



PERPUSTAKAAN PUSAT
UNIVERSITAS INDONESIA

UNIVERSITAS INDONESIA

**PELACAKAN GEN *iga Ureaplasma urealyticum* dengan
PELACAK GEN *iga PUTATIF Mycoplasma genitalium***

DISERTASI

**Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Biomedik
Pada Universitas Indonesia di Jakarta
dan untuk dipertahankan di hadapan Sidang Terbuka Senat Guru Besar
Universitas Indonesia di bawah pimpinan Rektor Universitas Indonesia
Profesor Doktor dokter Asman Boedisantoso Ranakusuma
Pada hari Rabu tanggal 19 Januari 2000 jam 13.00 WIB
di Ruang Sidang Program Pascasarjana Universitas Indonesia
Kampus Salemba Jakarta**

YOVITA HARMIATUN

PROGRAM PASCASARJANA

2000

D
575.12
Har
P

1/5



PERPUSTAKAAN PUSAT
UNIVERSITAS INDONESIA

UNIVERSITAS INDONESIA

**PELACAKAN GEN *iga Ureaplasma urealyticum* dengan
PELACAK GEN *iga PUTATIF Mycoplasma genitalium***

DISERTASI

**Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Biomedik
Pada Universitas Indonesia di Jakarta
dan untuk dipertahankan di hadapan Sidang Terbuka Senat Guru Besar
Universitas Indonesia di bawah pimpinan Rektor Universitas Indonesia
Profesor Doktor dokter Asman Boedisantoso Ranakusuma
Pada hari Rabu tanggal 19 Januari 2000 jam 13.00 WIB
di Ruang Sidang Program Pascasarjana Universitas Indonesia
Kampus Salemba Jakarta**

D
575.12
Har
P

YOVITA HARMIATUN

PROGRAM PASCASARJANA

2000



UNIVERSITAS INDONESIA

**PELACAKAN GEN *iga Ureaplasma urealyticum* dengan
PELACAK GEN *iga PUTATIF Mycoplasma genitalium***

DISERTASI

**Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Biomedik
Pada Universitas Indonesia di Jakarta
dan untuk dipertahankan di hadapan Sidang Terbuka Senat Guru Besar
Universitas Indonesia di bawah pimpinan Rektor Universitas Indonesia
Profesor Doktor dokter Asman Boedisantoso Ranakusuma
Pada hari Rabu tanggal 19 Januari 2000 jam 13.00 WIB
di Ruang Sidang Program Pascasarjana Universitas Indonesia
Kampus Salemba Jakarta**

YOVITA HARMIATUN

PROGRAM PASCASARJANA

2000

**PERPUSTAKAAN PUSAT
UNIVERSITAS INDONESIA**
Penyewaan/Modal dari

Diterima tgl: **12 APR 2001**

00328

Promotor

Profesor M.K. Tadjudin, dr.

Guru Besar Tetap Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Ko-Promotor

Profesor Dr.rer.med. Dr.habil Hans-Joachim Freisleben

Guru Besar Luar Biasa Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Purnomo Soeharso, Drs. PhD.

Dosen Tetap Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

KOMISI PENGUJI

Ketua :

Profesor Dr. Asman Boedisantoso Ranakusuma, dr. SpPD.
Guru Besar Tetap Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Rektor Universitas Indonesia.

Ketua Pelaksana:

Profesor Dr. Nana Subana
Guru Besar Tetap Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Anggota :

- 1. Profesor Maggy Suhartono, Ir. PhD.**
Guru Besar Tetap Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor
Peneliti pada Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor
- 2. Fera Ibrahim, dr. DSc.**
Dosen Tetap Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- 3. Purnomo Socharso, Drs. PhD.**
Dosen Tetap Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- 4. Herlina Yasmin Handoko, MSc. PhD.**
Dosen Tetap Fakultas Matematika Ilmu Pasti dan Pengetahuan Alam

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Pengasih, dan Maha Penyayang atas segala rahmat, karunia, bimbingan, kesehatan dan kekuatan yang telah dilimpahkanNya, hingga disertasi ini dapat penulis selesaikan.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Rektor Universitas Kristen Indonesia Profesor Dr. Ing. Tunggul Sirait dan Rektor sebelumnya Profesor Dr. Maurits Simatupang, atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Indonesia berikut pembiayaan pendidikan. Kepada Dekan Fakultas Kedokteran UKI bapak Bernard S.M. Hutabarat, dr. PAK dan Dekan sebelumnya, bapak Nico Lumenta, dr. SpPD., dan bapak Saut M.L. Toruan dr. DSA, penulis ucapkan banyak terima kasih atas kesempatan dan dorongan dalam mengikuti pendidikan ini hingga selesai. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada proyek bantuan Bank Dunia "University Research for Graduate Education" atas bantuan dana dalam penelitian *Ureaplasma urealyticum* ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Profesor M.K. Tadjudin, dr., selaku Promotor yang telah memberikan bantuan, bimbingan, dan dorongan demi terlaksananya penelitian ini hingga selesainya pembuatan disertasi.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Ko-promotor Profesor Dr. Hans-Joachim Freisleben, atas segala bantuan dan bimbingannya sejak saat penelitian hingga selesainya disertasi.

Kepada Ko-promotor bapak Purnomo Soeharso, Drs. PhD., penulis sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bimbingan, dorongan, dan bantuannya sejak awal hingga akhir penelitian yang begitu sarat dengan kesulitan.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Pembantu Rektor I UKI, bapak Atmonobudi Soebagyo, PhD, MSEE dan Pembantu Rektor I UKI sebelumnya, bapak ASL Rampen, dr. MS., dan bapak Zacheus Indrawan, Ir. ME, PhD, juga kepada Pembantu Rektor II UKI, ibu Ellen Gunawan, SE. MS., atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktor. Kepada seluruh Staf Pengajar di Bagian Biologi FKUKI tidak lupa pula penulis ucapkan terima kasih atas segala dorongannya.

Kepada Profesor Dr. N. Suhana selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik PPS UI yang tidak henti-hentinya memberikan semangat, agar penulis dapat menyelesaikan studinya, penulis ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Banyak terima kasih penulis sampaikan kepada Komisi Penguji disertasi: Profesor Dr. A.B. Ranakusuma, dr. SpPD, Profesor Dr. N. Suhana, Profesor Maggy Suhartono, Ir. PhD, ibu Fera Ibrahim, dr. DSc, dan ibu Herlina Yasmin, MSc. PhD., atas masukan-masukan dalam penulisan yang sangat berharga dalam penulisan disertasi.

Terima kasih yang sedalam-dalamnya penulis sampaikan kepada Kepala Bagian Biologi FKUI Profesor Dr. Oentoeng Soeradi, dan seluruh Staf Pengajar Bagian Biologi FKUI, atas kesempatan dan semangat yang telah diberikan kepada penulis untuk mempelajari ilmu kekhususan Biologi Kedokteran dan mengadakan penelitian dari awal hingga selesai di Bagian Biologi FKUI.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia, Profesor Dr. Wahyuning Ramelan dr. SpGn., dan direktur sebelumnya, Profesor Dr. Iskandar Wahidiyat, dr. SpA(K), dan Profesor Dr. Farid Anfasa Moeloek, dr. SpOG, dan juga kepada Rektor Universitas Indonesia Profesor Asman

Boedisantoso Ranakusuma dr. SpPD, dan Rektor sebelumnya Profesor M.K. Tadjudin, dr., atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan Program Doktor.

Kepada ibu Herawati Arusudoyo, dr. PhD dan ibu Patcharin, dr. PhD, penulis ucapkan banyak terima atas jasa pelayanannya dalam “sequencing” DNA hasil penelitian penulis.

Kepada semua rekan-rekan, Dr. Felix, Diana MS, Anita MS, Yuni MS, Tuti MS, Rosma MS, Dwi Ari MS, Yurnadi MS, Pujisari MS, dr Vita, Erlina, Dra., ungkapan terima kasih yang mendalam penulis sampaikan atas segala dorongan, bantuan, kerja sama, dan semangatnya bagi penulis, untuk menyelesaikan studi ini.

Kepada mbak Pur, Yuli, Yuni, Pak Mail, Pak Tarjo, Pak Haryo, Rukmana, mbak Herta, Sri, Pak Bagyo, dan Suki, terima kasih penulis ucapkan atas segala bantuannya.

Terima kasih yang tidak terhingga ananda haturkan kepada ayahanda Supomo Wignyosugito almarhum dan ibunda Maria Surati Supomo yang telah merawat, mendidik, membesarkan, dan selalu mendoakan ananda dengan penuh kasih sayang.

Khusus kepada suami dan anak-anakku: Mas Aris, Evi, Olin, Benny, Vanda, terimalah ungkapan terima kasihku yang tulus dan mendalam atas segala bantuan, kesabaran, dan pengorbanan serta doa-doa kalian selama studiku dari awal hingga selesai.

Jakarta, 19 Januari 2000

Penulis

DAFTAR ISI

UCAPAN TERIMA KASIH	i
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang penelitian	1
B. Permasalahan	5
C. Tujuan penelitian	6
D. Manfaat penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Gen <i>iga</i>	7
B. Bakteri <i>Mycoplasma genitalium</i> pembawa gen <i>iga</i> yang berkerabat dekat dengan <i>Ureaplasma urealyticum</i>	8
C. <i>Ureaplasma urealyticum</i> .	9
D. Imunoglobulin A	10
1. Imunoglobulin	10
2. Fungsi imunoglobulin A	12
3. Subkelas imunoglobulin A	13
E. Protease IgA1	14
1. Sifat dan aktivitas enzimatik protease IgA1	15
2. Aktivitas <i>in vivo</i> protease IgA1	19
3. Hilangnya fungsi efektor yang diperantarai oleh Fc α	20
4. Antibodi penetral anti- protease IgA1	21
5. Keseimbangan antara aktivitas protease dengan antibodi penetral	22

BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	24
A. Bahan dan rencana kerja	24
Skema kerja	27
B. Cara kerja	29
1. Pembiakan <i>U. urealyticum</i>	29
2. Isolasi genom <i>U. urealyticum</i>	30
3. Digesti genom <i>U. urealyticum</i>	31
4. Verifikasi pertumbuhan <i>U. urealyticum</i> dengan teknik PCR	31
5. Elektroforesis	32
6. Pembiakan <i>E. coli</i>	34
7. Isolasi plasmid	34
8. Digesti plasmid pUC18:: <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i>	36
9. Isolasi dan purifikasi gen <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i>	36
10. Transfer menurut cara Southern	37
10.1. Persiapan	37
10.2. Transfer	38
11. Hibridisasi	39
11.1. Prehibridisasi	39
11.2. Labelisasi pelacak	40
Prinsip labelisasi DNA Dig (digoksigenin) dan deteksi pelacak DNA Dig	40
11.3. Hibridisasi	41
11.4. Visualisasi	41
12. Perancangan primer dan amplifikasi gen <i>iga U. urealyticum</i>	42
13. "Sequencing" DNA	43
BAB IV. HASIL	44
A. Kultur <i>U. urealyticum</i>	44
B. Hasil isolasi dan digesti genom <i>U. urealyticum</i>	47
C. Hasil deteksi pertumbuhan <i>U. urealyticum</i> dengan amplifikasi gen <i>ure</i>	48
D. Hasil isolasi plasmid pUC18 dari kultur <i>E. coli sure2</i>	49
E. Hasil digesti plasmid pUC18:: <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i>	50
F. Hasil isolasi fragmen gen <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i>	51
G. Hasil hibridisasi antara fragmen gen <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i> dengan genom <i>U. urealyticum</i>	52

H. Hasil amplifikasi fragmen gen <i>iga U. urealyticum</i> dengan teknik PCR dengan menggunakan primer yang dirancang berdasarkan “sequence” gen <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i>	53
I. Hasil “sequencing” fragmen gen <i>iga U. urealyticum</i> produk PCR	55
BAB V. PEMBAHASAN	57
Patogenesis bakteri dalam hubungannya dengan protease IgA1	57
BAB VI. RINGKASAN, KESIMPULAN, DAN SARAN	64
A. Ringkasan	64
B. Kesimpulan	69
C. Saran	70
SUMMARY, CONCLUSIONS, AND SUGGESTION	71
A. Summary	71
B. Conclusions	75
C. Suggestion	76
DAFTAR PUSTAKA	77
RIWAYAT HIDUP	83

DAFTAR TABEL

I. FUNGSI EFEKTOR SEKUNDER IgA	13
II. REAKSI DIGESTI PLASMID PUC18:: <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i>	36



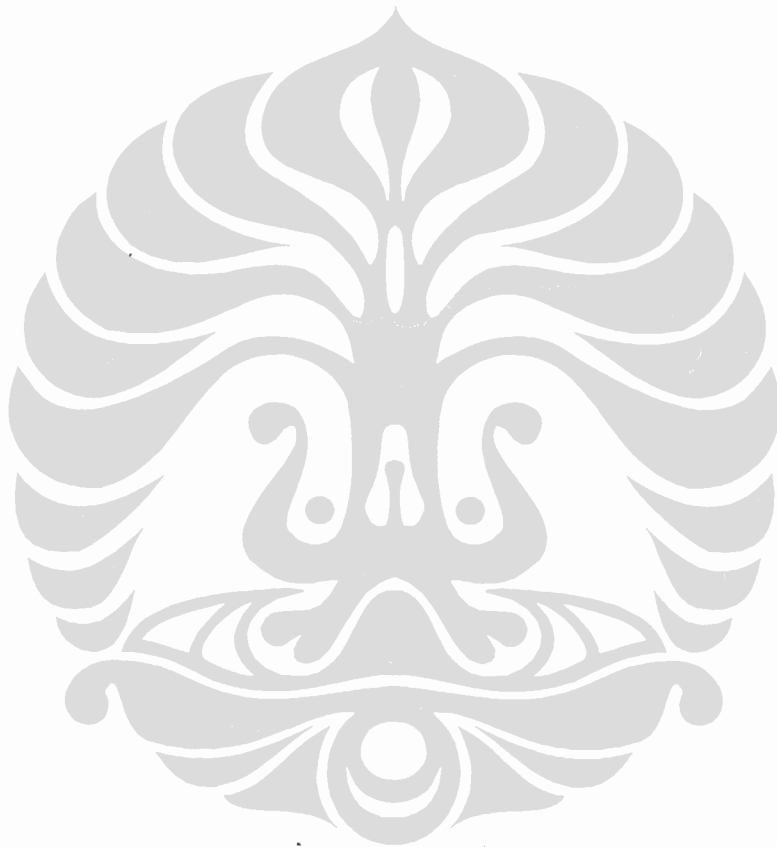
DAFTAR GAMBAR

1. Struktur dasar molekul imunoglobulin	11
2. Lokasi ikatan peptida pada rantai berat IgA1 manusia yang diputus oleh protease IgA1 mikroba	16
3. Jalur evolusi protease IgA1 bakteri	18
4. Hasil pemutusan IgA1 oleh protease IgA1	20
5. Elektroforesis gel mini agarosa	33
6. Visualisasi pita DNA dengan transiluminator UV	33
7. Transfer Southern blot	39
8. Kultur cair <i>U. urealyticum</i> dengan indikator "bromo thymol blue"	45
9. Kultur cair <i>U. urealyticum</i> dengan indikator "phenol red"	46
10. Kultur padat positif <i>U. urealyticum</i> dengan pewarnaan MnCl ₂ -urea	46
11. Hasil digesti genom <i>U. urealyticum</i> ATCC 27618 dengan <i>EcoRI</i>	47
12. Hasil amplifikasi gen <i>ure</i> <i>U. urealyticum</i> ATCC 27618 dengan PCR	48
13. Hasil isolasi plasmid pUC18 dari kultur <i>E. coli sure2</i>	49
14. Hasil digesti plasmid pUC18 dengan <i>BamHI</i> dan <i>EcoRI</i>	50
15. Hasil isolasi fragmen gen <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i>	51
16. Hasil hibridisasi gen <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i> dengan genom <i>U. urealyticum</i>	52
17. Hasil amplifikasi fragmen gen <i>iga</i> <i>U. urealyticum</i> produk PCR	53
18. Hasil hibridisasi fragmen gen <i>iga</i> <i>U. urealyticum</i> produk PCR dengan genom <i>U. urealyticum</i>	55
19. Homologi antara "sequence" gen <i>iga</i> putatif <i>M. genitalium</i> dan "sequence" gen <i>iga</i> <i>U. urealyticum</i> produk PCR	56

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

A	: Adenine
Ab	: Antibodi
Ag	: Antigen
ATP	: Adenosine triphosphate
C	: Cytosine
C _H	: Constant part of heavy chain
C _L	: Constant part of light chain
DNA	: Deoxyribose nucleic acid
^o C	: Derajat Celsius
CSPD	: Chemiluminescent signal detection
DIG-AP	: Digoxigenin-alkaline phosphate
dATP	: deoxy adenosine triphosphate
dCTP	: deoxy cytidine triphosphate
dGTP	: deoxy guanidine triphosphate
dTTP	: deoxy thymidine triphosphate
dNTP	: deoxy nuclotide triphosphate
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid
EtBr	: Ethidium bromide
Fab	: Antigen binding fragmen
Fc	: Crystalline fragment
G	: Guanine
g; g	: gram; gravitasi
l	: liter
IgA	: Immunoglobulin A
Gen <i>iga</i>	: Gen <i>protease IgA1</i>
Gen <i>ure</i>	: Gen <i>urease</i>
kb	: kilo basa
kDa	: kiloDalton
LB broth	: Luria Bertani broth
LB agar	: Luria Bertani agar
M	: Molar
mg	: miligram
ml	: mililiter
mM	: milimolar
N	: Normal
<u>N</u>	: Nukleotida
ORF	: Open reading frame
pb	: pasang basa
PCR	: Polymerase chain reaction
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
S-IgA	: Secretory immunoglobulin A
SSC	: Saline sodium citrate
TAE	: Tris HCl Acetic Acid-EDTA
T	: Thymine

ug	: mikrogram
ul	: mikroliter
um	: mikrometer
U. broth	: Ureaplasma broth
U. agar	: Ureaplasma agar
UV	: Ultra Violet
V_H	: Variable part of heavy chain
V_L	: Variable part of light chain
::	: Mendapatkan sisipan suatu gen



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar belakang penelitian

Ureaplasma urealyticum diklasifikasikan ke dalam kelas *Mollicutes*, ordo *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae* (Koneman *et al.*, 1992). Pada mulanya *U. urealyticum* lebih dikenal dengan sebutan *T-mycoplasma*, dan diketahui sebagai bakteri Gram-negatif, nonmotil, berukuran 0.2 – 0.25 um, tidak berdinding sel, dan berbentuk pleomorfik. *U. urealyticum* hanya diselubungi oleh membran plasma trilaminar, maka organisme ini tidak dihambat oleh antimikroba penghambat pembentukan dinding sel seperti golongan penisilin, basitrasin atau polimiksin-B (Marmion, 1989). *U. urealyticum* telah berhasil diisolasi dari tubuh binatang dan manusia. *U. urealyticum* dapat mengkolonisasi dan menginfeksi membran mukosa berbagai organ manusia (Phillips *et al.*, 1986; Marmion, 1989; Koneman *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994), meskipun demikian *U. urealyticum* juga dapat diisolasi dari orang-orang asimtomatik, sehingga organisme ini dapat digolongkan sebagai bakteri patogen oportunistik (Quinn *et al.*, 1985; Gibbs *et al.*, 1986; Koneman *et al.*, 1992).

Pada manusia *U. urealyticum* sering ditemukan pada saluran urogenital wanita dan pria. Menurut Koneman *et al.* (1992), frekuensi kolonisasi *U. urealyticum* pada saluran urogenital wanita berkisar antara 35% - 80%. Sementara itu menurut McCormack *et al.* (1972), McCormack *et al.* (1973), dan McCormack *et al.* (1975), frekuensi kolonisasi *U. urealyticum* pada saluran urogenital wanita berkisar antara 8.5% - 77.5% dan pada saluran urogenital pria berkisar antara 3% - 56%; frekuensi

kolonisasi ini erat hubungannya dengan umur, ras, pengalaman seksual, dan tingkatan sosio-ekonomi individu yang bersangkutan. *U. urealyticum* telah diketahui sebagai penyebab penyakit uretritis, vaginitis, servisit, salpingitis, infertilitas pada pria dan wanita, abortus, dan berat bayi lahir rendah (Cracea *et al.*, 1985; Taylor-Robinson, 1995; Cole *et al.*, 1996; Abele-Horn *et al.*, 1997; Clegg, *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 1999). Tjokronegoro *et al.* (1993) menyatakan bahwa kolonisasi *U. urealyticum* di dalam semen pria pasangan infertil tidak mempengaruhi motilitas dan kuantitas spermatozoa, namun pengaruhnya terhadap kemampuan sperma membuahi sel telur belum dapat disingkirkan. Pernyataan ini dapat dikaitkan dengan adanya kenyataan bahwa *U. urealyticum* dapat menyebabkan bocornya membran plasma sperma (Harmiatur, "submitted"). Bocornya membran plasma memungkinkan hilangnya enzim penetrasi sperma terhadap sel telur (hialuronidase, akrosin), sehingga dengan demikian sperma tidak mungkin lagi dapat membuahi sel telur. Kemungkinan bocornya membran plasma disebabkan oleh aktivitas suatu enzim. Kilian *et al.* (1996) menyatakan, protease IgA1 tipe-serin merupakan suatu golongan protein yang digunakan oleh berbagai kelompok bakteri Gram-negatif untuk kolonisasi dan invasi bakteri patogen pada sel target.

U. urealyticum telah berhasil diisolasi dari kultur darah wanita yang menderita demam postpartum. Kultur darah 10% wanita dengan demam postpartum mengandung *U. urealyticum* (Quinn *et al.*, 1983; Naessens *et al.*, 1989; Gauthier *et al.*, 1991).

U. urealyticum dihubungkan dengan adanya preeklamsia pada wanita hamil. Kecepatan terjadinya preeklamsia 3 kali lebih banyak pada wanita hamil yang urinnya

terkolonisasi *U. urealyticum* dibandingkan dengan wanita hamil yang tidak terkolonisasi oleh *U. urealyticum*. Patogenesis preeklamsia belum jelas, diduga *U. urealyticum*, seperti juga bakteri lain yang terlibat dalam bakteriuria, turut memberikan kontribusi terhadap proses kehamilan yang tidak normal (Koneman *et al.*, 1992).

Beberapa penelitian mengindikasikan bahwa *U. urealyticum* berkaitan dengan penyakit paru-paru kronik pada bayi prematur, bahkan juga dihubungkan dengan penyakit paru-paru kongenital yang fatal pada bayi yang lahir cukup bulan (Sanches and Regan, 1977; Quinn *et al.*, 1985; Syrogiannopoulos *et al.*, 1990; Cassell *et al.*, 1993; Heggie *et al.*, 1994). Beberapa studi prospektif menunjukkan korelasi yang kuat antara infeksi saluran nafas bagian bawah oleh *U. urealyticum* dengan perkembangan penyakit paru-paru kronik pada bayi (Cassell *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1998). Sekitar 45% bayi yang dilahirkan oleh ibu yang terkolonisasi *U. urealyticum* pada vaginanya, ternyata tubuhnya (misalnya saluran nafas), juga terkolonisasi oleh bakteri tersebut (Koneman *et al.*, 1992).

U. urealyticum dan *Mycoplasma hominis* ditemukan pula pada sistem saraf pusat sebagai penyebab meningitis pada periode perinatal. Infeksi karena *U. urealyticum* lebih berat dari pada infeksi karena *M. hominis*. Hal ini dapat dilihat dari hasil penelitian prospektif terhadap 100 bayi yang lahir tidak cukup bulan: 8 bayi terinfeksi *U. urealyticum* dan 5 bayi terinfeksi *M. hominis*. Dari kedelapan bayi yang terinfeksi *U. urealyticum*, 6 diantaranya mengalami pendarahan intraventrikuler, dari yang 6 ini tiga di antaranya mengalami hidrosefalus dan yang tiga lagi meninggal. Dari bayi yang terinfeksi *M. hominis* hanya satu yang menunjukkan tanda meningitis dan tidak seorang pun yang meninggal (Waites *et al.*, 1988; Waites *et al.*, 1990).

Telah dapat dibuktikan bahwa ketiga bakteri penyebab utama meningitis: *Haemophilus influenzae* (Saito *et al.*, 1999; Lomholt *et al.*, 1995), *Neisseria meningitidis* dan *Streptococcus pneumoniae* (Lomholt *et al.*, 1995) menghasilkan protease IgA1 yang memecah IgA1 manusia, maka disimpulkan bahwa protease IgA1 merupakan suatu faktor virulensi yang berkaitan dengan penyakit invasif tersebut (Lomholt *et al.*, 1995). Kapatais *et al.* (1985) menyatakan bahwa dari 28 galur *U. urealyticum* yang berhasil diisolasi dari saluran urogenital manusia, semuanya menghasilkan protease IgA1 yang memecah IgA1 manusia. Karena IgA1 merupakan pertahanan tubuh pada membran mukosa, diduga protease IgA1 merupakan faktor utama virulensi *U. urealyticum*, yang berperan pada tahap awal kolonisasi bakteri tersebut pada membran mukosa organ manusia. Pecahnya IgA1 membran mukosa mengakibatkan hilangnya pertahanan membran mukosa, sehingga *U. urealyticum* selanjutnya dapat menginfeksi membran mukosa dan menimbulkan berbagai penyakit seperti telah disebutkan di atas.

Di lain pihak banyak bakteri seperti *Streptococcus sanguis* (Gilbert *et al.*, 1988), *S. pneumoniae* (Lomholt, 1993; Wani *et al.*, 1996), *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, dan *Haemophilus influenzae* (Lomholt *et al.*, 1995), yang juga merupakan bakteri patogen pada membran mukosa manusia, menghasilkan protease untuk IgA1 (protease IgA1).

