

SELEKSI KLON GEN PENISILIN G ASILASE DENGAN MENGUNAKAN BAKTERI *Serratia marcescens*

Muharni
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Telah dilakukan seleksi klon gen penisilin G asilase dari pustaka genom *Bacillus sp. BAC4* dengan menggunakan bakteri *Serratia marcescens*. Seleksi dilakukan dengan menggunakan teknik overlay, yaitu dengan menumbuhkan klon rekombinan pada media LB (Luria Broth) dan kultur *S. marcescens* yang mengandung penisilin G disebarakan diatas koloni yang sudah tumbuh. Adanya daerah hambatan pertumbuhan *S. marcescens* yang berwarna bening menunjukkan adanya klon gen penisilin G asilase. Hasil seleksi dari 2576 klon rekombinan yang diuji, ternyata ada satu koloni yang diduga mengandung gen penisilin G asilase.

PENDAHULUAN

Kebutuhan akan antibiotik dewasa ini semakin meningkat seiring dengan berkembangnya berbagai jenis penyakit akibat infeksi mikroba. Penggunaan antibiotik yang tidak rasional telah menimbulkan dampak yang cukup serius yaitu adanya gejala resistensi dari beberapa mikroorganisme tertentu terhadap antibiotik. Untuk mengatasi masalah resistensi ini perlu diusahakan mencari antibiotik baru yaitu dengan cara membuat antibiotik semisintetik. Antibiotik semisintetik ini tidak hanya memberikan sifat yang lebih baik dari antibiotik alami tetapi juga dapat mengatasi masalah resistensi mikroba terhadap antibiotik. Disamping itu antibiotik semisintetik umumnya lebih stabil, lebih mudah

diabsorpsi dan lebih sedikit efek sampingnya dibandingkan dengan antibiotik alami (Valle *et al.*, 1991).

Penisilin G asilase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolitik penisilin G dengan menghasilkan produk berupa asam 6 aminopenisilamat (6-APA) dan asam fenilasetat. Enzim ini menjadi sangat penting karena 6-APA yang dihasilkan dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan antibiotik semisintetik (Vandamme, 1984).

Pada saat ini penelitian yang berhubungan dengan penisilin G asilase terutama ditujukan untuk memperoleh kuantitas enzim yang sebanyak-banyaknya serta meningkatkan efisiensi katalitik enzim, dengan maksud untuk mengoptimalkan 6-APA yang dihasilkan.

Berbagai langkah yang ditempuh untuk maksud tersebut antara lain : (1) mencari dan mengembangkan mikroorganisme baru yang memiliki kemampuan memproduksi penisilin G asilase, (2) menseleksi strain mikroorganisme penghasil enzim penisilin G asilase yang tinggi, (3) mengembangkan metode induksi eksternal untuk merangsang produksi enzim yang optimal, (4) mengembangkan teknologi enzim untuk meningkatkan efisiensi katalitik dan (5) menerapkan teknik DNA rekombinan untuk menghasilkan strain unggul (Bartholomeus dan Wirahadikusumah, 1993).

Teknologi DNA rekombinan merupakan suatu teknik pembuatan rekombinan dari material yang dapat diturunkan (DNA) melalui penyisipan fragmen DNA tersebut ke dalam suatu vektor, dimana vektor tersebut kemudian dimasukkan ke dalam sel inang (host) agar dapat diekspresikan (Howe, 1995). Teknik DNA rekombinan merupakan suatu cara yang paling ampuh untuk mempelajari ekspresi genetik suatu gen. Dalam hal ini, hampir seluruh proses dapat dikendalikan khususnya diluar sel. Dengan mengklon gen, akan memungkinkan lebih mudah mengisolasinya, dengan demikian dapat memudahkan untuk mempelajari ekspresi genetiknya. Kumpulan klon rekombinan yang mengandung semua DNA yang terdapat pada suatu organisme tertentu disebut pustaka genom (Brown, 1997). Penerapan teknik DNA

rekombinan dalam hal ini diharapkan dapat menghasilkan strain bakteri penghasil penisilin G asilase dengan aktifitas yang tinggi.

