

ULASAN

Gen Penanda Molekuler pada Bakteri (*Molecular Marker Gene in Bacteria*)

ARIS TRI WAHYUDI

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 11 November 1996/Disetujui 19 Maret 1997

PENDAHULUAN

Keberadaan dan aktivitas bakteri pada suatu habitat (lingkungan) dapat diketahui atau dimonitor dengan berbagai macam cara. Salah satu di antaranya yaitu dengan menggunakan teknik molekuler untuk mendeteksinya. Teknik molekuler tersebut meliputi tiga kelompok utama, yaitu metode imunologi (*immunological method*), metode pelacak asam nukleat (*nucleic acid probing*), dan metode penanda molekuler (*molecular marker*). Metode imunologi misalnya antibodi monoklonal dan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Metode dengan menggunakan pelacak asam nukleat melibatkan deteksi sekuens *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan *ribonucleic acid* (RNA) yang spesifik, yang mungkin secara acak berasosiasi dengan gen-gen yang fungsional, serta kepekaannya dapat ditingkatkan melalui amplifikasi sekuens dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik molekuler penanda molekuler merupakan topik utama dalam tulisan ini, melibatkan introduksi gen ke dalam bakteri yang diinginkan untuk ditelaah aktivitasnya, terutama di habitat alaminya.

Untuk mengetahui berbagai aktivitas bakteri di habitatnya, baik itu bakteri hasil rekayasa genetika maupun bukan hasil rekayasa, perlu adanya penanda molekuler dengan menggunakan gen yang mudah diasai penampilan dan ekspresinya. Gen merupakan suatu segmen DNA yang mampu menyandikan protein (enzim). Banyak penanda molekuler yang dapat digunakan untuk menandai bakteri. Namun, pada kesempatan ini hanya beberapa saja yang akan dikemukakan. Gen penanda tersebut nantinya dapat juga berperan sebagai gen pelapor (*reporter gene*) yang akan menunjukkan aktivitas bakteri tersebut di habitatnya. Dengan demikian, aktivitas bakteri tersebut di lingkungan dapat dipantau sehingga langkah-langkah apa yang akan diambil untuk kegiatan selanjutnya dapat ditentukan. Masalahnya se-

karang, bagaimana cara menandai bakteri yang kasat mata tersebut? Konjugasi merupakan salah satu teknik yang mampu menjawab pertanyaan ini. Teknik ini dapat digunakan untuk menandai bakteri yang akan dipantau atau ditelaah aktivitasnya dalam suatu lingkungan.

KONJUGASI BAKTERI

Konjugasi merupakan salah satu cara untuk memindahkan DNA dari satu bakteri ke bakteri lain melalui kontak fisik antarsel. Transfer DNA tersebut berlangsung melalui struktur bakteri yang dinamakan pilus seks. Dalam konjugasi harus terjadi pasangan yang spesifik antara sel bakteri donor dan resipiennya. Molekul DNA yang dipindahkan berupa utas tunggal, dan pasangan basa-basa komplemennya akan disintesis di dalam sel resipien. Begitu pula pada sel donor, setelah satu utas DNA ditransfer ke resipien sel donor akan segera mensintesis pasangan basa-basa komplemennya kembali. Molekul DNA hasil transfer yang ada di dalam sel resipien mempunyai sifat-sifat yang sama dengan DNA asalnya (donor). Untuk gen yang dibawa plasmid dalam kepentingannya sebagai penanda molekuler, pada umumnya plasmid pembawanya bersifat nonkonjugatif, artinya plasmid tersebut tidak dapat pindah sendiri ke bakteri lain karena tidak punya gen *tra* yang digunakan untuk pindah. Oleh karena itu, proses memindahkan plasmid tersebut ke bakteri lain harus dengan bantuan gen *tra* yang dibawa oleh plasmid pembantu (*helper plasmid*) yang berada di dalam sel bakteri tertentu (biasanya *Escherichia coli* HB101), atau gen *tra* yang telah disisipkan di dalam kromosom bakteri pembawa plasmid nonkonjugatif tadi. Produk dari gen *tra* (protein Tra) tersebut akan memobilisasi plasmid nonkonjugatif transfer ke bakteri lain (resipien). Pada umumnya plasmid penolong ini bersifat bunuh diri (*suicide*) kalau berada di luar galur inangnya, jadi berspektrum inang sempit (*narrow host range*). Untuk gen penanda yang

dibawa transposon. plasmid pembawanya umumnya juga berspektrum inang sempit, maksudnya setelah transposon tersebut meloncat dan menyisip pada genom bakteri resipien, plasmid pembawa transposon tersebut akan bunuh diri.

MENGAPA PERLU PENANDA?

