

ISOLASI DAN ANALISIS KUALITAS DNA PLASMID (pGEM®-3Zf(+)) SEBAGAI SEDIAAN KEBUTUHAN PRAKTIKUM DI LABORATORIUM BIOLOGI FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

Arifah Khusnuryani¹, Jumailatus Solihah², Anif Yuni Muallifah³

¹Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

^{2,3}Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

Jl. Marsda Adisucipto Yogyakarta 55281 Telp. +62-274-519739

Email: anikarifah@yahoo.com¹, jumailatus.solihah@uin-suka.ac.id², anif.s3ok@gmail.com³

Abstract

*Implementation of practical work in biology laboratory needs supporting media including laboratory equipments and materials. In genetics and molecular biology, the routine materials are mostly molecular resources, which are produced by certain company. To get the materials, we must order and pay for a relative high price. These molecular resources in biology laboratory is not only beneficial for practical activity, but also useful for research activity in related fields. This research works as an application of methods applied in laboratory to result in a product that is valuable in practical works, i.e. the pGEM plasmids. The methods that were employed involved the transformation of *E. coli* with pGEM plasmid, blue-white screening by using X-gal, and plasmid isolation by alkaline lysis method. The transformation results showed a relative low efficiency at $1,2 \times 10^3$ cfu/ μ g DNA. The electrophoresis in 0.8% agarose gel demonstrated that the plasmid DNA was successfully isolated with some thin bands at position 3000-4000bp, despite of a large chromosomal DNA and some smear RNA were still observed. The DNA obtained is pure enough, characterized by the ratio of A260/280 at the range of 1,8-2,0.*

Keywords: laboratory materials, plasmid DNA isolation, *E. coli*, blue-white screening, pGEM

PENDAHULUAN

Kegiatan pembelajaran dalam kelas maupun praktikum pada dasarnya bertujuan untuk lebih mengenal kebesaran Allah SWT. Dalam mengkaji ayat-ayat kauniah, baik di dalam kelas maupun di laboratorium, diperlukan sarana penunjang yang bermanfaat dalam pelaksanaan metode pembelajaran yang digunakan. Dalam pelaksanaan praktikum di bidang Biologi misalnya, sarana penunjang dapat berupa peralatan di laboratorium dan bahan praktikum. Bahan-bahan yang digunakan dalam praktikum di bidang biologi mencakup bahan-bahan kimia dan bahan segar (berupa atau bersumber dari makhluk hidup). Bahan segar yang digunakan sangat beraneka ragam bentuk dan sifatnya, mulai dari bahan-bahan molekuler hingga organisme hidup (berupa tumbuhan dan hewan).

Dalam bidang genetika dan biologi molekuler khususnya, bahan praktikum yang digunakan sebagian besar berupa bahan-bahan yang bersifat molekuler, yang saat ini umumnya diproduksi oleh produsen tertentu dan untuk mendapatkannya dapat dilakukan dengan cara memesan dan membeli dengan harga yang relatif tinggi. Di antara bahan-bahan tersebut adalah berbagai macam enzim, hormon, dan DNA plasmid. Ketersediaan bahan-bahan ini seringkali terkendala dalam hal pengadaan yang harus *indent*, di samping harga yang relatif mahal.

Penyediaan bahan-bahan molekuler di laboratorium Biologi tidak hanya bermanfaat untuk kegiatan praktikum, melainkan juga bermanfaat dalam penelitian bidang terkait. Salah satu bahan molekuler yang cukup dibutuhkan dalam kegiatan praktikum dan penelitian di bidang biologi molekuler adalah DNA plasmid. DNA plasmid di sini umumnya digunakan dalam percobaan kloning DNA.

Pada dasarnya, DNA Plasmid dapat diperoleh dari sel-sel bakteri yang mengandung plasmid. Tidak semua sel bakteri mengandung plasmid, dan tidak semua jenis plasmid dapat

digunakan dalam percobaan yang menggunakan metode tertentu. Sel-sel bakteri yang hanya mengandung plasmid spesifik dapat diperoleh melalui proses transformasi genetik. Dalam penelitian ini, DNA plasmid yang dipreparasi adalah plasmid pGEM[®]-3Zf(+). Perbanyak plasmid dilakukan dengan metode transformasi pada sel *E. coli* DH5 α (Sambrook & Russel, 2001), sedangkan plasmid dapat direcovery dari sel transforman melalui metode isolasi plasmid.

