



OPTIMASI METODE LISIS ALKALI UNTUK MENINGKATKAN KONSENTRASI PLASMID

Optimization of Alkaline Lysis Method for the Improvement of Plasmid Concentration

Dudi Hardianto^{1,*}, Alfik Indarto², Nurtjahjo Dwi Sasongko²

¹Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT, Gedung 630 Kawasan PUSPIPTEK, Setu, Tangerang Selatan, Banten 15314

²Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah 53122

*E-mail: dudi.hardianto@bppt.go.id

ABSTRACT

*Plasmids are extra chromosomal molecules of DNA that replicate autonomously and found in prokaryote and eukaryote cells. There are a number of methods that are used to isolate plasmids, such as alkaline lysis, boiling lysis, using cesium chloride, and chromatography. Amongst the disadvantages in plasmid isolation methods are lengthy time especially when handling a large number of samples, high cost, and low purity. Alkaline lysis is the most popular for plasmid isolation because of its simplicity, relatively low cost, and reproducibility. This method can be accomplished in 50 minutes to one hour. In this research, the alkaline lysis method was developed to obtain suitable plasmid for applications in a molecular biology laboratory. The aim of this research was to reduce contaminants and improve yield of plasmid. The result of isolation of pICZA plasmid in *Escherichia coli* gave the concentration of 3.3 to 3.8 µg/µL with the purity of 1.99.*

Keywords: *Plasmid isolation, pICZ A, Escherichia coli, rapid, alkaline lysis*

ABSTRAK

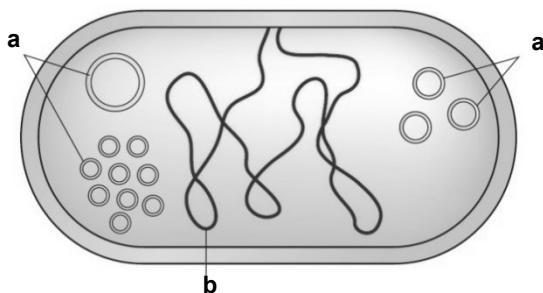
Plasmid merupakan molekul DNA ekstrakromosomal yang bereplikasi secara mandiri dan ditemukan dalam sel prokariot dan eukariot. Banyak metode yang digunakan untuk isolasi plasmid, seperti: lisis alkali, lisis dengan pemanasan, penggunaan sesium klorida, dan kromatografi. Kelemahan beberapa metode isolasi DNA adalah waktu isolasi yang lama terutama saat isolasi plasmid dalam jumlah banyak, mahal dan kemurniannya yang rendah. Metode lisis alkali merupakan metode yang sangat umum untuk isolasi plasmid karena mudah dilakukan, relatif murah, dan reproduibilitas. Metode ini dapat dilakukan dalam 50 menit sampai 1 jam. Pada penelitian ini dikembangkan metode lisis alkali untuk memperoleh plasmid yang sesuai untuk penggunaan di laboratorium biologi molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengurangi jumlah kontaminan dan meningkatkan konsentrasi plasmid. Hasil isolasi plasmid pICZA dalam *Escherichia coli* mempunyai konsentrasi antara 3,3 sampai 3,8 µg/µL dan kemurniannya 1,99.

Kata Kunci: Isolasi plasmid, pICZ A, *Escherichia coli*, cepat, lisis alkali

PENDAHULUAN

Plasmid merupakan molekul DNA ekstrakromosomal yang dapat bereplikasi (memperbanyak diri) secara mandiri dan ditemukan dalam sel prokariot dan eukariot. Secara alami plasmid terdapat pada bakteri dan beberapa organisme eukariot seperti *Saccharomyces cerevisiae*. Ukuran plasmid bervariasi antara 1 kb sampai 200 kb. Dalam penelitian rekayasa genetika, plasmid digunakan sebagai kendaraan molekuler untuk memasukkan gen dari luar ke dalam sel inang (Palomares et al. 2004; Yadav et al. 2011). Plasmid mempunyai 3 komponen penting yaitu: 1) *Origin of replication* (ORI), sehingga plasmid dapat bereplikasi secara mandiri, 2) mempunyai daerah unik sebagai situs pemotongan enzim endonuclease, yang biasa disebut *multiple cloning site* (MCS), 3) membawa penanda seleksi (biasanya resistensi terhadap antibiotika) untuk membedakan antara sel inang yang mengandung plasmid atau tidak.