Pada beberapa mikroorganisme seperti *S. sanguis*, *S. pneumoniae* (Gilbert *et al.*, 1988; Wani *et al.*, 1996), *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, dan *H. influenzae* (Poulsen *et al.*, 1989; Lomholt *et al.*, 1995) sudah dapat dideteksi adanya protease IgA1, yang diekspresikan oleh gen *iga*. Berdasarkan penemuan tersebut diperkirakan

bahwa protease IgA1 yang dihasilkan oleh *Ureaplasma urealyticum* juga diekspresikan oleh gen *iga*.

Genom bakteri *Mycoplasma genitalium* yang mengkolonisasi dan menginfeksi membran mukosa saluran urogenital wanita dan pria, ternyata juga mempunyai rangkaian nukleotida (gen *iga* putatif) yang homolog dengan gen *iga* *Haemophilus influenzae* (Fraser *et al.*, 1995).

B. Permasalahan

Mengingat bahwa: (1). *U. urealyticum* dapat menimbulkan penyakit infeksi dan infertilitas pada pria dan wanita, serta dapat menyebabkan aborsi, morbiditas dan mortalitas pada bayi. (2). Penyakit infeksi serta infertilitas masih merupakan masalah utama di Indonesia. (3). Kemungkinan penyakit infeksi karena *U. urealyticum* juga banyak terdapat di Indonesia, sedangkan penelitian mendalam berkesinambungan tentang *U. urealyticum* belum pernah dilakukan di Indonesia. (4). Gen yang mengekspresikan protease IgA1 pada *Ureaplasma urealyticum* sampai sekarang belum berhasil diisolasi dan diidentifikasi, padahal gen *iga* tersebut mempunyai peranan penting dalam infeksi *U. urealyticum*. Berdasarkan hal-hal tersebut maka dalam penelitian ini dilakukan upaya: "Pelacakan Gen *iga* *Ureaplasma urealyticum* dengan Pelacak Gen *iga* Putatif *Mycoplasma genitalium*".

Penggunaan gen *iga* *M. genitalium* sebagai pelacak untuk gen *iga* *U. urealyticum* dalam penelitian ini berdasarkan atas beberapa pertimbangan: (1). *U. urealyticum* dan *M. genitalium* berkerabat dekat, keduanya termasuk dalam familia *Mycoplasmataceae*. (2). *U. urealyticum* dan *M. genitalium* dapat mengkolonisasi jaringan organ yang sama, yaitu membran mukosa saluran urogenital, dan keduanya

juga dapat mengakibatkan penyakit yang sama, yaitu uretritis dan infertilitas. (3). Adanya konservasi nukleotida antar organisme, terutama organisme yang mempunyai kekerabatan yang dekat seperti *U. urealyticum* dan *M. genitalium*. (4). Sudah ditemukannya gen *iga* putatif *M. genitalium* (Fraser *et al.*, 1995).

C. Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen *iga* *U. urealyticum* dan untuk memberikan informasi tentang adanya gen *iga* pada *U. urealyticum*.

Tujuan penelitian jangka panjang

1. Mengungkapkan seluruh gen *iga* *U. urealyticum*.
2. Merancang pemakaian gen *iga* *U. urealyticum* sebagai alat diagnosis.
3. Mempelajari patogenesis *U. urealyticum* dalam mengekspresikan protease IgA1.
4. Merancang terapi yang tepat terhadap infeksi *U. urealyticum*, dengan cara menghambat ekspresi gen *iga* dengan obat tertentu.

D. Manfaat penelitian

Dengan mengetahui adanya gen *iga* yang dapat mengekspresikan protease IgA1 (suatu factor virulensi penting pada *U. urealyticum*), dan dengan mempelajari perbedaan antara gen *iga* *U. urealyticum* patogen dan non-patogen, penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi penatalaksanaan infeksi *U. urealyticum*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Gen *iga*

Gen *iga* adalah rangkaian nukleotida pada genom bakteri patogen membran mukosa manusia, yang berfungsi mengekspresikan enzim protease IgA1. Gen *iga* telah berhasil diidentifikasi dan dikarakterisasi dari bakteri *S. sanguis* (Gilbert *et al.*, 1988), *S. pneumoniae* (Wani *et al.*, 1996), *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* (Lomholt *et al.*, 1995), dan *H. influenzae* (Poulsen *et al.*, 1989; Lomholt *et al.*, 1995).

Gen *iga S. sanguis* ATCC 10556 berupa satu fragmen DNA kromosom sepanjang 6 kb (Gilbert *et al.*, 1988). Gen *iga S. pneumoniae* galur R6 berupa satu fragmen DNA kromosom 6.2 kb, dengan kandungan C-G rendah (Wani *et al.*, 1996). Gen *iga H. influenzae* HK 715 berupa satu fragmen DNA kromosom sepanjang 5.5 kb dengan kandungan C-G agak rendah (Poulsen *et al.*, 1992). Gen *iga N. gonorrhoeae* berupa satu fragmen DNA kromosom sepanjang 5 kb. Gen *iga N. gonorrhoeae* yang berhubungan dengan "sequence" sinyal ekspresi seperti "sequence" Shine-Dalgarno, "sequence" promoter, dan "sequence" terminasi tersebut berfungsi untuk mengekspresikan protease IgA1 dari 1,532 asam amino, dalam bentuk preprotein. Preprotein tersebut kemudian mengalami autoproteolitik menjadi protease IgA1 yang berfungsi (Pohlner *et al.*, 1987). Gen *iga H. influenzae* HK 368 berupa satu fragmen DNA kromosom sepanjang 5 kb. Gen *iga* tersebut diketahui mempunyai fragmen yang homolog dengan gen *iga* putatif *M. genitalium*. Gen *iga H. influenzae* HK368 diketahui berhubungan dengan sinyal ekspresi seperti "sequence" Shine-Dalgarno,

“sequence” promoter, dan “sequence” terminasi. Gen *iga H. influenzae* HK 368 tersebut terbukti dapat mengekspresikan protease IgA1 dalam bentuk preprotein dari 1,541 residu asam amino. Protease IgA1 diekspresikan dalam bentuk preprotein dengan berat molekul 169 kDa, kemudian mengalami autoproteolitik pasca translasi menjadi protease IgA1 yang berfungsi katalitik, dengan berat molekul 100 kDa (Poulsen *et al.*, 1989). Fraser *et al.* (1995) mengemukakan, bahwa genom *M. genitalium* yang panjangnya sekitar 580.070 kb, mengandung “sequence” nukleotida yang homolog dengan gen *iga H. influenzae*. Pada genom *Ureaplasma* dan *Mycoplasma* kodon UGA dibaca sebagai kodon untuk triptofan, dan bukan sebagai kodon stop (Blanchard, 1990; Inamine *et al.*, 1990).

B. Bakteri *Mycoplasma genitalium* pembawa gen *iga* yang berkerabat dekat dengan *U. urealyticum*.

M. genitalium adalah mikroorganisme yang berkerabat dekat dengan *U. urealyticum*. Organisme tersebut merupakan anggota kelas *Mollicutes*, ordo *Mycoplasmatales* dan familia *Mycoplasmataceae*. *M. genitalium* dapat menginfeksi manusia, hewan dan tanaman. Pada manusia *M. genitalium* dapat mengkolonisasi traktus urogenitalis dan menyebabkan penyakit uretritis dan infertilitas (Weisburg *et al.*, 1989; Koneman *et al.*, 1992). Genom *M. genitalium* berupa sebuah kromosom sirkuler, terdiri atas 580. 070 kb, dengan kandungan C-G rendah yaitu 32% (A, 34%; C, 16%; G, 16%, dan T 34%). Genom tersebut merupakan genom paling kecil di antara prokariota. Dari 470 gen pada genom *M. genitalium* yang sudah diidentifikasi, terdapat gen-gen yang diperlukan untuk replikasi, transkripsi, translasi, reparasi DNA, transportasi seluler, metabolisme energi, dan fragmen gen *iga* putatif (Fraser *et al.*,

1995). Perbandingan antara genom *M. genitalium* dan genom *H. influenzae* memperlihatkan bahwa perbedaan dalam kandungan genom direfleksikan oleh perbedaan dalam fisiologi dan kapasitas metabolisme. Sebaliknya di antara kedua genom tersebut juga terdapat kemiripan yang tinggi, misalnya antara gen *iga* putatif *M. genitalium* dan gen *iga* *H. influenzae* kemiripannya lebih dari 51.3% (Fraser *et al.*, 1995).

C. *Ureaplasma urealyticum*

Ureaplasma urealyticum merupakan bakteri Gram-negatif yang tidak berdinding sel. Bakteri tersebut hanya diliputi oleh unit membran trilaminar atau membran plasma. Genom *U. urealyticum* adalah satu molekul DNA untai ganda, berukuran 750 kb, dengan kandungan C+G rendah, antara 27 – 30%. Karena ukuran genomnya kecil, maka kemampuan biosintesis organisme tersebut juga terbatas, sehingga pembiakan *U. urealyticum* membutuhkan substrat tambahan yang mengandung prekursor untuk biosintesis asam nukleat, protein dan lemak. Prekursor untuk biosintesis asam nukleat dan protein diperoleh dari medium pepton basal dan ekstrak khamir, sementara untuk biosintesis lipid dapat dipenuhi dengan menambahkan serum ke dalam medium pertumbuhannya (Koneman *et al.*, 1992). *Ureaplasma urealyticum* merupakan ureaplasma yang membutuhkan urea untuk pertumbuhannya; dengan enzim urease yang diekspresikan oleh gen *ure*, urea dihidrolisis menjadi amonia dan asam karbamat. Pertumbuhan *Ureaplasma* dihambat oleh penghambat urease, hal ini mengindikasikan bahwa urease mempunyai peranan penting dalam aktivitas kehidupan *Ureaplasma* (Blanchard, 1990; Willoughby *et al.*, 1991). Dalam medium

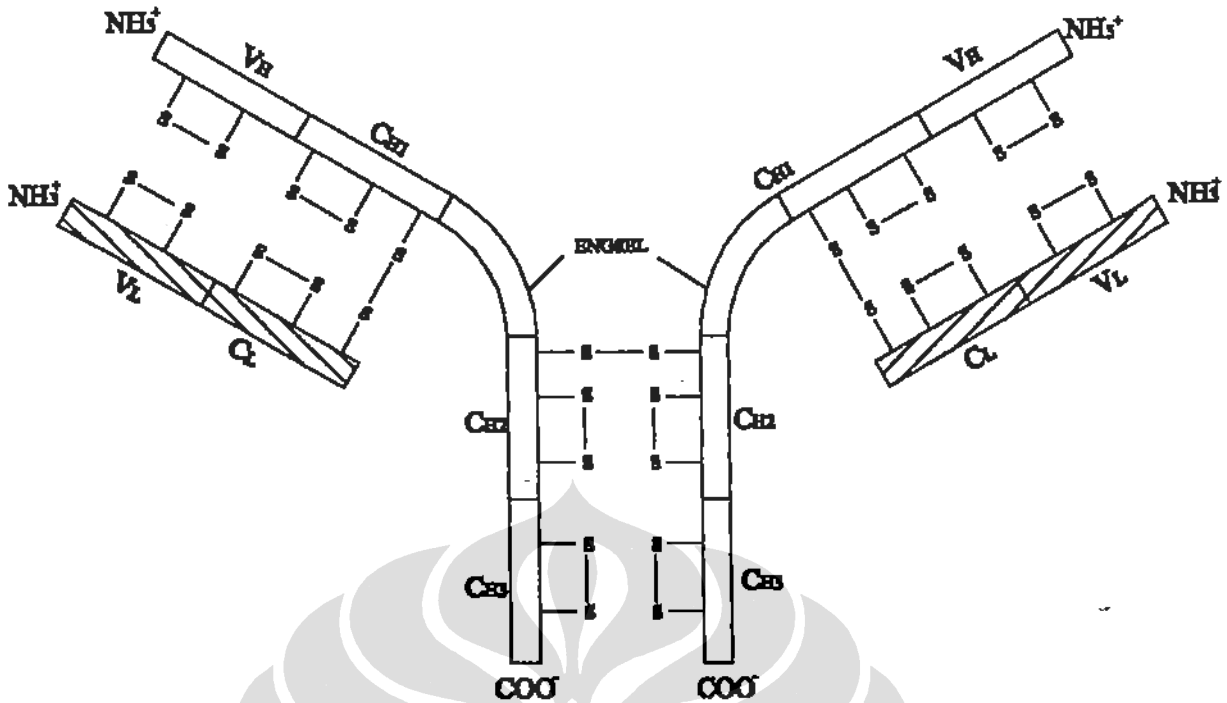
padat, koloni *U. urealyticum* berukuran sekitar 15-60 um. *U. urealyticum* tumbuh dengan baik pada suhu 37°C dan pH 6-6.5 (Marmion, 1989; Koneman *et al.*, 1992).

D. Imunoglobulin A

1. Imunoglobulin

Imunoglobulin adalah protein yang dihasilkan oleh sel plasma limfosit B karena adanya induksi antigen, dan dapat berikatan dengan antigen tersebut secara spesifik. Struktur dasar imunoglobulin terdiri atas 2 rantai ringan dan 2 rantai berat. Rantai ringan dan rantai berat masing-masing dihubungkan oleh ikatan disulfida, sehingga terbentuk struktur dasar yang simetris (Gambar 1). Rantai ringan dan rantai berat masing-masing mengandung satu unit variabel (V_L dan V_H). Unit-unit variabel tersebut berperan dalam pengikatan antigen spesifiknya. Rantai ringan mengandung satu unit konstan (C_L), dan rantai berat mengandung 3 unit konstan (C_{H1} , C_{H2} , dan C_{H3}) dan bagian engsel. Bagian konstan dari rantai berat berperan dalam aktivitas biologik suatu kelas imunoglobulin. Rantai ringan ada 2 macam, yaitu kappa (κ) dan lambda (λ), sedangkan rantai berat ada 5 macam yaitu α , δ , ϵ , γ , dan μ . Imunoglobulin dibedakan menjadi 5 kelas, dan kelima kelas imunoglobulin tersebut diberi nama sesuai dengan rantai berat yang menyusunnya yaitu imunoglobulin A (IgA), imunoglobulin D (IgD), imunoglobulin E (IgE), imunoglobulin G (IgG), dan imunoglobulin M (IgM).

Rantai ringan dan rantai berat diekspresikan oleh gen-gen yang berbeda, dan gen-gen tersebut terdapat di dalam kromosom yang berbeda. Rantai ringan kappa diekspresikan oleh gen dalam kromosom nomor 2, sedangkan rantai ringan lambda diekspresikan oleh gen dalam kromosom nomor 22. Rantai berat diekspresikan oleh



Gambar 1. Struktur dasar molekul imunoglobulin.

Struktur dasar molekul imunoglobulin terdiri atas 4 rantai polipeptida, yang berupa 2 rantai ringan dan 2 rantai berat yang identik, yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Rantai ringan dan rantai berat masing-masing mengandung 1 unit variabel (V_L dan V_H) pada ujung terminal amino. Rantai ringan juga mengandung 1 unit konstan (C_L) dan rantai berat mengandung 3 unit konstan (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), dan engsel. Sumber: Roitt *et al.*, 1985.

gen dalam kromosom nomor 14. Gen-gen rantai ringan terdiri atas gen variabel (V), gen penyambung (J), dan gen konstan (C), sedangkan gen-gen rantai berat terdiri atas gen variabel (V), gen diversitas (D), gen penyambung (J), dan gen konstan (C). Pada saat limfosit-B mengalami diferensiasi menjadi sel plasma, setiap anggota gen tersebut akan mengadakan rekombinasi dalam peristiwa "rearrangement", sehingga terbentuklah imunoglobulin fungsional (Roitt *et al.*, 1985).

2. Fungsi imunoglobulin A

Penelitian intensif terhadap sistem imun mukosa menunjukkan bahwa sistem imun tersebut memainkan peranan penting dalam proteksi tubuh manusia. Peranan tersebut tidak hanya sebagai alat pertahanan yang meliputi area permukaan saluran nafas, saluran gastrointestinal dan saluran urogenital ($>400\text{m}^2$), tetapi juga sebagai suatu regulator reaksi inflamasi yang potensial dalam jaringan dan organ internal (Kilian *et al.*, 1996).

Antibodi utama pada jaringan mukosa dan yang disekresikan untuk melawan patogen pada manusia dan hewan ialah imunoglobulin A (IgA) yang dilengkapi dengan sekreteri imunoglobulin A (S-IgA). S-IgA merupakan kompleks imunoglobulin yang diikat secara kovalen oleh komponen sekreteri. Imunoglobulin A dihasilkan oleh sel plasma limfosit B yang banyak ditemukan pada lamina propria saluran urogenital, saluran gastrointestinal, dan saluran nafas manusia (Poulsen *et al.*, 1989).

Bagian terpenting IgA adalah sekreteri IgA (S-IgA), yang dijumpai dalam sekret yang menutupi membran mukosa yang membentuk kompleks dimer IgA atau kompleks tetramer IgA yang terangkai secara kovalen oleh komponen sekreteri (KS). IgA sangat cocok untuk mengatasi lingkungan permukaan mukosa yang mengalami perubahan sifat fisikokimia, dengan jalan menciptakan resistensi terhadap sebagian besar enzim proteolitik dari derivat manusia dan mikroba (Kilian *et al.*, 1996).

Mekanisme molekuler S-IgA dalam sekret dan IgA dalam jaringan mukosa untuk melawan kolonisasi dan invasi mikroba serta bahaya lainnya yang cukup potensial dapat dilihat dalam TABEL I.

TABEL I

FUNGSI EFEKTOR SEKUNDER IgA

S-IgA di dalam sekret:

Menghambat perlekatan mikroba dan virus pada permukaan dengan:

-aglutinasi

-penghambatan adhesin

Menahan antigen pada membran mukosa

Menghambat penetrasi antigen melalui membran mukosa

Menetralkan toksin dan enzim bakteri

Menggalakkan efek faktor antibakteri non-spesifik di dalam sekret

IgA di dalam jaringan internal yaitu pada lamina propria:

Mengaktifkan anti-inflamasi

Membatasi kompleks imun

Meskipun fungsi efektor sekunder IgA tidak meliputi opsonisasi untuk fagositosis atau aktivasi sistem komplemen, namun kebanyakan fungsi IgA adalah analog dengan kelas imunoglobulin yang lain, yaitu tergantung pada bagian Fc molekul antibodi dan integritas strukturnya.

3. Subkelas imunoglobulin A

Imunoglobulin A dibagi menjadi 2 subkelas, yaitu IgA1 dan IgA2. Rantai alfa1 berubah oleh peristiwa penyisipan pada daerah engsel oleh serangkaian asam amino prolin, serin dan treonin. Hasil isolasi IgA1 dari serum dan sekret manusia menunjukkan bahwa IgA1 tersebut mengandung urutan oktapeptida berulang pada bagian engsel rantai berat alfa; segmen tersebut kaya akan residu prolin (Gilbert *et al.*, 1988), serin, dan treonin (Poulsen *et al.*, 1985). Peregangan di daerah engsel molekul imunoglobulin tersebut, potensial memberi jalan masuk bagi enzim-enzim proteolitik.

Pada IgA1 hal ini dilawan oleh urutan asam amino yang tidak lazim pada daerah engsel dan oleh glikosilasi residu serin yang mengakibatkan urutan asam amino tersebut tidak dapat dimasuki oleh enzim proteolitik tradisional.

E. Protease IgA1

Protease imunoglobulin A1 (IgA1) ialah enzim ekstraseluler yang terdapat dalam filtrat-filtrat kultur sejumlah bakteri patogen dari genus *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Clostridium*, *Bacteroides* (Gilbert *et al.*, 1988), dan *U. urealyticum* (Kapatais-Zoumbos *et al.*, 1985). Meskipun berasal dari sekelompok bakteri yang berbeda, protease IgA1 memberikan reaksi khas pada IgA1 manusia.

Berdasarkan penamaan dan klasifikasi enzim oleh Komisi Enzim yang dibentuk oleh Persatuan Biokimia Internasional, protease IgA1 termasuk enzim kelas hidrolase, karena reaksi yang dikatalisis oleh protease tersebut adalah reaksi hidrolisis terhadap ikatan peptida IgA1. Sedangkan penamaan protease IgA1 dengan kode atau nomor adalah sebagai berikut: E.C.3.4. ("Enzyme Commission 3.4.") yang artinya, protease IgA1 termasuk enzim kelas 3 (hidrolase), subkelas 4 (bekerja pada ikatan peptida IgA1) (Palmer, 1991).

Seperti telah disebutkan di atas, penyisipan pada daerah engsel rantai berat IgA1 menciptakan alat proteksi terhadap enzim proteolitik tradisional, selain itu komponen sekretori (KS) telah menciptakan resistensi pada molekul S-IgA1 terhadap protease. Sejumlah bakteri patogen mukosa penting dan sejumlah anggota flora komensal manusia telah berhasil mengembangkan protease yang hanya memutuskan IgA1 manusia pada daerah engsel, seperti protease IgA1 *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* *H.*

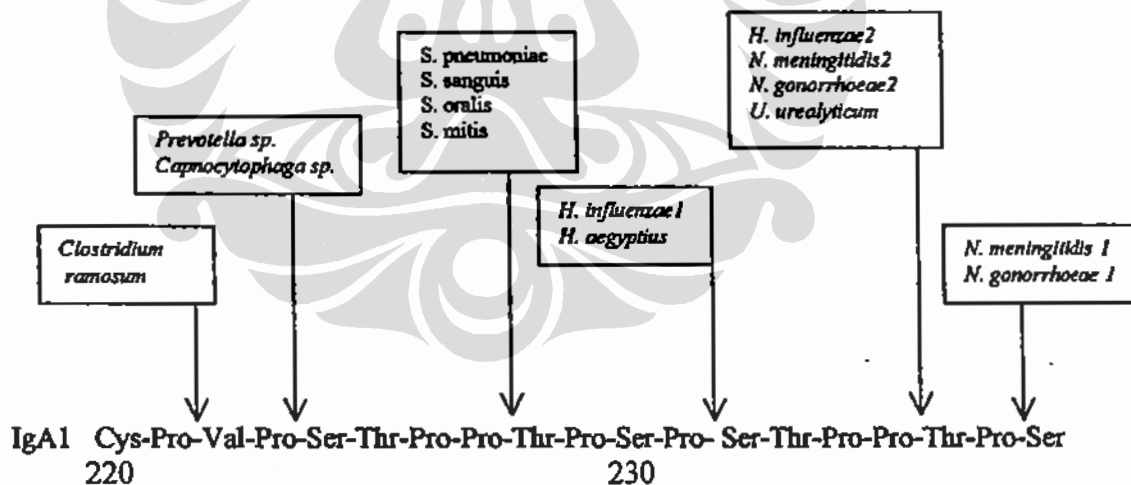
influenzae (Lomholt *et al.*, 1995), *U. urealyticum* (Kapatais-Zoumbos *et al.*, 1985), dan *S. pneumoniae* (Wani *et al.*, 1996). Diperkirakan bahwa protease IgA1 merupakan suatu faktor virulensi penting dari patogen-patogen tersebut di atas.

1. Sifat dan aktivitas enzimatik protease IgA1

Protease IgA1 pada umumnya merupakan enzim ekstraseluler yang dibebaskan dari permukaan bakteri ke dalam lingkungan sekitarnya (Pohlner *et al.*, 1987; Kapatais-Zoumbos *et al.*, 1985; Poulsen *et al.*, 1989; Lomholt *et al.*, 1995). Protease IgA1 bekerja sebagai endopeptidase pasca prolin, dengan kemampuan memutus salah satu dari beberapa ikatan peptida prolil-seril atau prolil-treonil dalam oktapeptida yang berduplikasi di daerah engsel IgA1 manusia (Poulsen *et al.*, 1989; Spooner *et al.*, 1992; Kilian *et al.*, 1996). Hasil deteksi Lomholt *et al.* (1995) menunjukkan bahwa substrat protease IgA1 adalah IgA1 manusia dan primata yang lain. Bakteri yang memproduksi protease IgA1 meliputi bakteri penyebab meningitis, penyebab infeksi saluran nafas, dan penyebab infeksi saluran urogenital. Tiap anggota spesies mengekspresikan protease IgA1 dengan suatu kespesifikan pemutusan tunggal pada IgA1. Pemutusan IgA1 oleh protease IgA1 tersebut menghasilkan fragmen Fab α dan fragmen Fc α . Hasil "sequencing" fragmen Fc α (produk digesti IgA1 oleh protease IgA1 *U. urealyticum*) menunjukkan bahwa protease IgA1 memutus IgA1 pada situs tunggal di daerah engsel rantai berat, yaitu di antara residu prolin nomor 235 dan residu treonin nomor 236. Kenapa enzim protease IgA1 memutus ikatan peptida hanya pada satu situs dalam urutan oktapeptida berulang, sampai sekarang belum dapat dijelaskan (Spooner *et al.*, 1992). Bila kadang-kadang aktivitas protease tidak terdeteksi, misalnya pada *S. mitis*,

hal itu karena adanya mutasi titik pada lokus gen yang bersangkutan. Kenyataannya aktivitas protease IgA1 begitu stabil (Kilian *et al.*, 1996).

Gambar 2 menunjukkan protease IgA1 bakteri yang memutus secara spesifik satu ikatan peptida pasca-prolin pada IgA1. Protease tipe-1 *H. influenzae* dan *Neisseria* memutus ikatan peptida prolil-seril daerah engsel IgA1, dan protease tipe-2 *H. influenzae* dan *Neisseria* memutus ikatan peptida prolil-treonil daerah engsel IgA1. Sedangkan protease IgA1 *U. urealyticum* (diperkirakan termasuk jenis protease serin) memutus IgA1 pada ikatan peptida prolil-treonil daerah engsel pada residu nomor 235-236 (Spooner *et al.*, 1992). Beberapa bakteri, fungi, dan parasit lainnya bisa menyerang IgA manusia tetapi tidak menunjukkan kespesifikan substrat yang unik dan biasanya menyebabkan degradasi seluruh molekul antibodi atau memutus di antara domain-domain di dalam bagian Fc (Kilian *et al.*, 1996).



