

Analisis DNA *Bacillus* sp. BAC4 Hasil Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan Primer-Primer yang Dirancang dari Gen *pga*

Philips Onggowidjaja¹, Maelita Ramdani Moeis², Eddy Ratnaningsih³

¹Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha,

²Jurusan Biologi Institut Teknologi Bandung, ³Jurusan Kimia Institut Teknologi Bandung

Abstract

Bacillus sp. BAC4 DNA was amplified using PCR method employing primers designed from *pga* genes of 5 bacteria (*Arthrobacter viscosus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, and *Providentia rettgeri*). Analysis of DNA base direct sequencing of PCR products showed the highest homology of *Bacillus* sp. BAC4 DNA with *Bacillus subtilis* DNA at the region from *citG* to *yirG*. This fact states that primers designed from *pga* genes of 5 bacteria has not been successful in amplifying *Bacillus* sp. BAC4 *pga* gene, and that *Bacillus* sp. BAC4 *pga* gene is predicted to be quite different from the existing data of *pga* genes available at Genbank. Analysis of DNA base direct sequencing amplified using the *pga* primers shows the highest homology to the DNA of *Bacillus subtilis*.

Keywords : *Bacillus* sp. BAC4, PCR, *pga* gene, PCR, DNA base direct sequencing

Pendahuluan

Pembuatan antibiotik jenis baru merupakan salah satu upaya untuk menanggulangi masalah resistensi bakteri patogen. Antibiotik jenis baru dapat dibuat dari senyawa 6-APA (asam 6-aminopenisilinat) dengan menambahkan berbagai rantai samping. Senyawa 6-APA merupakan hasil hidrolisis penisilin G oleh enzim penisilin G asilase (PGA).¹ Enzim PGA dikenal dihasilkan oleh berbagai mikroba, baik bakteri maupun jamur.² Salah satu bakteri yang berpotensi menghasilkan PGA adalah *Bacillus* sp. BAC4 (selanjutnya disebut BAC4), yang ditemukan oleh Syamsuriputera.³ Analisis urutan basa DNA untuk mengetahui sejauh mana kemiripan gen *pga* BAC4 dengan gen-gen *pga* beberapa bakteri dilakukan dengan pendekatan Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan primer-primer yang

dirancang dari gen-gen *pga* 5 bakteri penghasil PGA, dengan harapan primer-primer ini mengamplifikasi sebagian fragmen gen *pga* BAC4.

Bahan dan Cara

Biakan BAC4 (bahan penelitian) dan *Bacillus megaterium* (kontrol positif) diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknik Kimia ITB.

Pencuplikan sampel untuk pembuatan kurva tumbuh biakan BAC4 dan kurva aktivitas PGA dilakukan bersamaan dari biakan yang sama, dalam selang waktu 1½ jam selama 26 jam. Biakan BAC4 ditumbuhkan dalam medium LB (Luria Bertani, produk SIGMA) dengan komposisi NaCl 1 %, *Bacto Tryptone* 1 %, ekstrak ragi 0,5 % (ditambah 1,5 % *Bacto Agar* untuk medium LB padat), pH 7. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C, agitasi 150

rpm. Uji aktivitas dilakukan dengan substrat Penisilin G (produk SIGMA), dengan penggabungan metode Balasingham untuk karakter enzim PGA dan metode Yatsimirskaya untuk pemeriksaan spektrofotometrik.^{4,5} Pengukuran OD₆₀₀ biakan sel untuk membuat kurva tumbuh dan OD₄₁₅ untuk membuat kurva aktivitas PGA dilakukan dengan spektrofotometer Shimadzu UV-120-02. Hasilnya adalah konversi nilai absorbansi pada uji aktivitas ke dalam nilai unit aktivitas. Dalam penelitian ini didapatkan persamaan, sebagai berikut:
 Nilai absorbansi dikonversikan ke dalam konsentrasi 6-APA (X) dengan persamaan regresi linier yang didapat dari pembuatan kurva standar:

$$X = \frac{Y + 0,0027}{0,7523}$$

Y = nilai absorbansi (A) terkoreksi (A - 0,19).

Nilai 0,19 adalah absorbansi blangko. Nilai X dikalikan dengan faktor 2250, untuk menghasilkan nilai aktivitas PGA dalam satuan $\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{l}$ (U/l).

Isolasi DNA BAC4 maupun *B. megaterium* dilakukan menggunakan reagen-reagen produk SIGMA menurut metode Wang.⁶ Pengukuran OD_{260/280} untuk penentuan konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan spektrofotometer Shimadzu UV-120-02.