Metode yang dapat digunakan untuk menseleksi bakteri penghasil penisilin G asilase secara kualitatif telah diperkenalkan oleh Meevotism *et al.* (1983). Metode ini menggunakan teknik *overlay*, didasarkan atas daya hambat 6-APA terhadap pertumbuhan bakteri *Serratia marcescens*. Koloni bakteri *S. marcescens* berwarna merah, jika 6-APA dihasilkan di dalam medium, maka 6-APA yang terbentuk ini akan menghambat pertumbuhan *S. marcescens*, sehingga akan didapatkan zona bening disekitar koloni.

METODOLOGI

Bahan yang digunakan

Pustaka genom *Bacillus* sp. BAC4 diperoleh melalui teknik DNA rekombinan dengan menggunakan DNA kromosom *Bacillus* sp. BAC4 yang disisipkan pada vektor kosmid pHCT9 dan dimasukkan ke dalam sel inang *Escherichia coli* DH5 α . Bakteri *Serratia marcescens* diperoleh dari Laboratorium Rekayasa Genetika PPAU Bioteknologi ITB. Medium yang digunakan adalah media LB (Luria Broth).

Seleksi koloni bakteri pembawa gen penisilin G asilase

Koloni bakteri yang akan diuji terlebih dahulu ditanam pada media LB padat yang mengandung 0,1% asam fenil asetat (PAA) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama semalam. Perbanyakkan *S. marcescens* dilakukan dengan menumbuhkan sel pada 50 ml media LB cair pada suhu ruang dan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Dari kultur cair ini diambil 400 µl lalu dicampurkan dengan 4 ml media LB lunak (0,75%) dan 20 mg penisilin G. Campuran ini kemudian dituang ke dalam media LB padat yang sudah ditumbuhi koloni yang akan diuji. Sebagai kontrol adalah kultur *S. marcescens* tanpa penambahan penisilin G. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama semalam. Disekitar koloni yang menghasilkan penisilin G asilase akan terbentuk zona bening karena pertumbuhan *S. marcescens* terhambat.

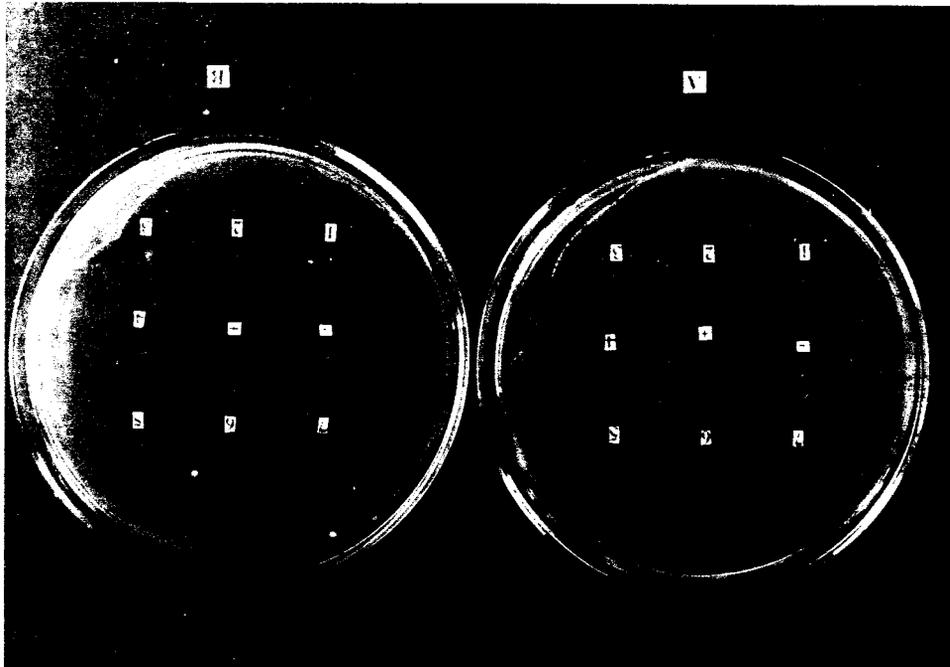
Uji aktivitas penisilin G asilase secara kimia

