

## TRANSFORMASI DAN KLONING PLASMID PJ804:77539 PADA *E.coli* TOP'10

<sup>1</sup>Siu S.S. Langden, <sup>1</sup>Anto Budiharjo, <sup>1</sup>Wijanarka dan <sup>2</sup>Wien Kusharyoto

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Laboratorium Rekayasa Genetika dan Desain Protein, LIPI, Cibinong

**Abstrak.** Kloning dan transformasi vektor PJ804:77539 dilakukan dengan tujuan perbanyakkan vektor *pRHA* pada sel bakteri *E.coli* TOP'10. Ekspresi vektor *pRHA* diharapkan dapat terjadi pada periplasma *E.coli* dan memberikan ekspresi berupa kemampuan resistensi terhadap *Ampicillin*. Ekspresi pada periplasma bertujuan untuk meminimalisir kerugian yang timbul pada sistem ekspresi di sitoplasma di antaranya tingkat ekspresi yang rendah, protein terpotong atau resiko kontaminasi. Sekresi protein rekombinan pada periplasma dapat meningkatkan aktivitas biologis serta tingkat kestabilan produk menjadi lebih tinggi. Proses isolasi protein yang diekspresikan pada periplasma dapat dilakukan dengan perlakuan stress osmotik ringan sehingga menurunkan resiko kontaminasi protein sitoplasma. Ekspresi protein pada periplasma diarahkan oleh peptida sinyal *pelB*. Peptida sinyal bekerja menarik produk protein ke periplasma dengan cara berfusi dengan ujung N-terminal pada peptida yang terekspresi. Penanda selektif (*selectable marker*) yang terdapat pada PJ804:77539 merupakan *Amp<sup>r</sup>*, suatu penanda yang memungkinkan bakteri untuk resisten pada keberadaan antibiotik *Ampicillin*. Transformasi dilakukan sesuai dengan metode *heat - shock* dan diseleksi pada medium LB agar dan LB cair yang mengandung antibiotik *Ampicillin* dengan konsentrasi 100 mg/mL. Diperoleh koloni tumbuh pada medium yang mengandung *Ampicillin* dan dilakukan isolasi plasmid. Visualisasi hasil elektroforesis memperlihatkan adanya pita plasmid yang diisolasi dari *E.coli* TOP'10 pada gel elektroforesis.

**Kata kunci :** *Ampicillin, E.coli, pelB, periplasm dan pRHA*

---

**Abstract.** Cloning and transformation of vector PJ804:77539 was conducted in order to multiply the *pRHA* vector in *E.coli* TOP'10 cell. The expression of *pRHA* vector is expected to occur in the periplasm of *E.coli* and give the resistance ability to *Ampicillin*. Expression in periplasm aimed to minimize the disadvantage which is occurred in cytoplasm expression system, low expression level, denaturation of protein, or the risk of contamination. The secretion of recombinant proteins in the periplasmic can improve biological activity and the stability of the product is even higher. The isolation process of protein which is expressed in the periplasm can be done by giving a light osmotic shock treatment and decrease the contamination risk of sitoplasm proteins. Proteins expression in periplasm is directed by *pelB*, a signal peptide. The signal peptide works carrying the protein to periplasm by its fusion with N-terminal of the expressed peptide. A selectable marker in PJ804:775399 is an *Amp<sup>r</sup>*, a marker that enables bacteria to be resistant of the of *Ampicillin*. Transformation was done by following *heat - shock* method. Transforman was selected in medium LB agar and LB broth contain 100 mg/mL *Ampicillin* as antibiotic. Result showed that colonies were obtained from medium containing *Ampicillin* and its plasmid were isolated. Electrophoresis visualization results showed plasmid bands isolated from *E.coli* TOP'10.

**Key words :** *Ampicillin, E.coli, pelB, periplasm and pRHA*

## A. PENDAHULUAN

Bidang biologi molekuler dan medis saat ini memanfaatkan teknologi rekombinan untuk menghasilkan protein tertentu yang umumnya dibutuhkan dalam skala besar atau untuk mengefisienkan ekspresi suatu gen tertentu. *Escherichia coli* merupakan bakteri yang sering digunakan dalam rekayasa genetika sebagai inang untuk proses rekombinan. *E.coli* merupakan bakteri gram negatif berkromosom tunggal dalam bentuk nukleoid. Ukuran genom sekitar  $4,6 \times 10^6$  bp dan sekuensnya telah dipetakan secara keseluruhan (Hyde, 2009).

