

PEMANFAATAN POLIPELEKS KHITOSAN-pDNA DALAM TRANSFORMASI SEL *Escherechia coli*

I Putu Mahendra¹, I Nengah Wirajana^{1,2*}, James Sibarani^{1,2}

¹Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Udayana, Jimbaran, Badung, Bali, Indonesia

²Program Magister Kimia Terapan Program Pascasarjana Universitas Udayana, Denpasar, Bali Indonesia

* wirajana@yahoo.com

ABSTRAK: Penelitian berkaitan dengan pemanfaatan khitosan sebagai pelindung DNA plasmid (pDNA) dalam proses transformasi sel pada sel inang *Escherechia coli* telah dilakukan yang bertujuan untuk memperoleh polipeks yang stabil dan untuk mengetahui dapat atau tidaknya diperoleh sel transforman dengan menggunakan polipeks. Penelitian ini diawali dengan melakukan isolasi khitosan dari limbah kulit udang yang memberikan derajat deasetilasi 83,30%. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA plasmid dengan menggunakan kit dari Qiagen yang memberikan konsentrasi DNA plasmid 37,8 µg/mL. Polipeks yang disintesis dari khitosan-DNA plasmid memberikan nilai potensial Zeta 9,63 mV. Penerapan polipeks dalam proses transformasi sel menunjukkan hasil positif, yang mana sel *E. coli* yang telah disisipkan material polipeks dan dibiakkan pada media ampisilin dapat tetap bertahan hidup, hal ini menunjukkan bahwa proses transformasi dengan polipeks khitosan-DNA plasmid telah berhasil dilakukan.

Kata kunci: Khitosan, DNA Plasmid, Polipeks, Transformasi Sel

ABSTRACT: The research about the application of chitosan as the carrier and protecting agent for the plasmid DNA (pDNA) in the cells transformation process on *Escherechia coli* had been carried out, the aim of this research was to obtain stabile and nanosize polyplex from chitosan and plasmid DNA and to get the information if the cells transformation process could be done using the polyplex. The chitosan was isolated from shrimp's shelled deacetylation degree of 83,3%. The concentration of plasmid DNA was 36,75 ug/mL isolated using a Qiagen kit. The chitosan-plasmid DNA polyplex had the Zeta potential of 9,63 mV. Further, the application of the polyplex on the transformation process of *E. coli* cells showed a positive result where *E. coli* cells that had been inserted with the polyplex were bred in ampicillin media still survived. This fact showed that the cells transformation process using the polyplex was successfully performed.

Keywords: Chitosan, Plasmid DNA, Polyplex, Cell Transformation

1. PENDAHULUAN

Nanopartikel khitosan mampu bertindak sebagai *carrier* makromolekul DNA dalam *gene therapy* [1]. Lai *et al.* [2] memaparkan bahwa khitosan memiliki kompatibilitas tinggi dengan DNA untuk membentuk

kompleks polimer bermuatan positif yang dikenal sebagai kation polipeks. Dalam penghantaran obat, khususnya terapi gen dan transfeksi gen, pemanfaatan konjugasi DNA plasmid dengan suatu material untuk

memperoleh polipleks telah banyak dilakukan [3]. Borchard [4] dan Tan *et al.* [5] menyatakan khitosan berperan sebagai pelindung makromolekul DNA terhadap degradasi enzim DNase I yang diamati secara *in vitro*.

Pemanfaatan polipleks khitosan-DNA dimungkinkan dalam proses rekayasa genetika, utamanya pada salah satu tahapan penting dalam proses tersebut yakni proses transformasi sel inang *Echerechia coli*. Transformasi sel ialah proses pemindahan material genetika, umumnya berupa makromolekul DNA, yang dapat masuk ke dalam sel inang dan menyebabkan perubahan genetika dan fenotip dari sel inang tersebut [6].

