

Kloning Gen Penisilin V Asilase dari *Bacillus* sp BAC4 Melalui Pembuatan Pustaka Genom

Gene Cloning of Penicillin V Acylase from *Bacillus* sp BAC4 by Genomic Library

ELFI SUSANTI VH^A, SRI RETNO DWI ARIANI

Program Studi Kimia Jurusan PMIPA FKIP Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126

Diterima: 12 Agustus 2002. Disetujui: 3 Nopember 2003

ABSTRACT

This research was aimed to clone and identify penicillin V acylase (PVA) gene of *Bacillus* sp. BAC4 by genomic library. Chromosome DNA of *Bacillus* sp. BAC4 was isolated by Wang method. pHB201 of *E. coli* was isolated by alkali lyses method. Recombinant DNA of *Bacillus* sp. BAC4 chromosome fragment and pHB201 was made by ligase process using T4 DNA ligase. Transformation of *E. coli* using this recombinant plasmid was carried out according to Mandel-Higa method. The results indicated that chromosome DNA fragment of *Bacillus* sp. BAC4 was bigger 23 kb with purity 1,3. Plasmid DNA fragment of *E. coli* was 6,5 kb. Transformants laboring pHB201 recombinant plasmid was screen as blue-white colonies in a medium containing IPTG/X-gal and chloramphenicol.

© 2004 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: genomic library, penicillin acylase, transformation, plasmid, chromosome.

PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan senyawa kimia yang digunakan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme penyebab infeksi. Kelompok antibiotik β -laktam sangat penting dalam terapi pengobatan. Salah satu antibiotik kelompok ini adalah penisilin, yang ditemukan Alexander Fleming pada tahun 1929 (Crueger dan Crueger, 1982). Antibiotik ini spesifik menghambat sintesis dinding sel bakteri dan telah banyak digunakan untuk terapi pengobatan penyakit infeksi.

Antibiotik penisilin pada awalnya digunakan untuk mengobati penyakit infeksi yang banyak terjadi pada saat perang dunia kedua. Namun beberapa tahun kemudian, pengobatan penyakit infeksi dengan antibiotik ini tidak efisien lagi, karena banyak mikroorganisme telah menjadi resisten. Oleh karena itu, dengan perkembangan ilmu pengetahuan, dikembangkan antibiotik-antibiotik baru melalui modifikasi struktur penisilin agar efektifitas antibiotik ini dapat diperoleh kembali (Wilson, 1982)

Berbagai turunan penisilin telah dibuat dan

digunakan. Dalam proses pembuatan turunan antibiotik, banyak melibatkan gen pengkode enzim-enzim tertentu, contohnya gen penisilin V asilase (PVA) yang banyak ditemukan pada bakteri dan jamur. Enzim ini merupakan kunci dalam pembuatan antibiotik β -laktam semisintetik karena dapat menghidrolisis penisilin V untuk menghasilkan senyawa antara yaitu asam 6-amino penisilinat (6-APA), suatu senyawa antara untuk memproduksi penisilin semisintetik, diantaranya metilsilin, kloksasilin, ampicilin dan karbenisilin (Hammond, 1978). Senyawa 6-APA yang diperoleh melalui proses hidrolisis enzimatis ini, ikatan amida pada rantai sampingnya terputus.

Peningkatan produksi enzim PVA banyak dilakukan melalui pendekatan genetik, yaitu dengan memindahkan gen pengkode PVA ke dalam suatu sel inang yang dapat mengekspresikan gen tersebut dengan aktivitas tinggi (Priest, 1984). Kloning gen PVA telah banyak dilakukan. Kloning gen yang mengkode PVA dari *Bacillus sphaericus* dan ekspresinya dalam *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* telah diteliti (Olson, *et al.*, 1985). Strain lokal *Bacillus* sp. BAC4 selain memproduksi penisilin G asilase (PGA) juga menghasilkan PVA.

Teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetika merupakan suatu metode yang dilakukan untuk memanipulasi DNA suatu makhluk hidup tertentu guna memperoleh sifat-sifat tertentu dalam organisme tersebut. Pada umumnya dalam teknologi

♥ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126.
Tel.: +62-271-648939. Fax.: +62-271-648939
e-mail: fisantivan@yahoo.com

DNA rekombinan, peneliti berusaha menambahkan sifat-sifat unggul ke dalam suatu organisme, sehingga diharapkan menjadi organisme yang menguntungkan kehidupan manusia (Glick dan Pasternack, 1994).

Pustaka genom (*genomic library*) adalah kumpulan klon rekombinan dalam bentuk plasmid, *phage* atau kosmid yang membawa fragmen molekul DNA tertentu secara independen, berukuran tertentu dan merupakan kumpulan keseluruhan informasi genetik suatu organisme (Winnaker *et al.*, 1987). Kebolehjadian suatu gen spesifik dalam kumpulan klon rekombinan dipengaruhi oleh panjang fragmen DNA dan tingkat kompleksitas genom. Semakin tinggi tingkat suatu spesies, maka semakin kompleks genomnya. Beberapa tahap penting yang dapat menentukan keberhasilan pembuatan pustaka genom adalah penyiapan fragmen DNA, penyiapan vektor, reaksi ligasi, dan perbanyakan DNA dalam sel inang. Pustaka genom dapat dibuat dengan memurnikan DNA kromosom dan memotong DNA tersebut secara parsial dengan enzim restriksi tertentu, baik melalui variasi konsentrasi enzim maupun variasi waktu inkubasi. Fragmen tersebut diharapkan mewakili keseluruhan gen pada suatu organisme. Selanjutnya fragmen DNA diinsersikan ke vektor yang sesuai sehingga dihasilkan vektor rekombinan. Hasil pengemasan (*packing*) dapat ditransfeksi ke dalam sel inang yang sesuai, sedangkan bila menggunakan vektor plasmid, hanya dilakukan transformasi dengan metode kejutan panas (*heat shock*) ke dalam sel inang (Boulnois *et al.*, 1987).

Spesies *Bacillus* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *B. cereus* dan *B. anthracis*. Mikroba jenis *Bacillus* tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolisme, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstra seluler membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri. Saat ini *Bacillus subtilis* dipakai sebagai organisme inang untuk studi DNA-rekombinan (Doi *et al.*, 1992).

Dalam penelitian ini, gen PVA dari *Bacillus* sp. BAC4 akan diklon ke dalam vektor plasmid menggunakan pustaka genom. Pustaka genom dibuat dengan memurnikan DNA kromosom *Bacillus* sp. BAC4 dan memotong DNA tersebut secara parsial dengan enzim restriksi tertentu melalui variasi konsentrasi enzim. Fragmen tersebut diharapkan mewakili seluruh gen yang terdapat pada suatu organisme. Selanjutnya fragmen DNA diinsersikan ke vektor yang sesuai sehingga menghasilkan vektor rekombinan. Hasil pengemasan (*packing*) ditransfeksi ke dalam sel inang yaitu *E. coli*. Ekspresi skrining dilakukan untuk melihat aktivitas PVA klon rekombinan. Pengukuran aktivitas enzim PVA didasarkan pada jumlah 6-APA yang dibebaskan pada reaksi hidrolisis enzimatis penisilin V.

Dari uraian di atas ingin diketahui apakah kloning gen PVA dari *Bacillus* sp. BAC4 dapat dilakukan

dengan menggunakan pembuatan pustaka genom. Jika telah didapatkan klon yang positif terhadap uji aktivitas PVA, akan dilihat bagaimana ekspresi serta aktivitas PVA dalam *E. coli*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengklon dan mengidentifikasi gen PVA dari *Bacillus* sp. BAC4. Studi perbandingan gen PVA dan aktivitas enzim PVA dari beberapa spesies akan memberikan pengertian yang lebih mendalam mengenai hubungan antara struktur dan fungsi enzim dari beberapa bakteri.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Mikroorganisme, yaitu *Bacillus* sp. BAC4 dan *E. coli* JM109 diperoleh dari Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Penelitian Antar Universitas, Institut Teknologi Bandung. Diperlukan pula enzim restriksi *HindIII*, enzim T_4 ligase, enzim RNase, proteinase-K, dan DNA standar. Bahan untuk ekstraksi DNA, yaitu gliserol, media LB (*Luria Bertani medium*) padat, medium LB cair, bufer lisis terdiri dari 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA pH 8 dan 10 mg lisosim, SDS 10%, NaClO_4 5 M, kloroform:isoamil alkohol (24:1), etanol 95%, etanol 70 %, bufer TEN terdiri dari 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, dan 100 mM NaCl, RNase, proteinasi K, fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1 v/v/v), dan ddH_2O .

