

# KLON GEN PENISILIN ASILASE PADA COSMID pHC79

Linar Z. Udin\* dan Hadi Sutedjo\*\*

\* Puslitbang Kimia Terapan LIPI, Jalan Sangkuriang, Bandung

\*\* Jurusan Kimia-ITB, Jalan Ganesha 10, Bandung

## ABSTRAK

Penisilin asilase berperan mengkatalisis reaksi hidrolisa benzilpenisilin menghasilkan senyawa asam 6-aminopenisilanat (6-APA), suatu senyawa yang merupakan bahan dasar pada pembuatan turunan penisilin.

Telah dilakukan klon gen penisilin asilase dari DNA kromosom *Escherichia coli* B130 pada vektor *cosmid* pHC79 untuk meningkatkan aktifitas enzim tersebut. Klon dilakukan melalui beberapa tahap, yakni isolasi DNA kromosom, pemotongan molekul DNA dengan enzim restriksi, penyambungan molekul DNA dengan enzim T4-DNA ligase, transformasi hasil ligasi, dan seleksi sel transforman. Pengujian terhadap sel transforman pembawa gen penisilin asilase dilakukan secara uji mikrobiologi menggunakan *Serratia marcescens* sebagai bakteri pengujian, sedangkan aktifitas penisilin asilase ditentukan berdasarkan metoda Kornfeld.

Hasil pengujian menggunakan *S. marcescens* menunjukkan bahwa di antara 2070 koloni yang ada, hanya 4 koloni yang mengekspresikan adanya penisilin asilase. Ke empat koloni ini ternyata mempunyai aktifitas enzim 4 - 6 kali lebih tinggi dari aktifitas penisilin asilase yang berasal dari *E. coli* B130.

## ABSTRACT

Penicillin acylase plays an important role in the catalysis of benzylpenicillin hydrolytic reaction, producing 6-aminopenicilanic acid (6-APA), a precursor for the formation of penicillin derivatives.

Cloning of the penicillin acylase gene of *Escherichia coli* B130 chromosomal DNA on pHC79 *cosmid* vector to increase the enzyme activity has been investigated. The cloning was conducted with several steps, including isolation of the chromosomal DNA, digestion by restriction enzyme, ligation by T4-DNA ligase, transformation of the recombinant DNA, and

selection of the transformants. Microbial assay utilizing *Serratia marcescens* was carried out for screening the penicillin acylase colony, whereas the determination of the enzyme activity was examined based on Kornfeld method.

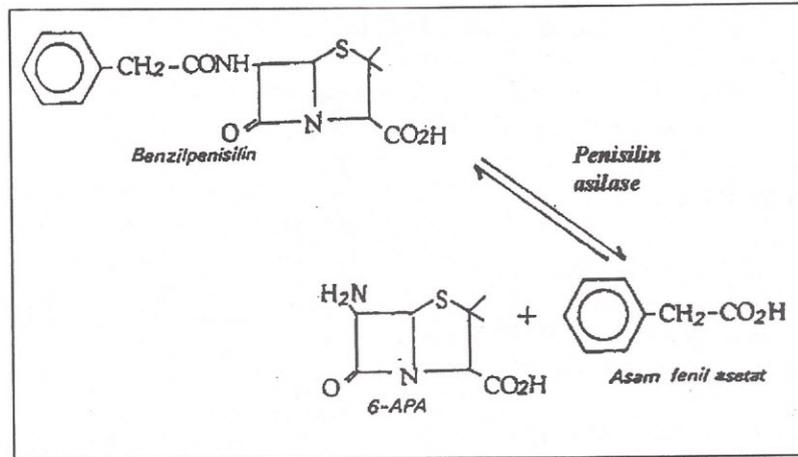
From 2070 colonies screened by *S. marcescens*, only 4 positive colonies were obtained. The enzyme activity of these colonies was 4-6 fold higher than the penicillin acylase activity from *E. coli* B130.

## PENDAHULUAN

Penisilin asilase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisa benzilpenisilin dengan menghasilkan produk berupa asam 6-aminopenisilanat (6-APA) (Gamabr 1). Enzim ini menjadi sangat penting karena 6-APA yang dihasilkan digunakan sebagai prekursor (bahan dasar) untuk pembuatan antibiotik semisintetik turunan penisilin (1, 2, 3). Hingga saat ini penelitian yang berhubungan dengan penisilin asilase ditujukan untuk memperoleh kuantitas enzim yang sebanyak-banyaknya serta meningkatkan efisiensi katalitik enzim dengan maksud untuk mengoptimalkan pembentukan 6-APA.

