

Activity of Skin Secretions of Frog *Fejervarya limnocharis* and *Limnonectes macrodon* against *Streptococcus pneumoniae* Multidrug Resistant and Molecular Analysis of Species *F. limnocharis*

(Aktivitas Sekresi Kulit Katak *Fejervarya limnocharis* dan *Limnonectes macrodon* terhadap *Streptococcus pneumoniae* Multidrug Resistant dan Analisis Molekuler Spesies *F. Limnocharis*)

Jajang Suhyana¹, I Made Artika^{1,2*}, Dodi Safari²

¹Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

²Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta, 10430, Indonesia

Received : 08 June 2015; Accepted: 08 September 2015

*Corresponding author: Dr. I Made Artika, M.App.Sc; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; E-mail: imart@ipb.ac.id

ABSTRACT

Indonesia has about 450 frog species which is approximately 20% of frog species in the world. Among frog species found in Indonesia are *Fejervarya limnocharis* dan *Limnonectes macrodon* belonging to family Dicroglossidae. Frog skin secretion is considered to have a potency to be used as an alternative source of antibacterial agent against *Streptococcus pneumoniae* multidrug resistant (MDR). The aims of the present study were to analyze antibacterial activity of skin secretions of *F. limnocharis* and *L. macrodon* against *S. pneumoniae* multidrug resistant (MDR) and conduct molecular phylogenetic analysis of the frog used to ensure classification of frog species. The release of skin secretion was stimulated using epinephrine injection. Antibacterial activity of the skin secretions was tested using the well and paper disc methods. Results showed that skin secretions of *F. limnocharis* have antibacterial activity against *S. pneumoniae* multidrug resistant (MDR) SPN1307. The activity, however, was lower compared to that of chloramphenicol in both well and paper disc methods. On the other hand, skin secretions of *L. macrodon* failed to inhibit the growth of *S. pneumoniae* multidrug resistant (MDR) SPN1307. Molecular phylogenetic analysis was carried out on *F. limnocharis* based on DNA sequence of a partial fragment of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. Results showed that the frog *F. limnocharis* is closely related (97%) to *Fejervarya sp* from Bali. Skin secretions of *F. limnocharis*, therefore, has the potency to be developed as a source of antibacterial agents against *S. pneumoniae* multidrug resistant (MDR) SPN1307.

Keyword: antibacterial agent, frog skin secretion, molecular phylogenetic analysis, *Streptococcus pneumoniae*.

ABSTRAK

Indonesia memiliki sekitar 450 spesies katak atau sekitar 20% dari jumlah spesies katak di dunia. Di antara spesies katak yang ditemukan di Indonesia adalah spesies *Fejervarya limnocharis* dan *Limnonectes macrodon* yang termasuk kedalam famili *Dicroglossidae*. Sekresi kulit katak diduga berpotensi untuk digunakan sebagai sumber alternatif bahan antibakteri *Streptococcus pneumoniae* multidrug resistant (MDR/non-MDR). Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antibakteri sekresi kulit katak *F. limnocharis* dan *L. macrodon* terhadap isolat *S. pneumoniae* multidrug resistant (MDR) dan melakukan analisis filogenetik molekuler untuk memastikan klasifikasi spesies katak yang digunakan. Pengeluaran sekresi kulit katak dilakukan melalui stimulasi menggunakan hormon epinefrin. Aktivitas antibakteri sekresi kulit katak diuji menggunakan teknik sumuran dan teknik perendaman kertas cakram. Sekresi kulit katak *F. limnocharis* memiliki aktivitas antibakteri *S. pneumoniae* multidrug resistant (MDR) SPN1307, namun aktivitasnya relatif rendah dibandingkan kontrol kloramfenikol baik dengan metode sumuran maupun kertas cakram. Sebaliknya, sekresi kulit katak spesies *L. macrodon* tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. pneumoniae*-multi-drug resistant (MDR) SPN1307. Analisis filogenetik molekuler dilakukan terhadap *F. limnocharis* berdasarkan sekuen fragmen gen sitokrom oksidase subunit I (COI) mitokondria. Hasil analisis menunjukkan bahwa katak *F. limnocharis* memiliki hubungan kekerabatan dekat (97%) dengan *Fejervarya sp.* asal Bali. Sekresi kulit katak *F. limnocharis* memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber bahan antibakteri terhadap *S. pneumoniae* multidrug resistant (MDR) SPN1307.

Kata kunci: bahan antibakteri, sekresi kulit katak, analisis filogenetik molekuler, *Streptococcus pneumoniae*.

1. PENDAHULUAN

Data WHO (2014) menunjukkan bahwa di seluruh dunia terjadi peningkatan signifikan jenis bakteri yang resisten terhadap beberapa obat antibakteri (*Multidrug Resistant/MDR*). Salah satu spesies bakteri yang sering menginfeksi masyarakat termasuk masyarakat Indonesia adalah *S. pneumoniae*. Walaupun demikian, di Indonesia permasalahan ini belum menjadi prioritas dan perhatian utama bidang kesehatan.

Antibiotik penisilin memberikan perubahan besar pada kesembuhan pasien (90%) terhadap *S. pneumoniae*, namun resistensi terhadap turunan antibiotik penisilin juga dilaporkan sejak awal penggunaannya di bidang kesehatan pada tahun 1940. Hingga tahun 2014, WHO mencatat lebih dari 826.000 kasus kematian di

seluruh dunia akibat infeksi *S. pneumoniae* yang resisten terhadap penisilin. Oleh karena itu, resistensi beberapa spesies bakteri khususnya *S. pneumoniae* terhadap antibiotik menjadi permasalahan global.