Cara kerja

Penentuan aktivitas enzim PVA. Uji pendahuluan dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim PVA dalam *Bacillus* sp. BAC4 menggunakan metode Konferld (1978). Aktivitas PVA diukur berdasarkan jumlah 6-APA yang dibebaskan. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol 6-APA permenit pada suhu 37 °C.

Isolasi DNA kromosom *Bacillus* sp. BAC4. Isolasi DNA kromosom *Bacillus* sp. BAC4 dilakukan dengan metode Wang (Doi dan McGloughlin, 1992). Tingkat kemurnian DNA ditentukan dengan spektrofotometer sinar UV pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Karakterisasi DNA dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi gel 0,8%. Konsentrasi larutan DNA kromosom hasil isolasi dapat diperkirakan dengan membandingkan intensitas warna pitanya dalam gel agarosa dengan intensitas pita standar yang telah diketahui ukuran dan konsentrasinya.

Isolasi DNA plasmid pHB201 dari *E. coli*. Isolasi ini dilakukan dengan metode lisis alkali. Lisis sel bakteri dilakukan secara kimia menggunakan kombinasi larutan EDTA dan lisozim, suatu senyawa yang merusak protein tanpa merusak molekul DNA maupun RNA. Proses lisis sel ini dipercepat dengan penambahan SDS, yang akan menghilangkan molekul lipid sehingga membran sel dapat terbuka secara perlahan. Pada metode ini, sebagian besar protein

dan RNA tidak larut. Penambahan fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1) diharapkan dapat mengekstrak protein, sedangkan molekul RNA didegradasi dengan menggunakan RNase.

Tingkat kemurnian DNA diukur menggunakan spektrofotometer sinar UV pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Karakterisasi DNA plasmid dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi gel 0,8%. Konsentrasi larutan DNA plasmid hasil isolasi dapat diperkirakan dengan membandingkan intensitas warna pita pada gel agarosa dengan intensitas pita standar yang telah diketahui ukuran dan konsentrasinya.

Pemotongan DNA kromosom dan DNA plasmid.

Pemotongan DNA plasmid, DNA asing, dan DNA rekombinan dilakukan menggunakan enzim restriksi tertentu dengan kondisi tertentu (Sambrook *et al.*, 1989). Enzim restriksi yang dipergunakan adalah enzim *Hind*III untuk memotong DNA plasmid dan DNA asing. Hasil pemotongan DNA dengan enzim restriksi diamati dengan elektroforesis gel agarosa.

Ligasi DNA kromosom ke dalam DNA vektor (pHB201). Ligasi fragmen DNA asing ke dalam vektor plasmid PHB201 dilakukan menggunakan enzim T_4 ligase. Hasil ligasi ini merupakan DNA plasmid rekombinan yang siap untuk ditransformasikan ke dalam *E. coli* JM 109.

