

## Penguncilan Gen Penyandi Enzim Nitrilase Enam Isolat Bakteri Unggulan Isolation of Genes Encoding Nitrilase Enzyme of Six Potential Bacterial

Rini Riffiani, Nunik Sulistinah, & Bambang Sunarko

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI Jl. Jakarta – Bogor km 46, Cibinong,  
Email: riniriffiani@gmail.com

Memasukkan: Juli 2014, Diterima: Oktober 2014

### ABSTRACT

Indonesia as a tropical country has a very high biodiversity. Biological diversity is thought to reflect the diversity of genetic diversity as well as chemical resource that can be used to search for a new biocatalyst. Six isolates of bacteria i.e: GLB5, LP3, TPIK, MICC, 23A2, and 26A2 have been isolated from a variety of industrial waste and have the potential to degrade nitrile. Isolation, identification and purification of nitrilase genes encoding enzymes of six bacterial isolates have been conducted. From this research, three potential bacterial isolates, namely GLB, LP3, and TPIK were identified as *Rhodococcus pyridinivorans*, whereas MICC was identified as *Bacillus subtilis*. *Brevibacillus brevis* was identified as 23A2, and 26A2 was identified as *Microbacterium oxydans*. Map of nucleotide base strands of genes encoding enzymes of the nitrilase three isolates with code GLB5, LP3, and TPIK have been mapped with nitrilase gene size of 960 bp. BLASTN analysis result revealed that the nitrilase gene fragment which was amplified by Nit1101F and Nit1101R primers has a high homology with *Rhodococcus rhodochrous strain tg1-A6 nitrilase gene* similarity percentage of 96%.

**Keywords:** Genes, isolation, nitrile degradate, enzyme

### ABSTRAK

Indonesia sebagai negara tropis memiliki biodiversitas yang sangat tinggi. Keanekaragaman hayati ini diperkirakan mencerminkan keanekaragaman kimiawi sekaligus keragaman genetik yang dapat dimanfaatkan untuk mencari biokatalis baru. Enam isolat bakteri yaitu GLB5, LP3, TPIK, MICC, 23A2, dan 26A2 telah diisolasi dari berbagai limbah industri dan mempunyai potensi sebagai pendegradasi nitril. Penguncilan, identifikasi dan purifikasi gen penyandi enzim nitrilase dari keenam isolat bakteri tersebut telah dilakukan. Dari kegiatan penelitian ini 3 isolat bakteri unggulan, yaitu GLB5, LP3, dan TPIK teridentifikasi sebagai *Rhodococcus pyridinivorans*, sedangkan MICC teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, 23A2 teridentifikasi sebagai *Brevibacillus brevis*, dan 26A2 teridentifikasi sebagai *Microbacterium oxydans*. Peta untaian basa nukleotida dari gen penyandi enzim nitrilase dari ketiga isolat yaitu GLB5, LP3, dan TPIK telah terpetakan dengan ukuran gen nitrilase sebesar 960 bp. Hasil analisis dengan BLASTN memperlihatkan bahwa fragmen gen nitrilase yang diamplifikasi dengan primer Nit1101F dan Nit1101R mempunyai homologi yang tinggi terhadap *Rhodococcus rhodochrous strain tg1-A6 nitrilase gen* dengan persentase kesamaan sebesar 96%.

**Kata Kunci:** Gen, isolasi, nitril, degradasi, enzim

### PENDAHULUAN

Peran enzim sebagai biokatalis dalam sintesis senyawa kimia semakin meningkat. Enzim dianggap sebagai katalis yang bersih, ekonomis dan dalam beberapa hal mampu menjembatani reaksi-reaksi yang tidak mudah dilakukan dengan metode kimia biasa. Cakupan aplikasi biokatalis tidak hanya terbatas untuk produksi bahan-bahan alam, seperti asam-asam amino, nukleotida atau vitamin,

namun juga berperan dalam beragam reaksi (Banerjee *et al.* 2006). Senyawa nitril dan produk hidrolisisnya, terutama dalam bentuk enansiomer murni telah dan akan diaplikasikan secara luas dalam industri farmasi dan kimia (Kaul 2007). Proses hidrolisis nitril dapat dilakukan melalui beberapa cara, termasuk dengan menggunakan biokatalis (Banerjee *et al.* 2006), yang melibatkan nitrilase (EC. 3.5.5.1), atau nitril hidratase (EC. 4.2.1.83 dan amidase (EC. 3.5.1.4).

Sampai saat ini, dikenal dua tipe reaksi degradasi senyawa nitril secara mikrobiologi. Reaksi pertama adalah hidrolisis senyawa nitril yang melibatkan dua enzim, yaitu nitril-hidratase dan amidase. Nitril hidratase mengkatalis hidrolisis nitril menjadi amida, dan amidase mengkatalis hidrolisis amida menjadi asam karboksilat dan amonia (Nagasawa *et al.* 1993; Drauz & Waldmann 1995; Sunarko 1995). Sedangkan, tipe reaksi kedua adalah hidrolisis senyawa nitril yang hanya melibatkan satu macam enzim, yaitu nitrilase. Enzim nitrilase mengkatalis hidrolisis senyawa nitril langsung menjadi asam karboksilat dan amonia tanpa menghasilkan amida sebagai produk intermedietnya (Nagasawa *et al.* 1987; Wyatt & Linton 1988; Drauz & Waldmann 1995).

