



**Universitas
Esa Unggul**
MODUL MATA KULIAH
REKAYASA GENETIKA
(IBT 431)

Disusun Oleh
Seprianto, S.Pi, M.Si

PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
2017

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT, atas berkat dan rahmatNya sehingga tim penyusun dapat menyelesaikan “**Modul Rekayasa Genetika**” dengan baik

Modul ini disusun sebagai panduan pembelajaran bagi mahasiswa/i program studi Bioteknologi untuk matakuliah Rekayasa Genetika. Diharapkan dengan adanya modul ini, mahasiswa akan dapat belajar mandiri dan terstruktur sehingga hasil yang diperoleh lebih optimal dalam penguasaan isi materi. Buku panduan ini bermanfaat bagi mahasiswa/i baik dalam kegiatan pembelajaran di perkuliahan maupun dalam melaksanakan praktikum di laboratorium.

Kami menyadari bahwa isi dari buku panduan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan dalam hal penyempurnaan pada masa yang akan datang.

Jakarta, 15 Agustus 2017

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	2
BAB I. GMO (Genetic Modified Organism).....	4
BAB II. Rekayasa Genetika DNA Rekombinan.....	14
BAB III. Enzim Restriksi.....	21
BAB IV. Vektor Kloning.....	28
BAB V. Bakteri Replikasi.....	38
BAB VI. Resistensi Antibiotik.....	51
BAB VII. Polynker, Promotor, dan Analisis Sekuens.....	57
BAB VIII. Ekspresi Gen Pada Prokariot dan Eukariot.....	66



BAB 1. GMO “Genetic Modified Organism”

Produksi, Penggunaan dan Keamanan

A. Pengantar

Mata kuliah ini mengenalkan kepada mahasiswa terhadap Produk Rekayasa Genetika atau yang dikenal dengan istilah *Genetik Modified Organism* serta peraturan yang mengatur tentang produk MGO. Rekayasa genetika (transgenik) atau juga yang lebih dikenal dengan Genetically Modified Organism (GMO) dapat diartikan sebagai manipulasi gen untuk mendapatkan galur baru dengan cara menyisipkan bagian gen ke tubuh organisme tertentu. Teknologi DNA atau rekayasa genetika merupakan kesinambungan dari proses yang terjadi secara alami di alam dengan menggunakan sains dan teknologi baru. Genetically Modified Organism (GMO) atau organisme transgenik merupakan organisme yang telah mengalami modifikasi bahan genetik, sehingga secara sederhana semua organisme merupakan GMO karena dalam proses reproduksinya terjadi pencampuran bahan genetik kedua inangnya. Organisme yang bereproduksi dengan membelah diri juga mengalami modifikasi terutama dari proses mutasi dan transfer gen. Saat ini pengertian GMO telah bergeser menjadi organisme yang telah mengalami modifikasi bahan genetik dengan menggunakan teknologi DNA

B. Kompetensi Dasar

Mahasiswa dapat mengetahui istilah GMO (Genetically Modified Organism) dan mampu menjelaskan produk GMO serta perkembangan GMO serta produk GMO yang telah berhasil dikembangkan di Indonesia

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

- Dapat menguraikan pengertian GMO
- Dapat menjelaskan Hukum yang mengatur tentang GMO
- Dapat menjelaskan Produk GMO serta perkembangan GMO di Indonesia.

D. Kegiatan Pembelajaran

- Pembelajaran dilakukan dengan metoda presentasi dosen, diskusi dan presentasi kelompok

- Mahasiswa memahami penjelasan dosen selama 30 menit dan selanjutnya diajukan masalah ke setiap kelompok untuk didiskusikan dan setiap kelompok presentasi di depan kelas

II. MATERI

2.1. Pengenalan Tentang GMO (Genetically Modified Organism)

Bioteknologi berasal dari kata bio yang berarti makhluk hidup dan teknologi yang berarti sesuatu yang memudahkan manusia. Bioteknologi merupakan pemanfaatan bahan-bahan atau proses-proses biologi untuk memecah masalah atau menghasilkan produk yang berguna. Bioteknologi mencakup seluruh pemanfaatan organisme untuk kepentingan manusia. Produk bioteknologi yang sudah dikenal dalam kehidupan sehari-hari adalah tempe, yoghurt, dan nata. Saat ini pengertian bioteknologi telah bergeser pada hal-hal yang berkaitan dengan rekayasa genetik organisme serta rekombinasinya. Secara sederhana, produk pertanian merupakan hasil dari modifikasi bahan genetik dan seleksi. Modifikasi bahan genetik dan seleksi terjadi ketika proses persilangan silang, mutasi spontan, dan mutasi fisik atau kimia. Modifikasi ini menghasilkan beragam sifat organisme dalam setiap galurnya. Tanaman budidaya diperoleh dari seleksi manusia terhadap galur-galur tertentu yang memberi manfaat terbesar.

Kemajuan di bidang ilmu hayati seperti biologi molekuler, genetika molekuler dan rekayasa genetika pada abad ke-20 telah dikemas menjadi suatu teknologi canggih yang disebut bioteknologi. Salah satu keunggulan bioteknologi adalah kemampuannya mengubah suatu sifat organisme menjadi sifat baru seperti yang dikehendaki. Perkembangan bioteknologi terkini telah memasuki tahap pemasaran GEP (*Genetically Engineered Plants*) yang lebih dikenal dengan tanaman transgenik. Perakitan tanaman transgenik dapat diarahkan untuk memperoleh kultivar tanaman yang memiliki produksi tinggi, nutrisi dan penampilan berkualitas tinggi, maupun resistensi terhadap hama, penyakit dan cekaman lingkungan. Fragmen DNA organisme manapun melalui teknik rekayasa genetika dapat disisipkan ke genom jenis lain bahkan yang jauh hubungan kekerabatannya. Pemandangan gen ke dalam genom lain tidak mengenal batas jenis maupun golongan organisme. Melihat potensi manfaat yang dapat disumbangkan, pendekatan bioteknologi dipandang mampu menyelesaikan problematika pangan dunia terutama di negara-negara yang sedang berkembang seperti yang telah berhasil dilakukan di negara-negara maju

2.2. Sejarah Perkembangan Produk GMO di Dunia

Seleksi genetik untuk pemuliaan tanaman (perbaikan kualitas/sifat tanaman) telah dilakukan sejak tahun 8000 SM ketika praktik pertanian dimulai di Mesopotamia. Secara konvensional, pemuliaan tanaman dilakukan dengan memanfaatkan proses seleksi dan persilangan tanaman. Kedua proses tersebut memakan waktu yang cukup lama dan hasil yang didapat tidak menentu karena bergantung dari mutasi alamiah secara acak. Contoh hasil pemuliaan tanaman konvensional adalah durian montong yang memiliki perbedaan sifat dengan tetuanya, yaitu durian liar. Hal ini dikarenakan manusia telah menyilangkan atau mengawinkan durian liar dengan varietas lain untuk mendapatkan durian dengan sifat unggul seperti durian montong.

Sejarah penemuan tanaman transgenik dimulai pada tahun 1977 ketika bakteri *Agrobacterium tumefaciens* diketahui dapat mentransfer DNA atau gen yang dimilikinya ke dalam tanaman. Pada tahun 1983, tanaman transgenik pertama, yaitu bunga matahari yang disisipi gen dari buncis (*Phaseolus vulgaris*) telah berhasil dikembangkan oleh manusia. Sejak saat itu, pengembangan tanaman transgenik untuk kebutuhan komersial dan peningkatan tanaman terus dilakukan manusia. Tanaman transgenik pertama yang berhasil diproduksi dan dipasarkan adalah jagung dan kedelai. Keduanya diluncurkan pertama kali di Amerika Serikat pada tahun 1996. Pada tahun 2004, lebih dari 80 juta hektare tanah pertanian di dunia telah ditanami dengan tanaman transgenik dan 56% kedelai di dunia merupakan kedelai transgenik.

2.2. Penggunaan GMO dalam Industri Pangan

Pangan merupakan salah satu elemen yang sangat penting yang menopang kehidupan manusia. Perubahan budaya dan cara hidup membuat ketersediaan pangan menjadi hal penting bagi manusia. Salah satu cara untuk menyediakan bahan pangan manusia adalah dengan pertanian. Penggunaan bioteknologi dalam pertanian memberi keuntungan antara lain tanaman atau ternak dapat menghasilkan produk yang lebih tinggi, pengurangan penggunaan pestisida dan herbisida pada lahan, dan memperpanjang daya tahan atau kesehatan tanaman atau ternak. Secara umum konsumen akan memilih pangan rendah atau tanpa pestisida dan herbisida, nilai gizi tinggi, dan peningkatan rasa dan penampilan.

Indonesia dan negara berkembang lain, memiliki 4 keuntungan dalam pengembangan bioteknologi bahan pangan. Keuntungan tersebut adalah

- ✓ Sistem pertanian yang dapat ditingkatkan produktivitasnya dengan menggunakan pengolahan konvensional termodifikasi,

- ✓ Pemupukan alami lebih ramah lingkungan yang menjamin ketersediaan nutrisi pada tanah
- ✓ Potensi pertanian yang belum teroptimalkan, dan mereduksi penggunaan bahan kimia dalam pestisida.
- ✓ Pengembangan bioteknologi dapat mendukung ketahanan pangan Indonesia.

Perkembangan produk GMO menjadi isu yang perlu diseriuskan dalam pengembangannya. Salah satu contoh produk GMO adalah tanaman transgenik. Untuk membuat suatu tanaman transgenik, pertama-tama dilakukan identifikasi atau pencarian gen yang akan menghasilkan sifat tertentu (sifat yang diinginkan). Gen yang diinginkan dapat diambil dari tanaman lain, hewan, cendawan, atau bakteri. Setelah gen yang diinginkan didapat maka dilakukan perbanyakan gen yang disebut dengan istilah kloning gen. Pada tahapan kloning gen, DNA asing akan dimasukkan ke dalam vektor kloning (agen pembawa DNA), contohnya plasmid (DNA yang digunakan untuk transfer gen). Kemudian, vektor kloning akan dimasukkan ke dalam bakteri sehingga DNA dapat diperbanyak seiring dengan perkembangbiakan bakteri tersebut. Apabila gen yang diinginkan telah diperbanyak dalam jumlah yang cukup maka akan dilakukan transfer gen asing tersebut ke dalam sel tumbuhan yang berasal dari bagian tertentu, salah satunya adalah bagian daun. Transfer gen ini dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu metode senjata gen, metode transformasi DNA yang diperantarai bakteri *Agrobacterium tumefaciens*, dan elektroporasi (metode transfer DNA dengan bantuan listrik).

- **Metode senjata gen** atau **penembakan mikro-proyektil**. Metode ini sering digunakan pada spesies jagung dan padi. Untuk melakukannya, digunakan senjata yang dapat menembakkan mikro-proyektil berkecepatan tinggi ke dalam sel tanaman. Mikro-proyektil tersebut akan mengantarkan DNA untuk masuk ke dalam sel tanaman. Penggunaan senjata gen memberikan hasil yang bersih dan aman, meskipun ada kemungkinan terjadi kerusakan sel selama penembakan berlangsung.
- **Metode transformasi yang diperantarai oleh *Agrobacterium tumefaciens***
Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dapat menginfeksi tanaman secara alami karena memiliki plasmid Ti, suatu vektor (pembawa DNA) untuk menyisipkan gen asing. Di dalam plasmid Ti terdapat gen yang menyandikan sifat virulensi untuk menyebabkan penyakit tanaman tertentu. Gen asing yang ingin dimasukkan ke dalam tanaman dapat disisipkan di dalam plasmid Ti. Selanjutnya, *A. tumefaciens* secara langsung dapat memindahkan gen pada plasmid tersebut ke dalam genom (DNA) tanaman. Setelah DNA asing

menyatu dengan DNA tanaman maka sifat-sifat yang diinginkan dapat diekspresikan tumbuhan

- **Metode elektroporasi.** Pada metode elektroporasi ini, sel tanaman yang akan menerima gen asing harus mengalami pelepasan dinding sel hingga menjadi protoplas (sel yang kehilangan dinding sel). Selanjutnya sel diberi kejutan listrik dengan voltase tinggi untuk membuka pori-pori membran sel tanaman sehingga DNA asing dapat masuk ke dalam sel dan bersatu (terintegrasi) dengan DNA kromosom tanaman. Kemudian, dilakukan proses pengembalian dinding sel tanaman

Berikut ini adalah beberapa produk GMO yang telah berhasil dikembangkan di Dunia tersaji pada Tabel 1

Tabel 1. Beberapa produk GMO dari Pangan yang dikembangkan di Dunia

NO	Jenis Tanaman	Sasaran Modifikasi Genetik	Hasil Modifikasi
1	Padi	Mengandung provitamin A (beta-karotena) dalam jumlah tinggi.	Gen dari tumbuhan narsis, jagung, dan bakteri <i>Erwinia</i> disisipkan pada kromosom padi
2	Jagung, kapas, kentang	Tahan (resisten) terhadap hama	Gen toksin Bt (<i>Crystal protoksin</i>) dari bakteri <i>Bacillus thuringiensis</i> ditransfer ke dalam tanaman
3	Tembakau	Tahan terhadap suhu dingin	Gen untuk mengatur pertahanan pada cuaca dingin dari tanaman <i>Arabidopsis thaliana</i> atau dari sianobakteri (<i>Anacyctis nidulans</i>) dimasukkan ke tembakau
4	Tomat	Proses pelunakan tomat diperlambat sehingga tomat dapat disimpan lebih lama dan tidak cepat busuk	Gen khusus yang disebut <i>antisenescens</i> ditransfer ke dalam tomat untuk menghambat enzim <i>poligalakturonase</i> (enzim yang mempercepat kerusakan dinding sel tomat).
5	Kedelai	Mengandung asam oleat tinggi dan tahan terhadap herbisida glifosat. Dengan demikian, ketika disemprot dengan herbisida tersebut, hanya gulma di sekitar kedelai yang	Gen resisten herbisida dari bakteri <i>Agrobacterium</i> galur CP4 dimasukkan ke kedelai dan juga digunakan teknologi molekular untuk meningkatkan

		akan mati	pembentukan asam oleat
6	Kanola	Menghasilkan minyak kanola yang mengandung asam laurat tinggi sehingga lebih menguntungkan untuk kesehatan dan secara ekonomi. Selain itu, kanola transgenik yang disisipi gen penyandi vitamin E juga telah ditemukan	Gen <i>FatB</i> dari <i>Umbellularia californica</i> ditransfer ke dalam tanaman kanola untuk meningkatkan kandungan asam laurat
7	Pepaya	Resisten terhadap virus tertentu, contohnya <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	Gen yang menyandikan selubung virus PRSV ditransfer ke dalam tanaman pepaya
8	Melon	Buah tidak cepat busuk	Gen baru dari bakteriofag T3 diambil untuk mengurangi pembentukan hormon etilen (hormon yang berperan dalam pematangan buah) di melon .
9	Gandum	Resisten terhadap penyakit <u>hawar</u> yang disebabkan <u>cendawan <i>Fusarium</i></u> .	Gen penyandi enzim kitinase (pemecah dinding sel cendawan) dari jelai (barley) ditransfer ke tanaman gandum.

Di Indonesia sendiri, tanaman transgenik (GMO) pernah dilakukan penanam pada tahun 1999, Indonesia pernah melakukan uji coba penanaman kapas transgenik di Sulawesi Selatan. Uji coba itu dilakukan oleh PT Monagro Kimia dengan memanfaatkan benih kapas transgenik *Bt* dari Monsanto. Hal itu mendatangkan banyak protes dari berbagai LSM sehingga pada bulan September 2000, areal kebun kapas transgenik seluas 10.000 ha gagal dibuka. Pada tahun yang sama, kampanye penerimaan kapas transgenik diluncurkan dengan melibatkan petani kapas dan ahli dalam dan luar negeri. Kasus tersebut berlangsung dengan pelik hingga pada Desember 2003, pemerintah Indonesia menghentikan komersialisasi kapas transgenik. Suatu studi kelayakan finansial terhadap kapas transgenik sempat dilakukan pada tahun 2001 di tiga kabupaten di Sulawesi Selatan, yaitu Bulukumba, Banteng, dan Gowa. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa budidaya kapas transgenik lebih menguntungkan secara finansial dibandingkan kapas nontransgenik.

Untuk saat ini tanaman transgenik yang berhasil dikembangkan dan sudah dikomersialkan di Indonesia adalah Tebu transgenik yang dikembangkan oleh tim

peneliti Universitas Jember, yang dipimpin Prof Bambang Sugiharto. Tebu transgenik ini tahan terhadap cekaman kekeringan yang diberi nama **Tebu NXI-4T Toleran Kekeringan**. Sebelumnya sudah ada PRG yang sudah dihasilkan oleh Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen) Balitbang Pertanian, Kementerian pertanian yaitu Padi dan Jagung. Namun masih dalam proses pengembangan dan uji kelayakan pangan. Berbagai riset tanaman transgenik yang meliputi padi, kedelai, pepaya, kentang, ubi jalar, dan tomat, masih terus dilakukan oleh Indonesia oleh beberapa kampus besar di Indonesia. Salah satunya IPB telah mengembangkan PRG kentang jala ipam. Pada tahun 2010, sebanyak 50% dari kedelai impor yang digunakan di Indonesia merupakan produk transgenik yang di antaranya didatangkan dari Amerika Serikat. Hal ini menyebabkan sebagian besar produk olahan kedelai, seperti tahu, tempe, dan susu kedelai telah terbuat dari tanaman transgenik.

2.3. Keamanan dan Peraturan (PP) dalam Penggunaan GMO

Perkembangan pesat produk GMO telah membuat National Institutes of Health (NIH) mengeluarkan panduan tentang laboratorium yang bekerja dalam teknologi DNA pada tahun 1976 dan direvisi pada 1980. Peraturan pangan produk GMO kemudian diregulasikan oleh Food and Drug Administration (FDA). Pada saat awal peraturan pangan produk GMO ini berfokus pada chymosin, triptopan, dan bovine somatotropin. Saat ini panduan mengenai produk pangan asal GMO disusun oleh National Institutes of Health (NIH), the Animal Plant Health Inspection Service (APHIS) of the USDA, Food and Drug Administration (FDA), dan Environmental Protection Agency (EPA)

Berdasarkan PP no 28 tahun 2004, pangan hasil rekayasa genetika atau GMO adalah pangan atau produk pangan yang diturunkan dari tanaman, atau hewan yang dihasilkan melalui proses rekayasa genetika. Sebagaimana jenis pangan lain yang diregulasi pemerintah melalui undang-undang (UU) dan peraturan pemerintah (PP), pangan GMO juga diregulasi dalam pasal 14 PP No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan, serta dalam pasal 35 PP No.69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan. Pemeriksaan keamanan pangan rekayasa genetika oleh FDA dan EPA meliputi keamanan bahan yang ditambahkan, keamanan produk, keamanan pangan secara keseluruhan dalam tahap produksinya. Secara khusus untuk menilai keamanan pangan daging asal hewan transgenik adalah ada tidaknya gen asing, bagaimana produk dari gen asing tersebut, ada tidaknya ancaman yang berasal dari gen yang ditransfer, dan kondisi fisik dan penampilan hewan tersebut

Berdasarkan pasal 14 PP No. 28 tahun 2004 yang terdiri atas 5 ayat, dapat disimpulkan bahwa setiap orang yang memproduksi pangan, bahan baku, bahan tambahan pangan atau bahan bantu lainnya yang merupakan GMO harus memeriksakan bahan-bahan tersebut ke komisi yang menangani keamanan pangan produk rekayasa genetika. Pemeriksaan tersebut antara lain meliputi informasi genetika dari bahan tersebut, deskripsi organisme donor, deskripsi modifikasi genetika, karakterisasi modifikasi genetika, dan informasi keamanan pangannya. Persyaratan dan tata cara pemeriksaan juga menjadi wewenang komisi yang menangani keamanan pangan produk rekayasa genetika untuk menetapkannya. Setelah itu, berdasarkan rekomendasi dari komisi tersebut, Kepala Badan POM menetapkan aman atau tidaknya pangan GMO tersebut.

Sedangkan menurut pasal 35 PP No. 69 tahun 1999, disebutkan bahwa pada label untuk pangan hasil rekayasa genetika wajib dicantumkan tulisan PANGAN HASIL REKAYASA GENETIKA. Pada Label cukup dicantumkan keterangan tentang pangan rekayasa genetika pada bahan yang merupakan pangan hasil rekayasa genetika tersebut dan juga dapat dicantumkan logo khusus pangan hasil rekayasa genetika. Dari isi ketiga ayat pada PP No. 69 tahun 1999 tentang label dan Iklan tersebut, Indonesia masih dalam posisi netral dan menghargai hak konsumen untuk mengetahui komponen bahan pangan yang dikonsumsinya, termasuk pangan hasil rekayasa genetika.

Tahapan pengujian produk GMO untuk dilepas ke lapangan harus mengikuti proses pengujian Fasilitas Uji Terbatas (FUT) dan Lapangan Uji Terbatas (LUT). Serta ditinjau dari keamanan pangan, dan lingkungan. Analisis Resiko Lingkungan (ARL) Produk GMO dapat di atur berdasarkan

Pasal 47 UU 32/2009 Tentang PPLH:

(1) Setiap usaha dan/atau kegiatan yang berpotensi menimbulkan dampak pen'ng terhadap lingkungan hidup, ancaman terhadap ekosistem dan kehidupan, dan/atau kesehatan dan keselamatan manusia wajib melakukan analisis risiko lingkungan hidup. Analisis Risiko Lingkungan adalah prosedur yang antara lain digunakan untuk mengkaji pelepasan dan peredaran produk rekayasa genetik dan pembersihan(clean up) limbah B3.

(2) Analisis risiko lingkungan hidup meliputi: pengkajian risiko; pengelolaan risiko; komunikasi risiko.

Untuk melakukan pengkajian Keamanan Lingkungan diperlukan Dokumen ARL (UU 32/2009) yang dibuat oleh Proponen. Data dan informasi untuk pengisian Dokumen ARL berasal dari data sekunder dan data primer di Indonesia. Data Primer

dilakukan melalui pengujian di FUT dan LUT (oleh Proponen bekerjasama dengan lembaga yang kompeten.