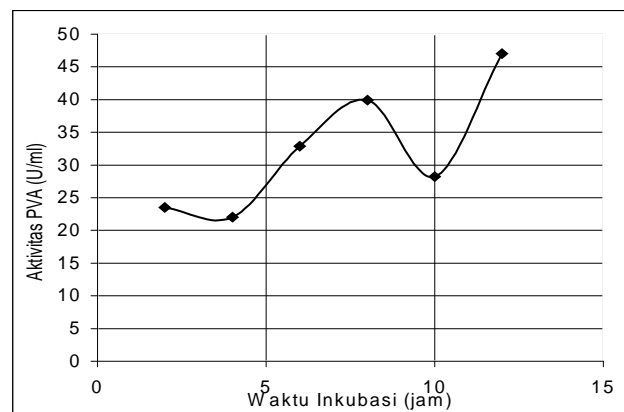
Transformasi ke *E. coli* JM109 dengan DNA rekombinan. Terdapat dua tahap penting dalam prosedur transformasi, yaitu penyiapan sel kompeten dan pemasukkan DNA ke dalam sel inangnya. Pembuatan sel kompeten *E. coli* JM 109 dilakukan menurut metode Mendel dan Higa yang telah dimodifikasi (Sambrook *et al.*, 1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas PVA dalam kultur *Bacillus* sp. BAC4 dilakukan untuk membuktikan bahwa bakteri tersebut benar-benar menghasilkan enzim PVA secara ekstraseluler. Hasil uji menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. BAC4 menghasilkan enzim PVA, diperlihatkan dengan adanya aktivitas PVA dari bakteri tersebut. Aktivitas PVA tertinggi dicapai pada jam ke-12. Pada grafik hubungan antara aktivitas PVA dengan waktu (Gambar 1), terlihat adanya pola naik dan turun. Hal ini diduga karena enzim PVA yang dihasilkan bersifat ekstraseluler, sehingga kestabilannya tidak dikendalikan lagi oleh sel, melainkan oleh lingkungannya.

Isolasi DNA kromosom *Bacillus* sp. BAC4 dilakukan dengan metode Wang (Doi dan McGloughlin, 1992). Metode ini dilakukan dalam beberapa tahap meliputi pembiakan bakteri, pemecahan dinding sel, dan pemurnian DNA kromosom. Pembiakan bakteri dilakukan pada suhu 37°C dan sel dipanen pada fasa logaritma. Pemanenan pada saat ini dipilih karena pada fasa ini sel bakteri relatif masih muda, sehingga memudahkan pemecahan dinding sel. Pemecahan dinding sel dilakukan secara enzimatik menggunakan

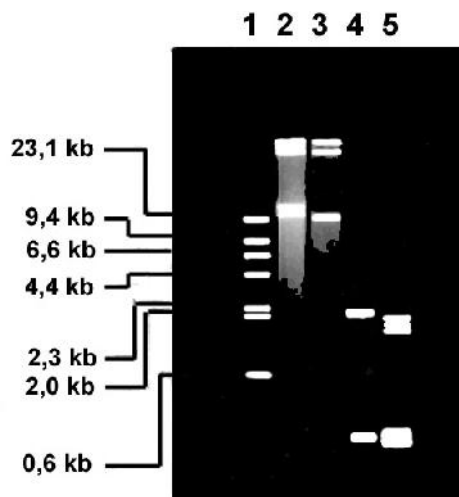
lisozim dan SDS. DNA dipisahkan dari debris sel dan protein melalui ekstraksi menggunakan campuran kloroform:isoamilalkohol (24:1 v/v). Kloroform dapat mendenaturasi protein dan melarutkan lipid serta dapat memisahkan fasa organik dan fasa air, sedangkan isoamilalkohol akan membantu pemisahan kedua fasa ini agar lebih sempurna. Pemurnian DNA dilakukan menggunakan campuran fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1 v/v/v). Penggunaan campuran ini menyebabkan terjadinya presipitasi protein tetapi DNA dan RNA tetap berada dalam fasa air. Penghilangan RNA dilakukan dengan penambahan RNase.



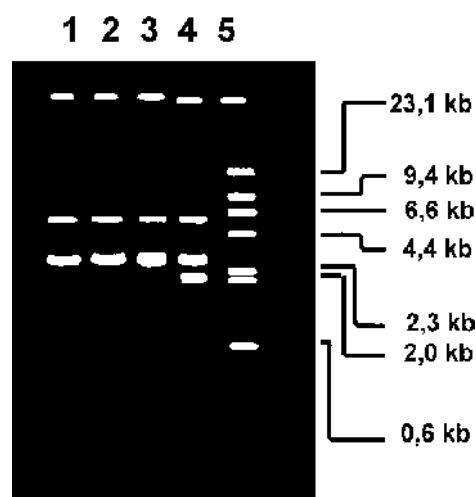
Gambar 1. Hubungan antara aktivitas PVA dengan waktu inkubasi kultur *Bacillus* sp. BAC4.

Kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi dihitung secara kuantitatif dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Dari hasil pengukuran diperoleh bahwa konsentrasi DNA *Bacillus* sp. BAC4 adalah 0,6 µg/µl dengan tingkat kemurnian 1,3. Hasil ini menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi masih kurang murni, diduga masih mengandung protein atau sisa-sisa fenol. Visualisasi DNA genom *Bacillus* sp. BAC4 dalam 0,8% gel agarosa tampak sebagai satu larik dengan ukuran lebih dari 23 kb dengan marker DNA λ /*Hind*III (Gambar 2).

DNA plasmid pHB201 diisolasi dari *E. coli* dengan metode lisis alkali skala kecil. Isolasi diawali dengan penanaman satu koloni tunggal bakteri *E. coli* yang mengandung plasmid pHB201 pada medium LB cair yang mengandung antibiotik kloramfenikol. Hal ini dilakukan karena plasmid pHB201 memiliki gen resisten kloramfenikol, sehingga diharapkan koloni yang tumbuh dalam medium adalah koloni bakteri yang mengandung plasmid pHB201. DNA plasmid yang diperoleh dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa (0,8%). Hasil analisis elektroforesis disajikan pada Gambar 3. Terlihat bahwa molekul DNA plasmid pHB201 memberikan 2 larik. Kedua larik tersebut menunjukkan adanya berbagai bentuk konformasi DNA plasmid. Larik yang berada paling bawah adalah *super coiled monomer* DNA, sedangkan pita paling atas merupakan DNA plasmid dengan konformasi *relaxed open circular*.



Gambar 2. Elektroferogram Hasil Isolasi DNA Kromosom *Bacillus* sp. BAC4 (1 = marker DNA λ /HindIII; 2, 3 = DNA kromosom hasil isolasi).



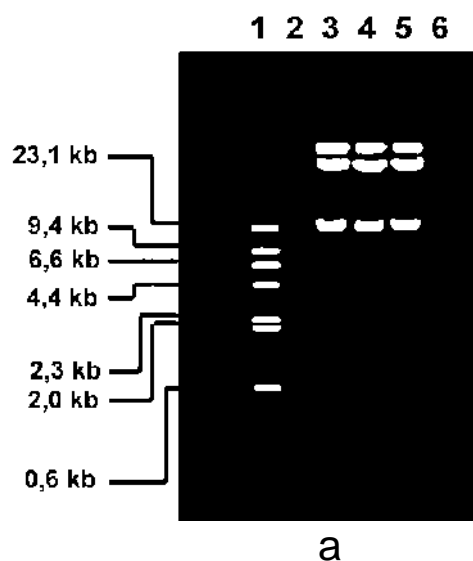
Gambar 3. Elektroforegram hasil isolasi DNA plasmid pHB201 (isi kesemua sumur merupakan pHB201 dari berbagai tabung).

Ukuran DNA plasmid tersebut tidak dapat dibandingkan dengan standar I karena konformasi molekulnya berbeda. DNA λ /HindIII memiliki konformasi linier, sedangkan DNA plasmid memiliki konformasi *covalently closed circular* (ccc). Oleh karena itu DNA plasmid perlu dipotong menggunakan enzim restriksi tertentu sehingga konformasinya menjadi linier dan dapat dibandingkan dengan marker DNA λ /HindIII.

