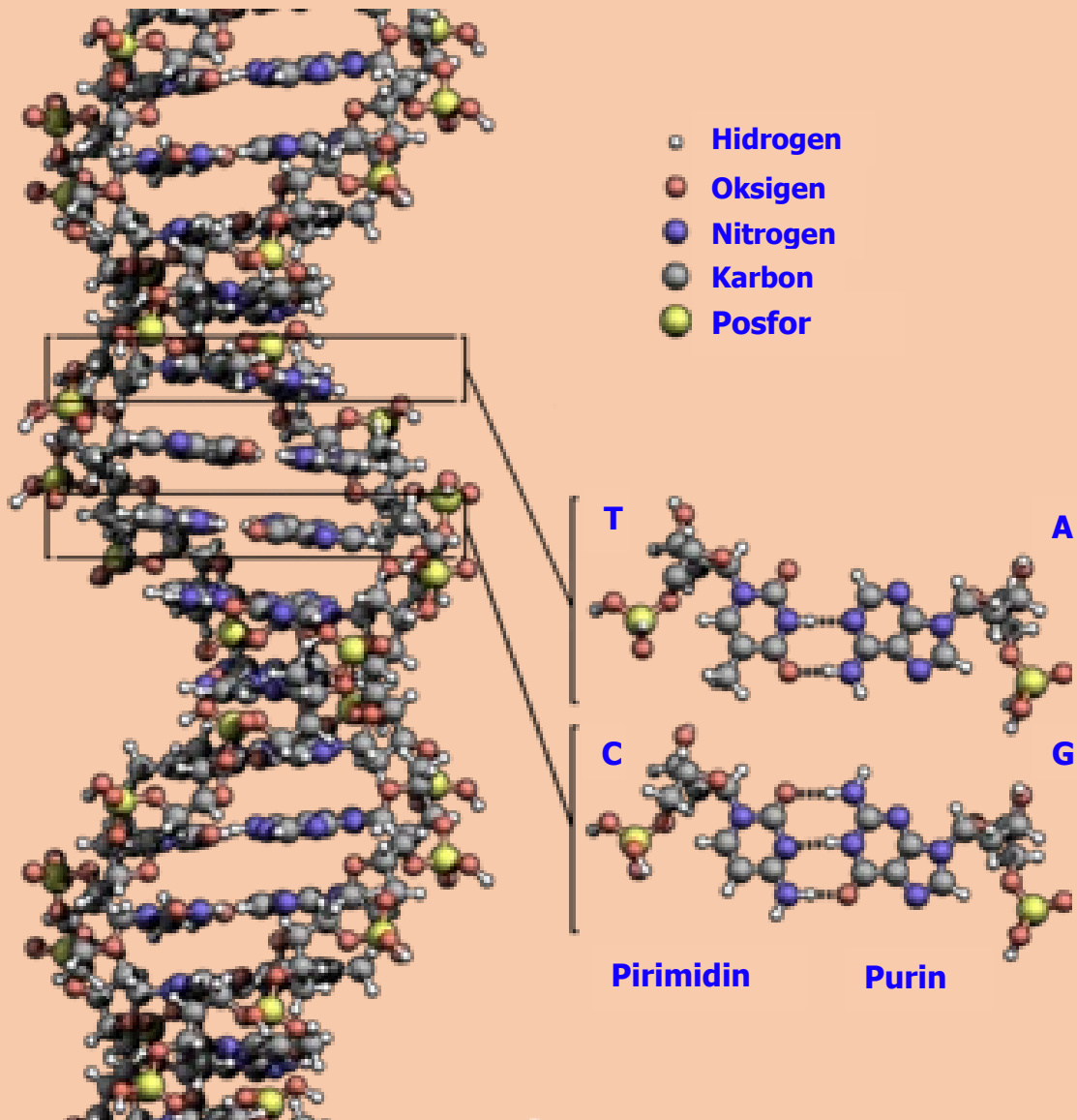


BUKU AJAR ASAM NUKLEAT

BERBASIS KONSTRUKTIVISME 5 FASE NEEDHAM



Disusun Oleh:
Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D
Dr. Diah Kartika Sari, M.Si

Buku Ajar Asam Nukleat
Berbasis Konstruktivisme 5 Fhase Needham
copyright © Agustus 2022

Penulis : Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D
Dr. Diah Kartika Sari, M.Si
Setting Dan Layout : Ardatia Murty
Desain Cover : Sri Antika

Hak Penerbitan ada pada © Bening media Publishing 2022
Anggota IKAPI No. 019/SMS/20

Hakcipta © 2022 pada penulis
Isi diluar tanggung jawab percetakan

Ukuran 21 cm x 29,7 cm
Halaman : vi + 271 hlm

Hak cipta dilindungi Undang-undang
Dilarang mengutip, memperbanyak dan menerjemahkan sebagian atau seluruh
isi buku ini tanpa izin tertulis dari Bening media Publishing

Cetakan I, Agustus 2022



Jl. Padat Karya
Palembang – Indonesia
Telp. 0823 7200 8910
E-mail : bening.mediapublishing@gmail.com
Website: www.bening-mediapublishing.com

ISBN : 978-623-5854-88-5

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu Wata'ala senantiasa kami ucapkan, atas rahmat dan karunia-Nya yang berupa iman dan kesehatan akhirnya kami dapat menyelesaikan buku ajar Asam Nukleat berbasis Kostruktivisme Lima Fhasa Needham. Buku Ajar Asam Nukleat merupakan materi perkuliahan Biokimia 2 Pelaksanaan proses pembelajarannya dapat dilakukan baik secara luring maupun daring dengan melakukan beberapa inovasi, sehingga mahasiswa memperoleh pengalaman belajar yang kontekstual. Walaupun dilakukan secara daring proses pembelajaran untuk meningkatkan kemampuan berpikir kreatif dan inovatif tetap terus dikembangkan dengan memperkaya pengalaman yang bermakna melalui persoalan pemecahan masalah.

Kimia sebagai produk merupakan pengetahuan kimia yang berupa fakta, konsep, hukum dan prinsip. Kimia sebagai proses berkaitan dengan bagaimana proses penemuan pengetahuan. Dengan demikian, apabila kimia disajikan secara utuh sebagai produk, proses dan sikap, maka akan dihasilkan mahasiswa yang terampil dalam berpikir tingkat tinggi. Berpikir tingkat tinggi adalah salah satu kemampuan yang harus dimiliki mahasiswa sebagai bekal untuk menghadapi perkembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (IPTEK). Proses berpikir tingkat tinggi mahasiswa seperti berpikir kritis, kreatif dan inovatif terus dikembangkan agar mampu bersaing di era digital. Mahasiswa saat ini merupakan era *digital natives* yaitu generasi yang lahir pada era digital, lebih banyak di dalam kehidupannya mengisi dengan menggunakan komputer, dan berbagai macam perangkat yang diproduksi di abad digital. Generasi *digital natives* menganggap perangkat komunikasi sebagai bagian integral dari kehidupan yang tidak dapat dipisahkan dengan teknologi. Pengembangan inovasi pembelajaran yang berbasis digital sudah menjadi kebutuhan untuk berlangsungnya proses pembelajaran.

Pada proses pembelajaran biokimia 2 mahasiswa diminta untuk merencanakan, merancang dan melaksanakan proyek yang berhubungan dengan materi perkuliahan. Materi perkuliahan tersebut dihubungkan dengan permasalahan

kehidupan sehari-hari yang ada pada lingkungan daerahnya masing-masing. Kemudian mahasiswa menyelesaikan dan membahas permasalahan tersebut, sehingga dapat menguji hipotesis mereka sendiri. Data hasil proyek yang telah dilakukan digunakan sebagai bahan diskusi untuk memperoleh suatu kesimpulan melalui elaborasi baik secara luring maupun daring. Selanjutnya mahasiswa membuat laporan hasil proyek, dan mensubmit ke Link yang sudah di tentukan. Mahasiswa dalam melaksanakan proyek diharapkan dapat mematuhi standar operasional prosedur yang telah ditetapkan. Dengan demikian diharapkan proses pelaksanaan pembelajaran biokimia 2 dapat berjalan lancar, tertib, aman dan terkendali. Akhirnya kami pengampu mata kuliah biokimia 2 mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung serta membantu dalam kegiatan dari persiapan sampai selesainya penyusunan buku ini.

Palembang, Agustus 2022,
Penulis,

Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D

Dr. Diah Kartika Sari, M.Si

DAFTAR ISI

1. Kata Pengantar	iii
2. Daftar Isi	v
3. BAB 19 ASAM NUKLEAT	1
A. Sejarah Perkembangan DNA	1
B. Struktur DNA	10
C. Sifat Heliks DNA	17
1) Struktur heliks tangan kanan	19
2) Struktur heliks Z kiri	21
3) Fungsi Biologi ADNA	22
4) Fungsi Biologi ZDNA	22
5) Fungsi Biologi BDNA	23
6) Struktur Palindrom	23
D. Replikasi DNA	27
E. Polimarase Chain Reaction	40
F. DNA materi Genetik	44
4. BAB 20 EKSPRESI GENETIK	53
A. Gen	53
B. Kromosom	59
C. Kode Genetik	66
D. Transkripsi	68
E. Translasi	74
5. BAB 21 MUTAGENESIS	98
A. Mutagen	99
B. Mutasi Gen	100
1) Mutasi Subtitusi	102
2) Mutasi Inversi	103

3) Mutasi Adisi	103
4) Mutasi Delisi	103
C. Mutasi Kromosom	105
1) Mutasi akibat perubahan jumlah kromosom	106
2) Mutasi akibat perubahan struktur kromosom	108
D. Dampak Mutasi	112
1) Kelainan Kromosom	112
2) Gangguan Monogenik	115
3) Gangguan Poligenik	120
E. Terapi Gen	123
6. BAB 22 ENZIM RESTRIKSI DAN VEKTOR	129
A. Enzim Restriksi	129
B. Vektor	142
1) Vektor Plasmid	142
2) Vektor Fhaga	147
3) Vektor cosmid	150
4) Vektor artificial kromosom	152
7. BAB 23 KOLNING GEN	157
A. Bahan Dasar Kloning	157
B. Langkah-langkah Kloning	158
1) Persiapan DNA total	158
2) Persiapan DNA Plasmid	162
3) Pembentukan DNA Rekombinan	163
4) Transformasi	166
5) Seleksi Rekombinan	169
8. BAB 24 SEKUENSING	182
A. Sekuensing DNA Maxam–Gilber	184
B. Sekuensing DNA Sanger	185
C. Sekuensing DNA otomatis	188

D. Sekuensing Genom	190
E. Analisis Homologi	192
F. Regulasi Ekspresi Kromosom	195
G. Mengidentifikasi dan Studi Produk dari Gen Kloning	205
9. BAB 25 APLIKASI TEKNOLOGI DNA	213
A. Aplikasi Dalam Pengobatan	213
B. Aplikasi dalam ilmu Forensik	215
1) Analisis DNA dalam Identifikasi Tersangka Kejahatan	216
2) Sidik Jari Genetik	217
3) Profil DNA dengan PCR dari Pengulangan Tamdem Pendek	224
4) Kekerabatan dengan Pembuatan Profil DNA	225
C. Aplikasi bidang Pertanian	225
1) Tanaman Rekayasa Genetika	226
2) Pengembangan Tanaman Transgenik	227
a) Transformasi Biolistik	230
b) Transformasi yang dimediasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	231
c) Masa depan tanaman Rekayasa Genetika	234
SINGKATAN UMUM	251
RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER	256

BAB 19 ASAM NUKLEAT

1. ORIENTASI

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah yang direncanakan adalah Mahasiswa menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah (CPMK-3), sedangkan kemampuan akhir pada pokok bahasan ini mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi DNA pada makhluk hidup (Sub-CPMK3). Pengalaman belajar yang diperoleh mahasiswa merencanakan, melaksanakan dan melaporkan proyek, presentasi tugas kelompok, mengerjakan lembar kerja mahasiswa, membuat dan mensubmit Laporan di <https://elearning.unsri.ac.id>

A. SEJARAH PERKEMBANGAN DNA

Asam deoksiribonukleat atau DNA adalah polimer nukleotida yang mengandung informasi genetik. Pada molekul DNA mengandung instruksi suatu organisme seperti untuk sintesis protein, pertumbuhan sel, dan bereproduksi. Asam deoksiribonukleat pertama kali diamati oleh seorang ahli biokimia Jerman bernama Frederich Miescher pada tahun 1869. Meskipun hanya sedikit orang yang menyadarinya, tahun 1869 adalah tahun yang penting dalam penelitian genetik, karena tahun itu adalah tahun di mana Friedrich Miescher pertama kali mengidentifikasi apa yang disebutnya "nuklein" di dalam inti sel darah putih manusia. (Istilah "nuklein" kemudian diubah menjadi "asam nukleat" dan akhirnya menjadi "asam deoksiribonukleat," atau "DNA.") Rencana Miescher adalah untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bukan nuklein (yang pada saat itu tidak disadari oleh siapa pun) melainkan komponen protein leukosit (sel darah putih). Oleh karena itu, Miescher mengatur agar klinik bedah setempat mengiriminya perban pasien bekas pakai nanah; begitu dia menerima perban, dia berencana untuk mencucinya, menyaring leukosit, mengekstrak dan mengidentifikasi berbagai protein di dalam sel darah putih. Tetapi ketika dia menemukan zat dari inti sel yang memiliki sifat kimia tidak seperti protein, termasuk kandungan fosfor yang jauh lebih tinggi dan

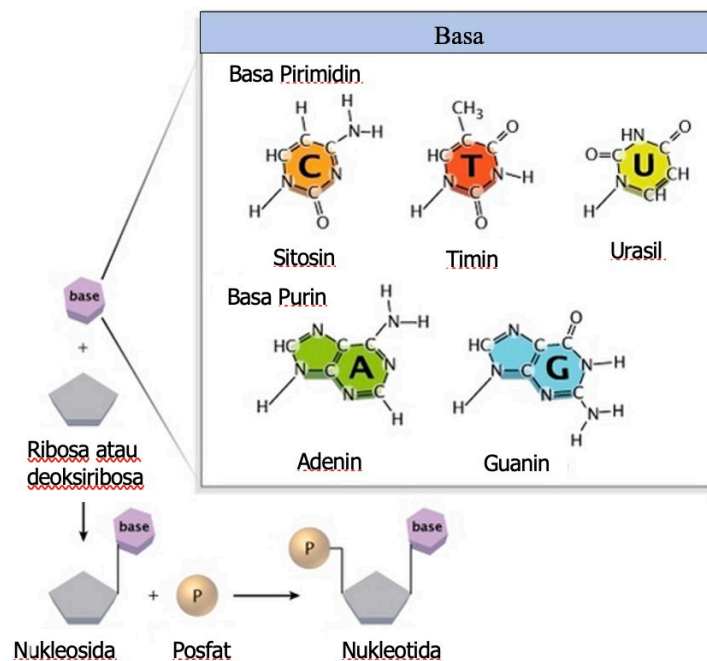
ketahanan terhadap proteolisis (pemutusan protein), Miescher menyadari bahwa dia telah menemukan zat baru. Merasakan pentingnya temuannya, Miescher menulis, "Tampaknya bagi saya bahwa seluruh keluarga dari zat yang mengandung fosfor yang sedikit berbeda akan muncul sebagai sekelompok nuklein, setara dengan protein".

Lebih dari 50 tahun berlalu sebelum pentingnya penemuan asam nukleat, Miescher dihargai secara luas oleh komunitas ilmiah. Menurut Chargaff, penemuan asam nukleat Miescher adalah unik di antara penemuan empat komponen seluler utama yaitu, protein, lipid, polisakarida, dan asam nukleat. Sementara itu, bahkan ketika nama Miescher menjadi tidak jelas pada abad kedua puluh, ilmuwan lain terus menyelidiki sifat kimia dari molekul yang sebelumnya dikenal sebagai nuklein. Salah satu ilmuwan lainnya adalah ahli biokimia Rusia Phoebus Levene. Seorang dokter menjadi ahli kimia, Levene adalah seorang peneliti yang produktif, menerbitkan lebih dari 700 makalah tentang molekul kimia biologis selama karirnya. Levene dikenal dengan banyak pengalaman pertama. Misalnya, dia adalah orang pertama yang menemukan urutan tiga komponen utama nukleotida tunggal (basa-fosfat-gula); yang pertama menemukan komponen karbohidrat RNA (ribosa); yang pertama menemukan komponen karbohidrat DNA (deoxyribose); dan yang pertama dengan benar mengidentifikasi cara molekul RNA dan DNA disatukan.

Selama tahun-tahun awal karir Levene, baik Levene maupun ilmuwan lain pada saat itu tidak mengetahui bagaimana komponen nukleotida DNA individu diatur dalam ruang; penemuan tulang punggung gula-fosfat dari molekul DNA masih bertahun-tahun lagi. Banyaknya gugus molekul yang tersedia untuk diikat oleh setiap komponen nukleotida berarti bahwa ada banyak cara alternatif agar komponen dapat bergabung. Beberapa ilmuwan mengajukan saran bagaimana ini bisa terjadi, tetapi model "polinukleotida" Levenelah yang terbukti benar. Berdasarkan tahun kerja menggunakan hidrolisis untuk memecah dan menganalisis asam nukleat ragi, Levene mengusulkan bahwa asam nukleat terdiri dari serangkaian nukleotida, dan bahwa setiap nukleotida pada gilirannya terdiri dari hanya satu dari empat basa yang mengandung nitrogen, molekul gula, dan gugus fosfat. Levene membuat proposal

awalnya pada tahun 1919, mendiskreditkan saran lain yang telah diajukan tentang struktur asam nukleat. Dalam kata-kata Levene sendiri, "Fakta baru dan bukti baru dapat menyebabkan perubahannya, tetapi tidak ada keraguan mengenai struktur polinukleotida asam nukleat ragi".

Memang, banyak fakta baru dan banyak bukti baru segera muncul dan menyebabkan perubahan pada proposal Levene. Salah satu penemuan kunci selama periode ini melibatkan cara nukleotida dipesan. Levene mengusulkan apa yang dia sebut struktur tetranukleotida, di mana nukleotida selalu terhubung dalam urutan yang sama (yaitu, G-C-T-A-G-C-T-A dan seterusnya).



Gambar 1 Struktur Nukleotida

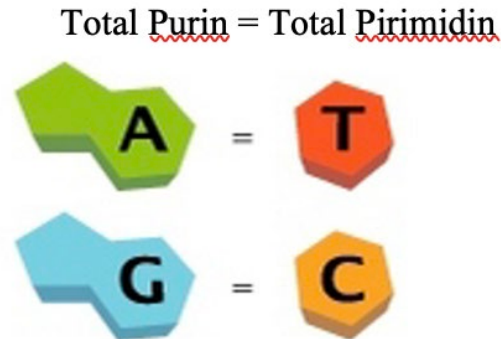
Namun, para ilmuwan akhirnya menyadari bahwa struktur tetranukleotida yang diusulkan Levene terlalu sederhana dan bahwa urutan nukleotida di sepanjang bentangan DNA (atau RNA), pada kenyataannya, sangat bervariasi. Meskipun realisasi ini, struktur polinukleotida yang diusulkan Levene akurat dalam banyak hal. Sebagai contoh, sekarang kita tahu bahwa DNA sebenarnya terdiri dari serangkaian nukleotida dan setiap nukleotida memiliki tiga komponen: gugus fosfat; gula ribosa (dalam kasus RNA) atau deoksiribosa (dalam kasus DNA); dan basa tunggal yang mengandung nitrogen. Kita juga tahu bahwa ada dua kategori dasar basa nitrogen:

purin (adenin [A] dan guanin [G]), masing-masing dengan dua cincin yang menyatu, dan pirimidin (sitosin [C], timin [T], dan urasil [U]), masing-masing dengan satu cincin. Selanjutnya, sekarang diterima secara luas bahwa RNA hanya berisi A, G, C, dan U (tanpa T), sedangkan DNA hanya berisi A, G, C, dan T (tanpa U) (Lihat Gambar 1).

Erwin Chargaff adalah salah satu dari segelintir ilmuwan yang memperluas pekerjaan Levene dengan mengungkap detail tambahan dari struktur DNA, sehingga semakin membuka jalan bagi Watson dan Crick. Chargaff, seorang ahli biokimia Austria, telah membaca makalah terkenal tahun 1944 oleh Oswald Avery dan rekan-rekannya di Universitas Rockefeller, yang menunjukkan bahwa unit-unit herediter, atau gen, terdiri dari DNA. Makalah ini memiliki dampak besar pada Chargaff, menginspirasinya untuk meluncurkan program penelitian yang berkisar pada kimia asam nukleat. Dari karya Avery, Chargaff pada tahun 1971 menulis sebagai berikut: "Penemuan ini hampir secara tiba-tiba muncul sebagai pertanda kimiawi hereditas, dan memungkinkan karakter asam nukleat gen. Avery memberikan pengetahuan pertama tentang hal yang baru, atau lebih tepatnya dia menunjukkan kepada kita di mana mencarinya, oleh karena itu saya memutuskan untuk mencari hal ini." Sebagai langkah pertamanya dalam pencarian ini, Chargaff berangkat untuk melihat apakah ada perbedaan DNA di antara spesies yang berbeda. Setelah mengembangkan metode kromatografi kertas untuk memisahkan dan mengidentifikasi sejumlah kecil bahan organik, Chargaff mencapai dua kesimpulan utama.

Pertama, ia mencatat bahwa komposisi nukleotida DNA bervariasi antar spesies. Dengan kata lain, nukleotida yang sama tidak berulang dalam urutan yang sama, seperti yang diusulkan oleh Levene. Kedua, Chargaff menyimpulkan bahwa hampir semua DNA apapun organisme atau jenis jaringannya mempertahankan sifat-sifat tertentu, meskipun komposisinya bervariasi. Secara khusus, jumlah adenin (A) biasanya sama dengan jumlah timin (T), dan jumlah guanin (G) biasanya mendekati jumlah sitosin (C). Dengan kata lain, jumlah total purin (A + G) dan jumlah total pirimidin (C + T) biasanya hampir sama. (Kesimpulan utama kedua ini sekarang dikenal sebagai "aturan Chargaff.") Penelitian Chargaff sangat penting untuk karya Watson dan Crick selanjutnya, tetapi Chargaff sendiri tidak dapat membayangkan

penjelasan tentang hubungan ini khususnya, bahwa A terikat pada T dan C terikat pada G dalam struktur molekul DNA (Gambar 2).

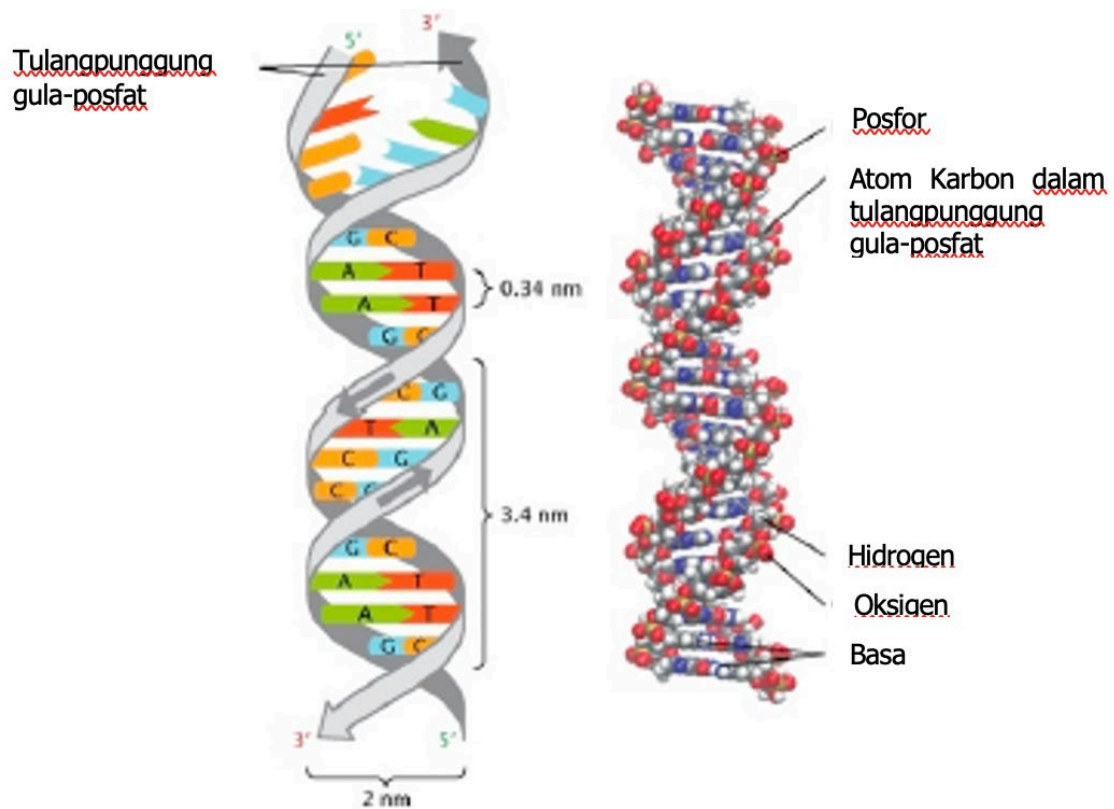


Gambar 2 Aturan Chargaff

Hasil penelitian Chargaff bahwa $A = T$ dan $C = G$, dikombinasikan dengan beberapa karya kristalografi sinar-X yang sangat penting oleh peneliti Inggris Rosalind Franklin dan Maurice Wilkins, berkontribusi pada derivasi Watson dan Crick tentang model heliks ganda tiga dimensi untuk struktur DNA. Penemuan Watson dan Crick juga dimungkinkan oleh kemajuan terbaru dalam pembuatan model, atau perakitan struktur tiga dimensi yang mungkin berdasarkan jarak molekul dan sudut ikatan yang diketahui, sebuah teknik yang dikembangkan oleh ahli biokimia Amerika Linus Pauling. Faktanya, Watson dan Crick khawatir bahwa mereka akan "disekop" oleh Pauling, yang mengusulkan model berbeda untuk struktur tiga dimensi DNA hanya beberapa bulan sebelum mereka melakukannya. Pada akhirnya, bagaimanapun, Prediksi Pauling salah.

Menggunakan potongan karton yang mewakili komponen kimia individu dari empat basa dan subunit nukleotida lainnya, Watson dan Crick menggeser molekul di sekitar desktop mereka, seolah-olah menyusun teka-teki. Mereka disesatkan untuk sementara waktu oleh pemahaman yang salah tentang bagaimana unsur-unsur yang berbeda dalam timin dan guanin (khususnya, cincin karbon, nitrogen, hidrogen, dan oksigen) dikonfigurasi. Hanya atas saran ilmuwan Amerika Jerry Donohue, Watson memutuskan untuk membuat potongan karton baru dari dua basa, untuk melihat apakah mungkin konfigurasi atom yang berbeda akan membuat perbedaan. Hal itu

ternyata benar. Hanya basa komplementer yang cocok bersama dengan sempurna (yaitu, A dengan T dan C dengan G), dengan masing-masing pasangan diikat oleh ikatan hidrogen, tetapi strukturnya juga mencerminkan aturan Chargaff (Gambar 3).



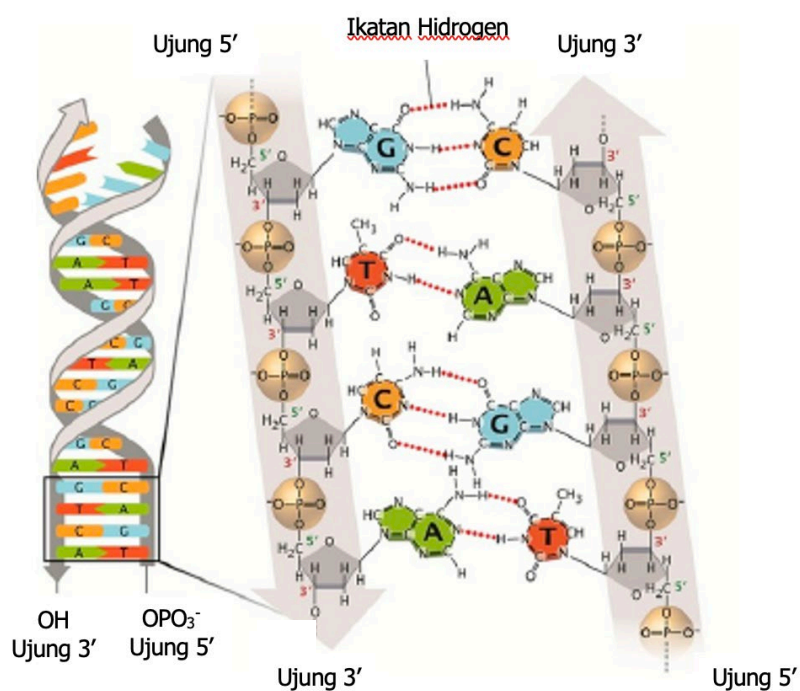
Gambar 3: Struktur heliks ganda DNA.

Struktur heliks ganda 3-dimensi DNA, dijelaskan dengan benar oleh James Watson dan Francis Crick. Basa komplementer disatukan sebagai pasangan oleh ikatan hidrogen.

Meskipun para ilmuwan telah membuat beberapa perubahan kecil pada model Watson dan Crick, atau telah menguraikannya, sejak dimulainya pada tahun 1953, empat fitur utama model tersebut tetap sama hingga hari ini. Fitur-fitur ini adalah sebagai berikut: DNA adalah heliks untai ganda, dengan dua untai dihubungkan oleh ikatan hidrogen. Basa A selalu berpasangan dengan T, dan C selalu berpasangan dengan G, yang konsisten dengan aturan Chargaff.

Kebanyakan heliks ganda DNA tidak kidal; Jika Anda mengulurkan tangan kanan Anda, dengan ibu jari menunjuk ke atas dan jari-jari anda melingkari ibu jari anda, ibu jari anda akan mewakili sumbu heliks dan jari-jari anda akan mewakili tulang punggung gula-fosfat, akan membentuk satu jenis DNA, yang disebut Z-DNA,

yang kidal. Heliks ganda DNA adalah anti paralel, yang berarti bahwa ujung 5' dari satu untai dipasangkan dengan ujung 3' dari untai komplementernya (dan sebaliknya). Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4, nukleotida dihubungkan satu sama lain oleh gugus fosfatnya, yang mengikat ujung 3' dari satu gula ke ujung 5' dari gula berikutnya. Tidak hanya pasangan basa DNA yang terhubung melalui ikatan hidrogen, tetapi tepi luar basa yang mengandung nitrogen terbuka dan tersedia untuk ikatan hidrogen juga. Ikatan hidrogen ini memberikan akses mudah ke DNA untuk molekul lain, termasuk protein yang memainkan peran penting dalam replikasi dan ekspresi DNA (Gambar 4).

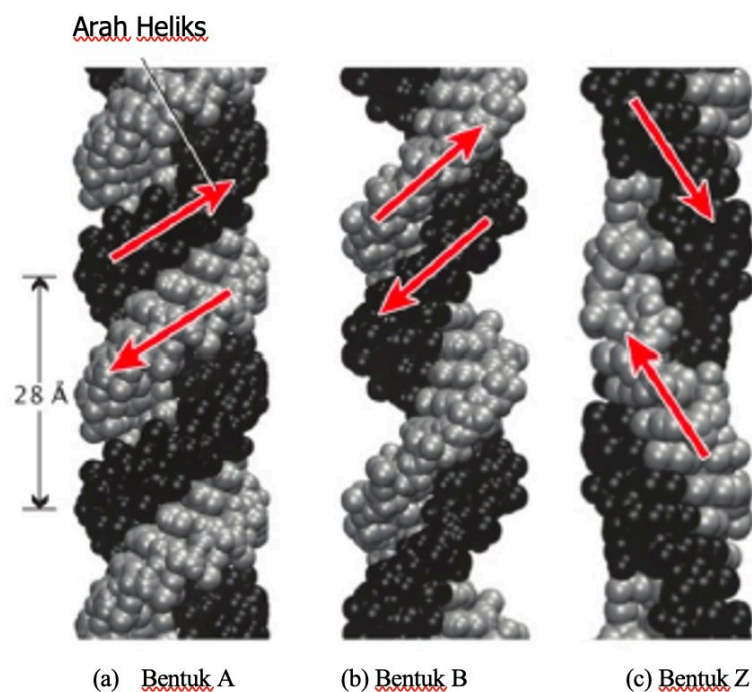


Gambar 4: Pasangan basa dalam DNA.

Dua ikatan hidrogen menghubungkan T ke A; tiga ikatan hidrogen menghubungkan G ke C. Tulang punggung gula-fosfat (abu-abu) berjalan anti-paralel satu sama lain, sehingga ujung 3' dan 5' dari dua untai sejajar.

Salah satu cara para ilmuwan telah menguraikan model Watson dan Crick adalah melalui identifikasi tiga konformasi berbeda dari heliks ganda DNA. Dengan kata lain, geometri dan dimensi yang tepat dari heliks ganda dapat bervariasi. Konformasi yang paling umum di sebagian besar sel hidup (yang digambarkan dalam sebagian besar diagram heliks ganda, dan yang diusulkan oleh Watson dan Crick)

dikenal sebagai B-DNA. Ada juga dua konformasi lain: A-DNA, bentuk yang lebih pendek dan lebih lebar yang telah ditemukan dalam sampel DNA yang mengalami dehidrasi dan jarang dalam keadaan fisiologis normal; dan Z-DNA, konformasi kidal. Z-DNA adalah bentuk DNA sementara, hanya kadang-kadang ada sebagai respons terhadap jenis aktivitas biologis tertentu (Gambar 5). Z-DNA pertama kali ditemukan pada tahun 1979, tetapi keberadaannya sebagian besar diabaikan hingga saat ini. Sejak itu para ilmuwan telah menemukan bahwa protein tertentu mengikat sangat kuat ke Z-DNA, menunjukkan bahwa Z-DNA memainkan peran biologis penting dalam perlindungan terhadap penyakit virus.



Gambar 5: Tiga konformasi berbeda dari heliks ganda DNA. (A) A-DNA adalah heliks tangan kanan yang pendek, lebar. (B) B-DNA, struktur yang diusulkan oleh Watson dan Crick, adalah konformasi yang paling umum di sebagian besar sel hidup. (C) Z-DNA, tidak seperti A- dan B-DNA, adalah heliks tangan kiri.

Keberhasilan James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins dan Rosalind Franklin pada tahun 1953 menemukan struktur DNA heliks ganda yang mereka sadari dapat membawa informasi biologis. Watson, Crick dan Wilkins dianugerahi penghargaan nobel bidang kedokteran pada tahun 1962 atas penemuan mereka

mengenai struktur molekul asam nukleat dan signifikansinya untuk transfer informasi dalam materi hidup.

Beberapa Tonggak Sejarah dalam Riset DNA adalah sebagai berikut:

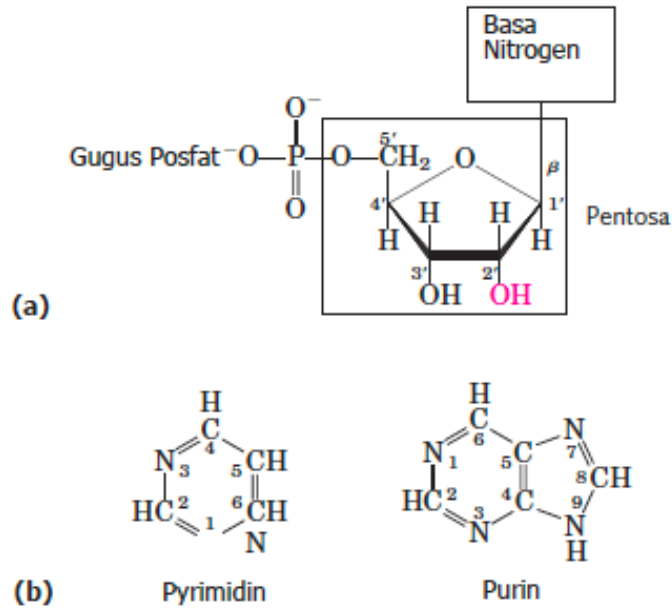
- 1868 DNA "Saga" dimulai ketika ahli biokimia Swiss Miescher mengisolasi Nuclein
- 1910 Levene mengemukakan Hipotesis Tetranukleotida
- 1928 Griffith mengemukakan Prinsip Transformasi
- 1944 Avery, MacLeod & McCarty mengemukakan DNA adalah Prinsip Transformasi

- 1950 Aturan Chargaff - $A=T$, $G=C$
- 1952 Hershey & Chase mengemukakan Eksperimen Blender
- 1953 James Watson, Francis Crick mengemukakan DNA mempunyai struktur double helix.
- 1958 Penemuan enzim DNA polymerase.
- 1961 Teori operon dan kontrol ekspresi gen. Triplet basa: satu kode genetik (kodon).
- 1966 Seluruh kode genetik DNA ditemukan.
- 1970 Penemuan enzim reverse transcriptase, Penemuan metoda transfer 'DNA asing, Penemuan enzim restriksi: restriksi (tipe II)
- 1972 DNA rekombinan melalui enzim ligase
- 1973 DNA rekombinan berfungsi, melalui transformasi sel inang
- 1975 Penemuan teknik sekuensing nukleotida
- 1985 Penemuan teknik Polimerase chain Reaction (PCR)
- 1990 Proyek Human Genome dimulai

B. STRUKTUR DNA.

DNA terdiri dari molekul yang disebut nukleotida. Setiap nukleotida mengandung gugus fosfat, gugus gula, dan basa nitrogen. Empat jenis basa nitrogen adalah adenin (A), timin (T), guanin (G) dan sitosin (C). DNA terdiri atas dua rantai polinukleotida yang saling berpilin (double helix). Double helix (dua pita yang berpilin) saling terikat melalui ikatan hidrogen di antara masing-masing pasangan basanya. 'Keadaan saling berpasangan' (complementary nature) bagi DNA merupakan inti kapasitas untuk replikasi diri (self-replication). Pasangan G-C lebih sulit terpisah dibandingkan dengan pasangan A-T. DNA memiliki struktur yang teratur, orientasinya lebar, lebar antara nukleotida, panjang dan jumlah nukleotida per putaran heliks adalah konstan. Semua fitur ini dijelaskan oleh Watson dan Crick. Adenin selalu berpasangan dengan timin, dan sitosin selalu berpasangan dengan guanin. Kedua untai tersebut disatukan oleh ikatan hidrogen: dua ikatan antara adenin dan timin dan tiga ikatan antara guanin dan sitosin.

Urutan asam amino dari setiap protein dalam sel, dan urutan nukleotida setiap RNA, ditentukan oleh urutan nukleotida dalam DNA sel. Segmen molekul DNA yang berisi informasi yang diperlukan untuk sintesis produk biologis fungsional, apakah protein atau RNA, disebut sebagai gen. Sebuah sel biasanya memiliki ribuan gen, dan molekul DNA, tidak mengherankan cenderung sangat besar. Penyimpanan dan transmisi informasi biologis adalah satu-satunya fungsi DNA yang diketahui. Nukleotida memiliki tiga komponen karakteristik: (1) basa nitrogen (mengandung nitrogen), (2) pentosa, dan (3) satu atau lebih fosfat. Molekul tanpa gugus fosfat disebut nukleosida. Basa nitrogen adalah turunan dari dua senyawa induk, pirimidin dan purin. Basa dan pentosa dari nukleotida umumnya adalah senyawa heterosiklik.

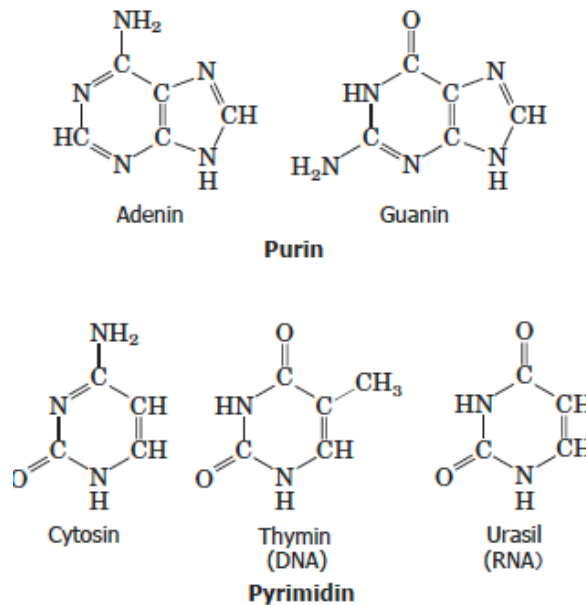


Gambar 6 Struktur nukleotida.

Pada gambar 6 di atas (a) Struktur umum yang menunjukkan konvensi penomoran untuk cincin pentose, ini adalah ribonukleotida. Dalam deoksiribonukleotida, gugus OH pada karbon 2 (berwarna merah) diganti dengan H. (b) Senyawa induk dari basa pirimidin dan purin dari nukleotida dan asam nukleat, menunjukkan konvensi penomoran.

Atom karbon dan nitrogen dalam struktur induk secara konvensional diberi nomor untuk memudahkan penamaan dan identifikasi banyak senyawa turunan. Basa nukleotida bergabung secara kovalen (pada N-1 pirimidin dan N-9 purin) dalam ikatan N- β -glikosil dengan ujung 1' karbon pentosa, dan fosfat diesterifikasi pada 5' karbon. Ikatan N- β -glikosil dibentuk dengan menghilangkan unsur-unsur air (gugus hidroksil dari pentosa dan hidrogen dari basa), seperti dalam pembentukan ikatan O-glikosidik. Baik DNA dan RNA mengandung dua basa purin utama, adenin (A) dan guanin (G), dan dua pirimidin utama. Dalam DNA dan RNA, salah satu pirimidin adalah sitosin (C), tetapi pirimidin umum kedua tidak sama di keduanya yaitu timin (T) dalam DNA dan urasil (U) dalam RNA. Hanya kadang-kadang timin terjadi pada RNA atau urasil dalam DNA. Struktur lima basa utama ditunjukkan pada Gambar 7 dibawah ini.

Asam nukleat memiliki dua jenis pentose yaitu unit deoksiribonukleotida (DNA) berulang mengandung 2-deoksi-D-ribosa, dan unit ribonukleotida (RNA) mengandung D-ribosa. Dalam nukleotida, kedua jenis pentosa berada dalam bentuk furanosa (cincin beranggota lima tertutup).

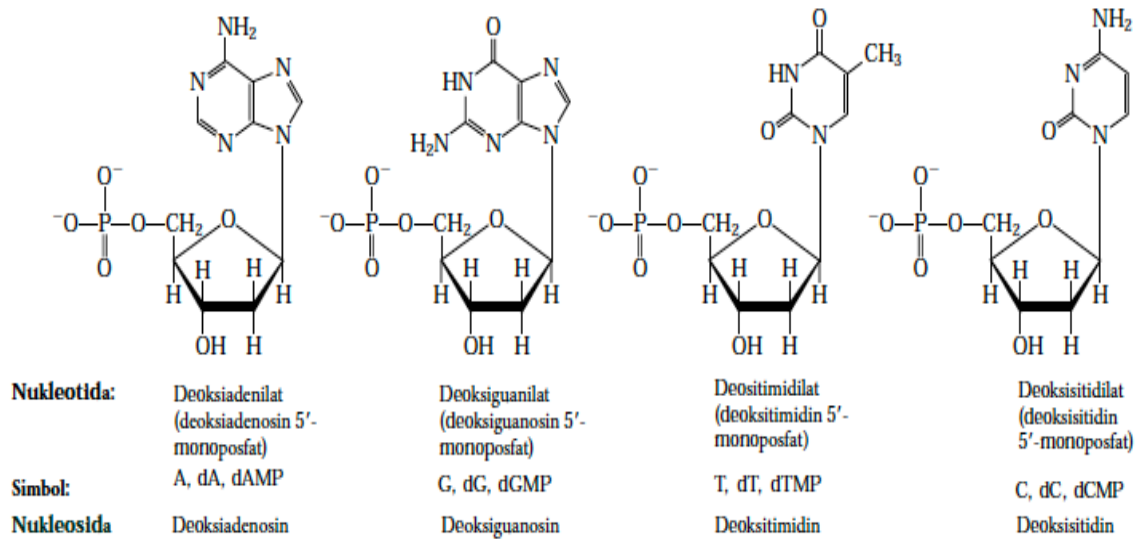


Gambar 7 Basa purin dan pirimidin

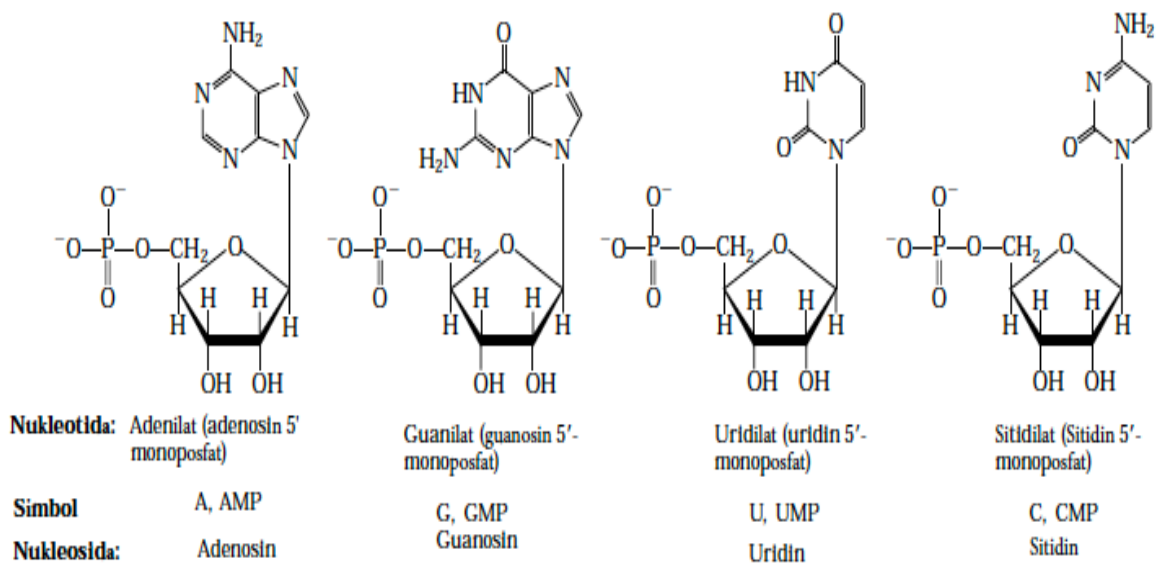
Pada gambar 7 di atas basa purin dan pirimidin utama dari asam nukleat. Beberapa nama umum dari pasangan ini mencerminkan keadaan penemuan mereka. Guanin, misalnya, pertama kali diisolasi dari guano (kotoran burung), dan timin pertama kali diisolasi dari jaringan timus.

Pada gambar 8 dan 9 dibawah ini memberikan struktur dan nama dari empat deoksiribonukleotida utama (deoksiribonukleosida 5-monofosfat), unit struktural DNA, dan empat ribonukleotida utama (ribonukleosida 5-monophosphates), unit struktural dari RNA. Nukleotida baik DNA maupun RNA berpolimesrisasi secara kovalen melalui ikatan posfodiester, di mana gugus 5-fosfat dari satu unit nukleotida bergabung dengan gugus 3-hidroksil dari nukleotida berikutnya. Jadi tulang punggung kovalen asam nukleat terdiri dari residu fosfat dan gula pentosa, dan basa nitrogen dapat dianggap sebagai kelompok samping yang bergabung dengan tulang punggung secara berkala.

Tulang punggung DNA dan RNA bersifat hidrofilik, yaitu gugus hidroksil dari residu gula membentuk ikatan hidrogen dengan air. Gugus fosfat, dengan pKa mendekati 0, sepenuhnya terionisasi dan bermuatan negatif pada pH 7, dan muatan negatif umumnya dinetralkan oleh interaksi ionik dengan muatan positif pada protein, ion logam, dan poliamina.

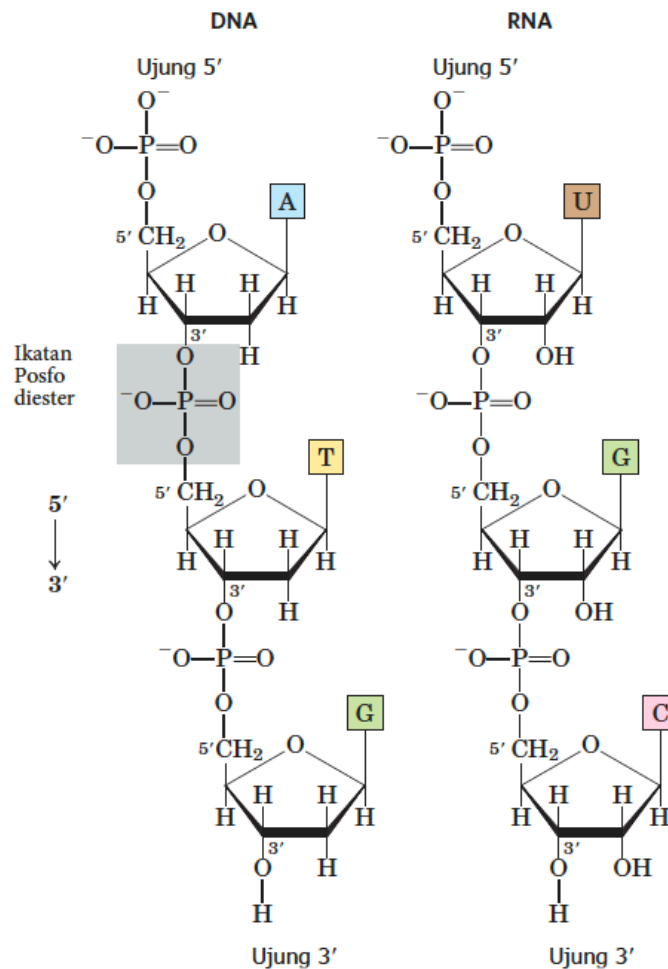


Gambar 8 Deoksiribonukleotida



Gambar 9 Ribonukleotida

Semua ikatan fosfodiester dalam DNA dan RNA memiliki orientasi yang sama di sepanjang rantai, memberikan setiap untai asam nukleat linier polaritas spesifik dan ujung 5' dan 3' yang berbeda. Orientasi 5' ke 3' untai asam nukleat mengacu pada ujung untai, bukan orientasi ikatan fosfodiester yang menghubungkan nukleotida penyusunnya.

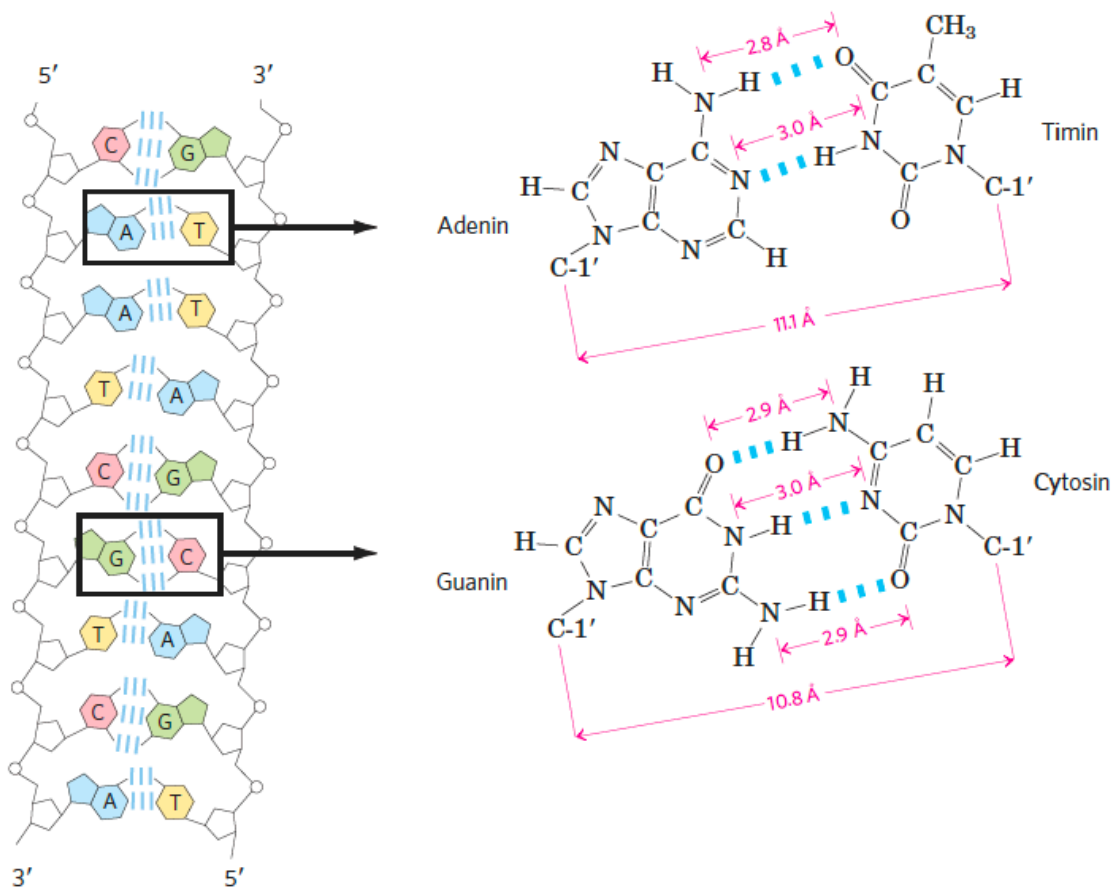


Gambar 10 ikatan fosfo diester

Ada alasan biologis untuk konvensi selalu menulis urutan DNA dalam arah 5' ke 3'. Sebagian karena struktur bahan awal (nukleotida 5' trifosfat), enzim di dalam sel yang menyalin DNA (misalnya DNA dan RNA polimerase) selalu mensintesis dalam arah 5' ke 3'. Untaian dalam DNA bersifat antiparalel; yaitu, mereka pergi ke arah yang berlawanan. Basa purin dan pirimidin bersifat hidrofobik dan relatif tidak larut dalam air pada pH sel yang mendekati netral. Pada pH asam atau basa basa menjadi bermuatan dan kelarutannya dalam air meningkat. Interaksi susun hidrofobik di mana dua atau lebih basa diposisikan dengan bidang cincinnya sejajar (seperti tumpukan

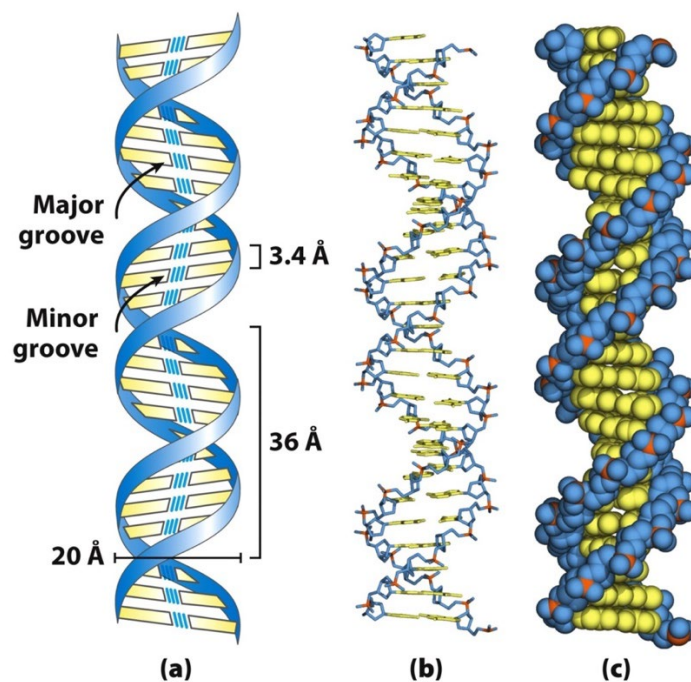
koin) adalah salah satu dari dua mode interaksi penting antara basa dalam asam nukleat. Penumpukan juga melibatkan kombinasi van der Waals dan interaksi dipol-dipol antara basa. Penumpukan basa membantu meminimalkan kontak basa dengan air, dan interaksi penumpukan basa sangat penting dalam menstabilkan struktur tiga dimensi asam nukleat.

Gugus fungsi pirimidin dan purin merupakan cincin nitrogen gugus karbonil, dan gugus amino eksosiklik. Ikatan hidrogen yang melibatkan gugus amino dan karbonil adalah cara paling penting dari interaksi antara dua (dan kadang-kadang tiga atau empat) untai asam nukleat komplementer. Pola ikatan hidrogen yang paling umum adalah yang didefinisikan oleh James D. Watson dan Francis Crick pada tahun 1953, di mana A berikatan secara khusus dengan T (atau U) dan G berikatan dengan C. Kedua jenis pasangan basa ini mendominasi DNA untai ganda dan RNA, dan tautomer yang ditunjukkan pada Gambar 11 di bawah ini.



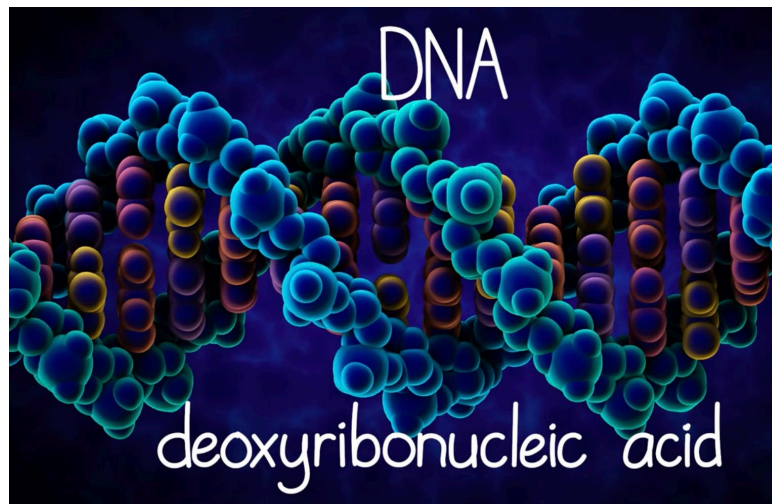
Gambar 11 Ikatan Hidrogen

Komposisi dasar DNA umumnya bervariasi dari satu spesies ke spesies lainnya. Spesimen DNA yang diisolasi dari jaringan berbeda dari spesies yang sama memiliki komposisi basa yang sama. Komposisi dasar DNA pada spesies tertentu tidak berubah dengan usia organisme, status nutrisi, atau perubahan lingkungan. Dalam semua DNA seluler, terlepas dari spesiesnya, jumlah residu adenosin sama dengan jumlah residu timidin (yaitu, $A = T$), dan jumlah residu guanosin sama dengan jumlah residu sitidin ($G \equiv C$). Dari hubungan ini dapat disimpulkan bahwa jumlah residu purin sama dengan jumlah residu pirimidin; yaitu, $A + G = T + C$. James Watson dan Francis Crick mengandalkan akumulasi informasi tentang DNA ini untuk mulai menyimpulkan strukturnya. Pada tahun 1953 mereka mendalilkan model tiga dimensi struktur DNA yang memperhitungkan semua data yang tersedia. Ini terdiri dari dua rantai DNA heliks yang dililitkan di sekitar sumbu yang sama untuk membentuk heliks ganda tangan kanan. Tulang punggung hidrofilik dari gugus deoksiribosa dan fosfat bergantian berada di luar heliks ganda, menghadap air di sekitarnya. Cincin furanosa dari setiap deoxyribosa berada dalam konformasi endo C-2'. Basa purin dan pirimidin dari kedua untai ditumpuk di dalam heliks ganda, dengan struktur cincin hidrofobik dan hampir planarnya sangat berdekatan dan tegak lurus terhadap sumbu panjang. Pasangan dari dua untai menciptakan *major groove* (alur utama) dan *minor groove* (alur kecil) pada permukaan dupleks.



Gambar 12 Model Watson-Crick untuk struktur DNA.

Gambar 12 di atas model asli yang diusulkan oleh Watson dan Crick memiliki 10 pasangan basa, atau 34°A (3,4 nm), per putaran heliks; pengukuran selanjutnya mengungkapkan 10,5 pasangan basa, atau 36°A (3,6 nm), per putaran. (a) Representasi skematis, menunjukkan dimensi heliks. (b) Representasi tongkat yang menunjukkan tulang punggung dan susunan alas. (c) Model pengisi ruang. Adapun penjelasan animasi tentang struktur DNA dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.

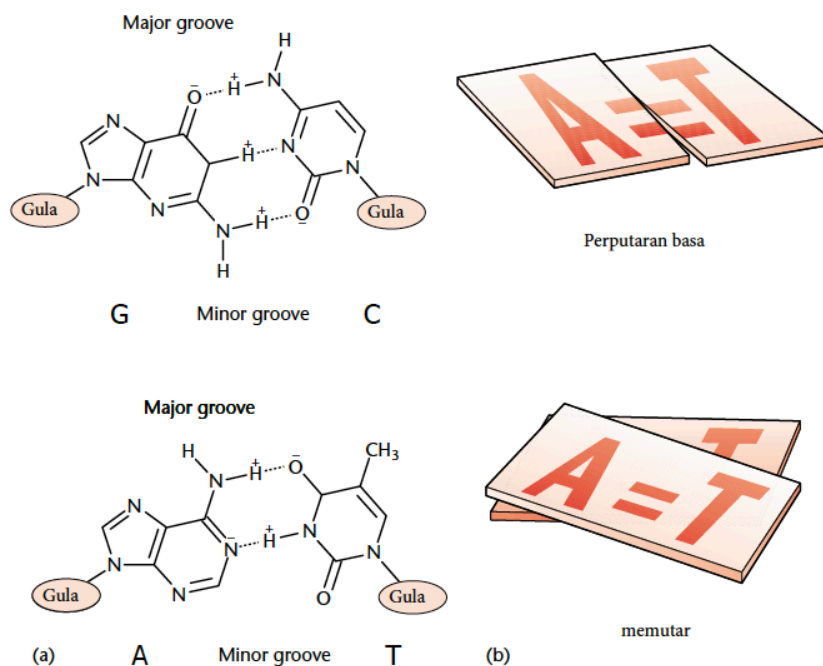


Gambar 13 Struktur DNA
Sumber: https://youtu.be/o_-6JXLYS-k

C. SIFAT HELIKS DNA

Kecenderungan menuju heliks berasal dari penumpukan basa individu di atas satu sama lain. Baik gula dan fosfat yang merupakan tulang punggung cukup larut dalam air. Namun basa DNA yang berada di tengah heliks relatif hidrofobik dan tidak larut. Misalnya, seseorang dapat dengan mudah melarutkan lebih dari 500 g gula deoksiribosa dalam satu liter larutan, dan lebih dari 100 g fosfat juga akan mudah larut dalam volume yang sama. Hanya setengah dari satu gram adenin akan larut dalam satu liter air. Karena pada dasarnya basa menumpuk di atas satu sama lain untuk membentuk 'lingkungan mini' yang lebih hidrofobik. Basis memutar sedikit untuk memaksimalkan interaksi hidrofobiknya satu sama lain, dan lilitan basa bertumpuk inilah yang menimbulkan heliks. Molekul adenin bebas, dengan sendirinya, akan secara spontan menumpuk di atas dirinya sendiri untuk membentuk heliks untai tunggal dalam larutan! Jadi alasan heliks dalam DNA terutama karena interaksi penumpukan hidrofobik dari basa.

Alur utama B-DNA diberi label pada Gambar 12a. Istilah 'alur utama' (Major groove) dan 'alur kecil' (Minor groove) didasarkan pada dua alur struktur Watson-Crick B-DNA. Meskipun dimensi alur mayor dan minor berbeda untuk tiga famili heliks yang berbeda, dari sudut pandang basa, alur mayor selalu pada sisi yang sama untuk pasangan basa tertentu. Perhatikan bahwa gula (Gambar 12a) lebih dekat ke satu sisi pasangan basa daripada yang lain. Ada lebih sedikit ruang di sisi antara gula (sisi bawah pasangan basa pada Gambar 14). Konvensinya adalah bahwa sisi yang paling dekat dengan gula disebut sisi alur minor.



Gambar 14 Sifat basa DNA

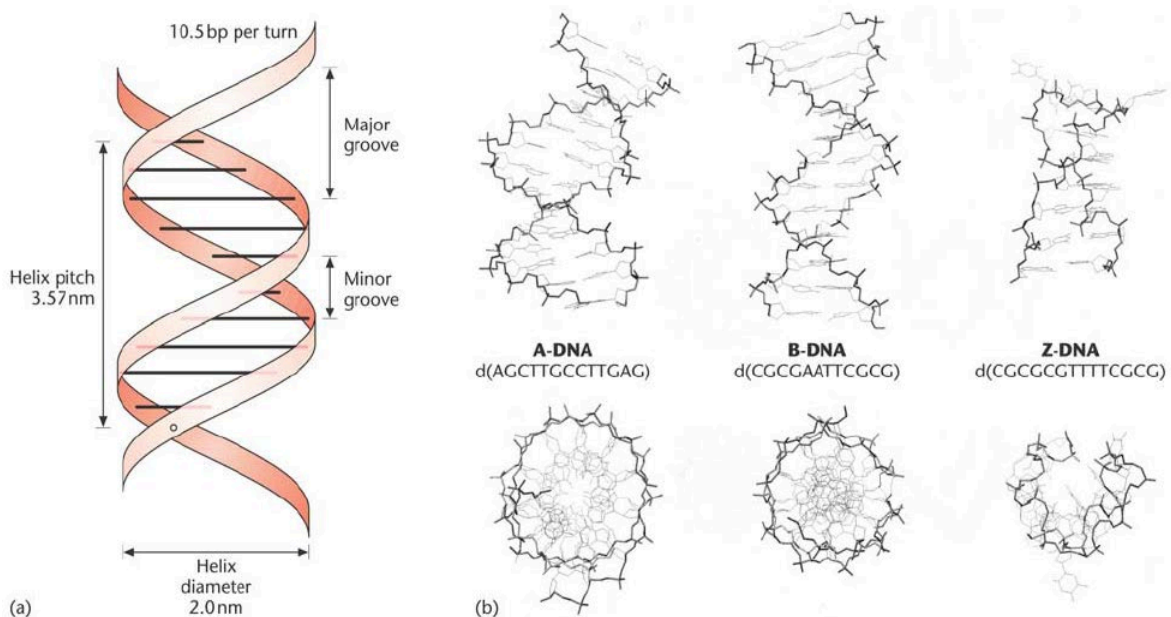
Untuk heliks B-DNA, ikatan protein di alur utama biasanya mengikat urutan yang spesifik, sering kali melalui penyisipan α heliks ke dalam alur utama. Selain itu, alur utama B-DNA kira-kira memiliki lebar yang cukup untuk menampung pasangan basa ketiga (biasanya pirimidin), seperti yang terjadi pada struktur DNA tripleks tertentu. Protein yang mengikat DNA secara nonspesifik (seperti protein kromatin) sering kali akan mengikat DNA pada protein alur kecil, melalui interaksi dengan untai protein b. Selain itu, molekul air dan ion kecil mengikat dan menstabilkan alur minor. Pada A-DNA, alur kecil berukuran hampir sama dengan alur utama, sedangkan pada Z-DNA, alur minor dalam dan sempit, dan alur mayor hampir tidak ada.

1) Struktur Heliks tangan kanan

a. Struktur A-DNA

DNA bentuk-A pertama kali diidentifikasi dari studi difraksi serat DNA pada kelembaban relatif 'rendah' (75%). Baru-baru ini, studi kristal telah mengidentifikasi urutan spesifik yang dapat mengadopsi jenis struktur A-DNA (Gambar 15b). Secara umum, A-DNA untuk sekuens apa pun disukai di bawah kondisi dehidrasi, dan peregangan purin tertentu akan mendukung konformasi-A, bahkan dalam kasus tingkat hidrasi yang lebih tinggi. Tampaknya setidaknya empat purin (atau pirimidin) berturut-turut cukup untuk membentuk heliks A-DNA lokal, meskipun tentu saja peregangan purin tertentu lebih cenderung membentuk A-DNA daripada yang lain. (Misalnya, urutan AAAA mengkristal sebagai B-DNA, bukan dalam heliks-A.) Dengan demikian, dimungkinkan untuk memiliki urutan DNA yang berisi beberapa daerah dalam bentuk-A dalam konteks terutama konformasi-B.

Heliks A-DNA sedikit lebih lebar dari B-DNA (dan juga Z-DNA), dan ini terutama disebabkan oleh fakta bahwa pasangan basa menumpuk hampir di atas satu sama lain dalam B-DNA, tetapi menumpuk sedikit di luar pusat dalam konformasi-A. Perhatikan pada Gambar 15b bahwa, jika anda melihat ke bawah heliks, ada lubang di konformasi A, yang tidak ada di dua konformasi heliks lainnya.



Gambar 15 Pandangan yang berbeda dari heliks DNA

Pada gambar 15 di atas (a) Struktur B-DNA seperti yang diusulkan oleh Watson dan Crick pada tahun 1953, berdasarkan studi difraksi serat. Dimodifikasi dari Sinden et al. (1998). (b) A-, B-dan Z-DNA, dilihat dari sisi heliks (atas), dan melihat ke bawah sumbu heliks (bawah). Struktur diambil dari struktur kristal, menggunakan program Cn3D, tersedia dari laman NCBI.



Gambar 16 Perbandingan bentuk A, B, dan Z DNA

Pada gambar 16 setiap struktur yang ditunjukkan memiliki 36 pasangan basa. Ribosa dan basa ditunjukkan dengan warna kuning. Tulang punggung fosfodiester direpresentasikan sebagai tali biru. Biru adalah warna yang digunakan untuk mewakili untaian DNA.

Table 1 Perbandingan parameter heliks yang berbeda untuk A-, B-, dan Z-DNA

Parameter	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Helix sense	Kanan	Kanan	Kiri
Base pairs per turn	11	10	12
Axial rise (nm)	0.26	0.34	0.45
Helix pitch (°)	28	34	45
Base pair tilt (°)	20	-6	7
Twist angle (°)	33	36	-30
Diameter of helix (nm)	2.3	2.0	1.8

Seperti yang diharapkan, heliks A-DNA menjadi kurang stabil daripada konformasi heliks B-DNA. A-DNA juga lebih kaku dari B-DNA, karena penumpukan basa yang tidak berada di tengah membuat mereka kurang fleksibel. Ada sekitar 11 bp per putaran untuk A DNA, dibandingkan dengan sekitar 10 bp per putaran untuk bentuk-B. Akhirnya, kemiringan pasangan basa lebih tinggi pada A-DNA daripada di B-DNA. Heliks A adalah bentuk umum untuk DNA-RNA hibrida, serta RNA untai ganda; ini karena gugus OH ekstra pada gula ribosa, yang tidak dapat dengan mudah masuk ke dalam ruang sempit yang disediakan untuk itu di B-DNA.

b. Struktur B-DNA

B-DNA adalah bentuk Watson-Crick dari heliks ganda yang kebanyakan orang kenal (Gambar 16). Itu pertama kali diidentifikasi dalam serat pada kelembaban relatif 92%. Beberapa sekuens yang mengkristal hingga resolusi tinggi telah ditemukan mengadopsi konformasi B-DNA. Meskipun rata-rata konformasi B-DNA sama dalam kristal seperti dalam larutan, struktur lokal sangat bergantung pada urutan lokalnya. Tabel 1 mencantumkan beberapa parameter struktural yang berbeda untuk B-DNA sebagai fungsi dari urutan dinukleotida. Tabel juga menunjukkan parameter rata-rata, yang sangat dekat dengan nilai yang diperoleh dalam studi difraksi serat. Dari tiga keluarga heliks DNA, B-DNA adalah yang paling umum, dan juga yang paling bervariasi dalam struktur.

2) Struktur Heliks-Z kiri

Salah satu urutan DNA pertama yang dikristalisasi adalah oligomer d(GCGCGC), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 16. Yang mengejutkan banyak orang, struktur ini adalah heliks kidal, berlawanan dengan heliks Watson-Crick tradisional. Tulang punggungnya tidak berbentuk heliks halus, tetapi tidak beraturan dan berbentuk zigzag, seperti namanya. Pada saat itu, struktur ini cukup kontroversial, tetapi sekarang diterima secara umum bahwa sekuens DNA tertentu (khususnya saluran purin-pirimidin yang berselang-seling) dapat membentuk Z-DNA kiri, sementara sebagian besar sekuens lainnya akan segera membentuk heliks tangan kanan. Heliks-Z lebih sempit daripada konformasi A-dan B, dan memiliki 12 bp per putaran. Basa

nukleotida terbalik, relatif terhadap tulang punggung fosfat, dalam Z-DNA bila dibandingkan dengan A-DNA dan B-DNA.

3) Fungsi Biologi A-DNA

Heliks bentuk-A umum untuk hibrid DNA-RNA, serta untuk RNA untai ganda; selain itu, konformasi-A disukai dalam DNA tripleks. Transisi dari B-DNA ke A-DNA telah didalilkan terjadi selama transkripsi, di mana hibrid RNA-DNA akan lebih stabil dalam konformasi-A. A-DNA juga berperan dalam beberapa proses yang tidak melibatkan RNA. Sebagai contoh, pada bakteri yang bersporulasi, terdapat protein yang dapat mengikat DNA pada konformasi B dan menginduksi perubahan pada heliks A-DNA. Kejadian biologis umum lainnya dari sekuens yang dapat dengan mudah membentuk A-DNA adalah pada pengulangan terminal panjang (LTRs) dari elemen transposabel. Daerah ini sering mengandung peregangan purin yang mendukung konformasi A-DNA. Faktanya, urutan DNA yang digunakan untuk urutan struktur kristal A-DNA yang ditunjukkan pada Gambar 15b berasal dari LTR dari human *immunodeficiency virus*. Ada kemungkinan bahwa daerah-daerah ini terlibat dalam rekombinasi. Peregangan pendek purin yang cenderung membentuk konformasi A-DNA ada dalam genom dalam kelimpahan yang jauh lebih besar daripada yang diharapkan dari komposisi mononukleotida, mulai dari sekitar seperempat genom pada bakteri hingga mendekati setengah DNA dalam kromosom eukariotik.

4) Fungsi Biologi Z-DNA

Urutan yang dapat membentuk Z-DNA pada dasarnya tidak ditemukan pada *Escherichia coli*, namun mereka lebih banyak terdapat pada eukariota kompleks. Contoh penting dari hal ini adalah kompleks CpG, yang berpotensi membentuk Z-DNA, terutama ketika termetilasi. Dalam skenario yang rumit, protein yang bertanggung jawab untuk pengeditan mRNA diaktifkan saat mengikat Z-DNA kiri di hulu gen. Selain itu, Z-DNA juga diduga berperan sebagai penambah transkripsi, dan dalam diferensiasi terminal. Dalam beberapa genom eukariotik, 10% atau lebih genom berisi urutan yang mampu membentuk Z-DNA.

5) Fungsi Biologi B-DNA

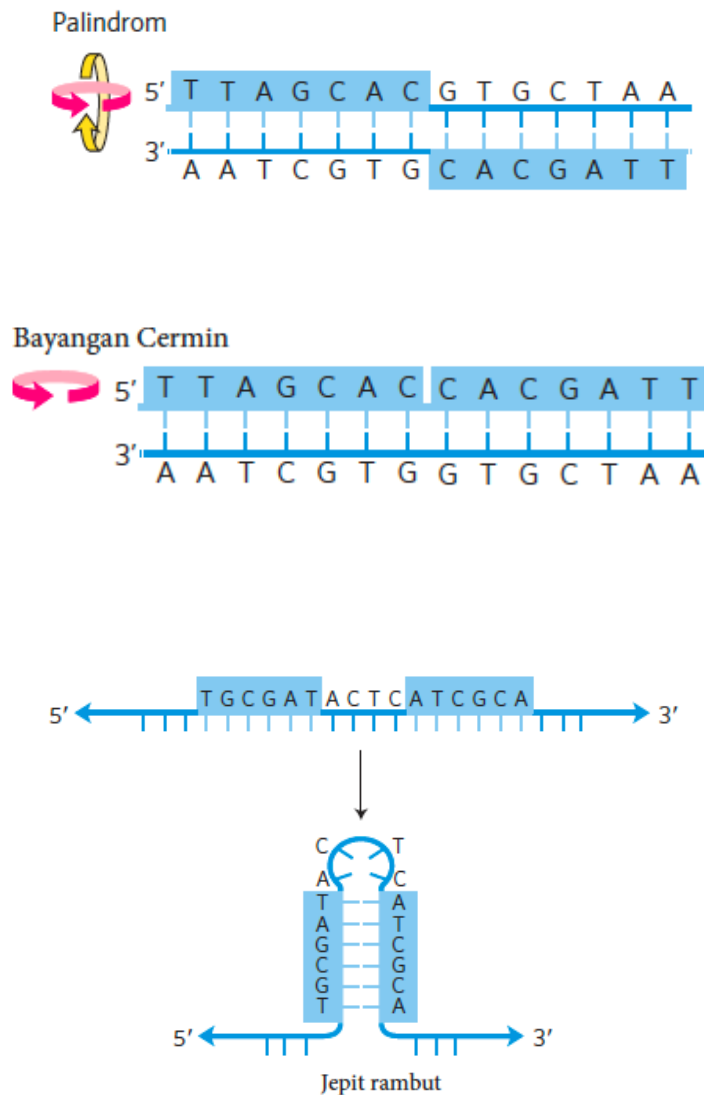
Seperti disebutkan di atas, struktur B-DNA sangat bergantung pada urutannya. Dengan demikian, beberapa sekuens yang dapat membuka dengan mudah (misalnya TATA) dapat ditempatkan secara strategis untuk membuka heliks DNA untuk inisiasi transkripsi. Urutan lain yang lebih kaku (atau fleksibel) dapat berfungsi sebagai tempat pengikatan protein dan pembentukan kompleks spesifik. Pada bakteri dan juga eukariota, sekuens di bagian hulu tempat awal transkripsi mengandung daerah yang lebih kaku dan akan lebih mudah membuka. Selain tiga konformasi heliks DNA yang berbeda, ada banyak struktur DNA lain, seperti kelengkungan DNA, DNA untai tiga, DNA tetrapleks dan DNA untai paralel, yang dapat dibentuk dalam berbagai kondisi.

Apakah urutan DNA akan berada dalam konformasi A, B-atau Z-DNA tergantung pada setidaknya tiga kondisi. Kondisi pertama adalah lingkungan ionik atau hidrasi, yang dapat memfasilitasi konversi antara bentuk heliks yang berbeda. A-DNA disukai oleh hidrasi rendah, sedangkan Z-DNA dapat disukai oleh garam tinggi. Kondisi kedua adalah urutan DNA: A-DNA disukai oleh rentang tertentu dari purin (atau pirimidin), sedangkan Z-DNA dapat paling mudah dibentuk oleh purin-pirimidin bergantian. Kondisi ketiga adalah adanya protein yang dapat mengikat DNA dalam satu konformasi heliks dan memaksa DNA untuk mengadopsi konformasi yang berbeda, seperti protein yang mengikat B-DNA dan dapat mendorongnya ke bentuk A atau Z. Dalam sel hidup, sebagian besar DNA berada dalam campuran konformasi A-DNA dan B-DNA, dengan beberapa daerah kecil yang mampu membentuk Z-DNA.

6) Struktur Palindrom

Variasi struktural lain yang bergantung pada urutan yang ditemukan pada kromosom yang lebih besar dapat mempengaruhi fungsi dan metabolisme segmen DNA di sekitar mereka. Misalnya, belokan yang terjadi pada heliks DNA di mana empat atau lebih residu adenosin muncul secara berurutan dalam satu untai. Enam adenosin berturut-turut menghasilkan lekukan sekitar 180° . Pembengkokan yang diamati dengan urutan ini dan urutan lainnya mungkin penting dalam pengikatan beberapa protein ke DNA. Jenis urutan DNA yang agak umum adalah palindrome.

Palindrom adalah kata, frasa, atau kalimat yang dieja sama dibaca maju atau mundur; dua contoh adalah ROTATOR dan NURSES RUN. Istilah ini diterapkan pada daerah DNA dengan pengulangan terbalik dari urutan basa yang memiliki simetri ganda pada dua untai DNA. Urutan tersebut saling melengkapi dalam setiap untai dan oleh karena itu memiliki potensi untuk membentuk struktur jepit rambut.

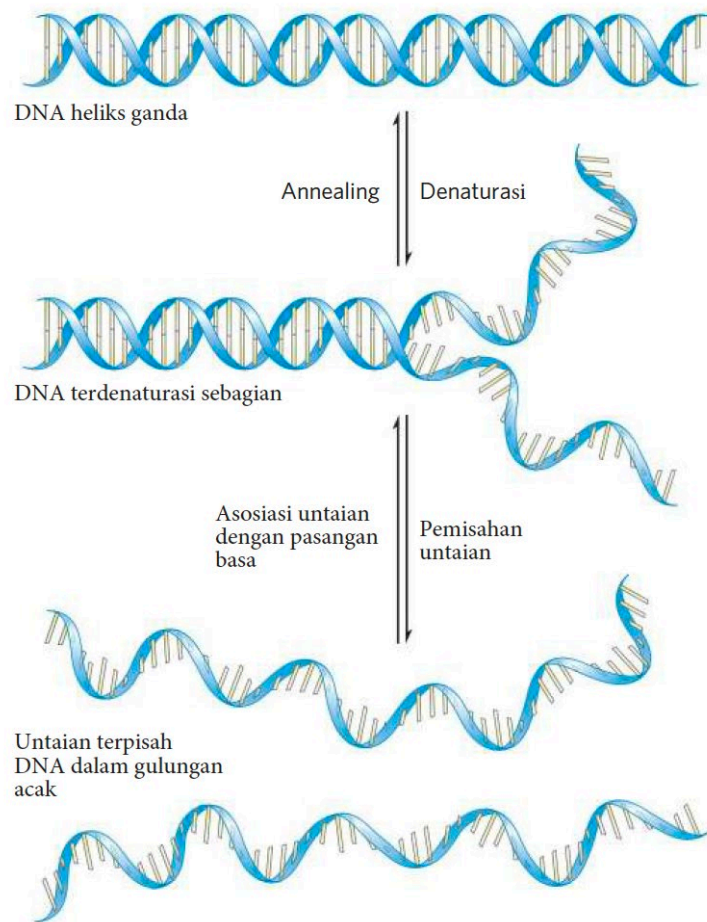


Gambar 17 Beberapa struktur DNA yang tidak biasa

Ketika pengulangan terbalik terjadi dalam setiap untai individu dari DNA, urutannya disebut bayangan cermin. Bayangan cermin tidak memiliki urutan komplementer dalam untai yang sama dan tidak dapat membentuk struktur jepit rambut. Urutan jenis ini ditemukan di hampir setiap molekul DNA besar dan dapat mencakup beberapa pasangan basa atau ribuan. Urutan untai tunggal DNA (atau

RNA) yang terisolasi dalam larutan terlipat menjadi struktur kompleks yang mengandung banyak bentuk jepit rambut.

DNA dan RNA Heliks Ganda Dapat Didenaturasi. Solusi dari DNA asli yang diisolasi dengan hati-hati sangat kental pada pH 7,0 dan suhu kamar (25 °C). Ketika larutan tersebut mengalami pH ekstrem atau suhu di atas 80 °C, viskositasnya menurun tajam, menunjukkan bahwa DNA telah mengalami perubahan fisik. Sama seperti panas dan ekstrem pH mendenaturasi protein globular, mereka juga menyebabkan denaturasi, atau pencairan, DNA heliks ganda. Terputusnya ikatan hidrogen antara basa berpasangan dan susunan basa menyebabkan pelepasan heliks ganda untuk membentuk dua untai tunggal, yang benar-benar terpisah satu sama lain sepanjang atau sebagian panjang (denaturasi parsial) molekul. Tidak ada ikatan kovalen dalam DNA yang terputus.



Gambar 18 Denaturasi dan Renaturasi DNA

Renaturasi molekul DNA adalah proses satu langkah yang cepat, selama segmen heliks ganda dari selusin atau lebih residu masih menyatukan dua untai. Ketika suhu atau pH dikembalikan ke kisaran di mana sebagian besar organisme hidup, segmen yang tidak terputus dari dua untaian secara spontan mundur, untuk menghasilkan dupleks utuh. Namun, jika dua untaian benar-benar terpisah, renaturasi terjadi dalam dua langkah. Pada langkah pertama yang relatif lambat, kedua untai "menemukan" satu sama lain melalui tumbukan acak dan membentuk segmen pendek heliks ganda komplementer. Langkah kedua jauh lebih cepat: basa yang tidak berpasangan yang tersisa secara berurutan masuk ke dalam register sebagai pasangan basa, dan kedua untaian "ritsleting" itu sendiri bersama-sama untuk membentuk heliks ganda.