Spesies *S. pneumoniae* adalah bakteri Gram positif penyebab infeksi pernafasan, meningitis dan bakterimia pada anak dan orang dewasa serta paling sering menimbulkan penyakit akut pada anak usia dibawah 2 tahun (Cobo *et al.* 2012). Berdasarkan data WHO (2005), sekitar 1.6 juta orang di seluruh dunia meninggal karena infeksi *S. pneumoniae* termasuk di antaranya 700.000 hingga 1 juta jiwa anak usia 1-59 bulan (WHO 2014). Sejak tahun 1960an, *S. pneumoniae* dianggap memiliki resistensi terhadap penisilin, namun tes yang sensitif terha-

dap dugaan tersebut sulit dilakukan. Appelbaum pada tahun 1977 menyatakan bahwa riset yang dilakukan tahun 1965 hingga 1967 di Australia, untuk pertama kalinya berhasil mengisolasi spesies *S. pneumoniae* yang resisten terhadap penisilin. Selain itu, *S. pneumoniae* resisten terhadap penisilin juga ditemukan di Papua New Guinea dan Afrika Utara. Di Jerman 0.3% hingga 9% isolat *S. pneumoniae* dilaporkan resisten terhadap penisilin (Margaret *et al.* 1999).

Bakteri *S. pneumoniae* memiliki karakteristik bentuk bulat berantai, serta bersifat fakultatif anaerob. Centers for Disease Control and Prevention (2012) menyebutkan bahwa bakteri ini secara khusus ditemukan berpasangan (*diplococci*) namun terkadang dalam keadaan tunggal atau rantai pendek. Beberapa pneumococcus memiliki kapsul, yang tersusun atas kompleks polisakarida. *Streptococcus* merupakan suatu spesies yang mendominasi komposisi bakteri dalam plak. Bakteri ini merupakan mikroflora normal rongga mulut, namun harus mendapat perhatian khusus karena kemampuannya membentuk plak dari sukrosa melebihi jenis bakteri lainnya (Angelina 2011). Kolonisasi pneumococcus adalah proses yang dinamis (Mehr dan Wood 2012). Martinez (2013) melaporkan bahwa *S. pneumoniae* memproduksi kapsul yang memproteksi dan menyelubungi sel. Fungsi kapsul antara lain untuk menghindari sistem imun sel inang serta berperan penting dalam kolonisasi bagian saluran pernafasan.

Data penelitian tentang resistensi *S. pneumoniae* terhadap penisilin di Polandia (Overweg *et al.* 1999) memberi informasi genetik berbagai spesies *S. pneumoniae* yang bersifat *multidrug resistant* terhadap penisilin. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk menanggulangi permasalahan resistensi *S. pneumoniae*

terhadap antibiotika. Salah satu upaya yang dilakukan adalah pengembangan senyawa antibakteri baru yang bersifat efektif dan efisien dalam mengendalikan *S. pneumoniae MDR*.

Indonesia memiliki sekitar 450 spesies katak (Wulandari *et al.* 2013). Cairan yang disekresikan oleh kulit katak merupakan salah satu bahan baku potensial untuk dikembangkan sebagai bahan antibakteri *multidrug resistant/MDR*. Secara klinis, laporan hasil penelitian Conlon dan Sonnevend (2011), menunjukkan bahwa ada bioaktivitas sekresi kulit katak terhadap bakteri yang telah resisten antibiotika. Selain itu Amiche *et al.* (2000) berhasil mengisolasi peptida berukuran 32 residu asam amino, dinamakan dermatoksin, dari spesimen katak pohon *Phyllomedusa bicolor* yang berasal dari Amerika Utara, yang menunjukkan daya hambat terhadap *mollicute* (eubakteria berdinding sel tipis), eubakteria Gram positif, dan eubakteria Gram negatif. Kulit amfibi secara langsung berinteraksi dengan lingkungan luar dan berfungsi menghalangi terjadinya luka, infeksi, parasitisme dan kerusakan oksidatif. Oleh karena itu, peptida bioaktif kulit amfibi menunjukkan keragaman sifat biologis. Lebih dari 110 polipeptida antimikroba dengan kemampuan sebagai inhibitor protease berhasil diisolasi dari kulit *Rana graham* dan 197 peptida bioaktif telah diidentifikasi dari *Odorrana andersonii* melalui *screening* pustaka cDNA (Song *et al.* 2013).

Senyawa bioaktif sekresi kulit katak memiliki prospek sebagai pengganti penisilin di masa depan. Penelitian Wang *et al.* (2012) menunjukkan bahwa peptida yang diisolasi dari kulit katak odorous di Hainan, Cina, mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif (*Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. dan *Rhodococcus* sp.), Gram negatif (*Sal-*

monella sp., *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *Psychrobacter* sp.) serta jamur (*Slime mould* dan *Candida albicans*). Oleh karena itu, eksplorasi dan uji aktivitas senyawa bioaktif sekresi kulit katak di Indonesia perlu dilakukan khususnya yang bersifat aktif menghambat spesies *S. pneumoniae multidrug resisistant* (MDR). Pinontoan *et al.* (2012) melaporkan adanya potensi sekresi kulit katak merah (*Leptophryne cruentata*) dan katak pohon Jawa (*Rhacophorus javanus*) sebagai sumber senyawa bioaktif penghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif (*Eschericia coli*), bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) serta jamur *Trichophyton mentagrophytes*.

Eksplorasi senyawa bioaktif dari amfibi terutama dari spesies yang ada di Indonesia masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi jenis senyawa terutama yang bersifat aktif menghambat pertumbuhan spesies *S. pneumoniae MDR* di Indonesia. Untuk pengembangan bahan antibakteri baru, perlu diteliti mekanisme kerja senyawa bioaktif sekresi kulit katak khususnya dalam menghambat spesies *S. pneumonia MDR*. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antibakteri sekresi kulit katak *F. limnocharis* dan *L. macrodon* asal Jawa Barat terhadap isolat *S. pneumoniae MDR*.

2. METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi katak yang didapat dari persawahan di sekitar Kampus IPB Dramaga, Kelurahan Babakan, Kecamatan Dramaga, Bogor-Jawa Barat. Bakteri uji adalah *S. pneumoniae non-MDR/ATCC49619* dan *S. pneumoniae multi drug resistant (MDR)/SPN1307*, larutan bufer, epine-

frin, media Mueller Hinton+Blood, *Go Taq Green*, dan kloramfenikol. Peralatan yang digunakan meliputi Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer, Nanodrop Spectrophotometer ND-1000, pengering beku Christ alpha 1-2/ LD plus, kontainer plastik, inkubator, HYUNDAI Micro syringe filter membran 0.22 µm (Cat. No. HM020P25), jarum ose, pipet mikro, pipet tetes, pH meter, neraca analitik, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, serta autoklaf HIRAYAMA Hiclave HVE-50.

