

# Perbandingan Pengaruh Agen Plasmid Curing *Acriflavine* dan *Acridine Orange* (AO) terhadap Laju Plasmid Curing dengan Kuantifikasi Fluoresensi Ekspresi Protein GFP pada Bakteri *Escherichia Coli* PRSET-emGFP

**Jonathan Harris Gultom\***

Mikrobiologi

Institut Teknologi Bandung,  
Bandung

10420002@mahasiswa.itb.ac.id

\*Corresponding Author

**Azka Fathiya**

Mikrobiologi

Institut Teknologi Bandung,  
Bandung

10420010@mahasiswa.itb.ac.id

**Ajeng Farahita Auria**

Mikrobiologi

Institut Teknologi Bandung,  
Bandung

10420015@mahasiswa.itb.ac.id

**Ayodya Kuncoroadi Y W**

Mikrobiologi

Institut Teknologi Bandung,  
Bandung

10420023@mahasiswa.itb.ac.id

**Nadhira Azzahra Arandri**

Mikrobiologi

Institut Teknologi Bandung,  
Bandung

10420030@mahasiswa.itb.ac.id

**Ahmad Hafiz Husamuddin  
Rahman**

Mikrobiologi

Institut Teknologi Bandung,  
Bandung

10419004@mahasiswa.itb.ac.id

**Abstrak**— Plasmid curing is an activity to remove plasmids in a bacterium. Plasmid itself is a structure that can carry genes that are beneficial for bacteria, such as making the bacteria resistant to antibiotics. Acridine Orange (AO) and Acriflavine are intercalating agents that function to break down the super helical shape of plasmid DNA and then form circular or open linear plasmid DNA which is used to carry out Plasmid Curing in this study and then compare its effect on the rate of plasmid curing by fluorescence quantification of GFP protein expression on *Escherichia coli* PRSET-emGFP bacteria. The results obtained from this experiment were the rate of plasmid loss per generation obtained by measuring the activity of the GFP reporter on the recombinant *E. coli* model given the curing agent Acridine Orange was 9.52% for the AO 50 treatment, 44.2% for the AO 100, 10.4% for the AO 50 treatment. Acriflavine 250, and 0.836% for Acriflavine 125. Therefore, it can be concluded that the Acridine Orange treatment was more effective than the Acriflavine treatment against the pRSET-EmGFP recombinant *E. coli* curing plasmid.

**Kata Kunci**— Plasmid, Plasmid Curing, Acridine Orange, Acriflavine, GFP, *E. coli* PRSET-emGFP.

## I. PENDAHULUAN

Plasmid merupakan elemen DNA ekstra-kromosom independen, melingkar, mereplikasi diri dengan nomor salinan karakteristik di dalam inang. Sifat-sifat yang dapat dikodekan oleh plasmid adalah resistensi terhadap antibiotik dan logam berat, degradasi hidrokarbon,

sintesis bakteriosin dan antibiotik, dan masih banyak lagi. Resistensi antibiotik yang dimediasi plasmid dapat ditransfer dengan mudah dari satu bakteri ke bakteri lain melalui transformasi, konjugasi atau mobilisasi (*Opal et al.*, 2000). Resistensi yang dikodekan oleh plasmid terhadap beberapa antibiotik semakin diakui sebagai tantangan utama dalam pengobatan infeksi. Selain resistensi antibiotik, beberapa plasmid bakteri memberikan patogenisitas ke sel inang (Saunders, 1981). Bahan plasmid curing adalah bahan kimia yang menghambat replikasi plasmid yang mengakibatkan eliminasi plasmid dari populasi inang setelah beberapa siklus replikasi.

Perbandingan strain yang menyimpan plasmid dan turunannya yang disembuhkan memungkinkan penetapan karakter fenotipik ke gen yang terletak pada plasmid. Hilangnya suatu sifat tertentu secara simultan melalui proses curing, memberikan indikasi yang kuat tentang sifat genetik yang dibawa oleh plasmidnya (Trevors, 1986). Selanjutnya, plasmid curing akan mengubah sel bakteri yang resisten antibiotik menjadi sel yang sensitif (Molnar, 1988). Dengan demikian, eliminasi R-plasmid membuat terapi antibiotik menjadi efektif. Strategi baru untuk melawan resistensi multiobat antimikroba diperlukan, dan penyembuhan plasmid, dan strategi anti-plasmid dapat mengurangi frekuensi gen resistensi antimikroba dan membuat bakteri peka terhadap antibiotik (Michelle *et al.*, 2018).

