

**PROBLEMATIKA PENUMBUHAN *Alteromonas luteoviolaceus* PENGHASIL MARINE ANTIBIOTIK
PENTABROMPSEUDILIN DALAM MEDIUM M₁⁺ dan DIFCO MARINE 2216
beserta ISOLASI DNA GENOMIKNYA**

Sri Mulyani¹ dan Okid Parama Astirin²

¹Prodi P.Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS Surakarta

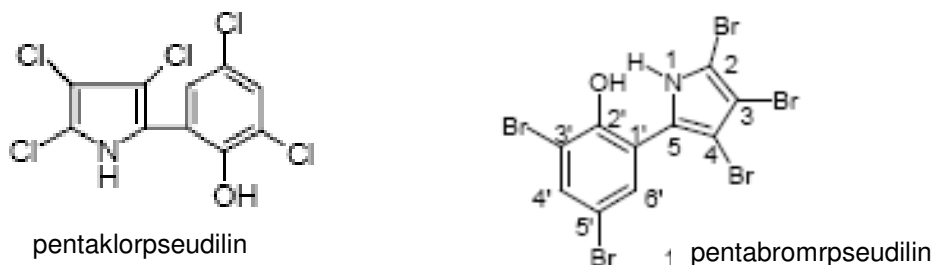
²Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari kondisi dalam menumbuhkan kultur *Alteromonas luteoviolaceus* dan mengisolasi DNA genomiknya sebagai langkah awal dalam penelitian dengan tema Identifikasi Gen Halogenase dari *A. luteoviolaceus* Penghasil Antibiotik Penta-brompseudilin Secara Hibridisasi. Penelitian ini bersifat eksploratif dengan disain penelitian faktor tunggal yang dianalisis secara kualitatif. Penumbuhan *A. luteoviolaceus* dilakukan dalam medium M₁⁺ yang dimodifikasi dan dalam Difco Marine Broth 2216. Isolasi DNA genom *A. luteoviolaceus* dengan dua prosedur, yaitu (1) dengan prosedur salting out (Pospiech and Neuman, 1995) dan (2) dengan prosedur Kirby mix dari (Hopwood *et al.*, 1985). Hasil penelitian menunjukkan bahwa marine bakteri *A. luteoviolaceus* dapat ditumbuhkan dalam medium M₁⁺ modifikasi pada 27-30°C selama 2-7 hari sedangkan dalam Marine Broth 2216 pada hari ke 3 terjadi penurunan pertumbuhan. Pertumbuhan dapat dipercepat dengan meletakkan spiral pada dasar Erlenmeyer yang digunakan. Isolasi DNA genom *Actinoplane sp* berhasil dilakukan dengan prosedur Kirby mix yang kulturnya ditumbuhkan dalam medium cair M₁⁺ modifikasi selama maksimum 2 hari. Dengan waktu inkubasi lebih dari 2 hari DNA genom tersebut sulit diperoleh. Meskipun dengan waktu inkubasi sampai 2 hari DNA genom juga tidak diperoleh jika diisolasi dengan prosedur salting out. Isolasi DNA genom *Actinoplane sp* juga tidak memperoleh hasil bila ditumbuhkan pada Difco Marine Broth 2216 selama 2 hari baik dengan prosedur salting out maupun Kirby mix.

PENDAHULUAN

Pentabrompseudilin dan pentaklorpseudilin adalah dua antibiotik yang mempunyai struktu yang identik (Gambar 1). Keduanya mengandung cincin pirrol dan fenil, hanya berbeda pada atom halogen yang diikatnya. Dua atom brom pada pentabrompseudilin diikat oleh cincin fenil sedangkan 3 atom brom lainnya diikat pada cincin pirrol.



Gambar 1. Struktur pentaklorpseudilin dan pentabrompseudilin.

