

Deteksi Transfer Plasmid Pendegradasi 2,4-D (pPP202) pada Bakteri *Escherichia coli* dH5 α dengan Menggunakan Indikator Media EMBA

Agus Subdono

Jurusan Ilmu Kelautan, FPK, Universitas Diponegoro Semarang
Pusat Kajian Pesisir dan Laut Tropis, Lembaga Penelitian UNDIP

Abstrak

Plasmid (pPP202) dari *Vibrio natriegens* diintroduksi secara laboratoris dengan elektrotransformasi pada inang bakteri *Escherichia coli* dH5 α . Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) digunakan untuk mengisolasi plasmid DNA. Plasmid pPP202 mengandung gen yang menyandi degradasi parsial senyawa 2,4-diklorofenosi asetat (2,4-D). Bakteri *E. coli* dH5 α tidak memiliki gen yang diperlukan untuk mineralisasi 2,4-D pada khromosomnya. Asumsi tersebut memungkinkan untuk dilakukannya studi transfer gen dengan menyeleksi transkonjugan pada media indikator EMBA yang mengandung 2,4-D sebagai sumber karbon. Sehingga isolat yang mengandung plasmid pPP202 pada inang *E. coli* bisa dideteksi dengan melihat kesamaan warna dengan koloni *V. natriegens* PP202 yang berwarna merah. Selanjutnya, transkonjugan tersebut diuji lagi pada media Zobell 2216E + 200 ppm 2,4-D yang dibandingkan dengan koloni negatif yang berwarna putih.

Kata kunci : plasmid, transfer gen, transkonjugan

Abstract

A plasmid (pPP202) of *Vibrio natriegens* was introduced on host *Escherichia coli* dH5 α . with electrotransformation. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) was used to isolate the DNA plasmid. Genes on this plasmid encode partial 2,4-dichlorophenoxycetic acid (2,4-D) degradation. The *E. coli* dH5 α . lacks the chromosomal genes necessary for mineralization of 2,4-D, and this fact allows presumptive transconjugants obtained in gene transfer studies to be selected by plating on EMBA indicator media containing 2,4-D as the carbon source. Use of this approach enabled detection of plasmid pPP202 transfer to *E. coli* where previously it had not been detected. Thus, all of the 2,4-D-degrading isolates of *E. coli* that contained a plasmid pPP202 whose red colony colour was similar to the colony colour of *V. natriegens* Strain PP202, were considered as transconjugants. In addition, transconjugants were observed at distinct times in Zobell 2216E + 200 ppm 2,4-D that supported transconjugant populations compared to controls (white colour) in which no gene transfer was detected.

Key words : plasmid, gene transfer, transconjugant

Pendahuluan

Plasmid merupakan molekul DNA ekstra khromosomal yang hampir dapat ditemukan pada berbagai jenis bakteri, berbentuk sirkuler tertutup, dapat mereplikasi secara otonom dalam sel inang (Goodenough, 1984; Lewin, 1987; Freifelder, 1987). Plasmid menyandi beberapa fungsi spesifik yang biasanya tidak begitu esensial bagi bakteri inangnya. Plasmid-plasmid penyandi gen khusus tersebut memberikan sumbangan pada inangnya kemampuan beradaptasi untuk dapat tumbuh dan bertahan pada kondisi yang berbeda-beda. Plasmid-plasmid dan elemen-elemen *transposable* yang sering di

miliki juga memainkan peranan secara integral selama proses evolusi spesies bakteri di dalam memacu distribusi dan pertukaran informasi genetik (Womble and Rownd, 1988). Lebih lanjut Womble dan Rownd (1988) mengatakan beberapa fungsi dan peranan plasmid yang meliputi transfer genetik, produksi dan resistensi bakteriosin, produksi dan resistensi antibiotik, resistensi terhadap logam berat dan DNA damaging agents, metabolisme karbohidrat, produksi toksin, virulensi dan faktor kolonisasi, produksi hemolysin, dan tumorigenicity dan fiksasi nitrogen pada tanaman.