- ✓ **Keamanan lingkungan** adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah kemungkinan timbulnya resiko yang merugikan keanekaragaman hayati' sebagai akibat pemanfaatan PRG.
- ✓ **Pengkajian keamanan lingkungan** adalah keseluruhan proses pemeriksaan dokumen dan pengujian PRG serta faktor sosial-ekonomi terkait.
- ✓ **Pengujian keamanan lingkungan** adalah evaluasi dan kajian teknis PRG meliputi teknik perkeayasaan, efikasi dan persyaratan keamanan hayati di laboratorium, fasilitas uji terbatas (FUT) dan/atau lapangan uji terbatas (LUT)

Sumber Data dalam pengakuan sebagai produk GMO harus memiliki sumber yang akurat. Pembagian ini dapat dikelompokkan menjadi 2 yaitu :

1. Data Primer

- ✓ Hasil pengujian di Indonesia (laboratorium, FUT, LUT), kecuali vaksin tidak memerlukan LUT
- ✓ Pengujian oleh lembaga terpercaya

2. Data Sekunder

- ✓ Data sah
- ✓ Sudah dipublikasi pada jurnal nasional terakreditasi, jurnal internasional terindeks atau media lain yang memiliki mitra bestari (peer review)

III. EVALUASI

A. Latihan

- 1) Jelaskan pengertian Genetic Modified Organism (GMO)?
- 2) Jelaskan Produk – Produk GMO yang telah dikembangkan didunia ?
- 3) Jelaskan Undang – Undang yang mengatur tentang GMO?
- 4) Jelaskan Tahapan pengujian dan syarat produk GMO sebelum dilepas kelapangan ?

B. Tugas

1. Buatlah makalah tentang salah satu produk GMO dan perkembangannya !
2. Presentasikan makalah tersebut oleh masing – masing kelompok !

C. Penilaian Tugas

1. Tugas dibuat di blog mahasiswa
2. Blog di link ke web hybrid learning.

3. Blog tersebut harus mencantumkan logo dan nama Universitas Esa Unggul
4. Diselesaikan sebelum batas akhir penyerahan tugas

IV. DAFTAR PUSTAKA

- Alexander N. Glazer, Hiroshi Nikaidō (2007). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-84210-5. Page.210-211
- Amiruddin Syam (21 January 2010). "Analisis Kelayakan Finansial Usahatani Kapas Transgenik di sulawesi Selatan". Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian.
- Antonius Suwanto. "Tanaman Transgenik: Bagaimana Kita Menyikapinya?". BB-Biogen Bogor. Diakses 20 Agustus 2017.
- Deborah B. Whitman (2000). "Genetically Modified Foods: Harmful or Helpful?". CSA Discovery Guides.
- FG Winarno, Agustinah W (2007). *Pengantar Bioteknologi*. MBRIO Press. ISBN 979-3098-58-9. Hal.131-139;182
- www.litbang.deptan.go.id (9 Februari 2007). "Riset Transgenik Tetap Dilakukan". Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Indonesian Agency for Agricultural Research and Development. Diakses 8 Juni 2017.

BAB II. REKAYASA GENETIKA

DNA REKOMBINAN

I. Pendahuluan

A. Pengantar

Teknik DNA rekombinan adalah rekayasa genetika untuk menghasilkan sifat baru dengan cara merekombinasikan gen tertentu dengan DNA genom. Teknik DNA rekombinan merupakan kumpulan bertujuan untuk merekombinasi gen dalam tabung reaksi. Teknik DNA rekombinan meliputi isolasi DNA, teknik memotong DNA, teknik menggabung DNA dan teknik untuk memasukan DNA ke dalam sel hidup. Teknologi DNA rekombinan atau sering disebut juga rekayasa genetika ini adalah suatu ilmu yang mempelajari pembentukan kombinasi materi genetik yang baru dengan cara penyisipan molekul DNA ke dalam suatu vektor sehingga memungkinkannya terjadinya integrasi dan mengalami perbanyakan dalam suatu sel organisme lain yang berperan sebagai sel inang. Manfaat rekayasa genetika ini diantaranya adalah dimungkinkannya melakukan isolasi dan mempelajari fungsi masing-masing gen dan mekanisme kontrolnya. Selain itu, rekayasa genetika juga memungkinkan diperolehnya suatu produk dengan sifat tertentu dalam waktu lebih cepat dan jumlah lebih besar daripada produksi secara konvensional. Sejak jaman dahulu, nenek moyang kita telah mengetahui adanya keanekaragaman makhluk hidup.

Keanekaragaman makhluk hidup ini memungkinkan manusia untuk memilih jenis makhluk hidup yang dikehendaknya. Salah satu upaya nenek moyang kita dalam memilih jenis makhluk hidup yang unggul adalah dengan breeding atau mengawinkan beberapa spesies unggul untuk didapatkan keturunan yang unggul pula dan memiliki sifat dari kedua induknya. Dengan semakin berkembangnya ilmu genetika dan ditemukannya gen, maka manusia pun memiliki alternatif lain yang lebih efektif yaitu melalui teknik rekayasa genetika (*Genetic Engineering*) dengan cara melakukan perubahan langsung pada DNA. Salah satu upaya yang dilakukan adalah dengan DNA rekombinan

B. Kompetensi Dasar

Mahasiswa dapat memahami dan menjelaskan tentang pembuatan DNA rekombinan sebagai bentuk hasil rekayasa genetik.

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

- a. Memahami dan menjelaskan tentang teknik DNA rekombinan

- b. Memahami fungsi serta bentuk hasil rekayasa genetika
- c. Menjelaskan tahapan dalam teknologi DNA rekombinan

D. Kegiatan Pembelajaran

- a. Pembelajaran dilakukan dengan metoda contextual learning dan project based learning
- b. Mahasiswa mencari bahan pustaka, membuat bahan presentasi dan mempresentasikan hasil literasinya

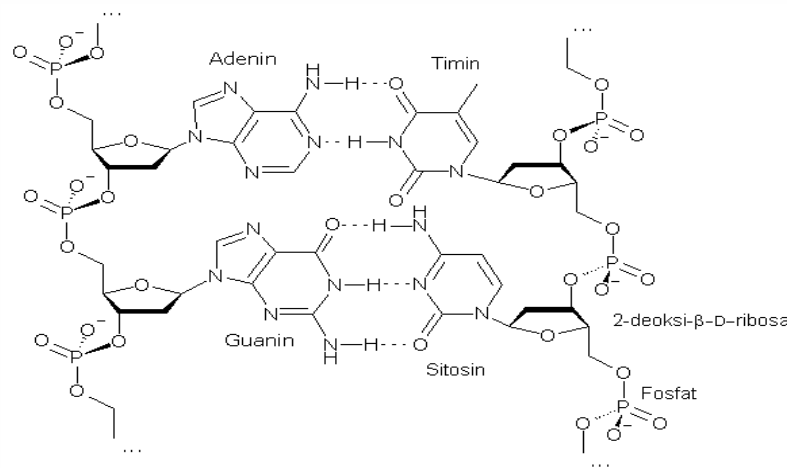
II. MATERI

2.1. DNA Sebagai Material Genetika

Rantai DNA adalah sebuah polimer panjang, tak bercabang, yang hanya tersusun dari empat macam subunit. Subunit – subunit ini adalah deoksiribonukleotid yang mengandung basa – basa adenine (A), sitonin (C), guanin (G), dan timin (T). Nukleotid – nukleotid itu saling dirangkaikan dengan ikatan ikatan fosfodiester kovalen yang menghubungkan karbon 5' pada sebuah gugus deoksiribosa dengan karbon 3' pada gugus berikutnya. Keempat macam basa tadi tersambung ke rantai gula –fosfat yang hampir seperti empat macam manik- manik yang menjadi sebuah kalung (Gambar 1).

Terdapat tiga hal penting pada struktur DNA dari hasil analisa kimia

1. DNA mengandung sejumlah basa purin dan pirimidin yang sama dalam heliks ganda.
2. Terdapat kesetimbangan antara jumlah adenin dengan timin, dan guanin dengan sitosin (A=T dan G=C).
3. Perbandingan antara (A+T) dengan (G+C) dapat bervariasi, tetapi mempunyai nilai yang tetap pada masing-masing spesies



Gambar 1. Struktur DNA

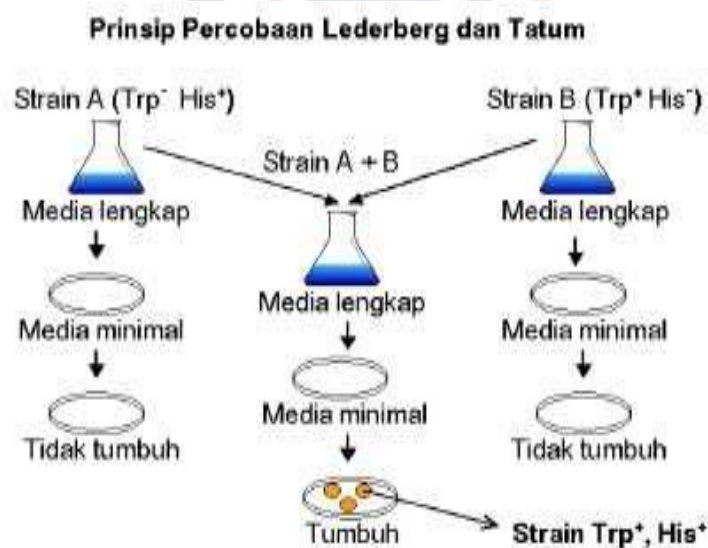
DNA tersusun atas 3 komponen utama yaitu gula deoksiribosa, basa nitrogen, dan fosfat. DNA yang menyusun kromosom ini merupakan nukleotida rangkap yang tersusun heliks ganda, dimana basa nitrogen dan kedua benang polinukleotida saling berpasangan dalam pasangan yang tetap melalui ikatan hidrogen dan antara nukleotida yang satu dengan nukleotida yang lain dihubungkan dengan ikatan fosfat. Ikatan-ikatan fosfat itu sangat kuat dan dikenal sebagai ikatan ikatan ester kovalen, atau ikatan fosfodiester. Residu fosfat (PO^4) sepanjang rantai ini bersifat asam, sehingga diberi nama asam nukleat.

2.2. Dasar Teknologi DNA Rekombinan

Teknik Dasar teknologi DNA rekombinan Bakteri memiliki mekanisme seksual yang telah dibuktikan pada tahun 1946.

Konsekwensi dari mekanisme seksual adalah:

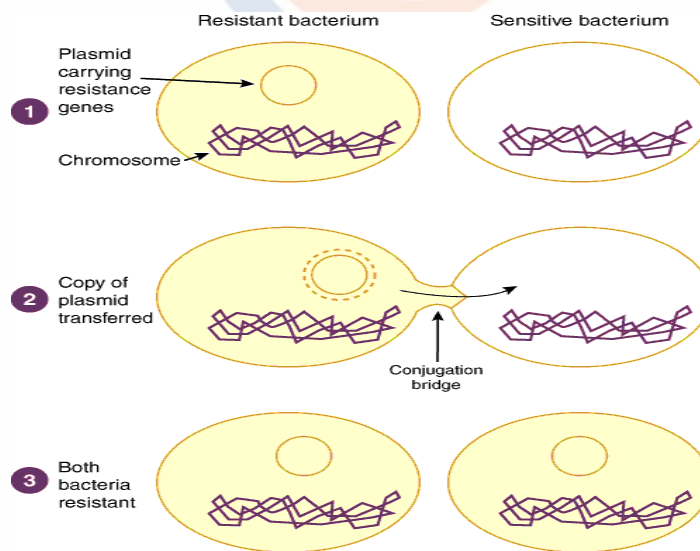
- Menyebabkan terbentuknya kombinasi gen-gen yang berasal dari dua sel yang berbeda
- Terjadi pertukaran DNA atau gen dari satu sel ke sel yang lain. Mekanisme seksual ini tidak bersifat reproduktif atau tidak menghasilkan keturunan



Gambar 2. Hasil Penelitian Lederberg dan Tatum

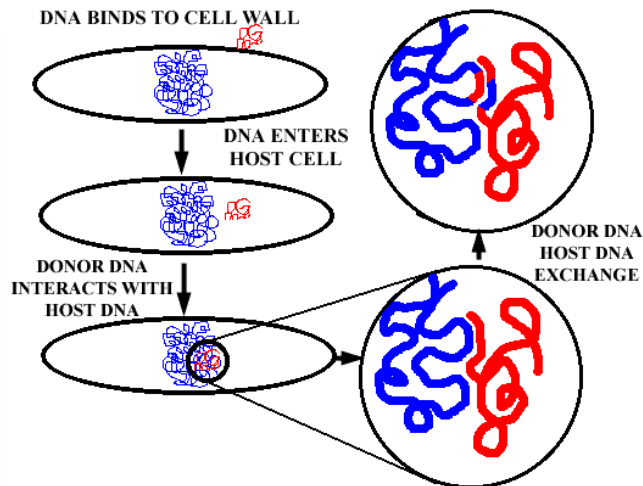
Transfer DNA atau perpindahan DNA ke dalam bakteri dapat melalui tiga cara, yaitu konjugasi, transformasi, dan transduksi. DNA yang masuk ke dalam sel bakteri selanjutnya dapat berintegrasi dengan DNA atau kromosom bakteri sehingga terbentuk kromosom rekombinan. Konjugasi merupakan perpindahan DNA dari satu sel (sel donor) ke dalam sel bakteri lainnya (sel resepien) melalui kontak fisik antara kedua sel. Sel donor memasukkan sebagian DNA-nya ke dalam sel resepien.

Transfer DNA ini melalui pili seks yang dimiliki oleh sel donor. Sel resepien tidak memiliki pili seks. DNA dari sel resepie berpindah ke sel resipien secara replikatif sehingga setelah proses ini selesai, sel jantan tidak kehilangan DNA. Ke dua sel tidak mengalami peningkatan jumlah sel dan tidak dihasilkan sel anak. Oleh karena itu, proses konjugasi disebut juga sebagai proses atau mekanisme seksual yang tidak reproduktif.

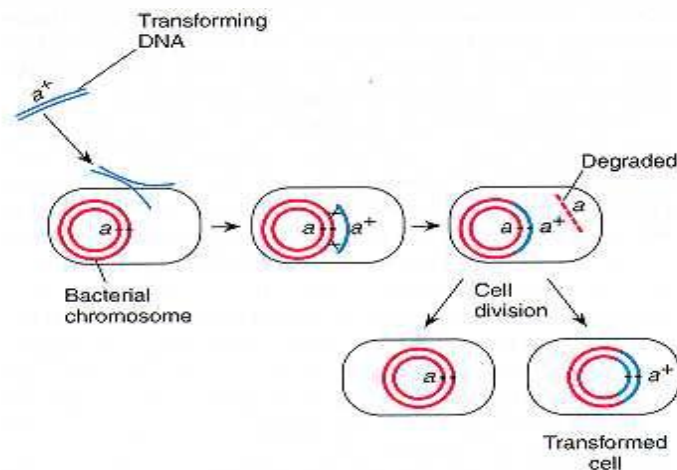


Gambar 3. Proses konjugasi yang menyebabkan resistensi pada plasmid

Transformasi merupakan pengambilan DNA oleh bakteri dari lingkungan di sekelilingnya. DNA yang berada di sekitar bakteri (DNA asing) dapat berupa potongan DNA atau fragmen DNA yang berasal dari sel bakteri yang lain atau organisme yang lain. Masuknya DNA dari lingkungan ke dalam sel bakteri ini dapat terjadi secara alami. Pada tahun 1928 ditemukan strain bakteri yang tidak virulen dapat berubah sifatnya menjadi virulen disebabkan adanya strain yang tidak virulen dicampur dengan sel-sel bakteri strain virulen yang telah dimatikan. Tahun 1944 ditemukan bahwa perubahan sifat atau transformasi dari bakteri yang tidak virulen menjadi virulen disebabkan oleh adanya DNA dari sel bakteri strain virulen yang masuk ke dalam bakteri strain yang tidak virulen (Gambar 4 dan Gambar 5)

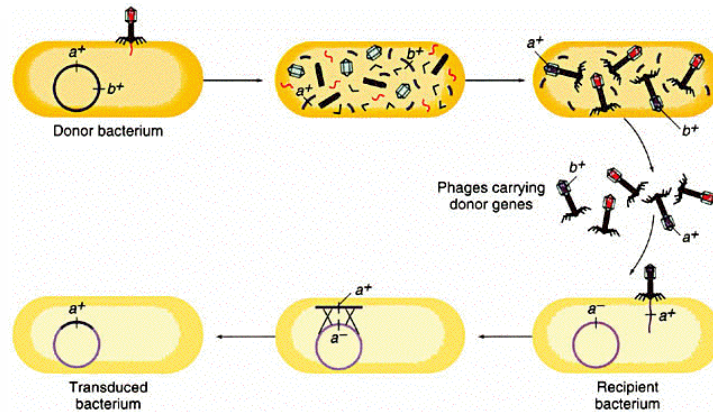


Gambar 4. Proses Transformasi DNA



Gambar 5. Proses transformasi pada sel bakteri

Transduksi adalah cara pemindahan DNA dari satu sel ke dalam sel lainnya melalui perantara bakteriofage. Beberapa jenis virus berkembang biak di dalam sel bakteri. Virus-virus yang inangnya adalah bakteri sering disebut bakteriofag atau fage. Ketika virus menginfeksi bakteri, fage memasukkan DNA-nya ke dalam sel bakteri. DNA tersebut kemudian akan bereplikasi di dalam sel bakteri atau berintegrasi dengan kromosom bakteri. DNA fage yang dikemas ketika membentuk partikel fage baru akan membawa sebagian DNA bakteri yang menjadi inangnya. Selanjutnya jika fage tersebut menginfeksi bakteri yang lain, maka fage akan memasukkan DNANYA yang sebagian mengandung DNA sel inang sebelumnya. Jadi, secara alami fage memindahkan DNA dari satu sle bakteri ke bakteri yang lain.



Gambar 6. Proses transduksi pada sel bakteri

2.3. Perangkat teknologi DNA rekombinan

Adapun perangkat yang digunakan dalam teknik DNA rekombinan diantaranya

- ✓ Enzim restriksi untuk memotong DNA, enzim ligase untuk menyambung DNA dan vektor untuk menyambung dan mengklonkan gen di dalam sel hidup,
- ✓ Transposon sebagai alat untuk melakukan mutagenesis dan untuk menyisipkan penanda,
- ✓ Pustaka genom untuk menyimpan gen atau fragmen DNA yang telah diklonkan,
- ✓ Enzim transkripsi balik untuk membuat DNA berdasarkan RNA,
- ✓ Pelacak DNA atau RNA untuk mendeteksi gen atau fragmen DNA yang diinginkan atau untuk mendeteksi klon yang benar.
- ✓ Vektor yang sering digunakan diantaranya plasmid, kosmid dan bakteriofag

III. EVALUASI BELAJAR

a. Latihan

- 1) Jelaskan tentang Teknologi DNA Rekombinan
- 2) Jelaskan 3 teknik dasar Teknologi DNA Rekombinan
- 3) Jelaskan Perangkat yang penting dalam Teknologi DNA Rekombinan

b. Tugas

- 1) Buatlah Kelompok diskusi yang menerangkan tentang Teknologi DNA Rekombinan

Penilaian Tugas

1. Tugas dibuat di blog mahasiswa
2. Blog di link ke web hybrid learning.

3. Blog tersebut harus mencantumkan logo dan nama Universitas Esa Unggul
4. Diselesaikan sebelum batas akhir penyerahan tugas

IV. DAFTAR PUSTAKA

Brown TA. 2006. *Gene Cloning and DNA analysis an Introduction*. 4nd ed. Australia: Blackweel Publishing Asia Pty Ltd

Old RW and Primrose SB. 2003. *Prinsip – Prinsip Manipulasi Gen* (terjemahan Herawati susilo). Edisi ke 4. UI press. Jakarta

Rifa'i M. 2010. *Buku Ajar Genetika*. Jurusan Biologi . Universitas Brawijaya. Malang

BAB III. ENZIM RESTRIKSI

I. PENDAHULUAN

A. Pengantar

Pada tahun 1960 an, enzim endonuklease restriksi ditemukan oleh Werner Arber dan Hamilton Smith, yang diisolasi dari mikroorganisme. Secara alamiah bakteri menghasilkan enzim endonuklease untuk mempertahankan dirinya dari keberadaan DNA asing yang masuk kedalam sel bakteri. Jika ada DNA asing masuk kedalam sel bakteri melalui proses transfer genetik yang terjadi secara alamiah, misalnya virus bakteriofag, maka akan mempertahankan dirinya dari keberadaan DNA asing tersebut, sel bakteri melepaskan enzim endonuklease yang dapat memotong DNA asing pada situs yang sangat spesifik dan restriktif Oleh sebab itu enzim tersebut dikenal dengan nama “enzim endonuklease restriksi”.

B. Kompetensi Dasar

Memiliki kemampuan dalam memahami tentang DNA sisipan serta situs pemotongan Enzim restriksi pada sekuens DNA

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan :

- a. Mampu menjelaskan tentang Enzim Restriksi
- b. Mampu menjelaskan dan mengelompokan Enzim restriksi berdasarkan situs pemotongannya
- c. Dapat mengenali jenis enzim restriksi pada suatu vektor

D. Kegiatan Pembelajaran

1. Pembelajaran dilakukan dengan metoda contextual learning *Small grup discussion* dan Presentasi
2. Mahasiswa mencari bahan pustaka, membuat bahan presentasi dan mempresentasikan hasil literasinya

II. MATERI

2.1 Enzim Enzim yang berkerja dalam manipulasi Gen

Enzim endonuklease restriksi yang sangat selektif dalam memotong untai DNA sangat bermanfaat bila diaplikasikan pada teknologi DNA rekombinan. Setiap enzim mengalami rangkaian 4 - 8 pasang basa tertentu yang terdapat dalam untai DNA. Bagian atas situs pada molekul DNA yang dikenali oleh enzim

endonuklease restriksi dikenal sebagai situs pemotongan enzim. Rangkaian - rangkaian situs pemotongan DNA oleh enzim ini apabila terdapat dalam genom bakteri itu sendiri, biasanya dilindungi dengan adanya gugus metil pada residu basa adenine (A) dan sitosin (C), sehingga tidak dapat dipotong oleh enzim endonuklease yang dihasilkan oleh bakteri sendiri. Setiap enzim endonuklease restriksi memiliki situs pengenalan pemotongan yang berbeda dan sangat spesifik.

