbagai metode untuk menggali mekanisme aksi antibiotik dan cara mendapatkan molekul yang memiliki kemampuan untuk menghambat jalur mekanisme biologis atau reaksi enzim tertentu.

Bagi pembaca yang tertarik dengan mekanisme aksi antibiotik melalui kemampuan merusak amplop sel bakteri, Bab 7 (tujuh) dengan judul *Application of a Bacillus subtilis Whole-Cell Biosensor (Pial-lux) for the Identification of Cell Wall Active Antibacterial Compounds* dapat dijadikan referensi. Pada Bab 7 (Tujuh) kontributor menggambarkan metode *whole-cell biosensors* yang dapat digunakan dalam penelitian terhadap kemampuan suatu molekul untuk merusak integritas dan sintesis dinding sel. Pada dasarnya biosensor berguna untuk memonitor kondisi lingkungan atau mengetahui ada tidaknya suatu molekul kimiawi. Dalam Bab 7 (tujuh), biosensor *Bacillus subtilis* digunakan untuk mendeteksi molekul penyusun dinding sel setelah paparan molekul calon obat antibiotik.

Bab 8, 9, 10 dengan judul *Determination of Bacterial Membrane Impairment by Antimicrobial Agents, Mass-Sensitive Biosensor Systems to Determine the Membrane Interaction of Analytes, dan Measurement of Cell Membrane Fluidity by Laurdan GP: Fluorescence Spectroscopy and Microscopy*, merupakan bagian yang membahas mengenai bagaimana melakukan penelitian terhadap molekul yang ditengarai memiliki kemampuan untuk mengganggu keseimbangan potensial membran dan kualitas kecairan atau fluiditas. Pada Bab 9 (sembilan), kontributor membahas mengenai penggunaan tetraphenyl phosphonium bromide (TTP) dan pengukuran kalium ekstraseluler untuk mendeteksi kerusakan membran, sedangkan pada Bab 10, tentang penggunaan biosensor mass-sensitive surface-acoustic wave (SAW) untuk mempelajari ikatan antara antibiotik dengan membran sel. Protokol rinci untuk

mengukur perubahan fluiditas membran akibat paparan antibiotik dijelaskan pada Bab 11.

Mekanisme aksi antibiotik lainnya adalah dengan menghambat metabolisme DNA. Pada Bab 11 yang berjudul *In Vitro Assays to Identify Antibiotics Targeting DNA Metabolism*, kontributor memberikan penjelasan rinci mengenai pemeriksaan kolorimetri primase-inorganic pyrophosphate yang dapat digunakan untuk melakukan skrining calon obat antibiotik yang berpotensi menghambat metabolisme bakteri. Di tingkat yang lebih kecil, ada pula antibiotik yang mampu menghambat proses metabolisme dan translasi RNA. Metode skrining terkini untuk meneliti obat-obat yang diperkirakan dapat menghambat enzim ribonuclease P yang berperan pada proses maturasi prekursor tRNA dijelaskan pada Bab 12, *Fluorescence-Based Real-Time Activity Assays to Identify RNase P Inhibitors*. Protokol yang disampaikan kontributor pada Bab 12 adalah aplikasi fluorescence polarization/anisotropy (FP/AP) untuk mengukur aktivitas RNase P yang menentukan konstanta disosiasi pra-tRNA. Bab 13 *Reporter Gene-Based Screening for TPP Riboswitch Activators* dan Bab 14 *Cell-Based Fluorescent Screen to Identify Inhibitors of Bacterial Translation Initiation* menambahkan penjelasan metode skrining molekul yang berpotensi menghambat inisiasi translasi. Bab 15 *Bacterial Histidine Kinases: Overexpression, Purification, and Inhibitor Screen* merupakan bagian terakhir dari tema kedua. Pada Bab 15, kontributor menjelaskan metode untuk menemukan inhibitor histidine kinase bakteri. Enzim histidine kinase merupakan molekul yang memiliki peran penting dalam mekanisme terjadinya resistensi antibiotik. Selain protokol standar ekspresi rekombinan dan purifikasi histidine kinase dan protein membran lain dari bakteri Gram-positif, Bab 15 juga memuat panduan analisis fosforilasi secara *in vitro* untuk melakukan skrining molekul antibiotik yang menjadikan histidine kinase sebagai target. Analisis berbasis fosforilasi tersebut memanfaatkan ATP berlabel radioaktif dan elektroforesis menggunakan gel phos-tag acrylamide.

