

## ISOLASI DNA GENOM BAKTERI POTENSIAL PENGKELAT LOGAM BERAT KADMIUM DARI LIMBAH CAIR PENEPUNGAN AGAR

Agung Pambudiono<sup>1</sup>, Endang Suarsini<sup>2</sup>, Mohamad Amin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pendidikan Biologi, Program Magister, Pascasarjana, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang No. 5 Malang, Malang

<sup>2,3</sup>Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang No. 5 Malang, Malang, Malang  
E-mail korespondensi: pambioinfor07@gmail.com

**Abstrak:** Bakteri mampu mengembangkan berbagai mekanisme resistensi dari sifat toksik logam berat sehingga penggunaan bakteri sebagai agen bioremediasi logam berat mulai banyak dipelajari hingga tingkat molekuler. Berbagai analisis biologi molekuler memerlukan hasil isolasi DNA dengan tingkat kemurnian dan kualitas yang baik. Proses ekstraksi untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam analisis molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi DNA genom dari dua bakteri potensial pengkelat logam berat Kadmium (Cd) yang berasal dari limbah cair pengolahan tepung agar di Malang Jawa Timur. Isolasi DNA genom bakteri dilakukan dengan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*. Isolat DNA genom bakteri yang diperoleh diuji secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri dan secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarose. Hasil isolasi DNA genom pada bakteri B diperoleh hasil isolat DNA dengan konsentrasi sebanyak 1873,1 ng/μl dengan tingkat kemurnian (A260/280) sebesar 2,04, sedangkan pada bakteri C diperoleh konsentrasi sebanyak 511,6 ng/μl dengan tingkat kemurnian (A260/280) sebesar 2,14. Hasil uji secara kualitatif menunjukkan bahwa panjang DNA genom yang berhasil diisolasi memiliki ukuran lebih dari 10000 bp baik pada sampel bakteri B maupun bakteri C.

**Kata Kunci:** analisis molekuler, isolasi DNA, bakteri potensial, kit DNA

### PENDAHULUAN

Penerapan bioremediasi untuk mengatasi masalah pencemaran berbagai polutan termasuk logam berat saat ini mulai mendapatkan perhatian. Saat ini penggunaan bakteri sebagai agen bioremediasi logam berat mulai banyak dipelajari (Krishna *et al.*, 2012, Ahemad & Malik, 2012, Kumar *et al.*, 2012). Para ilmuwan terus berusaha meningkatkan efektivitas penggunaan bakteri tersebut dengan mempelajarinya hingga tingkat molekuler. Kajian hingga tingkat molekuler dapat memberikan informasi yang lebih mendalam untuk mendukung upaya bioremediasi.

Kajian secara genomik memungkinkan untuk mengidentifikasi gen dan jalur metabolik yang digunakan organisme bioremediator untuk menghilangkan polutan. Proses bioakumulasi logam berat pada bakteria didukung oleh sintesis molekul protein berat rendah yaitu metallothionein (Chojnacka, 2010). Protein metallothionein pada eukariot dikode oleh lokus *smt*. Gen *smtA* merupakan segmen yang mengkode MT kelas II pada prokariot (Shi *et. al.*, 1992), sedangkan *smtB* mengkode represor dari transkripsi *smtA* (Huckle *et. al.*, 1993). Analisa secara molekuler yang melibatkan DNA genom bakteri diperlukan untuk mengkaji lebih jauh tentang keberadaan dan regulasi gen-gen tersebut.

