

ISOLASI SEKRETED AMYLASE DARI STREPTOMYCES LIVIDANS YANG DITUMBUHKAN PADA MEDIA MINIM PROTEIN

Setiawaty Yusuf dan Mardiyanto
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi sekreted amylase dari Streptomyces lividans yang ditumbuhkan dalam media yang minim protein. Pola fragmentasi protein sekreted amylase hasil fraksinasi 50% ammonium sulfat diuji dengan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) sedangkan pemisahan serta deteksi sekreted amylase dilakukan dengan metode antibody trapped. Sekreted amylase dengan konsentrasi 50 ng/ml terdeteksi oleh antibody sedangkan konsentrasi 120 ng/ml memperlihatkan noda yang optimal.

1. PENDAHULUAN

Perkembangan penggunaan enzim pendegradasi saat ini ditunjang oleh kemajuan ilmu Biologi Molekuler. Perusahaan (produsen) penghasil material organik sederhana (monomer) sudah tidak mau lagi menempuh cara sintesis karena prosedurnya rumit dan tidak sehat bagi karyawan ataupun lingkungan dimana pabrik itu berada. Dengan memahami prinsip bahwa material organik sederhana bisa dihasilkan dari degradasi polimer alam maka cara mikrobiologi lebih menguntungkan untuk memproduksi

monomer. Pemecahan polimer oleh mikroba ternyata dilakukan oleh enzim pendegradasi salah satunya *sekreted amylase* yang dihasilkan Streptomyces : mendegradasi polisakarida jadi simple sakarida (Gottschalk, G, 1986 dan Pierpersberg, 1994)

Perusahaan yang memproduksi tepung sekaligus bisa memproduksi monosakarida berupa sirup glukosa dan fruktosa dari limbah selulosa dan amylosa merasa terbantu akibat perkembangan pemakaian enzim *sekreted amylase*. Selain mengatasi masalah limbah ternyata sirup glukosa dan fruktosa saat ini menjadi produk andalan bagi perusahaan mereka. Selama ini perusahaan makanan

masih mengimpor sirup glukosa dan fruktosa sebagai bahan tambahan makanan, walaupun ada perusahaan pembantu yang memproduksi sirup glukosa dan fruktosa ternyata tidak bisa berbuat banyak karena tingkat produksinya yang rendah. Di Indonesia enzim pendegradasi selama ini masih diupayakan dari *Bacillus*, untuk mengatasi penyuplaian sirup glukosa dan fruktosa maka sudah saatnya dicari alternatif penghasil enzim degradase tersebut seperti dari *Streptomyces*. Dari segi kemampuan produksi jelas *Streptomyces* lebih unggul karena secara fisiologi produksi *sekreted amylase* dari *Streptomyces* lebih banyak (Hopwood, D.A., 1985)

Induksi dan produksi *sekreted amylase* dari *Streptomyces* dengan mudah dapat dilakukan tetapi pemisahan enzim ini dari protein pengotor lainnya adalah pekerjaan yang sulit. Selama ini pemisahan enzim dilakukan dengan teknologi yang dikembangkan dari aplikasi kromatografi afinitas dan presipitasi garam. Metoda ini sering dipadu dengan teknologi canggih seperti menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi sistem digital yang dikondisikan untuk reaksi enzimatik yang mengontrol dengan ketat suhu dan

kelembaban udara. Tetapi kecanggihannya metode ini tidak sepenuhnya menjamin kebenaran dalam menarik kesimpulan akhir tentang aktivitas enzim karena SDS-PAGE tidak bisa mendeteksi kalau enzim itu disusun oleh sub-sub unit tertentu, hanya antibodi yang bisa mengenali enzim dengan utuh tanpa terpotong. Selain itu perusahaan dan penelitian yang tidak menyediakan dana besar bisa memproduksi enzim ini. Akibat metode interaksi enzim dengan antibodi ini memang tidak memerlukan biaya banyak (Sambrook, J., 1989 dan Starr, P.M., 1981)

Metode pengidentifikasian dan pemisahan berdasarkan reaksi enzim dengan antibodi yang dikembangkan ini tidak hanya digunakan untuk *Streptomyces*, tetapi bisa juga dijadikan model untuk pelacakan enzim *sekreted amylase* yang diproduksi oleh bakteri selain *Streptomyces*.

II, METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Natrium klorida, glukosa, sukrosa, magnesium klorida, natrium fosfat, natrium hidrogen fosfat, polietilen glikol, kalsium klorida, kalium klorida, larutan "trace element", asam klorida, asam sulfat, xilen

xilenol, 2-merkaptotanol, etilen diamin tetraasetat (EDTA), natrium hidroksida, natrium dodesil sulfat ("sodium dodecyl sulphate", SDS), "Commase brilliant blue G250", asam asetat glasial, metanol, amonium asetat, etanol, isopropanol, dimetilsulfoksida, natrium asetat, kalium asetat, fenol, kloroform, isoamil alkohol, aseton, etil asetat, heksan, butanol, asetonitril, trishidroksimetil aminometan (Tris), ammonium persulfat (Merck), ekstrak ragi, ekstrak malt, bakto agar (Difco), tiostrepton, (Boehringer), marka protein, lisozim, dan proteinase (Amersam).

Mikroba yang digunakan adalah *Streptomyces lividans* dan *Streptomyces lividans* TK-21 pemberian Dr. D.A., Hopwood di "Departement Genetic of John Innes Centre.

2.2 Penyiapan Suspensi Spora *Streptomyces Lividans*

Koloni tunggal dari *S. lividans* dan *S. lividans* TK-21 ditumbuhkan dalam media YEME padat (minus pepton) dengan penambahan tiostrepton dan diinkubasi pada suhu 30°C sampai tumbuh spora berwarna putih. Spora yang terbentuk ini selanjutnya diambil dengan jarum ose steril dengan

kondisi pekerjaan yang aseptik kemudian disuspensikan pada larutan steril dapar fosfat natrium klorida PBS ("Phosphate Buffer Saline") mengandung gliserol 20% (v/v) serta tiostrepton 50 µg/ml sebagai antibiotik marka. Suspensi spora ini dimasukkan ke dalam botol kedap udara yang steril menggunakan pipet mikro dengan tip steril kemudian tabung dibungkus dengan *aluminium foil* untuk mencegah oksidasi oleh cahaya selama penyimpanan. Suspensi spora disimpan pada suhu -70°C.

2.3 Pemurnian Koloni dan Kurva Pertumbuhan^(3,10,11)

S. lividans dan *S. lividans* TK-21 ditumbuhkan pada media pertumbuhan YEME (minus pepton). Antibiotik marka yaitu tiostrepton 50 µg/ml untuk *S. lividans* rekombinan ditambahkan ke dalam media pertumbuhan adalah untuk proses seleksi. Koloni yang tumbuh dimurnikan lebih lanjut sampai didapat koloni tunggal dan seterusnya bisa diperbanyak untuk produksi *sekreted amylase*. Terhadap koloni tunggal dilakukan juga pengamatan profil pertumbuhannya dalam media cair setiap 3 jam selama 75 jam pengamatan dan profil pertumbuhan *S. lividans* berupa kurva dapat dilihat pada

Lampiran B, Gambar 4.1. Foto koloni hasil penggoresan pada media pertumbuhan padat dapat dilihat pada Lampiran B, Gambar 4.2.

2.4 Panen Enzim *Sekreted Amylase* dari Media Pertumbuhan

Pada media cair YEME (minus pepton) + tiostrepton pada jam ke 25 sampai jam ke 35 disentrifuga dingin 5000 rpm 10 menit hingga bebas dari miselium. Supernatan disimpan dalam *box ice* suhu 4°C untuk selanjutnya dilakukan presipitasi dengan amonium sulfat konsentrasi 45 sampai 65% tetap pada suhu dingin. Fraksi endapan protein total pada masing-masing tabung presipitasi dikumpulkan untuk dimasukkan dalam kantong dialisa dingin dalam buffer protein selama waktu satu malam. Hasil dialisa dikeringbekukan dengan *freeze dryer* dan hasil kering beku ini diuji pola fragmentasi proteinya dengan *SDS-PAGE* serta diuji juga aktivitas degradasi dari enzim *sekreted amylase* terhadap suspensi amylum dalam tahap penyeleksian tabung nomor berapa (merupakan hasil dari proses presipitasi) yang paling potensial menghasilkan enzim degradasi *sekreted amylase*.