Banyak laporan yang memanfaatkan enzim pendegradasi nitril sebagai biokatalis untuk memproduksi beragam amida dan/atau asam-asam karboksilat yang bernilai ekonomi tinggi, misalnya untuk memproduksi asam nikotinat, *precursor* Vitamin B<sub>3</sub> (Vaughan *et al.* 1988), akrilamida (Watanabe 1987) atau asam akrilat (Wyatt & Linton 1988). Bahkan sampai saat ini, beberapa biokatalis nitril telah diaplikasikan secara komersial, misalnya untuk produksi akrilamida (Mitsubishi-Rayon Chemical Co) (Nagasawa *et al.* 1993), bahan baku untuk sintesis azafenidin (herbisida) (DuPont).

Penapisan mikroba penghasil enzim pendegradasi nitril, purifikasi dan karakterisasi enzim-enzim tersebut dari beragam spesies mikroba telah banyak dilakukan. Demikian juga gen-gen penyandi enzim pendegradasi nitril telah diklon dari beragam spesies. Gen nitrilase dari *Rhodococcus rhodochrous* dilaporkan telah berhasil dikloning dan diekspresikan pada *Escherichia coli* (Luo *et al.* 2010). Selain itu, gen nitril hidratase dari *R. rhodochrous* J1 (Kobayashi *et al.* 1991), *Rhodococcus* sp. ACV2 (Bigey *et al.* 1999), *Rhodococcus* sp. N-774 (Hashimoto *et al.* 1994), *Rhodococcus* sp. N-771 (Nojiri *et al.* 1999), dan *P. chlororaphis* B23 (Nishiyama *et al.* 1991) juga telah diekspresikan sebagai enzim aktif dalam *E. coli* atau strain *R. rhodochrous*.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, hasil penapisan mikroba dengan menggunakan metode *microtiter plate* diperoleh 6 isolat dan memiliki aktivitas nitrilase untuk biotransformasi nitril. Isolat bakteri tersebut yang dapat tumbuh dalam asetonitril yaitu isolat TPIK, GLB5, LP3, 26A2, 23A2 dan MICC. Isolat TPIK mempunyai kemampuan paling baik dalam mentransformasi nitril dibandingkan isolat lainnya karena mampu menurunkan konsentrasi asetonitril hingga 91,02% dan menghasilkan asam asetat paling tinggi yaitu 42,44 % yaitu sebesar 424,40 mM (Sulistinah & Sunarko 2010).

Tujuan dari kegiatan penelitian ini adalah pengucilan, identifikasi dan mempurifikasi gen penyandi nitrilase dari 6 isolat bakteri unggulan. Dari penelitian ini diharapkan paling tidak satu isolat bakteri unggulan akan diperoleh peta untaian basa nukleutida dari gen penyandi enzim tersebut yang dapat digunakan sebagai landasan untuk konstruksi bakteri rekombinan untuk pengembangan biokatalis untuk mensintesis bahan obat yang secara optis aktif dari senyawa rasemat.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penapisan dilakukan terhadap  $\pm$  250 isolat yang telah teruji mampu mendegradasi senyawa nitril dan penapisan didasarkan pada penentuan pertumbuhan (*enrichment culture*) dan aktivitas enzim sasaran. Pengujian dilakukan menggunakan sistem penapisan cepat (*96 well-microtiterplate*) yang telah dikembangkan (Sulistinah & Sunarko 2010).

Primer dirancang secara semimanual dengan mencari terlebih dahulu urutan basa DNA penyandi gen nitrilase yang diperoleh dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Homologi sekuen ditentukan dengan menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Desain primer dilakukan dengan menggunakan urutan gen nitrilase dari *Rhodococcus rhodochrous* tgl-A6 yang dilaporkan memiliki aktivitas nitrilase serta

gen nitrilase telah berhasil diisolasi (Luo *et al.* 2010). Selanjutnya dilakukan *multiple alignment* urutan nukleotida *Rhodococcus rhodochrous* tgl-A6 dan beberapa strain yang mendekati *Rhodococcus rhodochrous* tgl-A6 sehingga diperoleh daerah terkonservasi menggunakan program Clustal W. Selanjutnya primer dirancang berdasarkan daerah terkonservasi tersebut dan diperoleh 3 pasang primer. Beberapa kandidat primer tersebut tercantum pada Tabel 1.

Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan metode GES (Pitcher *et al.* 1989). Optimasi metode ekstraksi DNA total dari keenam isolat bakteri uji dilakukan berdasarkan perbedaan konsentrasi lysozyme dan waktu inkubasi. Dari hasil optimasi tersebut menunjukkan isolat bakteri gram positif memerlukan lysozyme dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,01g/1,5 mL TE (GLB5,LP3, TPIK, dan MICC), sedangkan untuk isolat bakteri 23A2 dan 26A2 yang merupakan bakteri gram negatif konsentrasi lysozyme yang dibutuhkan relatif lebih rendah yaitu 0,001g/1,5 mL dengan waktu inkubasi selama 60 menit.

Identifikasi isolat bakteri unggulan dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial sekuens 16S rRNA. Amplikasi PCR dilakukan dengan menggunakan primer universal yaitu Primer 27F:5'...GATTTTGATCCTGGCTCAG...3' dan Primer 1492R: 5'...GTGCCAGCAG CCGCGG...3' (Lane 1991). Pencarian homologi secara on-line di pusat data DNA DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) dilakukan dengan cara memasukkan hasil peruntukan DNA (dalam format FASTA) ke dalam program BLAST.

Reaksi PCR dilakukan menggunakan Thermalcycler (Takara Shuzo Co., Ltd., Shiga, Japan)

dengan 40 siklus. Racikan reaksi PCR dilakukan dengan komposisi per reaksi sebesar 25 µL adalah sebagai berikut: Primer nitrilase dengan konsentrasi 10 µM masing-masing sebesar 1 µL, DNA templete dari isolat bakteri GLB5 dan LP3 1 µL, Go Taq® green master mix (Promega) sebesar 12,5 µL dan 9,5 µL *deionized water*.