Enzim restriksi digunakan untuk memotong DNA. Enzim restriksi mengenal dan memotong DNA pada sekuens spesifik yang panjangnya empat sampai enam pasang basa. Enzim tersebut dikenal dengan nama enzim endonuklease restriksi. Berikut ini adalah macam-macam enzim endonuklease restriksi

Tabel 2. Enzim restriksi yang sering digunakan pada proses rekombinasi DNA

Enzyme	Source	Recognition Sequence	Cut
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	3'CTTAAG 5'GAATTC	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
HindIII	<i>Haemophilus Influenzae</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
Sau3A	<i>Staphylococcus aureus</i>	5'GATC 3'CTAG	5'--- GATC---3' 3'---CTAG ---5'
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'
EcoRV	<i>Escherichia coli</i>	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT ATC---3' 3'---CTA TAG---5'
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5'GGTACC 3'CCATGG	5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5'
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	5'CTGCAG 3'GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5'GAGCTC 3'CTCGAG	5'---GAGCT C---3' 3'---C TCGAG---5'

Tahap kedua dalam kloning gen adalah pemotongan molekul DNA, baik genomik maupun plasmid. Perkembangan teknik pemotongan DNA berawal dari saat ditemukannya sistem restriksi dan modifikasi DNA pada bakteri *E. coli*, yang

berkaitan dengan infeksi virus atau bakteriofag lambda (λ). Virus λ digunakan untuk menginfeksi dua strain *E. coli*, yakni strain K dan C. Jika λ yang telah menginfeksi strain C diisolasi dari strain tersebut dan kemudian digunakan untuk mereinfeksi strain C, maka akan diperoleh λ progeni (keturunan) yang lebih kurang sama banyaknya dengan jumlah yang diperoleh dari infeksi pertama. Dalam hal ini, dikatakan bahwa efficiency of plating (EOP) dari strain C ke strain C adalah 1. Namun, jika λ yang diisolasi dari strain C digunakan untuk menginfeksi strain K, maka nilai EOP-nya hanya 10^{-4} . Artinya, hanya ditemukan λ progeni sebanyak 1/10.000 kali jumlah yang diinfeksi. Sementara itu, λ yang diisolasi dari strain K mempunyai nilai EOP sebesar 1, baik ketika direinfeksi pada strain K maupun pada strain C. Hal ini terjadi karena adanya sistem restriksi atau modifikasi (r/m) pada strain K. Pada waktu bakteriofag λ yang diisolasi dari strain C diinfeksi ke strain K, molekul DNANYA dirusak oleh enzim endonuklease restriksi yang terdapat di dalam strain K. Di sisi lain, untuk mencegah agar enzim ini tidak merusak DNANYA sendiri, strain K juga mempunyai sistem modifikasi yang akan menyebabkan metilasi beberapa basa pada sejumlah urutan tertentu yang merupakan tempat-tempat pengenalan (recognition sites) bagi enzim restriksi tersebut. DNA bakteriofag λ yang mampu bertahan dari kerusakan oleh enzim restriksi pada siklus infeksi pertama akan mengalami modifikasi dan memperoleh kekebalan terhadap enzim restriksi tersebut. Namun, kekebalan ini tidak diwariskan dan harus dibuat pada setiap akhir putaran replikasi DNA. Dengan demikian, bakteriofag λ yang diinfeksi dari strain K ke strain C dan dikembalikan lagi ke strain K akan menjadi rentan terhadap enzim restriksi. Metilasi hanya terjadi pada salah satu di antara kedua untai molekul DNA. Berlangsungnya metilasi ini demikian cepatnya pada tiap akhir replikasi hingga molekul DNA baru hasil replikasi tidak akan sempat terpotong oleh enzim restriksi. Enzim restriksi dari

strain K telah diisolasi dan banyak dipelajari. Selanjutnya, enzim ini dimasukkan ke dalam suatu kelompok enzim yang dinamakan enzim restriksi tipe I.

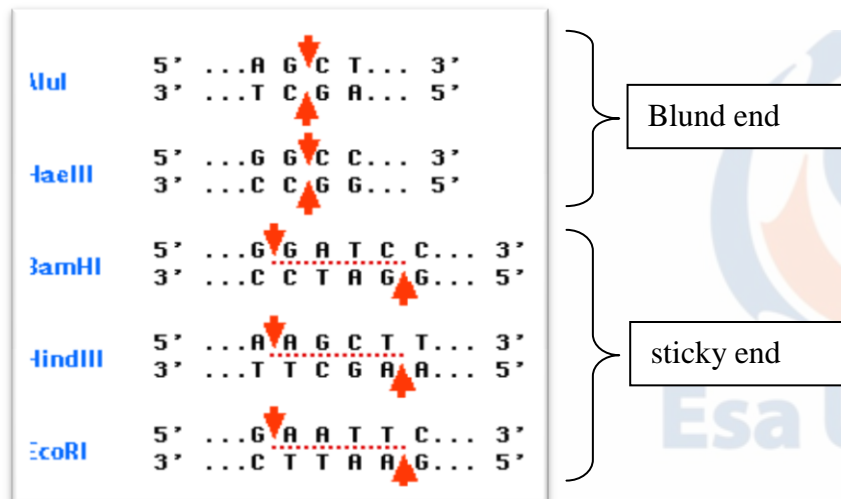
Banyak enzim serupa yang ditemukan kemudian pada berbagai spesies bakteri lainnya. Pada tahun 1970 ditemukan enzim pertama yang kemudian dimasukkan ke dalam kelompok enzim restriksi lainnya, yaitu enzim restriksi tipe II. Ia mengisolasi enzim tersebut dari bakteri *Haemophilus influenzae* strain Rd, dan sejak saat itu ditemukan lebih dari 475 enzim restriksi tipe II dari berbagai spesies dan strain bakteri. Semuanya sekarang telah menjadi salah satu komponen utama dalam tata kerja rekayasa genetika. Enzim restriksi tipe II antara lain mempunyai sifat-sifat umum yang penting sebagai berikut:

- ✓ Mengenal urutan tertentu sepanjang empat hingga tujuh pasang basa di dalam molekul DNA
- ✓ Memotong kedua untai molekul DNA di tempat tertentu pada atau di dekat tempat pengenalannya
- ✓ Menghasilkan fragmen-fragmen DNA dengan berbagai ukuran dan urutan basa.

Sebagian besar enzim restriksi tipe II akan mengenali dan memotong urutan pengenal yang mempunyai sumbu simetri rotasi. Pemberian nama kepada enzim restriksi mengikuti aturan sebagai berikut. Huruf pertama adalah huruf pertama nama genus bakteri sumber isolasi enzim, sedangkan huruf kedua dan ketiga masing-masing adalah huruf pertama dan kedua nama petunjuk spesies bakteri sumber tersebut. Huruf-huruf tambahan, jika ada, berasal dari nama strain bakteri, dan angka romawi digunakan untuk membedakan enzim yang berbeda tetapi diisolasi dari spesies yang sama. Tempat pemotongan pada kedua untai DNA sering kali terpisah sejauh beberapa pasang basa. Pemotongan DNA dengan tempat pemotongan semacam ini akan menghasilkan fragmen fragmen dengan ujung 5' yang runcing karena masing-masing untai tunggalnya menjadi tidak sama panjang

2.2 Tipe Pemotongan Enzim Restriksi

Enzim endonuklease restriksi yang berbeda, memiliki situs pemotongan yang berbeda, namun ada beberapa jenis enzim endonuklease restriksi yang diisolasi dari sumber yang berbeda memiliki situs pemotongan yang sama. Enzim - enzim endonuklease restriksi yang memiliki situs pemotongan yang sama disebut isochizomer. Sekuens basa DNA pada situs pemotongan memiliki urutan basa yang sama pada untai DNA heliks ganda, yang dikenal dengan sekuens palindromik. Misalnya enzim EcoRI, yang diisolasi pertama kali oleh Herbert Boyer pada tahun 1969 dari *Escherichia coli* yang memotong DNA pada bagian antara basa G dan A pada sekuens GAATTC. Hasil pemotongan enzim endonuklease restriksi ada dua macam yaitu menghasilkan ujung tumpul (**blunt end**) dan ujung menggantung (**sticky end**) atau kohesif (Gambar 6).



Gambar 6 Tipe pemotongan Enzim restriksi

Dua fragmen DNA dengan ujung yang runcing akan mudah disambungkan satu sama lain sehingga ujung runcing disebut sebagai ujung lengket (sticky end) atau ujung kohesif. Hal itu berbeda dengan enzim restriksi seperti Hae III, yang mempunyai tempat pemotongan DNA pada posisi yang sama. Kedua fragmen hasil pemotongannya akan mempunyai ujung 5' yang tumpul karena masing-masing untai tunggalnya sama panjangnya. Fragmen-fragmen DNA dengan ujung tumpul (blunt end) akan sulit untuk disambungkan. Biasanya diperlukan perlakuan tambahan untuk menyatukan dua fragmen DNA dengan ujung tumpul, misalnya pemberian molekul linker, molekul adaptor, atau penambahan enzim deoksinukleotidil transferase untuk mensintesis untai tunggal homopolimerik 3'

Ujung rata (blunt end) dihasilkan ketika dua utas molekul dipotong pada posisi yang sama, bagian akhirnya rata dan tidak ada nukleotida yang tidak berpasangan. Ujung kohesif (sticky end) dihasilkan ketika setiap molekul DNA dipotong pada posisi yang tidak sama sehingga salah satu utas (5' atau 3') menggantung dengan beberapa nukleotida. Akhiran single strand yang tidak rata ini dapat berpasangan secara spontan dengan basa 3 pasangannya sehingga disebut "sticky" (mudah lengket) atau kohesif.

2.3 Enzim seluler

Ada beberapa bagian terpenting yang selalu digunakan dalam rekayasa genetika. Yang pertama adalah enzim seluler dan yang kedua adalah vektor. Enzim yang dipakai oleh orang-orang bioteknologi dalam memanipulasi DNA diantaranya adalah sebagai berikut

Enzim Endonuklease, yaitu enzim yang mengenali batas-batas sekuen nukleotida spesifik dan berfungsi dalam proses restriction atau pemotongan bahan-

bahan genetik. Penggunaan enzim ini yang paling umum antara lain pada sekuen palindromik. Enzim ini dibentuk dari bakteri yang dibuat sedemikian rupa sehingga dapat menahan penyusupan DNA, seperti genom bacteriophage.

DNA polimerisase, yaitu enzim yang biasa dipakai untuk meng-copy DNA. Enzim ini mensintesis DNA dari sel induknya dan membentuk DNA yang sama persis ke sel induk barunya. Enzim ini juga bisa didapatkan dari berbagai jenis organisme, yang tidak mengherankan, karena semua organisme pasti harus meng-copy DNA mereka.

Enzim RNA polimerisase yang berfungsi untuk 'membaca' sekuen DNA dan mensintesis molekul RNA komplementer. Seperti halnya DNA polimerisasi, RNA polimerisasi juga banyak ditemukan di banyak organisme karena semua organisme harus 'merekam' gennya.

Enzim DNA ligase. Enzim DNA ligase merupakan suatu enzim yang berfungsi untuk menyambungkan suatu bahan genetik dengan bahan genetik yang lain. Contohnya saja, enzim DNA ligase ini dapat bergabung dengan DNA (atau RNA) dan membentuk ikatan phosphodiester baru antara DNA (atau RNA) yang satu dengan lainnya. Kemudian, ada pula enzim reverse transcriptases yang berfungsi membentuk blue-print dari molekul RNA membentuk cDNA (DNA komplementer). Enzim ini dibuat dari virus RNA yang mengubah genom RNA virus menjadi DNA ketika virus menginfeksi inangnya. Enzim ini biasa dipakai ketika bertemu dengan gen eukariotik yang biasanya terpisah-pisah menjadi potongan kecil dan dipisahkan oleh introns dalam kromosom

III. EVALUASI BELAJAR

A. Latihan

- Jelaskan tipe pemotongan enzim restriksi dan berikan contoh ?
- Jelaskan jenis enzim seluler yang biasa digunakan dalam manipulasi gen ?
- Buat 10 jenis enzim restriksi lengkap dengan situs pemotongannya!

B. Tugas

Buatlah pemetaan Enzim Restriksi pada suatu Vektor dan jelaskan tipe pemotongannya

C. Penilaian Tugas

- Tugas dibuat di blog mahasiswa
- Blog di link ke web hybrid learning.
- Blog tersebut harus mencantumkan logo dan nama Universitas Esa Unggul
- Diselesaikan sebelum batas akhir penyerahan tugas (Tanggal ...)

IV. DAFTAR PUSTAKA

Brown TA. 2006. *Gene Cloning and DNA analysis an Introduction*. 4nd ed. Australia: Blackweel Publishing Asia Pty Ltd

Old RW and Primrose SB. 2003. *Prinsip – Prinsip Manipuasi Gen* (terjemahan Herawati susilo). Edisi ke 4. UI press. Jakarta

Rifa'i M. 2010. *Buku Ajar Genetika*. Jurusan Biologi . Universitas Brawijaya. Malang

ggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa U

ggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa U

aaqul

Universitas
Esa Unaqul

Universitas
Esa U

BAB IV. VEKTOR KLONING

I. PENDAHULUAN

A. Pengantar

Pada Bab sebelumnya telah dibahas tentang teknologi DNA rekombinan dengan menggunakan vektor sebagai pembawa sisipan ke dalam sel. Jadi, Vektor adalah molekul DNA yang digunakan sebagai pembawa gen asing ke dalam sel inang. Vektor Rekombinan digunakan dalam manipulasi gen. Salah satu dari vektor tersebut adalah plasmid. Plasmid dipakai secara luas sebagai wahana pengkloning yang merupakan replikan yang diturunkan secara stabil dalam keadaan ekstrakromosom. Kebanyakan plasmid dalam bentuk molekul DNA melingkar yang berunting rangkap. Pembentukan vektor rekombinan dikarenakan adanya sisipan DNA asing yang dimasukkan dengan tujuan penggandaan DNA tersebut didalam sel bakteri atau yeast. Dalam bab ini akan dibahas tentang penggunaan plasmid secara umum sebagai vektor rekombinan

B. Kompetensi Dasar

Mahasiswa dapat memahami dan menjelaskan tentang pembuatan vektor rekombinan sebagai wahana pengkloning DNA dalam rekayasa genetika.

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

- ✓ Memahami dan menjelaskan tentang Vektor rekombinan
- ✓ Memahami dan mampu menjelaskan jenis – jenis vektor sesuai dengan sisipannya
- ✓

D. Kegiatan Pembelajaran

- ✓ Pembelajaran dilakukan dengan metoda contextual learning dan project based learning
- ✓ Mahasiswa mencari bahan pustaka, membuat bahan presentasi dan mempresentasikan hasil literasi
- ✓

II. MATERI

2.1 Pengertian dan Macam-macam Vektor Kloning

Vektor adalah molekul DNA yang berfungsi sebagai wahana atau kendaraan yang akan membawa suatu fragmen DNA masuk ke dalam sel inang dan memungkinkan terjadinya replikasi dan ekspresi fragmen DNA asing tersebut. Vektor

yang dapat digunakan pada sel inang prokariot, khususnya E. coli, adalah plasmid, bakteriofag, kosmid, dan fosmid. Sementara itu, vektor YACs dan YEps dapat digunakan pada khamir. Plasmid Ti, Baculovirus, SV40, dan retrovirus merupakan vektor-vektor yang dapat digunakan pada sel eukariot tingkat tinggi.

A.Plasmid

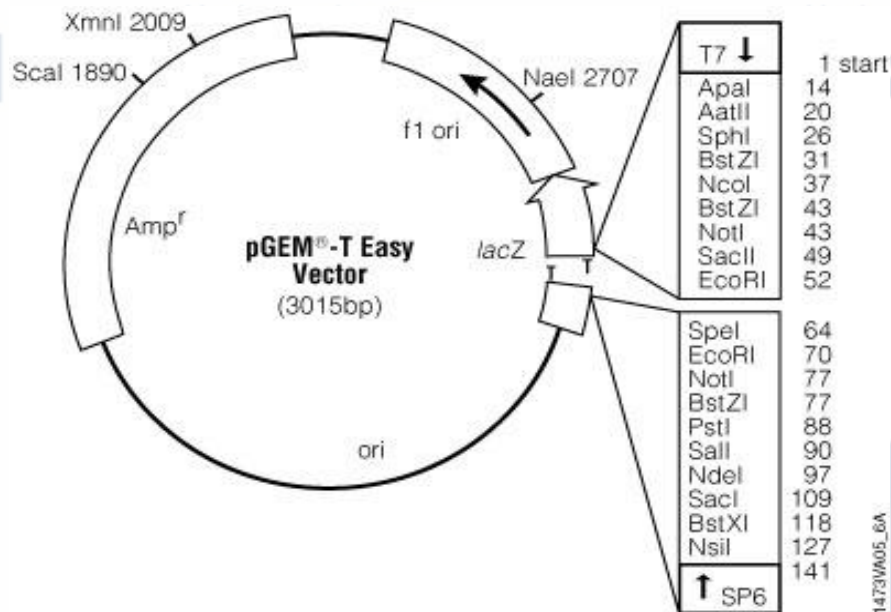
Secara umum plasmid dapat didefinisikan sebagai molekul DNA sirkuler untai ganda di luar kromosom yang dapat melakukan replikasi sendiri. Plasmid tersebar luas di antara organisme prokariot dengan ukuran yang bervariasi dari sekitar 1 kb hingga lebih dari 250 kb (1 kb = 1000 pb). Agar dapat digunakan sebagai vektor kloning, plasmid harus memenuhi syarat-syarat berikut ini:

- Mempunyai ukuran relatif kecil bila dibandingkan dengan pori dinding sel inang sehingga dapat dengan mudah melintasinya,
- Mempunyai sekurang-kurangnya dua gen marker yang dapat menandai masuk tidaknya plasmid ke dalam sel inang,
- Mempunyai tempat pengenalan restriksi sekurang-kurangnya di dalam salah satu marker yang dapat digunakan sebagai tempat penyisipan fragmen DNA, dan
- Mempunyai titik awal replikasi (ori) sehingga dapat melakukan replikasi di dalam sel inang.

Computational Plasmid adalah molekul DNA sirkular yang dapat bereplikasi secara autonom dalam sel bakteri hospes dan tersebar secara luas pada sel prokariot. Ukuran dari plasmid beragam dari yang pendek hingga yang berukuran ratusan kb (1-250 kb). Plasmid hampir selalu membawa satu atau lebih gen yang bermanfaat bagi hospesnya. Salah satunya kemampuan bertahan dalam konsentrasi toksik antibiotik seperti kloramfenikol dan ampisilin dikarenakan keberadaan dari plasmid bakteri yang membawa gen resisten antibiotik. Kebanyakan plasmid memiliki sekuens DNA yang menjadi *origin of replication*, sehingga plasmid dapat memperbanyak diri dalam sel secara independen.

Salah satu contoh plasmid buatan yang banyak digunakan dalam kloning gen adalah Plasmid pGEM-T Easy (Gambar 7) merupakan plasmid sirkular terbuka, memiliki dua buah origin of replication dan gen ketahanan terhadap ampisilin (Amp). Plasmid ini mengandung multy cloning site. Karena memiliki kelebihan timin yang menggantung di ujung terbuka plasmid (T overhang), plasmid ini sering dipakai sebagai vektor untuk produk PCR yang selalu memiliki kelebihan adenin pada ujungnya tanpa memerlukan tahapan pemotongan terlebih dahulu. Plasmid pGEM-T Easy juga termasuk plasmid high copy number yang mengandung T7 dan SP6

promotor pada daerah MCS yang cocok untuk menyimpan gen insert dalam suatu inang. Selain itu, pGEM-T Easy merupakan vektor yang berukuran kecil yaitu 3015 bp. Ukuran tersebut relatif kecil sehingga vektor dapat membawa DNA target cukup banyak dan memudahkan preparasi DNA sisipan dalam jumlah besar. Vektor berukuran kecil lebih mudah dimasukkan ke dalam sel inang dan lebih mudah dimurnikan karena cenderung tidak rapuh dibandingkan dengan vektor berukuran besar.

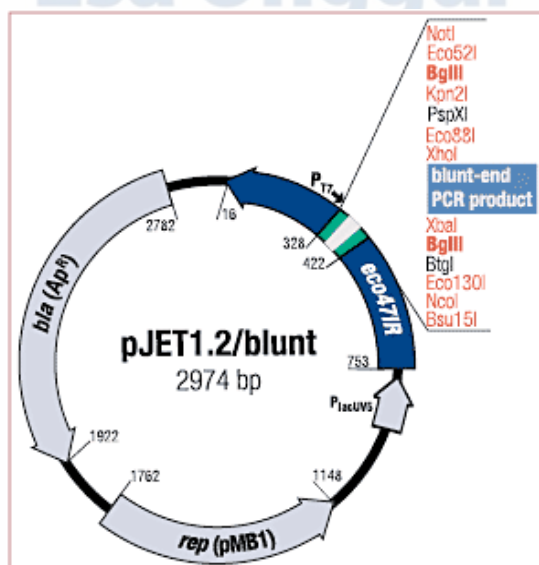


Gambar 7 Plasmid pGEM-T Easy (Amp^r = marker resisten ampisilin)

Misalnya saja kita menyisipkan suatu fragmen DNA pada daerah MCS yang terletak pada gen lacZ kedalam plasmid pGEM-T Easy dan mengtransformasikannya kedalam sel *E coli* DH5 α . Koloni yang mengandung vektor yang membawa sisipan berwarna putih sedangkan yang tidak membawa sisipan berwarna biru. Koloni berwarna biru timbul karena pada vektor terdapat gen lac Z yang menyandi enzim β -galaktosidase. Protein ini mengenal X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactoside) menjadi 5-bromo-4-chloroindoxyl yang mudah teroksidasi menjadi 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo dengan pigmen warna biru yang tidak larut sedangkan isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) berfungsi sebagai inducer yang akan mengaktifkan operon lacsehingga dapat mengekspresikan gen lacZ. Bila fragmen DNA sisipan menyisip pada gen lacZ, maka gen lacZ tidak dapat diekspresikan untuk menghasilkan enzim β -galaktosidase sehingga koloni *E. coli* DH5 α berwarna putih dan positif membawa DNA sisipan.

Salah satu vektor kloning yang sering digunakan dalam konstruksi pustaka genom adalah pJET1.2/blunt. Vektor ini merupakan plasmid yang bersifat linear yang dapat menerima sisipan dari 6 kb sampai 10 kb. Pada ujung 5' vektor mengandung

gugus fosforil sehingga forforilasi primer tidak diperlukan. Ujung 3'dA-overhangs dihasilkan dengan menggunakan Taq DNA polimerase dengan menggunakan blunt repairing enzymes. Produk PCR blunt –end dihasilkan oleh pembacaan DNA polimerase yang dapat langsung diligasikan ke dalam vektor dalam waktu 5 menit. Vektor pJET1.2/blunt mengandung lethal gene(gen mematikan) yang dapat membunuh host jika tersisipkan dalam host bakteri, tetapi apabila vektor ini tersisipkan oleh fragment DNA (gen) maka lethal gen tersebut menjadi tidak aktif sehingga dalam proses seleksi sel transforman yang mengandung fragmen sisipan saja yang dapat hidup. (Thermoscientific, Cat.No. #K1231)



Gambar 7. Vektor pJET1.2/blunt

Plasmid yang digunakan pada bakteri gram negatif belum tentu dapat digunakan pada bakteri gram positif. Namun, saat ini telah tersedia plasmid untuk kloning pada bakteri gram positif, misalnya pT127 dan pC194, yang dikonstruksi oleh S.D. Erlich pada tahun 1977 dari bakteri *Staphylococcus aureus*. Demikian juga, telah ditemukan plasmid untuk kloning pada eukariot, khususnya pada khamir, misalnya yeast integrating plasmids (YIps), yeast episomal plasmids (YEps), yeast replicating plasmids (YRps), dan yeast centromere plasmid (YCps).

