

UNIVERSALITAS MAKHLUK HIDUP

Universalitas makhluk hidup adalah suatu ciri utama yang sama atau hampir sama pada semua makhluk hidup. Adanya universalitas ini memudahkan kita mempelajari suatu makhluk hidup misalnya mempelajari bakteri akan dapat dijadikan sebagai dasar untuk mempelajari atau mengambil kesimpulan terhadap hewan. Siklus nitrogen yang merupakan komponen terpenting dalam pembentukan asam amino bermula dari kemampuan bakteri memfiksasi nitrogen bebas dari udara. Kemudian bakteri ini bersimbiosis dengan tumbuhan dan tumbuhan itulah yang menjadi sumber nitrogen bagi hewan dan manusia. Universalitas tersebut setidaknya meliputi:

1. Semua makhluk hidup tersusun atas 20 macam asam amino dan disandi oleh kodon yang sama yaitu Adenin (A), Timin (T), Guanin (G) dan Sitosin (C).
2. Adenosin Tri Fosfat (ATP) merupakan *energi currency* (mata uang energi) pada hampir seluruh makhluk hidup.
3. Pada makhluk hidup terdapat kemiripan metabolisme misalnya kesamaan metabolisme karbohidrat antara bakteri dengan sel manusia.

Kita dapat mengatakan bahwa karakteristik semua yang hidup adalah:

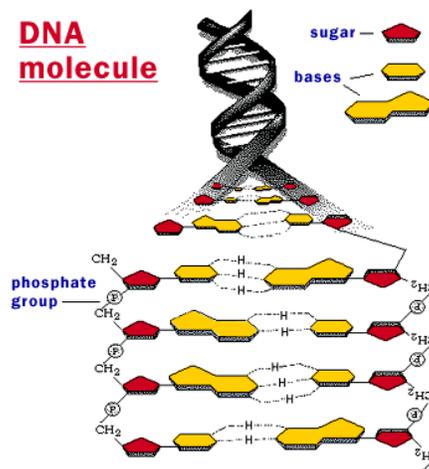
1. Terbuat dari elemen yang sama
2. Mereka hidup melalui aktifitas metabolisme
3. Mereka berinteraksi untuk mendapatkan energi dan bahan mentah
4. Mereka mampu merasakan dan merespon lingkungan
5. Reproduksi didasarkan instruksi yang terkandung dalam DNA.

Asam Nukleat

Asam nukleat berupa polimer nukleotida terdiri dari *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) dan *Ribose Nucleic Acid* (RNA). Satu nukleotida terdiri dari 1 basa nitrogen (N), 1 gula pentosa dan 1 asam monofosfat. Basa nitrogen terdiri dari

purin (adenin/A dan guanin/G), pirimidin (sitosin/C, timin/T dan urasil/U). Gula pentosa pada DNA adalah deoksiribosa sedangkan pada RNA adalah ribosa.

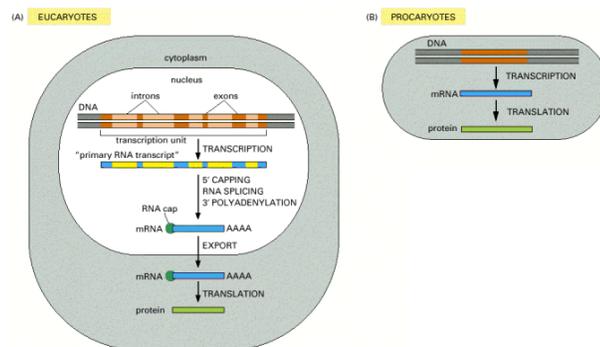
DNA merupakan dua untai polinukleotida membentuk formasi heliks ganda (*double helix*). Kedua untai berkomplemen pada basa dengan ikatan hidrogen yaitu: A dengan T dan C dengan G. Ikatan antar nukleotida pada gugus fosfat 5' nukleotida yang satu direduksi oleh gugus OH 3' dari nukleotida yang berdekatan membentuk ikatan fosfodiester.



Gambar 1. Skema rumus kimia asam nukleat yang terdiri dari gula dan fosfat sebagai tulang punggung dan basa nitrogen.

