



PERAN MUTASI GEN *ACYII* TERHADAP PRODUKSI ANTIBIOTIK TURUNAN SEFALOSPORIN

The Roles of *AcyII* Gene Mutations for Production of Antibiotics Derived From Cephalosporin

Indria Puti Mustika*, Ahmad Wibisana

Balai Bioteknologi BPPT, Gedung 630, Kawasan PUSPIPTEK, Setu, Tangerang Selatan, Banten 15314

*Email: indria.puti@bppt.go.id

ABSTRACT

Semisynthetic antibiotics cephalosporins are widely used to treat infectious diseases, especially those caused by gram-negative bacteria. Various types of semisynthetic antibiotics could be synthesized using 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) as the main raw material. 7-ACA is obtained by conversion of cephalosporin C, either chemically or enzymatically. Converting cephalosporin C to 7-ACA enzymatically in one step involves the cephalosporin acylase enzyme. Currently, all of cephalosporin acylase enzymes produced by wild-type microbes have only high activity on glutaryl-7-ACA as the main substrate. Genetic engineering of the encoding gene of cephalosporin acylase is required to obtain recombinant enzyme having high activity on cephalosporin C. In this paper, the engineering attempts made on *acyII* gene from *Pseudomonas* SE83 using directed mutagenesis, error prone PCR, and structural modeling are described.

Keywords: *AcyII* gene, cephalosporin, cephalosporin C acylase, enzyme activity, mutation

ABSTRAK

Antibiotik sefalosporin semisintetik banyak digunakan untuk mengatasi penyakit infeksi, khususnya yang ditimbulkan oleh bakteri gram negatif. Berbagai jenis antibiotik semisintetik dapat disintesis menggunakan senyawa asam 7-aminosefalosporinat (7-ACA) sebagai bahan baku utamanya. Senyawa 7-ACA diperoleh melalui konversi sefalosporin C, baik yang dilakukan secara kimiawi maupun enzimatik. Konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA secara enzimatik dalam satu langkah melibatkan enzim sefalosporin asilase. Hingga saat ini, seluruh enzim sefalosporin asilase yang dihasilkan oleh mikroba *wild type* hanya mempunyai aktifitas yang tinggi terhadap glutaryl-7-ACA. Rekayasa genetik terhadap gen pengkode enzim sefalosporin asilase diperlukan untuk memperoleh enzim rekombinan yang mempunyai aktifitas tinggi terhadap substrat sefalosporin C. Dalam ulasan ini diuraikan upaya-upaya rekayasa yang telah dilakukan terhadap gen *acyII* dari *Pseudomonas* SE83 menggunakan teknik mutasi terarah, *error prone PCR*, dan pemodelan struktur.

Kata kunci: Aktivitas enzim, gen *acyII*, mutasi, sefalosporin, sefalosporin C asilase

PENDAHULUAN

Antibiotik pertama kali diperkenalkan pada tahun 1942 oleh SA Waksman, merupakan golongan obat yang digunakan untuk mencegah dan mengobati infeksi bakteri. Penggunaan antibiotik pada tubuh yang terinfeksi bakteri memiliki mekanisme kerja dengan cara membunuh mikro-organisme penginfeksi atau menghambat pertumbuhan mikroba sehingga membatasi infeksi yang terjadi dalam tubuh. Antibiotik telah merevolusi dunia industri medis karena aplikasinya pada pengobatan terapeutik serta merupakan kelas penting di antara beberapa molekul lainnya yang telah dikembangkan (Mehta dan Sharma 2016). Saat ini terdapat lebih dari 10 kelas antibiotik yang telah dipasarkan, salah satunya adalah sefalosporin (Coates et al. 2011).

Sefalosporin telah menjadi bagian formulasi antibiotik utama di beberapa rumah sakit. Popularitas sefalosporin semakin meningkat karena memiliki aktivitas spektrum luas serta toksisitas dan alergenik lebih rendah dibandingkan dengan kelas antibiotik lainnya. Pemakaian antibiotik di dunia pada tahun 2010 telah meningkat lebih dari dua kali dibandingkan pada tahun 2000, sehingga sefalosporin menempati peringkat kedua dengan kategori kelas antibiotik yang paling banyak digunakan di dunia (Boeckel 2014). Pada tahun 2016, World Health Organization (WHO) bahkan telah mengkategorikan sefalosporin sebagai senyawa antimikroba sangat penting dengan prioritas tertinggi karena jumlah dan frekuensi penggunaan yang tinggi pada pasien yang terkena infeksi (World Health Organization 2017).

PRODUKSI ANTIBIOTIK SEFALOSPORIN

Antibiotik sefalosporin telah diproduksi dan dikategorikan menjadi beberapa generasi berdasarkan aktivitas spektrumnya sebagaimana ditampilkan pada Tabel 1. Antibiotik sefalosporin merupakan produk semisintetik yang didapat dari produk fermentasi sefalosporin C (huruf C adalah inisial dari kata *chromatography*). Sefalosporin C pertama kali diisolasi dari jamur *Cephalosporium acremonium* oleh ilmuwan Italia yang bernama Giuseppe Brotzu pada tahun 1945. Sintesis sefalosporin C menjadi

Tabel 1. Generasi antibiotik sefalosporin

Generasi	Aktivitas spektrum	Contoh	Rute
1	Aktif terhadap organisme gram-positif	Cefazolin	IV/IM
		Cephalothin	IV/IM
		Cephapirin	IV/IM
		Cephalexin	PO
		Cefadroxil	PO
2	Aktif terhadap organisme gram-positif dan gram-negatif	Cephadrine	PO
		Cefamandole	IV/IM
		Cefuroxime	IV/IM
		Cefoxitin	IV/IM
		Cefotetan	IV/IM
		Cefmetazole	IV
		Cefaclor	PO
3	Aktif terhadap organisme gram-positif dan gram-negatif	Cefprozil	PO
		Cefpodoxime	PO
		Loracarbef	PO
		Cefotaxime	IV/IM
		Ceftriaxone	IV/IM
4	Aktif terhadap organisme gram-positif (sama seperti generasi 1), resisten terhadap beta laktamase	Ceftizoxime	IV/IM
		Ceftazidime	IV/IM
		Cefoperazone	IV/IM
5	Aktif terhadap organisme gram-positif, termasuk <i>multidrug-resistant Staphylococcus aureus</i>	Cefixime	PO
		Cefipime	IV
5	Aktif terhadap organisme gram-positif, termasuk <i>multidrug-resistant Staphylococcus aureus</i>	Ceftaroline	IV
		Ceftobiprole	IV