Berbagai metoda telah dikembangkan untuk maksud tersebut di atas (4, 5). Salah satu metoda yang sekarang ini banyak dikembangkan adalah teknik pembuatan DNA rekombinan (6, 7). Motivasi dalam mengembangkan teknik DNA rekombinan ini di antaranya adalah (a) perpindahan materi genetik dapat diikuti dengan seksama secara terkontrol; (b) memungkinkan dilakukannya pemindahan sifat secara selektif; (c) khusus dengan penggunaan vektor, gen dapat diamplifikasi dan produk yang dihasilkan diharapkan akan dapat meningkat (8).

Penelitian-penelitian terdahulu yang berhubungan dengan teknik DNA rekombinan, pada umumnya menggunakan sumber gen dari DNA kromosom *E. coli*, disisipkan pada vektor *plasmid* (9, 10, 11).



Gambar 1. Hidrolisa benzil penisilin oleh penisilin asilase menghasilkan 6-APA.

Pada penelitian ini dilakukan kloning gen penisilin asilase dari DNA kromosom *E. coli* B130, disisipkan pada vektor *cosmid*. Penggunaan vektor *cosmid* dalam proses kloning adalah sangat menguntungkan karena ke dalam *cosmid* dapat disisipkan molekul DNA asing dengan ukuran yang relatif panjang. Sehingga dalam klon rekombinan yang mengandung fragmen insersi yang panjang ini diharapkan bahwa semua bagian-bagian penting dalam suatu gen dapat diperoleh secara lengkap dan utuh. Dengan demikian sel transforman yang

membawa DNA rekombinan akan dapat mengekspresikan adanya penisilin asilase.

## BAHAN DAN METODA

### Mikroorganisme dan *cosmid*.

Mikroorganisme dan *cosmid* yang digunakan dalam percobaan terlihat pada Tabel 1.

### Medium.

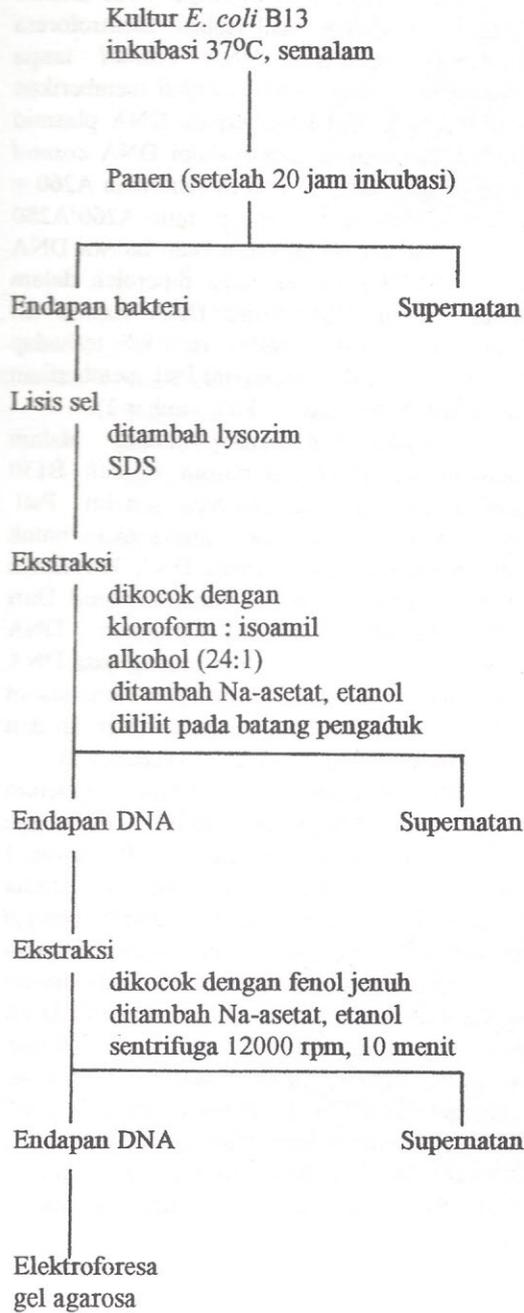
Medium peliharaan *E. coli* dan sel transforman terdiri dari (g/l) : bacto pepton 10, yeast extract 5, NaCl 5, bacto agar 18. Setelah sterilisasi, ke dalam medium ditambahkan tetrasiklin dengan konsentrasi akhir 10 ug/ml. Medium pertumbuhan untuk membiakkan sel transforman dibuat berdasarkan formula medium P (12). Sedang medium pertumbuhan untuk *S. marcescens* adalah sebagai berikut (g/l) : bacto pepton 5, yeast extract 2, buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,5.

Tabel 1. Mikroorganisme dan *cosmid* yang digunakan.