Koloni yang menunjukkan adanya zona bening akan dilanjutkan dengan uji secara kimia, yaitu dengan menumbuhkan koloni tersebut pada 50 ml media LB cair, suhu 30°C dan diinduksi dengan penambahan 0,2% asam fenil asetat pada

jam ke 8. Sel dipanen pada jam ke 20 melalui sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm, 4°C selama 20 menit. Pelet sel dicuci dengan bufer fosfat 0,01 M pH 7,0 dan disuspensikan dengan 1,5 ml bufer fosfat 0,01 M pH 7,0. Sel dilisis dengan menggunakan sonikator selama 15 menit (dalam es) dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, 4°C selama 10 menit. Sebanyak 100 µl supernatan diuji aktivitasnya dengan menggunakan metode Kornfeld (1978), metode ini didasarkan atas pembentukan basa shift antara 6-APA dengan paradimetilaminobenzaldehid (PDAB) dalam pereaksi Ehrlich.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi koloni penghasil penisilin G asilase dilakukan secara mikrobiologi dengan menggunakan bakteri *Serratia marcescens*. Bakteri ini resisten terhadap penisilin G tetapi sensitif dengan produk asam 6 amino penisilat (6-APA) yang dihasilkan. Apabila koloni yang ditanam tersebut menghasilkan enzim penisilin G asilase, maka enzim ini akan menghidrolisis penisilin G dan menghasilkan 6-APA. 6-APA yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. marcescens* sehingga akan membentuk zona bening disekitar koloni (Gambar 1).



Gambar 1. Seleksi koloni penghasil penisilin G asilase secara mikrobiologi dengan menggunakan kultur *S. marcescens*.
(A). Perlakuan dengan Penisilin G (B). Perlakuan tanpa penisilin G
(+) *E. coli* B130, (-) koloni kosmid normal, (1-7) koloni rekombinan

Sebanyak 2576 koloni yang diuji, ternyata ada 7 koloni yang memperlihatkan daerah hambatan yang tipis pada pertumbuhan *S. marcescens*. Dari 7 koloni ini dilakukan uji lanjutan dengan perlakuan kultur *S. marcescens* ditambah penisilin G dan kultur *S. marcescens* tanpa penambahan penisilin G. Ternyata dari 7 koloni tersebut hanya satu koloni yang menunjukkan daerah hambatan

yang tipis pada perlakuan kultur *S. marcescens* dengan penambahan penisilin G. Hal ini mungkin disebabkan jumlah sel *S. marcescens* yang dituang pada "plate" agar tidak sama, sehingga hanya satu koloni yang dapat menunjukkan adanya daerah hambatan pada pertumbuhan *S. marcescens*. Disamping itu mungkin juga disebabkan oleh penyebaran kultur *S. marcescens* pada "plate"

agar yang kurang merata. Pada perlakuan kultur *S. marcescens* tanpa penambahan penisilin G koloni ini juga memperlihatkan daerah hambatan yang sangat tipis pada pertumbuhan *S. marcescens*. Hal ini menunjukkan bahwa zona bening ini belum tentu disebabkan oleh adanya ekspresi gen penisilin asilase saja, tetapi mungkin disebabkan oleh adanya gen lain yang ekspresinya dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. marcescens*. Adanya ekspresi gen lain ini disebabkan oleh ukuran DNA sisipannya yang cukup besar yaitu 6,1 – 9,3 kb, kemungkinan pada DNA sisipan ini terdapat lebih dari satu gen. Sedangkan ukuran gen penisilin asilase dari *B. megaterium* adalah 2,4 kb (Martin *et al.*, 1995). Keadaan ini sama halnya dengan bakteri *Bacillus* sp. BAC4 itu sendiri yang dapat menghasilkan zona bening pada perlakuan kultur *S. marcescens* dengan penambahan penisilin G dan kultur *S. marcescens* tanpa penambahan penisilin G.