Struktur tiga dimensi DNA normal disebut struktur B yaitu: basa N ujung 5' untai polinukleotida yang satu berkomplemen dengan basa N ujung 3' dari polinukleotida pasangannya dan kedua untai polinukleotida membentuk struktur heliks-belitan searah jarum jam secara teratur mengelilingi sumbu tengah dengan jari-jari (R) sebesar 10 angstrom (10 \AA). Satu putaran penuh (360 derajat) dibentuk oleh 10 nukleotida, jarak satu putaran adalah 34 \AA , jarak antar nukleotida $34/10 = 3.4 \text{ \AA}$, sudut putaran adalah 10 \AA . Struktur yang tidak lazim (abnormal) adalah pengulangan GC, membentuk putaran berlawanan arah jarum jam (putar kiri) membentuk struktur Z (zig-zag).

Baik benda mati maupun makhluk hidup tersusun atas unit fundamental yang sama yaitu atom yang terdiri dari proton, elektron dan neutron. Dari atom inilah akan terbentuk molekul yang lebih besar yang menyusun benda mati dan makhluk hidup tsb. Pada tingkat makromolekul dari kehidupan terdapat perbedaan antara yang hidup dengan yang mati. DNA membawa rahasia hidup, DNA adalah molekul kehidupan. Sandi yang dibawa DNA merupakan rumusan bagi sejumlah protein yang memiliki fungsi struktural seperti porin maupun regulator seperti enzim. Enzim berfungsi mengkatalisis reaksi biokimia. Enzim mengatur laju kecepatan reaksi sehingga hidup ini terus berlanjut. Suatu pemahaman sederhana alur informasi dari DNA ke mRNA ke protein adalah konsep yang disebut *central dogma*. Sel berasal dari sel yang telah ada sebelumnya karena adanya salah satu ciri hidup yaitu reproduksi. Induk/orang tua akan mewariskan DNA kepada turunannya agar keturunan itu sama seperti induknya. Proses ini dapat berlangsung secara aseksual dari satu sel membelah menjadi dua atau seksual yaitu gabungan antara dua sel orang tua.



Gambar 2. Arah informasi genetik yang dikenal dengan *central dogma* yaitu dari DNA ke RNA (transkripsi) kemudian ke protein (translasi).

Energi

Segala yang ada di semesta ini memiliki energi yaitu kemampuan untuk melakukan kerja/usaha. Terdapat beberapa macam energi dan tidak ada sesuatu

yang terjadi kecuali adanya energi, tanpa energi organisme tidak dapat hidup, tumbuh dan bereproduksi. Metabolisme dapat didefinisikan sebagai kemampuan organisme untuk mendapatkan dan mengubah/mengkonversi energi dari lingkungannya, menggunakan untuk memelihara aktifitas hidupnya, untuk tumbuh dan bereproduksi.

Makhluk hidup dapat merasakan dan mengubah lingkungannya karena memiliki reseptor yang mampu mendeteksi stimulus spesifik. Stimulus adalah suatu bentuk perubahan energi di lingkungan seperti panas, cahaya dan suara. Sel akan menyesuaikan aktifitas metabolismenya dalam merespon stimulus. Organisme merespon perubahan energi dan kondisi operasional internal dalam cakupan yang amat sempit yang disebut homeostasis-yaitu sesuatu batasan kehidupan yang fisiologis.

Organisasi Kehidupan

Biosfer adalah semua bagian berupa air, tanah dan atmosfer dimana organisme berada. Ekosistem adalah komunitas dan lingkungan fisiknya. Komunitas adalah populasi dari semua spesies yang mendiami area yang sama. Populasi adalah kelompok individu sejenis yang mendiami suatu area tertentu. Organisme multiseluler adalah individu yang berisi sel yang saling tergantung satu sama lainnya membentuk organisasi berupa jaringan, organ dan sistem organ. Sistem organ adalah interaksi dua atau lebih organ dalam rangka menjaga kehidupan keseluruhan organisme tsb misalnya sistem pernafasan.