Keterangan: IV: intravena, IM: intramuskular, PO: postoperatif. (Barber et al. 2004; Mehta dan Sharma 2016)

antibiotik sefalosporin membutuhkan senyawa intermediate *7 aminocephalosporanic acid* (7-ACA). Konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA dapat dilakukan secara kimiawi maupun enzimatik dengan pemutusan rantai samping 7-amino adipoyl (Barber et al. 2004; Pollegioni et al. 2013).

KONVERSI SEFALOSPORIN C MENJADI 7-ACA

Sebanyak 3000 ton senyawa 7-ACA telah diproduksi setiap tahunnya dari hasil konversi sefalosporin C secara kimiawi.

Produksi 7-ACA yang tinggi melalui rute kimiawi memiliki pengaruh negatif, di antaranya adalah kebutuhan pelarut organik dan produksi limbah toksik relatif tinggi. Oleh karena itu, konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA secara kimiawi perlahan mulai digantikan dengan cara enzimatik (Barber et al. 2004).

Konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA secara enzimatik memiliki beberapa keuntungan, di antaranya ramah lingkungan, konsumsi energi relatif rendah, dan peralatan yang digunakan lebih sederhana. Konversi secara enzimatik membutuhkan enzim *D-amino acid oxidase* atau DAO (EC 1.4.3.3) dan enzim *glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase* atau GL-7-ACA asilase (EC 3.5.1.93) untuk mengkonversi sefalosporin C menjadi 7-ACA melalui proses dua tahap. Pada tahap pertama, sefalosporin C dideaminasi secara oksidatif membentuk keto-adipoyl-7-ACA (KA-7-ACA) dengan katalis enzim DAO. Reaksi tersebut melepaskan hidrogen peroksida (H_2O_2) sehingga menginduksi dekarboksilasi oksidatif secara spontan untuk membentuk glutaryl-7-ACA (GL-7-ACA). Pada tahap kedua, senyawa GL-7-ACA kemudian dihidrolisis oleh GL-7-ACA asilase membentuk 7-ACA (Gambar 1) (Barber et al. 2004).

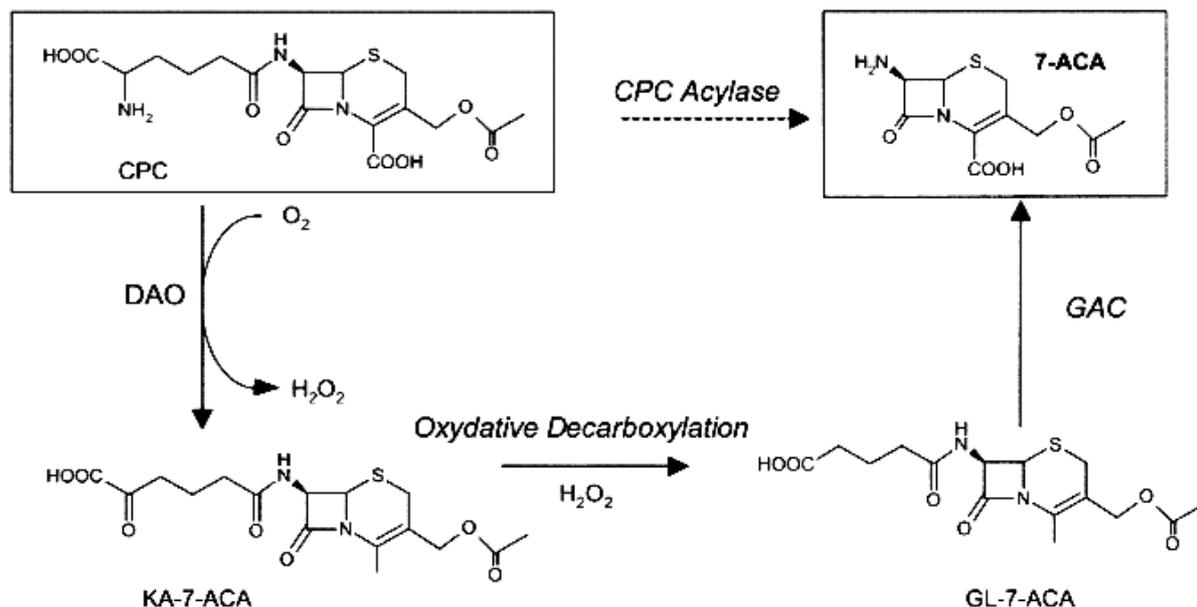
Konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA secara enzimatik melalui dua tahap

tidak sepenuhnya dapat memenuhi kebutuhan untuk produksi skala industri. Perkembangan penelitian mengenai konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA dengan reaksi enzimatik kemudian berlanjut melalui proses satu tahap dengan katalis enzim sefalosporin asilase untuk menghidrolisis sefalosporin C membentuk 7-ACA (Gambar 1) (Kim et al. 2000; Barber et al. 2004; Pollegioni et al. 2005). Hambatan terbesar pada proses enzimatik satu tahap adalah substrat utama untuk enzim sefalosporin asilase adalah senyawa GL-7-ACA, sedangkan aktivitas spesifik terhadap substrat sefalosporin C masih rendah, sehingga sulit diaplikasikan pada produksi 7-ACA skala industri (Kim et al. 2000; Pollegioni et al. 2005).