Pentaklorpseudilin diproduksi oleh bakteri *Actinoplanes sp.* ATCC 33002 (Cavalleri *et al.*, 1978), sedangkan pentabrompseudilin diproduksi oleh *Alteromonas luteoviolaceus* (Peschke, 1997). Biosintesis gen kluster pentapseudilin sudah di isolasi dan postulat jalur biosintesis pentaklorpseudilin sudah dirumuskan tetapi belum dipublikasi (Mann, 2005). Karena kemiripan strukturnya maka ada dugaan bahwa ada kemiripan jalur biosintesis pentabrompseudilin pada *A. luteoviolaceus* dengan jalur biosintesis pentaklorpseudilin pada *Actinoplanes sp.* Diantaranya adalah bahwa cincin pirrol diturunkan dari prolin melalui intermediet pirrol-2-karboksilat. Akan tetapi berdasarkan *feeding* studi terhadap *A. luteoviolaceus* diduga bahwa cincin pirrol dari pentabrompseudilin diturunkan dari prolin melalui jalur khusus yang detailnya sampai saat ini masih diteliti (Peschke, 2005). Biosintesis gen kluster pentabrompseudilin sampai saat ini belum dielusidasi.

Untuk investigasi jalur biosintesis suatu metabolit ada beberapa pendekatan yang bisa dilakukan diantaranya adalah (1) ekspresi heterologous dan karakterisasi protein dengan substratnya atau (2) inaktivasi gen-gene yang terlibat dalam biosintesis metabolit dan karakterisasi metabolit-metabolit yang disekresikan ke dalam medium (Sri Mulyani dan van Pee, 2006). Untuk melakukan hal itu dan untuk membuktikan apakah ada kemiripan jalur biosintesis antara kedua senyawa berhalogen tersebut, maka perlu dilakukan pemeriksaan secara genetis, diantaranya melalui identifikasi dan karakterisasi biosintesis gen kluster dari pentabrompseudilin. Langkah awal dari pengerjaan ini adalah menumbuhkan *A.luteoviolaceus* dan mengisolasi DNA genomiknya. Oleh karena *A.luteoviolaceus* adalah bakteri yang diisolasi dari laut maka apakah untuk menumbuhkannya invitro dengan medium yang disarankan dapat dilaksakan? dan bagaimanakah mengisolasi DNA genomnya ?



METODOLOGI

Medium untuk *Alteromonas luteoviolaceus* yang digunakan:

Medium Difco Marine Agar 2216

Bacto peptone	5.00 g
Bacto yeast extract	1.00 g
Fe(III) citrate	0.10 g
NaCl	19.45 g
MgCl ₂ (dried)	5.90 g
Na ₂ SO ₄	3.24 g
CaCl ₂	1.80 g
KCl	0.55 g
Na ₂ CO ₃	0.16 g
KBr	0.08 g
SrCl ₂	34.00 mg
H ₃ BO ₃	22.00 mg
Na-silicate	4.00 mg
NaF	2.40 mg
(NH ₄)NO ₃	1.60 mg
Na ₂ HPO ₄	8.00 mg

Distilled water 1000.00 ml

Final pH should be 7.6 ± 0.2 at 25°C.

Jika menggunakan complete medium dari Difco tambahkan 37.4 g pada 1 liter air.

Marine Agar (Medium 123 DSMZ), Medium M₁⁺

Pada 1000 ml "Synthetic sea water" tambahkan 5 g Bacto Peptone, 1 g Bacto Yeast extract, dan 15 g agar.

Synthetic sea water:

NaCl	24.00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	11.00 g
Na ₂ SO ₄	4.00 g
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	2.00 g
KCl	0.70 g
KBr	0.10 g
H ₃ BO ₃	0.03 g
NaSiO ₃ x 9 H ₂ O	5.00 mg
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0.04 g
NaF	3.00 mg
NH ₄ NO ₃	2.00 mg
Fe ₃ PO ₄ x 4 H ₂ O	1.00 mg

Air destilat 1000.00 ml

Set pH to 7.8.

