

Waktu Optimum Pemajanan Mutasi Bakteri Penghasil Vitamin B₁₂ *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 Menggunakan Sinar Ultraviolet

Retno Lestari¹, Abdul Latif², Danang Waluyo², Latri Rahmah¹

¹Laboratorium Genetika, Departemen Biologi, FMIPA UI, Kampus Depok

²Laboratorium Teknologi Gen, Bioteknologi, BPPT, Puspiptek Serpong

retno4_ui@yahoo.com

Latri_Rahmah@yahoo.com

Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui waktu optimum pemajanan sinar ultraviolet (UV) yang menyebabkan mutasi pada bakteri penghasil vitamin B₁₂ *Pseudomonas denitrificans* BioMCC B12 F942/288. Pemajanan sinar UV untuk perlakuan mutasi menggunakan illuminator UV pada panjang gelombang 254 nm dengan intensitas sebesar 590 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Waktu pemajanan optimum untuk perlakuan mutasi dengan sinar UV adalah yang menyebabkan rasio kematian 90--95%. Pengambilan data mutasi dengan variasi waktu pemajanan selama 30, 60, 90, dan 120 detik. Waktu pemajanan sinar UV yang menghasilkan rasio kematian 90--95% adalah 90 detik.

Abstract

Optimal time in ultraviolet illumination as mutagen for bacteria vitamin B₁₂ producer *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 had been researched. Ultraviolet was illuminated at wavelength 254 nm with intensity 590 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Optimal time of illumination will make 90--95% death rate. Illumination was done in several variation time (30, 60, 90, and 120 second). Optimal time for make 90--95% death rate of bacteria vitamin B₁₂ producer *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 is 90 second.

Keyword : illumination time, mutation, *Pseudomonas denitrificans* schlegel BioMCC B12 F942/288, ultraviolet light

1. PENDAHULUAN

Mutasi adalah perubahan informasi genetik yang terjadi pada DNA nukleotida suatu sel. Penyebab mutasi dinamakan mutagen. Mutagen antara lain terdiri dari kimia dan fisika. Mutagen fisika yang menyebabkan mutasi terbagi menjadi radiasi ionisasi dan tanpa ionisasi. Contoh radiasi ionisasi adalah proton, neutron, sinar x, alfa, gama dan beta. Contoh radiasi yang tidak mengionisasi adalah sinar ultraviolet [1].

Sinar ultraviolet bersifat letal bagi sel-sel hidup dan mikroorganisme karena diserap oleh DNA nukleotida. Meskipun demikian, bakteri memiliki sistem perbaikan yang beroperasi memperbaiki kerusakan yang disebabkan penyinaran sinar ultraviolet. Sinar ultraviolet dapat menyebabkan kematian jika sinar yang diserap oleh bakteri lebih banyak daripada yang dapat diperbaiki sel. Jumlah sinar ultraviolet yang terabsorpsi oleh bakteri

berbanding lurus dengan banyaknya waktu pemajanan [2].

Pseudomonas denitrificans Schlegel BioMCC B12 F942/288 yang dipajankan oleh sinar ultraviolet dapat mengalami kematian. Persentase kematian mutan *Pseudomonas denitrificans* didapat dari selisih koloni *wild type* dengan koloni mutan dibandingkan dengan koloni *wild type* keseluruhan. Persentase kematian optimal untuk mutan mikroorganisme adalah sebesar 90% - 95% [3].

Penelitian mutasi *Pseudomonas denitrificans* dengan sinar ultraviolet menggunakan alat illuminator. Illuminator adalah alat yang dapat memancarkan radiasi sinar ultraviolet. Panjang gelombang yang dipancarkan sebesar 254 nm dengan intensitas pemajanan sebesar 590 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ [4]. Pemajanan bakteri dilakukan dengan 4 variasi waktu pemajanan yaitu 30,60, 90 dan 120 detik.

Penelitian yang dilakukan merupakan bagian dari penelitian yang lebih besar. *Pseudomonas denitri-*

ficans memiliki kemampuan untuk menghasil-kan vitamin B₁₂ sebagai metabolit sekundernya. Mutasi secara acak yang dilakukan dengan pemjanaan sinar UV dapat menghasilkan strain *Pseudomonas denitrificans* dengan peningkatan produktivitas vitamin B₁₂ yang lebih tinggi. Selanjutnya perlu diuji kestabilan mutan *Pseudomonas denitrificans* yang mampu meningkatkan produktivitas vitamin B₁₂ [5,6].

