UJI AKTIVITAS ENZIM PENISILIN G ASILASE (PGA) SECARA KUALITATIF TERHADAP ISOLAT ESCHERICHIA COLI YANG BERASAL DARI AIR SUNGAI DI KOTA PADANG

Ruth Rize Paas Megahati

INFO ARTIKEL

Diterima:

Direview:

Disetujui:

Kata Kunci:

E.coli, penisilin asilase,
uji aktivitas enzim

Abstrak

Penicillin G acylase is catalysed hydrolisis enzym penicillin G to 6- amino penicilanad acid (6-APA). 6-APA is precursor to made semisynthetic penicillin. Semisynthetic penicillin derivated of natural penicillin that get it by change natural penicillin chemistry structure or synthesis nuclear penicillin. Penicillin G acylase (PGA) produce of bacteria but bacteria produced number penicillin is limited so looking new bacteria penicillin produce is importen to do. Based it haved bacteria isolation in Padang town any rivers, include air batang Kandis, air batang Kurao, air batang Kuranji, air batang Arau dan air batang Aru di kota Padang. This research do in Kopertis wilayah X laboratory. Activity assay PGA used Meevootisom methode is metode easy to selection, rapid and spesifik to selection bacteria strain PGA produced. Meevootisoom metode used Serratia marsescens, is resisten to penicillin and sensitiv to 6-APA. Result of this research is every isolated from all rivers contain PGA.

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Antibiotik merupakan suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang dapat membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain penyebab penyakit infeksi. Antibiotik pertama kali ditemukan oleh Fleming pada tahun 1929. Fleming menemukan adanya suatu substansi antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus* yang berada di cawan agar

yang telah dikontaminasi oleh jamur *Penicillium*, substansi ini selanjutnya disebut sebagai penisilin.

Penggunaan penisilin secara global di dunia, dan penggunaan penisilin dengan dosis di luar kontrol atau dosis kurang tepat serta mulai timbulnya gen – gen resisten terhadap antibiotik, menyebabkan timbulnya gejala resistensi pada beberapa macam mikroorganisme terhadap penisilin alami. Contohnya, sebanyak 80% strain *Staphylococcus aureus* resisten terhadap

penisilin dan pada beberapa macam antibiotik lain, seperti metisilin, sefalosforin, eritromisin, streptomisin dan neomisin. Masalah resistensi ini dapat diatasi dengan cara membuat penisilin semisintetik yang merupakan turunan dari penisilin alami.

Penisilin semisintetik dapat dihasilkan dari bahan dasar asam 6-aminopenisilamat (6-APA). 6-APA merupakan hasil hidrolisis dari penisilin alami oleh aktivitas enzim penisilin G asilase (Kafshnochi et al., 2010). Bakteri penghasil penisilin G asilase di alam jumlahnya masih sangat terbatas, maka diperlukan pencarian strain – strain baru E.coli dari air sungai di Padang (Sumatera barat).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian maka rumusan masalah, adalah Bagaimanakah hasil uji aktivitas enzim Penisilin G Asilase (PGA) secara kualitatif terhadap isolat *Escherichia coli* yang berasal dari air sungai di kota Padang.

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri E.coli penghasil enzim penisilin G asilase dari air sungai di kota Padang.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengatasi masalah resistensi terhadap penisilin
2. Pemanfaatan sumber daya alam setempat (air sungai kota Padang)

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah salah satu bakteri gram negatif yang dapat menghasilkan enzim penisilin G asilase.

E.coli bisa ditemukan pada dua habitat yang berbeda, yaitu habitat primer (host) dan habitat sekunder (lingkungan eksternal). Habitat primer E.coli adalah pada usus vertebrata, sedangkan habitat sekunder E.coli adalah air, tanah. dan fases hewan vertebrata. Perbedaan habitat primer dan habitat sekunder, antara lain pada habitat primer suhu lingkungan konstan, anaerob, nutrient bervariasi, berkompetisi sedangkan pada habitat sekunder suhu bervariasi, aerob, nutrient tidak bervariasi, kompetisi rendah. E.coli yang hidup di habitat primer mampu beradaptasi terhadap lingkungannya jika dibandingkan dengan E.coli yang hidup pada habitat sekunder, sehingga populasi E.coli pada habitat primer dan habitat sekunder berbeda secara genetik (Gordon,D.M et al 2002).

