

## PENGARUH TEGANGAN ELEKTROPORASI TERHADAP EFISIENSI TRANSFORMASI PLAMID pND968 BAKTERI ASAM LAKTAT KE *E. coli* HB101<sup>1)</sup>

[The Effect of Electroporation Voltage on Transformation Efficiency of Plasmid pND968 of Lactic Acid Bacteria Into *E. coli* HB101]

Widodo<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional PATPI, Semarang 9-10 Oktober 2001

<sup>2)</sup> Laboratorium Teknologi Pengolahan Susu, Fakultas Peternakan UGM – Yogyakarta

### ABSTRACT

The research was conducted to examine the effect of different electroporation voltage on transformation efficiency of plasmid pND968. This was carried out by exposing the mixture of plasmid pND968 and competent cells of *E. coli* HB101 on a difference level of electroporation voltage at 1500, 2000 and 2500 Volts. After electroporation, the cells were resuspended in a recovery medium and then poured into ampicillin-containing LB agar. Transformants appeared after 48-72 hours were then recorded. The results showed that electroporation voltage of 2500 Volts with resistance 200 Ohm and capacitor 25 uF resulted in the highest electroporation efficiency at  $7.72 \times 10^4$  CFU / ug DNA. Transformants confirmation by means of plasmid pND968 isolation showed that all of the ampicillin-resistant transformants harbored the intended pND968 with the expected size.

**Key words :** Electroporation, transformation efficiencies, and plasmid

### PENDAHULUAN

Transformasi DNA dapat terjadi secara alami maupun buatan. Transformasi secara alami, biasanya terjadi pada sebagian siklus hidup setiap mikroorganisme khususnya bakteri. Terjadinya transformasi secara alami berkaitan dengan kondisi kompeten sel selama sel tumbuh. Kondisi ini biasanya terjadi menjelang phase sel stasioner (*stationery phase*) dimana sel mencapai densitas tertinggi sepanjang pertumbuhannya. Kompeten sel sangat memungkinkan DNA luar masuk kedalam sel bakteri. Transformasi DNA secara alami, frekuensinya sangat rendah dikarenakan adanya syarat tertentu seperti kontak antar sel, homologi dari DNA yang bersangkutan, adanya proses modifikasi dalam inang, kondisi morfologi (kemampuan membentuk rambut/phili) dan perlunya gen khusus seperti gen *tra* untuk proses konjugasi (Brown, 1986; Old and Primrose, 1989). Kelemahan mendasar dari transformasi secara alami bahwa DNA yang dapat dipindahkan dengan metode alami ini hanyalah DNA yang berbentuk linear atau DNA kromosom, sedangkan DNA plasmid tidak dapat dipindahkan (Snyder dan Campness, 1987 *cit* Old and Primrose, 1989). Hal ini dikatakan sebagai kelemahan mendasar karena banyak sifat genetik bakteri sangat ditentukan oleh gen yang dibawa pada DNA plasmid. Dengan demikian, teknik transformasi buatan yang memungkinkan transfer DNA plasmid sangat perlu dikembangkan.

Salah satu teknik transformasi buatan yang memungkinkan DNA dapat dipindahkan ke dalam sel inang adalah teknik elektroporasi. Elektroporasi telah berhasil digunakan untuk memindahkan berbagai plasmid DNA ke dalam berbagai bakteri inang baik yang bersifat Gram positif maupun negatif. Fielder dan Wirth (1988) melaporkan tingkat elektroporasi  $10^4$  -  $10^5$  transforman per ug DNA plasmid dari *Enterococcus faecalis*. Sedangkan dengan teknik yang sama tingkat efisiensi yang diperoleh pada *Escherichia coli* dan *Pseudomonas putida* masing-masing adalah  $1 \times 10^3$  dan  $3 \times 10^4$  transforman per ug DNA.