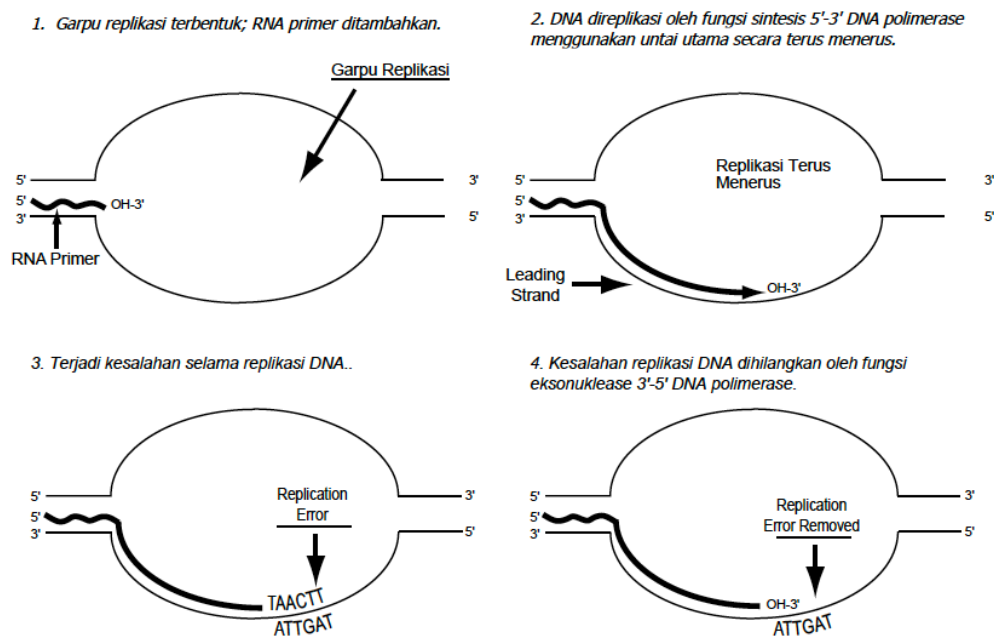
Interaksi yang erat antara tumpukan basa dalam asam nukleat memiliki efek penurunan penyerapan sinar UV relatif terhadap larutan dengan konsentrasi nukleotida bebas yang sama, dan penyerapan menurun lebih lanjut ketika dua untai asam nukleat komplementer dipasangkan. Ini disebut efek hipokromik. Denaturasi asam nukleat untai ganda menghasilkan hasil yang berlawanan: peningkatan penyerapan yang disebut efek hiperkromik. Transisi dari DNA untai ganda ke untai tunggal, bentuk terdenaturasi dengan demikian dapat dideteksi dengan memantau penyerapan UV pada 260 nm.

Molekul DNA virus atau bakteri dalam larutan mengalami denaturasi ketika dipanaskan perlahan. Setiap spesies DNA memiliki suhu denaturasi yang khas. suhu, atau titik leleh (t_m ; secara formal, suhu di mana separuh DNA hadir sebagai untai tunggal terpisah): semakin tinggi kandungan pasangan basa $G \cong C$, semakin tinggi titik leleh DNA. Ini karena pasangan basa $G \cong C$, dengan tiga ikatan hidrogen, membutuhkan lebih banyak energi panas untuk berdisosiasi daripada pasangan basa $A = T$. Jadi titik leleh molekul DNA, yang ditentukan dalam kondisi pH dan kekuatan ion yang tetap, dapat menghasilkan perkiraan komposisi basanya. Jika kondisi denaturasi dikontrol dengan hati-hati, daerah yang kaya akan pasangan basa $A = T$ akan terdenaturasi secara spesifik sementara sebagian besar DNA tetap beruntai ganda. Daerah terdenaturasi dapat divisualisasikan dengan mikroskop elektron.

Perhatikan bahwa dalam pemisahan untai DNA yang terjadi *in vivo* selama proses seperti replikasi dan transkripsi DNA, sisi di mana proses ini dimulai seringkali kaya akan pasangan basa A=T, seperti yang akan kita lihat. Dupleks dua untai RNA atau satu untai RNA dan satu untai DNA (hibrida RNA-DNA) juga dapat didenaturasi. Khususnya, dupleks RNA lebih stabil terhadap denaturasi panas daripada dupleks DNA. Pada pH netral, denaturasi RNA heliks ganda sering membutuhkan suhu 20 °C atau lebih tinggi daripada yang diperlukan untuk denaturasi molekul DNA dengan urutan yang sebanding, dengan asumsi untaian di setiap molekul saling melengkapi secara sempurna. Stabilitas hibrid RNA-DNA umumnya antara RNA dan dupleks DNA.

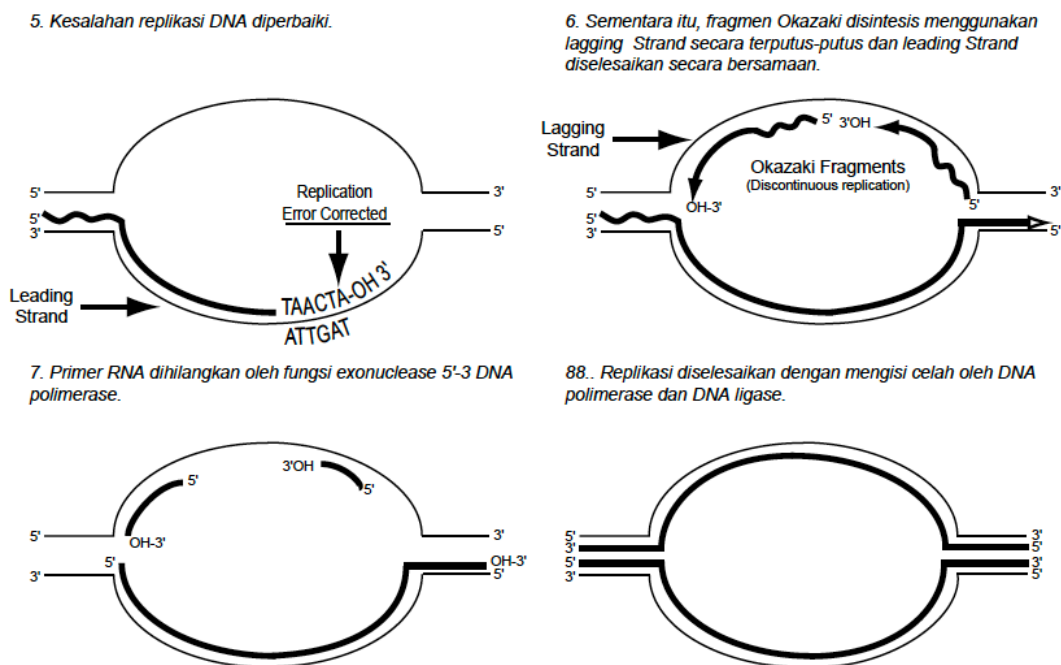
D. REPLIKASI DNA

Replikasi DNA adalah proses biologis yang penting, fungsi utamanya adalah menghasilkan DNA baru untuk pembelahan sel. Proses ini memiliki beberapa langkah yang berbeda untuk dipahami. Faktor-faktor yang merupakan syarat mutlak untuk memulai replikasi DNA adalah gugus 3'-OH bebas dan cetakan DNA. Primer RNA menyediakan gugus 3'-OH bebas. DNA yang akan direplikasi berfungsi sebagai cetakan. Penting diingat bahwa semua replikasi DNA berlangsung dalam arah 5'-3'.



Gambar 19 Replikasi pada E. Coli

Pada gambar 19 di atas DNA Polimerase I dan III. Polimerase III adalah enzim replikasi utama yang melakukan pemanjangan untai DNA. Ia menambahkan nukleotida pertama ke primer RNA dan kemudian menumbuhkan rantai dengan menciptakan ikatan fosfodiester. Ini juga memiliki fungsi proofreading (exonuclease) 3'-5' yang menghilangkan nukleotida yang tergabung secara tidak benar. DNA Polimerase I juga memiliki fungsi replikasi 5'-3', tetapi fungsi ini terutama digunakan untuk mengisi celah pada DNA yang direplikasi yang terjadi ketika primer RNA dihilangkan. Enzim ini juga memiliki fungsi eksonuklease 5'-3' yang digunakan untuk menghilangkan primer RNA.

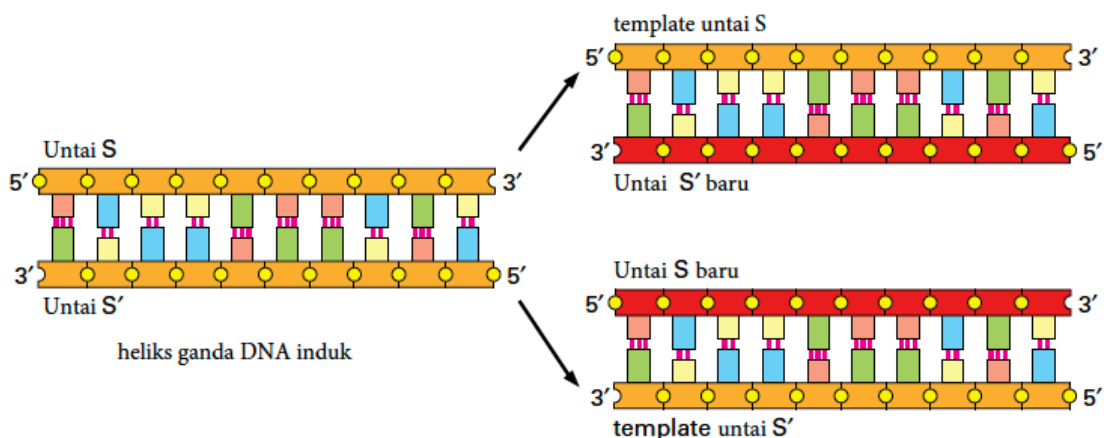


Gambar 20 Tahapan mulai Replikasi

Pada gambar 20 di atas fragmen Okazaki: Replikasi DNA prokariotik dan eukariotik berjalan dalam arah 5'-3'. Ini menimbulkan masalah karena garpu replikasi bergerak ke arah itu. Masalahnya berkaitan dengan apa yang disebut *lagging strand*. Itu harus direplikasi ke arah yang berlawanan dengan arah garpu replikasi. Masalah ini dipecahkan dengan penemuan fragmen *Okazaki* (dinamai sesuai nama orang yang menemukan prosesnya). Berbeda dengan untai utama, di mana DNA direplikasi sebagai molekul tunggal secara terus-menerus, DNA direplikasi secara terputus-putus pada *lagging strand*. Masing-masing primer dengan primer RNA, dan DNA PolIII

dalam *E. coli* membuat untai pendek DNA. Fragmen-fragmen ini kemudian digabungkan bersama ketika primer dilepas dan untai diselesaikan oleh aksi DNA Pol I dan ligase.

Selama replikasi DNA di dalam sel, masing-masing dari dua untai DNA lama berfungsi sebagai cetakan untuk pembentukan untai baru. Karena masing-masing dari dua anak dari sel yang membelah mewarisi heliks ganda DNA baru yang mengandung satu untai lama dan satu untai baru (Gambar 21), heliks ganda DNA dikatakan direplikasi "semikonservatif" oleh DNA polimerase. Bagaimana prestasi ini dicapai? Analisis yang dilakukan pada awal 1960-an pada seluruh kromosom yang bereplikasi mengungkapkan wilayah replikasi lokal yang bergerak secara progresif di sepanjang heliks ganda DNA induk. Karena strukturnya yang berbentuk Y, wilayah aktif ini disebut garpu replikasi. Pada garpu replikasi, DNA dari kedua untai anak baru disintesis oleh kompleks multienzim yang mengandung DNA polimerase.

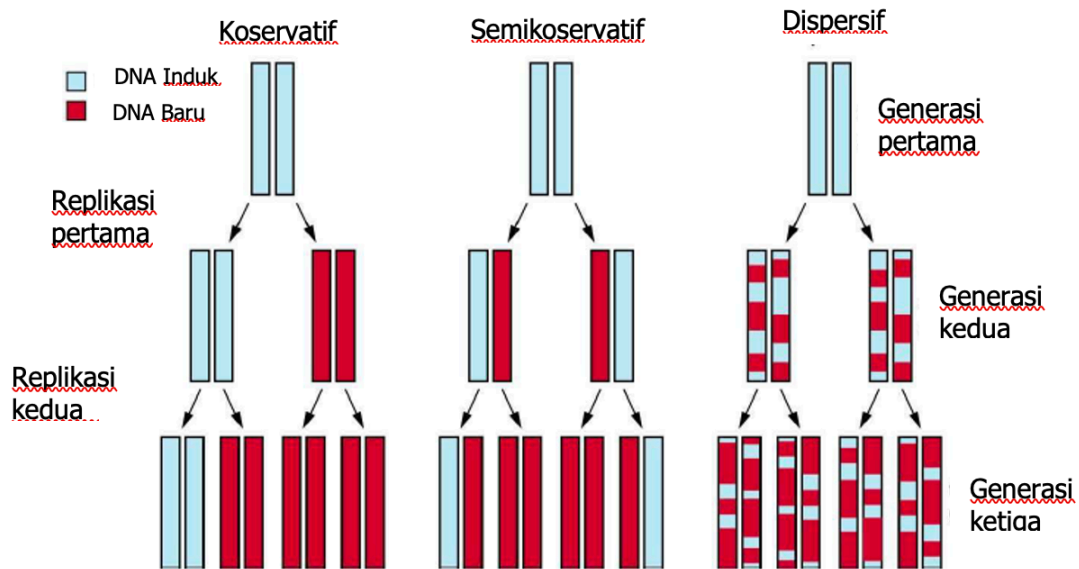


Gambar 21 Heliks ganda DNA

Pada gambar 21 di atas heliks ganda DNA bertindak sebagai cetakan untuk duplikasinya sendiri. Karena nukleotida A hanya akan berhasil berpasangan dengan T, dan G hanya dengan C, setiap untai DNA dapat berfungsi sebagai cetakan untuk menentukan urutan nukleotida dalam untai komplementernya melalui pasangan basa DNA. Dengan cara ini, molekul DNA heliks ganda dapat disalin dengan tepat.

Sebelum sifat replikasi DNA diketahui, ada tiga hipotesis yang diduga dapat menggambarkan sifat proses replikasi DNA. Dalam hipotesis pertama, untai anak

dibuat dengan cara yang benar-benar baru sambil mempertahankan struktur untai induk asli. Ini adalah model replikasi konservatif. Model kedua adalah model semikonservatif, dimana produk yang dihasilkan masing-masing mengandung satu untai DNA induk dan satu untai DNA baru. Model ketiga untuk replikasi DNA adalah dispersif, di mana DNA induk akan diselingi dengan urutan DNA yang baru direplikasi.



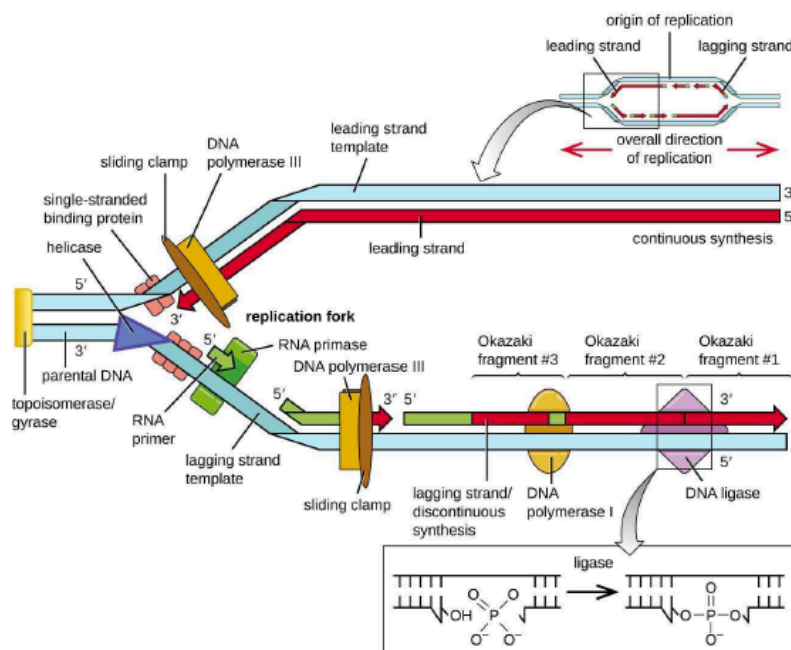
Gambar 22 Replikasi DNA semikonservatif

Pada gambar 22 di atas sifat semikonservatif DNA ditemukan melalui eksperimen pelabelan menggunakan isotop Nitrogen yang berbeda. Pada bagian pertama percobaan, seluruh DNA induk diberi label dengan nitrogen berat (^{15}N , nitrogen), kultur kemudian ditumbuhkan dalam ^{14}N , nitrogen. Jika replikasi DNA konservatif, semua nitrogen berat akan tetap bersama dan nitrogen ^{14}N yang lebih ringan juga akan tetap bersama setelah satu putaran replikasi. Jika DNA direplikasi dalam model semikonservatif atau dispersif, putaran pertama replikasi akan membuat pita tunggal DNA yang memiliki ^{14}N dan ^{15}N dicampur bersama di dalam produk.

Namun, setelah satu putaran, Anda tidak akan dapat membedakan antara model semikonservatif dan dispersif. Untuk ini, Anda perlu melakukan sintesis putaran kedua. Dalam hal ini, model semikonservatif akan menghasilkan produk yang memiliki campuran ^{15}N dan ^{14}N atau seluruhnya ^{14}N , sedangkan setelah putaran kedua replikasi, model dispersi hanya akan memiliki pita tunggal DNA yang telah

bercampur mengandung ^{15}N dan ^{14}N . Yang diamati adalah prediksi semikonservatif pita tunggal setelah putaran pertama replikasi dan dua pita setelah putaran kedua. Ini adalah indikasi pertama bahwa molekul DNA induk berfungsi sebagai cetakan untuk pembuatan untai anak baru.

Salah satu ciri utama DNA prokariotik adalah sifatnya yang melingkar, dan ukuran DNA kromosom jauh lebih kecil daripada eukariotik. Jadi, replikasi biasanya ditandai dengan memiliki satu titik asal replikasi, yang disebut Ori. Ori adalah sisi di mana heliks ganda DNA terbuka dan masing-masing untai digunakan sebagai cetakan untuk mensintesis untai anak baru. Perhatikan replikasi dua arah dan bergerak keluar dari Ori di kedua arah. Diagram dibawah ini memberikan gambaran tentang enzim dan protein utama yang terlibat dengan replikasi DNA. Setelah Ori dibuka, memperlihatkan DNA untai tunggal, garpu replikasi DNA dapat terbentuk. Enzim DNA *helicase* yang terlibat dalam penguraian DNA beruntai ganda untuk menciptakan DNA beruntai tunggal. Ketika *helicase* membuka DNA, ini menimbulkan lebih banyak ketegangan ke dalam DNA beruntai ganda di depan garpu replikasi. Enzim DNA topoisomerase/Girase digunakan untuk meredakan ketegangan superkoil ini selama proses replikasi. Protein SSB DNA akan mengikat DNA dan mencegahnya membentuk heliks ganda. Perhatikan bahwa setiap untai DNA terletak pada orientasi yang berlawanan, satu dalam arah 5' ke 3' dan yang lainnya dalam arah 3' ke 5'.

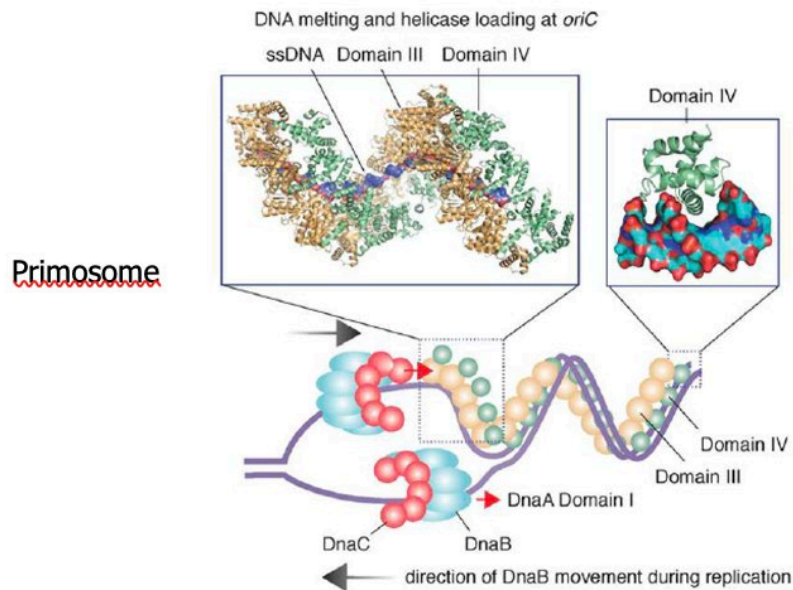


Gambar 23 Sintesis DNA arah 5' ke 3'

Ingat bahwa sintesis DNA hanya terjadi pada arah 5' ke 3' dengan penyisipan nukleotida baru pada 3'-OH basa sebelumnya. Jadi, agar sintesis dua arah terjadi, satu untai dapat bergerak dengan mudah ke arah yang sama dengan arah garpu replikasi. Ini adalah untai utama. Di sinilah untai baru dapat dibangun dalam arah 5' ke 3'. Untai lagging harus dibangun dalam rantai pendek ke arah yang berlawanan dari garpu replikasi karena templat untai lagging harus memutar dirinya sendiri ke belakang melalui enzim DNA polimerase untuk menghubungkan basa dalam arah 5' ke 3'.

Setelah untai pendek selesai, DNA dilepaskan dan diputar ulang lagi ke hulu. Ini menciptakan beberapa fragmen DNA yang lebih kecil pada untai tertinggal, yang dikenal sebagai fragmen Okazaki, selama proses replikasi. Enzim DNA polimerase membutuhkan beberapa komponen kunci untuk memediasi replikasi DNA. Ia harus memiliki untai cetakan untuk mengetahui basa mana yang akan dimasukkan ke dalam untai yang sedang tumbuh, dan juga harus memiliki primer untuk dapat menggabungkan basa berikutnya.

Replikasi DNA tidak bisa terjadi begitu saja, segmen RNA kecil akan berfungsi sebagai primer yang memungkinkan dimulainya replikasi DNA. Enzim RNA primase memediasi fungsi ini. Hanya satu primer yang diperlukan untuk untai utama memulai, tetapi beberapa primer kecil akan dibutuhkan pada untai yang tertinggal, setiap kali urutan dilepaskan. Enzim DNA polimerase lain akan menghilangkan urutan primer RNA dan mengisinya dengan DNA yang sesuai dan tulang punggung gula/fosfat akan diligasi kembali oleh enzim DNA ligase. Inisiasi replikasi di lokasi Ori membutuhkan perakitan kompleks protein yang dikenal sebagai primosom

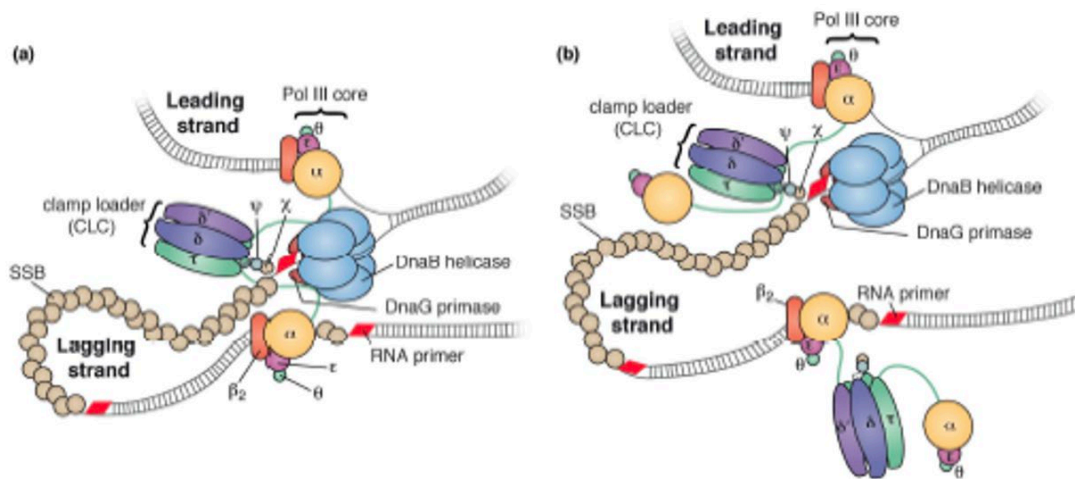


Gambar 24 Perakitan DNA primosom

Pada gambar 24 di atas menunjukkan perakitan DNA primosom. Ini melibatkan pengikatan protein inisiator ke urutan Ori. Pada *E. coli*, inisiator ini dikodekan oleh gen *DnaA*. Protein inisiator *DnaA* berikatan dengan ATP dan sekuens spesifik di Ori. *DnaA* adalah protein rantai panjang dengan banyak subunit. Domain III dan IV adalah yang paling terlihat. Pengikatan *DnaA* + ATP menyebabkan regangan torsional di Ori dan memulai proses pelepasan. *DnaC* (pemuat helikase) berinteraksi dengan *DnaA* yang terikat pada Ori, dan juga menjebak protein helikase *DnaB* dalam konformasi pembuka kunci sehingga dapat dimuat ke *single strand binding protein* (SSB) DNA. Domain I dari *DnaA* membantu menangkap kompleks *DnaB-DnaC* lain untuk dimuat pada untai yang berlawanan. Setelah ini dirakit, *DnaC* (pemuat helikase) terdisosiasi dari kompleks dan *DnaB* menggeser konformasi ke struktur cincin tertutup. Ini membentuk primosom fungsional. Helikase *DnaB* kemudian mulai melepas DNA pada garpu replikasi baru, dan enzim primase *DnaG* menambahkan primer RNA.

Bakteri *E. coli* memiliki total 5 enzim DNA Polymerase, 3 di antaranya terlibat dalam replikasi DNA (I, II, dan III). DNA polimerase III adalah polimerase utama yang terlibat dalam biosintesis untai utama dan sintesis Fragmen Okazaki selama

replikasi DNA. Holoenzim DNA polimerase III terdiri dari 10 protein berbeda yang disusun menjadi tiga rakitan yang berbeda secara fungsional, tetapi secara fisik saling berhubungan: (1) inti $\alpha\epsilon\theta$, (2) *sliding clamp* β_2 , dan (3) kompleks pemuat penjepit (*clamp loader complex*) $\psi\chi\psi\chi$. Gambar 25a, menunjukkan model dari Replisome DNA dengan proses yang digabungkan dan sangat terkoordinasi dari sintesis *leading strand* (untai utama) dan *lagging strand* (untai tertinggal).



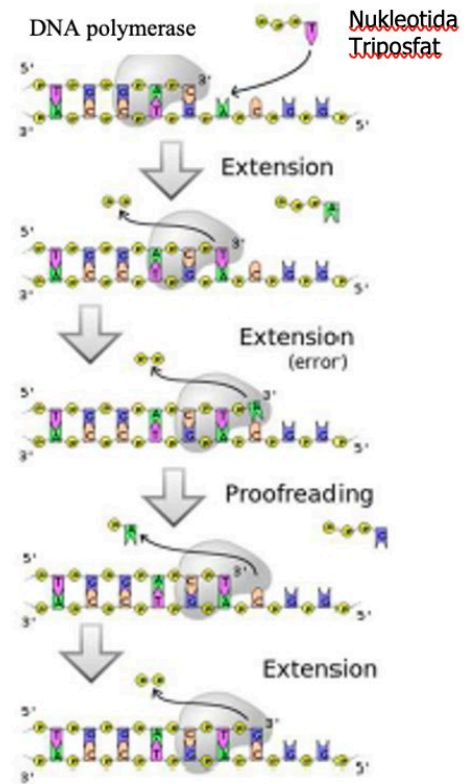
Gambar 25 DNA polimerase III

DNA polimerase III terhubung ke DnaB helicase melalui subunit dari kompleks *clamp-loader* dan dua atau tiga inti polimerase mereplikasi DNA dari template DNA untai utama dan untai tertinggal secara bersamaan. ssDNA dalam loop untai tertinggal terikat oleh protein pengikat ssDNA (SSB). Namun, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 25b, penelitian terbaru menunjukkan bahwa *E. coli* DNA polimerase III siap ditukar di fork dan bahwa sintesis untai utama dan untai tertinggal mungkin tidak digabungkan secara erat, atau bahkan dapat diselesaikan oleh holoenzim DNA polimerase III yang berbeda. Helikase DnaB juga dapat dipisahkan dari kompleks DNA polimerase dan bertranslokasi di depan puncak garpu.

DNA Pol III memiliki kemampuan DNA Polymerase dan Proofreading yang memberikan ketelitian yang sangat tinggi. Biasanya memiliki tingkat kesalahan 1 dalam 1 juta basis.

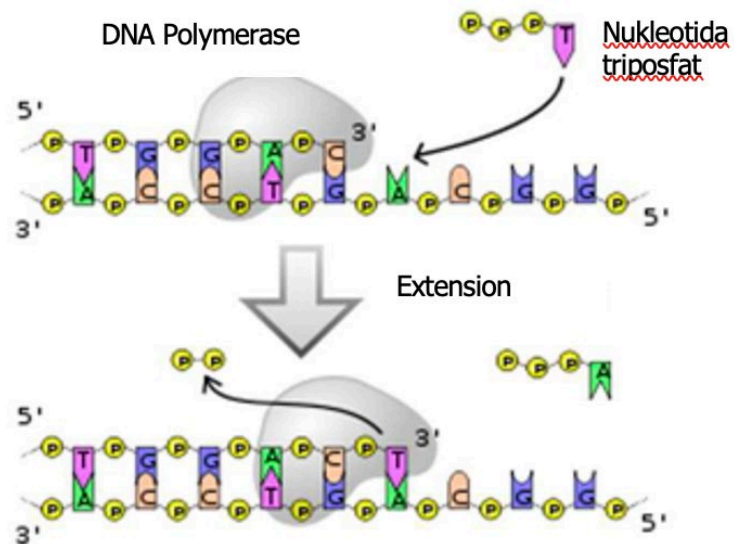
DNA POL III

Polymerase
Proofreading



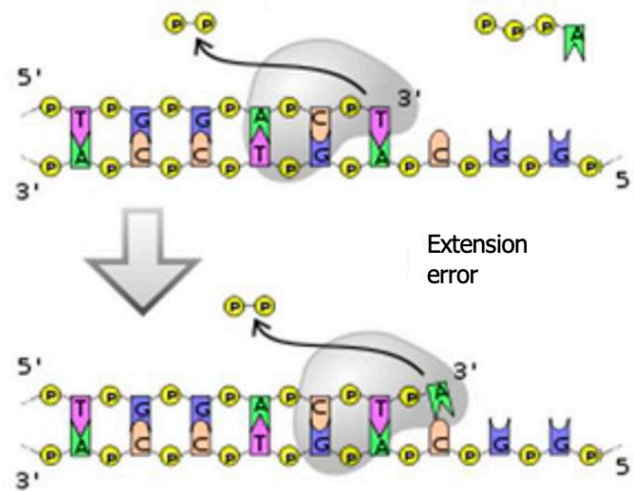
Gambar 26 Aktivitas DNA Polemarase 3

Aktivitas polimerase DNA Pol III ditunjukkan di sini dengan penggabungan *deoxythymidine triphosphate* ke dalam rantai yang sedang tumbuh.



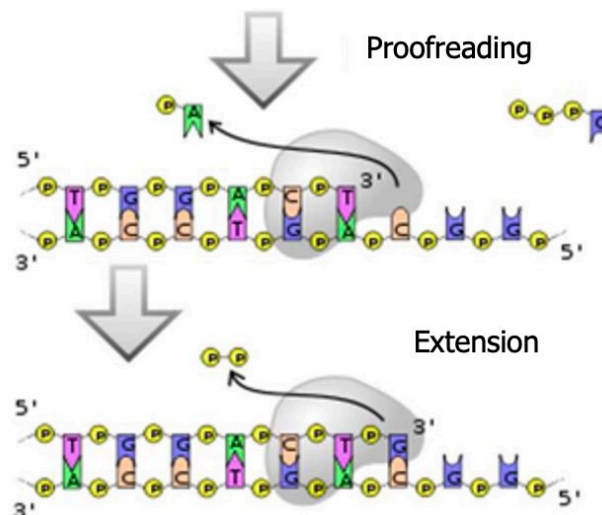
Gambar 27 Mekanisme Aktivitas DNA Polemarase 3

Kadang-kadang ada kesalahan ekstensi, di mana nukleotida yang salah dimasukkan ke dalam rantai yang sedang tumbuh. Pada gambar dapat dilihat bahwa 'A' telah dimasukkan berlawanan dengan 'C', bukan basis 'G' yang benar.



Gambar 28 Mekanisme proofreading

Dalam hal ini, kemampuan proofreading polimerase memanfaatkan aktivitas eksonuklease 3' sampai 5' untuk menghilangkan basa yang salah. Kemudian aktivitas polimerase normal dan perpanjangan untai DNA baru dapat dilanjutkan. Jadi secara keseluruhan, DNA polimerase III memiliki aktivitas polimerase 5' hingga 3' dan aktivitas proofreading exonuclease 3' hingga 5'.

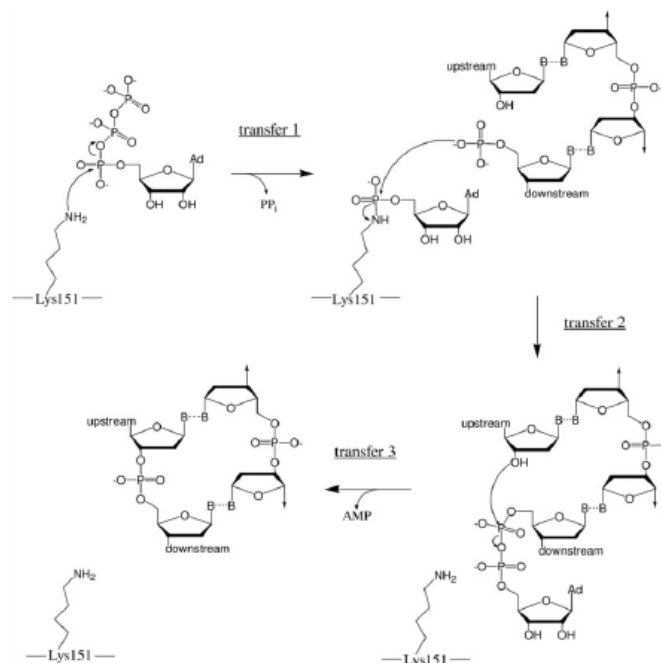


Gambar 29 Arah mekanisme proofreading

DNA Polymerase I terutama terlibat dengan penghapusan dan penggantian primer selama replikasi DNA, serta dengan DNA Proofreading. Selain 5' hingga 3'

polimerase aktif dan kemampuan proofreading eksonuklease 3' hingga 5', enzim DNA polimerase I juga memiliki aktivitas eksonuklease 5 hingga 3'. Ini berarti bahwa DNA Polimerase I dapat menghapus urutan primer RNA yang diletakkan di sepanjang untai tertinggal selama replikasi DNA, dan mengganti urutan itu dengan DNA.

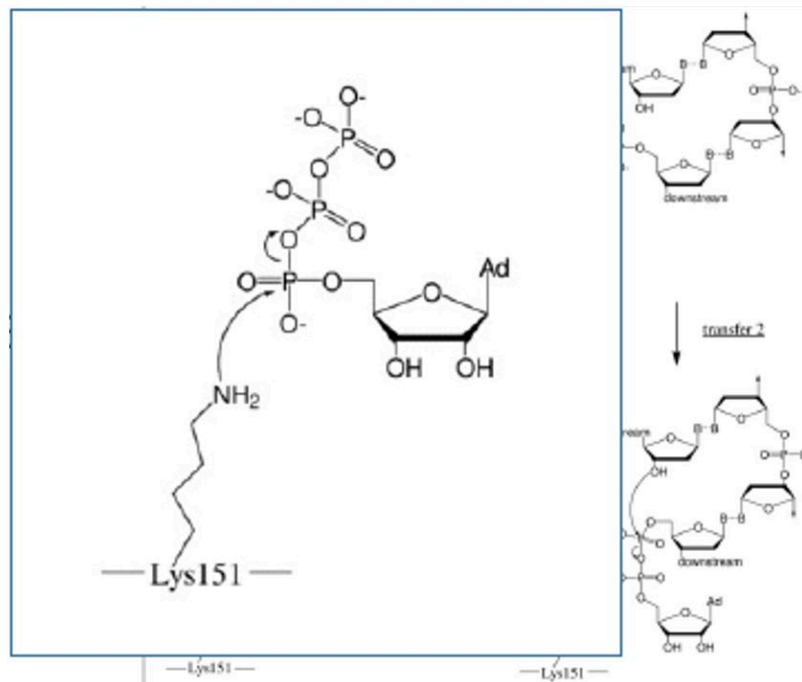
Setelah DNA Polimerase III selesai mensintesis sebagian besar DNA, bahwa untai tertinggal dari setiap garpu replikasi, memiliki banyak primer RNA di seluruh DNA. Ini tidak dapat dihilangkan oleh DNA polimerase III, karena tidak memiliki aktivitas eksonuklease 5' – 3'. Jadi, ketika DNA polimerase III berjalan ke primer hilir, ia jatuh dari DNA dan selesai dengan kemampuan sintesisnya. DNA Polymerase I akan menautkan ke DNA dan memindai sepanjang urutan memeriksa untai 5 'sampai 3'. Ia memiliki aktivitas eksonuklease 5 hingga 3 dan dapat menghapus dan mengganti primer RNA dalam fragmen Okazaki. Satu hal yang tidak bisa dilakukan, tidak bisa menutup celah di tulang punggung di antara fragmen Okazaki yang terpisah. Enzim DNA Ligase akan diperlukan untuk tujuan ini, dan kita akan melihatnya dalam beberapa slide berikutnya. Enzim DNA Ligase menggunakan ATP untuk menutup celah di tulang punggung gula-fosfat.



Gambar 30 Enzim DNA Ligase.

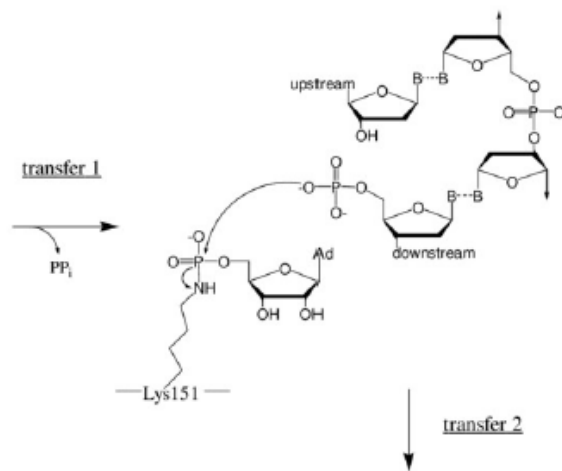
(Menggunakan ATP untuk menutup celah di tulang punggung gula-fosfat).

Pada gambar 30 Enzim DNA Ligase menggunakan residu sisi aktif lisin untuk memediasi reaksi. Sebelum itu benar-benar dapat menutup celah. Molekul ATP yang digunakan dalam reaksi pertama kali dilekatkan sebagai adenilat ke residu sisi aktif lisin. Nitrogen amina memediasi serangan nukleofilik pada atom fosfor alfa. Ini menciptakan perantara oksianion yang akan memantul dan menyebabkan pelepasan difosfat. Hidrolisis lebih lanjut dari difosfat melepaskan energi yang akan mendorong reaksi ke depan.



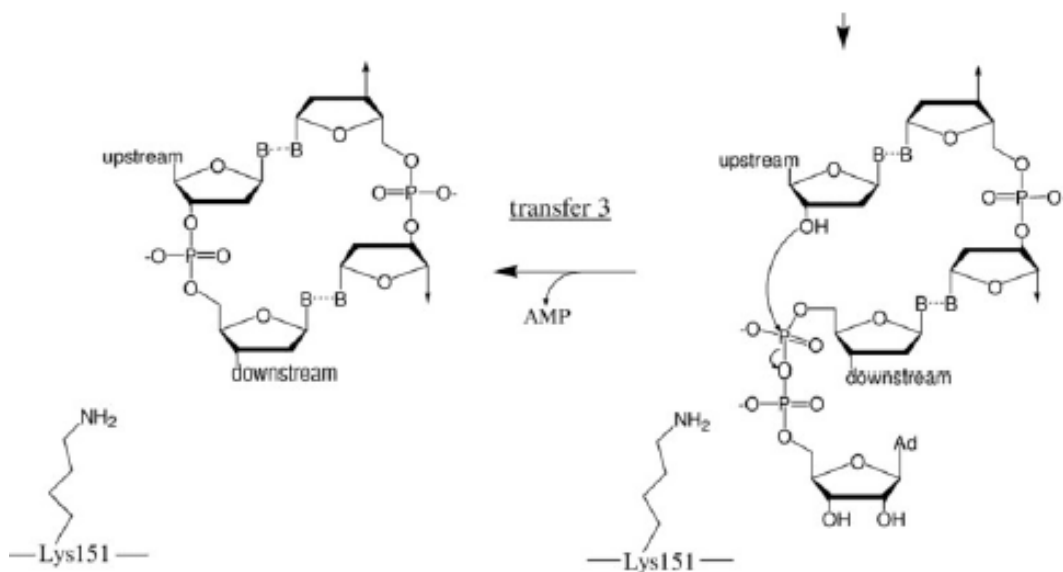
Gambar 31 Aktivasi enzim DNA Ligase.
(Enzim DNA Ligase menggunakan residu sisi aktif lisin untuk memediasi reaksi.)

Jadi inilah heliks DNA untai ganda, dengan pemutusan tulang punggung gula fosfat yang perlu disegel. Dan inilah residu lisin teraktivasi yang telah terikat secara kovalen dengan molekul AMP. Saat DNA ligase memindai DNA, ketika menemukan celah di tulang punggung, sisi aktif disejajarkan sehingga gugus fosfat 5' bebas dari tulang punggung DNA berada di dekat residu AMP-Lys. Fosfor dari gugus fosfat bebas memediasi serangan nukleofilik pada fosfor residu AMP-Lys. Gugus lisin amina berfungsi sebagai gugus pergi untuk reaksi. Pada titik ini, AMP sekarang telah ditransfer ke gugus fosfat hilir di tulang punggung DNA.



Gambar 32 Residu Lys yang teraktivasi
(Pemutusan tulang punggung gula fosfat yang perlu disegel.)

Sekarang gugus fosfat hilir diaktifkan, dan gugus 3'-OH dari nukleotida hulu, dapat memediasi serangan nukleofilik ke gugus fosfat 5' hilir. Ini sekali lagi menciptakan perantara oksianion yang kemudian akan memantul dan menyebabkan AMP menjadi gugus pergi yang baik. Ini mengembalikan enzim dalam proses dan menutup celah di tulang punggung DNA.



Gambar 33 Proses ligasi

Protein *Tus* terlibat dengan penghentian replikasi DNA pada prokariota. Pengakhiran replikasi DNA yang tepat penting untuk stabilitas genom. Replikasi *E. coli* berakhir di daerah yang berlawanan dengan *oriC*. Ada sepuluh sisi terminasi (Ter) 23-bp di wilayah tersebut dengan beberapa variasi urutan yang menentukan afinitas pengikatannya untuk protein terminasi monomer *Tus*.

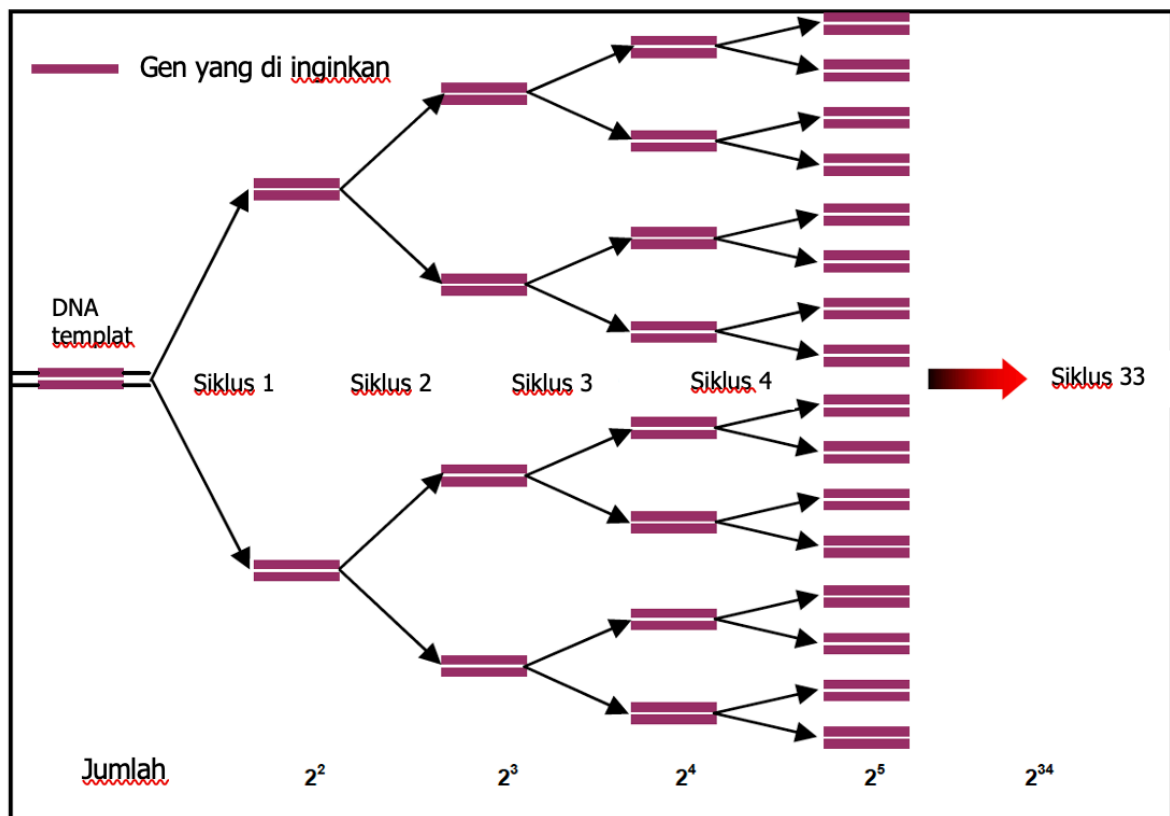
Adapun penjelasan animasi tentang struktur DNA dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.



Gambar 34 Video Replikasi
Sumber: <https://youtu.be/mxAjSBhDkEQ>

E. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Reaksi berantai Polimerase (PCR), pertama kali dibuat pada tahun 1984 oleh Kary Mullis, telah merevolusi ilmu kehidupan dan telah menjadi teknik penting dalam banyak aspek ilmu pengetahuan, termasuk diagnostik klinis, forensik dan rekayasa genetika. Kary Mullis akhirnya menerima Hadiah Nobel Kimia pada tahun 1993.

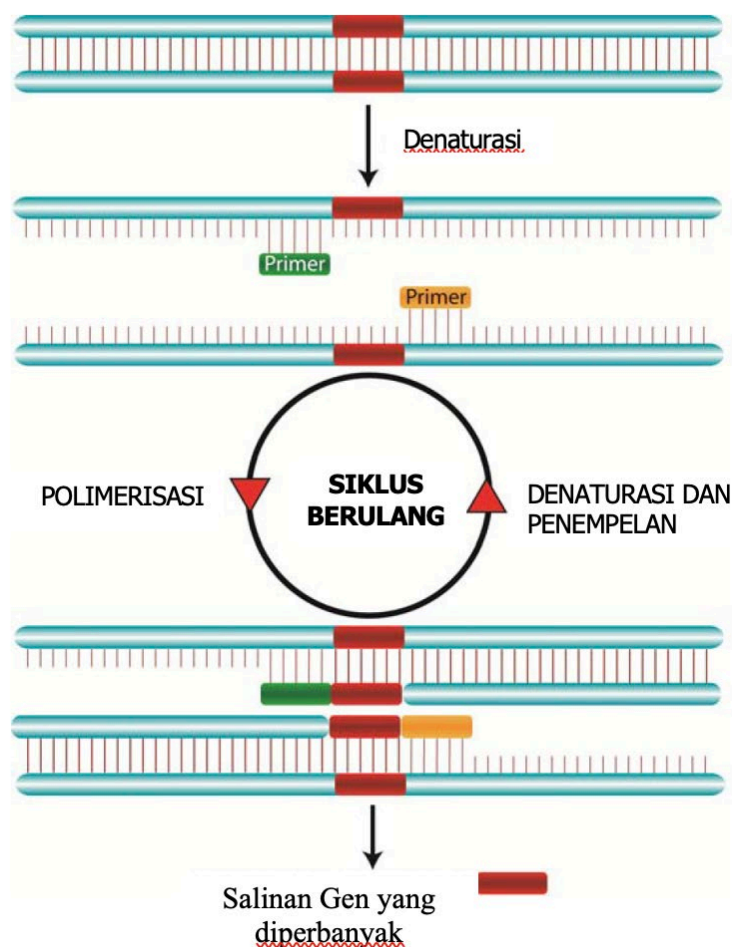


Gambar 35 PCR

PCR memungkinkan ilmuwan untuk membuat salinan tak terbatas dari fragmen DNA dan gen dari satu salinan DNA awal. Setiap siklus reaksi berantai polimerase menggandakan jumlah salinan gen yang diinginkan, jadi untuk percobaan ini, yang memiliki 33 siklus, lebih dari 17 miliar salinan gen yang Anda minati akan dibuat untuk setiap template awal (lihat gambar 35).

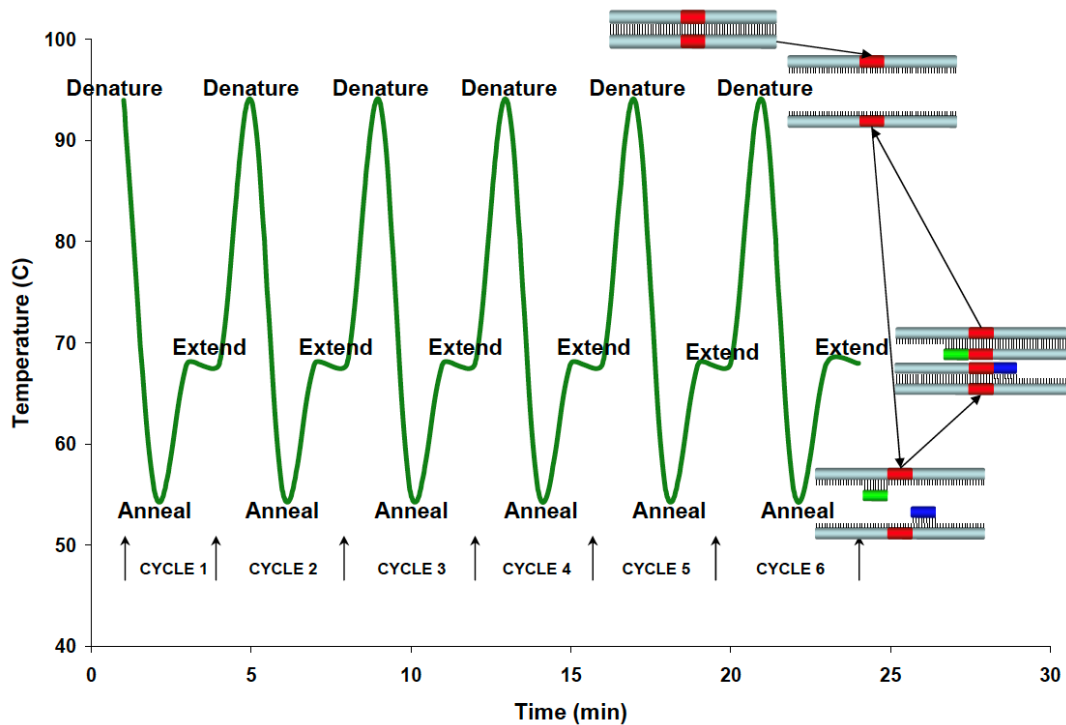
Penyalinan eksponensial gen yang diinginkan selama rantai polimerase reaksi. PCR memanfaatkan fungsi alami enzim polimerase. Dalam sel yang membelah normal, penyalinan gen membutuhkan serangkaian reaksi yang dimediasi enzim:

1. Untaian DNA didenaturasi oleh enzim untuk membentuk dua untai tunggal.
2. RNA polimerase mengikat dan mensintesis potongan RNA komplementer pendek pada untai DNA di tempat inisiasi replikasi.
3. Heteroduplex DNA/RNA ini bertindak sebagai sisi priming untuk DNA polimerase yang mengikat dan menghasilkan untai komplementer.



Gambar 36 Skema reaksi PCR

Kunci reaksi berantai polimerase pertama kali ditemukan pada tahun 1976. Kuncinya adalah Taq polimerase yang dimurnikan dari *thermophile Thermus aquaticus*. Termofil adalah organisme yang tumbuh pada suhu ekstrim (>100 °C). Pentingnya Taq polimerase yang dimurnikan dari termofil adalah bahwa enzim tidak akan dihancurkan pada suhu tinggi yang diperlukan untuk mengubah sifat DNA dan memungkinkan PCR untuk memulai. Skema reaksi PCR ditunjukkan pada gambar 36 dan representasi dari siklus suhu kritis ditunjukkan pada grafik pada gambar 37.



Gambar 37 Representasi siklus PCR

Pada gambar 37 di atas menggambarkan perubahan suhu dan efek yang dihasilkan pada DNA. Skema efek ini ditunjukkan di sebelah kanan grafik. Reaksi berantai polimerase mampu menghasilkan salinan besar dari gen yang diinginkan karena siklus di atas dapat diulang berkali-kali yang mengarah ke peningkatan eksponensial dalam jumlah salinan baru (gambar 35).

Ada tiga langkah dasar dalam PCR (Gambar 36). Pertama, DNA cetakan atau materi genetik didenaturasi; untai heliksnya dilepaskan dan dipisahkan dengan pemanasan hingga 90-96°C. Dalam sel normal, DNA dilepaskan oleh enzim tertentu. Langkah kedua adalah hibridisasi atau annealing (penempelan). Taq polimerase membutuhkan potongan pendek RNA untuk memulai replikasi DNA, yang dalam sel

normal disintesis oleh RNA polimerase. Dalam reaksi PCR, oligo untai ganda pendek komplementer ditambahkan yang mengikat DNA yang terdenaturasi dan bertindak sebagai asal mula replikasi. Oligo untai ganda ini dikenal sebagai primer dan melengkapi urutan panjang dan pendeknya dari gen yang diinginkan. Dua primer digunakan, satu untuk setiap untai DNA. Setelah denaturasi, campuran reaksi didinginkan dengan cepat ke suhu di bawah titik leleh primer spesifik ($\sim 55^{\circ}\text{C}$), di bawah suhu ini primer mengikat basa komplementernya pada DNA untai tunggal. Pada langkah ketiga, suhu reaksi dinaikkan ke suhu optimal untuk polimerase ($68\text{-}72^{\circ}\text{C}$). Polimerase mensintesis DNA baru, mulai dari primer, polimerase membaca untai cetakan dan menghasilkan nukleotida komplementer dengan sangat cepat. Hasilnya adalah dua heliks baru menggantikan heliks pertama, masing-masing terdiri dari salah satu untai asli ditambah untai komplementer yang baru dibentuk.

Thermocycler adalah bagian terpenting dari teknologi bagi para peneliti yang ingin menggunakan PCR. Sebuah thermocycler ketat mengatur perubahan suhu yang diperlukan untuk denaturasi, annealing dan ekstensi. Ini juga mengontrol jumlah siklus. Thermocycler saat ini sepenuhnya dapat diprogram dan memungkinkan pemanasan dan pendinginan yang cepat dan oleh karena itu kontrol PCR lebih ketat.

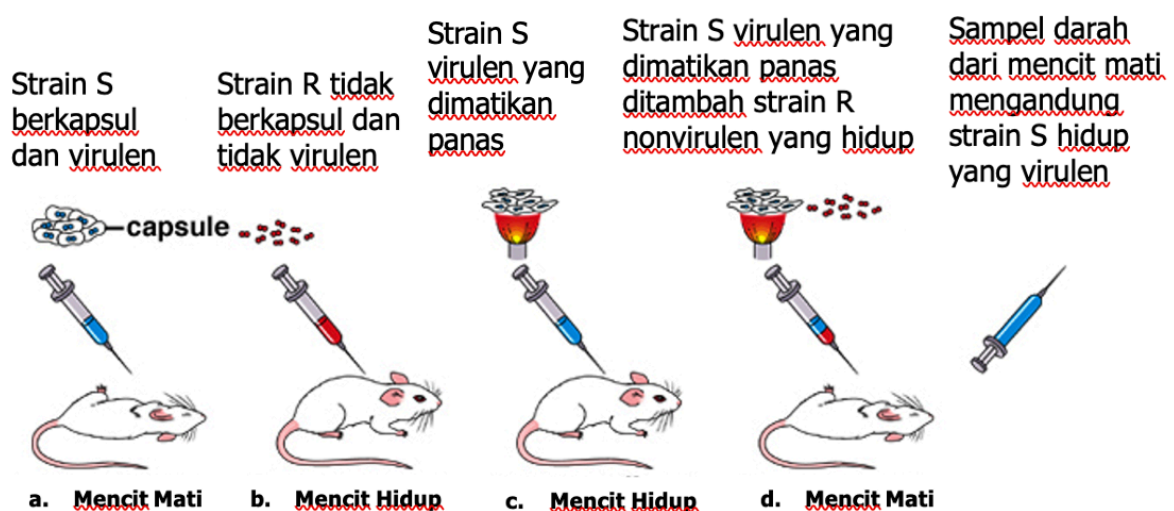


Gambar 38 Video PCR
Sumber: <https://youtu.be/iQsu3Kz9NYo>

F. DNA MATERI GENETIK

Pada tahun 1928, ahli bakteriologi Inggris Frederick Griffith melakukan serangkaian percobaan menggunakan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dan tikus. Griffith tidak mencoba mengidentifikasi materi genetik, melainkan mencoba mengembangkan vaksin untuk melawan *pneumonia*. Dalam eksperimennya, Griffith menggunakan dua strain bakteri terkait, yang dikenal sebagai strain R dan strain S.

Eksperimen Transformasi Griffith



Gambar 39 eksperimen transformasi Griffith

Strain R. Ketika ditumbuhkan dalam cawan petri, bakteri strain R membentuk koloni, atau rumpun bakteri terkait, yang memiliki tepi yang jelas dan penampilan yang kasar (karenanya disingkat "R"). Bakteri strain R bersifat nonvirulen, artinya tidak menyebabkan penyakit saat disuntikkan ke mencit (mencitnya tetap hidup).

Strain S. Bakteri strain S membentuk koloni yang membulat dan halus (makanya disingkat "S"). Penampilan halus itu disebabkan oleh polisakarida, atau lapisan gula yang diproduksi oleh bakteri. Mantel ini melindungi bakteri strain S dari sistem kekebalan tikus, membuatnya virulen (mampu menyebabkan penyakit), mencit yang disuntik dengan strain S, mencitnya mati. Sebagai bagian dari eksperimennya, Griffith mencoba menyuntikkan tikus dengan bakteri strain S yang dimatikan dengan panas (yaitu, bakteri strain S yang telah dipanaskan hingga suhu

tinggi, menyebabkan sel-sel mati). Tidak mengherankan, bakteri strain S yang dibunuh dengan pemanasan tidak menyebabkan penyakit pada mencit (mencit tetap hidup). Selanjutnya eksperimen menghasilkan hal yang tidak terduga, ketika bakteri strain R yang tidak virulen digabungkan dengan bakteri strain S yang telah dipanaskan kemudian disuntikkan ke mencit. Hasilnya mencit tidak hanya menderita *pneumonia* dan mati, tetapi ketika Griffith mengambil sampel darah dari mencit yang mati, ia menemukan bahwa itu mengandung bakteri S hidup. Griffith menyimpulkan bahwa bakteri strain R pasti telah mengambil apa yang disebutnya "prinsip transformasi" dari bakteri S yang mati dengan pemanasan, yang memungkinkan strain R untuk "berubah" menjadi bakteri berlapis halus dan menjadi virulen.

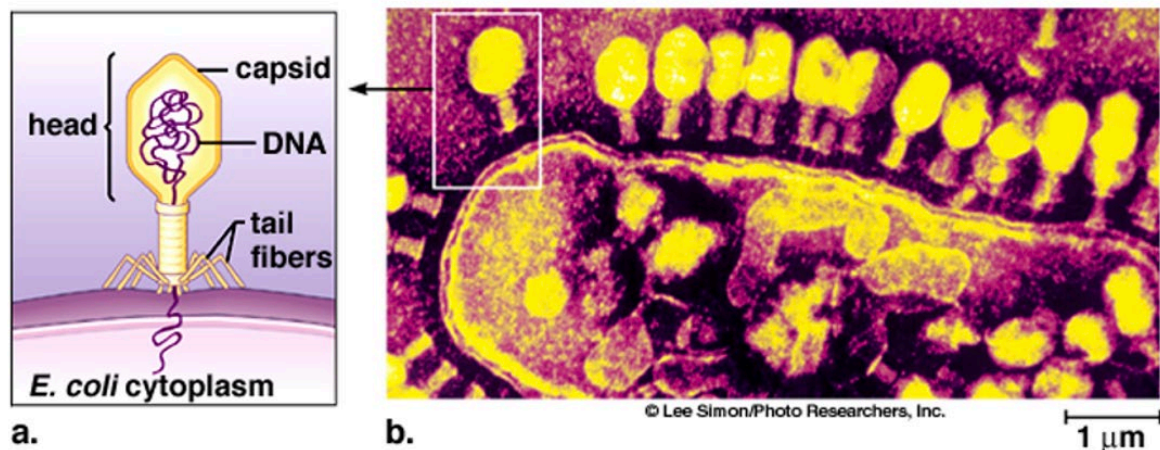
Pada tahun 1944, tiga peneliti Kanada dan Amerika, Oswald Avery, Maclyn McCarty, dan Colin MacLeod, mulai mengidentifikasi "prinsip transformasi" Griffith. Untuk melakukannya, mereka mulai dengan kultur besar sel S yang mati karena panas dan, melalui serangkaian langkah biokimia (ditentukan oleh eksperimen yang cermat, secara progresif memurnikan prinsip transformasi dengan mengisolasi, memisahkan, atau secara enzimatik menghancurkan komponen seluler lainnya. Dengan metode ini, mereka dapat memperoleh sejumlah kecil prinsip transformasi yang sangat murni, yang kemudian dapat mereka analisis melalui pengujian lain untuk menentukan identitasnya. Zat yang dimurnikan memberikan hasil negatif untuk mendeteksi protein, tetapi positif untuk mendeteksi DNA. Komposisi unsur dari prinsip transformasi yang dimurnikan sangat mirip dengan DNA dalam rasio nitrogen dan fosfornya.

Enzim pendegradasi protein dan RNA memiliki sedikit efek pada prinsip transformasi, tetapi enzim yang mampu mendegradasi DNA menghilangkan aktivitas transformasi. Semua hasil ini menunjuk pada DNA sebagai prinsip transformasi yang mungkin. Namun, Avery berhati-hati dalam menafsirkan hasilnya. Dia menyadari bahwa masih mungkin bahwa beberapa zat pencemar yang ada dalam jumlah kecil, bukan DNA adalah prinsip transformasi yang sebenarnya. Karena kemungkinan ini, perdebatan mengenai peran DNA berlanjut hingga tahun 1952, ketika Alfred Hershey

dan Martha Chase menggunakan pendekatan berbeda untuk mengidentifikasi DNA secara meyakinkan sebagai materi genetik.

Eksperimen Hershey dan Chase mempelajari bakteriofag, atau virus yang menyerang bakteri. Faga yang mereka gunakan adalah partikel sederhana yang terdiri dari protein dan DNA, dengan struktur luar terbuat dari protein dan inti dalam terdiri dari DNA. Hershey dan Chase tahu bahwa faga menempel pada permukaan sel bakteri inang dan menyuntikkan beberapa zat (baik DNA atau protein) ke dalam inang. Zat ini memberi "instruksi" yang menyebabkan bakteri inang mulai membuat banyak faga, dengan kata lain itu adalah materi genetik faga.

Bakteriofaga dan Bakteri

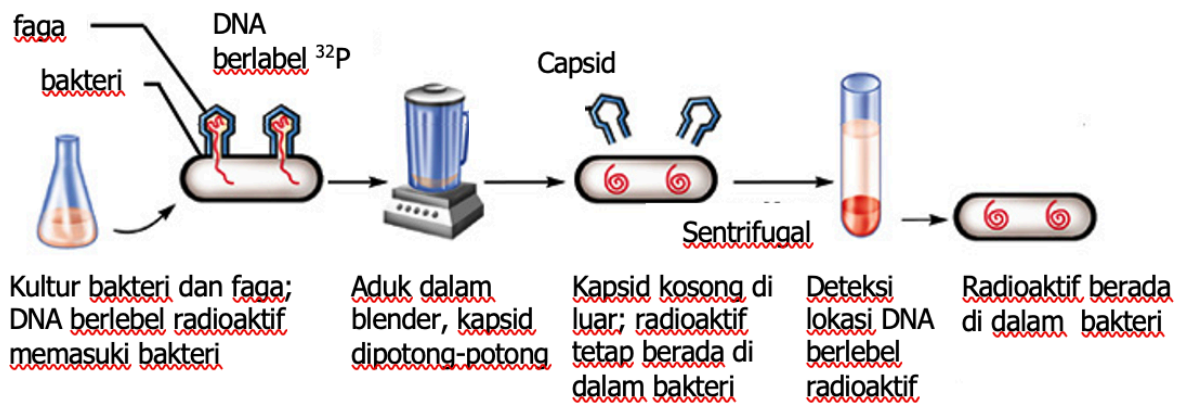


Gambar 40 Bakteriofaga dan Bakteri

Untuk menentukan apakah faga menyuntikkan DNA atau protein ke dalam bakteri inang, faga diproduksi dengan adanya unsur radioaktif tertentu, yang dimasukkan ke dalam makromolekul (DNA dan protein) yang membentuk faga.

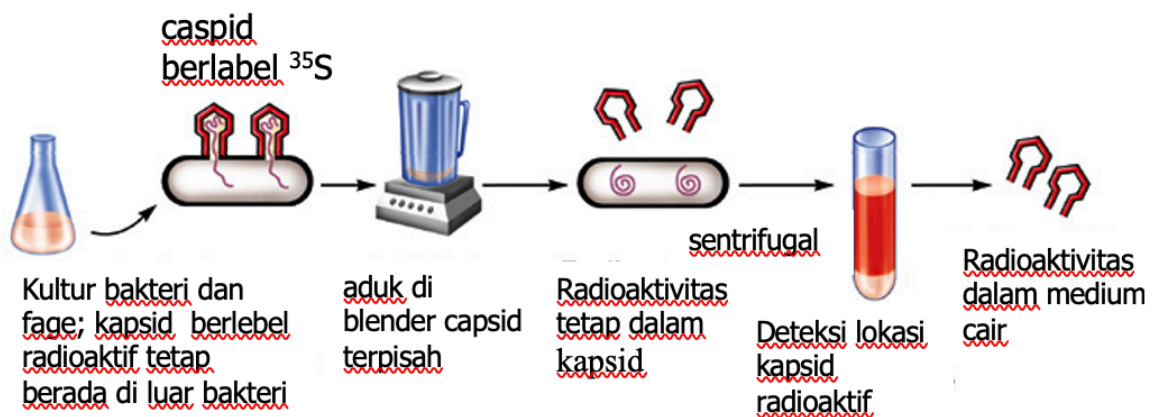
Satu sampel diproduksi dengan adanya ^{35}S , isotop radioaktif belerang. Sulfur ditemukan di banyak protein dan tidak ada dalam DNA, jadi hanya protein faga yang diberi label radioaktif oleh perlakuan ini. Sampel lainnya diproduksi dengan adanya ^{32}P , isotop radioaktif fosfor. Fosfor ditemukan dalam DNA dan bukan dalam protein, jadi hanya DNA faga (dan bukan protein faga) yang diberi label radioaktif oleh

perlakuan ini. Setiap batch faga digunakan untuk menginfeksi kultur bakteri yang berbeda. Setelah infeksi terjadi, setiap biakan dipecah dalam blender, menghilangkan sisa faga dan bagian faga dari bagian luar sel bakteri. Akhirnya, biakan disentrifugasi, atau diputar dengan kecepatan tinggi, untuk memisahkan bakteri dari puing-puing faga. Sentrifugasi menyebabkan material yang lebih berat, seperti bakteri, bergerak ke dasar tabung dan membentuk gumpalan yang disebut pelet. Bahan yang lebih ringan, seperti media (kaldu) yang digunakan untuk menumbuhkan kultur, bersama dengan faga dan bagian faga, tetap berada di dekat bagian atas tabung dan membentuk lapisan cair yang disebut supernatan.



a. DNA virus diberi label (merah)

Gambar 41 Eksperimen Hershey dan Chase dengan pelebela DNA

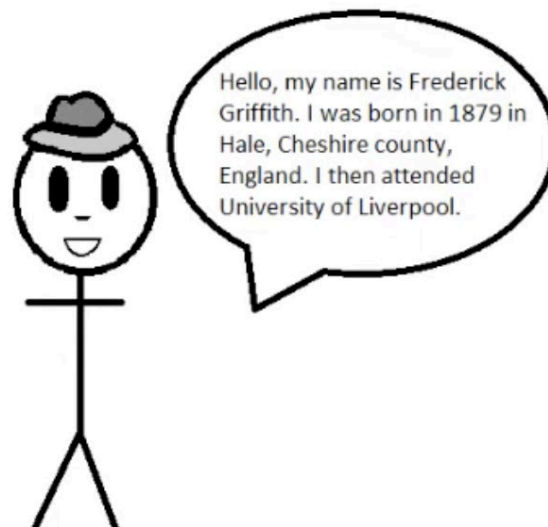


b. Kapsid virus diberi label (merah)

Gambar 42 Eksperimen Hershey dan Chase dengan pelebela pada caspid

Ketika Hershey dan Chase mengukur radioaktivitas dalam pelet dan supernatan dari kedua percobaan mereka, mereka menemukan bahwa sejumlah besar ^{32}P , muncul di pelet, sedangkan hampir semua ^{35}S muncul di supernatant. Berdasarkan eksperimen ini dan eksperimen serupa, Hershey dan Chase menyimpulkan bahwa DNA, bukan protein disuntikkan ke dalam sel inang dan membentuk materi genetik faga.

Adapun penjelasan animasi tentang DNA sebagai materi genetik dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.



Gambar 43 Eksperimen Griffith
Sumber: https://youtu.be/t9xBHPz_3ro

Berdasarkan materi dan video pembelajaran pada pokok bahasan Asam Nukleat yang telah disajikan; Identifikasilah senyawa-senyawa yang menyusun asam nukleat? Bagaimana senyawa penyusun asam nukleat berfungsi? Dari tayangan percobaan Grififith apa yang saudara dapat analisis? Selanjutnya dari percobaan Matthew Meselson and Franklin Stahl apa yang dapat saudara analisis?

2. PENCETUSAN IDE

Pahamilah orientasi di atas yang telah disajikan, kemudian diskusikanlah dengan kelompok saudara hal-hal berikut ini: Setelah saudara cermati materi di atas, dimanakah letak DNA pada organisme eukaryot maupun prokaryot? apa perbedaannya? Bagaimana penjelasan dari percobaan Grififith, dan penjelasan dari percobaan Matthew Meselson and Franklin Stahl? Kemudian bahaslah pada Lembar Kerja Mahasiswa (LKM) yang telah disediakan.

3. PENSTRUKTURAN IDE

Hasil pencetusan ide bersama dengan kelompok saudara rancanglah proyek tentang asam nukleat. Bahaslah naskah rancangan tersebut tulislah/gambarkan/skenariokan tentang asam nukleat. Mengapa DNA itu sangat penting bagi mahluk hidup? Mengapa Grifith melakukan percobaan tersebut? Mengapa pada percobaan Matthew Meselson and Franklin Stahl menggunakan radio aktif? Bahaslah bahan dan alat yang digunakan untuk menyelesaikan proyek tersebut.

4. APLIKASI

Berdasarkan rancangan yang telah di buat, bersama kelompok saudara lakukan pembuatan video pembelajaran asam nukleat. Proyek dilakukan di luar jam kuliah, sesuai operasional prosedur Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unsri. Lakukanlah proyek tersebut semenarik mungkin. Lakukanlah kolaborasi bersama teman- teman saudara dalam menyelesaikan proyek tersebut. Kemudian setelah selesai pembuatan video tersebut, bahaslah hal-hal berikut ini.

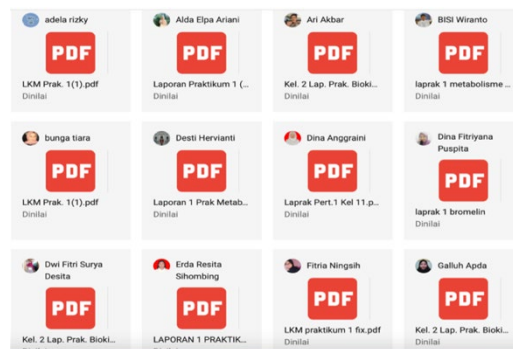
- 1) Bagaimana monomer nukleotida tersebut membentuk struktur DNA dan RNA?
- 2) Mengapa DNA dikatakan sebagai Materi Genetik?
- 3) Mengapa replikasi terjadi secara semi konservatif

- 4) Bagaimana Polymarase Chain Reaction (PCR) memperbanyak DNA secara in vitro?

5. REFLEKSI

Selanjutnya hasil elaborasi dengan dosen, saat proses pembelajaran jika ada perbaikan ditindaklanjuti dengan perbaikan, kemudian dituangkan dalam "Laporan 8 Asam Nukleat". Laporan tersebut di buat sesuai dengan format Lembar Kerja Mahasiswa yang telah di sediakan, kemudian di submit ke <https://elearning.unsri.ac.id>

Contoh submit laporan 8 Asam Nukleat.

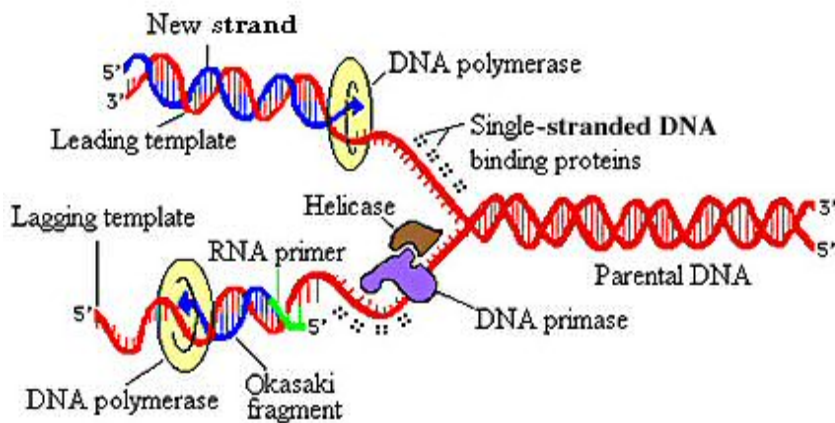


Gambar 44. Submit Laporan 8 Asam Nukleat

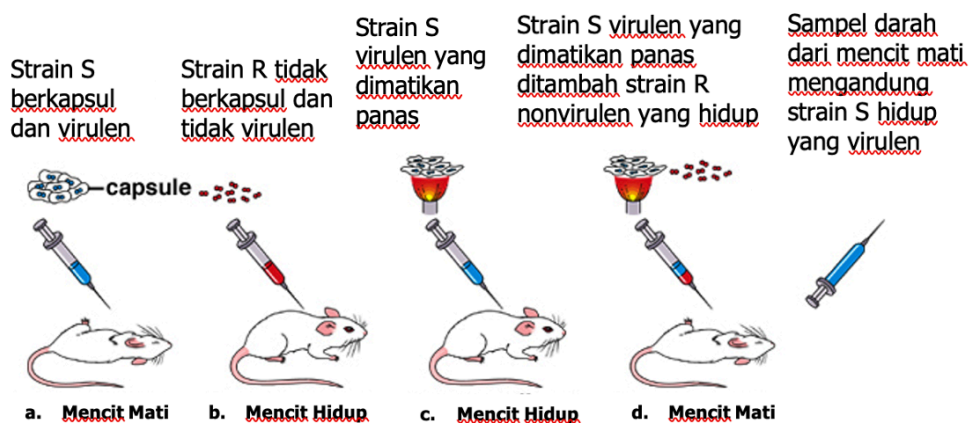
Laporan 8 asam nukleat minimal memuat hal-hal sebagai berikut yaitu: orientasi, pencetusan ide, penstrukturan ide, aplikasi, refleksi, dan daftar pustaka.

Latihan Soal

1. Jelaskan dan gambarkan struktur doble heliks menurut Watson dan Crick?
2. Jelaskan perbedaan struktur A DNA, B DNA dan heliks Z kiri?
3. Jelaskan proses terjadinya replikasi secara in vivo.
4. Jelaskan proses terjadinya replikasi secara in vivo.



5. Jelaskan DNA Sebagai materi genetik?



6. Jelaskan bagaimana DNA dapat melakukan proses transformasi ke dalam sel inang?
7. Kimia Nukleotida sel-sel dari banyak eukariotik organisme memiliki sistem yang sangat khusus yang secara khusus memperbaiki ketidakcocokan G-T dalam DNA. Ketidakcocokan diperbaiki untuk membentuk pasangan basa $G \cong C$ (bukan $A = T$). Mekanisme perbaikan ketidakcocokan G-T ini terjadi di samping sistem yang lebih umum yang memperbaiki hampir semua ketidakcocokan. Bisakah Anda menyarankan mengapa sel memerlukan sistem khusus untuk memperbaiki ketidakcocokan G-T?

DAFTAR PUSTAKA

1. Adam, R.L.P., Knowler, J.T., Leader, D.P. 1986. *The Biochemistry of the Nucleic Acids Tenth edition*. New York: Chapman and Hall Ltd.
2. Brown, T. A. 2011. *Introduction to genetics: A molecular approach*. New York: Garland Publishing.
3. <http://mcb.berkeley.edu> > mcb110 > Albertsch05. *Dna Replication, Repair, And Recombination* diakses pada tanggal 4 Desember 2022.
4. https://youtu.be/o_-6JXLYS-k. *The Structure of DNA*. Diakses pada tanggal 6 September 2019.
5. <https://youtu.be/mxAjSBhDkBQ>. *DNA Replication Process 3D Animation*. Diakses pada tanggal 6 September 2019.
6. <https://youtu.be/iQsu3Kz9NYo>. *PCR - Polymerase Chain Reaction (IQOG-CSIC)*. Diakses pada tanggal 6 September 2019.
7. https://youtu.be/t9xBHPz_3ro. *Griffith and Avery Stick Figure Movie*. Diakses pada tanggal 6 September 2019.
8. <https://www.gbiosciences.com> > BE-305_protocol . *Polymerase Chain Reaction (PCR) - G-Biosciences*. Diakses pada tanggal 25 Januari 2022.
9. Malayny, C., Rice, C., Ruckpaul, B., Specker, J., Thibodeau, A. *Structure & History of DNA. Structure & History of DNA*. Diakses pada tanggal 25 Januari 2022.
10. Nelson, D.L., Cox, M.M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry sixth edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
11. Pray, L.A. 2008. Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. *Nature Education* 1(1):100.
12. Sukaryawan, M., 1998. *Konstruksi Koleksi Parsial Genom dan Urutan Nukleotida Sebagian Gen ruvB Salmonella Typhimurium* Bandung: ITB.
13. Sukaryawan, M. 2004. *Biokimia*. Indralaya: Prodi Pendidikan Kimia FKIP Unsri
14. Sukaryawan, M., Sari, D.K. 2022. *Buku Ajar Biokimia1 berbasis Kostruktivisme Lima Fhasa Needham*. Palembang: Bening
15. Thenawidjaja, M. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga
16. Ussery, D.W. 2002. *DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families*. Denmark: Macmillan Publishers Ltd.
17. Watson, DJ., Tooze, J., Kurtz, DT. 1998. *DNA Recombinant*. Jakarta: Erlangga

BAB 20 EKSPRESI GENETIK

1. ORIENTASI

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah yang direncanakan adalah mahasiswa menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah (CPMK3). Sedangkan kemampuan akhir pada pokok bahasan ini adalah mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi gen, genom, kromosom, kode genetik, transkripsi dan translasi (Sub-CPMK3). Pengalaman belajar yang diperoleh mahasiswa merencanakan, melaksanakan dan melaporkan proyek, presentasi tugas kelompok, mengerjakan lembar kerja mahasiswa, membuat dan mensubmit Laporan di <https://elearning.unsri.ac.id>

A. GEN

Gen adalah urutan DNA yang memiliki informasi genetik mengkode untuk sintesis protein dan RNA. Secara klasik, gen didefinisikan sebagai bagian dari kromosom yang menentukan atau mempengaruhi satu karakter atau fenotipe (properti yang terlihat), seperti warna mata. George Beadle dan Edward Tatum mengusulkan definisi molekuler dari sebuah gen pada tahun 1940. Setelah mengekspos spora jamur *Neurospora crassa* ke sinar x dan agen lain yang diketahui merusak DNA dan menyebabkan perubahan dalam urutan DNA (mutasi), mereka mendeteksi strain jamur mutan yang kekurangan satu atau enzim lain tertentu, kadang-kadang mengakibatkan kegagalan seluruh jalur metabolisme. Beadle dan Tatum menyimpulkan bahwa gen adalah segmen materi genetik yang menentukan atau mengkode satu enzim: hipotesis satu gen-satu enzim. Kemudian konsep ini diperluas menjadi satu gen-satu polipeptida, karena banyak gen mengkode protein yang bukan enzim atau untuk satu polipeptida dari protein multisubunit.

Definisi biokimia modern dari sebuah gen bahkan lebih tepat. Gen adalah semua DNA yang mengkodekan urutan primer dari beberapa produk gen akhir, yang dapat berupa polipeptida atau RNA dengan fungsi struktural atau katalitik. DNA juga

mengandung segmen atau urutan lain yang memiliki fungsi pengaturan atau regulasi. Urutan regulasi memberikan sinyal yang dapat menunjukkan awal atau akhir gen, atau mempengaruhi transkripsi gen, atau berfungsi sebagai titik inisiasi untuk replikasi atau rekombinasi. Beberapa gen dapat diekspresikan dengan cara yang berbeda untuk menghasilkan banyak produk gen dari satu segmen DNA.

Berapa banyak gen dalam satu kromosom? Kromosom *Escherichia coli*, salah satu genom prokariotik yang telah diurutkan secara lengkap, adalah molekul DNA sirkular dengan 4.639.221 bp. Pasangan basa ini mengkodekan sekitar 4.300 gen untuk protein dan 115 gen lainnya untuk molekul RNA yang stabil. Di antara eukariota, sekitar 3,2 miliar pasangan basa genom manusia mencakup 30.000 hingga 35.000 gen pada 24 kromosom berbeda. Banyak spesies bakteri hanya memiliki satu kromosom per sel dan, dalam hampir semua kasus, setiap kromosom hanya berisi satu salinan dari setiap gen. Sangat sedikit gen, seperti untuk rRNA, diulang beberapa kali. Gen dan sekuens pengatur bertanggung jawab atas hampir semua DNA pada prokariota. Selain itu, hampir setiap gen persis kolinear dengan urutan asam amino (atau urutan RNA) yang dikodekannya. Organisasi gen dalam DNA eukariotik secara struktural dan fungsional jauh lebih kompleks. Studi tentang struktur kromosom eukariotik, dan baru-baru ini pengurutan seluruh genom eukariotik, telah menghasilkan banyak kejutan. Sebagian besar gen eukariotik memiliki ciri struktural yang khas dan membingungkan: urutan nukleotidanya mengandung satu atau lebih segmen DNA yang tidak mengkode urutan asam amino dari produk polipeptida. Sisipan yang tidak diterjemahkan ini mengganggu hubungan kolinear antara urutan nukleotida gen dan urutan asam amino dari polipeptida yang dikodekannya. Segmen DNA yang tidak diterjemahkan seperti itu dalam gen disebut urutan intervening atau intron, dan segmen pengkodean disebut ekson. Beberapa gen prokariotik mengandung intron.

Pada eukariota yang lebih tinggi, tipikal gen memiliki lebih banyak urutan intron daripada urutan yang dikhususkan untuk ekson. Misalnya, dalam pengkodean gen untuk rantai polipeptida tunggal ovalbumin protein telur unggas, intron jauh lebih panjangnya daripada ekson; semuanya, tujuh intron membentuk 85% dari DNA gen.

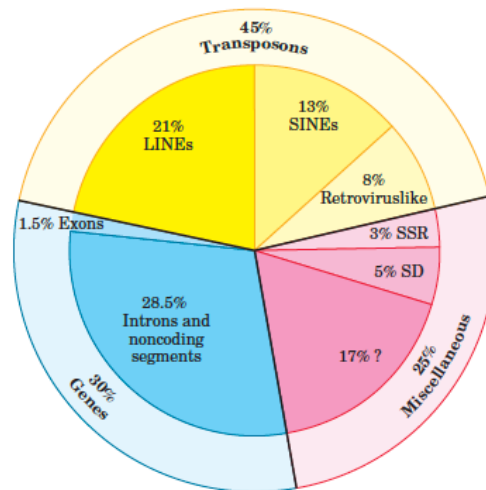
Dalam gen untuk subunit hemoglobin, satu intron mengandung lebih dari setengah DNA gen. Gen untuk protein otot titin adalah intron champion, dengan 178 intron. Gen untuk histon tampaknya tidak memiliki intron. Dalam kebanyakan kasus fungsi intron tidak jelas. Secara total, hanya sekitar 1,5% DNA manusia yang "mengkode" atau DNA ekson, membawa informasi untuk produk protein atau RNA. Namun, ketika intron yang jauh lebih besar dimasukkan dalam hitungan, sebanyak 30% genom manusia terdiri dari gen.

Kekurangan relatif gen dalam genom manusia membuat banyak DNA tidak diketahui. Sebagian besar DNA non gen berbentuk sekuens berulang dari beberapa jenis. Mungkin yang paling mengejutkan, sekitar setengah genom manusia terdiri dari urutan berulang sedang yang diturunkan dari elemen transposon-segmen DNA, mulai dari beberapa ratus hingga beberapa ribu pasangan basa, yang dapat berpindah dari satu lokasi ke lokasi lain dalam genom. Elemen transposon adalah sejenis parasit molekuler, yang secara efisien membuat rumah di dalam genom inang.

