

Analisis fragmen DNA dari bakteri *Pseudomonas fluorescens* sebelum dan sesudah imobilisasi dalam κ -karagenan

Syarif Hamdani, Isma Oktadiana, Dewi Astriany

Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (STFI), Jl. Soekarno-Hatta No.354 Bandung
Corresponding author email: syarifhamdani@stfi.ac.id

Abstrak

Imobilisasi merupakan pengurungan fisik atau lokalisasi bakteri utuh dalam lingkungan tertentu untuk memaksimalkan aktivitas biokatalis yang diinginkan. Imobilisasi mampu menyediakan bakteri sebagai biokatalis dalam konsentrasi tinggi sehingga dapat meningkatkan efisiensi serta produktivitas. Penelitian ini dilakukan untuk mengamati efek imobilisasi terhadap fragmen DNA bakteri setelah penyimpanan dingin selama lima bulan, bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas fluorescens* yang diimobilisasikan pada κ -karagenan lokal yang berasal dari perairan Karimun Jawa. Pengamatan dilakukan terhadap fragmen DNA setelah direstriksi oleh enzim EcoRI dan dianalisis menggunakan elektroforesis gel. Bakteri diimobilisasi dalam karagenan pada konsentrasi 1% dan 2% (b/v). Hasil menunjukkan bahwa DNA *P.fluorescens* memberikan fragmen identik antara bakteri terimobilisasi dan tanpa imobilisasi.

Kata Kunci : Imobilisasi, *Pseudomonas fluorescens*, Karagenan, Elektroforesis Gel.

Analysis of Pseudomonas fluorescens's DNA fragments before and after immobilize in κ -carrageenan

Abstract

Immobilization is physical confinement or localization of bacteria in a particular environment to maximize biocatalyst activity. Immobilization provide bacteria as biocatalysts in high concentrations in order to increase efficiency and productivity. This study was conducted to observe the effect of immobilization to bacterial DNA fragments after cool storage for five months, bacteria used was Pseudomonas fluorescens that immobilized in local κ -carrageenan from Karimun Jawa. Observations conducted to DNA fragments after being restricted by EcoRI enzymes and analyzed using gel electrophoresis. The bacteria were immobilized in carrageenan on concentrations of 1% and 2% (w / v), respectively. Result shown that P.fluorescens's DNA gave similar fragments between immobilized and without immobilized.

Keywords: *Immobilization, Pseudomonas fluorescens, Carrageenan, Gel Electrophoresis.*

Pendahuluan

Imobilisasi bakteri merupakan metode pengurungan fisik atau lokalisasi bakteri utuh dalam lingkungan tertentu untuk memaksimalkan aktivitas biokatalis yang diinginkan (Karel *et al.*, 1985). Berbagai jenis metoda imobilisasi telah digunakan secara luas tidak hanya di bidang bioteknologi, tetapi juga di bidang farmasi,

lingkungan, makan dan industri biosensor (Anal, 2007).

Imobilisasi harus dilakukan dengan menggunakan matriks untuk mempertahankan bakteri. Matriks imobilisasi yang ideal dapat berfungsi pada suhu ambien, tahan terhadap cekaman air limbah yang meliputi kontaminasi air dan turbiditas, dan dapat membiarkan aliran

nutrien dan oksigen mengalir melalui matriks tersebut. Matriks juga dapat mencegah aliran sel di dalam matriks itu sendiri (Fleming, 2004).

Metode jebakan merupakan metoda imobilisasi yang sangat populer dalam kalangan peneliti dan perusahaan bidang mikrobiologi. Proses imobilisasi telah banyak ditemukan jenis matriks yang dapat digunakan dalam metode penjebakan, salah satunya yaitu pemanfaatan karagenan (Wijffels *et al.*, 2007). Metode ini digunakan karena bakteri terimobilisasi lebih mudah dikendalikan, matriks stabil dan tidak toksik (Karel *et al.*, 1985). Pada saat ini telah banyak ditemukan jenis matriks yang dapat digunakan dalam metode jebakan, diantaranya agar, alginat, karagenan, selulosa dan turunannya (Ramakrishna, 2010).