Berbagai faktor menentukan tingkat efisiensi elektroporasi. Diantara faktor-faktor tersebut adalah konsentrasi DNA, medan listrik (voltase, hambatan listrik dan kapasitor) yang digunakan serta lamanya ekposisi medan listrik (Sambrook et al., 1989). Tingkat efisiensi  $10^9$  -  $10^{10}$  transforman per ug DNA dapat dicapai dengan kombinasi ketiga faktor tersebut. Dower et al., (1988) seperti disitir Sambrook et al., (1989) melaporkan tingkat efisiensi  $10^{10}$  transforman per ug DNA diperoleh ketika melakukan transformasi plasmid pUC18 ke dalam sel *E. coli* strain LE392 atau MC1061. Secara umum, efisiensi transformasi dengan elektroporasi dapat mencapai 10-20 kalinya dibandingkan dengan transformasi dengan kompeten sel yang disiapkan dengan bahan kimia. Lebih lanjut, Sambrook et al., (1989) menyatakan bahwa plasmid dengan ukuran 25 - 130 kb dapat ditransfer dengan efisiensi yang sama. Penyiapan kompeten sel bakteri inang juga relatif

lebih mudah. Sel bakteri ditumbuhkan sampai pertengahan phase logaritmit, didinginkan, dipanen dan dicuci dengan buffer dengan kandungan garam rendah untuk menurunkan tegangan ion dari suspensi sel (Sambrook et al., 1989).

Plasmid pND968 adalah salah satu bentuk *cloning vector* yang *food-grade* (non antibiotik) dan berperan penting dalam pengembangan bakteri asam laktat (Leelawatcharamas et al., 1997). Plasmid ini mempunyai ukuran 17,7 kb dengan membawa gen resisten terhadap tembaga (*copper*). Sebagai kloning vektor yang sifatnya *shuttle*, plasmid ini dapat dipindahtukarkan baik kedalam sistem genetik bakteri *E. coli* maupun bakteri asam laktat. Adanya penanda seleksi seperti ampicilin, resistensi tembaga dan nisin akan sangat memudahkan seleksi transforman hasil transformasi. Beberapa lokasi ensim restriksi seperti *SacI* dan *Apal* yang sifatnya tunggal dapat dipakai untuk menghilangkan komponen bakteri *E. coli* dari plasmid ini sehingga persyaratan *food-grade* terpenuhi (Leelawatcharamas et al., 1997).

Plasmid pND968 dikonstruksi dengan melakukan kloning gen resisten tembaga (*cop*) plasmid pND951 pada plasmid pND628. Plasmid pND628 sendiri tersusun atas 7,1 kilobasa dengan gen resisten terhadap nisin dan ampicilin yang diperoleh dari tetuanya yaitu plasmid pGEM-7Zf(+) (Promega). Replikon plasmid pND628 diperoleh dari *L. lactis* FG2. Replikon ini termasuk dalam tipe theta yang diketahui mempunyai stabilitas tinggi. Tampilan plasmid pND968 dapat dilihat pada Gambar 1 berikut:

Penelitian ini bertujuan mengkaji perbedaan tegangan elektroporasi terhadap tingkat efisiensi transformasi plasmid pND968. Untuk itu, selama elektroporasi dicoba berbagai tegangan elektroporasi

berbeda dan diamati pengaruhnya terhadap efisiensi transformasi.

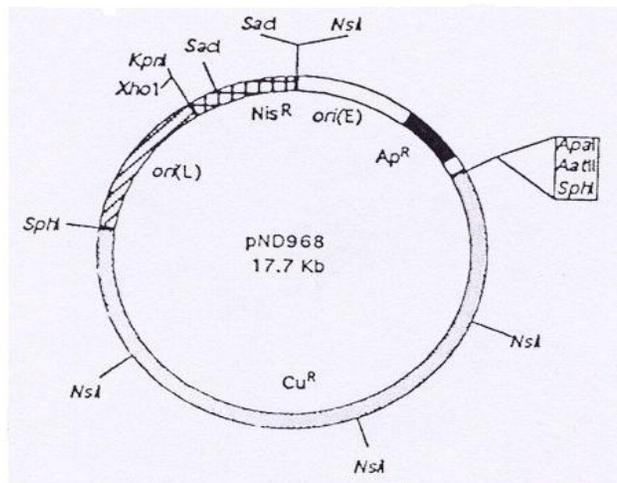
## METODOLOGI

### Bahan dan Alat

*Lactococcus lactis* subspecies *lactis* yang membawa plasmid pND968 dan bakteri *Eschericia coli* HB101 diperoleh dari laboratorium bioteknologi, Departemen Bioteknologi, *University of New South Wales*, Australia.

