

ISOLASI DAN KARAKTERISASI GEN SITRAT SINTASE BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* DARI FILOSPFER *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

*Isolation and Characterization of Citrat Synthase Gene of Pseudomonas aeruginosa
isolated from Hevea brasiliensis Phylosphere*

Radite TISTAMA¹⁾, Utut WIDYASTUTI²⁾, dan SUHARSONO²⁾

¹⁾ Balai Penelitian Sungei Putih, Pusat Penelitian Karet

Sungei Putih Galang Sumatera Utara, PO BOX 1415 Medan 20001

Email : raditetistama@yahoo.com

²⁾ Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor

Diterima tanggal 11 April 2013 / Disetujui tanggal 17 September 2013

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a major of rhizosphere bacteria which has many usefull characters for agriculture and environment. The bacteria secrete organic acid which help release phosphor and protect plant root from aluminium toxicity. Citrate is a major organic acid secreted by *Pseudomonas* in the soil. Citrate showed higher affinity to aluminium and provide higher phosphorus than that of the other organic acid. The organic acid is synthesized from a reaction between oxaloacetate and acetyl CoA, catalysed by citrate synthase in the Krebs cycle. The research was conducted to isolate and characterize citrate synthase (CS) of *Pseudomonas aeruginosa* which had been isolated from rubber tree leaf surface. Specific primer for CS gene was designed based on CS gene sequences of some bacteria which were kept in Genebank. The primer was used to amplify CS gene by using PCF machine. The CS gene was successfully isolated from phylosphere bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* CS gene (PaCS) consisted of 1287 bp and coded 428 amino acid. The PaCS had high similarity in amino acid and hidrophosity with the other bacteria CS gene and it might have similarity in enzyme activities.

Keywords: Citrate synthase, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hevea brasiliensis*

Abstrak

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri utama di dalam rizosfer yang mempunyai sifat-sifat yang dapat dimanfaatkan di dalam pertanian dan lingkungan. Bakteri tersebut mensekresikan asam organik yang dapat melepaskan fosfor dan melindungi akar dari keracunan aluminium. Sitrat merupakan asam organik yang dominan disekresikan oleh

Pseudomonas di dalam tanah. Sitrat menunjukkan afinitas terhadap aluminium dan menyediakan fosfor yang lebih tinggi dibandingkan asam organik lainnya. Asam organik ini disintesis dari sebuah reaksi antara aksaloasetat dan asetil KoA, dikatalisis oleh sitrat sintase (CS) di dalam siklus Krebs. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan meng-karakterisasi sitrat sintase dari *Pseudomonas aeruginosa* yang telah diisolasi dari permukaan daun tanaman karet. Primer spesifik untuk gen CS didesain berdasarkan sekuen gen sitrat sintase beberapa bakteri yang disimpan di Genbank. Primer tersebut digunakan untuk mengamplifikasi gen CS dengan menggunakan mesin PCR. Gen CS telah berhasil diisolasi dari bakteri filofere *Pseudomonas aeruginosa*. Gen CS *Pseudomonas aeruginosa* (PaCS) tersebut terdiri atas 1287 pb dan menyandikan 428 asam amino. PaCS mempunyai kesamaan asam amino yang tinggi dan hidrofobisitas dengan CS bakteri lainnya dan diduga mempunyai persamaan aktivitas enzim.

Kata kunci: Sitrat sintase, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hevea brasiliensis*

PENDAHULUAN

Bakteri gram negatif *Pseudomonas* merupakan salah satu mikroba utama di rhizosfer yang memberi beberapa keuntungan bagi tanaman seperti meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen (Atilla *et al.*, 2008), menyediakan unsur fosfor (Buch *et al.*, 2008), dan memicu pertumbuhan akar dengan mensekresikan *indole acetic acid* (IAA) (Khare dan Arora 2010). Bakteri gram negatif ini juga dapat hidup dalam jaringan tanaman tanpa memberikan efek negatif bahkan menguntungkan bagi

tanaman inangnya, seperti meningkatkan toleransi terhadap herbisida (Ahemad dan Khan, 2010).

Pseudomonas banyak dimanfaatkan dalam beberapa proses biologi seperti biodegradasi komponen organik (Idise *et al.*, 2010), sebagai antimikroba patogen (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003), mengurangi cekaman oksidatif (Hassett *et al.*, 1993), mengkelat logam (Lemire *et al.*, 2010) dan meningkatkan toleransi terhadap cekaman aluminium (de la Fuente *et al.*, 1997).

Kemampuan beberapa spesies dalam genus *Pseudomonas* dalam melarutkan fosfat (Buch *et al.*, 2008; Ahemad dan Khan, 2010) dikaitkan dengan kemampuan mensekresikan asam organik oleh bakteri tersebut. Sitrat merupakan asam organik yang dominan disekresikan oleh bakteri-bakteri dalam genus ini. Sekresi sitrat oleh *Pseudomonas* diperlukan untuk mengatasi keracunan aluminium (Mailloux *et al.*, 2008). Aluminium adalah racun bagi organisme karena merusak fungsi sel dengan mengganggu fungsi-fungsi kation penting seperti Fe, Ca dan Mg (Mundy *et al.*, 1997).

Biosintesis asam sitrat melibatkan kondensasi oksaloasetat dan asetil KoA yang dikatalisis oleh sitrat sintase (CS) yang mengatur aliran karbon ke dalam siklus asam trikarboksilat. Siklus ini mempunyai dua fungsi yaitu menyediakan energi seluler dan prekursor biosintesis senyawa yang lain (Park *et al.*, 1994). Transkripsi gen CS meningkat beberapa kali lipat pada saat fase eksponensial atau jika bakteri ditumbuhkan pada medium minimal (Jin dan Sonenshein, 1994). *Pseudomonas fluorescens* menggunakan isositrat liase dan isositrat dehidrogease NADP *dependent* untuk metabolisme sitrat pada saat dicekam Al (Lemire *et al.*, 2010).

Gen sitrat sintase *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*) pertama kali diisolasi oleh Donald *et al.* (1989) dengan cara membuat pustaka genom. Gen ini mempunyai homologi yang tinggi dengan CS dari *P. stutzeri*, *P. putida* dan *P. alcaligenes*. Sitrat sintase dari bakteri ini dihambat aktivitasnya oleh NADH. Mitcell *et al.* (1995) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* memiliki dua tipe sitrat sintase CS I dan CS II. *Bacillus subtilis* juga mempunyai dua tipe sitrat sintase, tetapi enzim ini dihambat oleh ATP (Jin dan Sonensheins, 2006).