Pada penelitian ini di gunakan matrik pendukung κ -karagenan yang berasal dari alga merah yang banyak terdapat di perairan Indonesia (Anggadiredja, 2010), karagenan dari sumber ini belum diketahui kemampuannya sebagai matrik penjerap dalam proses imobilisasi bakteri.

Karagenan adalah suatu nama umum untuk kelompok pembentuk gel polisakarida yang sangat kental yang didapat secara komersil dengan ekstraksi dari suatu spesies alga merah tertentu (*rhodophyceae*). Jenis karagenan yang umum digunakan sebagai matrik penjerap adalah karagenan dari jenis kappa yang memiliki kekuatan pembentukan gel yang lebih kuat dibandingkan dengan jenis iota dan gama (Rowe *et al.*, 2009).

Imobilisasi dengan menggunakan κ -karagenan dilakukan pada bakteri *Pseudomonas fluorescens*. *P.fluorescens* merupakan bakteri antagonis yang banyak dimanfaatkan sebagai agensia hayati untuk beberapa jamur dan bakteri patogen tanaman. Bakteri *P.fluorescens* mempunyai sifat sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), menghasilkan antibiotika yang dapat menghambat pertumbuhan patogen terutama dari golongan tulartanah, dan mempunyai kemampuan mengkoloni akar tanaman (Soesanto, 2011).

Bakteri pada kondisi terimobilisasi mendapatkan sumber nutrisi yang tidak optimal selama waktu penyimpanan sehingga memungkinkan terjadinya pola adaptasi yang mendorong terjadinya mutasi secara genetik. Keadaan ini yang menjadi dasar dari penelitian ini yaitu melalui analisis fragmen DNA menggunakan elektroforesis gel

Metode

Alat. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator (Memmert), autoklaf, oven (Memmert), *hotplate*, *microtube* dan tip (Biologix), *Laminar Air Flow* (Ersa Scientific), *vortex*, *consentrator* (Eppendorf), sentrifugator (Tomy MX-305®), alat elektroforesis gel (BioRad), *magnetic stirrer*, dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Bahan. Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas fluorescens* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB (Institut Teknologi Bandung). Bahan yang digunakan antara lain *Media Nutrient Agar* (Oxoid), κ -karagenan standar (Sigma Aldrich), κ -karagenan dari perairan Karimun Jawa (koleksi STFI), akuades, akuabides, NaCl 0,9 % (Widatra), isopropilalkohol, KCl, etanol 96 %, *TAE Buffer*, agarosa, *DNA Purification Kit* (Promega), *Restriction KIT* (Promega), *EcoRI* (Promega); *Elektrophoresis KIT: 1 kb DNA leader* (Thermo), *gel red* (Biotium), *loading dye*, *Nuclease Free Water* (Biotium).

Persiapan Bakteri *P.fluorescens* untuk Imobilisasi. Bakteri *P.fluorescens* dibiakkan pada media agar nutrien dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam, kemudian bakteri dibuat suspensi hingga diperoleh %T sebesar 25 %.

Imobilisasi Bakteri *P.fluorescens*. κ -karagenan dilarutkan terlebih dahulu dalam aquades dan disterilisasi pada suhu 121°C. Bakteri dimasukkan ke dalam larutan κ -karagenan dengan perbandingan 9 : 1 disertai dengan pengadukan pada suhu 40°C, kemudian ditambahkan larutan KCl dingin tetes demi tetes. Proses pengadukan dilanjutkan selama 20 menit sampai

terbentuk fase padat. Konsentrasi κ -karagenan yang digunakan adalah 1% dan 2%. (Suzana, 2004)

Pengujian Stabilitas Bakteri Terimobilisasi. Media nutrisi agar disiapkan ke dalam cawan petri, kemudian dilakukan penggoresan bakteri terimobilisasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan melakukan pengujian terhadap bakteri terimobilisasi berusia 1 dan 5 bulan.

