

**DETEKSI PLASMID PIJ 702 PADA *Streptomyces Lividans* REKOMBINAN YANG
DISIMPAN SELAMA 5 TAHUN PADA MATRIKS "DIATOME" DENGAN
PENAMBAHAN TIOSTREPTON**

Mardiyanto
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Telah dilakukan pendeteksian plasmid rekombinan yang berguna dalam proses rekayasa genetik Streptomyces yang tergabung ke dalam Keluarga Actinomycetaceae sebagai penghasil metabolit sekunder aktif yang paling penting sampai saat ini. Pada industri penghasil metabolit sekunder menggunakan Streptomyces hasil rekayasa genetik dan disimpan dalam bentuk suspensi spora. Pendeteksian plasmid yang telah diisolasi secara lisis alkali dengan bantuan kolon pemisahan Qiagen^R dilakukan secara Elektroforesis gel agarosa dan Spektrometri UV-Vis. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa penyimpanan Streptomyces lividans rekombinan pada suhu kamar dengan penambahan tiostrepton selama 5 tahun masih terdeteksi plasmid PIJ 702 dalam inangannya.

I. PENDAHULUAN

Sampai saat ini Actinomycetes masih menjadi penghasil metabolit terpenting dari segi kualitas maupun kuantitas karena lebih dari 10.000 jenis senyawa metabolit aktif berasal dari Actinomycetes. Streptomyces termasuk ke dalam kelompok Actinomycetes seperti juga halnya dengan Mycobacterium, Nocardia, Thermoactinomyces, Sporothermoactinomyces, dan lain-lain. Lima puluh tahun yang lalu sudah dimulai proses rekayasa biosintesa senyawa-senyawa aktif dari Streptomyces tetapi belum disentuh oleh

teknologi rekayasa genetik. Dengan berkembangnya ilmu biologi molekuler dan teknik rekayasa genetik juga sudah semakin majunya maka tidak heran rekayasa genetika dalam rangka merekayasa reaksi biosintesa suatu senyawa aktif dari Streptomyces juga berkembang.

Rekayasa genetik yang dilakukan pada Streptomyces umumnya didanai oleh Industri-industri senyawa obat dan tidak heran kalau hasil rekayasa itu tidak akan pernah dijumpai pada publikasi ilmiah. Walaupun sekarang sudah digunakan Streptomyces generasi terbaru tapi gen apa

yang direkayasa dan marka penyimpanan yang digunakan tidak jelas.

Dari penelitian terdahulu yang berhasil merekayasa gen yang terlibat dalam reaksi biosintesa Senyawa turunan terbaru dari golongan tetrasiklin (Mardiyanto, Purwantini, 2002) timbul masalah dalam penyimpanan *Streptomyces* hasil rekayasa tersebut. Mengingat susahnya pekerjaan manipulasi genetik *Streptomyces* dibandingkan *E. coli*. Penggunaan vektor ekspresi akan dibuang secara alamiah oleh *Streptomyces* kalau penyimpanannya tidak tepat untuk mengatasi masalah ini maka perlu dicari suatu metode yang tepat dalam penyimpanan *Streptomyces* hasil rekayasa.

Ada metode standar yang harus diketahui dalam penyimpanan, tetapi marka antibiotik tiostrepton yang ditambahkan dalam media penyimpanan mempunyai sifat kimia dan fisika yang stabil pada suhu ruangan tidak diketahui sampai kapan kestabilan plasmid itu terjaga. Makanya dalam rangkaian penelitian ini perlu dicari juga informasi kestabilan plasmid pIJ 702 sebagai vektor ekspresi.

II. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Streptomyces lividans rekombinan yang digunakan diperoleh dari Endang Purwantini, Ph.D., atas pemberian DR. Hop Wood di pusat penelitian *Streptomyces* John Innes Foundations dan *Streptomyces lividans* rekombinan tersimpan dalam matriks "diatome" dengan orientasi waktu 5 tahun dilakukan oleh Endang Purwantini, Ph.D sejak dari "Iowa USA University" tahun 1996 sampai di Departemen Farmasi ITB tahun 2001.

2.2 Perbanyakkan *Streptomyces* Pada Media YEME-Tiostrepton

Proses inokulasi *Streptomyces* dari matriks "diatome" pada media YEME-tiostrepton padat dilakukan dengan penambahan senyawa induksi glukosa 1,5%. Hasil inokulasi disimpan pada suhu 30 °C selama 48 jam. Spora yang tumbuh dipilih spora yang dilingkari oleh pigmen warna sebagai senyawa marka lainnya. Spora dijadikan suspensi dengan bahan pensuspensi buffer fosfat-NaCl.

