

AMPLIFIKASI GEN *pncA* DARI BAKTERI AIR BEKAS GALIAN TAMBANG DI SAMARINDA

AMPLIFICATION OF *pncA* GENES FROM WATER BACTERIAL POST MINING IN SAMARINDA

Ahmad Suryadi, Winni Astuti* dan Rudi Kartika

Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Mulawarman, Samarinda

Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua Samarinda, Kalimantan Timur

*Corresponding Author: winniastuti@gmail.com

Diterbitkan: 30 Oktober 2023

ABSTRACT

Amplification of *pncA* genes from water bacterial post mining in Samarinda has been done. The aim of this research is to isolate chromosomal DNA and amplified the *pncA* gene from water bacterial post mining in Samarinda. The research method consist of chromosomal DNA isolation and amplification of *pncA* gene with polymerase chain reaction (PCR) technique. The result showed the size of chromosomal DNA is ± 10 kb. By using primer *pncA* gene, the result of amplification of the *pncA* gene showed that there were two sizes of amplicon, namely 0.7 kb and 0.2 kb. The conclusion that can be drawn was there is two sizes of amplicon *pncA* gene.

Keywords: chromosomal DNA isolation, amplification of *pncA* gen, PCR

ABSTRAK

Amplifikasi gen *pncA* dari bakteri air bekas galian tambang di Samarinda telah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi DNA kromosom dan mengamplifikasi gen *pncA* dari bakteri air bekas galian tambang di Samarinda. Metode penelitian terdiri dari isolasi DNA kromosom dan amplifikasi gen *pncA* menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Data yang diperoleh berupa data semi kualitatif berupa visualisasi pita DNA. Hasil penelitian menunjukkan ukuran DNA kromosom adalah ± 10 kb. Hasil amplifikasi gen *pncA* menunjukkan terdapat dua ukuran amplicon yaitu 0,7 kb dan 0,2 kb. Kesimpulan yang dapat diambil adalah terdapat dua ukuran amplicon dari gen *pncA*.

Kata kunci: Isolasi DNA kromosom, amplifikasi gen *pncA*, PCR.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit TB dapat diobati dengan obat Pirazinamid (PZA). Pirazinamid adalah *prodrug* yang akan diaktifkan menjadi *drug* oleh enzim pirazinamidase. Enzim pirazinamidase dikodekan oleh gen *pncA* [1].

Gen *pncA* merupakan urutan basa nukleotida yang bertanggung jawab dalam pembentukan enzim pirazinamidase. Enzim pirazinamidase akan mengubah PZA menjadi

asam pirazinoic yang akan menyebabkan penurunan pH yang akan mengganggu sintesis asam lemak[2].

Teknologi yang dapat digunakan dalam mendapatkan gen secara spesifik adalah *polymerase chain reaction* (PCR). PCR adalah reaksi pebanyakan DNA dengan bantuan enzim DNA polimerase [3]. Oleh karena itu dilakukan penelitian amplifikasi gen *pncA* dari bakteri air bekas galian tambang di Samarinda

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Fisiologi Perkembangan dan Molekuler Hewan FMIPA



Universitas Mulawarman, Samarinda Kalimantan Timur. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yang meliputi tahap isolasi DNA, amplifikasi gen *pncA* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan pengukuran sampel secara semi kualitatif dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian meliputi antara lain yaitu; gelas ukur, gelas kimia (Pyrex), pipet mikro 0,5-10 µl pipet mikro (Lichen), 10-100 µl (Lichen), pipet mikro 100-1000 µl (Omnipette), tip 1000 µl, tip 200 µl, tip 10 µl, pipet tetes, tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi (Iwaki), tabung mikro (Tarsons), batang pengaduk, gelas ukur (Iwaki), corong kaca, termometer (Philips Harris Limited), Erlenmeyer (Iwaki), labu ukur, *hot plate* (Cypruz), *shaker waterbath* (Memmert), *laminar air flow cabinet* (Esco), autoklaf (Tomy) mikrosentrifugasi (Allegra™ X-22 R), *chamber elektroforesis*, sisir, elektroda dan *PCR thermal cycler* (Labnet TC0220A).