Klasifikasi plasmid berdasarkan karakteristik gen yang dikodenyanya. Terdapat 5 jenis plasmid (Brown 2010), yaitu: 1) plasmid fertilitas atau F, membawa gen *tra* sehingga plasmid dapat berpindah secara konjugasi, contoh plasmid F pada *E. coli*, 2) plasmid resisten atau R, membawa gen resistensi terhadap antibiotika, contoh: resistensi terhadap kloramfenikol, ampicilin, dan zeocin, 3) Plasmid Col mempunyai gen pengkode protein kolisin, protein yang dapat membunuh bakteri lain, contoh ColE1 pada *E. coli*, 4) plasmid degradatif memungkinkan sel inang memetabolisme senyawa yang tidak umum (toluene dan asam salisilat), contoh: Tol pada *Pseudomonas putida*, 5) plasmid virulensi, memungkinkan sel inang dapat menginfeksi organisme lain. Contoh plasmid Ti pada *Agrobacterium tumefaciens*

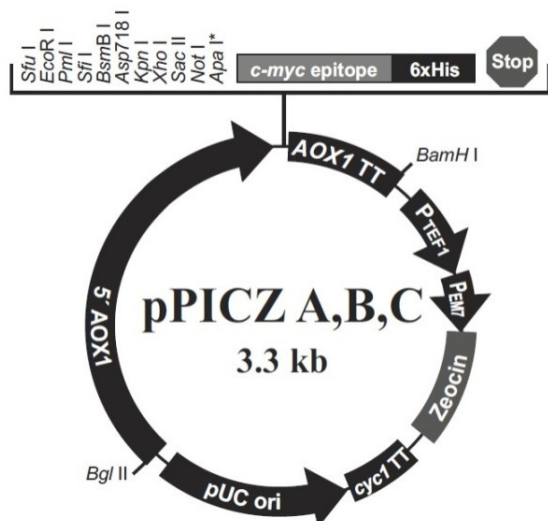


Gambar 1. Plasmid dalam sel bakteri, a: plasmid, b: kromosom bakteri (Brownj 2010)

sehingga dapat menginfeksi tanaman dikotiledon. Plasmid pCZ A merupakan salah satu jenis plasmid resisten yang mempunyai gen pengkode resisten terhadap zeocin.

Plasmid yang pertama kali dikonstruksi adalah plasmid pBR322 (pada tahun 1974) dan merupakan salah satu plasmid yang pertama kali digunakan dalam rekayasa genetika. Sistem penamaan plasmid menggunakan huruf dan angka. Sebagai contoh pBR322, p berarti plasmid, BR merupakan nama orang yang pertama kali mengkonstruksi plasmid (Bolivar dan Rodriguez), dan 322 merupakan nomor identitas spesifik dari plasmid (Balbas et al. 1986). Pada penelitian ini digunakan plasmid pCZ A sebagai model untuk optimasi isolasi plasmid dengan metode lisis alkali. Plasmid pCZ A berukuran 3329 bp mempunyai pUC sebagai ORI yang berasal dari *Escherichia coli* (*E. coli*) sehingga dapat bereplikasi di sel *E. coli*, mempunyai daerah MCS dengan 10 situs enzim restriksi, dan membawa penanda seleksi resistensi terhadap antibiotika zeocin (gen *Sh ble*). Perbedaan antara plasmid pCZ A, pCZ B, dan pCZ C adalah pada salah satu dari 10 situs enzim restriksi, untuk pCZ A terdapat *Apa* I, pCZ B *Xba* I, sedangkan pCZ C *Sna* I. Kelebihan plasmid pCZ A selain dapat bereplikasi dalam *E. coli* juga dapat terintegrasi ke dalam genom *Pichia pastoris*.

Sejak ditemukan plasmid, telah banyak metode dikembangkan untuk mengisolasi plasmid. Metode isolasi plasmid yang tepat sangat penting untuk mendapatkan plasmid dengan konsentrasi dan kemurnian yang tinggi. Keberhasilan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), penentuan urutan DNA (*sequencing*), dan kloning gen sangat ditentukan oleh konsentrasi dan kemurnian plasmid. Beberapa metode isolasi plasmid antara lain: lisis alkali, lisis dengan pemanasan, menggunakan bahan kimia sesium klorida, metode dengan menggunakan *microwave* (Dederich et al. 2002), dan metode kromatografi (Birnbom dan Doli 1979). Metode isolasi plasmid yang biasa dipakai adalah lisis alkali dan lisis dengan pemanasan (Kiran et al. 2010; Perez-ortin et al. 1986; Yadav et al. 2011). Kelemahan metode lisis dengan pemanasan adalah beberapa *E. coli* seperti HB101t