Pemanasan awal pada suhu 94 °C selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri dari denaturasi 1 menit pada suhu 94 °C, annealing selama 1 menit menggunakan sistem gradien pada suhu 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C dan 2 menit ekstensi pada suhu 72 °C. Setelah 40 siklus selesai, diikuti 4 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C selama 30 menit. Hasil amplifikasi di fraksinasi secara elektroforesis menggunakan Mupid Mini Cell (Exu) pada gel agarose 1% dalam buffer TEA (Tris-EDTA) yang ditambahkan ethidium bromida 6,5 µL/130 mL agarose selama 50 menit pada 100 V. Hasil pemisahan divisualisasi pada *Gel Doc Printgraph* (Bioinstrument ATTO) menggunakan UV transluminator dengan menggunakan standar 1 DNA ladder (Promega) untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi. Setelah diperoleh hasil amplifikasi selanjutnya dilakukan purifikasi PCR dengan menggunakan Kit Purifikasi PCR (Qiagen).

## HASIL

### Penapisan mikroba dan identifikasi 6 isolat unggulan.

Dari hasil penapisan ± 250 isolat bakteri yang diisolasi dari beragam sampel tanah dan air dari berbagai wilayah Indonesia diperoleh 6 isolat

Tabel 1. Primer spesifik fragmen gen nitrilase

Primer	Sekuen	T <sub>m</sub> (°C)	% GC	Σ basa (pb)
Nit 800F	5'CGGTACTTCGACAACCTCGCTGG-3'	72	59	22
Nit 800R	5'TACATCTCTTCCGGTGCGCCA-3	75	57	21
Nit 821F	5'GTGGCAGCTAAGTCGGGGCT-3	70	65	20
Nit 821R	5'CTTCCCGGTGCGCCAAATCG-3	72	65	20
Nit 1101F	5'-CGTACCACATCTGGG TGGACAGC-3'	72	60.9	23
Nit 1101R	5'-TCCGTCTCGTCGGAATGTGTGGA-3'	75	56.5	23

unggulan yang mempunyai aktivitas enzim dan pertumbuhan tertinggi terhadap senyawa nitril.

Dari penelitian sebelumnya didapatkan bahwa hasil penapisan isolat bakteri dengan menggunakan asetonitril, asetamida, benzonitril dan benzamida nampak bahwa isolat bakteri TPIK, GLB5, LP3, 26A2, MICC dan 23A2 mampu tumbuh dalam asetonitril dan asetamida dan mempunyai aktivitas enzim yang relatif lebih baik dibandingkan isolat-isolat bakteri lainnya. Hasil pengukuran aktivitas enzim selama pertumbuhan TPIK, GLB5, LP3, 23A2, MICC dan 26A2 dalam media asetonitril 1M menunjukkan aktivitas enzim pendegradasi asetonitril tertinggi ditunjukkan oleh isolat TPIK dan 26A2 yaitu masing-masing sebesar 4,97 dan 5,0 unit per ml dimana satu unit setara dengan satu mikromol amonium yang dihasilkan per menit per ml enzim (Sulistinah & Sunarko 2010).

Keenam isolat tersebut adalah TPIK, LP3, 23A2, MICC, 26A2 dan GLB5, yang secara visual ditampilkan dalam Gambar 1.

### Optimasi metode ekstraksi DNA total keenam isolat unggulan.

Optimasi metode ekstraksi DNA diperlukan untuk mendapatkan DNA yang berkualitas tinggi (Niemi *et al.* 2001). Hasil optimasi menunjukkan bahwa isolat bakteri gram positif memerlukan lysozyme dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,01g/1,5 mL TE (GLB5, LP3, TPIK, dan MICC), sedangkan untuk isolat bakteri 23A2 dan 26A2 konsentrasi lysozyme yang dibutuhkan relatif lebih rendah yaitu 0,001g/1,5 mL dengan waktu inkubasi selama 60 menit. Bakteri gram



**Gambar 1:** Enam isolat bakteri yang berpotensi sebagai pendegradasi nitril hasil penapisan yang menunjukkan aktivitas enzim dan pertumbuhan tertinggi.

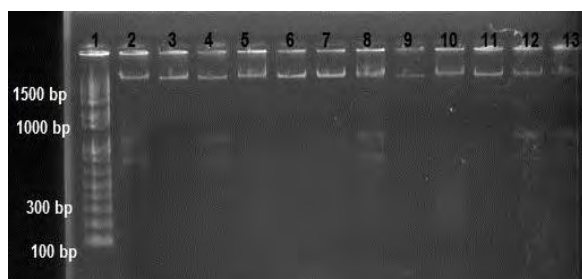
positif pada umumnya mempunyai dinding sel yang tebal sehingga untuk melisisnya diperlukan perlakuan khusus misalnya dengan penambahan enzim lysozyme. Homogenisasi setelah pemberian lysozyme harus larut sempurna agar enzim bekerja merata dan efektif.

Pita DNA dari keseluruhan isolat bakteri uji ditampilkan dalam Gambar 2. Pengujian DNA secara kualitatif dilakukan melalui elektroforesis gel agarosa 1.5%. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa pita DNA telah berhasil diisolasi sehingga DNA dapat digunakan dalam tahapan selanjutnya. Setelah didapatkan DNA dari masing-masing bakteri, selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri menggunakan 16S rRNA.

