

Kloning Gen *pcbC* dari *Penicillium chrysogenum* ke dalam Plasmid pPICZA untuk Pengembangan Produksi Penisilin G

Risma Wiharyanti¹, Dudi Hardianto², Hermin Pancasakti Kusumaningrum¹ dan Anto Budiharjo¹

1. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang
Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

². Balai Pengkajian Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT),
Gd.630 PUSPIPTEK Serpong, Telepon: (021) 7563120
email: wiharyanti.risma@gmail.com

Abstract

Availability of drugs in Indonesia is still limited by the high prices of drugs due to on the imported raw materials that reaches 95%. Developing antibiotic raw materials can be achieved by increasing of penicillin G production, which is the raw material for the formation of semisynthetic penicillin derivatives through the production of 6-aminopenisillanic acid (6-APA). One of the important enzyme in the penicillin G biosynthesis is Isopenisilin N Synthase (IPNS) that encodes by *pcbC* gene on *Penicillium chrysogenum*. This study aimed to obtain a recombinant of *pcbC* gene fragments that is inserted into pPICZA plasmid. Amplification of *pcbC* gene used *pcbC*-F and *pcbC*-R primers. The *pcbC* gene fragment was inserted into pPICZA vector and then transformed into TOP 10 F'. The results showed that the recombinant of the *pcbC* gene fragment from *P. chrysogenum* has been obtained. Analysis of DNA sequences using the BLAST program showed that the *pcbC* gene fragment has high homology (99%) with the *pcbC* gene from *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 and *P. chrysogenum* AS-P-78 which encodes IPNS

Keywords: *pcbC* Gene, *Penicillium chrysogenum*, cloning, penicillin G

Abstrak

Ketersediaan obat di Indonesia masih sangat terkendala dengan mahalnya harga obat akibat ketergantungan impor bahan baku obat yang mencapai 95%. Upaya mencapai kemandirian bahan baku antibiotik dapat dilakukan dengan pengembangan produksi penisilin G. Antibiotik tersebut merupakan bahan baku bagi pembentukan turunan penisilin semisintetik melalui produksi asam 6-aminopenisilinanat (6-APA). Salah satu enzim penentu dalam biosintesis penisilin G adalah Isopenisilin N Sintase (IPNS) yang dikode oleh gen *pcbC* pada *Penicillium chrysogenum*. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh rekombinan berupa fragmen gen *pcbC* yang disisipkan ke dalam plasmid pPICZA. Amplifikasi gen *pcbC* dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer *pcbC*-F dan *pcbC*-R yang selanjutnya disisipkan ke dalam vektor ekspresi pPICZA dan ditransformasikan ke dalam bakteri kompeten *E. coli* TOP 10 F'. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rekombinan berupa fragmen gen *pcbC* dari *P. chrysogenum* yang disisipkan ke dalam plasmid pPICZA telah diperoleh. Analisis sekuen DNA menggunakan program BLAST menunjukkan bahwa fragmen gen *pcbC* tersebut memiliki tingkat homologi yang tinggi (99%) dengan gen *pcbC* *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 dan *P. chrysogenum* AS-P-78 yang merupakan pengkode IPNS.

Kata Kunci : Gen *pcbC*, *Penicillium chrysogenum*, kloning, penisilin G

PENDAHULUAN

Kesehatan merupakan faktor fundamental dari suatu negara yang didukung oleh beberapa faktor, diantaranya obat dan ketersediannya di masyarakat. Jenis obat yang dibutuhkan bagi masyarakat Indonesia untuk dikembangkan saat ini adalah dari golongan antibiotik. Data Kementerian Kesehatan RI (2012) menyebutkan hingga tahun 2011 jenis penyakit infeksi masih mendominasi urutan teratas, namun ketersediaan obat di Indonesia masih terkendala dengan mahalnya harga obat akibat ketergantungan impor bahan baku obat yang mencapai 95%. Hal tersebut menjadikan Indonesia belum dapat dikatakan mandiri dalam sektor bahan baku obat.

Upaya mencapai kemandirian bahan baku obat khususnya antibiotik, dapat dilakukan dengan produksi penisilin G yang merupakan substrat bagi turunan penisilin semisintetik melalui produksi asam 6-aminopenisilinat (6-APA). Hingga saat ini, 6-APA merupakan bahan baku utama untuk pembuatan penisilin semisintetik yang dapat membuka peluang untuk pengembangan jenis antibiotik lainnya (Sukandar, 2010).