2.3 Isolasi Plasmid pIJ 702

Suspensi spora dimasukkan ke dalam media cair YEME-tiostrepton lalu diinkubasi dengan agitasi selama 48 jam. Sel dipanen dengan sentrifuga SorvalTWN 8000 rpm lalu dicuci dengan buffer sukrosa samapi bersih dengan sentrifuga SorvalTWN 10.000 rpm sebanyak tiga kali. Untuk mengikis peptidoglikan dari *Streptomyces* ditambahkan lisozim 30 µg/ml. Ditambahkan larutan 1 inkubasi 5 menit dan ditambahkan larutan 2 dan diinkubasi 15 menit suhu 70 °C. Disiapkan box-ice lalu tambahkan larutan 3 dingin dan diinkubasi dingin selama 15 menit. Hasil inkubasi dingin disentrifuga 4 °C kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Ambil lapisan supernatan dan endapkan pada kolom Qiagen, endapan di kolom dielusi dengan lalurlutan TE buffer. Tampung hasil elusi dan siap untuk dilakukan deteksi plasmid dengan Elektroforesis agarosa.

2.4 Deteksi Plasmid dengan Elektroforesis Gel Agarosa dan Spektro UV-Vis

Visualisasi pita-pita plasmid dengan pita DNA marka dilakukan dengan perendaman EtBr dan diekspos dengan sinar UV λ320 nm. Untuk memastikan bahwa itu plasmid adalah

memperkirakan migrasi pIJ 702 kosong dengan pIJ 702 rekombinan yang kosong akan lebih ke bawah. Untuk memastikan ukuran pIJ 702 rekombinan dilakukan pemotongan plasmid dengan enzim Bam H 1 lalu dengan Regresi linear pita standar dari marka DNA I kb ladder sebagai kurva standar diekstrapolasikan ukuran pita plamid yang dideteksi. Metoda UV-Vis untuk memastikan kemurnian plasmid dan kuantitas dari plasmid pada daerah panjang gelombang 260 nm untuk membandingkannya dengan protein yang juga ikut terisolasi maka dipakai daerah 280 nm untuk protein.

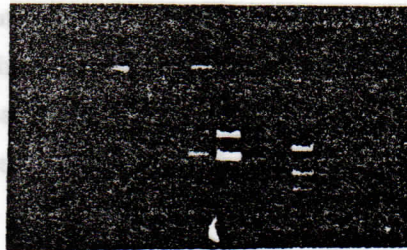
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbanyakkan koloni diperlukan untuk pembuatan suspensi spora, karena suspensi spora adalah material yang paling ideal untuk dimasukkan ke dalam media cair dibandingkan koloni yang dicongkel dengan jarum ose. Koloni yang diconkel dari media padat masih berupa campuran misellium demham spora dan umumnya masih berkoloni secara kompak sehingga memerlukan waktu yang lama untuk beradaptasi dan berkembang biak pada media

yang baru yaitu media cair. Koloni yang dipilih adalah koloni yang disekelilingnya terdapat pigmen warna coklat yaitu pigmen warna melanin.

Hasil isolasi dengan metode lisis alkali harus dikombinasi dengan metode

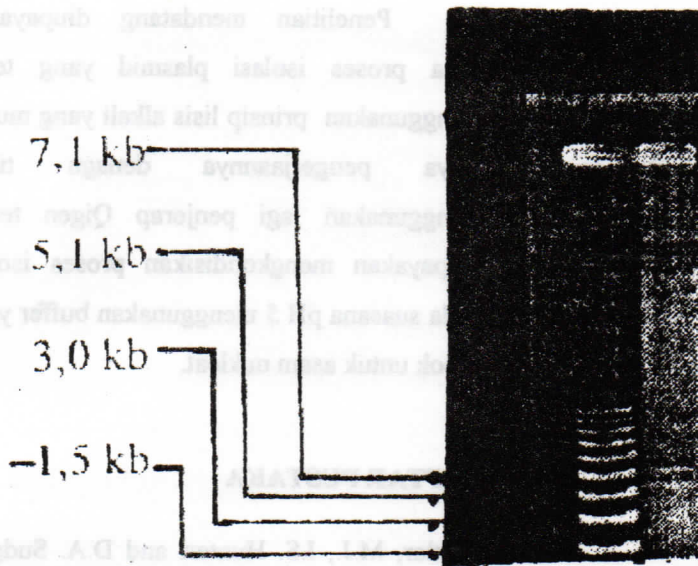
penjerapan pada kolom maksudnya adalah untuk memlimitasi gangguan visualisasi oleh melanin sebagai pigmen warna. Dari tiga pita yang diperoleh merupakan ciri-ciri dari pita plasmid yang masih berbentuk sirkuler sehingga menghasilkan 3 konformasi.



