

**PENGEMBANGAN METODE IDENTIFIKASI DNA (pIJ702)
MENGUNAKAN PRINSIP LISIS ALKALI DAN PENGENDAPAN DENGAN
NATRIUM ASETAT pH 2**

Budi Untari dan Mardiyanto
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Telah dilakukan perbaikan visualisasi plasmid bermarka melanin (pIJ 702) pada Streptomyces lividans Rekombinan dengan modifikasi metode lisis alkali. Larutan natrium asetat yang digunakan untuk mengendapkan DNA dalam metode lisis alkali didapar pada pH 2 memberikan hasil yang terbaik dalam memvisualisasikan pita plasmid pIJ 702. Dengan perendaman etidium bromida (50 µg dalam 50 mL air) lebih dari waktu normal juga tidak memperlihatkan melanin pengganggu, sedangkan larutan buffer penyimpan yang didapar pada pH dibawah 7 tidak memberikan pengaruh yang berarti ($p = 0,05$). Hasil visualisasi fragmen Bam HI plasmid pIJ 702 juga jelas pertanda metoda bebas dari pengaruh melanin.

I. PENDAHULUAN

Streptomyces terkenal sebagai penghasil metabolit sekunder yang paling banyak baik dari segi jenis maupun jumlah metabolit sekunder. Berbagai upaya rekayasa biosintesis termasuk rekayasa genetik telah dilakukan terhadap Streptomyces agar bisa menghasilkan ataupun mempertahankan produktivitasnya^(2,5,10).

Rekayasa biosintesis melalui pendekatan rekayasa genetik terhadap Streptomyces dewasa ini sering dilakukan menggunakan vektor kloning berupa plasmid

pIJ dan turunannya. Sebahagian dari plasmid ini mempunyai marka berupa gen pengkode melanin. Melanin sangat membantu dalam penyeleksian koloni yang tumbuh dengan penampakan pigmen warna coklat disekitar koloni. Dari pengalaman penelitian tentang isolasi plasmid pIJ 702 sebelumnya ternyata melanin ini juga mengganggu pengamatan pita fragmen DNA tersebut dalam gel agarosa yang direndam dengan etidium bromida. Pencegahan dini yang dilakukan berupa proses pengikatan secara berulang kali pada matrik kolom Qiagen^R berupa rangkaian kit

isolasi plasmid. Tentunya proses ini lebih mahal dibandingkan pengisolasian plasmid secara lisis alkali. Proses lisis alkali yang pernah dilakukan tidak memberikan hasil yang baik^(1,3,4).

Melanin merupakan pigmen warna berupa senyawa peptida. Larutan penyimpanan yang bersifat basa lemah menjadikan warna yang dihasilkan lebih tua kebalikan dengan suasana asam. Presipitasi plasmid berlangsung pada pH 2 sampai dengan 5,5 paling baik dalam larutan agak asam. Berdasarkan teori ini maka dengan mendapar larutan yang berisi fragmen DNA beserta melanin yang tersisa pada kondisi asam diharapkan proses isolasi plasmid jadi lebih sempurna. Keberhasilan kerja berupa isolasi plasmid ini sangat menentukan kesuksesan kerja lanjutan berupa pemotongan serta penyambungan dengan fragmen DNA lainnya, karena plasmid yang diperoleh cukup murni meskipun tidak menggunakan kit isolasi plasmid^(1,2,5).

Pada penelitian ini presipitasi fragmen DNA dilakukan pada pH yang berbeda-beda dimulai dari pH 2 sampai dengan 5. Pengamatan yang dilakukan berupa ketebalan fragmen DNA dalam gel agarosa

serta berkurangnya intensitas warna melanin. Jumlah fragmen DNA yang ditotolkan serta lama perendaman dalam larutan etidium bromida adalah sama.

II. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Asam asetat glasial, metanol, amonium asetat, etanol, isopropanol, dimetilsulfoksida, natrium asetat, kalium asetat, fenol, kloroform, natrium klorida, glukosa, sukrosa, magnesium klorida, natrium fosfat, natrium hidrogen fosfat, polietilen glikol, kalsium klorida, kalium klorida, larutan "trace element", asam klorida, asam sulfat, xilen xilenol, 2-merkptoetanol, etilen diamin tetraasetat (EDTA), natrium hidroksida, natrium dodesil sulfat ("sodium dodecyl sulphate", SDS), "Commasie brilliant blue G250", isoamil alkohol, aseton, etil asetat, heksan, butanol, asetonitril, trishidroksi-metil aminometan, ammonium persulfat (Merck^R), ekstrak ragi, ekstrak malt, bacto agar (Difco^R), tiostrepton, (Boehringer^R), marka protein, lisozim, proteinase (Amersam^R).