Bahan penelitian yang diperlukan diantaranya M17 medium (untuk pertumbuhan *L. lactis*), LB medium (untuk *E. coli*), Larutan 25% sukrosa dengan lisosim 30 mg/ml, Larutan 3% SDS 0,2N NaOH, 3 M sodium asetat, Larutan I (Tris/Glukosa/EDTA), Larutan II (1% SDS; 0,2%NaOH), Larutan III (5 M potasium asetat), *loading dye* (terdiri atas bromophenol biru, *xylene cyanol*, dan sukrosa), Isopropanol, es pendingin, 1% agarose gel untuk elektrophoresis, 1 X bufer TAE (Tris/Asetat/EDTA), RNase, Tris/EDTA bufer plus RNase, ensim lisosim, antibiotik eritromisin dan ampicilin, nisin dan tembaga sulfat ( $CuSO_4$ ), larutan EtBr untuk pengecatan dan akuades untuk pembilasan.

Alat yang diperlukan meliputi sentrifus 14000 rpm, pipet, tabung endof, *rotary shaker* dengan pengontrol suhu, seperangkat alat unruk pembuatan gel agarose, seperangkat alat elektrophoresis dan kamera untuk pemotretan plasmid DNA, dan seperangkat alat untuk elektroporasi (*electrophoration chamber*).



Gambar 1. Tampilan plasmid pND968 hasil rekayasa plasmid oleh Leelawatcheramas et al., (1997)

**Teknik penelitian**

Elektroporasi dilakukan menurut metode Well, et al., (1993). Elektroporasi dilakukan dengan volume sel kompeten 50 ul ditambah 5 ul DNA plasmid (dengan kisaran konsentrasi 20 - 200 ng DNA). 50 ul kompeten sel + 5 ul plasmid DNA ditempatkan dalam kuvet elektroporasi, didinginkan dalam es, dilanjutkan dengan elektroporasi pada tegangan 1500, 2000, 2500 volt pada 25 uF dan 200 ohm. Setelah elektroporasi, 1 ml medium M17G dingin ditambahkan dalam kuvet dan diinkubasi 30°C selama 2-3 jam. Setelah inkubasi, 200 ul suspensi sel ditaburkan pada medium M17G agar plus ampisilin sebagai penanda seleksi dan diinkubasi selama 24-48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dicatat sebagai transforman. Sel kompeten tanpa tambahan plasmid pND968 digunakan sebagai kontrol negatif.

Metode isolasi plasmid DNA dari transforman *E.coli* didasarkan atas metode yang telah dilakukan oleh Birnboim dan Dolly (1979) dan Sambrook et al., (1989) dengan berbagai pengembangan untuk mendapatkan hasil plasmid DNA yang paling layak. Metode isolasi plasmid pND968 dari *Lactococcus lactis* dilakukan berdasar metode O'Sullivan dan Klaenhammer (1993).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