Kemampuan yang dimiliki oleh polipleks khitosan dalam melintasi membran sel dan sebagai pelindung DNA, khususnya DNA plasmid (pDNA) belum pernah dimanfaatkan dalam proses transformasi sel inang pada teknologi DNA rekombinan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menyiapkan polipleks khitosan-pDNA yang digunakan dalam transformasi sel inang *E. coli*.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan, antara lain HCl (Merck), NaOH (Merck), etanol (Merk), aseton (Merk), CH₃COOH (Merck), H₂SO₄ 98% (Merck), KI (Merk), I₂ (Merk), Na₂SO₄ (Merck), buffer TE pH 8, buffer TAE 1x dan Na₂EDTA 1mM pH 8, loading buffer 6x [sukrosa 40%(b/v), bromophenol blue 0,25%(b/v)], EtBr, kit Qiagen (QIAprep Miniprep), media LB/LB-ampisilin, sel inang *E. coli* dan sel rekombinan yang mengandung DNA plasmid pYES2.

Peralatan yang digunakan adalah: pipet ukur 10 mL, gelas piala (*Beaker glass*), gelas ukur, Erlenmeyer, labu ukur, kuvet, batang pengaduk, botol semprot, bola hisap, *hot plate*, spatula, mikro pipet (Eppendorf), tip

mikro putih (10 µL), tip kuning (200 µL), dan tip biru (1000 µL), tabung mikro 1,5 mL (Eppendorf), spektrofotometer *UV-Vis Mini-1240 Single Beam* (Shimadzu), seperangkat alat elektroforesis horizontal (*Mupid 2 Plus*), neraca analitik, termometer, autoklaf, *magnetic stirer*, vorteks, *Centrifuge Hettich EBA III*, *High Speed Refrigerated Micro Centrifuge TOMY MX-301*, dan UV Transiluminator *Bioinstrument*.

2.2 Metode

Isolasi Khitosan

Khitosan diisolasi dari tepung kulit udang menggunakan metode dari [7] termodifikasi. Derajat deasetilasi khitosan ditentukan dengan menggunakan data absorbansi yang diperoleh dari spektra FTIR, dengan persamaan:

$$DD = \left[1 - \left[\frac{A_{1588}}{A_{3410}} \times \frac{1}{1,32} \right] \right] \times 100\%$$

dengan:

A_{1588} = absorbansi pada bilangan gelombang 1588 cm⁻¹.

A_{3410} = absorbansi pada bilangan gelombang 3410 cm⁻¹.

Isolasi DNA Plasmid

Isolasi DNA plasmid skala kecil dari *E. coli* dilakukan sesuai petunjuk dalam buku manual dari kit Qiagen (QIAprep Miniprep). Konsentrasi isolat DNA plasmid ditentukan dengan spektrofotometer UV pada 260 nm dan 280 nm serta secara kualitatif DNA plasmid dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarosa.

Pembentukan Polipleks

Sintesis polipleks khitosan-DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan metode koaservasi sesuai dengan metode Chew *et al.* [8] dan Gao *et al.* [9]. Sebanyak 3 mL larutan Na₂SO₄ 25 mM yang mengandung 6 µg DNA plasmid dicampurkan dengan larutan khitosan 0,2% (b/v) dalam asam asetat 1% dengan rasio 1:1. pada temperatur 55°C serta divorteks dengan kecepatan maksimum selama 45 detik. Campuran yang diperoleh ditempatkan pada temperatur ruangan selama 30 menit untuk stabilisasi.

Selanjutnya campuran yang diperoleh ditentukan ukuran partikelnya dengan *Particle Size Analyzer* (PSA) serta ditentukan kompleksasi DNA plasmid oleh khitosan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Transformasi Sel Inang

Metode pembuatan sel kompeten dan transformasi sel mengacu pada Sambrook *et al.* [10].