B. Penisilin

Penisilin mempunyai struktur dasar yang terdiri inti penisilin yaitu asam 6-aminopenisilamat (6-APA) dan rantai samping. Inti penisilin merupakan hasil kondensasi cincin thiazolidin dan cincin β -laktam (Gambar 1).

Gambar 1. Struktur kimia penisilin
 a. cincin β -laktam b. cincin thiazolidin R. rantai samping
 (Arroliga dan Pien, 2003)

Variasi struktur rantai samping akan membedakan jenis penisilin satu dengan yang lainnya dan akan mempengaruhi spektrum antibakterinya.

C. Penisilin asilase

Penisilin asilase adalah enzim yang mengkatalis proses hidrolisis penisilin G atau penisilin V menjadi 6-APA) dan asam organik. Asam organik yang dihasilkan akan beda – beda tergantung dari jenis penisilin yang dihidrolisis. Bila penisilin G yang dihidrolisis maka akan dihasilkan asam fenilasetat (PAA), tetapi bila yang dihidrolisis penisilin V maka akan dihasilkan asam fenoksi metil asetat (Rajendhran et al., 2004) Penisilin asilase dapat mengkatalis reaksi bolak – balik dalam menghidrolisis penisilin G, sehingga bila ada campuran asam fenilasetat dan asam 6-APA serta penisilin asilase maka akan terjadi reaksi pembentukan penisilin G (Chandel.A.K et al.,2007).

Penisilin G asilase yang dihasilkan oleh *E.coli* ATCC 11105 terdiri dari subunit α dan subunit β yang terdapat pada ruang periplasmik (Flores.G et al., 2004). Peptida sinyal berperan dalam proses transfer prekursor enzim ke ruang periplasmik, subunit α berperan untuk menentukan spesifitas substrat, endopeptida berperan dalam proses pelipatan prekursor enzim menjadi enzim penisilin asilase yang dewasa, dan subunit β berperan dalam menentukan aktivitas katalitik enzim (Lindsay & Pain 1990 ; Lindsay & Pain 1991).

D. Metode Meevootisom

Metode Meevootisom merupakan metode seleksi yang mudah, cepat, dan spesifik untuk menseleksi strain bakteri yang dapat menghasilkan enzim PGA baik secara intraseluler atau secara ekstraseluler. Metode Meevootisom menggunakan bakteri *Serratia marcescens* yang berwarna merah dan resisten terhadap penisilin

dan sensitive terhadap 6-APA. Adanya 6-APA di medium sebagai hasil hidrolisis penisilin G oleh bakteri yang mempunyai aktivitas PGA di dalam medium akan menghambat pertumbuhan *S. marcescens*. Terhambatnya aktivitas *S.marcescens* akan menghasilkan zona bening di sekitar bakteri yang mempunyai aktivitas PGA (Meevootisom & Saunders, 1987)

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada Bulan Juli s/d September tahun 2011 di Laboratorium Kopertis wilayah X.

B. Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, aquades, penisilin G, alkohol 70%, medium NA, medium LB, medium Endo Agar, bakteri *E.coli* strain lokal dan bakteri *Serratia marcescens*.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, botol sampel, tabung reaksi, tabung durham, cawan petri, jarum ose, kapas, aluminum foil, autoklav, bunsen, sarung tangan, inkubator, shaker, vorteks, botol larutan, tissu, spatula, mikropipet, hot plate, gelas ukur, beaker glass, timbangan analitik, lemari pendingin dan laminair flow.

C. Metode penelitian

Jenis penelitian ini adalah survey deskriptif, sampel diambil dari air sungai di kota Padang. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggugurkan metode Simple Random Sampling.

