



DETEKSI GEN NRPS AKTINOMISETES SIMBION RUMPUT LAUT DAN KARANG LUNAK

Riyanti¹, Saefuddin 'Aziz², Agus Sabdono^{3,4}, dan Ocky Karna Radjasa^{3,4}

¹Program Studi Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman

²Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

³Program Studi Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

⁴Pusat Bioteknologi Kelautan, Universitas Diponegoro

riyanti.anti@gmail.com

ABSTRAK

Actinomycetes merupakan bakteri Gram positif dengan kandungan GC yang tinggi dan dikenal sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder. Namun potensi aktinomycetes laut terutama dari lingkungan laut masih sangat terbatas dikembangkan. Penelitian yang telah dilaksanakan menyatakan bahwa telah diketahui adanya asosiasi antara bakteri Gram positif yang diduga kuat adalah aktinomisetes dengan rumput laut dan softcoral. Sehingga dari hasil penelitian ini dapat dilanjutkan untuk deteksi dini gen penyandi penghasil senyawa metabolit sekunder kelas PKSs dan NRPSs dan uji aktivitasnya sebagai antioksidan. Deteksi gen PKS I dan NRPS ini dilakukan untuk mencari isolat aktinomisetes yang mempunyai potensi sistem biosintetik senyawa poliketida dan non ribosomal peptida. Sampel untuk penelitian ini diambil dari perairan Pangandaran, Jawa Barat. Sampel yang diperoleh adalah rumput laut, lamun. Metode yang digunakan dalam penelitian ini mulai dari analisa mikrobiologi (isolasi aktinomycetes, uji Gram), analisa molekuler (rep-PCR, PCR gen NRPS). Berdasarkan penelitian ini diperoleh total aktinomycetes sebanyak 90, dengan keragaman genetik bervariasi koefisien similaritas hingga 1. Koefisien similaritas 1 menunjukkan kekerabatan genetik yang dekat dan koefisien similaritas kurang dari 1 menunjukkan kekerabatan genetik yang jauh. Hasil PCR gen NRPS diperoleh 6 isolat terdeteksi pembawa gen NRPS.

ABSTRACT

Actinomycetes a Gram positive bacteria with high GC content is known for producing secondary metabolites. However, the potential actinomycetes especially of the marine environment is still very limited development. The research has been known of the association between Gram positive actinomycetes with seaweed, and softcoral. So the results of this research can be continued for the early detection of genes encoding secondary metabolites producing PKSs and NRPSs class and test its activity as an antioxidant. Detection of PKS I and NRPS gene was performed to search for actinomisetes isolates that have potential compounds polyketide biosynthetic systems and non-ribosomal peptides. The sample for this study was taken from the waters of Pangandaran, West Java. The samples obtained were seaweeds and softcoral. The method used in this study ranging from microbiological analysis (actinomycetes isolation, Gram assay), molecular analysis (rep-PCR, PCR NRPS gene). Based on this study were obtained as many as 90 total actinomycetes, with varying genetic diversity of similarity coefficient to 1. Similarity coefficient of 1 indicates a close genetic and similarity coefficient of less than 1 indicates a distant genetic. NRPS gene PCR results obtained six isolates detected NRPS gene carriers.

Keyword: *aktinomycetes, metabolit sekunder, gen NRPS*



PENDAHULUAN

Aktinomicetes merupakan bakteri Gram positif dengan kandungan GC yang tinggi dan dikenal sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder. Namun potensi aktinomicetes laut terutama dari lingkungan laut masih sangat terbatas dikembangkan. Riyanti et al (2009) telah berhasil menskrining aktinomicetes yang berasosiasi dengan nudibranch yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri pathogen MDR (Multi Drugs Resistant).

Aktinomisetes yang mempunyai gen PKS dan NRPS dapat mensintesis senyawa poliketida dan non ribosomal peptida sebagai senyawa bioaktif (Yehuda, 2005). *Streptomyces coelicolor* A3(2) yang diketahui sebagai aktinomisetes model, sudah disekuensing genomnya secara lengkap, diketahui bahwa gen PKS dan NRPS terdapat pada DNA kromosom. Genom bakteri ini mempunyai lebih dari 18 kluster gen pengkode enzim yang bertanggungjawab terhadap pembentukan senyawa metabolit sekunder bioaktif, termasuk PKS dan NRPS (Bentley, 2002).