Untuk mengetahui bagaimana aktivitas dan potensi bakteri yang ada di habitat alami, bakteri tersebut perlu ditandai dengan penanda molekuler (gen) yang bersifat stabil yang sekaligus dapat berperan sebagai pelapor.

Di dalam habitat alaminya kemungkinan besar terdapat juga bakteri dari spesies yang sama dan mempunyai sifat atau ciri yang sama dengan bakteri yang ditelaah. Oleh karena itu, bakteri yang ditelaah perlu ditandai agar dapat dipantau aktivitasnya.

Dalam menandai bakteri dengan gen, perlu diketahui apakah gen yang digunakan dapat diekspresikan oleh bakteri yang ditandai. Kalau gen penanda dapat terekspresikan, kemudian perlu diketahui bagaimana stabilitas ekspresinya di dalam bakteri tersebut. Selain itu perlu diketahui pula apakah gen penanda yang digunakan itu dimiliki oleh bakteri yang akan ditandai. Kalau bakteri yang akan ditandai mempunyai gen yang sama dengan gen penanda yang akan digunakan maka gen penanda tersebut tidak dapat digunakan atau cara lain untuk mengintroduksinya harus dicari.

Gen penanda dapat dibawa langsung oleh plasmid ataupun dapat dibawa oleh transposon. Transposon merupakan suatu potongan DNA yang dapat loncat atau pindah dari satu situs ke situs yang lain dalam suatu genom. Transposon pembawa gen penanda pada umumnya dikonstruksi pada plasmid yang dapat bunuh diri setelah masuk ke dalam sel bakteri lain, sedangkan gen penandanya meloncat ke genom dan menyisip secara acak. Meloncatnya gen penanda tersebut disebabkan karena adanya enzim transposase yang disandikan oleh gen *tnp** yang terdapat pada plasmid pembawanya. Gen *tnp** umumnya dikonstruksi di luar transposon sehingga setelah transposon pembawa gen penanda ini meloncat dan menyisip pada kromosom, maka transposon tersebut tidak akan mampu meloncat lagi. Hal ini karena gen *tnp** bukan merupakan bagian dari elemen yang meloncat sehingga penyisipan tersebut umumnya akan bersifat stabil. Gen penanda yang langsung dibawa plasmid umumnya juga stabil, namun pada beberapa kasus dapat ditunjukkan ketidakstabilannya. Oleh karena itu, stabilitas ekspresi gen penanda yang akan digunakan pada bakteri yang akan ditandai atau ditelaah perlu diketahui terlebih dahulu.

BEBERAPA GEN PENANDA

Meskipun sejumlah gen penanda telah banyak dilaporkan, di sini hanya akan dikemukakan gen penanda yang telah teruji untuk memantau bakteri di lingkungan, khususnya untuk kelompok bakteri gram negatif. Gengen penanda tersebut yaitu gen *luxAB*, *lacZ*, *gus*, *xylE*, dan gen resistensi antibiotik.

Penanda resistensi antibiotik adalah penanda yang paling sering digunakan dan telah banyak dibuat sebagai dasar untuk pengembangan teknik penanda yang lain. Keuntungan dari teknik ini memungkinkan untuk menyeleksi populasi bakteri yang hidup dari bakteri yang ditandai dan teknik ini dapat dilakukan hanya dengan teknik pencawan menggunakan media yang mengandung antibiotik yang sesuai. Seleksi seperti ini relatif mudah dilakukan dan cukup sederhana. Disamping itu, gen penyandi resistensi antibiotik dapat dideteksi dengan teknik yang didasarkan pelacak (*probe-technique*), yang memungkinkan deteksi sel-sel bakteri pembawa gen resistensi antibiotik yang tidak dapat dikulturkan (*nonculturable bacteria*).

Gen *lacZ* dari *Escherichia coli* menyandikan enzim β -galaktosidase. Bakteri yang mengekspresikan gen ini dapat dideteksi dengan menumbuhkannya pada media padat yang mengandung substrat kromogenik X-Gal (*5-chloro-4-bromo-3-indolyl β -D-galaktopiranoside*). Pemecahan senyawa ini akan menimbulkan koloni berwarna biru. Sistem ini telah banyak digunakan sebagai penanda maupun sebagai pelapor kelompok bakteri *Pseudomonas fluorescens* di habitat tanah maupun kelompok bakteri lain yang tidak menghasilkan β -galaktosidase. Bakteri tersebut secara alami tidak mempunyai gen *lacZ* dan tidak dapat menggunakan laktosa. Pengamatan koloni pada media tersebut memperlihatkan adanya koloni berwarna biru yang menunjukkan terekspresinya gen *lacZ* tersebut.

