

TRANSFORMASI PLASMID YANG MENGANDUNG GEN *merB* PADA *Escherichia coli* BL21(DE3)

Zefanya G. Bernadus¹⁾, Fatimawali¹⁾, Beivy Kolondam²⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

²⁾Jurusan Biologi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

DNA transformation is one of the methods for inserting DNA into bacterial cells. The current transformation method is widely used to transfer plasmids containing genetic material. This study aims to evaluate the results of plasmid transformation containing merB gene in Escherichia coli BL21(DE3) bacteria. The stages of the research carried out were preceded by the microbiological identification of the E. coli BL21(DE3) bacteria used as hosts. Then the plasmid transformation containing merB gene into the E. coli BL21(DE3) host cell using the heat shock method was carried out. The transformation results were evaluated by observing at the presence of E. coli BL21(DE3) colonies on agar Luria Bertani (LB) media containing ampicillin antibiotics. Plasmids in E. coli BL21(DE3) were isolated and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The results showed the success of the transformation indicated by the growth of E. coli BL21(DE3) bacteria in agar LB media containing ampicillin and the visualization on agarose gel resulted that the plasmid which carried the merB gene could be transformed in to the E. coli BL21(DE3) bacteria.

Keywords : *Plasmids, merB genes, heat shock, Escherichia coli BL21(DE3)*

ABSTRAK

Transformasi DNA merupakan salah satu metode untuk memasukkan DNA ke dalam sel bakteri. Metode transformasi saat ini dipakai secara luas untuk mentransfer plasmid yang mengandung bahan genetika. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi hasil transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* pada bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3). Tahapan penelitian didahului dengan identifikasi secara mikrobiologi bakteri *E. coli* BL21(DE3) yang digunakan sebagai inang. Selanjutnya dilakukan transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* kedalam sel inang *E. coli* BL21(DE3) menggunakan metode heat shock. Hasil transformasi dievaluasi dengan melihat adanya koloni *E. coli* BL21(DE3) pada media agar Luria Bertani (LB) yang mengandung antibiotik ampisilin. Plasmid pada *E. coli* BL21(DE3) diisolasi dan dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Hasil penelitian menunjukkan keberhasilan transformasi dengan adanya pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21(DE3) pada media LB yang mengandung ampisillin dan hasil visualisasi pada agarose gel terlihat bahwa plasmid yang membawa gen *merB* dapat ditransformasikan ke dalam bakteri *E. coli* BL21(DE3).

Kata Kunci : *Plasmid, gen merB, heat shock, Escherichia coli BL21(DE3)*

PENDAHULUAN

Pencemaran lingkungan akibat merkuri menjadi permasalahan serius di seluruh dunia (Wang *et al.*, 2012). Sumber pencemaran merkuri dapat berasal dari aktivitas manusia seperti pembakaran batubara, jenis-jenis produk minyak bumi, penggunaan fungisida, katalisator merkuri dan penambangan emas yang menggunakan merkuri sebagai bahan pengekstraksi emas (Fatimawali, 2011).

Penambangan emas rakyat saat ini masih menjadi salah satu kegiatan ekonomi masyarakat Sulawesi Utara. Aktivitas penambangan ini menghasilkan produk limbah yang banyak mengandung logam-logam berat sehingga berpotensi mencemari lingkungan dan juga membahayakan kesehatan karena adanya efek toksik. Produk limbah ini dihasilkan dari sisa pengolahan emas dan salah satunya adalah merkuri (Bapedalda Sulut, 2002). Mengingat berbagai dampak akibat pencemaran merkuri ini maka perlu dipikirkan cara untuk mengubah atau menurunkan kadar merkuri.