Aktinomycetes memegang peranan yang penting dalam industri farmasi karena kemampuannya dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder yang bervariasi, baik dari struktur maupun fungsi senyawanya. Penelitian yang telah dilaksanakan menyatakan bahwa telah diketahui adanya asosiasi antara bakteri Gram positif yang diduga kuat adalah aktinomisetes dengan rumput laut dan softcoral. Sehingga dari hasil penelitian ini dapat dilanjutkan untuk deteksi dini gen penyandi penghasil senyawa metabolit sekunder kelas PKSS dan NRPSs dan uji aktivitasnya sebagai antioksidan.

METODE ANALISIS

Isolasi Aktinomisetes Laut

Isolasi aktinomisetes dari sampel sesuai dengan metode Burgess *et al.*, 2003. Sampel dicuci dengan air laut steril, kemudian dipotong – potong. Hasil potongan sampel ini diblender, kemudian sampel dimasukkan cawan petri. Sepuluh gram sampel dimasukkan kedalam erlenmeyer berisi 90 mL air laut steril, didapatkan pengenceran 10^{-1} . Pengenceran 10^{-1} tersebut diambil 1 ml sampel dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian selanjutnya sehingga diperoleh pengenceran sampel 10^{-3} ; 10^{-4} ; dan 10^{-5} .

Masing-masing seri pengenceran tersebut selanjutnya diambil 1 ml sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang dituangi dengan media starch nitrat. Cawan petri tersebut selanjutnya diinkubasikan pada suhu 30°C selama ± 7 hari. Koloni aktinomisetes yang tumbuh pada permukaan agar tersebut, kemudian dipisahkan dengan teknik goresan (*streak method*) sehingga diperoleh isolat aktinomisetes tunggal yang berasosiasi dengan organisme laut.

Uji Gram

Uji Gram dilakukan untuk memilih mikroorganisme yang masuk kelas Actinomycetes. Caranya adalah aktinomisetes yang telah terpurifikasi sebanyak 1 loop dicampurkan dengan 2 tetes KOH 3 % (w/v dalam H₂O), kemudian diaduk berulang kali dengan menggunakan jarum ose. Angkat jarum ose dengan cepat berkali-kali dari permukaan suspensi, amati apakah terbentuk suspensi aktinomisetes lengket yang terangkat seperti benang bersama jarum ose. Apabila suspensi berubah menjadi berlendir, lengket dan terangkat seperti benang bersama jarum ose, maka termasuk dalam Gram negatif (-). Apabila suspensi tetap encer, tidak terangkat dengan jarum ose, maka termasuk dalam Gram positif (+), hal ini berarti menandakan Actinomycetes (Suwanda, 2008).



Isolasi DNA

Actinomycetes yang termasuk Gram positif selanjutnya dilakukan isolasi DNA dengan metode Joo-won, (2004) yaitu kultur murni cair actinomycetes diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf kemudian disentrifugasi selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspendi dengan 400 μ l TE menggunakan mikropipet kemudian disentrifugasi kembali selama 5 menit. Larutan SET sebanyak 400 μ l dan larutan C TAB sebanyak 50 μ l ditambahkan dan diinkubasi pada temperatur 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam. Larutan SDS sebanyak 50 μ l ditambahkan dan diinkubasi kembali pada temperatur 65 $^{\circ}$ C selama 1 jam. Larutan NaCl sebanyak 167 μ l ditambahkan dan diinkubasi kembali pada temperatur 65 $^{\circ}$ C selama 1 jam. Ditambahkan kloroform dingin sebanyak 400 μ l dan diinkubasi pada temperatur kamar (37 $^{\circ}$ C) selama 30 menit. Setelah itu, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dan hasil supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam eppendorf baru. Ditambahkan larutan isopropanol dengan perbandingan 1:1 dan diinkubasi pada temperatur -20 $^{\circ}$ C 24 jam. Setelah 24 jam, sampel disentrifugasi selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang dan pelet dicuci dengan Etanol 70% dingin menggunakan mikro pipet secara perlahan. Etanol diuapkan sampai pelet kering dengan membuka tutup eppendorf. Setelah pelet kering, pelet diresuspendi dengan larutan TE 20-50 μ l, dan disimpan di freezer.