Curing plasmid adalah proses menghilangkan fungsi yang dikodekan plasmid seperti resistensi antibiotik, virulensi, degradasi senyawa aromatik, dan lain-lain pada bakteri. Beberapa bahan untuk plasmid curing telah

dilaporkan dalam literatur, namun tidak ada suatu agen plasmid curing yang dapat menghilangkan semua plasmid dari inang yang berbeda. Oleh karena itu, selalu ada kebutuhan akan agen plasmid curing baru yang dapat digunakan secara efektif untuk membalikkan fungsi yang dikodekan plasmid seperti virulensi, resistensi antibiotik, dan lain-lain

Protokol untuk plasmid curing sering kali terdiri dari pemaparan kultur terhadap konsentrasi sub-inhibitor dari beberapa bahan kimia, seperti misalnya acridine orange, acriflavine, dan sodium dodecyl sulfate atau ke suhu super-optimal diikuti dengan pemilihan turunan yang diawetkan. Agen interkalasi DNA seperti Acridine orange dan ethidium bromide adalah yang paling umum digunakan karena terbukti efektif melawan plasmid dalam berbagai genera. Meskipun semua agen ini telah digunakan untuk meningkatkan pemulihan turunan kurang plasmid dari berbagai bakteri, mereka secara individual hanya efektif terhadap beberapa plasmid dan kemungkinan responsnya tidak dapat diprediksi. Penghapusan plasmid (curing) dari kultur bakteri adalah metode terbaik untuk membuktikan hubungan antara sifat genetik dan pembawa plasmid spesifik oleh kultur karena karakter fenotipik yang terkait dengan plasmid tidak diekspresikan dalam turunan yang diawetkan tetapi pada pengenalan kembali plasmid ke strain sembuh fenotipe yang hilang muncul kembali. Efisiensi curing juga dapat sangat bervariasi tergantung pada plasmid dan inang bakteri tertentu yang membawanya. Dalam kebanyakan kasus, mekanisme yang mendasari penyembuhan tidak diketahui. Zat tersebut dapat mengganggu secara langsung replikasi plasmid seperti yang terjadi dengan curing yang diinduksi panas dari plasmid sensitif suhu tertentu atau curing dengan acridine orange atau etidium bromida. Alternatifnya, curing dapat mengganggu pertumbuhan bakteri pembawa plasmid sehingga memungkinkan segregasi tanpa plasmid yang muncul secara spontan menjadi dominan. Hal ini terjadi pada kasus tertentu dari curing dengan acridines, natrium dodesil sulfat dan urea. Menyembuhkan dengan MitomycinC juga efektif. Eksperimen curing biasanya dilakukan di bawah kondisi yang serupa dengan yang digunakan untuk kultur rutin bakteri kecuali pembatasan komponen esensial dimaksudkan secara khusus. Bila pengobatan dilakukan untuk jangka waktu yang terus menerus, zat tersebut digunakan pada konsentrasi yang hanya kurang dari yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan, dan jumlah bakteri awalnya kecil. Jika acridine digunakan, kultur dipertahankan pada pH 7,6 dan diinkubasi dalam gelap. Agen interkalasi berfungsi untuk memecah bentuk superhelikal DNA plasmid kemudian membentuk DNA plasmid bentuk melingkar atau linier terbuka. Acriflavine adalah agen interkalasi DNA yang memiliki sifat plasmid curing. Acriflavine selektif menghambat replikasi plasmid, dan mungkin memiliki peran dalam mengganggu konjugasi (Das et al., 2017). Acridine orange (AO) adalah pewarna fluorescent umum yang telah dikenal selama bertahun-tahun dan merupakan agen interkalasi pada plasmid curing (Byvaltsev et al., 2019). Penggunaan antibiotik secara berlebihan dalam

berbagai kegiatan manusia dapat menghasilkan sifat resistensi antibiotik pada berbagai mikroba. Sifat resistensi tersebut dapat menyebar antarmikroba melalui mekanisme horizontal gene transfer. Hal tersebut menyebabkan peningkatan kekhawatiran berpindahnya sifat resistensi tersebut kepada mikroba yang patogen pada manusia. Lingkungan yang mengandung kontaminan berupa antibiotik dapat memiliki potensi untuk menyeleksi mikroba resisten antibiotik. Menanggapi hal tersebut, perlu adanya penggunaan agen plasmid curing untuk mengantisipasi sifat resistensi yang dimiliki mikroba tersebut. Namun, perlu adanya analisis konsentrasi yang optimal bagi agen plasmid curing tersebut menjalankan tugasnya. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis secara kuantitatif laju kehilangan plasmid per generasi menggunakan pengukuran aktivitas reporter GFP pada model *E. coli* rekombinan.

Mekanisme horizontal gene transfer dapat menjadi cara untuk penyebaran antibiotik antar mikroba karena adanya sifat resistensi pada mikroba setelah penggunaan antibiotik yang berlebihan akibat dari berbagai kegiatan manusia. Hal tersebut menyebabkan peningkatan kekhawatiran atas perpindahan sifat resistensi tersebut kepada mikroba yang patogen pada manusia. Lingkungan yang berkontaminasi dapat memiliki potensi untuk menyeleksi mikroba yang resisten terhadap antibiotik. Penggunaan agen plasmid curing dapat mengantisipasi sifat resistensi mikroba, tetapi perlu ada analisis konsentrasi lebih lanjut bagi agen plasmid curing agar dapat menjalankan tugasnya secara optimal. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis secara kuantitatif laju kehilangan plasmid per generasi menggunakan pengukuran aktivitas reporter GFP pada model *E. coli* rekombinan. Dengan tujuan spesifik menentukan laju kehilangan plasmid per generasi menggunakan pengukuran aktivitas reporter GFP pada model *E. coli* rekombinan yang diberi agen curing *Acridine Orange*, menentukan laju kehilangan plasmid per generasi menggunakan pengukuran aktivitas reporter GFP pada model *E. coli* rekombinan yang diberi agen curing *Acriflavin*, dan membandingkan efektivitas perlakuan *Acridine Orange* dan *Acriflavin* terhadap plasmid curing *E. coli* rekombinan pRSET-EmGFP.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