Mikroba yang digunakan adalah *Streptomyces lividans* dan *Streptomyces lividans* TK-21 pemberian Dr. D.A., Hopwood di Departement Genetic of John Innes Centre.

2.2 Penyiapan Plasmid dalam *Streptomyces Lividans*^(10,11)

Proses inokulasi *Streptomyces* dari matriks "diatome" pada media YEME-tiostrepton padat dilakukan dengan penambahan senyawa induksi glukosa 1,5%. Hasil inokulasi disimpan pada suhu 30 °C selama 48 jam. Spora yang tumbuh dipilih spora yang dilingkari oleh pigmen warna sebagai senyawa marka lainnya. Spora dijadikan suspensi dengan bahan pensuspensi buffer fosfat-NaCl.

2.3 Lisis Sel dengan Alkali

Pellet sel dipanen dengan sentrifuga kecepatan 5000 rpm dan sel yang diperleh dicuci dengan wash buffer. Peptidoglikan Sel dibuang dengan bantuan lisozim dan membran sel dilisis dengan SDS-NaOH. Inkubasi suspensi yang terjadi pada suhu 30 °C.

2.4 Pengendapan dengan NaAsetat

Pada sel yang telah lisis dilakukan pengendapan DNA yang keluar dengan Na Asetat yang telah ditahan pH jadi lima variasi untuk melihat pada pH mana kondisi pengendapan sempurna dan melanin tidak mengganggu visualisasi. Larutan diinkubasi pada suhu 4°C selama 15 menit lalu dilanjutkan dengan sentrifuga 15.000 rpm hingga DNA terendapkan didasar tabung.

2.5 Ekstraksi dengan Buffer TE

Buffer TE dibuat pada pH 2 dan Te standar pH 5. Lalu DNA yang dikandungnya di running dengan elektroforesis untuk melihat kejelasan visualisasi antara Te terbuffer dengan yang normal.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

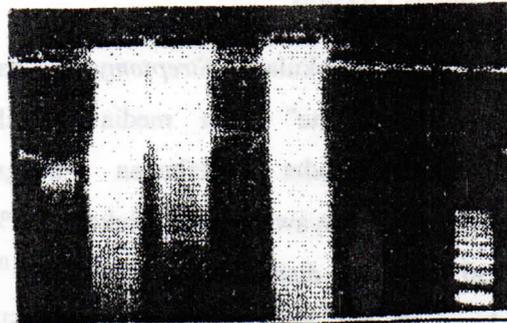
Langkah pertama yang dilakukan adalah memurnikan koloni yang membawa plasmid pIJ 702 tersebut karena kemurnian dari koloni ini menjamin lancarnya pekerjaan selanjutnya. *Streptomyces lividans* rekombinan yang sudah murni dijadikan suspensi spora. Ternyata menumbuhkan *Streptomyces* membutuhkan keterampilan

tersendiri mengingat waktu tumbuhnya yang lebih lama dari *E. coli* maka kondisi ini sangat memungkinkan sekali untuk terkontaminasi oleh jamur bila pemurnian koloni ini berada dalam kondisi yang tidak steril. Koloni *S. lividans* memperlihatkan kurva pertumbuhan dimana jam ke 16 adalah saat dimulainya fase logaritmik dan fase ini berakhir untuk masuk fase stasioner pada jam ke 36.

S. lividans yang membawa plasmid pIJ 702 mulai bermunculan setelah 3 hari inkubasi dan untuk pembentukan spora dibutuhkan waktu 5 sampai 7 hari. Disekitar koloni *S. lividans* yang tumbuh pada media YEME-tiostrepton padat bisa dijumpai pigmen melanin yang berwarna coklat tua. Sel yang telah menjadi spora ini mengindikasikan fase dimana pertumbuhan jadi lambat dengan arti kata sel hanya melakukan minimal metabolisme untuk penghematan cadangan energi yang dimiliki.