Isolasi DNA Bakteri *P.fluorescens*. Hasil imobilisasi bakteri dalam jangka waktu lima bulan, selanjutnya dilakukan isolasi DNA *P.fluorescens* menggunakan *Kit Purification DNA*, dengan prosedur sebagai berikut hasil imobilisasi diambil sebanyak 1 mL dimasukkan dalam mikrotube, lalu disentrifugasi 16.000 x g selama 2 menit. Hasil sentrifugasi terdapat pellet dan supernatan. Buang supernatan dan hasil pellet ditambahkan 600 μ L lisis nukleus kemudian diresuspensi, lalu diinkubasi pada suhu 8°C selama 5 menit, kemudian dinginkan. Tambahkan 3 μ L *RNAse* lalu campurkan dan diinkubasi selama 37°C selama 15-60 menit, dinginkan. Tambahkan 200 μ L larutan protein, vortex kuat, lalu diinkubasi es selama 5 menit dan disentrifugasi 16.000 x g pada suhu 4°C selama 3 menit. Hasil supernatannya dipindahkan ke mikrotube yang sudah berisi 600 μ L isopropanol lalu campurkan. Kemudian hasilnya terdapat pellet dan ditambahkan 600 μ L etanol, sentrifugasi 16.000 x g pada suhu 4°C selama 2 menit. Hasil pellet dikeringkan pada konsentrator, lalu ditambahkan *DNA dehydration* dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 4°C. Prosedur yang sama dilakukan terhadap bakteri terimobilisasi yang sudah disimpan selama satu dan lima bulan. (Corkill, 2008)

Restriksi Enzim *EcoRI* dan Analisis DNA Secara Kualitatif. Dalam tabung mikrotube dimasukkan aquabides 16,3 μ L, 2 μ L *Buffer*, 0,2 μ L BSA, sampel DNA isolat 1,0 μ L, kemudian ditambahkan 0,5 μ L enzim restriksi *EcoRI*, lalu disentrifugasi beberapa detik dengan kecepatan 16.000 x g dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Hasil isolat DNA bakteri *P.fluorescens* yang

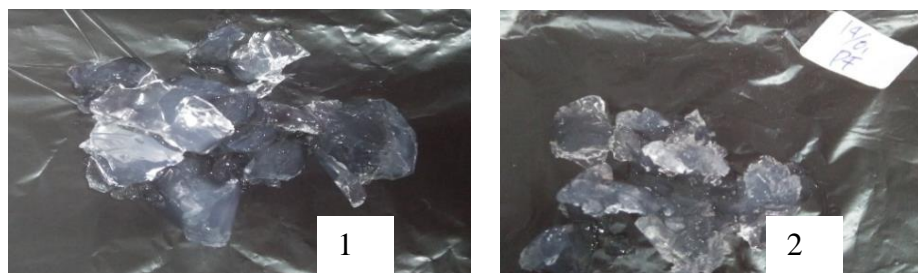
telah ditambahkan enzim *EcoRI*, kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1 % (b/v) (Martin, 1996). Tambahkan sampel DNA sebanyak 10 μ L, *loading dye* 1 μ L, *loading buffer* 2 μ L, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Hasil elektroforesis diamati menggunakan lampu UV.

Hasil dan Pembahasan

Persiapan Bakteri Untuk Imobilisasi. Pada persiapan untuk imobilisasi, bakteri yang digunakan yaitu *P.fluorescens* yang merupakan bakteri gram negatif bersifat aerob disuspensikan dengan aquadest hingga diperoleh %T sebesar 25 %.

Hasil Imobilisasi Bakteri *P.fluorescens*. Matriks pendukung imobilisasi yang digunakan yaitu matriks κ -Karagenan yang berasal dari perairan Karimun Jawa dan κ -Karagenan Sigma sebagai pembanding. Pada saat suhu diturunkan menjadi 40°C, polimer κ -Karagenan akan membentuk struktur pilinan ganda dan semakin bertambahnya bentuk heliks maka akan terbentuk agregat yang bertanggung jawab terhadap terbentuknya gel yang kuat sehingga bakteri dapat terjepit dalam matriks κ -karagenan (Fleming, 2004), penambahan bakteri dilakukan pada suhu ini untuk memastikan bakteri tetap hidup dan terjadi penjerapan dalam karagenan secara merata. Penambahan KCl bertujuan untuk meningkatkan kekuatan gel karena pada dasarnya κ -karagenan akan membentuk gel yang kuat dengan adanya kation-kation tertentu seperti K^+ , Rb^+ , dan Cs^+ yang berperan sebagai *gelling agent* (Glicksman, 1982).

