Jurnal Kimia Andalas, ISSN 0853-8018
Volume 3, Nomor 2, Tahun 1997 (140-146)

PENGUJIAN EKSPRESI GEN POLIAMIN OKSIDASE DARI TUMBUHAN ALFALFA (*Medicago sativa*) DIDALAM INANG *Escherichia coli* REKOMBINAN

Abdi Dharma

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang 25163

(Diterima 20 Juni 1997, disetujui 20 Juli 1997)

INTISARI

Pada kerja terdahulu, telah diklon gen untuk poliamin oksidase (PAO) dari alfalfa kedalam *Escherichia coli*. Disini dilaporkan aktifitas enzimatik PAO dari inang *E. coli* rekombinan yang membawa gen PAO didalam vektor Lambda UNI ZAP dan plasmid Bluescript (Stratagene). *E. coli* rekombinan dibiakkan dan ekstrak atau lisat kasar dari *E. coli* rekombinan inang diuji aktifitas enzimatik PAO dengan metoda colorimetri. Aktifitas enzimatic PAO didalam inang rekombinan *E. coli* ditemukan tergantung pada temperatur tumbuh. Tingkat tertinggi aktifitas enzimatik PAO didalam inang rekombinan terlihat pada biakan dengan temperatur tumbuh dibawah 30 °C dan optimum pada 23 °C. Sedangkan ekspresi dari gen PAO alfalfa diatur oleh promotor *lacZ* yang terdapat pada vektor.

ABSTRACT

In earlier work, the gene for polyamine oxidase (PAO) from alfalfa have been cloned into *Escherichia coli*. Here, the enzymatic activity of PAO in recombinant *E. coli* host bearing PAO gene in Lambda UNI ZAP and Bluescript plasmid (Stratagene) are reported. The recombinant *E. coli* have been cultured and crude extracts or lysates of recombinant *E. coli* host were assayed for PAO enzymatic activity colorimetricly. The enzymatic activity of PAO in recombinant *E. coli* host is dependent on the growth temperature. The highest levels of PAO enzymatic activity in the recombinant host are observed in culture grown below 30 °C, and optimum at 23 °C, while the expression of alfalfa PAO gene is regulated by *lacZ* promoter of the vector.

PENDAHULUAN

Poliamin seperti spermidin dan spermin merupakan senyawa yang ditemukan pada semua organisme hidup, oleh karena itu disebut dengan poliamin biasa. Sedangkan norspermidin, norspermin dan kaldopentamin serta poliamin lainnya hanya ditemukan pada organisme tertentu, oleh karena itu disebut dengan poliamin tidak biasa. Poliamin terutama poliamin biasa adalah kandungan sel yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan sel[1,2]. Sedangkan poliamin tidak biasa terlibat dalam mekanisme adaptasi tumbuhan dan organisme lain terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim seperti kekeringan dan panas[3]. Namun demikian, bentuk pengaturan secara enzimatik maupun genetik dari biosintesis dan penumpukan poliamin, serta mekanisme kerja dan peran fisiologisnya pada tumbuhan tinggi belum jelas. Oleh karena itu perlu dikembangkan probe molekular dan alat untuk menjelaskan peran dan bentuk pengaturan biosintesis senyawa poliamin biasa dan poliamin tidak biasa pada tumbuhan tinggi.

Dari penelitian pendahuluan pada alfalfa (*Medicago sativa*) yang mengalami tekanan kekeringan ditemukan tiga enzim kunci yang terlibat dalam reaksi katalisa biosintesis poliamin biasa dan tidak biasa dari diamin, putrescine. Ketiga enzim tersebut adalah putrescine aminopropiltransferase, poliamin oksidase [4] dan Schiff-base reductase-decarboxylase. Dua enzim terakir terlibat dalam biosintesis poliamin tidak biasa melalui suatu jalur baru yang tergantung pada L-aspartil β-semialdehid sebagai donor propilamin dan tidak tergantung pada S-adenosilmetionine terdekarboksilasi.