Gambar 2. Lokasi ikatan peptida pada rantai berat IgA1 manusia yang diputus oleh protease IgA1 mikroba.
Sumber: Kilian *et al.*, 1996.

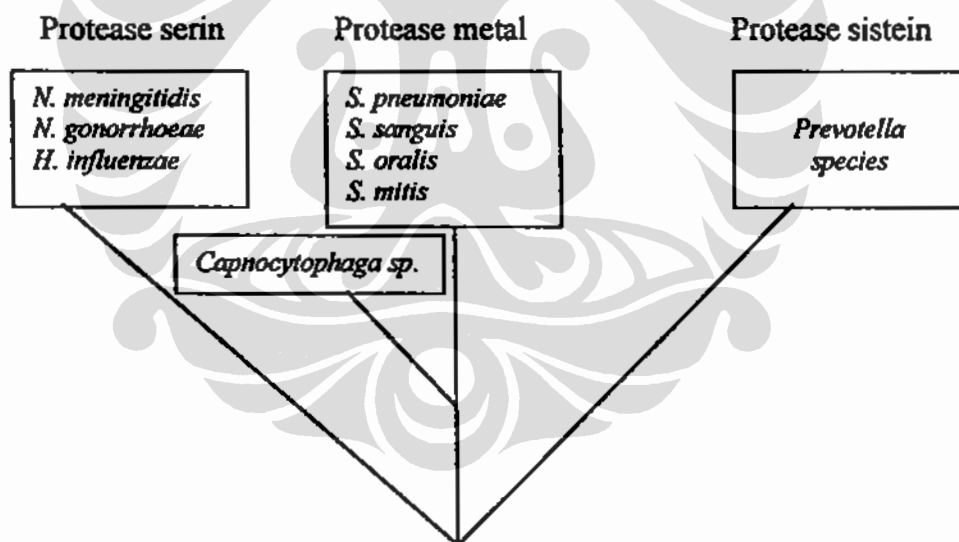
Protease IgA1 telah dikarakterisasi dari sejumlah bakteri seperti *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* (Poulsen *et al.*, 1989; Lomholt *et al.*, 1995), *S. sanguis* (Gilbert *et al.*, 1988), *S. pneumoniae* (Lomholt, 1993; Wani *et al.*, 1996), *Capnocytophaga species*, *Prevotella species* (Kilian *et al.*, 1996), dan *U. urealyticum* (Kapatais-Zoumbos *et al.*, 1985; Spooner *et al.*, 1992; Mesak, 1999). Protease IgA1 dari *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* dan *H. influenzae* menjalankan aksinya di dalam ruang antar sel membran mukosa, dengan cara menghidrolisis rantai berat molekul IgA1, tepatnya memecah ikatan peptida di antara residu prolin dan treonin daerah engsel IgA1 (Lomholt *et al.*, 1995). Sedangkan protease IgA1 yang dihasilkan oleh *S. pneumoniae*, salah satu dari banyak bakteri patogen yang mengkolonisasi dan menginfeksi mukosa saluran nafas manusia, juga menghidrolisis daerah engsel rantai berat imunoglobulin A1 di antara residu prolin dan treonin (Lomholt, 1993; Wani *et al.*, 1996).

Setiap protease IgA1 dari patogen di atas menghidrolisis IgA1 manusia. Enzim-enzim protease tersebut menggambarkan beberapa kelas molekul protein dengan mekanisme katalitik yang berbeda yaitu protease serin, protease tiol (sistein), dan protease logam (metal). Protease-protease tersebut mempunyai situs pemecahan ikatan peptida dalam daerah persendian rantai berat yang berbeda (Kilian *et al.*, 1996).

Pengetahuan tentang protease IgA1 pada bakteri baru sedikit dikenal. Protease IgA1 *H. influenzae* HK 368 disusun oleh 1,541 residu asam amino. Protease IgA1 tersebut diekspresikan oleh gen *iga* yang berasosiasi dengan sinyal-sinyal translasi sepanjang 5.1 kb (Poulsen *et al.*, 1989). Protease IgA1 *S. pneumoniae* yang disusun oleh 1,964 buah asam amino, mempunyai homologi yang tinggi dengan protease IgA1

S. sanguis. Adanya kemiripan antara enzim-enzim dari kedua spesies tersebut dan adanya situs pengikat seng (Zn), menimbulkan dugaan bahwa enzim pneumokokus tersebut adalah metaloprotease. Karena IgA1 merupakan sistem imunitas pada membran mukosa, maka dapat diperkirakan bahwa aktivitas protease IgA1 memungkinkan pneumokokus untuk menghindarkan diri dari sistem pertahanan tubuh lokal tersebut (Lomholt *et al.*, 1995).

Kemaknaan biologis enzim protease IgA1 didukung oleh adanya kenyataan bahwa tiga penyebab utama meningitis bakterial adalah *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, dan *H. influenzae*, yang ketiganya menghasilkan protease IgA1, sedangkan spesies nonpatogen tidak menghasilkan protease IgA1 (Lomholt *et al.*, 1995; Kilian *et al.*, 1996).

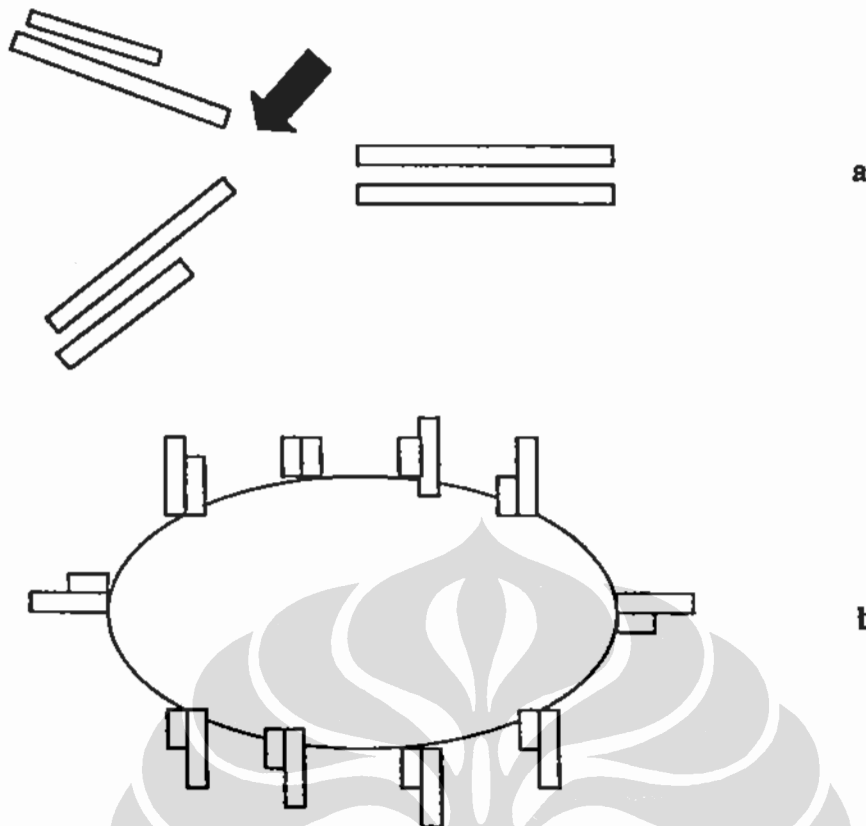


Gambar 3. Jalur evolusi protease IgA1 bakteri. Paling sedikit terdapat 3 jenis protease IgA1: protease serin, protease metal, dan protease sistein. Jalur evolusi protease IgA1 *Capnocytophaga* berbeda, tampak berasal dari jalur evolusi protease metal. Sumber: Kilian *et al.*, 1996.

Sebagai akibat dari adanya evolusi komponen bakteri pada tingkat gen atau enzim, paling sedikit terdapat 3 jenis protease IgA1 yaitu protease serin, protease metal, dan protease sistein. Protease IgA1 dari *Capnocytophaga* jalur evolusinya berbeda, namun berasal dari protease metal (Gambar 3). Protease IgA1 *U. urealyticum* tidak dilukiskan dalam Gambar 3, tetapi menurut Spooner *et al.* (1992), protease IgA1 *U. urealyticum* termasuk jenis protease serin.

2. Aktivitas *in vivo* protease IgA1

Berbeda dengan protease bakteri pada umumnya, protease IgA1 tidak dihambat oleh penghambat protease fisiologik seperti α 2-makroglobulin, α 1-protease dan lain-lainnya. Oleh karena itu fragmen-fragmen yang khas, hasil pemutusan protease IgA1 terhadap molekul S-IgA1 dan molekul IgA1 dapat dideteksi di dalam sekret nasofaring, oral, intestin, vagina, cairan serebrospinal individu yang terkolonisasi dan terinfeksi oleh bakteri yang memproduksi protease IgA1. Protease IgA1 memutus IgA1 menjadi fragmen Fab α dan fragmen Fc α . Fragmen-fragmen Fab α monomerik yang dibebaskan dari IgA1 oleh protease IgA1 tetap menjalankan aktivitas pengikatan antigennya. Oleh karena itu bakteri yang menghasilkan protease IgA1, yang tumbuh di lingkungan IgA1, nampak berselimutkan Fab α (Gambar 4) (Kilian *et al.*, 1996).



Gambar 4. Hasil pemutusan IgA1 oleh protease IgA1.
 a. Pemutusan IgA1 pada daerah engsel oleh protease IgA1 menghasilkan fragmen Fab α dan fragmen Fc α .
 b. Bakteri berselubungkan fragmen Fab α .
 Sumber: Kilian *et al.*, 1996.

3. Hilangnya fungsi efektor yang diperantarai oleh Fc α

Pemutusan IgA1 oleh protease IgA1 memisahkan bagian Fc dari fragmen-fragmen pengikat antigen (Fab). Sebagai akibatnya protease tersebut mampu menghilangkan fungsi efektor sekunder IgA seperti yang tercantum pada TABEL I. Studi *in vitro* yang meliputi gonokokus dan streptokokus oral menunjukkan bahwa aktivitas protease IgA1 mampu membatalkan pengaruh hambatan S-IgA terhadap perlekatan bakteri atau adhesin. Meskipun bakteri menjadi berselubungkan fragmen-fragmen Fab α sebagai akibat dari aktivitas protease IgA1, hal ini tidak nampak

menghilangkan kemampuannya untuk melekat pada permukaan targetnya. *U. urealyticum* diketahui mempunyai alat perlekatan pada sel target (Smith *et al.*, 1994).

Akibat aktivitas protease IgA1 tersebut di atas, kondisi bakteri yang memproduksi protease IgA1 tersebut menjadi lebih sukses untuk berkolonisasi. Mikroba pendatang baru menghasilkan unsur antigenik baru (protease IgA1), yang tidak dinetralkan oleh antibodi penetral yang diinduksi oleh protease IgA1 dari klon yang berkolonisasi sebelumnya (Lomholt, 1993). Penemuan ini menyokong pendapat tentang peranan protease IgA1 bagi suksesnya kolonisasi bakteri tersebut.

Hilangnya fragmen Fc α antibodi IgA1 yang terikat pada permukaan patogen akan menghilangkan mekanisme eliminasi patogen oleh IgA1 tersebut. Sementara itu fragmen Fab α yang tetap melekat pada permukaan bakteri akan menghalangi masuknya antibodi utuh yang lain, dan menutupi epitop yang relevan untuk sistem imun tersebut. Selanjutnya terpisahnya fragmen Fab α akan menghilangkan kemampuan fragmen Fc α untuk mengikat dan mengaktivasi sistem komplemen yang dirangsang oleh kompleks Ag-Ab, dan meniadakan kemampuan lisis oleh sistem komplemen terhadap bakteri tersebut.

4. Antibodi penetral anti- protease IgA1

Seperti faktor-faktor virulensi bakteri yang lain, protease IgA1 juga menginduksi beberapa antibodi yang mempunyai aktivitas menetralkan enzim. Antibodi tersebut telah dideteksi di dalam serum dan sekret, termasuk susu manusia yang terkolonisasi dan terinfeksi oleh bakteri penghasil protease IgA1. Antibodi tersebut dapat diinduksi dengan preparat protease di dalam tubuh kelinci dan hewan

lainnya. Pada umumnya susu manusia mengandung antibodi penetral terhadap kebanyakan protease IgA1.

Di samping menghambat aktivitas protease IgA1, antibodi penetral menghalangi pembebasan enzim bakteri, dan dapat mengaglutinasi bakteri tersebut dengan jalan berinteraksi dengan protease permukaan bakteri. Antibodi penetral dalam serum terutama adalah dari kelas IgG, tetapi bisa juga berupa antibodi IgA1.

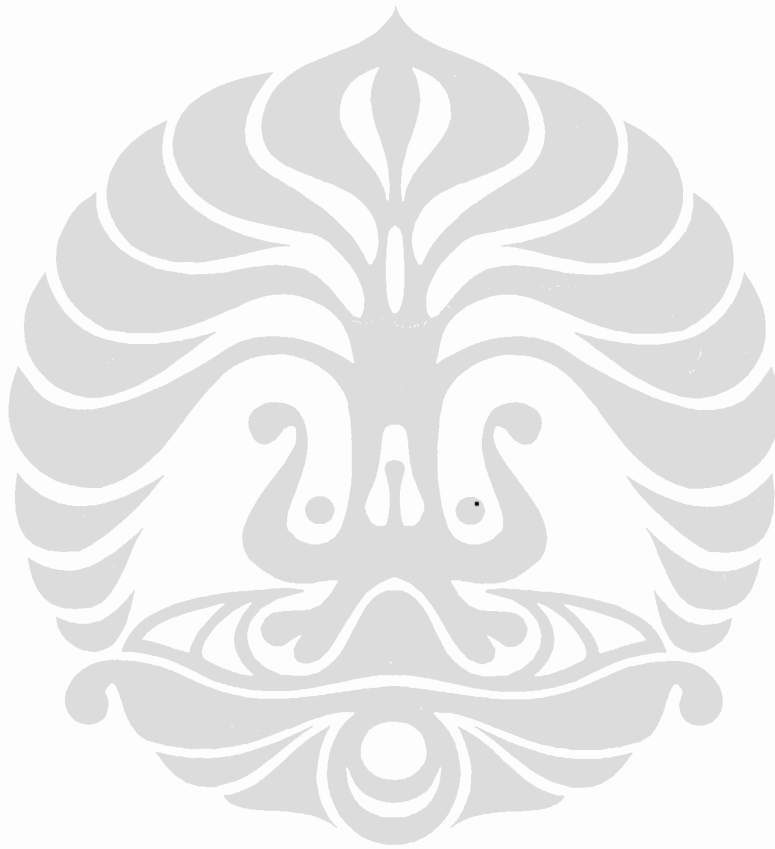
5. Keseimbangan antara aktivitas protease dengan antibodi penetral

Meskipun tidak ada penelitian yang membandingkan kinetika respons antibodi terhadap epitop permukaan patogen potensial dan terhadap protease IgA1, dapat diduga bahwa fungsi IgA1 dan protease IgA1 saling berlawanan. Sekali tubuh manusia (inang) merespon bakteri patogen dengan cara memproduksi IgA1, maka segera terjadi pemutusan IgA1 tersebut oleh protease IgA1 bakteri.

Pada tubuh manusia yang sedang diinfeksi oleh bakteri, jumlah bakteri patogen menjadi berlimpah dan dapat mensekresikan sejumlah protease IgA1 yang bisa mengatasi antibodi penetral yang tersedia. Selain itu dapat pula terjadi perbedaan dalam aktivitas protease IgA1 di antara galur bakteri yang berbeda. Beberapa galur bakteri dapat menunjukkan aktivitas 10 kali lebih tinggi daripada galur bakteri yang lain, dan aktivitas tersebut bisa karena pengaruh kondisi pertumbuhan.

Penelitian terhadap struktur dan sekresi protease IgA1 menunjukkan bahwa enzim tersebut mula-mula disintesis dalam bentuk prekursor protein. Selanjutnya prekursor protein tersebut mengalami pemutusan autokatalitik pada beberapa situs selama proses sekresi (Poulsen *et al.*, 1989; Kilian *et al.*, 1996). Selama proses

autokatalitik protease IgA1 *N. gonorrhoeae*, suatu polipeptida (protein α) dengan ukuran 12 – 24 kDa dibebaskan. Protein α mengandung rangkaian asam amino yang berperan sebagai penunjuk jalan protein tersebut ke dalam nukleus eukariotik. Protein tersebut mampu memasuki sel epitel manusia dan menembus nukleusnya, serta berikatan dengan DNA. Ikatan protein pada DNA dapat mempengaruhi ekspresi gen sel inang (Kilian *et al.*, 1996).



BAB III

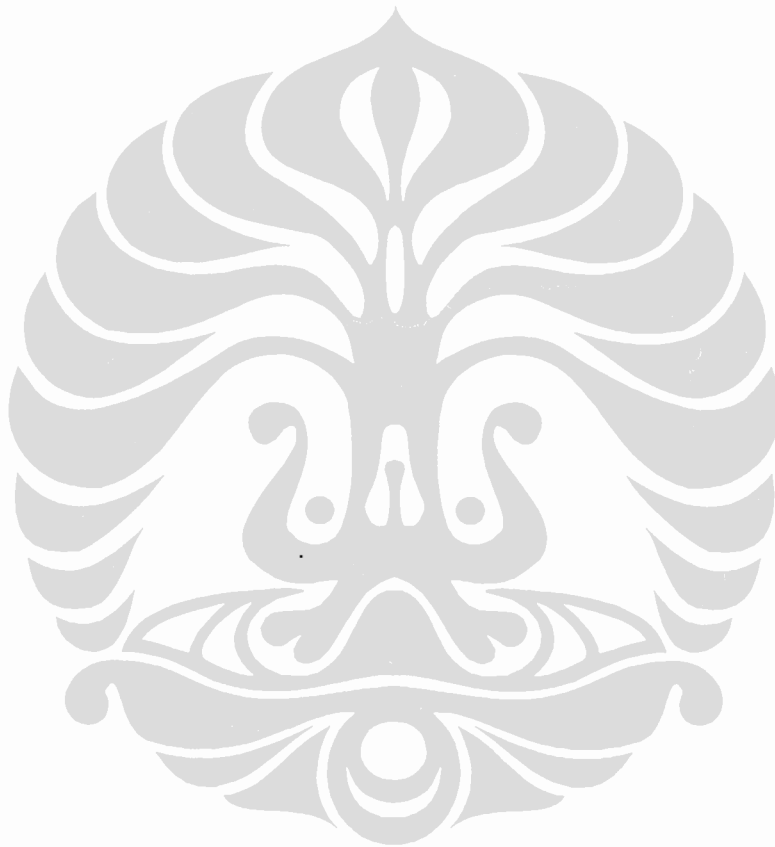
BAHAN DAN CARA KERJA

A. Bahan dan rencana kerja

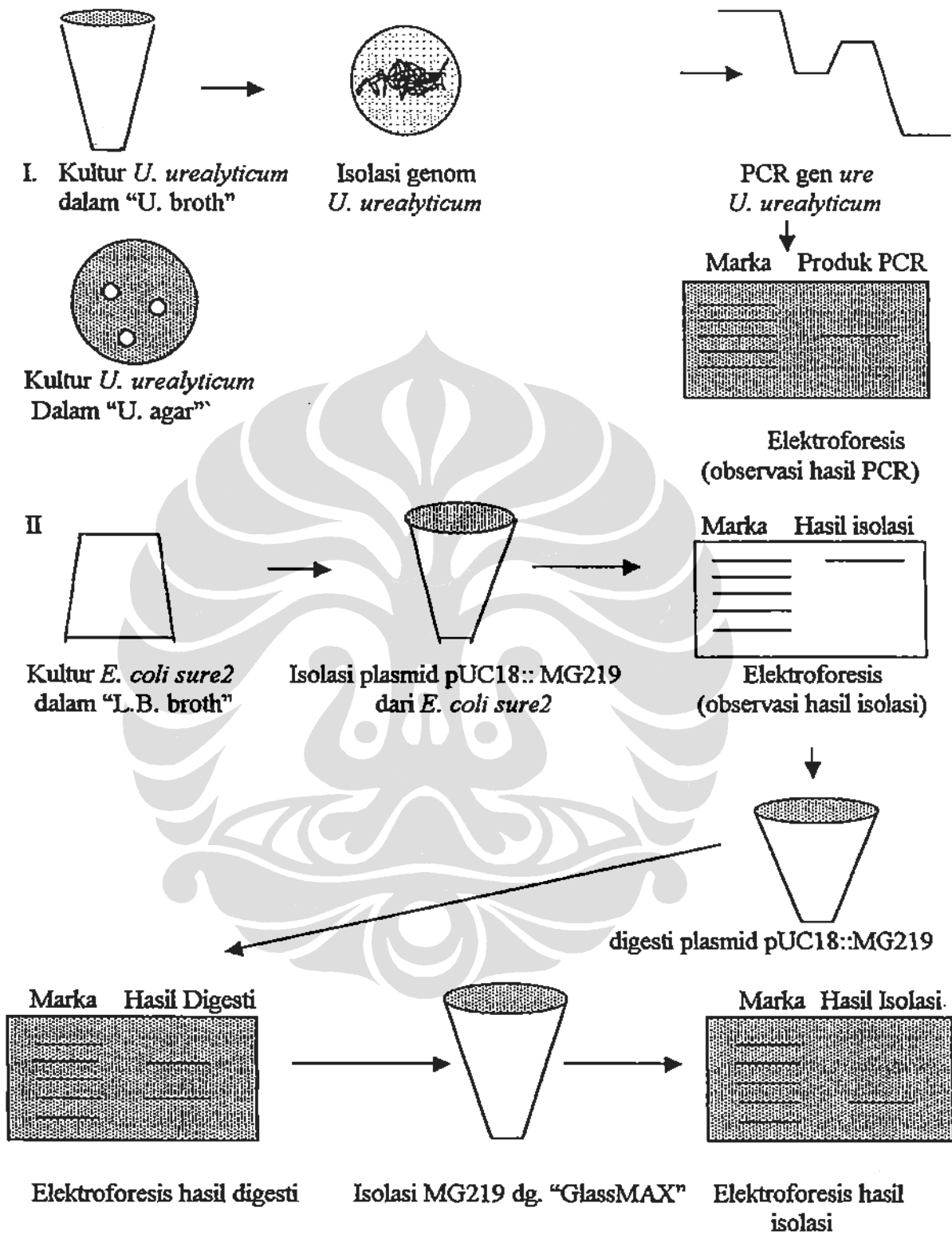
Dalam penelitian ini dilakukan pelacakan gen *iga* *U. urealyticum* dengan menggunakan gen *iga* putatif *M. genitalium* sebagai pelacaknya. Gen *iga* putatif *M. genitalium* mempunyai homologi yang cukup tinggi (51.3%) dengan gen *iga* *H. influenzae* (Fraser *et al.*, 1995). Dalam penelitian ini digunakan *U. urealyticum* standar galur 27618 dari "American Type Culture Collection" (ATCC). Gen *iga* putatif *M. genitalium* G37 dalam penelitian ini juga diperoleh dari ATCC. Gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan kode MG219, yang terletak dalam "sequence" DNA sepanjang 1.9 kb, disisipkan ke dalam vektor plasmid pUC18, dan selanjutnya ditransformasi ke dalam *Escherichia coli* sure 2. "Sequence" sisipan sepanjang 1.9 kb tersebut dapat dieksisi dari vektor (pUC18) dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Eco*RI. Langkah pertama dalam penelitian ini ialah melakukan penjajakan, apakah "sequence" gen *iga* putatif *M. genitalium* G37 tersebut homolog (dapat berhibridisasi) dengan "sequence" DNA *U. urealyticum*. Bila ternyata terjadi hibridisasi, maka dapat dimungkinkan untuk merancang primer dengan komputer, berdasarkan "sequence" gen *iga* putatif *M. genitalium*, untuk mengamplifikasi gen *iga* *U. urealyticum* dengan teknik "polimerase chain reaction" (PCR). Maka dalam penelitian ini mula-mula dilakukan pembiakan *U. urealyticum* di dalam medium cair ("U. broth") dan medium padat ("U. agar"), diteruskan dengan isolasi genom *U. urealyticum* dan verifikasi pertumbuhan dengan amplifikasi fragmen gen *ure* *U. urealyticum* menggunakan teknik PCR, dengan primer gen *ure* yang hanya