Strain dan <i>cosmid</i>	Sifat/	Pustaka Penggunaan
<i>Escherichia coli</i> B130	Sumber gen penisilin asilase	(4, 9, 10)
<i>Escherichia coli</i> HB101	Sel inang DNA rekombinan	(16)
<i>Serratia marcescens</i>	Bakteri pengujian pada seleksi sel transforman pembawa penisilin asilase	(14)
pHC79	Ampisilin resistan Tetrasiklin resistan DNA vektor	(16)

**Isolasi DNA kromosom.**

Gen penisilin asilase diisolasi dari DNA kromosom *E. coli* B130 dengan cara seperti pada Bagan 1 (13).



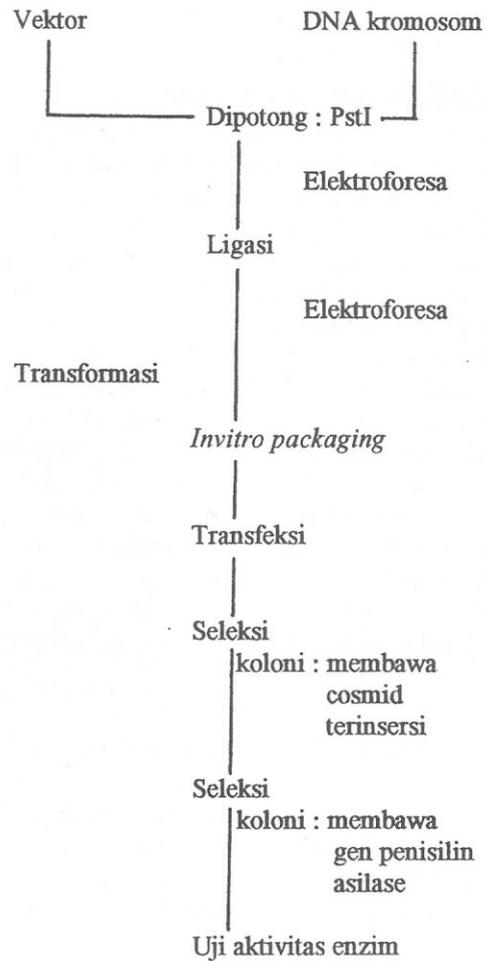
Bagan 1. Isolasi DNA kromosom.

Sebelum dilakukan ligasi, terlebih dahulu dilakukan defosforilasi pada DNA *cosmid* yang sudah dipotong oleh enzim restriksi PstI, dengan bantuan enzim BAP. Terhadap DNA kromosom, DNA *cosmid* hasil pemotongan oleh PstI dan DNA hasil ligasi, dilakukan uji elektroforesa. Sebagai pembanding digunakan DNA  $\lambda$  yang sudah dipotong oleh HindIII.

**Klon dengan cosmid.**

Tahap pengerjaan pada pembuatan DNA rekombinan dilakukan seperti pada Bagan 2 (13).

**Kloning dengan cosmid**



Bagan 2. Kloning dengan vektor *cosmid*.

## Transformasi.

Transformasi hasil ligasi ke dalam sel inang dilakukan secara transfeksi setelah melalui *in vitro packaging*.

### Seleksi sel transforman.

(a). Seleksi sel transforman pembawa *cosmid* terinsersi : sel transforman ditanam dalam medium yang mengandung tetrasiklin. Sebagai pembandingan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif. Untuk membedakan sel transforman, dilakukan penanaman ulang dalam medium yang mengandung tetrasiklin dan medium yang mengandung ampisilin.

(b). Seleksi sel transforman penghasil penisilin asilase : dilakukan dengan cara *shot-gun*, yaitu melalui pengujian mikrobiologis berdasarkan metoda Meevotisol (14).

### Uji aktifitas penisilin asilase.

Bakteri dibiakkan dalam medium P selama 20 jam. Setelah 8 jam inkubasi, ke dalam medium ditambahkan induser. Sel dipanen melalui sentrifugasi dan dipecah dengan sonikator. Uji aktifitas enzim dilakukan berdasarkan metoda Kornfeld (15). Sistem larutan yang terdiri dari 0,2% benzilpenisilin, buffer fosfat 0,01M pH 7,0 dan larutan enzim kasar, diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Setelah penambahan reagen Erlich, serapan larutan diukur pada 538 nm. Konsentrasi 6-APA dihitung berdasarkan kurva standar 6-APA. Kadar protein ditentukan berdasarkan metoda Lowry. Aktifitas enzim dinyatakan sebagai banyaknya 6-APA yang dihasilkan dari substrat pada kondisi reaksi 37°C, pH 7,0 selama 30 menit.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