D. Persiapan penelitian

1. Pembuatan medium

- Medium Natrium Agar (NA)
- Pembuatan Medium Endo
- Pembentukan Medium Laktosa Broth

2. Pembuatan kertas cakram

3. Sterilisasi alat menggunakan autoklav

4. Penyediaan bakteri *Serratia marsecens*

5. Penyediaan penisilin G

E. Prosedur penelitian

1. Pengambilan sampel di lapangan

2. Kerja di laboratorium

Untuk mendapatkan koloni bakteri *E.coli* dari air, dilakukan uji coliform, adapun langkah-langkah dalam melakukan uji coliform sebagai berikut:

- Uji dugaan
 - Uji penguat
- Uji aktivitas enzim secara kualitatif (Metode Meevootisom)
 - Pengenceran *Serratia marsecens*.
 - Pengenceran bakteri *E.coli*
 - Pembuatan larutan penisilin G
 - Pembuatan media tanam
 - Peletakkan kertas cakram f.
 - Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan tidak diolah secara statistik. Data penelitian ini merupakan hasil pengamatan yang dilakukan pada medium dengan melihat ada tidaknya zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang diletakkan di atas medium NA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Hasil penelitian yang telah dilakukan tentang isolasi dan uji aktivitas enzim penisilin G asilase secara kualitatif dari bakteri *Escherichia coli* pada air sungai kota Padang, dapat

dilihat pada Tabel 1, 2 dan Gambar 2 di bawah ini:

Tabel 1. Hasil isolasi *E.coli* dari air sungai kota Padang

No	Sumber isolat	Hasil isolasi
1	Air batang Kandis	+
2	Air Batang Kuranji	+
3	Air Batang Kurao	+
4	Air Batang Arau	+
5	Air Batang Aru	+

Ket: tanda += Air sungai didapatkan isolat murni *E. coli*

Dari Tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa isolasi *E. coli* yang telah dilakukan pada air batang Kuranji, air batang Kurao, air batang Kandis, air batang Arau dan air batang Aru di kota Padang menunjukkan hasil positif yang berarti bahwa pada kelima air sungai tersebut berhasil didapatkan isolat murni *E. coli*.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas enzim penisilin G asilase secara kualitatif pada *E.coli* yang diisolasi dari air sungai kota Padang.

No	Sumber isolat	Hasil uji aktivitas enzim
1	Air batang Kandis	+
2	Air Batang Kuranji	+
3	Air Batang Kurao	+
4	Air Batang Arau	+
5	Air Batang Aru	+

Ket: tanda += *E. coli* menghasilkan enzim penisilin G asilase

Hasil Uji Aktivitas Enzim Penisilin G Asilase dari Bakteri *E. coli* pada beberapa Air Sungai Kota Padang

A. Sumber isolat Air Batang Kandis dan Air Batang Kurao

B. Sumber Isolat Air Batang Arau dan Air batang kuranji

C. Sumber Isolat Air batang Aru

Gambar 2 . Isolat – isolat yang menghasilkan penisilin G asilase Dari Tabel 2 dan Gambar 2 di atas dapat dilihat bahwa uji aktivitas enzim penisilin G asilase yang telah dilakukan pada setiap isolat *E. coli* menunjukkan hasil positif yang berarti bahwa *E. coli* menghasilkan enzim penisilin G asilase.

B. Pembahasan

1. Isolasi *E. coli*

Isolasi *E.coli* yang telah dilakukan pada air batang Kuranji, air batang Kurao, air batang Kandis, air batang Arau dan air batang Aru di kota Padang menunjukkan hasil positif yang berarti bahwa pada kelima air sungai tersebut berhasil ditemukan isolat murni *E. coli*. Ditemukannya isolat murni *E. coli* pada sampel air sungai setelah melalui beberapa tahapan isolasi, mulai dari proses pengenceran sampel sampai penanaman sampel pada medium selektif.

Pada dasarnya ditemukannya *E. coli* pada air merupakan indikator air tersebut telah terkontaminasi oleh tinja manusia atau tinja hewan berdarah panas. Berdasarkan pengamatan penulis pada kelima sampel sungai tersebut banyak sekali terdapat aktivitas manusia.