Sefalosporin asilase digolongkan dalam dua jenis. Pertama, sefalosporin asilase yang memiliki aktivitas lebih tinggi terhadap substrat GL-7-ACA dibandingkan sefalosporin C (dinamakan GL-7-ACA asilase), berperan dalam konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA secara dua tahap. Kedua, sefalosporin asilase yang aktif pada substrat sefalosporin C dan GL-7-ACA (dinamakan sefalosporin C asilase) (Kim et al. 2000).

ENZIM SEFALOSPORIN C ASILASE

Sefalosporin C asilase (EC 3.5.1.11) merupakan enzim yang berperan dalam mengkonversi sefalosporin C menjadi 7-ACA

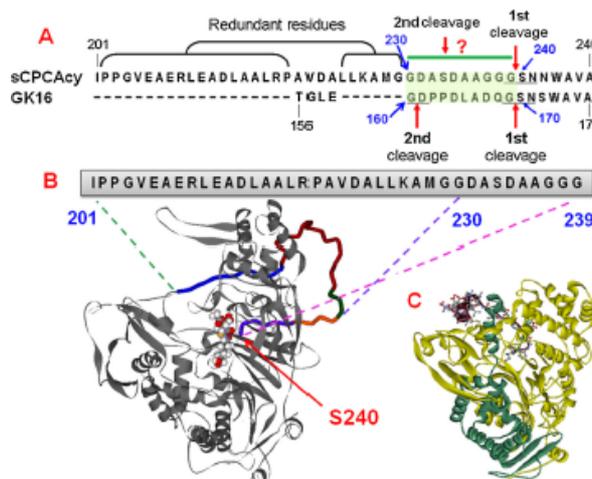


Gambar 1. Konversi sefalosporin C menjadi 7-ACA. CPC:cephalosporin C, DAO:D-amino acid oxidase, KA-7-ACA:keto adipoyl-7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA:7-aminocephalosporanic acid, GAC:glutaryl acylase, GL-7-ACA:glutaryl-7-aminocephalosporanic acid (Barber et al. 2004)

secara satu tahap. Sefalosporin C asilase dikategorikan menjadi lima kelas berdasarkan struktur gen, massa molekul, dan karakter enzimatik. Semua sefalosporin C asilase pada kelas tersebut memiliki aktivitas terhadap substrat sefalosporin C yang relatif bervariasi dari 0% sampai dengan 4% dibandingkan aktivitas terhadap substrat GL-7-ACA. Sefalosporin C asilase kelas III memiliki aktivitas relatif lebih tinggi terhadap sefalosporin C dibandingkan kelas lainnya. Sekuen asam amino pada anggota setiap kelas memiliki homologi 90% dengan lainnya.

Sefalosporin C asilase yang telah berhasil diidentifikasi berasal dari spesies *Pseudomonas* sp. 130, *Pseudomonas* sp. GK16, *Pseudomonas* sp. C427, *Pseudomonas* sp. SE83, *Pseudomonas* sp. A14, *P. diminuta* N176, *P. diminuta* V22, dan *Bacillus laterosporus* J1 (Tabel 2) (Kim et al. 2000; Pollegioni et al. 2013).

Sefalosporin asilase termasuk anggota dari superfamili enzim hidrolase yang bekerja pada nukleofil terminal N (Ntn), dimana gen prekursor ditranslasikan menjadi rantai polipeptida tunggal dan selanjutnya mengalami pelipatan menjadi pre-protein teraktifasi sendiri yang diaktifasi melalui pemutusan ikatan intramolekular ganda (Gambar 2) (Pollegioni et al. 2013). Pemutusan ikatan pertama terjadi di terminal N dari subunit β yang sangat penting dalam pembentukan residu serin yang terletak di pusat aktif katalis. Pemutusan ikatan kedua berperan penting dalam aktivasi enzim



Gambar 2. Lokasi pemutusan sekuen dan simulasi struktur tersier dari gen pre-sefalosporin C asilase dari *Pseudomonas* SE83. (A) Lokasi pemutusan sekuen gen pre-sefalosporin C asilase dibandingkan dengan GL-7-ACA asilase dari *Pseudomonas* sp. GK16 menggunakan *multiple sequence alignment tool* dari Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/>). Lokasi pemutusan pertama dan kedua dari *Pseudomonas* sp. GK16 dan lokasi pemutusan pertama pre-sefalosporin C asilase ditandai dengan anak panah merah. Rentang lokasi pemutusan sekuen kedua pre-sefalosporin C asilase ditandai dengan panah merah dan tanda tanya. (B) Simulasi struktur sefalosporin C asilase yang diperoleh menggunakan cetakan 1JYZ di database PDB. Tongkat-bola yang dekat dengan S240 di pusat aktif menunjukkan gabungan substrat (Wang et al. 2012) (C) Simulasi struktur sefalosporin C asilase lengkap diperoleh menggunakan cetakan 4HSR yang ada di database PDB. Tongkat-bola kecil menunjukkan terminal α-C dari sefalosporin C asilase (Golden et al. 2013)

Tabel 2. Sefalosporin C asilase

Kelas	Aktivitas relatif*	Pre-Kursor (kDa)	Sinyal peptida (asam amino)	Massa molekul subunit α (kDa)	Spacer peptide (asam amino)	Massa Molekul subunit β (kDa)	Sumber
I	2,3	70	29	16	10	54	<i>Pseudomonas</i> sp. 130
		70	29	16	Belum ditentukan	54	<i>Pseudomonas</i> sp. GK16
		70	27	16	8	54	<i>Pseudomonas</i> sp. C427
II	4,0 0	80	-	25	10	58	<i>Pseudomonas</i> sp. SE83 [AcyII]
		89	29	28	Belum ditentukan	61	<i>Pseudomonas</i> sp. A14
III	4,0 0 4,0	80	-	22	10	58	<i>Pseudomonas diminuta</i> N176
		80	-	22	Belum ditentukan	58	<i>Pseudomonas diminuta</i> V22
		80	-	25	10	58	<i>Pseudomonas</i> sp. SE83 [Acy II]
IV	0	64	-	40	Belum ditentukan	22	<i>Pseudomonas</i> sp. SE83 [AcyI]
		64	-	40	Belum ditentukan	22	<i>Pseudomonas</i> sp. V22
V	0	70	27	-	70	-	<i>Bacillus laterosporus</i> J1