Metode isolasi plasmid sangat berpengaruh terhadap kualitas hasil isolasi DNA. Dengan demikian perlu adanya metode yang tepat sehingga perlu adanya penelitian untuk mengetahui metode isolasi serta analisis kualitas DNA hasil isolasi plasmid tersebut. Dengan harapan akan mendapatkan hasil yang maksimal dan dapat dijadikan sebagai bahan untuk kegiatan praktikum dan penelitian bidang terkait.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

A. Bahan yang Digunakan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi TSS 1X, 85% LB medium, 10% PEG, 5% DMSO, 50 mM MMgCl₂, DNA plasmid, sel kompeten *E.coli* DH5 α , medium agar LB, ampicilin (10 μ g/ml), es batu, 0,1 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7,8), 1 mM dan 10 mM EDTA, 50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8), lisosim, 5 M Kalium asetat, 10 N NaOH, SDS 20%, 3M Na asetat, etanol absolut, etanol 70%, buffer TE, X-Gal (20 mg/ml), 100 mM IPTG, dan 7,5 M Amonium Asetat.

B. Alat yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan antara lain: timbangan analitik, autoklaf (untuk sterilisasi alat dan bahan), mikropipet p10, p100, dan p1000, mikrosentrifuge, vortex, apparatus elektroforesis, spektrofotometer UV Vis, pH meter, alat-alat gelas (drigalski, erlenmeyer, pipet volumetrik, pipet tetes, gelas beker), tabung falcon 15ml dan 50ml, tabung eppendorf 1,5ml, blue tip, yellow tip, white tip.

C. Cara Kerja

1. Transformasi *E.coli* DH5 α dengan metode *heat shock*

Kultur sel kompeten *E. coli* DH5 α sebanyak 100 μ l (dipreparasi menggunakan metode Chung, 2001) ditambah 2 μ l (10 ng) plasmid dan ditempatkan dalam tabung 1,5 ml. Tabung dijentik pelan-pelan dengan ujung jari untuk mencampur suspensi kemudian segera diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Sampel diberi perlakuan *heat shock* dalam *waterbath* suhu 42⁰ C selama 45 detik, selanjutnya diinkubasi di dalam es selama 5 menit. Setelah itu, 500 μ l TSS 1X ditambahkan dan suspensi diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit sambil dishaker (225 rpm). Setelah inkubasi, sebanyak 100 μ l suspensi sel dimasukkan ke dalam medium agar LB + X-Gal + IPTG secara aseptis dengan menggunakan mikropipet P 100. Suspensi disebar di seluruh permukaan media agar secara merata dengan menggunakan drigalski. Kemudian medium (kondisi tertutup) dikeringkan selama 10 menit dan diinkubasi semalam pada suhu 37⁰C.

2. Seleksi Transforman

Pengamatan hasil transformasi dilakukan secara makroskopis terhadap koloni bakteri *E.coli* DH5 α yang terbentuk pada media LB agar *plate* yang telah ditambah dengan X-Gal dan IPTG. Penambahan X-Gal dan IPTG pada media bertujuan untuk memudahkan seleksi transforman melalui *blue/ white colony screening*. Munculnya *blue colony* menjadi indikator keberhasilan transformasi plasmid ke dalam sel bakteri *E. coli* DH5 α . Koloni bakteri *E. coli* DH5 α yang berwarna biru menunjukkan bahwa

plasmid berhasil masuk ke dalam sel, Sedangkan koloni warna putih menunjukkan bahwa koloni tidak mengandung plasmid.