2.5 Produksi Antibodi Poliklonal *Sekreted Amylase*⁽¹⁰⁾

Dipersiapkan fraksi protein dan material kontrol untuk ikut disuntikkan pada tikus disamping yang utama yaitu enzim *sekreted amylase*. Penyuntikan diulangi setiap 5 hari sekali sampai satu bulan. Bulan berikutnya darah tikus diambil dari pembuluh vena otot paha. Darah dimasukkan dalam tabung sentrifuga yang sudah berisi buffer darah untuk segera disentrifuga dingin 5000 rpm selama 10 menit hingga diperoleh serum pada lapisan supernatan. Serum ini mengandung antibodi yang disekleksi menggunakan metode *dot blot* dengan enzim hasil presipitasi pada tabung yang menunjukkan aktivitas terbesar akan daya degradasi amylumnya. Antibodi yang cocok di simpan dalam tabung eppendorf kedap dan dibungkus aluminium foil pada suhu -20°C.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum proses perbanyak koloni hal pertama yang dilakukan adalah memurnikan koloni yang membawa plasmid pIJ 702 tersebut sebagai karakter dari *Streptomyces* yang diteliti, karena kemurnian dari koloni ini menjamin lancarnya pekerjaan selanjutnya. Koloni *S. lividans* memperlihatkan kurva pertumbuhan dimana jam ke 16 adalah saat dimulainya fase

logaritmik dan fase ini berakhir untuk masuk fase stasioner pada jam ke 36.

S. lividans yang membawa plasmid pIJ 702 mulai bermunculan setelah 3 hari inkubasi dan untuk pembentukan spora dibutuhkan waktu 5 sampai 7 hari. Disekitar koloni *S. lividans* yang tumbuh pada media YEME-tiostrepton padat bisa dijumpai pigmen melanin yang berwarna coklat tua. Sel yang telah menjadi spora ini mengindikasikan fase dimana pertumbuhan jadi lambat dengan arti kata sel hanya melakukan minimal metabolisme untuk penghematan cadangan energi yang dimiliki.

Panen enzim *sekreted amylase* dilakukan pada masa pertengahan dan akhir logaritmik (jam ke 25 dan 35) karena pada masa itu terjadi produksi enzim sebagai metabolit primer dalam jumlah yang banyak. Media cair dipisahkan dari sel dengan cara sentrifugasi 5000 rpm 15 menit. Terhadap media cair dilakukan presipitasi enzim menggunakan ammonium sulfat pada konsentrasi 45, 50, 55, 60, dan 65 %. Setelah diuji aktivitas degradasinya ternyata fraksi yang terendapkan pada konsentrasi 50% memiliki aktivitas yang terbesar maka dialisa dan *freeze drying* terpusatkan pada fraksi itu. Pengamatan atas proses dialisa ternyata

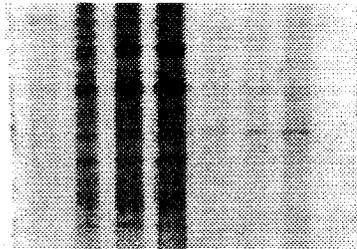
dalam waktu 24 jam dialisa plus strirer-agitasi menunjukkan kemurnian enzim yang tinggi (terlihat pada Tabel.1) yang diukur dengan alat spektronik uv-vis panjang gelombang 280 dan 260 nm.

Tabel.1 : Hasil Dialisa *Sekreted amylase*.

No.	Asal Tabung	Konsentrasi
1.	Media tanpa koloni	1,3 mg/ml
2	Lisis SDS 0,5 %	5,8 mg/ml
3	Lisis parsial	12,1 mg.ml
4	Lisis komplit	30,0 mg.ml
5	Media dan sel (sonikasi)	32,0 mg.ml