*Aktivitas relatif didefinisikan sebagai persentase dari 100% aktivitas terhadap GL-7-ACA (Shin et al. 2009, Pollegioni et al. 2013)

10	20	30	40	50
MTMAAKTDRE	ALQAALPPLS	GSLSTPGLSA	PVRVQRDQWG	IPHIKASGEA
.....60	70	80	90	100
DAYRALGFVH	AQDRLFQMEI	TRRKALGRAA	EWLGAEAAEA	DILVRRLGME
110	120	130	140	150
KVCRRDPEAL	GAEAKDMLRA	VVAGVNAFLA	SGAPLPIEYG	LLGAPEPEWE
160	170	180	190	200
PWHSIAVMRR	LGLLMGQVWF	KLWRMLALPV	VGAANALKLR	YDDGGQDLLC
210	220	230	240	250
IPPGVEAERI	EADLAALRPA	VDALLKAMGA	DASDAAGGGS	NNWAVAPGRT
260	270	280	290	300
ATGRPILAGD	PHRVFEIPGM	YAOHHLACDR	FDMIGLTVPG	VPGFPHFAHN
310	320	330	340	350
GKVAYCVTHA	FMDIHDLYLE	QFAEDGRTAR	FGNEFEPVAN	RRDRIAVRGG
360	370	380	390	400
ADREFDIVET	RHQPVIAGDP	LEGAALTLRS	VQFAETDLSE	DCLTRMPGAS
410	420	430	440	450
FVAQLYDATR	GWGLIDHNLV	AGDVAGSIGH	LVRARVPSRP	RENGWLPVPG
460	470	480	490	500
NSGEHEWRGW	IPHEAMPRLV	DPPGGLIVTA	NNRVVADDHP	DYLCTDCHFP
510	520	530	540	550
VRAERIMERL	VASPAFVADD	AAAIHADTLS	PHVGLLRARL	EALGIQGSLE
560	570	580	590	600
AEELRQTLIA	WDGRMDAGSQ	AASAYNAFRR	ALTRLVTARS	GLEQAIHHPF
610	620	630	640	650
AAVPPGVSPQ	GQVWVAVPTL	LRNDDAGMLK	GWSWDEALSE	ALSVATONLTA
660	670	680	690	700
GRGWGEEHRE	RFTHPLSAQF	PAWAALLNPV	SRPIGGDGDV	VLANGLVPSA
710	720	730	740	750
GPEATYGALS	RYVFDVGNWD	NSRWVVFHGA	SGHPASPHYA	DONAPWSDCA
760	770			
MVPMLYSNDR	IAAEAVTSQE	LVPA		

Keterangan : subunit α , spacer peptide, subunit β

Gambar 3. Sekuen asam amino pengkode sefalosporin C asilase dari *Pseudomonas* sp. SE83 (*acyII*) (Shin et al. 2009; UniProtKB-P15558)

dengan membentuk heterodimer yang lengkap, yaitu subunit α dan subunit β serta melepas *spacer* peptida dengan panjang asam amino yang berbeda-beda (8–11 asam amino) tergantung dari tipe sefalosporin C asilase (Kim et al. 2000; Zhang et al. 2014).

Sefalosporin C asilase yang diisolasi dari mikroorganisme asalnya memiliki aktivitas terhadap substrat sefalosporin C lebih kecil dibandingkan terhadap GL-7-ACA (kurang dari 5%). Oleh karena itu, sebagian peneliti melakukan upaya skrining mikroorganisme jenis baru yang memiliki aktivitas sefalosporin C asilase terhadap substrat sefalosporin C (Tanomand et al. 2009; Vasait dan Jobanputra 2013). Peneliti lain juga telah melakukan optimasi media pertumbuhan mikroba untuk produksi sefalosporin C asilase (Nupura et al. 2008; Gaurav et al. 2015; Isdiyono et al. 2017).

Teknik rekayasa genetika juga telah diterapkan pada upaya peningkatan aktivitas enzim sefalosporin C asilase terhadap substrat sefalosporin C. Salah satu di antaranya adalah kloning gen pengkode sefalosporin C asilase dari strain *Pseudomonas* ke dalam *Escherichia coli* (Aramori et al. 1991). Upaya lainnya adalah melakukan rekayasa gen pengkode sefalosporin C asilase melalui mutasi kemudian dilakukan kloning ke bakteri *E. coli*

(Shin et al. 2009). Beberapa upaya mutasi pada gen pengkode sefalosporin C asilase untuk meningkatkan spesifisitas enzim terhadap sefalosporin C diantaranya melalui mutasi terarah terhadap gen *Pseudomonas* N176 (Pollegioni et al. 2005) dan gen *Pseudomonas* sp. SE83-ACYII (Xiao et al. 2014). Untuk mengefisienkan upaya dalam melakukan rekayasa terhadap gen pengkode sefalosporin C asilase, maka para peneliti tersebut melakukan pemodelan secara *in silico* terlebih dahulu guna melihat pola interaksi ikatan antar molekul protein dan ligan. Pada tulisan ini diuraikan upaya-upaya yang telah dilakukan untuk meningkatkan spesifisitas enzim sefalosporin C asilase pada gen *acyII* dari *Pseudomonas* sp. SE83 yang telah banyak digunakan sebagai cetakan awal karena gen ini lebih aktif terhadap sefalosporin C dibandingkan dengan sefalosporin C asilase lainnya (Pollegioni et al. 2013).