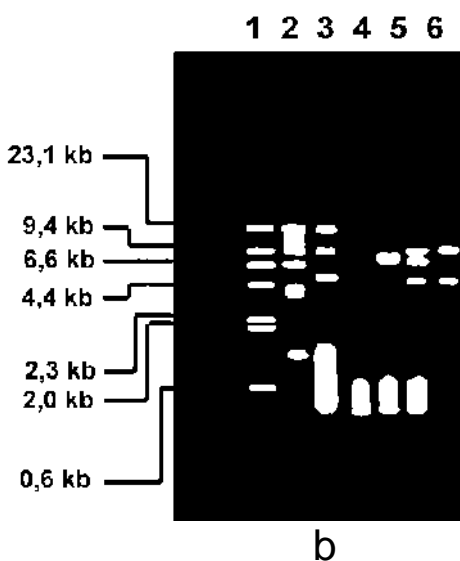
Pemotongan DNA kromosom dan DNA plasmid pHB201 hasil isolasi dilakukan dengan enzim restriksi HindIII. Enzim ini disolusi dari *Haemophilus influenzae* Rd dan mempunyai urutan pengenalan AAGCTT. Pemotongan DNA kromosom dan DNA plasmid dengan enzim HindIII akan menghasilkan ujung lengket AGCT (Brown, 1991). Analisis elektroforesis

gel agarose (0,8%) terhadap hasil pemotongan DNA kromosom dan DNA plasmid disajikan pada Gambar 4. Hasil pemotongan DNA plasmid dengan enzim HindIII memberikan satu pita berukuran 6,5 kb.

Ligasi antara fragmen DNA kromosom dengan plasmid pHB201 dilakukan dengan enzim T4 DNA ligase secara acak. Hasil ligasi dapat dianalisis dengan elektroforesis gel agarose (0,8%) karena mempunyai komposisi yang berbeda dibandingkan molekul sebelumnya (Gambar 5). Campuran reaksi ligasi kemungkinan mengandung molekul DNA rekombinan yang dikehendaki, molekul vektor yang tidak mengalami ligasi, fragmen DNA kromosom yang tidak mengalami ligasi, dan molekul vektor yang telah melingkar kembali tanpa adanya insersi DNA.

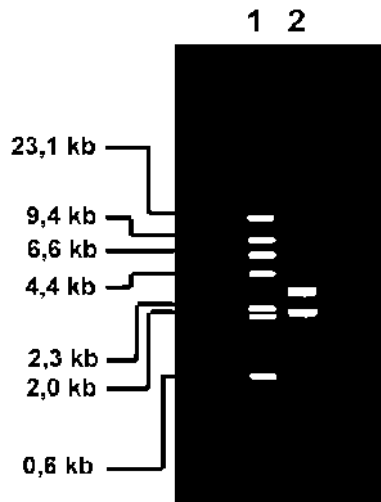


a



b

Gambar 4. Elektroferogram DNA kromosom dan DNA plasmid pHB201 yang telah dipotong dengan enzim HindIII (1a = marker DNA λ /HindIII, 2a, 3a, 4a = DNA kromosom yang telah dipotong. 1b = marker DNA λ /HindIII, 2b, 5b = plasmid pHB201 yang belum dipotong, 4b = DNA plasmid pHB201 yang telah dipotong).



Gambar 5. Elektroferogram hasil ligasi fragmen DNA kromosom dengan plasmid pHB201.

Plasmid rekombinan hasil ligasi digunakan untuk mentransformasi sel inang *E. coli* JM109. Transforman yang diperoleh ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung kloramfenikol, X-gal, dan IPTG. Vektor pHB201 membawa gen kloramfenikol menyebabkan koloni yang tumbuh bersifat resisten terhadap antibiotik kloramfenikol. Penyisipan DNA pada daerah gen *lacZ* dapat diseleksi berdasarkan warna koloni yang dihasilkan dengan adanya X-gal dan IPTG.

Hasil transformasi ditandai dengan tumbuhnya koloni biru dan putih (Gambar 6.). Koloni warna putih menandakan adanya vektor dengan DNA sisipan, sedangkan koloni warna biru menandakan tidak terdapatnya DNA sisipan pada vektor pHB201. Adanya koloni biru dan putih disebabkan DNA sisipan dimasukkan pada daerah pengkode gen *lacZ*. Gen *lacZ* tersebut merupakan daerah pengkode enzim β galaktosidase. Enzim ini dapat menguraikan senyawa mirip laktosa yaitu X-gal, dan adanya IPTG sebagai