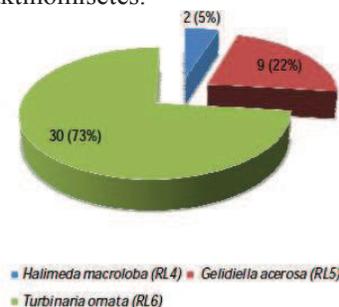
Amplifikasi gen NRPS

Gen NRPS isolat-isolat aktinomisetes dideteksi menggunakan primer rancangan Ayudo Sacido dan Genilloud (2005). Amplifikasi NRPS dengan volume total 10 μ l dan 2 jenis primer (A3R, A7R). Komposisi bahan untuk PCR adalah 2 μ l air destilat ganda dimasukkan ke dalam tabung PCR, diikuti dengan 1 μ l DNA dengan konsentrasi 50 ng/ μ l sebagai cetakan (*template*), primer masing-masing 0,5 μ l dengan konsentrasi 25 pmol/ μ l dan 5 μ l Kappa Mix. Siklus PCR berlangsung dengan kondisi denaturasi awal pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 5 menit dan proses selanjutnya sebanyak 30 siklus yang terdiri atas denaturasi (95 $^{\circ}$ C selama 30 detik), penempelan primer (58 $^{\circ}$ C selama 2 menit), dan polimerisasi (72 $^{\circ}$ C selama 4 menit). Setelah siklus PCR berakhir, polimerisasi dilanjutkan pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 10 menit. Hasil amplifikasi dianalisis menggunakan gel agarosa 2% (Ayuso-Sacido dan Genilloud, 2005).

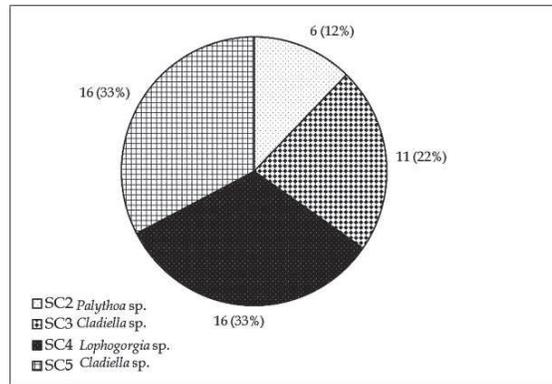
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Aktinomycetes

Hasil dari penelitian ini memperlihatkan aktinomycetes yang bersimbiosis dengan rumput laut jenis *Halimeda macroloba* (RL4), *Gelidiella acerosa* (RL5), dan *Turbinaria ornata* (RL6) berhasil diisolasi sebanyak 41 isolat. Isolat Actinomycetes yang diperoleh dari rumput laut sebanyak 41 isolat yaitu RL 4 sebanyak 2 isolat, RL 5 sebanyak 9 isolat dan RL 6 sebanyak 30 isolat. Hasil isolasi dari 4 sampel softcoral yaitu *Palythoa* sp. (SC2); *Cladiella* sp.(a) (SC3); *Lophogorgia* sp (SC4) dan *Cladiella* sp.(b) (SC5). didapatkan 49 isolat aktinomisetes. Isolat tersebut terdiri atas 6 (12%) isolat SC2, 11 (22%) isolat SC3, 16 (33%) isolat SC4 dan 16 (33%) SC5. Isolasi aktinomisetes dilakukan dengan menggunakan media selektif SNA hal ini dapat meminimalisir pertumbuhan bakteri lain. Atta *et al* (2009), menyebutkan bahwa media SNA merupakan media khusus aktinomisetes.