Berdasarkan beberapa penelitian dilaporkan adanya penguraian senyawa merkuri oleh bakteri yang menghasilkan perubahan bentuk merkuri di lingkungan. Umumnya bakteri ini ditemukan pada area kadar merkuri yang tinggi (Nelson *et al.*, 1972). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang berada di daerah tercemar merkuri dapat menjadi sumber isolasi bakteri resisten merkuri. Detoksifikasi oleh bakteri resisten merkuri dilakukan secara enzimatik. Hal ini dapat terjadi karena bakteri resisten merkuri memiliki operon merkuri resisten (*mer*). Saat ini diketahui ada beberapa jenis bakteri resisten merkuri diantaranya gen *merB* yang mengkode organomercuri liase yang mengkatalisis pemutusan ikatan merkuri-karbon sehingga menghasilkan senyawa organik dan ion Hg^{2+} , kemudian gen *merA*

mengkode merkuri reduktase menjadi H^0 yang sifatnya kurang toksik (Das dan Dash, 2015; Rojas *et al.*, 2011). Penggunaan gen ini dalam detoksifikasi perlu diproses lagi sehingga detoksifikasi dapat dilakukan oleh protein, namun sebelum itu diperlukan tahap transformasi sebelum dilakukan overproduksi untuk menghasilkan protein tersebut.

Kloning dilakukan dalam upaya seleksi dan pemurnian suatu gen dalam jumlah besar dan yang bebas dari kontaminasi oleh urutan DNA lain. Salah satu tahapan yang harus dilakukan dalam kloning gen adalah transformasi. Langkah awal pada kloning gen yakni fragmen DNA yang mengandung gen yang akan kloning diinsersi ke dalam vector. Vektor ini dapat menjadi media pengantar kepada *host cell* (Brown, 2010). Metode transformasi yang paling sering digunakan adalah metode *heat shock* yang umumnya dilakukan pada suhu $42^{\circ}C$ selama 2 menit. Prinsip metode ini yaitu kejutan suhu tinggi selama beberapa detik pada sel bakteri sehingga plasmid dapat masuk ke dalam sel (Sambrook dan Russel, 2001). Hasil transformasi ini dapat dipengaruhi oleh waktu dan suhu *heat shock*. Oleh karena itu pada beberapa penelitian sebelumnya dilakukan transformasi dengan variasi waktu dan suhu untuk melihat efektivitas transformasi plasmid ke dalam sel inang.

Adapun penelitian serupa dengan penelitian ini yang telah dilakukan sebelumnya oleh Fatimawali (2017), di mana detoksifikasi merkuri secara enzimatik dengan merkuri reduktase *merA* (merkuri reduktase). Merkuri reduktase digunakan untuk detoksifikasi merkuri anorganik, sedangkan gen *merB* (organomercuri liase) digunakan untuk detoksifikasi merkuri organik yakni dengan pemutusan ikatan merkuri-karbon. Untuk itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat apakah plasmid yang

mengandung gen *merB* dapat di transformasi pada bakteri *E. coli* BL21(DE3).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu cawan petri, lampu bunsen, tip, *sentrifuge tube*, tabung *microsentrifuge* (Eppendorf), *Incubator Shaker*, labu Erlenmeyer, timbangan analitik, jarum ose, inkubator (*Incucell*), *laminar air flow* (Biotek), autoklaf (ALP), *hot plate*, mikropipet (*Ecopipette*), kertas label, plastik wrap, aluminium foil, kapas, kasa, elektroforesis (*Biometra T-Personal*), UV transluminator dan alat fotografi.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu Aquabidest/ ddH₂O, Alkohol, NaCl, Tripton, Yeast, Agar *bacteriological*, Ethidium Bromide (EtBr), TSS (*Polyethylene Glicol* (PEG), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), Luria Bertani (LB) dan MgCl₂, Antibiotik ampicilin, Agarose, TAE, kit isolasi DNA bakteri (Geneaid), *loading dye*, dan spiritus.

