

# ISOLASI DAN ANALISIS PLASMID BEBERAPA ISOLAT BAKTERI FOTOSINTETIK ANOKSIGENIK

Djamburiyah S. Said dan M. Badjoeri

## PENDAHULUAN

Kelompok Bakteri fotosintetik anoksigenik (BFA) banyak ditemukan dan hidup pada berbagai habitat perairan, baik perairan tawar maupun perairan laut (Imhoff, 1988 dan Pfennig 1977). Menurut Atlas dan Bartha, (1987) dan Widiyanto (1996) Kemampuan aktivitas metabolisme BFA telah dimanfaatkan sebagai biokontrol atau bioremediasi. Beberapa isolat BFA mampu menggunakan senyawa H<sub>2</sub>S dalam proses fotosintesisnya. Sifat ini sangat menguntungkan karena H<sub>2</sub>S merupakan senyawa toksik di perairan. Sifat-sifat BFA yang menguntungkan lainnya seperti mampu berkompetisi (*in vitro*) dengan bakteri *Vibrio harveyi* (Tjahjadi *et al*, 1994). Menurut Gunalan (1993) kemampuan aktivitas bakteri melakukan perombakan (biodegradasi) dikarenakan adanya plasmid bakteri.

Plasmid merupakan molekul DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) untai ganda berbentuk sirkuler dan terdapat diluar kromosom bakteri. Ukuran plasmid berkisar 1 - 300 kb (kilo basa). Umumnya plasmid mengandung gen penyandi protein yang akan memberikan sifat-sifat yang menguntungkan bagi bakteri inang, seperti resistensi terhadap antibiotik dan logam berat, produksi toksin, produksi antibiotik (Crepin, 1987 dalam Said, 1997). Menurut Ausubel, *et al* (1995) fungsi penting dari plasmid mencakup sifat resistensi terhadap antibiotik dan juga produksi enzim restriksi. Dalam dekade 1970 an beberapa plasmid dibentuk di laboratorium dengan fagmen DNA dari plasmid alamiah. Plasmid artifisial ini atau derivatnya sangat umum digunakan sebagai vektor dalam pengerjaan DNA rekombinan. Semua plasmid digunakan sebagai *cloning vectors* yang mencakup tiga kegunaan umum yaitu sebagai replicator, *selectable marker* dan *cloning site*.

Oleh karena itu perlu dilakukan analisis plasmid BFA. dengan tujuan mencari isolat bakteri fotosintetik anoksigenik yang memiliki plasmid.

## BAHAN DAN METODE

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui dan memetakan plasmid BFA. Penelitian ini dilakukan di laboratorium genetika - Puslitbang Limnologi-LIPI.

### *Persiapan biakan murni BFA*

Bakteri BFA yang akan diuji plasmidnya di kultur dengan menggunakan media SWC cair (100%) dalam tabung raksi bertutup ulir sebanyak 50 ml selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar, selama 2 hari atau sekitar 3 x 24 jam. Komposisi media Sea Water Complete (SWC cair), yaitu : Bakto pepton (5 g), Ekstrak yeast (1 g), Gliserol (3 g), Aquadest (250 ml), Air laut (750 ml) selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 1 atm selama 20 menit. Pada tahap awal ini isolasi dan analisis DNA plasmid dilakukan pada ada 7 Isolat BFA yang diberi kode SKB 5, SKB 17, MW 4, MW 5, KR At, KR TI dan YG (Tabel 1).