Plasmid dapat diklasifikasikan menjadi 3

kelompok besar yang telah dikarakterisasi secara ekstensif yang terdiri dari plasmid F, plasmid *colicinogenic* (Col), dan plasmid resistensi (R) (Goodenough, 1984; Lewis, 1987; Freifelder, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Meskipun diketahui bahwa ukuran plasmid relatif kecil (biasanya kurang dari 200 kb), namun telah dilaporkan beberapa plasmid dengan ukuran besar, contoh, *Streptomyces* (590 kb, Kinashi and Shimaji, 1987), *Borrelia burgdorferi* (950 kb, Ferdows dan Barour, 1989), *Rhizobium meliloti* (1700 kb dan 1340 kb, Suwanto, 1994). Beberapa spesies *Pseudomonas* dapat mendegradasi senyawa organik sebagai sumber karbon, terutama pada senyawa-senyawa toksik camphor, toluene dan octane dengan ukuran plasmid 500 kb (pRA500), 225 kb (CAM) dan 176 kb (pWVO) (Yeo, 2000). Setiap plasmid memiliki peran satu atau lebih dalam mekanisme mendegradasi senyawa-senyawa tersebut. Karena beberapa enzim terlibat dalam mekanisme tersebut, maka plasmid tersebut berukuran besar (berat molekul 50-100 x 10⁶).

Keragaman genetik meningkatkan secara pesat kemampuan bakteri beradaptasi, dan keragaman ini dapat dipercepat oleh pertukaran informasi genetik secara horizontal, dimana dalam proses tersebut plasmid memegang peranan yang sangat penting. Transfer plasmid secara horizontal dapat terjadi dengan cara konjugasi, transformasi dan transduksi. Konjugasi dan transformasi merupakan proses aktif dari bakteri yang memerlukan informasi genetik yang diberikan baik oleh plasmid atau inangnya (Kwong *et al.*, 2000). Zatyka dan Thomas (1998) melaporkan bahwa proses konjugasi plasmid diantara bakteri gram negatif memerlukan komponen *cis-acting* yang disebut *origin of transfer* (*oriT*) dan beberapa gen yang terlibat di dalam proses dan pembentukan pasangan DNA. Selanjutnya Lorenz dan Wackernagel (1994) mengatakan bahwa pada proses transformasi secara alami, untai ganda DNA dihidrolisis menjadi bentuk untai tunggal dan ditransportasi menembus membran menuju ke dalam sitoplasma dan kemungkinan terjadi rekombinasi dengan genom inang. Beberapa contoh transformasi secara alami telah banyak dilaporkan, seperti pada *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17587, *Pseudomonas mendocina* ATCC 25411-13 dan *Pseudomonas alcaligenes* ATCC 12815 (Carlson *et al.*, 1983).

Di dalam laboratorium, pemindahan plasmid dapat dilakukan secara buatan dengan cara transformasi, dimana plasmid dimasukkan ke dalam sel bakteri yang dibuat kompeten, sehingga untuk sementara dinding sel bersifat permeabel dan dapat dilewati molekul DNA dengan ukuran kecil (Sambrook *et al.*, 1989). Lebih lanjut Sambrook *et*

al., (1989) mengatakan bahwa efek dari ukuran plasmid antara 25 - 130 kb dapat ditransformasi secara efisien.

Beberapa penelitian terdahulu melaporkan bahwa genus-genus bakteri seperti *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* dan *Alcaligenes* mampu mendegradasi senyawa herbisida 2,4-D (Don and Pemberton, 1981; Fisher *et al.*, 1978; Bhat *et al.*, 1996; Chaudry and Huang, (1988). Gen penyandi degradasi senyawa 2,4-D ini terletak pada plasmidnya. Namun akhir-akhir ini ditemukan bahwa gen penyandi degradasi senyawa 3,4-D juga ditemukan pada kromosom. Matheson *et al.*, (1994) dan Suwa *et al.*, (1996) melaporkan bahwa bakteri *Burkholderia* mampu mendegradasi senyawa 2,4-D dan gen penyandi degradasi tersebut terletak pada kromosomnya. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Ka dan Tiedje (1994) menunjukkan bahwa plasmid pendegradasi senyawa 2,4-D (pKA2) dapat berada dalam bentuk integrasi dalam kromosom inangnya ataupun sebagai plasmid bebas.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi gen pendegradasi senyawa 2,4-D pada bakteri karang *V. natriegens* strain PP202 yang ditransfer pada bakteri *E. coli* DH5 α .