Plasmid merupakan sebuah struktur ekstrakromosom yang dapat ditemukan di berbagai mikroorganisme yang dapat bereplikasi secara mandiri dan tidak terkait dengan replikasi kromosom. Plasmid membawa sejumlah kecil gen dibandingkan dengan kromosom. Plasmid dapat berfungsi sebagai pembawa materi genetik yang merubah bakteri menjadi memiliki keuntungan secara genetik seperti misalnya resisten terhadap antibiotik. Plasmid terdiri atas *origin of replication (ORI)*, *selectable marker*, *multiple cloning site*, *promoter region*, *protein tag*, dan *poly-adenylation signal*. Secara umum, plasmid terdiri atas lima tipe yakni plasmid F-, plasmid resistensi, plasmid virulensi, plasmid degradative, dan juga plasmid

Col (Couturir, 1988). Plasmid merupakan komponen pembawa gen resisten antibiotik dari bakteri AMR (*antimicrobial resistance*). Gen tersebut akan dibawa oleh plasmid yang kemudian ditransfer secara horizontal dari suatu bakteri ke bakteri lainnya. Ketika suatu bakteri memperoleh plasmid ini, terjadi perubahan karakteristik gen di dalamnya sehingga mengakibatkan mikroba yang bersangkutan menjadi resisten terhadap antibiotik karena sudah memiliki gen resisten dari bakteri AMR (Rozwandowicz *et al.*, 2018). Plasmid curing merupakan proses ketika suatu plasmid yang membawa fungsi sebagai resisten antibiotik, virulens, metal resisten, memiliki sifat patogen, dll. kehilangan kemampuannya atau hilang dari suatu mikroba secara keseluruhan atau sebagian kecil. Untuk mengamati fenomena tersebut, dapat digunakan agen curing seperti misalnya *acriflavine*, *ethidium bromide* dan *acridine orange* (pewarna interkalasi, dilakukan inhibisi replikasi plasmid), *coumermycin* dan *novobiocin* (menginhibisi DNA *gyrase-dependent supercoiling* dari plasmid), *mitomycin C* (aktivasi metabolik diikuti perubahan pada basa purin), *rifampicin* (menginhibisi RNA polimerase), dan SDS (sel dengan plasmid akan lebih sensitif terhadap SDS karena adanya *plasmid-specified* pili di permukaan sel) (Trevors, 1986).

Lysogeny Broth merupakan medium umum yang digunakan untuk mengkultivasi kultur bakteri. Lysogeny Broth mengandung nutrisi yang baik dipakai untuk mengkultur bakteri seperti *Escherichia coli* dan bakteri enterik lainnya (MacWilliams & Liao, 2006). Ampisilin merupakan agen antimikroba kelas penisilin yang bekerja dengan berinteraksi langsung dengan Penicillin-binding proteins (PBP) dan menghambat aktivitas transpeptidase (Parker, 2012). Penggunaan medium LB+Ampisilin dilakukan untuk mengeliminasi mikroorganisme umum dan meningkatkan pertumbuhan *E. coli* dengan plasmid pRSET-emGFP yang memiliki gen resisten terhadap antimikroba dan mengekspresi emerald-GFP.

Protokol untuk plasmid curing sering kali terdiri dari pemaparan kultur terhadap konsentrasi sub-inhibitor dari beberapa bahan kimia, seperti misalnya *acridine orange*, *acriflavine*, dan sodium dodecyl sulfate atau ke suhu super-optimal diikuti dengan pemilihan turunan yang diawetkan. Agen interkalasi DNA seperti *Acridine orange* dan *ethidium bromide* adalah yang paling umum digunakan karena terbukti efektif melawan plasmid dalam berbagai genera. *Acriflavine* adalah agen interkalasi DNA yang memiliki sifat plasmid curing. *Acriflavine* selektif menghambat replikasi plasmid, dan mungkin memiliki peran dalam mengganggu konjugasi (Das *et al.*, 2017). *Acridine orange* (AO) adalah pewarna fluorescent umum yang telah dikenal selama bertahun-tahun dan merupakan agen interkalasi pada plasmid curing (Byvaltsev *et al.*, 2019).

Pada penelitian kali ini, digunakan agen curing *Acridine orange* atau AO dan *acriflavine*. *Acridine orange* yang berfungsi sebagai pewarna fluoresen selektif asam nukleat memiliki sifat kationik sehingga membantu penentuan siklus sel. Agen curing ini bersifat sel-

permeabel, sehingga memungkinkan pewarna dapat berinteraksi dengan DNA melalui interkalasi, atau RNA dengan atraksi elektrostatik. Saat terikat pada DNA, AO memiliki eksitasi maksimum pada 520 nm dan 525 nm. Sedangkan, saat berikatan dengan ENA AO mengalami pergeseran eksitasi maksimum dari 525 nm menjadi 460 nm (biru). AO juga mampu menahan lingkungan yang berada pada pH rendah sehingga pewarna dapat menembus organel asam yang terikat membrane (Yektaeian *et al.*, 2019). Nilai MIC merupakan nilai konsentrasi terendah antibiotik yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bakteri (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Nilai MIC pada agen curing *acridine orange* sebesar  $4.1 \times 10^4$  M atau 108.8  $\mu\text{g/mL}$ , dengan nilai sublethal sebesar  $\frac{1}{2}$  dari nilai MIC yaitu 54.4  $\mu\text{g/mL}$  (Spengler, 2006).