MUTASI GEN *ACYII*

Gen *acyII* merupakan gen pengkode sefalosporin C asilase yang berasal dari spesies *Pseudomonas* sp. SE83. Sefalosporin C asilase tersebut merupakan polipeptida rantai tunggal yang tidak aktif, terdiri atas 774 asam amino serta berukuran sekitar 84 kDa setelah mengalami transkripsi dan translasi. Setelah ditranslasikan, enzim mengalami pemutusan ikatan intramolekular sebanyak dua kali pada posisi asam amino ke-230 dan 231 serta asam amino ke-239 dan 240, sehingga terjadi pemindahan *spacer peptide* sebanyak 9 asam amino dan memisahkan antara subunit α 25 kDa dan subunit β 58 kDa. Satu subunit α akan berpasangan dengan satu subunit β dengan interaksi hidrofobik untuk membentuk ikatan dimer dengan ukuran 83 kDa yang memiliki aktivitas asilase (Shin et al. 2009). Urutan asam amino pengkode sefalosporin C asilase yang berasal dari gen *acyII* *Pseudomonas* sp. SE83 telah dipaparkan (Gambar 3).

Upaya rekayasa gen *acyII* melalui proses mutasi telah dilakukan untuk mengembangkan mutan sefalosporin C asilase yang memiliki reaktivitas lebih tinggi terhadap substrat sefalosporin C dibandingkan gen *acyII* *wild type*. Gen mutan sefalosporin C asilase menyebabkan terjadinya perubahan pada beberapa asam

amino. Upaya mutasi tersebut dilakukan pada subunit α , subunit β , atau kedua subunit tersebut. Mutasi dilakukan melalui proses mutagenesis situs terarah, *reverse mutagenesis*, atau *error prone PCR*. Pengujian aktivitas enzim mutan dan *wild type* terhadap substrat sefalosporin C dilakukan setelah kedua jenis enzim tersebut dipurifikasi secara terpisah dari plasmid rekombinan yang diperbanyak dalam bakteri *E. coli* (Shin et al. 2009; Wang et al. 2012).

Gen *acyII* mempunyai pusat aktif yang terdiri atas residu katalitik, yaitu S1 β (residu asam amino serin pada posisi nomor satu subunit β); H23 β ; H70 β ; dan A242 β , beserta residu yang berfungsi untuk pengikatan rantai samping sefalosporin C, yaitu A24 β ; T32 β ; H57 β ; dan H178 β , yang keduanya berperan penting dalam aktivitas enzim sefalosporin C asilase (Li et al. 2014). Residu di sekitar pusat aktif tersebut menjadi target dalam melakukan mutasi terhadap gen *acyII*.

Berdasarkan pemodelan struktur pembentukan kompleks antara sefalosporin C asilase dengan sefalosporin C menunjukkan bahwa sefalosporin C memerlukan ruang yang lebih besar jika dibandingkan dengan GL-7-ACA, untuk berinteraksi dengan pusat aktif enzim. Sefalosporin C terdiri dari kerangka utama karbon dan rantai samping gugus D-amino yang mempunyai struktur yang lebih besar dibandingkan dengan struktur GL-7-ACA. Untuk menghilangkan hambatan sterik tersebut dan mempertahankan residu asam amino H57 β sebagai residu yang berperan penting dalam pengikatan rantai samping sefalosporin C, maka dilakukan mutasi pada residu M31 β L (mutasi dari asam amino metionin menjadi leusin). Residu M31 β L diprediksi dapat menghalangi interaksi antara rantai samping sefalosporin C dengan pusat aktif enzim karena dapat menyebabkan terjadinya tumbukan dengan gugus karboksil dan rantai samping D-amino dari sefalosporin C. Selanjutnya guna menjamin ketersediaan ruang untuk pengikatan rantai samping sefalosporin C yang mengalami perubahan torsi putaran oleh residu asam amino H57 β , maka residu P58 β M harus diganti dengan residu asam amino yang berukuran relatif lebih kecil seperti alanin, valin, leusin, metionin, sistein atau asparagin. Guna mengatasi

permasalahan hambatan sterik tersebut, Shin et al. (2009) melakukan mutasi ganda dari gen *acyII* pada *Pseudomonas* sp. SE83, yaitu pada residu M31 β L / P58 β M. Mutan yang diperoleh mampu meningkatkan aktivitas spesifik terhadap sefalosporin C sebesar 1,2 kali dibandingkan *wild type*.

Enzim mutan triplo pada asam amino M31 β L / P58 β M / H70 β S telah menghasilkan aktivitas spesifik terhadap sefalosporin C sebesar 5,2 kali lebih besar dibandingkan enzim sefalosporin C asilase *wild type*. Hal tersebut dikarenakan perubahan asam amino dari histidin menjadi serin mampu menstimulasi reaksi katalitik pada situs aktif S1 β , tetapi meningkatkan inhibisi oleh produk. Mutan lainnya dengan empat titik mutasi yaitu mutan P169 α Y / M31 β L / P58 β M / H70 β S diketahui mampu menghasilkan aktivitas spesifik lebih besar 7,3 kali terhadap sefalosporin C dibandingkan enzim sefalosporin C asilase *wild type*. Asam amino tyrosin digunakan sebagai pengganti fenilalanin karena memiliki kelompok hidroksil tambahan untuk stimulasi reaksi katalitik melalui pembentukan ikatan hidrogen dengan rantai samping sefalosporin C (Shin et al. 2009).

Mutan lima titik pada posisi P169 α Y / M31 β L / P58 β M / H70 β S / I176 β V juga telah dilakukan dan menghasilkan aktivitas spesifik terhadap sefalosporin C sebesar 11,2 kali lebih besar dibandingkan enzim sefalosporin C asilase *wild type*. Penambahan satu jenis mutasi dari isoleusin menjadi valin mampu memberikan ruang yang lebih besar bagi rantai samping sefalosporin C, sehingga adanya halangan sterik pada pengikatan rantai samping sefalosporin C oleh pusat aktif enzim dapat dihindari. Valin memiliki rantai samping dengan struktur sama dengan isoleusin tetapi mempunyai ukuran lebih kecil, sehingga mampu memberikan ruang yang lebih besar bagi rantai samping sefalosporin C (Shin et al. 2009; Yu 2013).