Walaupun poliamin telah diketahui terlibat dalam berbagai proses pertumbuhan dan pengembangan tumbuhan, namun perannya yang pasti masih menjadi perdebatan dikalangan para ahli. Salah satu pendekatan untuk memecahkan masalah ini, adalah dengan mengembangkan strategi genetika molekular untuk menguji hipotesa tertentu sehubungan dengan peran pasti dari poliamin pada biologi sel tumbuhan. Sebagai langkah pendahuluan dalam mengembangkan strategi genetika molekular adalah menentukan sifat-sifat dari enzim-enzim biosintetik senyawa bersangkutan, menentukan bentuk dan cara pengaturan dan ekspresi genetik dan enzimatik dari enzim tersebut serta penumpukan dari poliamin produk, serta pengembangan probe untuk analisa protein dan gen bersangkutan. Sebagai tujuan jangka pendek dari penelitian mengenai peran poliamin pada tumbuhan ini dipusatkan kepada segi biologi molekular dan biokimia, sedangkan tujuan jangka panjang dipusatkan kepada pengujian hipotesa tentang aspek fisiologis poliamin pada tumbuhan tingkat tinggi.

Salah satu hipotesis yang ingin diuji pada masa mendatang adalah apakah poliamin tidak biasa dan rantai panjang, mempunyai hubungan sebab akibat dengan kemampuan tumbuhan untuk beradaptasi dengan tekanan abiotik. Untuk itu telah dipilih alfalfa sebagai model untuk mengembangkan strategi genetika molekular dan alat untuk akhirnya menguji hipotesa ini.

Dari penelitian pendahuluan telah didapatkan galur alfalfa toleran dan rentan kekeringan. Sebagai respon terhadap kekeringan, alfalfa toleran kekeringan mensintesa poliamin rantai panjang, sedangkan alfalfa rentan kekeringan tidak[5]. Disamping itu, peta genetika molekular dan metoda transfer gen langsung telah tersedia pada alfalfa. Dengan mentransfer gen yang berperan dalam sintesis poliamin rantai panjang dan poliamin tidak biasa didalam genotip alfalfa rentan kekeringan akan dapat dilihat apakah ekspresi dari gen ini akan meningkatkan daya tahan tumbuhan ini terhadap kekeringan atau tidak. Dengan demikian dapat dibuktikan dengan kuat hubungan sebab akibat dari poliamin tidak biasa (rantai panjang) dengan penotipe toleran tekanan abiotik. Bila terbukti demikian, maka gen yang bertanggung jawab dalam sintesa poliamin akan dapat digunakan untuk meningkatkan toleransi tumbuhan secara genetik terhadap tekanan abiotik dalam program pemuliaan tanaman pertanian.

Gen untuk salah satu enzim yang berperan dalam biosintesa poliamin, yaitu gen untuk poliamin oksidase (PAO), telah diisolasi dari alfalfa perpustakaan cDNA. Kerja yang dilaporkan disini adalah pengamatan tentang sifat-sifat dari strain inang rekombinan *E. coli* yang membawa gen poliamin oksidase alfalfa didalam vektor plasmid atau phagemid. Secara alami, *E. coli* tidak mempunyai gen untuk poliamin oksidase.

PELAKSANAAN PENELITIAN

Uji Aktifitas Enzimatik Poliamin Oksidase

Aktifitas katalitik PAO diukur dengan pengukuran secara kolometrik produk dari oksidasi spermidin, 1-pyrroline, yang dikatalisa oleh PAO menurut metode Holmstedt *et al*[6] yang sudah dimodifikasi.

PAO mengkatalisa pemutusan spermidin pada atom nitrogen sekunder, menghasilkan 1,3-diaminopropan, pyrroline dan hidrogen peroksida.