Untuk mengetahui efisiensi transformasi maka dilakukan penghitungan *colony forming units* (cfu) plasmid rekombinan yang terbentuk pada medium LB agar plate. Berikut rumus perhitungan efisiensi transformasi:

$$\text{Transformation Efficiency (cfu}/\mu\text{g)} = \frac{\text{Cfu on control plate} \times 10^3 \text{ ng}}{\text{ng of competent cell control DNA plated } \mu\text{g}} \text{ (Anonim, 2014)}$$

3. Isolasi DNA Plasmid

Kultur sel bakteri yang mengandung DNA plasmid (ditumbuhkan dari koloni biru) berusia 16 jam dituang ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml. Kemudian sel dipanen dengan sentrifuga pada 12.000 rpm selama 1 menit. Pelet yang diperoleh ditambahkan 0,5ml STE (0,1 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl (pH 7,8); dan 1 mM EDTA) yang telah didinginkan dengan es lalu divorteks sampai homogen. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, endapan bakteri disuspensi kembali dalam 200 μL larutan I (50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8), 10 mM EDTA, 5 mg/ml lisosim ditambahkan sesaat sebelum digunakan). Campuran divorteks hingga homogen lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya larutan II (0,2 NaOH, SDS 1%, ddH₂O) ditambahkan sebanyak 400 μL kemudian tabung *diseal* dengan parafilm lalu isi tabung dicampur dengan cara membolak balik tabung dengan hati-hati dan dibiarkan dalam es selama 5 sampai 10 menit. Kemudian campuran ditambahkan 7,5 M amonium asetat sebanyak 300 μL , lalu divorteks selama 10 detik dan disimpan dalam es selama 10 menit. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit lalu supernatan dipindah ke tabung yang baru dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 0,6 volume supernatan, lalu tabung dibolak-balik sampai homogen. Setelah itu, campuran diinkubasi dalam suhu ruang selama 5 menit lalu disentrifugasi 13.000 rpm selama 5 menit. Kemudian supernatan dibuang lalu ditambahkan ethanol 70% dingin sebanyak 1mL dan disentrifugasi 13000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya, supernatan dibuang lalu pelet yang diperoleh dikeringanginkan. Hasil pelet yang diperoleh ditambahkan larutan TE sebanyak 25 μL lalu simpan dalam suhu -20°C .

4. Analisis Kualitatif dengan Elektroforesis Agarosa

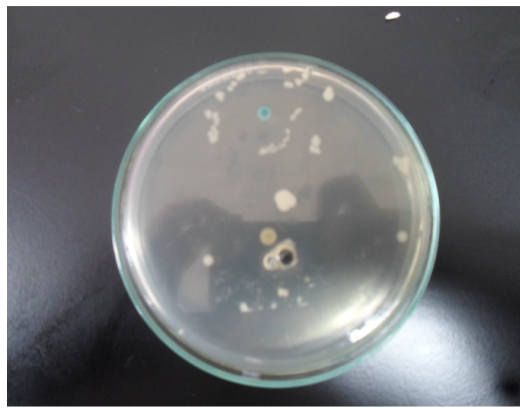
Plasmid hasil isolasi dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% (b/v) yang mengandung ethidium bromide 0,5ug/ml dan dengan fase gerak buffer TAE. Hasil elektroforesis didokumentasikan menggunakan *gel doc*.

5. Kuantifikasi Genom Total

Konsentrasi larutan DNA Plasmid diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 260nm. Kemurnian DNA dihitung berdasarkan rasio absorbansi pada 260/280nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Transformasi *E.coli* DH5a dengan metode *heat shock* dan *Transformation Efficiency*



Gambar 1. Hasil transformasi *E. coli* DH5 α , menunjukkan adanya koloni biru

Colony Forming Units (cfu)

