

TRANFORMASI FRAGMENT DNA KROMOSOM *Xanthomonas campestris* KE DALAM *Escherichia coli*

Wibowo Mangunwardoyo

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, 16424

E-mail: w_mangunwardoyo@hotmail.com

Abstrak

Penelitian transformasi fragmen DNA *Xanthomonas campestris* ke dalam *Escherichia coli* DH5 α , digunakan vektor plasmid *Escherichia coli* (pUC19). DNA kromosom diisolasi dengan metoda CTAB. DNA plasmid diisolasi dengan metoda alkali lisis. Kedua sumber DNA dipotong menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Sel kompeten disiapkan dengan CaCl₂, transformasi menggunakan metoda kejutan panas. Hasil transformasi didapatkan sebanyak 5 koloni putih (yang mengandung fragmen DNA), dengan frekuensi transformasi sebesar 1,22 x 10⁻⁸ koloni putih/sel kompeten. Elektroforesis agarosa menunjukkan variasi ukuran DNA fragmen sebesar 0,5 – 7,5 kb. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan dengan pembuatan pustaka genom untuk mendapatkan hasil transformasi yang lebih banyak.

Abstract

Research on DNA transformation of *Xanthomonas campestris* into *Escherichia coli* DH5 α using plasmid vector *Escherichia coli* (pUC19) was carried out. DNA chromosome was isolated using CTAB method, alkali lysis method was used to isolate DNA plasmid. Both of DNA plasmid and chromosome were digested using restriction enzyme *EcoRI*. Competent cell was prepared with CaCl₂ and heat shock method for transformation procedure. The result revealed transformation obtain 5 white colonies, with transformation frequency was 1,22 x 10⁻⁸ colony/competent cell. Electrophoresis analysis showed the DNA fragment (insert) in range 0.5 – 7.5 kb. Further research should be carried out to prepare the genomic library to obtain better result of transformant.

Keywords: Transformation, restriction enzyme, plasmid and chromosome

Pendahuluan

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya dengan judul Pemotongan Partial Kromosom *Xanthomonas campestris* dibiayai DIK-Mak 5250 tahun anggaran 1998/1999, dengan kontrak No: 15/DIK/LP/UI/V/1998. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA kromosom setelah dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI*, memberikan hasil yang diskret. Diharapkan fragmen tersebut mengandung gene protease selanjutnya akan ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli*

Enzim protease berfungsi sebagai biokatalisator reaksi, mempunyai peranan yang penting dalam industri, obat-obatan dan makanan. Penggunaan yang sangat luas ini karena sifatnya yang sangat spesifik, mampu aktif dalam konsentrasi rendah, selektif, aktif pada pH dan suhu yang

sempit. Kebutuhan akan enzim yang selalu meningkat di Indonesia, memacu untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial dari bumi pertiwi. *Xanthomonas campestris* merupakan bakteri gram negatif umumnya bersifat patogen pada tanaman kedelai. Bakteri ini juga mampu menghasilkan enzim protease yang tinggi. Pendekatan molekular, merupakan salah satu usaha yang tepat untuk peningkatan produksi enzim protease.

Ketergantungan Indonesia akan enzim protease terlihat adanya import yang setiap tahun selalu bertambah. Kekayaan biodiversitas di Indonesia yang selama ini hanya dimanfaatkan oleh peneliti asing, menjanjikan mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim protease dalam jumlah yang besar karena mikroorganisme merupakan pabrik dari segala enzim. Penelitian pendahuluan menunjukkan *Xanthomonas campestris*

mampu menghasilkan enzim protease. Secara molekular dapat dipindahkan gen protease dari bakteri tersebut ke dalam *Escherichia coli*, jika didapatkan inang yang cocok, maka enzim protease akan dihasilkan dalam jumlah banyak.