3. HASIL dan PEMBAHASAN

Hasil Isolasi dan Analisis Khitosan

Proses isolasi khitosan didahului dengan proses demineralisasi yang berguna untuk mengurangi kandungan mineral CaCO₃ dan Ca₃(PO₄)₂. Proses demineralisasi dilakukan dengan menggunakan HCl 1,5 M pada suhu 70°C dengan perbandingan 1:10. Rendemen produk dari tahapan demineralisasi adalah 47,11%.

Produk dari tahapan demineralisasi selanjutnya direaksikan dengan NaOH 3,5% pada suhu 70°C dengan perbandingan 1:10, tujuan penambahan NaOH pada tahapan ini adalah untuk menghilangkan kandungan protein pada tepung kulit udang dan dilanjutkan dengan proses penghilangan

warna dengan menggunakan aseton. Pada tahapan ini diperoleh khitin dengan rendemen 61,05%. Pembuktian diperolehnya khitin telah dilakukan secara kualitatif dengan mereaksikan khitin dengan larutan I₂/KI dengan ditandai terjadinya perubahan warna coklat menjadi ungu.

Khitin yang diperoleh selanjutnya direaksikan dengan NaOH 60% (b/v) perbandingan 1:100. Penggunaan NaOH atau bertujuan untuk mempercepat terjadinya reaksi pemutusan ikatan antara gugus asetil pada gugus amida sehingga diperoleh gugus amina bebas. Reaksi deasetilasi dilakukan 3 x 4 jam dengan menggunakan rangkaian refluks dan khitosan yang diperoleh sebanyak 0,7021 g. Hasil tahapan isolasi khitosan ditunjukkan pada Tabel 1. Residu yang diperoleh selanjutnya diuji secara kualitatif dengan dilarutkan dalam larutan asam asetat 1% dan residu yang diperoleh larut dengan sempurna. Dengan menerapkan persamaan Moore dan Robert [11] diperoleh nilai persen derajat deasetilasi isolat khitosan sebesar 83,30%. Derajat deasetilasi khitosan yang diperoleh layak untuk dilanjutkan dalam tahapan pembentukan polipleks khitosan-pDNA, karena pada umumnya pembentukan polipleks memanfaatkan khitosan yang memiliki derajat deasetilasi 75-80%.

Selain dianalisis secara kualitatif, khitin dan khitosan dapat pula dianalisis menggunakan instrumentasi FT-IR dengan melakukan analisis gugus fungsi, seperti pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Tahapan Isolasi Khitosan

Tahapan	Hasil
Penyiapan tepung kulit udang	100,0000 g
Demineralisasi	47,1105 g
Deproteinasi	28,7615 g
Deasetilasi*	0,7021 g
Derajat Deasetilasi	78,30 %

* Produk deasetilasi menggunakan 1 g produk deproteinasi

Tabel 2. Hasil analisis FT-IR dari khitin dan khitosan

Khitin		Khitosan	
Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3479,58	OH	3450,8	OH
3265,49	N – H ulur	3335,9	N – H ulur
2883,58	C – H ulur	2890,9	C – H ulur
1658,78	C = O ulur	1656,5	NH ₂ guntingan
1562,34	N – H bengkokan	1418,2	N – H bengkokan
1423,47	CH ₃	1073,7	CH ₃
1066,64	C – O – C	849,7	C – O – C
746,45	N-H kibas	714,8	NH ₂ kibas
			N-H kibas

Hasil Isolasi dan Analisis DNA Plasmid

Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan prosedur dari manual kit miniprep Qiagen. Dalam kit tersebut terdapat sejumlah komponen larutan yang ditambahkan secara berurutan yakni buffer P1, P2, N3, PE, dan buffer EB.