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain yaitu; isolat bakteri dari air bekas galian tambang Padat Karya Sempaja Utara Samarinda, aquades, ddH₂O, gliserol, etidium bromida (EtBr), primer maju *pncA* dan primer mundur *pncA*, agarosa, etanol, dNTP, MgCl₂, DNA *Taq polymerase*, *loading buffer* (Sukrosa 50%, EDTA 0,1 M pH 8, bromofenol biru 0,1 % pH 8), DNA marker (1 kb gen ruler).

Cara Kerja

Isolasi DNA Kromosom

Isolasi DNA kromosom dilakukan dengan menggunakan kit berupa *Ecospin Genomic Bacterial DNA kit*. Isolat bakteri yang telah dikulturkan selama 24 jam diambil sebanyak 1 mL dan dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya pelet sel dihomogenisasi dengan ditambahkan *EcoSpin resuspension buffer* sebanyak 200 µl. Kemudian ke dalam suspensi ditambahkan *Ecospin lysis buffer* sebanyak 200 µl dan dihomogenkan. Suspensi ditambahkan *EcoSpin proteinase K* sebanyak 20 µl dan dihomogenkan. Lalu suspensi dipanaskan pada suhu 55°C selama 30 menit. Kemudian *EcoSpin binding buffer* ditambahkan sebanyak 400 µl ke dalam tabung dan dihomogenkan. Selanjutnya campuran di

masukkan ke dalam *EcoSpin column* dengan untuk disentrifugasi dengan kecepatan maksimal selama 1 menit pada suhu ruang. Kemudian kolom dicuci dengan *EcoSpin wash buffer* sebanyak 500 µl, lalu disentrifugasi Kembali dengan kecepatan maksimal selama 1 menit pada suhu ruang. Kolom dicuci sebanyak 2 kali. Selanjutnya DNA yang terdapat di dalam kolom dielusi dengan *EcoSpin elution buffer* ditambahkan sebanyak 30 µl. DNA murni hasil elusi selanjutnya disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi Gen *pncA*

Amplifikasi gen *pncA* dilakukan dengan menggunakan DNA kromosom hasil isolasi sebagai DNA templat. Proses amplifikasi menggunakan primer maju *pncA* 5'GGA TCC GAT CGC GGC GTT GAT CAT C3' dan primer mundur *pncA* 5'CTC CAG GGA GCT GCA AAC CAA CTC3'. Campuran reaksi PCR dibuat dengan volume akhir 25 µl yang meliputi 2,5 µl *Dream Taq buffer*, 7 µl dNTP 2 mM, 1 µl masing-masing primer, 5 µl *Dream Taq*, 2,5 µl DNA templat dan 6 µl ddH₂O. Proses PCR dilakukan pada kondisi denaturasi 95°C, *annealing* pada suhu 50°C dan pemanjangan pada suhu 72°C.

Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil isolasi DNA kromosom dan amplifikasi di elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 1% dengan menimbang 0,3 g bubuk agarosa ke dalam 30 mL larutan buffer TBE 1x (Tris Borat EDTA). Kemudian larutan agarosa tersebut diaduk dan dididihkan hingga larut sempurna. Selanjutnya disiapkan cetakan gel agarosa dan dipasang sisi pada salah satu ujung cetakan. Larutan gel agarosa yang telah larut didinginkan hingga suhu 50-60°C, kemudian ditambahkan 3 µl etidium bromida (EtBr). Lalu larutan dihomogenkan dan dituang ke dalam cetakan gel agarosa, setelah itu ditunggu hingga menjadi padat. Setelah gel padat, lepaskan sisir secara perlahan dan hati-hati.

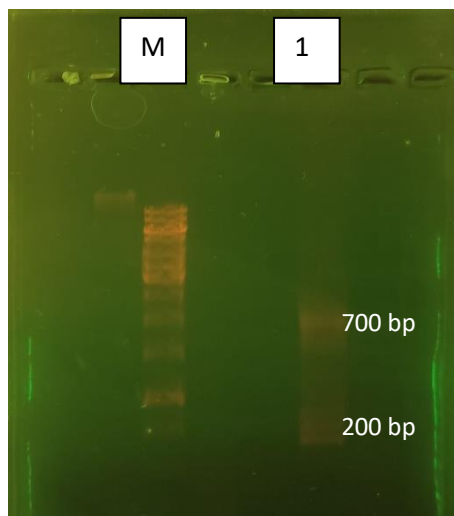
Cetakan gel dipindahkan ke dalam tangka elektroforesis dan diisi larutan TBE1x hingga cetakan gel terendam seluruhnya. Kemudian dimasukkan 3 µl DNA marker dan 5 µl sampel ke dalam sumuran gel agarosa dengan pipet mikro dengan hati-hati agar sampel tidak keluar sumur.