Medium M₁⁺ agar modifikasi

Peptone	5 g
Yeast extract	3 g
Agar	18 g
Air laut sintesis ^{*)}	750 ml
Air destilat/keran / biasa	250 ml

^{*)} Air laut sintesis (untuk 1 liter aquades)

Natrium chloride NaCl	24	g
Magnesium hexahydrat MgCl ₂ x 6H ₂ O	11	g
Natrium sulfat Na ₂ SO ₄	4	g
Calciumchlorid hexahydrat CaCl ₂ x 6H ₂ O	2	g
Kaliumchlorid KCl	0,7	g
Boric acid H ₃ BO ₃	30	mg
Natriummetasilikat nonahydrat NaSiO ₃ x 9H ₂ O	5	mg



Strontiumchlorid hexahydrat $\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	40	mg
Natriumflourid NaF	3	mg
Ammoniumnitrat NH_4NO_3	2	mg
Feri (III)-phosphat tetrahydrat $\text{FePO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1	mg

Strain Bakteri dan Kondisi Kultur

A. luteoviolaceus dikultur dalam variasi medium padat, yaitu: (1) M_1^+ agar sesuai referensi (DSMZ GmbH, 2004) yang mengandung bromida, selama lebih dari 4 hari, (2) M_1^+ agar modifikasi tidak mengandung bromida dengan menggunakan air destilat diinkubasi selama lebih dari 4 hari, (3) M_1^+ agar modifikasi tidak mengandung bromida dan menggunakan air pam (PDAM), diinkubasi selama 2-3 hari, dan (4) difco marine agar 2216. Masing-masing penumbuhan dilakukan pada suhu ruang ($25 - 30^\circ\text{C}$) dan dibungkus dengan alu foli.

Preparasi DNA Genom *A. luteoviolaceus*

DNA genom dari *A. luteoviolaceus* diisolasi dengan dua prosedur, yaitu (1) dengan prosedur salting out (Pospiech and Neuman, 1995) dan (2) dengan prosedur Kirby mix dari (Hopwood *et al.*, 1985). Untuk isolasi DNA genom *A. luteoviolaceus* ditumbuhkan dalam beberapa variasi medium cair, yaitu: (1) M_1^+ , (2) M_1^+ broth modifikasi, (3) difco marine broth 2216. Inkubasi dilakukan pada suhu 28°C selama maksimum 2 hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

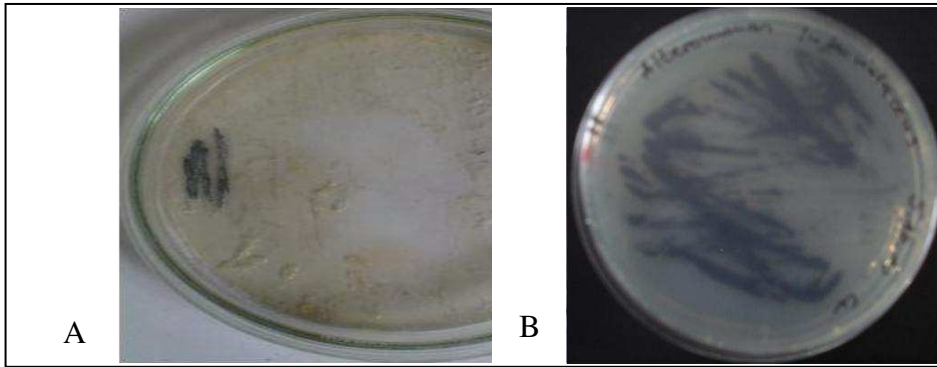
Penumbuhan Marine Bakteri *A. luteoviolaceus*

Untuk rekultur bakteri *A. luteoviolaceus* pada tahap pertama mengalami kesulitan. Bakteri diperoleh dari TUD Dresden dalam bentuk liofilisasi yang dikirim melalui pos udara dalam perjalanan memakan waktu 2 minggu. Penumbuhan bakteri *A. luteoviolaceus* pada medium M_1^+ cair sesuai referensi (DSMZ GmbH, 2004) setelah hari kedua mulai tumbuh, dan setelah hari kelima tidak menunjukkan adanya pertumbuhan yang ditandai dengan menurunkan kepekatan kultur, kemudian dilakukan percobaan untuk isolasi DNANYA dengan metode Frenkel namun tidak ada hasil.