Ekspresi gen CS penting untuk meningkatkan sintesis dan efluk sitrat ke dalam rizosfer. Beberapa kelompok peneliti telah melakukan ekspresi berlebih gen CS ke tanaman untuk meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman Al (de la Fuente *et al.*, 1997; Barone *et al.*, 2008). Ekspresi berlebih gen CS mitokondria Arabidopsis (*At-mtCS*) di tanaman wortel atau sebaliknya meningkatkan toleransi terhadap cekaman Al (Koyama *et al.*, 1999). Anoop *et al.* (2003) juga melaporkan introduksi *At-mtCS* ke dalam khamir dan kanola meningkatkan level sitrat di dalam sel-sel tunas dan memicu sekresi sitrat dua kali lipat saat diperlakukan dengan Al. Sebaliknya, Delhaized *et al.* (2001) melaporkan bahwa ekspresi berlebih gen CS aeruginosa di dalam tanaman tidak meningkatkan akumulasi sitrat di jaringan akar maupun meningkatkan sekresi sitrat.

Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengkarakterisasi gen sitrat sintase bakteri pseudo endofitik *Pseudomonas aeruginosa*.

BAHAN DAN METODE

Bakteri *P. aeruginosa* diperoleh dari koleksi Laboratorium Proteksi Tanaman Balai Penelitian Sungei Putih Pusat Penelitian Karet. Bakteri tersebut diisolasi dari permukaan daun *Hevea brasiliensis* di Perkebunan Sungei Putih. Analisis *polymerase chain reaction* (PCR) dan urutan DNA dilakukan di Laboratorium Biorin Pusat Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik IPB Bogor.

Kultur Bakteri *P. aeruginosa*

Medium yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri adalah Luria Bertani (LB) agar dan LB cair. Komposisi medium terdiri dari 5 g/L ekstrak khamir, 10 g/L NaCl, dan 10 g/L pepton. Media agar dibuat dengan menambahkan dengan 7 g/L bacto agar kemudian disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Bakteri diambil dari stok penyimpanan dan digoreskan pada LB agar dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Koloni tunggal diambil dan ditumbuhkan di dalam medium 10 ml LB cair. Kultur bakteri digoyang dengan kecepatan 175 rpm selama 12-16 jam pada suhu kamar.

Isolasi DNA Bakteri *P. aeruginosa*

DNA bakteri diekstrak dengan cetyl trimetil ammonium bromide (CTAB) mengikuti Metode Sambrook dan Russel (2001). Sebanyak 1,5 ml biakan bakteri diendapkan dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm (Jouan BR4i) selama 10 menit. Pada pelet bakteri ditambahkan 600 µl 2% CTAB suhu 65°C dan 1,2 µl β-mercaptoethanol, lalu diinkubasikan pada suhu 65 °C selama 1 jam. Ekstrak dibalik-balik setiap 10 menit, supaya homogen. Tabung berisi ekstrak dimasukkan ke dalam es dan ditambah 600 µl CI (kloroform: isoamilalkohol 24:1). Setelah beberapa kali ekstrak sel dibolak-balik, komponen padatan sel dipisahkan dengan cara disentrifugasi pada 10.000 rpm (Jouan BR4i) suhu 4°C, selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambah 1 kali volume PCI (fenol: kloroform: isoamilalkohol=25:24:1), dan disentrifugasi pada 10000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru lagi dan ditambah dengan 0,1 kali volume 2 M Na asetat pH 5,2 dan 2 kali volume etanol absolut. Campuran tersebut diinkubasikan di suhu -20°C selama semalam. Presipitat DNA diendapkan dengan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit. Pelet dicuci dengan 500 µl etanol 70%. DNA diresuspensikan dengan 30 µl buffer Tris-EDTA atau ddH₂O.

Spesies bakteri dipastikan dengan mengamplifikasi daerah 16S rRNA menggunakan primer forward 63F: 5`CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC`3 dan reverse 1381R: 5`GGG CGG WGT GTA CAA GGC`3 (Marchesi et al., 1998). Kondisi polymerase chain reaction (PCR) diatur sebagai berikut : pra PCR 94°C, 5 menit, diikuti siklus denaturasi 94°C, 30 detik, penempelan primer 52°C, 30 detik, pemanjangan pada 72°C, 1,5 menit, yang diulang 30 siklus, dan pasca PCR pada 72°C, 5 menit, diikuti dengan 15 °C selama 10 menit.

Isolasi Gen Sitrat Sintase *P. aeruginosa*

Gen sitrat sintase (CS) diisolasi dengan menggunakan primer spesifik berdasarkan urutan gen CS dari *P. aeruginosa* yang ada di Gene Bank. Urutan primer adalah sebagai berikut : primer forward 5'ATGGCTGACAAAAAGCGCAG3' dan

reverse 5'TCAGCCGCGATCCTTGAGGGC3'. Kondisi PCR diatur dengan siklus sebagai berikut: pra PCR 94°C, 5 menit, diikuti proses denaturasi 95°C, 30 detik, penempelan primer 55°C, 30 detik, pemanjangan pada 72°C, 1,5 menit, yang diulang 30 siklus, dan pasca PCR pada 72°C, 5 menit, diikuti dengan pendinginan 15°C, 10 menit.

Kandidat gen sitrat sintase yang diamplifikasi dari *P. aeruginosa* (PaCS) ini kemudian di klon ke dalam plasmid pGEM-T Easy (Promega Inc.), dengan cara mencampurkan 1 µl hasil PCR, 25 ng pGEM-T easy, 1,5 unit T4 DNA ligase, 2,5 µl 2x rapid buffer ligasi, dan ddH₂O hingga volume total menjadi 5 µl. Campuran diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam, kemudian diinkubasikan pada suhu 4°C selama 12 jam.

Introduksi pGEM-T PaCS ke dalam *E. coli* DH5a

Hasil ligasi ditransfer ke dalam *E. coli* DH5a. Satu koloni *E. coli* diinokulasikan ke dalam 2 ml media LB. Kultur bakteri digoyang di suhu 37°C selama semalam. Dari kultur tersebut diambil 10 µl untuk dikulturkan kembali ke 10 ml LB. Kultur digoyang di suhu 37°C selama 2 - 3 jam atau OD₆₀₀ = 0,25 - 3. Kultur disimpan di dalam es selama 15 menit. Dua jenis larutan 0,1 M CaCl₂ dan 0,1 M CaCl₂ yang mengandung 15% gliserol juga disimpan di dalam es. Sebanyak 1,5 ml kultur sel disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Medium dibuang dan sel diresuspensikan dengan 450 µl 0,1 M CaCl₂. Suspensi dibiarkan di es selama 30 menit, kemudian disentrifugasi seperti sebelumnya. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensikan dengan 45 µl 0,1 M CaCl₂ + 15% gliserol dan sel bakteri sudah menjadi kompeten.