Aktivitas manusia di sekitar badan sungai dapat menyebabkan terjadinya pencemaran bahan organik dan anorganik sehingga memicu terjadinya pencemaran mikroorganisme pada sungai. Terdapatnya bakteri *E. coli* pada air sungai merupakan dampak dari pencemaran bahan organik yang ditimbulkan oleh aktivitas manusia di pinggiran sungai tersebut.

Penentuan ada tidaknya *E. coli* yang berhasil diisolasi dari sampel air sungai dapat dilihat dari warna koloni bakteri yang ditimbulkan pada medium endo agar. Endo agar merupakan medium selektif yang digunakan dalam penelitian ini untuk penanaman sampel. Penanaman sampel pada endo agar setelah melalui beberapa tahapan isolasi. Tahap pertama dimulai dari pengenceran sampel yang bertujuan mengurangi komposisi mikroba yang terkandung di dalam sampel air sungai. Selanjutnya dilakukan uji coliform yang melalui beberapa langkah, uji coliform dilakukan dengan tujuan untuk menseleksi bakteri coliform yang mana salah satunya adalah *E. coli*. Sampel yang positif coliform kemudian ditanam pada medium endo agar.

Endo agar merupakan medium yang selektif terhadap bakteri gram positif tetapi sangat baik untuk pertumbuhan bakteri gram negatif. Masing-masing koloni bakteri dapat dikenali dari warna yang ditimbulkan pada medium endo agar, seperti *E. coli* akan menghasilkan warna merah atau logam mengkilap, sedangkan *Proteus*, *Salmonella*, *shigella*, menghasilkan warna pink pudar dan *Pseudomonas* tidak menghasilkan warna (Anonimus, 2011).

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan terlihat koloni yang tumbuh pada medium endo agar berwarna merah kilap logam. Penyebaran warna merah kilap logam hampir menutupi seluruh

permukaan medium endo agar. Warna koloni terlihat lebih jelas setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Menurut Dunling dan Fiessel (2007), berdasarkan karakteristik pertumbuhan *E. coli* pada berbagai macam medium pertumbuhan, didapatkan koloni *E. coli* dengan warna yang berbeda-beda. Pada media CCA *E. coli* menghasilkan warna ungu terang, pada medium DCA *E. coli* menghasilkan warna ungu terang dengan pink dan pada medium endo agar didapatkan koloni *E. coli* dengan warna merah logam mengkilap.

Penelitian yang dilakukan oleh Stoppe (2007), ia berhasil mengisolasi 49 strain *E. coli* dari sampel air minum di Brasil yang ditempatkan ke dalam phylogenetic groups A (15 strains), B1 (19 strains), B2 (2 strains) and D (13 strains). Dia menganalisis setiap sampel dengan menggunakan medium endo agar. Pada endo agar, koloni *E. coli* akan menimbulkan warna yang khas yaitu warna merah gelap dengan kilau metalik. Selanjutnya dia menyimpan isolat *E. coli* yang menunjukkan warna yang khas (merah kilau metalik) di dalam larutan gliserol 25%.

2. Uji aktivitas enzim

Uji aktivitas enzim penisilin G asilase yang dilakukan pada bakteri *E. coli* yang diisolasi dari air batang Kuranji, Kurao, Kandis, Arau dan air batang Aru positif menghasilkan enzim penisilin G asilase. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram pada medium. Zona bening terbentuk karena bakteri *Serratia marcescens* sensitif terhadap 6-APA, sehingga pertumbuhan dan aktivitasnya akan terhambat. Terhambatnya aktivitas dan pertumbuhan *Serratia marcescens* ditandai dengan terbentuknya zona bening.

Hal ini didukung oleh pernyataan Meevootisom (1987), *Serratia marsescens* yang sensitif terhadap 6-APA tetapi resisten terhadap penisilin G digunakan sebagai indikator. Kegagalan pertumbuhan *Serratia marsescens* yang ditandai dengan adanya zona bening disekeliling koloni bakteri, menunjukkan bahwa koloni tersebut menghasilkan enzim PGA yang menghidrolisis penisilin G menjadi 6-APA.