Karena 1-pyrrolin dalam keadaan setimbang dengan γ-amino-butiraldehid, maka senyawa terakhir dapat berkondensasi dengan o-amonobenzaldehida membentuk suatu senyawa dengan koefisien molar ekstinksi $1,86 \times 10^3$ /M cm [5] pada 435 nm. Campuran reaksi standar (1 ml) mengandung 150 µmol kalium fosfat, pH 6,5), 15 µmol spermidin trihidroklorida, pH 6,3, 66 µL dari 0,2% larutan o-aminobenzaldehida dalam etanol, 80 µg catalase dan 1 µmol asam dietilditiobarbamat. Reaksi diinsiasi dengan penambahan ekstrak enzim yang mengandung 0,2-1.0 mg protein. Campuran reaksi dieramkan pada 30 °C selama 30 min dan reaksi dihentikan dengan penambahan 66 µL asam trichloroasetat 50%. Protein yang telah terdenaturasi dan menggumpal dipisahkan dengan pemusingan pada 12,000 x g dan serapan dari larutan jernih supernatan diukur pada 435 nm dengan Hewlet-

Packard model 8452 A diode array spektrofotometer. Satu unit aktifitas enzim didefenisikan dengan jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu nmol 1-pyrroline per min.

Strain *Escherichia coli* dan Prosedur Kloning Gen

Dalam kerja terdahulu, perpustakaan cDNA dari kecambah alfalfa telah diklon kedalam sisi kloning EcoR1 dan Xhol dari vektor UNI ZAP XR, suatu vektor lambda phage yang ditengahnya disisipi dengan Bluescript plasmid, dan disebut juga dengan phagemid (phage yang mengandung plasmid). Sebagai inang digunakan *E. coli* SOLR. Promotor *lacZ* digunakan untuk mendorong ekpresi protein fusi untuk penapis-immunoan (immunoscreening) dan analisa Western Blot. Plasmid Bluescript yang mengandung sisipan cDNA alfalfa untuk PAO dipotong dari lambda phage dan ujung-ujungnya disambung membentuk lingkaran. Kerja ini dilakukan oleh ExAssist helper bacteriophage didalam inang *E. coli* Y1089. Pada penelitian yang dilaporkan ini, *E. coli* SOLR yang membawa phagemid yang mempunyai sisipan gen poliamin oksidase dari alfalfa, dan *E. coli* Y1089 yang mengandung plasmid Bluesript yang disisipi dengan gen PAO alfalfa dibiakkan didalam medium LB, atau M-9 dengan induser isopropilthiogalaktosida (IPTG), glukosa atau laktosa pada temperatur bervariasi selama 1 malam. Medium LB terdiri dari ekstrak ragi, trypton dan NaCl. Sedangkan medium M-9 adalah medium dasar yang mengandung metal runut, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NaCl, NH_4Cl, $CaCl_2$ dan $MgSO_4$. Kemudian protein dari sel inang diekstrak dengan bufer kalium fosfat pH, 6,5, dan diuji aktifitas enzimatik PAO.

HASIL DAN DISKUSI

Pengaruh Temperatur Tumbuh Terhadap Ekspresi Gen PAO

Pengaruh temperatur pertumbuhan terhadap aktifitas enzimatik PAO didalam rekombinan *E. coli* SOLR telah diuji. Plasmid rekombinan yang membawa gen PAO dari alfalfa diekspresikan didalam biakan *E. coli* SOLR yang ditanam pada 20, 23, 29, 35 dan 37 °C. *E. coli* transforman yang ditanam pada 23 °C menghasilkan protein rekombinan dengan aktifitas enzimatik PAO tertinggi (Tabel 1).

Hampir tidak ada aktifitas enzimatik PAO ditemukan pada biakan yang dieramkan pada 37 °C. Aktifitas enzimatik PAO ditemukan tinggi pada sel yang dieramkan pada temperatur dibawah 30 °C dan optimum pada 23 °C. Hasil ini memperlihatkan bahwa temperatur tumbuh dari sel mempengaruhi kapasitas organisme inang untuk menghasilkan PAO rekombinan yang mempunyai aktifitas enzimatik.