Variasi waktu pemajanaan digunakan untuk mendapatkan waktu optimum bagi pemajanaan sinar UV yang dapat menyebabkan persentase kematian *P. denitrificans* sebesar 90-- 95%. Waktu pemajanaan yang menyebabkan persentase kematian 90--95% akan digunakan sebagai tahap awal dalam penelitian uji stabilitas strain *Pseudomonas denitrificans* yang mengalami mutasi dengan menggunakan mutagen fisika dalam meningkatkan produktivitas vitamin B₁₂.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika, Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT, Serpong selama 3 bulan (Juni 2004 hingga Agustus 2004). Kultur bakteri *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMC B12 F942/288 pada medium Luria Bertani (LB) agar, disimpan dalam freezer -4° C. Medium dalam penelitian adalah medium LB cair dan LB agar. Bahan kimia dalam penelitian adalah etanol [Merck], ddH₂O, *bacto tryptone* [Difco], *yeast extract* [Oxoid], *bacto agar* [Oxoid], NaCl [Ajax Chemical Laboratories]. Peralatan dalam penelitian adalah tabung mikrosentrifus [Eppendorf]; pipet mikro [Thermo LabSistems]; *laminar air flow* [Gelaire-ICN Biomedicals]; spektrofotometer [Shimadzu UV-160A]; oven [Bicasa Termostatica]; inkubator [Hotech 624]; *shaker incubator* [HT]; mesin autoklaf [Tomy]; piranti sinar ultraviolet [Pharmacia]; *counter* [SJ504], dan peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

Sebelum melakukan mutasi, bakteri ditumbuhkan terlebih dahulu pada kultur awal dan kultur utama dalam medium LB cair. Setelah perlakuan mutasi kemudian bakteri ditumbuhkan pada medium LB agar. LB atau Luria Bertani adalah jenis medium yang mengandung nutrisi dan garam mineral yang diperlukan untuk bakteri *Pseudomonas* [7]. Kultur awal dibuat dengan mengambil kultur pada medium LB agar miring dengan ose kemudian memasukkan ke dalam 5 ml medium LB cair dalam tabung reaksi. Kultur awal diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 246 rpm selama 24 jam pada suhu 28°C. Fungsi kultur awal adalah untuk mengadaptasikan bakteri dengan medium dan kondisi lingkungan. Kultur utama dibuat dengan menginokulasikan kultur awal ke dalam labu

Erlenmeyer berukuran 100 ml yang berisi 10 ml medium LB dengan volume tertentu [8]. Kultur utama kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator dengan kecepatan 246 rpm pada suhu 28° C hingga tiba perlakuan mutasi.

Pemajanaan sinar UV dilakukan pada awal fase log, saat sel sedang dalam pertumbuhan dan telah beradaptasi dengan lingkungan. Sel-sel tersebut diharapkan mengalami perubahan susunan genetik akibat pemajanaan dengan mutagen tersebut. Sel-sel juga diperkirakan berada pada kondisi biologis optimal dan akan memperbanyak diri secara logaritmik sehingga perubahan susunan genetik tersebut akan diteruskan kepada keturunannya [9]. Berdasarkan Susanti [10] & Wulandari [11], awal fase log *P. denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 terjadi pada saat *optical density* (OD₆₀₀) kultur sel mencapai kisaran 0,94–1,04.

Bakteri dipajanaan dengan sinar ultraviolet yang berasal dari *illuminator* sinar ultraviolet yang diletakkan dalam *laminar airflow*. Cawan petri tanpa penutup diletakkan langsung di bawah *illuminator* dengan jarak 15 cm. Pemajanaan sinar UV dilakukan pada panjang gelombang 254 nm (intensitas sinar 590 μW/cm²). Panjang gelombang 254 nm adalah panjang gelombang sinar UV yang efektif untuk mutagenesis karena merupakan spektrum maksimum absorpsi DNA [12]. Variasi lama waktu pemajanaan dilakukan pada 30, 60, 90, dan 120 detik. Setiap usai satu masa pemajanaan, bakteri diambil dan diencerkan hingga mencapai konsentrasi tertentu. Bakteri sebanyak 100 μl dari masing-masing konsentrasi diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi medium agar LB dengan metode sebar. Cawan-cawan petri berisi kultur diletakkan dalam inkubator 28° C hingga koloni-koloni tumbuh, yaitu selama sekitar tiga hingga empat hari. Koloni yang tumbuh dihitung dengan metode *Total Plate Count* (modifikasi metode Maloy *dkk.* [13] dan Barker [14]. Rasio kematian dihitung untuk setiap kultur dari setiap konsentrasi dan waktu pemajanaan dengan rumus:

$$\text{Rasio kematian} = \frac{N-K}{N} \times 100\%$$

$$N = \sum \text{koloni hidup sebelum perlakuan}$$

$$K = \sum \text{koloni hidup setelah perlakuan}$$

Kondisi ideal yang diperlukan bagi mutasi dengan sinar UV, yaitu bila rasio kematian mencapai 90–95%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah koloni *P. denitrificans* yang tumbuh pada medium LB padat setelah pemajanaan dengan sinar UV

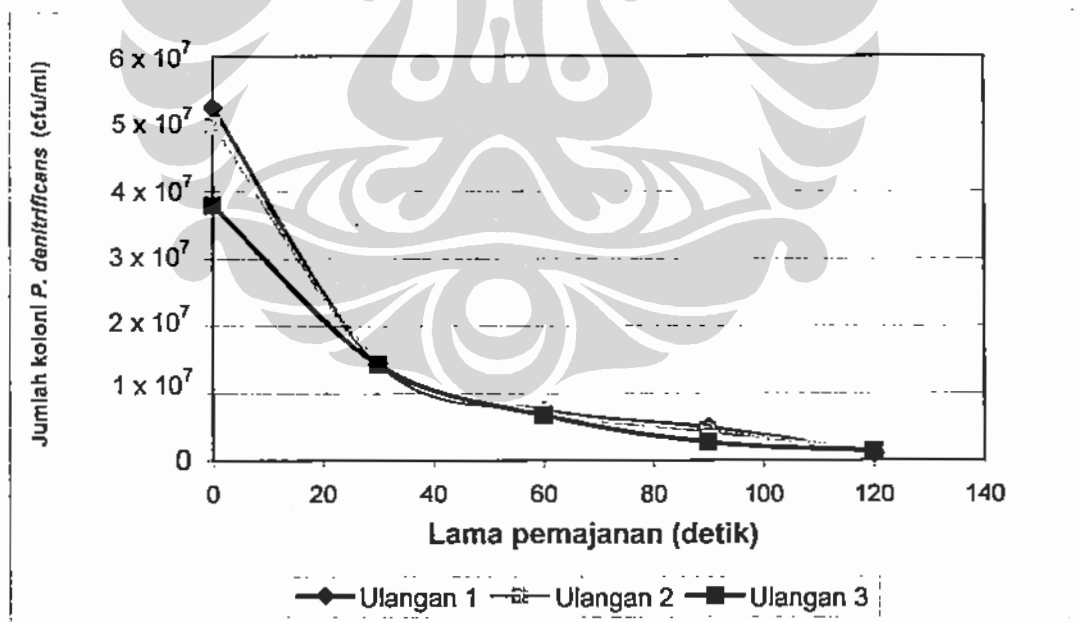
lebih sedikit daripada jumlah koloni tanpa pemajanan (Tabel 1). Menurut Maloy *dkk.* [13], bakteri yang terpapar dengan mutagen berupa radiasi akan berkurang kemampuannya membentuk koloni. Hal tersebut disebabkan mutasi dapat menginaktivasi produk gen yang penting bagi pertumbuhan sel. Meskipun demikian, mutasi juga dapat menginaktivasi produk gen yang tidak esensial bagi pertumbuhan,

sehingga sel dapat tetap hidup [15]. Sel-sel yang hidup setelah pemajanan diharapkan telah mengalami mutasi, sehingga terjadi perubahan gen pada sel tersebut. Menurut Madigan *dkk.* [3], mutasi akibat sinar UV bersifat acak sehingga posisi terjadinya mutasi dan pengaruhnya tidak dapat diketahui secara pasti.