Agen curing selanjutnya yang digunakan sebagai pembanding adalah *acriflavine*. *Acriflavine* merupakan antiseptic yang dapat berfungsi dalam mengurangi transfer factor F dan R plasmid. Mode of action agen curing ini adalah dengan membuat lateral gene transfer antar bakteri menjadi terhambat yang memicu populasi bakteri akan berkurang. *Acriflavine* akan berikatan dengan reseptor spesifik di membrane luar bakteri dan masuk ke dalam bakteri sehingga dapat berikatan pada membrane plasma dengan jenis ikatan irreversible binding. *Acriflavine* juga dapat mengatur regulasi gen-gen yang terlibat pada beberapa proses seluler seperti reaksi oksidasi-reduksi, transportasi transmembrane, biosintesis asam lemak dan pengikatan ion logam. Regulasi gen yang mengatur protein transporter ABC (ATP-binding cassette) dan MFS (major facilitator superfamily) juga dapat dikendalikan menggunakan agen curing *acriflavine*. Kedua protein transporter ini, ABC dan MFS, digunakan dalam resistansi antibiotik mikroba dan berbagai proses sekresi protein (Persinoti, *et al.*, 2014). Nilai MIC pada agen curing *acriflavine* sebanyak 250  $\mu\text{g/mL}$ . Sehingga untuk perhitungan sublethal dengan  $\frac{1}{2}$  MIC yaitu sebesar 125  $\mu\text{g/mL}$  (Villagra, *et al.*, 2008).

Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) merupakan reagen mimik dari alolaktosa, sebuah metabolit laktosa yang menginduksi transkripsi operon lac, yang berperan dalam ekspresi protein *E. coli*. IPTG mengaktifkan operon lac di *E. coli* dengan mengikat dan memblokir represor lac tanpa terdegradasi. Dengan adanya IPTG, gen yang diatur oleh urutan promotor atau operator lac atau tac diekspresikan dengan tingkat yang tinggi (Biologics International corp. 2018). Plasmid dari pRSET-emGFP adalah plasmid tipe ekspresi bakteri dengan ukuran 3600 bp, plasmid ini memiliki kemampuan resistensi antibiotik ampisilin dan merupakan vektor untuk mengekspresikan Emerald GFP pada bakteri. Plasmid ini mengandung promotor vacteriophage T7 untuk ekspresi Fluorescent Protein (FP) tingkat tinggi yang dapat diinduksi dalam *E. coli*, untuk terjemahan FP yang efisien, situs pengikatan ribosom (RBS) secara ideal diposisikan dari awal ATG, lalu Xpress epitop untuk mendeteksi protein fusi yang diekspresikan menggunakan situs pengenalan Anti-

Xpress antibodi Enterokinase (EK) untuk pembelahan efektif peptida fusi dari FP, selanjutnya ada protein fluoresen turunan eGFP (EmGFP), dan terakhir ada gen resistensi ampisilin untuk seleksi asal pUC E. coli untuk replikasi salinan tinggi dan pemeliharaan plasmid pada E. coli. Pada plasmid E. coli prSET-emGFP, promotor T7 mengontrol ekspresi 10 gen. Promotor ini dikenali oleh T7 RNA polimerase. Inang bakteri yang dapat digunakan adalah yang mengekspresikan T7 RNA polimerase atau menginfeksi sel dengan fag yang mengekspresikan T7 RNA polimerase untuk mengekspresikan gen Protein Fluorescent pada E. coli. Penggunaan strain E. coli turunan BL21 direkomendasikan sebagai inang konstruksi ekspresi karena T7 RNA polimerase diekspresikan dalam strain ini dengan cara yang terkontrol (Invitrogen, 2010).

Pada percobaan ini dilakukan pengukuran OD pada panjang gelombang 600 dan fluoresensi dengan Emisi pada panjang gelombang 500-550 nm dan eksitasi pada panjang gelombang 475 nm menggunakan GlomaxR Discover Promega. Pengukuran absorbansi pada OD 600 bertujuan untuk menghitung konsentrasi atau jumlah dari bakteri atau sel yang ada di dalam sampel cair. Pengukuran Fluoresensi dengan emisi pada panjang gelombang 500-550 nm dan eksitasi pada panjang gelombang 475 nm dilakukan karena range itu merupakan range GFP dapat mengeluarkan sinyal fluoresens. (Mandelstam, et.al., 1982; Brejc, et.al., 1997).