Persiapan Sampel

Eksplorasi dilakukan dengan penangkapan katak (tanpa alat bantu) secara bebas dan acak di semua area persawahan untuk memperbesar kemungkinan mendapatkan spesies katak yang menghasilkan sekresi kulit dengan kemampuan antibakteri khususnya dari spesies *F. limnocharis* dan *L. macrodon*. Spesies *F. limnocharis* diseleksi berdasarkan ciri khusus yaitu tubuh berukuran kecil, kepala runcing dan pendek serta memiliki struktur kulit berkerut yang tertutup oleh bintil-bintil tipis memanjang. *L. macrodon* diseleksi berdasarkan ciri antara lain berukuran sangat besar dengan kepala besar, kulit halus dengan beberapa bintil yang tersebar, pada bagian belakang pelupuk mata terdapat bintil-bintil, dan jari kaki berselaput sampai bagian ujung (Kusrini 2013).

Bakteri uji yang digunakan adalah *S. pneumoniae non-MDR (ATCC49619)* serta yang bersifat *multidrug resistant (MDR SPN1307)* yang merupakan koleksi Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta. *S. pneumoniae non-MDR (ATCC49619)* digunakan sebagai pembanding terhadap spesies bakteri yang telah bersifat MDR. Isolat SPN1307 digolongkan sebagai MDR karena tidak dapat dihambat oleh

sedikitnya tiga jenis antibiotik yaitu *azithromycin* dan *erythromycin* (golongan makrolida) serta *tetracycline* pada konsentrasi yang telah ditetapkan (Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI).

Pengukuran Karakteristik Fisik Katak

Pengeluaran sekresi kulit katak dirangsang dengan penyuntikan epinefrin. Jumlah epinefrin yang diinjeksikan dihitung berdasarkan berat badan sampel katak. Karakteristik fisik sampel katak yang diukur meliputi *Snout Vent Length* (SVL) dan berat badan. Pengukuran SVL dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran SVL dimulai dari ujung mulut katak diteruskan secara vertikal hingga mencapai ujung tulang ekor. Pengukuran dilakukan sebelum injeksi senyawa stimulan dengan tujuan menentukan dosis senyawa stimulan yang akan disuntikkan.

Penyuntikan epinefrin dilakukan pada bagian atas kulit. Penyuntikan epinefrin (Pinontoan 2012) dilakukan menggunakan stok larutan induk *epinephrine-base* konsentrasi 1 mg/mL (Kimia Farma, Corp). Variasi volume yang disuntikkan adalah 0.01 mL; 0.015 mL; 0.02 mL epinefrin per gram berat badan katak. Katak yang telah disuntik lalu ditempatkan dalam kontainer yang berisi 100 mL bufer (50 mM natrium klorida, 100 mM natrium asetat, pH 7.0). Setelah direndam selama 15 menit, katak kemudian dikeluarkan dari kontainer. Cairan yang mengandung sekresi kulit katak ditambahkan 1% HCl untuk penyimpanan pada -20°C, kemudian dikeringbekukan (liofilisasi) menggunakan pengering beku dengan prinsip pengeringan vakum pada suhu dingin (-20°C). Selanjutnya sekresi kulit katak dilarutkan dalam buffer fosfat (PBS) ($\pm 1-2$ mL) dan disterilkan dengan menggunakan

membran 0.22 μm untuk kemudian digunakan dalam uji aktivitas antibakteri.

Uji Aktivitas Antibakteri Sekresi Kulit Katak

Sebelum digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri, bakteri uji diremajakan. Regenerasi bakteri isolat *S. pneumoniae* MDR maupun non-MDR yaitu SPN1307 dan ATCC49619, dilakukan dengan menggoreskan masing-masing koloni ke dalam cawan petri yang berisi media Mueller Hinton+Blood (MHB) menggunakan jarum ose. Biakan disimpan dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C dan 5% CO₂. Setelah inkubasi, biakan bakteri yang telah diregenerasi diambil 1 jarum ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan steril NaCl 0.9%, lalu dilakukan pengenceran hingga konsentrasi menjadi 3x10⁸ CFU/mL (McFarland). Hasil pengenceran tersebut diambil secukupnya lalu digoreskan pada media padat biakan bakteri (Mueller Hinton+Blood).

Uji aktivitas antibakteri menggunakan teknik difusi cara sumuran dan *sterile paper disc*. Untuk teknik difusi cara sumuran, media MHB yang telah disiapkan dilubangi dengan diameter tertentu (± 5 mm) menggunakan pangsang tip steril sehingga dapat ditambahkan larutan sekresi kulit katak. Sekresi kulit katak yang dimasukkan dalam sumuran adalah sebanyak 50 μL dan sebagai kontrol digunakan 40 μL kloramfenikol konsentrasi 0.4 mg/mL (Pinontoan 2012). Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂ zona bening yang terbentuk diukur sebagai indikator aktivitas antibakteri. Selain itu juga digunakan teknik *paper disc*, melalui perbandingan lama perendaman *paper disc* steril dalam senyawa sekresi kulit katak, yaitu pada selang waktu 5 menit dan

30 menit. Setelah itu, *paper disc* hasil perendaman ditempelkan di permukaan media MHB yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri *S. pneumoniae* MDR maupun non-MDR. Zona bening yang terbentuk lalu diukur.

Isolasi DNA Genom Katak

Analisis filogenetik katak dilakukan berdasarkan sekuen fragmen DNA penyandi COI mitokondria. Sampel DNA genom berupa potongan jari depan dan jari belakang katak. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *DNeasy Blood & Tissue Kit* dari Qiagen. Proteinase K ditambahkan ke dalam *microtube* berisi sampel jaringan kulit katak dan diinkubasi selama $\pm 3-6$ jam, lalu ditambahkan beberapa kali *washing buffer* dan disentrifugasi pada 8000-14000 rpm hingga diperoleh DNA murni. DNA hasil isolasi diukur konsentrasinya menggunakan *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000* pada $\lambda=260$.