Banyak yang memiliki gen yang mengkode protein yang mengkatalisis proses transposisi. Beberapa transposon dalam genom manusia aktif, bergerak pada frekuensi rendah, tetapi sebagian besar merupakan peninggalan tidak aktif, yang diubah secara evolusioner oleh mutasi. Meskipun unsur-unsur ini umumnya tidak mengkodekan protein atau RNA yang digunakan dalam sel manusia, mereka telah memainkan peran utama dalam evolusi manusia: pergerakan transposon dapat menyebabkan redistribusi urutan genomik lainnya.

Sekitar 3% genom manusia lainnya terdiri dari urutan yang sangat berulang, juga disebut sebagai DNA urutan sederhana atau pengulangan urutan sederhana (*simple sequence repeats*) atau (SSR). Urutan pendek ini, umumnya kurang dari 10 bp, kadang-kadang diulang jutaan kali per sel. DNA sekuens sederhana juga disebut DNA satelit, dinamakan demikian karena komposisi basanya yang tidak biasa sering menyebabkannya bermigrasi sebagai pita "satelit" (terpisah dari sisa DNA) ketika sampel DNA seluler yang terfragmentasi disentrifugasi dalam cesium klorida. Studi menunjukkan bahwa DNA urutan sederhana tidak mengkodekan protein atau RNA.

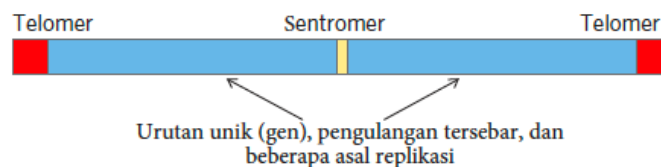
Tidak seperti elemen transposon, DNA yang sangat berulang dapat memiliki kepentingan fungsional yang dapat diidentifikasi dalam metabolisme sel manusia, karena sebagian besar terkait dengan dua fitur yang menentukan dari kromosom eukariotik: sentromer dan telomer.



Gambar 45 Jenis urutan dalam genom manusia
(Sumber: Nelson & Cox, 2013)

Diagram lingkaran ini membagi genom menjadi transposon (elemen transposable), gen, dan urutan lain-lain. Ada empat kelas utama transposon. Elemen diselingi panjang (LINE), panjang 6 hingga 8 kbp (1 kbp = 1.000 bp), biasanya mencakup beberapa gen yang mengkode protein yang mengkatalisasi transposisi. Genom memiliki sekitar 850.000 GARIS. Elemen pendek (SINEs) panjangnya sekitar 100 hingga 300 bp. Dari 1,5 juta dalam genom manusia, lebih dari 1 juta adalah elemen Alu, disebut demikian karena mereka umumnya menyertakan satu salinan urutan pengenalan untuk AluI, restriksi endonuklease. Genom juga mengandung 450.000 salinan transposon mirip retrovirus, panjangnya 1,5 hingga 11 kbp. Meskipun ini "terperangkap" dalam genom dan tidak dapat berpindah dari satu sel ke sel lain, mereka secara evolusioner terkait dengan retrovirus, yang mencakup HIV. Kelas akhir transposon (menjadi 1% dan tidak ditampilkan di sini) terdiri dari berbagai sisa transposon yang panjangnya sangat berbeda. Sekitar 30% genom terdiri dari sekuens yang termasuk dalam gen untuk protein, tetapi hanya sebagian kecil dari DNA ini yang berada dalam ekson (sekuens pengkodean). Sekuens lain-lain termasuk urutan sederhana berulang (simple sequence repeats atau SSR) dan duplikasi

segmental besar (*segmental duplications*) atau (SD), yang terakhir adalah segmen yang muncul lebih dari sekali di lokasi yang berbeda. Di antara elemen urutan yang tidak terdaftar (dilambangkan dengan tanda tanya) adalah gen yang mengkode RNA (yang bisa lebih sulit untuk diidentifikasi daripada gen untuk protein) dan sisa-sisa transposon yang telah diubah secara evolusioner sehingga sekarang sulit untuk diidentifikasi.



Gambar 46 Urutan unik (gen), pengulangan tersebar, dan beberapa asal replikasi (Sumber: Nelson & Cox, 2013)

Sentromer (Gbr 46) adalah urutan DNA yang berfungsi selama pembelahan sel sebagai titik perlekatan protein yang menghubungkan kromosom dengan gelendong mitotik. Keterikatan ini penting untuk distribusi set kromosom yang merata dan teratur ke sel anak. Sentromer *Saccharomyces cerevisiae* telah diisolasi dan dipelajari. Urutan penting untuk fungsi sentromer panjangnya sekitar 130 bp dan sangat kaya akan pasangan A=T. Urutan sentromer dari eukariota yang lebih tinggi jauh lebih panjang dan, tidak seperti ragi, umumnya mengandung DNA urutan sederhana, yang terdiri dari ribuan salinan tandem dari satu atau beberapa urutan pendek 5 sampai 10 bp, dalam urutan yang sama. orientasi. Peran yang tepat dari DNA urutan sederhana dalam fungsi sentromer belum dipahami.

Telomer (bahasa Yunani telos, "akhir") adalah urutan di ujung kromosom eukariotik yang membantu menstabilkan kromosom. Telomere yang memiliki karakter terbaik adalah yang dimiliki oleh eukariota yang lebih sederhana. Telomer ragi berakhir dengan sekitar 100 bp dari urutan bentuk yang diulang secara tidak tepat.

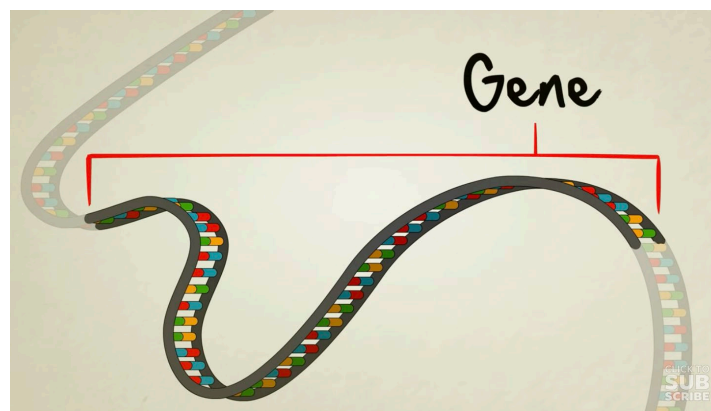
(5') (TxGy)n

(3') (AxCy)n

di mana x dan y umumnya antara 1 dan 4. Jumlah pengulangan telomer, n, berada dalam kisaran 20 hingga 100 untuk sebagian besar eukariota bersel tunggal dan

umumnya lebih dari 1.500 pada mamalia. Ujung molekul DNA linier tidak dapat direplikasi secara rutin oleh mesin replikasi seluler (yang mungkin menjadi salah satu alasan mengapa molekul DNA bakteri berbentuk lingkaran). Urutan telomer berulang ditambahkan ke ujung kromosom eukariotik terutama oleh enzim telomerase.

Gen adalah urutan DNA yang memiliki informasi genetik mengkode untuk sintesis protein dan RNA.. Selain gen, kromosom mengandung berbagai urutan pengaturan yang terlibat dalam replikasi, transkripsi, dan proses lainnya. Molekul DNA dan RNA genom umumnya lebih panjang dari partikel virus atau sel yang mengandungnya. Banyak gen dalam sel eukariotik, dan sedikit pada bakteri, diinterupsi oleh urutan non kode yang disebut intron. Segmen pengkodean yang dipisahkan oleh intron disebut ekson. Kurang dari sepertiga DNA genom manusia terdiri dari gen. Sebagian besar sisanya terdiri dari urutan berulang dari berbagai jenis. Parasit asam nukleat yang dikenal sebagai transposon menyumbang sekitar setengah dari genom manusia. Kumpulan gen dalam DNA disebut genom. Kromosom eukariotik memiliki dua sekuens DNA berulang dengan fungsi khusus yang penting: sentromer, yang merupakan titik perlekatan untuk gelendong mitosis, dan telomer, yang terletak di ujung kromosom. Adapun penjelasan animasi tentang gen dan genom dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.

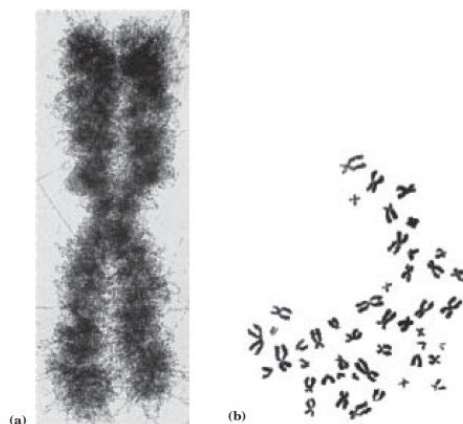


Gambar 47 Gen dan Genom
Sumber: <https://youtu.be/5MQdXjRPHmQ>

B. KROMOSOM

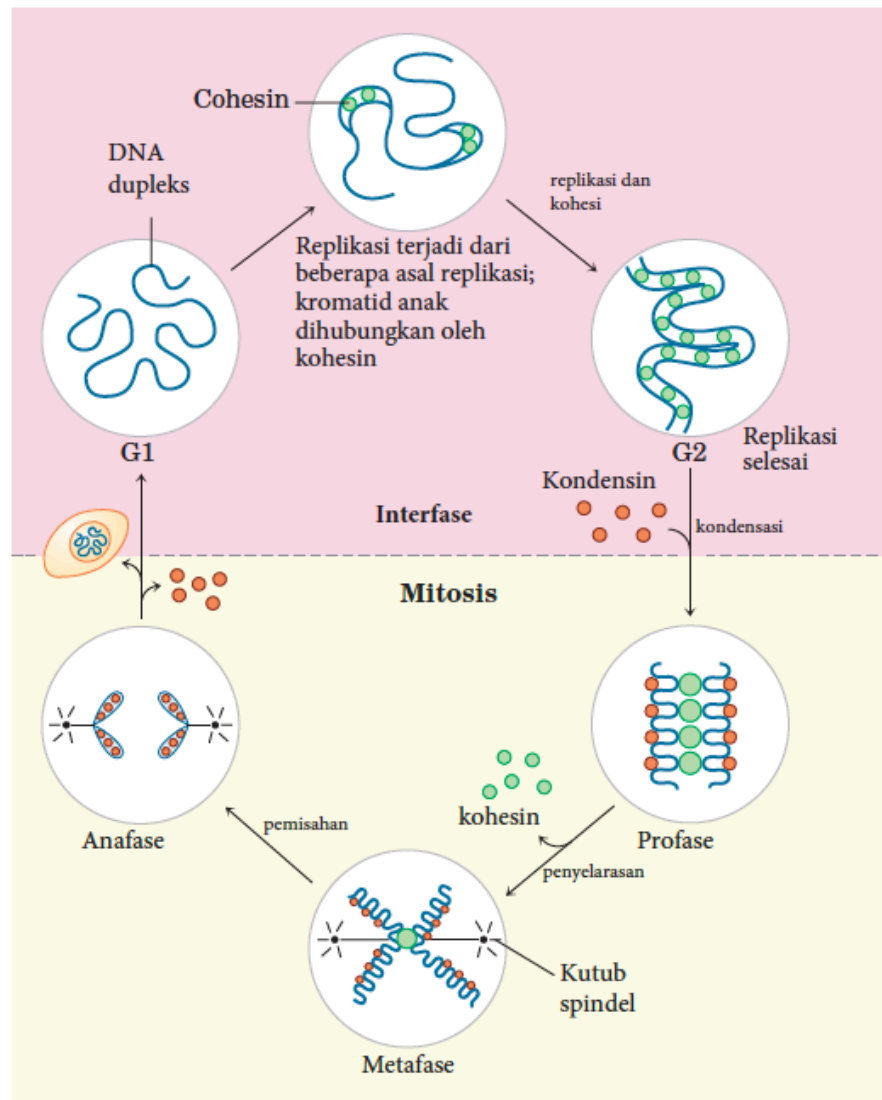
Istilah "kromosom" digunakan untuk merujuk pada molekul asam nukleat yang merupakan gudang informasi genetik dalam virus, bakteri, sel eukariotik. Pada sel eukariotik kromosom mengandung protein histon yang mengikat dan memadatkan struktur molekul DNA. Siklus sel eukariotik menghasilkan perubahan yang mencolok dalam struktur kromosom. Dalam sel eukariotik yang tidak membelah (dalam G₀) dan sel-sel dalam interfase (G₁, S, dan G₂), bahan kromosom, kromatin, bersifat amorf dan tampaknya tersebar secara acak di bagian-bagian tertentu dari nukleus. Pada fase S interfase, DNA dalam keadaan amorf ini bereplikasi, setiap kromosom menghasilkan dua anak kromosom (disebut kromatid anak) yang tetap berhubungan satu sama lain, setelah replikasi selesai kromosom menjadi jauh lebih padat selama profase mitosis, mengambil bentuk sejumlah spesies spesifik dari pasangan kromatid.

Kromatin adalah kompleks yang terdiri dari serat yang mengandung protein dan DNA dalam massa yang kira-kira sama, bersama dengan sejumlah kecil RNA. DNA dalam kromatin sangat erat terkait dengan protein yang disebut histon, yang mengemas dan menyusun DNA menjadi unit struktural yang disebut nukleosom. Juga ditemukan dalam kromatin banyak protein non histon, beberapa di antaranya membantu mempertahankan struktur kromosom, yang lain mengatur ekspresi gen tertentu. Dimulai dengan nukleosom, DNA kromosom eukariotik dikemas ke dalam suksesi struktur tingkat tinggi yang pada akhirnya menghasilkan kromosom kompak yang terlihat dengan mikroskop cahaya.



Gambar 48 Kromosom eukariotik
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

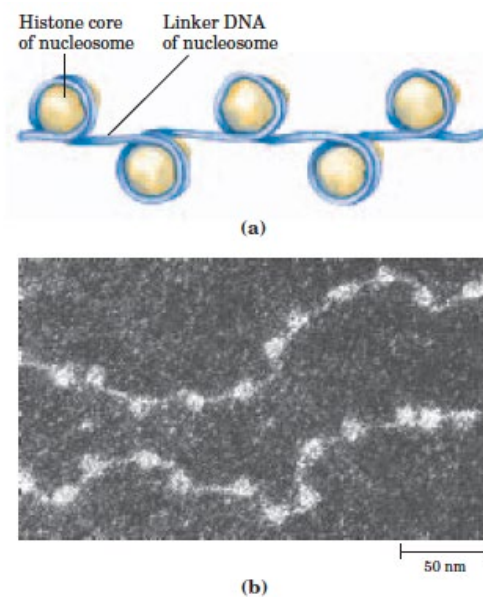
Pada gambar 48 (a) Sepasang kromatid anak yang terkait dan terkondensasi dari kromosom manusia. Kromosom eukariotik berada dalam keadaan ini setelah replikasi dan pada metafase selama mitosis. (b) Ada 46 kromosom di setiap sel somatik manusia normal.



Gambar 49 Perubahan struktur kromosom selama siklus sel eukariotik (Sumber: Nelson & Cox, 2004)

DNA seluler tidak terkondensasi sepanjang interfase. Periode interfase dapat dibagi lagi menjadi fase G1 (celah); fase S (sintesis), ketika DNA direplikasi; dan fase G2, di mana kromosom yang direplikasi saling menempel satu sama lain. DNA mengalami kondensasi dalam profase mitosis. Kohesin (hijau) dan kondensin (merah) adalah protein yang terlibat dalam kohesi dan kondensasi. Arsitektur kompleks kohesin-

kondensin-DNA belum ditetapkan, dan interaksi yang ditunjukkan di sini adalah kiasan, hanya menunjukkan peran mereka dalam kondensasi kromosom. Selama metafase, kromosom yang terkondensasi berbaris di sepanjang bidang di tengah antara kutub gelendong. Satu kromosom dari setiap pasangan dihubungkan ke setiap kutub gelendong melalui mikrotubulus yang memanjang antara gelendong dan sentromer. Kromatid anak terpisah pada anafase, masing-masing ditarik ke arah kutub gelendong yang terhubung. Setelah pembelahan sel selesai, kromosom mengalami dekondensasi dan siklus dimulai lagi.



Gambar 50 Nukleosom
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

Nukleosom dengan jarak teratur terdiri dari kompleks histon yang terikat pada DNA. (a) Ilustrasi skema dan (b) mikrograf elektron.

Protein histon ditemukan dalam kromatin semua sel eukariotik, histon memiliki berat molekul antara 11.000 dan 21.000 dan sangat kaya akan asam amino arginin dan lisin (bersama-sama membentuk sekitar seperempat dari residu asam amino). Semua sel eukariotik memiliki lima kelas utama histon, berbeda dalam berat molekul dan komposisi asam amino (tabel 2). Histon H3 hampir identik dalam urutan asam amino di semua eukariota, seperti halnya histon H4, menunjukkan konservasi ketat fungsinya. Misalnya, hanya 2 dari 102 residu asam amino yang berbeda antara molekul histon H4 kacang polong dan sapi, dan hanya 8 yang berbeda antara histon

H4 manusia dan ragi. Histon H1, H2A, dan H2B menunjukkan kesamaan urutan yang lebih sedikit di antara spesies eukariotik. Setiap jenis histon memiliki bentuk yang bervariasi, karena rantai samping asam amino tertentu dimodifikasi secara enzimatik dengan metilasi, ribosilasi ADP, fosforilasi, glikosilasi, atau asetilasi. Modifikasi tersebut mempengaruhi muatan listrik bersih, bentuk, dan sifat lain dari histon, serta sifat struktural dan fungsional dari kromatin, dan mereka memainkan peran dalam regulasi transkripsi.

Tabel 2 Jenis dan sifat Histon

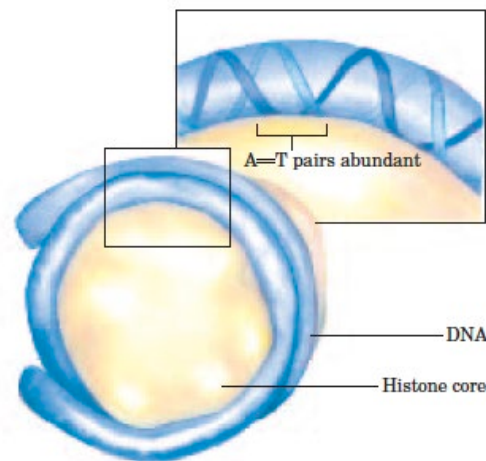
<i>Histone</i>	<i>Molecular weight</i>	<i>Number of amino acid residues</i>	<i>Content of basic amino acids (% of total)</i>	
			<i>Lys</i>	<i>Arg</i>
H1*	21,130	223	29.5	11.3
H2A*	13,960	129	10.9	19.3
H2B*	13,774	125	16.0	16.4
H3	15,273	135	19.6	13.3
H4	11,236	102	10.8	13.7

(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

Nukleosom adalah organisasi fundamental satuan kromatin. Kromosom eukariotik digambarkan pada Gambar 48 mewakili pemadatan molekul DNA sekitar $10^5 \mu\text{m}$ panjang ke dalam inti sel yang biasanya diameternya 5 sampai $10 \mu\text{m}$. Pemadatan ini melibatkan beberapa tingkat pelipatan yang sangat terorganisir. Kromosom pada saat tidak berlipat menunjukkan struktur di mana DNA terikat erat pada manik-manik protein, seringkali berjarak teratur. Manik-manik dalam susunan "manik-manik-pada-string" ini adalah kompleks histon dan DNA. Manik-manik ditambah DNA penghubung yang mengarah ke manik-manik berikutnya membentuk nukleosom, unit dasar organisasi tempat membangun pengemasan kromatin. Manik-manik setiap nukleosom mengandung delapan molekul histon: masing-masing dua salinan H2A, H2B, H3, dan H4. Jarak dari manik-manik nukleosom menyediakan unit berulang biasanya sekitar 200 bp, di mana 146 bp terikat erat di sekitar inti histon delapan bagian dan sisanya berfungsi sebagai DNA penghubung antara manik-manik nukleosom. Histon H1 berikatan dengan DNA penghubung. Perlakuan singkat kromatin dengan enzim yang mencerna DNA menyebabkan degradasi preferensial

dari DNA penghubung, melepaskan partikel histonnya yang mengandung 146 bp DNA terikat yang telah dilindungi dari pemutusan. Para peneliti telah mengkristalkan inti nukleosom yang diperoleh dengan cara ini, dan analisis difraksi sinar-x mengungkapkan sebuah partikel yang terdiri dari delapan molekul histon dengan DNA yang melilitnya dalam bentuk kumparan super solenoidal kidal.

Enzim topoisomerase telah terbukti diperlukan untuk merakit kromatin dari histon murni dan DNA sirkular tertutup *in vitro*. Faktor lain yang mempengaruhi pengikatan DNA ke histon dalam inti nukleosom adalah urutan DNA yang terikat. Inti histon tidak mengikat DNA secara acak; sebaliknya, mereka cenderung memposisikan diri di lokasi tertentu. Penempatan ini tidak sepenuhnya dipahami tetapi dalam beberapa kasus tampaknya bergantung pada kelimpahan lokal pasangan basa A=T dalam heliks DNA di mana ia bersentuhan dengan histon (Gbr. 51). Pembungkusan DNA yang rapat di sekitar inti histon nukleosom memerlukan kompresi alur kecil heliks pada titik-titik ini, dan sekelompok dua atau tiga pasangan basa A=T membuat kompresi ini lebih mungkin terjadi.



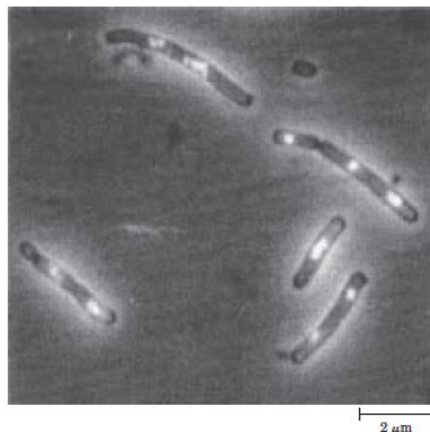
Gambar 51 Penempatan nukleosom
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

(Penempatan nukleosom untuk memanfaatkan pasangan basa A=T secara optimal di mana inti histon bersentuhan dengan alur kecil heliks DNA).

Protein lain diperlukan untuk penempatan beberapa inti nukleosom pada DNA. Dalam beberapa organisme, protein tertentu mengikat urutan DNA tertentu dan

kemudian memfasilitasi pembentukan inti nukleosom di dekatnya. Penempatan inti nukleosom yang tepat dapat berperan dalam ekspresi beberapa gen eukariotik.

DNA Bakteri Juga Sangat Terorganisir. DNA bakteri dipadatkan dalam struktur yang disebut nukleoid, yang dapat menempati sebagian besar volume sel (Gbr. 52). DNA tampaknya melekat pada satu atau lebih titik ke permukaan bagian dalam membran plasma. Lebih sedikit yang diketahui tentang struktur nukleoid daripada kromatin eukariotik. Dalam *E. coli*, struktur seperti perancah muncul untuk mengatur kromosom melingkar menjadi serangkaian domain melingkar, seperti yang dijelaskan di atas untuk kromatin. DNA bakteri tampaknya tidak memiliki struktur yang sebanding dengan organisasi lokal yang disediakan oleh nukleosom pada eukariota. Protein mirip histon berlimpah di *E. coli*-contoh yang paling baik dicirikan adalah protein dua subunit yang disebut HU (M_r 19.000), tetapi protein ini mengikat dan berdisosiasi dalam beberapa menit, dan tidak ditemukan struktur histon DNA yang teratur dan stabil.



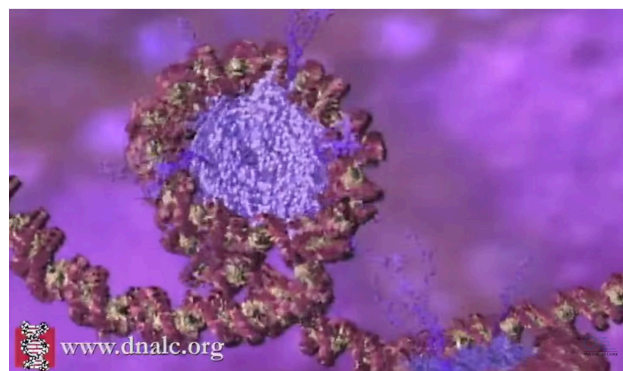
Gambar 52 Sel *E. coli* menunjukkan nukleoid.
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

DNA diwarnai dengan pewarna yang berfluoresensi saat terkena sinar UV. Area terang mendefinisikan nukleoid. Perhatikan bahwa beberapa sel telah mereplikasi DNA mereka tetapi belum mengalami pembelahan sel dan karenanya memiliki banyak nukleoid.

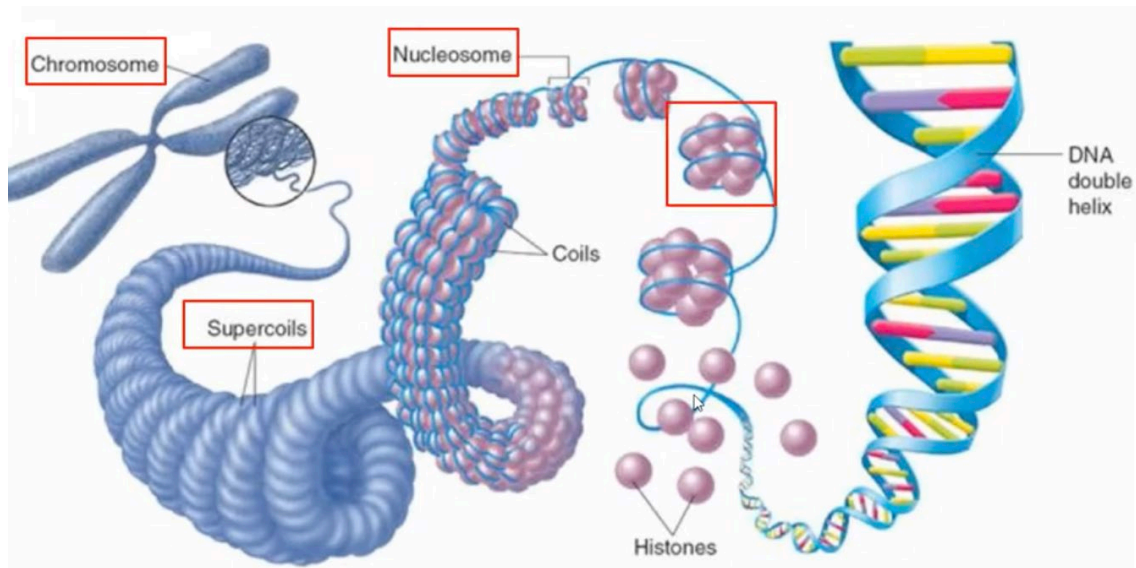
Kromosom bakteri adalah molekul yang relatif dinamis, mungkin mencerminkan persyaratan untuk akses yang lebih siap ke informasi genetiknya. Siklus pembelahan sel bakteri bisa sesingkat 15 menit, sedangkan sel eukariotik yang

khas mungkin tidak membelah selama berjam-jam atau bahkan berbulan-bulan. Selain itu, sebagian besar DNA prokariotik digunakan untuk mengkode RNA dan/atau produk protein. Tingkat metabolisme seluler yang lebih tinggi pada bakteri berarti bahwa proporsi DNA yang ditranskripsi atau direplikasi pada waktu tertentu jauh lebih tinggi daripada di sebagian besar sel eukariotik.

Unit dasar organisasi dalam kromatin sel eukariotik adalah nukleosom, yang terdiri dari histon dan segmen DNA 200 bp. Partikel protein inti yang mengandung delapan histon (masing-masing dua salinan histon H2A, H2B, H3, dan H4) dikelilingi oleh segmen DNA (sekitar 146 bp) dalam bentuk superkoil solenoidal kidal. Nukleosom disusun menjadi serat 30 nm, dan serat dilipat secara ekstensif untuk memberikan pepadatan 10.000 kali lipat yang diperlukan untuk menyesuaikan kromosom eukariotik yang khas ke dalam inti sel. Pelipatan tingkat tinggi melibatkan perlekatan pada perancah inti yang mengandung protein histon H1, topoisomerase II, dan SMC. Kromosom bakteri juga dipadatkan secara ekstensif ke dalam nukleoid, tetapi kromosom tampak jauh lebih dinamis dan strukturnya tidak teratur daripada kromatin eukariotik, yang mencerminkan siklus sel yang lebih pendek dan metabolisme sel bakteri yang sangat aktif. Selanjutnya bagaimana kromosom diskemas dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.



Gambar 53 Video proses pengemasan kromosom
Sumber: <https://youtu.be/gbSIBhFwQ4s>



Gambar 54 Kromosom

C. KODE GENETIK

Inti dari dogma sentral adalah konsep bahwa informasi dalam bentuk abjad empat huruf (A, G, C dan T) dari materi genetik diterjemahkan ke dalam abjad protein (asam amino) 20 huruf. Seperti yang telah kita lihat, perantara antara materi genetik, DNA, mesin translasi, dan ribosom, adalah RNA pembawa pesan atau mRNA. mRNA disalin dari DNA dalam proses yang disebut transkripsi dan kemudian diterjemahkan pada ribosom dalam proses yang disebut translasi, di mana mRNA mengarahkan urutan polimerisasi asam amino menjadi rantai polipeptida. Di sini kita fokus pada sifat dan logika kode genetik, adaptor RNA yang menguraikan kode genetik, cara kerja mesin molekuler yang menerjemahkan mRNA menjadi protein dan melakukannya dengan akurasi tinggi, dan kimia pembentukan ikatan peptida. Kode genetik didefinisikan sebagai hubungan antara urutan nukleotida dalam DNA (atau transkrip RNA-nya) dan urutan asam amino dalam protein. Setiap asam amino ditentukan oleh satu atau lebih triplet nukleotida (kodon) dalam DNA. Selama translasi, mRNA bertindak sebagai salinan kerja gen di mana kodon untuk setiap asam amino dalam protein telah ditranskripsi dari DNA ke mRNA.

Berapa banyak basa yang diperlukan untuk menentukan asam amino? Karena asam nukleat hanya memiliki empat basa dan protein terdiri dari dua puluh asam amino, unit pengkode atau kodon untuk setiap asam amino harus terdiri dari lebih dari satu basa. Bahkan dua pangkalan tidak akan cukup. Jika kodon terdiri dari dua basa, maka hanya 16 (atau 42) kodon yang berbeda yang mungkin, dan tidak akan cukup kodon untuk menentukan 20 asam amino. Namun, jika kodon terdiri dari tiga basa, maka 64 (atau 43) kodon dimungkinkan, lebih dari cukup untuk alfabet asam amino. Oleh karena itu, jumlah minimum basa yang diperlukan untuk menentukan 20 asam amino yang berbeda adalah tiga. Memang, kode genetik adalah kode triplet. Dari 64 kemungkinan kodon dalam kode genetik, 61 menentukan asam amino, yang menunjukkan bahwa banyak asam amino dikodekan oleh lebih dari satu kodon (lihat gambar 54). Dengan demikian, kode mengalami degenerasi dalam arti bahwa beberapa asam amino ditentukan oleh lebih dari satu kodon yang mirip. Contoh ekstrim asam amino: leusin, serin, dan arginin masing-masing ditentukan oleh enam kodon yang mirip. Di ekstrem lain asam amino: metionin dan triptofan memiliki satu kodon (AUG dan UGG). Kodon metionin AUG merupakan kodon inisiasi atau awal, yang menandakan awal dari urutan pengkodean dalam mRNA. Untuk asam amino yang memiliki lebih dari satu kodon, dua basa pertama dalam kodon biasanya sama, basa di posisi ketiga sering bervariasi.

Tiga (dari 64) triplet UAA, UGA, dan UAG, tidak menentukan asam amino apa pun. Sebaliknya, triplet ini adalah kodon stop yang menandakan akhir dari urutan pengkodean untuk RNA messenger. Jadi, urutan pengkodean memiliki dua jenis tanda baca: AUG di awal yang menandai awal dan satu (atau lebih berturut-turut) kodon berhenti di akhir.

		Posisi ke Dua					
		U	C	A	G		
FPosisi Pertama (5')	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	
						Posisi ke Tiga (3')	

Gambar 55 Kode Genetik

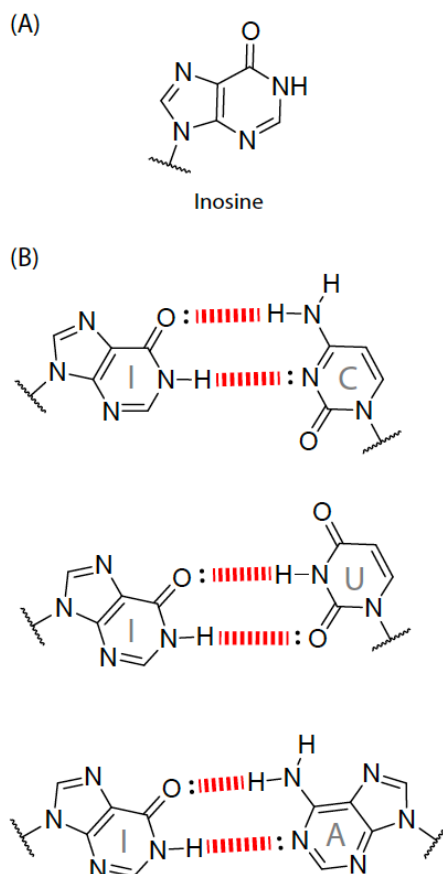
Sumber: https://projects.iq.harvard.edu/files/lifesciences1abookv1/files/11_-_a_primer_on_gene_regulation_revised_9-24-2018.pdf

D. TRANSKRIPSI

Bagaimana 61 kodon yang menentukan asam amino diuraikan sedemikian rupa sehingga masing-masing mengarahkan penggabungan asam amino yang sesuai? Jawabannya adalah bahwa kodon dikenali oleh molekul adaptor yang dikenal sebagai transfer RNA atau tRNA. Berbeda dengan mRNA, tRNA adalah RNA non-pengkode protein yang secara langsung bertindak sebagai adaptor. Setiap tRNA mengenali kodon untuk asam amino tertentu. Pengenalan dimediasi oleh pasangan basa antara kodon dan anti kodon yang sesuai dalam molekul tRNA, yang sejajar dalam orientasi anti paralel. Terikat secara kovalen pada setiap tRNA pada ujung 3'nya adalah asam amino serumpunnya, yaitu asam amino yang sesuai dengan yang ditentukan oleh

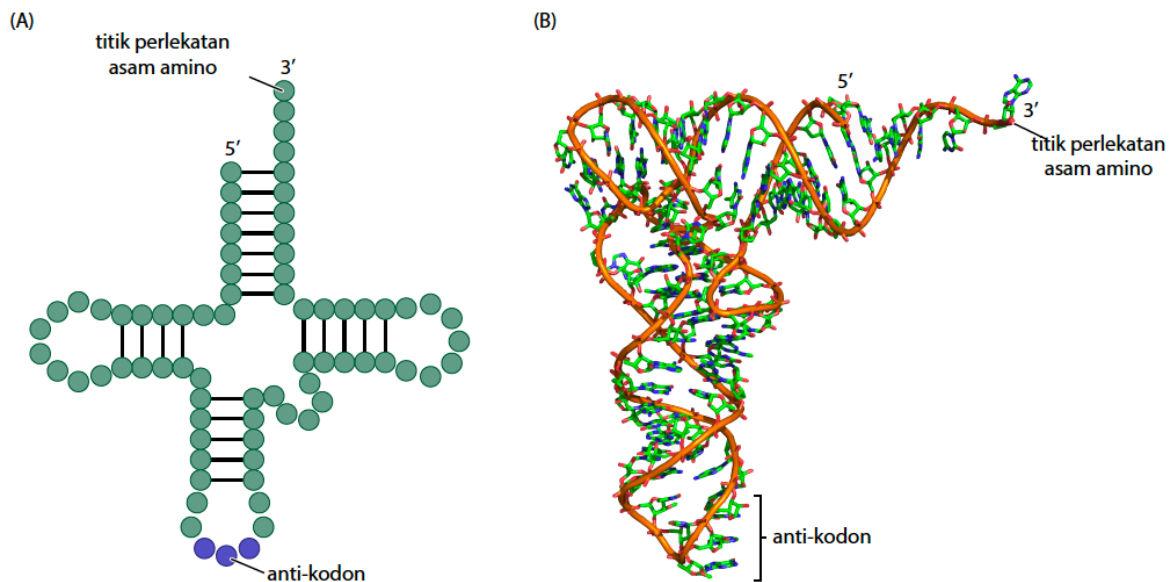
kodon. Dengan demikian, asam amino asam aspartat terikat secara kovalen pada tRNA yang antikodonna berpasangan dengan kodon asam aspartat 5'-GAC-3'.

Beberapa tRNA mengenali lebih dari satu kodon yang mirip. Hal ini dimungkinkan karena fenomena yang dikenal sebagai *wobble* (goyangan), yang memanfaatkan fakta bahwa kodon mirip sering berbeda satu sama lain pada posisi ketiga (3'). Bagian dari penjelasan untuk *wobble* adalah bahwa basa 5' di anti kodon tidak dibatasi secara spasial seperti dua lainnya, memungkinkannya untuk *wobble* dan membentuk ikatan hidrogen dengan basa selain basa serumpunnya pada posisi 3' dari kodon. Juga, beberapa tRNA memiliki basa yang tidak biasa, inosin pada posisi 5' *wobble* anti kodon; inosin dapat berpasangan dengan A, U atau C pada posisi 3' kodon. Dengan demikian, aturan pasangan basa yang membentuk dasar untuk struktur heliks ganda tidak dipatuhi secara ketat dalam kasus khusus interaksi kodon dan anti-kodon.



Gambar 56 Basa Inosin
Basa Inosin dapat membentuk pasangan basa dengan A, U, atau C

tRNA memiliki panjang sekitar 80 nukleotida, mengandung daerah saling melengkapi diri yang memungkinkan tRNA untuk melipat kembali diri mereka sendiri dalam pola loop seperti daun semanggi yang khas dan bentangan pendek heliks ganda (analog dengan struktur sekunder dalam protein). Daun semanggi, pada gilirannya, terlipat menjadi struktur tiga dimensi yang tepat (analog dengan struktur tersier protein) yang menyerupai huruf kapital "L". Fitur utama tRNA adalah bahwa anti kodon dan tempat perlekatan asam amino berada di ujung yang berlawanan dari molekul berbentuk L. Anti-kodon ditampilkan dalam satu lingkaran di satu ujung, dan asam amino dilampirkan ke ujung 3' di ujung lainnya. Perhatikan bahwa ujung 5' dan 3' keduanya berada di dekat ujung molekul yang sama tetapi ujung 3' menonjol sebagai bentangan pendek RNA untai tunggal di luar ujung 5'.



Gambar 57 Struktur sekunder dan tersier tRNA

Sumber: https://projects.iq.harvard.edu/files/lifesciences1abookv1/files/11_-_a_primer_on_gene_regulation_revised_9-24-2018.pdf.

Pada gambar di atas (A) ditampilkan adalah model yang mewakili struktur sekunder dua dimensi seperti daun semanggi dari tRNA generik. Setiap lingkaran mewakili nukleotida individu, dengan nukleotida anti kodon ditunjukkan dengan warna biru. Garis hitam menunjukkan pasangan basa dalam untai. (B) Ditampilkan adalah struktur kristal sinar-X dari molekul tRNA. Lipatan tRNA menjadi struktur berbentuk L, dengan anti kodon di satu ujung dan 3' hidroksil, yang mana asam amino menjadi

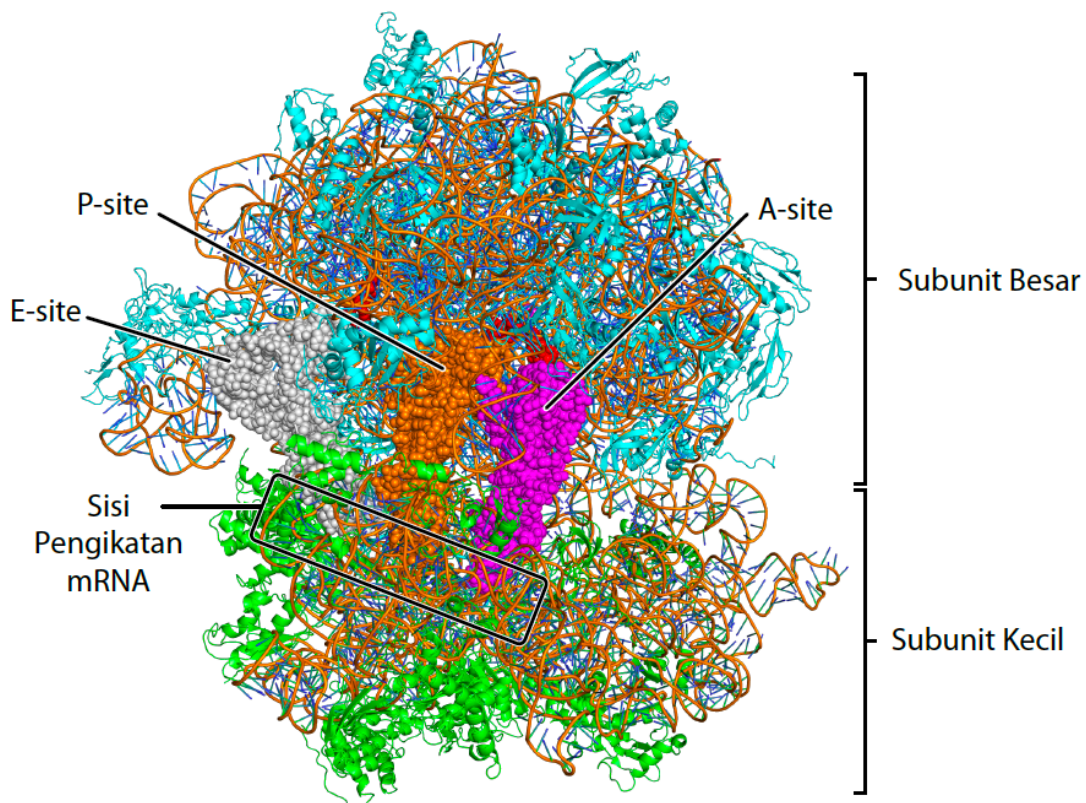
melekat, di ujung lainnya. Semua tRNA memiliki struktur lipatan keseluruhan ini, meskipun urutan nukleotida spesifiknya bervariasi. Ditampilkan adalah tRNA untuk fenilalanin; dengan demikian, ini dikenal sebagai tRNA^{Phe}.

Apa sifat hubungan antara asam amino dengan tRNA? Asam amino bergabung dengan tRNA melalui hubungan asil antara gugus karboksil dari asam amino serumpun dan 3' hidrosil pada ujung 3' molekul tRNA, menciptakan aminoasil-tRNA. tRNA yang memiliki ikatan aminoasil dikatakan bermuatan. Pengisian dikatalisis oleh enzim yang disebut aminoasil-tRNA sintetase. Setiap asam amino memiliki aminoasil-tRNA sintetase sendiri (artinya ada 20 sintetase), yang mengenali asam amino tertentu dan semua tRNA serumpun untuk asam amino tersebut. Aminoasil-tRNA Sintetase menggunakan selektivitas kimia dan proofreading untuk mencapai akurasi tinggi. Sebagai adaptor antara kodon dan asam amino, tRNA secara langsung bertanggung jawab untuk menguraikan kode genetik. Oleh karena itu penting bahwa setiap tRNA diisi dengan asam amino yang benar. Jadi, sintetase memiliki tantangan dua kali lipat: mereka harus mengenali tRNA serumpun dan mereka harus mengenali asam amino serumpun.

Ribosom adalah mesin molekuler, ribosom adalah yang paling luar biasa dari semua mesin molekuler yang memediasi proses sistem kehidupan. Ribosom terdiri dari dua subunit yang dikenal sebagai subunit besar dan subunit kecil. Massa total ribosom adalah sekitar 3.000 kilodalton (1 kilodalton = 1.000 unit massa atom), sekitar enam kali ukuran (~ 500 kilodalton) RNA polimerase. Molekul RNA, yang dikenal sebagai RNA ribosom atau rRNA, adalah RNA non-pengkode protein. Pada bakteri, subunit kecil terdiri dari 1.540 nukleotida-panjang rRNA dan 21 protein, sedangkan subunit besar mengandung dua rRNA, satu dari 120 nukleotida dan yang lainnya dari 2.900 nukleotida, dan 31 protein. Ribosom eukariota agak lebih besar dan lebih kompleks.

Ribosom mengandung tiga sisi pengikatan untuk tRNA yang merupakan penanda penting dalam proses translasi (Gambar 58). Ini adalah sisi-A, sisi-P, dan sisi-E, yang masing-masing menjangkau subunit besar dan kecil. Sisi A adalah tempat

masuknya aminoasil-tRNA. Sisi P adalah sisi di mana peptidil-tRNA, rantai polipeptida tumbuh yang melekat pada tRNA, berada. Akhirnya, sisi-E adalah sisi keluar dari mana tRNA yang telah menyerahkan muatannya meninggalkan ribosom. Ketiga sisi berpartisipasi secara dinamis dalam translasi sebagai tRNA bermuatan satu demi satu mengirimkan asam amino untuk digabungkan ke dalam rantai polipeptida yang sedang tumbuh.



Gambar 58 Pengikatan Ribosom

Sumber: https://projects.iq.harvard.edu/files/lifesciences1abookv1/files/11_-_a_primer_on_gene_regulation_revised_9-24-2018.pdf.

Ribosom terdiri dari subunit besar dan subunit kecil dan mengikat tRNA di tiga tempat. Ditampilkan di sini adalah struktur kristal sinar-X dari ribosom bakteri. Subunit besar dan kecil masing-masing ditampilkan dalam warna cyan dan hijau. Tiga tRNA yang ditunjukkan dalam warna ungu, oranye, dan abu-abu masing-masing terikat pada sisi A-, P-, dan E. mRNA dalam struktur ini tertutup oleh subunit kecil, tetapi lokasinya ditunjukkan.

Pembentukan ikatan peptida terjadi dalam tiga langkah:

Secara garis besar, translasi dimulai pada awal urutan pengkodean protein (yang akan kita sebut sebagai kerangka baca terbuka) di mana kodon awal berada dan

berakhir pada akhir urutan pengkodean, yang ditandai oleh satu atau lebih menghentikan kodon. Setiap siklus pembentukan ikatan peptida selama pemanjangan (elonggasi) berlangsung dalam tiga langkah:

Pada langkah 1, peptidil-tRNA, yaitu tRNA dengan rantai peptida yang melekat padanya melalui ikatan asil, di sisi-P dan aminoasil-tRNA memasuki sisi A. Rantai yang tumbuh di sisi-P adalah tripeptida, NH₂-metionin-treonin-arginin-COOH, dengan residu arginin yang terikat melalui gugus karboksilnya ke tRNA (tRNAArg). Peptidil-tRNA dipasangkan dengan kodon 5'-CGA-3' di mRNA melalui anti-kodon 3'-GCU-5'. Memasuki sisi-A adalah tRNAGly diaminoasilasi dengan glisin. Masuk ke sisi-A dimediasi dengan memasang antara kodon glisin 5'-GGA-3' di mRNA dan anti-kodon 3'-CCU-5' di tRNA yang diisi.

Pada langkah 2, ikatan peptida (peristiwa utama) terbentuk antara glisin di sisi-A dan asam amino terminal karboksil, arginin, dari rantai peptidil di sisi-P. Secara khusus, ikatan terbentuk antara gugus amino bebas dari glisin dan karbon karbonil yang dihubungkan ke tRNA melalui ikatan asil. Sebagai konsekuensi dari pembentukan ikatan peptida, ikatan asil antara peptida dan tRNAArg di sisi-P terputus dan rantai peptida yang sekarang satu residu lagi ditransfer ke tRNAGly di sisi-A. Dengan demikian, pembentukan ikatan peptida melibatkan transfer rantai yang tumbuh dari tRNA di sisi-P ke tRNA di sisi-A.

Pada langkah 3, ribosom mentranslokasi satu unit kodon (tiga nukleotida) sepanjang mRNA dalam arah 5'-ke-3', sehingga menggeser peptidil-tRNAGly ke sisi-P, menggeser tRNAArg yang sekarang dibebaskan dari muatannya ke dalam Sisi-E dan membiarkan sisi-A kosong. Begitu berada di sisi-E, tRNAArg terdisosiasi dari ribosom, meninggalkan sisi-E kosong. Sisi A yang sekarang kosong siap menerima tRNA bermuatan lain dalam siklus pembentukan ikatan peptida berikutnya. Perhatikan dalam contoh kita bahwa rantai peptida tumbuh dalam arah terminal NH₂-ke-COOH dan bahwa mRNA sedang diterjemahkan dalam arah 5'-ke-3', sesuai dengan aturan arah orientasi kodon 5'-ke-3'.

E. TRANSLASI

Sebuah mRNA mengandung serangkaian kode genetik (kodon) yang berinteraksi dengan antikodon aminoasil-tRNA sehingga serangkaian asam amino yang sesuai digabungkan ke dalam rantai polipeptida. Ribosome menyediakan lingkungan untuk mengontrol interaksi antara mRNA dan aminoasil-tRNA. Ribosom berperilaku seperti pabrik migrasi kecil yang berjalan di sepanjang template yang terlibat dalam siklus cepat sintesis ikatan peptida. Ribosom terdiri dari dua subunit yang memiliki peran khusus dalam sintesis protein. Messenger RNA dikaitkan dengan subunit kecil; 30 basa mRNA terikat setiap saat. Utas mRNA sepanjang permukaan dekat dengan persimpangan subunit. Dua molekul tRNA aktif dalam sintesis protein setiap saat, jadi pemanjangan polipeptida melibatkan reaksi yang terjadi hanya pada dua dari (kira-kira) sepuluh kodon yang dicakup oleh ribosom. Kedua tRNA dimasukkan ke sisi internal yang membentang di subunit. tRNA ketiga mungkin tetap berada di ribosom setelah digunakan dalam sintesis protein sebelum didaur ulang.

Biosintesis Protein Terjadi dalam Lima Tahap

Tahap 1: Aktivasi Asam Amino Untuk sintesis polipeptida dengan urutan yang ditentukan, dua persyaratan harus dipenuhi: (1) gugus karboksil dari setiap asam amino harus diaktifkan untuk memfasilitasi pembentukan ikatan peptida, dan (2) sebuah tautan harus dibuat antara setiap asam amino baru dan informasi dalam mRNA yang mengkodekannya. Kedua persyaratan ini dipenuhi dengan membawa asam amino ke tRNA pada tahap pertama sintesis protein. Membawa asam amino ke tRNA yang tepat sangat penting, reaksi ini berlangsung di sitosol, bukan di ribosom. Masing-masing dari 20 asam amino terikat secara kovalen pada tRNA spesifik dengan menggunakan energi ATP, enzim pengaktif yang bergantung pada Mg^{2+} yang dikenal sebagai aminoasil-tRNA sintetase. Ketika melekat pada asam amino mereka (aminoasilasi), tRNA dikatakan "bermuatan".

Tahap 2: Inisiasi mRNA yang membawa kode genetik (kodon) berikatan dengan subunit ribosom yang lebih kecil dan aminoasil-tRNA (anti kodon) yang akan memulai mwmbacanya. Subunit ribosom besar kemudian mengikat untuk

membentuk kompleks inisiasi. Inisiasi aminoasil-tRNA basa berpasangan dengan kodon mRNA AUG yang menandakan awal polipeptida. Proses ini, yang membutuhkan GTP, didorong oleh protein sitosol yang disebut faktor inisiasi.

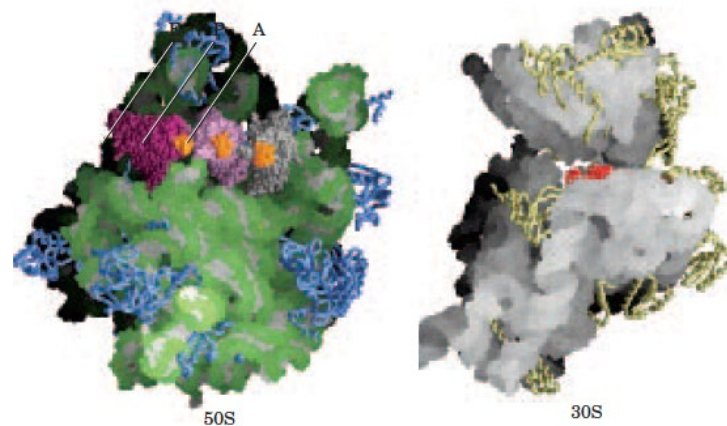
Tahap 3: Pemanjangan Polipeptida (elonggasi) yang baru terbentuk diperpanjang dengan ikatan kovalen (peptida) unit asam amino berturut-turut, masing-masing dibawa ke ribosom dan diposisikan dengan benar oleh tRNA-nya, yang berpasangan dengan kodon yang sesuai di mRNA. Pemanjangan membutuhkan protein sitosol yang dikenal sebagai faktor pemanjangan. Pengikatan setiap aminoasil-tRNA yang masuk dan pergerakan ribosom di sepanjang mRNA difasilitasi oleh hidrolisis GTP karena setiap residu ditambahkan ke polipeptida yang sedang tumbuh.

Tahap 4: Terminasi dan Pelepasan Penyelesaian rantai polipeptida ditandai oleh kodon terminasi (UAA, UGA, UAG) dalam mRNA. Polipeptida baru dilepaskan dari ribosome, dibantu oleh protein yang disebut faktor pelepasan.

Tahap 5: Pelipatan (Folding) dan pemrosesan pasca translasi Untuk mencapai bentuk (konformasi) biologis aktifnya, polipeptida baru harus terlipat menjadi konformasi tiga dimensi yang tepat. Sebelum atau setelah pelipatan, polipeptida baru dapat menjalani pemrosesan enzimatik, termasuk penghilangan satu atau lebih asam amino (biasanya dari terminal amino); penambahan asetil, fosforil, metil, karboksil, atau gugus lain pada residu asam amino tertentu; pembelahan proteolitik; dan/atau pengikatan oligosakarida atau gugus prostetik.

Ribosom Adalah Mesin Supramolekul Kompleks. Setiap sel E. coli mengandung 15.000 atau lebih ribosom, membentuk hampir seperempat dari berat kering sel. Ribosom bakteri mengandung sekitar 65% rRNA dan 35% protein; mereka memiliki diameter sekitar 18 nm dan terdiri dari dua subunit yang tidak sama dengan koefisien sedimentasi 30S dan 50S dan koefisien sedimentasi gabungan 70S. Kedua subunit mengandung lusinan protein ribosom dan setidaknya satu rRNA besar.

Ribosom bakteri adalah kompleks, dengan berat molekul gabungan 2,7 juta, dan memberikan banyak informasi (Gbr. 59). Pertama, fokus tradisional pada komponen protein ribosom telah bergeser. Subunit ribosom adalah molekul RNA besar, dalam subunit 50S, rRNA 5S dan 23S membentuk inti struktural. Protein adalah elemen sekunder dalam kompleks, menghiasi permukaan. Kedua yang paling penting, tidak ada protein dalam 18°A dari sisi aktif untuk pembentukan ikatan peptida. Struktur resolusi tinggi dengan demikian menegaskan apa yang telah diduga banyak orang selama lebih dari satu dekade: ribosom adalah ribozim. Selain wawasan yang mereka berikan tentang mekanisme sintesis protein (sebagaimana diuraikan di bawah), struktur rinci ribosom dan subunitnya telah merangsang pandangan baru pada evolusi kehidupan.

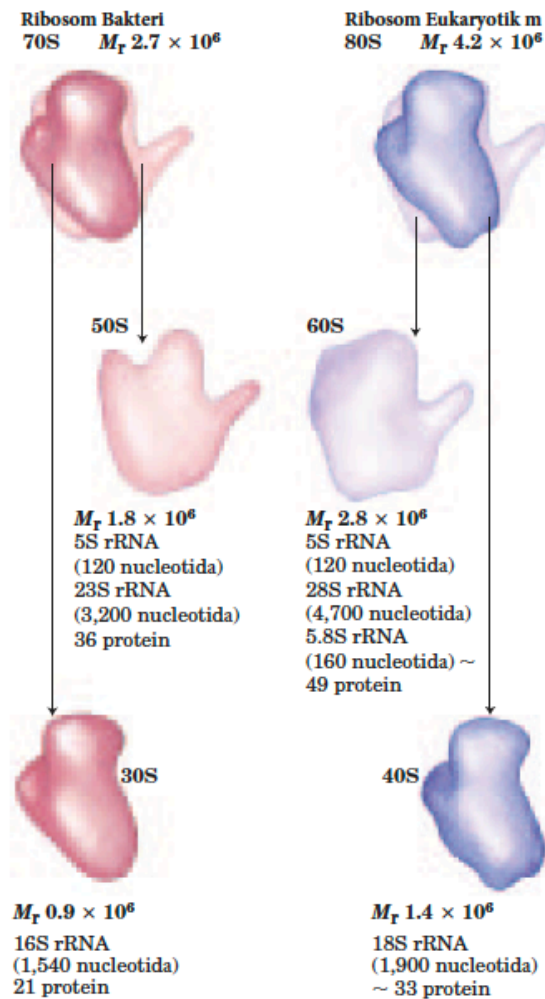


Gambar 59 Ribosom sub unit besar dan sub unit kecil
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

Dua subunit ribosom yang bentuknya tidak beraturan cocok bersama untuk membentuk celah yang dilalui mRNA saat ribosom bergerak sepanjang itu selama translasi. Protein dalam ribosom bakteri sangat bervariasi dalam ukuran dan struktur, berat molekul berkisar dari sekitar 6.000 hingga 75.000. Sebagian besar protein memiliki domain globular yang tersusun pada permukaan ribosom, namun fungsi dari beberapa protein ini belum dijelaskan secara rinci.

Ribosom sel eukariotik (selain ribosom mitokondria dan kloroplas) lebih besar dan lebih kompleks daripada ribosom bakteri (Gbr. 60), dengan diameter sekitar 23 nm dan koefisien sedimentasi sekitar 80S. Mereka juga memiliki dua subunit, yang

ukurannya bervariasi antar spesies tetapi rata-rata adalah 60S dan 40S. Secara keseluruhan, ribosom eukariotik mengandung lebih dari 80 protein berbeda. Ribosom mitokondria dan kloroplas agak lebih kecil dan lebih sederhana daripada ribosom bakteri. Namun demikian, struktur dan fungsi ribosom sangat mirip pada semua organisme dan organel.



Gambar 60 Ribosom Sel Prokaryotik dan Eukaryotik
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

Selama tahap pertama sintesis protein, yang berlangsung di sitosol, aminoasil-tRNA sintetase mengesterifikasi 20 asam amino menjadi tRNA yang sesuai. Setiap enzim spesifik untuk satu asam amino dan satu atau lebih tRNA yang sesuai. Kebanyakan organisme memiliki satu aminoasil-tRNA sintetase untuk setiap asam amino. Untuk asam amino dengan dua atau lebih tRNA yang sesuai, enzim yang sama

biasanya mengikuti asilat semuanya. Struktur semua aminoasil-tRNA sintetase E. coli telah ditentukan. Para peneliti telah membagi mereka menjadi dua kelas berdasarkan perbedaan substansial dalam struktur primer dan tersier dan mekanisme reaksi; kedua kelas ini sama di semua organisme.

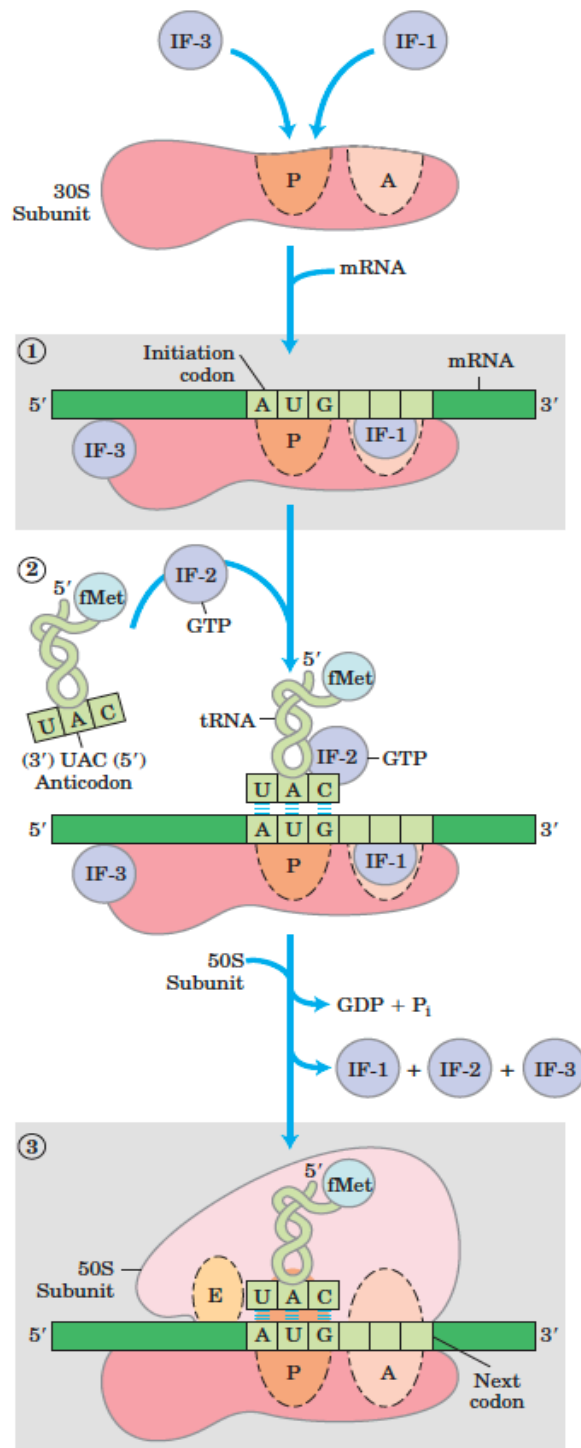
Proofreading oleh Aminoasil-tRNA Sintetase. Asilasi amino tRNA menyelesaikan dua ujung: (1) aktivasi asam amino untuk pembentukan ikatan peptida dan (2) pengikatan asam amino ke tRNA adaptor yang memastikan penempatan yang tepat dari asam amino dalam polipeptida yang sedang tumbuh. Identitas asam amino yang melekat pada tRNA tidak diperiksa pada ribosom, jadi perlekatan asam amino yang benar ke tRNA sangat penting untuk ketepatan sintesis protein. Selain proofreading setelah pembentukan intermediet aminoasil-AMP, sebagian besar aminoasil-tRNA sintetase juga dapat menghidrolisis ikatan ester antara asam amino dan tRNA dalam aminoasil-tRNA. Hidrolisis ini sangat dipercepat untuk tRNA yang diisi secara tidak benar, menyediakan filter ketiga untuk meningkatkan ketepatan proses keseluruhan.

Sintesis protein dimulai pada ujung terminal amino dan dilanjutkan dengan penambahan bertahap asam amino ke ujung terminal karboksil polipeptida yang sedang tumbuh. Kodon inisiasi AUG dengan demikian menentukan residu metionin terminal amino. Meskipun metionin hanya memiliki satu kodon, (5')AUG, semua organisme memiliki dua tRNA untuk metionin. Satu digunakan secara eksklusif ketika (5')AUG adalah kodon inisiasi untuk sintesis protein. Yang lain digunakan untuk mengkode residu Met dalam posisi internal dalam polipeptida. Perbedaan antara AUG awal (5') dan internal sangat mudah. Pada bakteri, dua jenis tRNA spesifik untuk metionin adalah tRNAMet dan tRNA^fMet. Asam amino yang bergabung sebagai respons terhadap kodon inisiasi (5')AUG adalah N-formil-metionin (fMet). Ia tiba di ribosom sebagai N-formylmethionyl-tRNA^fMet (fMet-tRNA^fMet), yang terbentuk dalam dua reaksi berturut-turut.

Transformilase lebih selektif daripada sintetase Met-tRNA; itu khusus untuk residu Met yang melekat pada tRNA^fMet, mungkin mengenali beberapa fitur

struktural unik dari tRNA itu. Sebaliknya, Met-tRNA^{Met} memasukkan metionin pada posisi interior dalam polipeptida. Penambahan gugus N-formil ke gugus amino metionin oleh transformilase mencegah fMet memasuki posisi interior dalam polipeptida sementara juga memungkinkan fMet-tRNA^{fMet} terikat pada sisi inisiasi ribosomal spesifik yang tidak menerima Met-tRNA^{Met} maupun aminoasil-tRNA lainnya. tRNA yang berbeda dari tRNA^{Met} yang digunakan pada kodon (5')AUG pada posisi interior mRNA. Akan tetapi, polipeptida yang disintesis oleh ribosom mitokondria dan kloroplas, dimulai dengan N-formilmetionin. Ini sangat mendukung pandangan bahwa mitokondria dan kloroplas berasal dari nenek moyang bakteri yang secara simbiosis digabungkan ke dalam sel eukariotik prekursor pada tahap awal evolusi. Bagaimana kodon (5')AUG tunggal dapat membedakan antara N-formilmetionin awal (atau metionin, pada eukariota) dan residu Met interior? Rincian proses inisiasi memberikan jawabannya.

Tiga Langkah Inisiasi sintesis polipeptida pada bakteri membutuhkan (1) subunit ribosom 30S, (2) pengkodean mRNA untuk polipeptida yang akan dibuat, (3) fMet-tRNA^{fMet} inisiasi, (4) satu set dari tiga protein yang disebut faktor inisiasi (IF-1, IF-2, dan IF-3), (5) GTP, (6) subunit ribosom 50S, dan (7) Mg²⁺. Pembentukan kompleks inisiasi berlangsung dalam tiga langkah.

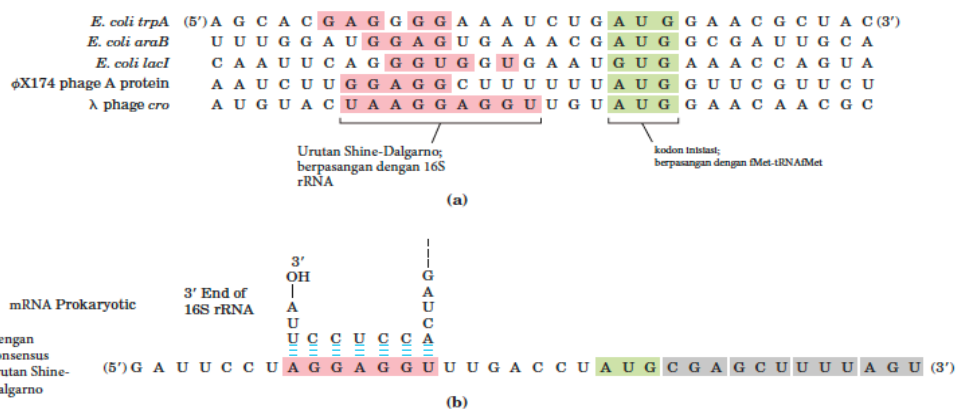


Gambar 61. Pembentukan kompleks inisiasi pada bakteri
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

(Bentuk kompleks dalam tiga langkah dengan mengorbankan hidrolisis GTP menjadi PDB dan Pi. IF-1, IF-2, dan IF-3 merupakan faktor inisiasi. P menunjukkan sisi peptidil, A sisi aminoasil, dan E sisi keluar. Di sini antikodon tRNA berorientasi 3' hingga 5', dari kiri ke kanan).

Pada langkah 1 subunit ribosom 30S mengikat dua faktor inisiasi, IF-1 dan IF-3. Faktor IF-3 mencegah subunit 30S dan 50S bergabung sebelum waktunya. mRNA kemudian berikatan dengan subunit 30S. Inisiasi (5')AUG dipandu ke posisi yang benar oleh urutan *Shine-Dalgarno* (dinamai untuk peneliti Australia John Shine dan Lynn Dalgarno, yang mengidentifikasinya) di mRNA. Urutan konsensus ini merupakan sinyal inisiasi dari empat hingga sembilan residu purin, 8 hingga 13 bp ke sisi 5' dari kodon inisiasi. Urutan pasangan basa dengan urutan kaya pirimidin komplementer di dekat ujung 3' dari 16S rRNA dari subunit ri-bosomal 30S. Interaksi mRNA-rRNA ini memposisikan urutan awal (5')AUG dari mRNA pada posisi yang tepat pada subunit 30S di mana ia diperlukan untuk inisiasi translasi. Khusus (5') AUG di mana fMet-tRNA^{fMet} akan diikat dibedakan dari kodon metionin lainnya oleh kedekatannya dengan urutan Shine-Dalgarno dalam mRNA.

Ribosom bakteri memiliki tiga sisi yang mengikat aminoasil-tRNA, sisi aminoasil (A), sisi peptidil (P), dan sisi keluar (E). Baik subunit 30S dan 50S berkontribusi pada karakteristik sisi A dan P, sedangkan sisi E sebagian besar terbatas pada subunit 50S. Inisiasi (5') AUG diposisikan di sisi P, satu-satunya sisi yang fMet-tRNA^{fMet} dapat mengikat (Gbr. 27-20). fMet-tRNA^{fMet} adalah satu-satunya aminoasil-tRNA yang mengikat pertama ke sisi P; selama tahap elongasi berikutnya, semua aminoasil-tRNA lain yang akan datang (termasuk Met-tRNA^{Met} yang berikatan dengan kodon AUG interior) pertama-tama berikatan dengan sisi A dan hanya selanjutnya ke sisi P dan E. Sisi E adalah sisi dari mana tRNA "tidak bermuatan" pergi selama pemanjangan. Faktor IF-1 mengikat di sisi A dan mencegah pengikatan tRNA di sisi ini selama inisiasi.



Gambar 62. Urutan RNA messenger yang berfungsi sebagai sinyal untuk inisiasi sintesis protein pada bakteri.

Pada gambar 62 di atas (a) Penjajaran AUG yang memulai (diarsir dalam warna hijau) di lokasi yang benar pada subunit ribo-somal 30S sebagian bergantung pada urutan Shine-Dalgarno hulu (merah muda). Bagian dari transkrip mRNA dari lima gen prokariotik ditampilkan. Perhatikan contoh yang tidak biasa dari protein E. coli LacI, yang dimulai dengan kodon GUG (Val). (b) Urutan Shine-Dalgarno dari pasangan mRNA dengan urutan di dekat ujung 3' dari 16S rRNA.

Pada langkah 2 dari proses inisiasi, kompleks yang terdiri dari subunit ribosom 30S, IF-3, dan mRNA bergabung dengan IF-2 yang terikat GTP dan fMet-tRNA^{fMet} yang memulai. Antikodon tRNA ini sekarang berpasangan dengan benar dengan kodon inisiasi mRNA.

Pada langkah 3 kompleks besar ini bergabung dengan subunit ribosom 50S; secara bersamaan, GTP yang terikat pada IF-2 dihidrolisis menjadi GDP dan Pi, yang dilepaskan dari kompleks. Ketiga faktor inisiasi berangkat dari ribosom pada titik ini.

Penyelesaian langkah-langkah menghasilkan ribosom 70S fungsional yang disebut kompleks inisiasi, yang mengandung mRNA dan fMet-tRNA^{fMet} inisiasi. Pengikatan fMet-tRNA^{fMet} yang benar ke sisi P di kompleks inisiasi 70S lengkap dipastikan oleh setidaknya tiga titik pengenalan dan pelekatan: interaksi kodon-antikodon yang melibatkan AUG inisiasi yang dipasang di sisi P; interaksi antara urutan Shine-Dalgarno dalam mRNA dan 16S rRNA; dan interaksi pengikatan antara sisi P ribosom dan fMet-tRNA^{fMet}. Kompleks inisiasi sekarang siap untuk perpanjangan.

Inisiasi pada Sel Eukariotik Penerjemahan umumnya serupa pada sel prokaryotic atau bakteri; sebagian besar perbedaan yang signifikan terletak pada mekanisme inisiasi. MRNA eu-kariotik terikat pada ribosom sebagai kompleks dengan sejumlah protein pengikat spesifik. Beberapa di antaranya mengikat ujung 5' dan 3' dari pesan. Pada ujung 3', mRNA terikat oleh protein pengikat poli(A) (PAB). Sel eukariotik memiliki setidaknya sembilan faktor inisiasi. Kompleks yang disebut eIF4F,

yang mencakup protein eIF4E, eIF4G, dan eIF4A, berikatan dengan tutup 5' melalui eIF4E. Protein eIF4G mengikat kedua eIF4E dan PAB, efektif mengikat mereka bersama-sama. Protein eIF4A memiliki aktivitas RNA helicase. Ini adalah kompleks eIF4F yang berasosiasi dengan faktor lain, eIF3, dan dengan subunit ribosom 40S. Efisiensi translasi dipengaruhi oleh banyak sifat mRNA dan protein dalam kompleks ini, termasuk panjang saluran 3' poli(A) (dalam banyak kasus, lebih lama lebih baik).

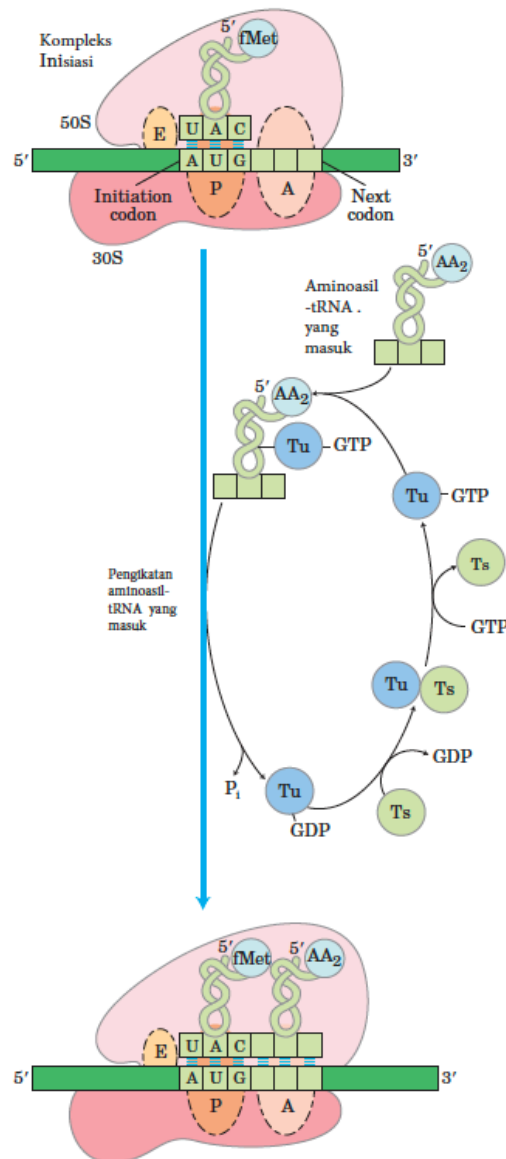
Inisiasi (5')AUG terdeteksi dalam mRNA bukan oleh kedekatannya dengan urutan seperti Shine-Dalgarno tetapi dengan proses pemindaian: pemindaian mRNA dari ujung 5' hingga AUG pertama ditemukan, menandakan awal dari kerangka baca. Kompleks eIF4F mungkin terlibat dalam proses ini, mungkin menggunakan aktivitas helikase RNA dari eIF4A untuk menghilangkan struktur sekunder pada bagian mRNA 5' yang tidak diterjemahkan. Pemindaian juga difasilitasi oleh protein lain, eIF4B.

Tahap ketiga dari sintesis protein adalah elongasi. Sekali lagi, fokus awal penjelasan ini adalah pada sel bakteri. Pemanjangan membutuhkan (1) kompleks inisiasi yang dijelaskan di atas, (2) aminoasil-tRNA, (3) satu set tiga protein sitosol terlarut yang disebut faktor pemanjangan (EF-Tu, EF-Ts, dan EF-G pada bakteri), dan (4) GTP. Sel menggunakan tiga langkah untuk menambahkan setiap residu asam amino, dan langkah tersebut diulangi sebanyak residu yang akan ditambahkan.

Langkah Pemanjangan 1: Pengikatan Aminoasil-tRNA yang Masuk Pada langkah pertama siklus pemanjangan (Gbr. 61), aminoasil-tRNA yang masuk yang sesuai berikatan dengan kompleks EF-Tu yang terikat GTP. Kompleks aminoasil-tRNA-EF-Tu-GTP yang dihasilkan berikatan dengan sisi A dari kompleks inisiasi 70S. GTP dihidrolisis dan kompleks EF-Tu-GDP dilepaskan dari ribosom 70S. Kompleks EF-Tu-GTP diregenerasi dalam proses yang melibatkan EF-T dan GTP.

Elongasi Langkah 2: Pembentukan Ikatan Peptida Sebuah ikatan peptida sekarang terbentuk antara dua asam amino yang terikat oleh tRNA mereka ke sisi A dan P pada ribosom. Hal ini terjadi melalui transfer gugus N-formilme-tionil inisiasi dari tRNA-nya ke gugus amino asam amino kedua, sekarang di sisi A (Gbr.62). Gugus α amino dari

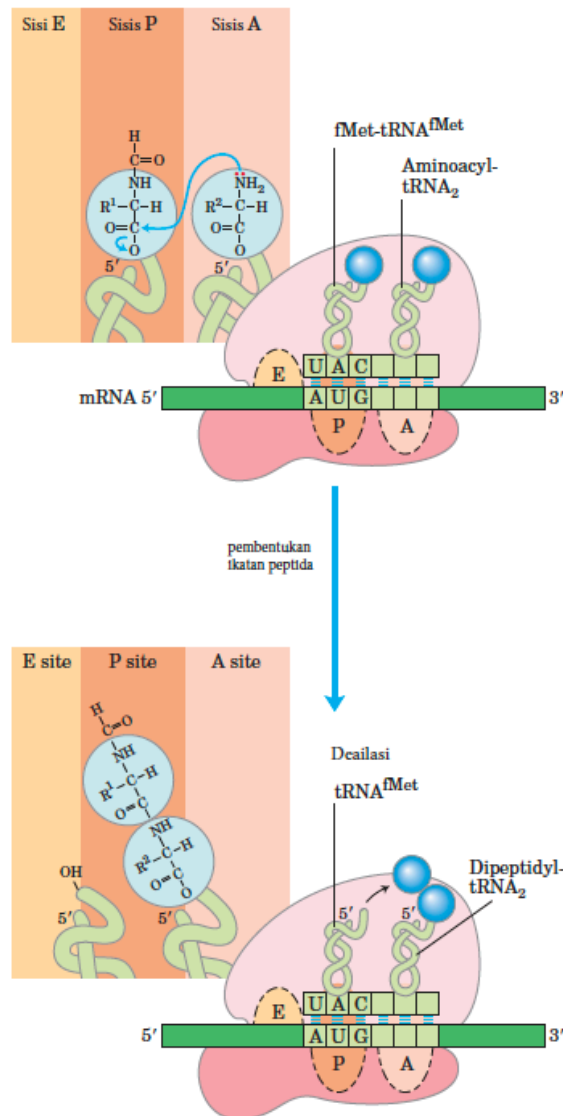
asam amino di sisi A bertindak sebagai nukleofil, menggantikan tRNA di sisi P untuk membentuk ikatan peptida. Reaksi ini menghasilkan dipeptidyl-tRNA di sisi A, dan tRNA^{fMet} yang sekarang "tidak bermuatan" (deacy-lated) tetap terikat ke sisi P. tRNA kemudian bergeser ke keadaan pengikatan hibrid, dengan elemen masing-masing mencakup dua sisi berbeda pada ribosom (Gambar 63).



Gambar 63 Langkah pemanjangan pertama pada bakteri

Pada gambar 63 di atas (Penggikatan aminoasil-tRNA kedua. Aminoasil-tRNA kedua memasuki sisi A ribosom yang terikat pada EF-Tu (ditunjukkan di sini sebagai Tu), yang juga mengandung GTP. Pengikatan aminoasil-tRNA kedua ke sisi A disertai dengan hidrolisis GTP ke GDP dan Pi dan pelepasan kompleks EF-Tu-GDP dari ribosom. PDB terikat dilepaskan ketika kompleks EF-Tu-GDP berikatan dengan EF-

Ts, dan EF-Ts selanjutnya dilepaskan ketika molekul GTP lain berikatan dengan EF-Tu. Ini mendaur ulang EF-Tu dan membuatnya tersedia untuk mengulang siklus). (Sumber: Nelson & Cox, 2004)



Gambar 64 Langkah pemanjangan kedua pada bakteri

Pembentukan ikatan peptida pertama. Peptidil transferase yang mengkatalisis reaksi ini adalah ribozim 23S rRNA. Gugus N-formilmetionil ditransfer ke gugus amino dari aminoasil-tRNA kedua di sisi A, membentuk dipeptidil-tRNA. Pada tahap ini, kedua tRNA terikat pada posisi pergeseran ribo-some di subunit 50S untuk mengambil keadaan pengikatan hibrid. TRNA yang tidak bermuatan bergeser sehingga ujung 3' dan 5'nya berada di sisi E. Demikian pula, ujung 3' dan 5' dari tRNA peptidil bergeser ke sisi P. Antikodon tetap berada di sisi A dan P. (Sumber: Nelson & Cox, 2004)

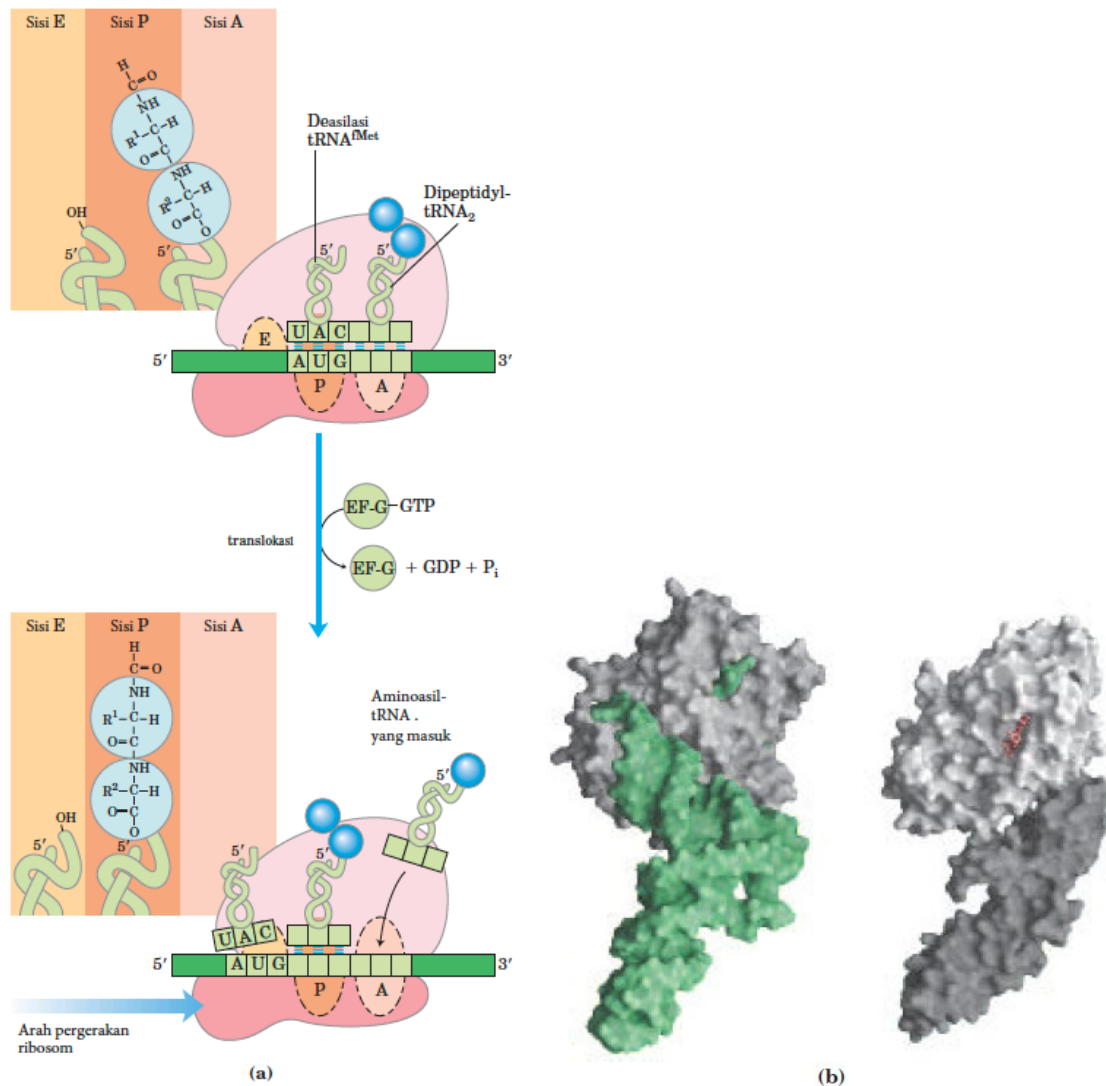
Langkah Pemanjangan 3: Translokasi Pada langkah terakhir dari siklus pemanjangan, translokasi, ribosom menggerakkan satu kodon menuju ujung 3' mRNA (Gbr. 63a). Gerakan ini menggeser antikodon dipeptidyl-tRNA, yang masih melekat pada kodon kedua mRNA, dari sisi A ke sisi P, dan menggeser tRNA yang terdeasilasi dari sisi P ke sisi E, dari mana tRNA dilepaskan ke dalam sitosol. Kodon ketiga dari mRNA sekarang terletak di sisi A dan kodon kedua di sisi P. Pergerakan ribosom di sepanjang mRNA membutuhkan EF-G (juga dikenal sebagai translocase) dan energi yang disediakan oleh hidrolisis molekul GTP lain.

