

DNA Polimerase sebagai Model Kajian Biomolekul Enzim Termotabil Isolat Lokal

Agustina L.N.A, Akhmaloka*, H. Pramono*

Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Diponegoro Semarang

*) PPAU Bioteknologi Institut Teknologi Bandung

Abstrak

Ekstremozim merupakan bahan kajian penelitian yang banyak dilakukan dalam dekade terakhir. Enzim ini merupakan biokatalis yang sangat efektif digunakan dalam proses industri. Salah satu sumber ekstremozim yang cukup potensial adalah bakteri termofilik, tumbuh pada sumber air panas. Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber air panas, tetapi sampai saat ini belum banyak peneliti yang mengeksplorasi bakteri termofilik. Salah satu bakteri termofilik dari Cimanggu, suatu sumber air panas di sekitar Bandung yang memiliki suhu sekitar 80°C telah berhasil diisolasi. DNA polimerase dipilih sebagai enzim model untuk mempelajari struktur fungsi dari enzim termotabil. Kloning terhadap gen pengkode DNA polimerase dilakukan dengan pendekatan pustaka genom dan amplifikasi genom menggunakan teknik PCR. Primer dirancang berdasarkan homologi urutan nukleotida gen pengkode DNA polimerase dari *Thermus aquaticus* dan *Thermus thermophilus*. Primer P1-P3 mengamplifikasi empat fragmen berukuran 1 kb, 1,4 kb, 1,6 kb dan 1,8 kb yang tidak saling overlap. Dalam hal ini fragmen DNA 1 kb telah ditentukan urutan nukleotidanya.

Kata kunci : Ekstremofil, enzim termotabil, DNA polimerase, kloning, pustaka genom

Abstract

Recently, there are a lot of researches about extremozyme. These enzymes are biocatalist, which effectively used in industry. Once of extremozyme source is thermophilic bacteria that live in hot-spring. Indonesia has many hot springs but so far just a few researchers that explore these bacteria. Thermophilic bacteria has been isolated from Cimanggu, hot-spring in Bandung. DNA polymerase has been chosen as protein model to understand structure function of thermostable enzyme. Cloning DNA polymerase gene were done using genomic library and polymerase chain reaction technique. The primers were constructed from homologous study of DNA polymerase sequence published, Taq and Tth. Primers P1-P3 amplified four DNA fragments do not overlap each other with different size of 1 kb, 1,4 kb, 1,6 kb and 1,8 kb. The 1 kb DNA fragment has been sequenced.

Key word : extremozyme, thermostable enzyme, DNA polymerase, genomic library

Telah dipresentasikan dalam Seminar Nasional Peran Peneliti Wanita di Jurusan Kimia FMIPA Undip tanggal 27 April 2000.

PENDAHULUAN

Kemajuan bidang biokatalis dalam dekade terakhir ditandai dengan meningkatnya pencarian bakteri

ekstremofil. Biokatalis dari mikroorganisme ekstrim (ekstremozim) makin diminati karena memiliki beberapa sifat terapan lebih

menguntungkan terutama bagi industri. Ekstremozim merupakan enzim yang bisa digunakan secara efektif pada temperatur, pH, atau pelarut organik ekstrim dalam proses industri. Selain perannya di dalam bidang industri, penelitian terhadap bakteri ekstemofil juga memiliki peran penting dalam perkembangan ilmu pengetahuan terutama dalam studi filogeni. Dimana diduga bahwa bakteri-bakteri ekstemofil merupakan organisme paling awal yang hidup di bumi. Sebelumnya dikemukakan teori bahwa organisme di dunia terbagi atas dua golongan berdasar garis evolusinya yaitu organisme prokariot dan organisme eukariot. Namun hasil penelitian yang telah dilakukan oleh sekelompok peneliti terhadap seluruh gen *Methanococcus jannaschii* yaitu suatu ekstemofil penghasil metan, menunjukkan adanya tiga garis evolusi yaitu bakteri, *archaea* dan eukariot, setelah membandingkan molekul RNA ribosom dari berbagai organisme.