### III. METODOLOGI

#### A. Alat dan Bahan

Kultur E. coli pRSET-emGFP ditumbuhkan pada medium LB+ampisilin yang kemudian melalui proses curing menggunakan agen Acriflavine pada konsentrasi 125 ug/mL dan 250 ug/ml; dan Acridine Orange pada konsentrasi 50 ug/mL dan 100 ug/mL. Alat yang digunakan antara lain : mikropipet dengan ukuran 100µL, 1000µL, falcon 15 mL dan 30mL, microtube, kuvet, microtiter, spektrofotometer, tabung reaksi, syringe, syringe filter. Kemudian bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain : ampisilin, agen curing acriflavine, agen curing acridine orange (AO), kultur E. coli pRSET-emGFP, tips mikropipet 100µL, 1000µL, NaCl 0.85%, kapas lemak, bahan-bahan untuk membuat medium (tripton, yeast extract, NaCl), akuades, alcohol, spiritus.

#### B. Pembuatan medium

Medium LB dibuat dengan komposisi tripton 10 gram, yeast extract 5 gram, NaCl 10 gram. Untuk medium padat ditambahkan agar 15 gram, dan untuk medium LB+ ampisilin ditambahkan ampisilin 0,375 gram, yang merupakan working culture sebesar 0,1% dari stock.

#### C. Aktivasi kultur

Kultur E.coli pRSET-emGFP dalam medium cair ditambahkan 2,5 uL larutan IPTG konsentrasi 1 Molar.

#### D. Induksi agen curing

Pada 10 ml kultur cair E. coli pRSET-emGFP diinduksi 2,5 uL IPTG kemudian diletakkan di incubator. Kemudian ditambahkan agen curing Acriflavine dan Acridine Orange pada volume tertentu kedalam medium sesuai konsentrasi yang diinginkan. Kultur kemudian disampling 400 uL kemudian diinkubasi 24 jam.

#### E. Perhitungan OD dan Absorbansi

Kultur hasil inkubasi kemudian disentrifugasi, kemudian peletnya dilarutkan menggunakan larutan fisiologis sampai volume 400 uL. Fluoresensi dan Absorbansi diukur menggunakan mikrotiter. Mikrotiter hitam digunakan untuk pengukuran fluoresensi sedangkan microtiter bening digunakan untuk pengukuran absorbansi. Untuk perhitungan fluoresensi digunakan sebanyak 170 uL kultur pada tiap well, dan untuk perhitungan absorbansi sebesar 200 uL kultur pada tiap well. Hasil perhitungan day 1 sampai day 3 dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

Well/No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air
B	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air
C	Air	AO 100 T0	AO 100 T4	AO 100 T0	AO 100 T24	AO 100 T24	AO 100 T24	Larfis	Air	Air	Air	Air
D	Air	AO 50 T24	AO 50 T24	AO 50 T24	AO 50 T0	AO 50 T0	AO 50 T0	Larfis	Air	Air	Air	Air
E	Air	Acri 250 T0	Acri 250 T0	Acri 250 T0	Acri 250 T24	Acri 250 T24	Acri 250 T24	Larfis	Air	Air	Air	Air
F	Air	Acri 125 T0	Acri 125 T0	Acri 125 T0	Acri 125 T24	Acri 125 T24	Acri 125 T24	Larfis	Air	Air	Air	Air
G	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air
H	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air

Gambar 1. Peta microtiter perhitungan fluoresensi dan absorbansi pada perlakuan day 1 dan day 2.

Well/No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air
B	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air
C	Air	AO 100 T24	AO 100 T24	AO 100 T24	AO 100 T0	AO 100 T0	AO 100 T0	Larfis	Air	Air	Air	Air
D	Air	AO 50 T24	AO 50 T24	AO 50 T24	AO 50 T0	AO 50 T0	AO 50 T0	Larfis	Air	Air	Air	Air
E	Air	Acri 250 T0	Acri 250 T0	Acri 250 T0	Acri 250 T24	Acri 250 T24	Acri 250 T24	Larfis	Air	Air	Air	Air
F	Air	Acri 125 T0	Acri 125 T0	Acri 125 T0	Acri 125 T24	Acri 125 T24	Acri 125 T24	Larfis	Air	Air	Air	Air
G	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air
H	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air

Gambar 2. Peta microtiter perhitungan fluoresensi dan absorbansi pada perlakuan day 3

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari Gambar 3, terlihat bahwa fluoresensi Acridine Orange konsentrasi 50 µg/ml menunjukkan peningkatan dari T0 sampai T24 jam. Pada T48 dan 72 jam terlihat fluoresensi berkurang signifikan. Acriflavine konsentrasi 125 µg/ml menunjukkan peningkatan pada T0 sampai T24 jam. Pada T48 dan 72 jam terlihat fluoresensi berkurang signifikan. Fluoresensi dari Acridine Orange 100 µg/ml dan Acriflavine 250 µg/ml menunjukkan trend menurun dari T0 sampai T72 jam.

Fluoresensi dihasilkan oleh protein emGFP yang memancarkan cahaya hijau pada gelombang 508 nm. Ketika diberikan perlakuan agen curing dan plasmid pRSET berhasil ter-curing menyebabkan fluoresensi berkurang seiring waktu perlakuan agen curing meningkat. Trend Fluoresensi yang berkurang menandakan bahwa ekspresi protein emGFP berkurang.