Amplifikasi Fragmen DNA Penyandi COI

Fragmen DNA COI diamplifikasi menggunakan metode PCR menggunakan dua pasang primer, dengan kondisi PCR 94°C 4 menit, 46°C 1 menit, 72°C 1 menit selama 35 siklus. Penggunaan 2 pasang primer merujuk Che *et al.* (2011) yang bertujuan untuk memilih primer terbaik dari Universal COI Primer (*a partial fragment of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I COI*) yaitu :

- (a) LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAA-GATATTGG-3' (Forward)
- (b) HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGAC-CAAAAATCA-3' (Reverse)
- (c) LepF : 5'-ATTCAACCAATCATAAAGAT-ATTGG-3' (Forward)
- (d) LepR1: 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAA-AAAATCA-3' (Reverse)

Produk PCR yang menghasilkan pita tunggal ($\pm 500-700$ bp) dimurnikan dengan menggunakan *PCR DNA Fragments Extraction Kit Geneaid* (Cat. No. DF300).

Sekuensing DNA dan Konstruksi Pohon Filogenetik

Penentuan sekuen DNA COI dari katak dilakukan merujuk Gonser & Collura (1996). Sekuensing DNA menggunakan sampel hasil amplifikasi PCR yang sebelumnya telah divalidasi kebenaran pita tunggalnya melalui elektroforesis agarosa. Cycle Sequencing dilakukan dengan menggunakan BigDye Terminator Sequencing Buffer. Reaksi PCR yang digunakan untuk cycle sequencing: BigDye sebanyak 6 μ L + primer forward/reverse (konsentrasi 2 μ M) sebanyak 1.5 μ L + DNA 1 μ L serta ddH₂O hingga volume total 15 μ L.

Kondisi PCR yang digunakan yaitu: 96°C 3 menit (pada awal siklus) lalu diikuti oleh 96°C 10 detik, 50°C 5 detik dan 60°C 4 menit, 35 siklus. Hasil PCR dilanjutkan dengan tahapan presipitasi. *Precipitation mix (Fresh)* dibuat dengan komposisi sebagai berikut: EDTA 125 μ M (0.75 μ L EDTA 250 μ M + 0.75 μ L H₂O) + 1.5 μ L NaAc 3 M serta etanol absolut 37.5 μ L. Larutan divortex kemudian diinkubasi pada suhu ruang 10 menit, dan pada 4°C selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 15000xg selama 20 menit pada 4°C. Supernatan dibuang, lalu ditambahkan 250 μ L etanol 70%. Larutan kemudian divortex dan disentrifus pada 15000xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, kemudian divacuum vortex selama ± 10 menit. Hasil presipitasi dianalisis dengan menggunakan *DNA Sequencer* yaitu *Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer*. Pohon filogenetik dikonstruksi meng-

gunakan software MEGA6 dengan membandingkan sekuen fragmen DNA COI hasil penelitian terhadap sekuen fragmen DNA COI dari beberapa spesies yang tersimpan pada *GenBank* dan *BOLD System*.

3. HASIL

Karakteristik Fisik Sampel Katak dan Dosis Epinefrin

Pengeluaran sekresi kulit katak distimulasi dengan penyuntikan epinefrin. Volume epinefrin yang diinjeksikan tergantung pada berat badan katak. Hasil pengukuran berat badan

katak, ukuran SVL, dan volume epinefrin yang diinjeksikan disajikan pada Tabel 1 dan 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas fisik katak berkurang setelah dilakukan stimulasi dengan senyawa stimulan epinefrin. Bagian bola mata katak yang sebelumnya normal tampak menjadi hitam keseluruhan disebabkan pengaruh stimulan yang efektif.

Aktivitas Antibakteri Sekresi Kulit Katak

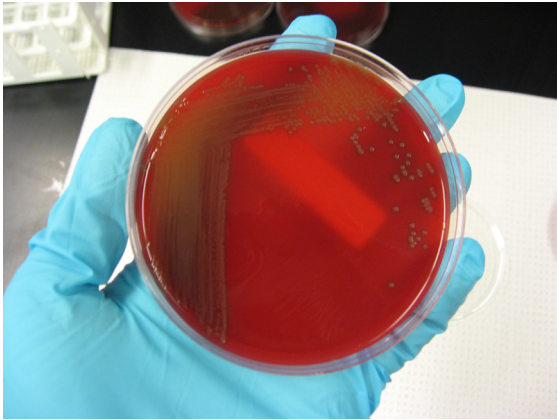
Isolat bakteri sampel MDR/SPN1307 dan non-MDR/ATCC49619 (Gambar 1) yang telah ditumbuhkan dalam media Mueller Hin-

Tabel 1 Karakteristik Fisik dan Dosis Epinefrin pada *F. limnocharis*

Kode Katak	SVL (snout vent length) (cm)	Berat Badan (g)	Dosis epinefrin (mg/g)	Volume Injeksi Epinefrin (mL)
FL1	4.65	9	0.010	0.090
FL2	4.11	6	0.010	0.060
FL3	3.63	6	0.010	0.060
FL4	5.16	11	0.015	0.165
FL5	3.79	7	0.015	0.105
FL6	3.62	5	0.015	0.075
FL7	4.28	10	0.020	0.200
FL8	4.09	6	0.020	0.120
FL9	3.50	4	0.020	0.080

Tabel 1 Karakteristik Fisik dan Dosis Epinefrin pada *L. macrodon*

Kode Katak	SVL (snout vent length) (cm)	Berat Badan (g)	Dosis epinefrin (mg/g)	Volume Injeksi Epinefrin (mL)
LM1	7.70	44.5	0.010	0.44
LM2	7.30	48.3	0.010	0.48
LM3	7.74	51.1	0.010	0.51
LM4	7.14	44.4	0.015	0.66
LM5	7.24	38.9	0.015	0.58
LM6	7.94	55.9	0.015	0.84
LM7	7.50	44.1	0.020	0.88
LM8	6.92	34.0	0.020	0.68
LM9	7.33	44.6	0.020	0.89