Enzim protease digunakan dalam bidang industri detergen, kopi, makanan, beer, kulit, sutera, susu, roti, kecap, obat-obatan, produksi asam amino dan pengolahan limbah [1]. Selain itu juga digunakan untuk hidrolisis protein, mencegah kekeruhan dalam industri minuman, memberi tekstur, peningkatan mutu gizi, deodorisasi, menghilangkan rasa pahit pada peptida, dalam bidang bioteknologi digunakan dalam isolasi DNA [2-3]. Penghasil protease bervariasi baik pada tumbuhan, hewan dan mikroorganisme termasuk bakteri, khamir dan kapang. Bakteri penghasil protease berasal dari genus: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Erwinia*, *Serratia* dan *Xanthomonas* [4].

Xanthomonas campestris, merupakan bakteri gram negatif penyebab penyakit bisul pada tanaman kedelai. Bakteri ini selain bersifat patogen ternyata juga merupakan penghasil protease yang baik. Penelitian molekular banyak melibatkan bakteri gram negatif terutama penggunaan *Escherichia coli* sebagai wahana dalam mempelajari sifat-sifat biologi dan kelakuan dari mikroorganisme, terutama dalam kloning. Kloning bakteri penghasil protease belum banyak dilakukan, terutama pada *Xanthomonas campestris*. Penelitian tentang bakteri ini banyak ditekankan pada mekanisme patogenisitas dengan pendekatan molekular. Kloning dengan beberapa metoda telah dilakukan oleh [5,6,7]. *Xanthomonas campestris* pv *campestris* dibuat pustaka genom dengan menggunakan cosmid pLAFR-3 dengan metode konyugasi, gen protease ditransformasi dan dapat terekspresi dalam *E. coli*. Metoda mutagenesis dengan transposon Tn5, dilanjutkan dengan subkloning didapatkan gene protease pada 10 kb fragmen *EcoRI*. Hasil pemotongan fragmen menunjukkan fragment *PstI* sebesar 4,5 kb yang merupakan gen protease struktural lengkap dengan promotornya. Studi pendahuluan telah dilakukan isolasi dari *Xanthomonas* di seluruh Jawa [8]. Screening awal terhadap isolat yang didapatkan telah dilakukan dan beberapa isolat memberikan harapan untuk menghasilkan protease yang tinggi terutama *Xanthomonas campestris* IFL [9]. Pemotongan gen *Xanthomonas* dengan menggunakan enzim *EcoRI*, telah dilakukan, memberikan gambaran kromosom yang diskret, data ini sangat berguna untuk isolasi fragmen DNA, tahap selanjutnya DNA digunakan keperluan transformasi [10].

Metode Penelitian

Pertumbuhan bakteri *Xanthomonas campestris* ditumbuhkan dalam Erlenmeyer 100 ml berisi 10 ml medium Luria Bertani (LB) yang mengandung 10 g tripton, 5 g yeast

ekstrak, dan 10 g NaCl dalam 1000 ml H₂O, ditambahkan antibiotik rifampicin (50 µg/ml) pH 7,1-7,2. Inokulum diambil dari koloni tunggal goresan kwadran pada medium YDC berisi 10 g yeast ekstrak, 5 g glukosa, 20 g CaCO₃ dan 15 g agar/ 1000 ml akuades.pH 7,2, inkubasi selama 20 jam, dalam *waterbath shaker* 28°C, dengan pengocokan 125 rpm. Plasmid (pUC19) ditumbuhkan dalam medium LB, dengan antibiotik Ampicillin (50 µg /ml), inkubasi selama 16 jam pada 37°C, dengan pengocokan 125 rpm.