Pengembangan produksi penisilin G dapat dilakukan melalui pendekatan genetik, yaitu dengan penerapan teknologi kloning gen. Penggunaan teknik kloning gen ditempuh dengan meningkatkan ekspresi gen penyandi enzim kunci biosintesis penisilin G, yaitu dengan cara memindahkan gen tersebut ke dalam suatu sel inang yang dapat mengekspresikan gen dengan aktivitas tinggi.

Kapang yang dapat menghasilkan penisilin untuk skala industri diantaranya adalah *Penicillium chrysogenum*, sehingga perekayasa mikroba tersebut hingga saat ini masih terus dilakukan. Gen *pcbC* pada *P. chrysogenum* berperan dalam mengkode Isopenisilin N Sintase (IPNS) yang merupakan salah satu enzim kunci pada produksi penisilin G. Penggunaan plasmid pPICZA dan *Escherichia coli* TOP 10 F' yang dirancang untuk memaksimalkan ekspresi protein asing diharapkan dapat mengoptimalkan ekspresi gen *pcbC* pada perkembangan penelitian selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Sumber gen menggunakan *Penicillium chrysogenum* koleksi Balai Pengkajian Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT). Sel inang (*host*) dan vektor dalam kloning menggunakan *Escherichia coli* galur TOP 10 F' dan plasmid pPICZA. Enzim restriksi menggunakan *pml* I.

Amplifikasi Fragmen Gen *pcbC* Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasi gen *pcbC* dari *P. chrysogenum* menggunakan *LA Taq DNA Polymerase* (Takara) dengan pasangan primer *pcbC-F* dan *pcbC-R*. Susunan basa nukleotida untuk primer *forward* (*pcbC-F*) adalah 5'-ATGGCTTCCACCCCAAGGC'-3, sedangkan susunan nukleotida primer *reverse* (*pcbC-R*) yaitu 5'-TCATGTCTGGCCGTTCTTGTTG'-3.

Program PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 98°C selama 1 menit dan 30 siklus reaksi yang terdiri dari denaturasi pada suhu 98 °C selama 10 detik, penempelan primer pada suhu 58 °C selama 20 detik dan pemanjangan suhu 72 °C selama 90 detik. Pada tahap akhir proses PCR dilakukan akhir pemanjangan pada suhu 72 °C selama 5 menit. Gradien pada suhu *annealing* dilakukan menggunakan *PrimeSTAR HS DNA Polymerase* dengan suhu yang dioptimasi pada kisaran 50°C-60°C. Karakterisasi DNA dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi gel 1%. Molekul DNA dipurifikasi menggunakan *Gel/ PCR DNA Fragments Extraction* (Geneaid) untuk kloning dan sekuensing.

Isolasi dan Digesti DNA plasmid pPICZA dari *E. coli*.

Isolasi dilakukan menggunakan *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas). Karakterisasi DNA plasmid dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa pada konsentrasi gel 1%. Konsentrasi diukur menggunakan nanodrop spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Tingkat kemurnian didapatkan melalui perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Digesti plasmid dilakukan menggunakan enzim restriksi *Pml* I dan penambahan *buffer* restriksi dengan inkubasi selama 4 jam pada suhu

37°C. Hasil pemotongan DNA dengan enzim restriksi diamati dengan elektroforesis gel agarosa.

Kloning Gen *pcbC*

Kloning gen *pcbC* dari *P. chrysogenum* dilakukan secara bertahap yaitu ligasi pada plasmid vektor, transformasi pada *E. coli* dan seleksi rekombinan yang membawa plasmid dengan sisipan (*insert*). Ligasi fragmen gen *pcbC* ke dalam vektor plasmid pPICZA dilakukan menggunakan enzim T4 DNA ligase dengan rasio molar 3:1. Inkubasi dilakukan pada suhu 4°C selama semalam. Hasil ligasi ditransformasi pada bakteri *E. coli* TOP 10 F' kompeten. Transformasi menggunakan teknik kejutan panas (*heat shock*), yaitu dengan perubahan suhu secara mendadak dari inkubasi *ice bath* ke *waterbath* (37°C) selama 2 menit. Bakteri *E. coli* TOP 10 F' yang telah ditransformasi dikultur dalam LB (*Luria Bertani medium*) dan diinkubasi selama 30 menit pada 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Seleksi koloni dilakukan dengan menumbuhkan bakteri transforman pada media yang mengandung zeocin. Koloni yang tumbuh merupakan koloni yang diduga mengandung plasmid rekombinan.