### Identifikasi isolat bakteri unggulan

Hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan primer 27F dan 1492R menunjukkan bahwa DNA 6 isolat unggulan teramplifikasi pada marker 1400 bp seperti terlihat pada Gambar 3. Hasil analisis sebagian sekuens 16S rDNA isolat-isolat tersebut dapat ditunjukkan bahwa isolat bakteri GLB5, LP3, dan TPIK memiliki kemiripan dengan *Rhodococcus pyridinivorans*, yang masing-masing dengan homologi sebesar 99%, 100% dan 99%. Hasil identifikasi 6 isolat bakteri unggulan tersebut ditampilkan dalam Tabel 2.

Dari hasil penelusuran pustaka, diketahui bahwa *Rhodococcus spp.* merupakan genus bakteri yang telah banyak dilaporkan mampu menghasilkan enzim pendegradasi nitril, terutama



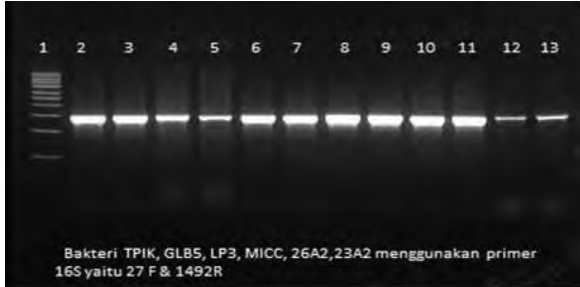
**Keterangan gambar:** 1. 100 bp DNA Ladder, 2,8= MICC; 3,9= LP3; 4,10= TPIK; 5,11= 23A2, 6,12= 26A2. 7-13= GLB5

**Gambar 2.** Elektroforesis hasil ekstraksi DNA total dari enam isolat.

*R. rhodochrous* dan *R. erythropilis*. Sedangkan untuk *R. pyridinivorans* belum banyak yang melaporkan mampu mendegradasi senyawa nitril. Sejauh ini hanya Precigou *et al.* (2004) yang melaporkan bahwa *R. pyridinivorans* mampu mensintesis enzim nitrilase.

Sebelum digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen nitrilase menggunakan 3 macam primer yang telah dirancang, dilakukan optimasi suhu aneling primer. Optimasi suhu *annealing* dilakukan menggunakan PCR gradien dengan variasi suhu antara 58 °C hingga 66°C. Isolat yang digunakan yaitu bakteri dengan kode TPIK. Hasil elektroforesis optimasi suhu aneling menggunakan 3 macam pasang primer dari DNA bakteri unggulan TPIK pada gel agarosa 1.5% ditampilkan pada Gambar 4a dan 4b.

Hasil elektroforesis pada optimasi suhu aneling menggunakan 3 macam pasang primer menunjukkan primer Nit 1101F dan Nit 1101R pada variasi suhu *annealing* 58 °C hingga 66 °C



Keterangan: 1. 1 Kb plus DNA Ladder, 2,3= TPIK; 4,5= GLB5 ; 6,7= LP3 ; 8,9= MICC; 10,11= 26A2. 12,13= 23A2

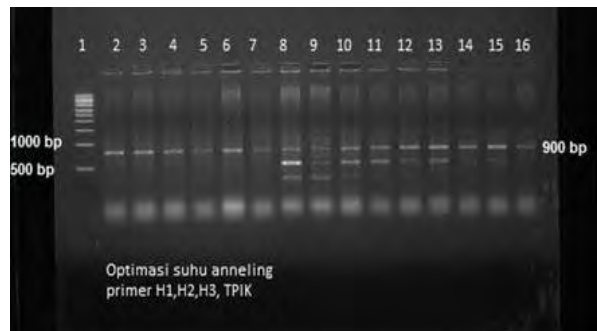
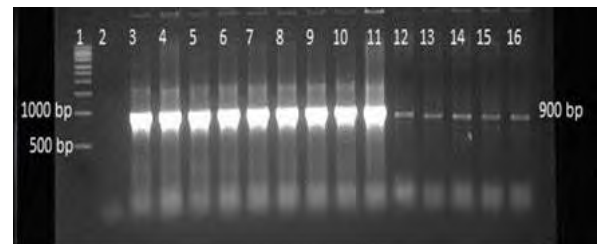
**Gambar 3.** Hasil elektroforesis produk PCR sekuen 16S rRNA dari 6 isolat selektif bakteri TPIK, GLB5, LP3, MICC, 26A2, dan 23A2 penghasil nitrilase.

**Tabel 2.** Identifikasi enam isolat bakteri unggulan secara molekuler

Kode Isolat	Gram	Taxon	Homologi
GLB 5	+	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	99
LP3	+	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	100
TPIK	+	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	99
MICC.	+	<i>Bacillus subtilis</i>	96
23A2	+	<i>Brevibacillus brevis</i>	99
26A2	+	<i>Microbacterium oxydans</i>	100

menghasilkan pita tunggal dengan intensitas yang tinggi, yaitu pada kisaran 960 pb. Sedangkan pada pasangan primer Nit800F dan Nit800R menghasilkan pita tunggal dengan intensitas yang rendah, terlihat tipis. Adapun amplifikasi menggunakan pasangan primer Nit821F dan Nit821R menghasilkan pita ganda. Atas dasar hasil tersebut maka pasangan primer Nit 1101F dan Nit 1101R dipilih untuk mengamplifikasi gen nitrilase pada 6 isolat unggulan yaitu TPIK, LP3, 23A2, MICC, 26A2 dan GLB5. Hasil elektroforesis amplifikasi 6 isolat unggulan menggunakan primer Nit 1101F dan Nit 1101R pada gel agarosa 1.5% dapat dilihat pada Gambar 5.