Berbagai teknologi analisis DNA diawali dengan tahapan utama yaitu isolasi DNA (Fatchiyah, 2011). Proses ekstraksi untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam analisis molekuler (Restu *et al.* 2012). Berbagai analisis biologi molekuler memerlukan hasil isolasi DNA dengan tingkat kemurnian dan kualitas yang baik. DNA hasil isolasi harus terbebas dari berbagai kontaminan seperti protein dan RNA yang dapat mengganggu berlangsungnya proses PCR. Oleh karena itu, metode isolasi DNA yang tepat sangat diperlukan untuk mendapatkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Berbagai teknik ekstraksi DNA telah dikembangkan dari prinsip dasar sehingga saat ini muncul berbagai teknik ekstraksi dan purifikasi DNA dalam bentuk kit yang prosesnya akan lebih mudah, cepat, dan sederhana.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi DNA genom dari dua bakteri potensial pengkelat logam berat Kadmium (Cd) yang berasal dari limbah cair pengolahan tepung agar di Malang Jawa Timur. Hasil penelitian ini merupakan dasar untuk penelitian selanjutnya serta diharapkan dapat dijadikan referensi untuk penelitian berikutnya.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium bioteknologi Universitas Negeri Malang dan Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Januari hingga Februari 2016. Isolat bakteri potensial pengkelat logam berat diperoleh dari penelitian pendahuluan yang berhasil mengisolasi empat isolat bakteri gram negatif yang potensial menurunkan kandungan logam berat Cd pada limbah cair penepungan agar di Lawang, Jawa Timur. Pada penelitian ini digunakan dua isolat bakteri yang paling potensial yaitu isolat B dan C. Peralatan yang digunakan antara lain tabung sentrifugasi, mikropipet, mikrotip, *freezer*, vortex, mesin sentrifugasi, *GD column*, *collection tube*, inkubator, kertas *parafilm*, *UV box*, seperangkat alat elektroforesis, dan spektrofotometer UV-Vis. Bahan yang diperlukan antara lain kultur murni bakteri, ddH<sub>2</sub>O, proteinase K, buffer TE, bahan dari *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*, dan gel agarose 1%.

Proses isolasi DNA pada penelitian ini dilakukan mengikuti protokol standar kit dari *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*. Secara umum tahapan yang dilakukan ialah persiapan sampel, lisis, pengikatan DNA, pencucian DNA, dan elusi DNA. Tahap persiapan sampel bakteri gram negatif dilakukan dengan prosedur sebagai berikut. Sekitar  $1 \times 10^9$  sel bakteri dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifius ukuran 1.5 ml. Dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 x g. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Ditambahkan *GT Buffer* sebanyak 180 µl dan pellet dilarutkan kembali dengan menggunakan vortex atau pipet. Ditambahkan *Proteinase K* sebanyak 20 µl (pastikan ddH<sub>2</sub>O telah ditambahkan sebelumnya). Diinkubasi pada suhu 60° C minimal selama 10 menit. Selama inkubasi, tabung dibalik setiap 3 menit.

Pada tahapan lisis, ditambahkan 200 µl *GB Buffer* ke dalam sampel dan dicampur hingga merata dengan cara divortex selama 10 detik. Diinkubasi pada suhu 70° C minimal selama 10 menit. Selama inkubasi, tabung dibalik setiap 3 menit. Selanjutnya pada tahap pengikatan DNA, ditambahkan 200 µl *absolute ethanol* pada lisate sampel dan dengan segera dicampur dengan cara dikocok. Jika terjadi pengendapan, pisahkan sebisa mungkin dengan menggunakan pipet. *GD Column* diletakkan pada *Collection Tube* 2 ml. Campuran (termasuk endapan) dipindahkan ke dalam *GD Column* selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14.000-16.000 x g selama 2 menit. *Collection Tube* 2 ml yang berisi materi sisa dipisahkan selanjutnya *GD Column* diletakkan pada *Collection Tube* 2 ml yang baru.