Ekspresi protein umumnya terjadi pada sitoplasma sel, namun terdapat beberapa kelemahan pada pola ekspresi protein di sitoplasma diantaranya tingkat ekspresi yang rendah, protein terpotong atau resiko kontaminasi, sehingga ekspresi suatu protein rekombinan diharapkan dapat terjadi di periplasma. Periplasma *E.coli* telah dilaporkan dapat memelihara protein rekombinan lebih baik dibandingkan sitoplasma sehingga dilakukan penambahan sekuens peptida sinyal *pelB* yang bertindak sebagai suatu agen yang membantu translokasi protein ke periplasma sel. Proses rekombinasi membutuhkan penanda selektif yang berfungsi untuk menyeleksi transforman. Penanda selektif pada vektor *pRHA* adalah sekuens gen yang memungkinkan transforman untuk tumbuh pada medium yang mengandung *Ampicillin*.

## B. REFERENSI

### 1. Kloning Gen

Kloning gen merupakan proses yang digunakan untuk memanipulasi DNA dan kemudian dikembalikan pada organisme hidup untuk diekspresikan. Teknologi ini memungkinkan untuk mengisolasi DNA tertentu dari genom suatu organisme hidup, kemudian mentransformasinya menggunakan vektor pada suatu inang seperti bakteri *Escherichia coli* (Lodge *et al.*, 2007; Brown, 2010). Prosedur kloning menurut McLennan *et al.*, (2014) meliputi isolasi plasmid DNA yang mengandung sekuens yang diinginkan, digesti (*cutting*) plasmid dengan *restriction endonuclease*, pemisahan fragmen dengan elektroforesis, pemurnian DNA target, ligasi (penyambungan) DNA ke plasmid baru untuk membentuk rekombinan baru, transfer plasmid yang berhasil disambung ke sel *E.coli* (Transformasi), seleksi bakteri yang berhasil menerima plasmid (Transforman) serta analisis plasmid rekombinan.

### 2. Vektor

Vektor merupakan molekul DNA yang dapat ditempatkan dalam suatu sel dan digunakan sebagai pembawa (*carrier*) DNA asing pada sel tersebut. Vektor harus memiliki kemampuan untuk bereplikasi secara mandiri dalam sel bakteri sehingga tidak perlu diinsersi pada genom bakteri. Vektor memiliki setidaknya satu *selectable marker*, hal ini agar kita dapat mengidentifikasi keberadaan vektor tersebut dalam sel bakteri (Hyde, 2009). Marka atau penanda selektif (*Selectable marker*) berfungsi mengidentifikasi sel bakteri yang

mengandung plasmid serta membedakan plasmid yang mengandung hasil kloning suatu DNA asing (Hyde, 2009). Marka yang paling umum digunakan adalah suatu elemen yang memungkinkan bakteri resisten terhadap antibiotik tertentu seperti *Ampicillin*, *Kanamycin* atau *Tetracycline* (Meyers, 1995).

Vektor *pRHA* disandi *pJExpress804:77539* dengan ukuran sebesar 5008bp (Andriani *et al.*, dalam Hariyatun, 2014) merupakan suatu promoter (*rhaS-P<sub>rha</sub>*) dengan sistem dual regulation (Balbas, 2004). Hal paling penting dan paling menguntungkan dari vektor ekspresi dengan sistem regulasi ganda (*dual regulation*) sebagai plasmid dan untuk ekspresi gen adalah ketika tidak ada induksi, maka vektor ini hanya merupakan *single-copy plasmid* (Balbas, 2004), dengan kata lain tidak terekspresi sehingga residunya teregulasi lebih ketat jika dibandingkan dengan vektor konvensional dengan ekspresi *multicopy*.

### 3. *rhaT* Promoter

Regulasi operon RHA mengacu pada regulasi dari regulon L-rhamnosa *E.coli* di bawah kontrol *pRHA* dan gen-gen regulator terkait seperti *rhaS* dan *rhaR* diinduksi oleh gula rhamnosa dan direpresi oleh keberadaan D-glukosa (Tobin & Schleif, 1987 dalam Hariyatun, 2014). Mekanisme induksi tersebut melibatkan *rhaT* sebagai sistem transpor dari luar dan ke dalam sel, kemudian L-rhamnosa diikat oleh *rhaR* dan *rhaS* sehingga kedua protein tersebut mengalami perubahan struktural yang memungkinkan terjadinya aktivasi transkripsi