Peningkatan aktivitas spesifik mutan P169 α Y / M31 β L / P58 β M / H70 β S / I176 β V terhadap sefalosporin C mampu menimbulkan terjadinya peningkatan inhibisi produk akhir oleh senyawa 7-ACA. Oleh karena itu, *reverse mutagenesis* dilakukan pada asam amino serin untuk dimutasikan kembali menjadi asam amino sebelumnya yaitu histidin untuk menurunkan tingkat

inhibisi produk akhir, sehingga mutan P169 α Y / M31 β L / P58 β M / I176 β V memiliki aktivitas spesifik relatif tinggi terhadap sefalosporin C dibandingkan enzim sefalosporin C asilase *wild type* namun memiliki tingkat inhibisi produk akhir yang lebih rendah dibandingkan mutan P169 α Y / M31 β L / P58 β M / H70 β S / I176 β V (Shin et al. 2009).

Pengembangan mutan selanjutnya dalam rangka peningkatan reaktivitas terhadap sefalosporin C adalah dengan melakukan *error prone PCR* menggunakan DNA mutan P169 α Y / M31 β L / P58 β M / I176 β V untuk konstruksi sebuah librari mutan yang memiliki mutasi satu titik pada sebuah situs acak. Produk amplifikasi tersebut selanjutnya diligasi dengan plasmid kemudian ditransformasi dalam *E. coli*. Transforman tersebut telah diseleksi secara acak dari 25.000 koloni melalui uji aktivitas spesifik terhadap sefalosporin C, sehingga didapat dua mutan yang memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan mutan P169 α Y / M31 β L / P58 β M / I176 β V, yaitu mutan G139 α S / P169 α Y / M31 β L / P58 β M / I176 β V dan mutan V121 α A / P169 α Y / M31 β L / P58 β M / I176 β V (Shin et al. 2009).

Pengujian enzim mutan TNS5 α β yang mengkode mutasi V121 α A / G139 α S / P169 α Y / M31 β L / P58 β M / I176 β V dan mutan S12 yang mengkode mutasi V121 α A / G139 α S / P58 β N / I75 β T / I176 β V / S471 β C menghasilkan aktivitas spesifik terhadap sefalosporin C berturut-turut sebesar 1,5 dan 5,8 unit/mg protein, atau meningkat 2,3 dan 8,5 kali dibandingkan enzim sefalosporin C asilase *wild type* dengan karakteristik fisik beserta reaksi yang sama dengan enzim sefalosporin C asilase *wild type*. Konstanta inhibisi produk, K_{IP} untuk gen *acyII wild type* sebesar 0,4 mM, sedangkan enzim mutan S12 sebesar 1,9 mM. Hal ini menunjukkan bahwa enzim mutan S12 secara signifikan dapat menurunkan inhibisi produk dibandingkan dengan enzim sefalosporin C asilase *wild type*. Mutan S12 selanjutnya dioverekspresikan di *E. coli* BL21(DE3) menggunakan plasmid vektor pET29 dan pada proses fermentasi mampu menghasilkan enzim sefalosporin C asilase dengan aktifitas sebesar 1207 U/L. Dengan menggunakan konsentrasi sefalosporin C 50 mM dan konsentrasi enzim 5 U/mL serta suhu 25°C selama 1 jam, tingkat konversi

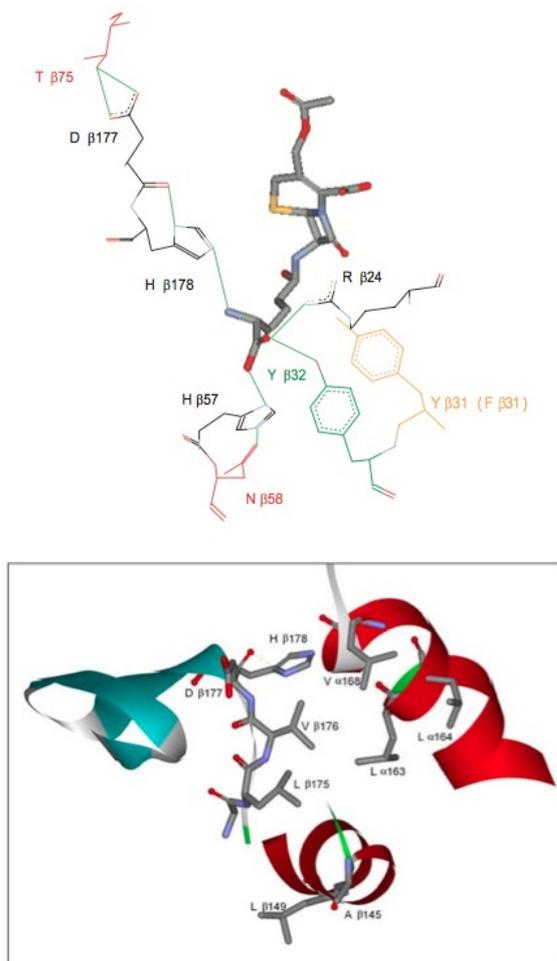
sefalosporin C menjadi 7-ACA menggunakan mutan S12 dan *wild type* berturut-turut mencapai 98% dan 60% (Shin et al. 2009).

Analisis struktur mutan S12 (V121 α A / G139 α S / P58 β N / I75 β T / I176 β V / S471 β C) juga telah dipelajari secara *in silico* (Gambar 4). Tiga jenis mutasi yang terjadi pada mutan S12 yaitu V121 α A, G139 α S, dan S471 β C merupakan residu asam amino yang posisinya jauh dari area aktif. Mutasi pada V121 α A dan G139 α S berhubungan dengan tingkat ekspresi protein, sedangkan mutasi pada S471 β C berhubungan dengan penurunan inhibisi produk (Tabel 3) (Yu 2013).