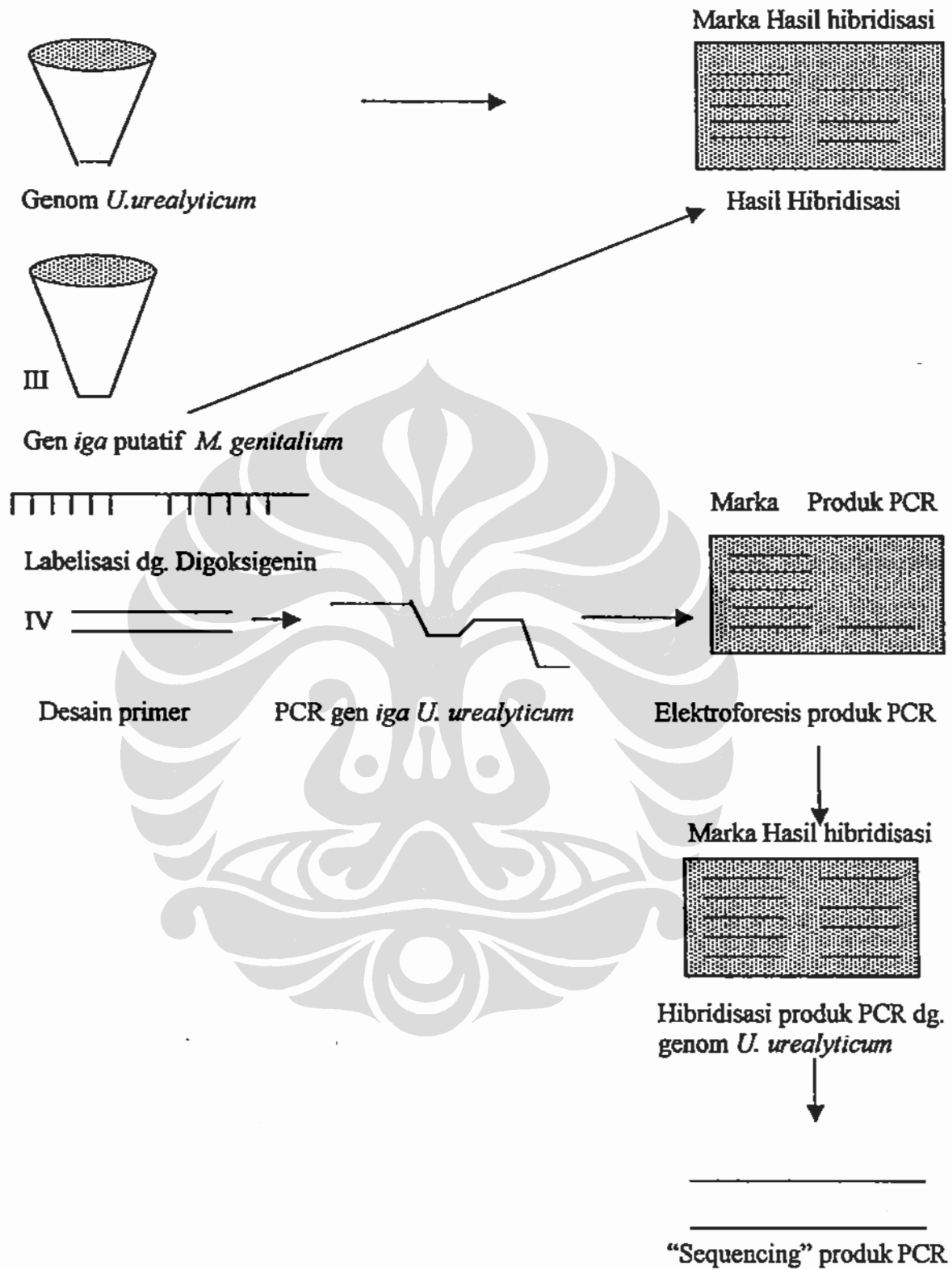
berkomplementer dengan genom *U. urealyticum*. Fragmen gen *ure* tersebut hanya terdapat pada *U. urealyticum*, dan tidak terdapat pada spesies yang lain (Teng *et al.*, 1994). Selanjutnya dilakukan digesti parsial terhadap genom *U. urealyticum* dengan enzim restriksi *EcoRI*. Sementara itu juga dilakukan pembiakan *E. coli sure2* yang telah ditransformasi dengan MG219 (gen *iga* putatif *M. genitalium*) dalam vektor plasmid pUC18. pembiakan *E. coli sure2* diteruskan dengan isolasi plasmid pUC18, dilanjutkan dengan digesti atau eksisi MG219 menggunakan enzim restriksi *BamHI* dan *EcoRI*. Selanjutnya dilakukan elektroforesis gel mini agarosa supaya gen tersebut mengalami pemisahan, baru kemudian diisolasi dengan metoda "GlassMAX". Hasil isolasi yaitu MG219 dipakai sebagai pelacak, setelah lebih dahulu dilabel dengan pelabel digoksigenin. Pelacakan dilakukan dengan cara menghibridisasikan gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan genom *U. urealyticum* dengan teknik hibridisasi Southern blot. Bila gen *iga* putatif *M. genitalium* dapat berhibridisasi dengan genom *U. urealyticum*, diartikan bahwa terdapat homologi antara gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan gen *iga* *U. urealyticum*. Selanjutnya dirancang primer berdasarkan "sequence" gen *iga* *M. genitalium*. Primer tersebut digunakan untuk mengamplifikasi gen *iga* *U. urealyticum*. Amplifikasi gen *iga* *U. urealyticum* dilakukan dengan teknik PCR, dan hasil amplifikasi diobservasi dengan elektroforesis gel agarosa, untuk memperkirakan panjang nukleotidnya (dalam kilobasa=kb), dengan menggunakan penanda sebagai pembanding. Untuk memastikan bahwa hasil PCR tersebut memang merupakan hasil amplifikasi yang berasal dari genom *U. urealyticum*, maka hasil amplifikasi tersebut perlu diverifikasi dengan cara menghibridisasikannya dengan genom *U. urealyticum*

dengan hibridisasi Southern blot. Untuk keperluan verifikasi, hasil PCR tersebut dilabel dengan digoksinin, kemudian digunakan sebagai pelacak terhadap genom *U. urealyticum* dalam hibridisasi. Bila terjadi hibridisasi (dapat dideteksi dengan film sinar-X), barulah selanjutnya dilakukan “sequencing” terhadap fragmen DNA hasil amplifikasi tersebut, untuk mengetahui urutan nukleotidanya dan persentase homologi. Selanjutnya dapat dilihat skema kerja pada halaman 27 dan 28.



Skema kerja





B. Cara kerja

1. Pemiakan *U. urealyticum*

U. urealyticum galur 27618 ATCC ditumbuhkan dalam 200 ml kaldu *Ureaplasma* ("U. broth") atau medium agar ("U. agar") (metoda Shepard dengan modifikasi). Cara membuatnya: "Mycoplasma broth base" 1% (Difco), ekstrak khamir 0.1% (Difco), 2 ml "bromo thymol blue" 4% atau "phenol red" (Serva), ditambah air, sehingga volume menjadi 160 ml, dan pH dijadikan 5.5. Untuk membuat medium "U. agar", ke dalam larutan di atas perlu ditambahkan agar Nobel 4 g (Difco) kemudian disterilkan di dalam autoklaf 121⁰C selama 15 menit. Setelah dingin ke dalam larutan tersebut ditambahkan serum kuda 10% (Boehringer Mannheim), 0.5 ml urea 10%, 1,000 UI/ml penisilin-G (PT Meiji Industries), dan amfoterisin-B 25 ug/ml (Sigma); pH medium menjadi 6.0. Medium cair yang berwarna kuning kemudian diinokulasi dengan *U. urealyticum*, diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 1 sampai 7 hari. Terjadinya pertumbuhan *U. urealyticum* (pertumbuhan positif) ditandai oleh adanya perubahan warna medium dari kuning menjadi hijau bila menggunakan indikator "bromo thymol blue", atau menjadi merah bila menggunakan indikator "phenol red". Untuk perbandingan dapat dilakukan pembiakan dalam medium agar secara mikroaerofilik, dan diuji dengan pewarnaan MnCl₂-urea, dan bila terjadi pertumbuhan akan memberikan warna coklat keemasan di sekeliling koloni *U. urealyticum*. *U. urealyticum* juga dapat ditumbuhkan di dalam "U. broth" dan "U. agar" yang dibuat berdasarkan metoda "Becton Dickinson Laboratory", dan metoda ini yang dipilih dalam penelitian ini. Cara membuat "U. broth" adalah sebagai berikut: Dibuat larutan yang terdiri atas bubuk pankreas 1 g/l (Becton Dickinson), dekstrosa 1 g/l (Becton

Dickinson), NaCl 5 g/l, kalium fosfat 2 g/l (Becton Dickinson), urea 20 g/l (Becton Dickinson), phenol red 0.012 g/l (Becton Dickinson), khamir 20 g/l (Difco), 1% serum kuda (Boehringer Mannheim), dan pH dijadikan 6.0. Larutan tersebut disterilkan dengan filtrasi, kemudian ditambahkan penisilin-G 1,000 UI/ml (PT Meiji Industries) dan amfoterisin-B 25 ug/ml (Sigma), baru kemudian dibuat alikuot. Medium "U. agar" dapat dibuat dengan melarutkan zat-zat di atas dengan 100 ml dH₂O kemudian disterilkan dengan filtrasi dan ditambah dengan larutan agar Noble (Difco) 20 g/900ml dH₂O (sudah disterilkan dengan autoklaf 121 °C selama 15 menit), yang sudah agak dingin. Terakhir ditambah dengan penisilin-G 1,000 UI/ml (PT Meiji Industries) dan amfoterisin-B 25 ug/ml (Sigma), kemudian dituang dalam cawan-cawan Petri steril. Pertumbuhan *U. urealyticum* di dalam "U. broth" dapat diverifikasi dengan uji amplifikasi gen *urease* dari genom *U. urealyticum*, dengan teknik PCR, dengan menggunakan primer gen *urease* yang diperoleh dari Universitas Nasional Singapore.

2. Isolasi genom *U. urealyticum*

Isolasi genom *U. urealyticum* dilakukan berdasarkan metoda Maniatis *et al.* (1982). Kultur *U. urealyticum* sebanyak 1.5 ml diputar dengan kecepatan 11,800 g selama 30 menit. Supernatan dibuang 1.4 ml, sisanya disuspensikan dengan 400 ul larutan TE. Selanjutnya larutan tersebut ditambah dengan 30 ul SDS 10% (Sigma) dan 25 ul proteinase K (2 mg/ml) (Gibco BRL), kemudian diinkubasikan pada suhu 50°C selama 1 jam. Setelah inkubasi larutan ditambah 400 ul phenol, divorteks selama 10 detik, kemudian diputar dengan kecepatan 5,000 g selama 5 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambah dengan 400 ul kloroform:

isoamilalkohol (24 : 1), divortek 10 detik, dan diputar dengan kecepatan 5,000 g selama 5 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambah dengan 1 ml etanol absolut (Merck), dan diinkubasikan pada -20°C minimal 2 jam, kemudian diputar dengan kecepatan 5,000 g selama 5 menit untuk mengendapkan DNA-nya. Supernatan dibuang kemudian peletnya dicuci dengan 1 ml alkohol 70%. Setelah diputar dengan kecepatan 5,000 g selama 5 menit, pelet (DNA) dikeringanginkan, kemudian dilarutkan dalam 50 ul TE (Merck) dan disimpan pada suhu -4°C .

3. Digesti genom *U. urealyticum*

Genom *U. urealyticum* sebelum dipergunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen *ure* maupun gen *iga* dengan teknik PCR lebih dahulu didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI* selama 60 menit pada suhu 37°C , dengan komposisi reagen digesti sebagai berikut: 10 ul (1.0 ug/ul) genom *U. urealyticum* di dalam tabung Eppendorf ditambah 2 ul (10 unit/ul) *EcoRI* dan 4 ul larutan dapar enzim. Selanjutnya volume dijadikan 40 ul dengan menambahkan 24 ul dH_2O . Reaksi enzim dihentikan dengan pemanasan 60°C selama 10 menit.

4. Verifikasi pertumbuhan *U. urealyticum* dengan teknik PCR

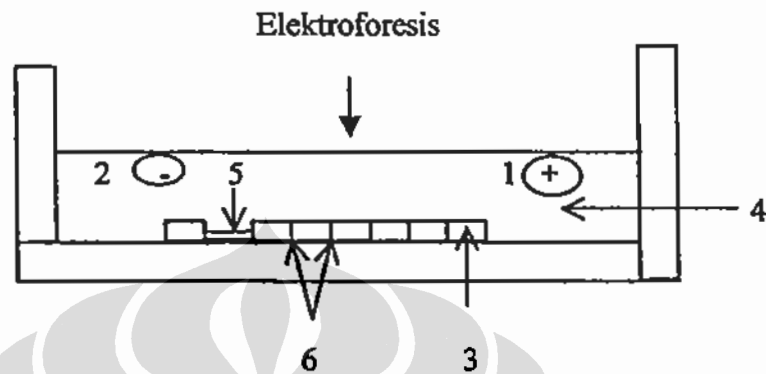
Untuk mengkonfirmasi bahwa organisme yang tumbuh di dalam medium "U. broth" memang benar *U. urealyticum* maka perlu adanya verifikasi. Verifikasi terhadap pertumbuhan *U. urealyticum* dapat dilakukan dengan amplifikasi gen *ure* dengan teknik PCR (dengan PCR System 9700, Perkin Elmer Cetus). Primer gen *ure* diperoleh dari Universitas Nasional Singapore, berupa primer yang hanya dapat

berkomplementer dengan gen *urease (ure)* *U. urealyticum*. Primer tersebut terdiri atas primer “forward” 5'-CCAGGAAAAGTAGTACCAGGAGC-3', dan primer “reverse” 5'-CTCCTAATCTAACGCTATCACC-3'. Sepasang primer tersebut dengan genom *U. urealyticum* yang sudah diisolasi sebagai cetakannya, dipakai untuk mengamplifikasi gen *ure*. Rincian komposisi reagen PCR adalah sebagai berikut: 1 ul dNTP (berupa campuran dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0.1 mM), 0.5 ul primer “forward” (1 uM), 0.5 ul primer “reverse” (1 uM), 5 ul larutan dapar enzim 10X, 1 ul genom (DNA cetakan 1 ug/ul), 0.5 ul Taq DNA-polimerase (5 unit/ul), 41.5 ul dH₂O. Dalam proses amplifikasi tersebut, denaturasi DNA dilakukan pada suhu 94°C selama 30 detik, “annealing” pada suhu 55°C selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 68°C selama 90 detik sebanyak 30 siklus (Teng *et al.*, 1994).

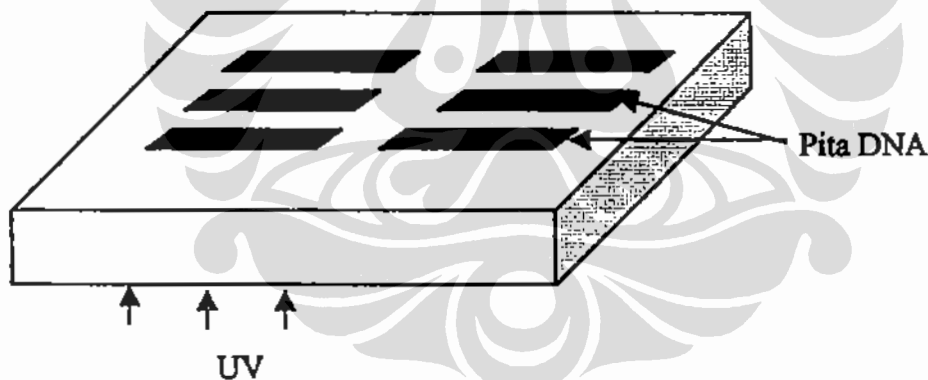
5. Elektroforesis

Untuk mengetahui hasil isolasi genom *U. urealyticum*, hasil amplifikasi gen *ure*, hasil amplifikasi gen *iga* *U. urealyticum*, dan juga sebelum dilakukan transfer Southern perlu dilakukan elektroforesis gel mini agarosa (SIGMA, Tipe II Medium) 0.8% dalam larutan 1X TAE (Merck), dengan tegangan listrik 90 Volt, selama 50 menit. Dengan elektroforesis ini fragmen-fragmen DNA akan terpisah berdasarkan ukuran DNA. Cara mempersiapkan elektroforesis gel mini agarosa: 50 ml larutan agarosa 0.8% dipanaskan di dalam “microwave” selama 2 menit. Setelah agak dingin kemudian dituangkan ke dalam plat gel, dan segera dipasang sisir dengan posisi tegak lurus terhadap gel. Gel dibiarkan mengeras selama 60 menit, baru kemudian sisir diangkat, agar supaya terbentuk sumur-sumur untuk memasukkan sampel DNA yang

akan diobservasi. Sampel DNA sebelum diisikan ke dalam sumur ditambah dengan “loading buffer” atau “tracking dye” (0.05% bromo phenol blue) (Merck), 0.05% silen sianol (Merck), 50% gliserol (Merck), 0.05 M EDTA dalam larutan dapar TE (Merck), 2 ul dalam 17 ul sampel (Gambar 5).



Gambar 5. Elektroforesis gel mini agarosa.
 1. Anoda. 2. Katoda. 3. Gel. 4. Larutan dapar.
 5. Sumur DNA. 6. Pita DNA.
 Sumber: Brown, 1995.



Gambar 6. Visualisasi pita DNA dengan transiluminator UV
 Sumber: Brown, 1995.

Setelah elektroforesis, gel mini direndam dalam larutan etidium bromida 2 ug/ml dH₂O selama 15 menit, agar DNA dapat divisualisasikan pada saat dipaparkan dengan sinar ultra violet dari lampu transiluminator (Maniatis *et al.*, 1982). Dalam

elektroforesis sebagai penanda dipakai marka VIII (DNA pUCBM2) dipotong dengan *HpaII*, *DraI*, dan *HindIII* (Promega), marka III (DNA λ dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII*) (Promega), dan marka II (DNA λ dipotong dengan *EcoRI*). Hasil elektroforesis dapat difoto dengan kamera Polaroid DS 34 di atas transiluminator ultra violet (Gambar 6).

6. Pembiakan *E. coli*

E. coli sure2 yang telah ditransformasi dengan pUC18 yang disisipi gen *iga* putatif *M. genitalium* ditumbuhkan dalam media cair ("LB broth") dan padat ("LB agar"), pada suhu 37°C selama semalam. Biakan cair memerlukan goyangan kuat. Medium cair Luria-Bertani terdiri atas tripton 10 g/l (Difco), ekstrak khamir 5 g/l (Difco), dan NaCl 10 g/l (Merck), sedangkan pada medium padat harus ditambahkan agar Nobel sebanyak 15 g/l (Difco). Media tersebut perlu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah dengan Ampisilin 100 ug/ml (Sigma).

7. Isolasi plasmid

Biakan cair *E. coli sure2* yang sudah ditumbuhkan semalam pada suhu 37°C dengan goyangan kuat sebanyak 1.5 ml dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5,000 g selama 2 menit untuk mengendapkan sel bakteri. Pelet yang berupa sel bakteri diresuspensi dengan 110 μ l larutan A (9 g glukosa (BDH), 20 ml 0.5 M EDTA (Merck), dan 25 ml 1 M Tris-Cl pH 8.0 dalam 1 l dH₂O). Suspensi tersebut diinkubasikan di dalam suhu ruangan selama 5

menit, kemudian ditambah dengan 200 ul larutan B yang masih segar (4.25 ml dH₂O, 0.5 ml 10% SDS (Sigma), dan 0.25 ml 4 N NaOH (Merck), dan selanjutnya disuspensikan dengan jalan membalikkan tabung beberapa kali secara perlahan-lahan, sehingga larutan menjadi bening dan lengket, baru kemudian diinkubasikan pada suhu 0°C (di dalam es) selama 10 menit. Setelah inkubasi suspensi ditambah 150 ul larutan C dingin (60 ml 5 M KCl (BDH), 11.5 ml asam asetat glasial (Merck), dan 28.5 ml dH₂O), divortek selama 10 detik dan diinkubasikan pada suhu 0°C selama 5 menit. Selanjutnya larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 5,000 g selama 3 menit, kemudian supernatannya dipindahkan ke tabung Eppendorf lain yang steril, baru kemudian ditambahkan 0.5 ml larutan campuran fenol, kloroform, isoamilalkohol (Merck), dengan perbandingan 25:24:1, divortek sejenak sehingga terbentuk suspensi, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5,000 g selama 5 menit. Lapisan atas dipindahkan secara hati-hati ke tabung lain, dan diusahakan tidak sampai tercampur dengan lapisan bawah yang mengandung fenol. Cairan tersebut kemudian ditambah dengan 1 ml etanol absolut dingin, dan diinkubasikan selama 2 jam atau lebih pada suhu -20°C. Cairan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5,000 g selama 5 menit. Supernatan dibuang, dan pelet yang terdiri atas DNA plasmid dan RNA dicuci dengan 1 ml etanol 70% yang dingin, disentrifugasi lagi seperti sebelumnya. Pelet dikeringanginkan, dan setelah kering diresuspensikan dengan 50 ul TE pH 8.0, kemudian disimpan pada suhu 4°C.

8. Digesti plasmid pUC18::*iga* putatif *M. genitalium*

Plasmid pUC18 yang membawa sisipan gen *iga* putatif, setelah diisolasi, kemudian didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *BamHI* dengan komposisi seperti terlihat dalam TABEL II, selama 2 jam pada suhu 37°C. Hasil digesti kemudian diobservasi dengan elektroforesis gel mini agarosa 0.8 %, dengan tegangan 90 Volt, selama 50 menit, dengan pembanding marka III.

TABEL II

REAKSI DIGESTI PLASMID pUC18::*iga* putatif *M. genitalium*
(dalam mikroliter=ul)

	DNA pUC18 1.0 ug /ul	H ₂ O	Bufer	<i>EcoRI</i> 10 unit /ul	<i>BamHI</i> 10 unit /ul	Jumlah
Sampel	10	22	4	2	2	40
Kontrol	5	15	0	0	0	20

9. Isolasi dan purifikasi gen *iga* putatif *M. genitalium*

Pita yang merupakan gen *iga* putatif *M. genitalium* yang terpisah pada gel agarosa melalui proses elektroforesis kemudian diisolasi dan dimurnikan dengan metoda "GlassMAX" (Gibco BRL) sebagai berikut: Potongan gel agarosa yang mengandung gen *iga* putatif tersebut setelah dicuci dengan bufer TE, dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, kemudian dihancurkan dengan "blue tip", dan dilarutkan dengan 3 volume "binding solution". Supaya lebih mudah dan cepat larut, potongan agarosa dibantu dengan pemanasan 50°C selama 20 menit. Larutan tersebut kemudian ditambah dengan satu volume suspensi "GlassMAX", divortek. selama 5 detik, kemudian diinkubasikan dalam suhu kamar selama 30 menit, dilanjutkan dengan

dengan kecepatan 5,000 g selama 60 detik. Supernatan dibuang, dan endapan diresuspensikan dengan larutan pencuci sebanyak 1 ml, kemudian diinkubasikan pada suhu 4°C selama 30 menit, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5,000 g selama 60 detik. Endapan dicuci sekali lagi seperti di atas. Supernatan dibuang, dan endapan dikeringanginkan selama 30 menit. Setelah kering endapan diresuspensikan dengan 50 ul bufer TE, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5,000 g selama 60 detik, dan supernatan dipindahkan ke tabung Eppendorf baru. RNA ikutan dapat dihilangkan dengan menambahkan 1 ul RNA-ase, kemudian diinkubasikan selama 15 menit pada suhu 37°C. Reaksi RNA-ase dihentikan dengan pemanasan 60°C selama 10 menit. Hasil purifikasi kemudian diobservasi sebagian dengan elektroforesis gel mini agarosa, dan sisanya dapat dipergunakan sebagai pelacak terhadap genom *U. urealyticum* dalam hibridisasi setelah dilabel dengan digoksigenin (Boehringer Mannheim) lebih dahulu.

10. Transfer menurut cara Southern

10.1. Persiapan

Genom *U. urealyticum* setelah dielektroforesis dengan 0.8% gel agarosa, sebelum ditransfer ke membran Hybond-N perlu dilakukan persiapan sebagai berikut: Gel agarosa bagian pinggir, yang tidak diperlukan, dipotong dan dibuang. Genom atau DNA pada gel agarosa didepurinasi dengan 0.25 M HCl (BDH), selama 15 menit sambil digoyang lambat, kemudian dibilas dengan akuades 2 kali. Kemudian gel didenaturasi dengan larutan denaturasi (1.5 M NaCl dan 0.5 M NaOH) selama dua kali 30 menit pada suhu kamar sambil digoyang lambat. Selanjutnya genom tersebut

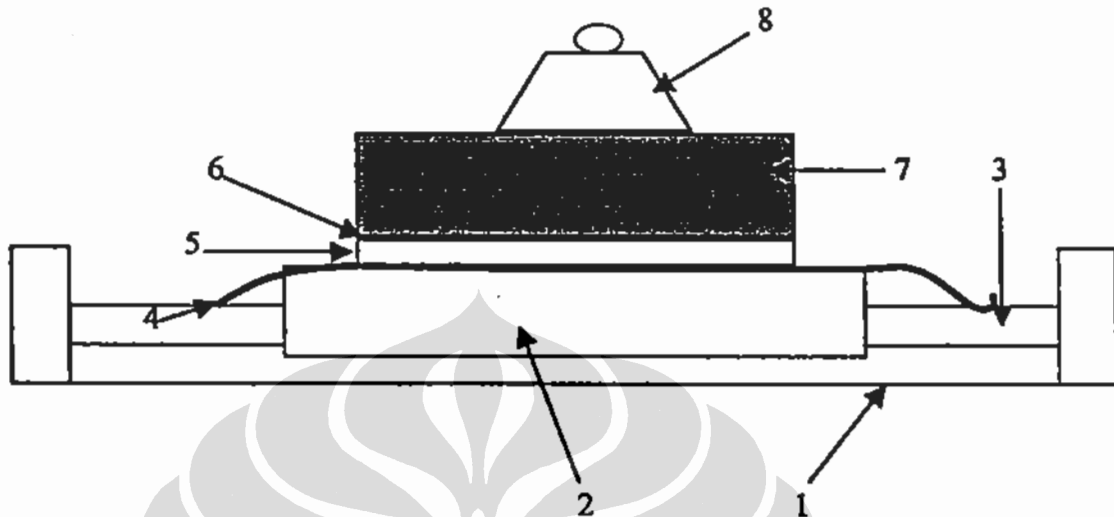
dinetralsasi dengan larutan netralisasi (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris HCl pH 7.2, 0.0001 M Na₂ EDTA) selama dua kali 30 menit pada suhu kamar sambil digoyang lambat.