κ -karagenan yang berasal dari Karimun Jawa menunjukkan stabilitas pembentukan gel yang serupa dengan κ -karagenan standar. κ -karagenan Karimun Jawa menunjukkan sifat *thermoreversible*, yaitu gel dapat mencair pada saat pemanasan dan membentuk gel kembali pada saat pendinginan Glicksman (1983), bertahan dalam jangka waktu penyimpanan selama 5 bulan. Secara visual κ -karagenan Karimun Jawa dengan konsentrasi 1 % dan 2 % ber-



Gambar 1. Bakteri terimobilisasi κ -karagenan Karimun Jawa

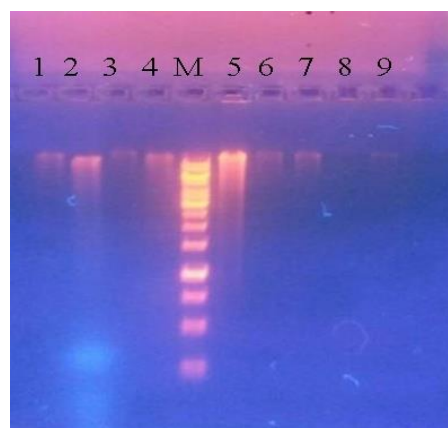
warna putih terang, strukturnya halus, dan tidak berbau, berbeda dengan κ -karagenan standar yang berwarna lebih coklat, kondisi ini tetap bertahan setelah penyimpanan selama 5 bulan pada suhu 4⁰C (gambar 1).

Uji Stabilitas Bakteri Terimobilisasi. Uji stabilitas bakteri terimobilisasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk dapat tetap hidup dalam matriks penjerap setelah disimpan setelah selang waktu pada suhu 4⁰C. Setelah penyimpan selama 5 bulan bakteri masih dapat hidup dan berkembangbiak secara optimal baik pada konsentrasi κ -karagenan 1 % dan 2 %, sebanding dengan bakteri yang terimobilisasi pada κ -karagenan standar.

Hasil Isolasi DNA Bakteri *P.fluorescens*. DNA hasil isolasi dari bakteri terimobilisasi pada pengujian dengan elektroforesis gel menunjukkan pita tanpa adanya fragmentasi, membuktikan DNA bakteri berhasil diisolasi dan dapat digunakan untuk proses tahapan selanjutnya (gambar 2).

Hasil Restriksi Enzim *EcoRI* dan Analisis DNA Secara Kualitatif. DNA bakteri hasil isolasi dipotong dengan penambahan enzim restriksi *EcoRI* dan diamati dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil visualisasi gel agarosa dibawah sinar UV memperlihatkan pita DNA yang terfragmentasi. Pola fragmen dari bakteri terimobilisasi pada κ -karagenan Karimun Jawa dengan konsentrasi 1% identik dengan yang terimobilisasi pada κ -karagenan standar, kedua fragmen ini pun identik dengan fragmen dari bakteri tanpa imobilisasi, hal ini menunjukkan tidak terjadi perbedaan pola pemecahan DNA dan hal ini pun menunjukkan tidak terdapat perbedaan

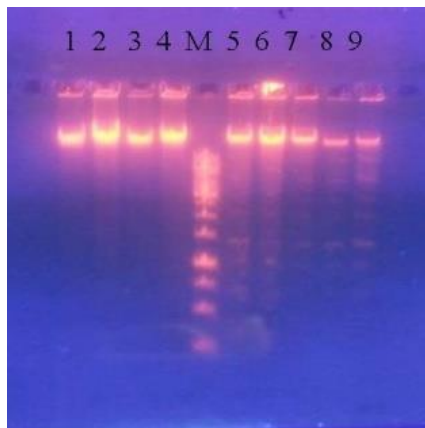
pola urutan basa. Pada bakteri terimobilisasi yang disimpan selama 5 bulan menunjukkan pola fragmen yang identik antara κ -karagenan Karimun Jawa dan standar walaupun pola fragmentasi tidak terlihat nyata pada setiap DNA (gambar 3).