Hasil ligasi dicampurkan ke dalam sel kompeten dan dibiarkan disimpan di dalam es selama 30 menit. Campuran sel kompeten dipanaskan pada suhu 42°C selama 60 detik, lalu dengan cepat dimasukkan ke dalam es selama 5 menit. LB ditambahkan ke dalam campuran tersebut kemudian diinkubasikan selama 1 jam. Kultur sel ini disebar pada media LB yang mengandung 50 µg/ml ampisilin.

Plasmid hasil ligasi diamplifikasi dengan primer yang didesain dari urutan T7 dan SP16 untuk mendapatkan urutan DNA utuh. Kondisi PCR adalah sama dengan kondisi saat isolasi gen *PaCS*.

Pengurutan DNA dan Analisisnya

Urutan DNA penyusun gen 16S dan PaCs dianalisis menggunakan DNA sequencer *ABI Prism model 310* versi 3.7. Selanjutnya, urutan DNA dianalisis homologinya dengan menggunakan program *basic local alignment search tools* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997). Urutan asam amino PaCS diketahui dengan cara mendeduksi urutan DNA yang diperoleh menggunakan program *translation* dari perangkat lunak Bioedit. Analisis keberadaan situs restriksi di dalam gen menggunakan perangkat lunak yang sama.

Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan Program MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Urutan DNA hasil *sequencing* dan urutan DNA dari gen CS dari berbagai spesies *Pseudomonas* yang akan dianalisis disimpan dalam bentuk file FASTA menggunakan perangkat lunak Bioedit. File tersebut kemudian dibuka dengan program MEGA4, kemudian data di sejajarkan dengan cara memilih menu bar *align ClustalW*. Data yang telah disejajarkan dianalisis kekerabatan dengan memilih data dan analisis filogenetik. Pohon kekerabatan dibuat dengan memilih menu bar *Neighbor-Joining Tree*. Penjajaran urutan asam amino penyusun bakteri CS maupun tanaman menggunakan perangkat lunak bioedit dengan memilih menu bar *align ClustalW*. Urutan gen CS dari beberapa tanaman digunakan sebagai pembanding.

HASIL DAN PEMBAHASAN

PCR menggunakan primer universal untuk 16S bakteri menghasilkan fragmen DNA berukuran 1301 pb (Gambar 1). Analisis *BLAST* berdasarkan urutan nukleotida menunjukkan bahwa urutan tersebut mempunyai kesamaan 99% dengan gen penyandi 16S ribosomal RNA dari beberapa galur *P. aeruginosa*. Hasil analisis sebelumnya menggunakan uji biokimia dan mikroskopik, galur bakteri ini diidentifikasi sebagai *Pseudomonas fluorescens* (Data tidak dipublikasikan). Perbandingan spesies bakteri banyak menggunakan urutan gen

16S rRNA sebagai dasar menyusun filogenetik (Weisburg *et al.*, 1990). Alasan menggunakan gen ini dikarenakan 16S rRNA secara fungsional konstan, dan mempunyai urutan yang lebih bervariasi (Woose, 1987). Gen 16S rRNA merupakan bagian dari operon (Coenye dan Vandamme, 2003). Kombinasi primer 16S rRNA dapat mengidentifikasi beberapa spesies sekaligus tanpa harus dikulturkan terlebih dahulu, sehingga proses identifikasi lebih cepat dan dapat mencakup bakteri-bakteri yang tidak atau belum dapat dikulturkan (Weisburg *et al.* 1990).

Primer untuk isolasi gen sitrat sintase (CS) didesain berdasarkan urutan gen CS dari beberapa galur *P. aeruginosa* yang telah didaftarkan di Gene Bank. Amplifikasi gen CS dari *P. aeruginosa* SP01 dengan PCR menghasilkan fragmen berukuran 1300 pb. Fragmen ini telah berhasil diklon ke dalam plasmid kloning *pGEM-T Easy* dan kemudian telah berhasil diintroduksi ke *E. coli* DH5a untuk diperbanyak (Gambar 2). Pengurutan DNA dari fragmen ini dilakukan dengan menggunakan primer yang didesain dari urutan promoter SP6 dan T7 yang mengapit gen CS di *pGEM-T Easy*.

Gen CS di genus *Pseudomonas* memiliki kesamaan urutan di 8 asam amino pertama dari kodon star dan kodon stop, sehingga memudahkan untuk mengisolasi gen tersebut dengan desain berdasarkan urutan dari sisi 5' dan di sisi 3'nya. *PaCS* terdiri atas 1287 pb dan dideduksi menyandi 428 asam amino. Variasi gen CS pada strain *P. aeruginosa* berada di urutan DNA di urutan 724-748 pb atau di urutan asam amino 242-248. Gen sitrat sintase pertama diisolasi dari *P. aeruginosa* berukuran 1287 pb dan mempunyai homologi yang tinggi dengan spesies *Pseudomonas* lainnya (Donald *et al.*, 1989). Ukuran CS eukariotik lebih besar dari prokariotik yaitu sekitar 1700 pb (Park *et al.*, 1997; Min *et al.*, 2011) (Gambar 3).