Materi dan Metoda

Materi penelitian

Strain bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri karang *Vibrio natriegens* strain PP202 yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa 2,4-D dan bakteri *Escherichia coli* DH5 α merupakan salah satu mutan *E. coli* yang digunakan sebagai inang dalam transformasi (sumbangan dari PAU Bioteknologi UGM). Genotip yang dimiliki *E. coli* DH5 α adalah *supE44 lacU6(Φ80/acZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi 1 RecA 1*.

Media dan kondisi pertumbuhan

Media Zobell 2216E + 0,1 % 2,4-D, pH 7,6 digunakan sebagai media indikator hasil transformasi, L broth digunakan sebagai media cair untuk pertumbuhan dan pembuatan sel kompeten bakteri *E. coli* DH5 α .

Isolasi plasmid DNA

Isolasi plasmid DNA dilakukan dengan menggunakan Pulse Field Gel Elektrophoresis (PFGE). Satu militer kultur *V. natriegens* strain PP202 yang telah ditumbuhkan selama 12 jam pada media cair Zobell 2216E dimasukkan dalam mikroependorf 1,5 ml. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 2 menit, lalu supernatan dibuang. Pellet sel kemudian diresuspensi

dengan 1 ml larutan PIV (10mM Tris-HCL, pH 7,5; 1 M NaCl) dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 0,3 ml PIV dan 0,2 ml 2% low melting point agarose dalam 1 x TE bufer, selanjutnya dimasukkan pada cetakan insert dan disimpan pada suhu 4°C selama 15 menit. Hasil cetakan *insert* dimasukkan pada tabung 25 ml yang berisi 5 ml larutan EC (6mM Tris pH 7.6, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5 % Brij-58, 0,5 % sarkosil and 0,2 % sodium deoxycholate) dan diinkubasi selama 24 jam pada Water Shaker Bath 37 OC. Setelah inkubasi, larutan EC dibuang, diganti dengan 5 ml larutan ESP (0,5 M EDTA pH 9, 1 % sodium lauryl sarkosil 200µg/ml proteinase K) dan inkubasikan selama 2 x 24 jam pada *shaker water bath* 55°C, 80 rpm. Larutan ESP dibuang dan diganti dengan larutan 1 x TE dan diinkubasi selama 2 jam pada shaker 6000 rpm, suhu ruang. Setelah itu larutan dibuang, insert disimpan pada bufer ES suhu 4°C.

Sampel insert kemudian di *running* pada 1 % High Melting Point Agrose (HMA) dalam 0,5 x TBE dengan *ramping pulse time* (*initial time*: 60 dan *final time* : 90), temperatur pada bak *running* 14 °C, voltage sebesar 200 Volt selama 46 jam. *Running time* dilebihkan selama 30 menit untuk memberikan *finishing process*. Hasil elektroforesis diamati pada lampu UV dan dilakukan pemotretan dengan Kodak Polaroid.

Elektroelusi

Pita plasmid pada agarose dipotong dengan silet stainless, kemudian dimasukkan dalam tabung dialisis yang sebelumnya telah direbus pada 2 % sodium bicarbonat dan 1 mM EDTA pH 8,0 selama 10 menit dan dicuci dengan air destilasi. Setelah tabung ditutup dibagian atas dan di *running* pada bak elektroforesis 100 V selama 1 jam. Sebelum tabung dialisis dipindahkan pada mikro eppendorf dan dilakukan presipitasi dengan menambah 1/25 volume 5M NaCl = 2,5 volume Etanol absolut dingin, digoyang perlahan dan disimpan pada suhu -20 °C semalam. Setelah itu, larutan disentrifugasi 12000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang, dan pellet ditambahkan etanol 70 % secara perlahan. Lalu larutan disentrifugasi selama 5 menit, 12.000 rpm, pellet dilarutkan dengan 50 µl 1 x TE dan konsentrasinya diukur dengan spektrofotometer pada OD₂₆₀.