Pada tahap pencucian, ditambahkan 400 µl of *W1 Buffer* pada *GD Column*. Disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 x g selama 30 detik selanjutnya materi pada *Collection Tube* dipisahkan. *GD Column* diletakkan kembali pada *Collection Tube* 2 ml. Ditambahkan 600 µl *Wash Buffer* (pastikan ethanol telah ditambahkan) pada *GD Column*. Disentrifugasi pada kecepatan 14.000-16.000 x g selama 30 detik selanjutnya materi pada *Collection Tube* dipisahkan. *GD Column* diletakkan kembali pada *Collection Tube* 2 ml. Disentrifugasi kembali selama 3 menit pada kecepatan 14.000-16.000 x g untuk mengeringkan kolom matrik dan selanjutnya dilakukan elusi DNA. *GD Column* kering dipindahkan pada tabung mikrosentrifius 1.5 ml bersih. Ditambahkan *pre-heated Elution Buffer* ke dalam tengah kolom matrik. Didiamkan sedikitnya 3 menit agar *Elution Buffer* terserap sempurna. Disentrifugasi dengan kecepatan 14.000-16.000 x g selama 30 detik untuk menghasilkan DNA yang murni.

Pengujian sampel DNA secara kuantitatif dilakukan dengan langkah sebagai berikut. Disiapkan sampel DNA hasil isolasi sebanyak 5 µl dan ditetaskan pada spektrofotometer UV-Vis *nanodrop 2000*. Dibaca grafik kemurnian dan konsentrasi DNA. Langkah pengujian sampel DNA secara kualitatif adalah sebagai berikut. Sampel DNA sebanyak 3 µl, ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1 µl dan 2 µl *loading dye* dihomogenkan di atas kertas parafilm. Hasil preparasi tiap sampel dan marker DNA dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose 1%. Perangkat elektroforesis diatur dengan voltage sebesar 100 volt selama 45 menit. Gel agarose hasil elektroforesis diamati dengan *UV box*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Strategi bioremediasi limbah logam berat yang paling efektif terus dikembangkan termasuk meningkatkan strain organisme bioremediator dengan cara rekayasa genetika. Di masa depan, rekayasa genetik mungkin diperlukan untuk memperoleh manfaat yang lebih baik dari protein-protein pengikat logam yang dapat disintesis oleh bakteri tertentu. Perkembangan teknologi DNA rekombinan memungkinkan para ilmuwan untuk mewujudkan organisme rekombinasi genetik untuk meningkatkan proses bioremediasi (Thieman & Palladino, 2013). Upaya untuk mewujudkan tujuan tersebut diantaranya dengan mempelajari berbagai mekanisme yang terjadi pada organisme bioremediator secara luas hingga tingkat molekuler. Oleh karena itu, tahapan isolasi DNA

merupakan langkah penting yang harus dilakukan dengan baik. Variasi proses pelisisan dan kemurnian DNA menjadi dasar yang berpengaruh pada keberhasilan analisis DNA dengan berbagai metode seperti PCR (Ahmed *et al.*, 2014).

Secara umum, isolasi DNA genom bakteri melibatkan tiga tahapan yaitu perusakan sel, ekstraksi DNA, dan purifikasi DNA (Ahmed, *et al.*, 2014). Prokariot memiliki DNA inti yang terkonsentrasi di wilayah yang tidak diselubungi oleh membran ganda (nukleus) seperti pada sel eukariot (Campbell & Reece, 2008). Pada kebanyakan bakteri, molekul DNA berukuran besar terorganisasi dalam bentuk kromosom sirkular (Ahmed *et al.*, 2014). Proses pengeluaran DNA dengan cara diekstraksi atau dilisiskan biasanya dilakukan dengan homogenasi dengan penambahan bufer ekstraksi atau bufer lisis untuk mencegah rusaknya DNA (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Isolasi DNA bakteri dimulai dengan melisiskan atau merusak sel bakteri. Proses ini sangat penting untuk penghancuran struktur protein dan memungkinkan untuk pelepasan asam nukleat. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang tebal dan kuat serta asam teichoic, sedangkan bakteri gram negatif memiliki lapisan luar lipopolisakarida dan hanya memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis (Tortora *et al.*, 2010). Oleh karena itu, pada bakteri gram positif proses perusakan dinding sel bakteri dapat dilakukan dengan menambahkan lisozim. Lisozim berfungsi mencerna dinding sel bakteri (Shahriar *et al.*, 2011) yaitu dengan cara menghidrolisis lapisan peptidoglikan yang tebal.