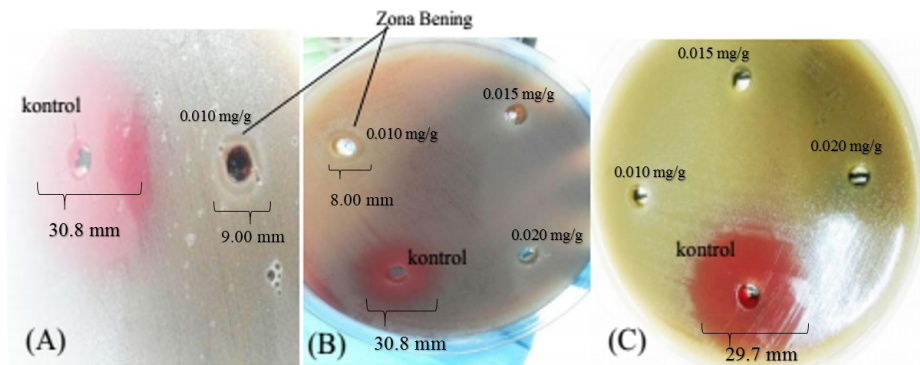


Gambar 1 Kultur isolat *S. pneumoniae* ATCC49619 (non-MDR)

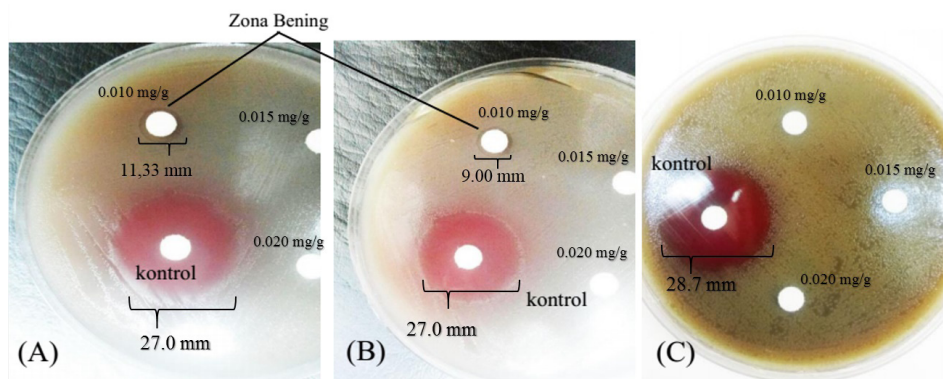
ton+Blood agar selama 24 jam pada 37°C dan 5% CO₂ menunjukkan profil umum isolat *S. pneumoniae* yaitu kokus tunggal berbentuk bu-

lat atau bulat telur dan tersusun dalam bentuk rantai. Ciri khusus pada spesies ini adalah kemampuannya untuk melakukan reaksi hemolitik pada agar darah. Kemampuan ini biasa dikenal kemampuan α -hemolitik (hemolisis sebagian). Hasil uji aktivitas antibakteri sekresi kulit katak terhadap bakteri *S. pneumoniae* MDR maupun non-MDR disajikan pada Gambar 2 dan 3. Data hasil pengukuran tingkat aktivitas antibakteri sekresi kulit katak disajikan pada Tabel 3, 4 dan 5.

Diameter zona bening pada metode difusi cara sumuran sekresi *F. limnocharis* (0.36 g/3 mL PBS) terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 dan ATCC49619 adalah 9.00±0.001 mm dan



Gambar 2 Aktivitas antibakteri sekresi spesies *F. limnocharis* terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 (A) , ATCC 49619 (B) dan aktivitas sekresi *L. macrodon* terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 (C)



Gambar 3 Aktivitas antibakteri sekresi spesies *F. limnocharis* terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 pada perendaman 5 menit (A) dan 30 menit (B) aktivitas sekresi *L. macrodon* terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 (C)

8.00±0.001 mm, sedangkan untuk *L. macrodon* tidak terbentuk. Pada metode perendaman *paper disk* selama 5 menit sampel *F. limnocharis* (rata-rata konsentrasi senyawa setelah liofilisasi 0.36 g/3 mL PBS) terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 dan ATCC49619 ukuran diameter zona bening adalah 11.33±0.057 mm dan 9.70±0.001 mm, serta untuk perendaman *paper disk* 30 menit

Tabel 3 Aktivitas antibakteri sekresi spesies *F. limnocharis* (FL) dan *L. macrodon* (LM) terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 dan ATCC 49619 menggunakan metode sumuran

Kode Spesies	Nama Isolat	Diameter zona bening (mm) dengan variasi dosis epinefrin			Kontrol (mm)	Disk (mm)
		0.010 mg/g	0.015 mg/g	0.020 mg/g		
		F.L	ATCC 49619	9.00±0.001 ^a		
	SPN1307	8.00±0.001 ^a	5.6*	5.6*		
L.M	ATCC 49619	6.4*	6.4*	6.4*	29.7	6.4*
	SPN1307	6.4*	6.4*	6.4*		

*d_{uji}=d_{sumuran}=Tidak menunjukkan bioaktivitas

Taraf α=99% (p<0.01)

Tabel 4 Aktivitas antibakteri sekresi spesies *F. limnocharis* (FL) dan *L. macrodon* (LM) terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 dan ATCC 49619 dengan perendaman *sterile paper disc* selama 5 menit

Kode Spesies	Nama Isolat	Diameter zona bening (mm) dengan variasi dosis epinefrin			Kontrol (mm)	Disk (mm)
		0.010 mg/g	0.015 mg/g	0.020 mg/g		
		F.L	ATCC 49619	9.70±0.001 ^a		
	SPN1307	11.33±0.057 ^b	6.4*	6.4*		
L.M	ATCC 49619	6.2*	6.2*	6.2*	28.7	6.2*
	SPN1307	6.2*	6.2*	6.2*		

*d_{uji}=d_{disc}=Tidak menunjukkan bioaktivitas

Taraf α=99% (p<0,01)

Tabel 5 Aktivitas antibakteri sekresi spesies *F. limnocharis* (FL) dan *L. macrodon* (LM) terhadap *S. pneumoniae* SPN1307 dan ATCC 49619 dengan perendaman *sterile paper disc* pada 30 menit

Kode Spesies	Nama Isolat	Diameter uji aktivitas antibakteri dengan variasi injeksi epinefrin (mm)			Kontrol (mm)	Disk (mm)
		Injeksi	Injeksi	Injeksi		
		0.010 mg/g	0.015 mg/g	0.020 mg/g		
F.L	ATCC 49619	8.90±0.044 ^a	6.4*	6.4*	27.0	6.4*
	SPN1307	9.00±0.032 ^a	6.4*	6.4*		
L.M	ATCC 49619	6.2*	6.2*	6.2*	28.7	6.2*
	SPN1307	6.2*	6.2*	6.2*		

*d_{uji}=d_{disc}=Tidak menunjukkan bioaktivitas

Taraf α=99% (p<0,01)

adalah 9.00 ± 0.032 mm terhadap SPN1307 dan 8.90 ± 0.044 mm pada ATCC49619.