Organ adalah gabungan sejumlah jaringan dalam rangka membentuk tugas/fungsi tertentu misalnya organ timus. Jaringan adalah sekelompok sel yang sama dan substansi yang mengelilinginya yang memiliki aktifitas khusus misalnya jaringan darah. Sel adalah unit terkecil dimana kehidupan dan reproduksi berlangsung. Organel adalah bagian sel yang dibatasi oleh suatu membran yang memiliki tugas khusus. Atom adalah substansi dasar (fundamental), dapat disebut juga elemen. Partikel subatom adalah elektron, proton atau neutron.

Ketergantungan Antar Kehidupan

Ketergantungan antar makhluk hidup tercermin dengan adanya produsen dan konsumen. Produsen adalah tumbuhan atau organisme lainnya yang dapat membuat makanannya sendiri. Secara umum proses pembuatan makanan itu disebut fotosintesis. Konsumen adalah hewan yang mengkonsumsi tumbuhan atau hewan lainnya. Mereka tergantung kepada energi yang disimpan dalam jaringan produsen atau hewan. Dekomposer adalah organisme yang dapat memecah materi biologis menjadi bentuk yang lebih sederhana agar dapat digunakan kembali (*recycling*). Semua energi yang didapat oleh produsen dari matahari akan dikembalikan ke lingkungan.

Keanekaragaman

Saat ini setidaknya telah dikenal 6 Kingdom kehidupan yaitu:

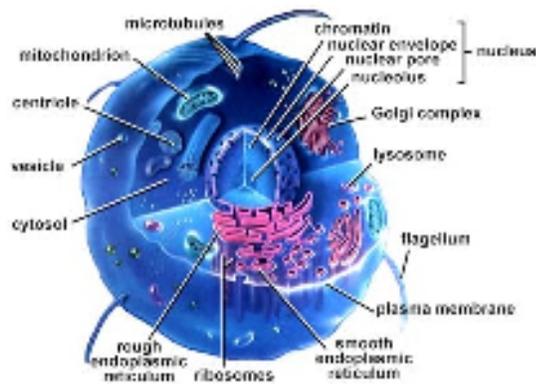
1. Kingdom *Archaeobacteria* (*Archae*) membentuk habitat anaerobik (oxygen-free), dapat hidup pada habitat yang ekstrem seperti bakteri di kawah gunung berapi.
2. Kingdom *Eubacteria* atau bakteri merupakan bentuk kehidupan yang paling sukses, ada dimana-mana termasuk dalam organisme lainnya.
3. Kingdom *Protista* adalah spesies berupa sel tunggal lebih besar dari bakteri dan merupakan eukariot misalnya ragi (*yeast*).
4. Kingdom *Fungi* mayoritas sebagai dekomposer dan sebagian sebagai parasit. Tanpa dekomposer dunia akan dipenuhi sampah.
5. Kingdom *Plantae* merupakan produsen multisel umumnya berfotosintesis
6. Kingdom *Animalia* adalah konsumen multisel yang memakan tumbuhan dan hewan

Sumber variasi (keragaman) pada makhluk hidup adalah mutasi dan evolusi. Mutasi adalah perubahan materi genetik, mutasi dapat menguntungkan, merugikan atau tidak ada pengaruh terhadap kehidupan suatu organisme. Evolusi yaitu perubahan suatu DNA dimana lingkungan menyeleksi perubahan ini dan

akan terjadi perubahan secara bertahap (gradual). Seleksi alam adalah hasil dari mekanisme bertahan hidup dari suatu populasi. Organisme yang lolos seleksi akan bertahan hidup dalam populasi dan dapat menurunkan genomnya ke generasi berikut.

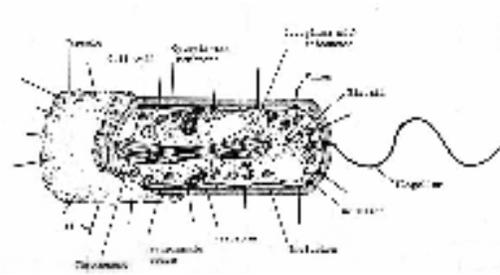
STRUKTUR DASAR KEHIDUPAN: SEL

Sel merupakan unit terkecil dari kehidupan. Semua makhluk hidup disusun oleh unit-unit yang mempunyai struktur dasar yang disebut sel. Berdasarkan susunan selnya makhluk hidup terdiri dari makhluk uniseluler misalnya bakteri, protozoa dan ragi dan makhluk multiseluler seperti hewan dan tumbuhan. Makhluk multiseluler umumnya terdiri dari jutaan/milyaran sel dan memiliki tingkatan (hirarki) pengorganisasian sel yaitu sel, jaringan, organ dan sistem organ.