Isolasi DNA kromosom dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri selama 20 jam, suspensi biakan dimasukkan ke dalam ependof 1,5 ml, disentrifugasi 5000 rpm, 2 kali. Pelet disuspensikan dengan 250 µl bufer TE dan ditambahkan lisosim 5 µg /ml, diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, sampai larutan menjadi bening. Campuran ditambahkan 50 µl SDS 10% dan 5 ul Proteinase K (10 mg/ml) diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 60 menit, sampai campuran jadi kental. Campuran ditambahkan 65 µl NaCl 5M dicampur dengan sempurna. Kemudian ditambahkan 80 µl N-cetyl-N-N-N trimetil ammonium bromid (CTAB), diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit. Penambahan kloroform: isoamil alkohol (24:1) dengan jumlah volume yang sama. Campuran digoyang pada *shaker* 150 rpm selama 30 menit, kemudian disentrifugasi selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan yang berisi kromosom DNA. Supernatan yang membawa kromosom bagian fase atas dipindahkan ke ependof yang berisi 600 µl isopropanol dingin. Tabung dibolak-balik sampai terbentuk benang-benang DNA. Benang DNA yang terbentuk disentrifugasi, dicuci dengan 700 µl 70% etanol dingin. Endapan yang diperoleh merupakan DNA kromosom, dikeringkan dengan pompa vakum, dilarutkan dengan 40 µl bufer TE. DNA terlarut disimpan dalam *freezer*, siap untuk digunakan [11].

Isolasi DNA plasmid dengan cara alkali lisis bakteri yang mengandung pUC19 setelah ditumbuhkan semalam dalam medium LB. Sebanyak 1,5 ml biakan dimasukkan tabung ependof, disentrifugasi pada 5000 rpm selama 2 menit. Pelet yang diperoleh ditambahkan 110 µl larutan glukosa EDTA, diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan SDS-NaOH (4.25 ml H₂O steril, 0,5 ml 10% SDS dan 0,25 ml 4N NaOH), divortek, inkubasi di atas es selama 10 menit. Ditambahkan larutan KAC/HAC dingin sebanyak 150 µl, divortek diinkubasi di atas es selama 10 menit. Larutan disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh ditampung pada ependof yang baru, kemudian ditambah 0,5 ml fenol: kloroform:isoamil alkohol (25:24:1). Tabung dibolak-balik perlahan, disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit.

Larutan yang berada di atas dipindahkan pada tabung endopof yang baru dan kemudian ditambahkan 1 ml etanol absolut dingin, campuran diinkubasi pada -20°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi 5 menit pada 5000 rpm. Pelet yang diperoleh dicuci dengan alkohol 70% dingin., alkohol dibuang dan pelet dikeringkan dengan pompa vakum selama 15 menit, terakhir *pellet* ditambahkan 20-30 μl TE bufer [12].

Ligasi dilakukan dengan menggunakan 1 unit/ μl enzim T4 ligase dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 16 jam. Sel kompeten disiapkan dengan menginokulasi 10 ml LB medium dengan koloni tunggal *Escherichia coli* DH5 α diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam. Satu ml suspensi sel ditumbuhkan pada 10 ml LB medium selama 3 jam untuk mencapai fase logaritma. Sejumlah 1,5 ml suspensi sel disentrifugasi dan ditambahkan 1 ml 50 mM CaCl_2 , diinkubasi selama 20 menit dalam es, selanjutnya disentrifugasi 1 menit 5000 rpm, disuspensikan 200 μl 50mM CaCl_2 dingin, diinkubasi 10 menit. Sel siap untuk tahap transformasi. Transformasi, sel kompeten ditambahkan 50 ng/10 μl , tabung dicampur pelan-pelan dan ditaruh dalam es 30 menit. Tabung diinkubasi dalam *waterbath* 42°C selama 2 menit, dengan cepat dimasukkan dalam es, selama 2 menit. Sel selanjutnya dimasukkan pada medium LB diinkubasi selama 60-90 menit pada 37°C dengan pengocokan yang kuat. Seleksi, rekombinan diseleksi menggunakan medium LA+Km+ 4 μl IPTG (200mg/ml) dan 40 μl X-gal(20 mg/ml) [12].

Elektroforesis gel agarosa, dengan menggunakan 0,8% (b/v) dilarutkan dalam bufer TAE 1X. Sampel DNA plasmid/kromosom yang akan dielektroforesis ditambahkan 1-2 μl *loading buffer*. Elektroforesis dilakukan pada volume 35-45 volt, selama 2 jam. Visualisasi dilakukan dengan merendam agarose dalam *EtBr* (1 μl /ml) selama 5-10 menit. Pita DNA diamati dengan *Uvi transluminator* pada panjang gelombang 280 nm. Dokumentasi dengan film *instant polaroid type 667 Kodak*.