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan ialah bakteri gram negatif sehingga lisis sel dilakukan hanya dengan penambahan proteinase K. Proteinase K merupakan enzim hidrolitik yang bekerja memutus ikatan-ikatan peptida pada protein (Cabral *et al.*, 2000). Setelah dilakukan ekstraksi, maka proses dilanjutkan dengan presipitasi DNA dengan menggunakan etanol absolut atau isopropanol (Fatchiyah *et al.*, 2011). Etanol akan melarutkan bahan-bahan lain selain DNA sehingga ketika dilakukan sentrifugasi DNA akan terpisah dengan bahan-bahan lain tersebut. Setelah terpisah, DNA dilarutkan kembali dengan buffer TE.

Hasil isolasi genom bakteri B dan C pada penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Pengujian secara kuantitatif isolat DNA genom pada bakteri B maupun C menunjukkan hasil konsentrasi DNA yang cukup tinggi yaitu 1873,1 ng/μl pada bakteri B dan 511,6 ng/μl pada bakteri C. Perbedaan jumlah konsentrasi tersebut dapat dipengaruhi oleh jumlah sel masing-masing bakteri sebelum diekstraksi. Hasil pengukuran pada panjang gelombang 260/280 menunjukkan kemurnian isolat DNA sebesar 2,14 pada sampel bakteri B dan 2,04 pada sampel bakteri C. Hasil tersebut menunjukkan hasil isolat DNA genom yang belum cukup murni. Kemurnian DNA ditunjukkan dengan nilai OD 260/280 antara 1.8 sampai 2.0, nilai OD 260/280 yang lebih dari 2.0 menunjukkan adanya kontaminasi berupa RNA (Khosravinia *et al.*, 2007). Oleh karena itu, perlu dilakukan proses purifikasi lebih lanjut dengan menggunakan RNase.

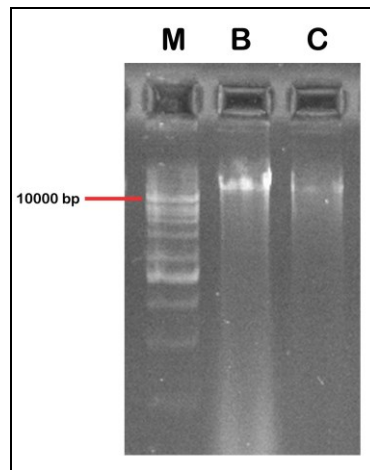
Hasil pengujian isolat DNA genom secara kualitatif menggunakan gel agarose ditunjukkan pada gambar 1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa panjang DNA genom yang berhasil diisolasi memiliki ukuran lebih dari 10000 bp baik pada sampel bakteri B maupun bakteri C. Hasil tersebut ditunjukkan oleh pendaran pita DNA pada gel agarose yang berada di atas DNA marker pada panjang sekitar 10000 bp. Gambar 1 juga memperlihatkan bahwa metode elektroforesis hanya menghasilkan pita tunggal pada masing-masing sampel. Hal tersebut mengindikasikan bahwa DNA genom bakteri tidak terdegradasi (Ahmed *et al.*, 2014). Perpendaran pita yang lebih tebal dan jelas pada sampel B menunjukkan bahwa konsentrasi isolat DNA genom pada sampel B lebih tinggi dibandingkan dengan sampel C. Hasil tersebut sesuai dengan hasil pengujian secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer.

## **SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI**

Isolasi DNA genom bakteri pengkelat logam berat CD telah berhasil dilakukan pada bakteri B dan C yang diperoleh dari limbah cair penepungan agar di Lawang Jawa Timur. Hasil pengujian secara kuantitatif menunjukkan konsentrasi DNA yang cukup tinggi yaitu 1873,1 ng/μl dengan tingkat kemurnian (A260/280) sebesar 2.04 pada bakteri B dan 511,6 ng/μl dengan tingkat kemurnian (A260/280) sebesar 2,14 pada bakteri C. Hasil pengujian secara kualitatif menunjukkan bahwa panjang DNA genom yang berhasil diisolasi memiliki ukuran lebih dari 10000 bp baik pada sampel bakteri B maupun bakteri C. Proses purifikasi DNA perlu dilakukan lebih lanjut untuk memperoleh isolat DNA genom yang lebih murni. Selain itu, perbandingan beberapa metode ekstraksi juga perlu dilakukan untuk menemukan metode ekstraksi yang paling efektif dan efisien.