Tabel 1. Rasio kematian *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 setelah dipajankan dengan sinar UV

Waktu (detik)	Ulangan I		Ulangan II		Ulangan III	
	Jumlah cfu/ml	Rasio kematian	Jumlah cfu/ml	Rasio kematian	Jumlah cfu/ml	Rasio kematian
0	$5,24 \times 10^8$	0%	$4,98 \times 10^8$	0%	$3,79 \times 10^8$	0%
30	$1,45 \times 10^8$	72%	$1,49 \times 10^8$	70%	$1,43 \times 10^8$	62%
60	$7,5 \times 10^7$	85%	$7,3 \times 10^7$	86%	$6,8 \times 10^7$	82%
90	$4,95 \times 10^7$	90%	$4,41 \times 10^7$	91%	$2,77 \times 10^7$	93%
120	$1,11 \times 10^7$	98%	$1,55 \times 10^7$	97%	$1,43 \times 10^7$	96%

Keterangan: cfu = colony forming unit



Gbr 1. Kurva perbandingan jumlah sel hidup dengan lama pemajanan sinar UV

Jumlah sel *P. denitrificans* yang mampu bertahan hidup setelah mutasi mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya lama waktu pemajanan (Gambar 1). Pengaruh lama waktu pemajanan sinar UV terhadap kultur sel *P. denitrificans* diobservasi melalui rasio kematian. Grimm [16] menyatakan bahwa semakin lama waktu pemajanan sinar UV pada kultur sel, semakin besar pula rasio kematian pada kultur tersebut. Menurut Mathews dkk [17] bakteri yang terpajankan dengan sinar UV akan mengalami dimerisasi pirimidin namun dapat diperbaiki dengan sistem reparasi DNA. Meskipun demikian, bila dosis sinar UV yang diberikan terlalu besar dapat bersifat letal bagi sel. Hal tersebut dapat terjadi karena dimerisasi yang terbentuk terlalu banyak dan mekanisme reparasi tidak dapat memperbaiki keseluruhan dimer. Menurut Kim & Sundin [18], dimer pirimidin yang terlalu banyak pada DNA bila tidak diperbaiki dapat menyebabkan kematian bagi sel bakteri.

Berdasarkan hasil penelitian, pemajanan sinar UV selama 30 detik hanya menyebabkan rasio kematian sel sebesar 62–72%; pemajanan selama 60 detik menyebabkan rasio kematian 82–86%; pemajanan selama 90 detik menyebabkan rasio kematian 90–93%; dan pemajanan selama 120 detik menyebabkan rasio kematian 96–98%.

Hasil mutasi *Pseudomonas denitrificans* dengan sinar ultraviolet disajikan dalam Tabel 1. Tabel 1 menyajikan jumlah koloni *Pseudomonas denitrificans* yang disebar pada medium padat baik koloni yang dipajankan maupun yang tidak dipajankan. Jumlah koloni yang telah dihitung digunakan untuk mendapatkan persentase kematian mutan dengan waktu pemajanan sinar UV yang berbeda.

Menurut Madigan dkk. [3], pemajanan sinar UV dalam proses mutasi dianggap efektif jika menghasilkan rasio kematian sebesar 90–95%. Diperkirakan pada rasio kematian tersebut, sel bakteri yang hidup adalah sel bakteri yang benar-benar mengalami mutasi sinar UV. Queener & Lively [9] menyatakan sejumlah penelitian membuktikan bahwa banyak mutan yang mengalami peningkatan produksi metabolit jika mutagen tersebut diberikan pada dosis yang menyebabkan kematian sebanyak 90% dari populasi sel. Berdasarkan hasil pengukuran rasio kematian yang diperoleh, maka lama waktu pemajanan sinar UV yang optimal sehingga diperoleh mutan yang menyebabkan rasio kematian 90–95% adalah pemajanan selama 90 detik.

Bakteri *Pseudomonas denitrificans* BioMCC B12 F942/288 yang telah dipajankan selama 90 detik tersebut diharapkan merupakan bakteri mutan yang dapat digunakan sebagai produk rekayasa genetik. Bakteri mutan hasil rekayasa genetik, perlu untuk diteliti dan dianalisis lebih lanjut. Analisis mutan hasil rekayasa genetik dapat dilakukan melalui pengukuran

kuantitas atau konsentrasi produk yang dihasilkan mutan, kinerja mutan, dan pengukuran kestabilan produk yang dihasilkan mutan [19,20].