10.2. Transfer

Transfer genom atau DNA ke membran Hybond N (Amersham) dilakukan menurut metoda Southern. Dibuat jembatan plastik yang diletakkan di dalam bak yang berisi larutan SSC 10X (Saline Sodium Citrate). Jembatan plastik tersebut kemudian ditutup dengan kertas Whatman 3 MM selebar gel agarosa, dan panjangnya jauh lebih panjang dari panjang gel, sehingga kedua ujungnya tercelup ke dalam larutan SSC 10X; dengan demikian seluruh kertas menjadi basah oleh SSC. Gel agarosa yang salah satu ujungnya sudah dipotong serong sedikit sebagai tanda, diletakkan terbalik di atas kertas Whatman. Kemudian di atas gel diletakkan membran Hybond-N (Amersham) yang ukurannya sama dengan ukuran gel. Diusahakan agar tidak ada gelembung udara di antara gel dan membran, agar tidak menghambat proses transfer. Di atas membran diletakkan 3 lembar kertas Whatman 3 MM, dan selanjutnya di atas kertas Whatman diletakkan setumpuk kertas towel masing-masing selebar dan sepanjang gel. Di atas tumpukan kertas towel diletakkan lempeng kaca, dan di atas lempeng kaca diletakkan pemberat sekitar 0.5 kg (Gambar 7). Proses transfer DNA dibiarkan berlangsung selama 12 – 24 jam atau semalaman pada suhu kamar. Di akhir inkubasi, pemberat, kaca, dan tumpukan kertas dibongkar satu persatu secara hati-hati.

DNA (penanda dan genom) difiksasi pada membran Hybond-N dengan cara meletakkan di atas lembaran plastik dan memaparkan membran tersebut di atas transiluminator ultra violet selama 8 menit. Membran dikeringanginkan selama sekitar

30 menit, kemudian disimpan di antara kertas Whatman 3 MM atau langsung dihibridisasikan dengan gen *iga* putatif *M. genitalium* yang sudah dilabel dengan digoksigenin sebagai pelacak DNA.



Gambar 7. Transfer Southern blot.

1. Bak. 2. Penyokong. 3. Larutan dapar. 4. Kertas Whatman 3 MM
5. Gel. 6. Membran nilon. 7. Kertas towel. 8. Pemberat.
Sumber: Brown, 1995.

11. Hibridisasi

Genom *U. urealyticum* pada membran Hybond-N kemudian dihibridisasi dengan pelacak (gen *iga* putatif *M. genitalium* yang sudah dilabel dengan digoksigenin) melalui beberapa tahap.

11.1. Prehibridisasi

Genom *U. urealyticum* dan marka III pada membran Hybond-N diprehibridisasi dengan 20 ml bufer prehibridisasi yang terdiri atas 5 ml SSC 5 X, 40 ul SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 0.02%, 2 ml "blocking reagent" 1% (Boehringer Mannheim), 200 ul

N-Lauril sarkosin 0.1% (Sigma), dan 12.760 ml akuades; prehibridisasi berlangsung selama 2 jam pada suhu 65°C dengan goyangan lambat.

11.2. Labelisasi pelacak

Prinsip labelisasi DNA Dig (digoksigenin) dan deteksi pelacak DNA Dig

Sistem Dig ini menggunakan digoksigenin, suatu hapten steroid untuk melabel DNA, RNA, atau nukleotida untuk hibridisasi, dan diikuti dengan deteksi luminesensi. Untuk labelisasi DNA, digoksigenin digabungkan dengan dUTP melalui ikatan ester alkali-labil. Pelacak DNA dapat dilabel dengan perangkat "Dig-High Prime" (Boehringer Mannheim) berdasarkan teknik labelisasi "random priming nick translation". Pelacak DNA berlabel Dig dapat dihibridisasikan dengan asam nukleat pada membran nilon atau membran yang lain. Pelacak berlabel Dig yang sudah dihibridisasikan dapat dideteksi dengan teknik imunodeteksi dengan anti-digoksigenin. Fragmen Fab dari anti-digoksigenin dikonjugasikan dengan alkalin fosfatase, kemudian divisualisasikan dengan CSPD ("chemiluminescence signal detection"). Defosforilasi CSPD dengan alkalin fosfatase menyebabkan terjadinya emisi sinar pada panjang gelombang 477 nm, dan emisi sinar ini dapat direkam dengan film "X-ray". Labelisasi pelacak dan deteksinya dikerjakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, berdasarkan rekomendasi Boehringer Mannheim Laboratories sebagai berikut:

Pelacak DNA (gen *iga* putatif *M. genitalium*) sebanyak 16 ul (1 μ g/ul) didenaturasi dengan cara memanaskannya pada suhu 100°C selama 10 menit, kemudian didinginkan cepat-cepat di dalam es selama 10 menit. Pelacak tersebut

kemudian dilabel dengan menambahkan 4 ul larutan digoksinin (Boehringer Mannheim), dicampur secara seksama, kemudian diinkubasikan selama 5 – 20 jam pada suhu 37^o C. Pada akhir inkubasi reaksi dihentikan dengan cara memanaskannya pada suhu 65^o C selama 10 menit. Pelacak yang sudah berlabel digoksinin tersebut dapat disimpan pada suhu -20^oC atau dipergunakan langsung untuk hibridisasi.

11.3. Hibridisasi

Pelacak yang sudah berlabel digoksinin sebanyak 20 ul didenaturasi dengan cara memanaskannya pada suhu 100^oC selama 10 menit, kemudian segera dimasukkan ke dalam es, dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya pelacak dimasukkan ke dalam bak plastik kecil yang berisi 20 ml bufer hibridisasi, yang komposisinya sama dengan bufer prehibridisasi. Membran segera dimasukkan ke dalam larutan hibridisasi tersebut, dan proses hibridisasi dibiarkan berlangsung satu malam pada suhu 65^oC, dengan goyangan lambat dalam penangas air (Waterbath Shaker Model-WB-20, Maryland).

11.4. Visualisasi

Setelah hibridisasi, membran dicuci dengan 50 ml larutan pencuci I, yang terdiri atas SSC 2 X dan SDS 10% sebanyak dua kali 5 menit sambil digoyang lambat pada suhu kamar. Pencucian membran diteruskan dengan larutan pencuci II yang terdiri atas larutan SSC 0.1 X dan SDS 0.1% sebanyak dua kali 5 menit dengan goyangan lambat pada suhu 65^oC. Pencucian selanjutnya dilakukan dengan larutan dapar 1 (maleat 0.1 M dan NaCl 0.15 M, pH 7.5) selama 5 menit, sambil digoyang, pada suhu kamar.

Kemudian membran diinkubasikan di dalam larutan dapar 2 atau "blocking buffer" (terdiri atas "blocking reagent" dan larutan dapar maleat dengan perbandingan 1:10) selama 30 menit, dengan goyangan lambat, pada suhu kamar. Membran dalam keadaan basah diletakkan di atas plastik, kemudian ditetesi dengan 2 tetes larutan CSPD, dan diratakan. Kelebihan larutan dibuang. Membran diinkubasikan selama 5 menit pada suhu kamar, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya membran diatur di dalam kaset yang beralaskan lembaran plastik, dipaparkan dengan film "X-ray" selama 30 menit, dan dimasukkan ke dalam larutan pengembang untuk visualisasi pita DNA (Maniatis *et al*, 1982). Bila terjadi hibridisasi antara genom *U. urealyticum* dengan gen *iga* putatif *M. genitalium* maka penelitian diteruskan dengan perancangan primer gen *iga U. urealyticum*.

12. Perancangan primer dan amplifikasi gen *iga U. urealyticum*

Primer gen *iga U. urealyticum* dirancang berdasarkan "sequence" gen *iga* putatif *M. genitalium* G37 dengan komputer dengan program "NCBI BLAST Search Result" (BLASTN). Hasil rancangan berupa sepasang primer yang diproduksi oleh PT Pacific Oligos, Australia, dengan urutan nukleotida sebagai berikut: primer "forward" 5'-AAAAATACCCATAATGAATAGTGATAG-3', dan untuk primer "reverse" 5'-TTTTGTTTGAATTTTGGGTTGGTTTAG-3'. Sepasang primer tersebut digunakan untuk amplifikasi gen *iga U. urealyticum* dengan genom *U. urealyticum* sebagai cetaknya. Amplifikasi gen *iga U. urealyticum* dilakukan dengan teknik "polimerase chain reaction" dengan menggunakan alat "PCR System Perkin Elmer Cetus". Dalam proses amplifikasi ini denaturasi DNA dilakukan pada suhu 94°C, selama 30

detik, “annealing” pada suhu 68°C selama 30 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 90 detik, sebanyak 30 siklus.

Hasil amplifikasi diobservasi dengan elektroforesis gel mini agarosa dengan cara seperti di atas, untuk memperkirakan panjang nukleotidanya. Untuk verifikasi amplifikasi gen *iga* dilakukan hibridisasi Southern blot (cara seperti telah diuraikan di atas), dengan menghibridisasikan genom *U. urealyticum* dengan produk PCR (hasil amplifikasi “sequence” *U. urealyticum*). Setelah verifikasi, tahap terakhir adalah “sequencing” nukleotida hasil amplifikasi “sequence” DNA *U. urealyticum* dengan primer yang didesain berdasarkan “sequence” gen *iga* putatif *M. genitalium*.

13. “Sequencing” DNA

“Sequencing” fragmen DNA *U. urealyticum* hasil amplifikasi dengan teknik PCR (setelah diisolasi), dilakukan dengan mesin “ABI 377A DNA sequencer” oleh Lembaga Eijkman, Jakarta.

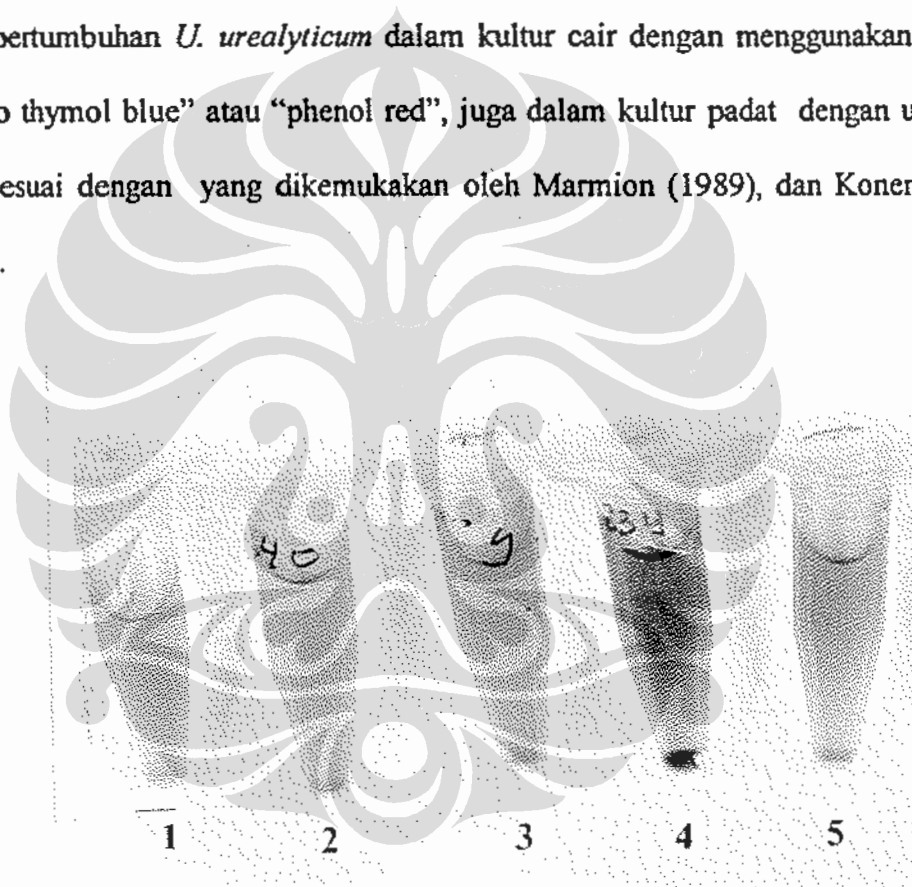
A. Kultur *U. urealyticum*

Pertumbuhan *U. urealyticum* dilakukan beberapa kali baik dalam medium cair maupun dalam medium padat, dan berhasil dengan baik. Pertumbuhan *U. urealyticum* yang membutuhkan waktu sekitar 1 – 7 hari ini dapat diketahui dengan adanya perubahan warna kultur dari kuning menjadi hijau muda atau atau menjadi merah sesuai dengan indikator yang digunakan. Kultur cair *U. urealyticum* ATCC 27618 dan *U. urealyticum* dari sampel semen pria pasangan infertil umur 2 hari, di dalam medium “U. broth” dengan menggunakan indikator “bromo thymol blue” tampak berwarna hijau seperti ditunjukkan pada Gambar 8. Kultur cair *U. urealyticum* ATCC 27816 umur 2 hari di dalam “U. broth” dengan menggunakan indikator “phenol red” tampak mengalami perubahan warna dari kuning menjadi merah, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 9. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh aktivitas metabolisme *U. urealyticum* yang sedang tumbuh. Dalam metabolisme, urease yang diekspresikan oleh gen *ure* menghidrolisis urea menjadi amonia, dan mengakibatkan naiknya pH medium. Bila pH medium naik menjadi sekitar 6.25 - 6.5, medium tampak berwarna hijau atau merah, sesuai dengan indikator yang digunakan. Kultur padat *U. urealyticum* ATCC 27618 umur 3 hari, di dalam medium “U. agar” diperlihatkan pada Gambar 10. Adanya pertumbuhan *U. urealyticum* di dalam medium padat dapat diketahui dengan menggunakan uji pewarnaan $MnCl_2$ -urea. Uji $MnCl_2$ -urea ini adalah untuk mendeteksi adanya pembentukan amonia oleh *U. urealyticum*. Dengan memaparkan koloni *U.*

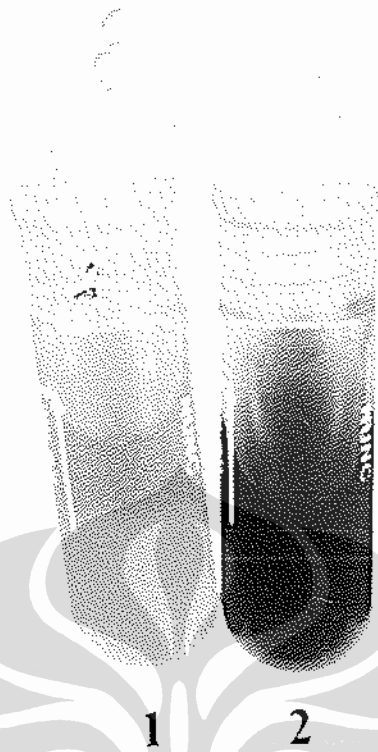
urealyticum pada larutan $MnCl_2$ -urea, enzim urease akan menghidrolisis urea menjadi amonia, dan selanjutnya terjadilah reaksi berikut ini:



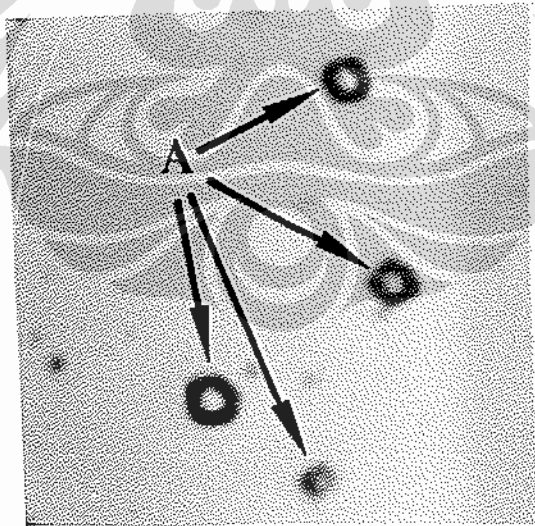
MnO yang terbentuk dalam reaksi ini tidak larut dalam air, dan membentuk endapan coklat keemasan disekeliling koloni seperti ditunjukkan dalam Gambar 10. Reaksi ini dapat dideteksi dengan mikroskop perbesaran kuat, kemudian diambil gambarnya. Hasil pertumbuhan *U. urealyticum* dalam kultur cair dengan menggunakan indikator “bromo thymol blue” atau “phenol red”, juga dalam kultur padat dengan uji $MnCl_2$ -urea, sesuai dengan yang dikemukakan oleh Marmion (1989), dan Koneman *et al.* (1992).



Gambar 8. Kultur cair *U. urealyticum* dengan indikator “bromo thymol blue”.
Dari kiri ke kanan: 1. Kontrol: medium tanpa *U. urealyticum*, berwarna kuning. 2 dan 3. Kultur negatif dari sampel semen pria pasangan infertil, berwarna kuning. 4. Kultur positif dari sampel semen pria pasangan infertil, berwarna hijau agak gelap karena adanya semen yang mengandung *U. urealyticum*.
5. Kultur positif *U. urealyticum* ATCC 27618 berwarna hijau terang.



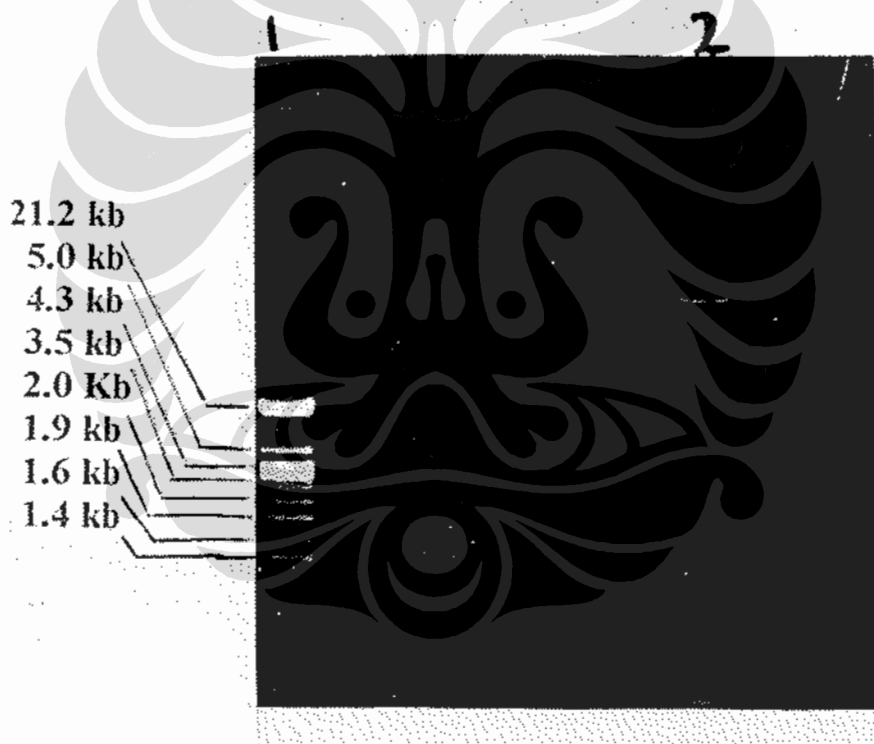
Gambar 9. Kultur cair *U. urealyticum* dengan indikator "phenol red".
 1. Kontrol: medium tanpa *U. urealyticum*, berwarna kuning.
 2. Kultur positif *U. urealyticum*, ATCC 27618 berwarna merah.



Gambar 10. Kultur padat positif *U. urealyticum* ATCC 27618 dengan pewarnaan MnCl₂-urea.
 A. Endapan MnO coklat keemasan di sekeliling koloni *U. urealyticum*.

B. Hasil isolasi dan digesti genom *U. urealyticum*

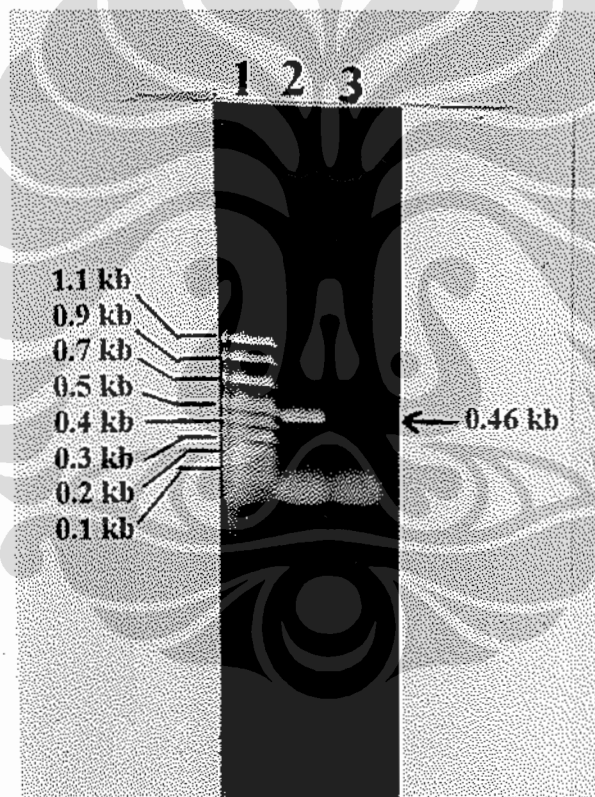
Adanya pertumbuhan *U. urealyticum* dalam kultur cair dikonfirmasi dengan uji amplifikasi gen *ure* dengan teknik PCR, dengan menggunakan genom *U. urealyticum* sebagai cetakan. Genom atau DNA cetakan untuk amplifikasi didapatkan dari hasil isolasi genom *U. urealyticum* dari hasil pembiakan *U. urealyticum* ATCC 27618 di dalam "U. broth". Hasil isolasi genom *U. urealyticum* setelah didigesti dengan *EcoRI* tampak "smear" seperti diperlihatkan pada Gambar 11. Gambaran yang "smear" tersebut karena banyaknya situs atau tempat pemutusan pada genom *U. urealyticum* oleh *EcoRI*.



Gambar 11. Hasil digesti genom *U. urealyticum* ATCC 27618 dengan *EcoRI*.
Lajur 1: Marka III (DNA λ didigesti dengan *EcoRI* dan *HindIII*)
Lajur 2: Genom *U. urealyticum* ATCC 27618 dengan *EcoRI*
Di antara lajur 1 dan lajur 2 juga terdapat 5 lajur hasil digesti *U. urealyticum* dengan *EcoRI*, hanya saja hasil ini samar-samar, sehingga tidak begitu tampak pada foto.

C. Hasil deteksi pertumbuhan *U. urealyticum* dengan amplifikasi gen *ure*

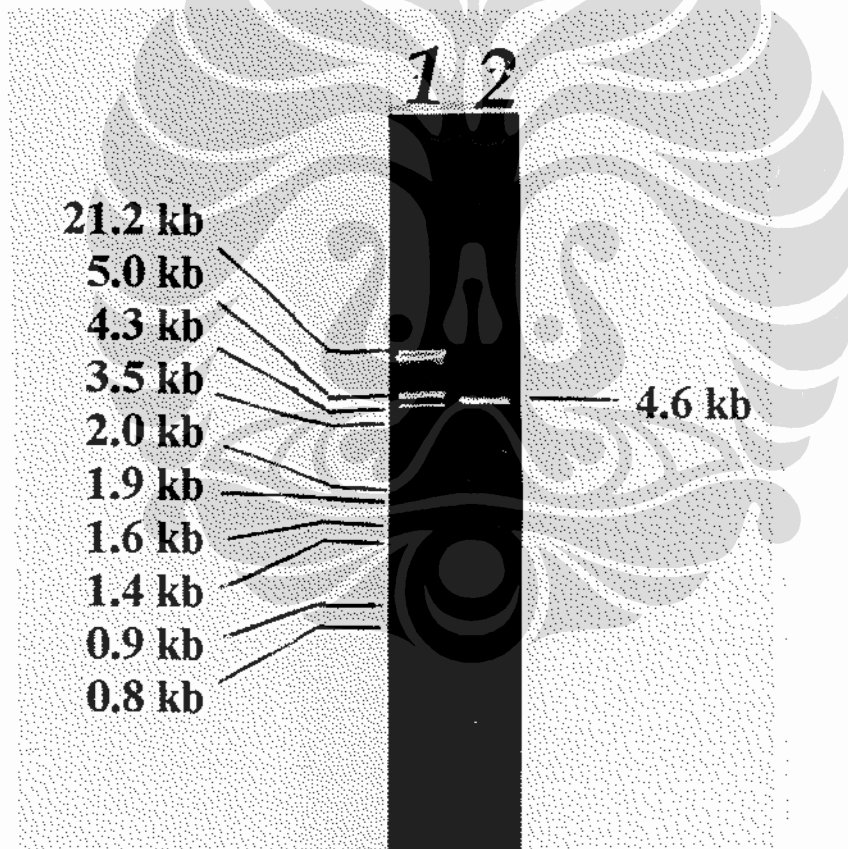
Amplifikasi genom hasil isolasi dari *U. urealyticum* ATCC 27618 dilakukan dengan teknik PCR untuk verifikasi adanya pertumbuhan kuman tersebut. Genom *U. urealyticum* tersebut diamplifikasi dengan menggunakan sepasang primer yang berkomplementer dengan gen *ure*. Setelah dideteksi dengan elektroforesis gel mini agarosa, produk PCR tersebut memperlihatkan pita gen *ure* sepanjang 0.46 kb, seperti ditunjukkan pada Gambar 12. Hasil tersebut sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Teng *et al.* (1994).