Digesti plasmid dengan Eco RI

Lima mikroliter plasmid ditambah dengan 4 µl buffer EcoR I, 4 µl EcoR I dan *nuclease free water* sehingga volume total akhir 20 µl. Campuran reaksi kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pemotongan dielektroforesis pada 100 volt.

Elektrotransformasi

Preparasi sel kompeten

Koloni tunggal *E. coli* DH5α dibiakkan ke dalam 5 ml medi LB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan agitasi 200 rpm. Setelah bakteri tumbuh, ditambah dengan 25 ml LB baru dan diinkubasikan selama 2-3 jam sampai didapatkan OD₆₀₀ antara 0,3-0,6 Kemudian 5 ml kultur bakteri dipanen dengan cara sentrifugasi 12.000 rpm selama 10 detik pada temperatur kamar. Pelet dicuci dengan akuades steril 5 kali, masing-masing 1,5 ml. Pelet diresuspensi dengan 200 µl akuades dan siap untuk proses transformasi.

Elektroforasi

Masing-masing 200 µl larutan yang mengandung sel bakteri kompeten ditambah dengan 5 µl plasmid yang sudah direstriksi dan tidak direstriksi, dan dicampur dengan baik. Elektrotransformasi dengan *Gene Pulser*TM pada 2,5 kV. Angka transformasi yang ditunjukkan pada alat *Gene Pulser*TM harus menunjukkan angka antara 13-16 sebagai indikasi keberhasilan proses transfer. Sampel kemudian ditambahkan media LB baru hingga volume akhir sebanyak 1 ml, dicampur baik, dan diinkubasikan pada 37 °C selama 1 jam. Setelah inkubasi sampel disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 detik, 800 µl supernatan dibuang dan sisanya sebanyak 200 µl diresuspensi dan ditanam pada plat agar.

Deteksi tranconjugant

Empatpuluh mikroliter hasil proses transformasi ditanam pada medium EMBA yang sudah ditambah 100 ppm 2,4-D secara merata dengan *spreadeeer stick*. Plat agar EMBA kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C semalam. Koloni berwarna merah menunjukkan keberhasilan transfer plasmid.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi plasmid DNA dari bakteri karang *V. natriegens* setelah dielektroforesis pada agarose 1 % dengan PFGE dapat dilihat pada Gambar 1. Selanjutnya plasmid DNA pada agarose di *recovery* dengan menggunakan teknik elektroelusi (*electroelutiaon*). Hasil isolasi plasmid PP202 dikarakterisasi dengan menggunakan elektroforesis pada gel 1% dalam bufer TAE (Gambar 2).

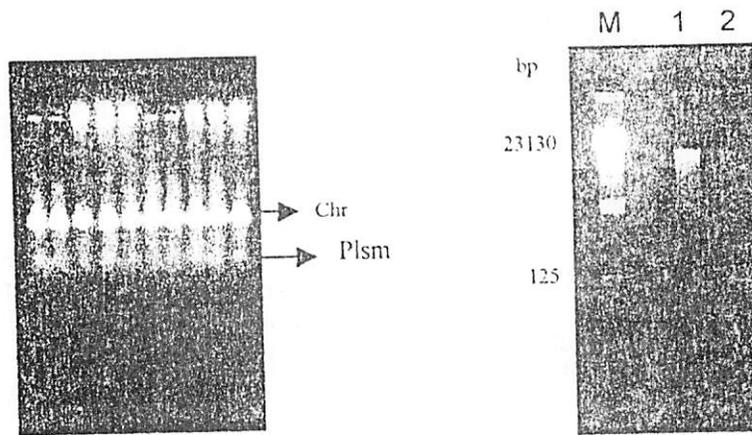
Pada Gambar 2 tampak plasmid DNA *V. natriegens* PP202 *smear* pada lapisan gel agarose. Hal ini sangat dimungkinkan karena sangat sulit untuk menjaga kondisi plasmid secara utuh dengan ukuran besar. Sambrook *et al* (1989) menyatakan bahwa plasmid dengan ukuran besar (>15 kb) sangat rentan terhadap kerusakan. Hasil karakterisasi secara

kuantitatif dengan menggunakan alat UV spektrofotometer memperoleh DNA dengan konsentrasi 207.5 µg/ml dan rasio kemurnian 1.809 ($A_{260} = 0,087$ dan $A_{280} = 0,046$)