### 4. Peptida Sinyal *pelB*

Peptida sinyal berperan dalam menghantarkan protein dari sitoplasma ke periplasma. Pada *E.coli*, protein rekombinan dihantarkan ke periplasma dengan memfusikan peptida sinyal pada N-terminalnya (Singh *et al.*, 2013). Sekresi protein rekombinan ke periplasma lebih menguntungkan dibandingkan dengan produksi intraseluler, yakni meningkatkan aktivitas biologis, stabilitas produk lebih tinggi serta ketepatan N-terminal (ujung N) dari peptida yang terekspresi (Mergulhao *et al.*, 2005).

## C. METODE

Rancangan penelitian dalam penelitian ini meliputi tahap konstruksi vektor rekombinan terdiri dari isolasi gen target, rekayasa vektor, kloning dan transformasi.

### 1. Pembuatan Medium Luria Bertani (LB) Cair dan Agar

Medium Luria Bertani Agar dibuat menggunakan LB Miller yang mengandung 10 g tripton, 10 g Sodium Klorida, 5 g Yeast Extract dan 15 g agar. LB Agar 100 ml dibuat dengan melarutkan 4 g LB agar Miller dalam 100 mL aquades. Medium cair (*broth*) dibuat dengan mencampurkan 2,5 g LBB Miller dengan 100 mL aquades. Bubuk LBB Miller terdiri dari 10 g tripton, 10 g Sodium Klorida dan 5 g *yeast extract*. Campuran dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Medium disterilkan

dengan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

*Ampicillin* ditambahkan pada media yang telah disterilkan dan siap dipakai. Media *broth* dapat ditambahkan *Ampicillin* setelah dingin, namun untuk media agar perlu dipanaskan terlebih dahulu hingga cair keseluruhan kemudian ditunggu sampai suhu sekitar 40 °C (jangan sampai kental) lalu ditambahkan *Ampicillin*. Suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan aktivitas *Ampicillin*.

## 2. Pembuatan Sel Kompeten

Stok gliserol bakteri *E.coli* DH5 sebanyak 20 uL diinokulasikan ke dalam 2 mL medium LBB. Kultur diinkubasi pada *shaker* 37 °C selama semalam. Selanjutnya kulturover *night* diambil sebanyak 1 mL dan diinokulasikan ke dalam 50 mL LBB. Kultur diinkubasi selama 2,5 jam (150 menit) pada suhu 37 °C pada *shaker* dengan kecepatan 150 – 200 rpm. Kultur yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi. Hasil sentrifugasi berupa pellet ditambahkan 2 mL TSS sementara supernatant dibuang. Langkah selanjutnya adalah membagi pellet sebanyak 200 µL ke *falcon* 15 mL.

## 3. Transformasi Sumber Plasmid *pRHA* ke Sel Kompeten *E.coli* TOP'10

Prosedur transformasi dilakukan sesuai dengan Chung *et al.*, (1989). Plasmid sebanyak 2 µL ditambahkan pada *falcon* yang berisi 200 µL sel kompeten *E.coli* TOP'10 sambil dikocok sebentar kemudian direndam dalam es selama 20 menit. Langkah selanjutnya adalah *heat shock* pada suhu 42 °C selama 45 detik sambil digoyang setiap interval 15 detik. Perlakuan selanjutnya adalah direndam dalam es selama 10 menit. LBB ditambahkan sebanyak 800 µL sehingga volume total adalah 1 mL. Inkubasi dilakukan selama 60 menit, kemudian kultur ditumbuhkan dengan metode *pour plate* pada medium LB agar yang mengandung *Ampicillin*.

## 4. Isolasi Plasmid

Isolasi plasmid dilakukan sesuai protokol produsen *QIAGEN* menggunakan *Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Midi Kit*.

## 5. Elektroforesis Gel Agarosa dan Visualisasi UV

Agar disiapkan sebanyak 1 g dan dicampur dengan TAE 1% sebanyak 100 ml kemudian dipanaskan di oven hingga mendidih. EtBr sebanyak 5 µL ditambahkan saat agar masih panas dan dilakukan di ruangan asam, dikocok agar campuran homogen. Sisir dipasang pada cetakan gel, kemudian agar dituang dan ditunggu hingga dingin dan memadat.