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil mutasi *Pseudomonas denitrificans* Schlegel galur BIOMCC F942/288 dengan sinar ultraviolet didapatkan bahwa pemajanan dengan waktu 90 detik menyebabkan rasio kematian efektif mutasi yaitu 90–95%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada Dr. Nadirman Haska, APU yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian di Laboratorium Teknologi Gen, Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT, Serpong. Rasa terimakasih juga hendak kami sampaikan kepada Dr. Abinawanto selaku Ketua Departemen Biologi., Dr. Ariyanti Oetari, Dr. Wellyzar Sjamsuridzal, M.Sc., dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo yang telah memberikan saran, bantuan, dan masukan selama penelitian.

DAFTAR ACUAN

- [1] Fairbanks, D.J. & W.R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*.
- [2] Volk, W.A. & M.F. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi dasar*. Terj. dari *Basic microbiology* oleh Adisoemarto, S. 5th ed. Penerbit Erlangga, Jakarta: xi + 389 hlm.
- [3] Madigan, M.T., J.M. Martinko, & J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganism*. 9th ed. Prentice Hall International, Inc., New Jersey: xix + 991 hlm + A-13 + G-14 + I-26 hlm.
- [4] UV illuminator note book. *UV detection*. (?) Camag UV illuminator. 1 hlm.
- [5] BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi). 1998. Laporan tahunan: Proyek pengkajian bioteknologi industri tahun anggaran 1997/1998. BPPT, Tangerang: 141 hlm
- [6] Martens, J.-H., H. Barg, M.J. Warren, & D. Jahn. 2002. Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbiology Biotcehnology* 58 (3): 275–285.
- [7] Sambrook, J.S. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: xxvii + 18.136 + A14.1 + R.22 + I.44 hlm.

- [8] Jones, R.N. & G.K. Rickards. 1992. Practical genetics. John Wiley & Sons Ltd, Chichester: vii + 456.
- [9] Queener, S.W. & D.H. Lively. 1986. Screening and selection for strain improvement. *Dalam: Demain, A.L. & N.A. Solomon (eds.). 1986. Manual of industrial microbiology and biotechnology.* American Society for Microbiology, Washington.
- [10] Susanti, A.D.D. 2004. Profil produktivitas vitamin B₁₂ oleh *Pseudomonas denitrificans* Schlegel F942 BCC setelah perlakuan dengan N metil N nitrosoguanidine. Skripsi S1 Departemen Biologi FMIPA UI, Depok: xii + 80 hlm.
- [11] Wulandari, D.T. 2004. Profil produktivitas vitamin B₁₂ oleh *Pseudomonas denitrificans* Schlegel F942 BCC setelah pemajanan dengan sinar ultraviolet. Skripsi S1 Departemen Biologi FMIPA UI. Depok: x + 35 hlm.
- [12] Warriner, K, G. Rysstad., A. Murden., P.Rumsby., D.Thomas & W.M. Males. 2000. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores on packaging surfaces by u.v. excimer laser irradiation. *Journal of Applied Microbiology* 88(4): 678–712.
- [13] Maloy, S.R., J.E. Cronan, Jr., & D. Freifelder. 1994. *Microbial genetics*. 2nd ed. Jones & Bartlett Publishers, Boston: xxiv + 484 hlm.
- [14] Barker, K. 1998. *At the bench: A laboratory navigator*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: xiv + 460 hlm.
- [15] Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, & P.R. Painter. 1986. *The microbial world*. 5th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs: xiv + 689 hlm.
- [16] Grimm, K. 1978. Comparison of spontaneous, uv-induced, and nitrosoguanidine-induced mutability to drug resistance in myxobacteria. *Journal of Bacteriology* 135 (3) : 748 – 753.
- [17] Mathews, C.K., K.E. van Holde & K.G. Ahem. 2000. *Biochemistry*. 3rd ed. An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc., San Francisco: xxviii + 1186 hlm.
- [18] Kim, J. J. & Sundin G.W. 2001. Construction and analysis of photolyase mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*: contribution of photoreactivation, nucleotide excision repair, and mutagenic DNA repair to cell survival and mutability following exposure to UV-B radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4): 1405–1411.
- [19] Seidman, L.A. & C.J Moore. 2000. Basic laboratory methods for biotechnology: Textbook and laboratory reference. Prentice Hall Inc. New Jersey: vi + 727 hlm.
- [20] Stanbury, P.F., A. Whitaker, & S.J. Hall. 2000. *Principles of fermentation technology*. 2nd ed. Butterworth-Heinemann, Oxford: xviii + 357 hlm.