Gambar 1. Jumlah isolat aktinomisetes simbion rumput laut

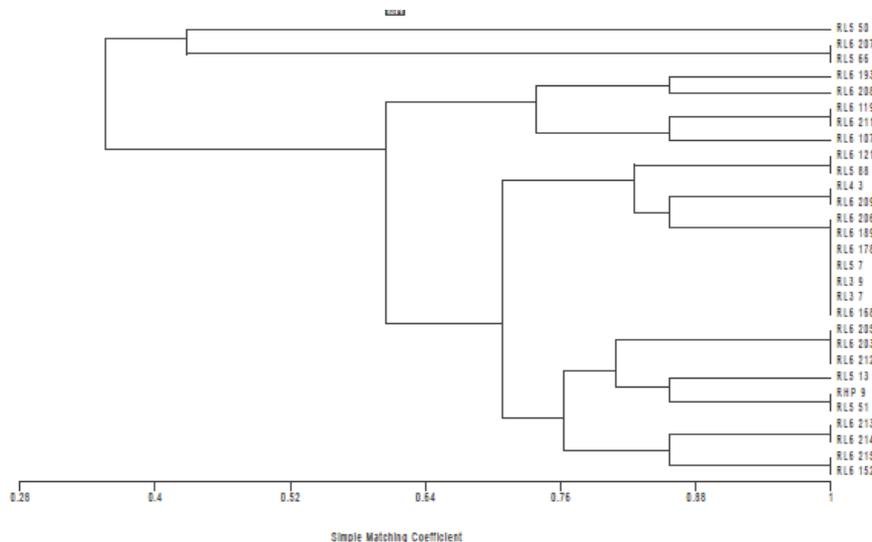


Gambar 2. Jumlah isolat aktinomisetes simbios softcoral

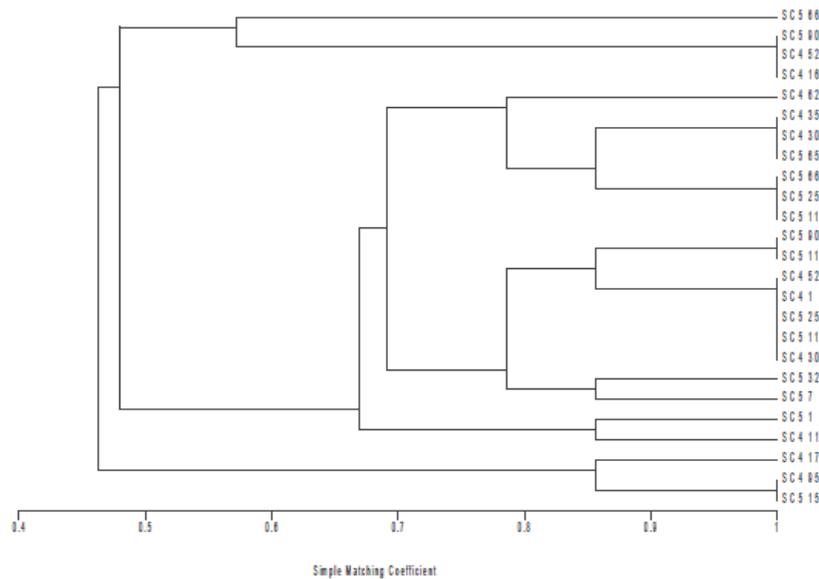
Hasil isolasi aktinomisetes memperlihatkan bahwa semua bakteri yang terisolasi mengindikasikan sebagai bakteri Gram positif. Hal ini dibuktikan dari hasil uji Gram dimana dalam uji Gram semua isolat masuk dalam Gram positif. Madigan dan Martinko, (2006) menjelaskan bahwa Actinomycetes merupakan bakteri Gram positif.

Keragaman Genetik Isolat Aktinomycetes

Dendrogram hasil rep-PCR dibuat untuk melihat pola keragaman sidik jari DNA masing-masing isolat. Keragaman genetik 90 isolat ini menggunakan repetitive genomic sequences-PCR (rep-PCR) pada kawasan BOX dengan primer BOXA1R. Analisis rep-PCR 90 isolat terpilih hasil penapisan awal dengan metode PCR gen NRPS menggunakan program NTSYS dengan analisis UPGMA berdasarkan pita-pita DNA yang teramplifikasi. Dendrogram hasil analisis UPGMA keragaman genetik isolat aktinomisetes disajikan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Dendrogram keragaman genetik isolat aktinomycetes simbios rumput laut