Perubahan konformasi tiga dimensi dari seluruh hasil ribosom dalam gerakannya sepanjang mRNA. Karena struktur EF-G meniru struktur kompleks EF-Tu-tRNA (63b), EF-G dapat mengikat sisi A dan mungkin menggantikan peptidil-tRNA. Ribosom, dengan dipeptidyl-tRNA dan mRNA yang melekat, sekarang siap untuk siklus pemanjangan berikutnya dan perlekatan residu asam amino ketiga. Proses ini terjadi dengan cara yang sama seperti penambahan residu kedua. Untuk setiap residu asam amino yang ditambahkan dengan benar ke polipeptida yang sedang tumbuh, dua GTP dihidrolisis menjadi GDP dan Pi saat ribosom bergerak dari kodon ke kodon sepanjang mRNA menuju ujung 3'.

Polipeptida tetap melekat pada tRNA dari asam amino terbaru yang akan dimasukkan. Asosiasi ini mempertahankan hubungan fungsional antara informasi dalam mRNA dan keluaran polipeptida yang didekodekannya. Pada saat yang sama, ikatan ester antara tRNA ini dan ujung karboksil dari pasang polipeptida yang sedang tumbuh mengaktifkan gugus karboksil terminal untuk serangan nukleofilik oleh asam amino yang masuk untuk membentuk ikatan peptida baru. Karena ikatan ester yang ada antara polipeptida dan tRNA terputus selama pembentukan ikatan peptida, hubungan antara poli-peptida dan informasi dalam mRNA tetap ada, karena setiap asam amino yang baru ditambahkan masih melekat pada tRNA-nya.

Siklus pemanjangan pada eukariota cukup mirip dengan pada prokariota. Tiga faktor pemanjangan eukariotik (eEF1 α , eEF1 $\beta\gamma$, dan eEF2) memiliki fungsi yang analog dengan faktor pemanjangan bakteri (EF-Tu, EF-Ts, dan EF-G, masing-

masing). Ribosom eukariotik tidak memiliki sisi E; tRNA yang tidak bermuatan dikeluarkan langsung dari sisi P.



Gambar 65 Langkah pemanjangan ketiga pada bakteri translokasi.

(a) Ribosom menggerakkan satu kodon menuju ujung 3' mRNA, menggunakan energi yang disediakan oleh hidrolisis GTP yang terikat pada EF-G (translokasi). Dipeptidyl-tRNA sekarang seluruhnya berada di sisi P, meninggalkan sisi A terbuka untuk aminoasil-tRNA (ketiga) yang masuk. TRNA yang tidak bermuatan berdisosiasi dari sisi E, dan siklus elongasi dimulai lagi. (b) Struktur EF-G meniru struktur EF-Tu yang dikomplekskan dengan tRNA. Ditampilkan di sini adalah (kiri) EF-Tu dikomplekskan dengan tRNA (hijau) (PDB ID 1B23) dan (kanan) EF-G dikomplekskan dengan GDP (merah) (PDB ID 1DAR). Bagian terminal karboksil dari EF-G (abu-abu tua) meniru struktur loop antikodon tRNA dalam bentuk dan distribusi muatan (Sumber: Nelson & Cox, 2004)

Proofreading pada Ribosom Aktivitas GTPase dari EF-Tu selama langkah pertama pemanjangan sel bakteri memberikan kontribusi penting pada kecepatan dan ketepatan proses biosintetik secara keseluruhan. Baik kompleks EF-Tu–GTP maupun EF-Tu–GDP ada selama beberapa milidetik sebelum terdisosiasi. Kedua interval ini memberikan peluang bagi interaksi kodon-antikodon untuk dikoreksi. Aminoasil-tRNA yang salah biasanya terdisosiasi dari sisi A selama salah satu periode ini. Jika analog GTP guanosin 5'-O-(3-thio-triphosphate) (GTP^S) digunakan sebagai pengganti GTP, hidrolisis diperlambat, meningkatkan kesetiaan (dengan meningkatkan interval proofreading) tetapi mengurangi laju sintesis protein.

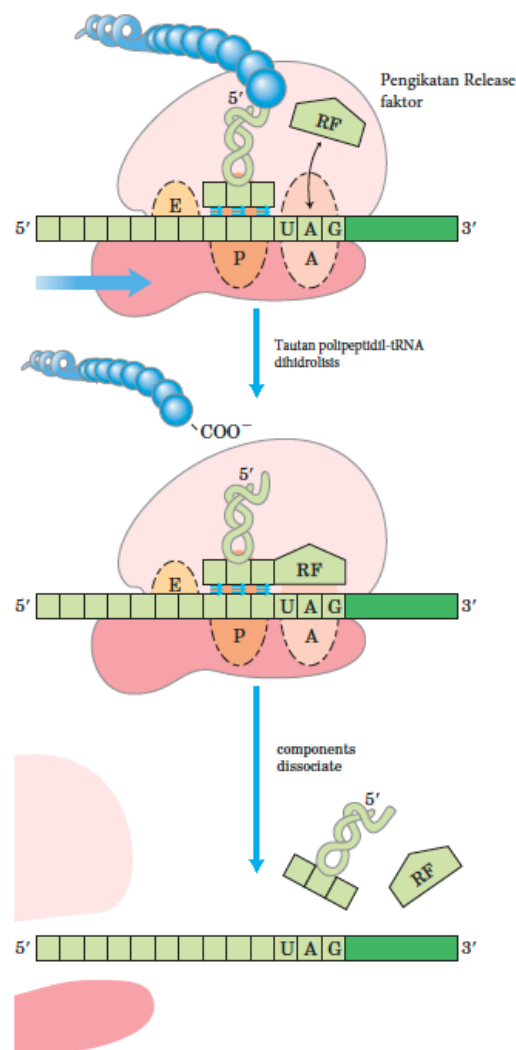
Proses sintesis protein (termasuk karakteristik pasangan kodon-antikodon yang telah dijelaskan) jelas telah dioptimalkan melalui evolusi untuk menyeimbangkan persyaratan kecepatan dan ketepatan. Fidelitas yang ditingkatkan mungkin mengurangi kecepatan, sedangkan peningkatan kecepatan mungkin akan membahayakan kesetiaan. Perhatikan bahwa mekanisme proofreading pada ribosom hanya menetapkan bahwa pasangan kodon-antikodon yang tepat telah terjadi. Identitas asam amino yang melekat pada tRNA tidak diperiksa pada ribosom. Jika tRNA berhasil diaminoasilasi dengan asam amino yang salah (seperti yang dapat dilakukan secara eksperimental), asam amino yang salah ini secara efisien dimasukkan ke dalam protein sebagai respons terhadap kodon apa pun yang biasanya dikenali oleh tRNA.

Tahap 4: Pengakhiran Sintesis Polipeptida

Memerlukan Sinyal Khusus. Pemanjangan berlanjut sampai ribosom menambahkan asam amino terakhir yang dikode oleh mRNA. Pengakhiran, tahap keempat sintesis polipeptida, ditandai dengan adanya salah satu dari tiga kodon terminasi dalam mRNA (UAA, UAG, UGA), segera setelah asam amino berkode akhir.

Pada bakteri, setelah kodon terminasi menempati sisi A ribosom, tiga faktor terminasi, atau faktor release—protein RF-1, RF-2, dan RF-3—berkontribusi pada (1) hidrolisis terminal peptidil-tRNA menjalin kedekatan; (2) pelepasan polipeptida bebas dan tRNA terakhir, sekarang tidak bermuatan, dari sisi P; dan (3) disosiasi ribosom 70S menjadi

sub-unit 30S dan 50S, siap untuk memulai siklus baru sintesis polipeptida (Gbr. 27-26). RF-1 mengenali kodon terminasi UAG dan UAA, dan RF-2 mengenali UGA dan UAA. Baik RF-1 atau RF-2 (tergantung pada kodon mana yang ada) mengikat pada kodon terminasi dan menginduksi peptidil transferase untuk mentransfer polipeptida yang sedang tumbuh ke molekul air daripada ke asam amino lain. Faktor pelepasan memiliki domain yang dianggap meniru struktur tRNA, seperti yang ditunjukkan untuk faktor pemanjangan EF-G pada Gambar 27-25b. Fungsi spesifik RF-3 belum ditetapkan secara pasti, meskipun diperkirakan melepaskan subunit ribosom. Pada eukariota, faktor pelepasan tunggal, eRF, mengenali ketiga kodon terminasi.



Gambar 66 Penghentian sintesis protein pada bakteri.
(Sumber: Nelson & Cox, 2004)

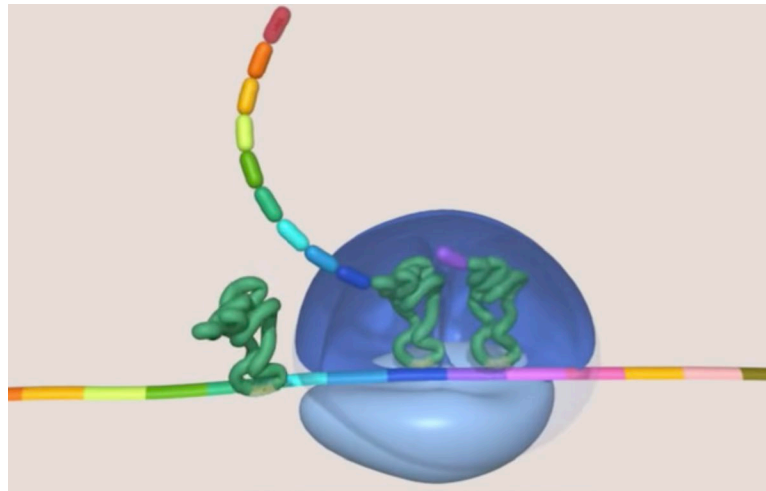
Pada gambar 66 di atas terminasi terjadi sebagai respons terhadap kodon terminasi di sisi A. Pertama, faktor pelepasan, RF (RF-1 atau RF-2, tergantung pada kodon

terminasi mana yang ada), berikatan dengan sisi A. Hal ini menyebabkan hidrolisis ikatan ester antara polipeptida yang baru lahir dan tRNA di sisi P dan pelepasan polipeptida yang telah selesai. Akhirnya, mRNA, tRNA terdeasilasi, dan faktor pelepas meninggalkan ribosom, dan ribosome berdisosiasi menjadi subunit 30S dan 50S.

Tahap 5: Rantai polipeptida yang baru disintesis menjalani pelipatan. Pada tahap akhir sintesis protein, rantai polipeptida yang baru lahir dilipat dan diproses menjadi bentuk aktif biologisnya. Selama atau setelah sintesisnya, polipeptida secara progresif mengasumsikan konformasi aslinya, dengan pembentukan ikatan hidrogen yang sesuai dan interaksi van der Waals, ionik, dan hidrofobik. Dengan cara ini, pesan genetik linier, atau satu dimensi, dalam mRNA diubah menjadi struktur tiga dimensi protein. Beberapa protein yang baru dibuat, baik prokariotik maupun eukariotik, tidak mencapai konformasi aktif biologis terakhirnya sampai mereka diubah oleh satu atau lebih reaksi pemrosesan yang disebut modifikasi pascatranslasi.

Modifikasi Terminal Amino dan Terminal Karboksil Residu pertama yang disisipkan di semua polipeptida adalah N-formylmethionine (pada bakteri) atau metionin (pada eukariota). Namun, gugus formil, residu Met terminal amino, dan sering residu terminal amino tambahan (dan, dalam beberapa kasus, terminal karboksil) dapat dihilangkan secara enzimatis dalam pembentukan protein fungsional akhir. Dalam sebanyak 50% protein eukariotik, gugus amino dari residu terminal amino adalah N-asetat setelah translasi. Residu terminal karboksil juga terkadang dimodifikasi.

Pengikatan rantai samping karbohidrat. Rantai samping karbohidrat dari glikoprotein terikat secara kovalen selama atau setelah sintesis polipeptida. Pada beberapa glikoprotein, rantai samping karbohidrat terikat secara enzimatis pada residu Asn (oligosakarida terkait-N), pada yang lain ke residu Ser atau Thr (pengendara oligosaccha-terkait-O). Banyak protein yang berfungsi secara ekstraseluler, serta proteoglikan pelumas yang melapisi membran mukosa, mengandung rantai samping oligosakarida. Selanjutnya bagaimana proses sintesis protein dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.



Gambar 67 Video animasi translasi
Sumber: <https://youtu.be/5bLEDd-PSTQ>

Berdasarkan materi dan video pembelajaran pada pokok bahasan Pondasi Biokimia yang telah disajikan, kemudian amatilah peristiwa atau kejadian sehari-hari disekeliling saudara yang berubungan dengan materi ini. Bagaimana proses makhluk hidup dapat tumbuh dan berkembang biak?

1. PENCETUSAN IDE

Pahamilah orientasi di atas yang telah disajikan, dari materi dan tayangan tersebut identifikasilah Kromosom, DNA, Gen, Genom, system transkripsi dan system translasi. Bahaslah bagaimana makhluk hidup dapat melakukan ekspresi gennya. Gambarkan posisi Kromosom, DNA, Gen, Genom system transkripsi dan system translasi dalam satu buah gambar. Kemudian bahaslah bersama kelompok saudara tentang ekspresi gen pada makhluk hidup pada Lembar Kerja Mahasiswa (LKM) yang telah disediakan.

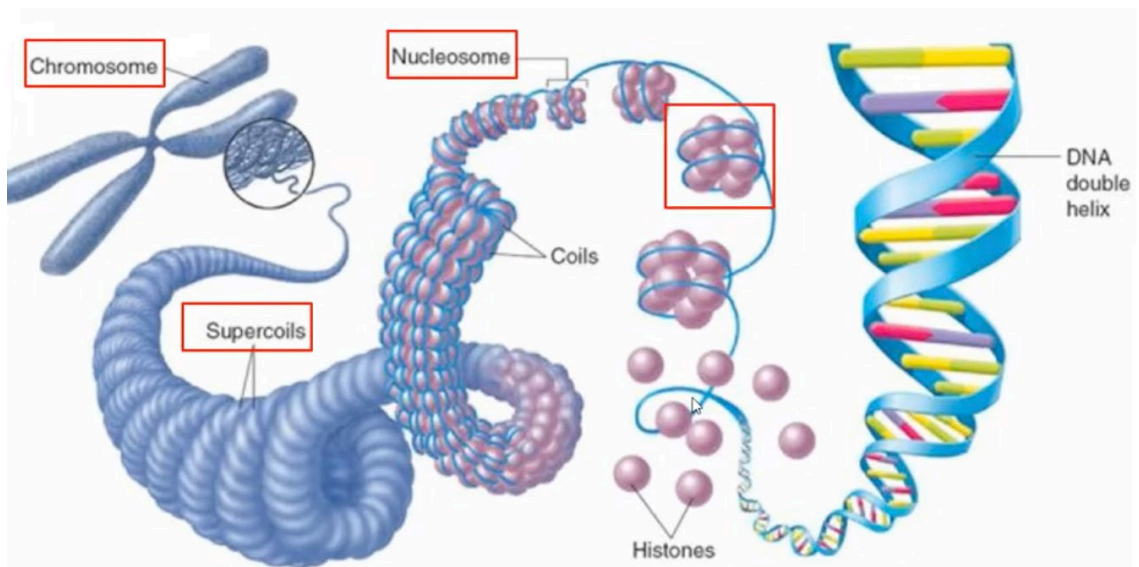
2. PENSTRUKTURAN IDE

Hasil pencetusan ide bersama dengan kelompok saudara rancanglah proyek tentang ekspresi genetik pada makhluk hidup. Bahaslah naskah rancangan tersebut tulislah/gambarkan/skenariokan tentang ekspresi genetik. Bahaslah bahan dan alat yang digunakan untuk menyelesaikan proyek tersebut.

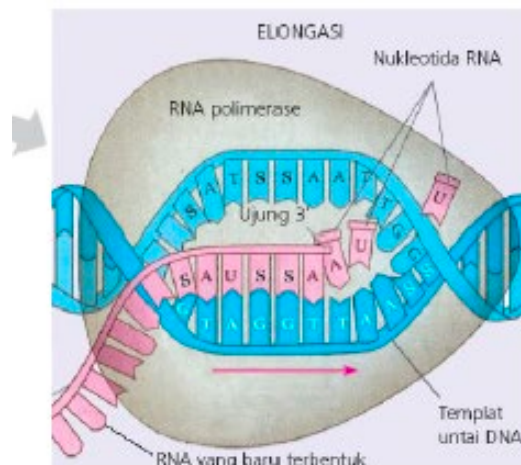
3. APLIKASI

Berdasarkan rancangan yang telah di buat, bersama kelompok saudara lakukan pembuatan video ekspresi gen pada mahluk hidup. Proyek dilakukan di luar jam kuliah, sesuai operasional prosedur Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unsri. Lakukanlah proyek tersebut semenarik mungkin. Lakukanlah kolaborasi bersama teman- teman saudara dalam menyelesaikan proyek tersebut. Kemudian setelah selesai pembuatan video tersebut, bahaslah hal-hal berikut ini.

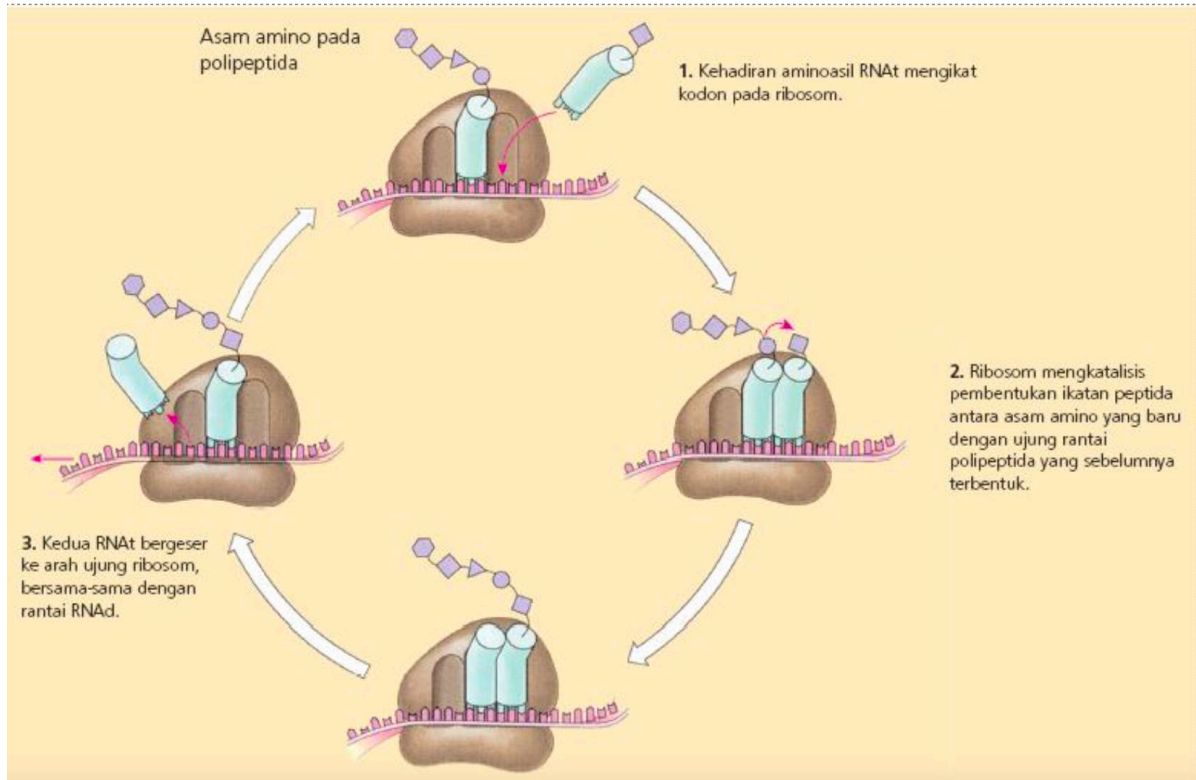
a. Jelaskan gambar dibawah ini



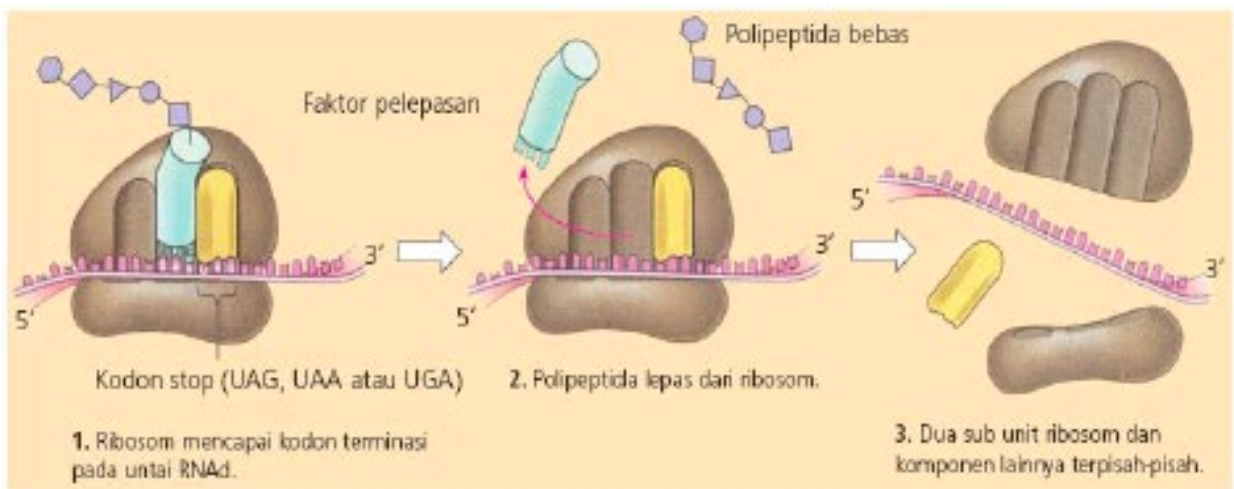
b. Berikan penjelasan ketiga gambar (Gambar a, b dan c) dibawah ini yang saling berkaitan satu sama lain.



Gambar a

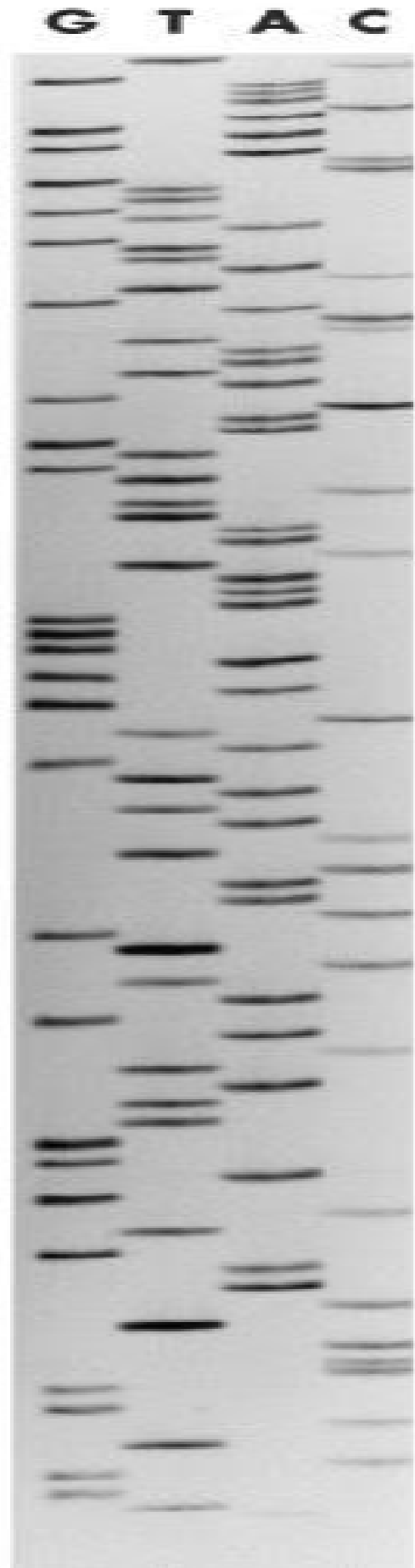


Gambar b



Gambar c

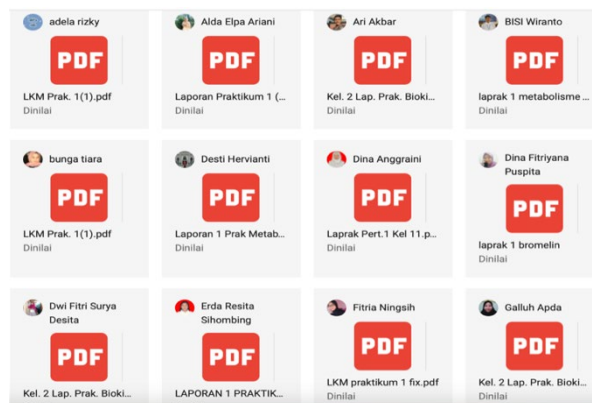
- c. Tulislah urutan DNA pada gambar di bawah ini
- d. Hasil dari pengurutan DNA tersebut jelaskan dan tuliskan hasil transkripsi dan translasinya.



4. REFLEKSI

Selanjutnya hasil elaborasi dengan dosen, saat proses pembelajaran jika ada perbaikan ditindaklanjuti dengan perbaikan, kemudian dituangkan dalam "Laporan 9 Ekspresi Genetik". Laporan tersebut di buat sesuai dengan format Lembar Kerja Mahasiswa yang telah di sediakan, kemudian di submit ke <https://elearning.unsri.ac.id>

Contoh submit laporan 9 Ekspresi Genetik.



Gambar 68. Submit Laporan 9 Ekspresi Genetik

Laporan 9 Ekspresi Genetik minimal memuat hal-hal sebagai berikut yaitu: orientasi, pencetusan ide, penstrukturan ide, aplikasi, refleksi, dan daftar pustaka.

Latihan Soal

1. Jelaskan hal-hal berikut ini:

- | | |
|--------------|-----------------|
| a. DNA | g. Histon |
| b. Kromosom | f. Intron |
| c. Gen | h. Kode Genetik |
| d. Genom | i. Transkripsi |
| e. Nukleosom | j. Translasi |

2. Jelaskan mekanisme terjadinya ekspresi gen?

3. Tuliskan dan jelaskan hasil ekspresi gen Urutan Nukleotida di bawah ini, sense 5' ke 3' sbb:

```
ATGGAAATTT GTCGGTGCGT TGATTATTAC TTCGTTGCTG ATTATTCCTG
CTGCTACTGC GCGTCGCTTT GCCCGCACGC CGGAACAGAT GGCTGGTGTC
GCTGTTTTGG TGGGGATGGT GGCAGTGA CTGGGTTTAA CCTTTTCCGC
GGTTTACGAT ACGCCGGCGG GTCCGTCGGT GGTGCTATGT GCGGCACTGT
```

4. Pengemasan DNA dalam Virus Bakteriofag T2 memiliki DNA dengan berat molekul 120×10^6 yang terdapat di kepala dengan panjang sekitar 210 nm. Hitung panjang DNA (anggap berat molekul pasangan nukleotida adalah 650) dan bandingkan dengan panjang kepala T2.

5. Mempertahankan Struktur DNA (a) Jelaskan dua fitur struktural yang diperlukan untuk molekul DNA untuk mempertahankan keadaan superkoil negatif. (b) Sebutkan tiga perubahan struktural yang menjadi lebih menguntungkan ketika sebuah molekul DNA disuperkoil secara negatif. (c) Enzim apa, dengan bantuan ATP, dapat menghasilkan superhelisitas negatif dalam DNA? (d) Jelaskan mekanisme fisik dimana enzim ini bekerja.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adam, R.L.P., Knowler, J.T., Leader, D.P. 1986. *The Biochemistry of the Nucleic Acids Tenth edition*. New York: Chapman and Hall Ltd.
2. Brown, T. A. 2011. *Introduction to genetics: A molecular approach*. New York: Garland Publishing.
3. <https://youtu.be/5MQdXjRPHmQ>. *What is a gene?*. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2019.
4. <https://youtu.be/qbSIBhFwQ4s>. *How DNA is Packaged*. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2019.
5. <https://youtu.be/5bLEDd-PSTQ>. *Translation*. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2019.
6. https://projects.iq.harvard.edu/files/lifesciences1abookv1/files/11_-_a_primer_on_gene_regulation_revised_9-24-2018.pdf. *The Genetic Code & Translation*. Diakses pada tanggal 11 Maret 2022.
7. Nelson, D.L., Cox, M.M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry sixth edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
8. Sukaryawan, M., 1998. *Konstruksi Koleksi Parsial Genom dan Urutan Nukleotida Sebagian Gen ruvB Salmonella Typhimurium* Bandung: ITB.
9. Sukaryawan, M. 2004. *Biokimia*. Indralaya: Prodi Pendidikan Kimia FKIP Unsri
10. Thenawidjaja, M. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga
11. Watson, DJ., Tooze, J., Kurtz, DT. 1998. *DNA Recombinant*. Jakarta: Erlangga
12. Winnacker, E.L. 1987. *From Gene to Clone*. New York: VCH.
13. Wirahadikusumah, M. 1985. *Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB

BAB 21 MUTAGENESIS

1. ORIENTASI

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah yang direncanakan adalah mahasiswa mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni (CPMK-4). Sedangkan kemampuan akhir pada pokok bahasan ini adalah mahasiswa mampu mengkaji implikasi mutagenesis pada makhluk hidup dan dampak yang diakibatkan dalam kehidupan sehari-hari (Sub-CPMK4). Pengalaman belajar yang diperoleh mahasiswa merencanakan, melaksanakan dan melaporkan proyek, presentasi tugas kelompok, mengerjakan lembar kerja mahasiswa, membuat dan mensubmit Laporan di <https://elearning.unsri.ac.id>

Mutasi gen adalah perubahan yang terjadi pada bahan genetik (DNA maupun RNA), baik pada taraf urutan gen (disebut mutasi titik) maupun pada taraf kromosom. Mutasi pada tingkat kromosomal biasanya disebut aberasi. Peristiwa terjadinya mutasi disebut mutagenesis, sedangkan makhluk hidup yang mengalami mutasi disebut mutan. Mutasi bersifat acak, 90% sesungguhnya bersifat merugikan bagi individu atau populasi suatu spesies. Dikatakan bersifat merugikan karena mutasi menimbulkan perubahan suatu karakter dari keadaan yang biasanya padahal karakter itu sudah beradaptasi selama jutaan tahun terhadap lingkungan. Dengan adanya perubahan, maka makhluk itu harus beradaptasi lagi.

Mutasi terjadi karena adanya perubahan lingkungan yang ekstrem, sesungguhnya mutasi itu dimaksudkan untuk menghadapi perubahan alam yang sewaktu-waktu akan timbul. Kalau perubahan itu sudah terjadi, maka sifat yang bermutasi tersebut kemungkinan akan lebih mudah beradaptasi daripada sifat yang asli. Bagi makhluk yang tidak dapat menyesuaikan diri, maka mereka secara perlahan akan menyusut selanjutnya akan punah. Penyebab mutasi disebut dengan mutagen

(agen mutasi). Kebanyakan mutagen adalah bahan fisika, kimia atau biologi yang memiliki daya tembus yang kuat sehingga dapat mencapai bahan genetis dalam inti sel, contohnya: zat radioaktif, zat kimia yang keras dan virus.

A. Mutagen

Mutagen yang berasal dari bahan kimia contohnya adalah kolkisin dan zat digitonin. Kolkisin adalah zat yang dapat menghalangi terbentuknya benang-benang spindel pada proses anafase dan dapat menghambat pembelahan sel pada anafase. Penyebab mutasi dalam lingkungan yang bersifat kimiawi disebut juga mutagen kimiawi. Mutagen-mutagen kimiawi tersebut dapat dipilah menjadi 3 kelompok, yaitu analog basa, agen pengubah basa, agen penyela. Senyawa yang merupakan contoh analog basa adalah 5Bromourasil (5BU). 5-BU adalah analog timin. Dalam hubungan ini posisi karbon ke-5 ditempati oleh gugus brom padahal posisi itu sebelumnya ditempati oleh gugus metil. Keberadaan gugus brom mengubah distribusi muatan serta meningkatkan peluang terjadinya tautomerik. Senyawa yang tergolong agen pengubah basa adalah mutagen yang secara langsung mengubah struktur maupun sifat kimia dari basa, yang termasuk kelompok ini adalah agen deaminasi, agen hidrosilasi serta agen alkilasi. Senyawa yang tergolong agen interkalasi akan melakukan insersi antara basa-basa yang berdekatan pada satu atau kedua untai DNA. Contoh agen interkalasi adalah proflavin, aeridine, ethidium bromida.

Mutagen yang berasal dari bahan fisika adalah sinar ultra violet, sinar radioaktif, dan sinar gamma. Sinar ultraviolet dapat menyebabkan kanker kulit. Penyebab mutasi dalam lingkungan yang bersifat fisik adalah radiasi dan suhu. Radiasi sebagai penyebab mutasi dibedakan menjadi radiasi pengion dan radiasi bukan pengion. Radiasi pengion adalah radiasi berenergi tinggi sedangkan radiasi bukan pengion adalah radiasi berenergi rendah. Contoh radiasi pengion adalah radiasi sinar X, sinar gamma, radiasi sinar kosmik. Contoh radiasi bukan pengion adalah radiasi sinar UV. Radiasi pengion mampu menembus jaringan atau tubuh makhluk hidup karena berenergi tinggi.

Sementara radiasi bukan pengion hanya dapat menembus lapisan sel-sel permukaan karena berenergi rendah. Radiasi sinar tersebut akan menyebabkan perpindahan elektron-elektron ke tingkat energi yang lebih tinggi. Atom-atom yang memiliki elektron-elektron sedemikian dinyatakan tereksitasi. Molekul-molekul yang mengandung atom yang berada dalam keadaan tereksitasi maupun terionisasi secara kimiawi lebih reaktif daripada molekul yang memiliki atom-atom yang berada dalam kondisi stabil. Aktivitas yang meningkat tersebut mengundang terjadinya sejumlah reaksi kimia, terutama mutasi. Radiasi pengion dapat menyebabkan terjadinya mutasi gen dan pemutusan kromosom yang berakibat delesi, duplikasi, insersi, translokasi serta fragmentasi kromosom umumnya. Mutagen yang berasal dari bahan biologi adalah virus dan bakteri diperkirakan dapat menyebabkan terjadinya mutasi. Bagian virus yang dapat menyebabkan terjadinya mutasi adalah DNA-nya.

B. Mutasi Gen

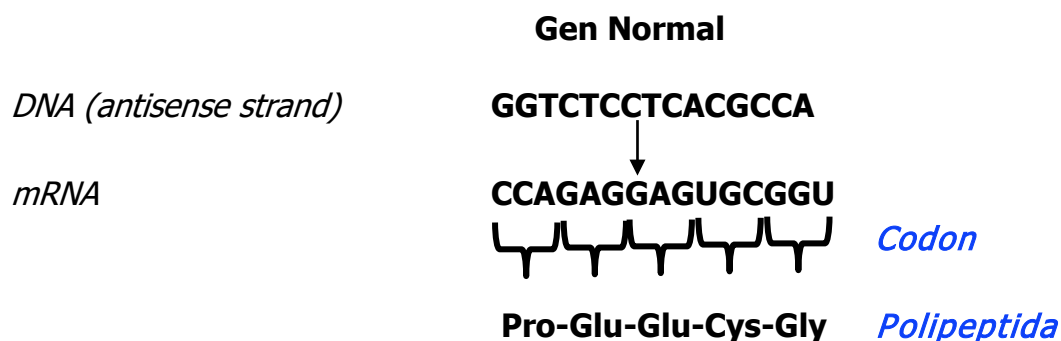
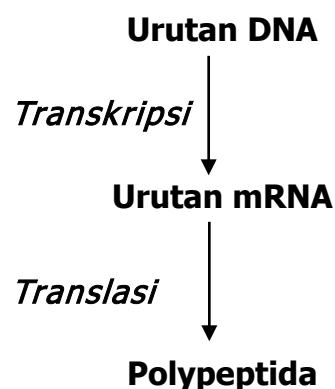
Mutasi adalah peristiwa perubahan genetik (gen atau kromosom) dari suatu individu yang bersifat menurun. Berdasarkan sel yang bermutasi dapat dibedakan menjadi 2 jenis:

- Mutasi somatik
- Mutasi gametik

Mutasi somatik adalah mutasi yang terjadi pada sel somatik yaitu sel tubuh seperti sel kulit. Mutasi ini tidak akan diwariskan pada keturunannya. Mutasi Gametik adalah mutasi yang terjadi pada sel gamet. Karena terjadinya di sel gamet, maka akan diwariskan kepada keturunannya.

Mutasi gen pada dasarnya merupakan mutasi titik (*point mutation*). Pada mutasi ini terjadi perubahan kimiawi pada satu atau beberapa pasangan basa dalam satu gen tunggal yang menyebabkan perubahan sifat individu tanpa perubahan jumlah dan susunan kromosomnya. Peristiwa yang terjadi pada mutasi gen adalah perubahan urutan-urutan DNA atau lebih tepatnya mutasi titik merupakan perubahan pada basa Nitrogen dari DNA atau RNA. Penggantian/substitusi pasangan basa terjadi

karena penggantian satu nukleotida dengan pasangannya di dalam untaian DNA komplementer dengan pasangan nukleotida lain. Pasangan basa nitrogen (basa N) pada DNA antara timin dengan adenine atau antara guanine dengan sitosin dihubungkan oleh ikatan hydrogen yang lemah. Atom-atom hydrogen dapat berpindah dari satu posisi ke posisi lain pada purin atau pirimidin. Perubahan kimia yang seperti itu disebut dengan perubahann tautomer. Misalnya secara tidak normal, adenine berpasangan dengan sitosin dan timin dengan guanine. Peristiwa perubahan genetik seperti itu disebut dengan mutasi gen karena hanya terjadi di dalam gen. Contoh: anemia bulan sabit. Mutasi titik relatif sering terjadi namun efeknya dapat dikurangi oleh mekanisme pemulihan gen. Mutasi titik dapat berakibat berubahnya urutan asam amino pada protein, dan dapat mengakibatkan berkurangnya, berubahnya atau hilangnya fungsi enzim. Mutasi titik merupakan mutasi gen yang hanya mempengaruhi satu gen, beberapa mutasi titik adalah sebagai berikut:



1) Mutasi Subtitusi

Mutasi substitusi hanya akan mempengaruhi satu kodon efeknya mungkin tidak serius kecuali jika mempengaruhi asam amino yang penting untuk struktur dan fungsi molekul protein akhir (misalnya anemia sel sabit).



Mutasi Subtitusi yang tidak berpengaruh pada fenotipe, perubahan basa ketiga kodon sering tidak berpengaruh.



Mutasi Subtitusi yang menyebabkan terjadinya stop kodon, mempengaruhi produk atau fungsi biologis protein.



2) Mutasi Inversi

Mutasi inversi juga hanya mempengaruhi sebagian kecil dari gen.

Gen Normal

GGTCTCCTCACGCCA

DNA



CCAGAGGAGUGCGGU

mRNA



Codon

Pro-Glu-Glu-Cys-Gly

Polipeptida

Mutasi Inversi

GGTCCTCCTCACGCCA



CCAGGAGAGUGCGGU



Pro-Gly-Glu-Cys-Gly

3) Mutasi Adisi

Mutasi yang terjadi pegeseran kode genetik, berpengaruh terhadap produk protein yang dihasilkan.

Gen Normal

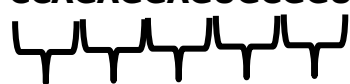
GGTCTCCTCACGCCA

DNA



CCAGAGGAGUGCGGU

mRNA



Codon

Pro-Glu-Glu-Cys-Gly

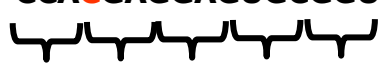
Polipeptida

Mutasi Adisi

GGTGCTCCTCACGCCA



CCACGAGGAGUGCGGU



Pro-Arg-Gly-Val-Arg

4) Mutasi Delisi

Mutasi yang terjadi pegeseran kode genetik, berpengaruh terhadap produk protein yang dihasilkan.

Gen Normal

GGTCTCCTCACGCCA

DNA



CCAGAGGAGUGCGGU

mRNA



Codon

Pro-Glu-Glu-Cys-Gly

Polipeptida

Mutasi Delisi

GGTC/CCTCACGCCA



CCAGGAGUGCGGU

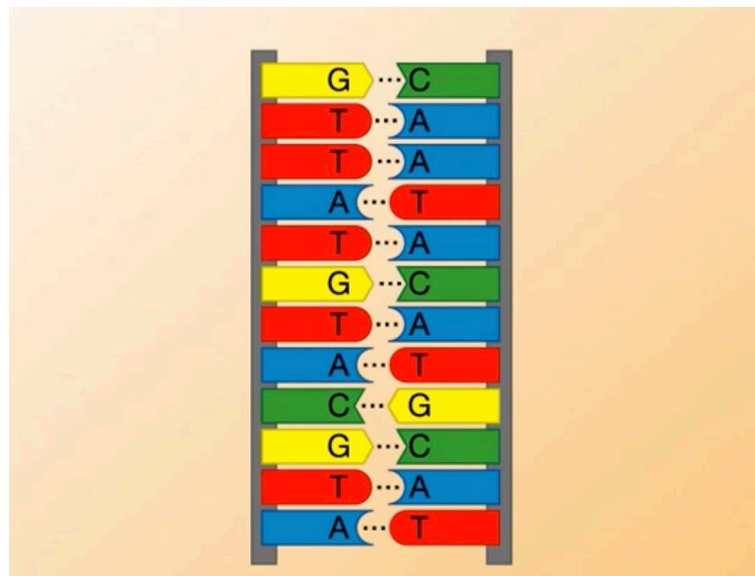


Pro-Gly-Ser-Ala-Val

Berdasarkan perubahan kode genetik mutasi dapat dibedakan menjadi:

- a. Mutasi salah arti (missense mutation), yaitu perubahan suatu kode genetik (umumnya pada posisi 1 dan 2 pada kodon) sehingga menyebabkan asam amino yang terkait pada rantai polipeptida berubah. Perubahan pada asam amino dapat menghasilkan fenotip mutan apabila asam amino yang berubah merupakan asam amino esensial bagi protein tersebut. Jenis mutasi ini dapat disebabkan oleh peristiwa mutasi substitusi dan tranversi.
- b. Mutasi diam (silent mutation), yaitu perubahan suatu pasangan basa dalam gen (pada posisi 3 kodon) yang menimbulkan perubahan satu kode genetik tetapi tidak mengakibatkan perubahan atau pergantian asam amino yang dikode. Mutasi diam biasanya disebabkan karena terjadinya mutasi substitusi dan tranversi.
- c. Mutasi tanpa arti (nonsense mutation), yaitu perubahan kodon asam amino tertentu menjadi kodon stop, yang mengakhiri rantai, mengakibatkan berakhirnya pembentukan protein sebelum waktunya selama translasi. Dengan kata lain pada mutasi tanpa arti terjadi perubahan kodon (triplet) dari kode basa Nitrogen asam amino tetapi tidak mengakibatkan kesalahan pembentukan protein. Hasilnya adalah suatu polipeptida tak lengkap yang tidak berfungsi. Hampir semua mutasi tanpa arti mengarah pada inaktifnya suatu protein sehingga menghasilkan fenotip mutan. Mutasi ini dapat terjadi baik oleh tranversi, substitusi, delesi, maupun insersi
- d. Mutasi Pergeseran Kerangka/perubahan rangka baca (frameshift mutation). Mutasi ini merupakan akibat penambahan atau kehilangan satu atau lebih nukleotida di dalam suatu gen. Hal ini mengakibatkan bergesernya kerangka pembacaan. Selama berlangsungnya sintesis protein, pembacaan sandi genetik dimulai dari satu ujung acuan protein yaitu mRNA, dan dibaca sebagai satuan tiga basa secara berurutan. Karena itu mutasi pergeseran kerangka pada umumnya menyebabkan terbentuknya protein yang tidak berfungsi sebagai akibat disintesisnya rangkaian asam amino yang sama sekali baru dari

pembacaan rangkaian nukleotida mRNA yang telah bergeser kerangkanya (yang ditranskripsikan dari mutase pada DNA sel). Mutasi ini merupakan mutasi adisi atau mutasi delisi pada mutasi titik yang menyebabkan terjadinya produk peptidanya yang tidak berfungsi. Penyisipan satu nukleotida pada suatu gen mengakibatkan transkripsi satu nukleotida tambahan pada mRNA. Ini mengakibatkan pergeseran kerangka ketika kodon-kodon dibaca selama berlangsungnya translasi sehingga semua kodon setelah penyisipan menjadi berubah dan semua asam amino yang disandikan menjadi berubah pula. Mutasi pergeseran kerangka sebagai akibat delesi satu nukleotida pada prinsipnya akan mempunyai efek yang sama. Selanjutnya animasi mutasi genetik dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.



Gambar 69 Mutasi Gen

Sumber: <https://youtu.be/U4mC0kGxuKk>

C. Mutasi Kromosom

Istilah mutasi pada umumnya digunakan untuk perubahan gen, sedangkan perubahan kromosom yang dapat diamati dikenal sebagai variasi kromosom atau aberasi. Mutasi kromosom, sering juga disebut dengan mutasi besar/*gross mutation* atau aberasi kromosom adalah perubahan jumlah kromosom dan struktur (susunan

atau urutan) gen dalam kromosom. Mutasi kromosom sering terjadi karena kesalahan meiosis dan mitosis. Adapun jenis-jenis mutasi kromosom pada sel gamet adalah sebagai berikut: Pertama Mutasi Autosomal, yaitu mutasi sel kelamin yang terjadi pada kromosom autosom. Mutasi jenis ini menghasilkan mutasi yang dominan dan mutasi yang resesif. Kedua Mutasi Tertaut Kelamin, yaitu mutasi sel kelamin yang terjadi pada kromosom seks (kromosom kelamin), berupa tertautnya beberapa gen dalam kromosom kelamin.

Pada prinsipnya, mutasi kromosom digolongkan menjadi dua, yaitu:

1) Mutasi Akibat Perubahan Jumlah Kromosom.

Mutasi kromosom yang terjadi karena perubahan jumlah kromosom (ploidi) melibatkan kehilangan atau penambahan perangkat kromosom (genom) disebut euploid, sedang yang hanya terjadi pada salah satu kromosom dari genom disebut aneuploid. Euploid (eu = benar; ploidi = unit) yaitu jenis mutasi dimana terjadi perubahan pada jumlah n . Makhluk hidup yang terjadi dari perkembangbiakan secara kawin, pada umumnya bersifat diploid, memiliki 2 perangkat kromosom atau 2 genom pada sel somatisnya ($2n$ kromosom). Organisme yang kehilangan 1 set kromosomnya sehingga memiliki satu genom atau satu perangkat kromosom (n kromosom) dalam sel somatisnya disebut monoploid. Sedang organisme yang memiliki lebih dari dua genom disebut poliploid. Misalnya: triploid ($3n$ kromosom); tetraploid ($4n$ kromosom); heksaploid ($6n$ kromosom). Poliploid yang terjadi pada tumbuhan misalnya pada apel dan tebu. Poliploid pada hewan misalnya pada daphnia, rana esculenta dan ascaris. Mutasi poliploid ada dua, yaitu:

- a) Autopoliploid yang terjadi akibat n -nya mengganda sendiri karena kesalahan meiosis dan terjadi pada kromosom homolog, misalnya semangka tak berbiji.
- b) Aloploid yang terjadi karena perkawinan atau hybrid. antara spesies yang berbeda jumlah set kromosomnya dan terjadi pada kromosom non homolog, misalnya Rhabanobrassica (akar seperti kol, daun mirip lobak).

Aneuploid ($an =$ tidak; $eu =$ benar; Ploid = Unit) yaitu jenis mutasi dimana terjadi perubahan jumlah kromosom atau perubahan jumlah n -nya. Dalam hal ini, " n " menandakan jumlah set kromosom. Sebagai contoh, sel tubuh manusia memiliki 2 paket kromosom sehingga disebut $2n$, dimana satu paket n manusia berjumlah 23 kromosom. Mutasi kromosom ini tidak melibatkan seluruh genom yang berubah, melainkan hanya terjadi pada salah satu kromosom dari genom. Mutasi ini disebut juga dengan istilah aneusomik. Penyebab mutasi ini adalah anafase lag (peristiwa tidak melekatnya benang-benang spindel ke sentromer) dan nondisjunction (gagal berpisah). Macam-macam aneusomik antara lain sebagai berikut.

- a) Monosomik ($2n-1$); yaitu mutasi karena kekurangan satu kromosom, misalnya Sindrom Turner pada manusia dimana jumlah kromosomnya 45 dan kehilangan 1 kromosom kelamin ($22AA+X0$).
- b) Nullisomik ($2n-2$); yaitu mutasi karena kekurangan dua kromosom trisomik ($2n + 1$, misalnya Sindrom Klinefelter pada manusia.
- c) Trisomik ($2n + 1$); yaitu mutasi karena kelebihan satu kromosom
- d) Tetrasomik ($2n + 2$); yaitu mutasi karena kelebihan dua kromosom

Aneuploid/Aneusomi pada manusia dapat menyebabkan:

- a. Sindrom Turner, dengan kariotipe ($22AA+X0$). Jumlah kromosomnya 45 dan kehilangan 1 kromosom kelamin. Penderita Sindrom Turner berjenis kelamin wanita, namun ovumnya tidak berkembang (ovaricular disgenesis).
- b. Sindrom Klinefelter, kariotipe ($22 AA+XXY$), mengalami trisomik pada kromosom gonosom. Penderita Sindrom Klinefelter berjenis kelamin laki-laki, namun testisnya tidak berkembang (testicular disgenesis) sehingga tidak bisa menghasilkan sperma (aspermia) dan mandul (gynaecomastis) serta payudaranya tumbuh.
- c. Sindrom Jacobs, kariotipe ($22AA+XYY$), trisomik pada kromosom gonosom. Penderita sindrom ini umumnya berwajah kriminal, suka menusuk-nusuk mata dengan benda tajam, seperti pensil,dll dan juga sering berbuat kriminal. Penelitian di luar negeri mengatakan bahwa sebagian besar orang-orang yang masuk penjara adalah orang-orang yang menderita Sindrom Jacobs.

- d. Sindrom Patau, kariotipe (45A+XX/XY), trisomik pada kromosom autosom. kromosom autosomnya mengalami kelainan pada kromosom nomor 13, 14, 15.
- e. Sindrom Edward, kariotipe (45A+XX/XY), trisomik pada autosom. Autosom mengalami kelainan pada kromosom nomor 16,17, atau 18. Penderita sindrom ini mempunyai tengkorak lonjong, bahu lebar pendek, telinga agak ke bawah dan tidak wajar.

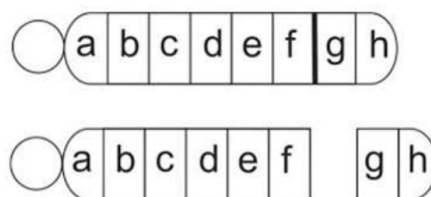
2) Mutasi Akibat Perubahan Struktur Kromosom

Mutasi karena perubahan struktur kromosom atau kerusakan pada bentuk kromosom. Mutasi ini disebut juga dengan istilah aberasi (kerusakan) pada bentuk kromosom. Macam-macam aberasi adalah:

a) Delesi atau defisiensi

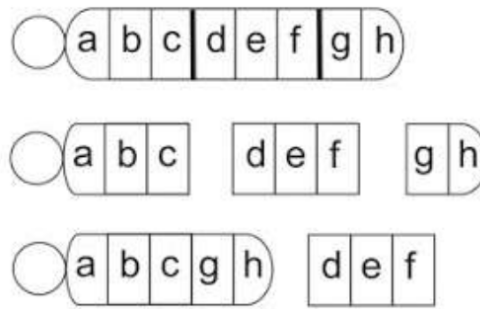
Delesi adalah mutasi karena kekurangan segmen kromosom. Hal ini yang terjadi karena sebagian segmen kromosom lenyap sehingga kromosom kekurangan segmen. Delesi terjadi ketika sebuah fragmen kromosom patah dan hilang pada saat pembelahan sel. Kromosom tempat fragmen tersebut berasal kemudian akan kehilangan gen-gen tertentu. Namun dalam beberapa kasus, fragmen patahan tersebut dapat berikatan dengan kromosom homolog menghasilkan Duplikasi. Fragmen tersebut juga dapat melekat kembali pada kromosom asalnya dengan arah terbalik dan menghasilkan Inversi. Defisiensi dapat menyebabkan kematian, separuh kematian, atau menurunkan viabilitas. Pada tanaman, defisiensi yang ditimbulkan oleh perlakuan bahan mutagen (radiasi) sering ditunjukkan dengan munculnya mutasi klorofil. Kejadian mutasi klorofil biasanya dapat diamati pada stadium muda (seedling stag), yaitu dengan adanya perubahan warna pada daun tanaman. Macam-macam delesi antara lain:

Delesi terminal, ialah delesi yang kehilangan ujung segmen kromosom



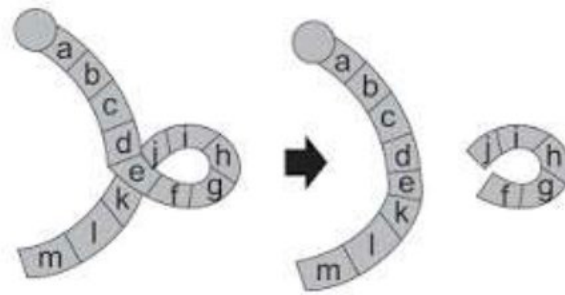
Gambar 70 Defisiensi/delesi terminal

Delesi interstitial, ialah delesi yang kehilangan bagian tengah kromosom.



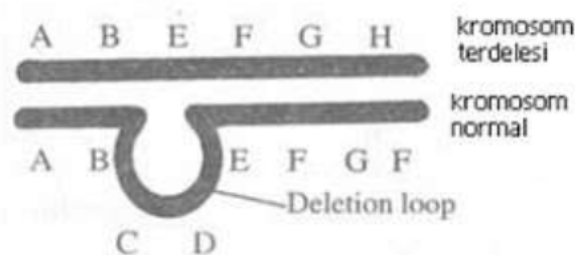
Gambar 71 Delesi interstitial

Delesi cincin ialah delesi yang kehilangan segmen kromosom sehingga berbentuk lingkaran seperti cincin.



Gambar 72 Delesi cincin

Delesi loop ialah delesi cincin yang membentuk lengkungan pada kromosom lainnya.



Gambar 73 Delesi loop

b) Duplikasi

Mutasi karena kelebihan segmen kromosom. Duplikasi terjadi karena adanya segmen kromosom yang mengakibatkan jumlah segmen kromosom lebih banyak dari kromosom aslinya. Mutasi ini terjadi pada waktu meiosis, sehingga memungkinkan

adanya kromosom lain (homolognya) yang tetap normal. Duplikasi menampilkan cara peningkatan jumlah gen pada kondisi diploid. Duplikasi dapat terjadi melalui beberapa cara seperti: pematihan kromosom yang kemudian diikuti dengan transposisi segmen yang patah, penyimpangan dari mekanisme crossingover pada meiosis (fase pembelahan sel), rekombinasi kromosom saat terjadi translokasi, sebagai konsekuensi dari inversi heterosigot, dan sebagai konsekuensi dari perlakuan bahan mutagen. Beberapa kejadian duplikasi telah dilaporkan dapat meningkatkan viabilitas tanaman. Pengaruh radiasi terhadap duplikasi kromosom telah banyak dipelajari pada bermacam jenis tanaman seperti jagung, kapas, dan barley.

c) Translokasi

Translokasi adalah pemindahan sebagian dari segmen kromosom ke kromosom lainnya yang bukan kromosom homolognya atau mutasi yang mengalami pertukaran segmen kromosom ke kromosom non homolog. Macam-macam translokasi antara lain sebagai berikut.

- Translokasi tunggal.

Translokasi ini terjadi jika kromosom yang patah pada satu tempat, kemudian bagian yang patah tersebut bersambungan dengan kromosom lain yang bukan homolognya.

- Translokasi perpindahan

Terjadi jika kromosom patah di dua tempat dan patahannya bersambungan dengan kromosom lain yang bukan homolognya

- Translokasi resiprok

Terjadi jika dua buah kromosom yang bukan homolognya patah pada tempat tertentu, kemudian patahan tersebut saling bertukar.

Translokasi resiprok dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu sebagai berikut:

- ii. Translokasi resiprok homozigot

Translokasi homozigot ialah translokasi yang mengalami pertukaran segmen dua kromosom homolog dengan segmen dua kromosom non homolog.

- ii. Translokasi resiprok heterozigot

Translokasi heterozigot ialah translokasi yang hanya mengalami pertukaran satu segmen kromosom ke satu segmen kromosom nonhomolognya.

iii. Translokasi Robertson

Translokasi Robertson ialah translokasi yang terjadi karena penggabungan dua kromosom akrosentrik menjadi satu kromosom metasentrik, maka disebut juga fusion (penggabungan).

d) Inversi

Inversi adalah mutasi yang terjadi karena selama meiosis kromosom terpilin dan terjadinya kiasma, sehingga terjadi perubahan letak/kedudukan gen-gen atau dengan kata lain inversi ialah mutasi yang mengalami perubahan letak gen-gen, karena selama meiosis kromosom terpilin. Inversi terjadi karena kromosom patah dua kali secara simultan setelah terkena energi radiasi dan segmen yang patah tersebut berotasi 180° dan menyatu kembali. Kejadian bila sentromer berada pada bagian kromosom yang terinversi disebut perisentrik, sedangkan bila sentromer berada di luar kromosom yang terinversi disebut parametik Inversi perisentrik berhubungan dengan duplikasi atau penghapusan kromatid yang dapat menyebabkan aborsi gamet atau pengurangan frekuensi rekombinasi gamet.

e) Isokromosom

Isokromosom ialah mutasi kromosom yang terjadi pada waktu menduplikasikan diri, pembelahan sentromernya mengalami perubahan arah pembelahan sehingga terbentuklah dua kromosom yang masing masing berlawanan identik (sama). Dilihat dari pembelahan sentromer maka isokromosom disebut juga fision, jadi peristiwanya berlawanan dengan translokasi Robertson (fusion) yang mengalami penggabungan.

f) Katenasi

Katenasi ialah mutasi kromosom yang terjadi pada dua kromosom non homolog yang pada waktu membelah menjadi empat kromosom, saling bertemu ujung-ujungnya sehingga membentuk lingkaran.

Selanjutnya animasi mutasi kromosom dapat dilihat pada video berikut dibawah ini.



Gambar 74 Mutasi Kromosom
Sumber: <https://youtu.be/WNboyqs67p4>

C. Dampak Mutasi

1) Kelainan kromosom

Beberapa sindrom/penyakit yang umum diamati akibat aberasi kromosom dijelaskan pada bagian berikut. Istilah sindrom umumnya mengacu pada sekelompok gejala yang secara konsisten terjadi bersama-sama, atau suatu kondisi yang dicirikan oleh serangkaian gejala yang terkait. Penyakit mengacu pada respons fisiologis abnormal terhadap faktor internal atau eksternal, misalnya, demam yang disebabkan oleh mikroba.

a) Sindrom Down

Insiden terjadi pada kira-kira 1 per 800 kelahiran hidup, Sindrom Down adalah kondisi genetik yang muncul karena adanya ekstra kromosom 21. Di sini, kromosom 21 diulang tiga kali (trisomi 21), bukannya muncul dua kali pada individu normal. Kariotipe sindrom Down direpresentasikan sebagai 47, XX,+21 (wanita) dan 47, XY, +21 (pria) (Gbr. 75).



Gambar 75 Kariogram dari (a) individu yang terkena down syndrome (b) individu yang terkena Klinefelter's.

Kondisi trisomik biasanya disebabkan oleh kesalahan dalam proses pembelahan sel yang disebut *non disjungsi*, yaitu ketidakmampuan kromosom untuk berpisah pada saat pembelahan sel. Kemungkinan memiliki bayi dengan Sindrom Down dalam keluarga meningkat seiring dengan bertambahnya usia ibu. Telah dilaporkan bahwa lebih dari 85% bayi Sindrom Down lahir dari ibu berusia di atas 35 tahun, pada saat kehamilan.

Ciri-ciri Sindrom Down:

- a. Kariotipe: 47, XX atau 47, XY
- b. Mongolism, telapak tebal seperti telapak kera
- c. Mata sipit miring ke samping
- d. Bibir tebal, lidah menjulur, liur selalu menetes
- e. Gigi kecil-kecil dan jarang
- f. Pertumbuhan kerdil,
- g. IQ rendah

Bayi sindrom Down juga menunjukkan masalah pernapasan, jantung, atau pendengaran. Sindrom Down biasanya didiagnosis dengan tambahan kromosom 21 pada kariotipe. Tidak ada protokol pengobatan standar tunggal untuk sindrom Down. Perawatan disesuaikan pada serangkaian kondisi spesifik yang disajikan oleh individu-individu ini. Pada usia dini, anak-anak dengan sindrom Down dapat memperoleh manfaat dari terapi wicara, fisioterapi, dan mengonsumsi suplemen nutrisi. Pada awal 1900-an, rata-rata, sindrom Down hidup sampai usia 9 tahun.

Sekarang dengan kemajuan teknologi diagnostik dan pengobatan, harapan usia telah meningkat hingga 60 dan bahkan lebih lama.

b) **Sindrom Klinefelter**

Insiden terjadi pada sekitar 1 dari 1000 laki-laki yang baru lahir. Dasar kromosom: Genotipe: 47, XXY. Mempengaruhi laki-laki. Kromosom ekstra tidak ditransmisikan secara genetik (yaitu, bayi baru lahir Klinefelter tidak dapat memiliki ayah Klinefelter) tetapi muncul dari ketidakmampuan kromosom X untuk melepaskan diri dari pasangan selama meiosis (pada saat pembentukan gamet). Pembuahan sel telur XX dengan sperma Y menghasilkan zigot XXY.

Ciri-ciri:

- a. Kariotipe: 47. XXY (kelebihan kromosom seks X) diderita oleh pria
- b. Bulu badan tidak tumbuh
- c. Testis mengecil, mandul (steril)
- d. Buah dada membesar
- e. Tinggi badan berlebih
- f. Jika jumlah kromosom X lebih dari dua mengalami keterbelakangan mental

Pada saat lahir, bayi dengan Klinefelter sedikit berbeda dengan bayi normal lainnya. Namun, seiring bertambahnya usia, perbedaannya menjadi nyata, terutama pada masa pubertas. Orang dengan sindrom Klinefelter sering diobati dengan testosteron agar terlihat maskulin. Mereka juga perlu dibimbing secara psikologis untuk mengendalikan depresi yang mengarah pada agresi.

c) **Sindrom Turner**

Insiden terjadi pada 1 dari 2.500 bayi perempuan yang baru lahir, sering diamati pada keguguran dan bayi lahir meninggal. Mempengaruhi wanita, muncul karena kromosom X yang hilang pada wanita yang terkena. Ini disebut monosomi X dan kariotipe direpresentasikan sebagai: 45, X. Kesalahan pembelahan sel selama meiosis ovum menghasilkan ovum tanpa kromosom X dan lainnya dengan dua kromosom X. Ovum tanpa kromosom X menyatu dengan sperma dengan satu kromosom X untuk menghasilkan kondisi 45, X. Ibu dengan sindrom Turner tidak

dapat mewariskan kondisi ini kepada anak perempuan mereka, yaitu kondisi ini tidak diwariskan. Sindrom Turner didiagnosis dengan ciri-ciri berikut:

- a. Kariotipe: 45 X 0 (44 autosom + satu kromosom X) diderita oleh wanita
- b. Tinggi badan cenderung pendek
- c. Alat kelamin terlambat perkembangannya
- d. Sisi leher tumbuh tambahan daging
- e. Bentuk kaki X
- f. Kedua puting susu berjarak melebar
- g. Keterbelakangan mental

Seperti sindrom lainnya, tidak ada obat yang permanen. Namun, fungsi pertumbuhan dan ovarium dapat diperkuat dengan pemberian hormon androgen dan estrogen yang terkontrol.

d) Sindrom Jacob

Ditemukan oleh P.A. Jacobs tahun 1965. Sindrom Jacobs terdiri dari adanya kromosom Y yang berlebihan. Prevalensi kelainan kromosom seks XYY pada bayi baru lahir, tetapi sering tidak teridentifikasi karena tidak selalu terkait dengan gangguan fisik atau kognitif yang berat, sehingga mungkin tidak pernah mendapat perhatian medis.

Ciri-ciri:

- a. Kariotipe 47.XYY (kelebihan sebuah kromosom seks Y) diderita oleh pria
- b. Berperawakan tinggi
- c. Bersifat antisocial, agresif, Sulit berbicara

2) Gangguan Monogenik

Penyakit monogenik disebabkan oleh kesalahan dalam satu gen. Menurut perkiraan saat ini, lebih dari 10.000 penyakit manusia diperkirakan bersifat monogenik yang mempengaruhi jutaan individu di seluruh dunia. Sifat penyakit, tanda dan gejalanya tergantung pada fungsi yang dilakukan oleh gen yang dimodifikasi atau rusak. Penyakit-penyakit ini diturunkan menurut Hukum Mendel. Dalam beberapa kasus, mutasi bisa spontan dan di mana kita tidak akan mendapatkan riwayat keluarga sebelumnya. Mungkin ada mutasi tunggal dalam

satu gen yang menyebabkan penyakit tertentu seperti anemia sel sabit atau beberapa jenis mutasi dalam satu gen dan menghasilkan penyakit yang sama seperti *cystic fibrosis* (lebih dari 200 jenis mutasi yang berbeda dapat terjadi dalam satu gen). Penyakit gen tunggal atau monogenik dapat diklasifikasikan ke dalam kategori berikut sesuai dengan pola pewarisan sebagai berikut:

- a. Resesif autosomal
- b. Dominan autosomal
- c. Resesif terkait-X
- d. Dominan terkait-X

Untuk mendiagnosis penyakit genetik yang diturunkan, kita harus memahami konsep analisis silsilah. Analisis silsilah adalah proses interpretasi informasi yang ditampilkan sebagai pohon keluarga. Jika lebih dari satu orang dalam keluarga terlibat dengan suatu penyakit maka analisis silsilah dapat dilakukan.

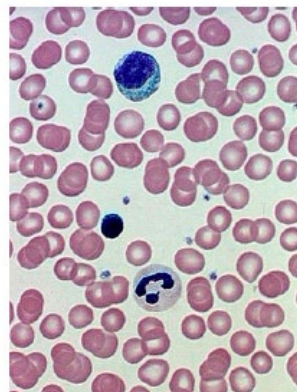
a) Gangguan Resesif Autosomal

Kata 'Resesif' menunjukkan bahwa 2 salinan gen diperlukan untuk memiliki sifat dan kelainan jika gen bermutasi. Dari 2 salinan satu gen diwarisi dari ayah dan satu dari ibu. Jika seseorang membawa satu gen resesif yang cacat dan satu gen resesif normal, maka dia akan menjadi pembawa dan tidak mengembangkan penyakit. Berdasarkan proyeksi statistik diperkirakan bahwa setiap manusia membawa sekitar 5 atau lebih gen resesif yang cacat yang dapat menyebabkan penyakit genetik. Fenotipe penyakit dari gangguan resesif disebabkan oleh homozigositas alel resesif dan fenotipe yang tidak terpengaruh adalah sekunder dari alel dominan yang sesuai.

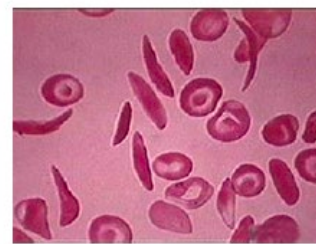
i) Anemia sel sabit

Anemia sel sabit yang merupakan penyakit resesif autosomal. Penyakit sel sabit disebabkan oleh mutasi pada gen hemoglobin- β yang ditemukan pada kromosom 11. Hal ini menyebabkan hemoglobin (Hb) rusak. Setelah melepaskan oksigen, molekul Hb yang rusak ini berkumpul bersama menghasilkan pembentukan struktur seperti batang. Sel darah merah menjadi kaku dan

berbentuk sabit. Sel darah merah menjadi kaku dan berbentuk sabit. Penyakit kronis yang diturunkan di mana sel darah merah biasanya berbentuk cakram, menjadi berbentuk bulan sabit. Akibatnya, berfungsi secara tidak normal dan menyebabkan pembekuan darah kecil. Gumpalan ini menimbulkan nyeri berulang yang disebut "krisis nyeri sel sabit". Penyakit sel sabit paling sering ditemukan pada populasi Afrika-Amerika. Penyakit ini ditemukan lebih dari 80 tahun yang lalu, tetapi belum mendapat perhatian yang layak.



Blood smear (normal)



Sickle cell anemia

Gambar 76 Anemia sel sabit

Anemia sel sabit sangat umum di antara orang-orang yang nenek moyangnya berasal dari Afrika sub-Sahara, Amerika Selatan, Kuba, Amerika Tengah, Arab Saudi, India, dan negara-negara Mediterania.

Hemoglobin adalah tetramer yaitu 2α dan 2β rantai. Gen untuk polipeptida ini ditemukan pada kromosom yang berbeda, gen rantai β ditemukan pada kromosom 11 Gen rantai α ditemukan pada kromosom 16. Urutan nukleotida telah dikerjakan Beberapa penyakit turunan terjadi pada rantai β , yang mengandung 146 asam amino.

Inisiator Metionin

ATG GTG CAT CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG
TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG
GGC AGG CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG
TCC TTT GGG GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT GTT ATG GGC AAC CCT
AAG GTG AAG GCT CAT GGC AAG AAA GTG CTC GGT GCC TTT AGT GAT
GGC CTG GCT CAC CTG GAC AAC CTC AAG GGC ACC TTT GCC ACA CTG
AGT GAG CTG CAC TGT GAC AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG AAC TTC
AGG CTC CTG GGC AAC GTG CTG GTC TGT GTG CTG GCC CAT CAC TTT
GGC AAA GAA TTC ACC CCA CCA GTG CAG GCT GCC TAT CAG AAA GTG
GTG GCT GGT GTG GCT AAT GCC CTG GCC CAC AAG TAT CAC TAA

Terminasi Nonsense

ii) Cystic Fibrosis

Penderita *cystic fibrosis* menghasilkan lendir yang kental dan lengket secara abnormal yang dapat merusak berbagai organ khususnya paru-paru yang mengakibatkan infeksi kronis.

iii) Tay-Sachs

Penyakit Tay-Sachs disebabkan tidak adanya enzim yang disebut hexosaminidase A yang mengakibatkan akumulasi zat lemak di sel-sel saraf terutama yang mempengaruhi otak. Ini adalah penyakit fatal yang bermanifestasi di masa kanak-kanak. Satu dari 27 orang individu keturunan Yahudi Ashkenazi Eropa membawa gen Tay-Sachs.

iv) Fenilketonuria

Fenilketonuria disebabkan oleh mutasi pada gen fenilalanin hidroksilase yang mengakibatkan peningkatan fenilalanin dalam darah. Orang dengan PKU tidak boleh mengonsumsi produk apa pun yang mengandung aspartam. PKU adalah

gangguan metabolisme yang terjadi ketika gen PKU diturunkan dari kedua orang tua. Disebabkan oleh kekurangan enzim yang diperlukan untuk metabolisme yang tepat dari asam amino fenilalanin.

b) Gangguan Dominan Autosomal

Pada pewarisan jenis ini alel normal bersifat resesif dan alel abnormal bersifat dominan. Gangguan dominan autosomal yang langka *Achondroplasia* dapat dianggap sebagai contoh yang mengarah ke tipe Dwarfisme pada individu yang terkena. Pada kondisi ini orang normal memiliki genotipe d/d, individu yang terkena penyakit ringan memiliki D/d dan sangat parah memiliki D/D yang seringkali mematikan. Jadi sebagian besar kasus achondroplasia yang masih hidup adalah heterozigot. Penyakit Huntington adalah contoh lain dari kelainan dominan autosomal langka yang mempengaruhi sistem saraf.

c) Gangguan resesif terkait-X

Dalam pewarisan resesif terkait-X pada ibu (XX) gen yang terpengaruh tetap berada pada satu kromosom X, akibatnya ia menjadi pembawa dan biasanya hanya laki-laki (XY) yang terpengaruh oleh kelainan tersebut. Pada keturunannya laki-laki mewariskan kromosom Y ke anak laki-laki mereka dan kromosom X mereka ke anak perempuan mereka. Jadi seorang pria yang terkena tidak akan menularkannya kepada anak laki-lakinya tetapi semua anak perempuannya akan menjadi pembawa.

i) Hemofilia

Hemofilia adalah kelainan perdarahan yang berhubungan dengan mutasi pada gen faktor koagulasi VIII (tipe A) atau gen faktor IX (tipe B). Mutasi pada gen faktor koagulasi menghasilkan produksi versi abnormal dari faktor koagulasi VIII atau IX, atau berkurangnya jumlah salah satu protein ini. Faktor koagulasi yang berubah atau hilang tidak dapat secara efektif menyelesaikan proses pembekuan darah yang menyebabkan perdarahan spontan atau peningkatan kecenderungan perdarahan.

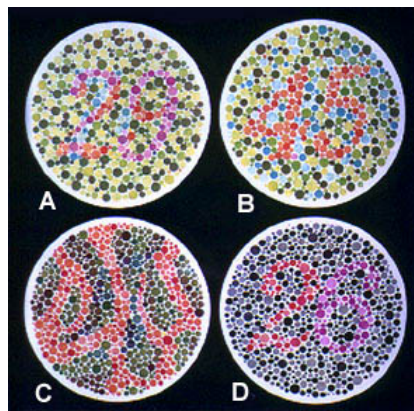
ii) Duchenne Muscular Dystrophy

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) disebabkan oleh mutasi gen distrofin yang mengakibatkan berkurangnya/tidak adanya distrofin atau adanya protein abnormal. Kelainan atau defisiensi distrofin menyebabkan distrofi atau degenerasi otot yang membuatnya lebih rapuh dan lemah.

iii) Buta Warna

Penyebab: resesif terkait-x, 1/10 laki-laki punya, 1/100 perempuan punya.

Individu tidak dapat membedakan warna merah-hijau.



Gambar 77 Model Warna

d) Gangguan dominan terkait-X

Dalam jenis pewarisan ini, Laki-laki yang terkena mewariskan gen dominan yang bermutasi ke semua anak perempuan mereka tetapi tidak kepada anak laki-laki mereka. Contoh gangguan tersebut adalah hipofosfatemia, sejenis rakhitis yang resisten terhadap vitamin D dan sindrom Alport, yang dikaitkan dengan gangguan pendengaran progresif dan penyakit ginjal.

3) Gangguan Poligenik

Gangguan poligenik disebabkan oleh defek atau aksi gabungan lebih dari satu gen. Contoh klasik penyakit poligenik termasuk hipertensi, penyakit jantung koroner dan diabetes. Sebagai patogenesis hasil penyakit tersebut tergantung pada asosiasi simultan dari beberapa gen dan oleh karena itu, mereka tidak dapat dijelaskan sebagai penyakit monogenik.

a) Diabetes mellitus

Penyakit ini adalah contoh penting dari penyakit poligenik. Ini adalah sekelompok gangguan heterogen yang ditandai dengan kadar gula darah tinggi atau hiperglikemia. Ada dua bentuk diabetes yang paling umum: diabetes tipe 1 (T1D, sebelumnya dikenal sebagai *insulin dependent diabetes* atau IDDM) dan diabetes tipe 2 (T2D, sebelumnya dikenal sebagai *non-insulin-dependent diabetes* atau NIDDM). Diabetes adalah salah satu penyakit tidak menular. Diabetes tipe I disebabkan oleh rusaknya sel beta pankreas akibat kelainan imunologis. Jenis ini merupakan sekitar 10% dari semua kasus diabetes. Perawatan seumur hidup dengan injeksi insulin diperlukan untuk kasus ini. Diabetes tipe 2 adalah bentuk penyakit yang paling umum dan mewakili sekitar 90% kasus. Hal ini disebabkan oleh gangguan sekresi insulin dari sel beta pankreas dan juga resistensi insulin perifer. Insulin diperlukan untuk mengangkut glukosa dari darah ke dalam sel seperti sel otot untuk menghasilkan energi dan mempertahankan fungsi sel. Biasanya, diabetes tipe 2 dikelola dengan mengontrol pola makan, olahraga dan obat-obatan oral atau persiapan lain yang dapat menurunkan kadar gula darah.

Ciri-cirinya Diabetes:

- a. Rasa haus yang ekstrim
- b. Penglihatan kabur dari waktu ke waktu
- c. Sering buang air kecil
- d. Kelelahan atau kantuk yang tidak biasa
- e. Penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan

Diabetes adalah penyebab utama gagal ginjal, kebutaan, dan amputasi pada orang dewasa, dan juga dapat menyebabkan penyakit jantung.

b) Kanker

Sel kanker adalah sel normal yang mengalami mutasi/perubahan genetik dan tumbuh tanpa terkoordinasi dengan sel-sel tubuh lain. Proses pembentukan kanker (karsinogenesis) merupakan kejadian somatik dan sejak lama diduga disebabkan

karena akumulasi perubahan genetic dan epigenetik yang menyebabkan perubahan pengaturan normal kontrol molekuler perkembangbiakan sel. Sel kanker yang tak mampu berinteraksi secara sinkron dengan lingkungan dan membelah tanpa kendali bersaing dengan sel normal dalam memperoleh bahan makanan dari tubuh dan oksigen. Tumor dapat menggantikan jaringan sehat dan terkadang menyebar ke bagian lain dari tubuh yakni suatu proses pemendekan umur yang lazim disebut metastasis. Potensi metastasis ini diperbesar oleh perubahan genetik yang lain. Jika tidak diobati, kebanyakan kanker mengarah ke pesakitan dan bahkan kematian. Kanker muncul melalui perubahan genetik rangkap/ganda dalam sel induk dari organ tubuh. Sebagian perubahan yang tidak dapat dihapuskan akan terus menumpuk bersamaan dengan bertambahnya umur dan tidak dapat dihindari, akan tetapi predisposisi genetik, faktor lingkungan dan yang paling banyak yakni gaya hidup adalah faktor-faktor yang penting.

c) Hipertensi

Hipertensi atau peningkatan tekanan darah yang terus-menerus merupakan faktor risiko utama untuk ginjal, jantung dan stroke yang melibatkan otak. Ini adalah penyebab utama kematian dan morbiditas global. Untuk mengontrol tekanan darah disarankan dengan pengurangan obesitas, olahraga teratur, dan peningkatan gaya hidup. Penyakit Jantung Koroner (PJK) juga merupakan penyebab penting morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia. Baik hipertensi maupun diabetes merupakan faktor risiko penting untuk penyakit ini. PJK berkembang karena penyempitan arteri koroner yang mensuplai darah ke otot jantung dengan penumpukan bertahap bahan lemak di dindingnya. Akumulasi bahan lemak di dinding arteri ini disebut aterosklerosis. Karena penyempitan arteri koroner oleh aterosklerosis tidak dapat memasok darah kaya oksigen ke otot jantung yangmembutuhkannya untuk aktivitas terus menerus. Fenomena pengurangan suplai darah ini disebut iskemia. Itulah sebabnya penyakit jantung koroner sebelumnya disebut sebagai penyakit jantung iskemik. Selanjutnya animasi dampak mutasi genetik dapat dilihat pada video berikut.



Gambar 78 Beberapa Dampak Mutasi
Sumber: <https://youtu.be/MmHd3Bg-EEo>

D. Terapi Gen

Terapi gen adalah suatu tehnik untuk memperbaiki gen yang cacat/rusak sehingga dapat menimbulkan penyakit. Gen itu terdapat dalam kromosom merupakan dasar fungsional dan fisik dari keturunan. Perintahnya berupa sandi untuk membuat protein pada struktur seluler. Bila terjadi perubahan dari gen, maka protein yang terbentuk tidak lagi dapat melakukan fungsi yang normal, sehingga akan menimbulkan kelainan genetic. Para ilmuwan sekarang sudah dapat menentukan gen yang dapat menimbulkan penyakit/kelainan. Dan sedang dipelajari pula bagaimana cara memperbaiki atau mengganti gen tersebut, dengan menggunakan bakteri, virus yang sudah dimodifikasi secara genetik, dan dipakai sebagai obat bahkan dapat menggantikan organ tubuh. Usaha para peneliti untuk memperbaiki gen yang cacat antara lain: Memasukkan gen yang normal kedalam lokasi non spesifik diantara genom untuk mengganti gen yang tidak berfungsi, Gen yang cacat diganti dengan gen yang normal melalui rekombinasi homologus, Gen yang cacat diperbaiki dengan mutasi balik yang selektif sehingga gen kembali ke fungsi yang normal.

Terapi gen adalah tehnik untuk mengoreksi gen yang cacat yang bertanggung jawab terhadap suatu penyakit. Pengobatan dengan gen terapi meliputi

1) Imunoterapi

Menggunakan sel yang telah dimodifikasi secara genetik dari partikel virus untuk menstimulir sistem imun tubuh sehingga mampu mengalahkan keganasan sel kanker.

2) Viro onkolitik

Menggunakan partikel sel virus yang bereplikasi didalam sel kanker dan menyebabkan sel kanker menjadi mati.

3) Transfer gen

Tehnik ini relatif baru, dengan cara memperkenalkan gen 2 baru yang dimasukan kedalam sel kanker atau mengelilingi jaringan kanker sehingga dapat menghentikan pertumbuhan dan menghancurkan sel kanker

Dalam terapi gen memerlukan satu molekul yang berfungsi sebagai karier disebut sebagai vektor. Vektor inilah yang membawa gen /DNA yang normal ke sel target pasien, dan yang biasa dipakai sebagai vektor adalah virus yang telah diubah secara genetik. Beberapa jenis virus yang digunakan untuk terapi gen: Retro virus dan Adeno virus. Retro virus adalah golongan virus yang dapat membuat rantai ganda DNA dari genomnya dan disatukan dengan kromosom sel inangnya mis: HIV (human defisiensi virus), sedangkan Adeno virus adalah golongan virus dengan rantai DNA gandanya dapat menyebabkan infeksi pada saluran pernapasan, saluran pencernaan dan menimbulkan kematian.

Berdasarkan materi dan video pembelajaran pertemuan ke sepuluh biokimia 2 pada pokok bahasan mutasi genetik yang telah disajikan, amatilah beberapa penyakit genetik yang pernah saudara lihat? Mengapa genetik makhluk hidup dapat mengalami mutasi?

2. **PENCETUSAN IDE**

Pahamilah orientasi di atas yang telah disajikan, kemudian berdasarkan pengamatan saudara diskusikan dengan kompok saudara hal-hal berikut ini: Apakah mutasi genetik membahayakan organismenya? Apa yang terjadi jika mutasi genetik pada level gen dan kromosom? Bagaimana mahluk hidup yang mengalami mutasi genetik, dapat melangsungkan kehidupannya. Bahaslah bersama kelompok saudara tentang mutasi genetik pada Lembar Kerja Mahasiswa (LKM) yang telah disediakan.

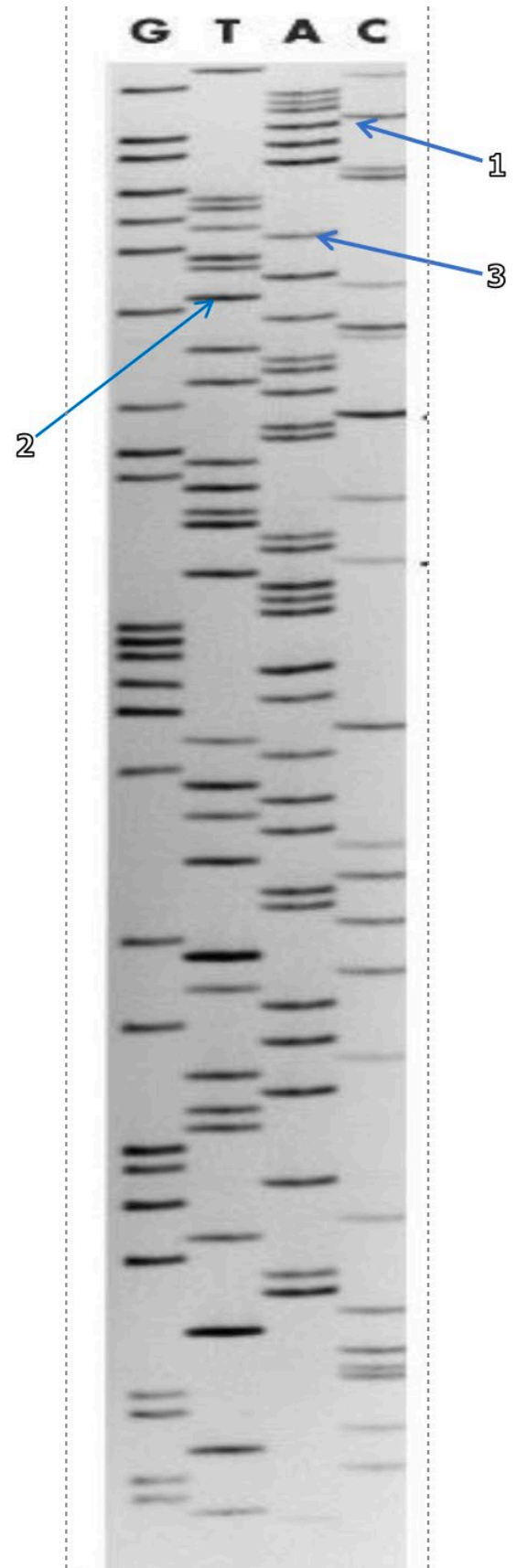
3. PENSTRUKTURAN IDE

Hasil pencetusan ide bersama dengan kelompok saudara rancanglah proyek tentang mutasi genetik makhluk hidup. Bahaslah naskah rancangan tersebut tulislah/gambarkan/skenariokan tentang mutasi genetik makhluk hidup. Buatlah analisa hasil yang menunjukkan jenis-jenis mutasi genetik, urutan DNA normalnya dan urutan DNA perubahannya. Bahaslah bahan dan alat yang digunakan untuk menyelesaikan proyek tersebut.

