

TRANSFORMASI PLASMID YANG MENGANDUNG GEN *merB* PADA BAKTERI *Escherichia coli* TOP-10

Sarah H. C. Rotinsulu¹⁾, Fatimawali¹⁾, Trina E. Tallei²⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

²⁾Jurusan Biologi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

DNA transformation is the process of inserting recombinant DNA into host cells via vector plasmid. The host cell that is often used is TOP-10 Escherichia coli. The transformation method is widely used to transfer plasmids containing genetic material. This study aimed to evaluate the results of plasmid transformation containing the merB gene in the Escherichia coli TOP-10 bacteria. This study initiated with identification of the microbiology of host cells to be used, namely Escherichia coli TOP-10. Escherichia coli TOP-10 host cells were made into competent cells by transforming plasmids containing merB gene into Escherichia coli TOP-10 host cells using the heat shock method. The transformation results were evaluated by observing at the growth of Escherichia coli TOP-10 colonies on agar LB media containing ampicillin antibiotics. Plasmids on Escherichia coli TOP-10 were isolated and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The results showed that the transformation of plasmids containing merB in Escherichia coli TOP-10 bacteria was successfully carried out as indicated by the growth of Escherichia coli TOP-10 bacteria on LB media agar 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 TOP-10 bacteria cell.

Keywords: Transformation, Plasmids, *merB* genes, heat shocks, *E. coli* TOP-10

ABSTRAK

Transformasi DNA merupakan proses memasukkan DNA kedalam sel bakteri. Metode transformasi dipakai secara luas untuk mantransfer plasmid yang mengandung bahan genetika. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi hasil transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* pada bakteri *Escherichia coli* TOP-10. Penelitian ini didahului dengan identifikasi secara mikrobiologi bakteri *Escherichia coli* TOP-10. Bakteri *Escherichia coli* TOP-10 dibuat menjadi sel kompeten yang digunakan sebagai inang. Selanjutnya dilakukan transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* kedalam sel inang *E. coli* TOP-10 menggunakan metode *heatshock*. Hasil transformasi dievaluasi dengan melihat adanya koloni *E. coli* TOP-10 pada media LB agar yang mengandung antibiotik ampisilin. Plasmid pada *E. coli* TOP-10 diisolasi dan dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* pada bakteri *Escherichia coli* TOP-10 berhasil dilakukan, ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri *E. coli* TOP-10 pada media LB agar yang mengandung ampisilin dan hasil visualisasi pada agarose gel terlihat bahwa plasmid yang membawa gen *merB* dapat ditransformasikan ke dalam sel bakteri *E. coli* TOP-10.

Kata kunci : Transformasi, Plasmid, gen *merB*, *heatshock*, *E. coli* TOP-10

PENDAHULUAN

Seiring dengan perkembangan zaman dan tuntutan pemenuhan kebutuhan hidup, manusia terkadang melupakan pentingnya kelestarian fungsi lingkungan. Kegiatan masyarakat dalam pemenuhan kebutuhan hidup ini banyak yang mengabaikan arti penting lingkungan dalam menunjang kehidupan mereka. Kegiatan masyarakat yang sangat merugikan lingkungan yang sedang marak berkembang adalah pertambangan emas (Kepel *et al.*, 2012).

Pertambangan emas ini dilakukan secara ilegal karena tidak memiliki ijin dari pejabat yang berwenang. Kegiatan penambangan emas tanpa ijin (PETI) ini sangat merugikan baik bagi masyarakat maupun pemerintah setempat dan dampak lingkungan yang diakibatkannya sangat mengkhawatirkan kelangsungan hidup generasi yang akan datang. Dampak lingkungan akibat aktivitas PETI ini antara lain yaitu kegiatan PETI dilakukan dengan membongkar lahan puluhan hektar sehingga mengubah keseimbangan ekosistem yang berpengaruh secara signifikan terhadap terjadinya kerusakan jenis, spesies serta habitat flora dan fauna (Nofiani, 2004).

