

INTISARI

Amoksisilin merupakan antibiotik yang banyak digunakan di Indonesia, dan dalam produksinya membutuhkan *6-aminopenicillanic acid* (6-APA) sebagai precursor yang diperoleh melalui hidrolisis penisilin G oleh enzim Penisilin G asilase (PGA). Enzim tersebut dapat ditemukan pada mikroorganisme seperti *E. coli*, meskipun jumlahnya rendah. Upaya peningkatan ekspresi dan aktivitas enzim PGA telah dilakukan melalui perancangan mutan menggunakan *molecular docking*, yang menghasilkan empat mutan potensial: β Phe256Arg, β Phe256Tyr, β Leu253Met, dan β Thr68Tyr. Mutan β Thr68Tyr telah diekspresikan, namun aktivitasnya tidak berbeda jauh dari PGA *wild type*. Oleh karena itu pada penelitian ini akan diekspresikan mutan β Phe256Tyr pada *E. coli* BL21 (DE3) untuk meningkatkan aktivitas enzim PGA.

Pada penelitian ini gen sintetik pengkode enzim PGA mutan β Phe256Tyr ditransformasikan ke *E. coli* BL21 (DE3). Koloni transforman kemudian dikonfirmasi dengan PCR dan sekuensing. Protein PGA mutan β Phe256Tyr dan β Thr68Tyr diekspresikan dengan penambahan IPTG sebagai inducer. Fraksi protein kemudian diisolasi dan digunakan untuk uji aktivitas enzim dengan substrat penisilin G. Hasil uji aktivitas kemudian dibandingkan antar isolat PGA mutan β Phe256Tyr, β Thr68Tyr dan kontrol plasmid.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein PGA mutan β Phe256Tyr berhasil diekspresikan yang ditunjukkan dengan adanya sub-unit β dari enzim PGA pada hasil SDS-PAGE. Total protein dari fraksi S1, S2, P1 dan P2 dari masing-masing isolat yaitu 46,11 mg, 1,90 mg, 68,10 mg dan 40,53 mg (kontrol plasmid); PGA mutan Thr68Tyr yaitu 50,96 mg, 2,98 mg, 311,33 mg dan 241,38 mg; PGA mutan Phe256Tyr yaitu 52,08 mg, 2,40 mg, 259,01 mg dan 213,62 mg. Hasil uji aktivitas enzim dari kontrol plasmid, PGA mutan β Thr68Tyr dan PGA mutan β Phe256Tyr secara berurutan yaitu 0,016 U/mg, 0,019 U/mg dan 0,014 U/mg untuk fraksi S1, sedangkan untuk fraksi S2 0,046 U/mg, 0,063 U/mg dan 0,068 U/mg. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa proses mutasi pada residu asam amino Phe256 maupun Thr68 yang diganti dengan Tyr tidak memberikan efek yang berbeda pada aktivitas enzim.

Keyword: *6-aminopenicillanic acid*, Aktivitas Enzim, Mutasi, Penisilin G asilase, PGA mutan,

ABSTRACT

Amoxicillin is among the most commonly used antibiotics in Indonesia, and its production depends on 6-aminopenicillanic acid (6-APA), which is derived from the hydrolysis of penicillin G using the enzyme penicillin G acylase (PGA). This enzyme is naturally produced by microorganisms like *E. coli*, although only in small amounts. To enhance its activity and expression, mutant variants of PGA have been designed through molecular docking studies, resulting in four potential candidates: β Phe256Arg, β Phe256Tyr, β Leu253Met, and β Thr68Tyr. While the β Thr68Tyr mutant has been previously expressed, its enzymatic activity was not significantly different from the wild-type. Therefore, this study focuses on expressing and analyzing the β Phe256Tyr mutant in *E. coli* BL21 (DE3) to evaluate its potential for increased activity.

The synthetic gene coding for the β Phe256Tyr mutant was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the resulting colonies were confirmed using PCR and DNA sequencing. Protein expression was induced using IPTG, and the resulting mutant proteins β Phe256Tyr and β Thr68Tyr were isolated into different fractions for enzyme activity assays using penicillin G as the substrate. The activities of both mutants were compared with a plasmid control.

SDS-PAGE analysis confirmed successful expression of the β Phe256Tyr mutant by showing the presence of the β subunit. Total protein in S1, S2, P1, and P2 fractions were measured: for the control (46.11, 1.90, 68.10, and 40.53 mg), β Thr68Tyr (50.96, 2.98, 311.33, and 241.38 mg), and β Phe256Tyr (52.08, 2.40, 259.01, and 213.62 mg). Enzyme activities (U/mg) in S1 and S2 fractions were 0.016/0.046 (control), 0.019/0.063 (β Thr68Tyr), and 0.014/0.068 (β Phe256Tyr). These results suggest that substituting Phe256 and Thr68 with Tyr does not significantly alter PGA enzymatic activity.

Keywords: *6-aminopenicillanic acid*, Enzyme Activity, Mutation, Penicillin G acylase, PGA mutant.