Salah satu sumber ekstemofil yang cukup potensial adalah sumber air panas. Secara geografis kawasan Indonesia merupakan wilayah yang kaya akan sumber air panas sebagai wahana bagi pertumbuhan bakteri termofilik, tetapi sampai saat ini belum banyak dieksplorasi. Dalam rangka pemanfaatan bakteri termofilik galur lokal, maka dilakukan studi biomolekul terhadap bakteri tersebut.

Dalam penelitian ini DNA polimerase telah dipilih sebagai enzim model untuk mempelajari struktur fungsi dari enzim termostabil. DNA polimerase termostabil merupakan enzim yang sangat berguna dalam teknik PCR dimana teknik operasionalnya menjadi lebih praktis dan bisa dilakukan otomatisasi. PCR merupakan suatu teknik sintesis dan

amplifikasi fragmen DNA *in vitro*. Teknik ini telah mempunyai banyak aplikasi diantaranya dalam proses kloning, analisis DNA, diagnosis penyakit keturunan, deteksi urutan asam nukleat dari organisme patogen dan penentuan jenis kelamin janin.

Studi struktur fungsi enzim DNA polimerase termostabil isolat lokal diperlukan enzim dalam jumlah banyak dan murni. Dalam rangka tujuan tersebut di atas maka dilakukan pendekatan rekayasa genetika yaitu mengklon gen pengkode DNA polimerase dengan pendekatan menggunakan teknik PCR dan pustaka genom

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas Cimanggu. *Phenil Methyl Sulphonyl Flouride* (PMSF), (-merkptoetanol, DNase, dan bahan kimia lain diperoleh dari Sigma. [³⁵S]dATP dan [(³²P]dCTP diperoleh dari Pharmacia. Untuk keperluan manipulasi genetika, sebagai sel inang digunakan *E. coli* MOSBlue dan *E. coli* DH5(Vektor yang dipakai adalah vektor-T pMOSBlue dan kosmid pHc 79. Enzim-enzim untuk karakterisasi dan manipulasi DNA *in vitro* diperoleh dari Amersham. DNA polimerase *Taq* dan dNTP diperoleh dari Pharmacia, Biotech, USA.

Pertumbuhan Bakteri termofilik

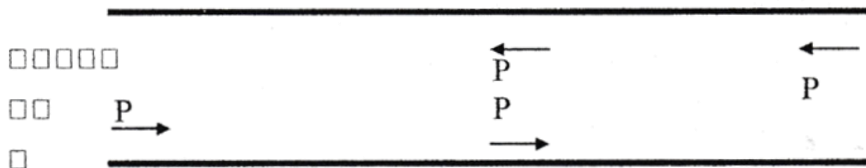
Bakteri hasil isolasi ditumbuhkan dalam media Luria Bertani pH 7 dimana untuk media padat ditambahkan 6% bacto agar (Maniatis, 1989). Selanjutnya media cair maupun

padat yang telah diinokulasi dengan bakteri termofilik diinkubasi pada temperatur 70°C.

Perancangan Primer

Perancangan primer didasarkan pada urutan DNA dari gen pengkode DNA polimerase *Taq* dan *Tth* yang memiliki panjang sekitar 3 kb. Daerah yang dipilih untuk perancangan primer sedemikian rupa sehingga primer dapat mengamplifikasi *open reading frame* dari gen. Seleksi primer dilakukan

menurut Randal K. Saiki (Innis, et al., 1990) dan desain primer menurut metode PCR (Newton, C.R. dan Graham, A., 1994). Primer dirancang menggunakan program komputer *Primer Detective* dan *Genmon*. Sintesis primer dilakukan dengan alat *DNA Synthesizer*. Untuk mengamplifikasi gen dirancang dua pasang primer dimana panjang masing-masing primer adalah 23 pb dengan pola sebagai berikut :



Urutan nukleotida masing-masing primer :

- P1 : 5'> GCG GTC TAC GGC TTC GCC AAG AG >3'
- P2 : 5'> TCC CCT ATC CCC ACC TCC ACC TC >3'
- P3 : 5'> GGG GTG GTG TTG GAA GGG TCC AG >3'
- P4 : 5'> CTG GAC CCT TCC AAC ACC ACC CC >3'