Isolat DNA plasmid yang diperoleh dilanjutkan dengan analisis konsentrasi dengan menggunakan spektrofotometer UV pada 260 nm. Data pengukuran DNA plasmid yang diperoleh secara spektrofotometri UV menunjukkan rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm (A_{260}/A_{280}) sebesar 1,9; dan konsentrasi 37,8 µg/mL. Selain menggunakan spektrofotometer UV, DNA plasmid juga dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa. Pada elektroforegram (Gambar 1) diperoleh pita DNA plasmid yang khas dalam lajur yang sama dari dua sampel DNA plasmid yang diperoleh. Hal ini menunjukkan bahwa DNA plasmid yang diperoleh berada dalam satu bentuk konformasi. Selain itu, pita DNA yang diperoleh cukup tajam dan tidak berekor yang mengindikasikan bahwa isolat

DNA bebas dari kontaminasi RNA dan protein.



Gambar 1. Elektroforegram DNA plasmid

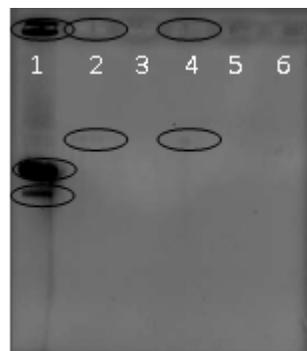
Hasil Sintesis dan Karakterisasi Polipleks

Proses koaservasi diawali dengan melakukan pemanasan terhadap larutan khitosan dan DNA plasmid secara terpisah hingga temperatur 55° C. Sebanyak 3 mL larutan DNA plasmid dipindahkan dan dicampurkan dengan 3 mL larutan khitosan pada tabung 15 mL. Campuran tersebut selanjutnya divorteks dengan kecepatan maksimum selama 20 detik dan selanjutnya distabilisasikan pada suhu ruang selama 30

menit. Setelah proses stabilisasi campuran larutan khitosan dan DNA plasmid dalam rasio 1:1 dan diperoleh sistem koloid yang ditandai oleh meningkatnya kekeruhan (warna putih susu).

Polipeks khitosan-pDNA yang diperoleh dapat diuji secara kualitatif dengan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa (Gambar 2). Berdasarkan hasil pengujian dengan elektroferesis gel menunjukkan bahwa telah diperoleh polipeks (lajur 3 dan 5) yang ditandai dengan tidak adanya fragmen pita DNA seperti pada kontrol DNA plasmid (lajur 1, 2, dan 4). Bukti telah terbentuknya polipeks juga dapat dibandingkan dengan elektroforegram pada Gambar 1. Hal tersebut menunjukkan bahwa polipeks tidak dapat beregrak ke kutub positif dalam proses elektroforesis yang mana pemisahan molekul di sini berdasarkan bobot molekul melalui kutub-kutub bermuatan dari negatif ke positif. Tidak diperolehnya pita-pita DNA disebabkan oleh muatan polipeks yang cenderung positif sehingga lebih tertahan pada kutub negatif pada elektroforesis gel agarosa.

Selain dengan elektroforesis gel agarosa, karakterisasi polipeks dapat dilakukan dengan menggunakan *Particle Size analyzer* (PSA) yang dapat nilai potensial Zeta. Dari data pengujian dengan menggunakan PSA memberikan nilai potensial Zeta 9,63 mV.



Gambar 2 Elektroforegram Polipeks

Stabilitas dan Toksisitas Polipeks

Uji pendahuluan berupa uji stabilitas dan toksisitas dilakukan terhadap polipeks yang diperoleh. Uji stabilitas dilakukan pada suhu 4°C, hal ini dilakukan untuk mengetahui kestabilan dari polipeks pada saat proses transformasi berlangsung yang mana menggunakan suhu inkubasi saat dicampurkan dengan sel inang *E coli* pada suhu 4°C. Pada Tabel 3 menunjukkan kestabilan polipeks diukur berdasarkan nilai *optikal density* (OD) yang diukur pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀). Terjadinya penurunan nilai OD₆₀₀ setelah menit ke 90 mengindikasikan bahwa terjadi penurunan jumlah hamburan partikel polipeks yang disebabkan kecenderungan polipeks mengalami pengendapan.