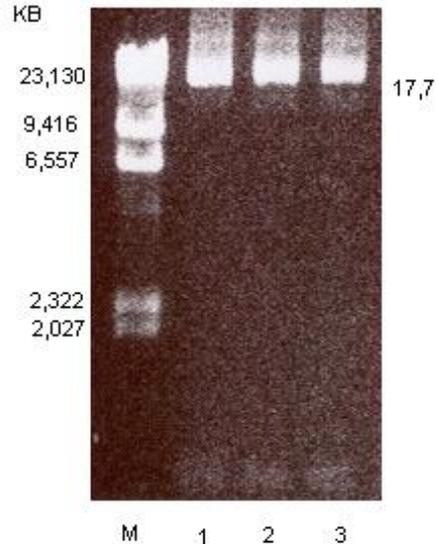
Koloni bakteri *E. coli* HB101 yang tumbuh pada medium LB agar plus ampisilin dihitung sebagai transforman. Kontrol yang ditumbuhkan pada medium yang sama dijadikan ukuran apakah koloni yang tumbuh benar-benar transforman atau kontaminan. Tidak adanya koloni yang tumbuh pada kontrol menunjukkan bahwa tidak ada kontaminan yang tumbuh sebagai sel resisten ampisilin. Hasil perhitungan tingkat efisiensi didasarkan per 5 ul plasmid DNA yang ditambahkan atau sekitar 200 ng/5 ul. Hasil perhitungan tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tingkat efisiensi transformasi plasmid pND968 dengan berbagai tegangan listrik yang elektroporasi berbeda.

Perlakuan	Ulangan I	Ulangan II	Rerata
2500 V, 200 Ohm, 25 uF	1.45 x 10 <sup>5</sup> CFU/ug	9.34 x 10 <sup>3</sup> CFU/ug	7.72 x 10 <sup>4</sup> CFU/ug
2000 V, 200 Ohm, 25 uF	1.25 x 10 <sup>5</sup> CFU/ug	3.45 x 10 <sup>3</sup> CFU/ug	6.42 x 10 <sup>4</sup> CFU/ug
1500 V, 200 Ohm, 25 uF	8.54 x 10 <sup>3</sup> CFU/ug	2.43 x 10 <sup>3</sup> CFU/ug	5.48 x 10 <sup>3</sup> CFU/ug
Kontrol	0	0	0

Dari Tabel 1 diatas diketahui bahwa perlakuan 2500 V, 200 Ohm, 25 uF menghasilkan tingkat efisiensi transformasi tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Untuk mengetahui lebih detail apakah transforman

tersebut betul-betul transforman pembawa plasmid pND968, maka ekstraksi plasmid dilakukan diikuti dengan elektroporesis untuk mengetahui ukuran plasmid hasil elektroporasi. Plasmid pND968 hasil elektroporasi dapat dilihat pada Gambar 2 berikut:



Keterangan: M : DNA penanda (*marker*) dari  $\lambda$  HindIII No 1, 2 dan 3 : Plasmid DNA pND968

Gambar 2. Plasmid pND968 hasil transformasi dengan elektroporasi

Dari Gambar 2 diatas dapat diketahui bahwa transforman yang diperoleh hasil elektroporasi memang benar transforman yang diharapkan. Maksudnya transforman ini membawa plasmid pND968 seperti yang

diharapkan. Keberadaan plasmid dalam transforman *E. coli* HB101 inilah yang menyebabkan *E. coli* mempunyai kemampuan tumbuh pada medium LB plus antibiotik ampisilin. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa proses transfer plasmid pND968 dengan elektroporasi dapat dikatakan berhasil dan perlakuan pada tegangan 2500 kV, 200 Ohm dan 25 uF memberikan hasil efisiensi transformasi yang terbaik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tegangan elektroporasi 2500 Volts dapat digunakan untuk memindahkan plasmid pND968 dengan tingkat efisiensi sekitar  $10^3$  sampai  $10^4$  transforman per ug DNA. Keberhasilan transfer plasmid DNA pada tegangan listrik tinggi ini disebabkan terbentuknya distorsi membran sel sehingga memungkinkan DNA masuk ke dalam sel pada saat sel ditempatkan pada medan listrik. Tingkat efisiensi transformasi  $10^3 - 10^4$  transforman per ug DNA memang dibawah tingkat efisiensi transformasi seperti yang dilakukan oleh Sambrook et al., (1989) namun menyamai tingkat efisiensi transformasi *Streptococcus sp* yang dilakukan oleh Powell et al., (1988) maupun Fieldler and Wirth (1988). Tingkat efisiensi transformasi ini sangat dipengaruhi banyak faktor seperti medan listrik (tegangan, hambatan, dan kapasitor), struktur sel, konsentrasi DNA, penyiapan kompeten sel dan keberadaan sistem restriksi DNA (Powell et al., 1988).