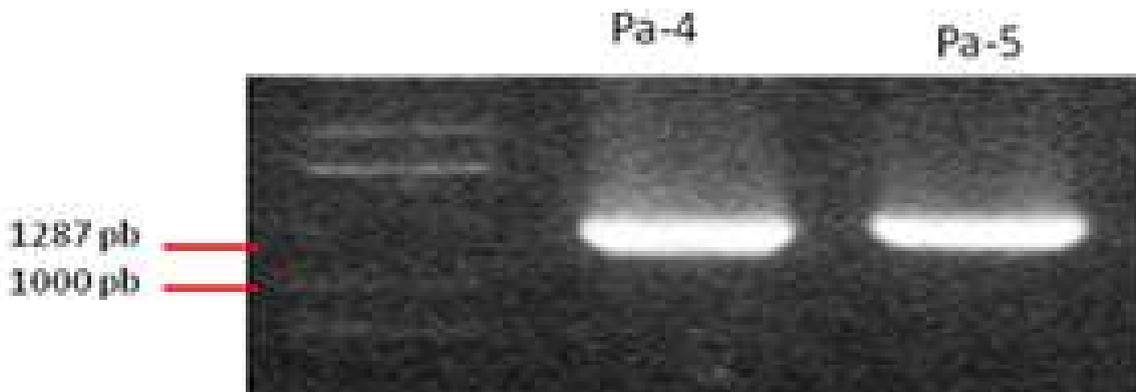
Hasil analisis *BLAST* menunjukkan bahwa fragmen DNA yang disisipkan di plasmid *pGEM-T* adalah gen sitrat sintase karena mempunyai kesamaan 96% dengan sitrat sintase tipe II *P. aeruginosa* PAO1 dan 95% *P. aeruginosa* PA7 (Tabel 1). Urutan tersebut dimulai dengan star kodon ATG dan diakhiri dengan stop kodon TGA, dengan demikian urutan merupakan gen utuh sitrat

```

GGGAGTAGACAGCTCTGGATCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCT
GGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGGAGA
AAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC
ACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG
ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG
TAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTA
CCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATG
TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGT
AGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGG
GATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTTCGACCCGCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTCCA
GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACC
AGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAACTGCCGGTGACAAACCGGAAGGAAGGGGG
GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTC
GGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTC
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCCGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGA
ATGCCCGTTGGTGGCGCC
    
```

Gambar 1. Urutan nukleotida fragmen DNA 16S rRNA *P. aeruginosa* SP01. Fragmen tersebut tersusun oleh 1301 pb

Figure 1. Sequence of nucleotide fragments of DNA 16S rRNA *P. aeruginosa* SP01. Fragments are composed by 1301 pb



Gambar 2. PCR koloni bakteri *E. coli* DH5a hasil transformasi *pGEM-T easy* yang mengandung gen sitrat sintase. Urutan gen sitrat sintase di Pa4 dan Pa5 mempunyai orientasi yang berlawanan.

Figure 2. PCR colony of bacteria of *E. coli* DH5a transformed from *pGEM-T easy* containing citrate synthase gene. Citrate synthase gene sequences in PA4 and PA5 has opposite orientation.

1	ATG	GCT	GAC	AAA	AAA	GCG	CAG	TTG	ATC	ATC	GAG	GGC	TCA	GCC	CCC	45
1	Met	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Gln	Leu	Ile	Ile	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	15
46	GTC	GAA	CTG	CCC	GTC	CTA	TCC	GGT	ACC	ATG	GGT	CCC	GAT	GTA	GTG	90
16	Val	Glu	Leu	Pro	Val	Leu	Ser	Gly	Thr	Met	Gly	Pro	Asp	Val	Val	30
91	GAT	GTA	CGG	GGC	CTC	ACC	GCC	ACG	GGC	CAC	TTC	ACC	TTC	GAT	CCT	135
31	Asp	Val	Arg	Gly	Leu	Thr	Ala	Thr	Gly	His	Phe	Thr	Phe	Asp	Pro	45
136	GGC	TTC	ATG	TCG	ACC	GCC	TCC	TGC	GAG	TCG	AAG	ATC	ACC	TAT	ATC	180
46	Gly	Phe	Met	Ser	Thr	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Lys	Ile	Thr	Tyr	Ile	60
181	GAC	GGC	GAC	AAA	GGC	GTC	CTC	CTC	CAT	CGC	GGC	TAC	CCC	ATC	GAG	225
61	As	Gly	Asp	Lys	Gly	Val	Leu	Leu	His	Arg	Gly	Tyr	Pro	Ile	Glu	75
226	CAA	CTG	GCA	GAG	AAA	TCC	GAC	TAC	CTG	GAA	ACC	TGC	TAC	CTG	CTG	270
76	Gln	Leu	Ala	Glu	Lys	Ser	Asp	Tyr	Leu	Glu	Thr	Cys	Tyr	Leu	Leu	90
271	CTG	AAC	GGC	GAG	CTG	CCC	ACC	GCC	GCG	CAG	AAG	GAA	CAG	TTC	GTC	315
91	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	105
316	GGC	ACC	ATC	AAG	AAC	CAC	ACC	ATG	GTT	CAC	GAG	CAG	TTG	AAG	ACC	360
106	Gly	Thr	Ile	Lys	Asn	His	Thr	Met	Val	His	Glu	Gln	Leu	Lys	Thr	120
361	TTC	TTC	AAC	GGC	TTC	CGC	CGC	GAC	GCC	CAC	CCG	ATG	GCC	GTG	ATG	405
121	Phe	Phe	Asn	Gly	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	His	Pro	Met	Ala	Val	Met	135
406	TGC	GGC	GTG	ATC	GGC	GCC	CTC	TCG	GCC	TTC	TAC	CAC	GAC	TCC	CTG	450
136	Cys	Gly	Val	Ile	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Phe	Tyr	His	Asp	Ser	Leu	150
451	GAC	ATC	AAT	AAC	CCG	AAG	CAT	CGC	GAA	GTC	TCC	GCG	CAT	CGC	CTG	495
151	Asp	Ile	Asn	Asn	Pro	Lys	His	Arg	Glu	Val	Ser	Ala	His	Arg	Leu	165
496	ATC	GCC	AAG	ATG	CCG	ACC	ATC	GCC	GCC	ATG	GTG	TAC	AAG	TAC	TCC	540
166	Ile	Ala	Lys	Met	Pro	Thr	Ile	Ala	Ala	Met	Val	Tyr	Lys	Tyr	Ser	180
541	AAG	GGC	GAG	CCG	ATG	ATG	TAT	CCG	CGT	AAC	GAC	CTG	AAC	TAC	GCG	585
181	Lys	Gly	Glu	Pro	Met	Met	Tyr	Pro	Arg	Asn	Asp	Leu	Asn	Tyr	Ala	195
586	GAA	AAC	TTC	CTG	CAC	ATG	ATG	TTC	AAC	ACC	CCC	TGC	GAG	ACC	AAG	630
196	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Met	Met	Phe	Asn	Thr	Pro	Cys	Glu	Thr	Lys	210
631	CCG	ATC	AGC	CCC	GTG	CTG	GCC	AAG	GCC	ATG	GAC	CGC	ATC	TTC	ATT	675
211	Pro	Ile	Ser	Pro	Val	Leu	Ala	Lys	Ala	Met	Asp	Arg	Ile	Phe	Ile	225
676	CTC	CAC	GCC	GAC	CAC	GAG	CAG	AAC	GCC	TCC	ACC	TCC	ACG	GTG	CGT	720
226	Leu	His	Ala	Asp	His	Glu	Gln	Asn	Ala	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Arg	240
721	CTG	GGC	CGG	CTC	CTC	CGG	CGC	CAT	CCG	TTC	GCC	TGC	ATC	GCC	TCC	765
241	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	His	Pro	Phe	Ala	Cys	Ile	Ala	Ser	255
766	GGC	ATC	GCC	GCC	CTG	TGG	GGA	CCG	GCC	CAT	GGC	GGC	GCG	AAC	GAA	810
256	Gly	Ile	Ala	Ala	Leu	Trp	Gly	Pro	Ala	His	Gly	Gly	Ala	Asn	Glu	270
811	CGC	GTG	CTG	CGC	ATG	CTC	GAC	GAG	ATC	GGC	GAC	GTG	TCC	AAC	ATC	855
271	Ala	Val	Leu	Arg	Met	Leu	Asp	Glu	Ile	Gly	Asp	Val	Ser	Asn	Ile	285
856	GAC	AAG	TTC	GTC	GAG	AAG	GCC	AAG	GAC	AAG	AAC	GAT	CCG	TTC	AAG	900
286	Asp	Lys	Phe	Val	Glu	Lys	Ala	Lys	Asp	Lys	Asn	Asp	Pro	Phe	Lys	300
901	CTG	ATG	GGC	TTC	GGC	CAT	CGT	GTC	TAC	AAG	AAC	TTC	GAC	CCG	CGC	945
301	Leu	Met	Gly	Phe	Gly	His	Arg	Val	Tyr	Lys	Asn	Phe	Asp	Pro	Arg	315
946	GCC	AAG	GTC	ATG	AAG	CAG	ACC	TGC	GAC	GAG	GTC	CTC	CAG	GAG	CTG	990
316	Ala	Lys	Val	Met	Lys	Gln	Thr	Cys	Asp	Glu	Val	Leu	Gln	Glu	Leu	330
991	GGC	ATC	AAC	GAC	CCG	CAA	CTG	GAA	CTG	GCG	ATG	AAG	CTA	GAA	GAA	1035
331	Gly	Ile	Asn	Asp	Pro	Gln	Leu	Glu	Leu	Ala	Met	Lys	Leu	Glu	Glu	345
1036	ATC	GCC	CGC	CAC	GAC	CCC	TAC	TTC	GTG	GAA	CGC	AAC	CTG	TAC	CCG	1080
346	Ile	Ala	Arg	His	Asp	Pro	Tyr	Phe	Val	Glu	Arg	Asn	Leu	Tyr	Pro	360
1081	AAC	GTC	GAC	TTC	TAC	TCG	GGG	ATC	ATC	CTC	AAG	GCG	ATC	GGC	ATT	1125
361	Asn	Val	Asp	Phe	Tyr	Ser	Gly	Ile	Ile	Leu	Lys	Ala	Ile	Gly	Ile	375
1126	CCG	ACC	AGC	ATG	TTC	ACC	GTG	ATC	TTC	GCC	CTG	GCG	CGT	ACC	GTC	1170
376	Pro	Thr	Ser	Met	Phe	Thr	Val	Ile	Phe	Ala	Leu	Ala	Arg	Thr	Val	390
1171	GGC	TGG	ATC	TCG	CAC	TGG	CAG	GAA	ATG	CTC	TCC	GGC	CCC	TAC	AAG	1215
391	Gly	Trp	Ile	Ser	His	Trp	Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Gly	Pro	Tyr	Lys	405
1216	ATC	GGC	CGC	CCG	CGC	CAG	CTC	TAT	ACC	GGC	CAC	ACC	CAG	CGC	GAC	1260
406	Ile	Gly	Arg	Pro	Arg	Gln	Leu	Tyr	Thr	Gly	His	Thr	Gln	Arg	Asp	420
1261	TTC	ACC	GCC	CTC	AAG	GAT	CGC	GGC	TGA	1287						
421	Phe	Thr	Ala	Leu	Lys	Asp	Arg	Gly	End							