Verifikasi hasil kloning

Verifikasi digesti tunggal menggunakan enzim restriksi *Kpn* I dilakukan pada transforman kandidat plasmid rekombinan hasil kloning yang telah diisolasi dengan *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 4 jam. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis gel pada 1% agarosa. Plasmid rekombinan yang telah memberikan hasil positif pada tahap verifikasi digesti, selanjutnya diverifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer *pcbC-F* dan *pcbC-R*. Produk PCR yang diperoleh dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

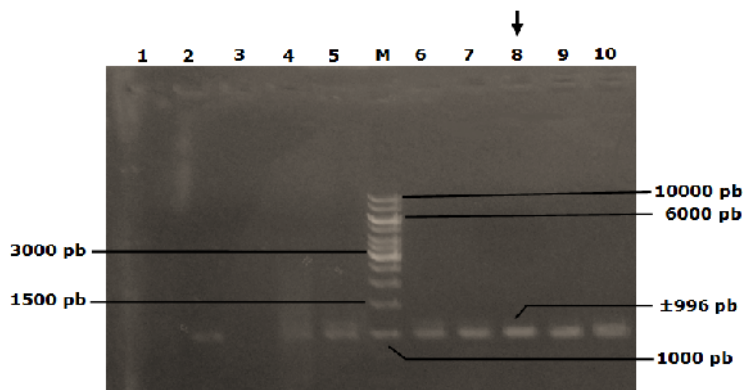
Sekuensing dan Analisis Sekuen

Fragmen DNA hasil PCR yang telah diekstraksi dikonfirmasi melalui sekuensing menggunakan primer *pcbC-F* dan *pcbC-R*. Proses sekuensing mencakup beberapa tahapan, yaitu PCR *cycle sequencing*, purifikasi produk *cycle sequencing* dan pembacaan sekuen melalui elektroforesis kapiler menggunakan alat *sequencer* ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystem). Hasil sekuensing diedit dengan perangkat lunak *geneious* dan *BioEdit*, kemudian dianalisis homologinya dengan gen yang sama di dalam pusat data *Genbank* menggunakan pendekatan teknik bioinformatika melalui program BLASTn.

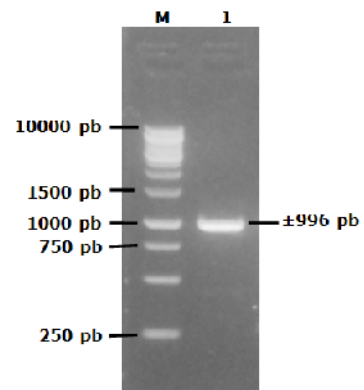
HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen *pcbC*

Optimasi pada suhu penempelan primer terhadap gen target (*annealing*) menghasilkan pita pada suhu 58°C dengan intensitas yang lebih tebal dibandingkan pita lainnya (Gambar 1). Henegariu *et al.*, (1997) menyatakan tebalnya pita DNA disebabkan pasangan primer berhasil menempel dengan spesifik pada DNA cetakan, yang dipengaruhi oleh ketepatan penggunaan suhu *annealing*. Suhu yang terlalu tinggi mengakibatkan kualitas penempelan primer pada DNA target menjadi lemah, karena banyaknya ikatan hidrogen yang terlepas, sedangkan suhu yang terlalu rendah mengakibatkan semakin besar peluang terjadinya penempelan primer pada lokasi non spesifik, sehingga terjadi kesalahan pada produk yang dihasilkan bahkan hingga tidak dihasilkan produk sama sekali (Sambrook & Russell, 2001; Dale & Schantz, 2002).



Gambar 1. Profil hasil amplifikasi gen *pcbC* pada berbagai suhu penempelan primer (lajur 1-5)=hasil amplifikasi berturut-turut pada suhu 50°C, 51°C, 52°C, 53°C & 54°C. (lajur 6-10)=hasil amplifikasi berturut-turut pada suhu 55°C, 57°C, 58°C, 59°C & 60°C. M=1 kb DNA *Ladder*. Panah menunjukkan suhu yang digunakan pada analisis selanjutnya.



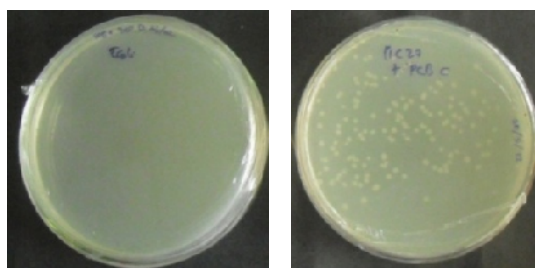
Gambar 2. Amplifikasi gen *pcbC*. Lajur 1=hasil amplifikasi gen *pcbC* pada suhu annealing 58°C. M=1 kb DNA *Ladder*

Produk PCR pada suhu 58°C (Gambar 2) menunjukkan fragmen gen *pcbC* dari *P. chrysogenum* berukuran ±996 pb yang berhasil diamplifikasi secara spesifik dan tanpa kontaminasi fragmen gen lain, tampak hanya satu pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi. Sampel DNA dikatakan spesifik dan berhasil diamplifikasi apabila hasil analisis elektroforesis menunjukkan terdapatnya pita tunggal DNA dengan ukuran sesuai berdasarkan penanda yang telah diketahui sebelumnya (Settanni *et al.*, 2006).