Gambar. 1: Pita plasmid sirkuler dalam 3 konformasi

Setelah dipotong dengan enzim restriksi *Bam* H1melihatkan ukuran yang benar yaitu 7,2 kb artinya memiliki 7200 pasangan basa dengan menggunakan marka DNA 1 kb ladder. Hasil

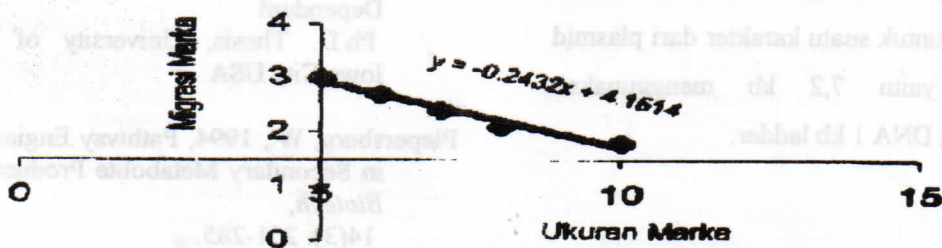
yang diperoleh setelah melakukan pembuatan kurva linear dari stradar 1 kb ladder seperti yang terlihat pada gambar 2.



Gambar.2: Pita plasmid linear *Bam* H1 dengan marka DNA 1 kb Ladder

Pita-pita dari marka yang berjumlah 9 pita itu adalah pita standar yang bisa dibuatkan kurva kalibrasinya antara jarak migrasi dengan

ukuran fragmen standar maka dihasilkan persamaan garis $Y = -0,2432X + 4,1514$ dengan koefisien korelasi 0,973.



Gambar. 3: Kurva kalibrasi pita DNA standar

Dengan memasukkan nilai migrasi pita plasmid yang telah dipotong dengan enzim restriksi BamH 1 maka didapat ukuran plasmid 7,2 kb dan itu adalah ukuran yang benar untuk sebuah plasmid pIJ 702 pada *Streptomyces lividans* rekombinan. Hasil pemeriksaan kemurnian plasmid hasil isolasi adalah 98% adalah angka yang bagus untuk sebuah proses isolasi Plasmid *Streptomyces* cara manual digabung dengan kolom Qiagen^R.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil deteksi plasmid secara Elektroforesis agarosa ternyata plasmid pIJ 702 masih terdapat dalam *Streptomyces lividans* rekombinan yang disimpan pada matriks "diatome" dengan penambahan tiostrepton selama 5 tahun. Tingkat kemurnian plasmid adalah 98% dan ukuran yang benar untuk suatu karakter dari plasmid pIJ 702 yaitu 7,2 kb menggunakan pembanding DNA 1 kb ladder.

Saran

Penelitian mendatang diupayakan pada proses isolasi plasmid yang tetap menggunakan prinsip lisis alkali yang murah biaya pengerjaannya dengan tidak menggunakan lagi penjerap Qigen tetapi diupayakan mengkondisikan proses isolasi pada suasana pH 5 menggunakan buffer yang cocok untuk asam nukleat.

DAFTAR PUSTAKA

- Buttler, M.J., I.S. Hunter, and D.A. Sudgen, 1999, Molecular Cloning of Resistance Genes and Architecture of a Linked Gene Cluster, *Mol.Gen. Genet.*, 215:231-238.
- Hopwood, D.A., 1995, *Genetics Manipulation of Streptomyces*, The John Innes Foundations, Norwich, 12-25.
- Purwantini, E., 1996, Purification of a Novel Enzim Glucose Dehidrogynase F420 Dependent Ph.D. Thesis, University of Iowa, Iowa City USA.
- Piepersberg, W., 1994, Pathway Engineering in Secondary Metabolite Producing, *J. Biotech*, 14(3): 251-285.