Gambar 2. Plasmid pICZ A (Easysselect *Pichia* Expression Kit 2015)

selnya tidak dapat dilisis dengan pemanasan (Sambrook dan Russell 2001). Metode lain untuk isolasi plasmid dengan menggunakan sesium klorida, yang sangat mahal, korosif, toksik, dan memerlukan waktu yang sangat lama, sehingga metode ini jarang digunakan (Perez-ortin et al. 1986). Banyak kit untuk isolasi plasmid beredar di pasaran. Kit ini menggunakan kolom kromatografi sekali pakai untuk mengabsorpsi plasmid. Matriks yang digunakan beragam, antara lain gelas, resin anion (dietilaminoetil, dietil-2-hidroksipropil-aminoetil). Isolasi plasmid menggunakan kit relatif lebih mudah tetapi mahal jika dilakukan secara rutin (Sambrook dan Russell 2001). Dari metode-metode isolasi di atas, metode lisis alkali merupakan metode isolasi plasmid yang banyak digunakan karena simpel, relatif murah, dan reproduksibilitas (Sambrook dan Russell 2001).

Biasanya plasmid diisolasi dari hasil kultivasi *E. coli* dalam media LB cair yang mengandung antibiotika tetapi *E. coli* dalam LB padat dapat juga digunakan untuk isolasi plasmid. Penggunaan *E. coli* dalam LB padat lebih menghemat waktu karena tidak memerlukan tahap sentrifugasi untuk mendapatkan sel *E. coli* dari media cair (Sato et al. 2012).

Masalah utama dalam isolasi plasmid adalah kontaminan yang berasal dari senyawa fenolik dan polisakarida. Polisakarida menghambat aktivitas enzim restriksi *Hind* III dan Taq polymerase

sehingga menyebabkan kesalahan dalam interpretasi data penelitian (Kotchoni et al. 2003). Pengembangan metode isolasi plasmid diperlukan untuk mendapatkan plasmid yang murni, mudah, sederhana, cepat, dan murah. Metode yang digunakan merupakan modifikasi metode lisis alkali dari Kotchoni karena metode ini sederhana dan cepat. Modifikasi metode lisis alkali yang telah dilakukan adalah dengan mengganti diterjen sodium dodesil sulfat (SDS) sebagai senyawa pelisis sel dengan campuran enzim lipase dan diterjen (Yadav et al. 2011).

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan metode isolasi plasmid yang mempunyai konsentrasi dan kemurnian tinggi, metode isolasi yang mudah, aman (tidak menggunakan bahan berbahaya), murah, dan waktu yang diperlukan untuk isolasi plasmid antara 50 menit sampai satu jam.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Luria-Bertani (LB) mengandung ekstrak ragi 5%, tripton 10%, dan NaCl 10% dalam air. LB padat mengandung ekstrak ragi 5%, tripton 10%, dan NaCl 10%, agar 2% dalam air. Larutan I mengandung glukosa 50 mM, tris-HCl pH 8,0 25 mM, EDTA pH 8,0 10 mM. Larutan I disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan setelah dingin di simpan pada suhu 4°C. Enzim lisozim ditambahkan ke dalam larutan I saat akan digunakan. Larutan II mengandung NaOH 0,2 M, SDS 1% (b/v). Larutan II harus dibuat segar dari stok NaOH 2 M dan SDS 10% (b/v). Larutan IIIA mengandung ammonium asetat 8 M. Larutan III A disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan setelah dingin di simpan pada suhu ruang. Larutan III B mengandung kalium asetat 5 M 60 mL, asam asetat glasial 11,5 mL, air steril 28,5 mL. Stok larutan enzim lisozim mengandung 20 mg/mL enzim lisozim dalam tris-HCl pH 8,0 10 mM.

Regenerasi *E. coli*

Satu koloni *E. coli* yang mengandung plasmid pICZ A diinokulasi dalam media LB padat yang mengandung zeocin 50 µg/mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam.