Transformasi plasmid yang mengandung gen *merB*

Prosedur transformasi dilakukan sesuai dengan Fatimawali *et al.*, (2017) dengan modifikasi. Plasmid yang mengandung gen *merB* di transformasikan pada *E. coli* BL21(DE3) yaitu 5 µL larutan plasmid dipipet kedalam *E. coli* BL21(DE3) 200 µL. Langkah ini dilakukan pada 3 falcon yang berbeda untuk variasi suhu pada *heat shock*. Langkah selanjutnya diinkubasi pada suhu 0^o C (es) selama 30 menit, kemudian di *heat shock* dengan inkubasi pada *thermo block* dengan variasi suhu (1) 40^o C, (2) 42^o C, (3) 44^o C

masing-masing dilakukan selama 30 detik. Setelah itu diinkubasi lagi pada es selama 10 menit, ditambahkan 800 µL media LB cair. Selanjutnya disentrifuge 3.670 rpm selama 10 menit dan sebanyak 800 µL supernatan dibuang sehingga tersisa 200 µL. Dipipet masing-masing sebanyak 200 µL dan di *spread* pada media LB agar yang mengandung ampicilin (100 µL/ml) kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37^o C. Disamping itu dibuat juga kontrol untuk membandingkan pertumbuhannya, dipipet sebanyak 200 µL hasil kultur *E. coli* BL21(DE3) dan di *spread* pada media LB agar yang mengandung ampicilin (100 µL/ml) kemudian diinkubasi seperti hasil transformasi yaitu selama 18 jam pada suhu 37^o C. Transformasi dikatakan berhasil bila adanya pertumbuhan pada media yang mengandung ampisillin dan bila terlihat pita DNA dengan ukuran 639 bp yaitu sesuai dengan ukuran gen *merB* yang telah diinsersikan pada plasmid.

Isolasi plasmid

Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid).

Elektroforesis hasil transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* dan Visualisasi UV

Prosedur elektroforesis dilakukan sesuai dengan Langden *et al.*, (2017) dengan modifikasi. Agarose 1% disiapkan yaitu sebanyak 0,4 g dan dicampur dengan TAE 1% sebanyak 40 ml kemudian dipanaskan di *hot plate* hingga mendidih. Sisir dipasang pada cetakan gel, kemudian dituang agar dan ditunggu hingga dingin dan memadat. Sampel ditambahkan 1 µL loading dye kemudian dimasukkan ke sumuran gel. Ladder (marker) juga di masukkan ke sumuran gel di sisi sampel. Elektroforesis dilakukan selama 50 menit. Hasil elektroforesis direndam selama

10 menit di dalam EtBr yang harus dilakukan dengan hati-hati dan sebaiknya di lakukan diruang asam. Setelah itu hasil elektroforesis divisualisasi dengan UV transluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Sel Kompeten

Sebelum di transformasi, sel bakteri *E. coli* BL21(DE3) dibuat menjadi sel kompeten terlebih dahulu. Tahap pembuatan sel menjadi kompeten merupakan langkah penting dalam proses transformasi (Silitonga, 2016). Untuk itu bakteri di subkultur selama 90 menit pada

incubator shaker kemudian di cek nilai *optical density* pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}). OD_{600} sering digunakan untuk mengukur pertumbuhan sel di mana pada nilai ini sel bakteri tidak akan mati meski terkena cahaya sinar UV yang terlalu banyak. Sel kompeten yang paling baik memiliki nilai OD_{600} (0,3-0,4) yaitu pada awal fase eksponensial (Chung, 1989) atau disebut juga periode *steady state* (Sezonov, 2007). Nilai OD_{600} pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai absorbansi sel kompeten (1) 40^o C, (2) 42^o C, (3) 44^o C

Nilai OD_{600}	Nilai OD_{600}	Nilai OD_{600}
(1)	(2)	(3)
0,38	0,32	0,42

Selanjutnya sel bakteri disentrifugasi kemudian peletnya ditambahkan TSS. TSS terdiri dari *Polyethylene Glicol* (PEG), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), Luria Bertani (LB) dan $MgCl_2$. Penambahan TSS dilakukan agar sel menjadi kompeten. Selain itu penambahan unsur garam dapat membuat lebih efisien dalam transformasi (Liu *et al.*, 2014). Dengan adanya kation bivalen Mg^{2+} , fusi membran akan meningkat sehingga akan mempercepat interaksi DNA dengan permukaan *E. coli* (Sato *et al.*, 2005).