Gambar 3. Deduksi asam amino dari hasil urutan DNA. Protein PaCS terdiri atas 428 asam amino. Huruf berwarna merah menunjukkan daerah yang spesifik dari gen PaCS dibanding gen sitrat sintase dari strain *P. aeruginosa* maupun *Pseudomonas* sp.

Figure 3. Deduced amino acid of sequence of DNA results. PACS protein consists of 428 amino acids. Red letters indicate specific regions of gene PACS compared with citrate synthase gene from a strain of *P. aeruginosa* and *Pseudomonas* sp

Tabel 1. Hasil analisis *Blastx* dari urutan hasil amplifikasi PCR fragmen DNA CS
 Table 1. *Blastx* analysis resulted from sequence the results of PCR amplification of DNA fragments CS

No.	Asesi	Deskripsi Description	Skor Score	Perkiraan cakupan Query coverage	Nilai kesalahan E-value	Identik maksimal Maximal Identic
1	NP 250271.1	Type II citrate synthase <i>P. aeruginosa</i> PAO1)	815	99%	0.0	96%
2	YP 001349048.1	Type II citrate synthase <i>P. aeruginosa</i> PA7)	812	99%	0.0	95%
3	AAAA25769.1	Citrate synthase (<i>P. aeruginosa</i>)	811	99%	0.0	95%
4	ZP 01364931.1	Hypothetical protein PaerPA 010002043 (<i>P. aeruginosa</i>)	770	94%	0.0	96%
5	YP 001187996.1	Type II citrate synthase (<i>P. medocina ymp</i>)	757	99%	0.0	88%