PCR dilakukan dengan pasangan primer PGA (FPGA dan RPGA) yang dibuat oleh Pacific Oligos. Urutan pasangan primer tersebut, dari arah 5' ke 3', adalah sebagai berikut :

FPGA :
 GCA MAR GAY CGM CTD TTC CA

(T_m = 58°C)
 RPGA :
 RTY DCC GTY YWY ATC TGC RTA
 (T_m = 56,6°C)

Catatan :

R = A atau G
 M = A atau C
 Y = C atau T
 D = A, G, atau T
 W = A atau T

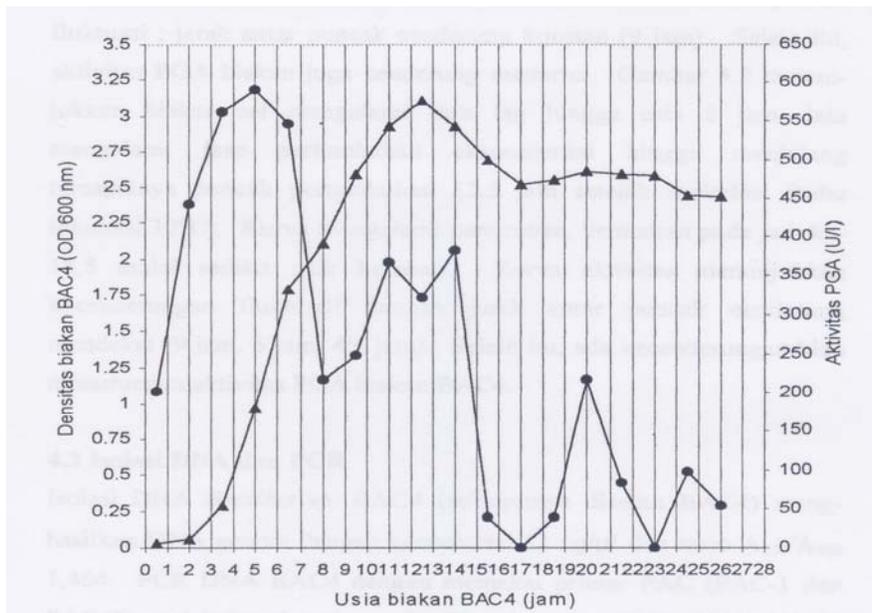
PCR dilakukan secara *hot start*, dengan kondisi: denaturasi 94°C, 1 menit; pelekatan 38 - 51°C, 1 menit; polimerisasi 72°C, 30 - 90 detik; sebanyak 30 siklus (reagen-reagen adalah produk Pharmacia) menggunakan alat *thermocycler* Perkin Elmer P 14416. Pemurnian DNA dilakukan dari gel elektroforesis menggunakan kit kolom GFX (Pharmacia). Pengurutan basa DNA hasil PCR dilakukan menurut metode dideoksi Sanger menggunakan kit reaksi pengurutan basa DNA (Perkin Elmer) dan alat pengurut basa DNA otomatis ABI 373A.

Komponen reaksi polimerisasi untuk reaksi pengurutan basa DNA adalah: primer FPGA atau RPGA 2,4 pmol, DNA 257 ng, *ABI Sequencing Kit* (terdiri atas: pewarna terminator-A, -C, -G, dan -T; dITP, dATP, dCTP, dan dTTP; Tris.Cl pH 9,0, MgCl₂, pirofosfatase tahan panas, dan polimerase DNA Amplitaq) 6 μl , dan air deion steril ditambahkan hingga volume akhir total 15 μl . Hasil pengurutan basa DNA dicari homologinya pada berbagai urutan DNA yang tersedia pada berbagai sumber data melalui internet (termasuk *GenBank* pada alamat www.ncbi.nlm.nih.gov).

Hasil dan Pembahasan

Biakan BAC4 mengalami fase lag hingga usia 2 jam, lalu memasuki fase eksponensial hingga menjelang tercapainya puncak pertumbuhan biakan 12,5 jam setelah inokulasi (suhu inkubasi 30°C). Kurva tumbuh menunjukkan penurunan, kemudian pada jam ke-18,5 mulai menunjukkan sedikit kenaikan. Kurva aktivitas

menunjukkan kecenderungan fluktuatif dengan jarak antar puncak cenderung kian mendekat (9 jam, 6 jam, 4 ½ jam). Selain itu, ada kecenderungan kian menurunnya aktivitas PGA biakan BAC4. Kurva tumbuh biakan BAC4 dan kurva aktivitas enzim PGA-nya (dengan substrat Penisilin G) dapat dilihat pada Gambar 1.