Tema ketiga yang dibahas buku *Antibiotic Research Protocols* adalah *Response and Susceptibility*, berisi metode-metode yang dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme resistensi yang sekaligus bisa diterapkan untuk mengetahui aksi antibiotik baru yang akan dikembangkan kemudian. Kontributor Bab 16 *Expression Profiling of Antibiotic-Resistant Bacteria Obtained by Laboratory Evolution* dan Bab 17 *Sample Preparation for Mass-Spectrometry Based Absolute Protein Quantification in Antibiotic Stress Research* mengawali tema ini dengan meninjau metode *global expression profiling* untuk mempelajari *transcriptome* (Bab 16) dan *proteome* (Bab 17). Sebagai contoh, *Escherichia coli* yang dibuat menjadi resisten terhadap antibiotik di laboratorium diamati menggunakan *expression profiling* untuk mengetahui gen apa saja yang berubah setelah terjadi resistensi (Bab 16). Di tingkat protein, protokol analisis yang dijelaskan pada Bab 17 adalah kuantifikasi protein absolut.

Hingga saat ini kecenderungan penelitian antibiotik adalah berfokus pada respon ribosom terhadap stress akibat perubahan lingkungan, termasuk stres antibiotik. Bab 18 *Label-Free Quantification of Ribosomal Proteins from Bacillus subtilis for Antibiotic Research* memberikan gambaran mengenai teknik untuk melakukan karakterisasi perubahan stoikiometri dan komposisi protein ribosom dan protein lain yang berkaitan dengan ribosom selama stres antibiotik. Kondisi stres antibiotik mempengaruhi profil ekspresi protein dan ribosom yang hibernasi. Mekanisme resistensi bakteri juga dapat diteliti dari segi gen resistensi yang secara alami ada pada mikroorganisme di berbagai jenis

lingkungan. Metode yang dapat digunakan untuk mempelajari gen resistensi alami tersebut dibahas pada Bab 19 *Functional Metagenomics to Study Antibiotic Resistance*. Bab terakhir, Bab 20 *Epidemiology Surveillance and Typing Methods to Track Antibiotic Resistant Strains Using High Throughput Sequencing* memberikan sudut pandang lain untuk meninjau resistensi bakteri, yakni dari segi epidemiologi. Informasi mengenai berbagai jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan penyebarannya dalam masyarakat ditujukan untuk mengidentifikasi penanda epidemiologis dan faktor-faktor yang berperan dalam terjadinya resistensi antibiotik dan virulensi dari mikroorganisme resisten antibiotik itu sendiri. Protokol yang dijelaskan pada Bab 20 meliputi analisis data *high-throughput sequencing* (HTS) yang di antaranya diaplikasikan untuk menentukan ada tidaknya gen resisten antibiotik. Secara umum, buku *Antibiotic Research Protocols* memuat berbagai protokol yang dijelaskan secara rinci. Setiap bab dilengkapi dengan catatan yang memberikan informasi tambahan, tips, dan catatan khusus yang dapat digunakan untuk membantu aplikasinya di laboratorium. Hal ini tidak mengherankan karena sejak awal dalam bagian pengantar, editor Peter Sass menulis '*we would be pleased to see the book more often in your lab than in the library*'.

Referensi Tambahan:

www.acs.org (American Chemical Society)
www.nobelprize.org
www.cdc.gov (Center for Disease Control and Prevention)