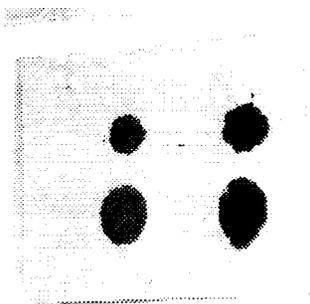
Keterangan : n = 3

Hasil fragmentasi protein dengan proses denaturasi dan dielektroforesis memperlihatkan hasil bahwa ada 7 pita tebal yang belum diketahui pasti apakah itu bagian dari enzim yang dicari karena masih perlu lagi kerja lanjutan yang canggih yaitu sequencing protein untuk penelitian lanjutan dari yang didapat ini. Pita-pita itu hanya bisa dibandingkan dengan pita protein standar seperti yang terlihat pada Gambar.1. Terlihat bahwa protein yang diperoleh dari campuran lisis sel dan protein media agak kotor (tidak sempurna terdialisa) sehingga mengganggu visualisasi pita lain. Tapi pada prinsipnya semua pita itu sama dengan pola 7 pita yang jelas.



Gambar. 1: Pola Fragmentasi dengan SDS-PAGE

Hasil Dot Blot melihat konsentrasi rendah (50 ng/ml) dari tabung mengandung hasil dialisa protein sekreted amylase bisa dideteksi oleh antibodi yang khas untuk mengenali sekreted amylase dan noda optimal diberikan oleh konsentrasi 120 ng/ml seperti yang terlihat pada Gambar.2 dibawah ini. Terlihat noda yang jelas itu diberikan oleh konsentrasi yang terbesar dibandingkan dengan noda terkecil samping kiri paling atas.



Gambar.2 : Hasil dot blot sekreted amylase.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan :

1. Fraksi protein yang mengendap dengan 50% ammonium sulfat memberikan aktivitas amylase yang besar dibandingkan fraksi lainnya.
2. Sekreted amylase dengan konsentrasi 50 ng.ml sudah terdeteksi oleh antibodi spesifik untuk mengenali amylase, sedangkan konsentrasi optimal yang dikenali oleh antibodi yaitu 120 ng/ml.

Saran :

Perlu diisolasi jenis protein dari masing-masing pita fragmen protein hasil SDS-PAGE dan diinteraksikan dengan antibodi sehingga didapat ukuran protein yang pasti berinteraksi dengan antibodi. Setelah itu protein itu disequencing untuk mengetahui urutan asam amino yang menyusun protein tersebut

DAFTAR PUSTAKA

- Binnie, C., Warren, M., and Butler, M.J., Cloning and Heterologous Expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* Genes Involved in Oxytetracycline Biosynthesis, *J. Bacteriol.*, 171(2), 1988, 887-895.

- Butler, M.J., Friend, E.J., Hunter, I.S., Hunter, F.S., Sugden, D.A., and Warren, M., Molecular Cloning of Resistance Genes and Architecture of a Linked Gene Cluster Involved in Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*, **Mol. Gen. Genet.**, 215, 1989, 231-238.
- Demain, A.L. and Nadine, A.S., **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1986, 108-207.
- Gottschalk, G., **Bacterial Metabolism**, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 1986, 15-18, 254-255.
- Gusek, T.W. and Kinsella, J.E., Review of *Streptomyces lividans* Vector pLJ 702 System for Gene Cloning, **Critical Reviews in Microbiol.**, 18(4), 1992, 247-260.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chatter, K.F., Keisser, T., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrempf, H., **Genetic Manipulation of Streptomyces : A Laboratory Manual**, The John Innes Foundation, Norwich, 1985, 12-52.
- Lengeler, J.W., Gerhart, D., and Hans, G.S., **Biology of the Prokaryotes**, Blackwell Science, Thieme, Stuttgart, New York, 1999, 593-597.
- Pierpersberg, W., Pathway Engineering in Secondary Metabolite-Producing Actinomycetes, **Biotech. Rev.**, 14(3), 1994, 251-285.
- Purwantini, E., Gillis, T. P., and Daniels, L., Presence of F₄₂₀-dependent Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from Mycobacterium and Nocardia species but Absence from Streptomyces and Corynebacterium Species and Methanogenic Archae, **FEMS Microbiol. Lett.**, 146, 1997, 129-134.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., **Molecular Cloning : A Laboratory Manual**, Cold Spring, New York, 1989, 231-253, 589-606.
- Starr, P.M., Heinsz, S, Hans, G.T., Albert, B., and Hans, G.S., **The Prokaryotes : A Handbook on Habitas, Isolation, and Identification of Bacteria**, Springer-Verlag, Berlin, 1981, 2028-2048.