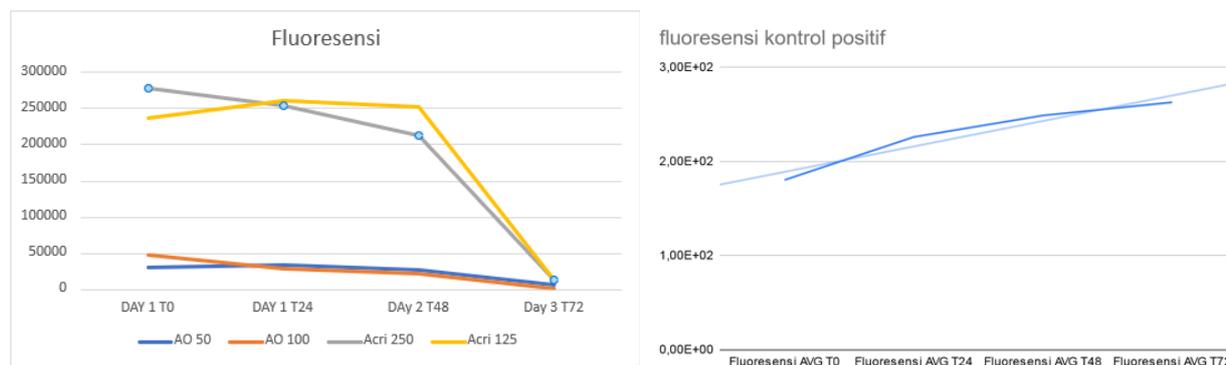
Dari grafik juga dapat terlihat bahwa kultur *E.coli* pRSET-emGFP yang diberi perlakuan Acridine Orange 50 dan 100 µg/ml menghasilkan fluoresensi yang fluktuatif pada T0 sampai T48 dengan trend menurun lambat, kemudian mengalami penurunan yang signifikan dan konstan dari awal T48 menghasilkan nilai fluoresensi

lebih rendah sampai T72. Dapat dilihat pada Tabel 1, Kultur *E. coli* pRSET-emGFP yang diberi perlakuan acriflavine 250 µg/ml menghasilkan nilai fluoresensi lebih tinggi pada T0, yang menurun dengan lambat sampai T48, dimana penurunan lebih signifikan sampai T72. Hasil fluoresensi T0 dari perlakuan acriflavine 125 µg/ml berfluktuasi sampai T48 dimana hasil mengalami penurunan drastis sampai T72. Ini dapat menjelaskan bahwa kedua agen curing yang dipakai beraktivasi pada waktu yang bersamaan (48 jam).

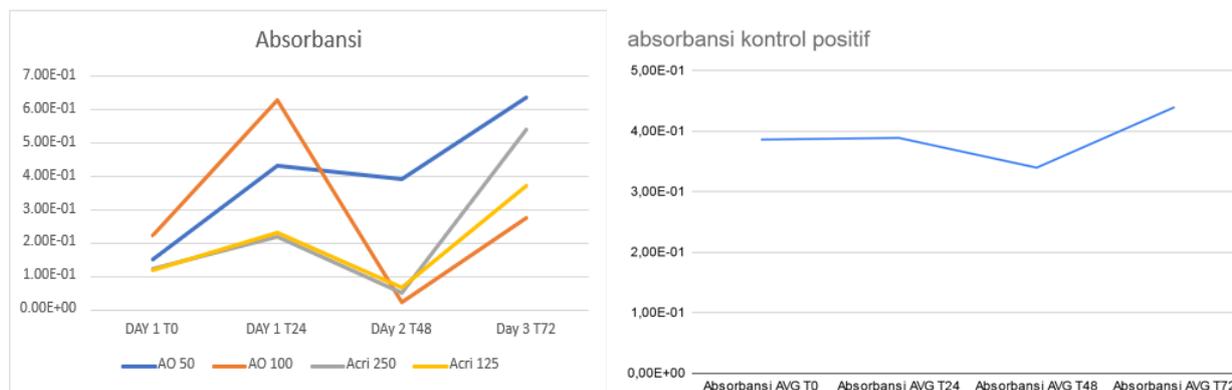
Pada T0 diamati bahwa nilai fluoresensi antara perlakuan Acridine Orange dan Acriflavine berbeda jauh. Ini merupakan sebuah kejanggalan yang tidak sesuai ekspektasi, karena pada T0 seharusnya nilai fluoresensi mirip karena baru mulai perlakuan. Hal ini dapat terjadi karena kesalahan dari peneliti berupa aktivasi kultur yang tidak sama jumlahnya. Pada agen curing AO diperoleh jumlah kultur yang lebih sedikit dibandingkan dengan acriflavine sehingga berpengaruh pada jumlah pRSET-emGFP yang juga semakin sedikit sehingga fluoresensi yang terdeteksi jauh lebih rendah dibandingkan dengan agen curing acriflavine.