Dari hasil elektroforesis pada Gambar 5 terlihat isolat GLB5, TPIK dan LP3 menghasilkan pita dengan intensitas yang tinggi dibandingkan



**Keterangan**

atas: 1: marker 1 kb plus, 2: kontrol negative, 3-11: menggunakan primer Nit 1101F& Nit1101R, 3,4: aneling 58°C, 5-6: aneling 60°C, 7-8: aneling 62,5°C, 9-10: aneling 64,5°C, 11: aneling 66°C, 12-16: menggunakan primer Nit 800F& Nit800R, 12-13: aneling 58°C, 14-16: aneling 60°C

bawah: 1: Ladder marker 1 kb plus, 2-7 menggunakan primer Nit 800F& Nit 800R, 2-3: aneling 62,5°C, 4-5: aneling 64,5°C, 6-7: aneling 66°C, 8-16 menggunakan primer Nit 821F& Nit821R, 8-9: aneling 58°C, 10-11: aneling 60°C, 12-13: aneling 62,5°C, 14-15 : aneling 64,5°C, 16: aneling 66°C.

**Gambar 4 a & b.** Hasil Gel Elektroforesis optimasi suhu aneling menggunakan 3 pasang primer yaitu Nit 1101F & Nit1101R, Nit 800F& Nit 800R untuk mendeteksi gen Nitrilase dari DNA bakteri TPIK.

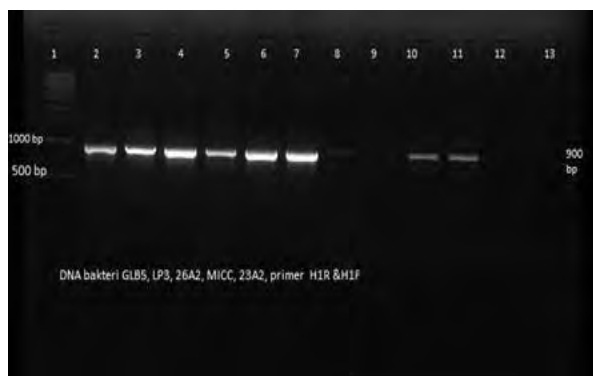
isolat MICC, 23A2, dan 26A2. Uji konfirmasi terhadap 3 isolat (TPIK, GLB5, LP3) yang mempunyai gen penyandi nitrilase ditampilkan pada Gambar 6. Gen nitrilase diharapkan dapat teramplifikasi secara penuh (*full length gene*) dengan pasangan primer Nit1101F dan Nit1101R. Namun, hasil elektroforesis (Gambar 6) diperoleh pita berukuran sekitar 960 pb dengan intensitas yang sangat tinggi. Produk PCR berukuran 960 pb ini diduga merupakan gen nitrilase parsial (*partial gene*), oleh karena itu, sekuensing terhadap produk PCR dilakukan untuk mengetahui sekuen dari fragmen gen tersebut. Ekstraksi dan purifikasi terhadap produk PCR perlu dilakukan sebelum sekuensing untuk menghilangkan berbagai pengotor seperti primer, nukleotida, komponen bufer, enzim, protein,

maupun RNA yang dapat mengganggu proses sekuensing. Produk PCR berukuran 960 pb kemudian diekstraksi dan dipurifikasi menggunakan *Gel Extraction Kit* (Qiagen).

### Sekuensing Gen Nitrilase

Gen nitrilase hasil amplifikasi disekuensing menggunakan primer H1F-H1R. Hasil sekuensing diperoleh urutan basa sebesar 969 bp. Selanjutnya dianalisis dengan program BLASTN untuk membandingkan suatu sekuen nukleotida (*query sequence*) yang kita miliki dengan *database* sekuen nukleotida, sehingga *output* yang didapat berupa identitas nukleotida tersebut, antara lain nama gen dan spesies penghasil dari sekuen lengkapnya. Tingkat homologi yang baik, dapat dilihat dari parameter nilai skor (*bits*) yang lebih dari 150 dan *E value* kurang dari  $10^{-4}$  (Claverie & Notredam 2003).

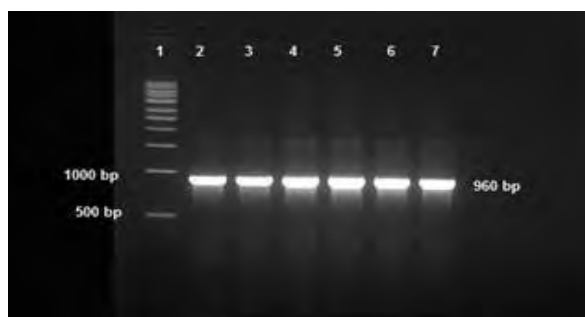
Analisis BLASTN dari sekuen fragmen gen nitrilase yang diamplifikasi dengan menggunakan pasangan primer Nit1101F dan Nit1101R menggunakan NCBI dapat dilihat pada Tabel 3-5,



Keterangan

- 1: Ladder marker 1 kb plus, 2 : PCR produk isolat GLB5,
- 3-4 : Purifikasi pcr produk GLB5, 5: PCR produk isolat LP3,
- 6-7 : Purifikasi pcr produk LP3, 8: PCR produk isolat 26A2,
- 9: Purifikasi pcr produk 26A2, 10: PCR, produk isolat MICC,
- 11: Purifikasi pcr produk MICC, 12: PCR produk isolat 23A2,
- 13: Purifikasi pcr produk 23A2

**Gambar 5** Hasil Gel Elektroforesis produk PCR dan hasil purifikasi produk PCR amplifikasi bakteri unggulan GLB5, LP3, MICC, 26A2, dan 23A2 menggunakan primer Nit 1101F & Nit1101R untuk mendeteksi gen Nitrilase pada suhu anelling optimum 60°C .