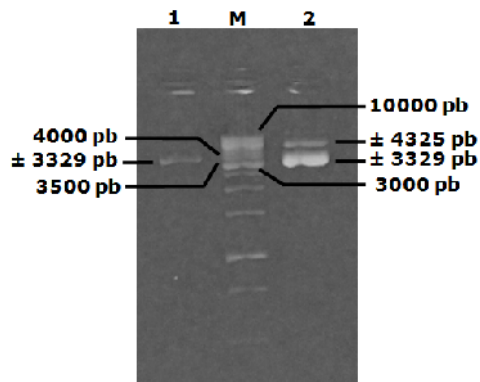
Transformasi

Keberhasilan transformasi ditandai dengan adanya ekspresi gen resistensi antibiotik yang dibawa plasmid pPICZA sehingga transforman

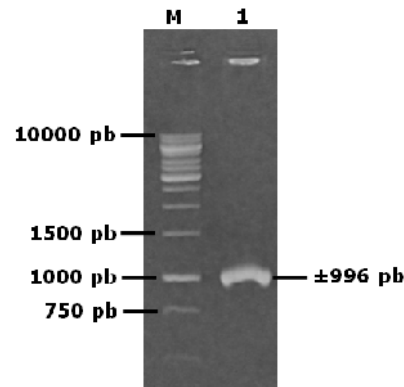
dapat hidup pada medium yang mengandung antibiotik (medium seleksi) berupa zeocin. Bakteri *E. coli* TOP 10 F' tanpa plasmid terbukti tidak tumbuh pada medium seleksi (Gambar 3.a), hal tersebut membuktikan bahwa *E. coli* TOP 10 F' bersifat sensitif terhadap zeocin dan tidak terjadi kontaminasi pada tahap pembuatan sel kompeten. Gambar 3.b memperlihatkan adanya koloni tumbuh yang diduga merupakan koloni rekombinan. Masuk dan stabilnya plasmid dalam sel inang mengubah sifat dasar *E. coli* TOP 10 F' yang semula sensitif terhadap antibiotik zeocin (Zeo^S) menjadi resisten terhadap zeocin (Zeo^R).



Gambar 3. (a) *E. coli* TOP 10 F' tanpa plasmid pada medium SOB+zeocin, (b) hasil transformasi plasmid rekombinan ke dalam *E. coli* TOP 10 F'



Gambar 3. Digesti Plasmid pPICZA oleh *Kpn* I. Lajur 1=hasil digesti pPICZA oleh *Kpn* I. Lajur 2=hasil digesti rekombinan pPICZA-*pcbC* oleh *Kpn* I. M=1 kb DNA Ladder



Gambar 4. Verifikasi menggunakan teknik PCR. Lajur 1 & 2=hasil amplifikasi gen *pcbC*. M=1 kb DNA Ladder

Verifikasi Hasil Kloning

Hasil digesti plasmid rekombinan oleh enzim *Kpn* I menunjukkan posisi pita yang lebih atas dibanding kontrol berupa digesti plasmid tanpa sisipan, dengan ukuran ± 4325 pb. Perbedaan pola migrasi DNA antara hasil digesti plasmid rekombinan dan plasmid kontrol yang cukup signifikan mengindikasikan gen *pcbC* berhasil tersisip pada plasmid pPICZA. Topcu (2000) menyatakan bahwa hasil visualisasi positif terhadap plasmid rekombinan adalah terdapatnya pita-pita DNA yang berada lebih tinggi dari plasmid tanpa DNA sisipan, hal tersebut disebabkan oleh panjang basa plasmid rekombinan yang lebih besar daripada plasmid tanpa DNA sisipan, sehingga pergerakannya di dalam gel agarosa menjadi lebih lambat. Terbentuknya dua pita pada lajur 3 disebabkan terdapatnya plasmid yang mengalami religasi, tampak dari ukuran plasmid yang sama dengan ukuran plasmid pada lajur 1 (Gambar 3) yang merupakan hasil digesti plasmid tanpa sisipan oleh enzim *Kpn* I.