### *Isolasi DNA Plasmid BFA*

1. Suspensi kultur BFA masing -masing dimasukan tabung eppendorf sebanyak 1,5 ml, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang.
2. Kedalam endapan (pelet) yang diperoleh ditambahkan lagi sebanyak 1,5 ml suspensi kultur bakteri yang sama untuk memperbanyak jumlah pelet yang diperoleh.
3. Sentrifugasi diulangi dengan kecepatan dan waktu yang sama dan supernatan dibuang. Sampai diperkirakan telah cukup pelet yang diperoleh.
4. Masing-masing pelet diresuspensikan dengan 110 µl larutan A, kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang.
5. Selanjutnya ditambahkan lagi sebanyak 200 µl larutan B pada masing-masing tabung dan dihomegenkan sampai terjadi lisis (larutan menjadi bening dan kental), kemudian diinkubasi selama 10 menit diatas es.
6. Kedalam masing-masing tabung ditambahkan 150 µl larutan C, lalu dihomogenkan dengan vortex selama 5 detik. Kemudian diinkubasi

- selama 10 menit diatas es. Selanjutnya tabung di sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 3 menit, supernatan yang didapat dipindahkan kedalam tabung eppendorf baru yang steril.
7. Kedalam tabung yang baru ditambahkan campuran phenol : chloroform : isoamyl-alcohol (25 : 24 : 1) sebanyak 0,5 ml. Kemudian divortex sebentar sampai terbentuk suspensi, lalu disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit.
  8. Supernatan yang didapat dipindahkan kedalam tabung eppendorf baru yang steril dengan menggunakan mikropipet.
  9. Kedalam masing-masing tabung ditambahkan 1,0 ml larutan ethanol absolut dingin, setelah dicampurkan (dihomogenkan dengan menggunakan mikropipet) tabung dinkubasikan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama minimum 10 menit.
  10. Selanjutnya tabung disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit dan supernatannya dibuang.
  11. Pelet yang didapat dicuci dengan menambahkan 700  $\mu\text{l}$  etanol dingin (70%), hanya sesaat, kemudian etanol langsung dibuang.
  12. Pellet dikeringkan dengan menggunakan *vacum evaporator* selama 20 menit atau sampai pelet terlihat bening (transparan).
  13. Pelet disuspensikan dalam 40  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O (aquabidest) steril.

#### *Digesti DNA Plasmid BFA*

1. Sebanyak 14 buah tabung eppendorf bervolume 1,5 ml dan masing-masing diberi kode isolat BFA, masing-masing tabung berisi larutan seperti tertera pada tabel 1.
2. Campuran diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan menggunakan *shaking water bath* selama 2 jam.
3. Sementara digesti berlangsung, gel elektroforesis disiapkan dengan melarutkan 0,3 gram agarose dalam 30 ml larutan 1 x TAE (1% gel), lalu dididihkan sehingga larut, larutan agarose didinginkan sampai suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  lalu dituangkan kedalam cetakan gel elektroforesis.

Tabel 1. Komposisi campuran yang dimasukkan untuk digensti plasmid

No. tabung/ kode isolat	dH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	DN A ( $\mu$ l)	Buffer ( $\mu$ l)	Enzim ( $\mu$ l)	Total larutan ( $\mu$ l)
1 SKB 5	2	5	2	1	10
2 SKB 5	5	5	-	-	10
3 SKB 17	2	5	2	1	10
4 SKB 17	5	5	-	-	10
5 MW 4	2	5	2	1	10
6 MW 4	5	5	-	-	10
7 MW 5	2	5	2	1	10
8 MW 5	5	5	-	-	10
9 Marker	5	-	-	-	5,0
10 KR Tl	2	5	2	1	10
11 KR Tl	5	5	-	-	10
12 KRA t	2	5	2	1	10
13 KR At	5	5	-	-	10
14 YG	2	5	2	1	10
15 YG	5	5	-	-	10
16 pUC 19 (kontrol)	-	-	-	-	1,0

Catatan: Enzim: *Eco* RI

Buffer: Reac 3

Marker: 1kb Ladder

4. Setelah agarose membeku, wadah elektroforesis diisi dengan buffer 1 x TAE sampai seluruh permukaan gel tergenangi.
5. Kedalam masing-masing tabung eppendorf yang berisi campuran ditambahkan *blue juice* sebanyak 5 $\mu$ l.
6. Masing-masing campuran dimasukkan kedalam sumur-sumur gel dengan nomor sesuai dengan nomor tabung. Sumur yang ke 9 diisi dengan *DNA marker (1kb ladder)*, dan sumur ke 16 diisi puc 19 sebagai kontrol.