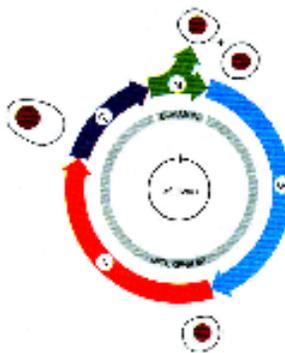
Gambar 3. Skema sel eukariot

Diperkirakan kehidupan berupa sel prokariot telah mulai sejak 4 milyar tahun yang lalu. Selama 2 milyar tahun bumi hanya dihuni oleh sel prokariot ini. Sedimen yang tersusun atas sel prokariot tertua berusia 3.8 milyar tahun ditemukan di Greenland. Fosil sel prokariot berusia 3.5 milyar tahun ditemukan di Western Australia dan South Africa. *Anoxygenic photosynthesis* yaitu bakteri fotosintesis yang bersifat anaerobik dan tidak memproduksi O_2 mendahului munculnya *oxygenic photosynthesis* (sel tumbuhan yang memproduksi O_2). Diduga *oxygenic photosynthesis* berasal dari *cyanobacteria*. Sel eukariot yang kompleks baru muncul sekitar 1.5 – 2 milyar tahun yang lalu.



Gambar 4. Skema sel bakteri (prokariot).

True bacteria atau bakteri sebenarnya merupakan bagian dari Kingdom Eubacteria (*bacteria*), sedangkan organisme yang dapat hidup dalam lingkungan ekstrem termasuk dalam kingdom *Archaeobacteria*. Morfologi keduanya serupa tetapi secara biokimiawi berbeda yaitu tidak memiliki nukleus dan dikelompokkan sebagai prokariot. Mayoritas *Archaea* hidup dalam lingkungan seperti air sulfur dengan suhu 80° C dan pH 2 (*thermoacidophiles*), lingkungan mengandung metan (*methanogens*) atau garam konsentrasi tinggi (*extreme halophiles*). *Archaea* dan bakteri berbeda secara mendasar dengan eukariot dalam hal ketiadaan membran inti, *multiple chromosome* dan ketiadaan organel seperti mitokondria, kloroplas, golgi apparatus, vakuola dsb. Selain itu *Archaea* dan bakteri tidak berdiferensiasi membentuk multisel sebagaimana eukariot.



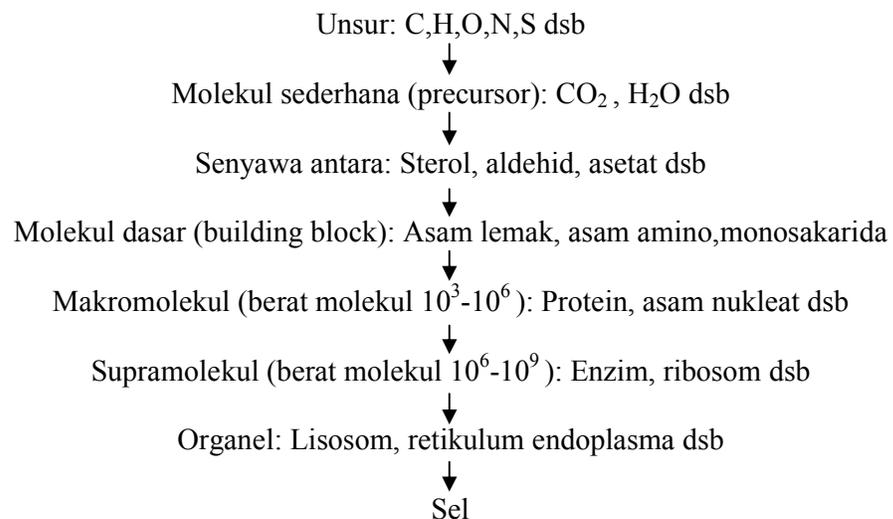
Gambar 5. Siklus sel eukariot.