Verifikasi lebih lanjut menggunakan PCR dilakukan untuk memastikan adanya sisipan gen *pcbC* pada plasmid rekombinan dan memperkuat hasil verifikasi digesti. Hasil amplifikasi plasmid rekombinan yang memberikan hasil positif pada tahap verifikasi digesti menunjukkan terbentuknya pita DNA yang spesifik dengan ukuran ± 996 pb

(Gambar 4). Hasil verifikasi kandidat rekombinan melalui digesti tunggal dan PCR menunjukkan bahwa gen *pcbC* tersisip dalam plasmid pPICZA.

Analisis Hasil Sekuensing

Konfirmasi identitas sekuen DNA dilakukan melalui sekuensing fragmen gen *pcbC* dan penjarannya dengan sekuen gen yang terdapat pada *GenBank*. Hal tersebut bertujuan untuk memastikan bahwa gen yang teramplifikasi merupakan fragmen gen target sesuai yang diharapkan. Sekuensing yang dilakukan dua arah menghasilkan sekuen DNA yang berukuran 917 pb. Analisis melalui BLASTn menunjukkan bahwa gen yang tersisip dalam plasmid pPICZA merupakan fragmen gen *pcbC* yang merupakan pengkode IPNS. Persentase tingkat homologi sekuen nukleotida ditunjukkan dengan keserupaan hasil penjaran sekuen yang terlihat dari nilai identitas. Fragmen gen *pcbC* dalam penelitian memiliki nilai identitas yang mencapai 99% dengan sekuen gen *pcbC* dalam spesies yang sama pada strain yang berbeda, yaitu *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 dan *P. chrysogenum* AS-P-78. Nilai identitas hanya mencapai 85% pada spesies dalam famili yang sama seperti *Aspergillus flavus* dan *A. oryzae*.

Tabel 1. Hasil BLASTn Fragmen Gen *pcbC*

No. Akses	Deskripsi	Nilai Identitas	<i>E-value</i>
XM_002569067.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> 54-1255	99%	0.0
DQ192518.1	<i>P. chrysogenum</i> AS-P-78	99%	0.0
XM_002380605.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	85%	0.0
XM_001825396.1	<i>A. oryzae</i> RIB40	85%	0.0

Tingkat homologi juga dapat diketahui dari nilai *Expect value (E-value)* yang terdapat pada *hit list* BLASTn. Nilai *E-value* 0 (nol) pada hasil analisis menunjukkan bahwa kedua sekuen tersebut memiliki homologi yang tinggi. Menurut Claverie & Notredame (2007), *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Semakin tinggi nilai *E-value* maka semakin rendah homologi antara kedua sekuen, sebaliknya semakin rendah nilai *E-value* maka semakin tinggi homologi antara kedua sekuen. Secara teoritis kisaran skor *E-value* > e-04 pada analisis BLAST menunjukkan tingkat homologi yang tinggi.

KESIMPULAN

Rekombinan fragmen gen *pcbC* yang disisipkan ke dalam plasmid pPICZA telah diperoleh dan ditransformasikan dalam sel *E.coli* TOP 10 F'. Hasil sekuen dan analisis BLASTn menunjukkan bahwa fragmen gen *pcbC* tersebut memiliki tingkat homologi yang tinggi (99%) dengan gen *pcbC* *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 dan *sP. chrysogenum* AS-P-78 yang merupakan pengkode Isopenisilin N Sintase (IPNS).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian dilakukan dengan fasilitas bahan kimia, primer dan alat penunjang di Laboratorium Teknologi Gen, Balai Pengkajian Bioteknologi Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong. Ucapan terimakasih disampaikan pada

Dudi Hardianto, M. Si. Apt atas arahan dan bantuan pembiayaan pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Claverie, J. & C. Notredame. 2007. Bioinformatics for Dummies. 2nd edition. Wiley Publishing, Inc, Indiana.
- Dale, J. W. & M. V. Schantz. 2002. From Genes to Genomes Concepts and Applications of DNA Technology. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Henegariu, O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vance & P. H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Bio Techniques* 23: 504-511.
- Kementrian Kesehatan RI. 2012. Profil Data Kesehatan Indonesia Tahun 2011.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3rd Edition. Cold-Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Settanni, L., S. Valmori, D. W. Sinderen, G. Suzzi, A. Paparella & A. Corsetti. 2006. Combination of Multiplex PCR and PCR-denturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated Lactobacillus spesies. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5):3793-3796.
- Topcu, Z. 2000. An optimizd recipe for cloning of the polymerase chain reaction-amplified DNA inserts into plasmid vectors. *Acta Biochimica Polonica* 47(3): 841-846.