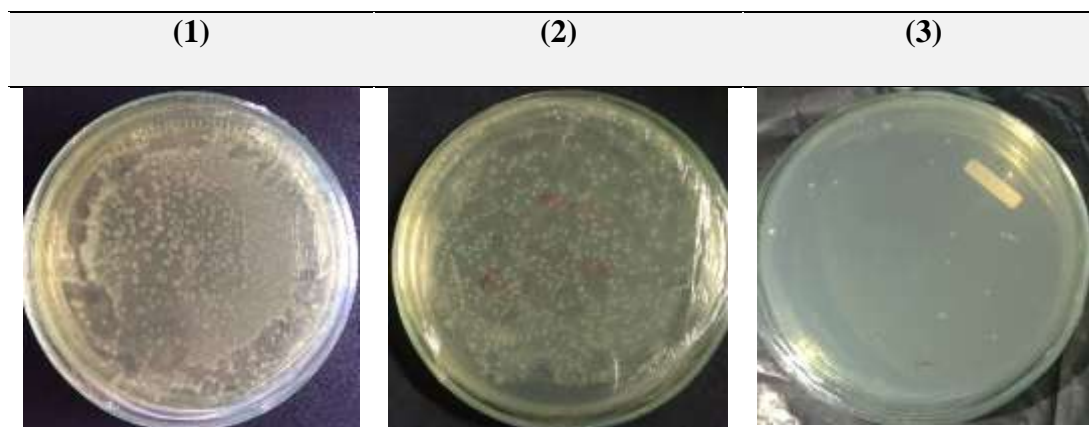
Transformasi

Pada penelitian ini transformasi menggunakan metode *heat shock* dilakukan pada beberapa suhu untuk melihat suhu yang paling optimal untuk transformasi. Suhu *heat shock* mempengaruhi efisiensi transformasi (Inoue, 1990). Tahapan *heat shock* merupakan salah satu hal yang mempengaruhi

keberhasilan transformasi. Dengan metode ini dapat membuat DNA mampu melewati dinding sel inang (Li *et al.*, 2010). Hasil transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* pada *E. coli* BL21(DE3) dengan 3 variasi suhu *heat shock* (1) 40^o C, (2) 42^o C, (3) 44^o C ditumbuhkan masing-masing pada media LB (Luria Bertani) agar yang diberikan antibiotik kemudian diinkubasi. Hal ini dilakukan untuk melihat keberhasilan hasil transformasi yaitu dengan seleksi antibiotik (Jang dan Magnuson, 2013). Begitupun kontrol yang digunakan pada penelitian ini yakni *E. coli* BL21(DE3) yang belum ditransformasi (sel inang) ditumbuhkan juga pada media yang mengandung antibiotik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa transformasi plasmid berhasil dilakukan karena *E. coli* BL21(DE3) rekombinan tumbuh pada media yang diberikan ampisillin (Gambar 4) sedangkan *E. coli* BL21(DE3)

tidak tumbuh (Gambar 5). Hal ini dapat terjadi karena bakteri *E. coli* BL21(DE3) rekombinan telah mengandung plasmid yang membawa sifat resisten terhadap antibiotik dan jenis plasmid yang digunakan pada penelitian ini resisten terhadap antibiotik jenis ampicilin sehingga bakteri *E. coli* BL21(DE3) rekombinan hanya akan tumbuh pada media

yang diberikan ampicillin (100 µL/ml) (Casali dan Preston, 2003). Media yang digunakan pada penelitian ini adalah LB yang terdiri dari *Trypton*, *Yeast extract*, NaCl dan air. Media ini sangat sering digunakan karena memungkinkan pertumbuhan yang cepat dan hasil pertumbuhannya baik untuk banyak spesies (Sesonov *et al*, 2007).