Sel eukariot merupakan struktur yang terdiri dari komponen sistem membran, organel, sitosol dan sitoskeleton. Sel eukariot mengalami siklus sel

untuk tumbuh dan kembang (diferensiasi) yang terdiri dari mitosis dan interfase. Interfase berlangsung lebih lama dibandingkan dengan mitosis. Interfase terdiri dari: fase S yaitu fase sintesa DNA, fase G1 yaitu fase antara mitosis dan sintesa DNA dan fase G2 yaitu fase persiapan mitosis. Beberapa jenis sel seperti sel saraf memiliki fase Go yaitu fase dorman atau tidak aktif. Fase mitosis terdiri dari profase, metafase, anafase dan telofase.

Selain itu terdapat pula struktur bukan sel tetapi terdiri dari komponen-komponen sel dan dapat menunjukkan ciri kehidupan ketika berinteraksi dengan sel atau makhluk hidup yaitu virus. Baik virus, prokariot maupun eukariot memiliki selubung dan molekul substantif yang mengatur aktivitasnya yaitu asam nukleat (DNA dan atau RNA).

Unsur-unsur yang menyusun sel adalah unsur mayor yaitu Hidrogen (H), Karbon (C), Oksigen (O) dan Nitrogen (N). Unsur minor yaitu Fosfor (P), Sulfur (S), Natrium (Na), Kalium (K), Magnesium (Mg), Kalsium (Ca) dan Klorida (Cl). Unsur renik (*trace elemen*) yaitu Ferrum (Fe), Mangan (Mn), Kobal (Co), Zinc (Zn) dan Cuprum (Cu). Organisasi molekuler dari suatu sel dapat digambarkan dalam diagram berikut ini:



Biomolekul adalah molekul yang berperan dalam fungsi hidup-yang terdiri dari:

1. Air dan Ion

Sebagian besar sel terbuat dari air. Air merupakan pelarut terpenting bahkan satu-satunya pelarut untuk makhluk hidup karena ikatan antar molekulnya demikian kuat, menyerap panas, stabil dan sangat *inert* (tidak dapat dioksidasi lagi). Ion/logam merupakan salah satu komponen pengatur pH, menentukan struktur dan fungsi makromolekul misalnya senyawa heme pada molekul hemoglobin.

2. Mikromolekul

Mikromolekul adalah molekul-molekul organik dalam ukuran kecil atau sedang di dalam sel yang berfungsi sebagai sumber energi misalnya glukosa, sebagai pembangun (*building block*) misalnya selulosa, kolagen, keratin, DNA dsb, sebagai caraka antar sel/intra sel (*second messenger*) misalnya cAMP, sebagai kofaktor misalnya vitamin dan sebagai alat penukar energi misalnya ATP.

3. Makromolekul

Fungsi utama makromolekul adalah mendukung 3 fungsi dasar kehidupan yaitu gerak (lokomotif) misalnya flagel pada bakteri, gradien/mempertahankan perbedaan antar kompartemen dalam sel misalnya perbedaan antara nukleus dengan sitoplasma dan fungsi reproduksi/replikasi. Makromolekul terdiri dari protein, lipid dan karbohidrat.

Protein merupakan suatu heteropolimer yang tersusun dari asam amino berbeda, yang terikat satu sama lain dengan ikatan peptida, yang terbentuk atas arahan DNA dalam sel. Beberapa virus membentuk protein dengan arahan RNA yaitu virus dengan genom RNA misalnya virus Picorna. Protein memiliki 4 macam struktur yaitu struktur primer berupa sekuen asam amino, struktur

sekunder yaitu interaksi antara dua atau lebih struktur sekunder, struktur tersier yaitu formasi protein membentuk struktur besar seperti globus misalnya pada imunoglobulin dan struktur kuaterner yaitu suatu oligomer besar misalnya enzim kompleks. Protein memiliki fungsi yang sangat luas mulai dari pembangun struktur organel atau bagian dari sel hingga fungsi enzimatik.