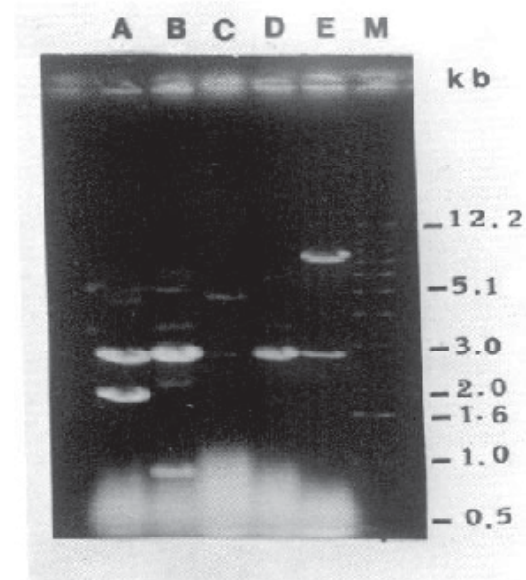
Hasil dan Pembahasan

Hasil transformasi DNA fragmen dengan tehnik *shot gun cloning* (kloning tembak langsung) yang berarti bahwa DNA fragmen dari total genom *Xanthomonas campestris* yang dipotong partial dengan *EcoRI*, dilanjutkan ligasi pada vektor plasmid *Escherichia coli* (pUC19) dan ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* DH5 α yang telah dibuat kompeten dengan CaCl_2 . Hasil seleksi rekombinan menggunakan medium LA+Ap+4 u X-gal (20 mg/ml) menunjukkan adanya koloni yang berwarna biru dan putih. Dihasilkan sebanyak 8 koloni putih, dari koloni putih yang dihasilkan, hanya 5 koloni putih yang

1,22X10⁻⁸/koloni putih/sel kompeten.

Hasil elektroforesis pada gel agarosa 0,8% untuk melihat ukuran DNA yang dapat tertransformasi dapat dilihat pada Gambar 1. Lima koloni putih yang dihasilkan mempunyai ukuran DNA fragmen 2,5 kb (lajur A); 0,8 kb (lajurB); 4,9kb (lajur C); 0,5 (lajur D) dan 7,5 kb (lajur E).

Transforman yang dihasilkan ada yang berwarna biru dan putih atau putih berubah menjadi biru, adanya warna biru karena senyawa X-gal dalam medium. Hal ini terjadi karena adanya α -komplementasi di mana vektor plasmid pUC 19 pada bagian poli-lingkernya masing-masing mengkode 146 asam amino dari β -galaktosidase (β -gal), sedangkan inangnya mengkode bagian C-terminal dan merupakan komplemen dari β -gal. Jika gen penyandi amino terminal β -gal dari vektor plasmid dirusak dengan adanya fragmen DNA, maka protein β -gal tidak terbentuk, hal ini menyebabkan koloni berwarna putih pada medium yang mengandung X-gal, sedangkan koloni yang melakukan komplementasi berwarna biru. Terjadinya perubahan koloni yang berwarna putih menjadi biru kembali, kemungkinan disebabkan adanya pergeseran kerangka baca (*frameshift*) dari protein, atau mungkin disebabkan adanya aktivitas eksonuklease yang memotong fragmen tersebut [13].