Pengaruh medan listrik diteliti pada penelitian ini. Hasilnya menunjukkan bahwa tingkat tegangan 2500 V relatif menghasilkan tingkat efisiensi transformasi yang paling baik dibandingkan tegangan 1500 V dan 2000 V. Hal ini dimungkinkan bahwa tingkat tegangan yang lebih tinggi akan lebih mampu membentuk pori-pori pada dinding sel dan membran plasma sehingga jumlah DNA yang masuk akan jauh lebih tinggi (Fieldler and Wirth, 1988). Namun demikian tingkat tegangan yang tinggi juga akan mengakibatkan tingkat kematian sel yang tinggi jika tidak dilakukan pada rentang waktu yang tepat. Kematian sel biasanya disebabkan oleh adanya perpecahan dalam sitoplasma sehingga fungsi metabolisme dalam sel akan rusak dan berakibat matinya sel bakteri (Fieldler and Wirth, 1988). Konsentrasi DNA plasmid juga sangat menentukan keberhasilan transformasi. Konsentrasi DNA (ng/ul) yang terlalu tinggi (misalnya >100 ng DNA per 40 ul sel) akan menghasilkan tingkat efisiensi yang rendah (Sambrook et al., 1989). Untuk transformasi *E. coli*, transformasi dengan 1 ul DNA ( konsentrasi sekitar 50 ng/ul) sudah lebih dari cukup untuk menghasilkan tingkat transformasi yang baik.

### KESIMPULAN

Transformasi plasmid pND968 dengan menggunakan tegangan elektroporasi 2500 Volts, 200

Ohm dan kapasitor 25 uF mampu menghasilkan tingkat efisiensi transformasi  $7,72 \times 10^4$  CFU/ug DNA. Hasil ini berada pada kisaran tingkat efisiensi yang lazim diperoleh oleh beberapa peneliti sebelumnya. Setelah ekstraksi plasmid, setiap transforman yang diperoleh menunjukkan membawa plasmid pND968 pada ukuran yang sama.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan dana penelitian dari Pemerintah Australia lewat AusAID dan Prof. Noel Dunn, Direktur CRC (*Cooperative Research Center*) for Food Industry and Innovation yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.A. 1986.** Gene Cloning: an introduction. P. 74-99. Chapman & Hall.
- Birnboim, H.C. and Dolly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*. 6(7):1513-1514
- Fieldler, S. and Wirth, R. 1988.** Transformation of bacteria with Plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem*. 170:38-44
- Leelawatcharamas, V., Chia, L.G., Charoenchai, P., Khunajakr, N., Liu, C.Q., and Dunn, N.W. 1997.** Plasmid-encoded copper resistance in *Lactococcus lactis*. *Biotech. Lett*. 19(7):639-643
- Old, R.W. and Primrose, S.B. 1989.** Principles of Gene Manipulation: An introduction to genetic engineering. P. 11-15. Blackwell Scientific Publications.
- O'Sullivan, D.J. and Klaenhammer, T.R. 1993.** Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus spp*. *Appl. Environ. Microbiol*. 59(8):2730-2733
- Powell, I.B., Achen, M.G., Hillier, A.J. and Davidson, B.E. 1988.** A simple and rapid method for genetic transformation of Lactic streptococci by electroporation. *Appl. Environ. microbiol*. 54:655-660
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual (2<sup>nd</sup> edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Watson, J.D., Tooze, T., and Kentz, O.T. 1983. DNA Rekombinan (terjemahan oleh Wisnu Gunarso). Penerbit Erlangga.

Well, J.M., P.W. Wilson and R.W.F Le Page (1993). *Improved cloning vectors and transformation procedure for Lactococcus lactis*. J. Appl. Bacteriol. 74:629-636

