

TEKNIK ISOLASI DNA PLASMID DARI BAKTERI TERKONSTRUKSI GEN ANTIVIRUS *pmAV*

Mujayana dan Nurjanna

Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau
Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan
E-mail: kti.bppbap@gmail.com

ABSTRAK

Isolasi DNA plasmid sangat penting dalam rekayasa genetika di mana plasmid memiliki peran yang sentral sebagai vektor untuk pengganda. Tujuan kegiatan ini adalah untuk mengisolasi DNA plasmid dari bakteri terkonstruksi gen *PmAV*. Isolasi plasmid dilakukan dengan menggunakan metode *alkaline lysis* yang secara garis besar terbagi ke dalam enam tahap, yakni tahap kultivasi bakteri dan pemanenan sel, tahap resuspensi sel, tahap lisis sel dan denaturasi DNA, tahap netralisasi, tahap purifikasi, dan tahap pemekatan DNA. Hasil dari kegiatan ini menunjukkan bahwa DNA plasmid dari bakteri terkonstruksi gen antivirus *PmAV* telah berhasil diisolasi yang ditunjukkan oleh posisi pita DNA pada 820 bp.

KATA KUNCI: isolasi DNA Plasmid, Gen *PmAV*

PENDAHULUAN

Plasmid adalah DNA ekstrakromosomal yang umumnya berbentuk sirkular dan secara alami dapat dijumpai di beberapa jenis *yeast* uniselular dan bakteri seperti *Escherichia coli*. Plasmid dapat berukuran mulai dari 1.000 *base pair* (bp) sampai 1.000 *kilo base pair* (Kbp), dengan jumlah per sel bervariasi dari satu sampai ribuan salinan (*copy*) molekul. Dalam rekayasa genetika, plasmid memiliki peran yang sentral sebagai vektor untuk pengklonan dan ekspresi gen. Sebagai vektor yang ideal, plasmid memiliki situs sebagai titik awal replikasi untuk perbanyakannya di dalam sel inang; *multiple cloning sites* (MCS) sebagai tempat penyisipan segmen DNA atau gen yang akan diklon atau diekspresikan, dan gen penanda seleksi, misalnya gen resistensi antibiotik yang berguna untuk seleksi klon.

Di Laboratorium Bioteknologi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau, telah dilakukan teknologi transgenesis. Teknologi transgenesis adalah suatu teknologi rekayasa gen dengan mengintroduksi satu atau lebih DNA asing ke hewan uji dengan tujuan untuk memanipulasi genotipnya ke arah yang lebih baik dan selanjutnya dapat ditransmisikan ke keturunannya (Beamout & Hoare, 2003 dalam Parenrengi, 2010). Adapun yang kami laporkan pada makalah

ini adalah plasmid yang telah disisipi gen antivirus *PmAV* untuk udang windu, sehingga nantinya akan didapatkan udang windu tahan virus. Oleh karena itu keberadaan plasmid merupakan hal yang terpenting dalam teknik DNA rekombinan. Keberhasilan suatu teknik DNA rekombinan tergantung dari keberhasilan isolasi DNA plasmid dari bakteri.

Pada kegiatan ini plasmid diisolasi dari bakteri *E. coli* menggunakan metode *alkaline lysis*. Secara umum, isolasi plasmid bertujuan mengekstrak plasmid dan memisahkannya dari berbagai komponen seluler bakteri lainnya, seperti protein, lemak, RNA, dan DNA kromosomal. Yang menjadi tantangan besar dalam isolasi plasmid adalah pemisahan DNA plasmid dari DNA kromosomal bakteri. Metode *alkaline lysis* secara garis besar terbagi ke dalam enam tahap, yakni tahap kultivasi bakteri dan pemanenan sel, tahap resuspensi sel, tahap lisis sel dan denaturasi DNA, tahap netralisasi, tahap purifikasi, dan tahap pemekatan DNA (Davis, 2012).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain sampel bakteri konstruksi *E. coli*, larutan STE (NaCl 1%, Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8), larutan

alkaline lysis I (glukosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8), larutan *alkaline lysis II* (NaOH 0,2 N, SDS 1 %), larutan *alkaline lysis III* (Kalium Asetat 5 M, Asam asetat glasial), *lysozyme* 10 mg/mL, media Luria Bertani (10 g/L tripton, 5 g/L ekstrak khamir, 10 g/L NaCl, pH 7,5), isopropanol, etanol 70%, *marker* 100 bp plus, *loading dye*, *TE Buffer*.

Alat

Alat yang digunakan adalah *sentrifuge*, perangkat DNA elektroforesis, dokumentasi gel, inkubator air begoyang, neraca analitik, *microwave*, *micro pipet*, erlenmeyer 50 mL, tabung *corning*, spatula, parafilm, tabung mikro, dan pipet tip.