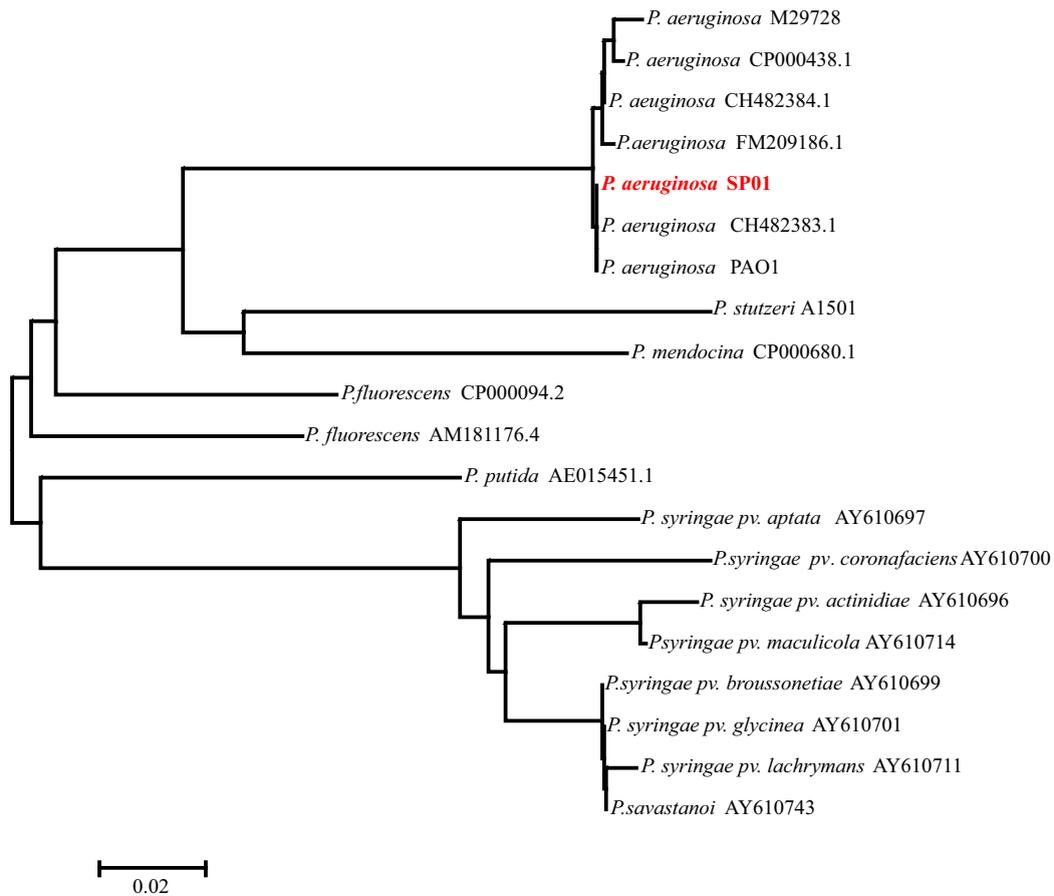
sintase tipe II dari *P. aeruginosa*, yang kemudian diberi nama gen PaCS. Mitchell (1996) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* mempunyai dua jenis sitrat sintase yaitu sitrat sintase I dan II yang perannya bervariasi tergantung fase pertumbuhannya. CS I berperan lebih dominan pada fase logaritmik, sementara CS II lebih berperan pada fase stationer. CS II merupakan jenis enzim yang sensitif terhadap NADH (Donald et al., 1989), seperti halnya CS II dari kebanyakan bakteri gram negatif. Berbeda dengan bakteri gram negatif lainnya CS *Bacillus subtilis* dihambat oleh ATP seperti halnya CS bakteri gram positif atau eukariotik (Jin dan Sonenshein, 1996).

Analisis restriksi menggunakan perangkat lunak bioedit menunjukkan bahwa enzim endonuklease yang tidak memotong urutan PaCS tetapi terdapat di dalam multiple cloning site (MCS) pGEMT-T Easy adalah AflII, ApaI, BamHI, BglII, BstEII, ClaI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, MluI, NdeI, NheI, NotI, NsiI, PstI, PvuII, RsrII, SfiI, SmaI, SpeI, SspI, StuI, XbaI, XhoI. Enzim-enzim tersebut dapat digunakan untuk pengklonan gen ke dalam plasmid atau untuk penyisipan ke dalam kaset pada konstruksi gen. Informasi ini juga penting untuk pemotongan DNA total tanaman transgenik untuk analisis sisipan PaCS dengan menggunakan southern blot.

Hasil analisis filogenetik, CS dari *P. aeruginosa* SP01 mengelompok dengan CS dari strain yang lain termasuk *P. aeruginosa*

PAO1 yang digunakan dalam penelitian de la Fuente et al. (1997). Gen CS dari masing-masing spesies *Pseudomonas* sp mempunyai urutan yang khas sehingga mengelompok dalam satu grup. Hal ini memperkuat penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa gen CS dapat digunakan untuk menganalisis kekerabatan seperti halnya 16S rRNA (Roux et al., 1997; Hernandez-Lucas et al., 2004) (Gambar 4).

Pada *E. coli*, CS berbentuk heksamerik sedangkan pada jantung babi berbentuk dimerik (Bhayana dan Duckword, 1984). Bentuk heksamerik ini kemungkinan berkaitan dengan hidrofobisitas asam amino penyusun CS. Analisis hidrofobisitas menunjukkan bahwa CS dari *P. aeruginosa* mempunyai enam puncak hidrofobik. Jika dibandingkan CS dari *P. aeruginosa* SP01 dengan galur PA01 maka perbedaan terjadi hanya pada puncak ke-5 yang disusun oleh asam amino 240-260. Hal ini terjadi karena penyusun asam amino di daerah 242-248 galur SP01 berbeda dari galur yang lain. Perbedaan hidrofobisitas antara CS dari *P. aeruginosa* SP01 dengan CS *P. fluorescens* terjadi pada puncak ke 1, 3, 4, 5, sedangkan jika dibandingkan dengan *P. putida* semua puncak terdapat perbedaan. Tingkat perbedaan hidrofobisitas ini meningkat sesuai dengan jarak evolusi masing-masing spesies. Hidrofobisitas asam-asam amino menentukan struktur tiga dimensi dan menentukan aktivitas suatu enzim (Darnell et al., 1990). Berdasarkan hidrofobisitas asam amino penyusun enzim CS dapat