Ishizuka et al. (1993)[7] juga mengamati pengaruh yang sama dari temperatur tumbuh terhadap aktifitas enzimatik dari putrescine oksidase protein rekombinan didalam *E. coli* JM109. Rekombinan protein yang dihasilkan oleh sel yang tumbuh pada 37 °C ditemukan dalam fraksi yang tidak larut.

Tabel 1.Aktifitas Spesifik dari Poliamin Oksidase didalam *E. coli* SOLR yang mengandung pBluescript plasmid dengan gen PAO alfalfa

No	Temperatur Tumbuh (°C)	Aktifitas Spesifik (nmol/min/mg protein)
1	20	12,2
2	23	36,2
3	29	28,4
4	35	3,3
5	27	0,6

Aktifitas Spesifik PAO dari Alfalfa Didalam Ekstrak Kasar *E. coli* SOLR yang Mengandung DNA Rekombinan

Aktifitas spesifik enzim PAO didalam ekstrak kasar *E. coli* SOLR rekombinan telah diuji. Aktifitas enzimatik PAO dari protein ekstrak kasar sel SOLR yang mengandung plasmid rekombinan ditemukan 2 - 8 kali lebih tinggi dari aktifitas enzimatik PAO sel SOLR tanpa plasmid rekombinan (Tabel 2). Percobaan ini menunjukkan bahwa klon rekombinan menghasilkan aktifitas enzimatik PAO.

Tabel 2. Aktifitas Spesifik dari PAO didalam *E. coli* SOLR yang mengandung Plasmid DNA Rekombinan dengan Gen PAO alfalfa

Sel SOLR yang mengandung plasmid DNA rekombinan dibiakkan satu malam dengan medium LB/Amp. Kemudian 1 ml biakan dipindahkan kedalam 100 ml medium segar LB/Amp dan dieramkan 4 jam pada 37 °C, setelah itu kedalam kultur ditambahkan IPTG dengan konsentrasi akhir 2 mM dan biakan dieramkan kembali 4 jam pada 23 °C. Biakan dipusing dan endapan sel disuspensikan kembali didalam bufer kalium fosfat dan selanjutnya sel dipecah dengan French pressure. Protein ekstrak kasar diuji terhadap aktifitas enzimatik PAO.

No	Garis Sel (Cell Line)	Media Tumbuh	Aktifitas Spesifik PAO (nmol/min/mg)
1	SOLR	LB	4,60
2	SOLR + pBS*	LB + IPTG	63,03
3	SOLR + pBS	LB - IPTG	6,60
4	SOLR + pBS	M-9 + glukosa	1,98
5	SOLR + pBS	M-9 + laktosa	13,80

*) pBS adalah plasmid yang mengandung gen PAO alfalfa.

Aktifitas Spesifik Poliamin Oksidase Alfalfa Didalam Lisat Kasar *E. coli* Y1089 yang Mengandung DNA Rekombinan

Lisat kasar dari lisogen *E. coli* Y1089 takrekombinan dan Y1089 rekombinan yang mengandung dan tidak mengandung gen PAO alfalfa telah diuji terhadap aktifitas enzimatik PAO. Seperti terlihat pada Tabel 3, aktifitas spesifik enzim PAO dari ekstrak sel Y1089 yang mengandung lisogen rekombinan lambda dengan gen PAO alfalfa sekitar 3 - 7 kali lebih tinggi dari aktifitas enzim PAO lisat protein dari koloni kontrol, tergantung pada induser pada media tumbuh.