Keterangan

- 1: Ladder marker 1 kb plus, 2-3 : Purifikasi pcr produk TPIK, 4-5 : Purifikasi pcr produk GLB5, 6-7 : Purifikasi pcr produk LP3

**Gambar 6.** Gel elektroforesis gen nitrilase bakteri unggulan TPIK, GLB5 dan LP3 menggunakan primer Nit1101F dan Nit1101R, dengan suhu anelling optimum 60°C.

**Tabel 3** Hasil analisis Blastn fragmen gen nitrilase dari TPIK menggunakan primer Nit1101F dan Nit1101R

Sekuen yang bersesuaian	Score (bits)	E value	Max Ident (%)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain tgl-A6 nitrilase gene	1564	0	98
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> nit A gene for nitrilase Strain PA34	1424	0	95
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> gene for nitrilase. complete cds	1424	0	95

Tabel 4 Hasil analisis Blastn fragmen gen nitrilase dari LP3 menggunakan primer Nit1101F dan Nit1101R .

Sekuen yang bersesuaian	Score (bits)	E value	Max Ident (%)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain tgl-A6 nitrilase gene	1596	0	99
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> nit A gene for nitrilase Strain PA34	1452	0	96
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> gene for nitrilase. complete cds	1452	0	96

Tabel 5 Hasil analisis BLASTN fragmen gen nitrilase dari GLB5 menggunakan primer Nit1101F dan Nit1101R .

Sekuen yang bersesuaian	Score (bits)	E value	Max Ident (%)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain tgl-A6 nitrilase gene	1543	0	98
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> nit A gene for nitrilase Strain PA34	1465	0	96
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> gene for nitrilase. complete cds	1465	0	96

berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa urutan basa yang diperoleh memiliki homologi sebesar 98% dengan sekuen *Rhodococcus rhodochrous strain tgl-A6 nitrilase gene* dengan nomor akses bank gen EF467367 (Luo *et al.* 2010). Akan tetapi memiliki homologi yang paling rendah 95% dengan *Rhodococcus rhodochrous gene for nitrilase. complete cds* dengan nomor akses bank gen D11425 (Kobayashi *et al.* 1992)

## PEMBAHASAN

### Kemampuan Isolat Bakteri sebagai Penghasil Nitrilase

Dari hasil penapisan sekitar 250 isolat bakteri yang diisolasi dari beragam sampel tanah dan air dari berbagai wilayah Indonesia diperoleh 6 isolat unggulan yang mempunyai aktivitas enzim dan pertumbuhan tertinggi terhadap senyawa nitril. Isolat bakteri yang mampu tumbuh dalam asetonitril diasumsikan mampu mensistesis pendegradasi nitril (nitrilase, NHase, Amidase) memiliki enzim nitrilase yang mampu mentransformasinya menjadi asam karboksilat dan amonia. Keberadaan aktivitas enzim ini dapat diketahui melalui terbentuknya asam asetat sebagai produk hasil degradasi senyawa nitril. Pada pengujian terdahulu didapatkan hasil bahwa TPIK, LP3 dan GLB5 mampu menghidrolisis 1M asetonitril sebagai substrat menghasilkan asam asetat sebagai produk degradasi sebesar 424,40mM;

284,56mM; 155,77Mm, sedangkan untuk MICC, 23A2 dan 26A2 produk degradasi sangat kecil sehingga tidak terdeteksi oleh HPLC (Sulistinah & Sunarko 2010).

Pertumbuhan bakteri dalam media yang mengandung senyawa nitril membuktikan bahwa bakteri mampu menghidrolisis senyawa nitril sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhannya (Kakeya *et al.* 1991).

### Hasil identifikasi keenam isolat unggulan

Hasil identifikasi bakteri menggunakan 16S rDNA yaitu 3 isolat bakteri unggulan (GLB5, LP3, dan TPIK) teridentifikasi sebagai *Rhodococcus pyridinivorans*, sedangkan MICC, 23A2, 26A2 teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis*, *Microbacterium oxydans*. Secara umum, ciri-ciri morfologi dan biokimia genus *Rhodococcus* spp. adalah sebagai berikut: *Rhodococcus* merupakan genus bakteri gram positif, non-motil, tidak menghasilkan spora, dan bersifat aerob. Marga ini berkerabat dekat dengan *Mycobacteria* and *Corynebacteria*. Kelompok bakteri ini ditemukan dan berkembang dalam berbagai lingkungan, termasuk tanah, air, dan dalam sel-sel eukariotik. *Rhodococcus* dilaporkan mempunyai keragaman genetik dan katabolis yang tinggi. *Rhodococcus* mempunyai potensi dalam mengkatabolisasi berbagai senyawa bioaktif dan menghasilkan steroid, akrilamida dan asam akrilat, dan keterlibatan

mereka dalam biodesulfurisasi bahan bakar fosil (Van der Geize & Dijkhuizen 2004). Selain itu, aplikasi lain yang penting dari *Rhodococcus* adalah dalam biokonversi untuk mengkonversi berbagai bahan awal yang murah menjadi senyawa yang lebih berharga. Selain itu, untuk memetabolisme polusi lingkungan yang berbahaya, seperti toluena, naftalena, herbisida, *Rhodococci* juga digunakan untuk memetabolisme substrat aromatik yang penting secara ekonomi (Kaplan *et al.* 2013).