Amplifikasi DNA Target

Isolasi DNA kromosom dilakukan dengan metode lisis alkali (Marmur, 1961), dan selanjutnya dipakai sebagai templat dalam proses PCR. Amplifikasi DNA target dilakukan dengan bantuan dua pasang primer yaitu P1-P3 dan P2-P4, yang masing-masing akan mengamplifikasi fragmen berukuran sekitar 1 kb dan 1,4 kb. Proses PCR dilakukan menurut Innis, M.A. dan Gelfand, H. (Innis, et al., 1990) dalam 30 siklus dengan sedikit modifikasi yaitu denaturasi pada 94°C, 1 menit; *annealing* pada 50°C, 1 menit; dan pemanjangan rantai pada 72°C, 1 menit

Kloning fragmen PCR

Fragmen DNA hasil PCR murni diligasi dengan vektor-T pMOSBlue. Transformasi sel inang *E. coli* MOSBlue menggunakan hasil reaksi ligasi dilakukan dengan metoda *heat shock*

Karakterisasi Plasmid Rekombinan

Karakterisasi plasmid dilakukan dengan cara pematangan dengan enzim restriksi, analisis fragmen menggunakan metoda hibridisasi *Southern blotting*, dan sekuensing menggunakan *Automatic Sequencer ABI PRISM*

Pembuatan Pustaka Genom

DNA kromosom dipotong parsial dengan menggunakan *Sau3A* I dan dilakukan pemisahan fragmen melalui metoda elektroforesis gel agarosa. Fragmen-fragmen berukuran lebih kurang 40 kb diisolasi dan diligasi dengan kosmid pH_C 79. Hasil reaksi ligasi dilakukan *in vitro* packaging dan ditransfeksi ke *E. coli* DH5 α .

HASIL DAN PEMBAHASAN :

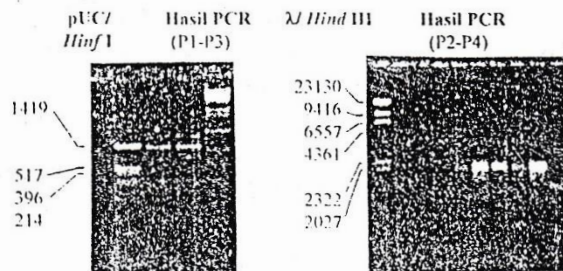
Amplifikasi DNA Target

Amplifikasi menggunakan primer P1-P3 dirancang untuk mendapatkan fragmen DNA sepanjang 1 kb, namun hasil amplifikasi selalu menghasilkan lebih dari satu fragmen yang tampak sejajar dengan pita berukuran 1419 pb dari standar DNA pUC19 /*Hinf* I. Sedangkan hasil amplifikasi dengan pasangan primer P2-P4 adalah satu pita berukuran 2 kb. Hasil PCR yang menghasilkan lebih dari satu fragmen menunjukkan bahwa spesifitas primer rendah, sehingga masih perlu dilakukan seleksi untuk menentukan fragmen yang diinginkan.

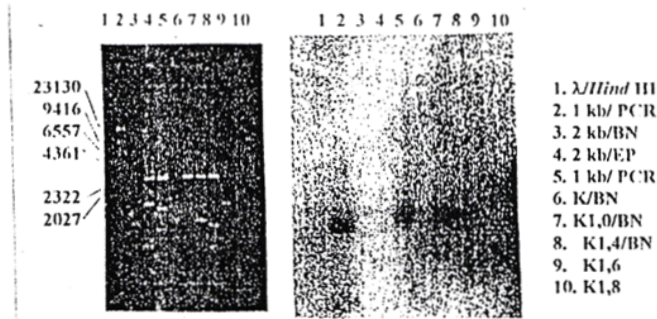
Kloning dan Karakterisasi Fragmen Hasil PCR

Kloning terhadap fragmen hasil PCR ternyata menunjukkan adanya pita-pita lain yang tidak tampak pada hasil elektroforesis gel agarosa, kemungkinan karena kurang spesifik. Pasangan primer P1-P3 menghasilkan empat fragmen dengan ukuran sekitar 1kb, 1,4 kb, 1,6 kb, dan 1,8 kb; sedangkan pasangan primer P2-P4 ternyata mengamplifikasi dua fragmen dengan ukuran sekitar 2 kb dan 0,6 kb.