Lingkungan yang terkontaminasi dengan merkuri dapat membahayakan kehidupan manusia, karena adanya merkuri yang terintegrasi dengan rantai makanan. Merkuri dapat terakumulasi di dalam mikroorganisme. Habitat yang mengandung kontaminasi merkuri dalam konsentrasi tinggi dalam jangka waktu yang lama akan berdampak pada populasi dan aktivitas bakteri, sehingga diasumsikan bahwa bakteri dapat hidup pada lingkungan yang terkontaminasi dengan mekanisme pertahanan spesifik yang dimilikinya (Morel *et al.*, 1998)

Strain bakteri yang resisten merkuri memiliki satu set gen yang disebut *mer* operon, yang biasanya terdapat pada plasmid

(Nascimento, 2003). Mekanisme bioremediasi merkuri oleh gen-gen ini salah satunya melibatkan gen *merB* yang mengkode pembentukan protein enzim MerB (organomerkuri liase) yang mengkatalisa pemutusan dengan ikatan C-Hg pada merkuri organik (Benison *et al.*, 2004) sehingga menghasilkan karbon yang tereduksi dan ion merkuri (Miller, 1999). Penggunaan gen ini dalam detoksifikasi perlu dianalisis lebih lanjut agar detoksifikasi dapat dilakukan oleh protein. Untuk mendapatkan protein MerB yang murni maka perlu dilakukan proses rekayasa genetika melalui prosedur pengklonan gen *merB* ke dalam plasmid. Plasmid hasil rekayasa kemudian diintroduksi ke dalam sel bakteri melalui proses transformasi.

Transformasi merupakan metode transfer genetik yang paling banyak terjadi pada bakteri dan dapat terjadi secara alami atau buatan yang dilakukan dengan sengaja. Metode transformasi yang sering digunakan yaitu *heatshock* (kejutan panas) yang pada umumnya dilakukan pada suhu 42^oC selama 2 menit (Brown, 2006), sehingga plasmid dapat masuk ke dalam sel. Waktu dan suhu *heatshock* dapat mempengaruhi hasil transformasi. Transformasi plasmid dapat dilakukan pada sel inang Bakteri *Escherichia coli*. Bakteri hasil transformasi mampu bereplikasi sangat cepat dan dapat tumbuh pada medium sederhana ataupun medium khusus, sehingga mudah dikulturkan (Casali dan Preston, 2003). Strain *E. coli* yang digunakan sebagai inang dalam proses transformasi dapat beragam, salah satunya yaitu *Escherichia coli* TOP-10, yang memiliki efisiensi transformasi yang cukup tinggi (Liu *et al.*, 2014). Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian tentang transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* pada bakteri *Escherichia coli* TOP-10.

METODE

Alat

Alat yang akan digunakan yaitu tabung mikrosentrifus, collection tube, PDH kolom, mikrosentrifugasi, alat elektroforesis, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), mikropipet, pipet tip, cawan Petri, lampu Bunsen, jarum Ose, tabung reaksi, gelas ukur, Erlenmeyer, gelas beker, *shaker* inkubator, inkubator, spektrofotometri, timbangan, sudip.

Bahan

Bahan yang akan digunakan yaitu bakteri *E. coli* Top-10, plasmid yang telah disisipkan gen *merB*, media Luria Berthani Broth cair dan padat, ampicillin, air ddH₂O, PD1 Buffer, PD2 Buffer, PD3 Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer, TAE 1x, bubuk Agarose, NaCl, Tripton, Yeast, Akuades, antibiotik ampicilin, Kristal violet, safranin, reagen kovak's, lugol, minyak emersi, media Nutrient Broth agar, media *Triple Sugar Ion Agar* (TSIA), media *Simmons's Citrate Agar*, media Lysin Iron Agar.

Prosedur Kerja

Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15-20 menit. Jarum Ose disterilkan dengan cara dipijarkan dengan pembakaran langsung di atas api bunsen.

Pembuatan Media Luria Berthani (LB) Cair

Media Luria Bertani cair dibuat dengan menimbang *sodium chloride* (NaCl) sebanyak 1,25 gram, Tripton 2,5 gram, dan Yeast Extract 1,25 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 250 mL. Suspensi media dihomogenkan dengan cara diaduk dan

dituangkan ke dalam dua Erlenmeyer dengan ukuran masing-masing 125 mL. Media yang sudah homogen ini disterilkan pada autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15-20 menit, tambahkan ampicillin pada satu Erlenmeyer sebanyak 12,5 µL. Medium kemudian dituangkan sebanyak 20 mL ke dalam masing-masing tabung falcon dan diberi label.

Pembuatan Media Luria Berthani (LB) Padat

Media Luria Bertani dibuat dengan menimbang *sodium chloride* (NaCl) sebanyak 1,25 gram, agar 3,75 gram, tripton 2,5 gram, dan *yeast extract* 1,25 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 250 mL. Suspensi dihomogenkan dengan cara diaduk. Media yang sudah homogen ini disterilkan pada autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15-20 menit, dan dituangkan ke dalam dua Erlenmeyer masing-masing sebanyak 125 mL, di mana ke dalam salah satu Erlenmeyer ditambahkan ampicilin sebanyak 12,5 µL. Media kemudian dituangkan pada masing-masing cawan Petri sebanyak 20 mL, didinginkan pada suhu ruangan dan diberikan label.