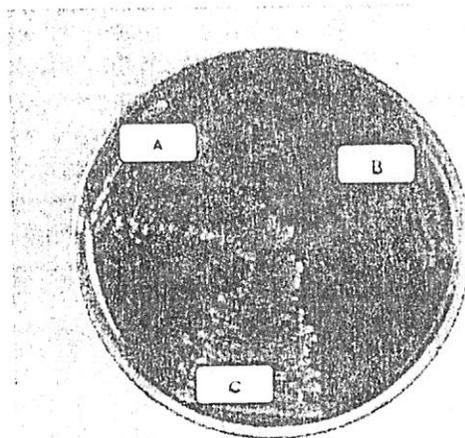
Hasil transformasi plasmid PP202 dapat dilihat pada Gambar 3. Adanya pertumbuhan koloni pada media 2,4 -D menunjukkan bahwa plasmid PP202 berhasil ditransformasi ke dalam sel bakteri inang *E. coli* DH5α. Harker *et al* (1989) mengatakan bahwa kemampuan bakteri resipien *E. coli* DH5α tumbuh pada 2,4 D sebagai sumber karbon karena disebabkan bakteru tersebut mampu mengekspresikan plasmid yang menyandi *tfd monooxygenase*. Hasil yang sama juga diperoleh pada penelitian yang

dilakukan oleh Kukor *et al* (1989) dengan melakukan transfer pJP4 dari *A. eutrophus* ke dalam bakteri *P. cepacia* dan *P. pickettii*, dan *P. oxaliticus* (Meyer dan Schlegel, 1983). Gen degradasi 2,4 -D (*tfdA*) juga dapat diekspresikan pada *E. Coli* JM 109 (Fukumori and Hausinger, 1993).

Plasmid yang didigesti dengan *EcoRI* tidak dapat diekspresikan secara utuh pada inangnya dengan tidak ditemukannya koloni yang berwarna merah. Diduga hal ini disebabkan oleh tidak tertransferynya bagian gen degradasi pada plasmid. Namun pada plasmid yang tidak didigesti dapat diekspresikan oleh inangnya dengan adanya koloni yang berwarna merah.



Gambar 1. Hasil elektroforesis plasmid DNA *V. natriegens* strain PP202 (Keterangan : (1) Chr: DNA khromosom; Plsm : DNA plasmid; (2) : Lambda DNA-*Hind* III, 1: plasmid intact, 2: plasmid didigesti dengan *EcoRI*)



Gambar 3. Uji koloni hasil transformasi pada media indikator EMBA (A: koloni (+); B: koloni (-); C: *V. natriegens*)

Pada gambar tersebut menunjukkan bahwa hasil transformasi tetap diekspresikan pada generasi selanjutnya. Singer dan Berg (1991) mengatakan bahwa DNA yang diperoleh dari transformasi akan berrekombinasi dengan daerah homolog atau tempat-tempat khusus pada genom organisme resipien atau sebagai minikromosom yang otonom, dengan demikian dapat merubah genotip. Hasil transformasi tersebut biasanya heritabel dan stabil, meskipun strukturnya tidak dideterminasi karena sulit ditemukan kembali (*recovery*).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa gen pendegradasi senyawa 2,4-D pada bakteri yang berasosiasi dengan karang (*V. natriegens* strain PP202) yang disandi dalam plasmidnya dapat ditransformasi dan diekspresikan pada spesies bakteri lainnya.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian dari Disertasi Doktor (S3) Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Untuk itu penulis mengucapkan terimakasih pada Prof. Dr. Ir. Joedoro Soedarsono, Dr. Hari Hartiko dan Dr. Wayan T. Artama, PAU-Bioteknologi UGM, Yogyakarta.