Tabel 3. Data Stabilitas Polipeks

Menit ke-	OD ₂₆₀
0	0,109
15	0,109
30	0,110
60	0,109
90	0,109
1080 (18 jam)	0,063
2520 (42 jam)	0,058

Hal ini disebabkan oleh nilai potensial Zeta dari polipeks yang lebih cenderung mudah ternetralisasi yang menyebabkan terjadinya pengendapan.

Uji pendahuluan berikutnya adalah pengujian toksisitas polipeks terhadap sel inang *E. coli* yang digunakan dalam transformasi sel. Pengujian ini dilakukan mengingat bahan baku pembentukan polipeks adalah khitosan yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Pengujian toksisitas juga dilakukan untuk menjelaskan hasil yang diperoleh pada proses transformasi sel.

Tabel 4 Data OD₆₀₀ Kultur *E.coli* pada Uji Toksisitas Polipeks

Volume Polipeks	OD ₆₀₀
0 µL	0,844
15 µL	0,853
30 µL	0,823
45 µL	0,668

Pengukuran toksisitas dilakukan dengan menentukan nilai OD pada panjang gelombang 600 nm. Pada Tabel 4, nilai OD₆₀₀ mengalami penurunan dengan meningkatnya volume polipeks yang ditambahkan. Hal tersebut menjelaskan bahwa toksisitas polipeks akan meningkat dengan bertambahnya volume polipeks yang digunakan. Nilai OD₆₀₀ berbanding lurus dengan banyaknya sel *E. coli* yang tumbuh. Pada volume polipeks yang digunakan sebanyak 15 µL menunjukkan nilai OD₆₀₀ yang relatif mendekati kontrol (penambahan polipeks 0 µL), bahkan OD₆₀₀ sedikit lebih tinggi, maka dalam proses transformasi sel

berikutnya jumlah polipeks yang digunakan adalah 15 µL.

Hasil Transformasi Sel dengan Polipeks

Proses transformasi sel kompeten dengan polipeks khitosan-pDNA dilakukan pada media cair dan disertai dengan perbandingan yakni, kontrol positif. Perbandingan keberhasilan proses transformasi ditentukan dengan mengukur tingkat kekeruhan larutan pada panjang gelombang 600 nm.

Pada kelompok negatif, sel inang kompeten tidak ditambahkan DNA plasmid melainkan hanya ditambahkan buffer TE pH 8 dan dibiakkan pada medium padat LB yang telah mengandung ampisilin. Dari hasil pengukuran dengan spektroskopi UV pada panjang gelombang 600 nm dapat diperkirakan tidak diperolehnya sel transforman karena OD₆₀₀ kelompok negatif lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (DNA plasmid) dan kelompok perlakuan menggunakan polipeks. Data absorbansi masing-masing kelompok dapat dilihat pada Tabel 5.

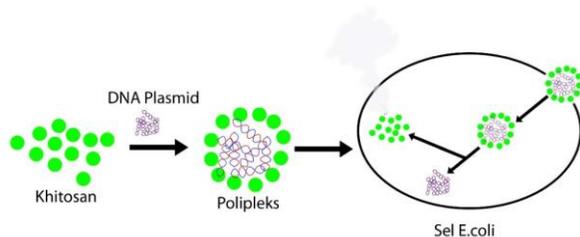
Transforman *E. coli* dapat tumbuh dalam media LB ampisilin karena dalam plasmid yang digunakan yaitu pYES2 mengandung gen penanda resisten terhadap ampisilin. Gen ini dapat mengkode enzim beta-laktamase dan berperan untuk memecah cincin betalaktam, sehingga jika proses transformasi berhasil

Tabel 5 Data OD₆₀₀ Sel Transforman

Kelompok	OD ₆₀₀
Negatif (Buffer TE)	0,968
Positif (DNA plasmid)	1,207
Perlakuan (Polipeks)	1,269

maka sel bakteri inang akan memiliki kemampuan untuk hidup pada medium yang mengandung antibiotik ampisilin [10].

