

MODUL BAKTERIOFAG

TEKNIK DASAR DETEKSI MOLEKULAR BAKTERIOFAG 1

Penyusun:

Erlia Narulita, S.Pd., M.Si., Ph.D.



FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2021



UNIVERSITAS JEMBER

MODUL BAKTERIOFAG

Teknik Dasar Deteksi Molekuler Bakteriofag 1

Isolasi dan Kultur/Perbanyakan bakteriofag

A. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu:

Memahami dan mendeskripsikan metode isolasi dan perbanyakan bakteriofag dari berbagai sampel: sampah, susu, makanan.

B. Uraian Konsep dan Teori

Bakteriofag merupakan virus parasit bakteri yang dapat menghancurkan sel bakteri dengan melisiskan dinding selnya. Bakteriofag mengontrol populasi bakteri jenis tertentu secara spesifik serta efektif dengan cara menginjeksikan materi genetik (DNA atau RNA) untuk bereplikasi menjadi partikel virus menggunakan 'mesin reproduksi' sel bakteri dan selanjutnya keluar serta menyebar dengan melisiskan sel tersebut. Karakter ini dimanfaatkan dalam pengembangan agen terapi di berbagai bidang. Berbagai jenis bakteri memiliki kemungkinan dapat diinfeksi oleh setidaknya satu jenis bakteriofag (Acheson, 2011).

Bakteriofag memiliki kelimpahan yang tinggi di alam. Isolasi bakteriofag dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai macam sampel baik berupa sampel padat maupun cair. Isolasi bakteriofag melalui sampel padat sedikit berbeda dengan isolasi melalui sampel cair. Sebelum melakukan isolasi bakteriofag, dilakukan peremajaan dan perbanyakan *host/inang* (bakteri) terlebih dahulu. Bakteriofag dapat diisolasi dengan memperlihatkan kemampuannya dalam membentuk zona bening (*plaque*) pada lapisan sel inangnya. *Plak* tersebut kebanyakan berbentuk melingkar atau tidak beraturan (Rahaju, 2014). Perbanyakan bakteriofag dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu *plate lysate* dan *liquid lysate*. *plate lysate* dapat dilakukan hanya dengan cara menambahkan SM buffer di atas plate yang sudah terbentuk *plaque* dengan jumlah yang optimum untuk proses pemanenan dan perbanyakan, kemudian dibiarkan pada -4°C selama 1 malam. Sedangkan *liquid lysate* dilakukan dengan membuat media cair perbanyakan bakteri inang serta ditambahkan phage dan diinkubasi pada suhu optimum. Hasil kuantitas bakteriofag yang diperoleh pada metode *liquid lysate* lebih tinggi dibandingkan dengan metode *plate lysate* (Bonilla, 2016).

C. Metode Praktikum

Alat dan Bahan

- Polypeptide
- Nacl
- *Yeast*
- Agar
- Appendorf
- Bakteri *E.coli*
- Bakteriofag
- Sampel suhu, sampah, makanan
- Aquades
- Syringe
- Filter membrane
- Plate
- Tabung reaksi
- Spektrofotometer
- Autoclave
- Kompor
- Mikropipet dan tip
- Shaker
- Enlemeyer
- Kulkas
- Microwave
- SM Buffer
- Inkubator
- Sentrifuge

Langkah kerja

Isolasi bakteriofag

7. Mengambil sampel (sampah: di encerkan dengan aquades, susu: diencerkan dengan aquades, makanan: ditambahkan dengan aquades, di shaker dalam enlemeyer selama semalam).
8. Menginokulasikan bakteri yang telah diisolasi pada medium LB broth (24 jam)
9. Mengambil 1 ml sampel dimasukkan eppendorf
10. Sentrifugasi selama 15 menit 12.000 rpm, 4°C

11. Mengambil supernatant dengan syringe
12. Supernatant difilter dengan menggunakan filter 0,2 μm
13. Hasil filter untuk spot assay/plaque assay