DNA Genom Katak

DNA genom katak berhasil diisolasi. Hasil isolasi DNA genom katak disajikan pada Tabel 6 dan 7. Konsentrasi DNA genom katak spesies *F. limnocharis* berkisar antara 13-59 ng/ μ L. Konsentrasi DNA genom katak spesies *L. macrodon* berkisar antara 11-65 ng/ μ L.

Amplikon Fragmen Gen Sitokrom Oksidase Subunit I

DNA genom katak hasil isolasi digunakan sebagai templat untuk amplifikasi fragmen Gen COI. Hasil amplifikasi fragmen DNA COI katak disajikan pada Gambar 4 dan 5. Hasil terbaik ditunjukkan oleh pasangan primer pertama yaitu LCO1490/ HCO2198. Sampel DNA yang menghasilkan pita tunggal digunakan untuk penentuan sekuen DNA.

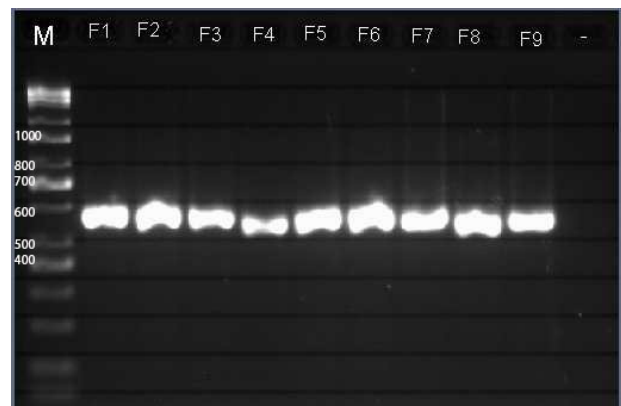
4. PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi dan menganalisis bioaktivitas sekresi kulit katak dari Indonesia. Katak yang digu-

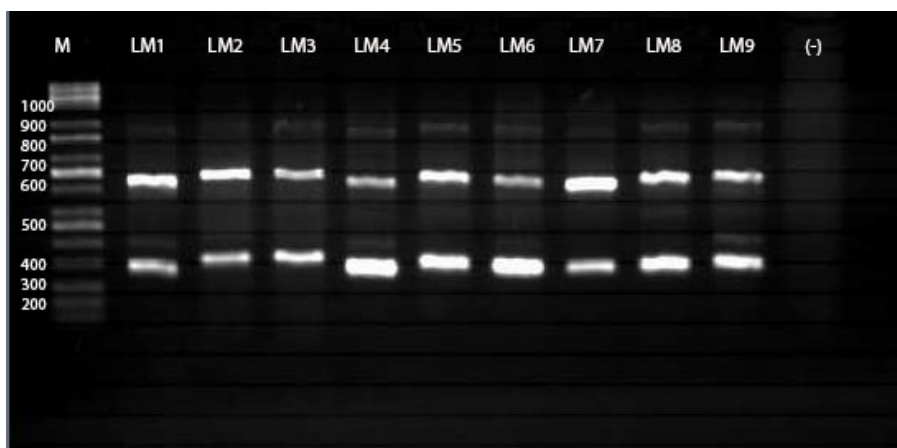
nakan termasuk kedalam famili *Dicroglossidae* yaitu spesies *F. limnocharis* dan *L. macrodon*.

Tabel 6 Konsentrasi DNA genom *F. limnocharis* dan *L. macrodon*

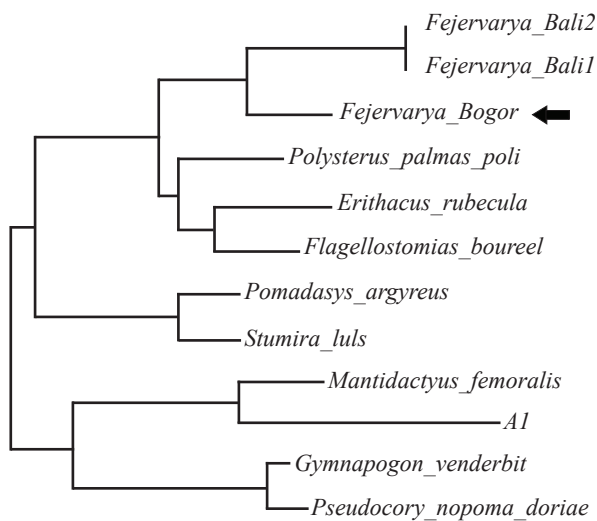
Kode Katak	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)	Kode Katak	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)
FL1	13	LM1	23
FL2	27	LM2	11
FL3	21	LM3	19
FL4	37	LM4	39
FL5	22	LM5	20
FL6	59	LM6	65
FL7	22	LM7	26
FL8	34	LM8	33
FL9	20	LM9	39



Gambar 4 Elektroforegram fragmen DNA COI *F. limnocharis* menggunakan pasangan primer LCO1490/ HCO2198



Gambar 5 Elektroforegram DNA COI *L. macrodon* menggunakan pasangan primer LCO1490/HCO2198



Gambar 6 Pohon filogenetik berdasarkan urutan basa COI dari *F. limnocharis* terhadap beberapa spesies hewan

Kedua katak ini dipilih karena keberadaannya yang dekat dengan pemukiman manusia dan ruang lingkup daerah pinggiran kota. Selain itu juga untuk memperkirakan eksistensi kedua jenis katak ini di alam bebas. Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian Pinontoan (2012), yang menemukan bahwa spesies katak hutan yang terancam punah ternyata memiliki sekresi kulit dengan aktivitas antimikroba. Aktivitas antibakteri yang diamati pada penelitian tidak setinggi yang dilaporkan oleh Pinontoan (2012). Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan habitat katak. Kemungkinan konsentrasi senyawa bioaktif yang ditujukan untuk pertahanan terhadap predator maupun infeksi mikroba lebih tinggi pada katak hutan dibandingkan katak yang hidup di daerah pinggiran kota. Spesies katak yang hidup pada lingkungan yang kaya dengan flora mikroba dilaporkan memiliki mekanisme pertahanan yang lebih baik (Rebecca 2008).