.Gambar 12. Hasil amplifikasi gen *ure* *U. urealyticum* ATCC 27618 dengan PCR. Lajur 1: marka VIII (pUCBM21 dipotong dengan *HpaII*, *DraI*, dan *HindIII*). Lajur 2: Gen *ure* *U. urealyticum*: 0.46 kb. Panah pada foto dimaksudkan untuk menunjukkan pita gen *ure* sepanjang 0.46 kb pada lajur 2. Lajur 3: kontrol negatif (dari genom *E. coli* DH5 α).

D. Hasil isolasi plasmid pUC18 dari kultur *E. coli sure2*

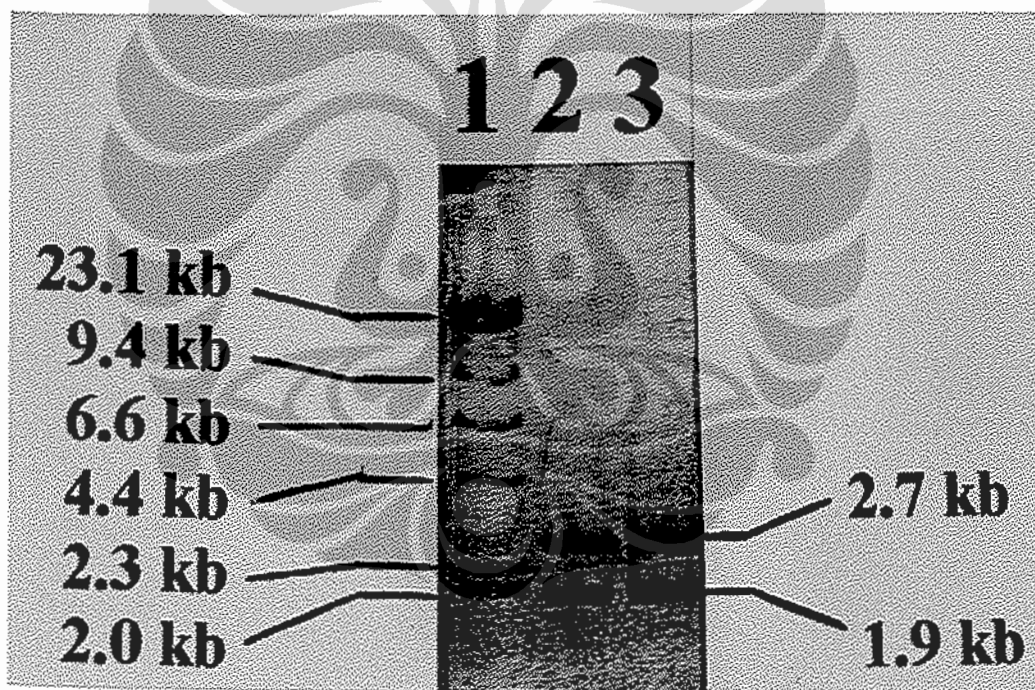
Pembiakan *E. coli sure2*, pUC18::iga putatif MG219 dilakukan dalam medium cair ("LB broth") dengan hasil baik (kultur tampak keruh). Pembiakan dilakukan dengan goyangan kuat, dan diinkubasikan selama satu malam pada suhu 37⁰ C. Hasil isolasi plasmid yang disisipi gen *iga* putatif *M. genitalium* (pUC18::iga putatif MG219) dari kultur *E. coli sure2* setelah diobservasi dengan elektroforesis gel mini agarosa menunjukkan pita sepanjang 4.6 kb, seperti tampak pada Gambar 13. Hasil tersebut sesuai dengan ukuran plasmid pUC18 sepanjang 2.7 kb, yang telah mendapatkan sisipan gen *iga* putatif *M. genitalium* sepanjang 1.9 kb.



Gambar 13. Hasil isolasi plasmid pUC18 dari kultur *E. coli sure2*.
Lajur 1: Marka III (DNA λ dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII*).
Lajur 2: pUC18 yang mendapat sisipan gen *iga* putatif *M. genitalium* (4.6 kb).

E. Hasil digesti plasmid pUC18::*iga* putatif *M. genitalium*

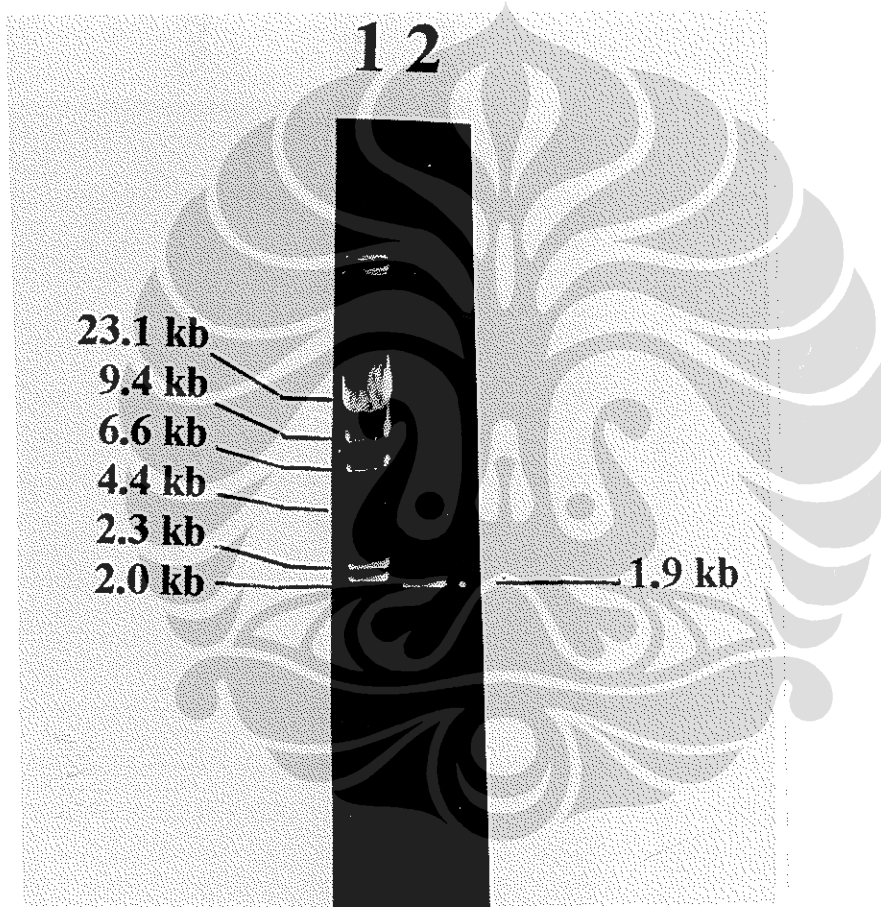
Gen *iga* putatif *M. genitalium* yang disisipkan di dalam plasmid pUC18 berhasil didigesti dengan menggunakan enzim *Bam*HI dan *Eco*RI. Hasil digesti (dideteksi dengan elektroforesis gel mini agarosa) dapat dilihat pada Gambar 14, tampak terdiri atas pita plasmid pUC18 2.7 kb dan pita fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* 1.9 kb. Hasil tersebut sesuai dengan keterangan atau perhitungan dari ATCC atau Fraser *et al.*, (1995), bahwa fragmen gen *iga* putative *M. genitalium* sepanjang 1.9 kb disisipkan ke dalam plasmid pUC18 sepanjang 2.7 kb, dan diklon di dalam *E. coli* *sure*2.



Gambar 14. Hasil digesti plasmid pUC18 dengan *Bam*HI dan *Eco*RI.
Lajur 1: marka II (DNA λ dipotong dengan *Eco*RI).
Lajur 2 dan 3: plasmid pUC18 (2.7 kb) dan fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* (1.9 kb).

F. Hasil isolasi fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium*

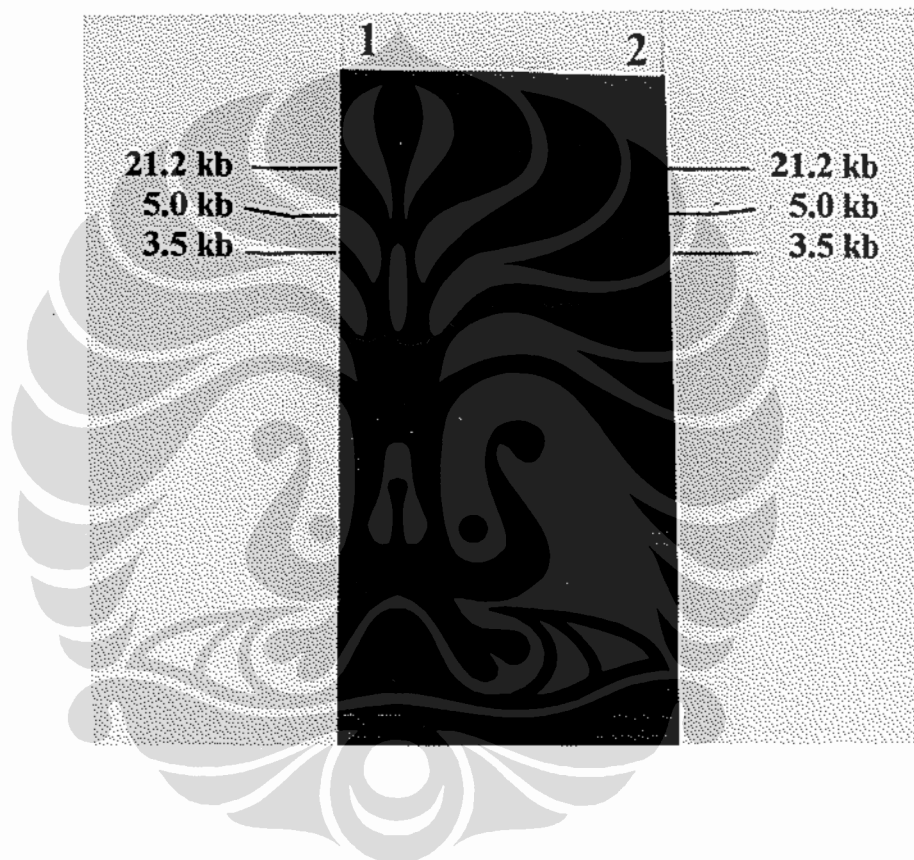
Fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* berhasil diisolasi dari gel agarosa dengan metoda "GlassMAX". Keberhasilan isolasi gen *iga* putatif *M. genitalium* dari plasmid pUC18::*iga* putatif MG219 dapat diketahui setelah dilakukan observasi dengan elektroforesis gel mini agarosa; hasilnya menunjukkan pita fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* sepanjang 1.9 kb seperti tampak pada Gambar 15.



Gambar 15. Hasil isolasi fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium*
Lajur 1: Marka II (DNA λ dipotong dengan *EcoRI*)
Lajur 2: Hasil isolasi fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* (1.9 kb)

G. Hasil hibridisasi antara fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan genom *U. urealyticum*

Fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* tersebut di atas setelah dilabel dengan digoksinenin dan dihibridisasikan dengan genom *U. urealyticum* menunjukkan pita-pita hibridisasi sepanjang 21.2 kb, 5.0 kb, dan 3.5 kb seperti tampak pada Gambar 16.



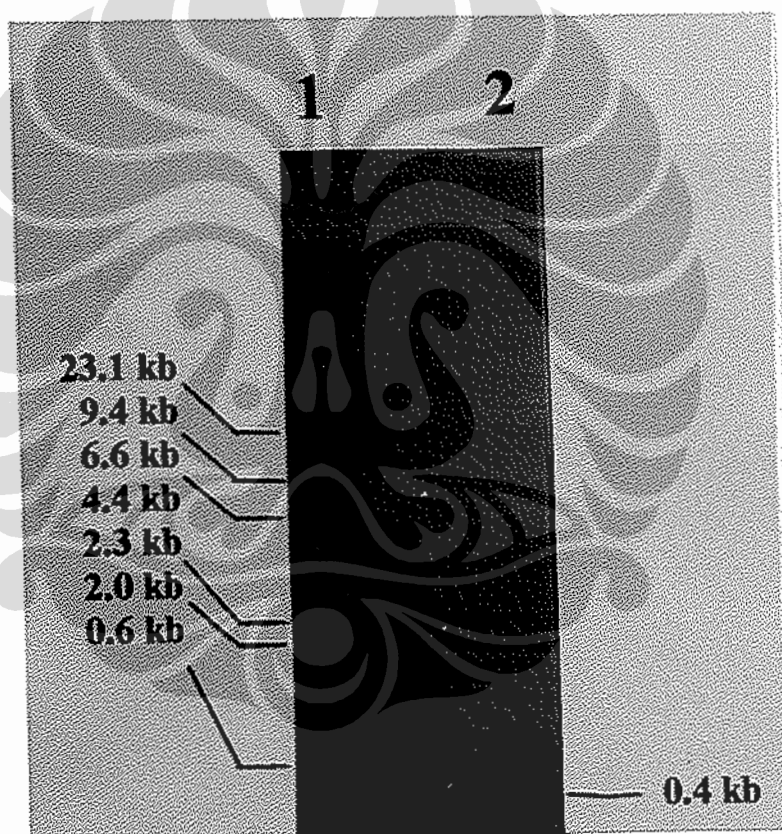
Gambar 16. Hasil hibridisasi gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan genom *U. urealyticum*.

Lajur 1: Hasil hibridisasi gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan genom *U. urealyticum* menunjukkan pita sepanjang 21.2 kb, 5.0 kb, dan 3.5 kb.

Lajur 2: Marka III (DNA λ dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII*).

H. Hasil amplifikasi fragmen gen *iga U. urealyticum* dengan teknik PCR dengan menggunakan primer yang dirancang berdasarkan “sequence” gen *iga* putatif *M. genitalium*.

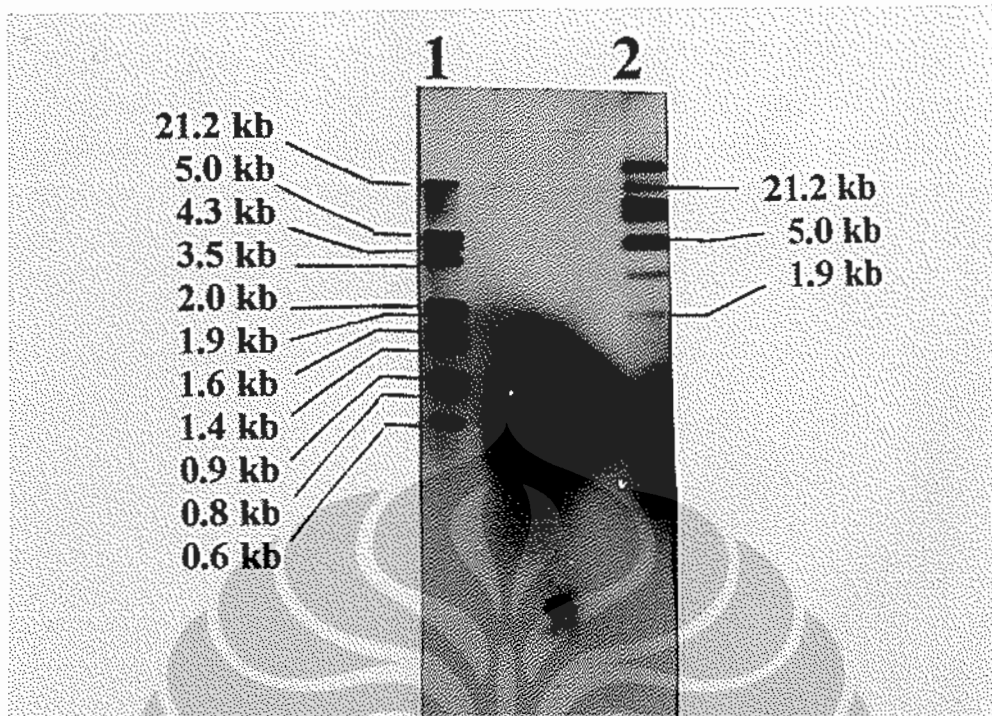
Perancangan primer berdasarkan rangkaian nukleotida gen *iga* putatif *M. genitalium* mendapatkan sepasang rangkaian oligonukleotida primer sebagai berikut: primer “forward” 5'-AAAAATACCCATAATGAATAGTGATAG-3', dan primer “reverse” dengan urutan 5'-TTTTGTTTGAATTTGGGTTGGTTTAG-3'. Sepasang primer tersebut digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA *U. urealyticum* dengan teknik PCR yang menggunakan genom *U. urealyticum* sebagai cetakannya.



Gambar 17. Hasil amplifikasi fragmen gen *iga U. urealyticum* produk PCR
Lajur 1: Marka II (DNA λ dipotong dengan *EcoRI*)
Lajur 2: Hasil amplifikasi fragmen gen *iga U. urealyticum* (0.4 kb) dengan teknik PCR.

Observasi produk PCR (hasil amplifikasi fragmen gen *iga U. urealyticum*) dengan elektroforesis gel mini agarosa menunjukkan pita sepanjang 0.4 kb, sebagaimana tampak pada Gambar 17. Pita DNA pada gel agarosa tersebut kemudian diisolasi dan dipurifikasi dengan metoda "GlassMAX". Untuk verifikasi hasil purifikasi produk PCR kemudian dilabel dengan digoksinin, dan selanjutnya dihibridisasikan dengan genom *U. urealyticum* dengan metoda hibridisasi Southern.

Hasil verifikasi produk PCR dengan cara menghibridisasikan produk PCR tersebut dengan genom *U. urealyticum*, dapat dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa. Fragmen gen *iga U. urealyticum* produk PCR berlabel digoksinin, berhibridisasi dengan fragmen-fragmen genom *U. urealyticum*, dan pita-pita hibridisasi dapat ditunjukkan dalam Gambar 18 dengan ukuran sebagai berikut: 1 pita dengan ukuran > 21.2 kb, 1 pita sepanjang 21.2 kb, 2 pita dengan ukuran antara 5.0 - 21.2 kb, 1 pita sepanjang 5.0 kb, 1 pita dengan ukuran antara 2.0 – 3.5 kb, dan 1 pita sepanjang 1.9 kb. Berdasarkan hasil tersebut yang teramplifikasi pada produk PCR adalah fragmen gen *iga* dari genom *U. urealyticum*.



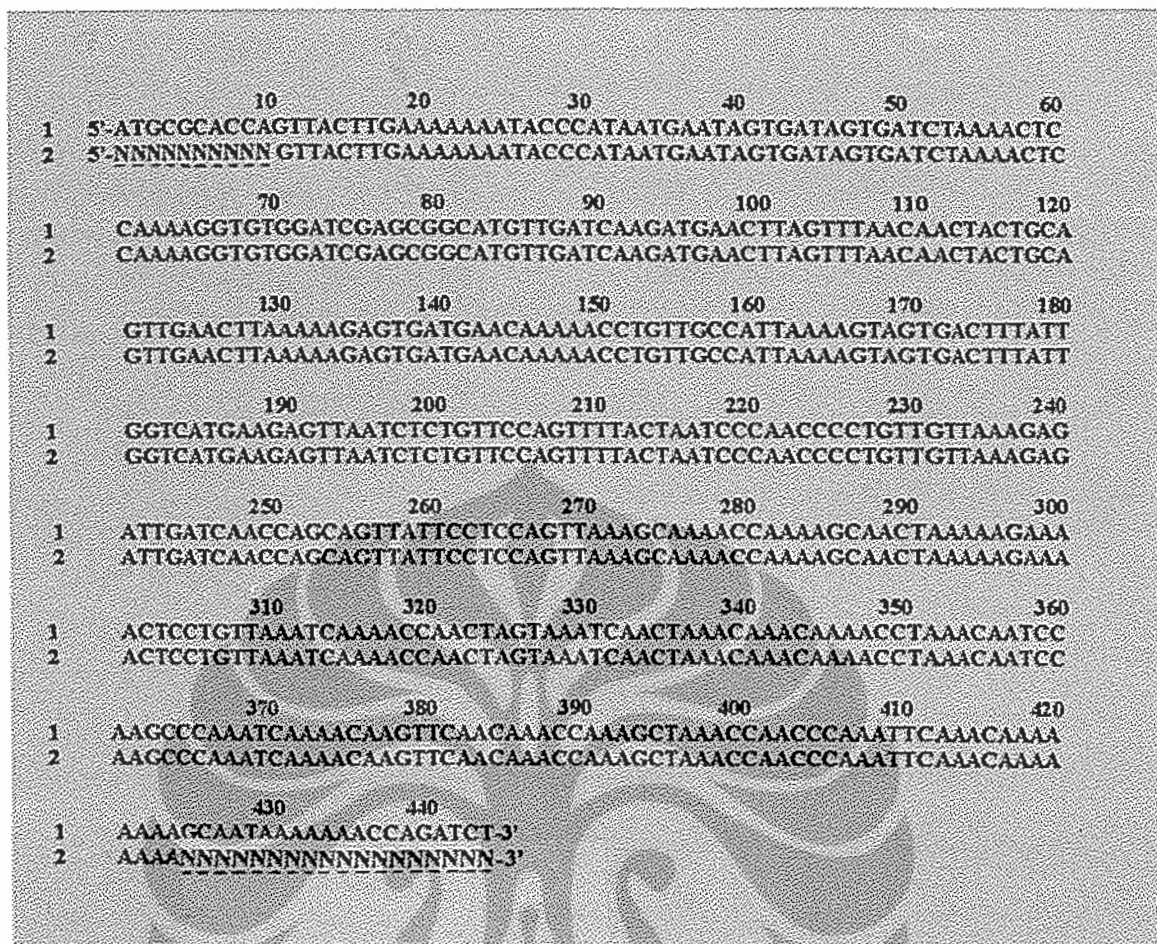
Gambar 18. Hasil hibridisasi fragmen gen *iga U. urealyticum* produk PCR dengan genom *U. urealyticum*.

Lajur 1: Marka III (DNA λ dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII*)

Lajur 2: Pita-pita hibridisasi fragmen gen *iga U. urealyticum* produk PCR dengan fragmen-fragmen genom *U. urealyticum* dengan ukuran: 1 pita dengan ukuran > 21.2 kb, 1 pita sepanjang 21.2 kb, 2 pita dengan ukuran antara 5.0 – 21.2 kb, 1 pita sepanjang 5.0 kb, 1 pita dengan ukuran antara 2.0 – 3.5 kb, dan 1 pita sepanjang 1.9 kb.

I. Hasil “sequencing” fragmen gen *iga U. urealyticum* produk PCR

“Sequencing” fragmen gen *iga U. urealyticum* produk PCR dengan mesin “ABI377A sequencer” oleh Lembaga Eijkman, Jakarta menunjukkan homologi 100% dengan “sequence” gen *iga putatif M. genitalium* sepanjang 400 pb seperti ditunjukkan oleh kedua “sequence” nukleotida yang tertera pada Gambar 19, berdasarkan penulisan Chadwick *et al.* (1998).



Gambar 19. Homologi antara “sequence” gen *iga* putatif *M. genitalium* dan “sequence” gen *iga* *U. urealyticum* produk PCR.

1. “Sequence” fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium*.
 2. “Sequence” fragmen gen *iga* *U. urealyticum* produk PCR.
- Angka 10-440 menunjukkan urutan nukleotida fragmen gen *iga*.

BAB V

PEMBAHASAN

Patogenesis bakteri dalam hubungannya dengan protease IgA1

IgA1 merupakan imunoglobulin utama pada permukaan membran mukosa manusia. Beberapa bakteri patogenik termasuk *U. urealyticum* terbukti dapat menghasilkan protease IgA1. Oleh karena protease IgA1 yang dihasilkan oleh bakteri patogen terbukti memutus rantai berat IgA1, maka protease IgA1 dipertimbangkan sebagai faktor virulensi potensial bakteri yang mengkolonisasi dan menginfeksi membran mukosa tersebut. Pada beberapa bakteri patogenik seperti *S. pneumoniae*, *H. influenzae* dan *N. meningitidis* telah dapat dibuktikan bahwa bakteri tersebut mempunyai gen *iga* yang berpotensi mengekspresikan protease IgA1. *U. urealyticum* juga diketahui dapat menyebabkan berbagai penyakit infeksi pada permukaan membran mukosa organ manusia, dan dapat menyebabkan infertilitas. Pernyataan yang terakhir ini diperkuat oleh hasil penelitian Harmiatun dan Soeharso (1998), bahwa *U. urealyticum* dapat dideteksi dalam 43 % semen pria pasangan infertil. Harmiatun (submitted) juga mendapatkan bahwa *U. urealyticum* di dalam semen pria pasangan infertil dapat menyebabkan bocornya membran plasma sperma pria tersebut. Bocornya membran plasma ini dapat dideteksi dengan uji pembengkakan membran plasma atau "hypoosmotic swelling test" (HOS Test), ekor sperma tampak lurus, tidak melengkung, atau tidak membengkak, namun tentang penyebab dan mekanisme terjadinya kebocoran membran plasma belum diketahui. Bocornya membran plasma memungkinkan hilangnya enzim penetrasi sperma terhadap dinding sel telur seperti akrosin dan hialuronidase, sehingga dengan demikian dapat mengganggu fungsi

sperma, antara lain dalam penetrasi atau pembuahan sel telur. *U. urealyticum* yang dapat menimbulkan penyakit infeksi pada berbagai organ dan dapat menyebabkan infertilitas pada manusia tersebut juga diketahui dapat menghasilkan protease IgA1, dan protease IgA1 yang dihasilkan oleh *U. urealyticum* juga dapat memutus rantai berat IgA1 menjadi fragmen Fab dan fragmen Fc. Hal ini telah dibuktikan oleh Kapatais *et al.* (1985) pada 28 galur *U. urealyticum*, Spooner *et al.* (1992), pada 14 galur *U. urealyticum*, dan Mesak (1999), pada *U. urealyticum* galur DKF3 dan CX-8. Mengingat bahwa penyakit infeksi dan infertilitas masih merupakan masalah utama di Indonesia, perlu adanya usaha untuk mendeteksi gen (*iga*) yang diduga kuat berkaitan dengan ekspresi protease IgA1 yang berperan sebagai faktor virulensi tersebut.