A. Bakteriofag

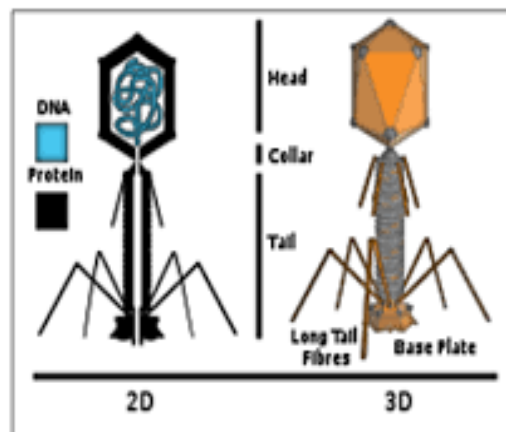
Bakteriofag adalah virus yang sel inangnya berupa bakteri. Dengan daur hidupnya yang bersifat litik atau lisogenik bakteriofag dapat digunakan sebagai vektor kloning pada sel inang bakteri. Ada beberapa macam bakteriofag yang biasa digunakan sebagai vektor kloning. Dua di antaranya akan dijelaskan berikut ini.

Bakteriofag λ

Bakteriofag atau fag λ merupakan virus kompleks yang menginfeksi bakteri *E. coli*. Berkat pengetahuan yang memadai tentang fag ini, kita dapat memanfaatkannya sebagai vektor kloning semenjak masa-masa awal perkembangan rekayasa genetika. DNA λ yang diisolasi dari partikel fag ini mempunyai konformasi linier untai ganda dengan panjang 48,5 kb. Namun, masing-masing ujung fosfatnya berupa untai tunggal sepanjang 12 pb yang komplementer satu sama lain sehingga memungkinkan DNA λ untuk berubah konformasinya menjadi sirkuler. Dalam bentuk sirkuler, tempat bergabungnya kedua untai tunggal sepanjang 12 pb tersebut dinamakan kos.

Seluruh urutan basa DNA λ telah diketahui. Secara alami terdapat lebih dari satu tempat pengenalan restriksi untuk setiap enzim restriksi yang biasa digunakan. Oleh karena itu, DNA λ tipe alami tidak cocok untuk digunakan sebagai vektor kloning. Akan tetapi, saat ini telah banyak dikonstruksi derivat-derivat DNA λ yang memenuhi syarat sebagai vektor kloning. Ada dua macam vektor kloning yang berasal dari DNA λ , yaitu **vektor insersional**, yang dengan mudah dapat disisipi oleh fragmen DNA asing, dan **vektor substitusi** yang untuk membawa fragmen DNA asing harus membuang sebagian atau seluruh urutan basanya yang terdapat di daerah nonesensial dan menggantinya dengan urutan basa fragmen DNA asing tersebut. Di antara kedua macam vektor λ tersebut, vektor substitusi lebih banyak digunakan karena kemampuannya untuk membawa fragmen DNA asing hingga 23 kb. Salah satu contohnya adalah vektor WES, yang mempunyai mutasi pada tiga gen esensial, yaitu gen W, E, dan S. Vektor ini hanya dapat digunakan pada sel inang yang dapat menekan mutasi tersebut.

Cara substitusi fragmen DNA asing pada daerah nonesensial membutuhkan dua tempat pengenalan restriksi untuk setiap enzim restriksi. Jika suatu enzim restriksi memotong daerah nonesensial di dua tempat berbeda, maka segmen DNA λ di antara kedua tempat tersebut akan dibuang untuk selanjutnya digantikan oleh fragmen DNA asing. Jika pembuangan segmen DNA λ tidak diikuti oleh substitusi fragmen DNA asing, maka akan terjadi religasi vektor DNA λ yang kehilangan sebagian segmen pada daerah nonesensial. Vektor religasi semacam ini tidak akan mampu bertahan di dalam sel inang. Dengan demikian, ada suatu mekanisme seleksi otomatis yang dapat membedakan antara sel inang dengan vektor rekombinan dan sel inang dengan vektor religasi.



Gambar 1. Struktur Bakteriofage

(Sumber: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/56/Tevenphage.svg>)

Gambar 9. DNA bakteriofag I

Bakteriofag I mempunyai dua fase daur hidup, yaitu fase litik dan fase lisogenik. Pada fase litik, transfeksi sel inang (istilah transformasi untuk DNA fag) dimulai dengan masuknya DNA I yang berubah konformasinya menjadi sirkuler dan mengalami replikasi secara independen atau tidak bergantung kepada kromosom sel inang. Setelah replikasi menghasilkan sejumlah salinan DNA I sirkuler, masing-masing DNA ini akan melakukan transkripsi dan translasi membentuk protein kapsid (kepala). Selanjutnya, tiap DNA akan dikemas (packaged) dalam kapsid sehingga dihasilkan partikel I baru yang akan keluar dari sel inang untuk menginfeksi sel inang lainnya. Sementara itu, pada fase lisogenik DNA I akan terintegrasi ke dalam kromosom sel inang sehingga replikasinya bergantung kepada kromosom sel inang. Fase lisogenik tidak menimbulkan lisis pada sel inang.

Di dalam medium kultur, sel inang yang mengalami lisis akan membentuk plak (plaque) berupa daerah bening di antara koloni-koloni sel inang yang tumbuh. Oleh karena itu, seleksi vektor rekombinan dapat dilakukan dengan melihat terbentuknya plak tersebut.

Bakteriofag M13

Ada jenis bakteriofag lainnya yang dapat menginfeksi *E. coli*. Berbeda dengan I yang mempunyai struktur ikosahedral berekor, fag jenis kedua ini mempunyai struktur berupa filamen. Contoh yang paling penting adalah M13, yang mempunyai genom berupa untai tunggal DNA sirkuler sepanjang 6.408 basa. Infeksinya pada sel inang berlangsung melalui pili, suatu penonjolan pada permukaan sitoplasma.

Ketika berada di dalam sel inang genom M13 berubah menjadi untai ganda sirkuler yang dengan cepat akan bereplikasi menghasilkan sekitar 100 salinan.

Salinan-salinan ini membentuk untai tunggal sirkuler baru yang kemudian bergerak ke permukaan sel inang. Dengan cara seperti ini DNA M13 akan terselubungi oleh membran dan keluar dari sel inang menjadi partikel fag yang infeksius tanpa menyebabkan lisis. Oleh karena fag M13 terselubungi dengan cara pembentukan kuncup pada membran sel inang, maka tidak ada batas ukuran DNA asing yang dapat disisipkan kepadanya. Inilah salah satu keuntungan penggunaan M13 sebagai vektor kloning bila dibandingkan dengan plasmid dan λ . Keuntungan lainnya adalah bahwa M13 dapat digunakan untuk sekuensing (penentuan urutan basa) DNA dan mutagenesis tapak terarah (site directed mutagenesis) karena untai tunggal DNA M13 dapat dijadikan cetakan (templat) di dalam kedua proses tersebut. Meskipun demikian, M13 hanya mempunyai sedikit sekali daerah pada DNANYA yang dapat disisipi oleh DNA asing. Di samping itu, tempat pengenalan restriksinya pun sangat sedikit. Namun, sejumlah derivat M13 telah dikonstruksi untuk mengatasi masalah tersebut.

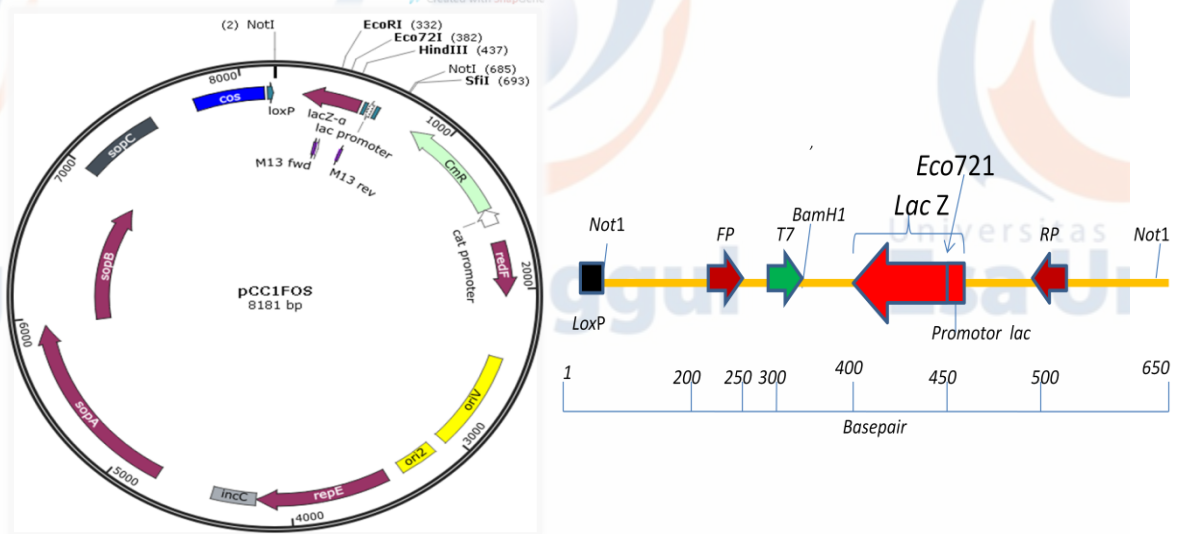
Kosmid

Kosmid adalah merupakan vektor yang diturunkan dari plasmid yang mengandung ujung kohesif dari fage λ . Kosmid merupakan vektor yang dikonstruksi dengan menggabungkan kos dari DNA λ dengan plasmid. Kemampuannya untuk membawa fragmen sisipan DNA yang lebih besar yaitu berkisar antara sepanjang 32 hingga 47 kb menjadikan kosmid lebih menguntungkan daripada fag λ dan plasmid. Namun sangat tidak mudah melakukan klon dengan menggunakan vektor ini.

Fosmid

Selain kosmid, ada kelompok vektor sintesis yang merupakan gabungan antara plasmid dan fag λ . Vektor yang dinamakan fosmid ini membawa segmen DNA λ yang berisi tempat att. Tempat att digunakan oleh DNA λ untuk berintegrasi dengan kromosom sel inang pada fase lisogenik. Salah satu fosmid yang digunakan adalah CopyControl™ Fosmid Library pCC1FOSTM Vektor (Gambar 10) merupakan salah satu vektor yang digunakan untuk pustaka genom. Vektor ini memiliki ukuran 8.1 kb yang bersifat linear yang dapat menerima sisipan 40 kb fragmen DNA. pCC1FOSTM membawa gen resisten kloramfenikol sebagai seleksi antibiotik dan gen LacZ sebagai seleksi biru putih. Keunggulan menggunakan vektor pCC1FOSTM adalah DNA yang diperoleh dapat diinduksi untuk mendapatkan *high copy number* dalam penggandaan klon rekombinan dari single copy menjadi 10–200 copies per selnya,

sehingga meningkat DNA fosmid untuk sekuensing, sidik jari (fingerprint), subkloning, in-vitrotranskripsi, dan aplikasilainnya. (Epicentre.Cat.No.CCFOS110)



Gambar 10. Peta CopyControl™ FOSmid Library pCC1FOS™ Vektor

Vektor YACs

Seperti halnya kosmid, YACs (yeast artificial chromosomes atau kromosom buatan dari khamir) dikonstruksi dengan menggabungkan antara DNA plasmid dan segmen tertentu DNA kromosom khamir. Segmen kromosom khamir yang digunakan terdiri atas sekuens telomir, sentromir, dan titik awal replikasi.

YACs dapat membawa fragmen DNA genomik sepanjang lebih dari 1 Mb. Oleh karena itu, YACs dapat digunakan untuk mengklon gen utuh manusia, misalnya gen penyandi cystic fibrosis yang panjangnya 250 kb. Dengan kemampuannya itu YACs sangat berguna dalam pemetaan genom manusia seperti yang dilakukan pada Proyek Genom Manusia.

Vektor YEps

Vektor-vektor untuk keperluan kloning dan ekspresi gen pada *Saccharomyces cerevisiae* dirancang atas dasar plasmid alami berukuran 2 µm, yang selanjutnya dikenal dengan nama plasmid 2 mikron. Plasmid ini memiliki sekuens DNA sepanjang 6 kb, yang mencakup titik awal replikasi dan dua gen yang terlibat dalam replikasi.

Vektor-vektor yang dirancang atas dasar plasmid 2 mikron disebut YEps (yeast episomal plasmids). Segmen plasmid 2 mikronnya membawa titik awal replikasi, sedangkan segmen kromosom khamirnya membawa suatu gen yang berfungsi sebagai penanda seleksi, misalnya gen LEU2 yang terlibat dalam

biosintesis leusin. Meskipun biasanya bereplikasi seperti plasmid pada umumnya, YEps dapat terintegrasi ke dalam kromosom khamir inangnya.

Plasmid Ti Agrobacterium tumefaciens

Sel-sel tumbuhan tidak mengandung plasmid alami yang dapat digunakan sebagai vektor kloning. Akan tetapi, ada suatu bakteri, yaitu *Agrobacterium tumefaciens*, yang membawa plasmid berukuran 200 kb dan disebut plasmid Ti (tumor inducing atau penyebab tumor). Bakteri *A. tumefaciens* dapat menginfeksi tanaman dikotil seperti tomat dan tembakau serta tanaman monokotil, khususnya padi. Ketika infeksi berlangsung bagian tertentu plasmid Ti, yang disebut T-DNA, akan terintegrasi ke dalam DNA kromosom tanaman, mengakibatkan terjadinya pertumbuhan sel-sel tanaman yang tidak terkendali. Akibatnya, akan terbentuk tumor atau crown gall.

Plasmid Ti rekombinan dengan suatu gen target yang disisipkan pada daerah T-DNA dapat mengintegrasikan gen tersebut ke dalam DNA tanaman. Gen target ini selanjutnya akan dieskpresikan menggunakan sistem DNA tanaman.

Dalam prakteknya, ukuran plasmid Ti yang begitu besar sangat sulit untuk dimanipulasi. Namun, ternyata apabila bagian T-DNA dipisahkan dari bagian-bagian lain plasmid Ti, integrasi dengan DNA tanaman masih dapat terjadi asalkan T-DNA dan bagian lainnya tersebut masih berada di dalam satu sel bakteri *A. tumefaciens*. Dengan demikian, manipulasi atau penyisipan fragmen DNA asing hanya dilakukan pada T-DNA dengan cara seperti halnya yang dilakukan pada plasmid *E.coli*. Selanjutnya, plasmid T-DNA rekombinan yang dihasilkan ditransformasikan ke dalam sel *A. tumefaciens* yang membawa plasmid Ti tanpa bagian T-DNA. Perbaikan prosedur berikutnya adalah pembuangan gen-gen pembentuk tumor yang terdapat pada T-DNA.

Baculovirus

Baculovirus merupakan virus yang menginfeksi serangga. Salah satu protein penting yang disandi oleh genom virus ini adalah polihedrin, yang akan terakumulasi dalam jumlah sangat besar di dalam nuklei sel-sel serangga yang diinfeksi karena gen tersebut mempunyai promotor yang sangat aktif. Promotor ini dapat digunakan untuk memacu overekspresi gen-gen asing yang diklon ke dalam genom baculovirus sehingga akan diperoleh produk protein yang sangat banyak jumlahnya di dalam kultur sel-sel serangga yang terinfeksi.

Vektor Kloning pada Mamalia

Vektor untuk melakukan kloning pada sel-sel mamalia juga dikonstruksi atas dasar genom virus. Salah satu di antaranya yang telah cukup lama dikenal adalah SV40, yang menginfeksi berbagai spesies mamalia. Genom SV40 panjangnya hanya 5,2 kb. Genom ini mengalami kesulitan dalam pengepakan (packaging) sehingga pemanfaatan SV40 untuk mentransfer fragmen-fragmen berukuran besar menjadi terbatas.

Retrovirus mempunyai genom berupa RNA untai tunggal yang ditranskripsi balik menjadi DNA untai ganda setelah terjadi infeksi. DNA ini kemudian terintegrasi dengan stabil ke dalam genom sel mamalia inang sehingga retrovirus telah digunakan sebagai vektor dalam terapi gen. Retrovirus mempunyai beberapa promotor yang kuat

III. EVALUASI BELAJAR

a. Latihan

1. Jelaskan tentang pengertian tentang vektor kloning
2. Jelaskan jenis – jenis vektor yang biasa digunakan dalam kloning
3. Jelaskan situs restriksi yang ada pada vektor pGEMT easy dan pJET1.2 blunt serta komponen penyusunnya.

b. Tugas

Gambarlah 3 vektor kloning yang biasa digunakan dalam pengklonan

Penilaian Tugas

1. Tugas dibuat di blog mahasiswa
2. Blog di link ke web hybrid learning.
3. Blog tersebut harus mencantumkan logo dan nama Universitas Esa Unggul
4. Diselesaikan sebelum batas akhir penyerahan tugas (Tanggal ...)

IV. DAFTAR PUSTAKA

Brown TA. 2006. *Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction*, 4nd ed. Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.

Muladno. 2002. *Teknik Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.

Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. New York (US): Cold Spring Harbor.

Yuwono Tribowo. 2006. *Biologi Molekular*. Jakarta : Erlangga

BAB V. BAKTERI REPLIKASI

I. Pendahuluan

A. Pengantar

Dalam bidang rekayasa genetika bakteri dapat digunakan sebagai sarana pencangkakan gen dari berbagai makhluk hidup. Dengan ini dapat dihasilkan suatu varietas makhluk hidup yang memiliki satu sifat gabungan sesuai dengan yang diinginkan manusia. Disamping itu, sekarang telah dikembangkan produksi asam amino berkualitas tinggi dengan menggunakan jasa bakteri. Selain itu bakteri berperan sebagai vektor yaitu beberapa mikroba yang membawa gen yang diinginkan ke genom target. DNA rekombinan vektor disebut DNA plasmid. Bakteri juga berguna sebagai alat yang digunakan dalam modifikasi genetik. Selain bakteri sudah banyak diadakan sebagai objek rekayasa, secara genetik, bakteri lebih mudah dipelajari dan pertumbuhannya juga cepat sehingga bakteri dijadikan agen perantara dalam transfer genetik dalam bentuk vektor rekombinan. Hal ini merupakan metode dasar yang melibatkan penggunaan bakteri untuk rekayasa genetika dari organisme lain.

Rekayasa Genetika pada mikroba bertujuan untuk meningkatkan efektivitas kerja mikroba tersebut (misalnya mikroba untuk fermentasi, pengikat nitrogen udara, meningkatkan kesuburan tanah, mempercepat proses kompos dan pembuatan makanan ternak, mikroba prebiotik untuk makanan olahan), dan untuk menghasilkan bahan obat-obatan, tanaman transgenik tahan hama dan kosmetika, serta Pembuatan insulin manusia dari bakteri (Sel pancreas yang mampu mensekresi Insulin digunting, potongan DNA itu disisipkan ke dalam Plasmid bakteri) DNA rekombinan yang terbentuk menyatu dengan Plasmid diinjeksikan lagi ke vektor, jika hidup segera dikembangbiakan.

B. Kompetensi Dasar

Mahasiswa dapat memahami dan menjelaskan tentang proses Replikasi terhadap bakteri yang digunakan sebagai agen dalam rekayasa genetika.

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

- Memahami dan menjelaskan Genetika Bakteri
- Memahami dan mampu menjelaskan Respon bakteri terhadap kerusakan DNA
- Menjelaskan sistem yang mengatur dalam replikasi bakteri

D. Kegiatan Pembelajaran

- Pembelajaran dilakukan dengan metoda contextual learning dan project based learning
- Mahasiswa mencari bahan pustaka, membuat bahan presentasi dan mempresentasikan hasil literasinya

II. MATERI

2.1. Pertukaran Materi Genetik Pada Bakteri

Dewasa ini muncul keanekaragaman dan variasi genetik pada bakteri disebabkan oleh proses rekombinasi gen antara jenis bakteri yang satu dengan bakteri lain. Rekombinasi atau pertukaran gen ini melalui berbagai cara yaitu:

1. Transfer Gen

Materi genetik dan plasmid dapat berpindah atau dipindahkan melalui berbagai mekanisme sebagai berikut:

a. Transduksi

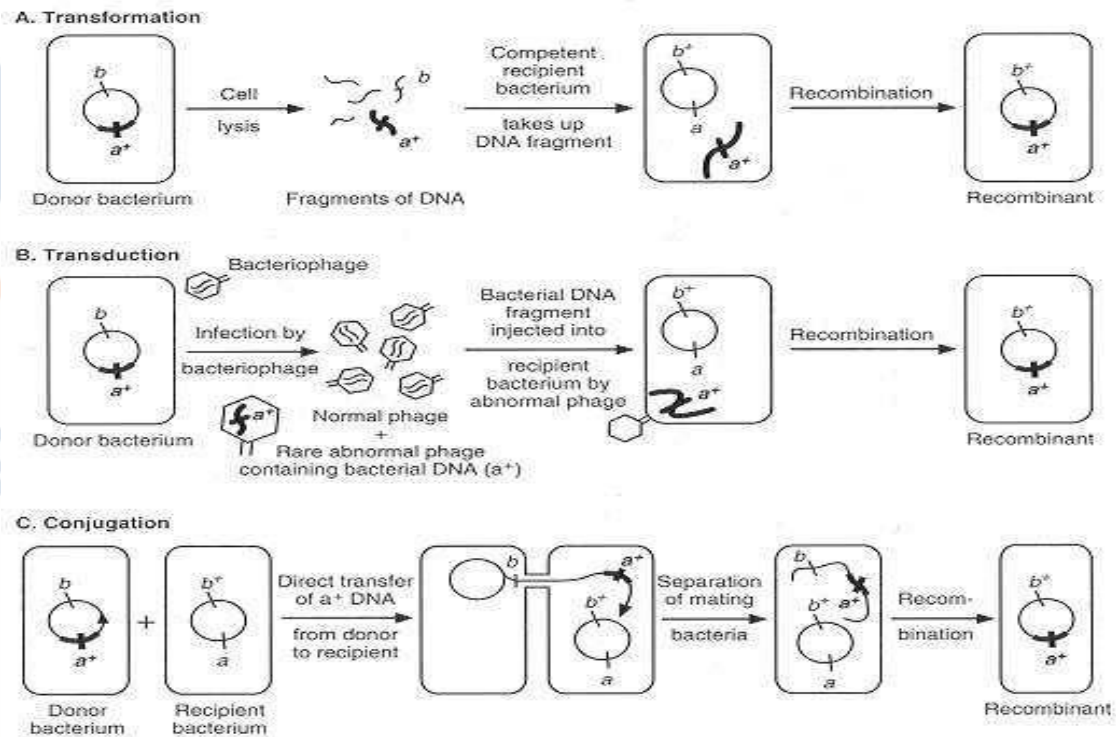
DNA dari plasmid masuk ke dalam genom bakteriofaga. Oleh bakteriofaga plasmid ditransfer ke populasi bakteri lain. Transduksi biasa terjadi pada bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus*, tapi diketahui pula terjadi pada *Salmonella*

b. Transformasi

Fragmen DNA bebas dapat melewati dinding sel dan kemudian bersatu dalam genom sel tersebut sehingga mengubah genotipnya. Hal ini biasanya dikerjakan di laboratorium dalam penelitian rekayasa genetika, tapi dapat pula terjadi secara spontan meskipun dalam frekuensi yang kecil.

c. Konyugasi

Transfer unilateral materi genetik antara bakteri sejenis maupun dengan jenis lain dapat terjadi melalui proses konyugasi ("mating" = kawin). Hal ini dimungkinkan karena adanya faktor F yang menentukan adanya pili seks pada virus bakterial tertentu. Kuman yang mempunyai pili seks disebut kuman F+, dan melalui pilinya materi genetik dari sel donor (F+) termasuk plasmid DNA-nya dapat berpindah ke dalam sel resipien. Jadi gen-gen tertentu yang membawa sifat resistensi pada obat dapat berpindah dari populasi kuman yang resisten ke dalam kuman yang sensitif. Dengan cara inilah sebagian besar dari sifat resisten obat tersebar dalam populasi kuman dan menimbulkan apa yang disebut multi drug resistance.