Isolasi plasmid pICZ A

Koloni tunggal *E. coli* diinokulasi dalam media LB cair yang mengandung zeocin 50 µg/mL dan diinkubasi dengan kecepatan putaran 200 rpm dan suhu 37°C selama semalam. Sebanyak 2 mL suspensi *E. coli* disentrifugasi dengan kecepatan 5000 g selama 5 menit pada suhu ruang. Endapan *E. coli* diresuspensi dalam 200 µL larutan I yang mengandung lisozim 4 µg/mL dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan larutan II sebanyak 400 µL dan dicampur dengan cara inversi 4 sampai 6 kali. Lalu ditambahkan larutan III A sebanyak 200 µL dan dicampur secara hati-hati dengan menggunakan mikropipet dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 5 menit. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 13000 g selama 5 menit pada suhu ruang. supernatan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf baru dan ditambah 0,6 volume isopropanol (misalnya jika diperoleh supernatant 1,0 mL maka ditambahkan isopropanol 0,6 mL), dicampur dengan cara inversi sebanyak 4 sampai 6 kali, diinkubasi pada suhu -20°C selama 10 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 g selama 5 menit pada suhu 4°C. supernatan dibuang. Pelet dicuci dengan etanol 70% 400 µL dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 g selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dengan desikator vakum selama 10 menit. Pelet diresuspensi dalam air bebas DNase dan RNase 50 µL, ditambahkan RNase A 1 µL, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Untuk modifikasi metode Kotchoni larutan III A diganti dengan larutan III B.

Konsentrasi dan kemurnian plasmid pICZ A

Sampel plasmid sebanyak 2 µL diukur dengan menggunakan nanodrop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian plasmid.

Elektroforesis

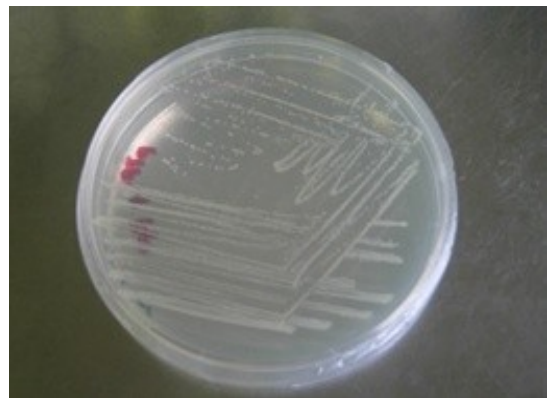
Gel agarosa 1% dibuat dengan menggunakan agarosa 0,4 gr dicampur dengan TAE 1X sebanyak 40 mL, dan dipanaskan menggunakan *microwave* sampai larut, setelah hangat ditambahkan SYBR Safe sebanyak 1 µL, dicampur sampai homogen, dan dituang ke dalam cetakan dan dibiarkan sampai padat. Sampel sebanyak 5 µL ditambahkan *loading dye* 6x 1 µL

dihomogenkan, lalu dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa yang terbentuk. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat dengan *UV-transilluminator*.

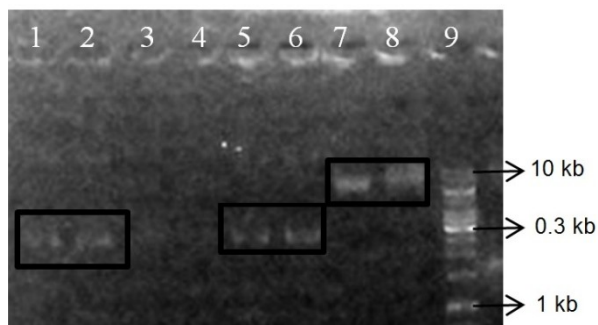
HASIL DAN PEMBAHASAN

Escherichia coli diregenerasi dalam LB padat yang mengandung zeocin 50 µg/mL untuk mendapatkan *E. coli* yang segar, muda, dan mencegah terjadinya kontaminasi saat penyimpanan. Koloni tunggal *E. coli* digunakan untuk mengisolasi plasmid pICZ A.