Dalam usaha mendeteksi gen *iga U. urealyticum* tersebut, dibutuhkan gen *iga* bakteri patogen lain yang homolog dengan gen *iga U. urealyticum* untuk melacaknya. Gen *iga* putatif *M.genitalium* diharapkan mempunyai homologi yang tinggi dengan gen *iga U. urealyticum*, dan diharapkan dapat digunakan untuk melacak gen *iga* tersebut. Dalam upaya mendeteksi gen *iga U. urealyticum* dengan pelacak gen *iga* putatif *M. genitalium*, diperoleh tahap-tahap penelitian yang memberikan harapan.

Upaya menumbuhkan *U. urealyticum*, setelah berusaha sekian lama akhirnya berhasil juga. Menumbuhkan *U. urealyticum* adalah amat sulit dan rumit di samping membutuhkan biaya yang mahal. Di samping viabilitas *U. urealyticum* yang mudah sekali turun bila terkena udara terbuka, juga pertumbuhannya di dalam medium cair tidak menimbulkan kekeruhan. Perubahan warna kultur cair yang ditunjukkan oleh indikator yang ditambahkan pada medium, juga belum memberikan jaminan mutlak bahwa telah terjadi pertumbuhan *U. urealyticum*. Mungkin saja perubahan warna

kultur tersebut akibat adanya pertumbuhan bakteri lain, misalnya *Mycoplasma hominis*. Oleh karena itu kebenaran akan pertumbuhan *U. urealyticum* di dalam medium cair perlu dikonfirmasi. Konfirmasi dapat dilakukan dengan melakukan subkultur *U. urealyticum* dari medium cair tersebut ke medium padat. Subkultur dilakukan segera setelah terjadi perubahan warna pada kultur cair, yaitu pada pH sekitar 6.25 – 6.5. Setelah tampak terjadi pertumbuhan pada kultur padat ini, segera dilakukan deteksi *U. urealyticum* dengan uji koloni, dengan menggunakan pewarnaan MnCl₂-urea. Dengan uji pewarnaan ini pertumbuhan *U. urealyticum* sudah dapat dikonfirmasi dari ciri-ciri khas koloni *U. ureaplasma* yang ditampilkan, yaitu koloni berwarna kuning dikelilingi halo atau lingkaran yang tidak bundar, dan berwarna coklat keemasan atau coklat tua. Ciri-ciri koloni tersebut tidak ada pada bakteri lain seperti misalnya pada *M. hominis* yang menampilkan koloni seperti telur mata sapi. Bila uji koloni pada kultur padat ini sudah dapat dilakukan dengan trampil, konfirmasi lain terhadap pertumbuhan *U. urealyticum* dalam medium cair tidak perlu dilakukan lagi, kecuali untuk mencari alternatif lain bagi penelitian yang akan datang, dan agar lebih meyakinkan lagi.

U. urealyticum ATCC 27618 dapat ditumbuhkan di dalam medium “U. broth” dan “U. agar” dalam waktu 1 sampai 7 hari. Keberhasilan menumbuhkan *U. urealyticum* tersebut memungkinkan proses penelitian tentang pelacakan gen *iga* dapat dilanjutkan, di samping adanya kemungkinan lain untuk mulai mendeteksi *U. urealyticum* pada berbagai spesimen klinik dari para penderita penyakit infeksi maupun pasangan infertil di Indonesia dengan metoda pembiakan.

Untuk lebih meyakinkan lagi akan kebenaran pertumbuhan *U. urealyticum*, dalam penelitian ini juga dilakukan uji amplifikasi gen *ure* *U. urealyticum* dengan

teknik PCR. Genom hasil isolasi dari kultur cair *U. urealyticum* dipakai sebagai cetakan untuk amplifikasi gen *ure*. Gen *ure* dipilih sebagai alat verifikasi untuk pertumbuhan *U. urealyticum* sebab *U. urealyticum* telah terbukti mempunyai gen *urease* yang mengekspresikan enzim urease. Enzim urease hanya diproduksi oleh *U. urealyticum*, dan tidak diproduksi oleh *mycoplasma* yang lain (Blanchard *et al.*, 1993; Teng *et al.*, 1994). Selain itu fragmen gen *ure* yang diamplifikasi dengan teknik PCR tersebut telah dipilih dari “sequence” gen *ure* yang tidak mempunyai homologi pada “sequence” gen *ure* spesies lain seperti *Proteus mirabilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Morganella morganii*, *Helicobacter pylori*, dan *Providencia stuartii* (Willoughby *et al.*, 1991; Blanchard *et al.*, 1993; Teng *et al.*, 1994; Neyrolles *et al.*, 1996). Dengan telah diketahuinya gen *ure* dan juga telah dirancang primer yang hanya berkomplementer dengan fragmen gen *ure* *U. urealyticum* (0.46 kb), yang tidak homolog dengan gen *ure* dari mikroorganisme lain, maka fragmen gen *ure* dapat dipakai untuk mendeteksi pertumbuhan *U. urealyticum* secara akurat (Teng *et al.*, 1994).

Uji amplifikasi gen *ure* *U. urealyticum* tersebut selanjutnya juga dapat dipakai untuk memperkuat hasil deteksi *U. urealyticum* pada berbagai spesimen klinik dari penderita penyakit infeksi atau dari pasangan suami-isteri infertil. Hasil verifikasi terhadap pertumbuhan *U. urealyticum* dengan teknik PCR, setelah diobservasi dengan elektroforesis gel mini agarosa menghasilkan pita sepanjang 0.46 kb, yaitu pita fragmen gen *ure* yang berhasil diamplifikasi dengan primer yang berkomplementer tersebut di atas. Hasil tersebut membuktikan bahwa biakan yang dilakukan merupakan pertumbuhan *U. urealyticum*.

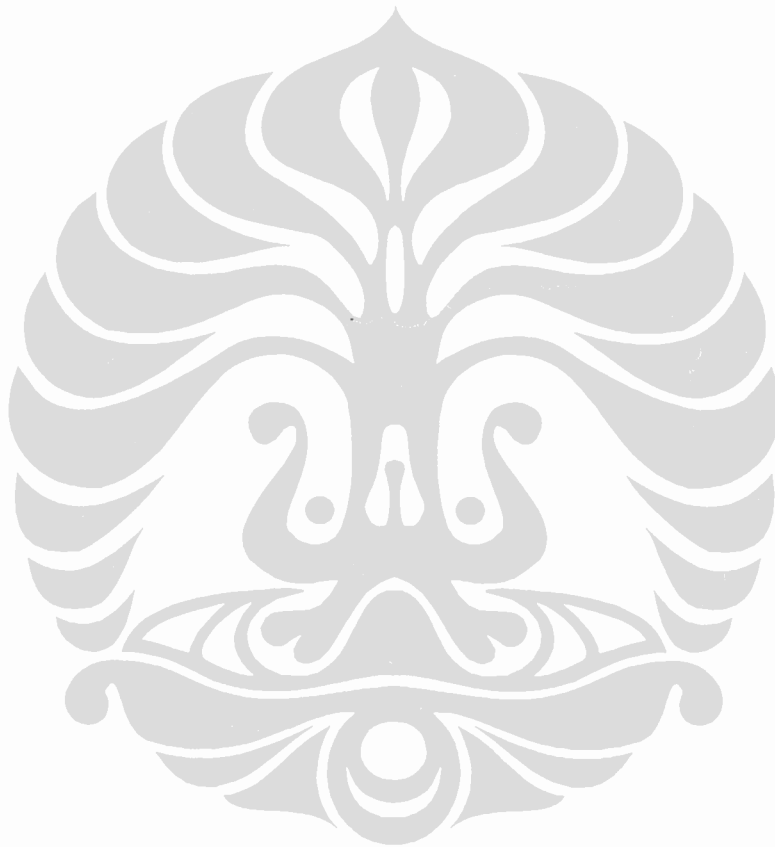
Karena gen *iga* putatif *M. genitalium* disisipkan di dalam plasmid pUC18 kemudian diklon di dalam *E. coli sure2*, maka langkah awal dalam upaya mengisolasi gen *iga* putatif *M. genitalium* tersebut ialah dengan membiakkan *E. coli sure2*. Isolasi plasmid pUC18::gen *iga* putatif *M. genitalium* yang dilakukan pada kultur *E. coli sure2* tersebut, menghasilkan pita 4.6 kb pada elektroforesis gel agarosa. Pita ini merupakan gabungan antara pita plasmid pUC18 sepanjang 2.7 kb dan pita gen *iga* putatif *M. genitalium* yang terdapat dalam "sequence" DNA sepanjang 1.9 kb.

Hasil isolasi dan purifikasi gen *iga* putatif *M. genitalium* sepanjang 1.9 kb tersebut setelah dilabel dengan digoksinen kemudian dihibridisasikan dengan genom *U. urealyticum* dengan metoda hibridisasi Southern blot. Hasil hibridisasi menunjukkan adanya beberapa pita DNA sepanjang 21.2 kb, 5.0 kb, dan 3.5 kb. Hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi peristiwa hibridisasi antara "sequence" fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan "sequence" fragmen-fragmen genom *U. urealyticum*. Terlihatnya pita hibridisasi juga menandakan bahwa labelisasi berhasil. Adanya signal hibridisasi tersebut, memungkinkan dilakukannya perancangan primer untuk mengamplifikasi fragmen gen *iga* *U. urealyticum* dengan teknik PCR berdasarkan "sequence" gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan menggunakan program komputer. Primer tersebut terbukti dapat berkomplementer dengan fragmen genom *U. urealyticum*, dan dapat mengamplifikasi fragmen genom *U. urealyticum* sepanjang 0.4 kb, sama panjang dengan "sequence" yang dipakai sebagai dasar untuk merancang primer gen *iga* *U. urealyticum*. Keberhasilan amplifikasi tersebut diperkuat oleh hasil verifikasi positif terhadap hasil amplifikasi (produk PCR), yaitu dengan terjadinya hibridisasi antara produk PCR yang sudah berlabel digoksinen dengan fragmen-

fragmen genom *U. urealyticum*. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa yang teramplifikasi adalah fragmen genom *U. urealyticum*. Adanya beberapa pita pada hasil hibridisasi mengindikasikan bahwa terdapat beberapa "sequence" fragmen genom *U. urealyticum* yang homolog dengan "sequence" fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium*. Hal ini bisa saja terjadi karena terbentuknya fragmen-fragmen genom *U. urealyticum* dalam berbagai ukuran pada saat isolasi genom dan pada saat digesti genom dengan *EcoRI*. Fragmen-fragmen genom *U. urealyticum* tersebut mengandung "sequence" nukleotida yang homolog dengan "sequence" nukleotida fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* yang digunakan sebagai pelacak. Dari hasil hibridisasi tersebut, dengan membandingkan pita hibridisasi dengan marka III (DNA λ dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII*), tampak pita-pita hibridisasi dengan ukuran: 1 pita dengan ukuran > 21.2 kb, 1 pita sepanjang 21.2 kb, 2 pita dengan ukuran antara 5.0 – 21.2 kb, 1 pita sepanjang 5.0 kb, 1 pita dengan ukuran antara 2.0 – 3.5 kb, dan 1 pita sepanjang 1.9 kb.

Untuk mengetahui besarnya atau tinggi rendahnya homologi antara fragmen "sequence" gen *iga* *U. urealyticum* dengan fragmen "sequence" gen *iga* putatif *M. genitalium*, dilakukan "sequencing" produk PCR. Hasil "sequencing" produk PCR yang dilakukan oleh Lembaga Eijkman, Jakarta, menunjukkan bahwa "sequence" fragmen genom *U. urealyticum* sepanjang 0.4 kb (400 pb) tersebut homolog 100% dengan "sequence" fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium*. Kebenaran pernyataan tersebut dapat dilihat pada "sequence" kedua fragmen yang disajikan pada Gambar 19. Tampak bahwa "sequence" fragmen genom *U. urealyticum* produk PCR sepanjang 400 pb tersebut merupakan bagian awal dari "open reading frame", yang ditandai oleh adanya "sequence" khusus ATG (nukleotida nomor 34-36), yang merupakan kodon

inisiasi translasi universal (Glick and Pasternack, 1994). Penemuan suatu “open reading frame” paling sedikit dapat merupakan petunjuk mengenai lokasi suatu gen (misalnya: gen *iga*). Perlu diketahui, pada genom *U. urealyticum*, UGA dibaca sebagai kodon triptofan dan bukan sebagai kodon stop (Blanchard, 1990; Inamine *et al.*, 1990).



BAB VI

RINGKASAN, KESIMPULAN, DAN SARAN

A. RINGKASAN

Ureaplasma urealyticum adalah bakteri Gram-negatif, nonmotil, tidak berding sel, berdiameter 0.2 - 0.25 um, dan bersifat oportunistik. *U. urealyticum* dapat mengkolonisasi membran mukosa uterus, plasenta, amnion, dan saluran nafas serta selaput otak bayi. Kolonisasi tersebut dapat menyebabkan prematuritas, aborsi spontan, berat bayi lahir rendah, morbiditas dan mortalitas bayi. Kolonisasi *U. urealyticum* pada saluran urogenital pria dan wanita dapat menyebabkan uretritis, salpingitis, dan infertilitas. *U. urealyticum* dan bakteri patogen lain seperti *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* dan *Streptococcus pneumoniae* telah diketahui mengekspresikan protease IgA1 yang memecah IgA1 manusia. Karena IgA1 merupakan faktor pertahanan tubuh utama pada membran mukosa, maka diperkirakan protease IgA1 merupakan faktor virulensi penting yang berperan dalam langkah awal patogenesis. Protease IgA1 pada bakteri patogen lain tersebut sudah berhasil dibuktikan diekspresikan oleh gen *iga*. Sedangkan protease IgA1 *U. urealyticum* belum berhasil diungkapkan, mengingat *U. urealyticum* yang merupakan bakteri paling kecil tersebut sulit ditumbuhkan dan mudah sekali mengalami penurunan viabilitas. Meskipun menumbuhkan *U. urealyticum* dalam medium cair sudah termasuk sulit, menumbuhkan *U. urealyticum* dalam medium padat masih jauh lebih sulit lagi. Di samping diperlukan kesabaran, ketelitian, ketekunan, serta keuletan, juga diperlukan kejelian dalam hal menumbuhkan dan mendeteksi koloni *U. urealyticum* dalam

medium padat. Usaha ke arah itu membutuhkan waktu yang cukup lama, di samping dana yang banyak. Meskipun penanganan *U. urealyticum* cukup sulit, mengingat *U. urealyticum* mempunyai dampak yang luas, dapat menyebabkan berbagai penyakit infeksi dan infertilitas, yang masih merupakan masalah serius di Indonesia, maka pada penelitian ini dilakukan upaya pelacakan gen *iga U. urealyticum* dengan menggunakan fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium*. Selain itu penelitian ini juga berupaya untuk mengidentifikasi dan memberikan informasi tentang adanya gen *iga U. urealyticum*, gen yang dapat mengekspresikan protease IgA1, suatu faktor virulensi pada permukaan membran mukosa organ manusia. Bila gen *iga U. urealyticum* dapat ditemukan, maka gen *iga* tersebut diharapkan dapat dipakai sebagai alat diagnosis dan dapat dipakai untuk mempelajari patogenesis *U. urealyticum*. Penemuan gen *iga U. urealyticum* juga diharapkan dapat dipakai sebagai landasan dalam mengupayakan terapi yang tepat terhadap infeksi *U. urealyticum*.

Penelitian ini menggunakan pelacak gen *iga* putatif *Mycoplasma genitalium*, karena *M. genitalium* dan *U. urealyticum* berkerabat dekat, keduanya termasuk familia *Mycoplasmataceae*. Kedua bakteri tersebut diketahui mengkolonisasi jaringan yang sama (membran mukosa saluran urogenital), serta dapat menyebabkan penyakit yang sama (uretritis), maka diperkirakan gen *iga* putatif *M. genitalium* mempunyai homologi yang tinggi dengan gen *iga U. urealyticum*, sehingga diharapkan gen *iga* putatif *M. genitalium* dapat melacak gen *iga U. urealyticum*.

U. urealyticum yang digunakan untuk penelitian berasal dari galur 27618 yang diperoleh dari "American Type Culture Collection". Juga fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* MG37 diperoleh dari "American Type Culture Collection", yang

direkomendasikan oleh Fraser *et al.* (1995), sebagai “sequence” fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* yang mempunyai homologi dengan gen *iga* *H. influenzae* sebesar 51.3%. Fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* (MG219) disisipkan pada plasmid pUC18 situs *EcoRI* dan *BamHI*, dan selanjutnya plasmid pUC18 tersebut digunakan untuk mentransformasi *E. coli* *sure2*.

Penelitian ini diawali dengan melakukan pembiakan *U. urealyticum* di dalam medium cair “U. broth” dan medium padat “U. agar” selama 1 – 7 hari. Pertumbuhan *U. urealyticum* dalam medium cair dikonfirmasi dengan pertumbuhan *U. urealyticum* dalam medium padat, dan pertumbuhan *U. urealyticum* dalam medium padat dikonfirmasi dengan uji $MnCl_2$ -urea. Konfirmasi atau verifikasi pertumbuhan *U. urealyticum* pada medium cair juga dapat dilakukan dengan mengamplifikasikan fragmen gen *ure* *U. urealyticum* dengan teknik PCR, dengan menggunakan primer yang hanya berkomplementer dengan gen *ure* *U. urealyticum*. Genom *U. urealyticum* diisolasi dari kultur cair *U. urealyticum* dengan metoda Maniatis *et al.* (1982).

Isolasi fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* diawali dengan pembiakan *E. coli* *sure2* yang ditransformasi dengan plasmid pUC18 yang telah disisipi fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* (MG219). pembiakan dilakukan di dalam medium cair dan medium padat Luria-Bertani selama satu malam. Setelah pembiakan diteruskan dengan isolasi plasmid pUC18 dan isolasi gen *iga* putatif *M. genitalium*. Gen *iga* putatif *M. genitalium* hasil isolasi diobservasi dengan elektroforesis gel mini agarosa. Selanjutnya gen *iga* putatif *M. genitalium* dilabel dengan digoksinin dan dihibridisasikan dengan genom *U. urealyticum*. Tujuan hibridisasi di sini ialah untuk melihat adanya konservasi atau homologi antara “sequence” nukleotida pada gen *iga*

putatif *M. genitalium* dengan “sequence” nukleotida genom *U. urealyticum*. Hibridisasi dilakukan dengan cara Southern. Hasil positif dari hibridisasi tersebut memungkinkan penelitian dilanjutkan dengan perancangan primer gen *iga U. urealyticum* berdasarkan “sequence” nukleotida gen *iga* putatif *M. genitalium*. Primer hasil rancangan dengan komputer digunakan untuk melakukan amplifikasi gen *iga U. urealyticum* dengan teknik PCR, dengan genom *U. urealyticum* sebagai cetakannya. Hasil amplifikasi gen *iga U. urealyticum* diobservasi dengan elektroforesis gel mini agarosa, untuk memperkirakan panjang nukleotida. Hasil amplifikasi gen *iga U. urealyticum* setelah dipurifikasi dan dilabel dengan digoksigenin dihibridisasikan dengan genom *U. urealyticum*, sebagai verifikasi terhadap produk PCR atau hasil amplifikasi gen *iga U. urealyticum*. Hibridisasi dilakukan dengan cara Southern blot.

“Sequencing” gen *iga U. urealyticum* hasil amplifikasi dilakukan untuk melihat besarnya homologi antara “sequence” fragmen gen *iga U. urealyticum* dengan “sequence” fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium*. “Sequencing” dilakukan dengan mesin “ABI 377A DNA sequencer” oleh Lembaga Eijkman, Jakarta.

Dalam penelitian ini pembiakan *U. urealyticum* dalam medium cair maupun dalam medium padat, dapat dilakukan dengan baik. Pertumbuhan *U. urealyticum* dalam medium cair dapat diketahui dengan adanya perubahan warna medium dari kuning menjadi hijau (bila memakai indikator “bromo thymol blue”), atau menjadi merah (bila memakai indikator “phenol red”). Pertumbuhan *U. urealyticum* dalam medium padat dapat diketahui dengan uji pewarnaan $MnCl_2$ -urea yang memberikan warna coklat keemasan di sekeliling koloni. Verifikasi pertumbuhan *U. urealyticum*

dengan amplifikasi gen *ure* dengan teknik PCR, dan observasi produk PCR dengan elektroforesis menunjukkan pita fragmen gen *ure* sepanjang 0.46 kb.

Gen *iga* putatif *M. genitalium* yang disisipkan ke dalam plasmid pUC18 dan diklon di dalam *E. coli sure2* dapat diisolasi dengan metoda "GlassMAX". Hasil isolasi gen *iga* putatif *M. genitalium* dari plasmid pUC18, dihibridisasikan dengan genom *U. urealyticum*. Hasil hibridisasi gen *iga* putatif *M. genitalium* tersebut dengan genom *U. urealyticum* menunjukkan pita sepanjang 21.2 kb, 5.0 kb, dan 3.5 kb. Pita-pita hibridisasi tersebut membuktikan tentang adanya homologi antara gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan fragmen genom *U. urealyticum*. Bukti tentang adanya homologi tersebut dimanfaatkan untuk merancang primer untuk amplifikasi gen *iga* *U. urealyticum* pada genom *U. urealyticum*.

Dari penelitian ini dihasilkan "sequence" fragmen genom *U. urealyticum* sepanjang 0.4 kb dengan teknik PCR. Fragmen genom *U. urealyticum* sepanjang 0.4 kb produk PCR (hasil amplifikasi) tersebut diperoleh dengan jalan menggunakan sepasang primer yang dirancang berdasarkan "sequence" gen *iga* putatif *M. genitalium* (yang homolog dengan gen *iga* *H. influenzae*).

Keberhasilan amplifikasi tersebut juga diperkuat oleh hasil verifikasi positif terhadap "sequence" produk PCR yaitu dengan terjadinya hibridisasi antara produk PCR dengan fragmen-fragmen genom *U. urealyticum*. Hasil hibridisasi menunjukkan adanya beberapa pita hibridisasi dengan ukuran: 1 pita > 21.2 kb, 1 pita sepanjang 21.2 kb, 2 pita dengan ukuran antara 5.0 – 21.2 kb, 1 pita sepanjang 5.0 kb, 1 pita dengan ukuran antara 2.0 – 3.5 kb, dan 1 pita sepanjang 1.9 kb.

Hasil “sequencing” terhadap produk PCR memperlihatkan homologi 100 % antara “sequence” fragmen genom *U. urealyticum* produk PCR dengan “sequence” fragmen gen *iga* putatif *M. genitalium* sepanjang 400 pb. Fragmen genom *U. urealyticum* sepanjang 400 pb tersebut mengandung “sequence” ATG, suatu “sequence” nukleotida yang menandakan kodon inisiasi dalam translasi protein.

B. KESIMPULAN

Berdasarkan pada hasil penelitian ini: (1). *U. urealyticum* ATCC 27618 dapat ditumbuhkan di dalam medium cair (“U. broth”) maupun medium padat (“U. agar”) dengan baik, dan konfirmasi positif pertumbuhan *U. urealyticum* telah dilakukan dengan cara mengamplifikasikan gen *ure* genom *U. urealyticum* menggunakan teknik PCR. (2). Gen *iga* putatif *M. genitalium* dapat berhibridisasi dengan genom *U. urealyticum*, dengan memperlihatkan pita hibridisasi sepanjang 21.2 kb, 5.0 kb, dan 3.5 kb, merupakan suatu bukti tentang adanya gen *iga* *U. urealyticum* dan adanya homologi antara gen *iga* putatif *M. genitalium* dengan fragmen gen *iga* pada genom *U. urealyticum*. (3). Adanya homologi 100 % antara “sequence” produk PCR (hasil amplifikasi fragmen genom *U. urealyticum*) dengan “sequence” gen *iga* putatif *M. genitalium* (yang dipakai sebagai dasar dalam merancang primer untuk amplifikasi gen *iga* *U. urealyticum*) sepanjang 400 pb. (4). Fragmen genom *U. urealyticum* produk PCR sepanjang 400 pb tersebut merupakan bagian dari suatu “open reading frame”, yang ditandai oleh adanya “sequence” nukleotida khusus, yaitu “sequence” ATG, yang merupakan kodon inisiasi translasi universal atau kodon start.

Penemuan suatu “open reading frame”, minimal dapat mengindikasikan akan lokasi suatu gen, oleh karena itu penulis menduga bahwa hasil amplifikasi fragmen genom *U. urealyticum* sepanjang 400 pb tersebut setidaknya-tidaknya merupakan bagian dari gen *iga U. urealyticum*; maka dapat disimpulkan bahwa *U. urealyticum* mengandung gen *iga*, dan bahwa “sequence” fragmen sepanjang 400 pb hasil amplifikasi dalam penelitian ini adalah suatu fragmen gen *iga U. urealyticum*.

C. SARAN

Perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi seluruh gen *iga U. urealyticum*, agar dapat digunakan sebagai alat diagnosis, dan dapat dipakai untuk mempelajari patogenesis *U. urealyticum*, serta dapat dipakai untuk merancang terapi yang lebih tepat, demi keberhasilan penatalaksanaan infeksi *U. urealyticum* di Indonesia pada khususnya.

SUMMARY, CONCLUSIONS, AND SUGGESTION

A. SUMMARY

Ureaplasma urealyticum is a Gram-negative bacteria, nonmotile, without rigid cell wall, with diameter 0.2-0.25 μm . *U. urealyticum* can colonize the mucosal membrane of the uterus, placenta, amnion, and also the respiratory tract and central nervous system of infants. That colonization of *U. urealyticum* has been considered to be a cause of premature delivery, spontaneous abortion, low birth weight, morbidity and mortality of infants. Urogenital tract colonization by *U. urealyticum* of men and women has been suggested to be a cause of urethritis, salpingitis, and infertility. However, *U. urealyticum* may also be isolated from asymptomatic persons, suggesting that *U. urealyticum* may behave principally as an opportunistic pathogen.