Produksi enzim penisilin G asilase pada *E.coli* sangat berkaitan dengan habitat dan faktor lingkungan. Habitat yang berbeda akan menyebabkan perbedaan *E. coli* secara genetic drift. Fenotip suatu organisme dihasilkan dari genotip dan pengaruh lingkungan organisme tersebut. Variasi fenotip suatu organisme disebabkan oleh perbedaan struktur gen atau urutan DNA. Penelitian yang dilakukan Arsyad (2006), *E. coli* yang diisolasi dari air, tanah, feses manusia dan beberapa feses hewan vertebrata menghasilkan kuantitas enzim penisilin G asilase yang berbeda.

Penisilin G asilase adalah enzim yang terdapat di ruang periplasmik yang terdiri dari subunit α dan subunit β . Kedua subunit dihasilkan oleh suatu prekursor tunggal yang dibawa ke ruang periplasmik kemudian akan mengalami proses pemotongan proteolitik untuk menjadi enzim yang aktif. Peptida sinyal berperan dalam proses transfer prekursor enzim ke ruang periplasmik, subunit α berperan untuk menentukan spesifitas substrat, endopeptida berperan dalam proses pelipatan prekursor enzim menjadi enzim penisilin asilase yang dewasa, dan subunit β berperan dalam menentukan aktivitas katalik enzim (Lindsay dan Pain, 1991).

Penisilin G asilase dikode oleh gen PGA yang terdapat di dalam genom *E.*

coli dengan panjang 2,4 kb. Perbedaan habitat akan menyebabkan perbedaan struktur gen PGA sehingga menyebabkan perbedaan dalam kualitas dan kuantitas PGA yang dihasilkan. Perubahan struktur gen PGA akan menyebabkan penu kerangka baca (reading frame) dari gen PGA. Perubahan reading frame a menyebabkan perubahan pada sintesa protein atau PGA (Dale, 1995).

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa setiap isolat bakteri *Escherichia coli* yang diisolasi dari air batang Kuranji, air batang Kandis, air batang Kurao, air batang Arau dan air batang Aru terbukti menghasilkan enzim penisilin G asilase karena terlihatnya zona bening di sekitar kertas cakram pada medium.

B. Saran

Dari hasil penelitian ini belum dapat ditentukan berapa jumlah enzim penisilin G asilase yang dihasilkan oleh setiap isolat *E. Coli*. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan uji aktivitas enzim penisilin G asilase secara kuantitatif dari bakteri *E.coli* pada air sungai kota Padang.

DAFTAR PUSTAKA

- Arroliga M.E, Pien.L.P 2003. Penicillin allergy : Consider trying penicillin again. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 70 : 313- 321
- Chandel A.K, L. Venkateswar Rao, M. Lakshmi Narasu, Om V. Singh. The realm of penicillin G acylase in lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology*.2008. 42 : 199–207.

- Flores G, Soberon X, Osuna J. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. *Protein Sci* 2004;13:1677–83.
- Gordon.D.M., Bauer.S., dan Johnsons.R. 2002. The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats. *Microbiology* 148: 1513-1522.
- Lindsay,C.D., dan Pain,R.H. 1990. The folding and solution conformation of penicillin G acylase. *J. Biochem* 192 : 133 – 144
- ,1991. refolding and assembly of penicillin acylase, an enzyme composed of two polypeptide chains that result from proteolytic activation. *J. Biochem* 30 : 9034 – 9040
- Kafshnochi.M, Farajnia.S, Aboshof.R, Babaei.H and Aminolroayae.M. 2010.
- Cloning and over-expression of Penicillin G acylase in *Escherichia coli* BL21. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(18) : 2697-2701.
- Mevootisoom. V, Somsuk. P, Prachaktam.R, Flegel.T 1983. Simple screening methods for isolation of penicillin acylase producing bacteria. *Appl environ microbial* 46 : 1227-1229
- Rajendhran J, Gunasekaran P. Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. *J Biosci Bioeng* 2004;97:1–13
- Sizmann,D., Kelmann,C., Bock,A. 1990. Primary structure requirement for the maturation in vivo of penicillin acylase from *E.coli* ATCC 11105. *J. Biochem* 192 : 143 – 151.