Metode

Isolasi DNA Plasmid

Plasmid yang mengandung promoter antivirus *PmAV* diisolasi dari bakteri *E. coli* dengan menggunakan metode *alkaline lysis*. Satu koloni bakteri yang mengandung plasmid rekombinan ditumbuhkan di dalam 10 mL media LB yang mengandung ampicilin 100 mg/L pada inkubator bergoyang dengan kecepatan 250 rpm pada suhu 37°C selama semalam (sekitar 16-18 jam). Bakteri diendapkan dalam tabung mikro secara bertahap dengan sentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dilarutkan dengan 200 µL larutan STE, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet diinkubasi pada suhu ruang selama 5 sampai 10 menit, kemudian pelet dilarutkan dengan 18 mL larutan *alkaline lysis I*, 2 mL larutan *lysozyme* 10 mg/mL dan 40 mL larutan *alkaline lysis II*, lalu dibolak-balik selama 5 kali dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 sampai 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 20 mL larutan *alkaline lysis III*, dibolak-balik selama 4 sampai 6 kali, kemudian diinkubasi dalam wadah yang berisi es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 11.000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru ditambahkan isopropanol sebanyak 0,6 kali volume supernatan, lalu dibolak-balik sampai homogen, diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm pada suhu 25°C selama 15 menit. Supernatan

dibuang dan ke dalam pelet ditambahkan 1 mL etanol 70%. Larutan dihomogenkan selama 1 menit dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringanginkan. Langkah terakhir pelet disuspensikan kembali dengan 20-50 µL larutan *TE Buffer* dan disimpan pada suhu -20°C.

Deteksi Gen Antivirus PmAV dengan Teknik PCR

DNA plasmid yang telah diisolasi diencerkan sebanyak 10 x untuk digunakan sebagai template DNA. Ke dalam RTG PCR Beads ditambahkan sebanyak 1 µL DNA plasmid yang telah diencerkan, 1 µL primer *PmAVORF-F*, 1 µL ORF-Sal1R dan ditambahkan 22 µL akuabides steril. Selanjutnya sampel diamplifikasi pada predenaturasi 94°C selama 2 menit, (denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing 61°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 45 detik) sebanyak 35 siklus, ekstensi akhir 72°C selama 7 menit dan 4°C. Kemudian hasil PCR dielektroforesis.

Elektroforesis

Agarose ditimbang sebanyak 0,2 g (agar 1,0%) dan dilarutkan dengan 20 mL TBE 1x. Selanjutnya dipanaskan dalam *microwave* sampai mendidih dan jernih. Kemudian ditambahkan gel red sebanyak 1 µL lalu dituang pada mini-gel elektroforesis sistem dan ditunggu sampai padat kurang lebih 20 menit. Setelah agar jadi, sisir pencetak diangkat dengan hati-hati lalu gel dimasukkan pada kotak running. Selanjutnya ke dalam kotak running ditambahkan TBE 1x sampai menggenangi gel. Sumuran pada gel diletakkan di dekat anoda (-) biasanya warna hitam, karena arus listriknya mengalir dari anoda (negatif) ke katoda (positif). *Loading dye* dispot di atas parafilm sebanyak 4 spot 3 untuk sampel dan 1 untuk *marker* masing-masing 1 µL. Sebanyak 3 µL sampel diambil kemudian dihomogenkan dengan *loading dye* dengan cara dipipet, lalu dengan hati-hati dimasukkan ke dalam sumur gel. Sampel dielektroforesis pada 50 V untuk 60 menit. Dengan menggunakan spatula, gel diangkat kemudian diletakkan di dalam UV transmittir untuk dilihat dan diambil gambarnya.

HASIL DAN BAHASAN

Secara garis besar prinsip yang digunakan dalam mengisolasi DNA plasmid adalah sama dengan isolasi DNA/RNA dari suatu sel. Prinsip yang digunakan adalah melakukan isolasi plasmid dengan sentrifugasi dan presipitasi. Hal ini dilakukan dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel-sel jaringan, DNA, dan RNA. Kemudian ekstrak sel dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung plasmid (Blackwell, 1997).

Isolasi plasmid diawali dengan kultivasi bakteri yang mengandung plasmid yang akan diisolasi. Untuk inang *E. coli*, umumnya bakteri dikultur selama 16-18 jam, karena pada umur tersebut pertumbuhan bakteri berada dalam fase eksponensial. Pemanenan sel pada jam tersebut bertujuan untuk memperoleh jumlah sel yang memadai sebagai sumber plasmid. Pemanenan sel dilakukan dengan sentrifugasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas seperti yang terlihat pada Gambar 1.