4. APLIKASI

Berdasarkan rancangan yang telah di buat, bersama kelompok saudara lakukan pembuatan video mutasi genetik makhluk hidup. Proyek dilakukan di luar jam kuliah, sesuai operasional prosedur Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unsri. Lakukanlah proyek tersebut semenarik mungkin. Lakukanlah kolaborasi bersama teman-teman saudara dalam menyelesaikan proyek tersebut. Kemudian setelah selesai pembuatan video tersebut, bahaslah hal-hal berikut, diberikan hasil sekuensing urutan nukleotida di samping ini;

- Jika urutan DNA C (1) diinsersi (ditambah) dengan T, tuliskan hasil ekspresi gennya (Protein).
- Jika urutan DNA T (2) di delisi, tuliskan hasil ekspresi gennya (Protein).

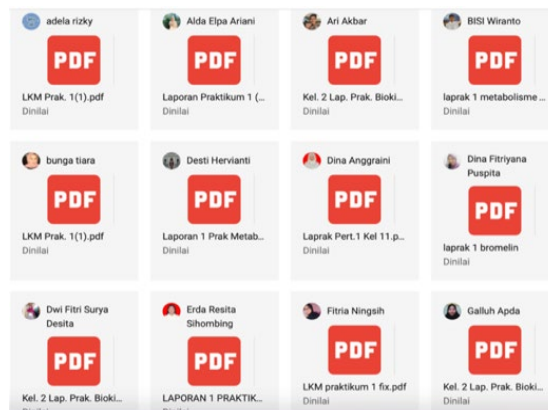


- c. Jika urutan DNA A (3) di substitusi dengan G, tuliskan hasil ekspresi gennya (Protein).

5. REFLEKSI

Selanjutnya hasil elaborasi dengan dosen, saat proses pembelajaran jika ada perbaikan ditindaklanjuti dengan perbaikan, kemudian dituangkan dalam "Laporan 10 Mutasi Genetik". Laporan tersebut di buat sesuai dengan format Lembar Kerja Mahasiswa yang telah di sediakan, kemudian di submit ke <https://elearning.unsri.ac.id>

Contoh submit laporan10 Mutasi Genetik.



Gambar 79. Submit Laporan 10 Mutasi Genetik

Laporan 10 Mutasi Genetik minimal memuat hal-hal sebagai berikut yaitu: orientasi, pencetusan ide, penstrukturan ide, aplikasi, refleksi, dan daftar pustaka. Materi perkuliahan pokok bahasan pondasi biokimia dapat anda pelajari juga dalam paparan berikut ini.

Latihan Soal

1. Pengaruh perubahan basa tunggal pada kode genetik dapat menyebabkan perubahan urutan asam amino protein mutan setelah basa tunggal diubah pada gen yang mengkode protein. Manakah dari penggantian asam amino berikut yang akan konsisten dengan kode genetik jika penggantian tersebut disebabkan oleh perubahan basa tunggal? Manakah yang bukan merupakan hasil dari mutasi basis tunggal? Mengapa?

- | | |
|-------------|-------------|
| (a) Phe→Leu | (e) Ile→Leu |
| (b) Lys→Ala | (f) His→Glu |
| (c) Ala→Thr | (g) Pro→Ser |
| (d) Phe→Lys | |

2. Memprediksi Antikodon dari Kodon Kebanyakan asam amino memiliki lebih dari satu kodon dan menempel pada lebih dari satu tRNA, masing-masing dengan antikodon yang berbeda. Tulis semua kemungkinan an-tikodon untuk empat kodon glisin: (5') GGU, GGC, GGA, dan GGG.

(a) Dari jawaban Anda, manakah di antara posisi antikodon yang merupakan determinan utama spesifisitas kodonnya dalam kasus glisin?

(b) Manakah dari pasangan antikodon-kodon ini yang memiliki pasangan basa goyah?

(c) Pada pasangan antikodon-kodon manakah ketiga posisi menunjukkan ikatan hidrogen Watson-Crick yang kuat?

3. Dasar mutasi sel sabit hemoglobin sel sabit memiliki residu Val pada posisi 6 dari rantai β -globin, bukan residu Glu yang ditemukan pada hemoglobin normal A. Dapatkah Anda memprediksi perubahan apa yang terjadi pada kodon DNA untuk glutamate penggantian residu Glu oleh Val?

4. Pentingnya "Kode Genetik Kedua" Beberapa sintetase aminoasil-tRNA tidak mengenali dan mengikat antikodon dari tRNA serumpunnya tetapi menggunakan fitur struktural lain dari tRNA untuk memberikan spesifisitas pengikatan. tRNA untuk alanin tampaknya termasuk dalam kategori ini.

(a) Ciri-ciri tRNAAla apa yang dikenali oleh Ala-tRNA synthetase?

(b) Jelaskan akibat dari mutasi \ominus G pada posisi ketiga antikodon tRNAAla.

(c) Mutasi jenis lain apa yang mungkin memiliki efek serupa?

(d) Mutasi jenis ini tidak pernah ditemukan pada populasi alami organisme. Mengapa?

DAFTAR PUSTAKA

1. Adam, R.L.P., Knowler, J.T., Leader, D.P. 1986. *The Biochemistry of the Nucleic Acids Tenth edition*. New York: Chapman and Hall Ltd.
2. Brown, T. A. 2011. *Introduction to genetics: A molecular approach*. New York: Garland Publishing.
3. Billiet. P. 2007. *Gene Mutations*. <https://www.lkouniv.ac.in> > site > siteContent > 20. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2019.
4. <https://youtu.be/U4mC0kGxuKk>. *Animation 26.2 Gene mutations*. Diakses pada tanggal 10 Desember 2019.
5. <https://youtu.be/WNboyqs67p4>. *Chromosomal mutations*. Diakses pada tanggal 5 Desember 2019.
6. <https://youtu.be/MmHd3Bg-EEo>. *Three Types of Genetic Diseases*. Diakses pada tanggal 10 Desember 2019.
7. Bachman, J.W. *Genetic Disorders*. <http://eknygos.lsmuni.lt> > springer. . Diakses pada tanggal 25 Januari 2022
8. Nelson, D.L., Cox, M.M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry sixth edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
9. Sukaryawan, M. 2004. *Biokimia*. Indralaya: Prodi Pendidikan Kimia FKIP Unsri
10. Thenawidjaja, M. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga
11. Watson, DJ., Tooze, J., Kurtz, DT. 1998. *DNA Recombinant*. Jakarta: Erlangga.
12. Warmadewi, D.A. 2017. *Buku Ajar Mutasi Genetik*. <https://simdos.unud.ac.id> > file_pendidikan_1_dir. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2019.
13. Wirahadikusumah, M. 1985. *Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB

BAB 22 ENZIM RESTRIKSI DAN VEKTOR

1. ORIENTASI

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah yang direncanakan adalah mahasiswa menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah (CPMK-3), sedangkan kemampuan akhir pada pokok bahasan ini adalah mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi enzim restriksi dan vector cloning gen (Sub-CPMK3). Pengalaman belajar yang diperoleh mahasiswa merencanakan, melaksanakan dan melaporkan proyek, presentasi tugas kelompok, mengerjakan lembar kerja mahasiswa, membuat dan mensubmit Laporan di <https://elearning.unsri.ac.id>

A. Enzim Restriksi

Pada pembahasan terdahulu telah di jelaskan tentang enzim yang merupakan protein aktif yang berfungsi sebagai biokatalisator, mengkatalisis reaksi-reaksi pada makhluk hidup. Enzim restriksi endonuklease adalah enzim yang biasa digunakan dalam rekayasa genetika. Enzim restriksi endonuklease adalah enzim yang memotong tulang punggung gula-fosfat dari untai DNA. Sebagian besar enzim ini telah diisolasi dari bakteri, di mana mereka melakukan fungsi pertahanan inang untuk sel. Enzim-enzim ini mengenali urutan basa DNA spesifik dan membelah kedua untai molekul DNA untai ganda di atau dekat lokasi pengenalan. Semua enzim restriksi endonuklease termasuk dalam salah satu dari tiga kelas, berdasarkan struktur molekulnya dan kebutuhan akan kofaktor spesifik. Enzim restriksi endonuklease tipe I memiliki berat molekul sekitar 300.000 Dalton, terdiri dari sub-unit yang tidak identik, dan membutuhkan Mg^{2+} , ATP (adenosine triphosphate), dan SAM (S-adenosyl-methionine) sebagai kofaktor untuk aktivitasnya. Enzim restriksi endonuklease tipe II jauh lebih kecil, dengan berat molekul berkisar antara 20.000 hingga 100.000 Dalton. Mereka memiliki sub-unit yang identik dan hanya membutuhkan Mg^{2+} sebagai kofaktor. Enzim restriksi endonuklease tipe III adalah

molekul besar, dengan berat molekul sekitar 200.000 Dalton, terdiri dari sub-unit yang tidak identik. Enzim-enzim ini berbeda dari enzim dari dua kelas lainnya karena mereka membutuhkan Mg^{2+} dan ATP tetapi tidak SAM sebagai kofaktor. Enzim restriksi endonuklease tipe III adalah yang paling langka dari tiga jenis enzim restriksi tersebut.

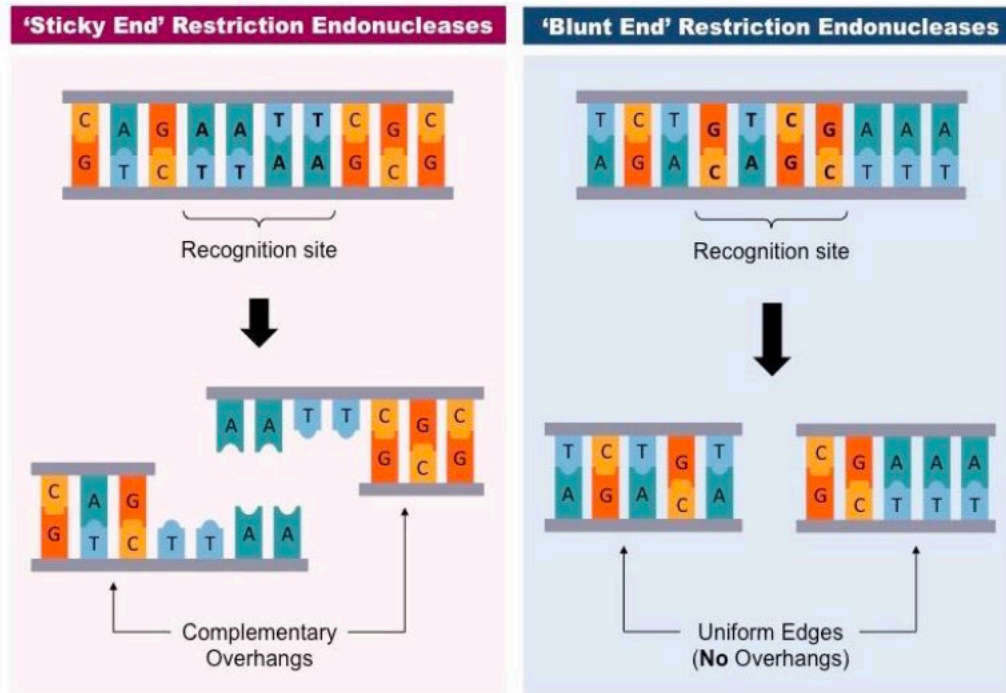
Pada tahun 1968 Matthew Meselson dan Robert Yuan melaporkan bahwa mereka telah mengidentifikasi enzim dalam bakteri *Escherichia coli*, strain K-12, yang tampaknya mampu mengenali dan memotong DNA asing. Mereka menyimpulkan enzim ini bisa menjadi agen yang bertanggung jawab untuk restriksi. Mereka menciptakan istilah restriksi endonuklease untuk merujuk pada enzim ini. Enzim restriksi endonuklease yang ditemukan oleh Meselson dan Yuan pada *E. coli* membutuhkan keberadaan Mg^{2+} , SAM, dan ATP untuk menjalankan fungsinya. Dengan demikian, enzim restriksi pertama yang diidentifikasi adalah enzim tipe I.

Tidak seperti enzim *E. coli*, bagaimanapun, endonuklease *H. influenzae* hanya membutuhkan keberadaan Mg^{2+} untuk aktivitasnya. Pola pembelahan kedua enzim terbatas dan dapat direproduksi secara konsisten, menunjukkan bahwa ada urutan DNA spesifik yang dikenali oleh enzim dan akan mengikat urutan ini sebelum pembelahan. Dalam makalah pendamping, Kelly dan Smith menawarkan bukti bahwa sisi pengenalan enzim adalah rangkaian enam nukleotida spesifik. Pada tahun 1975, Nathans dan Smith menyajikan nomenklatur standar yang konsisten untuk jumlah enzim yang diketahui berkembang pesat. Nama yang diberikan untuk setiap enzim baru akan menunjukkan genus dan spesies bakteri dari mana ia diisolasi, nomor regangan, dan urutan seri di mana enzim itu ditemukan. Dengan demikian, enzim restriksi yang disebut *Bam* HI merupakan enzim pertama yang ditemukan pada bakteri *Bacillus amyloliquifaciens*, strain H sedangkan enzim restriksi *Hae* III adalah enzim ketiga yang ditemukan pada *Haemophilus aegyptius*.

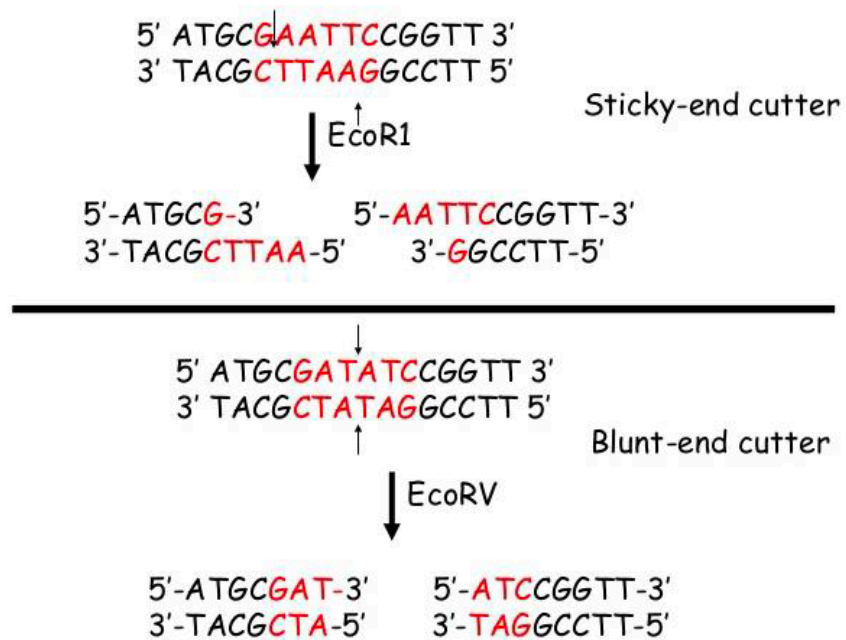
Kebanyakan urutan pengenalan enzim restriksi panjangnya dari empat sampai delapan basa dan kebanyakan palindromik. Keragaman tambahan ditemukan di antara *isoschizomer*. Sebagai contoh, enzim *Sma* I dan *Xma* I sama-sama mengenali

enam urutan basa CCCGGG tetapi memberikan fragmen yang berbeda dengan pemotongan CCC|GGG sebelumnya dan pemotongan terakhir C|CCGGG. Demikian pula, pasangan *isoschizomeric Hha I* dan *Hin PI* keduanya mengenali urutan GCGC tetapi yang pertama memotong GCG|C dan yang terakhir G|CGC. Perbedaan lebih lanjut ditemukan dalam kaitannya dengan kepekaan terhadap metilasi. Baik *Mbo I* dan *Sau 3A* memotong GA|TC tetapi ketika urutannya dimetilasi sebagai GA*TC, *Mbo I* gagal memotong sedangkan *Sau 3A* tidak terpengaruh. Sebaliknya, dalam kasus GATC*, situasinya terbalik. Fenomena ini dimanfaatkan dengan baik dalam kasus pasangan enzim restriksi *Hpa II* dan *Msp I*. Kedua enzim mengenali urutan CCGG tetapi ketika termetilasi sebagai CC*GG, *Mbo I* memotong urutan dan *Hpa II* tidak.

Enzim restriksi adalah protein (nuklease) yang mengenali urutan nukleotida DNA yang spesifik dan pendek (dikenal sebagai sisi restriksi atau urutan target atau urutan pengenalan) dan kemudian memotong DNA hanya di sisi tertentu. Enzim restriksi ditemukan pada bakteri (dan prokariota lainnya). Setiap enzim restriksi hanya mengenali satu atau beberapa sisi restriksi. Setelah mengenali urutan targetnya, enzim restriksi membuat potongan beruntai ganda pada molekul DNA. Biasanya, pemotongan berada di atau dekat sisi restriksi dan terjadi dalam pola yang teratur dan dapat diprediksi. Lebih dari 400 enzim restriksi telah diisolasi dari bakteri yang memproduksinya. Pada bakteri hidup, enzim restriksi berfungsi untuk mempertahankan sel dari serangan bakteriofag virus. Enzim restriksi bakteri membelah sisi restriksi dalam genom virus, memecah dan menghancurkan DNA bakteriofag yang menyerang sebelum dapat bergabung ke dalam genom inang (genom bakteri) dan mengambil alih sel. Menariknya, bakteri kebal (resisten) terhadap enzim restriksinya sendiri, bahkan jika ia memiliki urutan target, yang dapat dihancurkan oleh enzim restriksinya sendiri. Ini karena sisi restriksi bakteri sangat termetilasi, membuatnya tidak dapat dikenali oleh enzim restriksi. Enzim metilase menambahkan gugus metil (-CH₃) ke basa adenin atau sitosin dalam urutan pengenalan DNA, yang kemudian dimodifikasi dan dilindungi dari endonuklease bakteri itu sendiri. Enzim restriksi dan metilase yang sesuai merupakan sistem modifikasi restriksi spesies bakteri.



Gambar 81 Daerah pemotongan enzim restriksi.



Gambar 82 Hasil pemotongan DNA oleh enzim restriksi *EcoR1* dan *EcoRV*

Tabel berikut menunjukkan ujung lengket dan tumpul yang dihasilkan di sisi restriksi oleh berbagai enzim restriksi.

Tabel 3 Tipe pemotongan enzim restiksi

Enzim	Sumber	Urutan Pengenalan	Tipe pemotongan (Sticky or Blunt)
EcoR1	<i>Escherichia coli</i> Sticky ends	5' GAATTC 3' CTTAAG	5' ---G AATC---3' 3' ---CTTAA G---5'
BamH1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Sticky ends	5' GGATCC 3' CCTAGG	5' ---G GATCC---3' 3' ---CCTAG G---5'
Taq1	<i>Thermus aquaticus</i> Sticky ends	5' TCGA 3' AGCT	5' ---T CGA---3' 3' ---AGC T---5'
Alu1	<i>Arthrobacter luteus</i> Blunt ends	5' AGCT 3' TCGA	5' ---AG CT---3' 3' ---TC GA---5'

Sebagai contoh bagaimana enzim restriksi mengenali dan memotong pada urutan DNA, mari kita perhatikan *EcoRI*, enzim restriksi umum yang digunakan di laboratorium bioteknologi. *EcoRI* memotong di sisi pembatasan berikut:



Sisi Pengenalan *EcoRI*

Jika kita menempatkan dua untai DNA bersama-sama dalam garis lurus, mereka muncul sebagai palindrom (gambar cermin)

5'---GAATC---3'

3'---CTAAG---5'

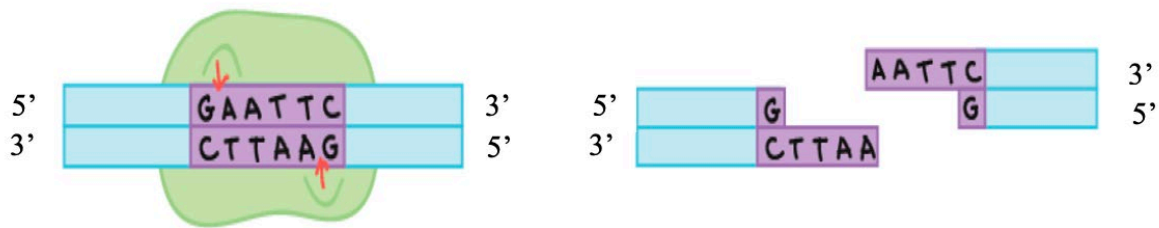
Urutan palindromik adalah urutan asam nukleat pada DNA atau RNA untai ganda, di mana pembacaan 5'-end ke 3'-end ke depan pada satu untai cocok dengan urutan pembacaan 3'-end ke 5'-end pada untai komplementer yang digunakannya. membentuk heliks ganda.

Untai atas membaca **5'-GAATTC-3'**, Untai bawah membaca **3'-CTTAAG-5'**. Jika untai DNA dibalik, urutannya persis sama (**5'GAATTC-3'** dan **3'-CTTAAG-5'**).

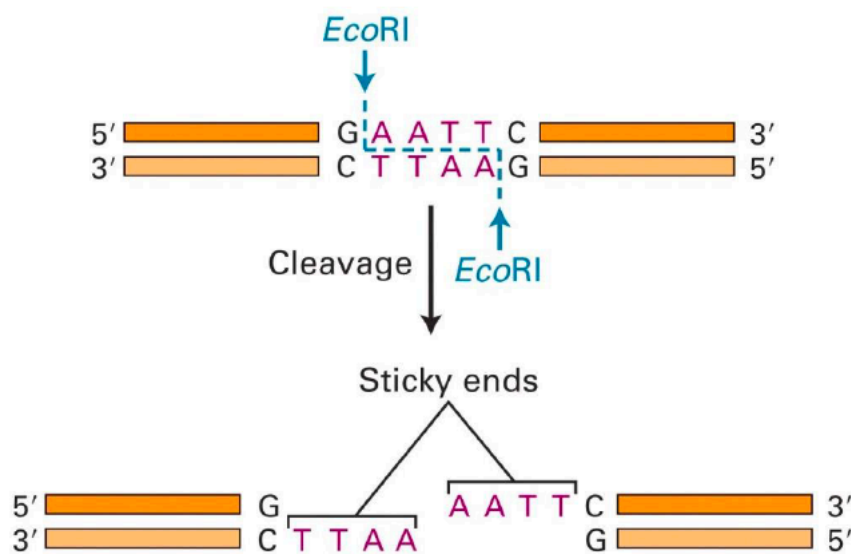
Enzim *EcoRI* mengikat ke sisi *EcoRI* dalam sepotong DNA dan membuat potongan pada kedua untai DNA seperti yang ditunjukkan di bawah ini.



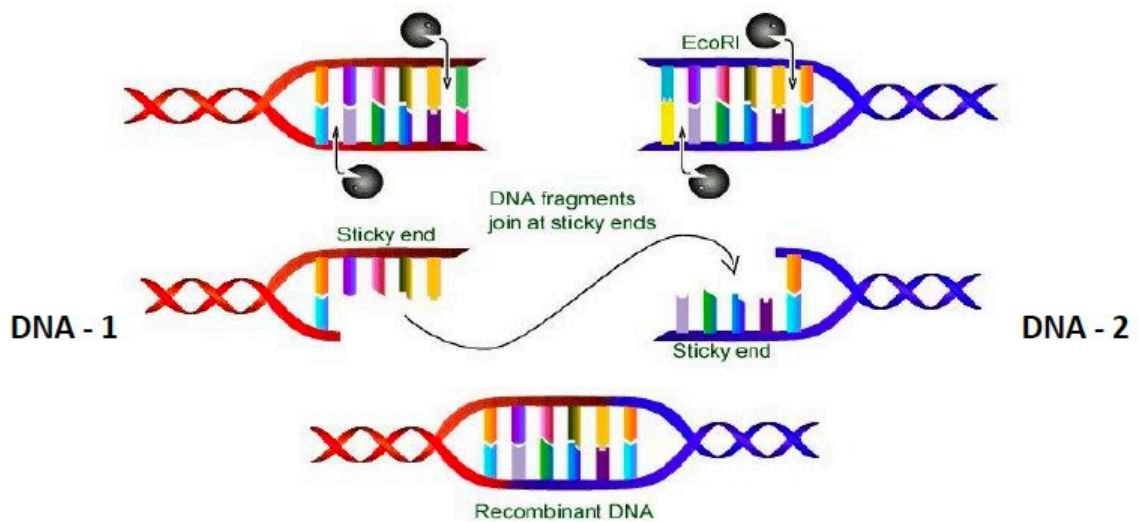
Ketika *EcoRI* mengenali dan memotong sisi restriksinya, *EcoRI* selalu melakukannya dalam pola yang sangat spesifik yang menghasilkan ujung dengan DNA untai tunggal yang menggantung. Dengan demikian, menghasilkan ujung lengket **5'-AATT-3'** pada setiap ujung DNA yang dipotong. Pola potongannya disebut potongan terhuyung-huyung, yang menghasilkan ujung yang lengket seperti yang ditunjukkan di bawah ini:



Gambar 83 Potongan DNA oleh *EcoRI* yang menghasilkan ujung lengket



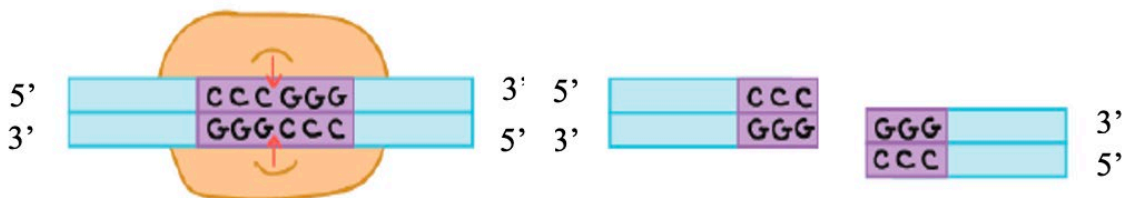
Gambar 84 Proses Pemotongan DNA oleh *EcoRI*



Gambar 85 Proses Pemotongan Enzim restriksi

Kedua ujung lengket dapat bergabung bersama oleh pasangan basa komplementer. Jika bagian lain dari DNA (DNA asing) memiliki ujung lengket yang cocok (dapat terjadi ketika kedua DNA dipotong dengan enzim restriksi yang sama seperti *EcoRI*), ujung lengket dari dua peregangan DNA yang berbeda juga dapat saling menempel dengan pasangan basa komplementer. Untuk alasan ini, enzim yang menghasilkan ujung lengket sangat reaktif. Ujung lengket sangat membantu dalam kloning dan rekayasa genetika karena mereka menyatukan dua potong DNA sehingga dapat dihubungkan oleh enzim DNA ligase.

Tidak semua enzim restriksi menghasilkan ujung yang lengket. Beberapa adalah pemotong tumpul, yang memotong lurus di tengah urutan target dan tidak meninggalkan overhang. Enzim restriksi *SmaI* adalah contoh pemotong tumpul. Lihat di bawah:



Gambar 86 pemotongan Enzim *SmaI*

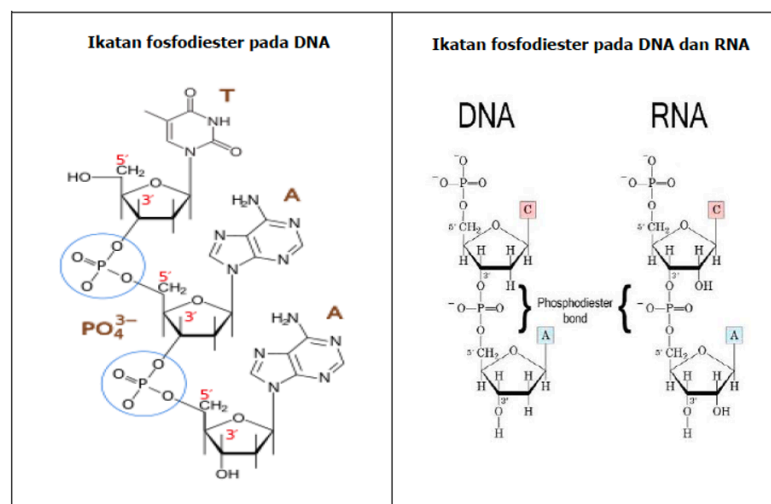
Enzim *SmaI* berikatan dengan sisi restriksi *SmaI*, yang diberikan di bawah ini:



Itu membuat potongan tepat di tengah urutan ini pada kedua helai, menghasilkan ujung tumpul. Sisi pemotongan ditunjukkan di bawah ini:



Fragmen DNA ujung tumpul juga dapat digabungkan satu sama lain oleh DNA ligase. Namun, fragmen berujung tumpul lebih sulit untuk diikat (digabungkan) bersama-sama (reaksi ligasi kurang efisien dan lebih cenderung gagal) karena tidak ada untai tunggal yang menggantung untuk menahan molekul DNA pada posisinya. DNA ligase adalah enzim yang menyatukan ujung-ujung DNA (lengket atau tumpul) dengan membentuk ikatan fosfodiester yang diperlukan untuk melengkapi tulang punggung gula-fosfat dari DNA transgenik yang baru disintesis.



Gambar 87 Pembentukan Ikatan Posfo diester oleh enzim ligase

Jenis enzim restriksi endonuklease:

Ada 3 kategori utama enzim restriksi endonuklease:

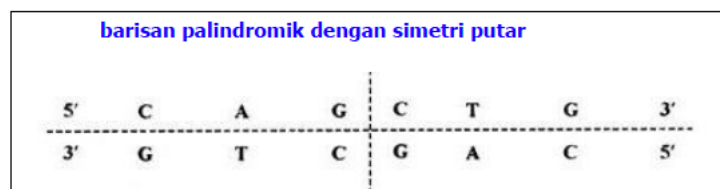
1. Enzim restriksi Tipe-I
2. Enzim restriksi Tipe-II
3. Enzim restriksi Tipe-III

Enzim restriksi endonuklease tipe-I:

Ini adalah jenis kompleks endonuklease yang memotong hanya satu untai DNA. Enzim-enzim ini memiliki urutan pengenalan sekitar 15 bp panjang. Enzim ini membutuhkan ion Mg^{++} dan ATP untuk berfungsi. Jenis restriksi endonuklease seperti itu memotong DNA sekitar 1000 bp dari ujung 5' dari urutan DNA yang terletak di dalam sisi pengenalan. Contoh penting dari enzim endonuklease restriksi Tipe-I adalah EcoK, EcoB, dll.

Enzim restriksi endonuklease tipe-II:

Ini adalah Enzim restriksi endonuklease paling penting untuk kloning gen dan karenanya untuk Teknologi DNA Rekombinan, enzim restriksi ini paling stabil. Enzim restriksi ini menunjukkan pemotongan hanya di sisi tertentu dan karena itu enzim restriksi ini menghasilkan fragmen DNA dengan panjang yang ditentukan. Enzim-enzim ini menunjukkan pemotongan di kedua untai DNA, tepat di luar urutan pengenalan. Enzim ini membutuhkan ion Mg^{++} untuk fungsinya. Enzim tersebut menguntungkan karena Enzim restriksi endonuklease tipe-II tidak memerlukan ATP untuk pemotongan dan enzim tersebut menyebabkan pemotongan pada kedua untai DNA. Hanya enzim restriksi endonuklease Tipe II yang digunakan untuk kloning gen karena kesesuaiannya. Urutan pengenalan untuk enzim restriksi endonuklease tipe-II dalam bentuk urutan palindromik dengan simetri rotasi, yaitu urutan basa pada paruh pertama satu untai DNA adalah bayangan cermin dari paruh kedua untai lain dari ganda DNA itu. Contoh penting dari endonuklease Pembatasan Tipe-II termasuk *HinfI*, *EcoRI*, *PvuII*, *AluI*, *HaeIII*, dll.



Gambar 88 Palindromik dengan simetri putar

Enzim restriksi endonuklease tipe-III:

Enzim restriksi ini tidak digunakan untuk kloning gen. Enzim ini adalah perantara antara tipe-I dan tipe-II restriksi endonuklease. Enzim ini membutuhkan ion Mg^{++} dan ATP untuk pembelahan dan enzim ini memotong DNA di luar sekuen yang dikenal. Enzim restriksi tipe III juga melakukan pemotongan acak di luar urutan pengenalan yang dikenali, mis. *Hinf* III, dll.

Tata nama enzim restriksi

Enzim restriksi diberi nama berdasarkan organisme di mana mereka ditemukan. Sebagai contoh, enzim *Hind*III diisolasi dari bakteri *Haemophilus influenzae*, strain Rd. Tiga huruf pertama (Hin) dari nama tersebut dicetak miring karena mereka menyingkat nama genus (H) dan spesies (dalam) organisme. Huruf keempat (d) biasanya berasal dari penunjukan strain bakteri. Biasanya, angka Romawi (I, II, III, dll.) menunjukkan urutan enzim restriksi ditemukan dalam strain tertentu.

Tabel 4 Penamaan Enzim Restriksi

Enzyme	Organism from which derived	Target sequence (cut at *) 5' →3'
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G* GATCC
Eco RI	<i>Escherichia coli RY 13</i>	G* AATTC
Hind III	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	A* AGCTT
Mbo I	<i>Moraxella bovis</i>	*GATC
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA*G
Sma I	<i>Serratia marcescens</i>	CCC*GGG
Taq I	<i>Thermophilus aquaticus</i>	T*CGA
Xma I	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	C*CCGGG

Tata nama enzim restriksi terdiri dari tiga bagian:

- Menunjukkan genus dan spesies organisme tertentu dengan menggunakan singkatan menjadi tiga huruf.

- Menunjukkan strain spesies yang relevan dengan menggunakan huruf, angka atau kombinasinya.
- Menunjukkan sistem modifikasi restriksi spesifik yang ada dalam organisme atau strain yang sama dengan menggunakan angka romawi.

Contoh: nama enzim restriksi EcoRI diturunkan sebagai:

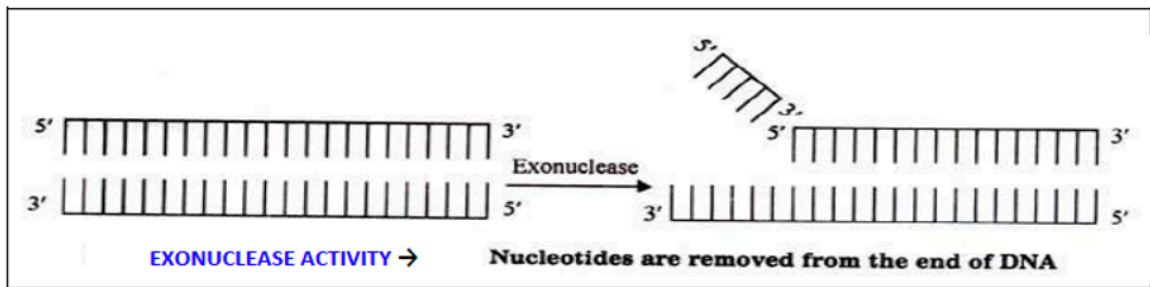
Singkatan	Formulir lengkap yang sesuai
E	<i>Escherichia</i> (genus)
Co	<i>coli</i> (species)
R	RY13 (strain)
I	Pertama kali diidentifikasi pada bakteri

Tabel 5 Daerah Pengenalan beberapa enzim restriksi

Microorganisms	Restriction enzymes	Cleavage sites	Cleavage products
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Bam HI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-GGATCC-3} \\ 3\text{-CCTAGG-5} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-G} & \text{GATCC-3} \\ 3\text{-CCTAG} & \text{G-5} \end{array}$
<i>B. globigii</i>	Bgl II	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-AGATCT-3} \\ 3\text{-TCTAGA-5} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-A} & \text{GATCT-3} \\ 3\text{-TCTAG} & \text{A-5} \end{array}$
<i>Escherchia coli</i> RY13	Eco RI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-GAATTC-3} \\ 3\text{-CTTAAG-5} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-G} & \text{AATTC-3} \\ 3\text{-CTTAA} & \text{G-5} \end{array}$
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hin dIII	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-AAGCTT-3} \\ 3\text{-TTCGAA-5} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-A} & \text{AGCTT-3} \\ 3\text{-TTCGA} & \text{A-5} \end{array}$
<i>H. parainfluenzae</i>	Hpa I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-GTTAAC-3} \\ 3\text{-CAATTG-5} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-GTT} & \text{AAC-3} \\ 3\text{-CAA} & \text{TTG-5} \end{array}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK 8	Kpn I	$\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \\ 5\text{-GGTACC-5} \\ 3\text{-CCATGG-3} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-GGTAC} & \text{C-3} \\ 3\text{-C} & \text{CATGG-5} \end{array}$
<i>Streptomyces albus</i> G	Sal I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-GTCGAC-3} \\ 3\text{-CAGCTG-5} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-G} & \text{TCGAC-3} \\ 3\text{-CAGCT} & \text{G-5} \end{array}$
<i>Staphylococcus aureus</i> 3AI	Sau 3AI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-GATC-3} \\ 3\text{-CTAG-5} \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5\text{-} & \text{GATC-3} \\ 3\text{-CTAG} & \text{5} \end{array}$

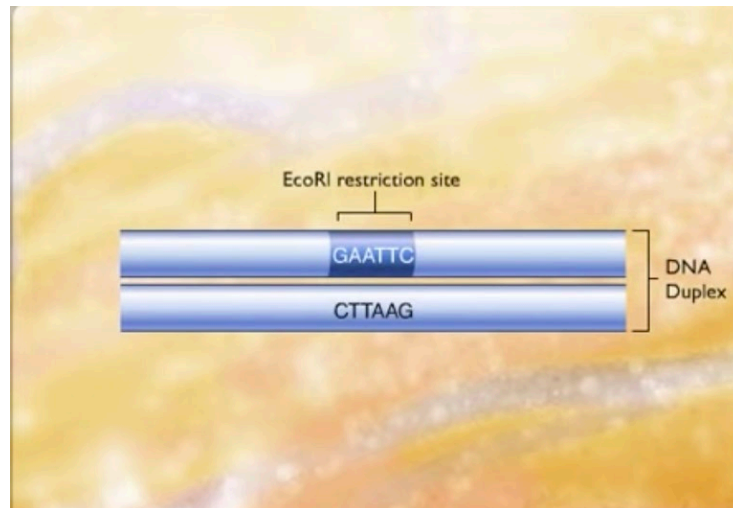
Enzim Eks nuklease:

Exonuclease adalah enzim yang menghilangkan nukleotida dari ujung molekul asam nukleat. Sebuah eks nuklease menghilangkan nukleotida dari ujung 5' atau 3' dari sebuah molekul DNA. Sebuah eks nuklease tidak pernah menghasilkan pemotongan internal DNA. Dalam teknologi DNA rekombinan, berbagai jenis eks nuklease digunakan seperti Exonuclease Bal31, *E. coli* exonuclease III, Lambda exonuclease, dll.



Gambar 89 Aktivitas Enzim Eks nuklease

Selanjutnya animasi dampak mutasi genetik dapat dilihat pada video berikut.



Gambar 90 Video Enzim Restriksi
<https://youtu.be/pDHCHa1C85Y>

B. Vektor

Kloning gen adalah bagian tak terpisahkan dari manipulasi genetik dan melibatkan penggabungan fragmen DNA yang diinginkan ke molekul vektor yang berfungsi untuk membawa segmen DNA tersebut pada sel inang. Setiap jenis vektor memiliki ciri-ciri yang mungkin tidak ada pada vektor lainnya. Perlu dicatat bahwa setiap jenis vektor kloning memiliki keunggulan tertentu yang membedakannya dari vektor lainnya. Namun, plasmid adalah molekul paling sederhana untuk ditangani. Bakteriofag dan virus lainnya dapat disimpan dengan baik untuk jangka waktu yang lama. Kosmid dan kromosom buatan dapat membawa fragmen DNA yang lebih besar untuk tujuan kloning. Semua vektor harus memenuhi syarat umum yaitu; Vector biasanya ukurannya kecil, Transfer gen dari sel donor ke penerima relatif mudah, Telah diketahui urutan DNANYA, Memiliki setidaknya satu asal replikasi dan mereka dapat bereplikasi di sel inang yang sesuai bahkan ketika mereka membawa DNA asing. Terakhir, kode vektor untuk fenotipe yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan rekombinan dan vektor induk (vektor yang tidak memiliki DNA asing) dapat diidentifikasi dari vektor rekombinan (vektor yang memiliki DNA asing). Ada beberapa jenis vector sebagai berikut:

- Plasmid
- lambda phages
- cosmids
- bacterial artificial chromosomes (BACs)
- yeast artificial chromosomes (YACs)

1) Vektor Plasmid

Plasmid adalah molekul DNA untai ganda, melingkar, mereplikasi diri, ekstra kromosom. Vektor plasmid memiliki banyak fitur yang membuatnya sangat menguntungkan sebagai kendaraan vektor kloning, karena vektor ditemukan banyak salinan di dalam bakteri, dan dapat mereplikasi secara mandiri pada sel inangnya. Urutan lengkap plasmid telah diidentifikasi, oleh karena itu lokasi sisi pemotongan enzim restriksi telah diidentifikasi. Selain itu, plasmid lebih kecil dari kromosom sel inang. Vektor dapat dengan mudah dipisahkan dari yang lain. Fragmen DNA yang diinginkan dapat dengan mudah diisolasi dengan memotong plasmid dengan enzim

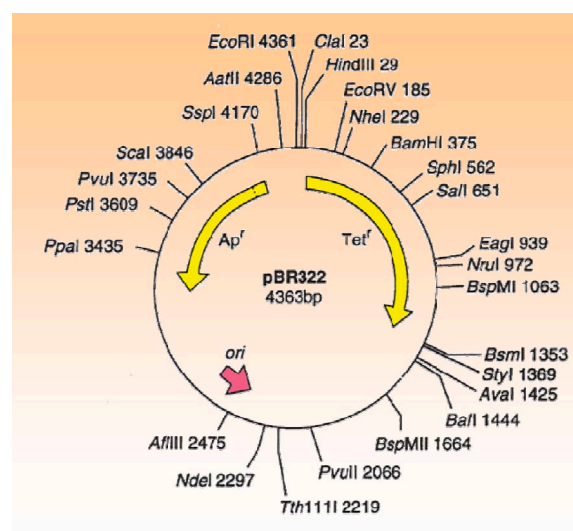
yang dikhususkan pada sisi restriksi di mana fragmen DNA asli telah disisipkan. Plasmid adalah vektor kloning pertama, mudah diisolasi dan dimurnikan, dan dapat di transformasi kembali ke dalam sel inangnya. Plasmid sering mengandung gen resistensi antibiotik, yang digunakan untuk memilih sel inangnya. Salah satu plasmid yang paling banyak digunakan adalah pBR322. Plasmid ini mengandung gen resisten untuk kedua antibiotik, ampisilin dan tetrasiklin dan banyak sisi restriksi yang hanya ada sekali dalam plasmid dan terletak di dalam gen resistensi antibiotik. Susunan ini membantu dalam pendeteksian plasmid rekombinan setelah melakukan transformasi. Misalnya, jika DNA asing dimasukkan ke dalam gen resisten ampisilin, plasmid tidak dapat memberikan resistensi untuk ampisilin setelah penyisipan ini. Dengan demikian, transforman yang kehilangan resistensi terhadap ampisilin mengandung plasmid rekombinan.

Seperti diketahui, DNA plasmid biasanya tidak mengkode fungsi penting apa pun, dan plasmid dapat membelah secara normal. Plasmid biasanya ada dalam bentuk multikopi, dan mereka dapat menjadi sarana untuk mengamplifikasi jumlah gen salinan tunggal esensial yang dimasukkan ke dalam genom mereka. Misalnya, penyisipan pada plasmid dapat menyebabkan amplifikasi cepat gen yang diperlukan untuk mencapai tingkat resistensi yang tinggi terhadap antibiotik. Dengan kata lain adalah bahwa setiap gen yang dibawa plasmid dapat dicopy dalam jumlah besar, sehingga memungkinkan sejumlah besar produk protein dapat dibuat.

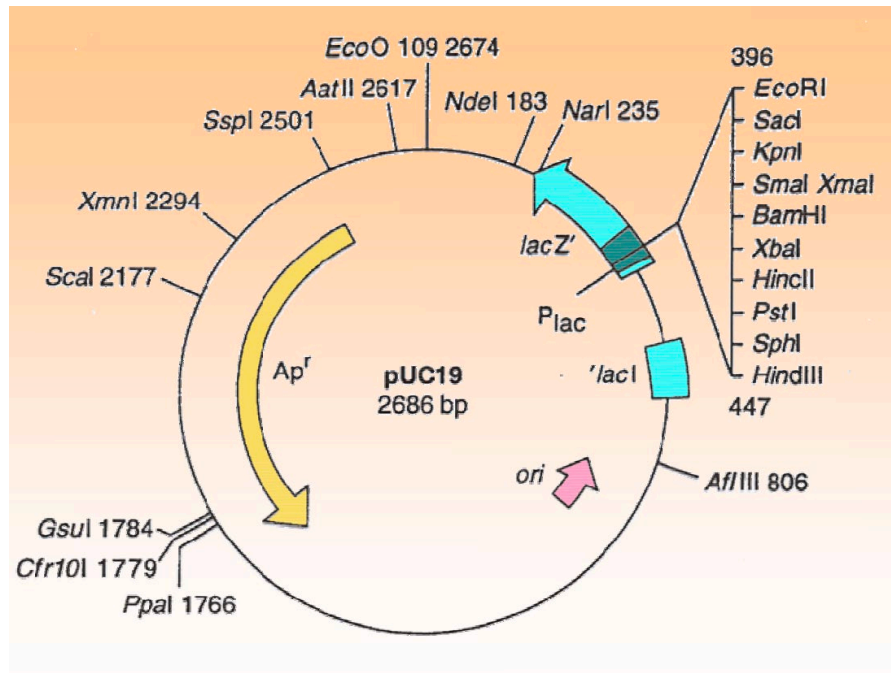
Sebagian besar vektor plasmid adalah multicopy, dan salah satu vektor plasmid adalah pBR322, yang merupakan salah satu vektor plasmid yang paling dikenal karena membawa dua gen resistensi antibiotik, ampR dan tetA yang bertindak sebagai penanda untuk memilih dan mengkarakterisasi rekombinan pada plasmid ini. Plasmid ini mengandung banyak sisi enzim restriksi yang tersedia untuk menyisipkan fragmen DNA. Sebagai contoh, ketika fragmen *Pst* I dimasukkan ke sisi restriksi *Pst*I pada vektor pBR322, yang terletak di dalam gen ampR, penyisipan semacam itu biasanya tidak akan pernah menghancurkan fungsi gen yang sesuai. Akibatnya, β laktamase aktif tidak pernah disintesis lebih lanjut. Oleh karena itu, plasmid rekombinan dapat dideteksi dengan kemampuannya memberikan resistensi terhadap

tetrasiklin dan bukan terhadap ampisilin. Adapun *Bam* HI, ketika fragmen DNA asing dimasukkan ke sisi restriksi *Bam* HI, gen yang memberikan resistensi terhadap tetrasiklin untuk bakteri sel inang dihilangkan. Setelah transformasi dengan plasmid rekombinan, bakteri ditempatkan ke dalam media tumbuh yang mengandung ampisilin. Salinan lain ditumbuhkan pada media yang mengandung tetrasiklin untuk menguji kepekaannya terhadap tetrasiklin. Ini memfasilitasi perolehan gen yang diinginkan dapat menseleksi bakteri yang mengandung plasmid rekombinan dan plasmid asli tanpa penambahan fragmen DNA asing.

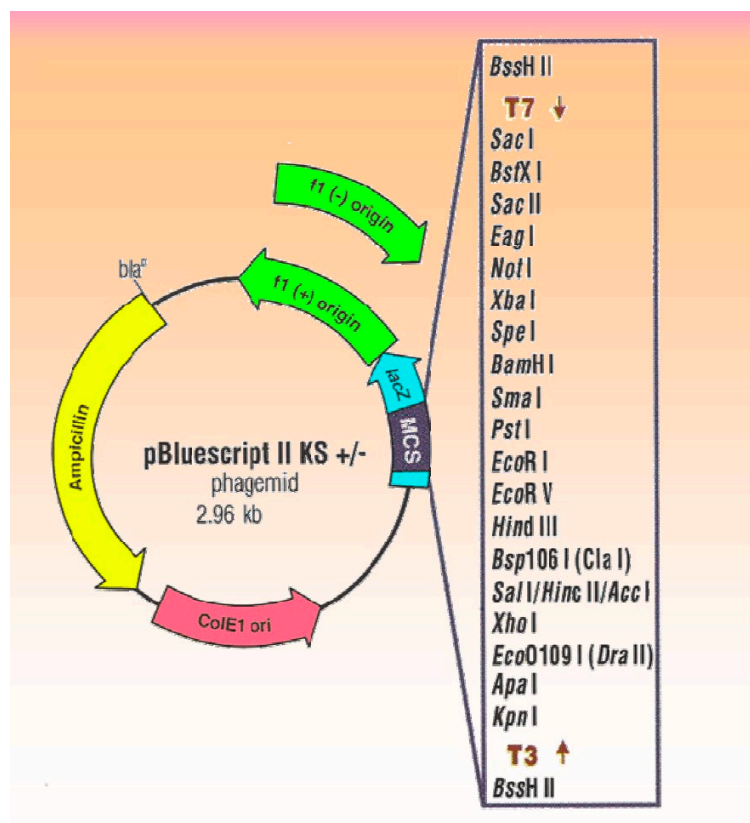
Plasmid merupakan vector yang sering digunakan dalam rekayasa genetika karena: Memiliki replikator (ColE1, pMB1, Memperbanyak Salinan), Memiliki penanda seleksi (Dominan misalnya Amp, Tet, Kan; Resesif misalnya LeuB), Memiliki banyak sisi cloning (sisi enzim restriksi), sisi pemotong 8-bp untuk tempat DNA sisipan, Urutan komplementer oligonukleotida, Memiliki Promotor RNA untuk transkripsi cRNA, Memiliki Gen LacZ untuk seleksi sisipan, Memiliki Promotor Trc untuk ekspresi yang diatur dalam *E. coli*, memiliki Propagasi, seleksi dan ekspresi di luar *E. coli*, Produk fusi transkripsi / translasi. Adapun contoh vector plasmid adalah sebagai berikut:



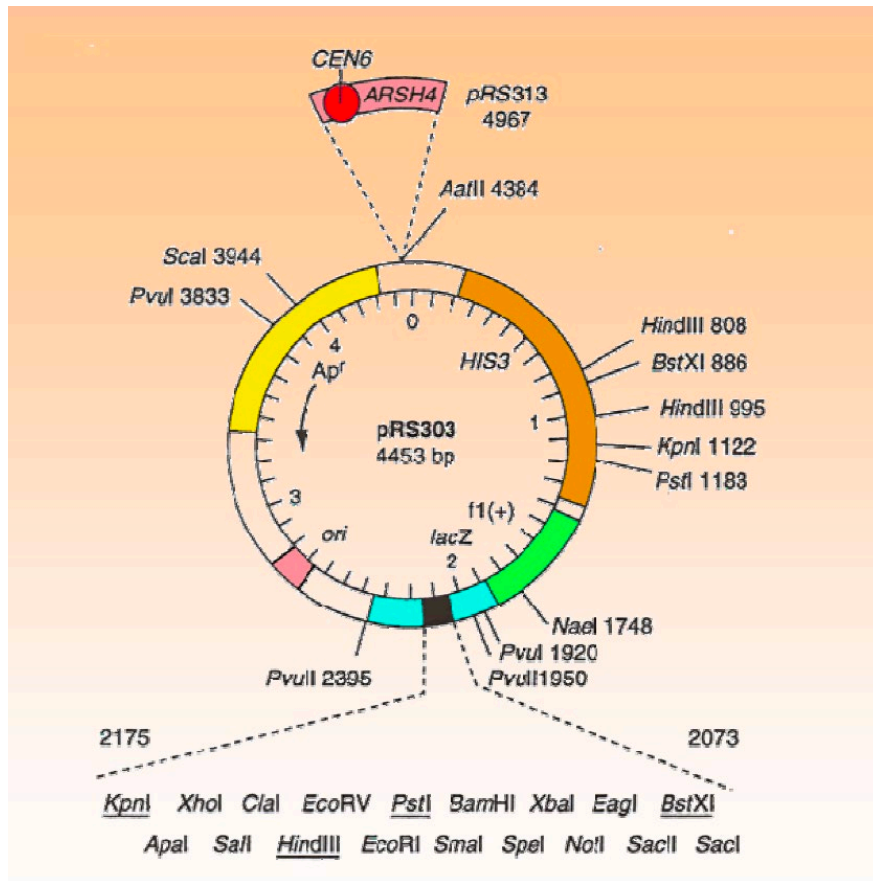
Gambar 91 Vektor pBR322



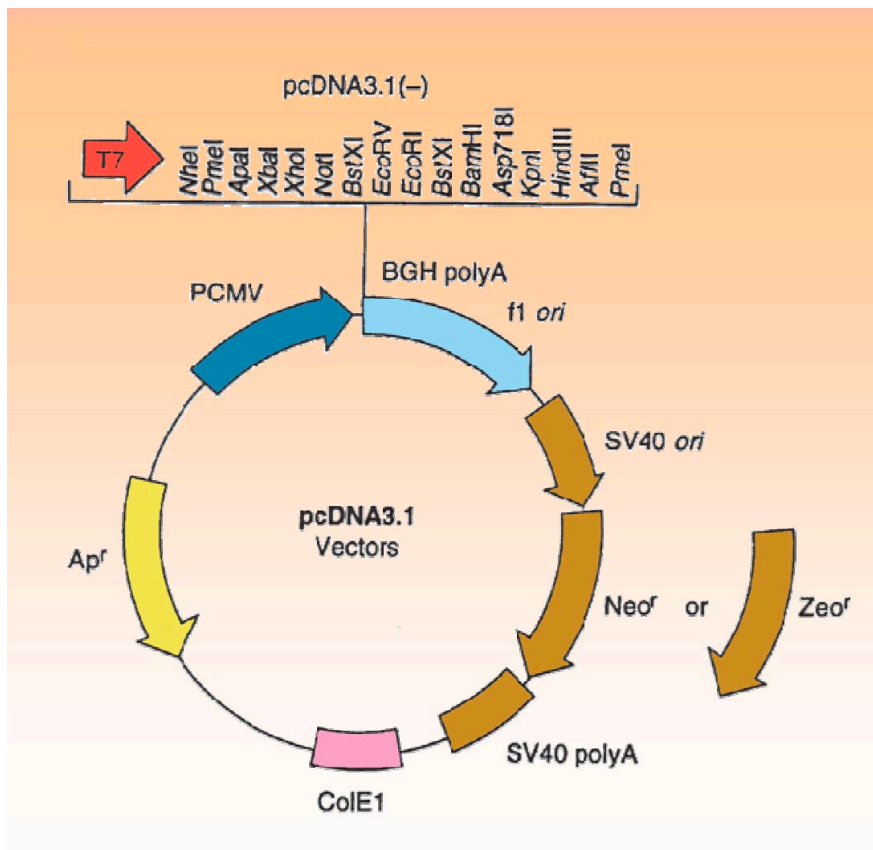
Gambar 92 Vektor pUC19



Gambar 93 Vektor pBluescript II KS



Gambar 94 Vektor pRS303

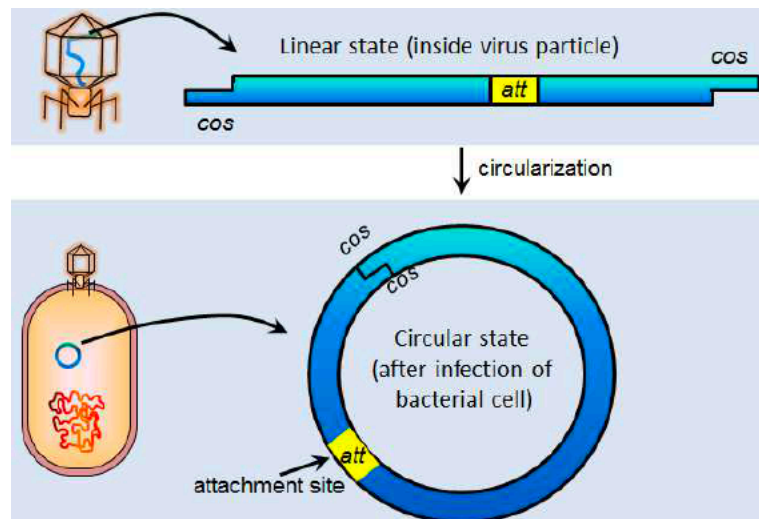


Gambar 95 Vektor pcDNA3.1

2) Vektor Phaga

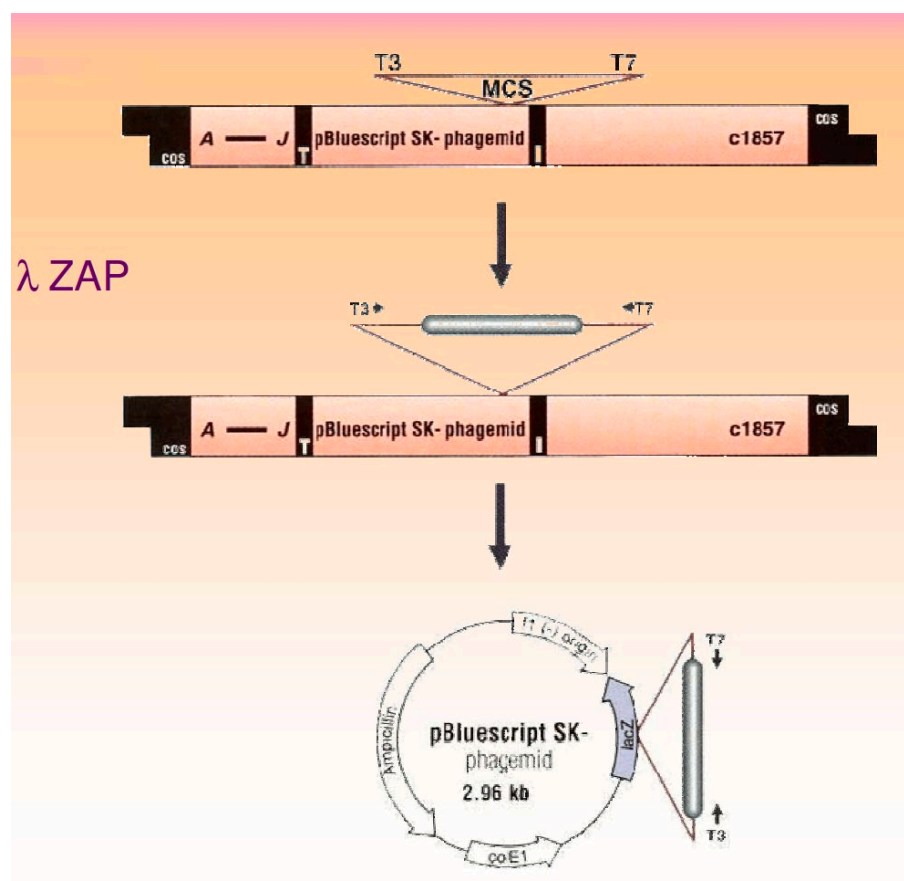
Faga memiliki molekul DNA linier, di mana DNA dapat dimasukkan melalui banyak sisi restriksi. DNA rekombinan terakumulasi setelah faga melanjutkan siklus litiknya dan menghasilkan partikel faga yang dewasa. Keuntungan penting untuk transportasi faga dari plasmid adalah kemampuannya untuk mentransfer molekul DNA yang lebih panjang. Vektor plasmid menerima fragmen DNA 6 – 9 kb, sedangkan vektor faga dapat menerima fragmen DNA sekitar 9 – 20 kb.

Bakteriofaga lambda yang menginfeksi *E. coli* telah banyak digunakan sebagai vektor kloning. Lambda adalah virus yang dicirikan dengan baik dengan alternatif litik dan lisogenik untuk siklus hidupnya. Meskipun DNA lambda bersirkulasi untuk replikasi dan penyisipan ke dalam kromosom *E. coli*, DNA di dalam partikel faga adalah linier. Pada setiap ujungnya terdapat ujung lancip sepanjang 12 bp yang saling melengkapi yang dikenal sebagai urutan cos (ujung kohesif). Begitu berada di dalam sel inang *E. coli*, pasangan ini dan ujung kohesif diikat bersama oleh enzim inang yang membentuk versi sirkular dari genom lambda. Hanya molekul DNA antara 37 dan 52 kb yang dapat dikemas secara stabil ke dalam kepala partikel lambda. Fragmen kecil DNA ekstra dapat dimasukkan ke dalam genom lambda tanpa mencegah pengemasan. Namun, untuk mengakomodasi sisipan yang lebih panjang, beberapa genom lambda perlu dihilangkan. Wilayah tangan kiri memiliki gen penting untuk protein struktural dan wilayah tangan kanan memiliki gen untuk replikasi dan lisis. Wilayah tengah genom lambda tidak esensial dan dapat diganti dengan sekitar 23 kb DNA asing. Karena wilayah tengah lambda memiliki gen untuk integrasi dan rekombinasi, vektor pengganti lambda tersebut tidak dapat berintegrasi ke dalam kromosom inang dan membentuk lisogen sendiri.



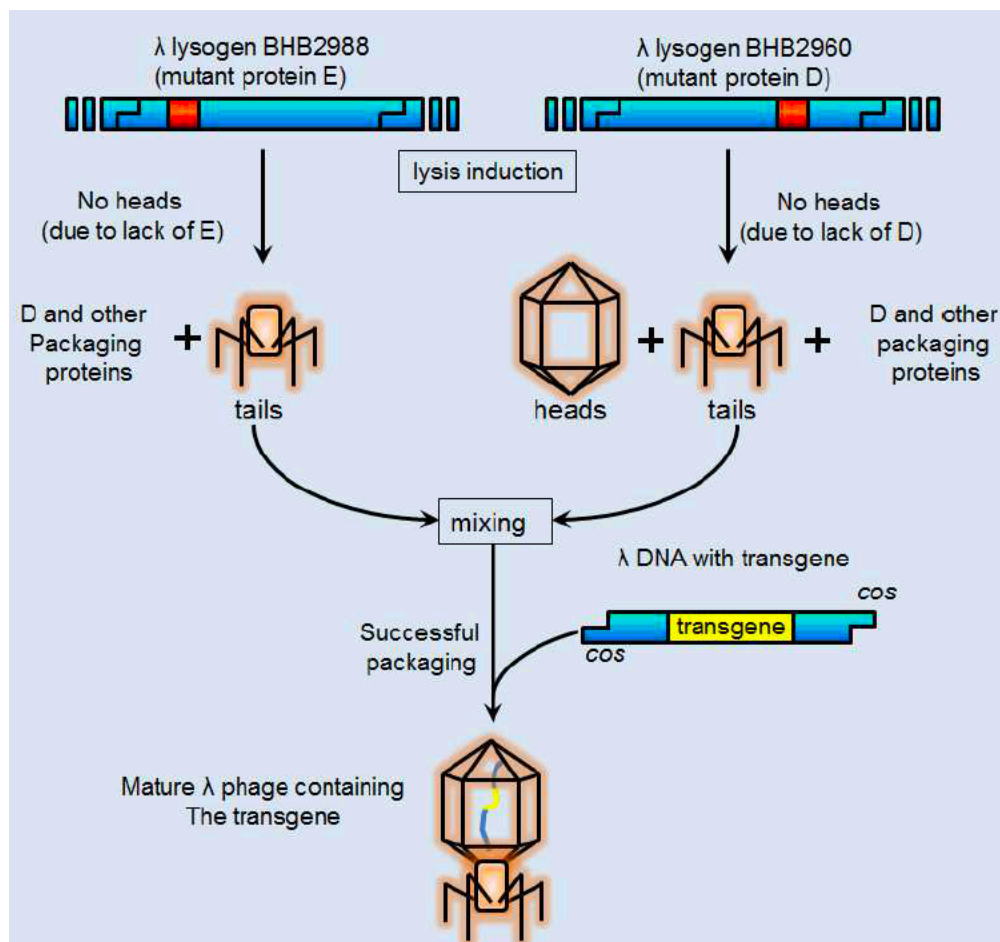
Gambar 96 materi genetik lambda faga

(Molekul DNA linier dengan dua urutan cos di setiap ujungnya. Setelah faga menyuntikkan DNA-nya ke dalam inang bakteri, DNA bersirkulasi. Kedua ujung kohesif tersebut berpasangan basa dan diikat menjadi satu oleh enzim bakteri sehingga membentuk lingkaran).



Gambar 97 Vektor pBluescript SK-phagamic

Pembentukan molekul rekombinan antara DNA asing dan lambda faga jauh lebih kompleks daripada yang terjadi pada vektor plasmid. Ini tidak terbatas pada integrasi DNA asing di tengah faga untuk membentuk DNA rekombinan linier dari dua ujung kohesif. Sebaliknya, molekul ini harus dikemas ke dalam kepala faga secara efisien untuk membentuk faga rekombinan yang mampu menginfeksi sel bakteri. Oleh karena itu, sel E coli membutuhkan apa yang dikenal sebagai kemasan in vitro (gambar 98). Dalam teknik ini, campuran protein lambda dicampur dengan DNA lambda rekombinan secara in vitro untuk membentuk partikel faga. Menginfeksi dua kultur E. coli yang terpisah dengan dua mutan lambda akan menghasilkan protein lambda yang diperlukan. Masing-masing dari dua mutan tidak memiliki protein kepala esensial dan tidak dapat membentuk partikel yang mengandung DNA-nya sendiri. Campuran kedua lisat menghasilkan satu set lengkap protein lambda dan ketika dicampur dengan DNA lambda dapat menghasilkan partikel faga menular yang mampu menginfeksi sel E. coli baru.



Gambar 98 Kemasan In Vitro Vektor Pengganti Lambda

Vektor kloning lambda yang mengandung DNA kloning harus dikemas dalam kepala faga sebelum dapat menginfeksi *E. coli*. Sebelum DNA dapat dikemas, protein kepala faga harus diisolasi. Untuk melakukan ini, kultur *E. coli*, diinfeksi dengan lambda mutan yang tidak memiliki gen untuk salah satu protein kepala yang disebut E. Kultur *E. coli* yang berbeda diinfeksi dengan mutan lambda yang berbeda, yang tidak memiliki protein kepala faga D. Kedua kultur *E. coli* ditumbuhkan dengan lambda mutan dan virus diinduksi untuk memasuki siklus litik. Meskipun *E. coli* dilisis oleh faga, mereka tidak dapat membentuk kepala yang lengkap. Selanjutnya campuran larutan protein faga diisolasi. Setiap lisat mengandung ekor faga, protein perakitan, dan komponen kepala, kecuali D atau E. Kedua lisat ini dicampur bersama dengan vektor lambda yang mengandung DNA kloning. Meskipun pencampuran dilakukan secara *in vitro*, komponen tersebut dapat merakit sendiri menjadi faga fungsional yang dapat menginfeksi *E. coli*.

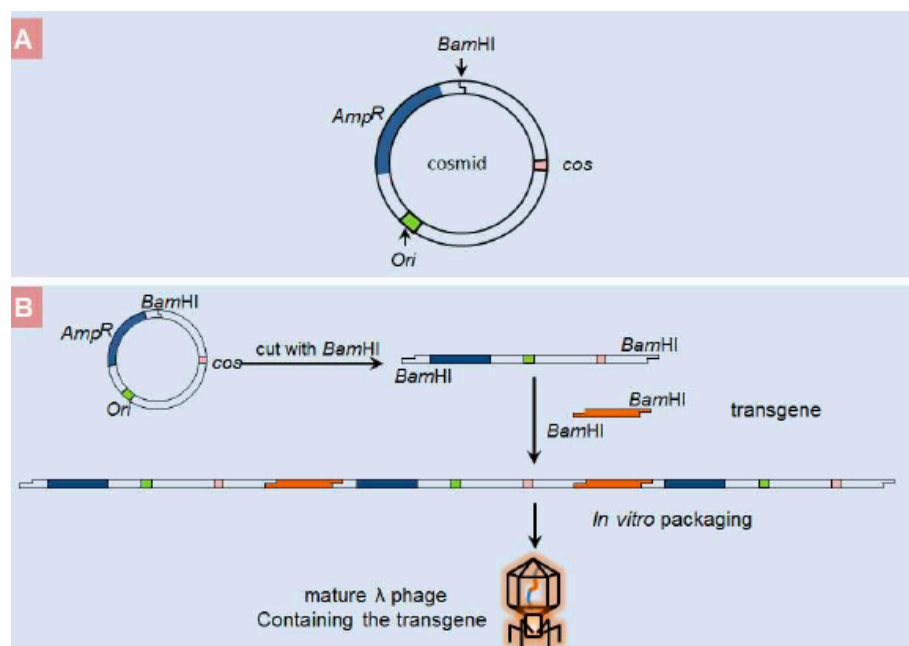
3) Vektor Cosmid

Vektor Kosmid; Kosmid adalah plasmid multikopi kecil yang membawa sisi cos yang berasal dari lambda faga dan dapat dikemas ke dalam kepala faga. Genom lambda berisi urutan pengenalan yang disebut sisi cos (atau ujung kohesif) di setiap ujungnya. Ketika genom akan dikemas di kepala, itu dibelah di satu sisi cos dan DNA linier dimasukkan ke dalam kepala sampai sisi cos kedua telah masuk. Jadi setiap DNA disisipkan di antara sisi cos yang dikemas. Kosmid biasanya mengandung beberapa sisi restriksi dan gen resistensi antibiotik.

Satu-satunya persyaratan DNA untuk pengemasan *in vitro* ke dalam faga adalah adanya dua sisi cos yang dipisahkan oleh urutan intervensi 37-51 kb. Kosmid dikembangkan berdasarkan pengamatan ini, dan hanyalah plasmid yang mengandung sisi cos faga. Sebagai plasmid, kosmid mengandung asal replikasi dan penanda yang dapat dipilih. Kosmid juga memiliki sisi pengenalan enzim restriksi yang unik di mana fragmen DNA dapat diikat. Setelah reaksi pengemasan terjadi, partikel yang baru terbentuk digunakan untuk menginfeksi sel *E. coli*. DNA disuntikkan ke dalam bakteri seperti DNA normal dan bersirkulasi melalui komplemen ujung cos. DNA sirkular akan dipertahankan dalam sel *E. coli* sebagai plasmid. Partikel faga dapat menerima antara 37 dan 51 kb DNA, dan sebagian

besar kosmid berukuran sekitar 5 kb, antara 32 dan 47 kb DNA dapat diklon ke dalam vektor-vektor ini. Ini mewakili jauh lebih banyak daripada yang bisa dikloning ke dalam vektor itu sendiri. Oleh karena itu, menggunakan kosmid kecil, katakanlah 4 kb, memungkinkan penyisipan hingga sekitar 45 kb untuk dikloning. Kosmid, seperti plasmid, sangat stabil, tetapi penyisipan fragmen DNA yang besar dapat berarti bahwa kosmid rekombinan sulit dipertahankan dalam sel bakteri. Urutan DNA berulang adalah umum dalam DNA eukariotik, dan penataan ulang DNA dapat terjadi melalui rekombinasi dari pengulangan yang ada pada DNA yang dimasukkan ke dalam kosmid. Kesulitan utama dalam bekerja dengan kosmid adalah, produksi fragmen DNA linier yang diikat, di mana kosmid dan sisipan digabungkan bersama.

Faga atau vektor kosmid digunakan dalam pembuatan perpustakaan genom. Biasanya, perpustakaan DNA adalah sekelompok fragmen DNA kloning dalam vektor kloning yang dapat digunakan untuk mencari DNA yang diinginkan. Ada dua jenis library yang digunakan untuk memperoleh DNA yang diminati. Jenis pertama disebut perpustakaan DNA genom. Pustaka ini dibuat dari genom organisme yang diinginkan. Jenis perpustakaan DNA kedua disebut perpustakaan cDNA. Pustaka cDNA dapat dibuat dengan menggunakan reverse transcriptase yang diturunkan dari retrovirus.



Gambar 99 Kloning DNA dalam vektor kosmid.

Untuk mengkloning potongan besar DNA menjadi vektor kosmid, keduanya harus memiliki ujung lengket yang kompatibel. Vektor kosmid pertama-tama dilinierkan sehingga setiap ujungnya memiliki sisi cos. Kemudian kosmid linier dipotong dengan *Bam*HI, yang menghasilkan ujung lengket dengan urutan GATC yang menggantung. DNA genom dari sumber yang diinginkan juga dipotong. Setelah dipotong *Bam*HI, DNA ini dipotong secara parsial dengan *Mbo*I, yang juga menghasilkan ujung lengket GATC. Pemotongan parsial membuat beberapa sisi tidak dipotong dan memungkinkan segmen besar genom diisolasi. Segmen ini dicampur dengan dua bagian kosmid dan digabungkan menggunakan ligase. Konstruksi akhir dikemas ke dalam partikel lambda in vitro dan digunakan untuk menginfeksi *E. coli*.

4) Vektor Artificial Chromosomes

Kromosom Buatan; Selain tiga jenis vektor utama, yaitu plasmid, bakteriofaga, dan kosmid, kromosom buatan dapat dianggap sebagai jenis penting untuk vektor kloning. Kromosom buatan adalah alat umum dalam transfer gen karena mengandung sejumlah besar materi genetik. Kromosom buatan ragi atau YAC adalah salah satu kromosom buatan yang paling luas digunakan. YACs adalah ekstensi DNA yang mengandung semua elemen yang diperlukan untuk menyebarkan kromosom dalam ragi, yang merupakan asal replikasi, sentromer, dan telomer. Mereka juga memiliki sisi untuk enzim restriksi dan penanda genetik di mana mereka dapat dilacak dan dipilih. YAC dipotong oleh enzim restriksi yang sesuai, yang memungkinkan fragmen DNA asing untuk disisipkan di antara sentromer dan telomer. Dengan demikian, YAC mengandung fragmen DNA berukuran antara 100kb hingga 200kb, dan dapat ditempatkan di *Saccharomyces cerevisiae*, dan dapat direplikasi secara berdampingan dengan kromosom asli.

Kromosom buatan bakteri merupakan vektor kloning alternatif, pemanfaatannya meningkat secara proporsional. BAC adalah vektor kloning berdasarkan plasmid F *E. coli*, dan mengandung sisi yang cocok untuk enzim restriksi dan penanda yang dapat dipilih, seperti resistensi untuk kloroform. Plasmid yang telah dimodifikasi dipotong pada sisi restriksi, dan fragmen DNA

asing diikat yang diperkirakan berukuran lebih dari 300kb menggunakan DNA ligase. BAC berkembang biak di *E. coli* setelah transformasi oleh pulsa listrik atau elektroporator. Ada kemungkinan vektor ini dapat direproduksi dan dimodifikasi dengan mudah, dan tidak mengalami rekombinasi seperti yang terlihat di YAC. Karena vektor BAC dapat membawa fragmen DNA yang besar, kromosom buatan sangat penting dalam mengidentifikasi urutan genom.

Berdasarkan materi dan video pembelajaran pada pokok bahasan enzim restriksi dan vector yang telah disajikan, kemudian analisislah apakah enzim restriksi?, samakah dengan enzim non restriksi? Apakah vector? Apakah sel inang?

2. PENCETUSAN IDE

Berdasarkan pengamatan saudara diskusikan dengan kelompok saudara hal-hal berikut ini: Setelah saudara cermati materi dan video pembelajaran di atas, bagaimanakah kerja enzim restriksi? Apa jenis enzim restriksi yang biasa digunakan dalam rekayasa genetika? Untuk apakah vector tersebut? Apa ciri-ciri vector yang dapat digunakan? Ada berapa banyak jenis vector tersebut? Bahaslah bersama kelompok saudara pada LKM yang sudah disediakan.

3. PENSTRUKTURAN IDE

Hasil pencetusan ide bersama dengan kelompok saudara rancanglah proyek tentang enzim restriksi dan vektor. Bahaslah naskah rancangan tersebut tulislah/gambarkan/skenariokan tentang enzim restriksi dan vector. Buatlah analisa tentang enzim restriksi dan vector yang digunakan dalam rekayasa genetika. Bahaslah bahan dan alat yang digunakan untuk menyelesaikan proyek tersebut.

4. APLIKASI

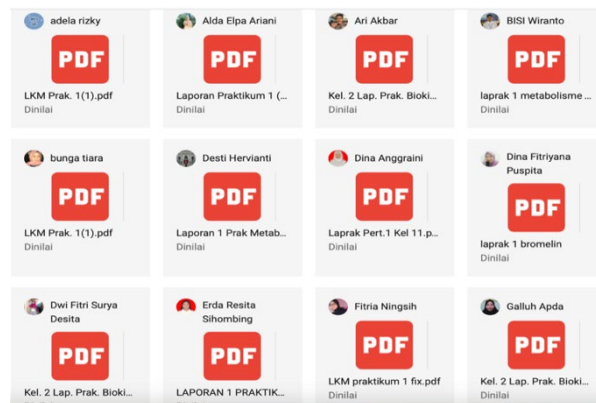
Berdasarkan rancangan yang telah di buat, kerjakanlah proyek bersama kelompok saudara, dokumentasikanlah dalam bentuk video tentang enzim restriksi dan vector. Proyek dilakukan di luar jam kuliah, sesuai operasional prosedur Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unsri. Lakukanlah proyek tersebut semenarik mungkin. Lakukanlah kolaborasi bersama teman-teman

saudara dalam menyelesaikan proyek tersebut. Dokumentasi video yang sudah di upload cantumkan link videonya dibawah aplikasi sebelum pembahasan. Berdasarkan hasil proyek yang telah saudara lakukan bahaslah hal-hal berikut ini. Jika urutan DNA berikut ini di reaksi dengan enzim reskripsi Bam H1 apa yang terjadi? Analisislah Fragmen DNA yang dihasilkan?

5. REFLEKSI

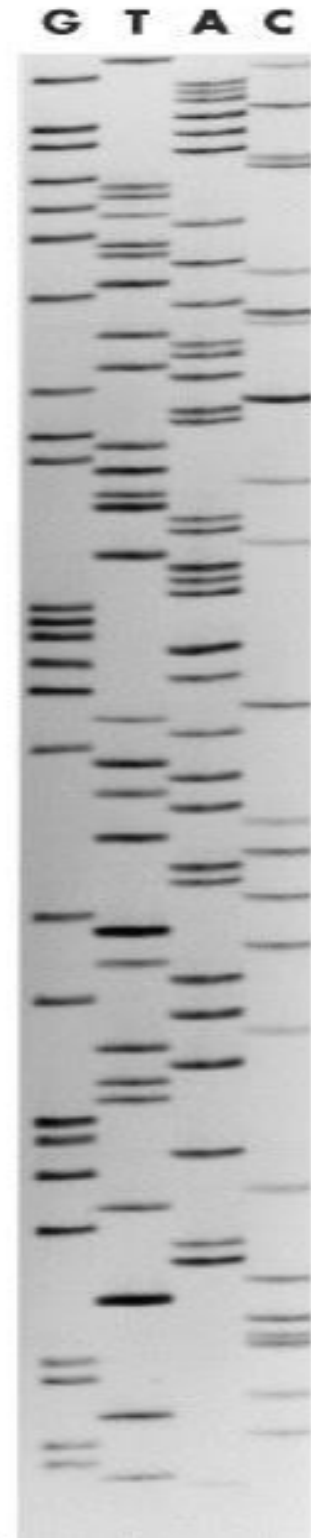
Selanjutnya hasil elaborasi dengan dosen, saat proses pembelajaran jika ada perbaikan ditindaklanjuti dengan perbaikan, kemudian dituangkan dalam "Laporan 11 Enzim dan Vektor". Laporan tersebut di buat sesuai dengan format Lembar Kerja Mahasiswa yang telah di sediakan, kemudian di submit ke <https://elearning.unsri.ac.id>

Contoh submit laporan 11 Enzim dan Vektor.



Gambar 100. Submit Laporan 1 Enzim dan Vektor

Laporan 11 Enzim dan Vektor minimal memuat hal-hal sebagai berikut yaitu: orientasi, pencetusan ide, penstrukturan ide, aplikasi, refleksi, dan daftar pustaka.

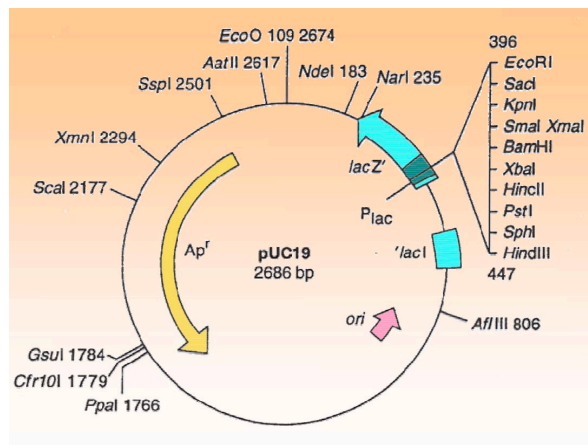


Latihan Soal

1. Jelaskan mengapa dalam rekayasa genetika pada umumnya menggunakan enzim restriksi endonuclease tipe II? Mengapa dengan enzim restriksi endonuclease tipe I dan tipe III?
2. Berikut ini urutan Nukleotida dari 5' ke 3' sbb:

**ATTATTCCTG CGGATCCTGC GCGTCGCTTT GCCCGCACGC GATGAAATTT GTCGGTGCCT
TGATTATTAC TTCGTTGCTG CGGAACAGAT GGCTGGTGTC GCTGTTTTGG GTCGGTCGGT
GGTGCTATGT GCGGCACTGT TGGGGATGGT GGCAGTGACT GGATCCTTAA CCTTTTCCGC
GGTTTACGAT ACGCCGGCGG**

Jika urutan DNA tersebut di potong dengan enzim restriksi *Bam*H1, jelaskan fragmen DNA yang terbentuk. Jika fragmen DNA tersebut di ligasi dengan vector pUC19 jelaskan proses ligasi dan DNA rekombinan yang terbentuk.



3. Jelaskan apakah perbedaan vector cloning berikut:
 - a) puC 19
 - b) pBr322
 - c) pBluescript SK-phagamic
 - d) Cosmid

DAFTAR PUSTAKA

1. Adam, R.L.P., Knowler, J.T., Leader, D.P. 1986. *The Biochemistry of the Nucleic Acids Tenth edition*. New York: Chapman and Hall Ltd.
2. Brown, T. A. 2011. *Introduction to genetics: A molecular approach*. New York: Garland Publishing.
3. <https://youtu.be/pDHCHa1C85Y>. *Restriction Endonucleases*. Diakses pada tanggal 15 September 2019.
4. Loenen, W.A.M. 2019. *Restriction Enzymes a History*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Sukaryawan, M., 1998. *Konstruksi Koleksi Parsial Genom dan Urutan Nukleotida Sebagian Gen ruvB Salmonella Typhimurium* Bandung: ITB.
6. Sukaryawan, M. 2004. *Biokimia*. Indralaya: Prodi Pendidikan Kimia FKIP Unsri
7. Thenawidjaja, M. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga
8. Watson, DJ., Tooze, J., Kurtz, DT. 1998. *DNA Recombinant*. Jakarta: Erlangga
9. Williams, R.J. 2003. *Restriction Endonucleases. Molecular Biotechnology, (23)*.
10. Winnacker, E.L. 1987. *From Gene to Clone*. New York: VCH.
11. Wirahadikusumah, M. 1985. *Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB

BAB 23 KLONING GEN

1. ORIENTASI

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah yang direncanakan adalah mahasiswa Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni (CPMK-4). Sedangkan kemampuan akhir pada pokok bahasan ini adalah mahasiswa mampu mengkaji implikasi kloning dalam kehidupan sehari-hari (Sub-CPMK5). Pengalaman belajar yang diperoleh mahasiswa merencanakan, melaksanakan dan melaporkan proyek, presentasi tugas kelompok, mengerjakan lembar kerja mahasiswa, membuat dan mensubmit Laporan di <https://elearning.unsri.ac.id>

A. BAHAN DASAR KLONING GEN

Mengkloning berarti membuat salinan yang identik. Kloning DNA melibatkan pemisahan gen tertentu atau segmen DNA dari kromosom, menggabungkannya ke DNA vector, hasilnya merupakan DNA hibrida yang disebut DNA rekombinan. Selanjutnya DNA Rekombinan ditransformasi ke dalam sel inang yang tepat (bakteri, virus atau ragi) dan direplikasi untuk membuat banyak salinan dari gen yang dipilih. Adapun bahan-bahan dasar (utama) yang digunakan dalam proses cloning adalah sebagai berikut:

1. Fragmen DNA, adalah gen target yang akan dikloning.
2. Vektor, adalah molekul DNA untai ganda, melingkar atau linier yang dapat menghasilkan molekul DNA rekombinan dalam proses kloning. Vektor mampu membawa gen target ke dalam sel inang melalui proses transformasi.
3. Sel inang, adalah sel hidup yang mampu ditumpangi oleh vector asli atau rekombinan. Sel inang dapat berupa organisme uniselular (bersel tunggal) seperti bakteri, maupun multiselular (bersel banyak) seperti jamur, tumbuhan, hewan hingga manusia. Sel inang mampu memperbanyak vektor, menghasilkan banyak

salinan identik, tidak hanya dari dirinya sendiri tetapi juga dari gen yang dibawanya. Ketika sel inang membelah, salinan molekul DNA rekombinan diteruskan keketurunan dan replikasi vektor lebih lanjut terjadi. Setelah sel inang melakukan pembelahan sel, koloni, atau klon yang diproduksi, maka setiap sel dalam klon berisi satu atau lebih salinan molekul DNA rekombinan, gen yang dibawa oleh molekul rekombinan sekarang dikatakan telah dikloning.

4. Enzim restriksi endonuklease, dan enzim ligase. Enzim restriksi endonuklease adalah enzim yang diperlukan untuk memotong untai DNA yang diinginkan, sedangkan enzim ligase digunakan untuk meligasi DNA sehingga memperoleh DNA rekombinan.