### *Running DNA plasmid*

Running dilakukan pada 110 mA, 50 V selama 2,5 jam. Setelah running selesai gel diangkat dan dimasukkan kedalam wadah (plastik) untuk dilakukan pewarnaan.

### *Pewarnaan (staining) DNA plasmid*

1. Gel setelah selesai elektroforesis (didalam wadah) direndam dengan larutan ethidium bromida (3 µg/ml) selama 10 - 15 menit, selama perendaman wadah digoyang-goyangkan. Setelah itu larutan ethidium bromida dikeluarkan.
2. Selanjutnya gel dibilas dengan menggunakan aquadest selama 5 - 10 menit (proses destaining). Selama proses pewarnaan harus *menggunakan sarung tangan*.

### *Pemotretan plasmid*

Pita-pita DNA diamati dengan menempatkan gel yang telah diwarnai diatas *UV-transiluminator*, maka akan diketahui ada atau tidaknya plasmid pada isolat bakteri. Selanjutnya gel difoto dengan kamera polaroid (gambar 1)

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Running yang dilakukan pada gel dengan 15 sumur (well) yaitu sampel DNA plasmid utuh dan yang didigest dengan enzim *Eco RI* memberikan hasil yang sulit dibaca karena ukurannya yang kecil. Berdasarkan pengamatan awal, isolat SKB 5 tidak menunjukkan adanya pita DNA plasmid sebab itu pada pengamatan berikutnya sampel SKB 5 tidak dianalisis lebih lanjut. Akhirnya running dilakukan ulang pada gel dengan 8 sumur yaitu khusus DNA plasmid utuh (tabel 2) dan yang didigest secara tersendiri. Pada gel dengan plasmid yang mengalami digest tidak menunjukkan adanya pita-pita DNA.

Berdasarkan hasil analisis plasmid BFA dari 7 isolat yang diuji diperoleh 6 isolat yang memiliki plasmid dengan ukuran berkisar antara 12,2-15,0 kb (Tabel 2). Isolat BFA: SKB 17, MW 5 dan YG memiliki DNA plasmid dengan panjang masing-masing 12,2 kb, sedangkan isolat MW4, KR At dan KR Tl memiliki DNA

plasmid engan panjang berturut-turut 13, 14, dan 15 kb. Perkiraan ukuran ini didasarkan pada marker yang digunakan (1 Kb ladder) dan ditempatkan pada sumur nomor 4, (gambar 1, tabel 2). Pita-pita tersebut digunakan sebagai pedoman untuk memperkirakan panjang fragmen DNA yang diperoleh dari sampel plasmid.

Tampak bahwa isolat-isolat BFA tersebut memiliki DNA plasmid dengan ukuran relatif panjang. Ini menunjukkan bahwa plasmid BFA memiliki untaian DNA yang relatif panjang, walaupun tidak semua potongan DNA yang dikandungnya memiliki fungsi untuk mengkopi enzim tertentu. Pita-pita yang diperoleh kemungkinan besar berbentuk OC (*open circular*). Pita berbentuk OC menduduki posisi yang lebih tinggi dari pada lainnya karena memiliki volume yang relatif lebih besar. Pada plasmid, selain bentuk OC sering pula diperoleh pita DNA berbentuk linier dan CCC (*covalently closed circular*). Bentuk linier biasanya berada pada posisi di bawah OC sedangkan bentuk CCC di bawah linier. Plasmid pUCD800 dari *Escherichia coli* memiliki panjang 14,5 kb, akan tetapi pada gel hasil *running* kadang-kadang diperoleh pita pada posisi 12 kb. Posisi 12 kb ini menunjukkan bentuk CCC dari plasmid tersebut (Said, 1997).