Pada medium M_1^+ agar menunjukkan sedikit pertumbuhan (gambar 1A) setelah hari keempat dan setelah dilakukan replat pada medium yang baru tidak ada pertumbuhan meski sudah diinkubasi lebih dari tujuh hari. Penumbuhan diulang dengan mendatangkan kultur baru. Pada medium M_1^+ agar sampai hari kedua masih ada pertumbuhan namun setelah hari keempat, pertumbuhan *A. luteoviolaceus* tidak stabil. Dengan berbagai analisis kemudian diketahui adanya brom dalam medium menyebabkan dihasilkan zat tertentu yang menyebabkan pertumbuhan bakteri ini tidak stabil. Selanjutnya komponen air laut sintesis dibuat tanpa mengandung brom dan bisa tumbuh stabil dalam medium agar tetapi tidak dalam medium cair. Brom ditambahkan sebanyak 50 gr bila dibutuhkan untuk produksi pentabrompseudilin dan hanya bisa hidup untuk 2-3 hari. Selanjutnya dilakukan modifikasi dengan memperbanyak jumlah pepton yang tadinya hanya 3 g/l menjadi menjadi 5g/L medium, dan melarutkannya dengan menggunakan air PDAM maupun air destilat, kultur bisa tumbuh stabil dalam medium cair maupun padat dan waktu inkubasi menjadi lebih cepat yaitu 2-3 hari. Agitasi dalam medium cair diperbaiki dengan menempatkan spiral di dasar Erlenmeyer.

Permasalahan penumbuhan bakteri *A. luteoviolaceus* muncul lagi setelah replat dalam medium M_1^+ agar maupun M_1^+ agar modifikasi dilakukan setelah 2 minggu atau lebih maupun jika menggunakan stok medium agar yang dibuat lebih dari 1 bulan. Bakteri tumbuh tidak stabil. Setelah dilakukan berkali kali pengulangan dengan menumbuhkan bakteri pada medium marine agar 2216 tidak lebih dari 3 hari dan mereplatennya pada medium M_1^+ agar modifikasi yang baru dan stoknya tidak lebih dari 1 bulan akhirnya diperoleh pertumbuhan yang stabil (Gambar 1B). Akhirnya untuk memelihara pertumbuhan bakteri *A. luteoviolaceus* secara rutin dilakukan dengan menumbuhkannya dalam medium M_1^+ agar modifikasi dan diinkubasi pada suhu kamar dengan dibungkus kertas atau alu foli karena bakteri ini sensitif dengan cahaya. Replate dilakukan tiap minggu dengan menggunakan stok medium tidak lebih satu bulan. Jika bakteri menunjukkan gejala kematian dilakukn replat segera dalam medium marine agar 2216 dan segera dalam waktu 2-3 hari di replat dalam medium M_1^+ agar modifikasi. Selanjutnya replat dapat dilakukan tiap minggu lagi.





Gambar 1. Kultur *A. luteoviolaceus*, dalam medium agar M_1^+ modifikasi (A) replat dilakukan setelah inkubasi 2 minggu, dan (2) replat dilakukan paling lambat setiap minggu.