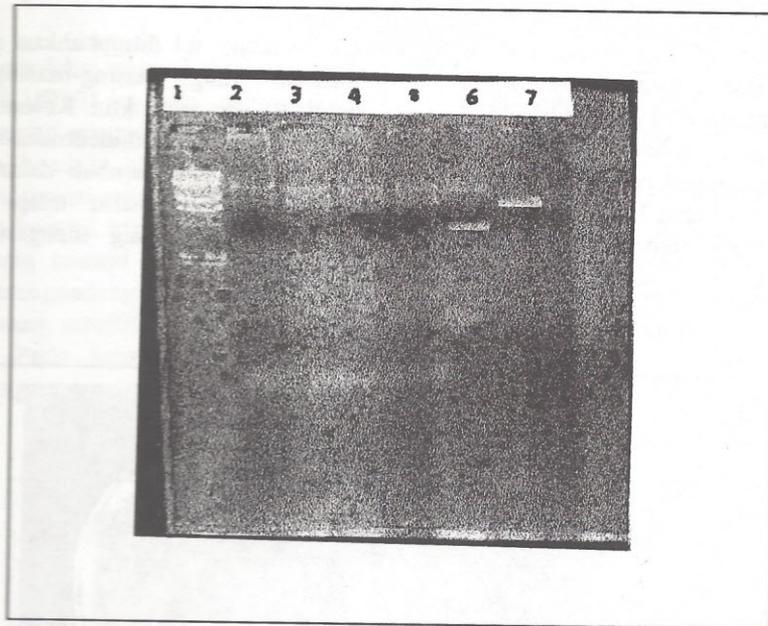
Analisa larutan DNA kromosom *E. coli* B130 hasil isolasi secara elektroforesa gel agarose menunjukkan adanya suatu pita tebal pada posisi relatif dekat dengan tempat pemuatan

sampel (Gambar 2). Setelah pengenceran 50 kali larutan DNA kromosom mempunyai  $A_{260} = 0,050$  dan  $A_{280} = 0,027$ . Hasil ini memberikan ratio  $A_{260}/A_{280} = 1,85$  dan konsentrasi DNA sebesar 130 ug/ml. Hal ini menunjukkan bahwa larutan DNA yang diperoleh adalah cukup murni.

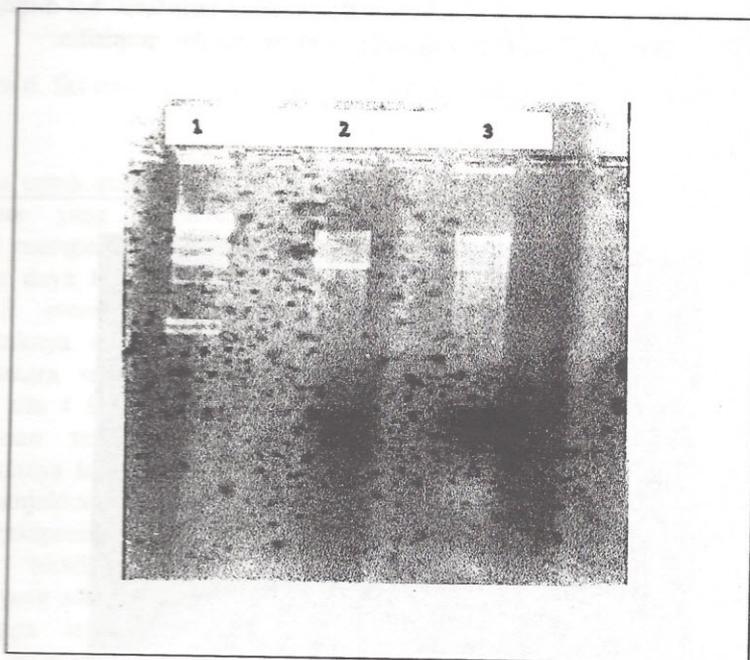
Hal serupa juga dijumpai pada analisa larutan DNA *cosmid* hasil isolasi. Elektroforesa gel agarose terhadap DNA *cosmid* tanpa pemotongan dengan enzim restriksi memberikan 2 pita DNA dengan karakteristik DNA plasmid (Gambar 2). Analisa spektroskopi DNA *cosmid* setelah pengenceran 50 kali memberikan  $A_{260} = 0,1$  dan  $A_{280} = 0,052$ , dengan ratio  $A_{260}/A_{280} = 1,92$ . Keadaan ini menunjukkan bahwa DNA *cosmid* pHc79 yang ada juga diperoleh dalam keadaan murni. Konsentrasi DNA *cosmid* ini adalah 250 ug/ml. Analisa restriksi terhadap DNA *cosmid* ini dengan enzim PstI memberikan 1 pita DNA berukuran 6,0 kb (Gambar 2).