Karbohidrat merupakan turunan aldehyd atau keton dari polialkohol. Karbohidrat dapat dikelompokkan menjadi monosakarida yaitu unit terkecil karbohidrat dan tidak dapat dihidrolisis menjadi karbohidrat yang lebih sederhana misalnya glukosa (heksosa). Disakarida seperti maltosa dan laktosa dapat dihidrolisa misalnya menjadi alfa monosakarida. Oligosakarida dapat dihidrolisa menjadi sejumlah monosakarida, jumlahnya sangat sedikit tetapi penting untuk kehidupan misalnya antigen A dan B pada golongan darah ABO. Polisakarida dapat dihidrolisa menjadi serangkaian monosakarida yang homogen misalnya amilum pada bakteri atau glikogen pada manusia. Karbohidrat berfungsi sebagai sumber energi, cadangan energi, pendukung misalnya mukopolisakarida bakteri, metabolit antara misalnya *paraamino benzoic acid* (PABA) pada bakteri dan pengenalan antar sel misalnya glikoprotein pada kebanyakan bakteri patogen.

Lipid merupakan senyawa yang relatif tidak larut dalam air atau pelarut polar tetapi larut dalam pelarut non polar. Berdasarkan hasil hidrolisisnya, lipid dapat dikelompokkan menjadi lipid sederhana dapat dihidrolisa menjadi asam lemak dan alkohol misalnya zat lilin (*wax*), lipid majemuk dihidrolisa menjadi asam lemak, alkohol dan senyawa lainnya misalnya fosfolipid, turunan lipid yaitu hidrolisa lipid yang bukan lipid sederhana atau lipid majemuk misalnya kolesterol. Lipid berfungsi sebagai sekat/isolator misalnya myelin pada saraf, sebagai cadangan energi, sebagai bantalan jaringan, sebagai caraka misalnya hormon steroid, sebagai penghantar sinyal misalnya rodopsin pada bakteriorodopsin dan sebagai deterjen misalnya mengemulsi garam empedu.

Cara Mempelajari Sel

Berbagai metode digunakan untuk mempelajari sel baik mempelajari struktur, fungsi maupun keduanya. Metode mempelajari sel ini dapat dilakukan pada sel mati (difiksasi) misalnya dengan mikroskop cahaya dan pada sel hidup misalnya biakan bakteri. Berikut ini akan dipaparkan beberapa metode yang digunakan untuk mempelajari sel.

Teknik mikroskopi adalah metode mempelajari sel secara visual. Teknik ini diperlukan karena mata kita tanpa alat bantu memiliki keterbatasan penglihatan yaitu hanya memiliki *resolving power* (RP) $100\mu\text{M}$, untuk ukuran lebih kecil dari itu tidak mampu dilihatnya. Sedangkan kita tahu bahwa bakteri/sel umumnya memiliki ukuran lebih kecil dari $100\mu\text{M}$. Mikroskop cahaya atau *compound microscope* memiliki RP antara $0.2 - 0.8\mu\text{M}$ ini berarti dapat digunakan untuk mempelajari sel dalam keadaan utuh, karena ukuran sel rata-rata antara $1-50\mu\text{M}$. Beberapa modifikasi mikroskop cahaya adalah mikroskop floresen (menggunakan zat berpendar), mikroskop fase kontras dan mikroskop lapangan gelap. Mikroskop floresen umumnya digunakan untuk melihat struktur spesifik di dalam sel misalnya kromosom. Mikroskop fase kontras biasanya digunakan untuk melihat sel dalam keadaan utuh (hidup), sedangkan mikroskop lapangan gelap digunakan untuk melihat sel dengan latar belakang gelap misalnya bakteri *Treponema pallidum*. Untuk melihat bentuk sel biasanya sel dibuat statis agar bentuk dan susunannya tidak berubah. Sel dimatikan/difiksasi, diwarnai dan diawetkan. Mikroskop elektron memiliki RP lebih tajam dibandingkan mikroskop cahaya yaitu $2-4 \text{ nM}$ (nano meter) sehingga dapat digunakan untuk visualisasi makromolekul dalam sel atau virus.