Isolasi DNA Genom dari Bakteri *A. luteoviolaceus*

Isolasi DNA genom *A. luteoviolaceus* pada tahap awal dilakukan dengan metode Frenkel yang biasa dilakukan untuk isolasi DNA genomik dari bakteri pada umumnya (Sambrook et al, 1989; Sri Mulyani, et al, 1995). Akan tetapi tidak diperoleh DNA yang dimaksud. Tambahan permasalahan muncul ketika dilakukan pengulangan penumbuhan dalam medium cair. Kultur tidak tumbuh bagus dalam medium cair jika kultur dari medium agar sudah berusia lebih dari 2 minggu. Untuk mendapatkan kultur yang baik harus digunakan kultur segar yang berusia kurang dari 1 minggu dari medium agar.

Kultur segar dari medium agar ditanam dalam medium M_1^+ broth modifikasi diinkubasi selama 2 hari. Bakteri tumbuh bagus kemudian dilakukan isolasi DNA genom dengan menggunakan prosedur salting out akan tetapi tidak diperoleh DNA. Kemudian dilakukan pengulangan penumbuhan bakteri dengan waktu inkubasi 3 hari dengan tujuan agar diperoleh sel yang cukup banyak kemudian dilakukan isolasi dengan prosedur Kirby mix namun DNA yang diharapkan tidak dapat diperoleh juga. Penumbuhan diulang lagi dengan waktu inkubasi dipersingkat tidak lebih dari 2 hari dan kemudian dilakukan isolasi dengan prosedur Kirby mix. DNA genom *A. luteoviolaceus* dapat diperoleh. Dengan kondisi pertumbuhan yang sama tetapi dengan menggunakan medium cair marine broth 2216 dan dengan prosedur Kirby mix yang sama DNA genom *A. luteoviolaceus* tidak dapat diperoleh. Kami mencoba berasumsi kemungkinan penggunaan medium yang berbeda tersebut mempengaruhi pembentukan dinding sel bakteri tersebut. Kemungkinan yang lain dengan tidak adanya brom dalam medium M_1^+ yang dimodifikasi menghasilkan zat tertentu yang memudahkan dinding sel bakteri *A. luteoviolaceus* untuk dirusak/dilisis dengan prosedur Kirby mix sehingga DNA genom dapat diisolasi. Adanya perbedaan zat yang diproduksi dalam kedua medium (yang mengandung maupun yang tidak mengandung brom) sangat tampak dalam warna buih yang dihasilkan selama penumbuhan.

Kultur *A. luteoviolaceus* yang ditumbuhkan dalam medium marine broth 2216 warna selnya hitam dan buih yang timbul selama inkubasi dalam shaker berwarna putih. Sedangkan yang ditumbuhkan dalam medium M_1^+ broth modifikasi buih yang ditimbulkannya berwarna ungu (Gambar 2).



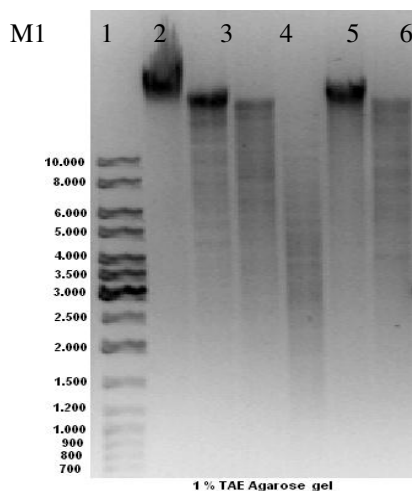
Gambar 2. Kultur *A. luteoviolaceus*, dalam medium marine broth 2216 (A) dan dalam medium M_1^+ broth modifikasi setelah diinkubasi 2 hari.