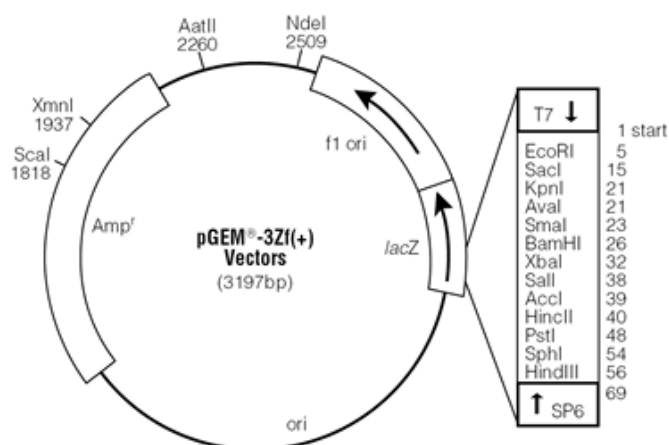
Jumlah koloni hasil transformasi (*blue colony*) yang muncul sebanyak 2 cfu. Dalam tahapan transformasi jumlah plasmid yang ditambahkan sebanyak 1 μ l (5 ng) ke dalam 50 μ l sel kompeten yang kemudian ditambahkan medium TSS 1x sebanyak 250 μ l. Volume yang digunakan untuk *plating* sebanyak 100 μ l. Dengan demikian, konsentrasi akhir plasmid setelah *plating* adalah 1,67 ng/100 μ l, dan nilai efisiensi transformasi adalah:

$$\frac{2 \text{ cfu}}{1,67 \text{ ng}} \times \frac{1 \times 10^3 \text{ ng}}{\mu\text{g}} = 1,2 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$$

Hasil efisiensi transformasi menunjukkan nilai yang relatif rendah. Untuk hasil optimum nilai efisiensi transformasi berkisar antara 10^8 - 10^{10} cfu/ μ g (Ahmad *et al.*, 2014). Keberhasilan transformasi (ditandai dengan nilai efisiensi transformasi yang relatif tinggi) sangat dipengaruhi oleh beberapa hal, di antaranya adalah kualitas sel kompeten (dalam hal ini adalah *E. coli* DH5 α) yang digunakan, konsentrasi plasmid yang ditambahkan, serta metode transformasi yang digunakan. Karena nilai efisiensi transformasi yang diperoleh relatif rendah, untuk mendapat jumlah koloni yang maksimum untuk isolasi plasmid, maka koloni bakteri *E. coli* DH5 α yang tersisipi DNA plasmid hasil transformasi dikultur kembali dalam media LB. Setelah itu dilakukan *plating* kembali sehingga didapatkan jumlah koloni bakteri yang tersisipi DNA plasmid dalam jumlah banyak. Dari koloni sel yang terbentuk tersebut selanjutnya dilakukan isolasi DNA plasmid.

2. Hasil Isolasi Plasmid

Plasmid yang digunakan dalam penelitian adalah plasmid pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -3Zf(+). Adapun peta konstruksi plasmid pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -3Zf(+) adalah sebagai berikut:



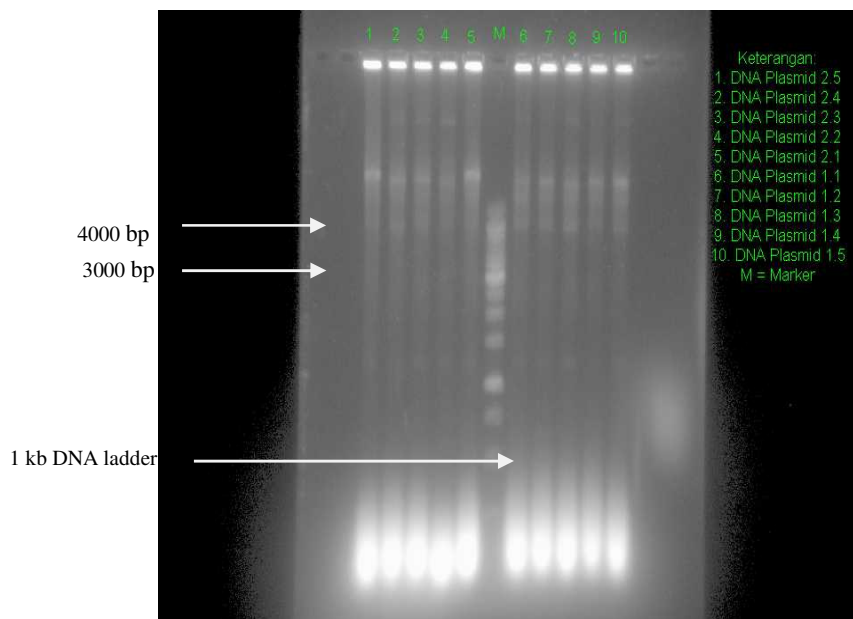
Gambar 2. Peta plasmid Vektor pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -3Zf(+) dan urutan titik restriksi