Selanjutnya dijalankan proses elektroforesis dengan diatur voltase dan waktu *running* pada 100 V selama 1 jam. Proses

elektroforesis berhenti ketika lampu indikator pada alat menunjukkan tanda *off*. Kemudian gel agarosa dikeluarkan dan diletakkan ke dalam UV *translluminator* dan diamati pendar pita-pita DNA yang tervisualisasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian tentang “Amplifikasi Gen *pncA* dari Bakteri Air Bekas Galian Tambang Di Samarinda” diperoleh dari isolat bakteri yang diisolasi dan diamplifikasi dengan metode PCR. Hasil isolasi DNA divisualisasi di bawah sinar UV dengan meletakkan gel agarosa pada UV *translluminator*. Hasil positif jika pada UV *translluminator* menunjukkan pendar pita DNA dan untuk menentukan ukuran DNA dilakukan perbandingan dengan DNA *marker* yang telah diketahui ukurannya. Hasil visualisasi berupa elektrogram gel agarosa ditampilkan pada Gambar 1. Yang menunjukkan pita DNA tunggal yang samar dengan ukuran sekitar ± 12 kb. Pita DNA yang samar diakibatkan oleh komposisi bufer lisis pada kit yang belum cukup kuat untuk menghancurkan membran sel sehingga jumlah DNA yang diperoleh sedikit.



Gambar 1. Amplifikasi gen *pncA* menggunakan primer *pncAF* dan *pncAR* dianalisa menggunakan gel agarosa 1% dari DNA bakteri. Line M : 1kb gen ruler. Line 1: Sampel.

Untuk mengetahui hasil PCR positif atau negatif, maka pada hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis gel agarosa dan divisualisasi pada UV *translluminator*. Hasil positif jika pada UV *translluminator* menunjukkan pendar pita DNA dan untuk menentukan ukuran DNA dilakukan perbandingan dengan DNA *marker* yang telah diketahui ukurannya. Hasil visualisasi berupa

elektrogram gel agarosa ditampilkan pada Gambar 1. Amplifikasi gen *pncA* menunjukkan dua ampikon fragmen yang memiliki ukuran sekitar 0,7 kb dan 0,2 kb. Primer *pncA* maju dan *pncA* mundur adalah primer yang digunakan untuk identifikasi gen *pncA* bakteri. Gen *pncA* yang mengkodekan enzim pirazinamidase yang spesifik untuk PZA dalam membunuh kuman *Mycobacterium tuberculosis* dan tidak memiliki efek pada bakteri lain[2]. Dua amplicon yang tervisualisasi disebabkan oleh pengaturan suhu *annealing* yang tidak tepat. Jika suhu *annealing* terlalu rendah maka dapat menyebabkan primer menempel pada bukan situs target [3].

KESIMPULAN

Gen *pncA* dari DNA kromosom bakteri air bekas galian tambang di Samarinda berhasil diamplifikasi yang ditunjukkan dengan adanya dua pita DNA yang memiliki ukuran 0,7 kb dan 0,2 kb. Pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan optimalisasi suhu *annealing* sehingga dapat dihasilkan pita tunggal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Dr. Winni Astuti, M. Si dan Bapak Dr. Rudi Kartika, M. Si yang telah membimbing dalam menyelesaikan tulisan ini, serta kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan baik berupa moral maupun materi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kurniawan, E., & Halid, I. (2022). Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Resistance to Pyrazinamide Antibiotic Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. *Jurnal Biologi Tropis*, 22(4), 1170-1176. <http://dx.doi.org/10.29303/jbt.v22i4.4224>
- [2] Santos, L. C. (2012). Review: The Molecular Basis of Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Open Journal of Medical Microbiology*, 02(01), 24–36. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2012.21004>
- [3] Maksum, Iman P., Sriwidodo., Shabarni, G., Khomaini, H., Toto, S., & Soetijoso, S. (2017). *Teknik Biologi Molekular*. Alqaprint Jatinangor. Bandung.