Perancangan primer yang tepat perlu dilakukan untuk mendapat gen penyandi nitrilase. Teknik ini digunakan untuk identifikasi suatu gen atau DNA yang spesifik. Pasangan primer nitrilase, Nit800 F dan Nit800R, Nit821F dan Nit821R, Nit1101F dan Nit1101R yang dirancang untuk mengamplifikasi gen sepanjang 1101 pb. Dari hasil optimasi suhu annealing menggunakan ketiga primer tersebut pada bakteri TPIK, menunjukkan primer Nit1101F dan Nit1101R menghasilkan intensitas pita yang lebih baik dibanding pasangan primer yang lain. Primer Nit 1101F memiliki sekuens 5'- CGT ACC ACA TCT GGG TGG ACA GC-3' dan primer Nit1101R memiliki sekuens 5'- TCC GTC TCG TCG GAA TGT GTG GA-3' memiliki C pada posisi terakhir ujung 3', karena dapat meningkatkan ikatan spesifik pada ujung 3', dikarenakan ikatan G atau C lebih kuat. Selain itu pasangan primer ini memiliki panjang primer yang optimal yaitu 23 bp sehingga dapat mencapai spesifitas yang cukup untuk terikat dengan mudah pada DNA template pada suhu *annealing*nya. Pada pasangan primer Nit821F dan Nit821R hasil elektroforesis lebih dari satu band yang terbentuk. Hal ini bisa terjadi karena T<sub>m</sub> yang terlalu tinggi menyebabkan hidridisasi primer-template yang kurang tepat sehingga yield produk PCR pun akan rendah. T<sub>m</sub> yang terlalu rendah dapat menyebabkan terbentuk produk-produk non-spesifik sehingga terjadi banyak *mismatch* yang menurunkan spesifitas PCR (Dieffenbach *et al.* 1993).

Amplifikasi gen nitrilase dari DNA dari isolat TPIK, GLB5, dan LP3 sebagai DNA cetakan,

menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki pita dengan intensitas yang baik dan kemurnian tinggi. Optimasi primer perlu dilakukan dalam mengamplifikasi fragmen gen nitrilase. Optimasi terhadap suhu *annealing* dilakukan dengan PCR gradien dengan variasi suhu antara 58°C -66°C. Perkiraan suhu *annealing* yang digunakan ditentukan berdasarkan nilai T<sub>m</sub>, yaitu 5 °C di bawah nilai T<sub>m</sub> (McPherson & Moller 2006).

Amplifikasi gen nitrilase menggunakan pasangan primer Nit1101F dan Nit1101R pada suhu annealing 60 °C menunjukkan adanya pita tunggal dengan intensitas yang tinggi, yaitu pada kisaran 960 pb. Berdasarkan elektroforegram (Gambar 6), produk PCR tidak memperlihatkan pita dengan ukuran yang diinginkan (1101 pb). Primer ini memiliki nilai *melting time* (T<sub>m</sub>) sebesar 72°C dan %GC sebesar 60.9%. Berdasarkan analisis dengan program *Gen Runner*, primer Nit1101F terdapat kemungkinan dimer sekitar 4 bp dan hairpin loop 4 pb. Primer Nit1101R memiliki sekuens 5'- TCC GTC TCG TCG GAA TGT GTG GA-3' dengan nilai T<sub>m</sub> 72°C dan %GC sebesar 56.5%.

Gen nitrilase hasil amplifikasi disekuon dengan menggunakan primer Nit1101F dan Nit1101R. Menghasilkan urutan basa sebesar 960 pb. Tingkat homologi yang baik, dapat dilihat dari parameter nilai skor (bits) yang lebih dari 150 dan *E value* kurang dari 10<sup>-4</sup> (Claverie & Notredam 2003). Hasil analisis BLASTN dari sekuen fragmen gen nitrilase yang diamplifikasi dengan menggunakan pasangan primer H1F-H1R dapat dilihat pada Tabel 3-5, berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa urutan basa yang diperoleh memiliki homologi yang tinggi dengan sekuen *Rhodococcus rhodochrous strain tg1-A6 nitrilase gene*. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Luo *et al.* (2010) yang berhasil mengisolasi gen nitrilase dari bakteri *Rhodococcus rhodochrous strain tg1-A6* sebesar 1,1 kb dan berhasil mengkloning dan mengover ekspresikan gen tersebut pada *E. coli*. Gen nitrilase juga berhasil diisolasi dari *Rhodococcus rhodochrous J1* kemudian dikloning dan diekspresikan pada *E. coli* (Kobayashi



*et al.* 1992). Saat ini bakteri rekombinan *E.coli* mampu mengekspresikan gen nitrilase dari bakteri *Alcaligenes faecalis* dan memproduksi nitrilase pada skala bioreactor (Jain *et al.* 2012).