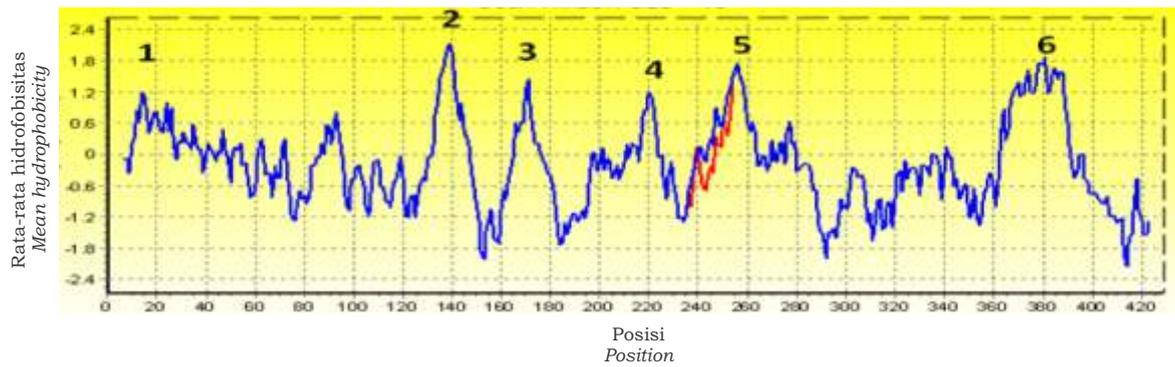


Gambar 4. Pohon filogenetik *Pseudomonas* sp berdasarkan urutan gen sitrat sintase
 Figure 4. Phylogenetic tree of *Pseudomonas* sp based on the sequence citrate synthase gene

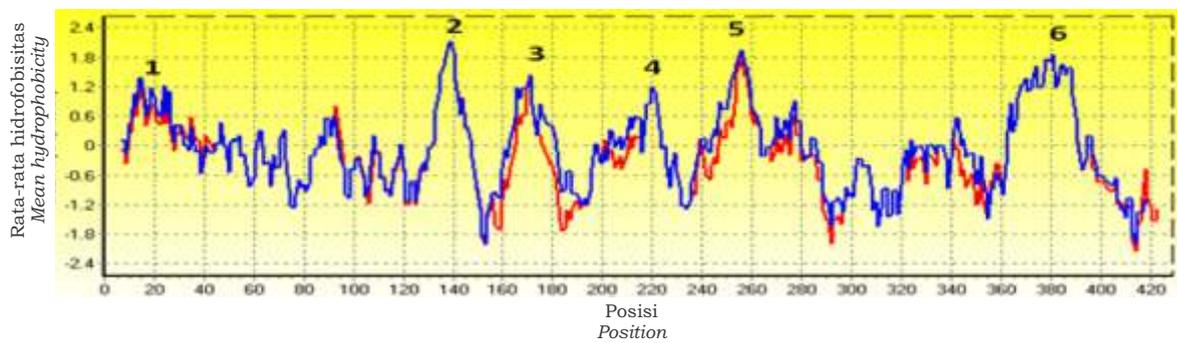
diduga struktur tiga dimensi enzim tersebut. Perbedaan hidrofobisitas asam amino penyusun enzim-enzim yang semakin tinggi diduga aktivitas enzim-enzim tersebut juga semakin berbeda (Gambar 5).

Hasil penjabaran urutan asam amino penyusun sitrat sintase antar spesies *Pseudomonas* menunjukkan adanya kemiripan yang tinggi satu dengan lainnya. Namun, urutan asam amino sitrat sintase *Pseudomonas* sp berbeda dengan sitrat sintase dari tanaman. Kemiripan susunan amino sitrat sintase antara *A. thaliana* dan *N. tabacum* juga relatif lebih rendah dibandingkan kemiripan antar spesies *Pseudomonas* (Gambar 6). Meskipun mempunyai perbedaan dalam hal urutan dan struktur, enzim sitrat sintase bakteri telah diketahui dapat berfungsi normal di dalam jaringan tanaman (de la Fuente et al., 1997; Barone et al., 2008).

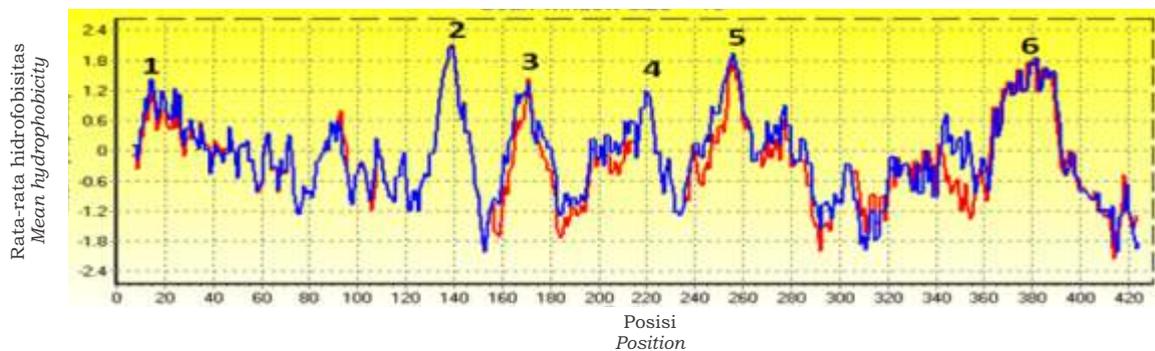
CS mempunyai peran yang strategis dalam menghasilkan energi baik pada prokariotik maupun eukariotik. Sitrat sintase juga berperan dalam virulensi pada *Agrobacterium*. Mutasi gen CS pada spesies tersebut menyebabkan penurunan daya virulensi (Suksomtip et al., 2005). Mutasi pada gen CS ini juga berpengaruh dalam pembentukan spora *Bacillus* sp (Donald et al., 1989). Sitrat sintase *Aspergillus nidulans* disandikan oleh gen *CitA* berukuran 471 pb dan berlokasi di dalam mitokondria (Min et al., 2010). Gen *CitA* ini ditemukan sebagai kopi tunggal, mempunyai 7 intron dan inisiasi transkripsinya pada posisi -26 (Park et al., 1997; Min et al., 2010). Pada bakteri *Coynebacterium glutamicum*, sitrat sintase disandikan oleh *gltA*. Ekspresi gen tersebut diatur oleh faktor transkripsi RamA, RamB dan GlxR yang terletak di bagian hulu dari gen tersebut (van Ooyen et al., 2011).



Perbandingan hidrofobisitas CS *P. aeruginosa* SP 01 dengan *P. aeruginosa* PA01
Comparison of the hydrophobicity CS *P. SP 01*



P. aeruginosa SP01 dengan *P. fluorescens*
P. aeruginosa aeruginosa PA01



P. aeruginosa SP01 dengan *P. putida*
P. SP01 with *P. aeruginosa putida*.

Gambar 5. Analisis hidrofobisitas asam-asam amino penyusun sitrat sintase *P. aeruginosa* SP01 dengan *Pseudomonas* sp lainnya dengan metode Kyte and Doolittle.