Pembuatan Sel Kompeten

Sebanyak 20 µL bakteri *E. coli* Top-10 dari stok gliserol diinokulasikan ke dalam 2 mL medium LBB. Kultur diinkubasi pada *shaker* dengan suhu 37⁰C semalam. Selanjutnya kultur diambil sebanyak 5% (v/v) dan diinokulasikan ke dalam 50 mL LBB. Kultur diinkubasi selama 3 jam (180 menit) pada suhu 37⁰C pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Kultur yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi. Supernatan dibuang dan hasil sentrifugasi berupa pelet ditambahkan 2 mL TSS. Langkah selanjutnya yaitu membagi pelet sebanyak 200 µL ke dalam tabung

falcon 15 mL (Langden, 2017).

Transformasi Plasmid yang mengandung gen *merB* ke dalam Sel Kompeten *E. coli* TOP-10

Sebanyak 5 µL larutan plasmid yang mengandung *merB* yang telah dilarutkan dalam akuades steril dipipet kedalam larutan pelet 200 µL sel *E. coli*. Larutan lalu diinkubasi pada suhu 0°C (es) selama 30 menit, dan dilanjutkan dengan diinkubasi pada *thermo block* pada suhu 42°C selama 90 detik. Setelah itu larutan diinkubasi pada es selama 30 menit, lalu ditambahkan media LB cair sebanyak 800 µL, dan diinkubasi pada

µL SDS 100% + 400 µL sukrosa 50% + akubides 548 µL), divortex 30 detik, diinkubasi 5 menit dalam es dan disentrifugasi 13.000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang diperoleh dielektroforesis pada gel agarose 1% selama 45 menit. Gel hasil elektroforesis, direndam dalam larutan *buffer* yang mengandung *ethidium bromide* selama 5 menit, selanjutnya direndam dalam akuades selama 20 menit dan divisualisasi dengan illuminator UV. (Fatimawali, 2016).

Isolasi Plasmid

Isolasi DNA plasmid (*mini preparation*) dilakukan dengan menggunakan Presto™

Tabel 1. Hasil nilai absorban sel kompeten

Nilai Absorban (OD ₆₀₀)		
Sampel 1 40°C	Sampel 2 42°C	Sampel 3 44°C
0.38	0.37	0.41

inkubator shaker selama 60 menit dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya kepadatan sel bakteri diukur pada OD₆₀₀ untuk mendapatkan nilai 0,4. Suspensi bakteri disentrifuge pada 3.670 rpm selama 10 menit, supernatant dibuang sebanyak 800 µL sehingga tersisa 200 µL, diaduk sehingga pelet sel tercampur dengan supernatant. Dari masing-masing tabung dipipet sebanyak 50 µL dan ditebar di atas media LB padat yang mengandung ampisillin, diratakan dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 – 20 jam. Koloni yang tumbuh, diambil dengan jarum Öse dan digores pada media padat yang mengandung kamanisin, diinkubasi pada suhu 37°C selama 17 jam. Terhadap koloni bakteri yang tumbuh, dilakukan lisis cepat dengan mengambil 1 Öse sel *E. coli*, ditambahkan EDTA 10 mM pH8, ditambah 50 µL larutan segar yang terdiri atas (2µL NaOH 5N + 50

Mini Plasmid Kit (Geneaid).

Elektroforesis Gel Agarosa dan Visualisasi UV

DNA plasmid hasil amplifikasi dengan PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel Agarose 1%. Sebanyak 0,4 g agarose dilarutkan dalam 40 mL TAE 1x untuk mendapatkan gel agarose 1%. Campuran dipanaskan di dalam oven selama 2 menit untuk melarutkan agarose. Larutan agarose didiamkan sebentar sampai suhu kira-kira mencapai suhu ruangan, lalu ditambahkan 3 µL larutan etidium bromida (EtBr) lalu dituangkan kedalam cetakan di dalam kotak elektroforesis yang sudah berisi buffer TAE 1x. Sampel DNA dan DNA marka/penanda dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis. Elektroforesis dilakukan pada voltase 80 V selama 60 menit. DNA divisualisasi di bawah

sinar UV.