## KESIMPULAN

Dari kegiatan penelitian ini 3 isolat bakteri unggulan, yaitu GLB5, LP3, dan TPIK teridentifikasi sebagai *Rhodococcus pyridinivorans*, sedangkan MICC, 23A2 dan 26A2 teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis*, *Microbacterium oxydans*. Peta untaian basa nukleutida dari gen penyandi enzim nitrilase dari ketiga isolat yaitu GLB5, LP3, dan TPIK telah teramplifikasi. Diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai landasan untuk mengkonstruksi bakteri rekombinan untuk pengembangan biokatalis untuk mensintesis bahan obat yang secara optis aktif dari senyawa rasemat.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Hendra Munandar, MSi dan Suri Handayani yang telah memberikan kontribusi yang besar selama penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Banerjee, A., P. Kaul & UC. Banerjee. 2006. Enhancing the catalytic potential of nitrilase from *Pseudomonas putida* for stereoselective nitrile hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 77-78.
- Bigey, F., H. Chebrou, D. Fournand & A. Arnaud. 1999. Transcriptional analysis of the nitrile-degrading operon from *Rhodococcus* sp. ACV2 and high level production of recombinant amidase with an *Escherichia coli*-T7 expression system. *Journal Applied Microbiology*. 86: 752-760.
- Claverie, JM. & C. Notredame. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Indianapolis: Wiley Publishing.
- Dieffenbach, C., TM. Lowe & GS. Dveksler. 1993. General concept for PCR primer design. *Genome Research*. 3: 30-37.
- Drauz, K. & H. Waldmann. 1995. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*. 365-367.
- Hashimoto, Y., M. Nishiyama, S. Horinouchi & T. Beppu. 1994. Nitrile hydratase gene from *Rhodococcus* sp N-774 requirement for its downstream region for efficient expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemical*. 58: 1859-1865.
- Jain D., VS Meena, S. Kaushik, A. Kamble, Y. Chisti, & UC Banerjee. 2012. Production of Nitrilase by a recombinant *Escherichia coli* in Laboratory Scale Bioreactor. *Fermentation Technology*. 1: 103-107.
- Takeya, H., N. Sakai, T. Sugai & H. Ohta .1991. Microbial hydrolysis as a potent method for the preparation of optically active nitriles, amides and carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*. 32: 1343-1346.
- Kaul, P., A. Banerjee, UC. Banerjee. 2007. Nitrile hydrolase. *Industrial Enzymes*: 531-547.
- Kaplan, O., AB.Vesela, A. Petrickova, F.Pasquarelli, M. Picmanova, A. Rinagelova, TC. Bhalla, M. Patek & Martinkova, L. 2013. A comparative study of nitrilases identified by genome mining. *Journal Molecular Biotechnology*. 54 (3): 996-1003.
- Kobayashi, M., M. Nishiyama, T. Nagasawa, S. Horinouchi, T. Beppu & H. Yamada.1991 Cloning nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Biochimica Biophysica Acta*. 1129:23-33.
- Kobayashi, M., H. Komeda, N. Yanaka, T. Nagasawa & H. Yamada. 1992. Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *Journal Biological Chemistry*. 26729: 20746-20751.
- Lane, DJ. 1991. 16/23 rRNA sequencing In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*

- Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds. Pp 115-175. Wiley, Chichester, Uk.
- Luo, H., L. Fan, Y. Chang, J. Ma, H. Yu & Z. Shen. 2010. Gene cloning, overexpression, and characterization of the nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* tg1-a6 in *E. Coli*. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 160: 393-400.
- McPherson, MJ., SG. Moller. 2006. *PCR Second Edition*. New York: Taylor and Francis Group.
- Nagasawa, T., H. Shimizu & H. Yamada. 1993. The superiority of the 3<sup>rd</sup> generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40: 189-195.
- Nagasawa, T., H. Nanaba, K. Ryuno, K. Takeuchi & H. Yamada. 1987. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Eur. Journal Biochemistry*. 162: 1305-1312.
- Nishiyama, M., S. Horinouchi, M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada & T. Beppu. 1991. Cloning and characterization of genes responsible for metabolism of nitrile compounds from *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Journal Bacteriology* 173: 2465-2472.
- Niemi, RM., I. Heiskanen, K. Wallenius & K. Lindstroms. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal Microbiology Methods*. 48: 155-165.
- Nojiri, M., M. Yohda, M. Odaka, Y. Matsushita, M. Tsujimura, T. Yoshida, N. Dohmae, K. Takio & I. Endo. 1999. Functional expression of nitrile hydratase in *Escherichia coli*: requirement of a nitrile hydratase activator and post-translational modification of a ligand cysteine, *Journal Biochemistry*. 125: 696-704.
- Pitcher, DOG., NA. Saunders & RJ. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA guanidium thiocyanate. *Letter in Applied Microbiology*. 8: 151-156.
- Precigou, S., M. Wieser, P. Pommare, P. Goulsd, & R. Duran. 2004. *Rhodococcus pyridinovorans* MW3, a bacterium producing a nitrile hydratase. *Biotechnology Letters* 26 (17): 1379-1384.
- Sulistinah, N. & B. Sunarko. 2010. Penapisan Mikroba Potensial Penghasil Enzim untuk Biotransformasi Senyawa Nitril. *Berkala Penelitian Hayati. Edisi Khusus*. 4F: 277-310.
- Sunarko, B. 1995. Mikrobieller Abbau von Acetonitril und Vinylacetat und Charakterisierung von Vinylacetatesterase. (Disertasi). Universität Bayreuth.
- Van der Geize, R & Dijkhuizen, L. 2004. Harnessing the Catabolic Diversity of Rhodococci for Bio-technological Applications. *Current Opinion Environmental and in Microbiology*. 7: 255-261.
- Vaughan, PA., PS. Cheetham & Knowles CJ. 1988. The utilization of pyridine carbonitriles and carboxamides by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *Journal General Microbiology* 134:1099-1107.
- Watanabe, I., Y. Satho, K. Endomoto. 1987. Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity. *Agriculture Biology Chemistry*. 51: 3193-3199.
- Wyatt, JM. & EA. Linton. 1988. The industrial potential of microbial nitrile biochemistry. Dalam: Mehnert, J., L. Brimer (eds.), *Cyanide Compounds in Biology*, John Wiley & Sons, Chichester. 32-42.