Berdasarkan uji aktivitas penisilin asilase dengan menggunakan metode Kornfeld (1978), terhadap 7 koloni tersebut di atas, ternyata tidak satupun koloni yang menunjukkan adanya aktivitas penisilin asilase. Hal ini mungkin karena jumlah enzim yang dihasilkannya sedikit sehingga tidak dapat terdeteksi. Sedikitnya jumlah enzim yang dihasilkan mungkin karena gen penisilin asilase dari *Bacillus* sp. strain BAC4 ini tidak terekspresi dengan baik pada inang *E. coli*. Meevootisom & Saunders (1987)

menyatakan bahwa ekspresi gen penisilin asilase dari *B. megaterium* pada sel inang *E. coli* jauh lebih rendah, yaitu 60 – 400 kali lebih rendah bila dibandingkan dengan ekspresinya pada sel inang *Bacillus subtilis*. Selain itu mungkin juga disebabkan oleh sekresi ke ruang periplasmik kurang lancar. Penisilin asilase yang disitoplasma umumnya belum mempunyai aktivitas enzimatik, enzim ini baru aktif setelah disekresi ke luar sitoplasma dan diproses melalui proteolisis. Pada bakteri Gram negatif, penisilin asilase disekresi ke ruang periplasmik, sedangkan pada bakteri Gram positif penisilin asilase di sekresi ke luar sel. Peptida sinyal penisilin asilase dari *Bacillus* sp. strain BAC4 kemungkinan tidak dapat dikenali dengan baik oleh sistem sekresi protein dari *E. coli*, sehingga hanya sedikit penisilin asilase yang dapat di sekresi ke ruang periplasmik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil seleksi secara mikrobiologi dengan menggunakan bakteri *Serratia marcescens*, sebanyak 2576 koloni yang diuji ternyata ada satu klon yang diduga mengandung gen penisilin G asilase.

DAFTAR PUSTAKA

- Bartholomeus, H dan Wirahadikusumah, M. 1993. *Produksi Penisilin G Asilase dari Transforman Escherichia coli*. Makalah Seminar Nasional Bioteknologi Industri. Bandung.
- Brown, T.A. 1997. *Gene Cloning an Introduction*. Third edition. Chapman & Hall. New York.
- Howe, C. 1995. *Gene Cloning and Manipulation*. Cambridge University Press. USA.
- Kornfeld, J.M. 1978. *A New Colorimetric Method for Determination of 6-Aminopenicillanic Acid*. Analytical Biochemistry. **86** : 118 - 126.
- Martin, L., Prieto, M.A., Cortes, E. and Garcia, J.L. 1995. *Cloning and Sequencing of the pac Gene Encoding the Penicillin G Acylase of Bacillus megaterium ATCC 14945*. FEMS Microbiology Letters. **125** : 287 - 292.
- Meevootisom, V., Somsuk, K., Prachaktam, R. and Flegel, T.W. 1983. *Simple Screening Method for Isolation of Penicillin Acylase Producing Bacteria*. Applied and Environmental Microbiology. **46** : 1227 - 1229.
- Meevootisom, V. and Saunders, J.R. 1987. *Cloning and Expression of Penicillin Acylase Genes from Overproducing Strains of Escherichia coli and Bacillus megaterium*. Applied Microbiology and Biotechnology. **25** : 372 - 378.
- Valle, F., Balbas, P., Merino, E., and Bolivar, F. 1991. *The Role of Penicillin Amidases in Nature and in Industry*. TIBS. **16** : 36 - 40.
- Vandamme, E.J. 1984. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. 1st edition. Marcel Dekker Inc. USA.