Plaque assay dan Plate lysate

11. Tumbuhkan inang bakteri *E.coli* dalam media Luria Bertani *broth* dan inkubasi pada suhu 37°C dalam semalam
12. Encerkan stok bakteriofag hingga mendapatkan konsentrasi dengan *plaque* yang dapat dihitung (konsentrasi optimum)
13. Siapkan media LB *plate* dengan komponen 1% polypeptide, 1% NaCl, 0,5% *yeast*, dan 1,5% agar dan TOP agar 0,5% dengan komponen 1% polypeptide, 1% NaCl, 0,5% *yeast*, dan 0,75% agar
14. Hitung OD suspensi bakteri dengan standart OD 1 @1000 μl
15. Campurkan 240 μl bakteri dengan 10 μl bakteriofag yang telah diencerkan (*mixture*)
16. Campurkan 5 ml TOP agar yang sudah direbus dalam microwave dan didinginkan hingga suhu menurun (hangat) dengan *mixture* yang sudah dibuat.
17. Tuangkan pada LB plate dan inkubasi pada suhu 37°C dalam semalam
18. Tuangkan 5 ml SM buffer di atas permukaan plate
19. Letakkan pada cooling room/4°C dalam semalam atau lebih
20. Panen cairan SM buffer yang sudah menjadi keruh lalu lakukan filtrasi
21. Bakteriofag hasil panen dapat disimpan pada suhu 4°C dan siap digunakan

Liquid lysate

1. Tumbuhkan inang bakteri *E.coli* dalam media Luria Bertani *broth* dan inkubasi pada suhu 37°C dalam semalam (dilusi hingga OD 0,1)
2. Siapkan media LB *broth* 100 ml
3. Encerkan stok bakteriofag hingga konsentrasi 1×10^6
4. Campurkan 100 ml LB, 100 μl bakteriofag, dan 5 ml bakteri
5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 jam atau sampai lysate bening (atau serpihan putih yang mengindikasikan bakteri telah lisis)

D. Daftar Pustaka

- Acheson H. Nicholas. 2011. *Fundamentals of Molecular Virology*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken.
- Bonilla, Natasha., M., I, Rojas., G., N. F. Cruz., S., Hung., F., Rohwer., and J., J. Barr. 2016. Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ*. 10.7717/peerj.2261.
- Rahaju, Sri H. 2014. Metoda Pengkayaan, Filtrasi dan Pertumbuhan untuk Isolasi Bateriafag Spesifik *Salmonella Typhimurium* Pada Sampel Air. *Sains, Teknologi, dan Kesehatan*: 315.

Isolasi DNA Bakteriofag

A. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu memahami dan mendeskripsikan metode isolasi DNA Bakteriofag

B. Uraian Konsep dan Teori

Deoxyribonucleic acid atau DNA adalah suatu material berisi informasi genetik yang secara turun temurun diwariskan oleh setiap organisme kepada generasi berikutnya. DNA yang terdapat dalam nukleus disebut DNA nukleus, sedangkan DNA yang terdapat pada mitokondria disebut mitokondria DNA (mtDNA). DNA merupakan molekul panjang yang terdiri dari 4 jenis basa nitrogen yaitu adenin, guanin, cytosin, timin. Setiap basa nitrogen berikatan dengan gula dan fosfat yang disebut dengan nukleotida yang tersusun berbentuk spiral atau double helix. Rangkaian gula dan gugus fosfat kedua rantai nukleotida sama, tetapi memiliki arah yang berbeda (3'-5' dan 5'-3') bagian ini disebut juga dengan backbone chain (rantai tulang punggung) (Buwono, 2018: 6)

Isolasi DNA adalah mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya seperti protein, karbohidrat, maupun lemak. Tahapan untuk isolasi DNA dimulai dari isolasi jaringan, pemecahan dinding dan membran sel, pengekstraksian dalam larutan buffer, presipitasi dan pencucian DNA. Selanjutnya DNA harus dipisahkan dari isi sel lainnya (purifikasi) agar bercampur dengan buffer ekstraksi. Isolasi DNA genom dapat dilakukan dengan metode lisis sel secara fisik dan kimia. Secara fisik sel dipecah dengan kekuatan mekanik yaitu secara freeze thaw, bead mill homogenization dan resonansi misalnya dengan sonikasi yaitu teknologi yang memanfaatkan gelombang ultrasonik. Sedangkan secara kimia sel dirusak dengan buffer lisis berisi senyawa kimia yang dapat merusak integritas barrier dinding sel, misalnya SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan CTAB (*Cetyl tri methyl ammonium bromide*) (Murtiyaningsih, 2017: 85). Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode berdasarkan tingkat modernnya, bisa secara konvensional maupun menggunakan kit. Ekstraksi DNA secara konvensional bisa dilakukan antara lain dengan metode CTAB/NaCl, metode SDS, dan metode fenol kloroform. Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, ekstraksi DNA dapat dilakukan menggunakan kit dari berbagai merk (Fitriya, dkk. 2015: 87-88).