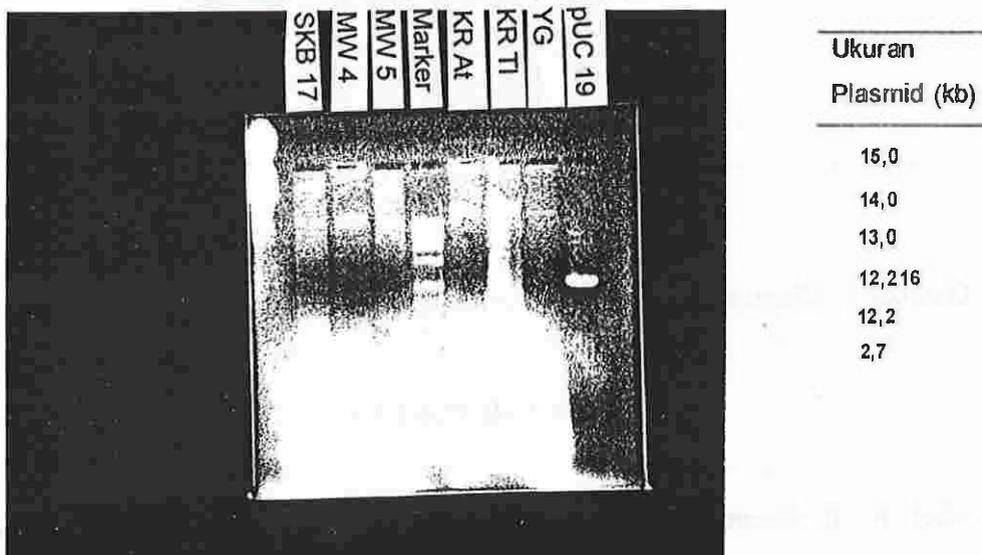
Tabel 2. Komposisi Campuran dan Perkiraan Panjang DNA Plasmid Utuh Beberapa Isolat BFA.

No. Sumur	Isolat BFA	DNA ( $\mu$ l)	dH20 ( $\mu$ l)	Total (( $\mu$ l)	Ukuran Plasmid (kb)
1	SKB 17	11	5	16	12,2
2	MW 4	11	5	16	13,0
3	MW 5	11	5	16	12,2
4	Marker	05	-	05	12,216 (max)
5	KR At	11	5	16	14,0
6	KR T1	11	5	16	15,0
7	YG	11	5	16	12,2
8	pUC19	01	5	06	2,7

Pada isolasi plasmid yang menghasilkan hanya satu pita seperti ini, kemungkinan karena proses purifikasi DNA plasmid yang kurang murni. Selain itu pula pada gambar 1 terlihat pita-pita yang diperoleh memiliki ketebalan yang berbeda, hal ini cenderung disebabkan oleh konsentrasi DNA yang dirunning berbeda.

Dengan diperolehnya beberapa isolat BFA yang memiliki plasmid, selanjutnya diharapkan dapat dilakukan transfer gen-gen tertentu sesuai kebutuhan kedalam isolat tersebut, misalnya gen untuk resistensi terhadap antibiotik atau logam berat, produksi antibiotik, dan lain-lain.