Setelah tahap kultivasi dan pemanenan sel dilakukan resuspensi sel dengan menggunakan larutan *alkaline lysis 1*. Larutan *alkaline lysis 1* ini berfungsi untuk memecah

dinding sel dan mensuspensikan pellet sampai larut. EDTA dapat menghambat DNase yang dapat mendenaturasi DNA sebagai pengkelat Mg^{2+} dan Ca^{2+} yang berperan merusak stabilitas membran plasma sehingga membran plasma menjadi tidak stabil. Selain itu, Tris-HCl juga berfungsi untuk menjaga pH larutan. Sedangkan glukosa berfungsi menjaga tekanan osmotik sel agar tidak pecah, sehingga keutuhan sel tetap terpelihara.

Pada tahap lisis dan denaturasi DNA menggunakan larutan *alkaline lysis 2*. Larutan ini digunakan untuk mengendapkan dinding sel bakteri. SDS dalam larutan ini berfungsi untuk menghancurkan membran sel dan mendenaturasi protein, sedangkan NaOH yang bersifat basa membuat seluruh molekul DNA berutas ganda baik DNA kromosomal maupun DNA plasmid mengalami denaturasi menjadi utas-utas tunggal. Itulah mengapa metode ini disebut sebagai metode lisis basa (*alkaline lysis*). Pada tahapan ini, DNA kromosomal terpisah sempurna menjadi utas-utas tunggal terpisah, sedangkan utas tunggal plasmid yang berbentuk lingkaran tetap terhubung, seperti dua cincin yang saling bertautan. Karakter ukuran dan struktur kedua jenis DNA inilah yang menjadi dasar pemisahan DNA plasmid dan DNA kromosomal. Seperti yang terlihat pada Gambar 2 bahwa DNA plasmid berukuran lebih kecil dibanding dengan DNA kromosomal.

Tahap netralisasi dilakukan dengan penambahan larutan *alkaline lysis 3*. Ion K^+



Gambar 1. Sentrifugasi untuk pemanenan bakteri

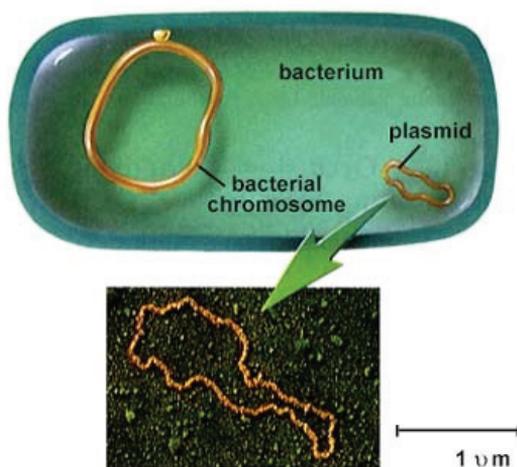
bebas yang berasal dari kalium asetat akan menetralkan muatan negatif dari kompleks-kompleks dodesil sulfat membentuk *kalium dodesil sulfat* (KDS) yang tidak larut dan terpresipitasi bersama lipid membran dan protein yang terdenaturasi. Laju presipitasi dapat ditingkatkan dengan inkubasi pada suhu es (4°C). Asam asetat dalam larutan ini berfungsi menetralkan suasana basa yang diciptakan oleh ion hidroksida dari NaOH yang diberikan pada tahap lisis sebelumnya. Ketika pH larutan kembali netral, ikatan-ikatan hidrogen antar basa utas tunggal DNA terbentuk kembali, sehingga molekul tersebut dapat berdenaturasi menjadi DNA berutas ganda. Proses renaturasi inilah yang menjadi tahap seleksi bagi plasmid. Utas-utas tunggal sirkular DNA plasmid yang berukuran kecil dan tetap saling bertautan dapat berdenaturasi sempurna membentuk utas ganda yang tetap berada dalam larutan, sedangkan DNA kromosomal yang berukuran jauh lebih besar dari plasmid tidak dapat berdenaturasi sempurna, membentuk struktur kusut tak beraturan yang terperangkap dan ikut terpresipitasi bersama kompleks KDS-lipid-protein. Oleh karena itu, pencampuran pada tahap lisis sel harus dilakukan dengan perlahan. Penambahan Larutan ini juga berfungsi untuk mempertahankan pH agar DNA plasmid tidak rusak.

Tahap purifikasi dilakukan dengan menggunakan isopropanol. Isopropanol

berfungsi untuk menghilangkan protein dan pengotor-pengotor lain dalam larutan. Isopropanol akan mengikat, menarik, dan mempresipitasi protein sehingga fase air yang terpisah akan mengandung DNA.