Gambar 11 Mekanisme pertukaran materi genetik pada bakteri, A) Transformasi, fragmen DNA lepas dari bakteri donor yang diterima oleh bakteri penerima B) Transduksi perpindahan materi genetik melalui bakteriofage (virus). C) Konyugasi perpindahan materi genetik dengan kontak langsung melalui hubungan sitoplasma (sumber: Randall K. Holmes & Michael G. Jobling, 2001)

2.3 Kode Genetik

Di alam ada 20 macam asam amino yang umum terdapat di dalam struktur polipeptida jasad hidup (Campbell *et al.* 2008). Tiap asam amino mempunyai kodon yang spesifik sedangkan nukleotidanya ada 4 macam yaitu A, U, G dan C. Jika suatu kodon hanya terdiri atas dua nukleotida saja maka hanya akan ada $4^2 (=16)$ asam amino, tetapi apabila kodon disusun oleh 3 nukleotida, maka akan diperoleh $4^3 (=64)$ asam amino, sedangkan jumlah asam amino yang umum diketahui ada pada jasad hidup hanya 20 macam. Beberapa kodon telah diketahui mengkode asam amino yang sama. Fenomena ini dikenal sebagai *genetic code redundancy (degeneracy)*. Oleh karena ada beberapa kodon yang berbeda untuk satu asam amino yang sama, maka dikenal ada 64 macam kodon, tiga diantaranya yaitu TAA (UAA pada mRNA), TAG (UAG pada mRNA) dan TGA (UGA pada mRNA) tidak mengkode asam amino apapun karena ketiga kodon tersebut merupakan kodon yang mengakhiri (terminasi) proses translasi (Gambar 12). Ada beberapa aspek yang perlu diketahui mengenai kode genetik, yaitu:

1. Kode genetik bersifat tidak saling tumpang tindih, kecuali pada kasus tertentu, misalnya bakteriofag ϕ X174 yang mempunyai kodon tumpang tindih.
2. Tidak ada sela (*gap*) diantara kodon satu dengan kodon yang lain.
3. Tidak ada koma di antara kodon.
4. Kodon bersifat *degenerate* artinya ada beberapa asam amino yang mempunyai lebih dari satu kodon.
5. Kodon bersifat hampir universal karena pada beberapa organel jasad tinggi ada beberapa kodon yang berbeda dari kodon yang digunakan pada sitoplasma.

Setiap kodon berpasangan dengan antikodon yang sesuai yang terdapat pada molekul tRNA. Sebagai contoh, kodon metionin (AUG) mempunyai komplemennya dengan bentuk antikodon UAC yang terdapat pada tRNA^{Met}. Pada waktu tRNA yang membawa asam amino diikat ke dalam sisi A pada ribosom, maka bagian antikodonna berpasangan dengan kodon yang sesuai pada sisi A tersebut

	U	C	A	G	
U	UUU UUC Leucine	UCU UCC UCA UCG Serine	UAU UAC Tyrosine	UGU UGC Cysteine	U C A G
	UUA UUG Leucine		UAA UAG Stop codon Stop codon	UGA UGG Stop codon Tryptophan	
C	CUU CUC CUA CUG Leucine	CCU CCC CCA CCG Proline	CAU CAC Histidine	CGU CGC CGA CGG Arginine	U C A G
			CAA CAG Glutamine		
A	AUU AUC AUA AUG Isoleucine Methionine; initiation codon	ACU ACC ACA ACG Threonine	AAU AAC Asparagine	AGU AGC Serine	U C A G
			AAA AAG Lysine	AGA AGG Arginine	
G	GUU GUC GUA GUG Valine	GCU GCC GCA GCG Alanine	GAU GAC Aspartic acid	GGU GGC GGA GGG Glycine	U C A G
			GAA GAG Glutamic acid		

Gambar 12. Kode genetik universal (Koolman dan Roehm 2005).

2.4. Pengaturan Sintesis Protein pada Bakteri

Dalam beberapa sel tidak semua gen aktif pada waktu yang bersamaan. Beberapa produk gen yang dibutuhkan akan secara terus menerus disintesis,

sebaliknya produk gen lain hanya dibutuhkan selama fase tertentu siklus sel atau dalam keadaan lingkungan yang tidak diharapkan. Beberapa protein yang dibutuhkan disintesis dalam jumlah yang besar, sedangkan yang lain dalam jumlah yang kecil. Oleh karena itu aktivitas semua gen yang dibutuhkan secara khusus diatur dalam satu atau banyak cara, untuk membuat efisiensi penggunaan energi yang tersedia dalam sel. Mekanisme pengaturan tersebut pada ekspresi gen dapat terjadi pada satu atau banyak tingkat. Pengaturan (regulasi) dapat terjadi pada tingkat gen itu sendiri dengan mengendalikan waktu dan/atau kecepatan transkripsi.

Mekanisme pengendalian lain dapat dilaksanakan selama translasi. Setelah translasi, beberapa protein akan berubah menjadi fungsional. Gen yang ditranskripsikan menjadi molekul RNA disebut gen struktural. Protein yang ditranslasi dari mRNA dapat berupa enzim dan nonenzim. Di antara protein nonenzimatik merupakan protein regulator yang berinteraksi dengan urutan nukleotida spesifik untuk mengendalikan aktivitas transkripsional gen spesifik. Gen yang mensintesis protein regulator disebut gen regulator. Setiap gen (atau secara terkoordinir mengendalikan kelompok gen struktural) didahului oleh suatu urutan (yang disebut promotor) yang dapat dikenali oleh RNA polimerase. Sekali polimerase berikatan kepada promotor, selanjutnya dapat mentranskripsikan rantai DNA anti-sense yang berdekatan menjadi suatu molekul RNA.

Suatu operator merupakan suatu urutan DNA dalam suatu operon, yang merupakan protein regulator dan disebut suatu pengikat protein repressor. Penempelan suatu protein repressor kepada suatu operator mencegah transkripsi seluruh gen struktural dalam operon yang sama. Suatu gen dengan bentuk pengaturan seperti ini dinamakan dibawah "negative control". Operon bakteri sering menghasilkan mRNA polycistronik (mengandung informasi pengkode untuk lebih dari satu rantai polipeptida atau molekul RNA); tapi semua mRNA eukariot sitoplasma (khususnya yang dihasilkan oleh organel) mono-sistronik.

Protein yang diperlukan untuk ekspresi suatu operon disebut aktivator. Protein tersebut dapat berikatan kepada tempat inisiator (initiator sites) yang ditempatkan pada suatu promotor operonnya atau (pada kasus ini disebut enhancer sites) dapat berikatan pada urutan yang jauh dari operon tersebut. Pada saat suatu protein regulator berikatan dengan tempat inisiator atau enhancer menyebabkan transkripsi gen struktural pada operon, proses tersebut dikatakan suatu mekanisme "positive control". Stimuli yang mengatur respon gen tersebut dapat bermacam-macam mulai dari molekul yang relatif kecil (gula, asam amino) sampai ke senyawa yang relatif besar (contoh, pada eukariot kompleks suatu hormon steroid dan protein reseptornya). Suatu senyawa yang membuat gen melakukan transkripsi ("on")

dikatakan sebagai suatu “inducer”, sebaliknya senyawa yang menghentikan transkripsi disebut suatu “repressor”. Gen “inducible” (dipengaruhi inducer) biasanya terlibat dalam reaksi katabolik (degradasi), seperti pada pemecahan polisakarida menjadi gula sederhana. Gen “repressible” (dipengaruhi repressor) biasanya terlibat dalam reaksi anabolik (sintetik), seperti pada penyusunan asam amino dari bahan bakunya. Jadi, dalam hal yang telah diuraikan di atas terdapat empat kemungkinan kombinasi pengendalian transkripsi dan satu pengendalian sesudah translasi, yaitu :

1). “Negatif inducible Control”

Prototipe kontrol negatif tersebut melalui suatu operon yang dapat diinduksi pada “sistem laktosa” (sistem lac) E. coli. (b-galaktosidase merupakan enzim dengan dua fungsi. Pertama berfungsi memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Kedua berfungsi mengubah ikatan 1-4 glukosa dan galaktosa (pada laktosa) menjadi ikatan 1-5 pada alolaktosa. Enzim ini secara normal tidak terdapat pada konsentrasi tinggi pada saat laktosa tidak terdapat dari lingkungan sel. Secara singkat, sesudah penambahan laktosa ke dalam medium dimana tidak ada glukosa, enzim tersebut mulai dihasilkan. Suatu protein transpor yang disebut galactoside permease dibutuhkan untuk efisiensi transpor laktosa melintasi membran sel. Protein ini juga berada dalam konsentrasi tinggi sesudah laktosa tersedia dalam medium. “Sistem laktosa” E. coli tipe-liar terdiri dari suatu gen regulator (i+) dan suatu operon yang mengandung suatu urutan promotor (p+), suatu lokus operator (o+), dan tiga gen struktural untuk b-galaktosidase (z+), permease (y+), dan transasetilase (suatu enzim yang berfungsi dalam metabolisme laktosa dengan tetap tidak terpecah). Mutasi pada setiap lokus tersebut sudah ditemukan. Terdapat beberapa “overlap” pada daerah promotor dan operator sistem lac tersebut; pada beberapa operon lain lokus operator secara keseluruhan dapat disimpan pada promotor. Operon regulator tersebut secara konstitutif menghasilkan protein represor pada tingkat rendah karena ia memiliki suatu “promotor inefficient”. Sintesis protein tersebut tidak dipengaruhi oleh tingkat laktosa dalam sel. Sebaliknya, promotor normal dari operon lac, secara efisien mengikat RNA polimerase. Pada keadaan tidak terdapat laktosa (noninduced conditions), suatu protein represor aktif (yang dihasilkan oleh i+) berikatan kepada operator o+. RNA polimerase tidak dapat berikatan kepada promoter juga tidak membaca urutan operator karena protein represor menempati daerah tersebut. Oleh karena itu, transkripsi ketiga gen struktural pada operon lac dicegah. Pada saat terdapat laktosa (“induced conditions”), laktosa tersebut secara tidak efisien ditranspor ke dalam sel karena secara normal hanya terdapat sedikit molekul galaktoside permease.

Di dalam sel, beberapa laktosa dapat diubah menjadi alolaktosa oleh (*b*-galaktosidase). Alolaktosa merupakan “inducer” operon *lac*. Ia berikatan kepada protein repressor dan menyebabkan perubahan konformasional pada protein tersebut yang mengganti tempat yang diikatnya kepada operator. RNA polimerase selanjutnya berkemampuan untuk melewati operator terbuka dan mensintesis suatu molekul mRNA polycistronic, jadi menghitung tingkat permease dan (*b*-galaktosidase yang sangat rendah, yang secara normal terdapat dalam sel. Molekul mRNA bakteri memiliki waktu paruh yang sangat pendek (hanya beberapa menit), jadi sintesis protein berhenti segera setelah sel ditekan (*repress*). Protein, pada lain pihak sangat stabil, tetapi akan dilarutkan melalui setiap tahap pembelahan sel.

2 . “Negatif, repressible control”

Sebuah contoh dari suatu operon yang dapat ditekan (“repressible”) melalui kontrol negatif ditemukan pada “sistem triptofan” *E. coli*. Asam amino triptofan disintesis dalam lima tahap, masing-masing tahap diperantarai oleh enzim spesifik. Gen yang dapat melakukan respon untuk lima enzim tersebut disusun dalam suatu operon umum pada perintah yang serupa, sebagai protein enzimatiknya menghasilkan fungsi dalam jalur biosintetik. Gen regulator untuk sistem konstitutif ini mensintesis suatu protein nonfungsional yang disebut “aporepressor”. Pada saat triptofan terdapat secara berlebihan, peran triptofan yang berlebihan tersebut sebagai corepressor. Pengikatan corepressor kepada aporepressor membentuk suatu kompleks repressor fungsional. Repressor fungsional tersebut berikatan kepada operator *trp* dan secara terkoordinir menekan transkripsi semua gen struktural dalam operon. Daerah promoter dan operator overlap secara signifikan, dan secara kompetitif mengikat repressor aktif dan RNA polimerase

2.5. Respon Bakteri Terhadap Kerusakan DNA

Perubahan struktur DNA ini disebut mutasi DNA yang dapat terjadi pada saat proses replikasi DNA. Menurut Yuwono (2008), ada beberapa tipe mutasi gen:

- ✓ **Missense mutation**, adalah mutasi yang menyebabkan perubahan kodon spesifik suatu asam amino ke asam amino yang lain.
- ✓ **Nonsense mutation**, adalah mutasi yang menyebabkan perubahan kodon spesifik suatu asam amino ke kodon terminasi.
- ✓ **Insertion**, mengakibatkan suatu perubahan jumlah basa DNA pada gen dengan menambahkan sebagian dari DNA (pada nukleotidanya). Hasilnya, protein yang dibuat oleh gen tersebut tidak dapat berfungsi semestinya.

- ✓ **Deletion**, mengakibatkan perubahan jumlah basa DNA pada gen dengan menghilangkan sebagian dari DNA. DNA yang hilang akan mengubah fungsi dari protein tersebut.
- ✓ **Duplication**, terdiri atas sebagian DNA yang terkopi satu atau lebih dari satu kali. DNA yang terkopi akan mengubah fungsi dari protein tersebut.
- ✓ **Frameshift mutation**, menggeser pengelompokan dari basa dan mengubah pengkodean untuk asam amino. Protein yang dihasilkan biasanya tidak berfungsi.
- ✓ **Repeat expansion**, mutasi yang meningkatkan banyaknya rantai pendek DNA berkali-kali, mengakibatkan protein yang dihasilkan tidak dapat berfungsi dengan benar.

Menurut Garret & Klenk (2007), kerusakan DNA akibat bahan kimia, fisik, dan lingkungan diklasifikasikan menjadi empat tipe, yaitu:

1. Perubahan satu basa

- a. Depurinasi
- b. Deaminasi sitosin menjadi urasil
- c. Deaminasi adenin menjadi hipoxantin
- d. Alkilasi basa
- e. Insersi atau delesi nukleotida
- f. Penyertaan analog basa

2. Perubahan dua basa

- a. Dimmer antartimin (pirimidin) yang diinduksi oleh sinar UV
- b. Ikatan silang agen pengalkil bifungsional

3. Pemutusan rantai

- a. Radiasi pengionan
- b. Disintegrasi elemen rangka (tulang punggung) oleh radioaktivitas
- c. Pembentukan radikal bebas oksidatif

4. Ikatan silang

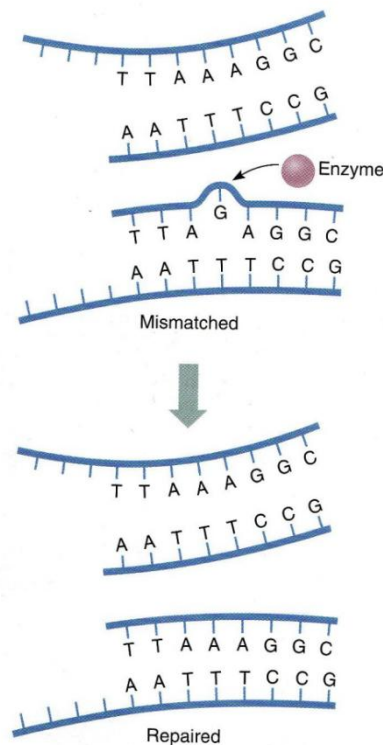
- a. Antara basa di untai yang sama atau berlawanan
- b. Antara DNA dan molekul protein (misalnya Histon)

2.6. Mekanisme Perbaikan DNA

Menurut Francoise et al. (2000), region abnormal DNA, baik karena kesalahan penyalinan atau kerusakan DNA, diganti melalui empat mekanisme, yaitu:

1. *Mismatch repair* (perbaikan ketidakcocokan)

Mismatch repair memperbaiki kesalahan yang dibuat ketika DNA disalin. Contohnya, C dapat terselip berhadapan dengan A, atau polimerase dapat “tergelincir” atau “tersendat” dan menyisipkan dua sampai lima basa tambahan yang tidak berpasangan. Protein-protein yang spesifik memindai DNA yang baru dibentuk menggunakan metilasi adenin di dalam sekuens GATC sebagai titik referensi. Untai cetakan mengalami metilasi, dan untai yang baru dibentuk tidak demikian. Perbedaan ini tidak memungkinkan enzim perbaikan mengidentifikasi untai yang mengandung kesalahan nukleotida dan memerlukan pergantian. Jika ditemukan ketidakcocokan atau lengkung kecil, suatu GATC endonuklease memotong untai yang mengandung mutasi di tempat yang berkorespondensi dengan GATC. Suatu eksonuklease kemudian mencerna untai ini dari GATC sehingga DNA yang cacat tersebut dapat dibuang

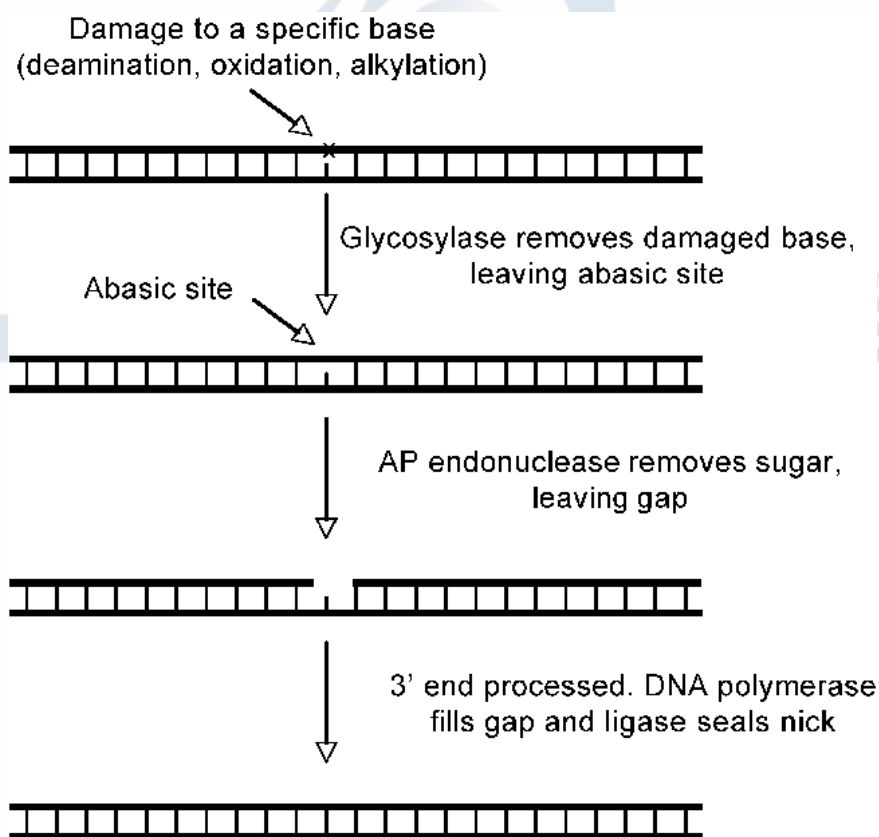


Gambar 13. *Mismatch repair*. Mekanisme ini memperbaiki kesalahan pembentukan satu pasangan basa (misalnya G dengan T, bukannya A dengan T). Bagian yang cacat dikenali oleh suatu endonuklease yang melakukan pemotongan untai-tunggal di sekuens GATC termetilasi. Untai DNA dikeluarkan melalui mutasi, diganti, lalu disambung kembali.

2. *Base excision repair* (perbaikan dengan memotong basa)

Depurinasi DNA, yang terjadi secara spontan karena labilitas termal ikatan N-glikosida purin, terjadi dengan kecepatan 5.000-10.000/sel/hari pada suhu 37°C.