Kelompok perlakuan berupa sel inang kompeten yang telah ditambahkan polipeks dan dibiakkan pada medium padat LB-ampisilin memberikan hasil positif dengan diperolehnya transforman *E. coli* yang mampu hidup pada media yang mengandung ampisilin. Hal ini mengindikasikan bahwa polipeks mampu masuk ke dalam sel *E. coli* yang telah kompeten dan selanjutnya polipeks mampu membebaskan DNA plasmid di dalam sel, sehingga kelompok *E. coli* ini mampu untuk mengekspresikan enzim betalaktamase yang dapat memecah cincin betalaktam pada ampisilin dan perlu dibuktikan lebih lanjut.



Gambar 3. Usulan mekanisme polipeks dalam transformasi sel inang *E. coli*

Mekanisme terbentuknya polipeks dan proses terjadinya transformasi sel inang *E. coli* diusulkan seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Proses yang terjadi dalam transformasi sel dengan polipeks diduga bahwa polipeks dapat menembus sel inang *E. coli* yang telah kompeten (setelah perlakuan dengan CaCl_2), kemudian terjadi pelepasan DNA plasmid dari polipeks dalam sel. Indikasi telah terjadinya pemisahan antara khitosan dan DNA plasmid didasarkan atas telah diperolehnya transforman *E. coli*

yang resisten terhadap ampisilin karena gen marker ampisilin yang ada dalam DNA plasmid dapat terekspresi apabila dalam keadaan bebas. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan teknik yang lain dan mendalam untuk mengetahui mekanisme yang sesungguhnya dalam proses ini.

4. KESIMPULAN

Pada penelitian ini polipeks yang stabil telah disintesis dengan nilai potensial Zeta sebesar +9,63 mV dan dapat ditransformasikan ke dalam sel inang *E. coli*.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (Dikti) Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKMP). Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Drs. Wayan Budiarsa Suyasa, M.Si; I A. G. Widihati, S.Si., M.Si; dan Putu Suarya, S.Si., M.Si atas saran dan masukannya.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kim, Tae-Hee; Jiang, Hu-Lin; Jere, Dhananjay; Park, In-Kyu; Cho, Myung-Haing; Nah, Jae-Woon; Choi, Yun-Jaie; Akaike, Toshihiro; Cho, Chong-Su. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo., *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 726–753.
- [2] Lai WF, Lin MC. Nucleic Acid Delivery with Chitosan and Its Derivatives., *J Control Release*, 2009, 134, 158 – 68

- [3] Luo D, Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface., *Nat Biotechnol.*, 2000, 18, 893–5.
- [4] Borchard, G., Chitosans for Gene Delivery, *Adv Drug Deliv Rev.* 2001, 52, 145 – 50
- [5] Tan ML, Choong PF, Dass CR. Cancer. Chitosan Nanoparticles and Catalytic Nucleic Acids. 2009, *J Pharm Pharmacol.* 2009, 61, 3-12.
- [6] Brown, T.A. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 4th Ed., Black Well Science. 2001.
- [7] Sudiarti, Ni Made. Aplikasi Khitosan Kulit Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*) sebagai Pengawet Tahu. *Thesis*, Program Studi Kimia Terapan, Universitas Udayana, 2011.
- [8] Chew, Joon Lin; Wolfowicz, Claudia Betina; Mao, Hai-Quan; Leong, Kam W.; Chua, Kaw Yan. Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen, Der p 1 for oral vaccination in mice, *Vaccine*, 2003, vol 21, 2720–2729.
- [9] Gao, Yu; Zhang, Zhiwen; Chen, Lingli; Gu, Wangwen; and Yaping Li. Chitosan N-betainates/DNA self-assembly nanoparticles for gene delivery: In vitro uptake and transfection efficiency. , *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 371(1–2), 156–162.
- [10] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [11] Moore G.K., Roberts G.A.F., *Int J Biol Macromol.*, 1980, 2, 115-6.