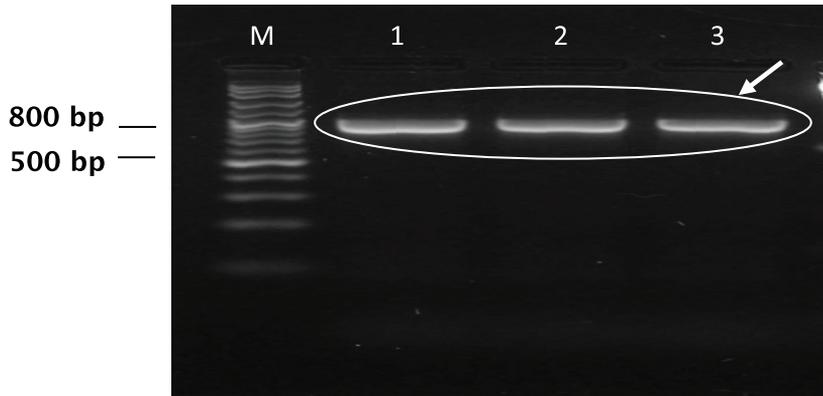
Tahap terakhir adalah tahap pemekatan DNA yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari larutan sehingga diperoleh konsentrasi yang lebih tinggi dengan penambahan etanol. Penambahan etanol absolut bertujuan untuk mengendapkan plasmid karena adanya perbedaan polaritas. Penambahan etanol absolut harus dilakukan pada keadaan dingin dengan tujuan agar DNA plasmid yang terendap cukup banyak. Prinsip pengendapan dengan menggunakan etanol absolut dingin, yaitu pada saat penambahan garam yaitu Nasetat yang berfungsi sebagai penetralisasi pada gula fosfat DNA, maka ion-ion seperti kation Na⁺ akan menyelimuti rantai DNA yang bermuatan negatif. Jika di dalam air, gaya elektrostatis antara ion positif (Na⁺) dan negatif (DNA) masih lemah karena sebagian rantai DNA masih berikatan dengan air. Air memiliki konstanta dielektrik yang tinggi, sehingga penambahan pelarut organik seperti etanol dapat menurunkan konstanta dielektrik tersebut atau memperbanyak ikatan DNA dengan Na⁺ sehingga membuat DNA lebih mudah terpresipitasi (Brown, 2010).

Selain itu, penambahan etanol juga berfungsi untuk membersihkan sisa-sisa



Sumber : <https://aguskrisnoblog.wordpress.com/page/43>

Gambar 2. DNA plasmid dan DNA kromosomal pada bakteri



Ket. M= Marker 100 bp plus, 1-3 = sampel, tanda panah menunjukkan gen target

Gambar 3. Visualisasi DNA plasmid

larutan yang digunakan untuk mengendapkan plasmid sebelumnya sehingga diperoleh plasmid yang murni.

Untuk mengetahui keberadaan gen antivirus *PmAV* yang ada dalam DNA plasmid hasil isolasi dilakukan amplifikasi menggunakan primer *PmAV* ORF-F dan ORF-Sal1R. Gen antivirus *PmAV* ditandai dengan adanya pita pada posisi sekitar 820 base pairs (bp). Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa DNA plasmid dan *marker* tervisualisasi seperti yang terlihat pada Gambar 3.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa DNA plasmid dari bakteri terkonstruksi gen antivirus *PmAV* berhasil diisolasi. Pita tunggal DNA yang bersih menunjukkan bahwa proses isolasi dilakukan dengan baik terutama pada proses inkubasi, proses sentrifugasi dan homogenisasi telah dilakukan dengan teknik dan waktu yang tepat.

KESIMPULAN

DNA plasmid dari bakteri konstruksi gen antivirus *PmAV* berhasil diisolasi dengan baik yang ditunjukkan dengan adanya pita tunggal DNA yang bersih dan berada pada posisi sekitar 820 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Andi Tenriulo, S.Si., M.Si, Ibu Emma Suryati, M.S., Ibu Dr. Ince Ayu Khairana Khadriah, M.Sc., dan Bapak Ir. Abdul Malik, MS yang telah membimbing dalam menyelesaikan tulisan ini.

DAFTAR ACUAN

- Brown, T.A. (2010). Gene cloning and DNA analysis: an introduction. Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-8173-0. p. 35-36.
- Muchdar, D. (2012). Isolasi DNA plasmid metode *Alkaline Lysis*. Prinsip Dasar dan Tips. <https://muchdardavis.wordpress.com/2012/07/06/isolasi-dna-plasmid-metode-alkaline-lysis-prinsip-dasar-dan-tips/> diakses pada tanggal 16 Maret 2015.
- Parenrengi, A. (2010). Peningkatan resistensi udang windu *Panaeus monodon* terhadap penyakit *White Spot Syndrome Virus* melalui transfer gen *Panaeus monodon Antiviral*. Tesis. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor, hlm. 2.
- Sambrook, R. (2006). The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.