Mutasi I75 β T pada mutan S12 dibutuhkan untuk menggantikan residu isoleusin yang bersifat non polar dengan asam amino threonin yang bersifat polar pada area pengikatan dengan senyawa sefalosporin C. Rantai samping yang bersifat polar pada threonin 75 β membantu dalam hal stabilisasi area pengikatan dengan menambahkan ikatan hidrogen pada asam amino yang terletak di sebelahnya yaitu aspartat 177 β . Kelompok C-O yang dimiliki aspartat 177 β selanjutnya berinteraksi dengan histidin 178 β untuk menyesuaikan dengan bagian adipyl amino dalam senyawa sefalosporin C (Yu 2013).

Mutasi isoleusin 176 β menjadi valin (I176 β V) pada mutan S12 bertujuan untuk menghindari tumbukan antara rantai samping dengan residu sebelahnya seperti leusin 163 α dan leusin 175 β . Hal tersebut dikarenakan residu asam amino valin 176 β memiliki rantai samping yang lebih pendek dibandingkan dengan isoleusin 176 β . Selain itu, posisi V176 β juga berdekatan dengan dua residu penting (A175 β dan H176 β) yang berinteraksi dengan bagian adipyl amino dalam sefalosporin C, sehingga valin menstabilkan interaksi penting dalam pengikatan (Yu 2013).

Pada penelitian lainnya menunjukkan bahwa tidak hanya mutasi yang terjadi pada area aktif saja yang mempengaruhi dalam katalisis enzim sefalosporin C asilase, tetapi juga pada area kanal transport substrat sefalosporin C. Residu asam amino yang dipilih untuk dimutasikan pada area kanal transport substrat adalah L666P A675G (mutasi dari alanin menjadi glisin pada



Gambar 4. Analisis struktur secara *in silico* pada mutasi S12 terhadap substrat sefalosporin C. Substrat sefalosporin C direpresentasikan dalam bentuk gambar batang (Yu 2013)

urutan asam amino ke-675), dan L677P (mutasi dari leusin menjadi fenilalanin pada urutan asam amino ke-677). Hasil dari pengujian aktivitas terhadap sefalosporin C menunjukkan bahwa mutan L666P dan L677P memiliki aktivitas spesifik lebih rendah dibandingkan dengan enzim sefalosporin C asilase *wild type* dengan nilai aktivitas masing-masing sekitar 10% dan 70%. Namun mutan A675G memiliki aktivitas spesifik terhadap sefalosporin C lebih tinggi dibandingkan dengan enzim sefalosporin C asilase *wild type* dengan nilai aktivitas sekitar 112% (Wang et al. 2012). Berdasarkan pemodelan pembentukan kompleks gen *acyII* dengan sefalosporin C serta berbagai mutasi terarah pada residu asam amino di sekitar pusat aktif maka dapat disimpulkan bahwa residu R24 β , Y32 β , V49 β , H57 β , V68 β , dan H70 β

Tabel 3. Aktivitas sefalosporin C asilase dan mutan

Jenis sefalosporin C asilase	Aktivitas relatif terhadap sefalosporin C*
<i>Wild-type</i>	100
Mutasi terarah:	
M31 β L/F58 β M	120
M31 β L/F58 β M/H70 β S	520
F170 α Y/M31 β L/F58 β M/H70 β S	730
F170 α Y/M31 β L/F58 β M/H70 β S/I176 β V	1120
EP-PCR1:	
G140 α S/F170 α Y/M31 β L/F58 β M/I176 β V	800
V122 α A/F170 α Y/M31 β L/F58 β M/I176 β V	800
V122 α A/G140 α S/F170 α Y/M31 β L/F58 β M/I176 β V (TnS5 β)	950
EP-PCR2:	
V122 α A/G140 α S/F58 β N/I176 β V	1900
V122 α A/G140 α S/F58 β N/L175 β T/I176 β V	1900
V122 α A/G140 α S/F58 β N/I176 β V/S471 β C (S12)	1900
V122 α A/G140 α S/F58 β N/I75 β T/I176 β V/S471 β C	1900
Mutasi terarah dari <i>AcylI</i>:	
V122 α A/G140 α S/F58 β R/L75 β V/I176 β V/S471 β C (sAcy)	395
V122 α A/G140 α S/F58 β R/I75 β V/I176 β V/A436 β G/S471 β C	395

*Aktivitas spesifik untuk enzim *wild type* dihitung 100% dan digunakan sebagai referensi yang ditentukan pada pH 8,0 atau 8,5 dan 37°C menggunakan substrat sefalosporin C dengan konsentrasi \approx 24 mM (setara dengan spesifik aktivitas sebesar 0,65 U/mg protein) (Shin et al. 2009; Wang et al. 2012; Pollegioni et al. 2013)

berinteraksi langsung dengan sefalosporin C melalui ikatan hidrogen; residu V49 β dan V68 β berinteraksi lemah secara hidrofobik dengan atom C9 dan C5 dari sefalosporin C; residu P22 β , H23 β , M31 β , dan P56 β harus terletak berdekatan dengan peregangan gugus adipyl D- α -amino dari sefalosporin C dan dapat mempengaruhi residu penting lainnya seperti S1 β ; dan residu L427 β , W434 β , A435 β , A436 β , L437 β , dan L438 β yang terletak di sekitar area kanal transportasi substrat dapat berpengaruh terhadap pengikatan sefalosporin C melalui halangan sterik (Wang et al. 2012). Optimal produktivitas mutan ditunjukkan oleh mutasi A675G yang mencapai 5349 U/L setelah kultivasi selama 24 jam, yang setara dengan peningkatan sebesar 35% jika dibandingkan dengan sefalosporin C asilase *wild type* (Wang et al. 2012).