Hasil dan Pembahasan

Pembuatan Sel Kompeten

Pada penelitian ini sel kompeten yang digunakan yaitu bakteri *E. coli* TOP-10 yang akan berfungsi sebagai organisme yang akan memperbanyak plasmid. Menurut Radji (2011) larutan CaCl_2 merupakan larutan garam yang paling baik untuk membuat sel kompeten dalam proses transformasi. Penambahan CaCl_2 menyebabkan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri sehingga mampu dilewati plasmid. Bakteri yang telah mendapat perlakuan ini disebut dengan sel kompeten.

Pertumbuhan bakteri dapat diamati dengan cara mengukur *optical density* (OD) atau kekeruhan media pertumbuhan yang telah ditambahkan dengan bakteri pada panjang gelombang tertentu. Indikasi adanya pertumbuhan yaitu kekeruhan yang semakin meningkat akibat semakin meningkatnya

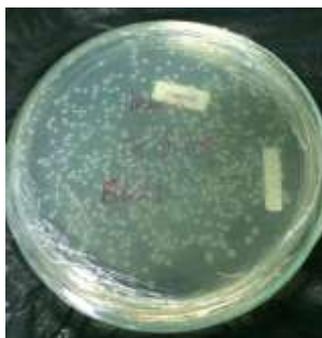
jumlah sel bakteri. Pertumbuhan bakteri mengacu pada penambahan sel-sel bakteri bukan pada perkembangan individu organisme bakteri. Setiap jam pertumbuhan bakteri tersebut diamati dengan cara mengukur OD pada panjang gelombang 600 nm.

Nilai OD_{600} yang paling baik untuk transformasi plasmid ke dalam *E. coli* adalah 0,3-0,4 (Sezonov *et al.*, 2007). Nilai OD_{600} 0,3-0,4 dapat dicapai dalam waktu inkubasi 3 jam (Sekse *et al.*, 2012). Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 1 Sel kompeten yang digunakan dalam transformasi juga berperan penting dalam mempengaruhi efisiensi transformasi.

Transformasi Plasmid yang mengandung gen *merB* ke dalam Sel Kompeten *E. coli* TOP-10

Plasmid pengkode *merB* dicampur dengan sel kompeten kemudian diinkubasi dalam es. Tujuannya agar plasmid menempel

Sel inang + plasmid tumbuh pada media LB + Ampisilin



(1) 40 °C



(2) 42 °C



(3) 44 °C

Sel inang kosong tidak tumbuh pada media LB + Ampisilin



Gambar 1. Hasil transformasi sel inang dan plasmid setelah diinkubasi, suhu mengindikasikan suhu *heat shock* yang berbeda.

pada membran sel bakteri. Selanjutnya, sel *E. coli* TOP-10 yang kompeten diberi perlakuan *heat shock* untuk membuka pori pada dinding sel bakteri. Pada tahap ini diharapkan pori-pori membran bakteri terbuka dan plasmid masuk ke dalam sel bakteri. Proses ini dilakukan dengan memindahkan secara cepat sel yang tadinya dikubasi dalam es selamat 30 menit ke dalam suhu hangat, masing-masing pada 40 °C, 42°C, 44 °C selama 30 detik, jika terlalu lama akan terjadi kerusakan membran sel sehingga bakteri akan mati. Proses ini harus dilakukan secara cepat dan tepat waktu sehingga sel benar-benar dalam kondisi terkejut (Brown, 2006).

Uji resistensi antibiotik merupakan salah satu cara yang digunakan untuk mengetahui berhasil tidaknya sebuah plasmid diinsersikan ke dalam sel inang (Casali, 2003). Ketika plasmid yang mengandung gen *merB* berada di dalam *E. coli* TOP-10, maka bakteri tersebut akan mengalami transformasi yaitu perubahan resistensi terhadap antibiotik ampisilin. Hal ini dikarenakan pada plasmid terdapat gen yang resisten terhadap antibiotik ampisilin. Bakteri *E. coli* TOP-10 yang awalnya tidak mampu bertahan hidup (tidak

resisten) pada media yang mengandung antibiotik ampisilin, setelah memperoleh plasmid yang mengandung gen resisten ampisilin menjadi mampu bertahan hidup (resisten) pada media yang mengandung antibiotik ampisilin.