Prinsip dasar isolasi DNA pertama secara fisik menghancurkan sel yang bisa dilakukan diantaranya dengan teknik sonikasi, *grinding/giling*, cacah atau dengan tekanan tinggi agar sel

hancur. Namun, langkah ini sering mengakibatkan DNA terpotong-potong sehingga kemurnian DNA kurang. Atau bisa dengan cara enzimatik/kimia pemberian detergen. Sabun akan melarutkan lipid membran sel serta berperan sebagai inhibitor DNase dan dapat mendenaturasi protein dari larutan uji. Detergen yang biasanya digunakan sebagai pelarut lisis sel adalah yang bersifat anionik seperti SDS (Sodium Deodesil Sulfat) atau Sarkosil (Sodium Deodesil Sarkosinat) (Puspitaningrum, 2018: 2).

Selanjutnya adalah membuang semua materi atau komponen protein, dikenal sebagai deproteinasi. Prinsipnya yaitu membuang kelarutan protein sehingga protein tidak larut atau mengendap sedangkan asam nukleat tetap larut. Banyak metode yang biasanya sering digunakan diantaranya fenol kloroform. Phenol chloroform metode yang menggunakan senyawa Phenol-chloroform-isoamyl alcohol, Metode standard untuk ekstraksi DNA, Akhirnya ini ditinggalkan, karena sifat toksik phenol. Metode Salting Out Menggunakan garam konsentrasi tinggi (NaCl 6 M), untuk mendenaturasi protein menggunakan Proteinase K untuk denaturasi protein. Metode Guanidine isothiocyanate yaitu metode yang lebih cepat dibanding dua metode sebelumnya, Thiocyanate bersifat toksik, untuk lisis dinding sel, Memerlukan chloroform untuk denaturasi protein. Metode Silica Gel Silica gel yang dapat mengikat DNA dengan perantaraan garam/buffer tertentu (NaI), Cepat, tetapi recovery DNA kurang. (Puspitaningrum, 2018: 3).

C. Metode Praktikum

Alat dan Bahan

- Sampel bakteriofag
- 10% N-Lauroylsarcosine-Na
- proteinase-K
- ddH₂O
- PCI
- Kloroform
- Natrium Asetat
- Isopropanol
- Etanol 70%
- TE buffer
- Appendorf
- Mikropipet dan tip
- Sentrifuge

- Heat block
- Elektroforesis

Langkah Kerja

1. Siapkan suspensi 300 µl bakteriofag dengan konsentrasi tinggi
2. Tambahkan 50 µl 10% N-Lauroylsarcosine-Na
3. Tambahkan proteinase-K 50 µl dan ddH₂O 200 µl
4. Dikocok-kocok
5. Letakkan pada *heat block* 55°C selama 2 jam
6. Ambil 500 µl hasil pemanasan tambahkan PCI 500 µl
7. Sentrifugasi selama 10 menit 15.000 g, 4°C
8. Ambil lapisan bagian atas 500 µl dan tambahkan PCI
9. Sentrifugasi selama 10 menit 15.000 g, 4°C
10. Ambil lapisan bagian atas dan tambahkan klorofom sejumlah volume sampel
11. Dikocok-kocok
12. Sentrifugasi selama 5 menit 15.000 g, 4°C
13. Ambil lapisan atas dan tambahkan Natrium Asetat 50 µl
14. Tambahkan isopropanol sejumlah volume sampel
15. Resuspensi dan tambahkan etanol 70% 500 µl
16. Sentrifugasi 3 menit 15.000 g, 4°C
17. Kering anginkan dan tambahkan TE buffer 300 µl
18. Lakukan pengecek-an dengan elektroforesis

D. Daftar Pustaka

- Buwono, Ibnu Dwi., Iskandar., Agung, M.Untung Kurnia., Subhan, Ujang. 2018. *Buku Ajar Aplikasi Teknologi DNA Rekombinan untuk Perakitan Konstruksi Vector Ekspresi Ikan Lele Transgenic*. Yogyakarta: Deepublish.
- Fitriya, Riya Tyas., Ibrahim, Muslimin., dan Lisdiana, Lisa. 2015. The Effectiveness of Modified DNA Isolation Method of Kit and CTAB/NaCl ON *Staphylococcus aureus* and *Shigella dysenteriae*. *Lentera Bio*. 4(1): 87-88.
- Murtiyaningsih, Hidayah. 2017. DNA Genom Isolation And Identification Of Genetic Relationship Pineapple Usingrapd (Random Amplified Polimorphic DNA. *Agritrop*. 15(1): 85.
- Puspitaningrum, Rini., Adhiyanto, Chris., Solihin. 2018. *Genetika Molekuler dan Aplikasinya*. Yogyakarta: Deepublish.



FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2021