Tabel 3. Aktifitas Spesifik Enzim PAO didalam *E. coli* Y1089 yang terinfeksi dengan Lisogen Rekombinan Lambda

Lisat kasar dari lisogen lambda dipersiapkan dengan menginokulasikan 50 ml medium LB dengan satu koloni lisogen rekombinan Y1089. Setelah biakan yang dieramkan pada 32 °C tumbuh sampai OD_{600} = 0,5, temperatur pengeraman dinaikkan dengan cepat sampai 42-45 °C. IPTG 0,5 M (1 ml) ditambahkan kedalam biakan setelah pengeraman 20 min pada 42-45 °C. Selanjutnya biakan dieramkan satu lagi pada 37-38 °C. Sel dipusing pada 3000 x g selama 5 min, dan endapan sel disuspensikan kembali didalam bufer 0,2 M kalium fosfat pH 7 dan segera dibekukan didalam nitrogen cair. Sel beku dicairkan kembali dan dipusing pada 11,000 x g selama 10 min. Larutan supernatan diuji aktifitas enzimatik PAO.

No	Garis Sel (Cell Line)*	Media + Induser	Aktifitas PAO	
			mol/mim/mg	%
1	Y1089	LB	1,66	100
2	Y1089 + λ + Gen X	LB + IPTG	1,56	94
3	Y1089 + λ + Gen PAO	LB − IPTG	5,25	316
4	Y1089 + λ + Gen PAO	LB + Laktosa	12,71	766

*). Y1089 adalah suatu strain *E. coli*, (Y1089 + L + gen X) dan (Y1089 + L + Gen PAO) adalah *E. coli* Y1089 yang terinfeksi oleh lambda rekombinan membawa gen alfalfa yang tidak dikenal dan gen PAO alfalfa secara berturut-turut.

Induser Untuk Rekombinan Gen

Biakan *E. coli* Y1089 yang membawa gen PAO didalam phagemid memberikan aktifitas enzimatik PAO yang lebih tinggi bila diinduksi dengan laktosa atau IPTG. Ekspresi gen PAO pada biakan *E. coli* SOLR yang membawa gen PAO didalam plasmid pBluescript juga diinduksi oleh laktosa atau IPTG. Hal ini menunjukkan bahwa gen PAO alfalfa didalam rekombinan phagemid dikontrol oleh promotor *lacZ*.

KESIMPULAN

Enzim tumbuhan, poliamin oksidase, telah diklon kedalam inang bakteri, dalam bentuk suatu vektor phagemid yang disisipi dengan plasmid pBluescript. Ekspresi enzim aktif poliamin oksidase dari inang ini tergantung kepada temperatur. Temperatur tumbuh dibawah 30 °C diperlukan untuk mendapatkan enzim PAO yang aktif katalitik.

Strain inang rekombinan mengekspresikan poliamin oksidase alfalfa dibawah kontrol promotor *lacZ*. Induser dari promotor *lacZ* seperti IPTG dan laktosa mempunyai kemampuan untuk menginduksi ekspresi gen didalam inang tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

1. P. T. Evans, R. L.. Malmberg, Do polyamines have a role in plant development ?. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 235-269 (1989)
2. O. Heby Role of Polyamines in the controle of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1- 20 (1981)
3. H. E. Flores. Polyamines and Plant Stress. In Stress Responses in Plants: Adaptation and Aclimation Mechanism. *Plant Biology* 12: 217-377 (1990)
4. S. Bagga, A. Dhanna, G.C. Phillips, G.D. Kuehn. Evidence for the occurrence of polyamine oxidase in dicotyledonous plant *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Cell Report* 10: 550-554 (1991)
5. G.D. Kuehn, B. Rodriguez-Garay B, S.Bagga, G.C. Phyllips, Novel occurrence of uncommon polyamines in higher plants. *Plant Physiol* 94: 855-857 (1990)
6. B. Holmstedt, L. Larson, R. Tham, Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity. *Biochim Biophys Acta* 48: 182-186 (1961)
7. H. Ishizuka, S. Horinouchi, T. Beppu , Putrescine oxidase of *Micrococcus rubbens*: primary structure and expression in *Escherichia coli*. *J. Gen Microbiol* 139: 425-432 (1993)