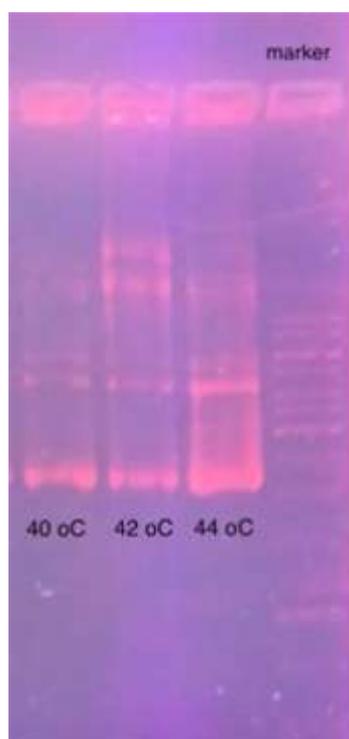
Sel inang yang ditanam pada media padat yang mengandung ampisilin tidak tumbuh dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil transformasi menunjukkan pertumbuhan koloni *E. coli* TOP-10 pada media padat yang mengandung ampisilin.

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 Gel Agarosa dan Visualisasi UV

Hasil isolasi DNA plasmid dielektroforesis pada gel agarose sehingga menghasilkan pita-pita DNA yang berbeda ukurannya. Hasil visualisasi plasmid yang mengandung sisipan gen *merB* disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Elektroforegram Hasil Transformasi Plasmid. Rekombinan (1) 40^oC *E. coli* TOP-10; Rekombinan (2) 42^oC *E. coli* TOP-10; Rekombinan (3) *E. coli* TOP-10

Saat elektroforesis terlihat pemisahan molekul DNA berdasarkan ukurannya seperti pita-pita. Berdasarkan hasil penelitian pemisahan DNA plasmid dengan elektroforesis terlihat masih adanya kontaminan. Hal itu disebabkan karena hasil isolasi plasmid yang dilakukan belum murni. Kemungkinan kontaminan disebabkan oleh adanya DNA kromosomal yang mengalami fragmentasi. Pita yang terletak pada bagian akhir merupakan fragmen DNA yang memiliki elektromobilitas lebih cepat. Hal ini menandakan ukuran fragmen DNA plasmid tersebut lebih kecil. Pita yang berada di dekat sumur gel, yang menandakan bahwa ukuran fragmen lebih besar (DNA 2002). Berdasarkan hasil visualisasi pada agarose gel, maka dapat disimpulkan bahwa plasmid yang membawa gen *merB* dapat ditransformasikan ke dalam sel bakteri *E. coli* TOP-10.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa transformasi plasmid yang mengandung gen *merB* ke dalam *E. coli* TOP-10 berhasil dilakukan yang diindikasikan dengan adanya *E. coli* TOP-10 yang mampu tumbuh pada medium LB yang mengandung antibiotik ampicilin serta adanya pita plasmid pada gel agarosa yang dapat divisualisasi dengan UV.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Johnson, and A., Lewis, J., 2002, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Gartand Science, New York.
- Benison, G. C., Lello P., Shokes, I. E., Cosper, N. J., Scott, R. A., Legault, P., Omichinski, J. G. 2004. A stable mercury containing complex of the organomercurial lyase MerB: catalysis, product release, and direct transfer to MerA. *Biochemistry*. 43(26): 8333-45.
- Brown, T.A. 2006. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Fifth edition. Wiley Blackwell.
- Casali, N. dan Preston, A. 2003. *E. coli plasmid vectors: methods and applications*. Humana Press, New Jersey.
- Kepel, B. J., Fatimawali, Yusuf, I., Natsir, R., dan Badaruddin, F. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Gen *merB* pada Bakteri *Pseudomonas* sp., Sebagai Gen Resistensi Merkuri Organik. *J. Kedokteran Yarsi*, 20(2) : 69-80.
- 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.
- Miller, S. M. 1999. Bacterial detoxification of Hg(II) and organomercurials. *Essay Biochemistry*. 34: 17-30.
- Morel , F. M., Krapiel, A. M. L., and Amyot, M. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 543-66
- Nascimento A. M. A., and Souza, C. E., 2003. Operon Mer: Bacterial resistance to Mercury and Potential for Bioremediation Of Contaminated Enviroments, *Genet*, 2: 92-101.
- Nofiani, R., dan Gusrizal. 2004. Bakteri Resisten Merkuri Spektrum Sempit dari daerah Bekas Penambangan Emas Tanpa Izin (PETI) Mandor, Kalimantan Barat. *Jurnal Natur Indonesia.*, 6(2): 67-74.
- Sekse, C., Bohlin, J., Skjerve, E., Vegarud, G. E. 2012. Growth comparison of several *Escherichia coli* exposed to various concentration of lactoferrin using linear spline regression. *Microbial informatics*

and experimentation 2(5) : 1-12.

Sezonov, G., Joseleau-Pelit, D dan D'Ari, R.
2007. *Escherichia coli* Physiology in
Luria-Bertani Broth. *Journal of
Bacteriology*. (189)23: 8746-8749.