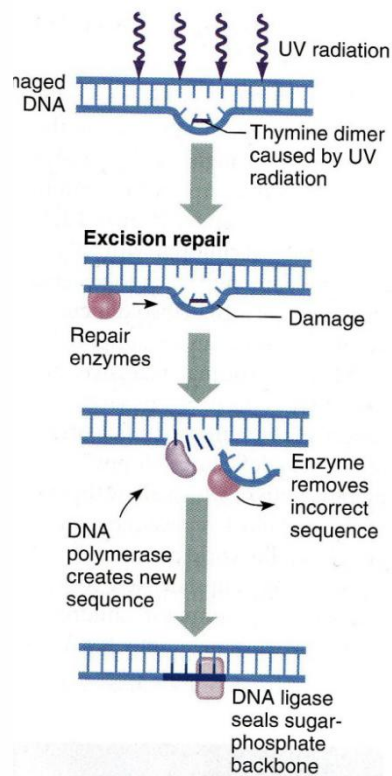
Enzim - enzim spesifik mengenali bagian yang mengalami depurinasi dan menggantikannya dengan purin yang secara langsung, tanpa interupsi pada tulang punggung fosfodiester. Basa sitosin, adenin, dan guanin di DNA secara spontan membentuk, masing-masing, urasil, hipoxantin, xantin. Karena tidak ada satupun dari ketiga basa tersebut yang terdapat di DNA pada keadaan normal, tidaklah mengherankan jika N-glikosilase spesifik dapat mengenali basa-basa abnormal ini yang mengeluarkan sendiri basa dari DNA. Pengeluaran ini menandai letak kecacatan dan memungkinkan endonuklease apurinik atau apirimidinik memotong gula tanpa basa. Basa yang sesuai kemudian memotong gula tanpa basa ini. Basa yang sesuai kemudian dipasang oleh DNA polimerase, dan ligase memembalikan DNA ke keadaannya semula. Rangkaian kejadian ini disebut *base excision repair* (perbaikan dengan memotong basa). Basa teralkilasi dan analog basa dapat dikeluarkan dari DNA dan DNA dipulihkan kebentuknya semula. Mekanisme ini cocok untuk menggantikan basa tunggal, tetapi tidak efektif untuk mengganti region DNA yang rusak



Gambar 14. *Base excision repair* kerusakan dikenali oleh glikosilase, yang kemudian menghilangkan basa yang salah, kemudian membentuk *abasic site*. Kemudian AP endonuklease menghilangkan gula pentosanya kemudian DNA polimerase merepair rantai rusak tersebut.

3. Nucleotide excision repair (perbaikan dengan mengeluarkan/memotong nukleotida)

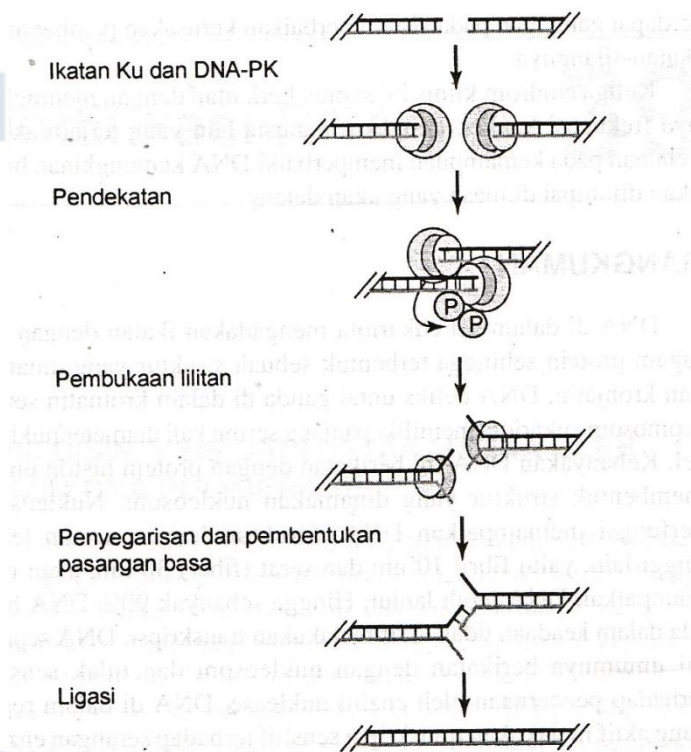
Mekanisme ini digunakan untuk menggantikan suatu regio DNA dengan panjang 30 bp yang mengalami kerusakan. Penyebab umum kerusakan DNA semacam ini adalah sinar ultraviolet (UV), yang memicu pembentukan dimer antarpirimidin siklobutan. Cacat-cacat ini diperbaiki oleh suatu proses perbaikan yang disebut eksisi nukleotida. Proses rumit yang melibatkan lebih banyak produk gen dibandingkan dengan dua tipe perbaikan sebelumnya, pada dasarnya mencakup hidrolisis dua ikatan fosfodiester di untai yang mengandung kecacatan. Suatu nuklease eksisi khusus (eksinuklease), yang terdiri atas sedikitnya tiga subunit pada *E. coli* melaksanakan tugas ini. Pada *E. coli*, protein UvrA, UvrB, dan UvrC berperan dalam membuang nukleotida (dimer akibat *UV light*). Kemudian kekosongan akan diisi dengan bantuan enzim DNA polimerase I dan DNA ligase. Pada *yeast*, proteins Uvr's dikenal dengan nama RADxx ("RAD" kependekan dari *radiation*), seperti RAD3 dan RAD10



Gambar 15. Perbaikan eksisi nukleotida (*nukleotida excision repair*). Setelah kelainan dideteksi, suatu nuklease eksisi (eksinuklease) memotong DNA dari bagian yang cacat. Celah ini kemudian diisi oleh polimerase dan disambung kembali. (Sumber: Garret & Klenk, 2007)

4. Double strand break repair (perbaikan kerusakan untai ganda)

Mekanisme perbaikan ini dapat diselesaikan dengan menggunakan sinapsis, pembukaan lilitan, penyegarisan dan ligasi atau penyambungan. Dalam perbaikan untai ganda yang terputus ini terdapat dua buah protein yang terlibat, yaitu heterodimer Ku dan protein kinase bergantung-DNA (DNA PK, DNA –dependent protein kinase)



Gambar 16. Double strand break repair (perbaikan kerusakan untai ganda)

Pada gambar tampak protein Ku dan DNA-PK bergabung untuk mendekatkan kedua untai dan membuka lilitannya. Fragmen yang sudah disegariskan akan membentuk pasangan basa. DNA yang sudah didekatkan dan dibuka lilitannya ini akan membentuk pasangan basa. Ekor nukleotida tambahan dibuang oleh enzim eksonuklease dan celah yang terbentuk diisi serta ditutup oleh enzim DNA ligase

III. DAFTAR PUSTAKA

Campbell NA, Reece JB, Mitchell LG. 2003. *Biologi* (terjemahan). Erlangga: Jakarta.

Francoise C, Gregory R, Qing W, Nathalie D, Frederic C, Jean-Marc L, Jean-Christophe S, Alain P, Sylviane O, Thierry F. 2000. *Detection of Exon Deletions and Duplications of the Mismatch Repair Genes in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families Using Multiplex Polymerase Chain Reaction of Short Fluorescent Fragments*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.

Garret RA, Klenk HP. 2007. *Archaea Evolution, Physiology, and Molecular Biology*. Australia: Blackwell Publishing.

O'Brien PJ. 2006. Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes. *Chem Rev* 106 (2): 720–52.

Yuwono T. 2008. *Biologi Molekuler*. Erlangga: Jakarta

BAB VI. RESISTENSI ANTIBIOTIK

I. Pendahuluan

A. Pengantar

Penggunaan antibiotik dalam teknik transformasi menjadi sangat penting dalam seleksi sel yang membawa vektor yang mengandung DNA sisipan. Setiap vektor kloning membawa gen resistensi terhadap antibiotik. Jenis gen resistensi yang di bawa vektor tergantung dari jenis vektor yang digunakan. Penggunaan antibiotik biasa pada media tumbuh bakteri yang digunakan dalam transformasi contohnya *E. coli* DH5 α , *E. coli* TOP 10. Secara umum resistensi terhadap antibiotik bisa di dapat dari lingkungan atau merupakan bawaan. Pada resistensi bawaan, gen yang mengkode mekanisme resistensi ditransfer dari satu organisme ke organisme lain. Secara klinis resistensi yang di dapat, adalah dimana bakteri yang pernah sensitif terhadap suatu antibiotik menjadi resisten. Resistensi antimikrobal merupakan resistensi mikroorganisme terhadap obat antimikroba yang sebelumnya sensitif. Organisme yang resisten (termasuk bakteri, virus, dan beberapa parasit) mampu menahan serangan obat antimikroba tersebut, seperti antibiotik, antivirus, dan lainnya, sehingga standar pengobatan menjadi tidak efektif dan infeksi tetap persisten dan mungkin menyebar. Resistensi antibiotik merupakan konsekuensi dari penggunaan antibiotik yang salah, dan perkembangan dari suatu mikroorganisme itu sendiri, bisa jadi karena adanya mutasi atau gen resistensi yang didapat dari vektor yang diintroduksi ke dalam sel bakteri.

B. Kompetensi Dasar

Mahasiswa dapat Memahami dan mengetahui jenis – jenis antibiotik yang digunakan dalam seleksi sel transforman dalam teknik rekayasa genetika.

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

- ✓ Memahami dan menjelaskan tentang gen yang membawa resistensi antibiotik
- ✓ Mengelompokkan jenis– jenis antibiotik berdasarkan struktur kimia dan mekanisme kerjanya

D. Kegiatan Pembelajaran

- ✓ Pembelajaran dilakukan dengan metoda contextual learning dan project based learning

- ✓ Mahasiswa mencari bahan pustaka, membuat bahan presentasi dan mempresentasikan hasil literasinya

II. MATERI

2.1 Resistensi antibiotika

Resistensi adalah berkurangnya pengaruh obat anti infeksi terhadap bakteri atau secara alamiah bakteri tidak sensitif terhadap antibiotika. Resistensi merupakan kegagalan pengobatan dengan suatu antibiotika dengan dosis terapi. Ada tiga tipe resistensi yang diketahui yaitu resistensi non genetik, resistensi genetik dan resistensi silang. Resistensi non genetik terdapat pada bakteri dalam keadaan inaktif atau istirahat, resistensi genetik merupakan mutasi gen yang bersifat spontan tanpa dipengaruhi antibakteri, sedangkan resistensi silang adalah resistensi bakteri terhadap suatu antibiotika tertentu dan antibiotika lain yang mempunyai struktur hampir sama. **Antibiotik** merupakan zat anti bakteri yang diproduksi oleh berbagai spesies mikroorganisme (bakteri, jamur, dan actinomycota) yang dapat menekan pertumbuhan dan atau membunuh mikroorganisme lainnya

Bakteri menjadi resisten terhadap agen antibakteria karena mutasi, transformasi, transduksi maupun konjugasi. Mekanisme resistensi dapat melalui berbagai cara, antara lain: penginaktifan obat, perubahan target atau struktur enzim, penurunan akumulasi obat oleh sel, adanya variasi jalur metabolik maupun peningkatan konsentrasi metabolik. Mekanisme resistensi melalui proses mutasi tidak diketahui karena beberapa spesies mikroorganisme bermutasi secara spontan. Transformasi terjadi pada biakan karena mikroorganisme yang sensitif memperoleh DNA dari mikroorganisme yang bermutasi secara spontan. Transduksi terjadi bila faktor resistensi dipindahkan dari satu mikroorganisme yang resisten ke mikroorganisme yang sensitif dengan perantaraan bakteriofag. Konjugasi terjadi dengan cara kontak langsung antara sel mikroorganisme sehingga terjadi pemindahan resistensi

Berdasarkan lokasi gen dikenal resistensi kromosomal dan resistensi ekstra kromosomal. Resistensi kromosomal terjadi secara spontan pada lokus yang bertanggung jawab mengendalikan kepekaan terhadap suatu antibiotika. Resistensi ekstra kromosomal terjadi karena adanya pemindahan gen atau pendukung gen dari satu bakteri ke bakteri yang lain, dari satu keturunan yang sama atau berlainan (Prescott, 2000). Menurut Black tidak hanya dalam spesies tetapi dapat terjadi antar spesies dalam satu genus. Mekanisme resistensi yang berhubungan dengan permeabilitas membran (termasuk membran luar) dikode secara kromosoma.

Plasmid adalah elemen genetik DNA yang stabil untuk diturunkan dan bereplikasi secara independen dari kromosom bakteri. Plasmid mempunyai berat molekul dari 1 MDa sampai ratusan Mda. Ukuran plasmid bervariasi, dari 2,1 kb atau berat 1,8 MDa sampai 213 kb atau berat 142 MDa. Adanya plasmid baru terlihat apabila gen yang dikandungnya memberikan sifat-sifat baru pada inang. Umumnya plasmid tersebut dinamai sesuai sifat plasmid tersebut, misalnya: plasmid resistensi, plasmid virulensi, plasmid degradatif, seks plasmid dan Kol-plasmid. Sel bakteri dapat mempunyai satu jenis atau lebih DNA ekstra kromosomal atau plasmid. Secara umum plasmid membawa gen yang penting bagi bakteri tetapi bukan gen yang esensial untuk pertumbuhan dan pembelahan sel bakteri. Di samping itu diketahui ada plasmid bakteri yang tidak mempunyai fungsi yang disebut dengan cryptic plasmid. Sejumlah isolat bakteri menunjukkan reaksi resisten terhadap beberapa antibiotika tertentu yang banyak digunakan di lapangan. Apabila sifat resistensi (R) tersebut disandi oleh plasmid, ada kekhawatiran sifat tersebut ditransfer ke bakteri lain yang compatible sehingga dapat membahayakan ekologi bakteri di lingkungan. Transfer plasmid R terjadi tidak hanya dalam satu spesies tetapi dapat terjadi dalam satu genus seperti *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*. Transfer plasmid R menjadi penting karena meningkatkan populasi resistensi bakteri di alam dan mengurangi efektifitas pengobatan

2.2. Penggolongan Antibiotik

Penggolongan antibiotik secara umum dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

1. Berdasarkan struktur kimia antibiotik

a. Golongan Beta-Laktam, antara lain golongan sefalosporin (sefaleksin, sefazolin, sefuroksim, sefadroksil, seftazidim), golongan monosiklik, dan golongan penisilin (penisilin, amoksisilin). Penisilin adalah suatu agen antibakterial alami yang dihasilkan dari jamur jenis *Penicillium chrysognum*.

b. Antibiotik golongan aminoglikosida, aminoglikosida dihasilkan oleh jenis-jenis fungi *Streptomyces* dan *Micromonospora*. Semua senyawa dan turunan semi-sintesisnya mengandung dua atau tiga gula-amino di dalam molekulnya, yang saling terikat secara glukosidis. Spektrum kerjanya luas dan meliputi terutama banyak bacilli gram-negatif. Obat ini juga aktif terhadap gonococci dan sejumlah kuman gram-positif. Aktifitasnya adalah bakterisid, berdasarkan dayanya untuk menembus dinding bakteri dan mengikat diri pada ribosom di dalam sel. Contohnya streptomisin, gentamisin, amikasin, neomisin, dan paranomisin.

c. Antibiotik golongan tetrasiklin, khasiatnya bersifat bakteristatis, hanya melalui injeksi intravena dapat dicapai kadar plasma yang bakterisid lemah. Mekanisme

kerjanya berdasarkan diganggunya sintesa protein kuman. Spektrum antibakterinya luas dan meliputi banyak cocci gram positif dan gram negatif serta kebanyakan bacilli. Tidak efektif Pseudomonas dan Proteus, tetapi aktif terhadap mikroba khusus Chlamydia trachomatis (penyebab penyakit mata trachoma dan penyakit kelamin), dan beberapa protozoa (amuba) lainnya. Contohnya tetrasiklin, doksisisiklin, dan monosiklin.

d. Antibiotik golongan makrolida, bekerja bakteristatis terhadap terutama bakteri gram-positif dan spectrum kerjanya mirip Penisilin-G. Mekanisme kerjanya melalui pengikatan reversibel pada ribosom kuman, sehingga sintesa proteinnya dirintangi. Bila digunakan terlalu lama atau sering dapat menyebabkan resistensi. Absorbnya tidak teratur, agak sering menimbulkan efek samping lambung-usus, dan waktu paruhnya singkat, maka perlu ditakarkan sampai 4x sehari.

e. Antibiotik golongan linkomisin, dihasilkan oleh srteptomycetes lincolnensis (AS 1960). Khasiatnya bakteristatis dengan spektrum kerja lebih sempit dar ipada makrolida,n terutama terhadap kuman gram positif dan anaerob. Berhubung efek sampingnya hebat kini hanya digunakan bila terdapat resistensi terhadap antibiotika lain. Contohnya linkomisin.

f. Antibiotik golongan kuinolon, senyawa-senyawa kuinolon berkhasiat bakterisid pada fase pertumbuhan kuman, berdasarkan inhibisi terhadap enzim DNA-gyrase kuman, sehingga sintesis DNAny dihindarkan. Golongan ini hanya dapat digunakan pada infeksi saluran kemih (ISK) tanpa komplikasi.

g. Antibiotik golongan kloramfenikol, kloramfenikol mempunyai spektrum luas. Berkhasiat bakteristatis terhadap hampir semua kuman gram positif dan sejumlah kuman gram negatif. Mekanisme kerjanya berdasarkan perintangn sintesa polipeptida kuman. Contohnya kloramfenikol.

2. Berdasarkan sifat toksisitas selektif,

Ada antibiotik yang bersifat bakteristatik dan ada yang bersifat bakterisida Agen bakteristatik menghambat pertumbuhan bakteri. Sedangkan agen bakterisida membunuh bakteri. Perbedaan ini biasanya tidak penting secara klinis selama mekanisme pertahanan pejamu terlibat dalam eliminasi akhir patogen bakteri. Pengecualiannya adalah terapi infeksi pada pasien immunocompromised dimana menggunakan agen-agen bakterisida. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Antibiotik tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteristatik menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM

3. Berdasarkan mekanisme kerjanya terhadap bakteri, antibiotik dikelompokkan sebagai berikut (Stringer, 2006) :

a. Inhibitor sintesis dinding sel bakteri memiliki efek bakterisidal dengan cara memecah enzim dinding sel dan menghambat enzim dalam sintesis dinding sel. Contohnya antara lain golongan β -Laktam seperti penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam, dan inhibitor sintesis dinding sel lainnya seperti vancomysin, basitrasin, fosfomysin, dan daptomysin.

b. Inhibitor sintesis protein bakteri memiliki efek bakterisidal atau bakteriostatik dengan cara mengganggu sintesis protein tanpa mengganggu sel-sel normal dan menghambat tahap-tahap sintesis protein. Obat-obat yang aktivitasnya menghambat sintesis protein bakteri seperti aminoglikosida, makrolida, tetrasiklin, streptogamin, klindamisin, oksazolidinon, kloramfenikol.

c. Mengubah permeabilitas membran sel memiliki efek bakteriostatik dan bakterisidal dengan menghilangkan permeabilitas membran dan oleh karena hilangnya substansi seluler menyebabkan sel menjadi lisis. Obat-obat yang memiliki aktivitas ini antara lain polimiksin, amfoterisin B, gramisidin, nistatin, kolistin

d. Menghambat sintesa folat mekanisme kerja ini terdapat pada obat-obat seperti sulfonamida dan trimetoprim. Bakteri tidak dapat mengabsorpsi asam folat, tetapi harus membuat asam folat dari PABA (asam para amino benzoat), dan glutamat. Sedangkan pada manusia, asam folat merupakan vitamin dan kita tidak dapat menyintesis asam folat. Hal ini menjadi suatu target yang baik dan selektif untuk senyawa-senyawa antimikroba.

e. Mengganggu sintesis DNA mekanisme kerja ini terdapat pada obat-obat seperti metronidasol, kinolon, novobiosin. Obat-obat ini menghambat asam deoksiribonukleat (DNA) girase sehingga menghambat sintesis DNA. DNA girase adalah enzim yang terdapat pada bakteri yang menyebabkan terbukanya dan terbentuknya superheliks pada DNA sehingga menghambat replikasi DNA.

4. Berdasarkan aktivitasnya, antibiotik dikelompokkan sebagai berikut

a. Antibiotika spektrum luas (broad spectrum) contohnya seperti tetrasiklin dan sefalosporin efektif terhadap organism baik gram positif maupun gram negatif. Antibiotik berspektrum luas sering kali dipakai untuk mengobati penyakit infeksi yang menyerang belum diidentifikasi dengan pembiakan dan sensitifitas.

b. Antibiotika spektrum sempit (narrow spectrum) golongan ini terutama efektif untuk melawan satu jenis organisme. Contohnya penisilin dan eritromisin dipakai untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram positif. Karena antibiotik

berspektrum sempit bersifat selektif, maka obat-obat ini lebih aktif dalam melawan organisme tunggal tersebut daripada antibiotik berspektrum luas.

5. **Berdasarkan daya hambat antibiotik**, terdapat 2 pola hambat antibiotik terhadap kuman yaitu

a. Time dependent killing. Pada pola ini antibiotik akan menghasilkan daya bunuh maksimal jika kadarnya dipertahankan cukup lama di atas Kadar Hambat Minimal kuman. Contohnya pada antibiotik penisilin, sefalosporin, linezolid, dan eritromisin.

b. Concentration dependent killing. Pada pola ini antibiotik akan menghasilkan daya bunuh maksimal jika kadarnya relatif tinggi atau dalam dosis besar, tapi tidak perlu mempertahankan kadar tinggi ini dalam waktu lama. Contohnya pada antibiotik aminoglikosida, fluorokuinolon, dan ketolid.

III. EVALUASI BELAJAR

a. Latihan

1. Jelaskan tentang pengertian resistensi dan antibiotik
2. Jelaskan Mekanisme kerja antibiotik dalam sel
3. Tuliskan minimal 5 jenis antibiotik yang biasa digunakan dalam seleksi sel tranforman

Penilaian Tugas

4. Tugas dibuat di blog mahasiswa
5. Blog di link ke web hybrid learning.
6. Blog tersebut harus mencantumkan logo dan nama Universitas Esa Unggul
7. Diselesaikan sebelum batas akhir penyerahan tugas (Tanggal ...)

VI. DAFTAR PUSTAKA

Brown TA. 2006. *Gene Cloning and DNA analysis an Introduction*. 4nd ed. Australia: Blackweel Publishing Asia Pty Ltd

Campbell NA, Reece JB, Mitchell LG. 2003. *Biologi* (terjemahan). Erlangga: Jakarta.

Garret RA, Klenk HP. 2007. *Archaea Evolution, Physiology, and Molecular Biology*. Australia: Blackwell Publishing.