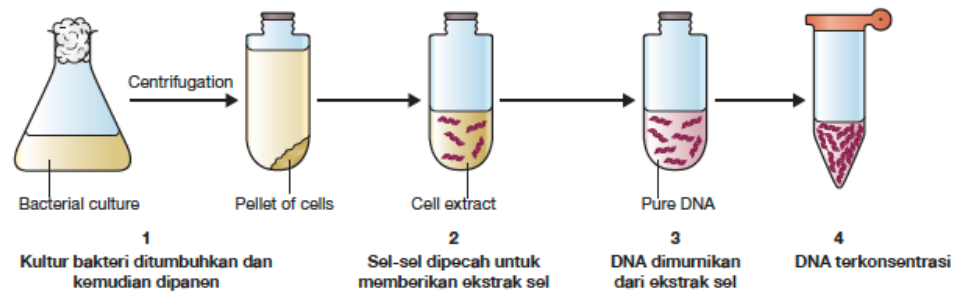
Proses rekayasa genetika perlu menyiapkan setidaknya tiga jenis DNA yang berbeda. Pertama, DNA sel total akan sering dibutuhkan sebagai sumber bahan untuk memperoleh gen yang akan dikloning. DNA sel total dapat berupa DNA dari kultur bakteri, dari tumbuhan, dari sel hewan, atau dari jenis organisme lain. Jenis DNA kedua yang akan dibutuhkan adalah DNA plasmid murni. Persiapan DNA plasmid dari kultur bakteri mengikuti langkah-langkah dasar yang sama seperti pemurnian DNA sel total, dengan perbedaan penting bahwa pada tahap tertentu DNA plasmid harus dipisahkan dari sebagian besar DNA kromosom yang juga ada di dalam sel. Ketiga adalah DNA Vektor, seperti DNA faga akan dibutuhkan jika vektor kloning faga akan digunakan. DNA faga umumnya dibuat dari partikel bakteriofaga dari sel yang terinfeksi, sehingga tidak ada masalah dengan kontaminasi DNA bakteri. Namun, diperlukan teknik khusus untuk menghilangkan kapsid faga. Pengecualian adalah bentuk replikasi untai ganda dari M13, yang dibuat dari sel *E. coli* dengan cara yang sama seperti plasmid bakteri.

B. LANGKAH-LANGKAH DALAM KLONING GEN

1) Persiapan DNA sel total

Langkah pertama dalam proses kloning gen adalah persiapan DNA yang diinginkan atau fragmen DNA target. Persiapan DNA target dilakukan dengan mempertimbangkan jenis prosedur pemurnian DNA yang paling sederhana, di

mana seluruh komplemen DNA dari sel bakteri diperlukan. Prosedur preparasi DNA total dari kultur sel bakteri dapat dibagi menjadi empat tahap (Gambar 101):



Gambar 101 Langkah dasar dalam preparasi DNA sel total dari kultur bakteri.

1. Kultur bakteri ditumbuhkan dan kemudian dipanen.
2. Sel-sel dipecah untuk mendapatkan DNANYA.
3. Ekstrak sel ini diperlakukan pemurnian untuk menghilangkan semua komponen kecuali DNA.
4. Larutan DNA yang dihasilkan terkonsentrasi.

Sebagian besar bakteri dapat ditumbuhkan dengan baik pada media cair (kultur kaldu). Media kultur harus menyediakan campuran nutrisi esensial yang seimbang pada konsentrasi yang memungkinkan bakteri tumbuh dan membelah secara efisien. Media pertumbuhan bakteri yang khas dapat dilihat tabel dibawah ini.

Tabel 6 Komposisi dua media khas untuk pertumbuhan kultur bakteri.

MEDIUM	COMPONENT	g/l OF MEDIUM
M9 medium	Na ₂ HPO ₄	6.0
	KH ₂ PO ₄	3.0
	NaCl	0.5
	NH ₄ Cl	1.0
	MgSO ₄	0.5
	Glucose	2.0
	CaCl ₂	0.015
	LB (Luria-Bertani medium)	Tryptone
	Yeast extract	5.0
	NaCl	10.0

M9 adalah contoh media yang ditentukan di mana semua komponen diketahui. Media ini mengandung campuran nutrisi anorganik untuk menyediakan unsur-unsur penting

seperti: nitrogen, magnesium, dan kalsium, serta glukosa untuk memasok karbon dan energi. Dalam prakteknya, faktor pertumbuhan tambahan seperti elemen dan vitamin harus ditambahkan ke M9 untuk mendukung pertumbuhan bakteri. Tepatnya suplemen mana yang dibutuhkan tergantung pada spesies yang bersangkutan.

Selanjutnya media Luria-Bertani (LB) adalah media yang kompleks atau tidak terdefinisi, artinya identitas dan kuantitas komponennya yang tepat tidak diketahui. Ini karena dua bahan, tripton dan ekstrak ragi, adalah campuran rumit dari senyawa kimia yang tidak diketahui. Tripton sebenarnya memasok asam amino dan peptida kecil, sementara ekstrak ragi (sediaan kering dari sel ragi yang dicerna sebagian) menyediakan kebutuhan nitrogen, bersama dengan gula dan nutrisi anorganik dan organik. Media kompleks seperti LB tidak memerlukan suplementasi lebih lanjut dan mendukung pertumbuhan berbagai spesies bakteri.

Media yang ditentukan harus digunakan ketika kultur bakteri harus ditumbuhkan di bawah kondisi yang dikontrol dengan tepat. Namun, hal ini tidak diperlukan bila biakan ditumbuhkan hanya sebagai sumber DNA, dan dalam keadaan ini media yang kompleks sesuai. Dalam media LB pada suhu 37°C, diangin-anginkan dengan pengocokan (Shaker) pada 150-250 rpm, sel *E. coli* membelah sekali setiap 20 menit atau lebih sampai kultur mencapai kepadatan maksimum sekitar $2-3 \times 10^9$ sel/ml. Pertumbuhan kultur dapat dimonitor dengan membaca optical density (OD) pada 600 nm, di mana panjang gelombang 1 unit OD sesuai dengan sekitar $0,8 \times 10^9$ sel/ml.

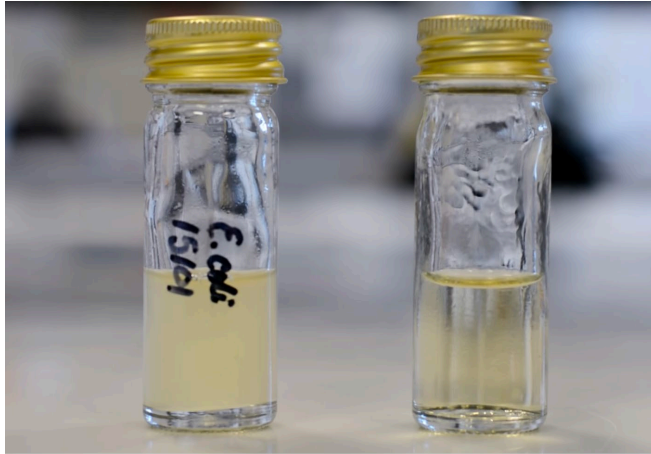
Teknik untuk memecahkan sel bakteri dapat dibagi menjadi metode fisik, di mana sel-sel terganggu oleh kekuatan mekanik, dan metode kimia, di mana lisis sel disebabkan oleh paparan bahan kimia yang mempengaruhi integritas penghalang sel. Metode kimia paling sering digunakan dengan sel bakteri jika objeknya adalah preparasi DNA. Lisis kimia umumnya melibatkan satu agen yang menyerang dinding sel dan yang lainnya mengganggu membran sel. Bahan kimia yang digunakan tergantung pada spesies bakteri yang terlibat, tetapi dengan *E. coli* dan organisme terkait, melemahnya dinding sel biasanya disebabkan oleh lisozim, etilendiamin

tetraasetat (EDTA), atau kombinasi keduanya. Lisozim adalah enzim yang terdapat dalam putih telur yang dapat memotong senyawa polimer yang membuat dinding sel menjadi kaku. EDTA menghilangkan ion magnesium yang penting untuk mempertahankan struktur keseluruhan selubung, dan juga menghambat enzim seluler yang dapat mendegradasi DNA. Dalam beberapa kondisi, melemahkan dinding sel dengan lisozim atau EDTA sudah cukup untuk menyebabkan sel bakteri pecah, tetapi biasanya deterjen seperti natrium dodesil sulfat (SDS) juga ditambahkan. Deterjen membantu proses lisis dengan menghilangkan molekul lipid dan dengan demikian menyebabkan gangguan pada membran sel. Setelah melisiskan sel, langkah terakhir dalam preparasi ekstrak sel adalah menghilangkan puing-puing sel yang tidak larut. Komponen seperti fraksi dinding sel yang lisis dapat dibuat pelet dengan sentrifugasi, meninggalkan ekstrak sel sebagai supernatan yang cukup jernih. Selain DNA, ekstrak sel bakteri mengandung sejumlah besar protein dan RNA. Berbagai metode dapat digunakan untuk memurnikan DNA dari campuran ini. Salah satu pendekatan adalah memperlakukan campuran dengan reagen yang mendegradasi kontaminan, sehingga memisahkan larutan murni DNA. Metode lain menggunakan kromatografi penukar ion untuk memisahkan campuran menjadi berbagai komponennya, sehingga DNA dipisahkan dari protein dan RNA dalam ekstrak. Untuk memurnikan DNA dapat dibaca buku referensi cloning gene.

Selanjutnya Cara menumbuhkan bakteri pada media padat dan media cair dapat dilihat pada video berikut.



Gambar 102 Menumbuhkan Bakteri
Sumber: https://youtu.be/_1KP9zOtjXk



Gambar 103 Menumbuhkan Bakteri pada media cair
Sumber: <https://youtu.be/RaTaNQugAuE>

2) Persiapan DNA Plasmid

Pemurnian plasmid dari kultur bakteri melibatkan strategi umum yang sama seperti preparasi DNA sel total. Kultur sel, yang mengandung plasmid, ditumbuhkan dalam medium cair, dipanen, dan ekstrak sel disiapkan. Protein dan RNA dihilangkan, dan DNA mungkin terkonsentrasi oleh pengendapan etanol. Namun, ada perbedaan penting antara pemurnian plasmid dan persiapan DNA sel total. Dalam preparasi plasmid selalu perlu untuk memisahkan DNA plasmid dari sejumlah besar DNA kromosom bakteri yang juga ada di dalam sel. Memisahkan kedua jenis DNA ini bisa sangat sulit, tetapi tetap penting jika plasmid akan digunakan sebagai vektor kloning. Kehadiran jumlah terkecil DNA bakteri yang mencemari dalam percobaan kloning gen dapat dengan mudah menyebabkan hasil yang tidak diinginkan. Untungnya beberapa metode tersedia untuk menghilangkan DNA bakteri selama pemurnian plasmid, dan penggunaan metode ini, secara individu atau kombinasi, dapat menghasilkan isolasi DNA plasmid yang sangat murni. Plasmid dan kromosom bakteri berbentuk sirkular, tetapi selama preparasi ekstrak sel, kromosom selalu dipecah untuk menghasilkan fragmen-fragmen linier. Oleh karena itu, metode untuk memisahkan molekul melingkar dari molekul linier akan menghasilkan plasmid murni.

Sentrifugasi gradien kerapatan etidium bromida-cesium klorida. Ini adalah versi khusus dari teknik kesetimbangan atau sentrifugasi gradien densitas yang lebih

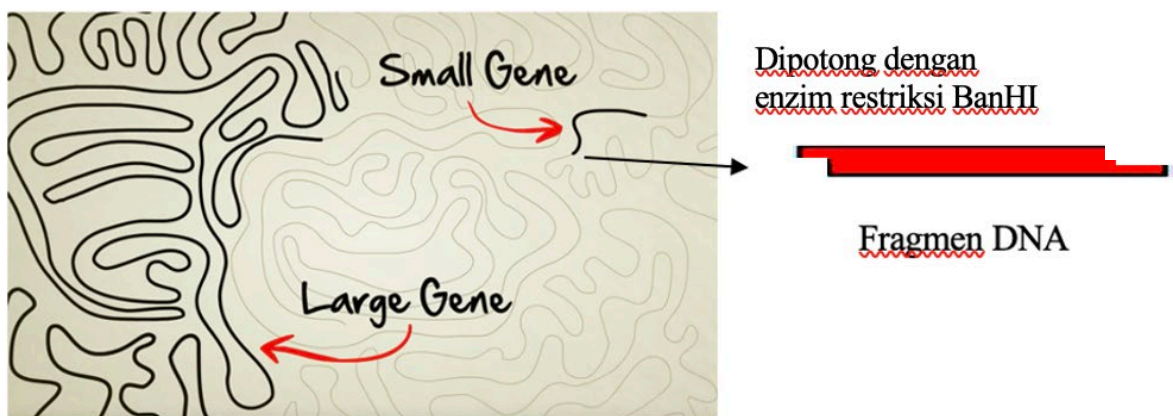
umum. Gradien densitas dihasilkan dengan cara mensentrifugasi larutan, protein mengapung di atas gradien dan pelet RNA di bagian bawah. Posisi pita DNA dapat dilihat dengan menyinari radiasi ultraviolet pada tabung, yang menyebabkan ikatan EtBr berfluoresensi. DNA plasmid murni diambil dengan menusuk sisi tabung dan mengambil sampel dengan jarum suntik. EtBr yang terikat pada DNA plasmid diekstraksi dengan n-butanol dan CsCl dihilangkan dengan dialisis. Plasmid yang dihasilkan hampir 100% murni dan siap digunakan sebagai vektor kloning. DNA plasmid hanya terbentuk sebagian kecil dari total DNA dalam sel bakteri. Oleh karena itu, hasil DNA dari kultur bakteri mungkin sangat rendah. Amplifikasi plasmid perlu dilakukan, tujuannya adalah untuk meningkatkan jumlah salinan plasmid.

3) Pembentukan DNA Rekombinan

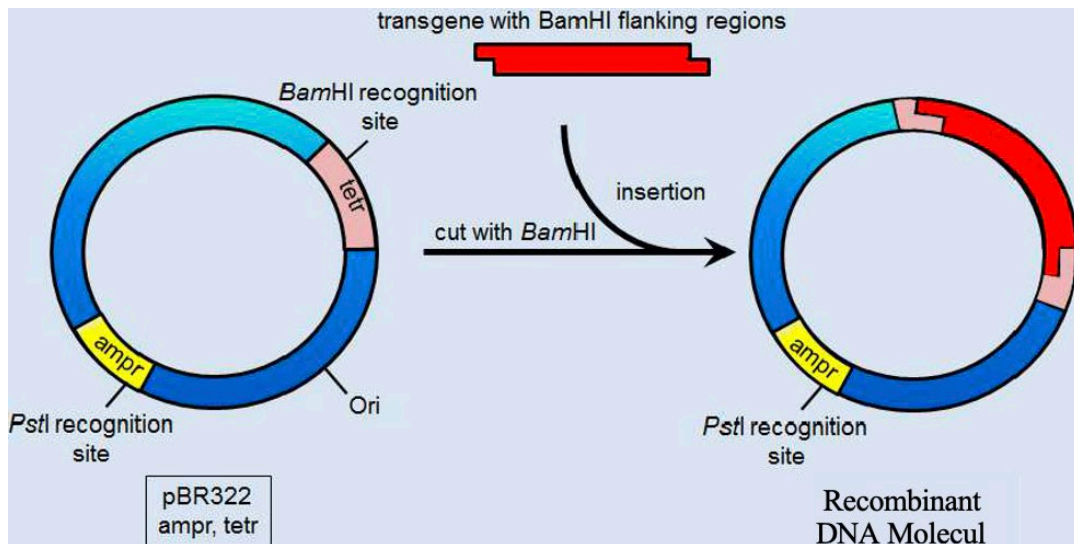
Setelah sampel DNA murni disiapkan, langkah berikutnya dalam eksperimen kloning gen adalah konstruksi molekul DNA rekombinan. Untuk menghasilkan molekul rekombinan ini, vektor, serta DNA yang akan dikloning, harus dipotong pada titik-titik tertentu dan kemudian digabungkan bersama secara terkendali. Memotong dan menyambung adalah dua contoh teknik manipulasi DNA, berbagai variasinya telah dikembangkan selama beberapa tahun terakhir. Selain dipotong dan digabungkan, molekul DNA dapat diperpendek, atau diperpanjang, disalin menjadi RNA atau menjadi molekul DNA baru, dan dimodifikasi dengan penambahan atau penghilangan gugus kimia tertentu. Manipulasi ini, yang semuanya dapat dilakukan di dalam tabung reaksi, memberikan dasar tidak hanya untuk kloning gen, tetapi juga untuk studi biokimia DNA, struktur gen, dan kontrol ekspresi gen.

Hampir semua teknik manipulasi DNA menggunakan enzim yang dimurnikan. Di dalam sel, enzim-enzim ini berpartisipasi dalam proses penting seperti replikasi dan transkripsi DNA, pemecahan DNA asing atau yang tidak diinginkan (misalnya, DNA virus yang menyerang), perbaikan DNA yang bermutasi, dan rekombinasi antara molekul DNA yang berbeda. Manipulasi pemotongan dan penyambungan yang mendasari kloning gen dilakukan oleh enzim yang disebut restriksi endonuklease (untuk pemotongan) dan ligase (untuk penyambungan).

Enzim restriksi endonuklease dapat digunakan dalam proses ini untuk mendapatkan fragmen DNA yang diinginkan. Setiap enzim restriksi memotong DNA pada urutan basa tertentu, yang disebut urutan pengenalan, yang dapat divariasikan dari 4 menjadi 16 atau 20 pasangan basa. Jika kita mendalilkan bahwa pengenalan DNA didistribusikan secara acak dalam molekul DNA, maka kita dapat menghitung berapa banyak enzim memotong molekul DNA. Suatu pengertian yang penting harus diketahui, yaitu bahwa untuk setiap posisi molekul DNA terdapat empat kemungkinan, (A, C, G, atau T). Oleh karena itu, enzim restriksi yang mengenali urutan empat nukleotida, mereka akan memotong sekali per masing-masing 256 bps (atau 4^4). Enzim lain yang mengenali enam urutan nukleotida, dapat memotong sekali per masing-masing 4096 bps (atau 4^6). Setelah identitas enzim restriksi diketahui, maka harus diketahui bagaimana enzim restriksi mengidentifikasi sekuens pengenalan yang tersedia pada DNA untuk memotongnya. Jadi bagaimana enzim menemukan urutan pengenalannya? Sebagian besar enzim restriksi mengenali dan memotong sekuens DNA palindrom. Urutan ini mewakili substrat yang terkena serangan oleh restriksi endonuklease.



Gambar 104 Pemotongan gen dengan enzim restriksi



Gambar 105 Ligasi dengan enzim Ligase

Setelah memotong molekul DNA asing dengan enzim restriksi yang sesuai, demikian juga vector harus dipotong dengan enzim restriksi yang sama, kemudian di ligasi dengan enzim ligase. Ligase ini bergabung dengan fragmen DNA secara kovalen. Dua persyaratan harus dipenuhi agar enzim ligase dapat melakukan tugasnya. Pertama, molekul harus menjadi substrat yang benar, yaitu, mereka harus memiliki gugus 3'-hidroksil dan 5'-fosfat. Kedua, gugus-gugus pada molekul yang akan digabungkan harus diposisikan dengan benar terhadap satu sama lain. Jika DNA ligase menemukan dua fragmen DNA yang disatukan dari ujungnya, itu akan menyegelnya bersama-sama. Dalam eksperimen rekayasa genetika, fragmen DNA yang ujungnya lengket cenderung menyatu untuk waktu yang lama. Fragmen DNA ujung tumpul tidak memiliki cara untuk disatukan, mereka berada jauh dari satu sama lain. Akibatnya, penyegelan ujung tumpul sangat lambat dan membutuhkan konsentrasi enzim ligase yang tinggi, selain konsentrasi fragmen DNA yang tinggi untuk disegel. Semua sel hidup menghasilkan DNA ligase, tetapi enzim yang digunakan dalam rekayasa genetika biasanya dimurnikan dari bakteri *E. coli* yang telah terinfeksi faga T4.

4) Transformasi

Setelah pembuatan DNA rekombinan, langkah selanjutnya dalam eksperimen kloning gen adalah memasukkan molekul-molekul ini ke dalam sel hidup, (Transformasi) biasanya bakteri, yang kemudian tumbuh dan membelah untuk menghasilkan klon. Sebenarnya, kata "kloning" hanya mengacu pada prosedur tahap selanjutnya, dan bukan pada konstruksi molekul DNA rekombinan itu sendiri.

Kloning mempunyai dua tujuan utama yaitu: Pertama, memungkinkan sejumlah besar molekul DNA rekombinan untuk diproduksi dari bahan awal dalam jumlah terbatas. Pada awalnya hanya beberapa nanogram DNA rekombinan yang mungkin tersedia, tetapi setiap bakteri yang mengambil plasmid kemudian membelah berkali-kali untuk menghasilkan koloni, setiap sel yang berisi banyak salinan molekul. Beberapa mikrogram DNA rekombinan biasanya dapat dibuat dari satu koloni bakteri, menunjukkan peningkatan seribu kali lipat dari jumlah awal. Jika koloni digunakan bukan sebagai sumber DNA tetapi sebagai inokulum untuk biakan cair, sel yang dihasilkan dapat menyediakan miligram DNA, peningkatan hasil satu juta kali lipat. Dengan cara ini kloning dapat menyediakan sejumlah besar DNA yang dibutuhkan untuk studi tentang struktur dan ekspresi gen.

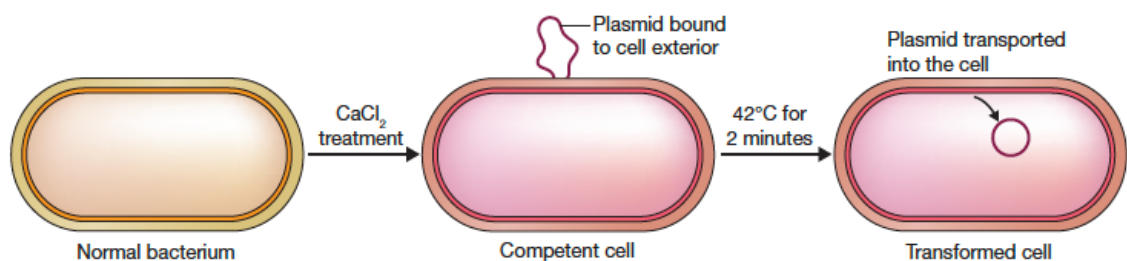
Fungsi penting kedua dari kloning dapat digambarkan sebagai pemurnian. Manipulasi yang menghasilkan molekul DNA rekombinan jarang dapat dikontrol sejauh tidak ada molekul DNA lain yang hadir pada akhir prosedur. Campuran ligasi selain molekul rekombinan yang diinginkan, dapat mengandung sejumlah sebagai berikut.

- a. Molekul vektor tidak terikat,
- b. Fragmen DNA tidak terikat,
- c. Molekul vektor yang telah disirkulasi ulang tanpa memasukkan DNA baru (vektor "self-ligated")
- d. Molekul DNA rekombinan yang membawa fragmen DNA yang salah disisipkan.

Molekul yang tidak terikat jarang menyebabkan masalah karena, meskipun mereka dapat diambil oleh sel bakteri, hanya dalam keadaan luar biasa mereka akan direplikasi. Lebih jauh mungkin bahwa enzim di dalam bakteri inang mendegradasi potongan-potongan DNA ini. Molekul vektor self-ligated dan plasmid rekombinan yang salah lebih penting karena mereka direplikasi sama efisiennya dengan molekul yang diinginkan. Namun, pemurnian molekul yang diinginkan masih dapat dicapai melalui kloning karena bagi satu sel tidak biasa untuk mengambil lebih dari satu molekul DNA. Setiap sel memunculkan satu koloni, sehingga setiap klon yang dihasilkan terdiri dari sel-sel yang semuanya mengandung molekul yang sama. Tentu saja, koloni yang berbeda mengandung molekul yang berbeda: beberapa mengandung molekul DNA rekombinan yang diinginkan, beberapa memiliki molekul semut rekombinan yang berbeda, dan beberapa mengandung vektor self-ligated. Oleh karena itu, masalahnya bagaimana untuk mengidentifikasi koloni yang mengandung plasmid rekombinan yang benar.

Sebagian besar spesies bakteri mampu mengambil molekul DNA dari media tempat mereka tumbuh. Seringkali molekul DNA yang diambil dengan cara ini akan terdegradasi, tetapi kadang-kadang mampu bertahan dan bereplikasi di sel inang. Khususnya ini terjadi jika molekul DNA plasmid dengan asal replikasi yang dikenali oleh inang. Di alam, transformasi mungkin bukan proses utama dimana bakteri memperoleh informasi genetik. Hal ini dicerminkan oleh fakta bahwa di laboratorium hanya beberapa spesies (terutama anggota genus *Bacillus* dan *Streptococcus*) yang dapat diubah dengan mudah. Studi tentang ini telah mengungkapkan bahwa mereka memiliki mekanisme canggih untuk pengikatan dan penyerapan DNA. Sebagian besar spesies bakteri, termasuk *E. coli*, hanya mengambil DNA dalam jumlah terbatas dalam keadaan normal. Untuk mengubah spesies ini secara efisien, bakteri harus menjalani beberapa bentuk perlakuan fisik dan/atau kimia yang meningkatkan kemampuannya untuk mengambil DNA.

Seperti banyak terobosan dalam teknologi DNA rekombinan, perkembangan menyangkut transformasi terjadi pada awal 1970-an, ketika diamati bahwa sel-sel *E. coli* yang telah direndam dalam larutan garam sedingin es lebih efisien pada serapan DNA daripada sel yang tidak direndam. Sebuah larutan 50 mM kalsium klorida (CaCl_2) secara tradisional digunakan, meskipun garam lain, terutama rubidium klorida, juga efektif. Persisnya mengapa perlakuan ini berhasil, belum dipahami. Mungkin CaCl_2 menyebabkan DNA mengendap di bagian luar sel, atau mungkin garam bertanggung jawab atas beberapa hal jenis perubahan pada dinding sel yang meningkatkan pengikatan DNA. Bagaimanapun, perendaman CaCl_2 hanya mempengaruhi pengikatan DNA, dan bukan penyerapan sebenarnya ke dalam sel. Ketika DNA ditambahkan ke sel perlakuan, DNA tetap melekat pada bagian luar sel, dan pada tahap ini tidak diangkut ke dalam sitoplasma. Pergerakan DNA yang sebenarnya ke dalam sel yang kompeten dirangsang dengan menaikkan suhu secara singkat hingga 42°C . Sekali lagi, alasan pasti mengapa kejutan panas ini efektif belum dipahami.



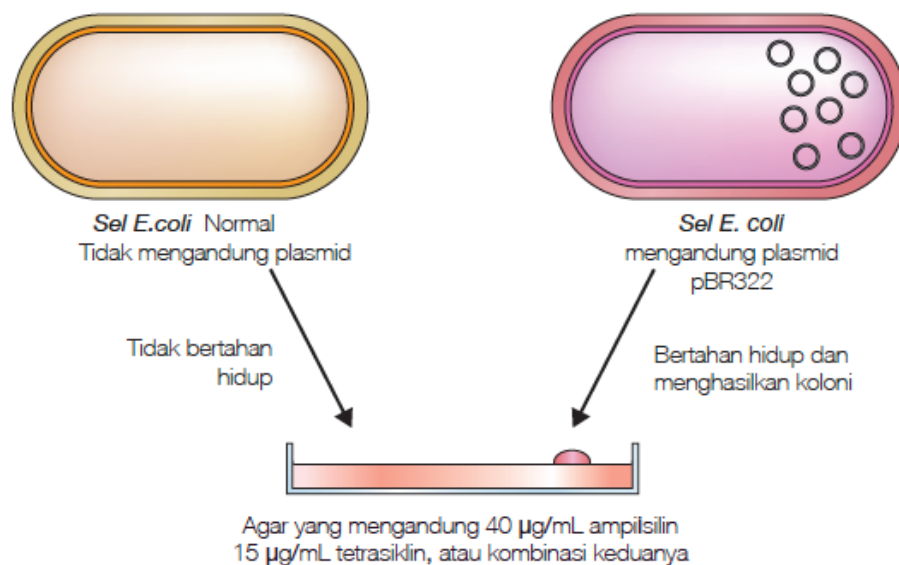
Gambar 106 Tansformasi (Sumber Brown, 2010)

Transformasi sel yang kompeten adalah prosedur yang tidak efisien, betapapun hati-hatinya sel telah disiapkan. Meskipun 1 ng vektor plasmid yang disebut pUC8 dapat menghasilkan 1000-10.000 transforman, ini mewakili penyerapan hanya 0,01% dari semua molekul yang tersedia. Lebih jauh lagi, 10.000 transforman hanyalah sebagian kecil dari jumlah total sel yang ada dalam kultur yang kompeten. Fakta terakhir ini berarti bahwa beberapa cara harus ditemukan untuk

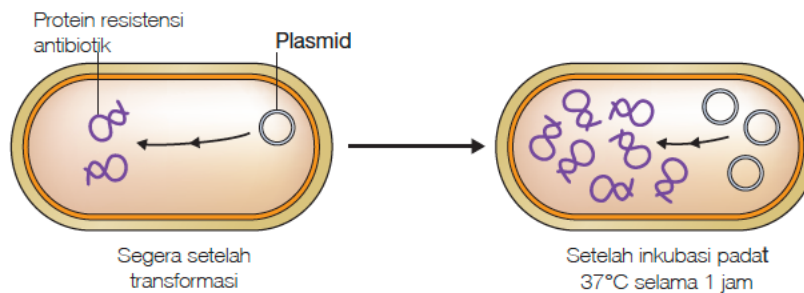
membedakan sel yang telah mengambil plasmid dari ribuan yang belum ditransformasi.

5) Seleksi rekombinan

Penyerapan dan retensi plasmid stabil biasanya dideteksi dengan mencari ekspresi gen yang dibawa oleh plasmid. Misalnya, sel *E. coli* biasanya sensitif terhadap efek penghambatan pertumbuhan antibiotik ampisilin dan tetrasiklin. Namun, sel-sel yang mengandung plasmid, yang merupakan salah satu vektor kloning pertama yang dikembangkan pada tahun 1970-an, resisten terhadap antibiotik ini. Ini karena pBR322 membawa dua set gen, satu gen yang mengkode enzim b-laktamase yang mengubah ampisilin menjadi bentuk yang tidak beracun bagi bakteri, dan set kedua gen yang mengkode enzim yang mendetoksifikasi tetrasiklin. Setelah percobaan transformasi dengan pBR322, hanya sel *E. coli* yang telah mengambil plasmid ampRtetR dan mampu membentuk koloni pada media agar yang mengandung ampisilin atau tetrasiklin; non-transforman, yang masih amp^Stet^S, tidak menghasilkan koloni pada media selektif. Karena itu transforman dan non-transforman mudah dibedakan.



Gambar 107 Seleksi Rekombinan
Sumber: Brown, 2010

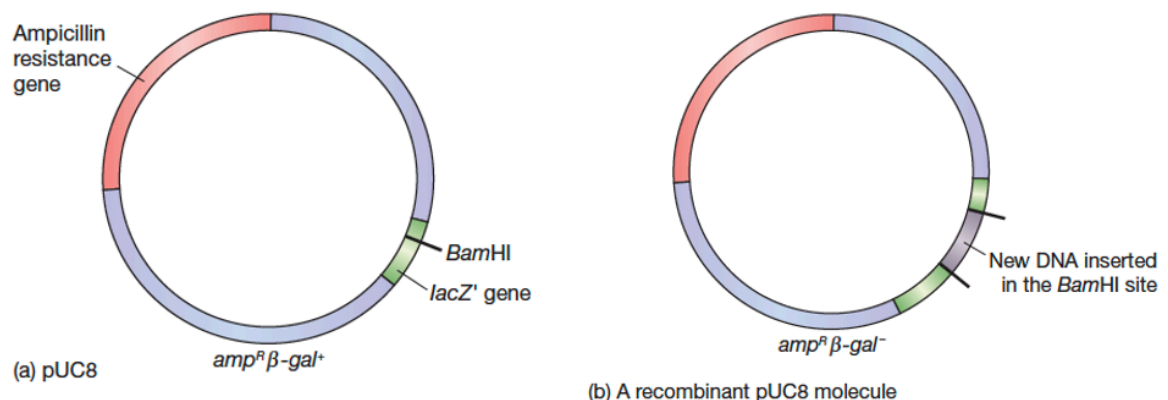


Gambar 108 Ekspresi fenotip.

(Inkubasi pada 37°C selama 1 jam sebelum *plating out* meningkatkan kelangsungan hidup transforman pada media selektif, karena bakteri memiliki waktu untuk memulai sintesis enzim resistensi antibiotik. Sumber: Brown, 2010)

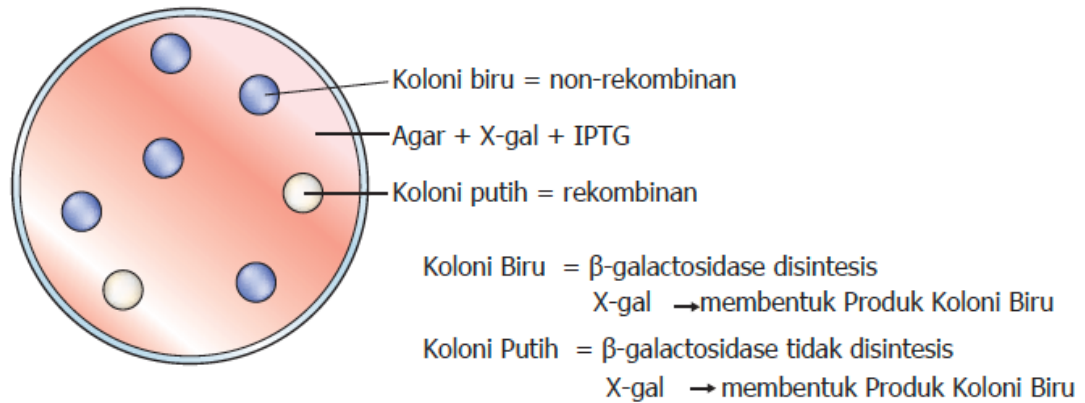
Kebanyakan vektor kloning plasmid membawa setidaknya satu gen yang memberikan resistensi antibiotik pada sel inang, pemilihan transforman dengan pelapisan ke media agar yang mengandung antibiotik yang relevan. Akan tetapi, perlu diingat bahwa resistensi terhadap antibiotik tidak hanya disebabkan oleh adanya plasmid dalam sel yang diubah. Gen resistensi pada plasmid juga harus diekspresikan, sehingga enzim yang mendetoksifikasi antibiotik dapat disintesis. Ekspresi gen resistensi dimulai segera setelah transformasi, tetapi akan membutuhkan beberapa menit sebelum sel mengandung cukup enzim untuk dapat menahan efek toksik antibiotik. Untuk alasan ini bakteri yang diubah tidak boleh dilapiskan ke media selektif segera setelah perlakuan kejut panas, tetapi pertamanya ditempatkan dalam volume kecil media cair, tanpa antibiotik, dan diinkubasi untuk waktu yang singkat. Replikasi dan ekspresi plasmid kemudian dapat dimulai, sehingga ketika sel dilapisi dan bertemu dengan antibiotik, mereka telah mensintesis enzim resistensi yang cukup untuk dapat bertahan hidup. Menumbuhkan ke media selektif memungkinkan transforman untuk dibedakan dari non-transforman. Masalah berikutnya adalah untuk menentukan koloni yang ditransformasikan yang terdiri dari sel-sel yang mengandung molekul DNA rekombinan, dan yang mengandung molekul vektor self-ligated. Sebagian besar vektor kloning, penyisipan fragmen DNA ke dalam plasmid menghancurkan integritas salah satu gen yang ada pada molekul. Oleh karena itu rekombinan dapat diidentifikasi karena karakteristik yang dikodekan oleh gen yang tidak aktif tidak lagi ditampilkan oleh sel inang.

Meskipun inaktivasi penyisipan gen resistensi antibiotik memberikan cara yang efektif untuk identifikasi rekombinan, metode ini dibuat tidak nyaman dengan kebutuhan untuk melakukan dua skrining, satu dengan antibiotik yang memilih untuk transforman, diikuti oleh yang kedua, setelah pelapisan replika, dengan antibiotik yang membedakan rekombinan. Oleh karena itu, kebanyakan vektor plasmid modern menggunakan sistem yang berbeda. Contohnya adalah pUC8, yang membawa gen resistensi ampisilin dan gen yang disebut *lacZ'*, yang mengkode bagian dari enzim b-galaktosidase. Kloning dengan pUC8 melibatkan inaktivasi penyisipan gen *lacZ'*, dengan rekombinan diidentifikasi karena ketidakmampuan mereka untuk mensintesis β -galaktosidase. Enzim β -Galaktosidase adalah salah satu dari serangkaian enzim yang terlibat dalam pemecahan laktosa menjadi glukosa dan galaktosa, biasanya dikodekan oleh gen *lacZ*, yang berada pada kromosom *E. coli*. Beberapa galur *E. coli* memiliki gen *lacZ* yang dimodifikasi, gen yang tidak memiliki segmen sebagai *lacZ'* dan mengkode bagian a-peptida dari b-galaktosidase. Mutan ini dapat mensintesis enzim hanya ketika mereka memiliki plasmid, seperti pUC8, yang membawa segmen *lacZ'* yang hilang dari gen. Eksperimen kloning dengan pUC8 melibatkan pemilihan transforman pada agar ampisilin diikuti dengan seleksi aktivitas β -galaktosidase untuk mengidentifikasi rekombinan. Sel yang memiliki plasmid pUC8 normal adalah *amp^R β -gal⁺* dan mampu mensintesis b-galaktosidase membentuk koloni yang berwarna biru, sedangkan sel rekombinan juga *amp^R* tetapi tidak dapat membuat β -galaktosidase membentuk koloni berwarna putih.



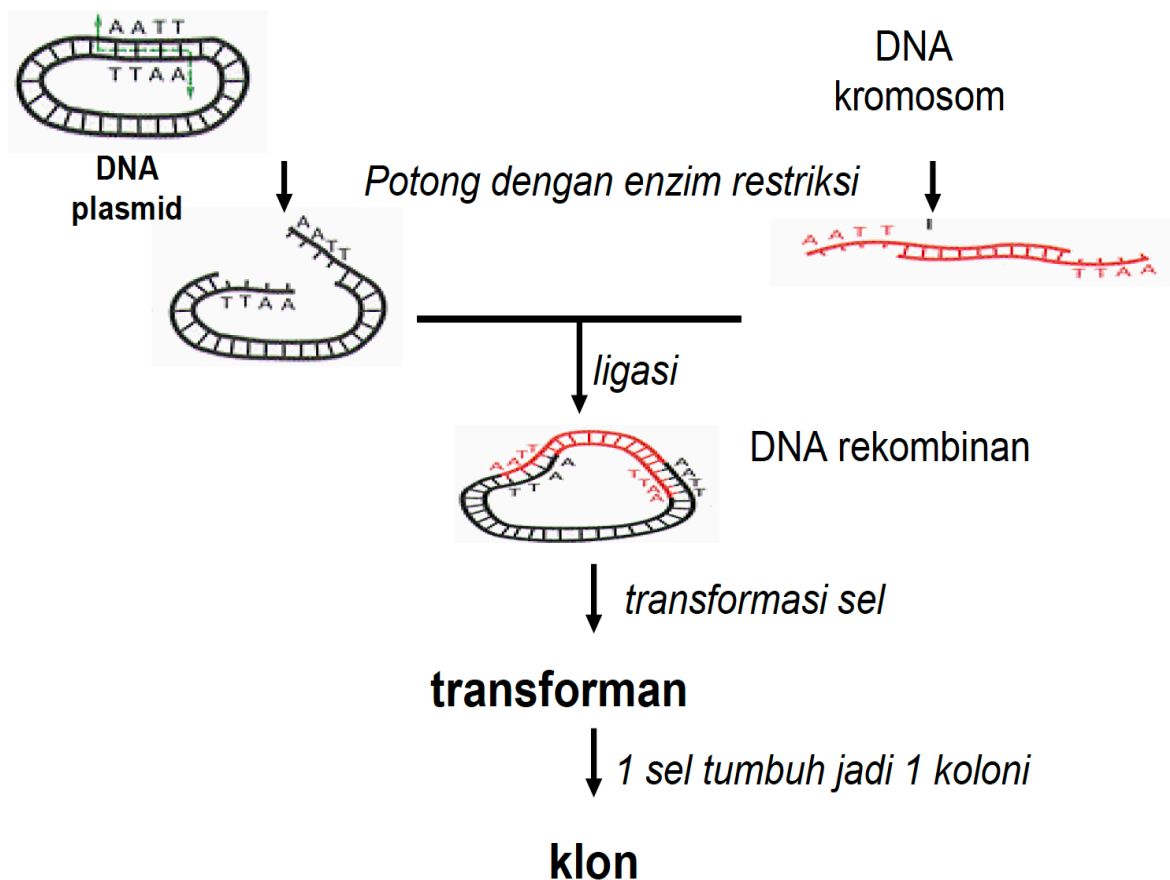
Gambar 109 Vektor kloning pUC8

Pada gambar 109 (a) molekul vektor normal; (b) molekul rekombinan yang mengandung fragmen DNA tambahan yang dimasukkan ke dalam sisi *Bam*HI (Sumber Brown, 2006).

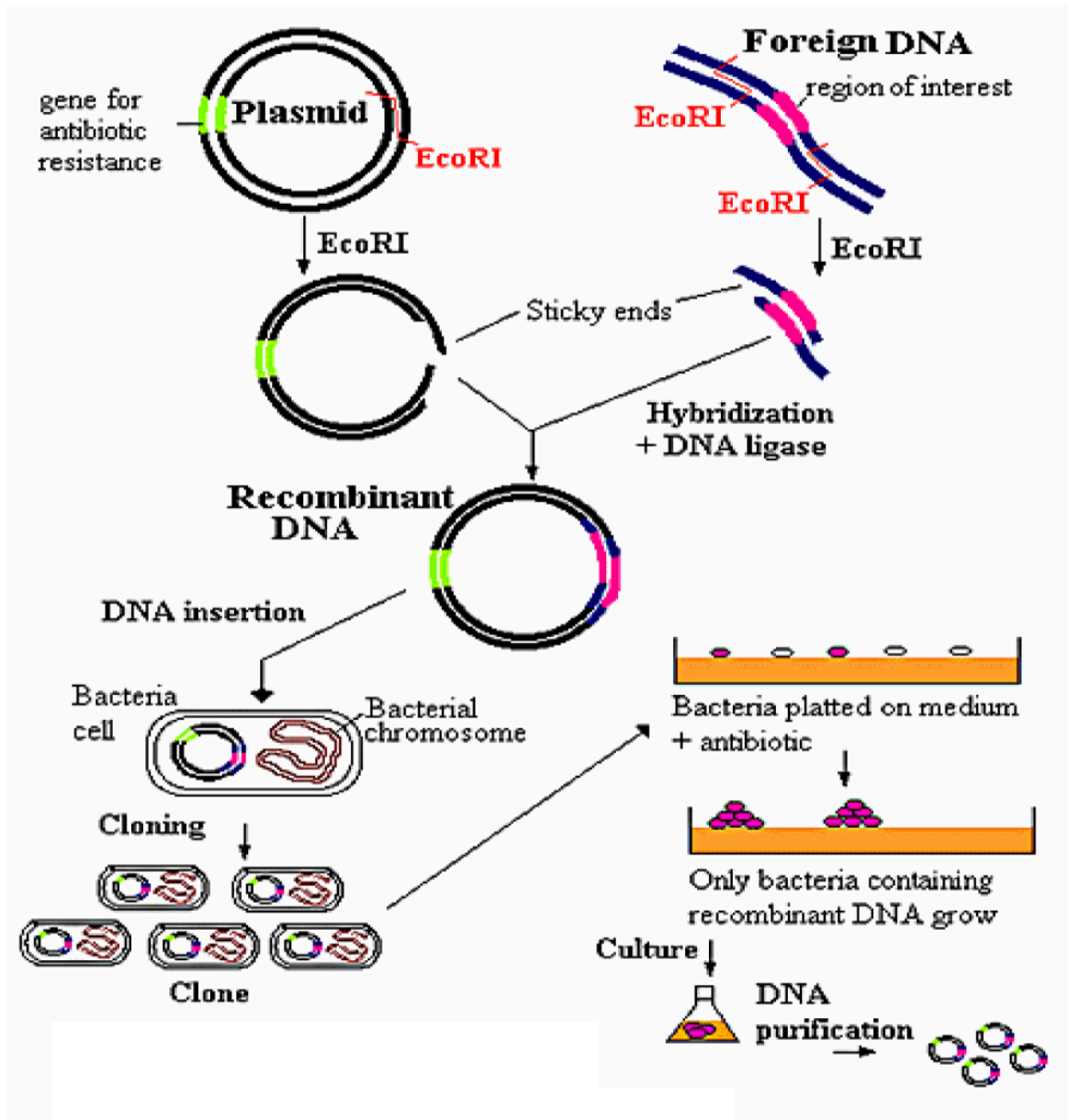


Gambar 110 Skrining untuk rekombinan pUC8.

Secara umum cloning gen dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 111 Pembuatan DNA Rekombinan



Gambar 112 Seleksi plasmid rekombinan

Cara transformasi DNA ke dalam ragi, jamur, hewan, dan tumbuhan juga diperlukan jika organisme ini akan digunakan sebagai inang untuk kloning gen. Sebenarnya, proses-proses ini bukanlah "transformasi", karena istilah itu memiliki arti khusus yang hanya berlaku untuk pengambilan DNA oleh bakteri. Namun, ahli biologi molekuler telah melupakan ini selama bertahun-tahun dan "transformasi" sekarang digunakan untuk menggambarkan penyerapan DNA oleh organisme apa pun. Secara umum, perendaman sel dalam garam hanya efektif dengan beberapa spesies bakteri, meskipun perlakuan dengan litium klorida atau litium asetat meningkatkan

pengambilan DNA oleh sel ragi, dan sering digunakan dalam transformasi *Saccharomyces cerevisiae*. Namun, untuk sebagian besar organisme yang lebih tinggi, diperlukan metode yang lebih canggih.

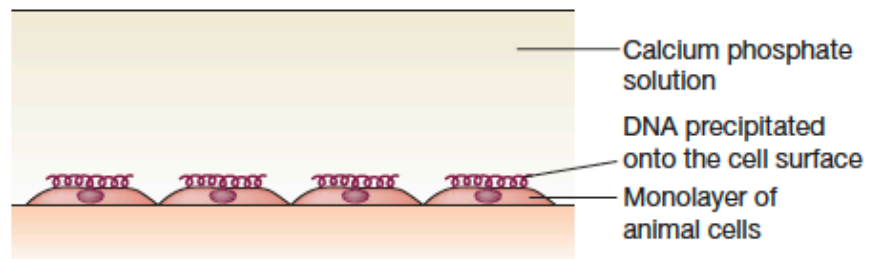
Sebagian besar organisme, penghalang utama untuk pengambilan DNA adalah dinding sel. Sel hewan yang dikultur, yang biasanya tidak memiliki dinding sel, mudah diubah, terutama jika DNA diendapkan ke permukaan sel dengan kalsium fosfat atau dalam liposom yang menyatu dengan membran sel. Untuk jenis sel lainnya jawabannya sering kali adalah dengan menghilangkan dinding selnya. Enzim yang mendegradasi ragi, jamur, dan dinding sel tumbuhan tersedia, dan di bawah kondisi yang tepat protoplas utuh dapat diperoleh. Protoplas umumnya mengambil DNA cukup mudah, tetapi transformasi dapat dirangsang dengan teknik khusus seperti elektroporasi, di mana sel-sel dikenakan pulsa listrik pendek, dianggap menginduksi pembentukan sementara pori-pori di membran sel, sehingga molekul DNA dapat masuk ke dalam sel. Setelah transformasi protoplas dicuci untuk menghilangkan enzim degradatif dan dinding sel secara spontan terbentuk kembali.

Berbeda dengan sistem transformasi yang dijelaskan sejauh ini, ada dua metode fisik untuk memasukkan DNA ke dalam sel eukaryot. Yang pertama adalah injeksi mikro, yang menggunakan pipet yang sangat halus untuk menyuntikkan molekul DNA langsung ke dalam inti sel yang akan diubah. Teknik ini awalnya diterapkan pada sel hewan tetapi kemudian berhasil dengan sel tumbuhan. Metode kedua melibatkan pemboman sel dengan mikroproyektil kecepatan tinggi, biasanya partikel emas atau tungsten yang telah dilapisi dengan DNA. Proyektil mikro ini ditembakkan ke sel dari senjata partikel. Teknik yang tidak biasa ini disebut biolistik dan telah digunakan dengan sejumlah jenis sel yang berbeda.

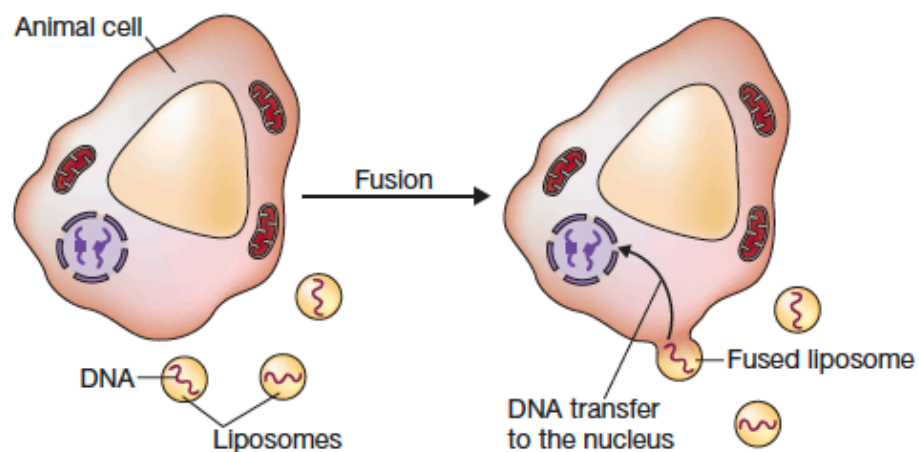
Transformasi dengan hewan dan tumbuhan, produk akhir yang diinginkan mungkin bukan sel yang ditransformasi, tetapi organisme yang ditransformasi. Tanaman relatif mudah untuk diregenerasi dari sel yang dikultur, oleh karena itu, satu sel tanaman yang ditransformasi dapat menghasilkan tanaman yang ditransformasi yang membawa DNA kloning di setiap sel, dan meneruskan DNA kloning ke

keturunannya setelah pembungaan dan pembentukan biji. Hewan, tentu saja tidak dapat diregenerasi dari sel yang dikultur, jadi untuk mendapatkan hewan yang ditransformasi memerlukan pendekatan yang lebih halus. Salah satu teknik dengan mamalia seperti tikus adalah mengeluarkan telur yang telah dibuahi dari saluran telur, menyuntikkan mikro DNA, dan kemudian menanamkan kembali sel-sel yang telah diubah ke dalam saluran reproduksi induk.

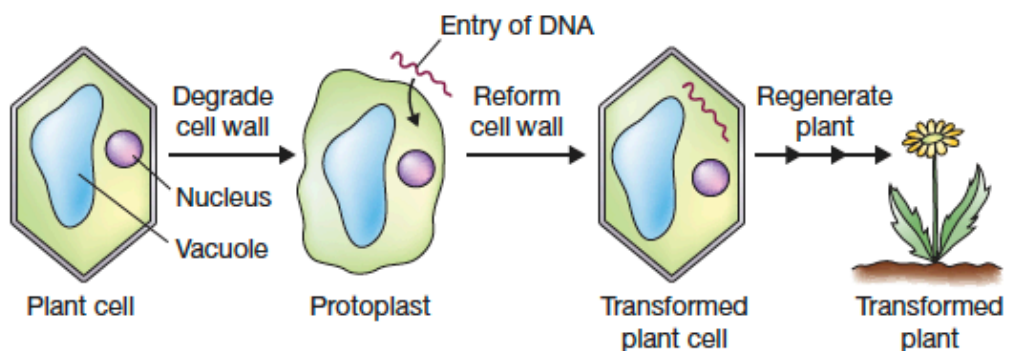
(a) Precipitation of DNA on to animal cells



(b) Fusion with DNA-containing liposomes

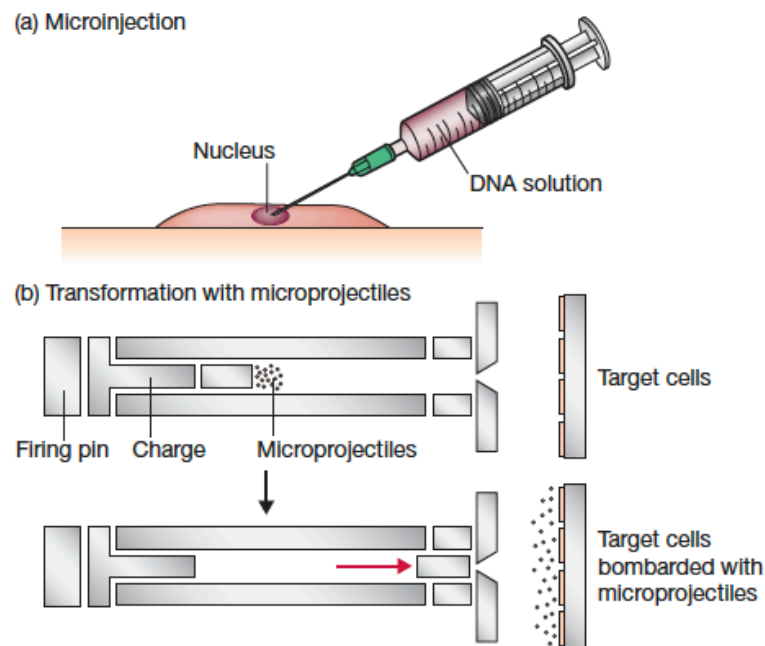


(c) Transformation of plant protoplasts



Gambar 113 Strategi untuk transformasi DNA baru ke dalam sel hewan dan tumbuhan

Gambar 113 (a) pengendapan DNA ke sel hewan; (b) pengenalan DNA ke dalam sel hewan melalui fusi liposom; (c) transformasi protoplas tumbuhan.

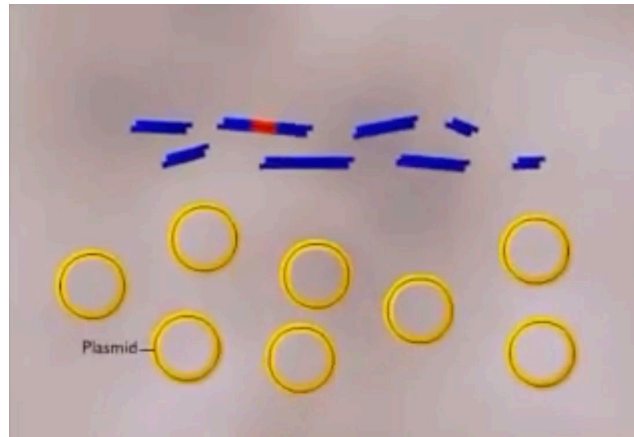


Gambar 114 Dua metode fisik untuk transformasi DNA ke dalam sel.

Meskipun ada banyak prosedur berbeda untuk mendapatkan klon yang diinginkan, semuanya merupakan variasi pada dua metode dasar:

- a. Seleksi langsung untuk gen yang diinginkan, yang berarti bahwa percobaan kloning dirancang sedemikian rupa sehingga satu-satunya klon yang diperoleh adalah klon dari gen yang dibutuhkan. Hampir selalu, seleksi terjadi pada tahap pelapisan.
- b. Identifikasi klon dari perpustakaan gen, yang merupakan senjata awal kloning, untuk menghasilkan perpustakaan klon yang mewakili semua atau sebagian besar gen yang ada dalam sel, diikuti dengan analisis klon individu untuk mengidentifikasi yang benar. Kedua metode identifikasi telah dijelaskan di atas.

Selanjutnya tahap-tahap cloning gen dapat di lihat pada video berikut ini.



Gambar 115 Tahap-tahap Kloning Gen
Sumber: <https://youtu.be/DiUH4nCUSV0>

Berdasarkan materi dan video pembelajaran pertemuan ke dua belas biokimia 1 pada pokok bahasan cloning gen yang telah disajikan, kemudian analisislah mengapa ada cloning gen? Untuk kepentingan apa melakukan cloning gen? Berbahayakah melakukan cloning gen?

2. PENCETUSAN IDE

Pahamilah orientasi di atas yang telah disajikan, setelah saudara diskusikan mengenai cloning gen, bahaslah: Bagaimana proses cloning gen? Apa syarat-syarat cloning gen? apakah boleh di Indonesia melakukan cloning gen? Bahaslah bersama kelompok pada Lembar Kerja Mahasiswa (LKM) yang telah disediakan.

3. PENSTRUKTURAN IDE

Hasil pencetusan ide bersama dengan kelompok saudara rancanglah proyek tentang cloning gen. Bahaslah naskah rancangan tersebut tulislah/gambarkan/skenariokan tentang bagaimana tahapan-tahapan cloning gen? bagaimana seleksi cloning gen? Bahaslah bahan dan alat yang digunakan untuk menyelesaikan proyek tersebut.

4. APLIKASI

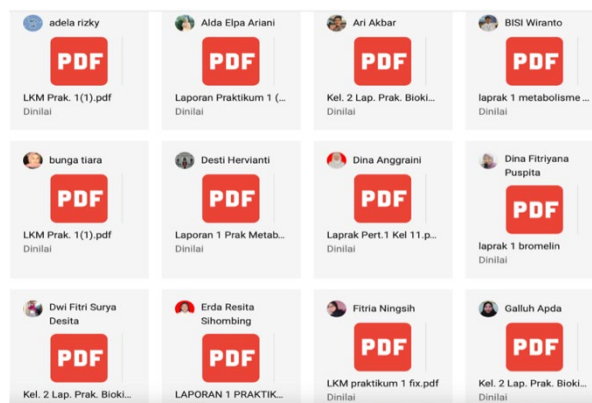
Berdasarkan rancangan yang telah di buat, kerjakanlah proyek bersama kelompok saudara, dokumentasikanlah dalam bentuk video tentang cloning gen.

Proyek dilakukan di luar jam kuliah, sesuai operasional prosedur Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unsri. Lakukanlah proyek tersebut semenarik mungkin. Lakukanlah kolaborasi bersama teman-teman saudara dalam menyelesaikan proyek tersebut. Dokumentasi video yang sudah di upload cantumkan link videonya dibawah aplikasi sebelum pembahasan. Berdasarkan hasil proyek yang telah saudara lakukan bahaslah hal-hal berikut ini: Pada pertemuan 11 yang telah saudara kerjakan, hasil pemotongan DNA dengan enzim restriksi *Bam* H1, Jika salah satu fragmen DNA hasil dari pemotongan Enzim Restriksi *Bam* H1 pada urutan DNA di cloning dengan vector pUC 19. Rancanglah proses cloning tersebut. Analisislah seleksi rekombinan pada proses tersebut.

5. REFLEKSI

Selanjutnya hasil elaborasi dengan dosen, saat proses pembelajaran jika ada perbaikan ditindaklanjuti dengan perbaikan, kemudian dituangkan dalam "Laporan 12 cloning Gen". Laporan tersebut di buat sesuai dengan format Lembar Kerja Mahasiswa yang telah di sediakan, kemudian di submit ke <https://elearning.unsri.ac.id>

Contoh submit laporan 12 cloning gen.



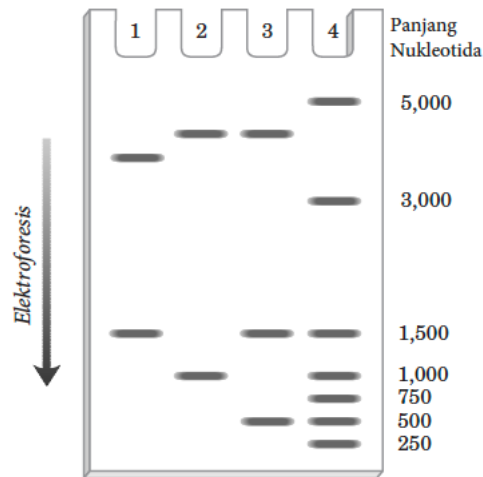
Gambar 116. Submit Laporan 1 Cloning Gen

Laporan 12 cloning gen minimal memuat hal-hal sebagai berikut yaitu: orientasi, pencetusan ide, penstrukturan ide, aplikasi, refleksi, dan daftar pustaka.

Latihan Soal

1. Memilih Plasmid Rekombinan Ketika mengkloning fragmen DNA asing ke dalam plasmid, seringkali berguna untuk menyisipkan fragmen di tempat yang mengganggu penanda yang dapat dipilih (seperti gen resistensi tetrasiklin pBR322). Hilangnya fungsi gen yang terputus dapat digunakan untuk mengidentifikasi klon yang mengandung plasmid rekombinan dengan DNA asing. Dengan vektor bakteriofag tidak perlu melakukan ini, namun seseorang dapat dengan mudah membedakan vektor yang menggabungkan fragmen DNA asing yang besar dari yang tidak. Bagaimana vektor rekombinan ini diidentifikasi?

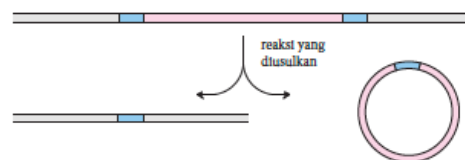
2. Vektor kloning plasmid pBR322 dipotong dengan enzim restriksi endonuklease *Pst*I. Fragmen DNA yang diisolasi dari genom eukariotik (juga diproduksi oleh pembelahan *Pst*I) ditambahkan ke vektor yang disiapkan dan diligasi. Campuran DNA yang diligasi kemudian digunakan untuk mengubah bakteri, dan bakteri yang mengandung plasmid dipilih melalui pertumbuhan dengan adanya tetrasiklin.
 - a. Selain plasmid rekombinan yang diinginkan, jenis plasmid apa lagi yang mungkin ditemukan di antara bakteri yang terbentuk yang resisten terhadap tetrasiklin? Bagaimana jenis-jenisnya dapat dibedakan?
 - b. Fragmen DNA hasil kloning memiliki panjang 1.000 bp dan memiliki sisi *Eco*RI 250 bp dari salah satu ujungnya. Tiga plasmid rekombinan yang berbeda dipotong dengan *Eco*RI dan dianalisis dengan elektroforesis gel, memberikan pola yang ditunjukkan. Apa yang dapat dijelaskan setiap pola tentang DNA kloning? Perhatikan bahwa pada pBR322, sisi restriksi *Pst*I dan *Eco*RI berjarak sekitar 750 bp. Seluruh plasmid tanpa sisipan kloning adalah 4.361 bp. Penanda di jalur 4 memiliki ukuran panjang nukleotida yang telah diketahui.



3. Mengidentifikasi Gen untuk Protein dengan Urutan Asam Amino yang Diketahui untuk menerjemahkan kode genetik, rancang probe DNA yang memungkinkan Anda mengidentifikasi gen untuk protein dengan urutan asam amino terminal amino berikut. Panjang probe harus 18 sampai 20 nukleotida, ukuran yang memberikan spesifisitas yang memadai jika ada cukup homologi antara probe dan gen.

H3N⁺-Ala-Pro-Met-Thr-Trp-Tyr-Cys-Met-Asp-Trp-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Trp-Phe-Arg-Lys-Asn-Thr-Lys-

4. Menggunakan PCR untuk Mendeteksi Molekul DNA Sirkular Dalam spesies protista bersilia, segmen DNA genom terkadang dihapus. Penghapusan adalah reaksi terprogram secara genetik yang terkait dengan perkawinan seluler. Seorang peneliti mengusulkan bahwa DNA dihapus dalam rekombinasi yang disebut rekombinasi sisi spesifik, dengan DNA di kedua ujung segmen bergabung bersama dan DNA yang dihapus berakhir sebagai produk reaksi DNA melingkar.



Sarankan bagaimana peneliti dapat menggunakan reaksi berantai polimerase (PCR) untuk mendeteksi keberadaan DNA sirkular yang dihapus dalam ekstrak protista.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adam, R.L.P., Knowler, J.T., Leader, D.P. 1986. *The Biochemistry of the Nucleic Acids Tenth edition*. New York: Chapman and Hall Ltd.
2. Brown, T. A. 2011. *Introduction to genetics: A molecular approach*. New York: Garland Publishing.
3. Brown, T. A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. Chichester UK: John Wiley & Sons.
4. <https://youtu.be/1KP9zOtjXk>. *Streak Plate Method*. Diakses pada tanggal 20 November 2019.
5. <https://youtu.be/RaTaNQugAuE>. *Broth Culturing*. Diakses pada tanggal 20 November 2019.
6. <https://youtu.be/DiUH4nCUSV0>. *Steps in Cloning a Gene*. Diakses pada tanggal 20 November 2019.
7. Sukaryawan, M., 1998. *Konstruksi Koleksi Parsial Genom dan Urutan Nukleotida Sebagian Gen *ruvB* Salmonella Typhimurium* Bandung: ITB.
8. Sukaryawan, M. 2004. *Biokimia*. Indralaya: Prodi Pendidikan Kimia FKIP Unsri
9. Thenawidjaja, M. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga
10. Watson, DJ., Tooze, J., Kurtz, DT. 1998. *DNA Recombinant*. Jakarta: Erlangga
11. Williams, R.J. 2003. *Restriction Endonucleases. Molecular Biotechnology, (23)*.
12. Winnacker, E.L. 1987. *From Gene to Clone*. New York: VCH.
13. Wirahadikusumah, M. 1985. *Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB

BAB 24 SEKUENSING

1. ORIENTASI

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah yang direncanakan adalah mahasiswa Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni (CPMK-4). Sedangkan kemampuan akhir pada pokok bahasan ini adalah mahasiswa mampu mengkaji implikasi sekuensing dan analisis homologi dalam kehidupan sehari-hari (Sub-CPMK5). Pengalaman belajar yang diperoleh mahasiswa merencanakan, melaksanakan dan melaporkan proyek, presentasi tugas kelompok, mengerjakan lembar kerja mahasiswa, membuat dan mensubmit Laporan di <https://elearning.unsri.ac.id>

Teknik penting metode pengurutan DNA telah ada selama 40 tahun, sejak pertengahan 1970-an pengurutan yang cepat dan efisien telah dimungkinkan. Awalnya teknik ini diterapkan pada gen individu, tetapi sejak awal 1990-an semakin banyak urutan genom yang diperoleh. Ada beberapa prosedur untuk pengurutan DNA, yang paling populer adalah metode pemutusan rantai yang pertama kali ditemukan oleh Fred Sanger dan rekan-rekannya pada pertengahan 1970-an. Urutan pemutusan rantai telah mendapatkan keunggulan karena beberapa alasan, paling tidak karena relatif mudahnya teknik ini dapat diotomatisasi. Untuk mengurutkan seluruh genom, sejumlah besar eksperimen pengurutan individu harus dilakukan, dan akan memerlukan waktu bertahun-tahun untuk melakukan semua ini. Oleh karena itu, teknik pengurutan otomatis sangat penting jika proyek genom harus diselesaikan dalam rentang waktu yang wajar.

Pengembangan metode yang memungkinkan seseorang untuk dengan cepat dan andal menentukan urutan basa, atau 'urutan', dalam sebuah fragmen DNA. Pengetahuan tentang urutan DNA memungkinkan pemahaman yang lebih besar

tentang dasar molekuler kehidupan. informasi urutan DNA memberikan informasi yang penting untuk memahami berbagai proses biologis. Urutan basa dalam DNA menentukan urutan basa dalam RNA, molekul di dalam sel yang secara langsung mengkodekan informasional protein. Para ilmuwan secara rutin menggunakan urutan informasi DNA untuk menyimpulkan informasi urutan protein.

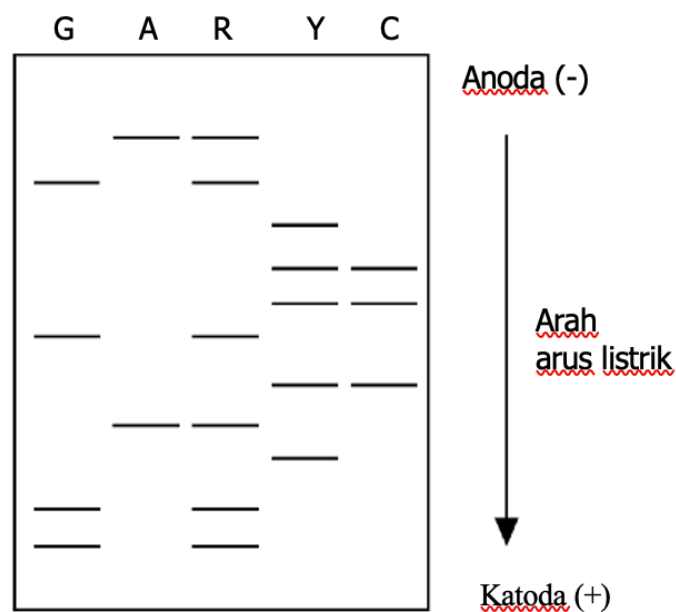
Untuk memahami proses pengurutan DNA, haruslah mengingat beberapa fakta tentang DNA. Pertama, molekul DNA terdiri dari empat basa, adenin (A), guanin (G), sitosin (C) dan timin (T). Basa-basa ini berinteraksi satu sama lain dengan cara yang sangat spesifik melalui ikatan hidrogen, sehingga A berinteraksi dengan T, dan G berinteraksi dengan C. Interaksi spesifik antara basa ini disebut sebagai basa pasangan. Dua untai molekul DNA terjadi dalam orientasi antiparalel di mana satu untai diposisikan dalam arah 5' hingga 3' dan untai lainnya diposisikan dalam arah 3' hingga 5'. Istilah 5' dan 3' mengacu pada arah tulang punggung DNA, dan sangat penting untuk menggambarkan urutan basa. Konvensi untuk menggambarkan urutan dasar dalam urutan DNA menggunakan arah 5' ke 3', dan ditulis dari kiri ke kanan. Jadi, jika salah satu mengetahui urutan satu untai DNA, urutan komplementer dapat disimpulkan. Ada dua metode yang biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA; Yang pertama menggunakan bahan kimia untuk secara khusus mendegradasi untai DNA, dan disebut sebagai pengurutan DNA Maxam-Gilbert untuk menghormati penemunya, A. Maxam dan W. Gilbert. Metode kedua melibatkan penghambatan spesifik sintesis DNA enzimatik dan disebut sebagai sequencing Sanger untuk menghormati penemunya, F. Sanger. Kedua metode pengurutan ini dijelaskan secara lebih rinci di bawah ini.

Kedua metode mengharuskan produk reaksi berbagi titik akhir yang sama. Persyaratan ini berasal dari metode pemisahan yang digunakan untuk memvisualisasikan produk reaksi. Produk reaksi ini dipisahkan ukurannya dengan menerapkan arus listrik melalui matriks gel (elektroforesis), dan ujung yang sama diperlukan untuk menjaga agar produk reaksi tetap sesuai dengan mobilitas ukuran, sehingga produk yang lebih kecil bermigrasi lebih cepat pada gel relatif terhadap produk yang lebih besar. Lebih khusus lagi, ujung 5' atau 3' dapat menentukan titik

akhir fragmen dalam reaksi sekuensing Maxam-Gilbert, sementara hanya ujung 5' yang mendefinisikan titik akhir fragmen dalam reaksi sekuensing Sanger. Alasan perbedaan ini dijelaskan di bawah ini.

A. Sekuensing DNA Maxam–Gilbert

Dalam metode ini, satu fragmen DNA berlabel akhir (biasanya diberi label dengan penanda radioaktif) terkena kerusakan spesifik. Bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi kerusakan DNA adalah dimetilsulfat (menyerang G), natrium hidroksida (menyerang A), asam format (menyerang G dan A), hidrazin (menyerang C dan T), dan hidrazin dengan adanya natrium klorida (menyerang C). Perlakuan ini terbatas sehingga rata-rata hanya satu basa di untai yang rusak. Modifikasi dan pada akhirnya, penghapusan basa (bukan gula) menghasilkan titik lemah dalam molekul DNA yang rentan terhadap pembelahan. Selanjutnya, DNA terkena piperidin pada suhu tinggi untuk memutuskan untai pada posisi melemah. Karena reaksi ini dilakukan pada populasi molekul, elektroforesis reaksi menghasilkan tangga produk pembelahan yang sesuai dengan posisi basa itu di sepanjang untai DNA. Produk dari modifikasi kimia yang berbeda dielektroforesis di jalur sebelah pada gel dan membaca untuk menentukan urutan DNA (Gambar 117).



Gambar 117 Tampilan skema produk reaksi Maxam-Gilbert.

Pada gambar 117 G, A, R, Y dan C mewakili reaksi kimia spesifik yang mengidentifikasi relative posisi basa guanin (G), adenin (A), purin ('R'; G dan A), pirimidin ('Y'; C dan T) dan sitosin (C). Dalam contoh ini fragmen diberi label di ujung 5'. Membaca dari bawah ke atas gel, pola pita sesuai dengan urutan 5'GGTACGCCTGA 3'.

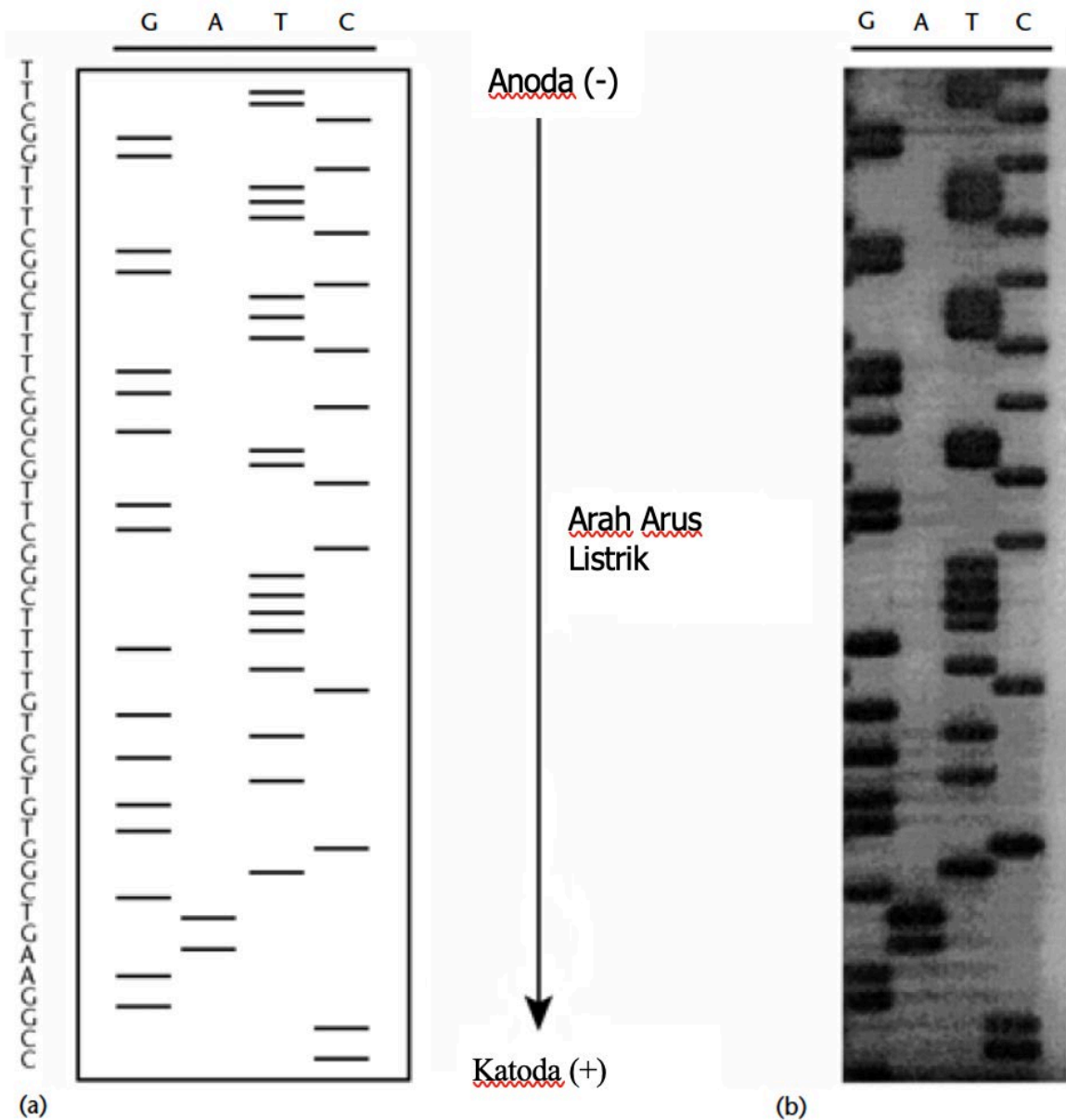
Fragmen yang lebih kecil menunjukkan identitas basa yang paling dekat dengan ujung berlabel, dan produk yang lebih besar secara berturut-turut menunjukkan identitas basa yang lebih jauh. Tergantung pada apakah label terletak di ujung 5' atau 3' untai DNA, urutan dasar dibaca dari bawah ke atas autoradiogram sebagai 5' hingga 3' atau 3' hingga 5', masing-masing. Metode penentuan urutan Maxam-Gilbert tidak secara rutin digunakan oleh sebagian besar peneliti karena beberapa alasan. Pertama, data yang dihasilkan dalam reaksi sekuensing kimia biasanya lebih ambigu daripada data yang dihasilkan dalam reaksi sekuensing enzimatik. Salah satu alasannya adalah bahwa reaktivitas kimia basa dipengaruhi oleh pengotor reaksi. Karena itu, ketika seseorang membaca urutan dari jenis reaksi ini, intensitas relatif dari produk reaksi harus dianalisis untuk interpretasi yang tepat dari identitas dasar. Selain itu, prosedur ini menggunakan bahan kimia berbahaya dan radioaktivitas tingkat tinggi. Jika dibandingkan dengan sekuensing DNA enzimatik, sekuensing Maxam-Gilbert menghasilkan informasi urutan yang relatif lebih pendek dan prosedur yang diperlukan untuk menghasilkan informasi ini lebih padat karya.

B. Sekuensing DNA Sanger

Metode pengurutan Sanger saat ini merupakan metode yang paling umum digunakan untuk pengurutan DNA. Metode ini memanfaatkan beberapa fitur *DNA polymerase*: kemampuannya untuk membuat salinan yang tepat dari sebuah molekul DNA; arah sintesis enzimatiknya (5' hingga 3'); persyaratannya untuk untai DNA ('primer') untuk memulai sintesis; dan persyaratannya untuk 3' OH di ujung primer. Jika 3' OH tidak tersedia, untai DNA tidak dapat diperpanjang oleh polimerase. Jika dideoksinukleotida (ddNTP – ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), analog dasar yang tidak memiliki 3' OH, ditambahkan ke dalam reaksi sekuensing

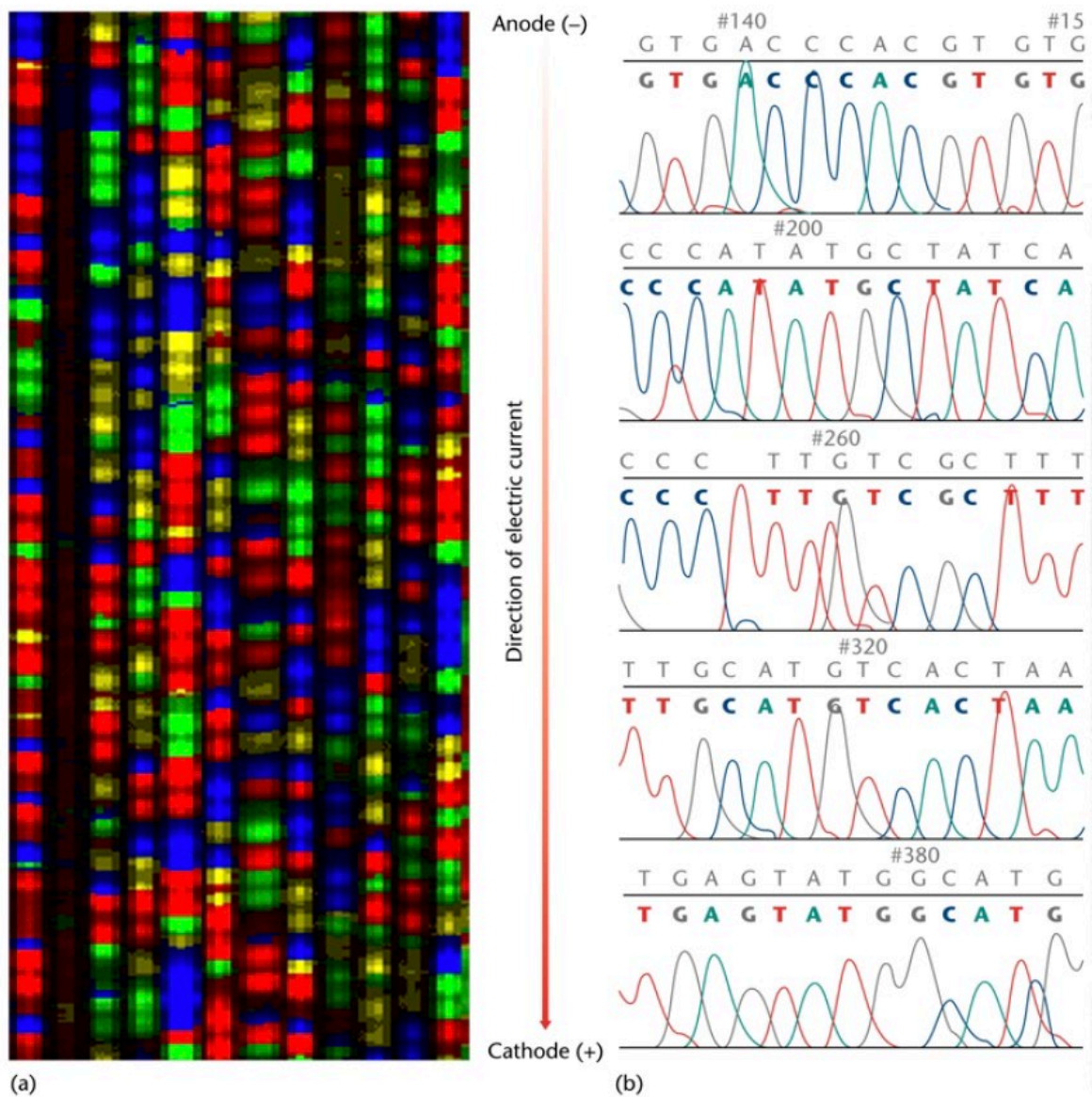
enzimatik, ia dimasukkan ke dalam untai yang tumbuh oleh polimerase. Namun, setelah ddNTP digabungkan, polimerase tidak dapat menambahkan basa tambahan ke ujung untai. Yang penting, ddNTP dimasukkan ke dalam Untai DNA oleh polimerase menggunakan basa yang sama, aturan penggabungan yang menentukan penggabungan nukleotida alami, di mana A menentukan penggabungan T, dan G menentukan penggabungan C (dan sebaliknya). Setelah polimerase menggabungkan ddNTP, rantai ekstensi berhenti. Untuk menentukan urutan DNA, seseorang melakukan empat reaksi per cetakan, di mana setiap reaksi digunakan untuk menentukan posisi relatif basa spesifik di sepanjang untai DNA. Hal ini dicapai dengan menambahkan dideoksinukleotida yang berbeda ke dalam setiap reaksi yang mengandung DNA polimerase, primer DNA, dan dNTP. Rasio antara ddNTP dan dNTP sangat penting untuk menentukan berapa banyak nukleotida (rata-rata) polimerase dapat bergabung ke dalam molekul DNA sebelum memasukkan ddNTP, sehingga menghentikan pemanjangan rantai. Primer DNA, ddNTP, atau dNTP dapat diberi label radio aktif atau diberi tag untuk memungkinkan deteksi untai DNA yang baru disintesis.

Karena reaksi ini dilakukan pada populasi molekul, elektroforesis reaksi menghasilkan tangga produk ekstensi yang sesuai dengan posisi basa itu di sepanjang untai DNA. Produk dari bejana reaksi yang berbeda dielektroforesis di jalur yang bersebelahan pada gel sekuensing, dideteksi, dan dibaca untuk menentukan sekuens DNA (Gambar 118). Semakin kecil fragmen menunjukkan identitas basa yang paling dekat dengan ujung 5' dan, karena DNA polimerase hanya menggabungkan basa dalam arah 5' hingga 3', membaca identitas produk yang lebih besar secara berurutan memberikan urutan 5' hingga 3' dari DNA untai yang diperpanjang. Biasanya, sekitar 300-400 basa dapat ditentukan dalam satu reaksi (manual).



C. Sekuensing DNA Otomatis

Kemajuan besar dalam menentukan informasi urutan DNA terjadi dengan diperkenalkannya mesin pengurutan DNA otomatis. Sequencer otomatis digunakan untuk memisahkan produk reaksi pengurutan, mendeteksi dan mengumpulkan (melalui komputer) data dari reaksi, dan menganalisis urutan basa secara otomatis menyimpulkan urutan basa dari fragmen DNA. Sekuenser otomatis mendeteksi produk ekstensi yang mengandung tag fluoresen, memungkinkan peneliti menghilangkan radioaktivitas dari proses pengurutan DNA. Panjang urutan yang dapat dibaca menggunakan sequencer otomatis tergantung pada berbagai parameter, tetapi biasanya berkisar antara 500 dan 1000 basa.