Teknik biokimia bertujuan untuk mempelajari sel secara analitik yaitu menganalisa organisasi molekuler sel dan peran molekul tersebut (metabolisme). Pada eukariot umumnya molekul yang akan dipelajari diisolasi dan dianalisa sifat fisik, kimia dan biologi sehingga dapat diinterpretasikan fenomena kehidupan sel seperti struktur/organisasi sel, metabolisme, reproduksi, motilitas dsb. Pada

prokariot/bakteri umumnya dilakukan uji biokimiawi untuk menilai aspek metabolisme dan gerak bakteri. Pemecahan/penghancuran sel eukariot sebelum dianalisa mutlak diperlukan. Pemecahan ini dapat dilakukan dengan larutan hipotonus, sonikasi (getaran), deterjen, pemberian enzim litik dan homogenizer. Setelah didapatkan homogenat (hasil dari penghancuran sel) maka dilakukan analisa fraksi sel misalnya analisa protein dengan cara sentrifugasi, kromatografi, elektroforesis, isoelectric focusing, radiografi dan spektroskopi.

Biakan *in vitro* bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan sel, diferensiasi, fisiologi dan biokimia serta proses penuaan dan kematian sel. Pada teknik ini digunakan pendekatan sedemikian rupa sehingga dihasilkan biakan yang sama atau mendekati kondisi aslinya (*in vivo*). Sel ditumbuhkan dalam media kultur dan diberi perlakuan yang memenuhi syarat bagi kehidupan/pertumbuhan sel. Pada awalnya para peneliti menggunakan serum binatang sebagai media, tetapi saat ini telah tersedia media sintesis yang berisi larutan fisiologis, bahan-bahan metabolit yang diperlukan oleh sel, *growth factor* seperti hormon, prekursor biosintesis dan *carrier* seperti transferin pembawa zat besi. Pada bakteri umumnya hanya diperlukan media dan substrat yang sesuai untuk pertumbuhan karena bakteri telah memiliki enzim metabolik sendiri. Pada sel hewan/manusia pertama harus dipisahkan dari jaringan misalnya dengan enzim kolagenase, dibiakan dalam kondisi tertentu misalnya sesuai suhu tubuh manusia. Kultur primer adalah kultur yang berasal dari jaringan yang langsung diambil dari manusia/hewan. Kultur sekunder adalah kultur sel yang berasal dari kultur primer, dipindahkan ke media baru. Prosesnya disebut replating dan pemindahannya disebut *passage*.

Teknik biomolekuler ditujukan untuk mempelajari asam nukleat, regulasi dan ekspresinya (produk) yaitu protein. Proses ini meliputi kajian genomik yaitu mengkaji asam nukleat dan kajian pascagenom yaitu mengkaji protein. Teknik paling awal dalam mengkaji genom adalah deteksi kromosom dengan cara melisis sel. Dengan cara ini dapat diketahui bahwa jumlah kromosom manusia adalah 46 buah atau 23 pasang. Metode yang dikembangkan selanjutnya adalah deteksi asam nukleat (DNA) dengan cara hibridisasi. Pada metode ini dibuat pelacak

(*probe*) yang merupakan untaian asam nukleat yang kira-kira *matching* dengan DNA yang akan dideteksi. Ketepatan metode ini rerata dibawah 80%. Teknologi paling akurat untuk mendeteksi asam nukleat adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang memiliki ketepatan hingga 100%. Pada metode ini suatu segmen asam nukleat diperbanyak (diampifikasi) menggunakan panduan *primer* yaitu batasan sekuen basa nitrogen yang ada pada hulu atau hilir segmen yang dimaksud. Asam nukleat yang diperbanyak akan dengan mudah divisualisasi dengan elektroforesis. Ketepatan deteksi sekuen nukleotida dapat dilakukan dengan metode sekuensing. Saat ini sekuensing telah dilakukan dengan *computerized* sehingga hasilnya dapat dianalisa dengan lebih akurat. Teknologi yang telah disebutkan adalah mengolah asam nukleat dalam keadaan sel yang mati. Pada saat ini para ahli biomolekuler telah merambah riset rekayasa asam nukleat pada sel hidup bahkan pada makhluk hidup utuh yaitu kultur sel dengan gen yang dimodifikasi, kloning dan pembuahan *in vitro*.