Tjay, Tan Hoan dan Kirana Rahardja, 2007, Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya, Edisi Keenam, 262, 269-271, PT. Elex Media Komputindo, Jakarta

Yuwono T. 2008. *Biologi Molekuler*. Erlangga: Jakarta

BAB VII. Polylinker, Promoter dan Analisis Sekuensing

I. Pendahuluan

a. Pengantar

Sekuensing DNA adalah metode penentuan urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA. Metode sekuensing yang umum dilakukan adalah metode Sanger yang dapat dilakukan melalui metode radioaktif dan metode fluoresens. Metode sekuensing radioaktif merupakan metode sintesis enzimatik fragmen berlabel radioaktif dari rantai DNA tak berlabel. Metode sekuensingnya dilakukan secara manual. Metode ini terdiri atas tiga tahap reaksi yaitu preparasi templat, pembentukan kelompok fragmen berlabel, serta elektroforesis dan pembacaan gel. Metode sekuensing fluorescens merupakan metode perpanjangan enzimatik untuk sekuensing DNA menggunakan basa terminasi dye fluorescens. Kelebihan metode sekuensing otomatis adalah reaksi sekuensing dilakukan dalam tabung tunggal, dapat menentukan urutan nukleotida lebih banyak, dan penyiapan tempat lebih mudah

b. Kompetensi Dasar

Mahasiswa dapat memahami dan menjelaskan tentang Daerah Polynker, promotor dan analisis sekuensing

c. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

- b. Memahami dan menjelaskan tentang daerah polynker pada suatu vektor
- c. Memahami tentang fungsi promotor dalam ekspresi gen
- d. Menjelaskan teknik analisis hasil sekuens DNA

d. Kegiatan Pembelajaran

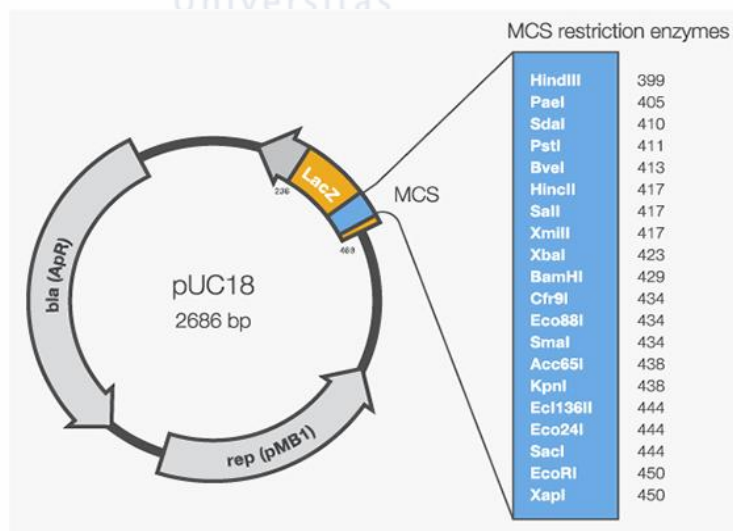
Pembelajaran dilakukan dengan metoda contextual learning dan project based learning

Mahasiswa mencari bahan pustaka, membuat bahan presentasi dan mempresentasikan hasil literasinya

II. MATERI

2.1 Multiple Cloning Site (Polylinker)

Daerah MCS (multiple Cloning Site) atau yang dikenal dengan *polylinker* merupakan segmen DNA pendek yang banyak mengandung situs enzim restriksi yang terdapat dalam vektor kloning. Polylinker dimasukkan ke dalam vektor untuk membuat kloning lebih mudah dengan pengenalan situs restriksi dalam kloning DNA, dipotong dengan sejumlah enzim restriksi yang berbeda, menjadi satu plasmid tunggal. Daerah polylinker berguna untuk mengkloning fragmen DNA yang memiliki kohesif yang berbeda pada setiap ujungnya (yaitu diproduksi dengan memotong fragmen DNA dari molekul dengan dua enzim restriksi yang berbeda). Bila plasmid dipotong dengan dua enzim yang berbeda diligasi ke fragmen DNA yang mengandung dua ujung kohesif yang ada di plasmid dan kemudian campuran ligasi ditransformasikan ke dalam sel bakteri, sebagian besar transforman mengandung plasmid rekombinan yang diinginkan dimana satu molekul fragmennya tepatnya berorientasi pada plasmid. Sebaliknya, ketika fragmen DNA dikelompokkan menjadi potongan plasmid dengan satu enzim tunggal, sehingga kedua ujung kohesifnya sama. Selanjutnya, sisipan memiliki orientasi tunggal, sedangkan fragmen dengan ujung kohesif identik dengan menyisipkan dengan orientasi probabilitas yang sama. Pasangan polylinker tersedia yang memiliki rangkaian lokasi yang sama, namun dalam orientasi yang berlawanan, memungkinkan kloning fragmen dalam orientasi yaitu, pUC18 dan pUC12 (Gambar 17)



Gambar 17. Vektor dengan Daerah Polylinker

2.2. Promotor sebagai Kontrol Ekspresi

Promotor adalah urutan DNA spesifik yang berperan dalam mengendalikan transkripsi gen struktural dan terletak di daerah upstream (hulu) dari bagian

struktural gen. Promotor berfungsi sebagai tempat awal pelekatan enzim RNA polimerase yang nantinya melakukan transkripsi pada bagian struktural. Operator Operator merupakan urutan nukleotida yang terletak di antara promotor dan bagian struktural dan merupakan tempat pelekatan protein represor (penekan atau penghambat ekspresi gen). Jika ada represor yang melekat di operator maka RNA polimerase tidak bisa berlangsung. selain adanya supresor juga terdapat enhancer. supresor digunakan untuk menghambat sedangkan enhancer digunakan untuk meningkatkan proses transkripsi dengan meningkatkan jumlah RNA polimerase. Namun letaknya tidak pada lokasi yang spesifik seperti operator, ada yg jauh di upstream atau bahkan downstream dari titik awal transkripsi

3. Analisis Sekuens

Molekul DNA rekombinan yang memperlihatkan hasil positif dalam reaksi hibridisasi dengan fragmen pelacak sangat diduga sebagai molekul yang membawa fragmen sisipan atau bahkan gen yang diinginkan. Namun, hal ini masih memerlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa fragmen tersebut benar-benar sesuai dengan tujuan kloning. Analisis antara lain dapat dilakukan atas dasar urutan (sekuens) basa fragmen sisipan.

Penentuan urutan (sekuensing) basa DNA pada prinsipnya melibatkan produksi seperangkat molekul/fragmen DNA yang berbeda-beda ukurannya tetapi salah satu ujungnya selalu sama. Selanjutnya, fragmen-fragmen ini dimigrasikan/dipisahkan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid atau *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) agar pembacaan sekuens dapat dilakukan. Di bawah ini akan diuraikan sekilas dua macam metode sekuensing DNA.

1. Metode Maxam-Gilbert

Metode sekuensing DNA yang pertama dikenal adalah metode kimia yang dikembangkan oleh A.M. Maxam dan W. Gilbert pada tahun 1977. Pada metode ini fragmen-fragmen DNA yang akan disekuens harus dilabeli pada salah satu ujungnya, biasanya menggunakan fosfat radioaktif atau suatu nukleotida pada ujung 3'. Metode Maxam-Gilbert dapat diterapkan baik untuk DNA untai ganda maupun DNA untai tunggal dan melibatkan pemotongan basa spesifik yang dilakukan dalam dua tahap.

Molekul DNA terlebih dahulu dipotong-potong secara parsial menggunakan piperidin. Pengaturan masa inkubasi atau konsentrasi piperidin akan menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang bermacam-macam ukurannya. Selanjutnya, basa

dimodifikasi menggunakan bahan-bahan kimia tertentu. Dimetilsulfat (DMS) akan memetilasi basa G, asam format menyerang A dan G, hidrazin akan menghidrolisis C dan T, tetapi garam yang tinggi akan menghalangi reaksi T sehingga hanya bekerja pada C. Dengan demikian, akan dihasilkan empat macam fragmen, masing-masing dengan ujung G, ujung A atau G, ujung C atau T, dan ujung C.

2. Metode Sanger

Dewasa ini metode sekuensing Maxam-Gilbert sudah sangat jarang digunakan karena ada metode lain yang jauh lebih praktis, yaitu metode dideoksi yang dikembangkan oleh A. Sanger dan kawan-kawan pada tahun 1977 juga. Metode Sanger pada dasarnya memanfaatkan dua sifat salah satu subunit enzim DNA polimerase yang disebut fragmen klenow. Kedua sifat tersebut adalah kemampuannya untuk menyintesis DNA dengan adanya dNTP dan ketidakmampuannya untuk membedakan dNTP dengan ddNTP. Jika molekul dNTP hanya kehilangan gugus hidroksil (OH) pada atom C nomor 2 gula pentosa, molekul ddNTP atau dideoksi nukleotida juga mengalami kehilangan gugus OH pada atom C nomor 3 sehingga tidak dapat membentuk ikatan fosfodiester. Artinya, jika ddNTP disambungkan oleh fragmen klenow dengan suatu molekul DNA, maka polimerisasi lebih lanjut tidak akan terjadi atau terhenti. Basa yang terdapat pada ujung molekul DNA ini dengan sendirinya adalah basa yang dibawa oleh molekul ddNTP. Dengan dasar pemikiran itu sekuensing DNA menggunakan metode dideoksi dilakukan pada empat reaksi yang terpisah. Keempat reaksi ini berisi dNTP sehingga polimerisasi DNA dapat berlangsung. Namun, pada masing-masing reaksi juga ditambahkan sedikit ddNTP sehingga kadang-kadang polimerisasi akan terhenti di tempat-tempat tertentu sesuai dengan ddNTP yang ditambahkan. Jadi, di dalam tiap reaksi akan dihasilkan sejumlah fragmen DNA yang ukurannya bervariasi tetapi ujung 3'nya selalu berakhir dengan basa yang sama. Sebagai contoh, dalam reaksi yang mengandung ddATP akan diperoleh fragmen-fragmen DNA dengan berbagai ukuran yang semuanya mempunyai basa A pada ujung 3'nya.

Sekuens-sekuens baru terus bertambah dengan kecepatan yang kian meningkat. Begitu pula, sejumlah perangkat lunak komputer diperlukan agar data yang tersedia dapat dimanfaatkan dengan lebih baik. Ketika sekuens suatu fragmen DNA telah diketahui, hanya ada sedikit sekali gambaran yang dapat diperoleh dari sekuens tersebut. Analisis sekuens perlu dilakukan untuk mengetahui beberapa karakteristik pentingnya seperti peta restriksi, rangka baca, kodon awal dan kodon akhir, atau kemungkinan tempat promoternya. Di samping itu, perlu juga dipelajari hubungan kekerabatan suatu sekuens baru dengan beberapa sekuens lainnya yang telah terlebih dahulu diketahui. Biasanya, analisis semacam itu dilakukan

menggunakan paket-paket perangkat lunak menjelaskan prinsip kerja sekuensing DNA dengan metode Maxam-Gilbert, menjelaskan prinsip kerja sekuensing DNA dengan metode Sanger, menyebutkan beberapa pangkalan data sekuens DNA, dan menyebutkan beberapa proyek sekuensing DNA.

Pengetahuan awal yang diperlukan oleh mahasiswa agar dapat mempelajari pokok bahasan ini dengan lebih baik adalah dasar-dasar teknologi DNA rekombinan, konstruksi perpustakaan gen, vektor kloning, dan teknik PCR, yang masing-masing telah dibicarakan pada Bab IX hingga XII.

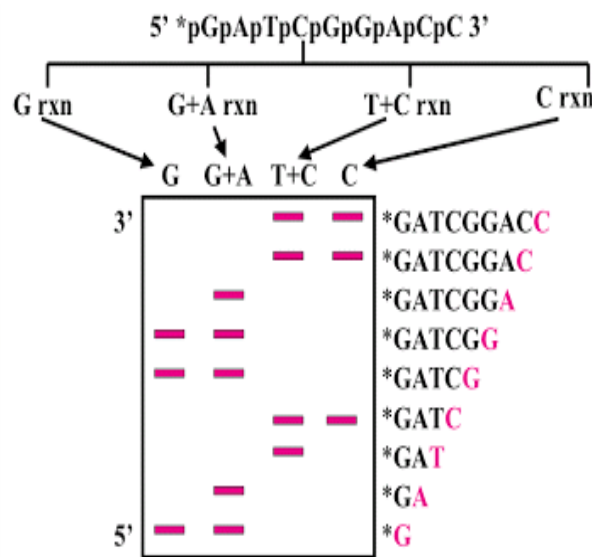
Prinsip Sekuensing DNA

Molekul DNA rekombinan yang memperlihatkan hasil positif dalam reaksi hibridisasi dengan fragmen pelacak sangat diduga sebagai molekul yang membawa fragmen sisipan atau bahkan gen yang diinginkan. Namun, hal ini masih memerlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa fragmen tersebut benar-benar sesuai dengan tujuan kloning. Analisis antara lain dapat dilakukan atas dasar urutan (sekuens) basa fragmen sisipan. Penentuan urutan (sekuensing) basa DNA pada prinsipnya melibatkan produksi seperangkat molekul/fragmen DNA yang berbeda-beda ukurannya tetapi salah satu ujungnya selalu sama. Selanjutnya, fragmen-fragmen ini dimigrasikan/dipisahkan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid atau polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) agar pembacaan sekuens dapat dilakukan. Di bawah ini akan diuraikan sekilas dua macam metode sekuensing DNA.

Metode Maxam-Gilbert

Metode sekuensing DNA yang pertama dikenal adalah metode kimia yang dikembangkan oleh A.M. Maxam dan W. Gilbert pada tahun 1977. Pada metode ini fragmen-fragmen DNA yang akan disekuens harus dilabeli pada salah satu ujungnya, biasanya menggunakan fosfat radioaktif atau suatu nukleotida pada ujung 3'. Metode Maxam-Gilbert dapat diterapkan baik untuk DNA untai ganda maupun DNA untai tunggal dan melibatkan pemotongan basa spesifik yang dilakukan dalam dua tahap. Molekul DNA terlebih dahulu dipotong-potong secara parsial menggunakan piperidin. Pengaturan masa inkubasi atau konsentrasi piperidin akan menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang bermacam-macam ukurannya. Selanjutnya, basa dimodifikasi menggunakan bahan-bahan kimia tertentu. Dimetilsulfat (DMS) akan memetilasi basa G, asam format menyerang A dan G, hidrazin akan menghidrolisis C dan T, tetapi garam yang tinggi akan menghalangi reaksi T sehingga hanya bekerja pada C. Dengan demikian, akan dihasilkan empat macam fragmen, masing-masing dengan ujung G, ujung A atau G, ujung C atau T, dan ujung C.

Maxam-Gilbert sequencing



Gambar 18. Contoh PAGE sekuensing dengan metode Maxam-Gilbert

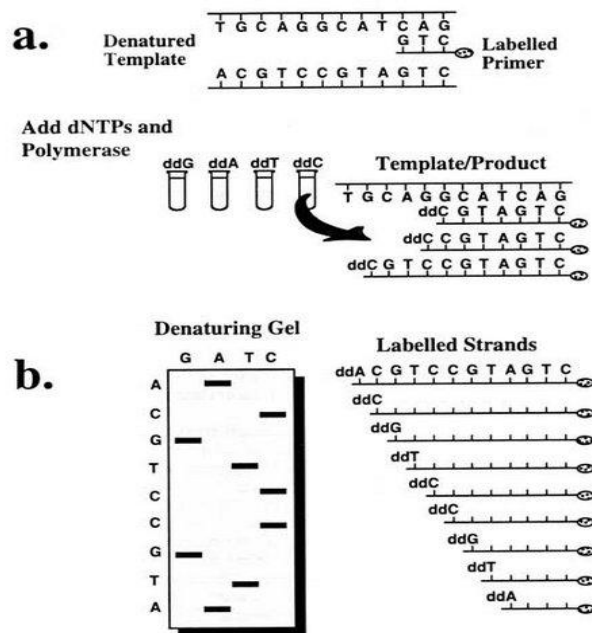
Dari hasil PAGE pada Gambar 18 dapat diketahui sekuens fragmen DNA yang dipelajari atas dasar laju migrasi masing-masing pita. Lajur kedua berisi fragmen-fragmen yang salah satu ujungnya adalah A atau G. Untuk memastikannya harus dilihat pita-pita pada lajur pertama. Jika pada lajur kedua terdapat pita-pita yang posisi migrasinya sama dengan posisi migrasi pada lajur pertama, maka dapat dipastikan bahwa pita-pita tersebut merupakan fragmen yang salah satu ujungnya adalah G. Sisanya adalah pita-pita yang merupakan fragmen dengan basa A pada salah satu ujungnya. Cara yang sama dapat kita gunakan untuk memastikan pita-pita pada lajur ketiga, yaitu dengan membandingkannya dengan pita-pita pada lajur keempat. Seperti halnya pada elektroforesis gel agarosa (Bab X), laju migrasi pita menggambarkan ukuran fragmen. Makin kecil ukuran fragmen, makin cepat migrasinya. Dengan demikian, ukuran fragmen pada contoh tersebut di atas dapat diurutkan atas dasar laju/posisi migrasinya. Jadi, kalau diurutkan dari yang terkecil hingga yang terbesar, hasilnya adalah fragmen-fragmen dengan ujung TTGCCCCGCGTGGCGCAAAGG. Inilah sekuens fragmen DNA yang dipelajari

Metode Sanger

Metode Sanger pada dasarnya memanfaatkan dua sifat salah satu subunit enzim DNA polimerase yang disebut fragmen klenow. Kedua sifat tersebut adalah kemampuannya untuk menyintesis DNA dengan adanya dNTP dan ketidakmampuannya untuk membedakan dNTP dengan ddNTP. Jika molekul dNTP hanya kehilangan gugus hidroksil (OH) pada atom C nomor 2 gula pentosa, molekul ddNTP atau dideoksi nukleotida juga mengalami kehilangan gugus OH pada atom C

nomor 3 sehingga tidak dapat membentuk ikatan fosfodiester. Artinya, jika ddNTP disambungkan oleh fragmen klenow dengan suatu molekul DNA, maka polimerisasi lebih lanjut tidak akan terjadi atau terhenti. Basa yang terdapat pada ujung molekul DNA ini dengan sendirinya adalah basa yang dibawa oleh molekul ddNTP.

Pada Gambar 19 diberikan sebuah contoh sekuensing sebuah fragmen DNA. Tabung ddATP menghasilkan dua fragmen dengan ukuran tiga dan tujuh basa; tabung ddCTP menghasilkan tiga fragmen dengan ukuran satu, dua, dan empat basa; tabung ddGTP menghasilkan dua fragmen dengan ukuran lima dan sembilan basa; tabung ddTTP menghasilkan dua fragmen dengan ukuran enam dan delapan basa. Di depan (arah 5') tiap fragmen ini sebenarnya terdapat primer, yang berfungsi sebagai prekursor reaksi polimerisasi sekaligus untuk kontrol hasil sekuensing karena urutan basa primer telah diketahui. Setelah ukurannya diketahui, dilakukan pengurutan fragmen mulai dari yang paling pendek hingga yang paling panjang, yaitu fragmen dengan ujung C (satu basa) hingga fragmen dengan ujung G (sembilan basa). Dengan demikian, hasil sekuensing yang diperoleh adalah CCACGTATG. Urutan basa DNA yang dicari adalah urutan yang komplementer dengan hasil sekuensing ini, yaitu GGTGCATAC.



Gambar 19. Skema sekuensing DNA Metode Sanger

- a) reaksi polimerisasi dan terminasi
- b) PAGE untuk melihat ukuran fragmen

Pangkalan Data Sekuens DNA

Selama bertahun-tahun telah banyak sekuens DNA yang ditentukan oleh para ilmuwan di seluruh dunia, dan saat ini kebanyakan jurnal ilmiah mempersyaratkan penyerahan sekuens DNA terlebih dahulu untuk keperluan pangkalan data publik sebelum mereka menerima naskah selengkapannya dari para penulis/ilmuwan. Pengelola pangkalan data akan saling bertukar informasi tentang sekuens-sekuens yang terkumpul dan menyediakannya untuk akses publik sehingga semua pangkalan data yang ada akan menjadi nara sumber yang sangat bermanfaat. Sekuens-sekuens baru terus bertambah dengan kecepatan yang kian meningkat. Begitu pula, sejumlah perangkat lunak komputer diperlukan agar data yang tersedia dapat dimanfaatkan dengan lebih baik.

EMBL di Eropa dan GenBank di Amerika Serikat merupakan dua pangkalan data sekuens DNA terbesar di dunia. Selain sekuens DNA, mereka juga mengelola data sekuens RNA dan protein. Sementara itu, beberapa perusahaan mempunyai pangkalan data sekuens DNA sendiri. Ketika sekuens suatu fragmen DNA telah diketahui, hanya ada sedikit sekali gambaran yang dapat diperoleh dari sekuens tersebut. Analisis sekuens perlu dilakukan untuk mengetahui beberapa karakteristik pentingnya seperti peta restriksi, rangka baca, kodon awal dan kodon akhir, atau kemungkinan tempat promoternya. Di samping itu, perlu juga dipelajari hubungan kekerabatan suatu sekuens baru dengan beberapa sekuens lainnya yang telah terlebih dahulu diketahui. Biasanya, analisis semacam itu dilakukan menggunakan paket-paket perangkat lunak, misalnya paket GCG Universitas Wisconsin dan DNASTAR.

Proyek-proyek Sekuensing Genom

Sejalan dengan berkembangnya mesin-mesin sekuensing DNA otomatis (automatic DNA sequencer), sejumlah organisasi telah memberikan perhatian dan dukungan dana bagi penentuan sekuens genom berbagai spesies organisme penting. Beberapa genom yang ukurannya sangat kecil seperti genom virus HIV dan fag λ telah disekuens seluruhnya. Genom sejumlah bakteri, misalnya *E. coli* ($4,6 \times 10^6$ pb), dan khamir *Saccharomyces cerevisiae* ($2,3 \times 10^7$ pb) juga telah selesai disekuens. Sementara itu, proyek sekuensing genom tanaman *Arabidopsis thaliana* ($6,4 \times 10^7$ pb) dan nematoda *Caenorhabditis elegans* saat ini masih berlangsung. Proyek Genom Manusia (Human Genom Project), yang diluncurkan pada tahun 1990 dan sebenarnya diharapkan selesai pada tahun 2005, ternyata berakhir dua tahun lebih cepat daripada jadwal yang telah ditentukan.

Pada genom manusia dan genom-genom lain yang berukuran besar biasanya dilakukan pemetaan kromosom terlebih dahulu untuk mengetahui lokus-

lokus gen pada tiap kromosom. Selanjutnya, perpustakaan gen untuk suatu kromosom dikonstruksi menggunakan vektor YACs (lihat Bab V) dan klon-klon YACs yang saling tumpang tindih diisolasi hingga panjang total kromosom tersebut akan tercakup. Demikian seterusnya untuk kromosom-kromosom yang lain hingga akhirnya akan diperoleh sekuens genom total yang sambung-menyambung dari satu kromosom ke kromosom berikutnya

III. DAFTAR PUSTAKA

Brown TA. 2006. *Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction*, 4nd ed. Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.

Muladno. 2002. *Teknik Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.

Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. New York (US): Cold Spring Harbor.