Untuk keperluan kloning dalam penelitian ini, DNA kromosom *E. coli* B130 dipotong secara parsial oleh enzim PstI. Pemotongan secara parsial dimaksudkan untuk memperoleh fragmen-fragmen DNA kromosom yang sesuai untuk kloning ke dalam *cosmid*. Dari hasil interpolasi migrasi fragmen DNA kromosom terhadap logaritma pasang basa DNA lambda terlihat bahwa fragmen DNA kromosom hasil pemotongan berukuran antara 7-16 kb dan berukuran lebih besar dari 23 kb (Gambar 2).

Defosforilasi yang dilakukan sebelum proses ligasi ditujukan untuk mencegah terjadinya ligasi intramolekul (*self ligation*) terutama antara DNA *cosmid*. Hal ini karena fragmen hasil pemotongan dengan enzim restriksi akan mempunyai ujung-ujung 5'P dan 3'OH yang akan membentuk kembali ikatan fosfodiester antara potongan-potongan DNA *cosmid* dengan adanya enzim ligase. Ikatan fosfodiester tersebut akan menurunkan efisiensi ligasi antara DNA kromosom dengan DNA *cosmid*. Setelah defosforilasi, kedua ujung potongan DNA *cosmid* mengandung gugus-gugus OH, maka tidak terjadi ligasi di antara *cosmid*.



Gambar 2. hasil elektroforesa gel agarose dari DNA kromosom, DNA *cosmid*, dan fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim PstI. (1) Pita-pita DNA  $\lambda$ , berukuran 2,3; 9,4; 6,5; 4,3 2,3 dan 2,0 kb. (2) DNA kromosom yang belum dipotong. (3) DNA kromosom yang dipotong oleh PstI dengan waktu pemotongan 15 menit. (4) DNA kromosom hasil pemotongan oleh PstI setelah 30 menit. (5) DNA kromosom hasil pemotongan oleh PstI setelah 40 menit. (6) *Cosmid* yang belum dipotong. (7) *Cosmid* hasil pemotongan oleh PstI.

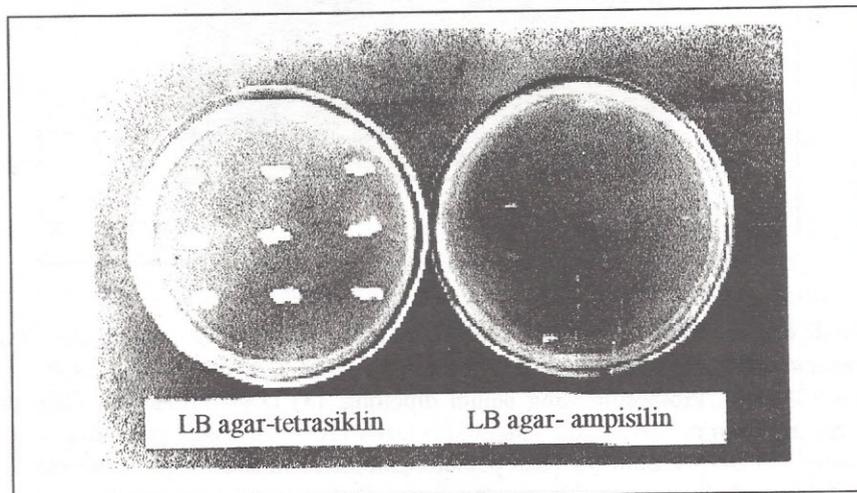


Gambar 3. Hasil uji elektroforesa gel agarose setelah ligasi antara DNA *cosmid* dengan DNA kromosom. (1) Pita-pita DNA  $\lambda$ , (2) DNA *cosmid* sebelum diligasi, (3) Hasil ligasi DNA *cosmid*-DNA kromosom.