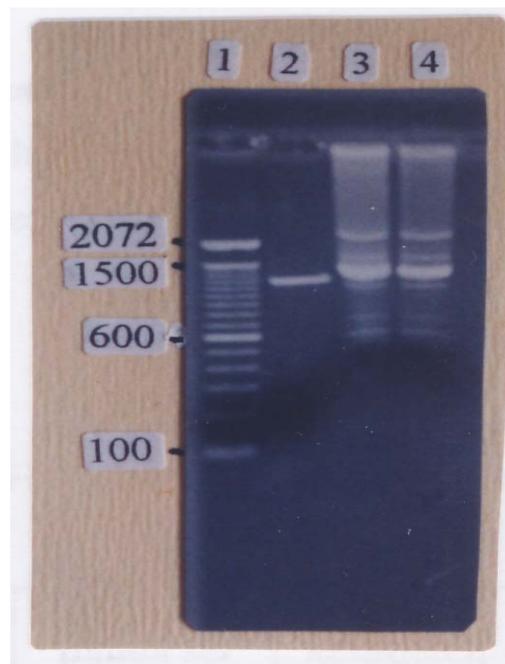
Gambar 1. Kurva tumbuh biakan BAC4 dan kurva aktivitas enzim PGA (Substrat Penisilin G)

Keterangan :

- ▲ = densitas biakan BAC4 (OD₆₀₀)
- = aktivitas PGA (U/l)

Hasil uji aktivitas dengan substrat penisilin G menunjukkan bahwa puncak produksi enzim penisilin G asilase (PGA) biakan BAC4 dicapai ketika biakan berada pada fase eksponensial, puncak-puncaknya berada pada fase kematian. Menurut Syamsuriputera, kurva aktivitas PGA berhubungan dengan kurva pertumbuhannya.³ Bila biakan BAC4 diinkubasi pada suhu 41°C (suhu optimum pertumbuhan BAC4), puncak produksi PGA-nya berada pada awal fase stasioner, sedangkan pada suhu 30°C, puncak produksi PGA dicapai

pada fase eksponensial. Ketidakstabilan produksi PGA dapat disebabkan oleh aktivitas protease yang juga dihasilkan secara ekstraseluler oleh galur ini.⁷ Protease ini mendegradasi protein-protein, termasuk enzim PGA. Puncak-puncak aktivitas PGA yang kian menurun dapat disebabkan oleh kian menipisnya persediaan nutrisi dan dapat pula dikaitkan dengan kian berkurangnya sel yang hidup. Sementara itu, jarak antar puncak yang kian berkurang mungkin disebabkan oleh aktivitas protease yang kian terakumulasi pada biakan tua.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis DNA Hasil PCR dengan Pasangan Primer PGA

Keterangan :

1 = 100 bp DNA ladder

2 = larik DNA hasil PCR DNA *Bacillus megaterium* (kontrol positif)

3, 4 = larik-larik DNA hasil PCR DNA BAC4

Proses isolasi DNA *Bacillus* sp. BAC4 menghasilkan DNA genom dengan konsentrasi 82 ng/ μ l dan rasio $A_{260}/A_{280} = 1,464$. PCR DNA BAC4 dengan memakai pasangan primer PGA (FPGA dan RPGA) pada kondisi optimum (denaturasi 94°C, 1 menit; pelekatan 45°C, 1 menit; polimerisasi 72°C, 1 menit; 30 siklus) menghasilkan 6 larik DNA (Gambar 2), berukuran kira-kira 0,6 kb, 0,75 kb, 1,1 kb, 1,3 kb (paling tebal), 1,6 kb, dan 2,2 kb. PCR dengan DNA *Bacillus megaterium* menghasilkan larik tunggal berukuran 1,2 kb. PCR dengan salah satu primer tidak menghasilkan pita samasekali.

Pemurnian larik DNA hasil PCR dari gel agarosa menghasilkan larutan DNA dengan konsentrasi 33 ng/ μ l, rasio $OD_{260/280} = 1,435$. Reaksi pengurutan

basa DNA langsung hasil PCR menghasilkan dua macam urutan nukleotida, masing-masing merupakan hasil pengurutan basa DNA dengan primer FPGA dan RPGA, seperti disajikan dalam Gambar 3.