Tabel 1. Fluoresensi terhadap waktu pemaparan agen curing dari *E. coli* pRSET-emGFP

	AO 50	AO 100	Acriflavine 250	Acriflavine 125
Day 1 T-0	29600	48100	278333.3333	236333.3333
Day 1 T-24	33833.3333	29100	253666.6667	261000
Day 2 T-48	27466.6667	20900	213666.6667	252000
Day 3 T-72	5.69E+03	1.74E+03	12266.66667	12433.33333

Gambar 3. Fluoresensi terhadap waktu pemaparan agen curing dari *E.coli* pRSET-emGFPTabel 2. Absorbansi terhadap waktu pemaparan agen curing dari *E. coli* pRSET-emGFP

	AO 50	AO 100	Acriflavine 250	Acriflavine 125
Day 1 T-0	1.53E-01	2.25E-01	1.22E-01	1.18E-01
Day 1 T-24	4.33E-01	6.29E-01	2.19E-01	2.31E-01
Day 2 T-48	3.94E-01	2.43E-02	5.01E-02	6.73E-02
Day 3 T-72	6.39E-01	2.76E-01	5.43E-01	3.73E-01

Gambar 4. Absorbansi terhadap waktu pemaparan agen curing dari *E. coli* pRSET-emGFP

Berdasarkan data yang didapatkan dari Tabel 2 dan Gambar 4, terlihat absorbansi dari *E. coli* pRSET-emGFP yang diberikan perlakuan Acridine Orange dengan konsentrasi 100 mikrogram/mL mengalami kenaikan pada hari pertama, dan mengalami penurunan drastis di hari kedua, dan mengalami kenaikan kembali pada hari ketiga. Pada *E. coli* pRSET-emGFP yang diberikan perlakuan Acridine Orange 50 mikrogram/mL terlihat absorbansi mengalami kenaikan pada hari pertama, kemudian mengalami sedikit penurunan pada hari kedua, dan kembali naik pada hari ketiga. Pada *E. coli* pRSET-emGFP yang diberikan dan Acriflavine 250 mikrogram/mL dan Acriflavine 125 mikrogram/mL, absorbansi mengalami kenaikan pada hari pertama, mengalami penurunan pada hari kedua, dan mengalami kenaikan pada hari ketiga dengan konsentrasi 250 mikrogram/mL memiliki absorbansi yang lebih tinggi dari konsentrasi 125 mikrogram/mL.

Nilai absorbansi menunjukkan jumlah sel dalam kultur. Absorbansi dihitung pada OD 600 nm yang digunakan untuk menghitung konsentrasi total dari bakteri dan sel lainnya. Metode kuantifikasi ini menyebabkan kerusakan minimal terhadap kultur dan tidak menghambat pertumbuhan (Mandelstam & McQuillen, 1968). Absorbansi ini dihitung dari kultur yang ditumbuhkan pada medium LB+ampisilin, yang memastikan bahwa jumlah sel yang terhitung hanya

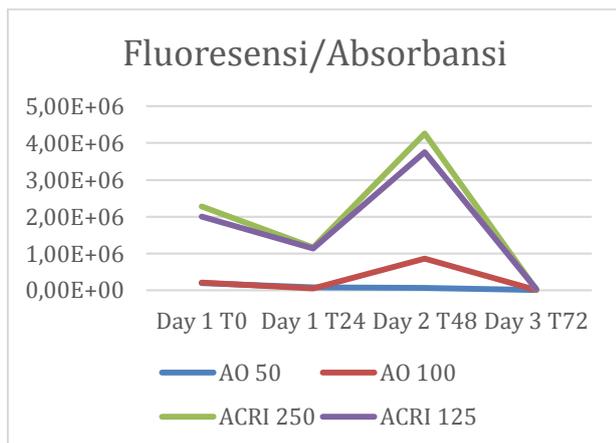
organisme *E. coli* yang mengandung plasmid pRSET-emGFP, yang bersifat resisten terhadap agen antimikrobal ampisilin dalam medium.

Data pengamatan menunjukkan bahwa perlakuan agen curing Acridine Orange 50 µg/ml, 100 µg/ml, Acriflavine 125 µg/ml, dan 250 µg/ml semua mengalami peningkatan dari T0 sampai T24 jam, menurun dari T24 sampai T48, kemudian menunjukkan kenaikan lagi pada T48 sampai T72. Ini dapat diinterpretasikan sebagai agen curing belum bekerja dengan efisien terhadap *E. coli* pRSET-emGFP pada waktu 24 jam sehingga *E. coli* dapat meningkat jumlah, yang menaikkan nilai absorbansi. Agen curing baru menunjukkan hasil curing yang signifikan pada T=48 jam, mengurangi jumlah *E. coli*, menurunkan nilai absorbansi.

Kenaikan nilai absorbansi pada T=72 jam dapat menandakan terbentuk organisme *E. coli* yang dapat bertahan hidup dalam kehadiran agen curing, sehingga absorbansi sel dapat naik. Ini dapat dibuktikan dengan nilai fluoresensi menurun pada T=72 jam, pengurangan ekspresi protein dari *E. coli* pRSET-emGFP menandakan bahwa *E. coli* plasmid pRSET-emGFP tetap menurun, dan jumlah sel yang meningkat pada T72 merupakan organisme *E. coli* yang resisten terhadap agen curing, tapi tidak mengandung plasmid emGFP.