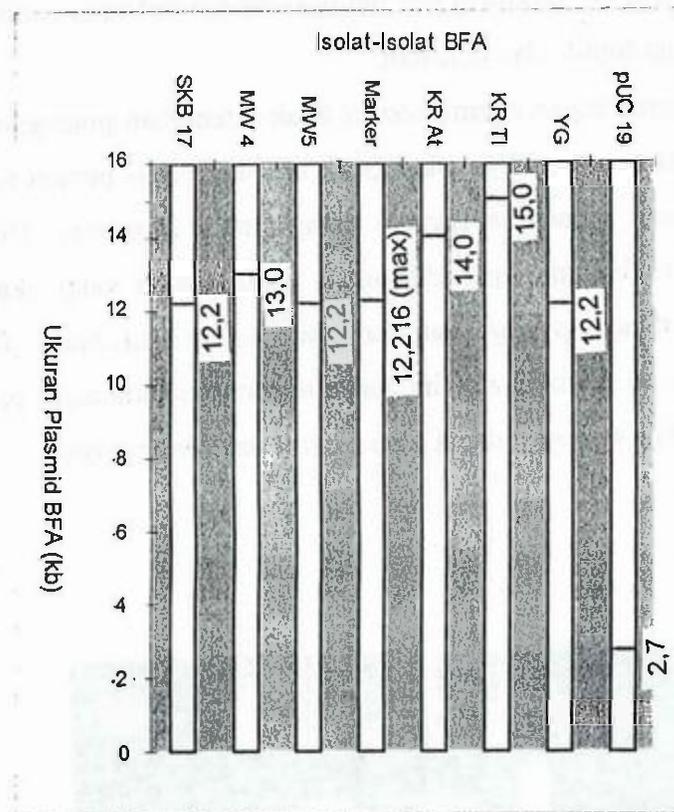
Pada digest dengan enzim *Eco RI* tidak ditemukan potongan DNA plasmid, diduga enzim *Eco RI* yang digunakan tidak memiliki situs pemotongan pada isolat-isolat tersebut atau proses pengerjaan yang kurang sempurna. Dengan demikian pemetaan plasmid belum dapat dilakukan. Pada waktu yang akan datang akan dilakukan digest dengan penggunaan enzim lain seperti *PstI*, *SmaI*, *XmaI* atau enzim lainnya, diharapkan enzim-enzim ini memiliki situs pemotongan pada isolat-isolat BFA yang dianalisis sehingga dapat dibuat pemetaan plasmidnya.



Gambar 1. Visualisasi DNA plasmid beberapa isolat BFA

## KESIMPULAN

Isolat-isolat BFA yang memiliki plasmid adalah SKB 17, MW4, MW5, KR At, KR TI dan YG. Perkiraan panjang plasmid dari keenam isolat tersebut berkisar antara 12,2 sampai 15,0 kb.



Gambar 2. Diagram profil DNA plasmid beberapa isolat BFA hasil interpretasi

## DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. 1995. *Escherechia coli*, Plasmids and Bacteriophage. *In* Short Protocols in Molucular Biology. 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 1-27.
- Atlas.R.M. and R. Bartha, 1987 *Microbial Ecology, Fundamentals and Apjications*. The Benyamin/Cumings Publ. Co. Menlo Park. California.

- Gunalan , D.E.A. 1993. Penerapan Bioremediasi untuk Melenyapkan Polutan Organik dari Lingkungan. Makalah Diskusi Panel. Kongres Nasional Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia, Surabaya 2-4 Desember 1993. Univ. Erlangga. 13 hal.
- Imhoff. J.F. 1988. Anoxygenic Phototrophic Bacteria . *in* Methods in Aquatic Bacteriology. Austin, B. (Ed). A. Wiley-interscience Publication. NewYork. p. 207-239.
- Pfennig, N.1977. Phototrophic Green dan Purple Bacteria: A Comparative Systematic Survey. *Annual Review of Microbiology*, p. 275-297.
- Said. D. S. 1997. Rekayasa Genetika. Laporan Kursus. Lab. Mikrobiologi dan Biokimia. Pusat Antar Universitas -IPB, Puslitbang Limnologi-LIPI, Bogor. 28 hal.
- Tjahjadi, R.M., S.L. Angka, and A. Suwanto. 1994. Isolation and Evaluation of Marine Bacteria for Biocontrol of Luminous Bacterial Disease in Tiger Shrimp Larvae (*Penaeus monodon* Fab.). *Aspac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 2: 347-352.
- Widiyanto, T. 1996. Bakteri Fotosintetik Anoksigenik Sebagai Biokondisioner di Tambak Udang : Pengurangan Produksi H<sub>2</sub>S dan Pengaruhnya pada Pertumbuhan *Vibrio harveyi*. Program Pasca Sarjan68 a. IPB. Bogor. hal.