Gambar 119 Sekuensing otomatis

Pada gambar 119 di atas (a) Data sekuens awal dikumpulkan pada sekuenser DNA otomatis (Perkin-Elmer ABI PRISM Model 377). Empat warna menunjukkan kerabat posisi basa dalam fragmen DNA. Setiap garis vertikal empat warna sesuai dengan reaksi urutan yang berbeda. Fragmen yang lebih kecil (lebih dekat katoda) mengidentifikasi basa yang lebih dekat ke primer (5' ujung urutan informasi). (b) Bagian dari perwakilan, urutan yang dianalisis ditentukan oleh sequencer otomatis.

Seperti yang dijelaskan untuk reaksi pengurutan tipe Sanger yang menggunakan (terutama) isotop untuk mendeteksi produk ekstensi, beberapa pengurutan otomatis menggunakan empat jalur untuk mengumpulkan data dari reaksi. Namun, beberapa mesin menggunakan secara berbeda tag fluorescent berwarna untuk menunjukkan identitas dasar (Gambar 119). Pendekatan ini memungkinkan satu jalur berisi data untuk templat DNA dan meningkatkan empat kali lipat jumlah data yang terkandung pada gel. Pendekatan jalur tunggal ini dimungkinkan oleh pengembangan tag fluoresen yang dapat dilekatkan pada primer DNA atau ke ddNTP. Empat warna kimia digunakan oleh lebih banyak peneliti, dibahas sebagai berikut.

Ketika kimia pewarna primer digunakan untuk mendeteksi produk sekuensing, tag fluoresen dilampirkan ke sekuensing primer. Dengan kimia ini, primer disintesis empat kali dan tag yang berbeda (sesuai dengan identitas basa yang berbeda) melekat pada primer selama setiap sintesis. Selanjutnya, merakit empat reaksi terpisah, masing-masing berisi template DNA, ddNTP spesifik dan primer berkode warna, dan reagen yang diperlukan untuk menghasilkan produk ekstensi. Primer mendefinisikan awal (5' ujung) dari produk ekstensi, dan ddNTP yang tergabung mendefinisikan identitas dasar di ujung 3' dari molekul. Setelah reaksi selesai, produk yang diberi kode warna dikumpulkan dan disiapkan untuk dimuat ke dalam satu jalur pada sequencer otomatis.

Ketika kimia pewarna terminator digunakan untuk mendeteksi produk pengurutan, identitas dasar ditentukan oleh *tag fluorescent* yang melekat pada ddNTP. Jenis reaksi kimia ini dilakukan dalam tabung tunggal yang berisi cetakan

DNA, primer, keempat ddNTP berlabel fluoresen, dan reagen yang diperlukan untuk menghasilkan produk ekstensi. Primer mendefinisikan awal (5' akhir) dari produk ekstensi dan ddNTP berkode warna yang tergabung mendefinisikan identitas dasar pada ujung 3' molekul. Setelah reaksi selesai, produk ekstensi disiapkan untuk dimuat ke dalam satu jalur pada sequencer otomatis. Keuntungan dari kimia pewarna terminator adalah bahwa produk ekstensi adalah: divisualisasikan hanya jika mereka diakhiri dengan label pewarna ddNTP; produk yang dihentikan sebelum waktunya tidak terdeteksi. Dengan demikian, sinyal latar belakang yang berkurang biasanya dihasilkan dengan metode ini.

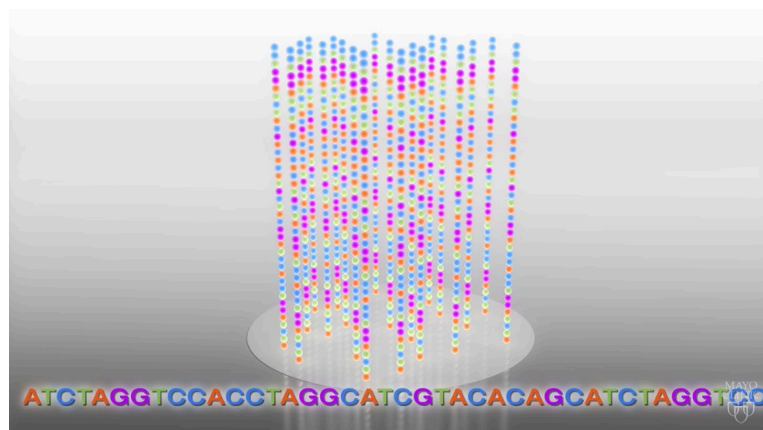
D. Sekuensing Genom

Sangat sering, seorang peneliti perlu menentukan urutan fragmen DNA yang lebih besar dari panjang baca sekuensing rata-rata 500-1000 basa. Tidak mengherankan, strategi untuk mencapai ini telah dikembangkan. Strategi ini dibagi menjadi dua kelas besar, acak atau terarah. Pilihan strategi dipengaruhi oleh ukuran fragmen yang akan diurutkan. Secara acak sekuensing DNA, fragmen DNA besar (biasanya satu lebih besar dari 20.000 pasangan basa) dipecah menjadi fragmen yang lebih kecil yang dimasukkan ke dalam vektor kloning. Diasumsikan bahwa jumlah informasi yang terkandung dalam klon yang lebih kecil ini setara dengan yang terkandung dalam fragmen DNA asli. Banyak klon yang lebih kecil dipilih secara acak, templat DNA disiapkan untuk reaksi sekuensing, dan primer berlabel fluoresensi yang akan berpasangan dengan DNA vector urutan yang berbatasan dengan sisipan digunakan untuk memulai reaksi pengurutan.

Selanjutnya, urutan fragmen DNA asli direkonstruksi oleh komputer perakitan urutan yang diperoleh dari fragmen DNA yang lebih kecil. Strategi ini digunakan secara luas untuk menentukan urutan fragmen yang mewakili seluruh genom manusia. Namun, pendekatan acak ini biasanya tidak cukup untuk menyelesaikan penentuan urutan, karena kesenjangan dalam urutan sering tetap setelah perakitan komputer. Strategi terarah (dijelaskan di bawah) biasanya digunakan untuk menyelesaikan proyek urutan. Strategi pengurutan terarah, atau primer berjalan, dapat digunakan untuk mengisi celah yang tersisa setelah fase acak

pengurutan fragmen besar, dan sebagai pendekatan yang efisien untuk pengurutan fragmen DNA yang lebih kecil. Strategi ini menggunakan primer DNA yang menempel pada template di satu sisi dan bertindak sebagai sisi awal untuk pemanjangan rantai. Pendekatan ini membutuhkan pengetahuan tentang beberapa informasi urutan untuk merancang primer.

Urutan yang diperoleh dari yang pertama reaksi digunakan untuk merancang primer untuk reaksi berikutnya dan langkah-langkah ini diulang sampai urutan lengkap ditentukan. Dengan demikian, strategi berbasis primer melibatkan langkah-langkah pengurutan berulang dari daerah DNA yang diketahui ke daerah DNA yang tidak diketahui; proses ini meminimalkan redundansi, dan tidak memerlukan langkah kloning tambahan. Namun, strategi ini membutuhkan sintesis primer baru untuk masing-masing putaran urutan. Kebutuhan merancang dan mensintesis primer baru, ditambah dengan biaya dan waktu yang dibutuhkan untuk sintesisnya, telah membatasi aplikasi rutin primer berjalan untuk mengurutkan fragmen DNA yang besar. Para peneliti telah mengusulkan menggunakan perpustakaan primer pendek untuk menghilangkan persyaratan untuk sintesis primer khusus. Ketersediaan perpustakaan primer akan meminimalkan pemborosan primer, karena masing-masing primer dapat digunakan untuk beberapa reaksi, dan akan memungkinkan akses langsung ke primer sekuensing berikutnya. Selanjutnya animasi sekuensing dapat dilihat pada video berikut.



Gambar 120 Sekuensing
Sumber: <https://youtu.be/2JUu1WqidC4>

E. Analisis Homologi

Setelah menentukan urutan DNA, untuk menetapkan fungsi urutan tersebut, perlu dilakukan analisis homolog, yang terkait oleh nenek moyang yang sama, umumnya memiliki fungsi yang sama atau sangat mirip, identifikasi mereka dapat digunakan untuk menyimpulkan fungsi urutan baru. Metode untuk mengidentifikasi urutan homolog bergantung pada menemukan kesamaan antara urutan yang tidak mungkin terjadi secara kebetulan, sehingga memungkinkan kesimpulan bahwa urutan telah berevolusi dari nenek moyang yang sama.

Metode yang paling umum digunakan adalah *BLAST*, nyaman digunakan melalui layanan online, memiliki akses ke database DNA dan protein utama, dan menyediakan alat yang mudah digunakan untuk menampilkan dan menganalisis output. Seseorang juga dapat mengunduh *BLAST* ke komputer lokal untuk penggunaan internal. *BLAST* mencapai kecepatannya dengan menghilangkan sebagian besar komputasi dan memfokuskan upayanya pada jalur dengan skor tertinggi melalui matriks. Ini dilakukan dengan membuat indeks dari urutan kueri, dan kecocokan dengan skor tinggi.

Kecocokan yang mengarah ke keselarasan yang signifikan diperpanjang sejauh mungkin untuk memberikan hasil yang homolog yang paling tinggi. Analisis homologi ini dilakukan sebagai berikut: mula-mula masuklah ke *website ncbi*, selanjutnya masuk ke program *blast sequence similarity*. Urutan DNA atau protein yang telah diperoleh, selanjutnya di submit ke *Blast Sequence Similarity* pada *geneBank*. Selanjutnya *GeneBank* akan melakukan analisis homologi dengan fragmen DNA atau urutan asam amino yang di submit.

Scanning entire sequence for 90% homology

Linear Protein sequence RUVSTM(1:131)

Homology 122/131 = 93%

Linear Protein sequence RUVIGB(131:261)

```
AIGVVIVLAILFWQWRNLLSMTISPDLAFVDGVKLQRVKLLMLVTALTIGVTHKFVGALIITSLLIIPAATARRFARTP
*****
AIGVVIVVAILFWQWRNLLSMTISPDLAFVDGVKLQRVKLLMLVTALTIGVAMKFVGALIITSLLIIPAATARRFARTP
```

```
EQMAGVAVGVSMIAVTGGLTFSAFYDTPARPSVMLCAALLFIFSMKKQAS
*****
EQMAGVAVLVGMVAVTGGLTFSAVYDTPAGPSVVLCAALLFILSMKKQAS
```

Gambar 123 Analisis homologi tingkat asam amino

```
MIELLFPGWLAGIMLACAAGPLGSFVWRRMSYFGDTLAHASLL
GVAFGLLLDVNPFYAVIAVTLLLAGGLVWLEKRPQLAIDTLLGIMAHSALSGLVVVS
Daerah homologi yang dianalisis
LMSNIRVDLMAYLEGDLLAVTPEDLISYAIGVVIVVAILFWQWRNLLSMTISPDLAFV
DGVKLRVKLLMLVTALTIGVAMKFVGALIITSLLIIPAATARRFARTPEQMAGVAV
LVGMVAVTGGLTFSAVYDTPAGPSVVLCAALLFILSMKKQAS
```

Gambar 124 Gen *ruv* B lengkap E. coli K-12 MG1655

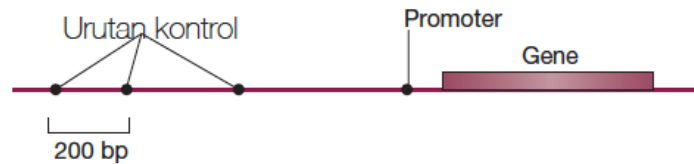
F. Regulasi Ekspresi Gen

Beberapa gen diekspresikan sepanjang waktu, sebagian besar tunduk pada regulasi dan diaktifkan hanya ketika produk gen mereka dibutuhkan oleh sel. Sistem regulasi gen yang paling sederhana terdapat pada bakteri seperti *E. coli*, yang dapat mengatur ekspresi gen untuk proses biosintetik dan metabolisme, sehingga produk gen yang tidak diperlukan tidak disintesis. Misalnya, gen yang mengkode enzim yang terlibat dalam biosintesis triptofan dapat dimatikan ketika ada jumlah triptofan yang melimpah di dalam sel, dan diaktifkan lagi ketika tingkat triptofan turun. Demikian pula, gen untuk pemanfaatan gula seperti laktosa diaktifkan hanya ketika gula yang relevan ada untuk dimetabolisme. Pada organisme yang lebih tinggi, regulasi gen lebih kompleks karena ada lebih banyak gen yang harus dikendalikan. Diferensiasi sel melibatkan perubahan besar dalam pola ekspresi gen, dan proses perkembangan dari sel telur yang dibuahi menjadi sel dewasa memerlukan koordinasi antara sel yang berbeda serta perubahan ekspresi gen yang bergantung pada waktu.

Banyak masalah dalam regulasi gen memerlukan pendekatan genetik klasik: genetika memungkinkan gen yang mengontrol regulasi untuk dibedakan, memungkinkan sinyal biokimia yang mempengaruhi ekspresi gen untuk diidentifikasi, dan dapat mengeksplorasi interaksi antara gen yang berbeda dan keluarga gen. Karena alasan inilah sebagian besar terobosan dalam memahami perkembangan pada organisme tingkat tinggi dimulai dengan studi tentang lalat buah *Drosophila melanogaster*. Kloning gen dan analisis DNA melengkapi genetika karena mereka memberikan informasi yang jauh lebih rinci tentang peristiwa molekuler yang terlibat dalam mengatur ekspresi gen tunggal.

Ekspresi gen yang diatur memiliki satu atau lebih sekuens kontrol di wilayah hulunya dan bahwa gen diaktifkan dan dinonaktifkan oleh penempelan protein pengatur ke sekuens ini. Protein pengatur dapat menekan ekspresi gen, dalam hal ini gen dimatikan ketika protein terikat pada urutan kontrol, atau sebagai alternatif

protein mungkin memiliki peran positif atau meningkatkan, mengaktifkan atau meningkatkan ekspresi gen target.



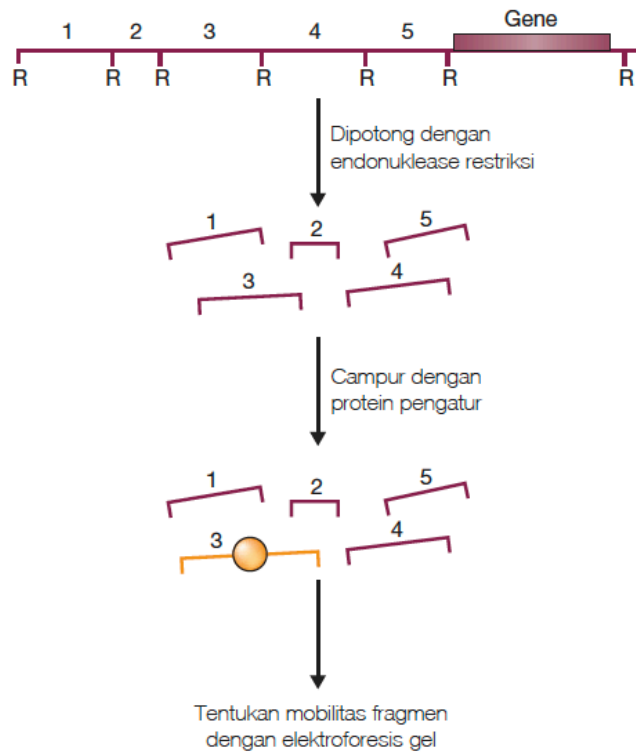
Gambar 125 Regulasi Gen

1) Mengidentifikasi sisi pengikatan protein pada molekul DNA

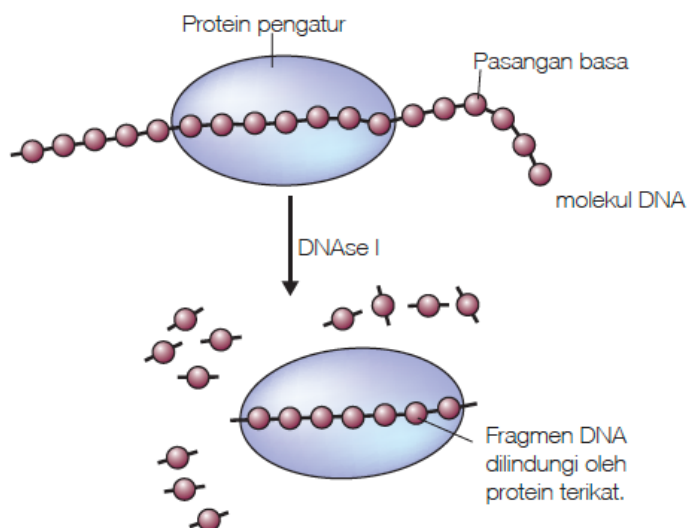
Urutan kontrol wilayah DNA yang dapat mengikat protein pengatur. Oleh karena itu mungkin untuk mengidentifikasi urutan kontrol hulu gen dengan mencari wilayah yang relevan untuk sisi pengikatan protein. Ada tiga cara berbeda untuk melakukan ini.

a) Retardasi gel kompleks DNA-protein

Protein adalah struktur yang cukup substansial dan protein yang melekat pada molekul DNA menghasilkan peningkatan besar dalam massa molekul keseluruhan. Jika peningkatan ini dapat dideteksi, sebuah fragmen DNA yang mengandung sisi pengikatan protein akan dapat diidentifikasi. Dalam praktiknya, sebuah fragmen DNA yang membawa protein terikat diidentifikasi dengan elektroforesis gel, karena memiliki mobilitas yang lebih rendah daripada molekul DNA yang tidak terkompleks. Prosedurnya adalah disebut sebagai retardasi gel. Dalam percobaan retardasi gel (Gambar 126), daerah hulu DNA dari gen yang dikenali oleh enzim restriksi endonuklease dan kemudian dicampur dengan protein pengatur atau, jika protein belum dimurnikan, dengan protein tak terfraksionasi.



Gambar 126 Percobaan Retardasi gel.



Gambar 127 Protein terikat melindungi wilayah molekul DNA dari degradasi oleh nuklease seperti DNase I (Sumber: Brown, 2010)

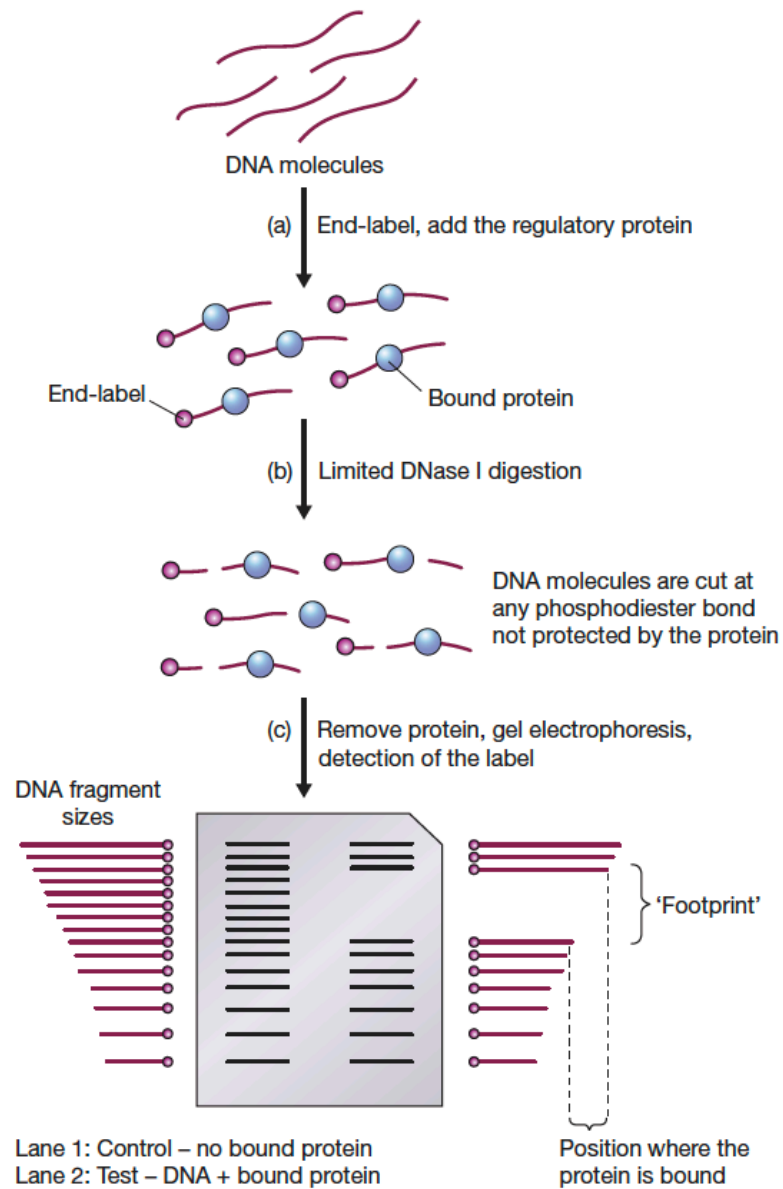
Fragmen restriksi yang mengandung urutan kontrol membentuk kompleks dengan protein pengatur, semua fragmen lainnya tetap sebagai DNA. Lokasi urutan kontrol kemudian ditentukan dengan menemukan posisi pada peta restriksi dari fragmen yang dihambat selama elektroforesis gel. Ketepatan urutan kontrol yang dapat ditempatkan tergantung pada seberapa rinci peta restriksi dan seberapa nyaman penempatan lokasi restriksi. Urutan kontrol tunggal mungkin berukuran kurang dari 10 bp, sehingga retardasi gel jarang dapat menunjukkan dengan tepat. Oleh karena itu, teknik yang lebih tepat diperlukan untuk menggambarkan posisi urutan kontrol dalam fragmen yang diidentifikasi oleh retardasi gel.

b) *Footprinting* dengan DNase I

Prosedur umumnya disebut *footprinting* memungkinkan wilayah kontrol untuk diposisikan dalam fragmen restriksi yang telah diidentifikasi oleh retardasi gel. *Footprinting* bekerja atas dasar bahwa interaksi dengan protein pengatur melindungi DNA di wilayah sekuens kontrol dari aksi degradatif endonuklease seperti deoksiribonuklease (DNase) I. Fenomena ini dapat digunakan untuk menemukan sisi pengikatan protein pada molekul DNA. Fragmen DNA yang diperlakukan pertama-tama diberi label pada salah satu ujungnya, dan kemudian dikomplekskan dengan protein pengatur. Kemudian DNase I ditambahkan, tetapi jumlah yang digunakan dibatasi sehingga tidak terjadi degradasi lengkap dari fragmen DNA. Sebaliknya, tujuannya adalah untuk memotong setiap molekul hanya pada satu ikatan fosfodiester. Jika fragmen DNA tidak memiliki protein yang melekat padanya, hasil dari perlakuan ini adalah keluarga fragmen berlabel, yang berbeda ukurannya hanya dengan satu nukleotida.

Setelah pelepasan protein terikat dan pemisahan pada gel poliakrilamida, kelompok fragmen berlabel muncul sebagai tangga pita. Namun, protein terikat melindungi ikatan fosfodiester tertentu tidak dipotong oleh DNase I, yang berarti bahwa dalam kasus ini kelompok fragmen tidak lengkap, karena fragmen yang dihasilkan dari pembelahan dalam urutan kontrol tidak ada. Ketidakhadiran mereka muncul sebagai "*Footprinting*", terlihat jelas pada Gambar 128. Wilayah molekul

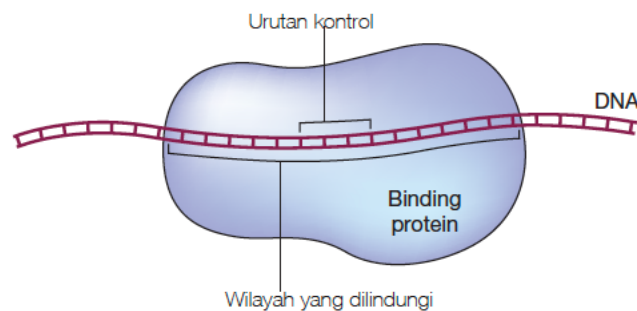
DNA yang mengandung urutan kontrol sekarang dapat ditentukan dari ukuran fragmen di kedua sisi jejak.



Gambar 128 DNase I footprinting
(Sumber: Brown, 2010)

c) Modifikasi tes interferensi

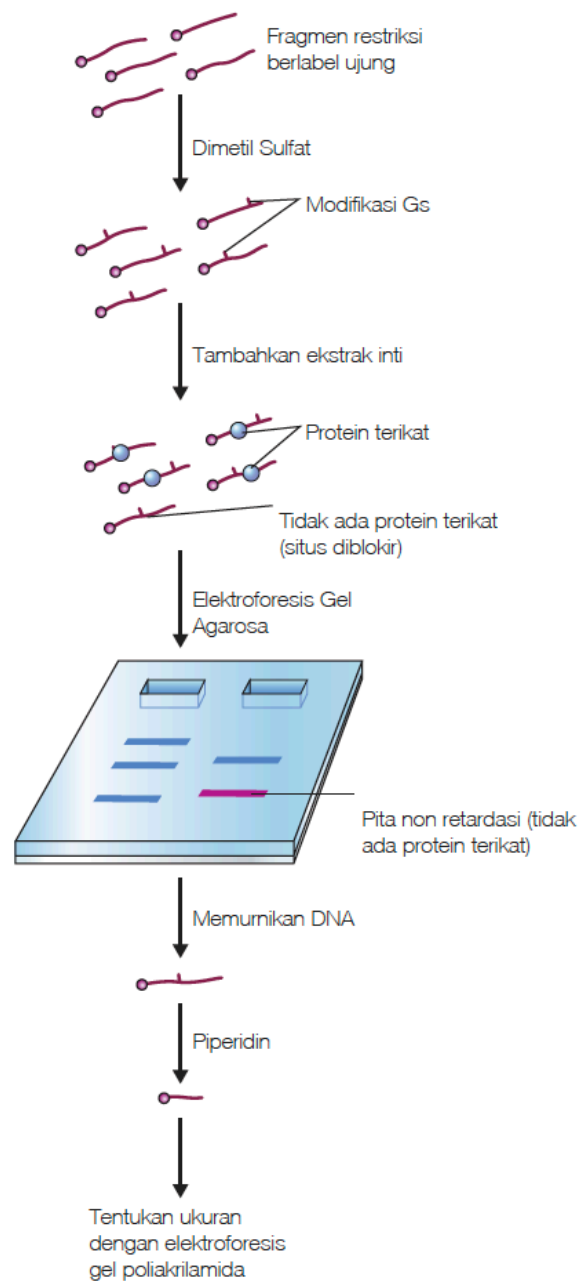
Analisis retardasi gel dan *footprinting* memungkinkan urutan kontrol untuk ditempatkan, tetapi tidak memberikan informasi tentang interaksi antara protein pengikat dan molekul DNA. Yang lebih tepat dari kedua teknik ini jejak kaki hanya mengungkapkan wilayah DNA yang dilindungi oleh protein yang terikat. Protein relatif besar dibandingkan dengan heliks ganda DNA, dan dapat melindungi beberapa puluh pasangan basa ketika terikat pada urutan kontrol yang panjangnya hanya beberapa pasangan basa (Gambar 129). Oleh karena itu, jejak kaki tidak menggambarkan wilayah kontrol itu sendiri, hanya wilayah di mana ia berada.



Gambar 129 Protein terikat dapat melindungi wilayah DNA yang lebih panjang dari urutan kontrol.

Nukleotida yang benar-benar membentuk perlekatan dengan protein terikat dapat diidentifikasi dengan uji interferensi modifikasi. Seperti dalam *footprinting*, fragmen DNA pertama-tama harus diberi label di salah satu ujungnya. Kemudian mereka diperlakukan dengan bahan kimia yang memodifikasi nukleotida tertentu, contohnya adalah dimetil sulfat, yang mengikat gugus metil ke nukleotida guanin. Modifikasi ini dilakukan di bawah kondisi terbatas sehingga rata-rata hanya satu nukleotida per fragmen DNA yang dimodifikasi. Sekarang DNA dicampur dengan ekstrak protein. Kunci untuk pengujian ini adalah bahwa protein pengikat mungkin tidak akan menempel pada DNA jika salah satu guanin dalam daerah kontrol

dimodifikasi, karena metilasi nukleotida mengganggu reaksi kimia spesifik yang memungkinkannya membentuk ikatan dengan protein.



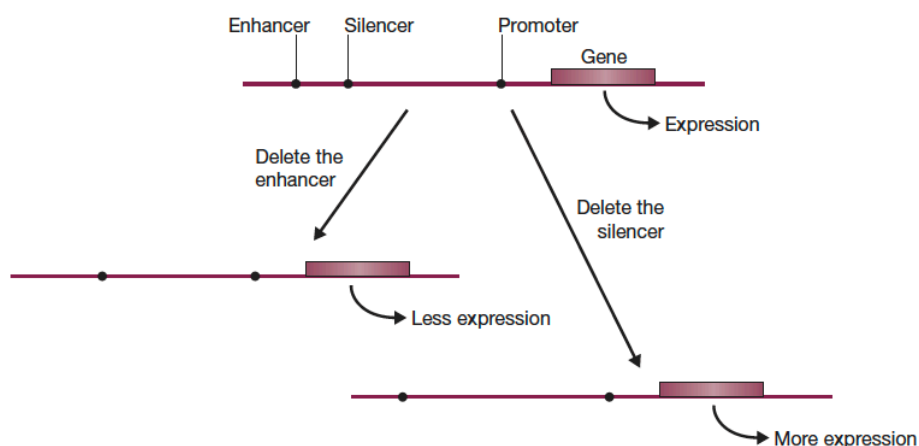
Gambar 130 Uji interferensi modifikasi.
(Sumber: Brown, 2010)

Bagaimana tidak adanya pengikatan protein dipantau? Jika campuran DNA dan protein diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa, dua pita akan terlihat, satu terdiri dari kompleks DNA-protein dan satu lagi mengandung DNA tanpa protein

terikat, bagian dari prosedur ini adalah uji retardasi ge. Pita yang terdiri dari DNA tidak terikat dimurnikan dari gel dan diperlakukan dengan piperidin, bahan kimia yang memotong molekul DNA pada nukleotida termetilasi. Produk piperidin sekarang dipisahkan dalam gel poliakrilamida dan pita berlabel divisualisasikan. Ukuran pita yang terlihat menunjukkan posisi dalam fragmen DNA guanin yang metilasinya mencegah pengikatan protein. Guanin ini terletak dalam urutan kontrol. Uji modifikasi sekarang dapat diulang dengan bahan kimia yang menargetkan nukleotida A, T, atau C untuk menentukan posisi yang tepat dari urutan kontrol.

2) Mengidentifikasi urutan kontrol dengan analisis penghapusan

Retardasi gel, jejak kaki, dan uji interferensi modifikasi dapat menentukan urutan kontrol yang mungkin di hulu gen, tetapi mereka tidak memberikan informasi tentang fungsi dari urutan individu. Analisis penghapusan adalah pendekatan yang sama sekali berbeda yang tidak hanya dapat menemukan urutan control, tetapi yang penting juga dapat menunjukkan fungsi dari setiap urutan. Tekniknya tergantung pada asumsi bahwa penghapusan urutan control akan menghasilkan perubahan cara ekspresi gen kloning (Gambar 131). Misalnya, penghapusan urutan yang menekan ekspresi gen harus menghasilkan gen yang diekspresikan pada tingkat yang lebih tinggi. Demikian pula, jaringan spesifik urutan kontrol dapat diidentifikasi sebagai hasil penghapusannya pada gen target yang diekspresikan dalam jaringan.



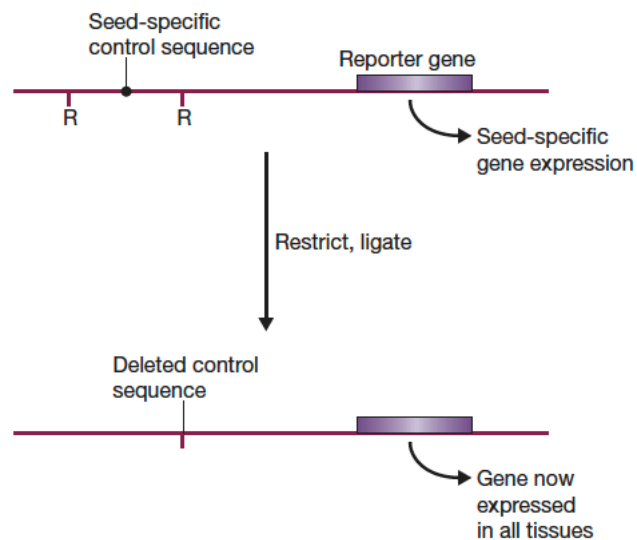
Gambar 131 Prinsip analisis Delisi

a) Gen reporter

Sebelum melakukan analisis penghapusan, harus ditemukan cara untuk menguji efek penghapusan pada ekspresi gen kloning. Efeknya mungkin hanya akan diamati ketika gen dikloning ke dalam spesies asalnya: tidak akan ada pengujian yang baik untuk regulasi gen cahaya tanaman jika gen tersebut dikloning dalam bakteri. Vektor kloning sekarang telah dikembangkan untuk sebagian besar organisme, jadi kloning gen yang dikembalikan ke inangnya seharusnya tidak menimbulkan masalah. Kesulitannya adalah bahwa dalam kebanyakan kasus, inang sudah memiliki salinan gen di dalam kromosomnya. Bagaimana perubahan pola ekspresi gen kloning dapat dibedakan dari pola ekspresi normal yang ditunjukkan oleh salinan kromosom gen? Jawabannya adalah dengan menggunakan gen reporter. Ini adalah gen uji yang menyatu dengan daerah hulu gen kloning, menggantikan gen ini. Ketika diklon ke organisme inang, pola ekspresi gen reporter harus persis meniru gen asli, karena gen reporter berada di bawah pengaruh urutan kontrol yang persis sama dengan gen asli. Gen reporter harus dipilih dengan hati-hati. Kriteria pertama adalah bahwa gen reporter harus mengkode fenotipe yang belum ditampilkan oleh organisme inang. Jenis fenotipe dari gen reporter harus relatif mudah dideteksi setelah dikloning ke dalam inang, dan idealnya mungkin untuk menguji fenotipe secara kuantitatif. Kriteria ini tidak terbukti sulit untuk dipenuhi dan berbagai gen reporter yang berbeda telah digunakan dalam studi regulasi gen.

Setelah gen reporter dipilih dan konstruksi yang diperlukan dibuat, melakukan analisis penghapusan cukup mudah. Penghapusan dapat dilakukan di wilayah hulu konstruksi dengan salah satu dari beberapa strategi, contoh sederhana ditunjukkan pada (Gambar 132 dibawah ini). Efek penghapusan kemudian dinilai dengan mengkloning konstruksi yang dihapus ke dalam organisme inang dan menentukan pola dan tingkat ekspresi gen reporter. Peningkatan ekspresi akan menyiratkan bahwa urutan penekan atau pembungkaman telah dihilangkan, penurunan akan menunjukkan penghapusan aktivator atau penambah, dan perubahan dalam spesifisitas jaringan akan menunjukkan urutan kontrol yang responsif terhadap jaringan.

Hasil analisis penghapusan harus ditafsirkan dengan sangat hati-hati. Komplikasi mungkin timbul jika penghapusan tunggal menghilangkan dua rangkaian kontrol yang terkait erat atau, dua rangkaian kontrol yang berbeda bekerja sama untuk menghasilkan satu respons. Terlepas dari potensi kesulitan ini, analisis penghapusan, dalam kombinasi dengan studi sisi pengikatan protein, telah memberikan informasi penting tentang bagaimana ekspresi gen individu diatur, dan telah melengkapi dan memperluas analisis genetik berbasis diferensiasi dan perkembangan yang lebih luas.



Gambar 132 Analisis penghapusan.

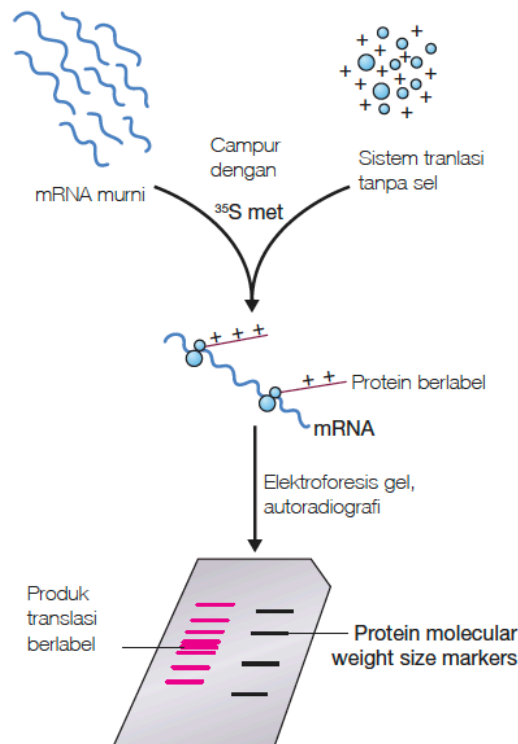
Pada gambar 132 Sebuah gen reporter telah ditambahkan ke wilayah hulu dari gen khusus benih dari tanaman. Penghapusan fragmen restriksi yang dibatasi oleh sisi R menghapus urutan kontrol yang memediasi ekspresi gen spesifik benih, sehingga gen reporter sekarang diekspresikan di semua jaringan tanaman.

G. Mengidentifikasi dan Studi Produk dari Gen kloning

Selama bertahun-tahun kloning gen menjadi semakin berguna dalam studi tidak hanya gen itu sendiri tetapi juga protein yang dikodekan oleh gen kloning. Penyelidikan terhadap struktur dan fungsi protein telah sangat diuntungkan dari pengembangan teknik yang memungkinkan terjadinya mutasi pada titik-titik tertentu dalam gen kloning, yang menghasilkan perubahan terarah pada struktur protein yang dikodekan. Sebelum mempertimbangkan prosedur ini, pertama-tama kita harus melihat masalah yang lebih biasa tentang bagaimana mengisolasi protein yang dikodekan oleh gen kloning. Dalam banyak kasus, analisis ini tidak diperlukan, karena protein telah dikarakterisasi jauh sebelum eksperimen kloning gen dilakukan dan sampel protein murni sudah tersedia. Di sisi lain, ada saat-saat ketika produk terjemahan dari gen kloning belum diidentifikasi. Sebuah metode untuk mengisolasi protein kemudian diperlukan.

1) *HRT* dan *HART* dapat mengidentifikasi produk translasi dari Kloning Gen

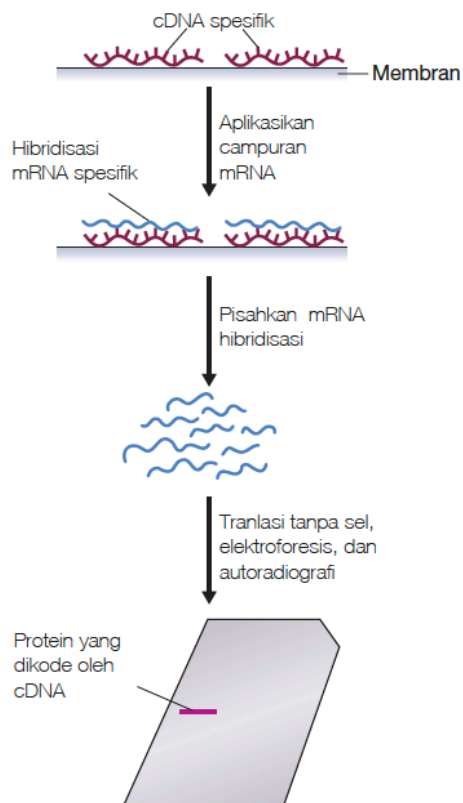
Dua teknik terkait, *hybrid-release translation* (HRT) dan *hybrid-arrest translation* (HART), digunakan untuk mengidentifikasi produk translasi yang dikodekan oleh gen kloning. Keduanya bergantung pada kemampuan mRNA murni untuk mengarahkan sintesis protein dalam translasi tanpa sel. Ini adalah ekstrak sel, biasanya dibuat dari biji gandum yang berkecambah atau dari sel retikulosit kelinci (keduanya sangat aktif dalam sintesis protein) dan mengandung ribosom, tRNA, dan semua molekul lain yang diperlukan untuk sintesis protein. Sampel mRNA ditambahkan ke translasi tanpa sel, dengan campuran 20 asam amino yang ditemukan dalam protein, salah satunya diberi label (sering digunakan ^{35}S -metionin). Molekul mRNA diterjemahkan ke dalam campuran protein radioaktif (Gambar 133), yang dapat dipisahkan dengan elektroforesis gel dan divisualisasikan dengan autoradiografi. Setiap pita mewakili satu protein yang dikodekan oleh salah satu molekul mRNA yang ada dalam sampel.



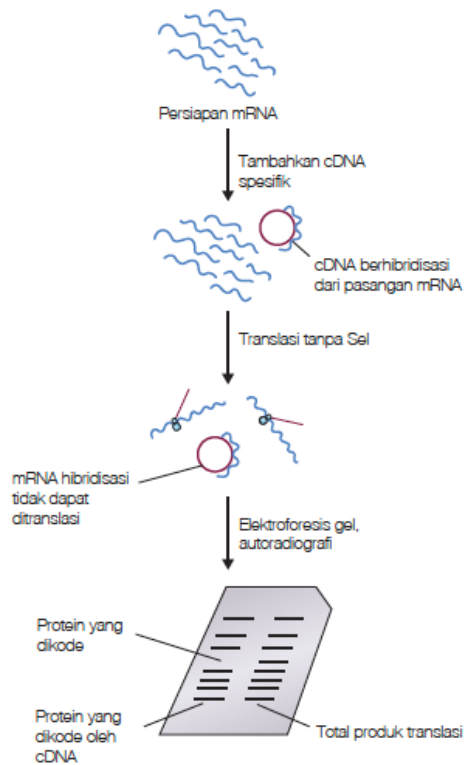
Gambar 133 Sistem Translasi tanpa Sel
(Sumber: Brown, 2010)

Baik *HRT* dan *HART* bekerja paling baik ketika gen yang dipelajari telah diperoleh sebagai klon cDNA. Untuk *HRT*, cDNA didenaturasi, diimmobilisasi pada nitroselulosa atau nilon, dan diinkubasi dengan sampel mRNA (Gambar 134). Pasangan mRNA spesifik dari cDNA berhibridisasi dan tetap melekat pada membrane. Setelah membuang molekul yang tidak terikat, mRNA hibridisasi dipulihkan dan ditranslasi dalam kloning tanpa sel. Ini memberikan sampel murni dari protein yang dikodekan oleh cDNA.

Translasi *hybrid-arrest* sedikit berbeda karena cDNA yang terdenaturasi ditambahkan langsung ke sampel mRNA (Gambar 135). Hibridisasi kembali terjadi antara cDNA dan pasangan mRNA-nya, tetapi dalam kasus ini mRNA yang tidak terikat tidak dibuang. Sebaliknya seluruh sampel ditranslasi dalam cloning tanpa sel. mRNA hibridisasi tidak dapat melakukan translasi langsung, sehingga semua protein kecuali yang dikode oleh gen kloning disintesis. Oleh karena itu, produk translasi gen diidentifikasi sebagai protein yang tidak ada dalam autoradiograf.



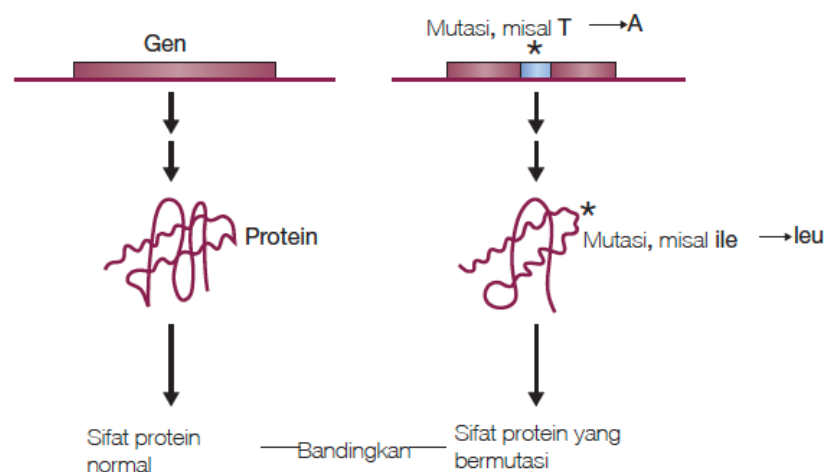
Gambar 134 Hybrid-release translation



Gambar 135 Hybrid-arrest translation
(Sumber: Brown, 2010)

2) Analisis protein dengan mutagenesis in vitro

Meskipun *HRT* dan *HART* dapat mengidentifikasi produk translasi dari gen kloning, teknik ini hanya memberi tahu kita sedikit tentang protein itu sendiri. Beberapa pertanyaan utama adalah pada hubungan antara struktur protein dan cara aktivitasnya. Cara terbaik untuk mengatasi masalah ini adalah dengan menginduksi mutasi pada gen yang mengkode protein dan kemudian menentukan pengaruh perubahan urutan asam amino terhadap sifat produk translasi (Gambar dibawah 136). Dalam keadaan normal, mutasi terjadi secara acak dan sejumlah besar mungkin harus disaring sebelum ditemukan yang memberikan informasi berguna. Sebuah solusi untuk masalah ini disediakan oleh mutagenesis in vitro, sebuah teknik yang memungkinkan mutasi terarah dibuat pada titik tertentu dalam gen kloning.



Gambar 136 Mutasi dapat mengubah urutan asam amino protein. Produk translasi dapat mempengaruhi sifat-sifatnya. (Sumber: Brown, 2010)

Meskipun berpotensi berguna, manipulasi ini bergantung pada kejadian kebetulan dari sisi restriksi di area yang diminati dalam gen kloning. Mutagenesis terarah oligonukleotida adalah teknik yang lebih serbaguna yang dapat membuat mutasi pada titik mana pun dalam gen.

Berdasarkan materi dan video pembelajaran pertemuan ke tiga belas biokimia 1 pada pokok bahasan sekuensing yang telah disajikan, untuk kepentingan apa melakukan sekuensing? Mengapa perlu melakukan analisis homologi baik pada tatanan DNA maupun protein?

1. PENCETUSAN IDE

Pahamilah orientasi di atas yang telah disajikan, diskusikan dengan kelompok saudara hal-hal berikut ini: Bagaimana cara pembacaan DNA hasil sekuensing? Bagaimana cara untuk menentukan analisis homologi? Kemudian, bahaslah bersama kelompok saudara tentang metode sekuensing pada Lembar Kerja Mahasiswa (LKM) yang telah disediakan.

2. PENSTRUKTURAN IDE

Hasil pencetusan ide bersama dengan kelompok saudara rancanglah proyek tentang Bagaimana teknik melakukan sekuensing? Bagaimana teknik melakukan analisis homologi tingkat DNA dan Protein pada *Gene Bank*? Bahaslah naskah rancangan tersebut tulislah/gambarkan/skenariokan tentang bagaimana teknik melakukan sekuensing. Bahaslah bahan dan alat yang digunakan untuk menyelesaikan proyek tersebut.

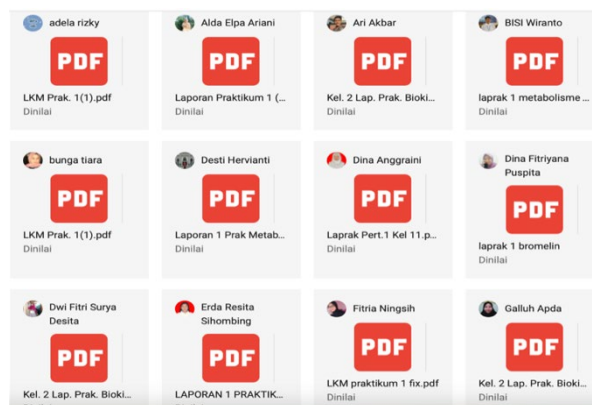
3. APLIKASI

Berdasarkan rancangan yang telah di buat, kerjakanlah proyek bersama kelompok saudara, dokumentasikanlah dalam bentuk video tentang sekuensing. Proyek dilakukan di luar jam kuliah, sesuai operasional prosedur Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unsri. Lakukanlah proyek tersebut semenarik mungkin. Lakukanlah kolaborasi bersama teman- teman saudara dalam menyelesaikan proyek tersebut. Kemudian setelah selesai pembuatan video tersebut, bahaslah analisis homologilah urutan DNA dan Protein (sesuai aplikasi bab 22) pada Gene Bank?

4. REFLEKSI

Selanjutnya hasil elaborasi dengan dosen, saat proses pembelajaran jika ada perbaikan ditindaklanjuti dengan perbaikan, kemudian dituangkan dalam "Laporan 13 Sekuansing dan analisis homologi". Laporan tersebut di buat sesuai dengan format Lembar Kerja Mahasiswa yang telah di sediakan, kemudian di submit ke <https://elearning.unsri.ac.id>

Contoh submit laporan13 Sekuansing dan analisis homologi.



Gambar 137. Submit Laporan 13 Sekuansing dan analisis homologi

Laporan 13 Sekuansing dan analisis homologi minimal memuat hal-hal sebagai berikut yaitu: orientasi, pencetusan ide, penstrukturan ide, aplikasi, refleksi, dan daftar pustaka. Materi perkuliahan pokok bahasan pondasi biokimia dapat anda pelajari juga dalam paparan berikut ini.

Latihan Soal

1. Jelaskan teknik sequencing menurut metode Maxam–Gilbert dan metode dan metode Sanger.
2. Jelaskan bagaimana melakukan analisis homologi baik tingkat DNA maupun Protein?
3. Jelaskan bagaimana teknik mengidentifikasi protein produk dari Gen cloning?
4. Analisis homologilah urutan DNA dan Protein urutan DNA dibawah ini pada Gene Bank?

ATG GTG CAT CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG
TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG
GGC AGG CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG
TCC TTT GGG GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT GTT ATG GGC AAC CCT
AAG GTG AAG GCT CAT GGC AAG AAA GTG CTC GGT GCC TTT AGT GAT
GGC CTG GCT CAC CTG GAC AAC CTC AAG GGC ACC TTT GCC ACA CTG
AGT GAG CTG CAC TGT GAC AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG AAC TTC
AGG CTC CTG GGC AAC GTG CTG GTC TGT GTG CTG GCC CAT CAC TTT
GGC AAA GAA TTC ACC CCA CCA GTG CAG GCT GCC TAT CAG AAA GTG
GTG GCT GGT GTG GCT AAT GCC CTG GCC CAC AAG TAT CAC TAA

DAFTAR PUSTAKA

1. Brown, T. A. 2011. *Introduction to genetics: A molecular approach*. New York: Garland Publishing.
2. Brown, T. A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. Chichester UK: John Wiley & Sons.
3. Clinic, M. 2018. What is Genomic Sequencing?. <https://youtu.be/2JUu1WqidC4>. Diakses pada tanggal 25 Januari 2022.
4. Hardin, S.H. 2001. *DNA Sequencing*. Encyclopedia Of Life Sciences: Nature Publishing Group
5. Nelson, D.L., Cox, M.M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry sixth edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
6. Stormo, G.D. 2009. *An Introduction to Sequence Similarity UNIT 3.1 ("Homology") Searching*. Washington University: Wiley Interscience
7. Sukaryawan, M., 1998. *Konstruksi Koleksi Parsial Genom dan Urutan Nukleotida Sebagian Gen ruvB Salmonella Typhimurium* Bandung: ITB.
8. Thenawidjaja, M. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga
9. Watson, DJ., Tooze, J., Kurtz, DT. 1998. *DNA Recombinant*. Jakarta: Erlangga
10. Williams, R.J. 2003. *Restriction Endonucleases. Molecular Biotechnology, (23)*.
11. Winnacker, E.L. 1987. *From Gene to Clone*. New York: VCH.
12. Wirahadikusumah, M. 1985. *Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB

BAB 25 APLIKASI TEKNOLOGI DNA

1. ORIENTASI

Capaian Pembelajaran Mata Kuliah yang direncanakan adalah mahasiswa mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni (CPMK-4), sedangkan kemampuan akhir pada pokok bahasan ini adalah mahasiswa Mampu mengkaji implikasi Kloning dalam kehidupan sehari-hari (Sub-CPMK5). Pengalaman belajar yang diperoleh mahasiswa merencanakan, melaksanakan dan melaporkan proyek, presentasi tugas kelompok, mengerjakan lembar kerja mahasiswa, membuat dan mensubmit Laporan di <https://elearning.unsri.ac.id>

Kemajuan dalam teknologi DNA rekombinan telah terjadi secara paralel dengan perkembangan proses genetik dan variasi biologis. Perkembangan teknologi baru telah menghasilkan produksi sejumlah besar protein yang penting secara medis dan menciptakan potensi yang sangat besar untuk industri farmasi. Protein ekstra seluler kemungkinan besar untuk digunakan baik dalam terapi, maupun penggantian pengobatan. Adapun aplikasi teknologi DNA rekombinan yang telah dilakukan dan dimanfaatkan adalah sebagai berikut.

A. Aplikasi rDNA Dalam Pengobatan

Beberapa produk DNA rekombinan digunakan dalam terapi manusia: Dengan menggunakan prosedur seperti ini, banyak gen manusia telah dikloning dalam *E. coli* atau dalam ragi. Ini memungkinkan untuk pertama kalinya memproduksi protein manusia dalam jumlah tak terbatas secara *in vitro*. Sel yang dikultur (*E. coli*, ragi, sel mamalia) yang diubah dengan gen manusia digunakan untuk memproduksi.

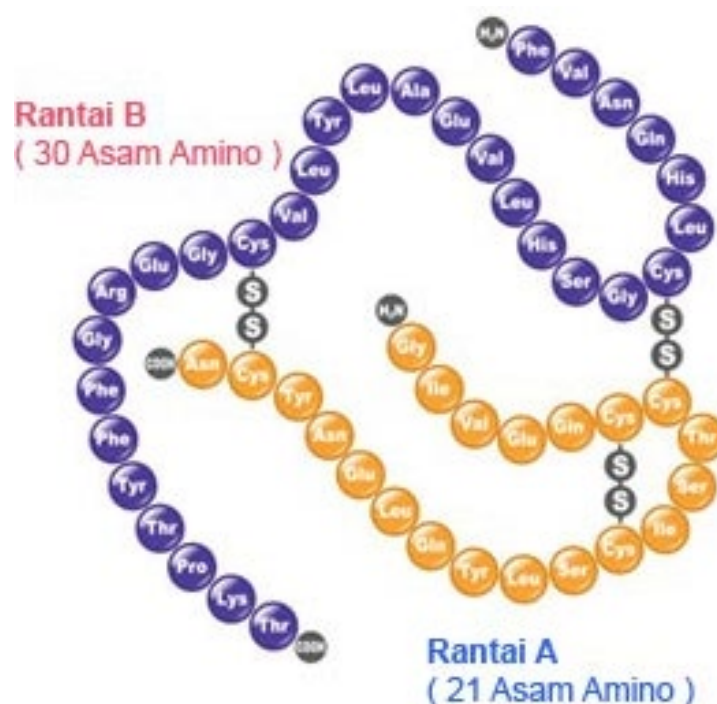
- Insulin untuk penderita diabetes
- Faktor VIII untuk laki-laki yang menderita hemofilia A

- Faktor IX untuk hemofilia B
- Hormon pertumbuhan manusia (GH)
- *Erythropoietin* (EPO) untuk mengobati anemia
- Tiga jenis interferon
- Beberapa interleukin
- *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) untuk merangsang sumsum tulang setelah transplantasi sumsum tulang
- Faktor perangsang koloni granulosit (G-CSF) untuk merangsang produksi neutrofil, misalnya, setelah kemoterapi dan untuk memobilisasi sel induk hematopoietik dari sumsum tulang ke dalam darah.
- *Tissue plasminogen activator* (TPA) untuk melarutkan bekuan darah
- *Adenosine deaminase* (ADA) untuk mengobati beberapa *severe combined immunodeficiency* (SCID)
- Angiostatin dan endostatin untuk uji coba sebagai obat anti kanker
- Hormon paratiroid
- Leptin
- Antigen permukaan hepatitis B (HBsAg) untuk memvaksinasi virus hepatitis B

Teknologi DNA Rekombinan dalam Sintesis Insulin Manusia

Sejak ditemukannya hormon insulin pada tahun 1921 pasien diabetes, yang kadar gulanya meningkat, disebabkan oleh gangguan produksi insulin, telah diobati dengan insulin yang berasal dari kelenjar pankreas hewan potong hewan. Hormon, yang diproduksi dan disekresikan oleh sel beta Langerhans pankreas, mengatur penggunaan dan penyimpanan makanan, terutama karbohidrat. Meskipun insulin sapi mirip dengan insulin manusia, komposisinya sedikit berbeda. Akibatnya, sejumlah sistem kekebalan pasien menghasilkan antibodi terhadapnya, menetralkan tindakannya dan menghasilkan respons inflamasi di tempat suntikan. Ditambah dengan efek buruk insulin sapi, ada kekhawatiran akan komplikasi jangka panjang yang terjadi dari penggunaan reguler. injeksi zat asing, serta proyeksi penurunan produksi insulin yang berasal dari hewan. Faktor-faktor ini mengarahkan para peneliti untuk mempertimbangkan mensintesis insulin dengan

memasukkan gen insulin ke dalam vektor yang sesuai, sel bakteri E. coli, untuk menghasilkan insulin yang secara kimiawi identik dengan rekan yang diproduksi secara alami. Ini telah dicapai dengan menggunakan teknologi DNA Rekombinan. Metode ini adalah metode yang lebih andal dan berkelanjutan daripada mengekstraksi dan memurnikan insulin dari hewan. Struktur Insulin secara kimiawi, adalah protein kecil dan sederhana. Ini terdiri dari 51 asam amino, 30 di antaranya merupakan satu rantai polipeptida, dan 21 di antaranya terdiri dari rantai kedua. Kedua rantai dihubungkan oleh ikatan disulfida.



Gambar 138 Insulin

Kode genetik untuk insulin ditemukan dalam DNA di bagian atas lengan pendek kromosom kesebelas. Ini mengandung 153 basa nitrogen (63 di rantai A dan 90 di rantai B). Sintesis protein tertentu seperti insulin ditentukan oleh urutan pengulangan basa ini.

Ketika bakteri bereproduksi, gen insulin direplikasi bersama dengan plasmid, bagian melingkar DNA. E. coli menghasilkan enzim yang dengan cepat mendegradasi protein asing seperti insulin. Dengan menggunakan galur mutan

yang kekurangan enzim ini, masalah dapat dihindari. Sejak insulin sapi dihapus, dan sebagian besar pasien yang bergantung pada insulin sekarang diobati dengan insulin manusia rekombinan yang direkayasa secara genetik, dokter dan pasien menjadi khawatir tentang peningkatan jumlah hipoglikemik. Meskipun hipoglikemia kadang-kadang dapat terjadi dengan semua jenis insulin, beberapa orang dengan diabetes mengklaim bahwa mereka kurang menyadari serangan hipoglikemia sejak beralih dari insulin hewani ke insulin manusia DNA Rekombinan.

B. Aplikasi rDNA Dalam Ilmu Forensik

Aplikasi biokimia di pusat forensik sebagian besar pada kemampuan analisis DNA untuk mengidentifikasi individu dari rambut, jenis darah dan barang-barang lain yang ditemukan dari tempat kejadian perkara (TKP). Di media populer, teknik ini disebut sidik jari genetik, meskipun istilah yang lebih akurat untuk prosedur yang digunakan saat ini adalah pembuatan profil DNA. Selain identifikasi penjahat, profil DNA juga dapat digunakan untuk menyimpulkan jika dua atau lebih individu adalah anggota dari keluarga yang sama. Jenis studi ini disebut analisis kekerabatan dan aplikasi utamanya sehari-hari adalah dalam pengujian paternitas.

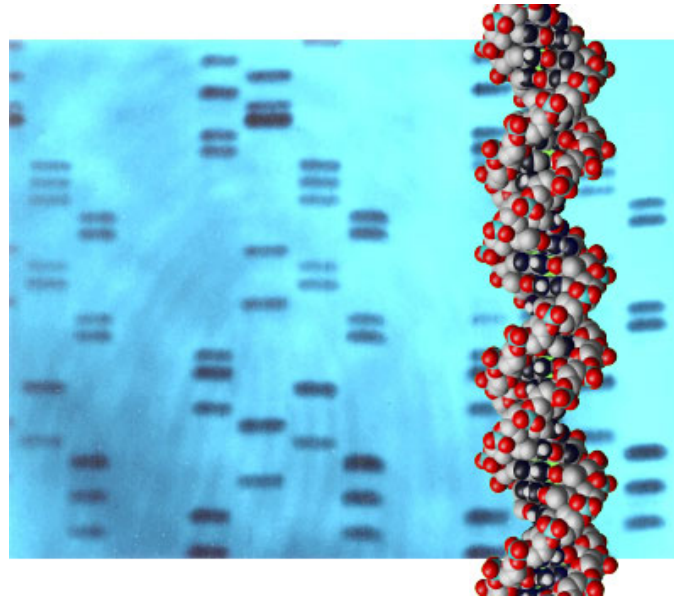
1) Analisis DNA dalam Identifikasi Tersangka Kejahatan

Tidak mungkin seseorang melakukan kejahatan tanpa meninggalkan jejak DNA-nya. Rambut, bercak darah dan bahkan sidik jari konvensional mengandung jejak DNA, cukup untuk dideteksi dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Analisis profil DNA tidak saja dilakukan pada perkara yang baru, dalam beberapa tahun terakhir sejumlah kejahatan masa lalu telah dipecahkan dan pelakunya dibawa ke pengadilan karena tes DNA yang telah dilakukan pada sampelnya. Dasar dari sidik jari genetik dan profil DNA adalah kembar identik adalah satu-satunya individu yang memiliki salinan identik dari genom manusia. Genom manusia kurang lebih sama pada setiap orang, gen yang sama akan berada dalam urutan yang sama dengan bentangan DNA

intergenik yang sama di antara mereka. Tetapi genom manusia, serta organisme lain, mengandung polimorfisme, posisi di mana urutan nukleotida tidak sama di setiap anggota populasi. Sisi polimorfik yang digunakan sebagai penanda DNA dalam pemetaan genom meliputi *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs), *short tandem repeats* (STR) dan *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Ketiganya dapat terjadi di dalam gen maupun di daerah intergenik, dan secara keseluruhan ada beberapa juta polimer dalam genom manusia, dengan SNP sebagai yang paling umum.

2) Sidik Jari Genetik dengan Penyelidikan Hibridisasi

Ini adalah metode pertama untuk menggunakan analisis DNA untuk mengidentifikasi individu. Teknik ini tidak didasarkan pada salah satu jenis sisi polimorfik, tetapi pada jenis variasi yang berbeda dalam genom manusia yang disebut sekuens berulang yang tersebar variabel hiper. Seperti namanya, ini adalah urutan berulang yang terjadi di berbagai tempat (tersebar) dalam genom manusia. Kunci utama dari sekuens ini adalah bahwa posisi genomiknya bervariasi: mereka terletak pada posisi yang berbeda dalam genom orang yang berbeda. Untuk menyiapkan sidik jari, sampel DNA dipotong dengan enzim restriksi endonuclease, dan fragmen dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa dan *Southern blot* disiapkan. Hibridisasi ke blot dari probe berlabel yang berisi urutan pengulangan mengungkapkan serangkaian pita yang masing-masing mewakili fragmen restriksi yang berisi pengulangan. Karena tempat penyisipan dari urutan berulang bervariasi, prosedur yang sama yang dilakukan dengan sampel DNA dari orang kedua akan memberikan pola pita yang berbeda. Inilah adalah sidik jari genetik untuk orang-orang tersebut.



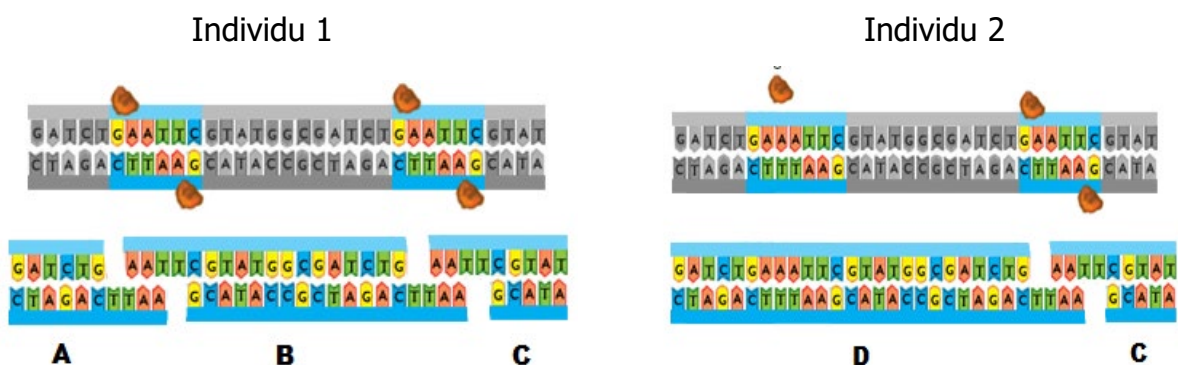
Gambar 139 Fragmen DNA menunjukkan pola unik dari satu orang ke orang berikutnya.

a) Menyiapkan Sidik Jari DNA

Koleksi Spesimen: Bisa berupa amplop yang dijilat, cucian kotor, puntung rokok, air liur. Tindakan pencegahan khusus dalam menangani spesimen: sarung tangan, instrumen sekali pakai, hindari berbicara dan bersin, hindari menyentuh sampel dengan kulit anda, keringkan barang bukti sebelum dikemas agar jamur tidak tumbuh. Sampel ideal: 1 mL darah segar utuh (sel darah putih) yang ditreatmen dengan EDTA.

b) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

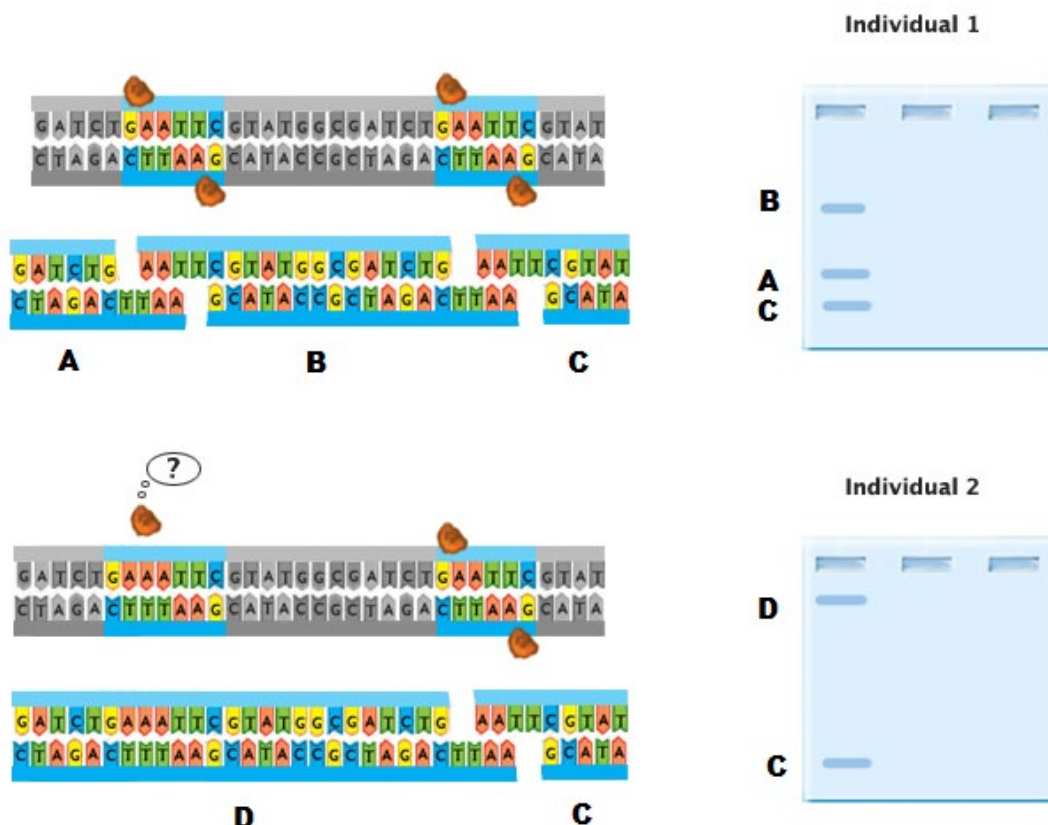
Variasi sekuens nukleotida di suatu wilayah DNA yang menghasilkan perbedaan panjang fragmen sesuai dengan ada tidaknya sisi pengenalan enzim restriksi.



Gambar 140 Restriction Fragment Length Polymorphism

Pada gambar di atas *Restriction Fragment Length Polymorphism*, atau disingkat RFLP, dihasilkan karena mutasi di sisi pengenalan. Ini adalah urutan nukleotida spesifik yang dikenali oleh enzim restriksi. Enzim restriksi mengikat DNA dan memotong di dalam sisi pengenalan. Jika urutan nukleotida telah bermutasi, maka enzim restriksi tidak akan mengikat dan karena itu tidak akan memotong di sisi itu. Seperti yang ditunjukkan contoh ini, perubahan pada sisi pengenalan akan menghasilkan fragmen panjang yang berbeda dalam restriksi. Satu individu memiliki dua sisi restriksi untuk enzim *EcoRI*. Itu berarti *EcoRI* akan memotong fragmen DNA ini dua kali. Dua pemotongan menghasilkan tiga fragmen yang diberi label di sini sebagai A, B, dan C. Pada individu 2 sisi pengenalan pertama tidak ada. Enzim restriksi *EcoRI*, hanya akan memotong satu kali dan menghasilkan dua fragmen, D dan C.

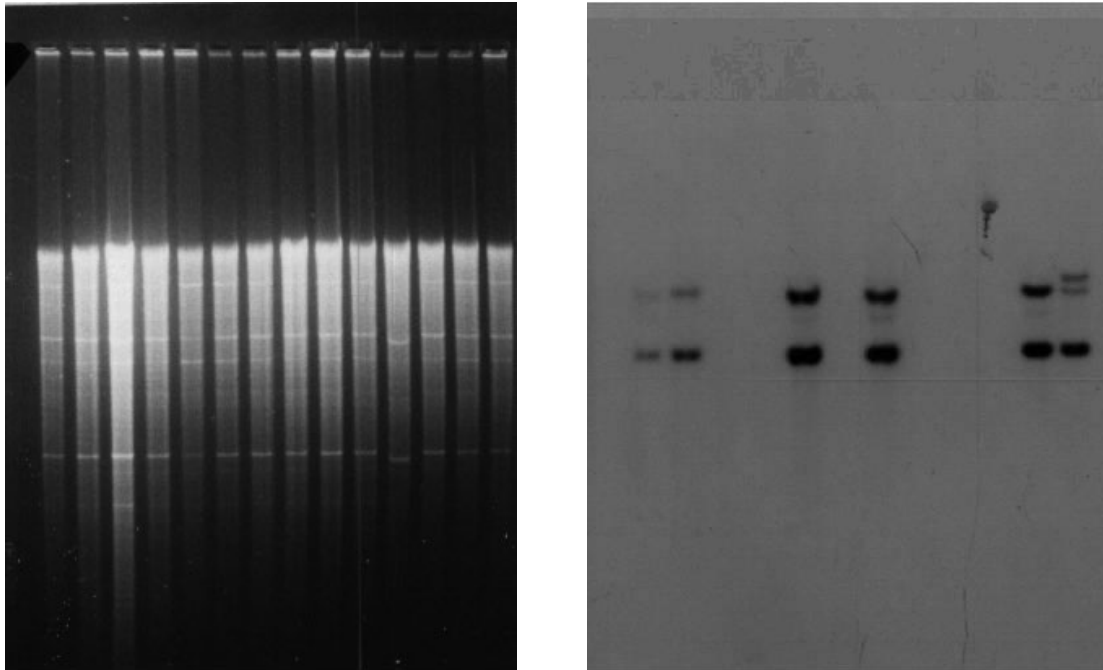
Fragmen RFLP dapat dipisahkan dengan elektroforesis gel.



Gambar 141 Animasi RFLP

c) Southern Blot

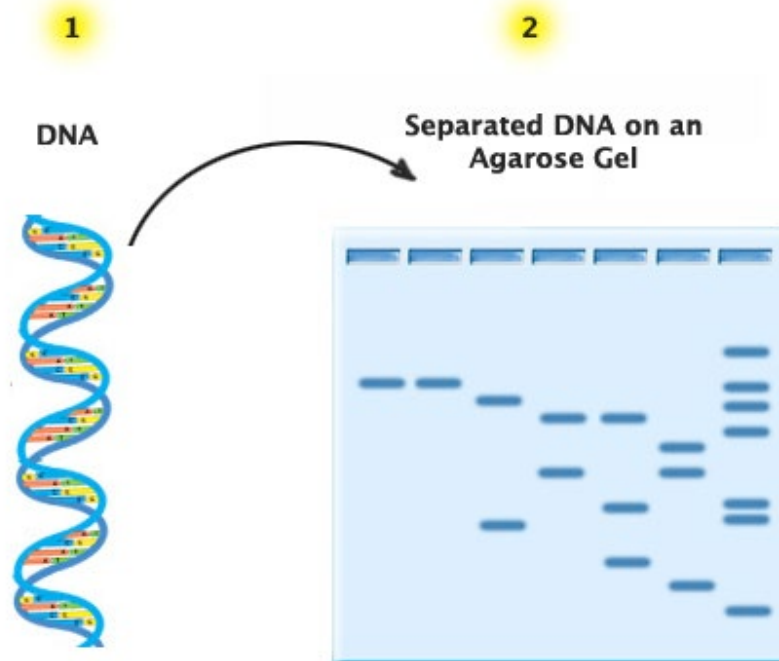
Teknik molekuler di mana DNA ditransfer ke membran dari gel agarosa dan probe dihibridisasi.



Gambar 142 Southern Blot

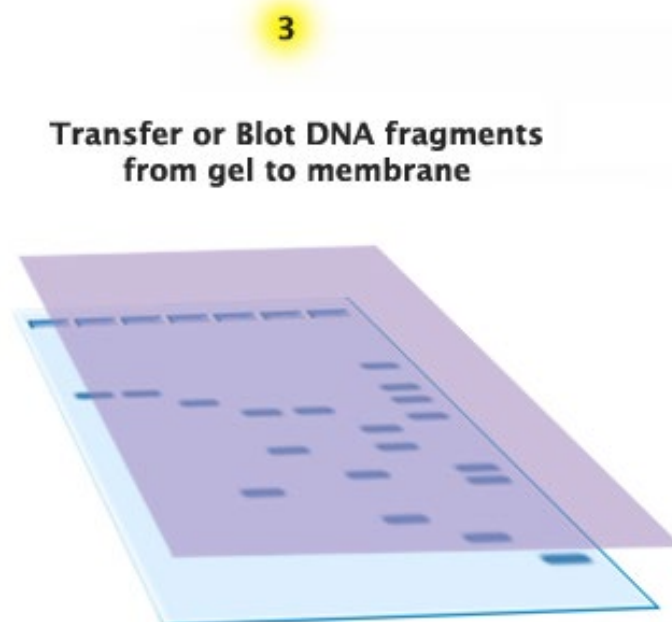
Salah satu cara untuk mendapatkan DNA yang permanen menggunakan restriksi yang dapat diuji dan dimanipulasi, adalah dengan mentransfer DNA ke dalam membran nilon, disebut sebagai "*Southern Blot*". DNA genomik manusia adalah 3 miliar pasangan basa dan berisi ribuan sisi pengenalan untuk enzim restriksi. Ketika DNA genom manusia dipotong dengan enzim restriksi dan dijalankan pada gel agarosa, biasanya melihat noda seperti gambar di sebelah kiri. Kemudian mentransfer DNA ini ke membran nilon memungkinkan peneliti untuk menghibridisasi probe tertentu untuk menghasilkan gambar seperti yang ada di sebelah kanan. Gambar ini jauh lebih jelas dan lebih informatif.

Langkah pertama dalam mempersiapkan *Southern Blot* adalah memotong DNA genom dan dijalankan pada gel agarosa.



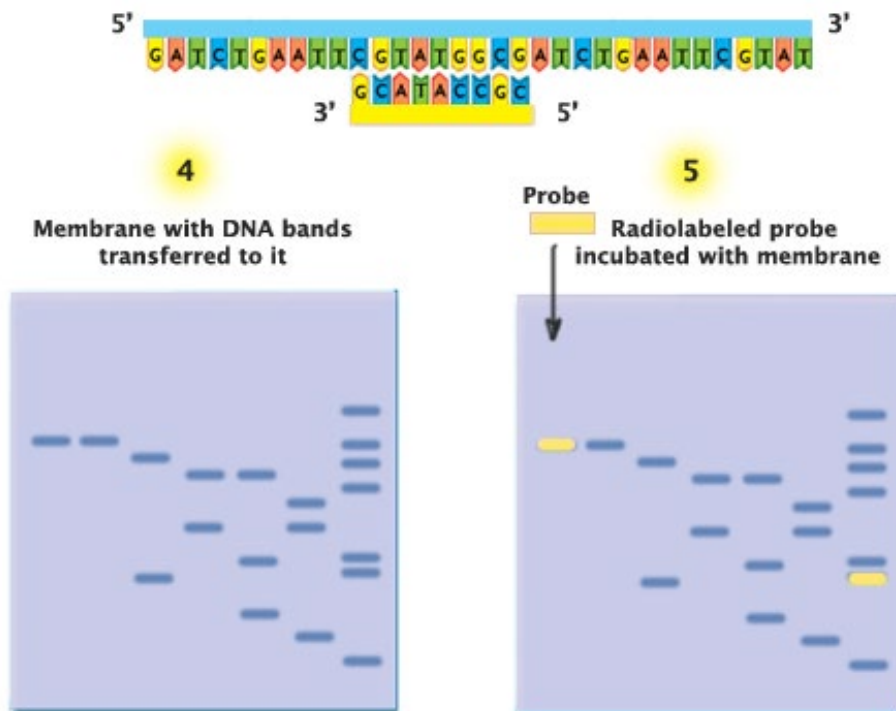
Gambar 143 Pemisahan dengan gel agarose

Langkah selanjutnya adalah mentransfer fragmen DNA beruntai tunggal ke membran nilon.



Gambar 144 Transfer DNA ke membrane nilon

Langkah selanjutnya adalah menghibridisasi probe DNA berlabel radioaktif ke urutan spesifik pada membran.

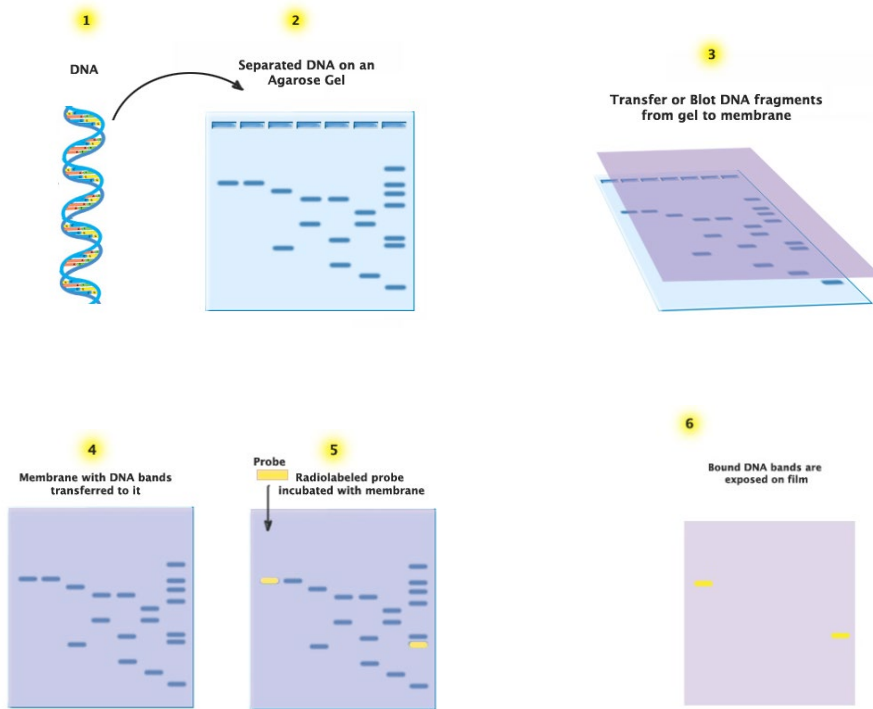


Gambar 145 hibridisasi probe DNA berlabel ke membrane

Langkah terakhir adalah mengekspos membran berlabel radioaktif ke selebar film besar. Anda hanya akan memvisualisasikan pita di mana probe dihibridisasi dengan DNA.

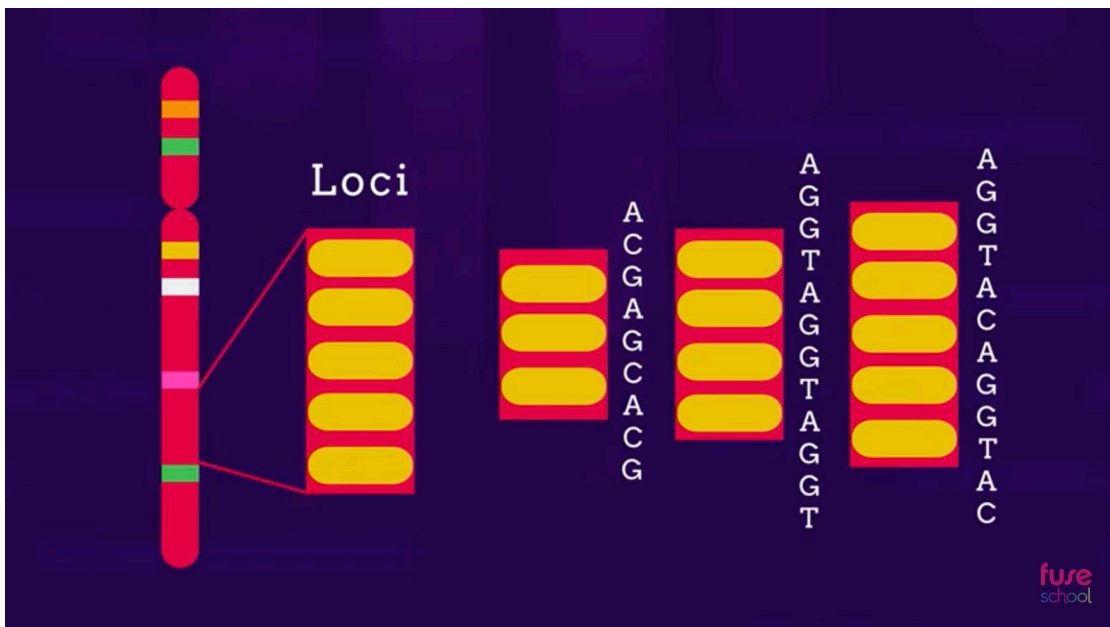


Gambar 146 Visualisasi pita DNA pada lembaran film.



Gambar 147 Southern Blot

Selanjutnya animasi DNA fingerprinting dapat di lihat pada video berikut ini.

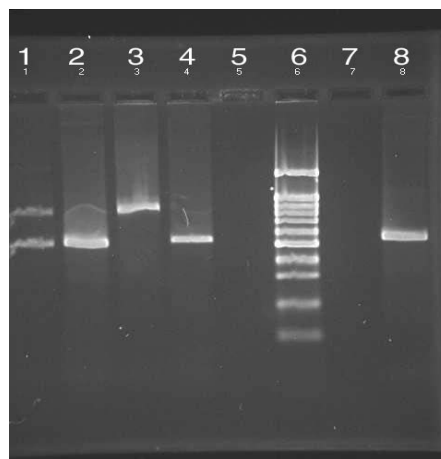


Gambar 148 DNA Fingerprinting
 Sumber: <https://youtu.be/7onjVBsQwQ8>

3) Profil DNA Dengan PCR dari Pengulangan Tandem Pendek:

Teknik yang lebih kuat dari profil DNA menghindari keterbatasan analisis hibridisasi dari urutan pengulangan yang tersebar. Pembuatan profil menggunakan rangkaian polimorfik yang disebut STRs (*Polymorphic sequences*). STR adalah urutan pendek, satu hingga 13 nukleotida panjangnya yang diulang beberapa kali dalam susunan tandem. Dalam genom manusia, jenis STR yang paling umum adalah pengulangan dinukleotida [CA] $_n$ di mana 'n', jumlah pengulangan, biasanya antara 5 dan 20. Jumlah pengulangan dalam STR tertentu adalah variabel karena pengulangan dapat ditambahkan atau, dihilangkan oleh kesalahan yang terjadi selama replikasi DNA.

Dalam populasi secara keseluruhan, mungkin ada sebanyak sepuluh versi berbeda dari STR tertentu, masing-masing alel dicirikan oleh jumlah pengulangan yang berbeda. Dalam pembuatan profil DNA, alel dari sejumlah STR yang berbeda ditentukan. Ini dapat dicapai dengan cepat dan dengan jumlah DNA yang sangat kecil dengan PCR dengan primer yang menyatu dengan sekuens DNA di kedua sisi pengulangan. Setelah PCR, produk diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa dengan ukuran pita atau pita yang menunjukkan alel atau alel yang ada dalam sampel DNA yang telah diuji. Dua alel STR diperoleh dalam satu sampel DNA karena ada dua salinan dari setiap STR, satu pada kromosom yang diwarisi dari ibu dan satu pada kromosom dari ayah. Karena PCR digunakan, pembuatan profil DNA sangat sensitif dan memungkinkan hasil yang diperoleh dengan rambut dan spesimen lain yang hanya berisi sejumlah kecil DNA. Hasilnya tidak ambigu, dan kecocokan antara profil DNA biasanya diterima sebagai bukti dalam persidangan.