Tabel 3. Fluorosensi/absorbansi terhadap waktu pemaparan agen curing dari *E. coli* pRSET-emGFP

	AO 50	AO 100	Acriflavine 250	Acriflavine 125
Day 1 T-0	1.93E+05	2.14E+05	2.28E+06	2.00E+06
Day 1 T-24	7.81E+04	4.63E+04	1.16E+06	1.13E+06
Day 2 T-48	6.98E+04	8.61E+05	4.26E+06	3.75E+06
Day 3 T-72	8.90E+03	6.29E+03	2.26E+04	3.33E+04



Gambar 5. Fluoresensi/absorbansi terhadap waktu pemaparan agen curing dari *E.coli* pRSET-emGFP

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada Tabel 3 dan Gambar 5, perlakuan menggunakan agen curing Acridine Orange pada konsentrasi 50 tidak mengalami fluoresensi pada 3 hari pengamatan. Berbeda dengan variasi konsentrasi AO 100 yang mengalami fluoresensi pada perlakuan day 2 pada waktu T0 yang dapat dilihat pada grafik. Namun tren ini menurun setelah day 2 T48 dan menjadi tidak. Berfluoresensi setelah day 3 dan di T0. Untuk menghitung %curing, kami menghitung nilai fluoresensi (T0-T24) / T0  $\times$  100% dari Day 1 sampai 3, dan dihitung rata-rata. Data yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai % curing dari perlakuan AO 50 sebesar 9.52%, AO 100 sebesar 44.2%, Acriflavine 250 sebesar 10.4%, dan Acriflavine 125 sebesar 0.836%. Nilai %curing dari paling besar sampai paling kecil berurut sebagai berikut: AO 100 > Acri 250 > AO 50 > Acri 125.

## V. KESIMPULAN

Laju kehilangan plasmid per generasi yang didapatkan dengan menggunakan pengukuran aktivitas reporter GFP pada model *E. coli* rekombinan yang diberi agen curing *Acridine Orange* adalah sebesar 9.52% untuk perlakuan AO 50 dan sebesar 44.2% untuk AO 100. Sedangkan laju kehilangan plasmid per generasi yang didapatkan menggunakan pengukuran aktivitas reporter GFP pada model *E. coli* rekombinan yang diberi agen curing *Acriflavine* adalah sebesar 10.4% untuk *Acriflavine* 250, dan sebesar 0.836% untuk *Acriflavine* 125. Perlakuan *Acridine Orange* lebih efektif daripada perlakuan *Acriflavine* terhadap plasmid curing *E. coli* rekombinan pRSET-EmGFP.

## DAFTAR PUSTAKA

Biologics International Corp. 2018. *IPTG Induction Theory*. <https://www.biologicscorp.com/blog/iptg-induction-protein-expression>: Diakses pada 12/05/2022 pk. 15:02 WIB

Brejč, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormö, M., & Remington, S. J. (1997). Structural basis for dual excitation and

photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2306–2311.

- Byvaltsev, Vadim A.; Bardonova, Liudmila A.; Onaka, Naomi R.; Polkin, Roman A.; Ochkal, Sergey V.; Shepelev, Valerij V.; Aliyev, Marat A.; Potapov, Alexander A. (2019). *Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy*. *Frontiers in Oncology*, 9(), 925–.
- Couturier, M. A. R. T. I. N. E., Bex, F., Bergquist, P. L., & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews*, 52(3), 375-395.
- Das, T., Chakraborty, B., & Ray, R. (2017). In-Vitro Study on Potential Efficacy of Acriflavine in the Prevention of Conjugal Transfer of Drug Resistance in Bacteria. *J. Evol. Med. Dent. Sci*, 6, 5540-5547
- Invitrogen. (2010). pRSET/CFP, pRSET/EmGFP, pRSET/BFP Vectors User Manual. Available from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/prsetfpvectors\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/prsetfpvectors_man.pdf)
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.
- MacWilliams MP, Liao MK. 2006. Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol. *American Society for Microbiology*. [www.asmscience.org](http://www.asmscience.org): Diakses pada 12/05/2022 pk. 0:02 WIB
- Mandelstam, J., & McQuillen, K. (1968). Biochemistry of bacterial growth. *Biochemistry of bacterial growth*. Parker N. 2012. *Microbiology*. Openstax: p.568-570
- Persinoti, G. F., Peres, N. T. A., Jacob, T. R., Rossi, A., Vencio, R. Z. dan Martinez-Rossi, N. M. 2014. RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* Transcriptome in Response to Sublethal Doses of Acriflavin. *BioMed Central*. 15(7).
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gongalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73 (5), 1121–1137.
- Trevors, J. T. (1986). Plasmid curing in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 1(3-4), 149-157.
- Villagra, Nicolás & Hidalgo, Alejandro & Santiviago, Carlos & Saavedra, Claudia & Mora-Longa, Guido. (2008). SmvA, and not AcrB, is the major efflux pump for acriflavine and related compounds in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 62. 1273-6. 10.1093/jac/dkn407.
- Yektaeian, N., Mehrabani, D., Sepaskhah, M., Zare, S., Jamhiri, I., Hatam, G. (2019). "Lipophilic tracer Dil and fluorescence labeling of acridine orange used for *Leishmania major* tracing in the fibroblast cells". *Heliyon*. 5 (12): e03073.