Induksi senyawa sekresi dari kulit katak dilakukan dengan menggunakan stimulan berupa hormon epinefrin. Pemilihan metode ini

didasarkan pada penelitian sebelumnya yang lebih menyarankan penggunaan senyawa stimulan, agar diperoleh hasil lebih efektif dan aman serta tidak menyebabkan kematian pada hewan coba (Robertson *et al.* 2013). Penelitian ini juga melakukan variasi dosis epinefrin. Menurut Pinontoan (2012) dosis epinefrin 0.01 mg/g berat badan hewan coba menghasilkan sekresi senyawa yang lebih baik. Penyuntikan dengan variasi dosis 0.015 dan 0.02 mg/g berat badan diduga dapat menyebabkan tingkat stres berlebih pada hewan coba, sehingga tidak terjadi sekresi senyawa yang diinginkan akibat efek kelainan detak jantung serta peredaran darah yang tidak teratur. Pada tingkat tertentu pengaruh ini dapat menyebabkan kematian. Selain menggunakan stimulan horman, pengeluaran sekresi kulit katak dapat pula dilakukan melalui kejutan listrik, penggosokan kulit secara kontinyu atau pemberian kondisi lingkungan yang memicu stres pada katak.

Hasil sekresi kulit katak berupa campuran senyawa yang perlu dipertahankan stabilitasnya sebelum pengujian bioaktivitas. Untuk tujuan ini dilakukan liofilisasi. Pada proses liofilisasi, pelarutnya berupa air atau senyawa organik lain akan teruapkan tanpa merusak struktur senyawa sekresi yang diharapkan. Kristal padat hasil liofilisasi dilarutkan dan disaring menggunakan *syringe sterile* dengan diameter 0.22 μm untuk mencegah adanya kontaminan seperti spora jamur atau bakteri.

Sekresi kulit katak *F. limnocharis* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel bakteri *S. pneumoniae* MDR maupun yang non-MDR. Sebaliknya, cairan sekresi kulit katak *L. macrodon* tidak menunjukkan kemampuan antibakteri. Daya hambat sekresi kulit katak spesies *F. limnocharis* lebih rendah dibandingkan kon-

trol kloramfenikol. Selanjutnya ketidakmampuan sekresi kulit katak *L. macrodon* menghambat pertumbuhan bakteri uji dapat disebabkan oleh rendahnya aktivitas maupun kandungan senyawa bioaktif dalam sekresi kulit katak jenis ini.

Penggunaan bakteri MDR (SPN1307) dalam uji bioaktivitas senyawa sekresi kulit katak dimaksudkan untuk mencari bahan antibakteri alternatif yang mampu menekan pertumbuhan bakteri mutan khususnya yang memiliki kemampuan melisis dinding sel bakteri. Spesies *S. pneumoniae* SPN1307 bersifat resisten terhadap antibiotik golongan makrolida seperti eritromisin yang bekerja dengan menghambat sintesis protein dikarenakan adanya gen resisten *mefA*, *ermB* dan *ermTR*. Selain itu, solusi untuk pengendalian bakteri *S. pneumoniae* MDR adalah pengembangan vaksin oligosakarida sintetis didasarkan atas polisakarida kapsular yang menjadi faktor virulensi utama *S. pneumoniae* (Safari 2010).

Secara umum, hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri sekresi kulit katak tidak berbeda terhadap bakteri MDR maupun non-MDR, kecuali terhadap isolat MDR SPN1307 sekresi kulit katak lebih aktif ketika *paper disc* direndam selama 5 menit bila dibandingkan dengan perendaman 30 menit. Pada perendaman 30 menit diduga daerah permukaan *paper disc* lebih kuat mengikat pelarut ketimbang peptida. Ada daya saing antar pengikatan peptida dengan pelarut pada permukaan *paper disc*. Selain itu, konsentrasi senyawa antibakteri dalam sekresi kulit katak yang kecil akan semakin menurun ketika pelarut terabsorpsi pada bagian pori-pori permukaan *paper disc*.

Aktivitas antibakteri senyawa sekresi kulit katak dapat terjadi akibat adanya perusakan

dinding sel bakteri. Selain itu, senyawa sekresi diduga ada yang memiliki aktivitas kationik dan komposisi hidrofobik, sehingga mampu berinteraksi dengan membran sitoplasma mikroba yang bersifat anionik. Interaksi pada membran terluar mikroba dapat mengakibatkan kerusakan lipid. Senyawa sekresi kulit katak juga dapat menghilangkan gradien elektrokimia lintas membran plasma. Senyawa sekresi kulit katak dapat secara cepat melewati tipisnya lapisan proteoglikan bakteri Gram positif (Wimley 2010).

Penelitian ini tidak secara spesifik menentukan senyawa yang terkandung dalam sekresi kulit katak tersebut, jenis atau konsentrasi serta jumlah peptida yang terkandung di dalamnya. Senyawa sekresi kulit katak menghasilkan varian peptida yang mampu menjadi agen antibakteri, karena adanya karakteristik jumlah asam amino <60 (kebanyakan L-asam amino), bermuatan positif (kationik), amfipatik, mengaktifkan permeabilitas membran yang menyebabkan depolarisasi membran pada bakteri (Zhao 2003).

DNA hasil isolasi diperoleh dengan melakukan ekstraksi jaringan tubuh katak. Lisis pada jaringan tersebut dilakukan menggunakan proteinase-K. Proteinase-K adalah suatu enzim serine protease yang berperan dalam lisis jaringan. Keunggulan proteinase-K diantaranya memiliki kemampuan dan daya tahan terhadap suhu tinggi. Pada ekstraksi DNA, terdapat protein kontaminan yang harus dihilangkan. Enzim ini berperan memotong ikatan peptida pada protein kontaminan khususnya pada bagian gugus karboksil dari residu asam amino hidrofobik (alifatik dan aromatik).