DNA templat yang didapatkan untuk PCR tidak terlalu murni, namun dapat digunakan untuk menghasilkan larik-larik DNA secara konsisten. PCR dengan menggunakan salah satu primer dilakukan dengan tujuan memastikan bahwa larik-larik DNA berukuran tertentu memang dihasilkan dari proses amplifikasi menggunakan sepasang primer. PCR dengan pasangan primer PGA (FPGA dan RPGA) menghasilkan 6 larik DNA; diperkirakan hal ini menunjukkan keunikan urutan DNA gen *pga* BAC4.

Urutan nukleotida DNA BAC4 menggunakan primer FPGA

```

5'  GAGAAGATACCTGCTGAAAATATGGGGCCATGATTATTICGGCACTGACCGGGTGGTCCG 3'
      10          20          30          40          50          60
5'  ATGATCTTGIGCGGAGGCTGAGAAAAAAATGCCCGGGTAAAGGTTGAGACCATTACG 3'
      70          80          90          100         110         120
5'  GATTCCGGCTACAGGATGATGACGTCATGAAAATAAGCCGCTTGCTTTTCAAATTTGGGT 3'
      130         140         150         160         170         180
5'  GGTCATCTCAGGCATCCTCTANCCATTTGATTCTGCTTCTCCTGCTGTTCTCAAAATAC 3'
      190         200         210         220         230         240
5'  CCTGCGTCATTTTTCACNGATNAAAC 3'
      250         260
  
```

Urutan nukleotida DNA BAC4 menggunakan primer RPGA

```

5'  CCNCGCGGATTTGATTTTCGAGAATGTTTTCAAGAAGTTTGCTCCATTGTTCCGGATCAC 3'
      10          20          30          40          50          60
5'  CGGGCATCATAATACATCTCTGTATCAACGGTCCACGATAATTCCTTCCGGGCCATT 3'
      70          80          90          100         110         120
5'  TGAGCCGTTCAATGACTTCTTCCGTGACCTTCACAATGTCAAATGTCTCATGGTGCACCC 3'
      130         140         150         160         170         180
5'  GCTGCTTCATAAATAATCAAGCTTCGTTAAATATAATAATCCTTAATTTCTTCTCAA 3'
      190         200         210         220         230         240
5'  GTTTTCTGCTTCGCCTTCAATGACATCAATTGIGGTTTCCAGATCCCCCTTAGGAAAAA 3'
      250         260         270         280         290         300
5'  TCCCGTCTTATTGATTGAGTATAGCCCCATTATCACATGACAGGCGTTTTAAATCATG 3'
      310         320         330         340         350         360
  
```

Gambar 3. Hasil Pengurutan Basa DNA BAC4 menggunakan Primer FPGA (267 nukleotida) (atas) dan Primer RPGA (360 nukleotida) (bawah)

Keunikan ini menyebabkan pasangan primer yang dirancang tidak cukup spesifik untuk mengamplifikasi sebagian dari gen *pga* BAC4. Dugaan ini diperkuat dengan rendahnya suhu pelekatan tertinggi yang bisa digunakan untuk dapat menghasilkan larik DNA (45°C). Dari 6 larik DNA, larik DNA yang berukuran 1,3 kb dipilih untuk ditentukan urutan basanya, karena paling mendekati ukuran larik DNA yang diperoleh melalui PCR DNA *Bacillus megaterium* (kontrol positif), yaitu sekitar 1,2 kb.

Hasil analisis perangkat lunak komputer atas homologi DNA BAC4 hasil pengurutan basa dengan primer FPGA dan RPGA, berturut-turut disajikan dalam Tabel 1 dan Tabel 2

Hasil pengurutan langsung dari basa DNA hasil PCR menyajikan

beberapa fakta, misalnya dari aspek taksonomi molekuler. Data yang diperoleh belum memadai untuk membicarakan aspek ini secara khusus. Untuk sementara, data yang diperoleh menyatakan, bahwa secara molekuler, DNA BAC4 hasil PCR menunjukkan homologi tertinggi dengan DNA *Bacillus subtilis*. Penelitian yang dilakukan oleh Pancasakti pada tahun 1999 menunjukkan bahwa BAC4 dan *Bacillus subtilis* adalah bakteri yang sama.⁸ Hasil PCR belum bisa dibandingkan secara penuh dengan DNA *Bacillus megaterium*, karena genom total *B. megaterium* belum lengkap diketahui. Meskipun demikian, berdasarkan aspek taksonomi konvensional ukuran sel BAC4 lebih menyerupai ukuran *B. megaterium*.⁸

Tabel 1. Hasil Analisis Homologi antara DNA BAC4 Hasil Pengurutan Basa menggunakan Primer FPGA (267 basa) dan Urutan Basa DNA pada *GenBank*