Terhadap masing-masing fragmen dilakukan hibridisasi satu sama lain untuk menguji homologi masing-masing fragmen. Hasil hibridisasi dengan metoda *Southern blotting* menunjukkan bahwa fragmen-fragmen tersebut berbeda satu sama lain, salah satu hasil pengujian diperlihatkan pada gambar 2. Dugaan bahwa terdapat daerah tumpang tindih antara fragmen 1 kb dan 2 kb ternyata tidak ditunjukkan oleh hasil hibridisasi *Southern blotting*.



Gambar 1. Fragmen-fragmen hasil PCR yang tampak pada gel agarosa. (a) Hasil PCR dengan primer P1-P3, (b) Hasil PCR dengan primer P2-P4.



Gambar 2. Hasil autoradiografi hibridisasi *Southern blotting*. Hibridisasi dilakukan terhadap fragmen 1 kb; 1,4 kb; 1,6 kb; 1,8 kb, dan 2 kb, dengan pelacak (*probe*) fragmen 1 kb. Keterangan : BN = *Bam* H I - *Nde* I, EP = *Eco* R I - *Pst* I, K = klon.

1	GCGGTCTACG	GCTTCGCCAA	GAGCTGTGAC	481	AGAGFAAGCA	CCCATACCGC	CCGTGTTTGG
31	ACATAAACA	CGACCACCG	CAGTCAAGAT	511	ACCTTGATCG	CCTTCAAAGA	TACGTTTGTG
91	GIGACCGTCG	GCACFCATIG	IAGIGCCCGC	541	ATCTTGTGAA	GTTGCCATTG	GTAAAATGTT
91	ATGGAAGAT	TTTGTGTTTT	CAGGAGATFG	571	GTCGCCATCA	ATCAFACAAA	TGAAAGATGC
121	ACCAAGACCA	GAGAATACGF	CACCTIGACG	601	TTCTTACCT	GC AAGGAAT	GTTC AATCAC
151	AACAGTTCCT	GGGTAGCCTT	CTGCTGCTAG	631	AACACGTGAA	CCGGCATCAC	CAAACTGTGT
181	GACAATACCA	ATGATTTTGC	GTTCATCCCA	661	GCCCGCCAAC	ATGTCAICAA	TCGCATCAAA
211	FICAGCTTCT	GCTGGAAGAT	TACCTGCAAT	691	AGCTTCTTGG	TTGGTCATGG	CTACAATCAC
241	ACAGCTTCA	ACCAGATCGA	CCAAIGATGA	721	GCCTTACC	GCAGCAAGAC	CATCGGCTTT
271	TTTTAAMCG	AFCVAAICG	GTTGTGTTTC	751	GATCACGATT	GGCGGCCAT	TTTTTCAAC
301	AGGATCGCCA	AAAGACAGT	TAAATTCGAT	781	AAATGCTTTT	GCTGCATCGA	CTTCAGTAAA
331	FACACGAGGT	TGACCTTGT	CATCAATCAT	811	TACATCGTAG	AACGCAGTAG	GAATGTTGTG
361	GAGGCTTGCA	TACAAGAAGC	CTGTGFAAAC	841	GCGTTTAACT	AAGTGCTTAG	CAAATGCTTT
391	ATGACCATCT	TTTTTCATGC	CTTCCACAGT	871	TGAGCTTCT	AACTGGGCAG	CAAATGAGT
421	TGGACGCATA	ATTTAGTCA	TGCAAGATC	901	TGGGCCCAA	ATTTGAAGCT	CTGCGCGCG
451	AAATACTTCA	GCTGTAACCA	CTGGAGCAGG	931	GCAAGCATCA	ACTACACCAT	TTACAAGCGG
				961	TGCTTCTGGA	CCCTTCAAC	ACCACCC