Tabel 1. Hasil Uji Kuantitatif Isolat DNA Genom

No.	Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ l)	$\lambda$ 260/280
1	Bakteri B	1873,1	2,14
2	Bakteri C	511.6	2.04



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA Genom.  
(M : Marker DNA, B: Sampel Bakteri B, C: Sampel Bakteri C)  
Sumber: Dokumen Pribadi

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ahemad, M. & Abdul Malik. (2011). Bioaccumulation of Heavy Metal by Zinc Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. *Bacteriology Journal*, 1-10. DOI: 10.3923/bj.2011.
- Ahmed, O. B., Atif H. A. & Mogahid M. E. (2014). Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *African Journal of Microbiology Research*, 8(6), 598-602. DOI: 10.5897/AJMR2013.6459.
- Cabral, H., M.T. Ruiz, C.M.A. Carareto & G.O. Bonilla-Rodriguez. 2000. A plant proteinase, extracted from *Bromelia fastuosa*, as an alternative to proteinase K for DNA extraction. *Dros. Inf. Serv*, 83, 178-185.
- Campbell, Neil A. & Jane B. Reece. (2008). *Biologi: Edisi 8 Jilid 1*. Terjemahan Damaring Tyas Wulandari. 2008. Jakarta: Erlangga.
- Chojnacka, K. 2010. Biosorption and Bioaccumulation – The Prospects for Practical Applications. *Environment International*. 36, 299–307.
- Fatchiyah, Estri L. Arumingtyas, Sri Widyarti, & Sri Rahayu. (2011). *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Huckle, J. W., Andrew P. M., Jennifer S. T. & Nigel J. R. (1993). Isolation of a Prokaryotic Metallothionein Locus and Analysis of Transcriptional Control by Trace Metalions. *Molecular Microbiology*, 7 (2), 177-187.
- Khosravania, H., H. N. Narasimha Murthy, D. Thertha P. & N. Pirany. (2007). Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *African Journal of Biotechnology*, 6 (4), 481-486.
- Krishna, M. P., Rinoy Varghese, Arun V. Babu & A. A. Mohamed Hath. (2012). Bioaccumulation of Cadmium by *Pseudomonas Sp.* Isolated from Metal Polluted Industrial Region. *Environmental Research, Engineering and Management*, 3(61), 58-64. DOI: 10.5755/j01.irem.61.3.1268.
- Kumar, A., Balwant Singh B., & Vishnu Datt J. (2010). Biosorption of Heavy Metals by four acclimated microbial species, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.* and *Aspergillus niger*. *Journal Biology Environmental Science*, 4(12), 97-108.

- Restu, M., Mukrimin, & Gusmiaty. (2012). Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (Toona Sureni Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Natur Indonesia*, 14(2), 138-142.
- Shahriar, M., Md. Rashidul H., Shaila K., Irin D & Mohiuddin A. B. (2011). Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(1), 53-57.
- Shi, J., William P. L., James W. H., Andrew P. M., & Nigel J. R. (1992). Cyanobacterial Metallothionein Gene Expressed In Escherichia Metal-Binding Properties of The Expressed Protein. *Federation of European Biochemical Societies*, 303 (23), 159-163.
- Thieman, J William & Micheal A. Pallidino. (2013). *Introduction to Biotechnology-Third Edition*. Amerika : Pearson.
- Tortora, Gerard J., Berdell R. Funke, & Christine L. Case. 2010. *Microbiology: an introduction-Tenth Edition*. San Francisco: Pearson Education.