No	Sumber DNA yang homolog	Porsi homologi	Homologi (%)
1	Genom lengkap <i>Bacillus subtilis</i>	96/113	84
2	Fragmen DNA 42,7 kb <i>B. subtilis</i> (yvvsA-yvqA)	96/113	84
3	Fragmen DNA genomic <i>B. subtilis</i> (citG-yirG)	96/113	84
4	Urutan DNA manusia (<i>Homo sapiens</i>) dari klon 596C3	22/23	95
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> D (<i>pvdD</i>), gen reseptor feripyoverdin (<i>fpvA</i>), pyoverdine sintetase E (<i>pvdE</i>), & pyoverdin sintetase F (<i>pvdF</i>)	19/19	100
6	Urutan lengkap <i>Pan troglodytes</i> 12cp 12 BAC RPC 143-135M19	19/19	100
7	Gen reseptor feripyoverdin (<i>fpvA</i>) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19/19	100
8	Gen nitrit oksida sintetase (NOS) <i>Oryctolagus cuniculus</i>	18/18	100
9	SF-assembly mRNA dari <i>Chlamydomonas eugametos</i>	21/22	95
10	DNA kosmid 165K09 <i>Fugu rubripes</i> untuk gen GRM7, TRIP, Sand, & PRGFR3	18/18	100

Tabel 2. Hasil Analisis Homologi antara DNA BAC4 Hasil Pengurutan Basa Menggunakan Primer RPGA (360 basa) dan Urutan Basa DNA pada *GenBank*

No	Sumber DNA yang homolog	Porsi homologi	Homologi (%)
1	Fragmen DNA 42,7 kb <i>Bacillus subtilis</i> (<i>yvsA-yvqA</i>), no. 40913 - 41083	144/171	84
2	Idem, no. 40727 - 40791	57/65	87
3	Genom lengkap <i>B. subtilis</i> , no. 189374 - 189204	144/171	84
4	Idem, no. 189560 - 189496	57/65	87
5	Fragmen DNA genomik <i>B. subtilis</i> (<i>citG-yirG</i>), no. 2429 - 2599	144/171	84
6	Idem, no. 2243 - 2307	57/65	87
7	Kromosom-4 <i>Arabidopsis thaliana</i> , BAC klon F19B15	20/20	100
8	Kromosom-4 <i>A. thaliana</i> , BAC klon F25024	20/20	100
9	Gen protein A1M1 <i>A. thaliana</i>	20/20	100
10	Protein M17 melimpah tahap embriogenesis akhir, protein M10, dan gen-gen striktosidin sintetase (STS) "putative" <i>A. thaliana</i>	19/19	100

Larik DNA paling tebal yang diurutkan biasanya ternyata bukan merupakan bagian dari gen *pga* BAC4. Salah satu larik DNA yang lebih tipis, berukuran kira-kira 1,1 kb, bisa saja merupakan bagian gen yang diharapkan. Hal ini berarti, bahwa pasangan primer yang digunakan dalam PCR lebih cocok dengan bagian DNA yang bukan merupakan gen *pga* dari galur ini.

Urutan DNA BAC4 hasil pengurutan langsung basa DNA dengan primer RPGA maupun FPGA mempunyai homologi dengan genom *B. subtilis*. Urutan basa *B. subtilis* no. 2429 - 2599 ternyata homolog (84 %) dengan urutan basa hasil pengurutan basa dengan primer RPGA. Urutan basa *B. subtilis* no. 3278 - 3390 ternyata homolog (84 %) juga dengan urutan basa hasil pengurutan basa DNA dengan primer FPGA (Gambar 4).

Analisis keberadaan *Open reading frame* (ORF) menghasilkan

dugaan, bahwa urutan 267 basa yang diurutkan dengan bantuan primer FPGA mencakup 119 basa yang termasuk *putative ORF* dan 148 sisanya mencakup daerah di antara 2 *putative ORF*.

Simpulan

Pasangan primer PGA yang dirancang dari urutan asam amino enzim PGA dari 5 bakteri penghasil enzim ini belum berhasil mengamplifikasi gen *pga* BAC4. Hasil pengurutan basa DNA tidak menunjukkan homologi dengan gen *pga* bakteri manapun. Gen *pga* BAC4 diperkirakan sangat berbeda dari gen-gen *pga* bakteri lain yang datanya tersedia pada *GenBank* selama penelitian ini dilakukan. Analisis hasil pengurutan basa DNA yang diamplifikasi dengan pasangan primer PGA menunjukkan homologi tertinggi dengan DNA *Bacillus subtilis*.