Sumber: www.promega.com

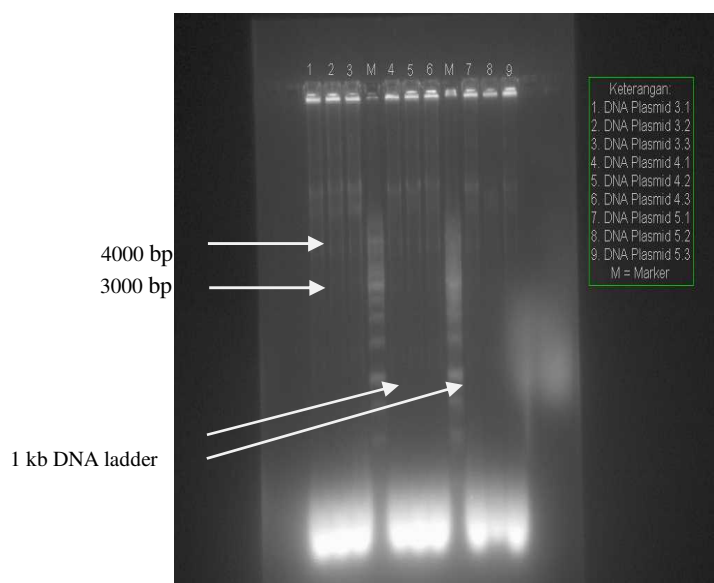
Sebagai indikator keberhasilan transformasi adalah munculnya koloni bakteri yang berwarna biru. Munculnya warna biru menandakan adanya ekspresi gen *LacZ* yang terdapat pada plasmid pGEM®-3Zf(+) dan genom bakteri. Hal ini dapat terjadi karena adanya metabolisme substrat buatan 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) yang telah ditambahkan pada media kultur (Lu,n.d).

Metode yang digunakan dalam isolasi DNA adalah metode lisis alkali, Metode ini cukup sederhana dan DNA yang dihasilkan memiliki kemurnian yang relatif cukup bagus (Birnboim dan Doly, 1979)

Analisis secara kualitatif hasil isolasi plasmid dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8% dengan menggunakan buffer TAE 1 X sebagai fase gerak. Dalam penelitian ini isolasi plasmid dilakukan pada 5 koloni bakteri *E.coli dh5a*. Masing-masing koloni ditumbuhkan dalam media kultur yang selanjutnya dilakukan isolasi DNA plasmid. Berikut adalah hasil visualisasi elektroforesis hasil isolasi DNA plasmid pada gel agarose 0,8%.



Gambar 3. Hasil elektroforesis isolasi DNA plasmid pada kultur koloni 1 (sampel no 6 – 10) dan koloni 2 (sampel no 1-5).



Gambar 4. Visualisasi hasil isolasi DNA plasmid pada kultur koloni 3 (sampel no 1-3), 4 (sampel no 4-6), dan 5 (sampel no 7-9).

Secara umum, visualisasi hasil isolasi DNA plasmid menunjukkan kualitas yang relatif rendah, dikarenakan *band* atau pita DNA yang terbentuk kurang jelas atau tipis. Beberapa *band* atau pita yang memiliki ukuran yang besar di atas 10.000 bp juga dapat teramati pada gambar, menunjukkan masih adanya kontaminan berupa DNA genom. Plasmid yang diperoleh kemungkinan dalam bentuk *supercoil* atau *nicked* (Anonim, 2013). Apabila hasil isolasi DNANYa murni maka akan muncul satu atau dua *band*. Dilihat dari ukuran panjang *band*, DNA yang terlihat mendekati ukuran plasmid yang digunakan yaitu 3197 bp. Sedangkan ukuran plasmid hasil isolasi yang terlihat di antara ukuran 3000 bp sampai dengan 4000 bp. Hasil yang berupa pita tipis dapat dipengaruhi banyak faktor. Di antaranya adalah konsentrasi DNA yang digunakan untuk elektroforesis, kualitas pewarna DNA, serta buffer yang digunakan sebagai geraknya elektroforesis.