Gambar 149 PCR

4) Mempelajari Kekerabatan dengan Pembuatan Profil DNA

Individu Terkait Memiliki Profil DNA yang Mirip: Profil DNA seperti semua aspek lain dari genom diwarisi sebagian dari ibu dan sebagian dari ayah. Oleh karena itu, hubungan dalam sebuah keluarga menjadi jelas ketika alel dari STR tertentu ditandai pada silsilah keluarga. Dalam contoh ini, kita melihat bahwa tiga dari empat anak mewarisi alel 12-ulang dari sang ayah. Pengamatan ini sendiri tidak cukup untuk menyimpulkan bahwa ketiga anak ini adalah saudara kandung, meskipun peluang statistiknya akan cukup tinggi jika alel ulangan 12 tidak umum dalam populasi secara keseluruhan. Untuk meningkatkan derajat kepastian, lebih banyak STR harus dibuat, seperti halnya identifikasi individu, analisisnya tidak perlu terus-menerus, karena perbandingan sembilan STR memberikan probabilitas yang dapat diterima hubungan-hubungan yang diamati secara nyata.

C. Aplikasi Bidang Pertanian

Semua organisme hidup memiliki kemampuan untuk memperbaiki diri melalui cara-cara alami untuk beradaptasi dengan perubahan kondisi lingkungan. Namun, dibutuhkan ratusan tahun sebelum perbaikan terdeteksi diperoleh. Manusia kemudian belajar bagaimana memelihara dan membiakkan tanaman untuk mengembangkan tanaman sesuai dengan keinginan dan kebutuhannya sendiri dengan menggunakan berbagai cara termasuk bioteknologi.

Bioteknologi didefinisikan sebagai seperangkat alat yang menggunakan organisme hidup (atau bagian dari organisme) untuk membuat atau memodifikasi produk, meningkatkan tanaman, pohon atau hewan, atau mengembangkan mikroorganisme untuk penggunaan tertentu. Bioteknologi pertanian adalah istilah yang digunakan dalam perbaikan tanaman dan ternak melalui alat-alat bioteknologi. Bioteknologi mencakup sejumlah alat dan elemen teknik pemuliaan konvensional, bioinformatika, mikrobiologi, genetika molekuler, biokimia, fisiologi tanaman, dan biologi molekuler.

Bioteknologi yang penting dalam pertanian antara lain:

- Pemuliaan tanaman konvensional
- Kultur jaringan dan mikropropagasi

- Pemuliaan molekuler atau seleksi dengan bantuan penanda
- Tanaman Rekayasa Genetika (RG)
- Alat Diagnostik Molekuler

Sesuai dengan judul di atas maka pada bagian ini hanya akan dibahas tanaman rekayasa genetika (RG).

1) Tanaman Rekayasa Genetika (RG)

Selama 30 tahun terakhir, bidang bioteknologi pertanian telah berkembang pesat karena pemahaman yang lebih besar tentang DNA. Rekayasa genetika merupakan salah satu alat bioteknologi pertanian modern yang didasarkan pada teknologi DNA rekombinan. Istilah rekayasa genetika, sering dipertukarkan dengan istilah seperti teknologi gen, modifikasi genetik, atau manipulasi gen, digunakan untuk menggambarkan proses di mana susunan genetik suatu organisme dapat diubah menggunakan "teknologi DNA rekombinan." Ini melibatkan penggunaan alat laboratorium dan enzim khusus untuk memotong, menyisipkan, dan mengubah potongan DNA yang mengandung satu atau lebih gen yang diinginkan. Kemampuan untuk memanipulasi gen individu dan mentransfer gen antar spesies yang akan tidak mudah pada kawin silang, inilah yang membedakan rekayasa genetika dari pemuliaan tanaman tradisional.

Dengan pemuliaan tanaman konvensional, ada sedikit atau tidak ada jaminan untuk mendapatkan kombinasi gen tertentu dari jutaan persilangan yang dihasilkan. Gen yang tidak diinginkan dapat ditransfer bersama dengan gen yang diinginkan atau ketika satu gen yang diinginkan diperoleh, yang lain hilang karena gen dari kedua orang tua dicampur bersama dan diurutkan kembali lebih banyak atau kurang acak pada keturunannya. Sebaliknya, rekayasa genetika memungkinkan transfer langsung dari satu atau hanya beberapa gen, antara organisme yang berkerabat dekat atau jauh. Tidak semua teknik rekayasa genetika melibatkan penyisipan DNA dari organisme lain. Tanaman juga dapat dimodifikasi dengan menghilangkan atau mematikan gen tertentu dan kontrol genetik (promotor).

Teknik rekayasa genetika hanya digunakan ketika: 1) sifat yang akan diperkenalkan tidak ada di plasma nutfah tanaman; 2) sifat tersebut sangat sulit untuk diperbaiki dengan cara konvensional metode pemuliaan; dan 3) akan membutuhkan waktu yang sangat lama untuk memperkenalkan dan/atau memperbaiki sifat tersebut pada tanaman dengan metode pemuliaan konvensional. Pemuliaan tanaman modern adalah proses multidisiplin dan terkoordinasi di mana: sejumlah besar alat dan elemen teknik pemuliaan konvensional, bioinformatika, biokimia, genetika molekuler, biologi molekuler dan genetika rekayasa dimanfaatkan dan terintegrasi.

2) Pengembangan tanaman transgenik

Meskipun ada banyak teknik yang beragam dan kompleks yang terlibat dalam Teknik genetika, prinsip dasarnya cukup sederhana. Namun, sangat penting untuk mengetahui mekanisme aksi biokimia dan fisiologis, regulasi ekspresi gen dan keamanan gen dan produk gen yang akan dimanfaatkan. Proses rekayasa genetika membutuhkan beberapa Langkah sebagai berikut.

Langkah 1. Ekstraksi asam nukleat (DNA/RNA)

Ekstraksi asam nukleat, baik DNA atau asam ribonukleat (RNA) adalah langkah pertama dalam proses rekayasa genetika. Oleh karena itu penting bahwa metode yang dapat diandalkan tersedia untuk mengisolasi komponen ini dari sel. Dalam isolasi prosedur apapun, langkah awal adalah gangguan sel organisme yang diinginkan, yang mungkin virus, bakteri atau sel tumbuhan, untuk mengekstrak asam nukleat. Setelah serangkaian langkah kimia dan biokimia, asam nukleat yang diekstraksi dapat diendapkan untuk membentuk pelet DNA/RNA seperti benang.

Langkah 2. Kloning gen

Langkah kedua adalah kloning gen. Pada dasarnya ada empat tahap dalam setiap cloning eksperimen: pemurnian fragmen DNA, bergabung ke vektor, propagasi di sel inang, dan pemilihan urutan yang diperlukan (seleksi). Dalam ekstraksi DNA, semua DNA dari organisme yang diinginkan diekstraksi. DNA genomik ini diperlakukan dengan spesifik enzim yang disebut enzim restriksi memotongnya

menjadi fragmen yang lebih kecil dengan ujungnya untuk memungkinkannya dikloning menjadi vektor bakteri. Salinan vektor kemudian akan menampung banyak sisipan genom yang berbeda. Vektor-vektor ini diubah menjadi sel bakteri dan ribuan salinan diproduksi. Menggunakan informasi yang berkaitan dengan urutan penanda molekuler tertentu dan fenotipe yang diinginkan, vektor yang menyimpan urutan yang diinginkan dideteksi, dipilih, diisolasi dan klon diproduksi. Enzim restriksi sekali lagi digunakan untuk menentukan apakah sisipan gen yang diinginkan telah dikloning secara lengkap dan benar.

Langkah 3. Desain dan Pengemasan Gen

Setelah gen yang diinginkan telah dikloning, gen tersebut harus dihubungkan dengan potongan DNA yang akan mengontrol ekspresinya di dalam sel tanaman. Potongan DNA ini akan menghidupkan (promotor) dan mematikan (terminator) ekspresi gen yang disisipkan. Perancangan/pengemasan gen dapat dilakukan dengan mengganti promotor yang ada dengan yang baru, memasukkan gen penanda dan gen reporter yang dapat dipilih, menambahkan fragmen penambah gen, intron, dan sekuens pelokalan organel.

Promotor memungkinkan ekspresi gen yang berbeda. Misalnya beberapa promotor menyebabkan gen yang disisipkan diekspresikan sepanjang waktu, di semua bagian tanaman (konstitutif) sedangkan yang lain memungkinkan ekspresi hanya pada tahap pertumbuhan tanaman tertentu, dalam jaringan tanaman tertentu, atau sebagai respons terhadap sinyal lingkungan eksternal. Jumlah produk gen yang akan diekspresikan juga dikendalikan oleh promotor. Beberapa promotor lemah, sedangkan yang lain kuat. Mengontrol ekspresi gen merupakan keuntungan dalam mengembangkan tanaman RG.

Gen penanda yang dapat dipilih biasanya terkait dengan gen yang menarik untuk memfasilitasi pendeteksiannya di dalam jaringan tanaman. Hal ini memungkinkan pemilihan sel yang telah berhasil digabungkan dengan gen yang diinginkan, dengan demikian menghemat biaya dan usaha yang cukup besar. Peneliti menggunakan resistensi antibiotik dan gen penanda resistensi herbisida

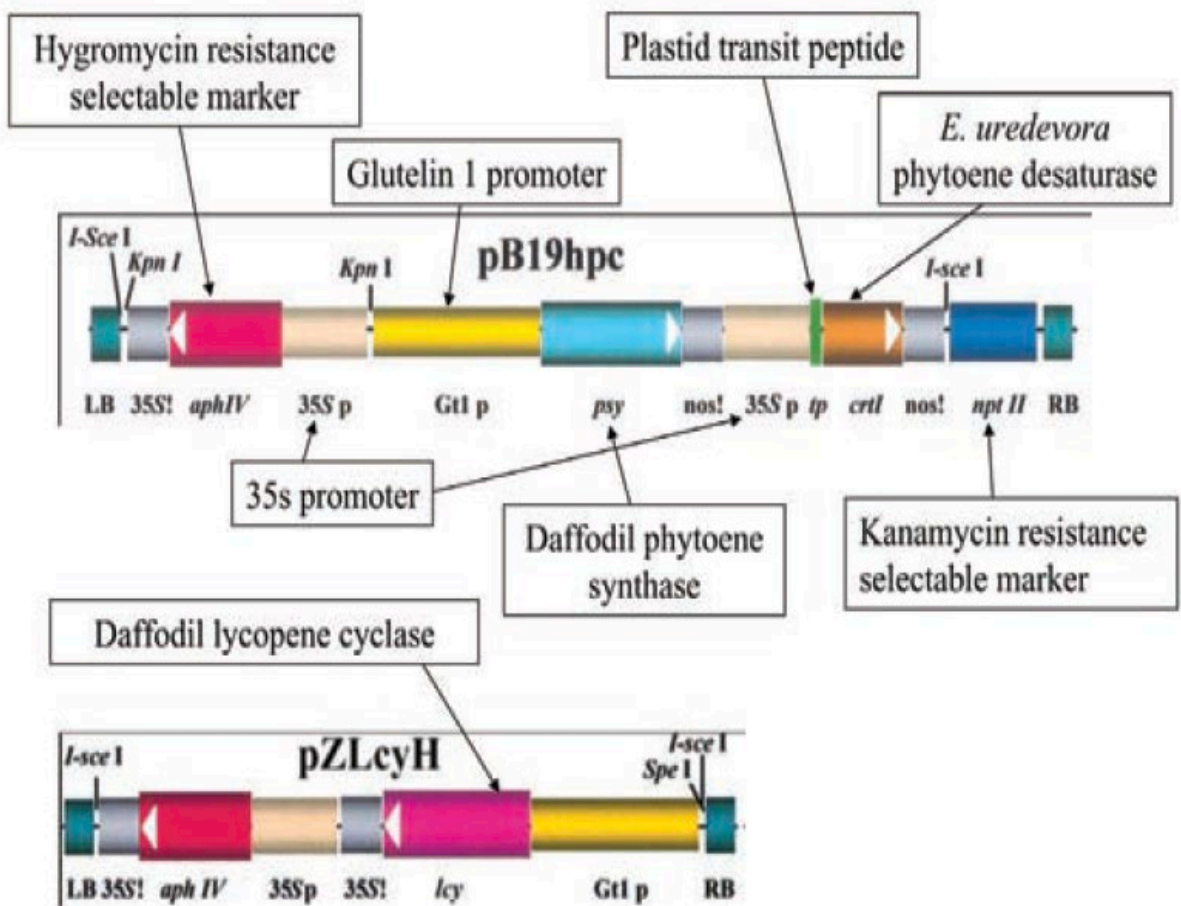
terhadap mendeteksi sel yang mengandung gen yang disisipkan. Sel yang bertahan dari penambahan agen penanda ke media pertumbuhan menunjukkan adanya gen yang disisipkan. Meskipun peningkatan resistensi antibiotik pada manusia dan hewan tidak mungkin terjadi dengan menggunakan penanda resistensi antibiotik, gen yang mengkode resistensi terhadap antibiotik non medis lebih disukai. Selain itu, telah dikembangkan jenis alternatif gen penanda yang terkait dengan metabolisme tanaman seperti fosfomannosa isomerase, xilosa isomerase dan lain-lain.

Gen reporter diklon ke dalam vektor di dekat gen yang diinginkan, untuk memfasilitasi identifikasi sel yang diubah serta untuk menentukan ekspresi yang benar dari gen yang disisipkan. Gen reporter yang telah digunakan meliputi: gen beta glukuronidase (gen *gusA*) yang bekerja pada substrat tertentu yang menghasilkan produk biru, sehingga membuat sel yang ditransformasi menjadi biru; protein fluorescent hijau (*gfp*) yang memungkinkan sel-sel yang berubah bersinar di bawah lampu hijau; dan gen luciferase yang memungkinkan sel bersinar dalam gelap.

Beberapa urutan genetik juga dapat diklon di depan urutan promotor (peningkat) atau di dalam urutan genetik itu sendiri (intron, atau urutan non-coding) untuk mempromosikan ekspresi gen. Contohnya adalah kloning dari promotor virus mosaik kembang kol di depan promotor tanaman. Setelah gen yang diinginkan dikemas bersama dengan promotor, reporter, dan gen penanda, gen tersebut kemudian dimasukkan ke dalam bakteri untuk memungkinkan pembuatan banyak salinan paket gen. DNA yang diisolasi dari klon bakteri kemudian dapat digunakan untuk transformasi sel tanaman menggunakan bombardir partikel. Namun, jika penggunaan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* lebih disukai dalam transformasi tanaman, seluruh paket gen harus diklon di antara dua sekuens perbatasan (batas kiri dan kanan) dari plasmid vektor biner. Ini akan memungkinkan pemrosesan *Agrobacterium* sehingga hanya DNA transfer (T-DNA) yang akan dimasukkan ke dalam genom tanaman.

Langkah 4. Transformasi

Metode yang paling umum digunakan untuk memasukkan paket gen ke dalam sel tanaman dalam proses yang disebut transformasi atau penyisipan gen, termasuk transformasi biolistik menggunakan senjata gen dan transformasi yang dimediasi *Agrobacterium*.



Gambar 150 Komponen konstruksi gen yang digunakan dalam pengembangan Beras Emas

a) Transformasi Biolistik

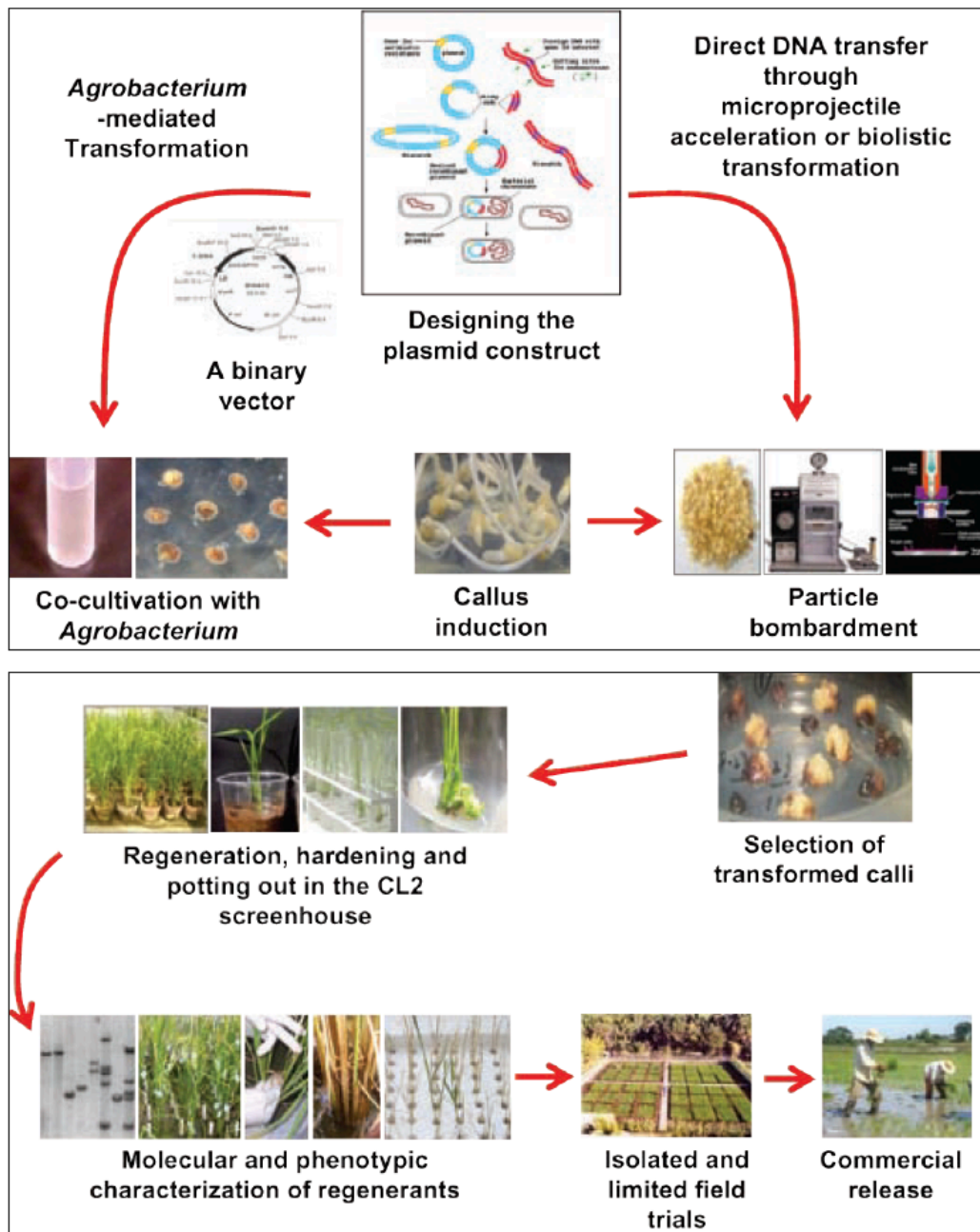
Pengeboman partikel adalah metode mekanis untuk memperkenalkan gen yang diinginkan. Urutan genetik yang diinginkan dikloning ke dalam vektor DNA tanaman dan dimasukkan ke dalam tanaman menggunakan pistol gen atau pistol partikel. Seperti pada senjata biasa, senjata gen menggunakan partikel kecil tungsten atau emas sebagai pelurunya. Partikel-partikel ini dilapisi dengan larutan

DNA dan ditembakkan ke sel tumbuhan melalui kekuatan gas Helium di dalam ruang hampa udara. DNA dan partikel tungsten/emas masuk ke dalam sel, dan dalam waktu 12 jam, DNA yang dimasukkan masuk ke dalam nukleus dan terintegrasi dengan DNA tanaman. Partikel tungsten/emas diasingkan ke vakuola dan kemudian dihilangkan. Sel-sel yang diubah dikultur secara in vitro dan diinduksi untuk membentuk tanaman kecil (regenerasi) yang mengekspresikan gen yang disisipkan.

b) Transformasi yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens, bakteri tanah yang dikenal sebagai 'perekayasa genetika alam sendiri', memiliki kemampuan alami untuk merekayasa genetika tanaman. Ini menyebabkan penyakit empedu mahkota di berbagai tanaman berdaun lebar, seperti apel, pir, persik, ceri, almond, raspberry dan mawar. Penyakit ini mendapatkan namanya dari pembengkakan besar seperti tumor (empedu) yang biasanya terjadi di ubun-ubun tanaman, tepat di atas permukaan tanah. Pada dasarnya, bakteri mentransfer sebagian DNA-nya ke tanaman, dan DNA ini berintegrasi ke dalam genom tanaman, menyebabkan produksi tumor dan perubahan terkait dalam metabolisme tanaman. Peneliti telah memanfaatkan mekanisme biologis ini untuk meningkatkan hasil panen. Gen yang menyebabkan penyakit empedu dihilangkan dan diganti dengan gen yang mengkode sifat yang diinginkan. Sel tumbuhan yang terinfeksi bakteri tersebut tidak akan membentuk empedu, tetapi menghasilkan sel yang mengandung gen yang diinginkan, yang bila dikulturkan dalam media khusus akan beregenerasi menjadi tumbuhan dan mewujudkan sifat yang diinginkan.

Tujuan utama dalam setiap prosedur transformasi adalah untuk memasukkan gen yang diinginkan ke dalam inti sel tanpa mempengaruhi kemampuan sel untuk bertahan hidup. Jika gen yang diperkenalkan berfungsi, dan produk gen disintesis, maka tanaman tersebut dikatakan mengalami transformasi. Setelah gen yang disisipkan stabil, diwariskan dan diekspresikan pada generasi berikutnya, maka tanaman tersebut dianggap transgenik.



Gambar 151 Metode transformasi genetik (Biolistik atau *Gene Gun* dan metode transformasi yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens*)

Langkah 5. Deteksi Gen yang Disisipkan

Metode deteksi molekuler telah dikembangkan untuk menentukan integritas transgen (gen introduksi) ke dalam sel tanaman. Reaksi berantai polimerase atau PCR adalah uji cepat untuk menentukan apakah sel atau tanaman transgenik yang diregenerasi mengandung gen tersebut. Ini menggunakan satu set primer (Fragmen DNA), primer maju dan mundur, yang urutan nukleotidanya didasarkan pada urutan gen yang disisipkan. Primer dan nukleotida tunggal diinkubasi dengan

DNA genom untai tunggal dan beberapa siklus amplifikasi DNA dilakukan dalam mesin PCR. Analisis produk PCR dalam gel agarosa akan menunjukkan jika tanaman benar-benar berubah ketika fragmen DNA yang ukurannya setara dengan gen yang disisipkan ada dan diamplifikasi.

Analisis *Southern blot* menentukan integritas gen yang dimasukkan: apakah gen tersebut lengkap dan tidak terfragmentasi, pada orientasi yang benar, dan dengan satu nomor salinan. Urutan pengkodean DNA adalah *probe* yang mengikat DNA genom untai tunggal dari tanaman transgenik yang ditransfer pada kertas nitroselulosa. Autoradiografi akan mengungkapkan status transgenik tanaman. Satu salinan transgen diinginkan untuk ekspresi optimal.

Analisis *Northern blot* menentukan apakah transkrip atau RNA pembawa pesan (mRNA) dari DNA yang diperkenalkan ada dan ditranskripsikan dengan benar di tanaman transgenik. Messenger RNA dari tanaman transgenik diisolasi dan diproses untuk berikatan dengan membran nitroselulosa. DNA berlabel digunakan untuk mengikat mRNA dan dapat divisualisasikan melalui autoradiografi.

Analisis *Western blot* atau protein *immuno blotting* adalah teknik analisis yang digunakan untuk mendeteksi apakah tanaman transgenik menghasilkan produk protein spesifik dari gen yang diinginkan. Sampel protein diekstraksi dari tanaman transgenik, diproses menjadi protein terdenaturasi dan dipindahkan ke membran nitroselulosa. Protein kemudian diperiksa atau dideteksi menggunakan antibodi spesifik terhadap protein target.

Langkah 6. Backcross Breeding (jika diperlukan)

Transformasi genetik biasanya dilakukan pada varietas elit atau komersial yang sudah memiliki sifat agronomis yang diinginkan tetapi tidak memiliki sifat penting dari transgen. Dengan demikian, setelah berhasil dilakukan, tanaman rekayasa genetika akan mudah direkomendasikan untuk komersialisasi jika menunjukkan stabilitas dalam beberapa generasi dan setelah berhasil melewati dan memenuhi persyaratan pendaftaran varietas. Beberapa transformasi tanaman

mungkin telah dilakukan pada varietas tanaman yang dapat menerima transformasi genetik tetapi tidak beradaptasi. Mungkin juga ada masalah kemandulan pada tanaman transgenik. Dalam kasus tersebut, pemuliaan tanaman konvensional dilakukan di mana tanaman transgenik menjadi sumber serbuk sari dalam program pemuliaan dan galur elit atau varietas komersial sebagai induknya. Pemuliaan silang balik memungkinkan kombinasi sifat yang diinginkan dari induknya dan garis transgenik pada keturunannya. Lamanya waktu dalam mengembangkan tanaman transgenik tergantung pada gen, spesies tanaman, sumber daya yang tersedia dan persetujuan peraturan. Ini bervariasi dari 6 hingga 15 tahun sebelum tanaman transgenik atau hibrida baru siap untuk rilis komersial.

Dengan rekayasa genetika, lebih dari satu sifat dapat dimasukkan ke dalam tanaman dan disebut sifat gabungan. Saat ini adalah tanaman jagung, kapas, dan kedelai dengan herbisida dan sifat toleransi serangga. Tanaman transgenik dengan sifat gabungan juga tersedia secara komersial seperti jagung toleran herbisida dan tahan serangga. Penumpukan gen yang berbeda untuk satu sifat membuat tanaman lebih tahan terhadap hama/penyakit dan mentolerir lebih banyak herbisida. Strategi lain untuk meningkatkan keberlanjutan teknologi adalah penggunaan tempat perlindungan. Pengembang teknologi telah mempelajari sistem perlindungan yang efektif untuk peristiwa transformasi tertentu. Ini didiskusikan secara ekstensif dengan petani untuk implementasi yang tepat, dan dipantau secara teratur untuk mengamati serangga atau gulma yang resisten.

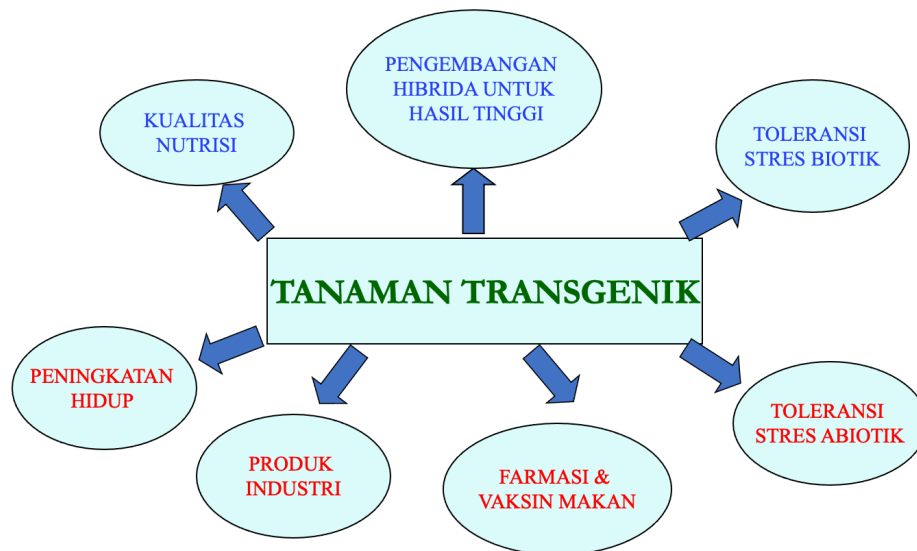
c) Inisiatif baru dan masa depan dalam rekayasa genetika tanaman

Sampai saat ini, tanaman RG komersial telah memberikan manfaat dalam produksi tanaman, tetapi ada juga sejumlah produk yang akan memberikan kontribusi lebih langsung terhadap kualitas makanan, lingkungan yang bersih, produksi farmasi, dan pakan ternak. Contoh produk ini meliputi: nasi dengan kadar zat besi dan beta karoten yang lebih tinggi (mikronutrien penting yang diubah menjadi vitamin A dalam tubuh); pisang umur panjang yang matang lebih cepat di pohon dan karena itu dapat dipanen lebih awal; jagung dengan nilai pakan yang lebih baik; pepaya matang yang tertunda; pepaya tahan virus *ringspot* pepaya;

tomat dengan flavonol tingkat tinggi, yang merupakan antioksidan kuat; jagung dan gandum yang toleran kekeringan; jagung dengan ketersediaan fosfor yang lebih baik; tanaman toleran arsenik; terong dan nasi tahan serangga; vaksin yang dapat dimakan dari buah dan sayuran; pohon rendah lignin untuk pembuatan kertas.

Kisah Sukses dari Tanaman transgenic merupakan sifat penting untuk perbaikan tanaman:

- Hasil panen tinggi,
- Kualitas nutrisi tinggi,
- Toleran stres abiotik,
- Ketahanan hama,
- Adaptasi untuk tumpang sari,
- Fiksasi nitrogen,
- Eliminasi senyawa beracun.



Gambar 152 Pengembangan tanaman transgenic

Beberapa produk hasil transgenic sebagai berikut.



Gambar 153 Bawang tanpa air mata



Gambar 154 Kembang kol warna warni



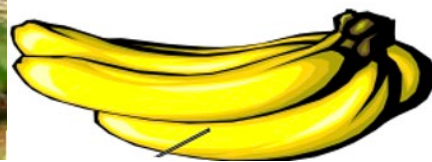
Gambar 155 Mawar Biru



Gambar 156 Tomat tahan lama



Gambar 157 (a) Beras Normal (b) Beras Emas



Gambar 158 Vaksin Makanan



Gambar 159 Jagung Tahan Serangga



Gambar 160 Ubi Ungu

Beberapa pertanyaan masyarakat tentang tanaman transgenik dapat dirangkum sebagai berikut.

1. Bagaimana keamanan pangan hasil rekayasa genetika?

Sebelum makanan dan produk RG yang terbuat dari tanaman RG disetujui untuk digunakan, mereka telah menjalani pengujian keamanan oleh perusahaan atau lembaga yang mengembangkannya. Data ditinjau oleh badan pengatur pemerintah dan peninjau ilmiah berdasarkan protokol yang diterima secara internasional. Makanan RG juga diuji oleh kelompok luar dan hasilnya dipublikasikan dalam jurnal peer review. Proses ini sebanding dengan penilaian keamanan untuk obat-obatan farmasi dan biomarker; perusahaan farmasi menyediakan data keamanan yang kemudian ditinjau oleh para ilmuwan Administrasi Makanan dan Obat-obatan AS (FDA). Sampai saat ini semua produk RG di pasar telah menjalani tinjauan penuh oleh badan pengatur terkait keamanan dan konten relatif terhadap formulir yang tidak dimodifikasi. Mengirimkan data keamanan adalah demi kepentingan terbaik pengembang mengingat kewajiban hukum yang timbul jika masalah dengan makanan muncul setelah pengenalan pasar. Di Indonesia produk obat-obatan dan makanan juga harus mendapatkan izin dari BPOM Republik Indonesia sebelum beredar di pasaran.

2. Apa yang terjadi pada DNA ketika dimakan?

DNA secara kimiawi terlepas dari sumbernya dan sebagian besar terdegradasi selama pemrosesan industri dan di saluran pencernaan. Fragmen kecil dapat dideteksi pada jaringan tubuh tertentu, seperti leukosit, hati, dan limpa. Asupan DNA manusia setiap hari dalam makanan diperkirakan 0,1-1g. Perkiraan total asupan DNA transgen harian dapat dihitung dengan asumsi 50% makanan berasal dari makanan RG dan transgen mewakili sekitar 0,0005% dari total DNA dalam makanan, sebagai 0,5-5ug/hari. Pada Juli 2007, Otoritas Keamanan Pangan Eropa merilis pernyataan tentang nasib gen dan protein dalam makanan dan pakan: "Setelah konsumsi, degradasi cepat menjadi fragmen DNA atau peptida pendek diamati di saluran pencernaan hewan dan manusia" dan "Untuk Saat ini, sejumlah besar penelitian eksperimental dengan ternak telah menunjukkan bahwa fragmen

DNA rekombinan atau protein yang berasal dari tanaman RG belum terdeteksi dalam jaringan, cairan, atau produk yang dapat dimakan dari hewan ternak”

3. Apakah ada perubahan pada kandungan nutrisi genetic makanan rekayasa?

Makanan RG diuji dibandingkan dengan makanan konvensional dalam hal komposisi nutrisi: kadar protein, karbohidrat, lemak, vitamin, mineral, serat, kadar air, dan fitokimia, dan dianalisis komposisinya pada dasarnya setara. Tanaman RG dan tanaman konvensional seharusnya ditanam dalam kondisi yang sebanding untuk menghilangkan pengaruh lingkungan dalam komposisi nutrisi. Ada juga tanaman RG yang dikembangkan untuk mengubah profil nutrisi makanan seperti makanan dengan peningkatan B-karoten, flavonoid, kalsium, folat, dan ketersediaan zat besi. Menurut kebijakan US-FDA, makanan RG dengan sifat nutrisi yang berubah harus diberi label untuk menunjukkan perbedaan nutrisi; salah satu contohnya adalah *Vistive™*, minyak rendah linoleat dari kedelai RG yang dapat digunakan sebagai pengganti minyak yang mengandung lemak trans. Tanaman tersebut harus diuji untuk kesetaraan substansial untuk senyawa yang tidak terkait dengan sifat yang diperkenalkan.

4. Apakah protein Bt mempengaruhi manusia?

Protein Bt adalah insektisida alami yang diproduksi oleh bakteri tanah, *Bacillus thuringiensis*, yang digunakan untuk mengendalikan hama tanaman seperti larva kupu-kupu dan ngengat, kumbang, dan nyamuk sejak tahun 1920-an. Protein Bt insektisida yang bersifat kristalin dan tidak aktif membentuk tubuh di dalam bakteri, dan menjadi aktif ketika mereka dimakan oleh larva serangga target dan dibelah. Peptida aktif mengikat reseptor khusus di usus tengah serangga, menciptakan lubang di membran usus yang menyebabkan isi bocor dan membunuh larva. Ketepatan protein Bt yang berbeda untuk target mereka terletak pada spesifisitas protein Bt, terletak pada kekhususan ikatan erat mereka dengan reseptor pendamping di usus serangga. Dalam beberapa tahun terakhir, berbagai studi keamanan dilakukan secara khusus pada protein Bt asli untuk menunjukkan bahwa mereka tidak memiliki karakteristik alergen atau racun makanan. Data *Cry1Ab* dalam jagung dan kapas dan *Cry1Ac* dalam tomat, jagung, dan kapas telah

ditinjau dengan cermat oleh badan pengatur di banyak negara, termasuk AS, Kanada, Jepang, Inggris, UE, Rusia, dan Afrika Selatan.

5. Apakah makanan hasil rekayasa genetika menyebabkan alergi makanan?

Tidak ada makanan yang 100% aman, baik itu konvensional, RG, atau organik. Alergi hadir dalam "delapan besar" yang terdiri dari susu, telur, ikan, kerang, kacang pohon, kedelai, gandum, dan kacang tanah. Karena pengujian keamanan pangan yang dilakukan pada makanan RG berfokus pada gen yang diperkenalkan dan produk proteinnya, tampaknya tidak mungkin bahwa masalah alergenitas yang terkait dengan makanan RG komersial yang telah menjalani pengawasan ketat peraturan kesehatan pemerintah akan lebih besar daripada makanan konvensional, yang dibuat oleh klasik. pemuliaan dan mutasi yang belum mengalami pemeriksaan tersebut.

6. Bisakah urutan genetik virus yang dimasukkan ke dalam tanaman rekayasa genetika menimbulkan risiko bagi manusia?

Salah satu perhatian penting adalah penggunaan promotor turunan virus yang diperkenalkan sekuens pada tanaman transgenik yang mengatur berapa banyak, di mana, dan kapan protein yang dikodekan itu diekspresikan. Ini termasuk virus mosaik kembang kol 35S yang digunakan pada beberapa tanaman RG komersial, misalnya. Jagung Bt 11, Bt 176, Mon 810, dan kedelai *Roundup Ready*. Spekulasi bahwa "promotor 35S dapat mempengaruhi lambung dan lapisan usus besar dan menyebabkan efek faktor pertumbuhan tidak terbukti mempercepat pembentukan kanker di organ-organ itu" tanpa eksperimen ilmiah. Spekulasi ini telah dibantah secara luas oleh komunitas ilmiah karena promotor 35S dapat ditemukan di mana-mana di alam. Misalnya, diperkirakan 14-25% lobak minyak di lapangan terinfeksi CaMV; jumlah yang sama telah diperkirakan untuk kembang kol dan kubis. Karena prevalensinya dalam makanan, manusia telah mengonsumsi CaMV dan promotornya pada tingkat tinggi selama beberapa dekade tanpa efek yang dapat diamati. Kehadiran promotor CaMV di pabrik RG pada prinsipnya tidak menghadirkan situasi yang berbeda. Selain itu, DNA dalam makanan dengan cepat

dipecah selama pencernaan, memberikan sedikit waktu untuk berinteraksi dengan lambung dan lapisan kolon.

7. Bisakah gen resistensi antibiotik dalam makanan rekayasa genetika meningkatkan resistensi antibiotik pada manusia?

Untuk mengembangkan resistensi antibiotik pada mikroorganisme yang ada di saluran pencernaan manusia dan hewan, harus ada transfer fungsional gen resistensi antibiotik, elemen pengontrolnya, dan integrasinya dalam kromosom bakteri. Ini hampir tidak mungkin, karena selama mengunyah, sel-sel dalam makanan dipecah. Dalam makanan mentah, ketika sel-sel dihancurkan, DNA dilepaskan dan enzim yang sangat aktif dalam air liur dan tanaman mulai mendegradasi DNA. Proses ini berlanjut di saluran pencernaan di mana enzim lain lebih lanjut memecah DNA dan protein. Pada manusia, makanan tetap berada di perut selama kurang lebih 2 jam, di mana sisa DNA terfragmentasi menjadi potongan-potongan kecil. Gen resistensi antibiotik dari jagung RG terbukti tidak berpindah ke bakteri usus pada ayam yang diberi makan jagung RG.

8. Bisakah rekayasa genetika digunakan untuk membuat obat-obatan? Bisakah tanaman rekayasa genetika mencemari pasokan makanan?

Obat-obatan dan vaksin yang berasal dari tumbuhan untuk penyakit umum seperti hepatitis B, pneumonia, dan pes, serta melawan alergi penderita, asma, alergi musiman dan atopik Dermatitis telah dikembangkan sejak awal 1990-an. Vaksin tanaman memiliki keunggulan mudah dikonsumsi, tanpa pemrosesan tanpa perlu penyimpanan dingin. Namun, tanaman RG ini dapat memasuki persediaan makanan jika tidak benar ditangani dan dipantau. Di AS, di mana tanaman farmasi tersebut dibudidayakan, peraturan pemerintah sudah ada. APHIS yang mengatur pergerakan dan medan pengujian tanaman RG memerlukan langkah-langkah khusus untuk mencegah tanaman penghasil obat atau enzim industri mencemari tanaman pangan: 1. pelabelan, pengemasan, dan pemisahan bahan tanaman yang diatur; 2. isolasi reproduktif untuk mencegah serbuk sari RG membuahi tanaman konvensional; 3. pemantauan pascapanen untuk membuang tanaman sukarelawan; dan 4. pembuangan bahan transgenik dengan benar.

9. Mengapa pelabelan makanan rekayasa genetika tidak diwajibkan oleh FDA?

Kebijakan pemerintah tentang pelabelan telah dikembangkan secara berbeda di banyak negara. Di AS, kebijakan pelabelan FDA untuk makanan RG sama dengan makanan konvensional dan memastikan bahwa konsumen diberi informasi tentang nutrisi, keamanan kesehatan, atau perubahan kualitas makanan pada produk akhir. Label yang diamanatkan FDA tidak digunakan untuk memberikan informasi tentang proses pembuatan makanan. Jika makanan RG berbeda secara signifikan dari makanan konvensionalnya, makanan tersebut harus diberi label untuk menunjukkan perbedaannya. Contoh di mana perubahan profil nutrisi disertakan, misalnya jika makanan RG dibuat menggunakan informasi genetik dari sumber alergen yang dikenal sebelumnya, seperti kacang tanah, kedelai, atau gandum, atau jika protein baru memiliki karakteristik alergen yang diketahui. Misalnya, minyak yang dibuat dari kedelai RG dan varietas kanola dengan perubahan komposisi asam lemak harus diberi label; makanan yang mengandung minyak tersebut harus diberi label dan perusahaan yang memproduksi minyak tersebut harus menggunakan nama baru. Misalnya, Monsanto menggunakan nama Vistive™, untuk memasarkan produk asam linoleat rendah dari minyak kedelai RG. Jika makanan mengandung protein baru yang berpotensi menyebabkan alergi, label harus menyatakan bahwa produk tersebut mengandung alergen dan menyebutkan sumbernya.

10. Apa itu makanan organik?

Pertanian organik adalah metode produksi pertanian yang tidak memungkinkan penggunaan pestisida sintetis, pupuk atau penambah pertumbuhan. Makanan yang ditanam di bawah sertifikasi organik berbeda dari makanan yang diproduksi secara konvensional dengan cara tumbuh, ditangani, dan diproses, tetapi label "organik" tidak menjamin sifat produk, makanan, atau bahan, hanya metode produksinya. Faktor penting bagi banyak orang yang mengonsumsi makanan organik berkaitan dengan persepsi bahwa mereka lebih sehat, lebih enak rasanya, lebih baik untuk lingkungan, memiliki tingkat pestisida yang lebih rendah dan lebih sedikit bahan tambahan makanan, dan lebih baik untuk kesejahteraan hewan. Namun, sertifikasi organik tidak berarti bahwa

makanan yang diproduksi dengan metode organik lebih bergizi atau lebih aman daripada yang diproduksi tanpa metode organik.

Perbedaan yang dilaporkan dalam komposisi nutrisi antara makanan yang diproduksi secara organik dan konvensional menarik tetapi sangat sulit untuk mengontrol semua variabel yang mungkin mempengaruhi kualitas nutrisi dan memastikan bahwa variasi yang diamati signifikan dan dapat direproduksi. Selain itu, ada banyak nutrisi penting yang tidak ditemukan perbedaan signifikan. Lebih banyak penelitian diperlukan untuk menentukan apakah perbedaan nutrisi yang diamati antara produk makanan organik dan konvensional dapat direproduksi dan memiliki dampak signifikan pada kesehatan manusia.

Dari perspektif nutrisi, tidak ada cukup data saat ini untuk menunjukkan manfaat nutrisi dari makanan yang diproduksi secara konvensional atau organik yang mendukung konsumsi baik untuk manfaat kesehatan. Namun, jika tujuannya adalah untuk mempromosikan makan sehat, lebih penting bagi konsumen untuk fokus pada makan yang sehat, diet seimbang, kaya buah dan sayuran, daripada berfokus pada makanan yang diproduksi dengan metode tertentu. Bukti epidemiologis yang meyakinkan menunjukkan bahwa pola makan yang kaya buah dan sayuran segar, terlepas dari metode yang digunakan untuk memproduksinya, dapat meningkatkan Kesehatan.

11. Dapatkah tanaman rekayasa genetika menyebabkan efek buruk pada organisme non target? Apakah ada efek merugikan pada organisme non-target yang disebabkan oleh tanaman RG?

Efek pada tanaman RG pada organisme non target telah dipelajari dengan fokus pada:

- b. Kupu-kupu raja dan burung layang-layang ekor hitam. Perlindungan Lingkungan AS Agensi telah menyimpulkan berdasarkan dua penelitian bahwa jagung Bt tidak signifikan dalam kematian lapangan larva raja, khususnya

- kerabat untuk faktor-faktor seperti penggunaan yang meluas pestisida dan penghancuran kebiasaan musim dingin kupu-kupu.
- c. Mikroorganisme tanah bukan sasaran. Studi pada empat varietas jagung dengan dua protein Bt yang berbeda (Cry1Ab dan Cry3Bb1) versus varietas non-Bt yang hampir isogenik mengungkapkan bahwa meskipun jumlah dan jenis mikroba dan aktivitas enzim berbeda dari musim ke musim di antara varietas, tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik terlihat dalam jumlah mikroba yang berbeda, aktivitas enzim, atau pH. Hasil serupa ditemukan membandingkan kapas Bt dan non-Bt, dan tidak ada protein Cry2Ab yang terdeteksi di rizosfer di lapangan yang ditanam dengan kapas Bt.
 - d. Arthropoda non-target. Studi tentang arthropoda yang tinggal di dedaunan di Jagung Bt yang mengekspresikan Cry3Bb1 dibandingkan dengan jagung yang diberi insektisida konvensional menunjukkan bahwa tidak ada dampak merugikan pada kelimpahan artropoda non target. Namun, artropoda yang diobati dengan insektisida mengurangi jumlah serangga non-target: kumbang kepik, sayap renda, dan serangga damsel.
 - e. Mikroba dan serangga air non target. Sedimen air dan air permukaan setelah pelabelan DNA genom jagung GE Bt mengungkapkan bahwa sedimen memiliki lebih banyak DNA daripada air permukaan. Selain itu, protein Cry1Ab tidak terdeteksi di kedua sampel.

13. Bisakah penggunaan tanaman rekayasa genetika mengakibatkan penurunan populasi organisme lain?

Penurunan populasi organisme lain telah menjadi fenomena yang berkelanjutan sejak manusia belajar bagaimana menjinakkan tanaman. Pengenalan teknologi pertanian modern termasuk varietas baru; persaingan antara varietas lokal dan varietas baru menyebabkan terjadinya perpindahan varietas lokal; dan menggusur varietas lokal dengan variabilitas genetik populasi tanaman regional. Pemuliaan tanaman ekstensif pada awal 1960-an untuk memenuhi peningkatan populasi yang luar biasa menghasilkan varietas unggul tanaman pangan utama, menghasilkan peningkatan hasil tetapi juga perpindahan yang signifikan dari varietas tradisional dan hilangnya keragaman genetik secara

bersamaan, terutama ras sereal dan kacang-kacangan. Pengakuan fakta ini menyebabkan pembentukan *bank gen* di seluruh dunia dengan fokus pada tanaman tertentu. Salah satu isu tentang keragaman adalah aliran gen dari tanaman RG ke kerabat liar yang dapat memberikan keuntungan selektif penerima di lingkungan tertentu. Aliran gen juga dapat terjadi secara alami pada tanaman yang dibiakkan secara konvensional dan dikomersialkan. Hal ini diatasi dengan penerapan langkah-langkah yang diperlukan dalam budidaya tanaman RG di dekat pusat asal, tergantung pada sifat sifat dan frekuensi pengenalannya ke dalam ekosistem. Saat ini, studi tentang penilaian dampak transgen yang pindah ke kerabat liar dan potensi untuk mengubah dinamika ekosistem diminta dalam pernyataan dampak lingkungan sebelum pabrik RG dilepaskan. Ini memberikan wawasan tentang kemungkinan hasil pada lingkungan.

14. Apa pengaruh penggunaan tanaman RG dalam penggunaan pestisida?

Memiliki tanaman yang toleran terhadap herbisida dan serangan hama meningkatkan pilihan pengelolaan hama dan juga dapat mengurangi jumlah dan kekuatan aplikasi pestisida. Pertumbuhan tanaman RG HT juga memungkinkan aplikasi topikal herbisida pada tanaman dan gulma, yang menggantikan penyemprotan di antara barisan tanaman dan penghilangan gulma secara mekanis, yang keduanya dapat merusak tanaman dan mengakibatkan kerusakan lingkungan. Mengurangi pengolahan tanah secara mekanis akan menurunkan konsumsi bahan bakar dan membantu melestarikan tanah yang rentan terhadap erosi dan pemadatan. Tanaman HT juga dapat menyebabkan pengobatan herbisida yang lebih fleksibel.

15. Dapatkah sistem tanam organik, konvensional dan rekayasa genetika hidup berdampingan?

Petani terbiasa menanam varietas yang berbeda dan strategi penanaman untuk mengembangkan produk pertanian yang memenuhi kebutuhan konsumen. Mereka terbiasa menanam jagung putih dan kuning, cabai pedas dan manis, dan masih mencapai standar kemurnian yang ditentukan oleh spesifikasi benih bersertifikat. Strategi harus dirancang untuk memungkinkan petani tetangga

bertani dengan cara yang layak secara ekonomi. Ini dapat melibatkan saling mengingatkan tentang rencana mereka dan memodifikasinya untuk mengakomodasi kebutuhan satu sama lain. Ketika tanaman RG ditanam di samping pertanian organik, praktik-praktik tertentu yang meminimalkan penyimpangan, pestisida sintesis juga dapat membatasi aliran gen RG. Aliran gen bukan hanya sarana bagi RG untuk berbaur dengan tanaman konvensional atau organik; tanaman juga harus dipisahkan selama panen, pengiriman dan pemrosesan.

Berdasarkan materi dan video pembelajaran pada pokok bahasan aplikasi rekayasa genetika yang telah disajikan, kemudian amatilah peristiwa atau kejadian sehari-hari disekeliling saudara bahan pangan atau bahan kesehatan atau bahan yang lain yang dihasilkan dari rekayasa genetika?

2. PENCETUSAN IDE

Pahamilah orientasi di atas yang telah disajikan, diskusikan dengan kelompok saudara hal-hal berikut ini: Apakah produk-produk hasil rekayasa genetika dapat langsung digunakan? Apakah ada syarat-syarat produk hasil rekayasa genetika dapat digunakan? Apakah ada perubahan kandungan nutrisi pada pangan hasil rekayasa genetika? Bahaslah bersama kelompok saudara pada LKM yang telah disediakan.

3. PENSTRUKTURAN IDE

Hasil pencetusan ide bersama dengan kelompok saudara rancanglah proyek tentang aplikasi teknologi DNA. Bahaslah bersama dengan kelompok saudara naskah rancangan tersebut tulislah/gambarkan/skenariokan tentang aplikasi teknologi DNA. Bagaimana tahapan-tahapan produk hasil rekayasa genetika agar dapat digunakan oleh manusia. Bahaslah bahan dan alat yang digunakan untuk menyelesaikan proyek tersebut.

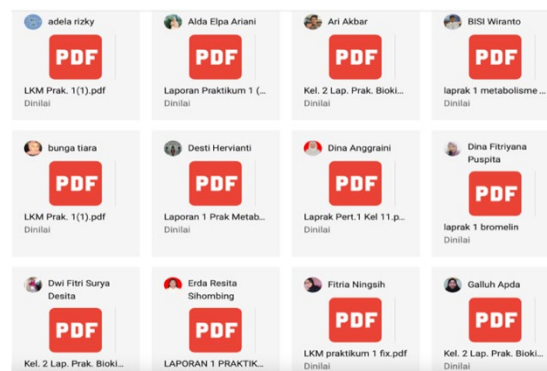
4. APLIKASI

Berdasarkan rancangan yang telah di buat, kerjakanlah proyek bersama kelompok saudara, dokumentasikanlah dalam bentuk video tentang aplikasi teknologi DNA. Proyek dilakukan di luar jam kuliah, sesuai operasional prosedur Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unsri. Lakukanlah proyek tersebut semenarik mungkin. Lakukanlah kolaborasi bersama teman-teman saudara dalam menyelesaikan proyek tersebut. Dokumentasi video yang sudah di upload cantumkan link videonya dibawah aplikasi sebelum pembahasan. Berdasarkan hasil proyek yang telah saudara lakukan bahaslah hal-hal berikut ini.

1. Bagaimana serum hasil rekayasa genetika, jelaskan tahapan yang dilakukan sampai pada produk serum siap pakai.
2. Bagaimana produk pangan hasil rekayasa genetika, jelaskan tahapan yang dilakukan sampai pada bahan pangan tersebut siap di konsumsi masyarakat.

5. REFLEKSI

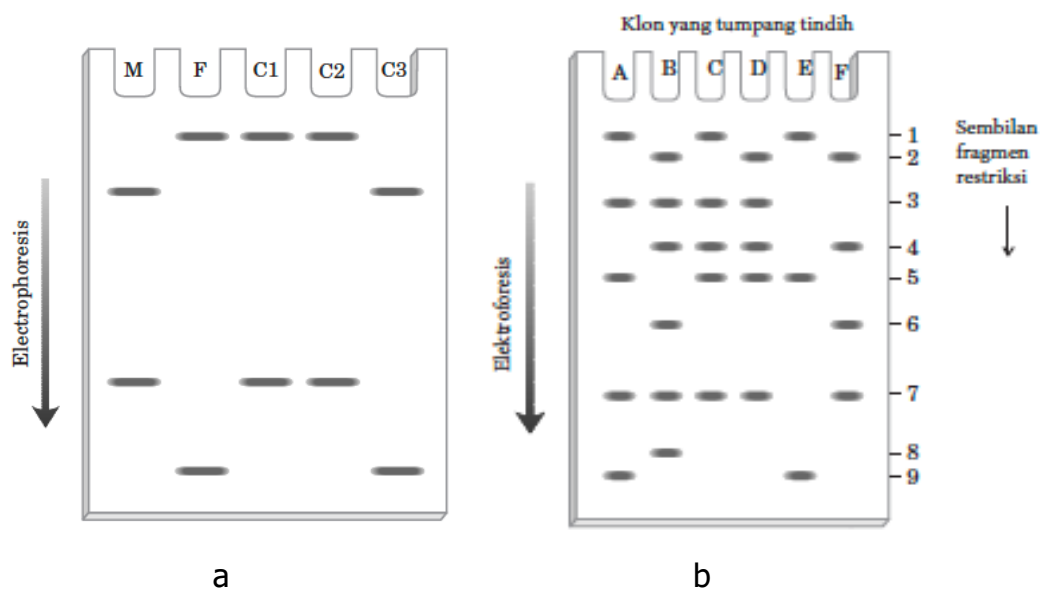
Hasil elaborasi dengan dosen, saat proses pembelajaran jika ada perbaikan ditindaklanjuti dengan perbaikan, kemudian dituangkan dalam "Laporan 14 aplikasi teknologi DNA". Selanjutnya laporan aplikasi teknologi DNA tersebut di submit ke <https://elearning.unsri.ac.id>. Laporan 14 aplikasi teknologi DNA minimal memuat hal-hal sebagai berikut yaitu: orientasi, pencetusan ide, penstrukturan ide, aplikasi, refleksi, dan daftar pustaka. Contoh submit laporan 14 Aplikasi teknolodi DNA.



Gambar 161. Submit Laporan 14 Aplikasi teknolodi DNA

Latihan Soal

1. Jelaskan bagaimana proses pembuatan tanaman transgenik?
2. Apakah produk tanaman transgenik aman di konsumsi?
3. Jelaskan bagaimana metode DNA fingerprinting dapat digunakan untuk mendeteksi kasus criminal, mendeteksi anggota keluarga?
4. DNA fingerprinting dan analisis RFLP sering digunakan untuk menguji paternitas. Seorang anak mewarisi kromosom dari ibu dan ayah, sehingga DNA dari seorang anak menampilkan fragmen restriksi yang diturunkan dari setiap orang tua. Dalam gel yang ditunjukkan (gambar a) di sini, anak mana, jika ada, yang dapat dikecualikan sebagai keturunan biologis dari ayah yang diduga? Jelaskan alasan Anda. Jalur M adalah sampel dari ibu, F dari ayah yang diduga, dan C1, C2, dan C3 dari anak-anak.



5. Sekelompok klon yang tumpang tindih, ditunjuk A sampai F, diisolasi dari satu wilayah kromosom. Masing-masing klon secara terpisah dipotong oleh enzim restriksi dan fragmennya dielektroforesis pada gel agarosa, dengan hasil yang ditunjukkan pada gambar di atas (gambar b). Ada sembilan fragmen restriksi yang berbeda di wilayah kromosom ini, dengan *subset* muncul di setiap klon. Dengan menggunakan informasi ini, simpulkan urutan fragmen restriksi dalam kromosom.

DAFTAR PUSTAKA

1. Brown, T. A. 2011. *Introduction to genetics: A molecular approach*. New York: Garland Publishing.
2. Brown, T. A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. Chichester UK: John Wiley & Sons.
3. <https://www.isaaa.org> > publications > *Agricultural Biotechnology (A Lot More than Just GM Crops)*. Diakses pada tanggal 25 Januari 2022.
4. School, F. 2019. DNA Fingerprinting. <https://youtu.be/7onjVBsQwQ8>. Diakses pada tanggal 25 Januari 2022.
5. Shivanand, P., Noopur, S. 2010. Recombinant DNA Technology: Applications In The Field Of Biotechnology And Crime Sciences. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1(1):43-49.
6. Sukaryawan, M., 1998. *Konstruksi Koleksi Parsial Genom dan Urutan Nukleotida Sebagian Gen *ruvB* Salmonella Typhimurium* Bandung: ITB.
7. Thenawidjaja, M. 1990. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga
8. Watson, DJ., Tooze, J., Kurtz, DT. 1998. *DNA Recombinant*. Jakarta: Erlangga
9. Williams, R.J. 2003. *Restriction Endonucleases. Molecular Biotechnology, (23)*.
10. Winnacker, E.L. 1987. *From Gene to Clone*. New York: VCH.
11. Wirahadikusumah, M. 1985. *Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB

SINGKATAN UMUM DALAM BIOKIMIA

A	Adenin atau Adenosin
ACP	Protein pembawa asil
ACTH	Hormon adrenokortikotropik
Asil-KoA (asil-S-KoA)	Turunan asil dari koenzim A
AMP	Adenosin 5'-monofosfat
ADP	Adenosin 5'-difosfat
ATP	Adenosin 5'-trifosfat
cAMP	3', 5' – AMP siklik
dAMP, dGMP, dADP, dll	deoksiguanosin 5'-monofosfat, deaksiadenosin 5'-difosfat, dan lain lain.
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asam aspartat
ATPase	Trifosfatase adenosin
C	Sitosin atau Sitodin
CAP	Protein pengaktif katabolik
cDNA	DNA pasangan
CMP, CDP,CTP	Sitidin 5',-mono-, -di-, -trifosfat
KoA (KoA-SH)	Koenzim A
KoQ	Koenzim Q(ubikuinon)
Sis	Sistein
dATP	2'- Deoksiadenosin 5'-trifosfat,
dGTP	2'- deoksiguanosin 5'-trifosfat,
dCTP	2'- deksisitidin5'-trifosfat
dTTP	2'- deksitimidin5'-trifosfat
DFP (DIFP)	Diisopropilfosfofluoridat
DNA	Asam deoksiribunokleat
DNAase	Deoksiribunoklease

DNP	2,4-Dinitrofenol
DOPA	Dihidroksifenilalanin
EC (diikuti oleh jumlah)	Komisi enzim (jumlah menunjukkan klasifikasi resmi enzim)
EDTA	Asam etilendiamintetraasetat
ETP	Partikel pemindah elektron (dari membran mitokondria)
FA	Asam lemak
FAD, FADH ₂	Flavin adenin dinukleotida dan bentuk reduksinya
FCCP	Karbonilsianida <i>p</i> -trifluorometoksifenilhidrazon
Fd	Feredoksin
FDNB (DNFB)	1- Fluoro- 2,4-dinitrobenzen
FDP	Fruktosa 1,6-difosfat
FFA	Asam lemak bebas
FH ₂ , FH ₄ , (THFA)	Asam dihidro dan tetrahidrofolat
fMet	<i>N</i> -Formilmetionin
FMN, FMNH ₂	Flavin monokleotida dan bentuk reduksinya
FP	Flavoprotein
ΔG^{01}	Perubahan energi bebas baku
ΔG	Perubahan energi bebas
ΔG_p	Perubahan energi bebas dari hidrolisis ATP di bawah kondisi tidak baku
G	Guanin atau guanosin
Gal	D-Galaktosa
GalNAc	N-Asetil-D-Galaktosamin
GDH	Dehidrogenase glutamat
GH	Hormon Pertumbuhan

Glc	D-glukosa
GlcNAc	N-asetil-D-glukosamin
Gln	Glutamin
Glu	Asam Glutamat
Gli	Glisin
cGMP	3', 5' - siklik GMP
GMP	Guanosin 5'-mono fosfat
GDP	Guanosin 5'-difosfat
GTP	Guanosin 5'-trifosfat
G3P	Gliseraldehida 3-fosfat
G6P	Glukosa 6-fosfat
GSH, GSSG	Glutation dan bentuk oksidasinya
Hb, HbO ₂ , HbCO, MetHb	Hemoglobin, oksihemoglobin, karbon monosakarida hemoglobin, metemoglobin
His	Histidin
hnRNA	RNA inti heterogen
Hip	Hidroksiprolin
I	Isonin
Ile	Isoleusin
IMP, IDP, ITP	Inosin 5'-mono-, -di-, -trifosfat
αKG	α-Ketoglutarat
LDH	Dehidrogenase laktat
Leu	Leusin
LH	Hormon luteinizing
Lis	Lisin
Mb, MbO ₂	Mioglobin, Oksimioglobin
MDH	Dehidrogenase malat
MtDNA	DNA mitokhondria
Met	Metionin
MSH	Hormon perangsang Melanosit

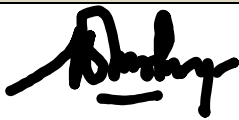


NAD*, NADH	Nikotinamid adenin dinukleotida dan bentuk reduksinya
NADP*, NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotida fosfat dan bentuk reduksinya
NMN*, NMNH	Nikotinamid mononukleotida dan bentuk reduksinya
OAA	Oksaloasetat
P _i	Ortofosfat inorganik
PAB atau PABA	Asam p-aminobenzoat
PEP	Fosfoenolpiruvat
3PG	3-Fosfogliserat
PGA	Asam pteroilglutamat (asam folat)
PGP	3-Fosfogliserol fosfat
Phe	Fenilalanin
PP _i	Pirofosfat anorganik
PQ	Plastokuinon
Pro	Prolin
PRPP	5-Fosforilbosiil 1- pirofosfat
Q	Koenzim Q (ubikuinon)
Rib	D-Ribosa
RNA	Asam ribonukleat
hnRNA	RNA inti heterogen
mRNA	RNA pembawa pesan
rRNA	RNA ribosom
snRNA	RNA inti kecil
tRNA	RNA tranfer
RNase	Ribonuklease
KR	Kuosien respirasi
Ser	Serin

T	Tiamin atau timidin
HT	Hormon tiotropik
Thr	Treonin
TMP	Timidin 5'-mono-fosfat
TDP	Timidin 5'-di-fosfat
TTP	Timidin 5'-trifosfat
TMV	Virus mosaik tembakau
TPP	Tiamin pirofosfat
Tir	Triptofan
U	Urasil atau uridin
UDP-gal	Uridin difosfat galaktosa
UDP-glc	Uridin difosfat glukosa
UMP	Uridin 5' –mono-fosfat
UDP	Uridin 5' –di -fosfat
UTP	Uridin 5' –trifosfat
UV	Sinar ultraviolet
Val	Valin



UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN KIMIA

RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER (RPS)
(Luring 85%)
(Daring 15%)

Mata Kuliah	: Biokimia 2		
Kode / SKS	: GKM328317/3		
Semester	: 6		
Dibuat	: Indralaya, 14 Mei 2021		
Dosen Pengampu		Diperiksa oleh	Disetujui oleh
			
Drs. Made Sukaryawan, M.Si., PhD NIP. 196508051991021001		Dr. Diah Kartika Sari, M.Si NIP.198405202008012010	Drs. K. Anom W., M.Si NIP 195904061984031001 (Penjamin Mutu Prodi PKimia)
Drs. Effendi, M.Si NIP 196010061988031002 (Koordinator Prodi PKimia)			
Kode	CPL Prodi yang dibebankan pada mata kuliah		
CPL-S9	Menunjukkan sikap bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri;		
CPL-P1	Mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora yang sesuai dengan bidang keahliannya;		
CPL-P5	Menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah;		
CPL-KU3	Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni.		
Kode	Capaian Pembelajaran Mata Kuliah (CPMK)		
CPMK-1	Mahasiswa mampu bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri (CPL-S9);		
CPMK-2	Mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora yang sesuai dengan bidang keahliannya (CPL-P1);		
CPMK-3	Mahasiswa menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah (CPL-P5);		
CPMK-4	Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni (CPL-KU3).		
Kode	Kemampuan akhir tiap tahapan belajar (Sub-CPMK)		
Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami metabolisme makhluk hidup (CPMK-1);		
Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme dalam kehidupan sehari-hari (CPMK-2);		
Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik dalam materi DNA, Gen dan Kloning (CPMK3);		
Sub-CPMK4	Mampu mengkaji implikasi mutagenesis pada makhluk hiup dalam kehidupan sehari-hari (CPMK4);		
Sub-CPMK5	Mampu mengkaji implikasi kloning gen dalam kehidupan sehari-hari CPMK4);		

Deskripsi Singkat Mata Kuliah	
Perkuliahan ini membahas bagaimana menganalisis konsep bioenergetika anabolisme dan katabolisme dalam pembentukan energi yang berasal dari biomolekul; Menggunakan konsep informasi genetik untuk aplikasi diberbagai bidang kehidupan; dan Menganalisis pengaturan metabolisme biomolekul dan hubungannya dengan gangguan metabolisme yang umum terjadi.	
Pustaka	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lehninger, A.L. 2017. <i>Principles of Biochemistry</i> 7th edition 2. Denise R. F. 2017. <i>Biochemistry</i> 7th edition 3. David P.C. 2009. <i>Biotechnology</i> 4. Wirahadi K.M . 2014. <i>Dasar-dasar Biokimia</i>

PertemuanKe	Kemampuan akhir tiap tahapan belajar		Materi pelajaran	Metode Pembelajaran	Pengalaman Belajar	Teknik Penilaian	Waktu dan Media	Daftar referensi
1	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme glukosa.	Katabolisme Glukosa: <ul style="list-style-type: none"> • Glikolisis • Energi Katabolisme • Pengaturan Katabolisme 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,4
2	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami siklus asam sitrat	Siklus Asam Sitrat <ul style="list-style-type: none"> • Mekanisme Siklus Asam Sitrat • Pengaturan Siklus Asam Sitrat • Transport elektron dan Fosforilasi Oksidatif 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,4
3	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme asam lemak.	Katabolisme Asam Lemak <ul style="list-style-type: none"> • Katabolisme Asam lemak berkarbon genap • Katabolisme Asam Lemak berkarbon ganjil • Katabolisme Asam lemak tak jenuh • Energi Katabolisme Pengaturan Katabolis 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,4
4	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme asam amino.	Katabolisme Asam Amino <ul style="list-style-type: none"> • Siklus Urea • Energi katabolisme • Pengaturan Katabolisme 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,4
5	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme karbohidrat dalam kehidupan sehari-hari.	Biosinteis Karbohidrat <ul style="list-style-type: none"> • Biosintesis Karbohidrat dalam Jaringan Hewan • Pengaturan metabolisme • Kelainan Metabolisme Karbohidrat 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3

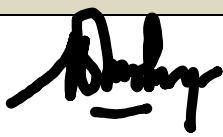


6	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme asam lemak dalam kehidupan sehari-hari.	Biosintesa Asam Lemak <ul style="list-style-type: none"> • Biosintesa Asam lemak • Pengaturan Metabolisme • Kelainan Metabolisme Asam lemak. 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
7	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme asam amino dalam kehidupan sehari-hari	Biosintesis Asam Amino dan Nukleotida <ul style="list-style-type: none"> • Mekanisme Biosintesis Asam Amino • Mekanisme Biosintesis Nukleotida • Pengaturan Metabolisme Asam Amino • Pengaturan Metabolisme Nukleotida 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
8	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi DNA pada mahluk hidup.	Asam Nukleat <ul style="list-style-type: none"> • Sejarah Perkembangan DNA • Struktur DNA dan RNA • Replikasi DNA • DNA Sebagai Materi Genetik 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	2,3
9			Ujian Tengah Semester		-		1 Jam	
10	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi gen, genom, kromosom, kode genetik, transkripsi dan translasi.	Ekspresi Genetik <ul style="list-style-type: none"> • Gen • Genom • Kromosom • Kode Genetik • Transkripsi • Translasi 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
11	Sub-CPMK4	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi mutagenesis pada mahluk hidup dan dampak yang diakibatkan dalam kehidupan sehari-hari.	Mutagenesis <ul style="list-style-type: none"> • Jenis-jenis Mutasi Gen • Penyakit Kelainan Genetik • Pengendalian Mutasi Gen 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3

12	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi enzim restriksi dan vector kloning gen.	Enzim Restriksi <ul style="list-style-type: none"> • Enzim Restriksi • Vektor • Sel Inang 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
13	Sub-CPMK5	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi kloning dalam kehidupan sehari-hari.	Kloning Gen <ul style="list-style-type: none"> • Pembuatan DNA Rekombinan • Seleksi DNA Rekombinan 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
14	Sub-CPMK5	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi sekuensing dan analisis homologi dalam kehidupan sehari-hari.	Sekuensing <ul style="list-style-type: none"> • Sekuensing DNA • Analisis Homologi 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
15	Sub-CPMK5	Mahasiswa Mampu mengkaji Aplikasi Kloning dalam kehidupan sehari-hari	Aplikasi DNA Rekombinan <ul style="list-style-type: none"> • Aplikasi Pada Bidang Kesehatan • Aplikasi Pada Bidang Forensik • Aplikasi Pada Bidang Pertanian 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes 	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
16			Ujian Akhir Semester				1 Jam	



UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN KIMIA

RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER (RPS)
(Luring 50%)
(Daring 50%)

Mata Kuliah	: Biokimia 2		
Kode / SKS	: GKM328317/3		
Semester	: 6		
Dibuat	: Indralaya, 14 Mei 2021		
Dosen Pengampu		Diperiksa oleh	Disetujui oleh
			
Drs. Made Sukaryawan, M.Si., PhD NIP. 196508051991021001		Dr. Diah Kartika Sari, M.Si NIP.198405202008012010	Drs. K. Anom W., M.Si NIP 195904061984031001 (Penjamin Mutu Prodi PKimia)
Drs. Effendi, M.Si NIP 196010061988031002 (Koordinator Prodi Pkimia)			
Kode	CPL Prodi yang dibebankan pada mata kuliah		
CPL-S9	Menunjukkan sikap bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri;		
CPL-P1	Mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora yang sesuai dengan bidang keahliannya;		
CPL-P5	Menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah;		
CPL-KU3	Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni.		
Kode	Capaian Pembelajaran Mata Kuliah (CPMK)		
CPMK-1	Mahasiswa mampu bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri (CPL-S9);		
CPMK-2	Mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora yang sesuai dengan bidang keahliannya (CPL-P1);		
CPMK-3	Mahasiswa menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah (CPL-P5);		
CPMK-4	Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni (CPL-KU3).		
Kode	Kemampuan akhir tiap tahapan belajar (Sub-CPMK)		
Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami metabolisme makhluk hidup (CPMK-1);		
Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme dalam kehidupan sehari-hari (CPMK-2);		
Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik dalam materi DNA, Gen dan Kloning (CPMK3);		
Sub-CPMK4	Mampu mengkaji implikasi mutagenesis pada makhluk hiup dalam kehidupan sehari-hari (CPMK4);		
Sub-CPMK5	Mampu mengkaji implikasi 261loning gen dalam kehidupan sehari-hari CPMK4);		

Deskripsi Singkat Mata Kuliah	
Perkuliahan ini membahas bagaimana menganalisis konsep bioenergetika anabolisme dan katabolisme dalam pembentukan energi yang berasal dari biomolekul; Menggunakan konsep informasi genetik untuk aplikasi diberbagai bidang kehidupan; dan Menganalisis pengaturan metabolisme biomolekul dan hubungannya dengan gangguan metabolisme yang umum terjadi.	
Pustaka	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lehninger, A.L. 2017. <i>Principles of Biochemistry</i> 7th edition 2. Denise R. F. 2017. <i>Biochemistry</i> 7th edition 3. David P.C. 2009. <i>Biotechnology</i> 4. Wirahadi K.M . 2014. <i>Dasar-dasar Biokimia</i>

Pertemuan Ke	Kemampuan akhir tiap tahapan belajar	Materi pelajaran	Metode Pembelajaran	Pengalaman Belajar	Teknik Penilaian	Waktu dan Media	Daftar referensi	
1	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme glukosa.	Katabolisme Glukosa: <ul style="list-style-type: none"> • Glikolisis • Energi Katabolisme • Pengaturan Katabolisme 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsrri/google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4
2	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami siklus asam sitrat	Siklus Asam Sitrat <ul style="list-style-type: none"> • Mekanisme Siklus Asam Sitrat • Pengaturan Siklus Asam Sitrat • Transport elektron dan Fosforilasi Oksidatif 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsrri/google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4
3	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme asam lemak.	Katabolisme Asam Lemak <ul style="list-style-type: none"> • Katabolisme Asam lemak berkarbon genap • Katabolisme Asam Lemak berkarbon ganjil • Katabolisme Asam lemak tak jenuh • Energi Katabolisme Pengaturan Katabolisme 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi Submit 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsrri/google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4
4	Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme asam amino.	Katabolisme Asam Amino <ul style="list-style-type: none"> • Siklus Urea • Energi katabolisme • Pengaturan Katabolisme 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: k Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsrri/google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4
5	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme karbohidrat dalam kehidupan sehari-hari.	Biosinteis Karbohidrat <ul style="list-style-type: none"> • Biosintesis Karbohidrat dalam Jaringan Hewan • Pengaturan metabolisme • Kelainan Metabolisme Karbohidrat 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: k Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsrri/google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3

6	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme asam lemak dalam kehidupan sehari-hari.	Biosintesa Asam Lemak <ul style="list-style-type: none"> Biosintesa Asam lemak Pengaturan Metabolisme Kelainan Metabolisme Asam lemak. 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/google classroom/zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
7	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme asam amino dalam kehidupan sehari-hari	Biosintesis Asam Amino dan Nukleotida <ul style="list-style-type: none"> Mekanisme Biosintesis Asam Amino Mekanisme Biosintesis Nuleotida Pengaturan Metabolisme Asam Amino Pengaturan Metabolisme Nukleotida 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi dengan Membuat 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/google classroom/zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
8	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi DNA pada mahluk hidup.	Asam Nukleat <ul style="list-style-type: none"> Sejarah Perkembangan DNA Struktur DNA dan RNA Replikasi DNA DNA Sebagai Materi Genetik 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/google classroom/zoom meeting/LKM (150 menit)	2,3
9			- Ujian Tengah Semester		-		1,5 Jam	
10	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi gen, genom, kromosom, kode genetik, transkripsi dan translasi.	Eksprei Genetik <ul style="list-style-type: none"> Gen Genom Kromosom Kode Genetik Transkripsi Translasi 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
11	Sub-CPMK4	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi mutagenesis pada mahluk hidup dan dampak yang diakibatkan dalam kehidupan sehari-hari.	Mutagenesis <ul style="list-style-type: none"> Jenis-jenis Mutasi Gen Penyakit Kelainan Genetik Pengendalian Mutasi Gen 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3





12	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi enzim restriksi dan vector kloning gen.	Enzim Restriksi <ul style="list-style-type: none"> • Enzim Restriksi • Vektor • Sel Inang 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
13	Sub-CPMK5	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi kloning dalam kehidupan sehari-hari.	Kloning Gen <ul style="list-style-type: none"> • Pembuatan DNA Rekombinan • Seleksi DNA Rekombinan 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
14	Sub-CPMK5	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi sekuensing dan analisis homologi dalam kehidupan sehari-hari.	Sekuensing <ul style="list-style-type: none"> • Sekuensing DNA • Analisis Homologi 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
15	Sub-CPMK5	Mahasiswa Mampu mengkaji Aplikasi Kloning dalam kehidupan sehari-hari	Aplikasi DNA Rekombinan <ul style="list-style-type: none"> • Aplikasi Pada Bidang Kesehatan • Aplikasi Pada Bidang Forensik • Aplikasi Pada Bidang Pertanian 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran luring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat 	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes	Tatap muka Power point/video pembelajaran/LKM (150 menit)	1,2,3
16			Ujian Akhir Semester				1,5 Jam	



UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN KIMIA

RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER (RPS)
(Daring 100%)

Mata Kuliah	: Biokimia 2
Kode / SKS	: GKM328317/3
Semester	: 6
Dibuat	: Indralaya, 14 Mei 2021

Dosen Pengampu		Diperiksa oleh	Disetujui oleh
			
Drs. Made Sukaryawan, M.Si., PhD NIP. 196508051991021001	Dr. Diah Kartika Sari, M.Si NIP.198405202008012010	Drs. K. Anom W., M.Si NIP 195904061984031001 (Penjamin Mutu Prodi PKimia)	Dr. Effendi, M.Si NIP 196010061988031002 (Koordinator Prodi PKimia)

Kode	CPL Prodi yang dibebankan pada mata kuliah
CPL-S9	Menunjukkan sikap bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri;
CPL-P1	Mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora yang sesuai dengan bidang keahliannya;
CPL-P5	Menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah;
CPL-KU3	Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni.
Kode	Capaian Pembelajaran Mata Kuliah (CPMK)
CPMK-1	Mahasiswa mampu bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri (CPL-S9);
CPMK-2	Mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora yang sesuai dengan bidang keahliannya (CPL-P1);
CPMK-3	Mahasiswa menguasai pondasi metode saintifik dan integritas akademik serta prinsip-prinsip penggunaan Teknologi Informasi dan Komunikasi dalam pembelajaran kimia, penelitian dan karya ilmiah (CPL-P5);
CPMK-4	Mampu mengkaji implikasi pengembangan atau implementasi ilmu pengetahuan dan teknologi yang memperhatikan dan menerapkan nilai humaniora sesuai dengan keahliannya berdasarkan kaidah, tata cara dan etika ilmiah dalam rangka menghasilkan solusi, gagasan, desain atau kritik seni (CPL-KU3).
Kode	Kemampuan akhir tiap tahapan belajar (Sub-CPMK)
Sub-CPMK1	Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami metabolisme makhluk hidup (CPMK-1);
Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme dalam kehidupan sehari-hari (CPMK-2);
Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik dalam materi DNA, Gen dan Kloning (CPMK3);
Sub-CPMK4	Mampu mengkaji implikasi mutagenesis pada makhluk hiup dalam kehidupan sehari-hari (CPMK4);
Sub-CPMK5	Mampu mengkaji implikasi kloning gen dalam kehidupan sehari-hari (CPMK4);
Deskripsi Singkat Mata Kuliah	

Perkuliahan ini membahas bagaimana menganalisis konsep bioenergetika anabolisme dan katabolisme dalam pembentukan energi yang berasal dari biomolekul; Menggunakan konsep informasi genetik untuk aplikasi diberbagai bidang kehidupan; dan Menganalisis pengaturan metabolisme biomolekul dan hubungannya dengan gangguan metabolisme yang umum terjadi.

Pustaka	<ol style="list-style-type: none">1. Lehninger, A.L. 2017. <i>Principles of Biochemistry</i> 7th edition2. Denise R. F. 2017. <i>Biochemistry</i> 7th edition3. David P.C. 2009. <i>Biotechnology</i>4. Wirahadi K.M . 2014. <i>Dasar-dasar Biokimia</i>
---------	---

Pertemuan Ke	Kemampuan akhir tiap tahapan belajar	Materi pelajaran	Metode Pembelajaran	Pengalaman Belajar	Teknik Penilaian	Waktu dan Media	Daftar referensi
1	Sub-CPMK1 Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme glukosa.	Katabolisme Glukosa: • Glikolisis • Energi Katabolisme • Pengaturan Katabolisme	5 Fhasa Nedham - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi	Pembelajaran Daring: - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4
2	Sub-CPMK1 Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami siklus asam sitrat	Siklus Asam Sitrat • Mekanisme Siklus Asam Sitrat • Pengaturan Siklus Asam Sitrat • Transport elektron dan Fosforilasi Oksidatif	5 Fhasa Nedham - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi	Pembelajaran Daring: - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: k Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4
3	Sub-CPMK1 Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme asam lemak.	Katabolisme Asam Lemak • Katabolisme Asam lemak berkarbon genap • Katabolisme Asam Lemak berkarbon ganjil • Katabolisme Asam lemak tak jenuh • Energi Katabolisme Pengaturan Katabolisme	5 Fhasa Nedham - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi	Pembelajaran Daring: - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Submit laporan	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4
4	Sub-CPMK1 Mahasiswa mampu menunjukkan sikap tanggungjawab untuk memahami katabolisme asam amino.	Katabolisme Asam Amino • Siklus Urea • Energi katabolisme • Pengaturan Katabolisme	5 Fhasa Nedham - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi	Pembelajaran Daring: - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan	1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,4

5	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme karbohidrat dalam kehidupan sehari-hari.	Biosintesis Karbohidrat <ul style="list-style-type: none"> Biosintesis Karbohidrat dalam Jaringan Hewan Pengaturan metabolisme Kelainan Metabolisme Karbohidrat 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> Prates Aktifitas diskusi. Tugas Mandiri: Submit makalah Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
6	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme asam lemak dalam kehidupan sehari-hari.	Biosintesa Asam Lemak <ul style="list-style-type: none"> Biosintesa Asam lemak Pengaturan Metabolisme Kelainan Metabolisme Asam lemak. 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> Prates Aktifitas diskusi. Tugas Mandiri: kumpul makalah Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
7	Sub-CPMK2	Mahasiswa mampu menerapkan pemikiran logis, kritis, sistematis, inovatif, dalam konteks peranan metabolisme asam amino dalam kehidupan sehari-hari	Biosintesis Asam Amino dan Nukleotida <ul style="list-style-type: none"> Mekanisme Biosintesis Asam Amino Mekanisme Biosintesis Nukleotida Pengaturan Metabolisme Asam Amino Pengaturan Metabolisme Nukleotida 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> Prates Aktifitas diskusi. Tugas Mandiri: Submit makalah Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
8	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi DNA pada mahluk hidup.	Asam Nukleat <ul style="list-style-type: none"> Sejarah Perkembangan DNA Struktur DNA dan RNA Replikasi DNA DNA Sebagai Materi Genetik 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> Orientasi Pencetusan ide Penstrukturan Ide Aplikasi Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> Presentasi tugas klp Mengamati video/PW/LKM Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan Mengaplikasikan pengetahuan Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> Prates Aktifitas diskusi. Tugas Mandiri: Submit makalah Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	2,3
9			- Ujian Tengah Semester		-		1,5 Jam	

10	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi gen, genom, kromosom, kode genetik, transkripsi dan translasi.	Ekspresi Genetik <ul style="list-style-type: none"> • Gen • Genom • Kromosom • Kode Genetik • Transkripsi • Translasi 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
11	Sub-CPMK4	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi mutagenesis pada makhluk hidup dan dampak yang diakibatkan dalam kehidupan sehari-hari.	Mutagenesis <ul style="list-style-type: none"> • Jenis-jenis Mutasi Gen • Penyakit Kelainan Genetik • Pengendalian Mutasi Gen 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: kumpul makalah 4. Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
12	Sub-CPMK3	Mahasiswa menguasai pondasi saintifik materi enzim restriksi dan vector kloning gen.	Enzim Restriksi <ul style="list-style-type: none"> • Enzim Restriksi • Vektor • Sel Inang - 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
13	Sub-CPMK5	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi kloning dalam kehidupan sehari-hari.	Kloning Gen <ul style="list-style-type: none"> • Pembuatan DNA Rekombinan • Seleksi DNA Rekombinan 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan membuat laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
14	Sub-CPMK5	Mahasiswa mampu mengkaji implikasi sekuensing dan analisis homologi dalam kehidupan sehari-hari.	Sekuensing <ul style="list-style-type: none"> • Sekuensing DNA • Analisis Homologi 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3

15	Sub-CPMK5	Mahasiswa Mampu mengkaji Aplikasi Kloning dalam kehidupan sehari-hari	Aplikasi DNA Rekombinan <ul style="list-style-type: none"> • Aplikasi Pada Bidang Kesehatan • Aplikasi Pada Bidang Forensik • Aplikasi Pada Bidang Pertanian 	5 Fhasa Nedham <ul style="list-style-type: none"> - Orientasi - Pencetusan ide - Penstrukturan Ide - Aplikasi - Refleksi 	Pembelajaran Daring: <ul style="list-style-type: none"> - Presentasi tugas klp - Mengamati video/PW/LKM - Pencetusan dan penstrukturan pengetahuan - Mengaplikasikan pengetahuan - Merefleksi dengan - Membuat dan submit laporan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prates 2. Aktifitas diskusi. 3. Tugas Mandiri: Submit makalah 4. Postes 	e-learning Unsri/ google classroom/ zoom meeting/LKM (150 menit)	1,2,3
16			Ujian Akhir Semester				1,5 Jam	

BIODATA PENULIS



Drs. Made Sukaryawan, M.Si., Ph.D merupakan dosen Pendidikan Kimia FKIP UNSRI yang lahir di Karang Asem pada tanggal 5 Agustus 1965. Beliau menyelesaikan studi S1 Pendidikan Kimia di Universitas Sriwijaya tahun 1990. S2 Kimia-Biokimia di Institut Teknologi Bandung tahun 1998 dan melanjutkan kuliah S3 pada Program Doktor Pendidikan Kimia di Universiti Pendidikan Sultan Idris yang selesai pada tahun 2019.



Diah Kartika Sari merupakan dosen Pendidikan Kimia FKIP UNSRI yang lahir di Palembang pada tanggal 20 Mei 1984. Beliau menyelesaikan studi S1 Pendidikan Kimia di Universitas Sriwijaya tahun 2006, S2 Kimia-Biokimia di Institut Teknologi Bandung tahun 2010 dan melanjutkan kuliah S3 pada Program Doktor Pendidikan IPA Universitas Pendidikan Indonesia yang selesai pada tahun 2017.