Tiga jenis optimasi yang dilakukan pada tahap penambahan larutan III dan kondisi sentrifugasi. Pada metode Kotchoni pengendapan kontaminan atau pengotor plasmid digunakan ammonium asetat 8 M sedangkan pada penelitian ini digunakan larutan yang mengandung kalium asetat 5 M 60 mL, asam asetat glasial 11,5 mL, air steril 28,5 mL sehingga diharapkan pengotor lebih mudah mengendap. Kondisi sentrifugasi yang dioptimasi pada tahap pemisahan pengotor yang tidak larut dengan plasmid, pada metode Kotchoni disentrifugasi dengan kecepatan putaran 10000 g selama 3 menit, sedangkan pada penelitian ini disentrifugasi dengan kecepatan putaran 13000 g selama 5 menit. Hal ini dilakukan agar semua pengotor mengendap sempurna. Optimasi yang ketiga pada tahap pengendapan plasmid, untuk metode Kotchoni plasmid diendapkan dengan penambahan 0,6 volume isopropanol dan diinkubasi pada suhu ruang, sedangkan metode modifikasi plasmid diendapkan dengan penambahan 0,6 volume isopropanol dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 10 menit sehingga



Gambar 3. Regenerasi *E. coli* yang mengandung plasmid



Gambar 4. Elektroforegram plasmid. Sumuran 1-2 hasil isolasi plasmid pICZ A dengan metode Kotchoni, sumuran 5-6 hasil isolasi plasmid pICZ A dengan metode modifikasi, sumuran 7-8 hasil isolasi plasmid pET-21d(+) dengan kit, Marker 1 kb.

diharapkan jumlah plasmid yang mengendap lebih banyak karena suhu dingin akan menyebabkan berkurangnya kelarutan plasmid.

Salah satu faktor keberhasilan proses kloning adalah konsentrasi dan kemurnian plasmid yang diperoleh dari hasil isolasi. Penentuan konsentrasi plasmid diukur pada panjang gelombang 260 nm sedangkan kemurnian plasmid ditentukan dengan membandingkan serapan pada panjang gelombang 260/280 nm. DNA murni mempunyai nilai antara 1,8 sampai 2,0. Untuk penentuan konsentrasi dan kemurnian plasmid pICZ A digunakan Nanodrop. Dari hasil penentuan konsentrasi plasmid pICZ A diperoleh antara 3,3 sampai 3,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sedangkan metode Kotchoni menghasilkan plasmid sebanyak 2,0 sampai 2,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Kemurnian plasmid pICZA adalah 1,99 (memenuhi persyaratan). Modifikasi metode Kotchoni menghasilkan jumlah plasmid lebih banyak dibandingkan metode Kotchoni.

Hasil visualisasi plasmid pICZ A menunjukkan bahwa plasmid yang diperoleh dengan modifikasi metode Kotchoni mempunyai pita yang lebih tebal dibandingkan dengan metode Kotchoni (Gambar 4.) Modifikasi Kotchoni mempunyai lebih tebal karena mempunyai konsentrasi plasmid lebih besar (antara 3,3 sampai 3,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

KESIMPULAN

Modifikasi metode Kotchoni menghasilkan plasmid pICZ A antara 3,3 sampai 3,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dan kemurniannya 1,99.

DAFTAR PUSTAKA

- Birnboim HC, Doli J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Brown TA (2010) *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, ed. Ke-6. Graphicraft Limited. Hongkong.13-17
- Dederich DA, Okwuonu G, Garner T, Denn A, Sutton A, Escotto M, Martindale A, Delgado O, Muzny DM, Gibbs RA, Metzker ML (2002) Glass bead purification of plasmid template DNA for high throughput sequencing of mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* 30:1-5
- Easyselect *Pichia* Expression Kit for Expression of Recombinant Protein Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia* https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf, diakses 20 Oktober 2015
- Kiran C, Sreekanth P, Ponnala D, Paithankar KR (2010) A quick and economical method to isolate plasmid DNA for large scale sequencing. *Int J Appl Biol Technol* 1:1236-1238
- Kotchoni SO, Gachomo EW, Betiku E, Shonukan OO (2003) A home made kit for plasmid DNA mini-preparation. *Afr J Biotechnol* 2:88-90
- Palomares LA, Mondaca ST, Ramirez OT (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *In: Methods in Molecular Biology: Recombinant Gene Expression Reviews and Protocols*, vol 267. Balbas P & A Lorence (ed). Humana Press Inc., New Jersey
- Perez-Ortin JE, Ramon D, Ferrer S, Tordera V (1986) Rapid plasmid isolation, A laboratory experiment. *Biochem Edu* 14:142-144
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York
- Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sukarai T, Watanabe S (2012) A simplified protocol for the semi-large scale recovery of plasmids from *Escherichia coli* grown on agar plates. *J Biomed Sci Eng* 5:406-408
- Yadav P, Yadav A, Garg V, Datta TK, Goswami SL, De S (2011) A novel method of plasmid isolation using laundry detergent. *Indi J Exp Biol* 49:558-560