Untuk mengetahui kuantitas DNA plasmid hasil isolasi, maka dilakukan pula pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer. Berikut adalah tabel hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA plasmid.

Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi DNA plasmid (berdasarkan absorbansi pada 260nm) dan kemurnian DNA plasmid (berdasarkan rasio absorbansi 260/280nm)

No.	Nama Sampel	Ulangan	Absorbance (AU)		A260/A280	Konsentrasi (µg/ml)
			Wavelength 260 nm	Wavelength 280 nm		
1	DNA Plasmid Koloni 1	1	0.585	0.296	1.9758	2925.8618
		2	0.345	0.178	1.9436	1727.2510
		3	0.541	0.280	1.9299	2703.2947
		4	0.515	0.265	1.9408	2573.8562
		5	0.529	0.252	2.0987	2644.3037
	Rata-Rata		0.503	0.254	1.9778	2514.9135
2	DNA Plasmid Koloni 2	1	0.604	0.294	2.0575	3020.4646
		2	0.490	0.239	2.0469	2450.2747
		3	0.608	0.295	2.0605	3038.2224
		4	0.576	0.295	1.9512	2882.4065
		5	0.665	0.325	2.0483	3326.3809
	Rata-Rata		0.589	0.290	2.0329	2943.5498
3	DNA Plasmid Koloni 3	1	1.221	0.617	1.9781	6104.4565
		2	1.115	0.532	2.0956	5574.3965
		3	1.202	0.622	1.9321	6010.5298
	Rata-Rata		1.179	0.590	2.0019	5896.4609
4	DNA Plasmid Koloni 4	1	0.939	0.501	1.8727	4695.6089
		2	1.157	0.579	1.9982	5784.5073
		3	1.032	0.491	2.1004	5158.0571
	Rata-Rata		1.043	0.524	1.990	5212.724
5	DNA Plasmid Koloni 5	1	1.048	0.524	1.9984	5237.7017
		2	0.497	0.278	1.7860	2486.9758
		3	1.098	0.535	2.0523	5489.5264
	Rata-Rata		0.881	0.446	1.9456	4404.7346

Secara kuantitas, rata-rata hasil isolasi DNA plasmid menunjukkan tingkat kemurnian yang tinggi yaitu antara 1,9 – 2, dan rata-rata konsentrasi DNA antara 2514,9135 (µg/ml) sampai dengan 5896,4609(µg/ml).

KESIMPULAN

Penelitian ini merupakan aplikasi metode yang dipergunakan di laboratorium untuk menghasilkan produk yang dapat dipergunakan dalam praktikum, yaitu berupa plasmid pGEM. Metode yang digunakan terdiri atas metode transformasi bakteri *E. coli* dengan plasmid pGEM, *blue-white screening* dengan menggunakan X-gal, dan isolasi plasmid dengan metode lisis alkali. Hasil transformasi menunjukkan efisiensi $1,2 \times 10^3$ cfu/ μ g DNA. Hasil elektroforesis pada gel agarose 0,8% menunjukkan bahwa DNA plasmid berhasil diisolasi dengan munculnya *band* tipis pada posisi 3000-4000bp, meskipun masih terdapat pula DNA kromosomal dan *smear* RNA. DNA yang diperoleh cukup murni ditandai dengan nilai rasio A260/280 berkisar antara 1,8-2,0.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LP2M) UIN Sunan Kalijaga yang telah memberikan hibah untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., Rubbab, T., Deeba, F., Naqvi, S. (2014). Optimization of *E. coli* culture for efficient DNA uptake by electroporation. *Turkish Journal of Biology*. Tubitak 38: 568-573.
- Anonim. 2013. Plasmid Isolation (Alkaline Lysis). Bioscience A Gene Technology, Inc. USA
- Anonim. 2014. *E. coli* Competent Cells. *Technical Bulletin*. Promega Corporation. USA. www.promega.com
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Chung, C.T. 1989. One-step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2172-2175.
- Lu, S. n.d. *E. coli* Plasmid Vector Methods and Applications. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 235. Humana Press. Totowa, NJ.
- Sambrook, J., Russel, D. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