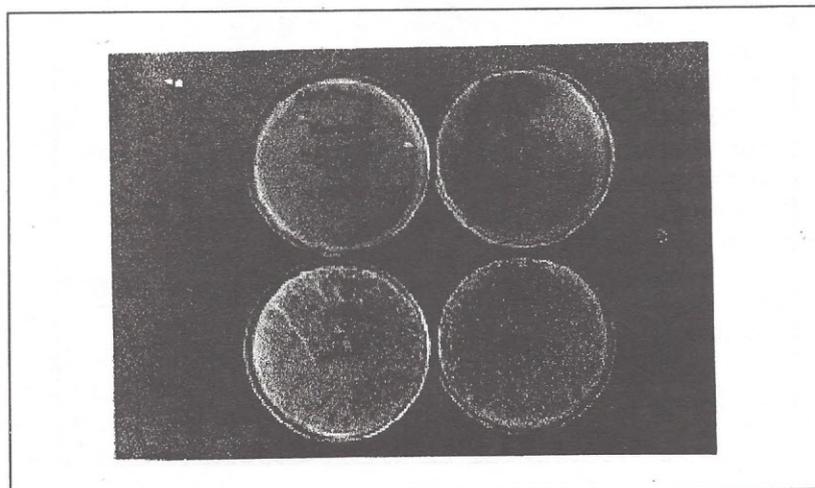
Dari hasil ligasi seperti yang terlihat pada Gambar 3, diketahui bahwa proses ligasi yang terjadi relatif sempurna. Hal ini terlihat dari pita hasil elektroforesis yang hanya memberikan 1 pita DNA didekat tempat pemuatan sampel dengan ukuran lebih besar dari 23 kb.

Untuk mengetahui suatu sel transforman membawa DNA *cosmid* terinsersi (DNA

rekombinan), sel ditumbuhkan dalam 2 macam medium yang masing-masing mengandung ampisilin dan tetrasiklin. Koloni yang membawa DNA rekombinan diidentifikasi sebagai koloni yang tidak dapat tumbuh dalam medium yang mengandung ampisilin tetapi dapat tumbuh dalam medium yang mengandung tetrasiklin (Gambar 4).



Gambar 4. Hasil seleksi sel transforman yang membawa DNA *cosmid* terinsersi. Sel ditumbuhkan dalam 2 macam medium LB masing-masing mengandung tetrasiklin dan ampisilin.

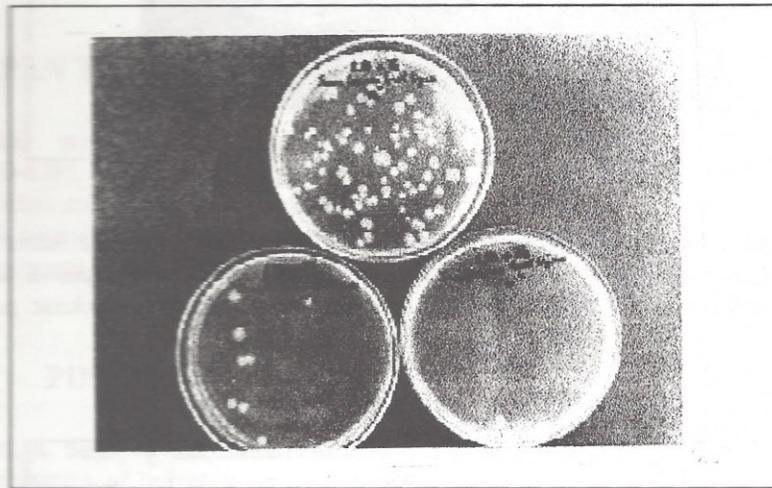


Gambar 5. Kontrol negatif dan positif dari sel transforman yang ditanam dalam medium LB. (A) kontrol negatif : sel transforman ditumbuhkan dalam medium LB yang mengandung ampisilin, (B) kontrol positif : sel transforman ditumbuhkan dalam medium LB yang mengandung tetrasiklin .

Hasil transfeksi *cosmid* terinsersi pada sel inang *E. coli* HB101 ini juga menunjukkan bahwa kontrol positif maupun kontrol negatifnya memperlihatkan keadaan yang sesuai dengan yang diharapkan, seperti yang diperlihatkan pada Gambar 5. Pada kontrol negatif, sel inang yang tidak mengandung *cosmid* tidak tumbuh pada medium yang mengandung tetrasiklin maupun ampisilin. Sel inang sensitif terhadap tetrasiklin dan ampisilin. Pada kontrol positif, terlihat bahwa sel inang yang mengandung *cosmid*

pHC79 dapat tumbuh baik pada medium yang mengandung baik tetrasiklin maupun ampisilin. Keadaan ini disebabkan sel inang dengan adanya *cosmid* menjadi tahan terhadap kedua antibiotik tersebut.

Jumlah koloni transforman yang ada pada pengenceran suspensi koloni  $10^0$ - $10^{-2}$  setelah penanaman dalam medium LB yang mengandung tetrasiklin adalah sebanyak 2070 (Gambar 6).



Gambar 6. Sel transforman ditumbuhkan dalam medium LB yang mengandung tetrasiklin.