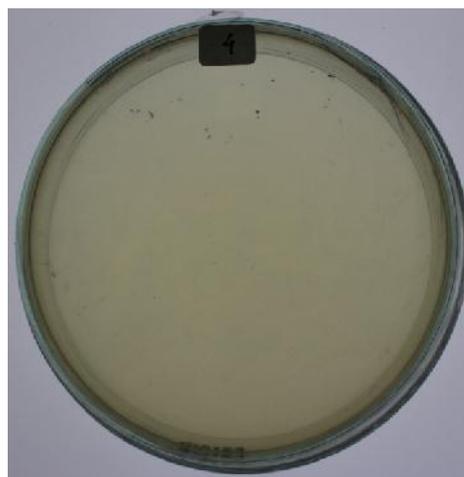
Sampel ditambahkan 1 µL *loading dye* kemudian dimasukkan ke sumuran gel. Elektroforesis dilakukan selama 50 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi UV *transluminator*.

## D. HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbanyakan vektor *pRHA* merupakan langkah awal menghasilkan koloni tumbuh pada medium yang mengandung *Ampicillin* seperti yang diperlihatkan pada Gambar 1.1. TOP'10 yang telah ditransformasi dengan sumber vektor *pRHA* tumbuh dengan baik pada media dengan penambahan *Ampicillin*.



Gambar 1.1 *E.coli* TOP'10 150 µL pada LB *Ampicillin*



Gambar 1.2 Kontrol negatif sel kompeten *E.coli* TOP'10 pada media *Ampicillin*

Kemampuan resistensi terhadap keberadaan *Ampicillin* pada medium merupakan bentuk ekspresi dari gen *Amp<sup>r</sup>* yang terdapat pada vektor *pRHA*. Hal ini menandakan bahwa plasmid vektor telah berhasil masuk ke dalam sel *E.coli* TOP'10 dan mampu terekspresi. Proses inkubasi dilakukan selama 16 jam pada suhu 37 °C, perlakuan yang sama dilakukan pada kontrol transformasi. Kontrol transformasi menggunakan sel kompeten *E.coli* TOP'10 diperlihatkan oleh Gambar 1.2 dan 1.3 Sel kompeten merupakan sel yang tidak ditransformasi dengan vektor *pRHA*.

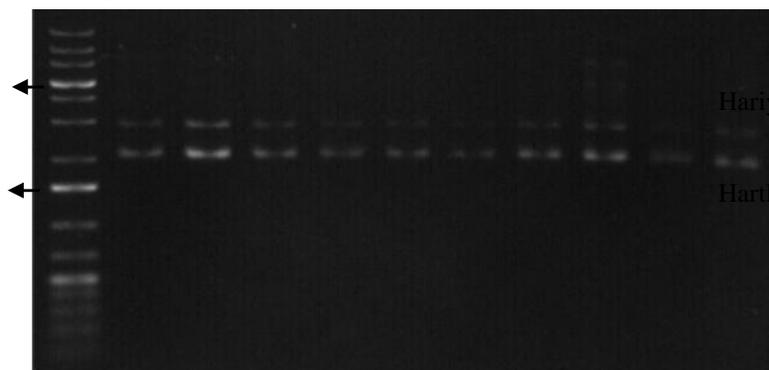


Gambar 1.3 Kontrol positif sel kompeten *E.coli* TOP'10 pada media *non-Ampicillin*

Gambar 1.2 merupakan kontrol negatif sel kompeten *E.coli* TOP'10 menunjukkan tidak ada koloni yang tumbuh pada medium *Ampicillin*. Hal ini berarti bahwa sel kompeten yang digunakan memang tidak memiliki kemampuan resistensi terhadap keberadaan *Ampicillin*. Hal yang berbeda terlihat pada cawan petri yang berisi media non – *Ampicillin* (Gambar 1.3) terlihat pertumbuhan sel kompeten *E.coli* TOP'10 yang baik dengan kepadatan yang tinggi pada media. Hal ini berarti tidak ada masalah pada sel kompeten *E.coli* TOP'10 yang digunakan.