Gambar 2. Hasil Restriksi Bakteri Terimobilisasi Tanpa *EcoRI*

Keterangan:

- 1 : κ -karagenan standar 1 % (5 bulan)
- 2 : κ -karagenan standar 2 % (5 bulan)
- 3 : κ -karagenan 1 % (5 bulan)
- 4 : κ -karagenan 2 % (5 bulan)
- M : Marker
- 5 : κ -karagenan standar 1 % (1 bulan)
- 6 : κ -karagenan standar 2 % (1 bulan)
- 7 : κ -karagenan 1 % (1 bulan)
- 8 : κ -karagenan 1 % (1 bulan)
- 9 : Non Imobilisasi



Gambar 3. Hasil Restriksi DNA dengan *EcoRI*

Keterangan:

- 1 : κ -karagenan standar 1 % (5 bulan)
- 2 : κ -karagenan standar 2 % (5 bulan)
- 3 : κ -karagenan 1 % (5 bulan)
- 4 : κ -karagenan 2 % (5 bulan)
- M : Marker
- 5 : κ -karagenan standar 1 % (1 bulan)
- 6 : κ -karagenan standar 2 % (1 bulan)
- 7 : κ -karagenan 1 % (1 bulan)
- 8 : κ -karagenan 1 % (1 bulan)
- 9 : Non Imobilisasi

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri *Pseudomonas fluorescens* yang diimmobilisasi dengan menggunakan karagenan lokal yaitu κ -karagenan Karimun Jawa dengan konsentrasi 1 % dan 2 % dapat digunakan untuk imobilisasi bakteri sebanding dengan κ -Karagenan standar. Hasil fragmen DNA menunjukkan pola fragmen yang identik yang menunjukkan urutan basa bakteri tidak berubah pada imobilisasi selama 5 bulan.

Daftar Pustaka

Anal, Kumar Anil dan Harjander Singh. (2007) : *Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics for Industrial Applications and Targeted Delivery*. India: Trends Food Science and Technology.

Anggadiredja, T., Zalnika, A., Purwoto, H., dan Istini, S. (2010): *Rumput Laut*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Corkill, G., Rapley, R. (2008): *The Manipulation of Nucleic Acids: Basic Tools and Techniques in Molecular Biomethods*, 2th Edition. USA: Humana Press.

Fleming, Dara L. (2004): *Evaluating Bacterial Cell Immobilization Matrices For Use In A Biosensor*. Virginia USA: Virginia Polytechnic Institute and State University.

Glicksman, M. (1982): *Red Seaweed Extracts (Agar, Carrageenan, Furcellaran) in Food Hydrocolloids*, Vol 2. Boca Raton: CRC Press.

Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R. (1985): *Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles*. USA: Chemical Engineering Science 40.

Martin, R. (1996): *Gel Elektrophoresis: Nucleic Acids*. Oxford: Bros Scientific Publisher Ltd.

Ramakrisna. S.V. and Prakasham, R. S., (2010): *Microbial Fermentations with Immobilized Cell*.

Rowe, R.C., Sheskey, P.J. and Quinn M., E. (2009): *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Lexi-Comp: American Pharmaceutical Association, Inc.

Soesanto L. (2008): *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.

Suzana, C. udia S. M., Claudia, M., a, M., Larissa Guedes Fiuacute za, M. C. o, & ra, T. dde S. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12(28), 4412–4418.

Wijffels, R.H. (2007): *Potential of Sponges and Microalgae for Marine Biotechnology*. Netherlands: Wageningen University.