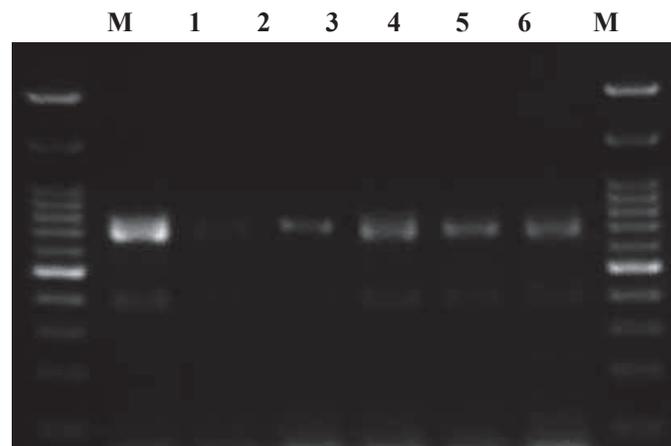


Gambar 4. Dendrogram keragaman genetik isolat aktinomicetes simbion karang lunak

Koefisien similaritas 1 menunjukkan kekerabatan genetik yang dekat dan koefisien similaritas kurang dari 1 menunjukkan kekerabatan genetik yang jauh. Rademaker et al (2005) menyebutkan bahwa Rep-PCR banyak digunakan karena kemampuannya untuk membedakan isolat bakteri hingga tingkat spesies, subspecies dan strain dengan cepat dan spesifik sehingga dapat digunakan untuk pengelompokan bakteri (*rapid grouping*).

Deteksi gen PKS I - NRPS

Gen PKS I diamplifikasi menggunakan primer K1F dan M6R . Primer ini spesifik untuk sekuens ketosintase (KS) dan metil-malonil-CoA transferase dengan panjang fragmen 1200 – 1400 bp. Amplifikasi gen NRPS dengan primer A3F dan A7R, spesifik untuk sekuens adenilasi (A) dengan panjang fragmen 700 – 800 bp. Berdasarkan hasil PCR diperoleh 6 isolat pembawa gen NRPS. Visualisasi hasil amplifikasi gen PKS I dan NRPS disajikan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Hasil deteksi gen NRPS (dari kiri ke kanan : M (DNA Ladder 100bp); 1(RL6-119); 2(RL5-50);3(RL5-88);4 (RL6-205);5(SC4-17);6(SC5-65) M (DNA Ladder 100bp)



Gen NRPS pada aktinomisetes terlibat dalam produksi metabolit sekunder yang penting dalam industri farmasi. Deteksi gen NRPS ini dilakukan untuk mencari isolat aktinomisetes yang mempunyai potensi sistem biosintetik senyawa poliketida dan non ribosomal peptida. Pada aktinomisetes, kedua gen ini berperan dalam biosintesis senyawa metabolit sekunder, sedangkan pada bakteri lain seperti *Lactobacillus casei* dan *Bacillus subtilis*, gen NRPS berperan dalam biosintesis metabolit primer (Ayuso-Sacido and Genilloud, 2005). Deteksi gen NRPS menggunakan primer hasil rancangan Ayuso-Sacido and Genilloud (2005). Hasil deteksi gen PKS I dan NRPS ini digunakan sebagai dasar dalam pemilihan isolat yang akan dilakukan uji antioksidan.

KESIMPULAN

Aktinomycetes memiliki hubungan simbiosis dengan rumput laut dan karang lunak. Dalam penelitian ini ditemukan 41 isolat aktinomycetes simbiosis pada rumput laut dan 49 isolat aktinomycetes simbiosis pada karang lunak. Berdasarkan hasil deteksi PCR gen NRPS diketahui 6 isolat membawa gen NRPS yang dapat digunakan sebagai dasar pemilihan isolat untuk uji antioksidan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas sumber dana melalui Hibah Pekerti.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayuso-Sacido, A., and O. Genilloud. 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes : detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*.49 :10- 24.
- Bentley, S.D. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 417. 9 May 2002.
- Rademaker, J. L. W., H. J. M. Aarts and P. Vinuesa. 2005. Molecular Typing of Environmental Isolates. In: A.M. Osborn and C.J. Smith (Eds). *Molecular Microbial Ecology*. Taylor and Francis Group. New York. 97-134.
- Riyanti, J. Widada, & O.K. Radjasa. 2009. Isolation and Screening of Antimicrobial Producing-Actinomycetes Symbionts in Nudibranch. *Indonesia Journal of Biotechnology*, **14** (1):1132-1138.
- Suwanda, Z. A. 2008. Pedoman Diagnosis Optik Golongan Bakteri. Departemen Pertanian. Badan Karantina Pertanian. Hal 24.
- Yehuda, M.L. 2005. The search for novel secondary metabolites from marine obligate actinomycetes. myehuda@ucsd.edu.