Yuwono Tribowo. 2006. *Biologi Molekular*. Jakarta : Erlangga

BAB VIII. EKSPRESI GEN PADA PROKARIOT DAN EUKARIOT

I. Pendahuluan

A. Pengantar

Ekspresi gen merupakan suatu proses penerjemahan informasi yang dikode oleh gen menjadi urutan asam amino dalam sintesis protein. Dalam sintesis protein, informasi genetik yang dibawa DNA akan disalin menjadi mRNA melalui proses transkripsi. Selanjutnya mRNA yang terbentuk diterjemahkan menjadi polipeptida melalui proses translasi. Ekspresi gen adalah proses penentuan sifat suatu organisme oleh gen. Suatu sifat yang dimiliki oleh organisme merupakan hasil metabolisme yang terjadi di dalam sel. Proses metabolisme dapat berlangsung karena adanya enzim yang berfungsi sebagai katalisator proses-proses biokimia. Enzim dan protein lainnya diterjemahkan dari urutan nukleotida yang ada pada molekul mRNA, dan molekul mRNA itu sendiri disintesis berdasarkan untaian cetakan DNA. Gen tersusun dari molekul DNA, sehingga gen menentukan sifat suatu organisme.

B. Kompetensi Dasar

Mahasiswa dapat memahami dan menjelaskan tentang proses ekspresi gen pada sel prokariot.

C. Kemampuan Akhir yang Diharapkan

Mahasiswa diharapkan mampu :

- e. Memahami dan menjelaskan tentang vektor ekspresi
- f. Memahami komponen yang mempengaruhi dalam ekspresi

D. Kegiatan Pembelajaran

- g. Pembelajaran dilakukan dengan metoda contextual learning dan project based learning
- h. Mahasiswa mencari bahan pustaka, membuat bahan presentasi dan mempresentasikan hasil literasinya

II. MATERI

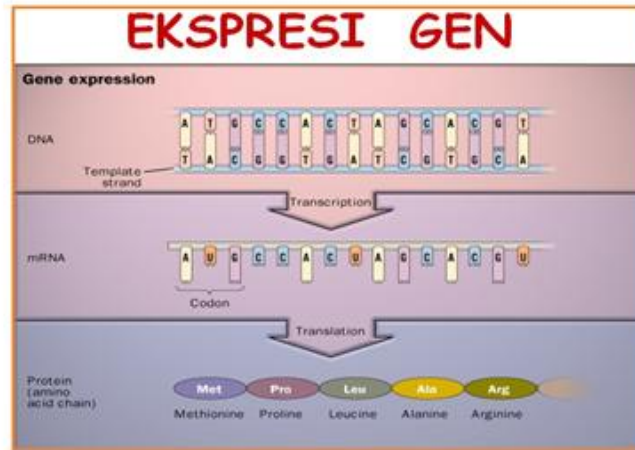
2.1 Struktur Gen

Gen adalah bagian dari kromosom atau salah satu kesatuan kimia (DNA) dalam kromosom yaitu dalam lokus yang mengendalikan ciri-ciri genetis dari suatu makhluk hidup. Genom DNA tersusun atas gen – gen. satu gen mengandung satu

unit informasi mengenai suatu sifat yang dapat diamati. Gen juga dianggap sebagai fragmen DNA didalam kromosom. Struktur gen tersusun dari

1. **Daerah pengkode** yaitu ekson dan intron yang mengkode RNA atau protein. Intron (intervening sekuens merupakan sekuens yg tidak mengkode asam amino sedangkan ekson merupakan merupakan bagian yang akan dikode menjadi asam amino.*.
2. **Promotor** adalah urutan DNA spesifik yang berperan dalam mengendalikan transkripsi gen struktural dan terletak di daerah upstream (hulu) dari bagian struktural gen. Promotor berfungsi sebagai tempat awal pelekatan enzim RNA polimerase yang nantinya melakukan transkripsi pada bagian struktural.
3. **Operator** merupakan urutan nukleotida yang terletak di antara promotor dan bagian struktural dan merupakan tempat pelekatan protein represor (penekan atau penghambat ekspresi gen). Jika ada represor yang melekat di operator maka RNA polimerase tidak bisa berlangsung. selain adanya supresor juga terdapat enhancer. supresor digunakan untuk menghambat sedangkan enhancer digunakan untuk meningkatkan proses transkripsi dengan meningkatkan jumlah RNA polimerase. Namun letaknya tidak pada lokasi yang spesifik seperti operator, ada yg jauh di upstream atau bahkan downstream dari titik awal transkripsi

Ekspresi gen merupakan suatu proses penerjemahan informasi yang dikode oleh gen menjadi urutan asam amino dalam sintesis protein. Dalam sintesis protein, informasi genetik yang dibawa DNA akan disalin menjadi mRNA melalui proses transkripsi. Selanjutnya mRNA yang terbentuk diterjemahkan menjadi polipeptida melalui proses translasi. Ekspresi gen adalah proses penentuan sifat suatu organisme oleh gen. Suatu sifat yang dimiliki oleh organisme merupakan hasil metabolisme yang terjadi di dalam sel. Proses metabolisme dapat berlangsung karena adanya enzim yang berfungsi sebagai katalisator proses-proses biokimia. Enzim dan protein lainnya diterjemahkan dari urutan nukleotida yang ada pada molekul mRNA, dan molekul mRNA itu sendiri disintesis berdasarkan untaian cetakan DNA. Gen tersusun dari molekul DNA, sehingga gen menentukan sifat suatu organisme.



Gambar 20. Ekspresi gen pada sintesis protein

2.2. Transkripsi pada Sel Prokariotik dan Eukariotik

Transkripsi pada dasarnya adalah proses penyalinan urutan nukleotida yang terdapat pada molekul DNA menjadi RNA. Dalam proses transkripsi, hanya salah satu untai DNA yang disalin menjadi urutan nukleotida RNA (transkrip RNA). Urutan nukleotida pada transkrip RNA bersifat komplementer dengan urutan DNA cetakan (DNA template), tetapi identik dengan urutan nukleotida DNA pada untai pengkode.

Perbedaan transkripsi pada sel Prokariotik dan eukariotik dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Waktu dan Lokasi

Sel Prokariotik:

Proses transkripsi terjadi di dalam sitoplasma.

Sel Eukariotik:

Proses transkripsi terjadi di dalam inti sel

2. Gen

Sel Prokariotik:

Pada sel prokariotik terdiri dari 3 macam gen yakni:

a. Promoter,

Adalah bagian yang berperan dalam mengendalikan proses transkripsi dan terletak pada ujung 5'. Fungsi promoter adalah sebagai tempat awal pelekatan enzim RNA polimerase yang nantinya melakukan transkripsi pada bagian gen struktural.

Salah satu bagian penting promoter disebut sebagai *Pribnow box* pada urutan nukleotida -10 dan -35. Oleh karena urutan konsensus pada Pribnow box adalah TATAAT, maka seringkali disebut juga TATA box. Pribnow box berperan dalam mengarahkan enzim RNA polimerase sehingga arah transkripsinya adalah dari

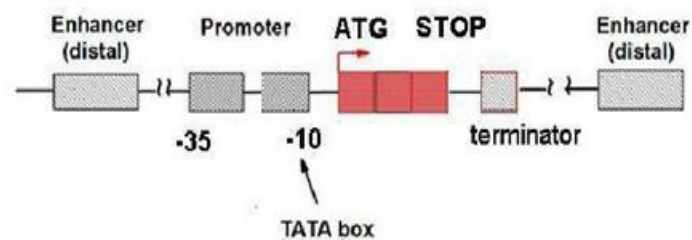
ujung 5'→3'. Selain itu, daerah ini merupakan tempat pembukaan heliks DNA untuk membentuk kompleks promotor yang yang terbuka.

b. Struktural

Adalah bagian yang mengandung urutan DNA spesifik (kode genetik) yang akan ditranskripsi.

c. Terminator

Adalah bagian yang memberikan sinyal pada enzim RNA polimerase untuk menghentikan proses transkripsi. Signal terminasi dicirikan oleh struktur jepit rambut /hairpin dan lengkungan yang kaya akan urutan GC yang terbentuk pada molekul RNA hasil transkripsi



Gambar 21. Struktur gen pada prokariot

Proses terminasi pada sel prokariotik dipengaruhi oleh :

a. Urutan nukleotida (rho independent)

Terminasi dilakukan tanpa harus melibatkan protein khusus, namun ditentukan oleh adanya urutan nukleotida tertentu pada bagian terminator. Ciri urutan adalah adanya struktur jepit rambut/hairpin yang kaya akan basa GC. Akibat struktur itu, RNA polimerase berhenti dan membuka bagian dari sambungan (hibrid) DNA-RNA. Sisa hibrid merupakan urutan oligo U (rU) yang tidak cukup stabil berpasangan dengan A (dA)→ ikatan hidrogen hanya 2 buah, akibatnya ikatan lemah terlepas dan RNA hasil transkripsi lepas

b. Protein / faktor rho (rho dependent)

Terminasi memerlukan protein rho. Faktor rho terikat pada RNA transkrip kemudian mengikuti RNA polimerase sampai ke daerah terminator. Faktor rho membentuk destabilisasi ikatan RNA-DNA hingga akhirnya RNA terlepas.

Sel Eukariotik

Pada sel eukariotik, gen dibedakan menjadi 3 macam kelas yakni:

a. Gen kelas I

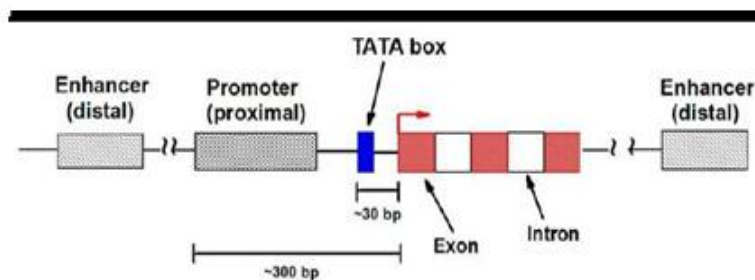
Meliputi gen-gen yg mengkode 18SrRNA, 28SrRNA dan 5,8SrRNA (ditranskripsi oleh RNA polimerase I). Pada gen kelas I terdapat dua macam promoter yaitu promoter antara (spacer promoter) dan promoter utama.

b. Gen kelas II

Meliputi semua gen yang mengkode protein dan beberapa RNA berukuran kecil yang terdapat di dalam nukleus (ditranskripsi oleh RNA polimerase II). Promoter gen kelas II terdiri atas 4 elemen yaitu sekuens pemulai (initiator) yg terletak pada daerah inisiasi transkripsi, elemen hilir (downstream) yang terletak disebelah hilir dari titik awal transkripsi, kotak TATA dan suatu elemen hulu (upstream).

c. Gen kelas III

Meliputi gen-gen yg mengkode tRNA, 5SrRNA dan beberapa RNA kecil yang ada di dalam nukleus (ditranskripsi oleh RNA polimerase III). Sebagian besar gen kelas III merupakan suatu cluster dan berulang.



Gambar 22. Struktur umum gen pada eukariotik

3. Sistem operon

Sel Prokariotik

Pada prokariotik, gen diorganisasikan dalam satu sistem operon. Satu promoter untuk mengendalikan seluruh gen struktural. Contoh dari operon adalah operon lac yang mengendalikan kemampuan metabolisme laktosa pada bakteri *Eschericia coli*.

Sel Eukariotik

Pada eukariotik, tidak dikenal adanya sistim operon karena satu promotor mengendalikan seluruh gen struktural. Pada gen struktural eukariotik, keberadaan intron merupakan hal yang sering dijumpai meskipun tidak semua gen eukariotik mengandung intron.

4. Sifat ekspresi gen

Sel Prokariotik

Sifat ekspresi gen mRNA pada sel Prokariotik adalah polisistronik. Hal ini berarti dalam satu transkrip terkandung lebih dari satu rangkaian kodon (sistron) polipeptida yang berbeda.

Sel Eukariotik

Sifat ekspresi gen mRNA pada sel eukariotik adalah monosistronik. Hal ini berarti dalam satu transkrip yang dihasilkan hanya mengkode satu macam produk ekspresi gen. Satu mRNA membawa satu macam rangkaian kodon untuk satu macam polipeptida.

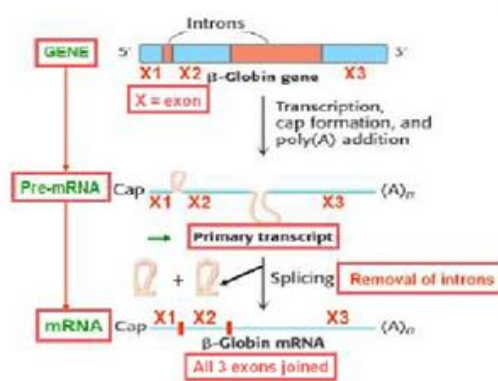
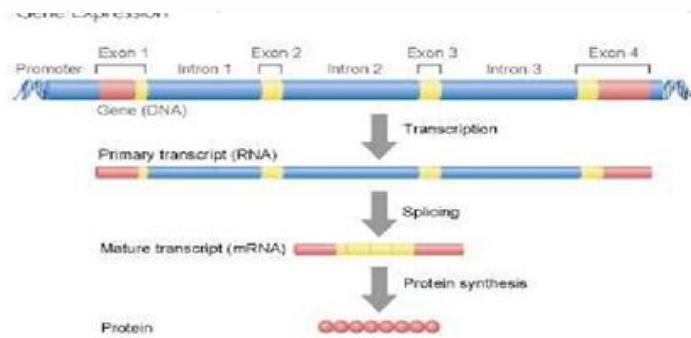
5. Proses splicing

Sel Prokariotik

Splicing merupakan proses pemotongan dan penyambungan RNA. Pada sel prokariotik tidak terjadi splicing. Hal ini dikarenakan pada sel prokariotik tidak terdapat intron dalam satu untai mRNA hasil transkripsi (kecuali pada beberapa Archaea tertentu).

Sel Eukariotik

Pada sel eukariotik terjadi splicing karena dalam satu untai mRNA hasil transkripsi yang akan diterjemahkan terdapat intron dan ekson yang berseling-seling. Terjadinya splicing ini adalah ketika fase pasca transkripsi. Awalnya, gen memiliki 2 macam kode yakni ekson dan intron. Ekson merupakan kode yang dipakai sedangkan intron merupakan kode yang tidak dipakai dan akan dibuang. Selanjutnya terjadi proses pemotongan intron dan penyambungan ekson. Sehingga akan terbentuklah mRNA yang matang dan selanjutnya akan ditransfer ke sitoplasma untuk melalui tahap selanjutnya yakni translasi di ribosom.



Gambar 23. Proses splicing

6. Proses capping dan poliadenilasi

Sel Prokariotik

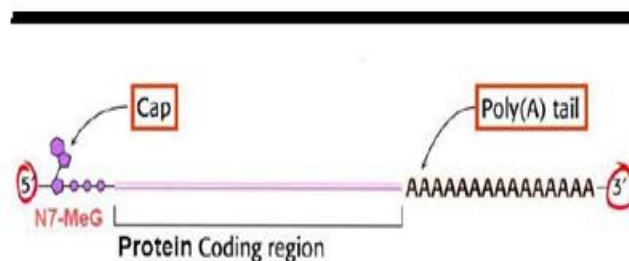
Pada sel prokariotik tidak terjadi proses capping dan poliadenilasi. Hasil dari sintesis RNA polimerase dapat langsung melanjutkan proses transkripsi.

Sel Eukariotik

Pada sel eukariotik, setiap ujung molekul pre-mRNA yang telah terbentuk dimodifikasi dengan cara tertentu. Ujung 5' yaitu ujung depan, pertama kali dibuat saat transkripsi segera ditutup dengan nukleotida guanin (G) yang termodifikasi.

Proses capping (pemberian topi) ini mempunyai fungsi yakni :

- Ujung ini melindungi mRNA dari degradasi enzim hidrolisis.
- Setelah mRNA sampai di sitoplasma, ujung 5' berfungsi sebagai bagian tanda “lekatkan disini” untuk ribosom.
- Pada ujung 3' suatu enzim terjadi proses poliadenilasi yakni penambahan ekor yang terdiri dari 30-200 nukleotida adenin. Ekor poli(A) berfungsi mempermudah ekspor mRNA dari nukleus.



Gambar 24. Proses capping dan poliadenilasi

C. Translasi pada Sel Prokariotik dan Eukariotik

Translasi adalah proses penerjemahan urutan nukleotida yang ada pada molekul mRNA menjadi rangkaian asam amino yang menyusun suatu polipeptida atau protein. RNA yang ditranslasi adalah mRNA, sedangkan tRNA dan rRNA tidak ditranslasi. Molekul rRNA adalah salah satu molekul penyusun ribosom yaitu organel tempat berlangsungnya sintesis protein, sedangkan tRNA adalah pembawa asam-asam amino yang akan disambungkan menjadi rantai polipeptida.

Proses translasi pada sel prokariotik dan eukariotik dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Waktu dan Tempat

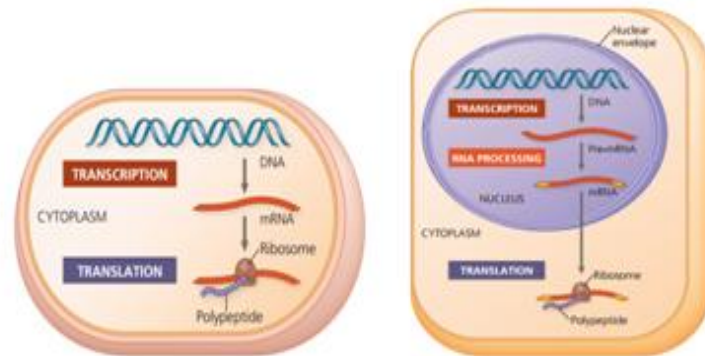
Sel Prokariotik

Pada sel prokariotik, proses translasi terjadi sebelum transkripsi selesai sempurna. Hal ini berarti proses terjadinya translasi dan transkripsi hampir bersamaan dan sama-sama terjadi di sitoplasma. Ini dikarenakan tidak adanya membran inti.

Sel Eukariotik

Pada sel eukariotik, proses translasi terjadi setelah transkripsi selesai (tidak terjadi secara bersamaan). Sebelum proses translasi terdapat fase pasca transkripsi. Terjadinya proses translasi ini berbeda dengan transkripsi karena terjadi di sitoplasma. Ini dikarenakan terdapat membran yang membatasi antara nukleus dan sitoplasma.

lasma.



Gambar 6. Perbedaan letak transkripsi dan translasi pada (a) sel prokariotik (b) sel eukariotik

2. Proses Inisiasi

Sel Prokariotik

RNA polimerase menempel langsung pada DNA di promoter tanpa ada ikatan dengan protein tertentu. Kodon inisiasi pada prokariot adalah formil-metionin/ fMet.

Sel Eukariotik

Terdapat transkripsi faktor berupa protein sebagai tempat menempelnya RNA polimerase. Kodon inisiasi pada eukariot adalah metionin.

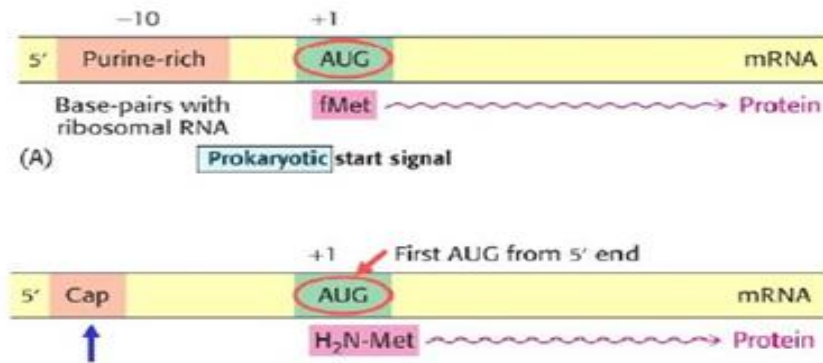
3. Sub Unit Ribosomal

Sel Prokariotik

Sub unit ribosomal adalah 70S yang terdiri dari bagian besar 50S dan bagian kecil 30S.

Sel Eukariotik

Sub unit ribosomal adalah 80S yang terdiri dari bagian besar 60S dan bagian kecil 40S.



Gambar 7. Perbedaan translasi pada prokariot dan eukariot

D. Pengendalian Ekspresi Gen

1. Pengendalian Negatif Ekspresi Gen

Gen regulator menghasilkan suatu protein represor yg dikode oleh gen *lacI*. Represor ini menempel pd daerah operator (*lacO*) yang terletak disebelah hilir promoter. Operator *lac* berukuran sekitar 28 pasang basa. Penempelan menyebabkan RNA polimerase tidak dapat melakukan transkripsi gen-gen struktural (*lacZ*, *lacY* dan *lacA*) sehingga operon mengalami represi.

Pengendalian negatif disebutkan bahwa induser melekat pada bagian represor dan mengubah sisi allosterik dari represor, sehingga mengubah secara allosterik konformasi molekul represor, kemudian represor tidak dapat menempel lagi pada operator dan represor tidak mampu menghambat transkripsi. RNA polimerase akan terus berjalan. Represor yang dihasilkan oleh gen regulator tidak berikatan dengan ko-represor akan tidak aktif dan transkripsi pun akan berjalan. Represor yang berikatan dengan ko-represor pada sisi allosteriknya akan menghambat transkripsi.

2. Pengendalian Positif Ekspresi Gen

Gen regulator menghasilkan suatu aktivator yang belum aktif, sehingga transkripsi tidak bisa berjalan. Aktivator yang dihasilkan oleh gen regulator berikatan dengan protein induser sehingga aktivator akan tereaktivasi dan transkripsi pun berjalan. gen regulator yang menghasilkan suatu aktivator yang sudah aktif dan transkripsi akan berjalan. Aktivator akan berikatan dengan dengan ko-represor sehingga menjadi tidak aktif, maka tidak terjadi transkripsi.

3. Pengendalian Ekspresi Gen Secara Konstitutif

Pengaturan ekspresi gen selalu berjalan terus. Kelompok gen konstitutif merupakan kelompok gen yang bertanggung jawab terhadap metabolisme dasar, misalnya metabolisme energi atau sintesis komponen-komponen selular, sehingga pengaturan ekspresi gen ini harus berjalan secara kontinyu

III. DAFTAR PUSTAKA

Brown TA. 2006. *Gene Cloning and DNA analysis an Introduction*. 4nd ed. Australia: Blackweel Publishing Asia Pty Ltd

Muladno. 2002. *Teknik Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.

Old RW and Primrose SB. 2003. Prinsip – Prinsip Manipulasi Gen (terjemahan Herawati susilo). Edisi ke 4. UI press. Jakarta

Rifa'i M. 2010. Buku Ajar Genetika. Jurusan Biologi . Universitas Brawijaya. Malang

Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. New York (US): Cold Spring Harbor.

Yuwono Tribowo. 2006. *Biologi Molekular*. Jakarta : Erlangga