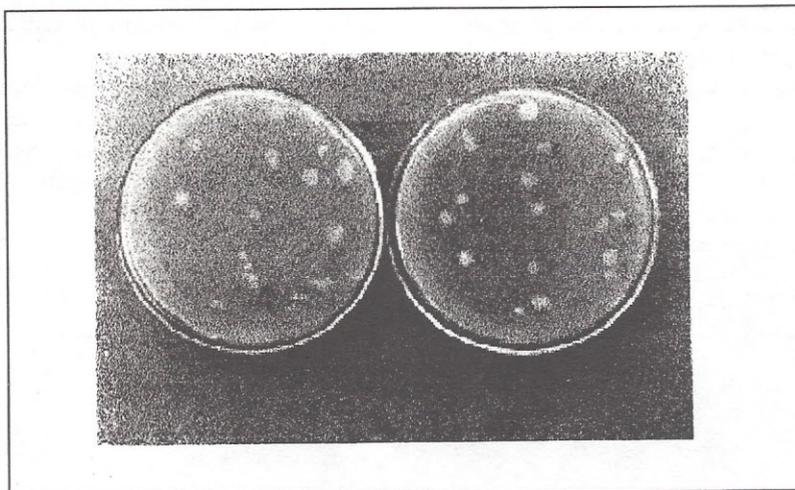
Metoda untuk seleksi bakteri penghasil penisilin asilase yang dikembangkan oleh Meevotison ini merupakan teknik *overlay* yang didasarkan atas daya hambat 6-APA terhadap pertumbuhan *S. marcescens*, yang ditandai dengan terbentuknya daerah bening disekitar koloni. Di antara semua koloni yang ada, ternyata hanya ada 4 koloni yang memberikan adanya hambatan terhadap *S. marcescens* (Gambar 7). Adanya hambatan disekitar koloni yang diuji menunjukkan bahwa sel transforman tersebut mengekspresikan adanya penisilin asilase. Sel tersebut dapat mengurai benzilpenisilin yang ada dalam medium menjadi 6-APA, sehingga terjadi inhibisi terhadap pertumbuhan *S. marcescens*. Selain itu, keempat koloni yang mengekspresikan penisilin asilase menunjukkan bahwa klon rekombinan mengandung DNA insersi dengan bagian-bagian penting gen secara utuh. Artinya kemungkinan gen promotor dan gen-gen utama lainnya yang mengendalikan proses sintesis penisilin asilase

ikut terinsersi, sehingga proses transkripsi dapat berlangsung yang menyebabkan dapat diproduksinya penisilin asilase oleh sel transforman.

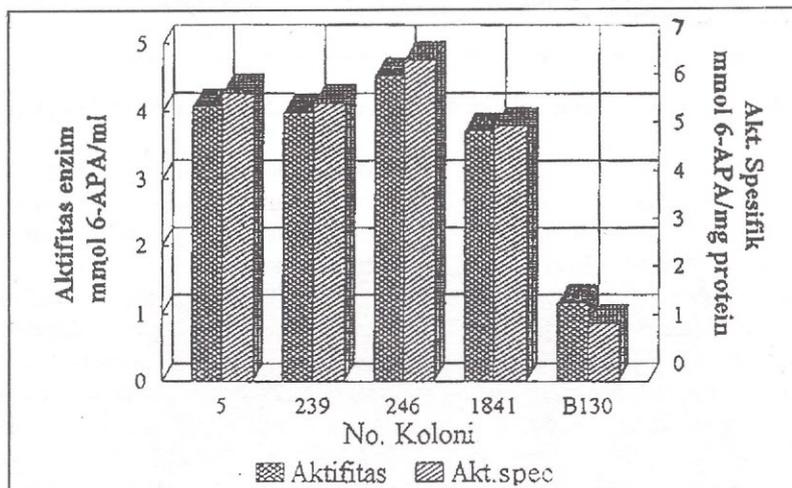
Pada ke empat koloni yang aktif secara mikrobiologi ini, setelah dilakukan uji aktifitas enzimnya menggunakan metoda Kornfeld yang berdasarkan pada pembentukan basa shift antara 6-APA dengan pDAB (paradimetilaminobenzal-dehid), menunjukkan bahwa aktifitas penisilin asilase sel transforman meningkat menjadi sekitar 4-6 kali lebih tinggi (Gambar 8) dari aktifitas penisilin asilase yang berasal dari *E. coli*. Salah satu penyebab kemampuan sel transforman menghasilkan penisilin asilase lebih tinggi dari kemampuan *E. coli* adalah karena DNA vektor yang membawa gen penisilin asilase di dalam sel transforman direplikasi lebih banyak dibanding DNA kromosom. Dengan demikian, dalam sel transforman akan terkandung lebih dari satu DNA vektor yang membawa gen penisilin asilase. Sebaliknya, pada *E. coli* B130, gen penisilin asilase hanya terdapat di dalam

DNA kromosom, dan hanya direplikasi dengan jalan pembelahan sel. Sehingga kuantitas enzim

yang dihasilkan juga akan lebih rendah dibanding produksi oleh sel transforman.