KESIMPULAN

Senyawa 7-ACA merupakan senyawa yang sangat penting untuk sintesis antibiotik semisintetik sefalosporin. Proses biokonversi sefalosporin C menjadi 7-ACA dalam satu langkah menggunakan enzim sefalosporin C asilase merupakan proses konversi yang efisien dan ramah lingkungan sehingga sangat diminati oleh industri. Kendala utama dari aplikasi enzim sefalosporin C asilase di industri antara lain terkait dengan permasalahan spesifisitas yang rendah terhadap sefalosporin C dan stabilitas enzim. Teknik rekayasa genetika diperlukan untuk memperoleh enzim sefalosporin C asilase yang mempunyai spesifisitas tinggi terhadap sefalosporin C. Perkembangan rekayasa yang telah dilakukan oleh para peneliti terhadap enzim sefalosporin C asilase yang melibatkan pemodelan secara *in silico*, mutasi terarah, *error prone* PCR telah memberikan hasil yang menggembirakan. Enzim sefalosporin C asilase rekombinan yang dihasilkan mempunyai spesifisitas yang meningkat hingga lebih dari 20 kali (spesifik aktifitas yang diperoleh 10 U/mg protein) dengan menggunakan SE83 acyl sebagai gen cetakan dan 4 U/mg protein dengan menggunakan N176 sebagai gen cetakannya. Meskipun demikian hasil ini masih belum memenuhi persyaratan untuk aplikasi di industri. Untuk memperoleh enzim sefalosporin C asilase yang sesuai untuk aplikasi di industri maka diperlukan pendekatan menyeluruh yang meliputi pendekatan mikrobiologi, bioinformatik (untuk meningkatkan produksi dan memperoleh enzim sefalosporin C asilase baru menggunakan analisis kemiripan sekuen), rekayasa protein (untuk meningkatkan karakteristik enzim sefalosporin C asilase dan menghilangkan inhibisi substrat maupun produk), imobilisasi (untuk memperoleh enzim sefalosporin C asilase yang dapat digunakan secara berulang dan stabil), dan desain reaktor enzim (untuk memfasilitasi terjadinya reaksi enzimatik yang sekaligus berfungsi untuk pemisahan produk).

DAFTAR PUSTAKA

Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M, Iwami M, Isogai T, Ono H, Ishitani Y, Kojo H, Kohsaka M, Ueda Y, Imenaka H

(1991) Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strains. *J Ferment Bioeng* 72:232-243. doi: 10.1016/0922-338X(91)90155-A

Barber MS, Giesecke U, Reichert A, Minas W (2004) Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β -lactams. *Adv Biochem Engin/ Biotechnol* 88:179-216. doi: 10.1007/b99261

Boeckel VTP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14:742-750. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7

Coates ARM, Halls G, Hu Y (2011) Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol* 163:184-194. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x

Gaurav K, Srivastava R, Sharma JG, Kundu S (2015) Statistical medium optimization for the production of cephalosporin-c acylase by *Pseudomonas diminuta*. *J Biochem Technol* 6:977-981

Golden E, Paterson R, Tie WJ, Anandan A, Flematti G, Molla G, Rosini E, Pollegioni L, Vrieling A (2013) Structure of a class III engineered cephalosporin acylase: comparisons with class I acylase and implications for differences in substrate specificity and catalytic activity. *Biochem J* 451: 217-226. doi: 10.1042/BJ20121715

Isdiyono BW, Hardianto D, Ivan FX (2017) Produksi rekombinan sefalosporin asilase sebagai biokatalis untuk produksi asam 7-aminosefalosporinat. *J Bioteknologi Biosains Indones* 4:28-35. doi: 10.29122/jbbi.v4i1.2059

Kim Y, Yoon KH, Khang Y, Turley S, Hol WGJ (2000) The 2.0 Å crystal structure of cephalosporin acylase. *Structure* 8:1059-1068. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00505-0

Li Q, Huang X, Zhu Y (2014) Evaluation of active designs of cephalosporin C acylase by molecular dynamics simulation and molecular docking. *J Mol Model* 20:2314. doi: 10.1007/s00894-014-2314-5

- Mehta D, Sharma AK (2016) Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology* 1:1-6
- Nupura H, Asmita T, Sharath B, Asmita P (2008) Media optimization for the production of cephalosporin C acylase from a novel bacteria source: *Alcaligenes xylosoxidans* MTCC*491. *Res J Biotechnol* 3:16-21
- Pollegioni L, Lorenzi S, Rosini E, Marcone GL, Molla G, Verga R, Cabri W, Pilone MS (2005) Evolution of an acylase active on cephalosporin C. *Protein Sci* 14:3064-3076. doi: 10.1110/ps.051671705
- Pollegioni L, Rosini E, Molla G (2013) Cephalosporin C acylase: dream and(/or) reality. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2341-2355. doi: 10.1007/s00253-013-4741-0
- Shin YC, Jeon JYJ, Jung KH, Park MR, Kim Y (2009) Cephalosporin C acylase mutant and method for preparing 7-ACA using same. United States Patent No US 7,592,168 B2
- Tanomand A, Abeshov R, Farajnia S (2009) Determination of cephalosporin acylase activity by biological and colorimetric method in bacteria. *Afr J Biotechnol* 8:6697-6699
- Vasait RD, Jobanputra AH (2013) Screening, isolation and identification of bacterial isolates having potential for bioconversion of cephalosporin C. *Biotechnol India J* 7:159-162
- Wang Y, Yu H, Song W, An M, Zhang J, Luo H, Shen Z (2012) Overexpression of synthesized cephalosporin C acylase containing mutations in the substrate transport tunnel. *J Biosci Bioeng* 113:36-41. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.08.027
- World Health Organization (2017) Critically important antimicrobials for human medicine. 5th rev. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Xiao Y, Huo X, Qian Y, Zhang Y, Chen G, Ouyang P, Lin Z (2014) Engineering of CPC acylase using a facile pH indicator assay. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:1617-1625. doi: 10.1007/s10295-014-1501-9
- Yu R (2013) Modeling and experimental analysis of cephalosporin C acylase and its mutant. *Open Biotechnol J* 7:30-37. doi: 10.2174/1874070701307010030
- Zhang J, Yu H, Wang Y, Luo H, Shen Z (2014) Determination of the second autoproteolytic cleavage site of cephalosporin C acylase and the effect of deleting its flanking residues in the α -C-terminal region. *J Biotechnol* 184:138-145. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.016