Daftar Pustaka

- Bhat, M.A., M. Tsuda, K. Horike, M. Nozaki, C.S. Vidyathan and T. Nakazawa. 1994. Identification and Characterization of a new plasmid carrying genes for degradation 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Halomonascepacia* CSV90. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 307-3112.
- Carlson, C.A., M. Steenbergen and J.L. Ingraham. 1984. Natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* by plasmids that contain cloned fragments of chromosomal deoxyribonucleic acid. *Arch. Microbiol.* 140 : 134-138.
- Charudry, G.R. and G. H Huang. 1988. Isolation and Characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium sp.* which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *J. Bacteriol.* 170: 3897-3902.
- Don, R. H and J. M. Pemberton. 1985. Genetic and Physical Map of the 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid Degradative Plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 61 : 466-468.
- Ferdows M. S. and A. G. Barbour. Megabase-size linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdoferi*, the lyme disease agent. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 86: 5969-5973.
- Fukumori, F. dan R.P. Hausinger 1993. *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 " 2,4-D monooxygenase" is an a-ketoglutarate-dependent dioxygenase. *J. Bacteriol.* 175 (7) : 2083-2086.
- Freifelder, D. 1987. Microbial genetics. Jones and Bartlett Publisher.
- Goodenough, U. 1984. Genetics. CBS College Publishing.
- Harker, A. R., R. H. Olsen and R. J. Seidler 1989. Phenoxycetic acid degradation by the 2,4-D (*tfd*) Pathway of plasmid pJP4: Mapping and characterization of the *tfd* regulatory gene, *tfdR*. *J. Bacteriol.* : 171 (1) : 314-320.
- Ka, J. O. and J. M. Tiedje. 1994. Integration and Excision of a 2,4-D-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfer. *J. Bacteriol.* 176 (17) : 5284-5289.
- Kinashi, H. and M. Shimaji 1987. Detection of giant linear plasmids in antibiotic producing strains *Streptomyces* by the OFAGE technique. *J. Antibiotics* 6: 913-916.
- Kukor, J. J., R. H. Olsen and S. S. June 1989. Recruitment of a chromosomally encoded maleylacetate reductase for degradation of 2,4-D by plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 171: 3385-3390.
- Kwong, S. M., C. Yeo, A. Suwanto dan C.L. Poh 2000. Characterization of the endogenous plasmid from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867: DNA sequence and Mechanism of transfer. *J. Bacteriol.* 182 (1) : 81-90
- Lewin, B. 1994. *Genes V.* Oxford University Press, New York.
- Lorenz, M. G. and W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev.* 58:563-602.
- Matheson, V. G. L.J. Forney, Y. Suwa, C.H. Nakatsu, A. J. Sextone and W.E. Holben. 1996. evidence for acquisition in nature of chromosomal 2,4-D/a-ketoglutarat dioxygenase gen by different *Burkholderia spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7) : 2457-2463
- Meyer, M. and H. G. Schlegel 1983. Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* 143:92-97
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. CSH Laboratory Press.

- Singer, M. and P. Berg. 1991. Genes and Genomes. Blacwell Scientific Publication
- Suwa, Y., A. D. Wright, F. Fukumori, K. A. Nummy, R.P. Hausinger, W.Ee. Holben and L.J Forney 1996. Characterization of a chromosomally encoded 2,4-D/ α -kateglutarat dioxygenase from *Burkholderia sp* strain RASC. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:24-2469
- Suwanto, A. 1984. Pulsed-Field Gel Electrophoresis: A revolution in microbial genetics. *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 2(2) : 78085.
- Womble, D.D. and R. H. Rownd 1988. Genetic and physical map of plasmid NR1 : Comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmid. *Microbial Rev.* 52 (4) : 433-45.
- Yeo, C.C. 2000. Bacterial catabolism of aromatic hydrocarbon. Int. training workshop on Advance in molecular biology techniques to asses microbial biodiverstiy Seameo Biotrop, Bogor.
- Zatyka, M. And C. M. thomas 1998. Control of genes for contugative transfer of plasmids and other mobile elments. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:291-319