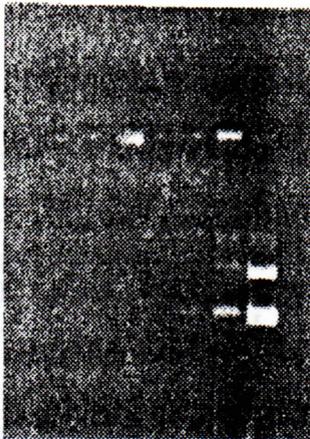
Larutan pengendap DNA yaitu natrium asetat normal punya pH 5,2 merupakan kondisi larutan yang bisa menampilkan ekspresi melanin sehingga mengganggu visualisasi plasmid yang diisolasi.

Hasilnya dapat diamati Gambar. 1 dan 2. Dari lima jenis pH yang divariasikan dalam 3 kali ulangan ternyata memberikan pengaruh yang beragam ($p = 0,05$) dan konsentrasi yang terbaik untuk menampilkan pola running plasmid adalah natrium asetat pH 2.



Gambar 1: Pita hasil isolasi pH 5

Pada pH 3 dan 4 memperlihatkan konsentrasi plasmid hasil isolasi cukup baik tetapi pada kasus ini melanin masih mengkontaminasi dan protein juga terdeteksi pada panjang gelombang 280 nm. Berikut akan ditampilkan angka-angka kemurnian plasmid hasil isolasi dengan natrium asetat pada berbagai pH seperti yang terlihat pada Tabel 1



Gambar 2 : Pita hasil isolasi dengan pH 2

Stock buffer Te pH 5 memperlihatkan pengaruh yang tidak berarti ($p=0,05$) dengan arti kata pita plasmid tetap pada intensitas yang terkontaminasi oleh melanin. Jika dibandingkan dengan pita standar ke tiga dari DNA marka \square HinD III seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Pola fragmentasi oleh BamH I dengan modifikasi lisis alkali memperlihatkan sebuah karakter yang benar dari plasmid pIJ 702 yaitu berukuran 7,2 dan 5 KB. Marka DNA yang digunakan adalah DNA 1 KB ladder (Amersham^R)

Tabel. 1 : Perbandingan pH dengan konsentrasi Plasmid Hasil Isolasi

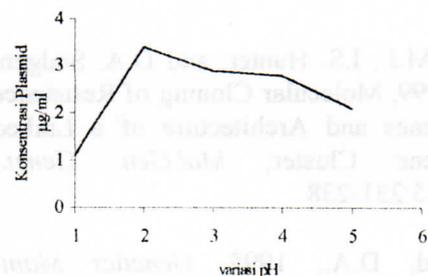
No	Variasi pH	Konsentrasi Plasmid rata-rata (\square g / ml)
1.	1	1,1
2.	2	3,4
3.	3	2,9
4.	4	2,8
5.	5	2,1

Keterangan : n = 3
Please do not use illegal software...

Tabel. 2 : Perbandingan pH dengan Kemurnian Plasmid

No.	Variasi pH	Kemurnian Plasmid rata-rata (faktor)
1.	1	1,9
2.	2	1,3
3.	3	1,2
4.	4	1,0
5.	5	0,8

Keterangan : n = 3



Gambar. 4 : Perbandingan pH dengan konsentrasi plasmid hasil isolasi

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan :

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa perbaikan visualisasi plasmid pIJ 702 menggunakan natrium asetat yang terbaik adalah dengan pendaparan pH 2 ($p=0,05$). Penyimpanan dalam buffer stock E pada pH 2 tidak berpengaruh terhadap perbaikan visualisasi plasmid ($p=0,05$).

Saran :

Dari data yang diperoleh bisa disarankan untuk isolasi plasmid pIJ dan turunannya dari *Streptomyces* selanjutnya bisa menggunakan teknik lisis Alkali biasa tapi dengan menggunakan larutan pengendap Na Asetat pH 2.

DAFTAR PUSTAKA

Buttler, M.J., I.S. Hunter, and D.A. Sudgen, 1999, Molecular Cloning of Resistance Genes and Architecture of a Linked Gene Cluster, *Mol.Gen. Genet.*, 215:231-238.

Hopwood, D.A., 1995, *Genetics Manipulation of Streptomyces*, The John Innes Foundations, Norwich, 12-25.

Mardiyanto, 2002, Peningkatan Produksi Tetrasiklin dari *Streptomyces aureofaciens* Melalui Pendekatan Rekayasa genetik, MS Thesis, ITB, Bandung

Purwanti, E., 1996, Purification of Novel Enzim Glucose Dehidrogynase F420 Dependent, Philoshopy Docktoral Thesis, University of Iowa, Iowa City USA.

Piepersberg, W., 1994, Pathway Engineering in Secondary Metabolite Producing, *J. Biotech*, 14(3): 251-285.