U. urealyticum and other pathogenic bacteria such as *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* have been proved to express IgA1 protease that cleaves human IgA1. IgA1 is the main immunoglobulin (immune system) presence at mucosal surfaces. Thus the IgA1 protease is suggested as the important virulence factor of *U. urealyticum* that has an important role in the first step of pathogenesis. In the other pathogenic bacteria (*N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, and *S. pneumoniae*), it was found that the IgA1 protease is encoded by the *iga* gene. It is suggested that IgA1 protease of *U. urealyticum* is also expressed by *iga* gene. The gene of *U. urealyticum* that expresses IgA1 protease has not been found, because *U. urealyticum*, the smallest bacteria, is very difficult to cultivate and the viability changes easily. It is much more difficult to cultivate *U. urealyticum* in a solid medium than in a liquid medium. Careful action and

skill in cultivating and detecting *U. urealyticum* colony in the solid medium are needed. A lot of time and fund are also needed. Although it is very difficult, considering that *U. urealyticum* has wide effect as a potential cause of various infectious diseases and infertility, which are still the main problems in Indonesia, this study tried to utilize a probe *Mycoplasma genitalium* putative *iga* gene to detect *Ureaplasma urealyticum* *iga* gene. This study also tried to identify and to give information about the presence of *iga* gene in the *U. urealyticum*, a gene that can express IgA1 protease, a potential virulence factor of *U. urealyticum* in the human organ mucosal membrane. The finding of *U. urealyticum* *iga* gene was hoped could be used as a tool for diagnosing and studying the pathogenesis of *U. urealyticum* infection, and could also be used as a foundation in the design of a right therapy of *U. urealyticum* infection.

In trying to identify *Ureaplasma urealyticum* *iga* gene, a sequence fragment of the *Mycoplasma genitalium* putative *iga* gene was used as a probe. The use of this probe was based on: (1). *U. urealyticum* and *M. genitalium* are mucosal pathogens that can colonize the same tissue (mucosal membrane of urogenital tract) and cause the same diseases (urethritis and infertility). (2). *U. urealyticum* and *M. genitalium* are closely related, they are both classified in the class *Mollicutes*, the order *Mycoplasmatales*, and the family *Mycoplasmataceae*. It was suggested that *M. genitalium* putative *iga* gene has high homology with *U. urealyticum* *iga* gene, and it was hoped that *M. genitalium* putative *iga* gene can be used as a probe for *U. urealyticum* *iga* gene.

This study used *U. urealyticum* standard, strain 27618 and putative *iga* gene *M. genitalium* MG37 (MG219) that was inserted in the plasmid pUC18 (between *EcoRI*

and *Bam*HI sites) and transformed into the *E. coli sure2*, both obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Sequence of the *M. genitalium* putative *iga* gene as recommended by Fraser *et al.* (1995), has 51.3% homology with the sequence of the *H. influenzae iga* gene.

First, *U. urealyticum* was cultivated in U. broth and U. agar. The growth of *U. urealyticum* in the liquid medium was confirmed by the growth of *U. urealyticum* in the solid medium, and the growth of *U. urealyticum* in the solid medium was confirmed by $MnCl_2$ -urea test. The verification of the growth of *U. urealyticum* in the liquid medium can also be done by amplifying the fragment of *U. urealyticum urease* gene with PCR technique, using the primer which paired only with *U. urealyticum urease* gene. *U. urealyticum* genome was isolated from the liquid culture of *U. urealyticum* using the method of Maniatis *et al.* (1982).

Cultivation of *E. coli sure2*, *pUC18::MG219* in the Luria-Bertani medium was followed by isolation of plasmid *pUC18::MG219*, and detection the plasmid by agarose mini gel electrophoresis. The plasmid was digested by *Eco*RI and *Bam*HI to get the putative *iga* gene of *M. genitalium* (MG219). The result of the putative *iga* gene digestion was observed by agarose mini gel electrophoresis and then purified by GlassMAX method.

The putative *iga* gene of *M. genitalium* after labeled with digoxigenin, was hybridized with the genome of *U. urealyticum* to detect homology between the sequences. Hybridization was conducted with the Southern blot method.

The positive result of hybridization enabled the study to be continued with the design of an *U. urealyticum iga* gene primer based on the sequence of the putative *iga*

gene from *M. genitalium*. The primer for amplifying *U. urealyticum* *iga* gene with PCR technique used the genome of *U. urealyticum* as the template. The result was observed by agarose mini gel electrophoresis. The *iga* gene of *U. urealyticum* was purified by GlassMAX method and labeled with digoxigenin and subsequently hybridized to the genome of *U. urealyticum* to confirm the *iga* gene amplicon was from the genome of *U. urealyticum*. The amplification result was sequenced to see the homology between the *U. urealyticum* *iga* gene and the *M. genitalium* putative *iga* gene. Sequencing was carried out with "ABI377 A DNA sequencer" by Eijkman Institute, Jakarta.

The result of this study shows that the growth of *U. urealyticum* in the liquid and solid media are conveniently monitored by the change of the medium colour, from yellow to be green or red. The liquid culture of *U. urealyticum* with the bromo thymol blue indicator has green colour, and the liquid culture of *U. urealyticum* with the phenol red indicator has red colour. The growth of *U. urealyticum* in the solid medium can also been confirmed by MnCl₂-urea test. Hydrolysis of urea by urease liberated hydroxyl groups from water, and these hydroxyl moieties oxidized manganous chloride to insoluble manganese oxide, causing the deposition of golden brown presipitate around the *U. urealyticum* colonies within a few minutes. The verification of the growth of *U. urealyticum* by amplifying the *urease* gene with PCR technique showed the 0.46 kb fragment of urease gene.

The isolation of the *M. genitalium* putative *iga* gene from the liquid culture of the *E. coli* *sure2* was carried out by GlassMAX method. Next, the hybridization between the genome of *U. urealyticum* and the fragment of *M. genitalium* putative *iga* gene showed 3 hybridization bands, one band of 21.2 kb, one band of 5.0 kb, and one band

of 3.5 kb; it means there was homology between fragments of *U. urealyticum* genome and fragment of *M. genitalium* putative *iga* gene. This finding enabled the study to be continued with the design of a pair of *U. urealyticum* *iga* gene primers. The primers, which were designed from a fragment sequence of the *M. genitalium* putative *iga* gene that was homologous to the fragment sequence of the *H. influenzae* *iga* gene, could be used for amplifying a 0.4 kb fragment of *U. urealyticum* genome. The verification of the PCR product by hybridization method was successful. The amplification result, after being labeled by digoxigenin could then be hybridized with the *U. urealyticum* genome. The result showed several hybridization bands: one band of length > 21.2 kb, one band of 21.2 kb, two bands of length between 5.0 – 21.2 kb, one band of 5.0 kb, one band of length between 2.0 – 3.5 kb, and one band of 1.9 kb. Thus, it means that the PCR product was a fragment of *U. urealyticum* genome.

The sequencing result showed 100% homology between a 400 bp fragment of *U. urealyticum* genome (amplification result, PCR product) and a 400 bp fragment of the *M. genitalium* putative *iga* gene. The 400 bp fragment sequence of *U. urealyticum* genome is a part of open reading frame (ORF) marked by the special nucleotide sequence, ATG, the universal translation initiation codon or start codon in the 400 bp fragment (Glick and Pasternack, 1994). The finding of an ORF can at least indicate the location of the gene (*iga* gene).

B. CONCLUSIONS

Based on the result of this study: (1). *U. urealyticum* ATCC 27618 could be cultivated well in the ureaplasma media (U. broth and U. agar). (2). *M. genitalium* putative *iga*

gene hybridized with *U. urealyticum* genome and showed 3 hybridization bands, one band of 21.2 kb, one band of 5.0 kb, and one band of 3.5 kb. That is proof about the presence of *U. urealyticum iga* gene and the homology between the genome fragments of *U. urealyticum* and the fragment of *M. genitalium* putative *iga* gene.

(3). There was 100% homology between a 400 bp fragment of *U. urealyticum* genome (amplification result that was used as a probe of the hybridization) and a 400 bp fragment of the *M. genitalium* putative *iga* gene (that was used as the base of primer design).

(4). The 400 bp fragment sequence of the *U. urealyticum* genome is a part of open reading frame (ORF) marked by the special nucleotide sequence, ATG, the universal translation initiation codon, or the start codon. The finding of an open reading frame can at least indicate the location of the gene, so it is suggested, that the 400 bp fragment of the amplification result of *U. urealyticum* genome is part of the *U. urealyticum iga* gene. Based on these findings it can be concluded that *U. urealyticum* contains an *iga* gene and that the 400 bp amplification result of this study is a fragment of *U. urealyticum iga* gene.

C. SUGGESTION

Further studies are needed for identification and isolation of the entire *U. urealyticum iga* gene, so that it can be used as a tool for diagnosing and studying the pathogenesis of *U. urealyticum* infection and as a foundation in the design of a right therapy of *U. urealyticum* infection.

DAFTAR PUSTAKA

- Abelle-Horn, M., Wolff, C., Dressel, P., Pfaff, F., and Zimmermann, A. (1997). Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1199 – 1202.
- Blanchard, A. (1990). *Ureaplasma urealyticum* urease gene: use of a UGA tryptophan codon. *Mol. Microbiol.* 4: 669 – 676.
- Blanchard, A., Hentschel, J., Duffy, L., Baldus, K., and Cassell, G.H. (1993). Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin. Infect. Dis.* 17: S148 – S153.
- Brown, T.A. (1995). *Gene cloning: an introduction*. 3rd ed. Chapman & Hall. London, New York, Tokyo: 69 – 185.
- Cassell, G.H., Waites, K.B., Crouse, D.T., Rudd, P.T., Canupp, K.C., Stagno, S., and Cutter, G.R. (1988). Association of *Ureaplasma urealyticum* infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth-weight infants. *Lancet* 7: 240 – 244.
- Cassell, G.H., Waites, K.B., Watson, H.L., Crouse, D.T., and Harasawa, R. (1993). *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborn. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 69 – 87.
- Chadwick, B.P., Heath, S.K., Williamson, J., Obermayr, F., Patel, L., Sheer, D., and Frischauf, A. (1998). The human homologue of the *ninjurin* gene maps to the candidate region of hereditary sensory neuropathy type 1 (HSN1). *Genomics* 47: 58-63.
- Clegg, A., Passey, M., Yoannes, M., and Michael, A. (1997). High rates of genital *Mycoplasma* infection in the Highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit. *J. Clin. Microbiol.* 35: 197-200.
- Cole, B.C. (1996). *Mycoplasma* interactions with the immune system: implications for disease pathology. Immune system responses to antigens from these organisms could play key roles in diseases such as rheumatoid arthritis and AIDS. *Features* 62: 457 – 475.
- Cracea, E., Constantinescu, S., and Lazar, M. (1985). Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* isolated from patients with nongonococcal urethritis and gonorrhea and from asymptomatic urethral carriers. *Sex. Transm. Dis.* 12: 219 – 223.

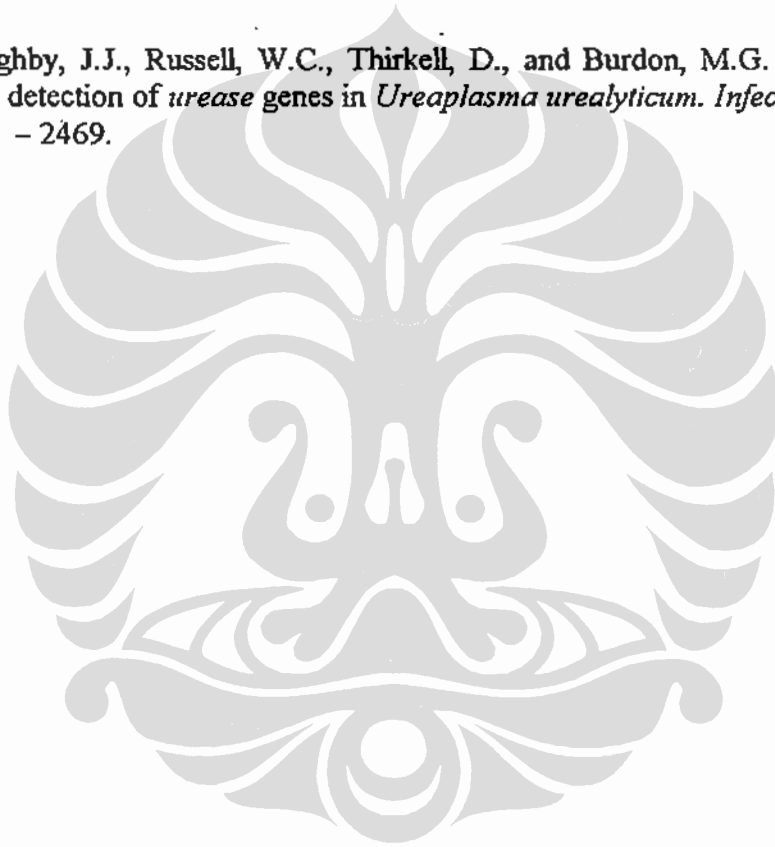
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleishmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritschman, J.L., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J.L., Nguyen, D.T., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchinson, C.A. III., and Venter, J.C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397 – 403.
- Gauthier, D.W., Meyer, W.J., and Bieniarz, A. (1994). Expectant management of premature rupture of membranes with amniotic fluid cultures positive for *Ureaplasma urealyticum* alone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170: 587 – 590.
- Gibbs, R.S., Cassell, G.H., Davis, H.K., St. Calir, P.J. (1986). Further studies on genital *Mycoplasmas* in intra-amniotic infection: blood cultures and serologic response. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 4: 717 – 726.
- Gilbert, J.V., Plaut, A.G., Fishman, Y., and Wright, A. (1988). Cloning of the gene encoding *Streptococcal* immunoglobulin A protease and its expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56: 1961 – 1966.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J. (1994). *Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press. Washington, D.C. 4: 83-111.
- Harmiatur, Y. dan Socharso, P. (1998). Deteksi *Ureaplasma urealyticum* pada semen pria pasangan infertil. *Seminar Nasional IV Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia. Universitas Padjadjaran. Bandung*
- Heggie, A.D., Jacobs, M.R., Butler, V.T., Baley, J.E., and Boxerhaum, B. (1994). Frequency and significance of isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from cerebrospinal fluid and tracheal aspirate specimens from low birth weight infants. *J. Pediatr.* 124: 956 – 961.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (9th ed.). Williams & Wilkins. Baltimore, Philadelphia, Tokyo.
- Inamine, J.M., Ho, K-C., Loechel, S., and Hu, P-C. (1990). Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Bacteriol.* 172: 504 – 506.
- Joste, N.E., Kundsinn, R.N., and Genesis, D.R. (1994). *Ureaplasma* and spontaneous abortions. *Am. J. Clin. Path.* 12: 423 – 424.

- Kapatais-Zoumbos, K., Chandler, D.K., and Barile, M.G. (1985). Survey of immunoglobulin A protease activity among selected species of *Ureaplasma* and *Mycoplasma*: specificity for host immunoglobulin A. *Infect. Immun.* 3: 704 – 709.
- Kilian, M., Reinholdt, J., Lomholt, H., Poulsen, K., and Frandsen, E.V.G. (1996). Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis : critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* 104: 321-338.
- Koneman, E.W., Allen, A.D., Janda, W.N., Schreckenberger, P.C., and Winn, W.C. Jr. (1992). *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: *Diagnostic microbiology*. 4th ed. Lipincott Co. Philadelphia. 15: 675 – 702.
- Kong, F., Zhu, X., Wang, W., Zhou, X., Gordon, S., and Gilbert, G.L. (1999). Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple-banded antigen genes of *Ureaplasma urealyticum* Biovar 1. *J. Clin. Microbiol.* 37: 538-543.
- Likitnukul, S., Kusmiesz, H., Nelson, J.D., and McCracken, G.H. (1986). Role of genital mycoplasmas in young infant with suspected sepsis. *J. Pediatr.* 109: 971 –974.
- Lomholt, H. (1993). Evidence of recombination and an antigenically diverse immunoglobulin A1 protease among strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63:4238 – 4243.
- Lomholt, H. Poulsen, K., and Kilian, M. (1995). Comparative characterization of the *iga* gene encoding IgA1 protease in *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* 15: 495 – 506.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Marmion, B.P. (1989). *Mycoplasma: Acholeplasma: Ureaplasma*. In : *Practical medical microbiology*. 13th ed. (Collee, J.G., Duguid, J.P., Fraser, A.G., and Marmion eds.). Vol. 2: 745 – 768.
- Mc Cormack, W.M., Almeid, P.C., Bailey, P.E., Grady, E.M., and Lee, Y.H. (1972). Sexual activity and vaginal colonization with genital *Mycoplasmas*. *Yama* 221: 1375 – 1377.
- Mc Cormack, W.M., Lee, Y.H., and Zinner, S.H. (1973). Sexual experience and urethral colonization with genital *Mycoplasmas*. *Ann. Intl . Med.* 78: 696 – 698.

- Mc Cormack, W.M., Rosner, B., Lee, Y.H., Rankin, J.S., and Lin, J.S. (1975). Isolation of genital *Mycoplasmas* from blood obtained shortly after vaginal delivery. *Lancet* 3: 596 – 599.
- Mesak, F. M. (1999). Bagaimana *Ureaplasma urealyticum* menampilkan aktivitas protease IgA1?. *Disertasi Program Biomedik. Program Pascasarjana. Universitas Indonesia. Jakarta.*
- Naessens, A., Foulon, W., Breynaert, J., and Lauwers, S. (1989). Postpartum bacteremia and placental colonization with genital *Mycoplasmas* and pregnancy outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 160: 647 – 650.
- Nelson, S., Matlow, A., Johnson, G., Th'ng, C., Dunn, M., and Quinn, P. (1998). Detection of *Ureaplasma urealyticum* in endotracheal tube aspirates from neonates by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1236-1239.
- Neyrolles, O., Ferris, S., Behbahani, N., Montagnier, L., and Blanchard, A. (1996). Organization of *Ureaplasma urealyticum urease* gene cluster and expression in a suppressor strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 647 – 654.
- Palmer, T. (1991). *Understanding enzymes. 3rd ed.* Ellis Horwood Ltd. New York, Singapore. 1: 19-30.
- Phillips, L.E., Goodrich, K.H., Turner, R.M., and Faro, S. (1986). Isolation of *Mycoplasma* species and *Ureaplasma urealyticum* from obstetrical and gynecological patients by using commercially available medium formulations, *J. Clin. Microbiol.* 24: 377 – 379.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325: 458 – 462.
- Poulsen, K., Reinholdt, J., and Kilian, M. (1992). A comparative genetic study of serologically distinct *Haemophilus influenzae* type 1 immunoglobulin A1 proteases. *J. Bacteriol.* 174: 2913-2921.
- Poulsen, K., Brandt, J., Hjorth, J.P., Thogersen, H.C., and Killian, M. (1989). Cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 proteases gene (*iga*) of *Haemophilus influenzae* serotype b. *Infect. Immun.* 57: 3097 – 3105.
- Quinn, P.A., Shewchuk, A.B., Shuber, J., Lie, K.I., Ryan, R., and Sheu, M. (1983). Serologic evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in women with spontaneous pregnancy loss. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 145: 245 – 250.

- Quinn, P.A., Gillan, J.E., Markestad, T., St. John, M.A., Daneman, A., Lie, K.I., Li, H.C.S., Czeplady-Nagy, E., and Klein, M. (1985). Intrauterine infection with *Ureaplasma urealyticum* as a cause of fatal neonatal pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 4: 538 – 543.
- Roifman, C.M., Rao, C.P., Lederman, H.M., Lavi, S., Quinn, P., and Gelfand, E.W. (1986). Increased susceptibility to *Mycoplasma* infection in patients with hypogammaglobulinemia. *Am. J. Med.* 80: 590 – 594.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., and Male, D.K. (1985). *Immunology*. Gower Medical Publishing. London, New York.
- Saito, M., Umeda, A., and Yoshida, S. (1999). Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2142-2147.
- Sanchez, P.J. and Regan, J. (1977). *Ureaplasma urealyticum* colonization and chronic lung disease in low birth weight infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7: 542 – 546.
- Smith, D.G.E., Russell, W.C., and Thirkell, D. (1994). Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human epithelial cells. *Microbiol.* 140: 2893-2898.
- Syrogiannopoulos, G.A., Kapatais-Zoumbos, K., Decavalas, G.O., Markantes, C.G., Katsarou, V.A., and Beratis, N.G. (1990). *Ureaplasma urealyticum* colonization of full term infants: perinatal acquisition and persistence during early infancy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 236-240.
- Spooner, R.K., Russell, W.C., and Thirkell, D. (1992). Characterization of the immunoglobulin A protease of *Ureaplasma urealyticum*. *Infect. Immun.* 60: 2544 – 2546.
- Taylor-Robinson, D. (1995). *Mycoplasma and Ureaplasma*. 6th ed. In: *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. (Murray, P.R., Baron E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. eds). Washington, D.C.
- Teng, K., Li, M., Yu, W., Li, H., Shen, D., and Liu, D.X. (1994). Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenital infections. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2232 – 2234.
- Tjokronegoro, A., Ayuningtyas, D., dan Ganjar, I. (1993). Pengaruh *T-Mycoplasma (Ureaplasma urealyticum)* terhadap semen pria pasangan infertil. *Maj. Kedok. Indon.* 43: 223 – 233.
- Wani, J.H., Gilbert, J.V., Plaut, A.G., and Weiser, J.N. (1996). Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64: 3967 – 3974.

- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaichu, H., and Yang, D. (1989). A phylogenetic analysis of the *Mycoplasmas*: basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171: 6455 – 6467.
- Waites, K.B., Crouse, D.T., Nelson, K.G., Rudd, P.T., Canupp, K.C., Ramsey, C., and Cassell, G.H. (1988). Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection of central nervous system in preterm infants. *Lancet* 2: 17 – 21.
- Waites, K.B., Duffy, L.B., Crouse, D.T., Dworsky, M.E., Strange, M.J., Nelson, K.G., and Cassell, G.H. (1990). Mycoplasmal infections of cerebrospinal fluid in newborn infants from a community hospital population. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 241 – 245.
- Willoughby, J.J., Russell, W.C., Thirkell, D., and Burdon, M.G. (1991). Isolation and detection of *urease* genes in *Ureaplasma urealyticum*. *Infect. Immun.* 59: 2463 – 2469.



RIWAYAT HIDUP

- Nama : Yovita Harmiatun
- Tempat, tanggal lahir : Solo, 5 September 1945
- Status : Menikah dengan Aris Susanto
- Dikaruniai anak : 4 orang (2 putera, 2 puteri)
Vanda, Beni, Olin, Evi.
- Alamat : 1. Tempat tinggal:
Jl. Strada 20 Menteng Dalam
Jakarta Selatan 12870
Phone: 8290948
2. Tempat bekerja:
Bagian Biologi Fakultas Kedokteran UKI
Jl. Let. Jen. Sutoyo, Cawang, Jakarta.
Phone: 8092425.
- Pendidikan : - Lulus SMA Santa Ursula Solo, 1963.
- S1 Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada 1969.
- S2 Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Indonesia 1988.
- S3 Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Indonesia 2000.
- Penataran-penataran.
- Pengalaman kerja : - Asisten Mahasiswa Bagian Zoologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada 1964 – 1968.
- Asisten Mahasiswa Bagian Genetika Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada 1964 – 1968.
- Staf Pengajar Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Unika Atmajaya 1969 – 1978.
- Staf Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia 1978 - 1981.
- Staf Pengajar Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia 1980 – sekarang.
- Karya ilmiah : - Pengaruh *Allium sativum* terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Sacharomyces cereviceae*.
- Pengaruh streptomisin terhadap perkecambahan biji *Oryza sativa*.

- Penyakit *Fasciola hepatica* pada hewan dan manusia.
- Levamisol sebagai spermisid terhadap spermatozoa manusia *in vitro*.
- Banjir, masalah Nasional.
- Pengaruh ejakulasi interval pendek terhadap fungsi prostat dan vesikula seminalis.
- Uji penetrasi telur hamster *in vitro* untuk mengevaluasi kapasitas fertilisasi spermatozoa manusia.
- Polinukleotida berlabel biotin: Pelacak berafinitas asam nukleat.
- Peningkatan kapasitas penetrasi spermatozoa manusia melalui sentrifugasi dengan gradien nycodenz dan percoll.
- Karsinogen dan anti-karsinogen makanan.
- Peranan umur ibu pada reproduksi.
- Insiden disomi kromosom nomer 3, 7, 10, 11, 17, dan X pada sperma manusia: dideterminasi dengan hibridisasi *in situ* non-radioaktif.
- Deteksi *Ureaplasma urealyticum* pada plasma semen pria pasangan infertil.
- Pengaruh *Ureaplasma urealyticum* pada membran plasma sperma manusia.
- Homologi gen *iga* putatif *Mycoplasma genitalium* dan gen *iga* *Ureaplasma urealyticum*.
- Dll.

- Penghargaan : - Dalam lomba karya ilmiah di Kopertis Wilayah III Jakarta (Judul: Banjir, masalah Nasional).
- Organisasi profesi : - Anggota Perhimpunan Andrologi Indonesia.
 - Anggota Perhimpunan Biologi Indonesia.
 - Anggota Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia.
- Organisasi sosial : - Pengurus Yayasan Dharma Ibu 1979 – sekarang.
 - Dirigen Paduan Suara Anna 1987 – 1994.
 - Dirigen Paduan Suara Fransiskus 1993 – sekarang.
 - Koordinator Paduan Suara Asisi 1991 – 1999.