Gambar 3. Urutan nukleotida fragmen 1 kb. Panjang fragmen 988 pb dan diawali dengan urutan primer P1

Karakterisasi Fragmen DNA Hasil Amplifikasi

Hasil sekuensing parsial terhadap masing-masing plasmid rekombinan yang mengandung fragmen hasil PCR menunjukkan fenomena yang unik, dimana fragmen 0,6 kb dan 2 kb ternyata diamplifikasi oleh sepasang primer yang sama yaitu P4-P4. Fragmen 1,4 kb, 1,6 kb, dan 1,8 kb diamplifikasi sepasang primer yang

sama yaitu P3-P3. Sedangkan fragmen 1 kb diamplifikasi oleh pasangan primer P1-P3.

Berdasarkan hasil sekuensing parsial di atas dapat disimpulkan bahwa fragmen DNA yang diamplifikasi oleh pasangan primer P4-P4 dan P3-P3 bukan merupakan bagian dari gen yang diinginkan, tetapi hasil amplifikasi dari primer yang tidak spesifik. Dengan demikian hanya fragmen 1 kb yang dikarakterisasi lebih lanjut. Hasil

penentuan urutan nukleotida fragmen 1 kb menunjukkan bahwa pasangan primer P1-P3 mengamplifikasi DNA sepanjang 988 basa seperti tampak pada gambar 3.

Kesimpulan :

Amplifikasi fragmen DNA kromosom bakteri termofilik isolat lokal menggunakan teknik PCR dengan primer homolog gen DNA polimerase *Taq* dan *Tth* menghasilkan beberapa fragmen DNA. Hasil studi homologi menunjukkan bahwa masing-masing fragmen mengamplifikasi daerah yang berbeda. Fragmen 1,4 kb, 1,6 kb, 1,8 kb dan 2 kb bukan merupakan fragmen yang diharapkan karena diamplifikasi oleh primer P3-P3 dan P4-P4. Penentuan urutan nukleotida fragmen 1 kb menunjukkan bahwa primer P1-P3 mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 988 pb

Ucapan terima kasih kepada :

TORAY, atas bantuan dananya untuk penelitian ini dan Direktur PAU-Bioteknologi ITB, yang telah memberikan kesempatan kepada kelompok Termofilik untuk melakukan penelitian di laboratorium Rekayasa Genetika PAU.

Pustaka :

1. Adams, Michael, W.W. (1993), "Enzymes and Proteins from Organism that Grow Near and Above 100°C", **Annu.Rev.Microbiol.** 47, 627-658
2. Adams, W.W. and Kelly, R.M. (1995), "Enzymes from Microorganism in Extreme Environments", **Chemical and Engineering News, Special Report**

3. Asakura, K., Komatsubara, H., Soga, S., Yomo, T., Oka, M., Emi, S., and Urabe, I. (1993), "Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of DNA Polymerase Gene (Pol A) From *Thermus Thermophilus* HB-8", **J. Ferment. Bioeng.** 76, 265-269
4. Edwards, C., "Microbiology of Extreme Environments", Mc. Hill. Publishing Company, 1990
5. Elie, C., De Recondo, A., and Forterre, P., (1989), "Thermostable DNA Polymerase from the Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*, Purification, Characterization, and Immunological Properties", **Biochem.** 178, 619-626.
6. Eom, S.H., Wang, J., and Steitz, T.A., Structure of *Taq* Polymerase with DNA at the Polymerase Active Site, **Nature**, 382, 1996, 278-281.
7. Innis, M.A. and Gelfand, H., "Optimization of PCR: PCR Protocols. A guide to Methods and Applications", Academic Press. Inc., California, 1990
8. Ito, J. and Braihwaite, (1991), "Compilation and Alignment of DNA Polymerase Sequences", **Nucleic Acids Research**, vol.3, 208-218
9. Madigan, M.T. and Marrs, B.L., (1997), "Extremophiles", **Scientific American**, pp. 67-71.
10. Marmur, J., (1961), "A Procedure for Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms", **J. Molecular Biology**, vol.3, 208-218