Pada penumbuhan bakteri *A. luteoviolaceus* dengan waktu inkubasi lebih dari 2 hari DNA genomnya sulit diperoleh dengan prosedur Kirby mix. Untuk hal ini kami berasumsi barangkali selnya terlalu tua sehingga susah untuk dilisis dengan metode tersebut. Kemungkinan karakteristik dinding sel bakteri *A. luteoviolaceus* sangat berbeda nyata dengan bakteri golongan *Streptomyces* pada umumnya. DNA genom bakteri-bakteri *Streptomyces* yang diisolasi dari darat sangat mudah diperoleh dengan prosedur salting out maupun Kirby mix meski inkubasi kultur dilakukan selama 4 hari. Hal ini sangat dimungkinkan karena bakteri



A. luteoviolaceus diisolasi dari laut dan tentunya mempunyai struktur dinding yang khusus agar bisa survive dalam kondisi medium berkadar garam tinggi.

Gambar 3 dibawah ini adalah hasil isolasi DNA genom *A. luteoviolaceus* yang diperoleh dengan prosedur Kirby mix dari kultur yang ditumbuhkan dalam medium M_1^+ broth yang dimodifikasi selama 2 hari. belum dipotong dengan enzim restriksi dan yang telah dipotong dengan enzim *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I dan *Sac*I.



Gambar 3. Hasil isolasi DNA genom *A. luteoviolaceus*. M1 adalah DNA marker, line 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 masing-masing adalah DNA genom *A. luteoviolaceus* yang belum dipotong, yang dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I dan *Sac*I.

Dari gambar 3 tampak bahwa dengan menggunakan enzim restriksi *Hind*III diperoleh pita pita lebih dengan ukuran lebih pendek dan banyak bila dibandingkan dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi *Pst*I. Pemotongan DNA dengan enzim *Eco*RI dan *Sac*I menghasilkan pita-pita dengan ukuran yang hampir sama.

KESIMPULAN

Marine bakteri *A. luteoviolaceus* dapat ditumbuhkan dalam medium M_1^+ modifikasi pada 25-30°C selama 2-3 hari. Isolasi DNA genom *Actinoplane sp* berhasil dilakukan dengan prosedur Kirby mix (Hopwood, et al., 1985) yang kulturnya ditumbuhkan dalam medium cair M_1^+ modifikasi selama maksimum 2 hari, pertumbuhan dapat dipercepat dengan meletakkan spiral pada dasar Erlenmeyer yang digunakan. Jika waktu inkubasi lebih dari 2 hari maka DNA genom akan sulit diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, England
- Mann, K. (2005). *Molekulargenetische Untersuchungen zur Biosynthese des Antibiotikums Pentachlorpseudilin*. Dissertation, Technische Universität Dresden.
- Peschke, J.D., Hanefeld, U. and Laatsch H. (2005). *Biosynthesis of the marine antibiotic pentabromopseudilin*, 2. The pterole ring. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69: 628-630
- Peschke, J. C. (1997). *Biosynthesen mariner Naturstoffe – Untersuchungen zur Bildung des Phenylpyrrols Pentabromopseudilin*. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Pospiech, A. and Neumann, B. (1995). *A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria*, *Trends in Genetics* 11 (1995), pp. 217–218.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sri Mulyani, Muktiningsih, Ari Rudiretna, Achmad Syaifuddin Noer, Muhammad Wirahadikusumah, and Oei Ban Liang (1995). Urutan Nukleotida Fragmen DNA Lokus *pyrA* *Salmonella typhimurium*, The Second ITB-UKM Joint Seminar On Chemistry, ITB Bandung, 28-29 Juni, pp 443-460
- Sri Mulyani dan K.-H. van Pee (2006). Biosintesis Antibiotik Glikopeptida pada *Amiclatopsis balhimycina*: β -Hydroxytyrosine sebagai Monomer Balhimycin. Annual Scientific Meeting 2006, *Indonesian Society for Microbiology*, Surakarta, 26-27 Agustus.

PERTANYAAN

Penanya: Erlina

Mengapa menggunakan air laut sintetik?

Jawab:

Menggunakan air laut sintetik karena disesuaikan dengan kondisi asli laut, beserta kandungan – kandungan air laut tersebut, kandungan marine broad yang digunakan untuk menghidupkan bakteri diambil dari laut.