Gambar 7. Hasil seleksi sel transforman yang membawa gen penisilin asilase secara mikrobiologi menggunakan *S. marcescens* sebagai bakteri penguji. Koloni yang positif terhadap uji *S. marcescens* ini ditandai dengan adanya hambatan (zona bening) disekitar pertumbuhan *S. marcescens*.



Gambar 8. Aktivitas penisilin asilase ekstrak kasar sel *E. coli* B130 dan sel transforman.

Pemeriksaan terhadap ukuran DNA terinsersi hanya dilakukan terhadap koloni yang memberikan uji positif dengan *S. marcescens*. Analisa restriksi dengan enzim PstI terhadap transforman no.1841 memberikan fragmen-fragmen berukuran 20; 9; 6; 4 dan 3 kb. Ukuran vektor *cosmid* pHC79 adalah 6,0 kb; jadi dapat

dihitung bahwa ukuran DNA insersi dalam transforman adalah sekitar 36,0 kb. Analisa terhadap koloni yang sama dengan enzim EcoRI memberikan fragmen-fragmen berukuran 20; 9; 6; 5; dan 3 kb. Ukuran DNA insersi dalam transforman adalah sekitar 37,0 kb.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa percobaan kloning gen penisilin asilase pada cosmid pHC79 telah dapat dilakukan. Hasil seleksi sel transforman dengan *S. marcescens* sebagai bakteri penguji, menunjukkan bahwa di antara 2070 koloni yang ada, hanya 4 koloni yang memberikan uji positif terhadap *S. marcescens*. Ini berarti bahwa ke empat koloni tersebut mengekspresikan adanya penisilin asilase. Aktifitas enzim sel transforman dapat meningkat 4-6 kali lebih tinggi dari aktifitas penisilin asilase *E. coli* B130.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada STAD-LIPI, PAU-Bioteknologi ITB dan semua yang telah memberikan kesempatan dan bantuan untuk menyelesaikan pekerjaan ini serta fasilitas laboratorium yang telah tersedia.

## PUSTAKA

1. F. Ishimura, K. Suga, Hydrolysis of Penicillin G by Combination of Immobilized Penicillin Acylase and Electrodialysis, *Biotech. and Bioeng.*, 39 : 171 (1991).
2. J.H. Kang, Y. Hwang, O.J. Yoo, Expression of Penicillin G Acylase Gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *J. of Biotech.*, 17 : 99 (1991).
3. Y. Guan, X. Wu, T.E. Treffry, T.H. Lilley, Studies on the Isolation of Penicillin Acylase from *Escherichia coli* by Aqueous Two-Phase Partitioning, *Biotech. and Bioeng.*, 40 : 517 (1992).
4. P.B. Mahajan, Penicillin Acylase, *Appl. Biochem. and Biotech.*, 9 : 537 (1984).
5. F. Valle, B. Paulina, M. Enrique, B. Francisco, The Role of Penicillin Amidase in Nature and in Industry, *TIBS*, 16 : 36 (1991).
6. H. Meyer, J. Collins, F. Wagner, Cloning of the Penicillin G Acylase Gene of *E. coli* ATCC 11105 on Multycopy Plasmid, *Enzyme Eng.*, 5 : 61 (1979).
7. J.L. Garzia, J.M. Buesa, *J. Biotech.*, 3 : 187 (1986).
8. J.E. McCullough, Gene Cloning in Bacilli Related to Enhanced Penicillin Acylase Production, *Biotech.*, 1 : 879 (1983).
9. R. Silaban, Klon Gen Penisilin Asilase pada Bakteri *E. coli*, Tesis S2-ITB (1991).
10. E. Wonohadi, Kloning Gena Penisilin Asilase dan Seleksi Hasil Klon dengan berbagai cara, Tesis S2-ITB (1993).
11. A. Dahliaty, Subklon Fragmen Gen Pengkode Penisilin Asilase pada Plasmid pBR322 Ampisilin Sensitif, Tesis S2-ITB (1992).
12. L.Z. Udin, Klon Gen Penisilin Asilase pada Cosmid pHC79, Tesis S2-ITB (1994).
13. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989).
14. V. Meevotism, P. Somsuk, R. Prachatam, T.W. Flegel, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 5 : 1227 (1983).
15. J. M. Kornfeld, A New Colorimetric Method for the Determination of 6-Aminopenicilanic Acid, *Anal. Biochem.*, 86 : 118 (1978).
16. -----, *Biochemicals for Molecular Biology*, Boehringer Mannheim Biochemica GMBH, 1991.