Analisis filogenetik molekuler dilakukan untuk mengkonfirmasi spesies dan menentukan hubungan kekerabatan jenis katak yang digu-

nakan. Spesies katak umumnya diklasifikasikan berdasarkan hasil analisis morfologi dan genetik. Selain itu analisis molekuler juga untuk inventarisasi keragaman sekuen DNA COI katak asal Indonesia. Gen COI digunakan karena urutan nukleotida gen ini tidak mudah berubah atau bermutasi (Moritz dan Cicero 2004).

Kedua pasang primer yang digunakan dirancang berdasarkan gen COI (Che *et al.* 2011). Primer ini dilaporkan mampu mengidentifikasi lebih dari 36 jenis katak dan salamander di Cina. Namun primer ini belum diterapkan dalam identifikasi spesies katak untuk wilayah Asia yang lain seperti Indonesia. Pada penelitian ini, hasil terbaik ditunjukkan oleh pasangan primer LCO1490/HCO2198, sedangkan primer LepF1/LepR1 tidak memberikan hasil. Penggunaan primer LCO1490/HCO2198 untuk amplifikasi fragmen DNA COI spesies *L. macrodon* menunjukkan ketidakspezifikan target gen, sehingga muncul dua pita yang berukuran 300 bp dan 700 bp. Hal ini kemungkinan dikarenakan primer dirancang untuk DNA COI universal sehingga perlu dilakukan optimasi pada tiap-tiap target gen.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Lembaga Biologi Molekuler Eijkman atas izin dan dukungan fasilitas yang diberikan. Terima kasih juga ditujukan kepada staf dan rekan-rekan dari Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, Fakultas Kehutanan IPB, Sdr Miftahuddin Majid Khoeri dan rekan peneliti pada Laboratorium Bakteriologi Lembaga Eijkman atas bantuan dan kerjasamanya selama penelitian.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Amiche M, Seon AA, Wroblewski H, Nicolas P. 2000. Isolation of dermatotoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *Eur J Biochem.* 267: 4583-4592.
- Angelina. 2011. Studi *Streptococcus pneumoniae* pada Rongga Mulut [Skripsi]. Makassar (ID): Universitas Hasannudin.
- Appelbaum PC. 1992. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An Overview. *Clin Infect Dis.* 15(1):77-83
- Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. The pink book: course textbook-12th edition (233-248). Atlanta.
- Che J, Chen HM, Yang JX, Jin JQ, Jiang K, Yuan ZY, Murphy RW, Zhang YP. 2011. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources.* doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03090.x
- Cobo F, Teresa M, Isabel M. 2012. *Streptococcus pneumoniae* bacteremia: clinical and microbiological epidemiology in a health area of Southern Spain. *Infectious Disease Report.* doi: 10.4081/idr.2012.e29
- Conlon JM, Sonnevend A. 2011. Clinical application of amphibian antimicrobial peptides. *J Med Sci.* 4(2): 62-72.
- Dorr T, Lewis K, Vulic M. 2009. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics.* 5(12). doi: 10.1371/journal.pgen.1000760.
- Gonser RA, Collura RV. 1996. Waste not, want not: toe-clips as source of DNA. *J Herpetology.* 30(3): 446-447.
- Kusrini M. 2013. Panduan Bergambar Identifikasi Amfibi Jawa Barat. Institut Pertanian Bogor-Jawa Barat. ISBN: 978-979-9337-53-5.
- Margaret IP, Donald JL, Yung WH, Chan C, Cheng FB. 1999. Evidence of clonal dissemination of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *J Clinical Microbiol.* 37(9): 2834-2839.

- Martinez RM. 2013. Pneumonia Bacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2(5). doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01178-5.
- Mehr A, Wood N. 2012. *Streptococcus pneumoniae* - a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatric Respiratory Reviews*. 13(2012): 258-264.
- Moritz C, Cicero C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology*. 2(10): e354.
- Overweg K, Peter WM, Trzcinski K, Sluijter M, Groot R, Hryniewicz W. 1999. Multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: Identification of emerging clones. *J Clinical Microbiol*. 37(6): 1739-1745.
- Pinontoan S. 2012. Aktivitas Antimikroba Sekresi Kulit Katak Merah (*Leptophryne cruentata*) dan Katak Pohon Jawa (*Rhacoporus javanus*) [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Rebecca JJ. 2008. Biologically Active Peptides from Australian Amphibians [disertasi]. Adelaide (AUS): Department of Chemistry University of Adelaide.
- Robertson LS, Fellers GM, Marranca JM, Kleeman PM. 2013. Expression analysis and identification of antimicrobial peptides transcripts from six North American frog species. *J Dis Aquat Org*. 104: 225-236. doi: 10.3354/dao02601.
- Safari D. 2010. Development of New Synthetic Oligosaccharide Vaccines. Universiteit Utrecht Holland. ISBN: 978-90-816156-1-7.
- Song Y, Ji S, Liu W, Yu X, Meng Q, Lai R. 2013. Different expression profiles of bioactive peptides in *Pelophylax nigromaculatus* from distinct region. *Biosc Biotechnol Biochem*. 77(5): 1075-1079.
- Wang H, Yu Z, Hu Y, Li F, Liu L, Zheng H, Meng H, Yang S, Yang X, Liu, J. 2012. Novel antimicrobial peptides isolated from the skin secretion of Hainan odorous frog, *Odorrana hainanensis*. *Peptides*. 35: 285-290. doi: 10.1016/j.peptides.2012.03.007.
- Wimley WC. 2010. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chemical Biology*. 5(10): 905-917. doi: 10.1021/cb1001558.
- Wulandari DR, Ibrohim MH, Listyorini D. 2013. The observation of frog species at State University of Malang as a preliminary effort on frog conservation. *J Tropical Life Sci*. 3: 43-47.
- [WHO] World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. France: ISBN 978 92 4 156474 8.
- Zhao H. 2003. Mode of Action of Antimicrobial Peptides [disertasi]. Finlandia: Institute of Biomedicine Faculty of Medicine University of Helsinki.