Figure 5. Analysis of the hydrophobicity of the amino acids making up citrate synthase *P. aeruginosa* SP01 with the method of Kyte and other Doolittle.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Gen sitrat sintase telah berhasil diisolasi dari *Pseudomonas aeruginosa* SP01. Gen tersebut berukuran 1287 pb dan menyandikan 428 asam amino.
2. PaCS mempunyai kemiripan urutan asam amino dan hidrofobisitas dengan sitrat sintase *Pseudomonas aeruginosa* PA0. Kemiripan urutan dan hidrofobisitas ini mendukung kemiripan aktivitas antara kedua enzim sitrat sintase ini.

Ekspresi gen CS *P. aeruginosa* SP01 perlu diuji ekspresinya di dalam jaringan tanaman untuk mengetahui perannya dalam toleransi terhadap cekaman aluminium.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahemad, M., and M.S. Khan. 2010. Phosphate-solubilizing and plant-growth promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves green gram performance in quizalato-p-ethyl and clodinato-p amended soil. *Arch of Envir Contami and Toxicol* 58 (2): 361-372.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Scaffer, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-3402.
- Anoop, V.M., U. Basu, M.T. McCammon, L. McAlister-Henn, and G.J. Taylor 2003. Modulation of citrate metabolism alters aluminium tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132: 2205-2217.
- Atilla, C., A. Ueda, S.L. Cirillo, J.D. Chen, W. Chen, T.K. Wood. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence factors and poplar tree response in rhizosphere. *Micro Biotechnol* 1(1): 17-19.
- Barone, P., D. Rosellini, P. LaFayette, J. Bouton, F. Veronesi, and W. Parrott. 2008. Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfafa. *Plant Cell Rep* 27: 893-901.
- Bhayana, V. and H.W. Duckwork 1984. Amino acid sequencing of *E. coli citrate synthase*. *Biochem* 23: 2900-2905.
- Buch, A.B., G. Archana, and G. Naresh-Kumar. 2008. Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Res Microbiol* 159: 635-642.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., G.V. Bloemberg, and B.J.J. Lugtenberg. 2003. Phenazine and their role in bicontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol* 157: 503-523.
- Coenye, T., and P. Vandamme. 2003. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol. Lett* 228: 45-49.
- Darnell, J., H Lodish, and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. 2nd Edition . Scientific America Books. New York USA. 1105 p.
- de la Fuente, J.M., V. Ramire-Rondriguez, J.L. Cabrera-Ponce and L. Harrere-Estrell. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plant by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568.
- Delhaize, E., D.M. Hebb, and P.R. Ryan. 2001. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol* 125: 2059-2067.
- Donald, L.J., G.F. Molgat, and H.W. Duckworth. 1989. Cloning, sequencing, and expression of the gene for NADH sensitive citrate synthase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Bact* 171(10): 5542-5550.
- Hassett, D.J., W.A. Woodruff, D.J. Wozniak, M.L. Vasil, M.S. Cohen, and D.E. Ohman. 1993. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* sodA and sodB genes encoding manganese and iron cofactored superoxide dismutase: Increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *J. Bacteriol.* 7668-7665.

- Hernandez-Lucas, I., M. Rosel-Hernandez, L. Segovia, J. Rojas, E. Martinez-Romero. 2004. Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. *Syst. Appl. Microbiol* 27: 703-706.
- Idise, O.E., J.B. Ameh, S.E. Yakubu, and C.A. Okuofu. 2010. Biodegradation of a refinery effluent treated with organic fertilizer by modified strain of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Afric. J. Biotech* 9(22): 3298-3302.
- Jin, S. and A. Sonenshein. 1994. Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J. Bact* 176(15): 4680-4690.
- Khare, E. and Arora N.K. 2010. Effect of indol-3-acetic acid (IAA) produced by *Pseudomonas aeruginosa* in suppression of charcoal rot disease of chickpea. *Curr. Microbiol* 61(1): 64-68.
- Koyama, H., E. Takita, A. Kawamura, T. Harai, and D. Shibata. 1999. Overexpression of mitochondria citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell. Physiol* 40(5): 482-488.
- Lemire, J. R. Mailloux, C. Auger, D. Whalen, and V.D. Appana. 2010. *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminum toxicity. *Envir. Microb* 12(6): 1384-1390.
- Mailloux, R.J., J. Lemire, S. Kalyuzhnyi, and V. Appanna. 2008. A novel metabolic network leads to enhanced citrate biogenesis in *Pseudomonas fluorescens* exposed to aluminum toxicity. *Extremophiles* 12: 451-459.
- Marchesi, J.R., T.T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, D.Dymock, W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. & Envir. Mricob* 64(2): 795-799.
- Min, I.S., J.Y. Bang, S.W. Seo, C.H. Lee, and P.J. Maeng P.J. 2010. Differential expression of *cit A* gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans* in response to developmental status and carbon sources. *J. Microbiol* 48 (2): 188-198.
- Mitchell, C.G, S.C. Anderson, and E.L. el-Mansi. 1995. Purification and characterization of citrate synthase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J* 2: 507-511.
- Mundy, W.R., T.M. Freudenrich, and P.R.S. Kodavanti. 1997. Aluminum potentiates glutamate-induced calcium accumulation and iron-induced oxygen free radical formation in primary neuronal cultures. *Mol. and Chem. Neuropath* 32(1-3): 41-57.
- Park, B.W., K.H. Han, C.Y. Lee, C.H. Lee, P.J. Maeng. 1997. Cloning and characterization of the *citA* gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell* 7(2): 290-295.
- Roux, Raoult. 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the *Rickettsiae*. *Int. J. Syst. Bact* 47(2): 252-261.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning. A Manual Laboratory*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Suksomtip, M., P. Liu, T. Anderson, S. Tungpradapkul, D.W. Wood, and E.W. Nester. 2005. Citrate synthase mutants of *Agrobacterium* are attenuated in virulence and display reduced *vir* gene induction. *J. Bact* 187 (14): 4844-4856.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 4.0. *Mol. Biol. Evol* 24: 1596-1599.

- van Ooyen, J., D. Emer, M. Bussman, and M. Bott. 2011. Citrat synthase in *Corynebacterium glutamicum* is encoded by two *gltA* transcripts which are controlled by RamA, RamB and GlxR. *J. Biotech* 154(2-3): 140-148.
- Woose, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microb. Rev* 51(2): 221-271.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1990. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Microb* 173(2): 697-703.