Gambar 1. Hasil elektroforesis koloni putih transforman tehnik *shot gun cloning* genom *Xanthomonas campestris*, menggunakan vektor plasmid *Escherichia coli* pUC19 dan inang *Escherichia coli* DH5 α . Lajur A (2,5 kb); Lajur B (0,8 kb); Lajur C (4,9kb);Lajur D (0,5 kb);Lajur E (7,5b); M (penanda molekular 1 kb DNA ladder)

Frekuensi transformasi yang dihasilkan sangat rendah hanya $1,22 \times 10^{-8}$ /koloni putih/sel kompeten, hal ini kemungkinan disebabkan oleh karena adanya sifat genetik dari strain, di samping faktor-faktor lain yang mempengaruhi proses transformasi, misalnya: suhu, jumlah/ukuran DNA, lama perlakuan kejutan panas, adanya enzim eksonuklease, cara pemberian kejutan panas, spesifikasi inang, kekuatan ion, konformasi dan konsentrasi DNA [14-15]. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya variasi ukuran fragmen DNA kromosom yang masuk ke dalam sel inang *Escherichia coli* DH5 α sebesar 0,5 – 7,5 kb. Variasi ini disebabkan oleh karena sifat DNA yang rapuh, terjadi pematihan sewaktu dilakukan isolasi, atau kemungkinan lain karena adanya sistem modifikasi dan restriksi yang dimiliki oleh inang, sehingga apabila ada DNA asing yang masuk, akan mengalami pemotongan atau degradasi [14].

Kesimpulan

Transformasi fragmen DNA *Xanthomonas campestris* ke dalam *Escherichia coli* DH5 α , menggunakan vektor plasmid *Escherichia coli* (pUC19), menghasilkan 5 koloni putih, dengan frekuensi transformasi $1,22 \times 10^{-8}$ koloni putih/sel kompeten, hasil elektroforesis agarosa menunjukkan variasi ukuran fragmen DNA, sebesar 0,5-7,5 kb.

Daftar Acuan

1. O. P. Ward. Proteinase, *In*. Forgarty, W.M. Microbiol Enzyme and Biotechnology, (Applied Science Publisher London and New York, 1983).
2. A. Yamamoto. *In*. Reed, G (Ed.) Enzyme in Food Processing 2nd. Academic Press, New York, 1975
3. M. Fujimaki., H. Arai dan M. Yamashita. *In*. Feeney, R.E. & J.R. Withaker (Eds.) Enzymatic Modification of Food Protein, Advance in Chemistry Series No 160. Americans Chemical Society, Washington D.C., 1997.
4. C.C. Hase dan R.A. Finkelstein. *Microbial Review*, 57, (1993), 823
5. J.M. Dow, M.J. Fan, M.A. Newman dan M.J. Daniels, *Applied and Environ. Microbiol.* 59, (1993) 3996
6. Y. N. Liu, J.L. Tang, B.R. Clarke, J.M. Dow dan M.J. Daniles, *Mole Gen. Genet*, 220 (1990) 433
7. J. L. Tang, C.L. Gough, C.E. Barber, J.M. Dow, M.J. Daniels, *Mol. Gen. Genet*. 210 (1987) 443.
8. Y. Rukayadi. Tesis PPS-IPB, Bogor 1995.
9. S. Santoso. Tesis PPS-IPB, Bogor 1997.
10. W. Mangunwardoyo. Jurusan Biologi FMIPA-UI, Depok, 1999. Laporan Penelitian. Pemotongan Partial Chromosom *Xanthomonas campestris*.
11. J. E. Leach, F.F. White, M.L. Rhoads dan H. Leung. *Mol Plant Microb. Interact.* 38, (1994) 502
12. J. E. Sambrook, F. Fritsch, dan T. Maniatis. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. (Cools Spring Harbor Laboratory Press, US, 1989).
13. L. G. Davis, W.W. Kuehl dan J.F. Battey. *Basic Methods in Molecular Biology*, 2nd, Prentice Hall International, 1994.
14. R. L. Rodriguez, dan R.C. Tait. *Recombinant DNA Technique: An Introduction* (The Benjamin Clummings Publishing Company, Inc, Canada, (1983).
15. D. Hanahan, dan F.R. Bloom. Mechanism of DNA Transformation, *In*. F.C. Neinhart (ed), *Escherichia coli and Salmonella typhimorium Cellular and Molecular Biology*, American Society Microbiology, Washington, D.C. 1996.