Gambar 4. *E. coli* BL21(DE3) rekombinan setelah diinkubasi;
Keterangan : transformasi dengan suhu *heat shock* (1)40⁰ C, (2) 42⁰ C, (3) 44⁰ C



Gambar 5. *E. coli* BL21(DE3) setelah diinkubasi (Kontrol)

Metode *heat shock* adalah metode transformasi yang paling sering digunakan. Prinsip metode ini yakni *heat shock* (kejutan panas) selama beberapa waktu sehingga plasmid dapat masuk kedalam sel inang (Sambrook dan Russel, 2001). *Heat shock* mengubah struktur membran bakteri sehingga membantu DNA masuk ke dalam sel dengan cepat.

Pada penelitian sebelumnya transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada *E. coli* BL21(DE3) berhasil dilakukan pada suhu *heat shock* 44⁰ C selama 30 detik (Tanio, 2017). Selain itu adapun penelitian lain yang menyatakan transformasi yang efisien pada suhu 42⁰ C selama 30 detik (Singh, 2010). Oleh karena itu dapat dilihat bahwa belum ada suhu pada saat *heat shock* yang optimum untuk transformasi.

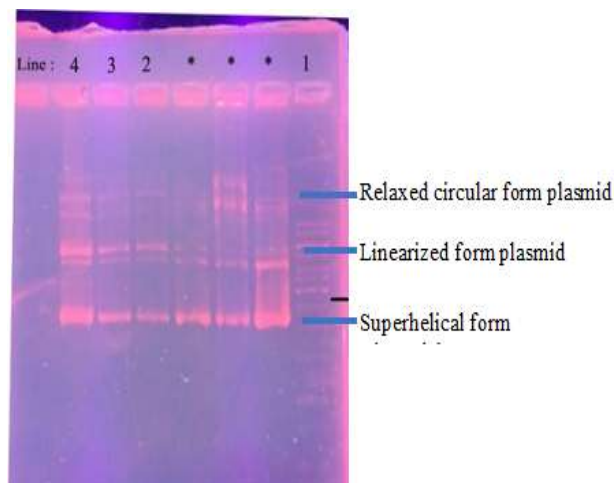
Pada penelitian ini dapat dilihat bahwa perlakuan transformasi dengan metode *heat shock* berhasil dilakukan pada 3 variasi suhu *heat shock* (1) 40⁰ C, (2) 42⁰ C, (3) 44⁰ C. Meskipun demikian, efisiensi transformasi tidak hanya dipengaruhi pada suhu *heat shock*, melainkan ada juga faktor-faktor lain seperti ukuran plasmid, bentuk plasmid yang digunakan, dan juga jenis larutan garam pada saat pembuatan sel kompeten yang akan menjadi sel inang (Liu *et al.*, 2014).

Isolasi Plasmid

Pada penelitian ini dilakukan isolasi plasmid menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). Pada prinsipnya isolasi plasmid ini dilakukan untuk memisahkan DNA dari protein dan RNA dan memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom.

Elektroforesis hasil transformasi plasmid dan Visualisasi UV

Hasil isolasi plasmid dilanjutkan dengan uji konfirmasi yaitu dengan elektroforesis gel agarose 1% kemudian di visualisasi UV. Visualisasi gel agarosa dilakukan menggunakan *UV-transilluminator*. Visualisasi UV hasil transformasi dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil elektroforesis ini terlihat dengan munculnya pita (*band*) DNA yang berada pada ukuran antara 600 bp dan 700 bp. Ukuran gen *merB* adalah 639 bp (Fatimawali, komunikasi pribadi). Hal ini membuktikan bahwa transformasi plasmid berhasil dilakukan pada bakteri *E. coli* BL21(DE3).