Gen *xylE* secara alami berada pada plasmid TOL (pWWO) bakteri *P. putida*. Gen tersebut menyandikan enzim katekol 2,3-dioksigenase yang mampu mengubah katekol (tidak berwarna) menjadi *hydroxymuconic semialdehyde* yang berwarna kuning. Gen *xylE* telah banyak digunakan untuk menandai, baik itu kelompok bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Bakteri yang ditandai dengan gen *xylE* dapat dideteksi dengan berbagai cara, namun yang paling umum yaitu dengan pencawan berisi media untuk bakteri yang ditandai. Setelah bakteri tumbuh, koloninya disemprot dengan katekol 1%. Koloni yang berasal dari sel bakteri yang ditandai dengan gen *xylE* segera akan berubah menjadi kuning, sedangkan yang tidak ditandai warnanya tetap (tidak berubah warna). Gen ini umumnya terekspresi pada suhu 37°C. Cara ini relatif sederhana dan mudah

dilakukan untuk memantau populasi bakteri di habitat alaminya.

Sistem penanda yang didasarkan pada bioluminesens melibatkan introduksi gen-gen untuk emisi cahaya. Asalnya gen tersebut diklon dari bakteri asal laut, yaitu *Photobacterium fischeri* atau *Vibrio harveyi*. Biologi molekuler dan biokimia produksi emisi cahaya oleh bakteri telah banyak dilaporkan. Gen yang bertanggung jawab terhadap produksi cahaya tersebut ialah gen *luxAB*. Gen ini akan mengekspresikan enzim lusiferase yang akan dapat memancarkan cahaya kalau ada oksigen (aerob). Dengan demikian, gen *luxAB* dapat digunakan sebagai penanda molekuler ataupun sebagai pelapor pada bakteri. Bakteri yang ditandai dengan gen ini akan memproduksi cahaya luminesens yang mudah dilihat dalam keadaan gelap, sehingga bagaimana aktivitas bakteri di habitatnya dapat diketahui. Akhir-akhir ini telah dilaporkan bahwa gen *luxAB* yang telah dikonstruksi dalam suatu plasmid telah berhasil disisipkan pada kromosom *Rhizobium meliloti*. Bintil yang dibentuk oleh bakteri ini ternyata memperlihatkan adanya cahaya luminesens. Melalui cahaya yang dihasilkan tersebut, dapat dianalisis aktivitas bakteri *R. meliloti* yang ditandai di habitatnya.

Sistem penanda lain menggunakan gen *gus* juga telah banyak digunakan untuk menelaah aktivitas bakteri di lingkungan. Gen ini aktif mensintesis enzim glukuronidase yang dapat dideteksi dengan relatif mudah. Akhir-akhir ini, penggunaan gen *gus* bahkan telah digunakan untuk memantau aktivitas *Rhizobium* dalam membentuk bintil akar. Cara ini relatif mudah dan hasilnya dapat diandalkan. Gen tersebut juga dibawa transposon Tn5 yang dapat dimasukkan ke *Rhizobium* melalui konjugasi. Bintil yang terbentuk dan mengandung bakteri hasil rekayasa ini berwarna biru. Hal ini mudah sekali diketahui, apakah galur *Rhizobium* hasil rekayasa (yang ditandai) atau galur lain yang secara alami ada di lingkungan tersebut yang membentuk bintil akar. Kemungkinan penggunaan gen ini sebagai penanda pada bakteri lain yang menjadi perhatian masih

terbuka lebar asalkan secara alami bakteri tersebut tidak menghasilkan glukuronidase. Untuk itu perlu adanya suatu penelitian.

Mengingat peran penting gen di atas sebagai penanda molekuler untuk menelaah aktivitas bakteri di habitat alaminya, maka pemilihan penggunaan gen sebagai penanda harus disesuaikan dengan bakteri yang akan ditelaah. Dengan demikian, hasil maksimum yang diharapkan mungkin dapat diperoleh dengan menggunakan gen penanda (pelapor) yang relatif sederhana, namun hasilnya dapat diandalkan. Untuk itu, pemanfaatan gen penanda seperti di atas merupakan cara yang relatif mudah untuk menganalisis berbagai aktivitas bakteri di habitat alaminya, asalkan gen penanda tersebut sesuai dan dapat diandalkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Herrero, M., V. deLorenzo & K. N. Timis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- O'kane, D. J., W. L. Lingle, J. E. Wampler, M. Legocki, R. P. Legocki & A. A. Szalay. 1988. Visualization of bioluminescence as a marker of gene expression in rhizobium-infected soybean root nodules. *Plant Mol. Biol.* **10**: 387-399.
- Prosser, J. I. 1994. Molecular marker system for selection of genetically engineered microorganism in the environment. *Microbiol.* **140**: 5-17.
- Willetts, N. 1988. Conjugation, hlm. 49-77. Di dalam J. Grinsted & P. M. Bennett (ed.), *Plasmid Technology*. London: Academic Press.
- Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. L. Akermans & R.A. Jefferson. 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiol.* **141**: 1691-1705.