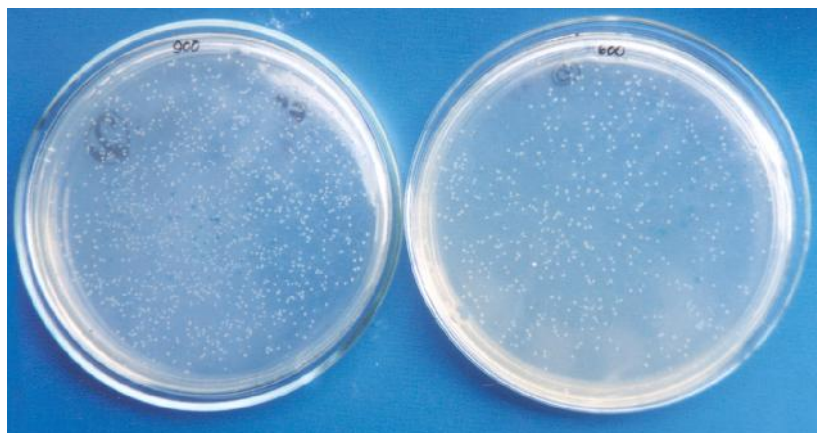
penginduksi dihasilkan senyawa galaktosa dan 5-bromo-4-kloroindigo yang berwarna biru. DNA sisipan yang masuk pada daerah pengkode gen *lacZ* menyebabkan gen tersebut akan rusak dan sebagai hasilnya tidak ada aktivitas enzim yang dikode oleh gen *lacZ*. Enzim β galaktosidase tidak diproduksi dan koloni warna putih dihasilkan (Brown *et al.*, 1991).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa DNA kromosom *Bacillus* sp BAC4 dan pemotongan DNA kromosom hasil isolasi dengan enzim restriksi *Hind*III menghasilkan fragmen yang berukuran lebih besar dari 23 kb dengan tingkat kemurnian 1,3. DNA plasmid yang diisolasi dari bakteri *E. coli* dan pemotongan DNA plasmid hasil isolasi dengan enzim restriksi *Hind*III menghasilkan fragmen berukuran 6,5 kb. Plasmid rekombinan hasil ligasi digunakan untuk mentransformasi sel inang *E. coli* JM109. Hasil transformasi ditandai dengan tumbuhnya koloni biru dan putih. Disarankan untuk dilakukan kloning dengan metode *PCR* (Polymerase Chain Reaction) dan dilakukan transformasi menggunakan inang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Boulnois, G.J. 1987. *Genomic Library Cloning, Genom Cloning and analysis A Laboratory Guide*. Oxford: Blacwaell Scientific Publication.
- Brown, T.A. 1991. *Pengantar Kloning Gen*. Penerjemah: Sumiati, A.M dan Praseno. Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica.
- Glick, B., and J.J. Pasternack. 1994. *Molecular Biotechnology: principle and Applications of Recombinant DNA*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Hammond, S.M. and P.A. Lambert. 1978. *Antibiotics and Antimicrobial Action*. New York: Edward Arnold.
- Kieser, T. 1984. Factor affecting the isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12: 19-36.
- Korfeld, J.M. 1978. A new colorimetric method for the determination of 6-aminopenicillanic acid. *Analytical Biochemistry* 86: 118-



Gambar 6. Hasil transformasi klon rekombinan dalam *E.coli* JM 109.

- 128.
- Morrison, D.A., 1979. Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. *Methods in Enzymology* 68: 326-331.
- Olsson, A., H. Thomas, N. Bjorn, U. Mathias, and G. Sten. 1985. Molecular cloning of **Bacillus sphaericus** penicillin V amidase gene and its expression in **Escherichia coli** and **Bacillus subtilis**. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1084-1089.
- Priest, F.G. 1984. *Extracellular Enzymes*. London: Van Nostrand Reinhold Co. Ltd.
- Sambrook, J., T. Maniatis, and E.F. Fritsch. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Vandamme, E.J. and J.P. Voets. 1974. Microbial penicillin acylases. *Advance Applied Microbiology* 17: 311-369
- Wilson, L. and L. Gisvold. 1982. *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Philadelphia: Harper and Row Publishers, Inc.
- Winnacker, E.L. 1987. *From Gene to Clones Genomic Libraries*. New York: VHC Verlagsgesellschaft mbH.