Gen *Amp<sup>r</sup>* pada vektor menyebabkan bakteri dapat tumbuh pada media yang mengandung *Ampicillin* karena terjadi sekresi *-lactamase* mengakibatkan *Ampicillin* terdegradasi, sehingga bakteri dapat tumbuh. Pembuktian berhasilnya transformasi juga dilakukan dengan mengisolasi vektor lalu dilakukan gel elektroforesis. Hasil elektroforesis diperlihatkan pada Gambar 1.4. Sumber vektor *pRHA* diisolasi dari *E.coli* TOP'10 menggunakan Kit dari produsen *QIAGEN*. Keberadaan plasmid pada gel elektroforesis ditunjukkan dengan adanya pita – pita berwarna putih cerah pada saat divisualisasi dengan sinar UV menggunakan *Gel doc*. Pada Gambar 1.4 terlihat adanya pita DNA *ladder* 1Kb yang berfungsi sebagai marker untuk mengetahui ukuran suatu pita DNA. Sumur ke - 2 hingga ke - 11 pada gel terisi pita – pita plasmid. Pada setiap sumur terlihat jelas dua pita berwarna putih cerah, namun terdapat pita lain pada bagian atas. Pita plasmid terlihat jelas dan tebal menunjukkan bahwa konsentrasi plasmid hasil isolasi tinggi.

DNA *ladder* 1Kb (Marker) Pita plasmid sumber vektor *pRHA* uncut (sumur 2 – 11)



1500 bp  
500 bp  
Gambar 1.4 Visualisasi hasil elektroforesis sumber vektor *pRHA E.coli* TOP'10 dengan DNA *ladder* 1Kb

Vektor diperbanyak dan diisolasi dari bakteri sehingga hasil isolasinya diasumsikan tidak sepenuhnya linear, menurut Hartl dan Ruvolo (2013) plasmid pada organisme prokariotik terdapat dalam 3 bentuk yaitu sirkuler, linear maupun *supercoil*. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 1.4 plasmid terlihat bertumpuk dan belum terkonsentrasi pada satu pita saja. Untuk menggunakan vektor hasil transformasi tersebut untuk aplikasi molekuler lainnya dibutuhkan proses – proses molekuler lanjutan yakni proses restriksi atau pemotongan plasmid dengan enzim tertentu, purifikasi plasmid agar terbebas dari kontaminan, serta proses ligasi untuk rekombinasi dengan gen tertentu.

## E. SIMPULAN

Telah dilakukan transformasi dan kloning vektor *pRHA* pada *E.coli* TOP'10 dengan metode *heat – shock*. Hasil isolasi plasmid diverifikasi dengan gel elektroforesis dan diperoleh pita plasmid dengan konsentrasi yang tinggi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.rer.nat. Wien Kusharyoto selaku kepala laboratorium Rekayasa Genetika dan Desain Protein LIPI atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium Bioteknologi LIPI, Cibinong serta arahan dan bimbingan beliau selama berlangsungnya penelitian. Penulis juga berterima kasih atas bimbingan Dr.rer.nat. Anto Budiharjo, M.Biotech dan Dr.Drs.. Wijanarka, M.Si selama proses penulisan.

## REFERENCES

- Balbas, P. 2004. *Methods in Molecular Biology : Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols* (2<sup>nd</sup>). New Jersey : Humana Press Inc.
- Brown, T.A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*.UK : Wiley – Blackwell
- Chung, C.T., Suzanne L.N., Roger H.M. 1989. One-step Preparation of Competent *Escherichia coli* : Transformation and Storage of Bacterial Cells in The Same Solution. *Proc.Natl.Acad.Sci*86 : 2172-2175
- Haryatun. 2014. Kloning dan Ekspresi Gen Penyuka Fragmen Protein Intimin dari *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157:H7. Skripsi. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Hartl, D.L., and Maryellen R. 2013. *Genetics Analysis of Genes and Genomes*.USA : Jones & Bartlett Learning

- Hyde, D.R. 2009. Introduction to Genetic Principle. New York : McGraw-Hill Companies Inc.
- Lodge, J., Pete L., Steve M. 2007. Gene Cloning Principles and Applications. UK : Taylor and Francis Group
- McLennan, A., Andy B., Phil T., Mike W. 2013. Molecular Biology (4<sup>th</sup>). New York : Taylor & Francis Group
- Mergulhao, F.J.M., D.K. Summers, G.A. Monteiro. 2005. Recombinant Protein Secretion in *Eschericia coli*. *Biotechnology Advances* 23 : 177-202
- Meyers, R.A. 1995. Molecular Biology and Biotechnology. New York : Wiley-VCH
- Singh, P., Likhesh S., S.R. Kulothungan, Bharat V.A., Ravindra S.P.i, P.S.S. Ali, Beena K., Raghavan V. 2013. Effect of Signal Peptide on Stability and Folding of *Eschericia coli* Thioredoxin. *PLoS ONE* 8(5)