Gambar 6. Electrophoregram hasil

transformasi plasmid: Line 1 : marker; Line 2 : *E.coli* BL21 (DE3) rekombinan (1) 40⁰ C; Line 3 : *E.coli* BL21 (DE3) rekombinan (2) 42⁰ C; Line 4 : *E.coli* BL21 (DE3) rekombinan 44⁰ C ; Line * : *E.coli* TOP10

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa gen *merB* dapat ditransformasikan kedalam sel inang *Escherichia coli* BL21(DE3), sehingga dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya pada proses detoksifikasi merkuri organik menggunakan enzim *merB*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bapedalda Sulut, 2002. Penelitian Tentang Limbah Merkuri di Propinsi Sulawesi Utara Selang 2002 sampai 2001. Sub.Bidang Pengendalian Pencemar Air, Bapedalda, Manado
- Brown, T. A. 2010. *Gene cloning and DNA analysis*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Casali, N. dan Preston, A. 2003. *E. coli plasmid vectors: methods and applications*. Humana Press, New Jersey.
- Chung, C., Suzanne, L., Niemela., dan Miller, R. 1989. One-step preparation of

- competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution (recombinant DNA). *Biochemistry* (86): 2172-2175.
- Das, S. dan Dash, H. R. 2015. *Microbial biotechnology –a laboratory manual for bacterial systems*. Springer, New Delhi.
- Fatimawali., Kepel, B., dan Tallei, T. 2017. Overproduction of mercuric reductase protein expressed by synthetic *merA* gene and reduction of inorganic mercury HgCl₂. *Bioscience Research*. (4)14: 1253-1260.
- Fatimawali, F., Badaruddin, F., Yusuf, I. 2011. Isolasi dan identifikasi bakteri resisten merkuri dari muara Sungai Sario yang dapat digunakan untuk detoksifikasi limbah merkuri. *Jurnal Ilmiah Sains*. (2)11, 282-288.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96. (1) : 23- 28.
- Jang, C dan Magnuson, T. 2013. A Novel Selection Marker for Efficient DNA Cloning and Recombineering in *E. coli*. *PLoS ONE*. (2)8 :1-7.
- Liu, X., Liu, L., Wang, Y., Wang, X, Ma, Y., dan Li, Y. 2014. The study on the factors affecting transformation efficiency of *Escherichia coli* competent cells. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* (3)27 : 679-684.
- Langden, S., Budiharjo, A., Wijanarka., dan Kusharyoto, W. 2017. Transformasi Dan Kloning Plasmid Pj804:77539 Pada *E. coli* Top'10. *Jurnal Biologi*. (1)6: 65-70
- Nelson., J., Blair, W., Brinckman, F., Collwel, R., Iverson, W. 1973. Biodegradation of Phenylmercuric Acetate by Mercury-Resistant Bacteria. *Applied Microbiology*. (26)3 : 321-326
- Rojas, L.A., Yanez, C., Gonzalez, M., Lobos, S., Smalla, K. dan Seeger, M. 2011. Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strains MSR33 generated for mercury bioremediation. *PLoS ONE*, 6: 1-1
- Sambrook, J dan Russel, I., 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Volume 2*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sezonov, G., Joseleau, D dan D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. (189)23: 8746–8749
- Sato, Y., Kumazawa, N., Yoshikawa, K., dan Kurusu, Y. 2005. Transformation of *Escherichia coli* Mediated by Natural Phospholipids.
- Silitonga, Y. 2016. Resistensi *Cronobacter Sakazakii* Terhadap Ampisilin dan Hubungannya dengan Stabilitas dan Ekspresi Gfpuv [tesis]. Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Tanio, E. 2017. Efisiensi transformasi plasmid pTa7002-*AtRKD4* pada *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan metode kejutan panas [skripsi]. Universitas Atmajaya, Yogyakarta.
- Wang, J., Feng, X., Anderson, C., Xing, Y., Shang, L. 2012. Remediation of mercury contaminated sites - A review. *Journal of Hazardous Materials*. (221-222): 1-18