Bioteknologi

Bioteknologi kedokteran adalah metode rekayasa sel dan atau komponennya (molekul) untuk tujuan diagnostik, terapi dan pencegahan. Setelah selesainya peta fisik genom manusia maka para ahli semakin intensif menggali fungsi gen manusia yang berjumlah sekitar 40 ribu. Uji coba ekspresi gen dilakukan baik *in vitro* maupun *in vivo* pada hewan coba. Beberapa riset telah berhasil seperti pengembangan protein rekombinan, antibodi monoklonal dan vaksin rekombinan. Sementara itu masih sangat banyak kegagalan atau keterbatasan pengetahuan tentang dasar molekul suatu penyakit seperti infeksi HIV/AIDS, malignansi dan degenerasi.

Riset biomolekuler saat ini tidak dapat dipisahkan dengan komputer atau bioinformatika. Beribu-ribu perangkat lunak (*software*) telah diciptakan dan digunakan untuk menganalisa hasil riset dan memprediksi hasil tersebut atau intrapolasi antar organisme. Peralatan canggih serba robotik pun digunakan

seperti *multiple pipet* pada teknologi DNA *microarray*. Teknik kloning kini jauh lebih berkembang dengan adanya rekayasa sel punca (*stem cell*).

Perkembangan pesat di bidang bioteknologi kedokteran telah memberikan harapan sekaligus kekhawatiran. Harapan terutama pada penemuan gen atau kumpulan gen yang mendasari suatu penyakit kemudian gen tersebut dimodifikasi atau dibuatkan penawarnya (obat) sehingga penyakit yang bersangkutan dapat disembuhkan. Pengetahuan tentang dasar molekuler kanker telah membuka peluang untuk melakukan manipulasi pada siklus sel yaitu mengembalikan siklus sel kanker ke siklus normal seperti semula dengan merekayasa gen pengendali apoptosis atau menghentikan gen penyandi keganasan. Di sisi lain kekhawatiran muncul pada rekayasa pembuahan *in vitro* dan kloning. Pada pembuahan *in vitro* (bayi tabung) sangat mungkin diabaikan etika, moral dan agama manakala tidak dilakukan pembatasan tentang donor dan resipien dan penyimpanan embrio serta kemungkinan manipulasi gennya. Kekhawatiran yang lebih besar yang saat ini menjadi perhatian serius seluruh dunia adalah kemungkinan kloning manusia. Setelah keberhasilan para ahli pada kloning domba Dolly maka sangat mungkin ada yang berusaha mencoba mengkloning manusia. Jika ini benar-benar terwujud maka akan rusak tatanan sosial kemasyarakatan terutama tatanan keluarga dan dapat terjadi jual beli organ/anggota tubuh dengan *massive*.

Masalah lain yang belum terpecahkan meskipun pengetahuan biomolekuler tentang hal ini sudah demikian rinci adalah masalah penyakit infeksi seperti tuberkulosis, malaria, HIV/AIDS. Tampaknya manusia kalah cepat dalam bersaing dengan kuman penyebab infeksi tersebut. Tuberkulosis misalnya telah dikenal dan ditemukan obatnya lebih dari 100 tahun yang lalu, akan tetapi saat ini justru prevalensinya meningkat. Resistensi dan virulensi kuman yang meningkat diduga menjadi dasar yang melandasi kegagalan terapi. Hal serupa terjadi pada kasus malaria. Pada penyakit virus seperti HIV, terjadi mutasi pada virus yang demikian aktif sehingga sangat sulit merancang obat yang benar-benar tepat untuk menghentikan virus tersebut.

BIOINFORMATIKA

Bioinformatika adalah disiplin ilmu yang merupakan gabungan ilmu biologi, ilmu komputer dan teknologi informasi. Ilmu ini mengelola dan menganalisis data biologi menggunakan teknik komputasi canggih. Tujuan akhir bioinformatika adalah menemukan pemahaman baru yang dibangun dari prinsip-prinsip biologi. Komputer sangat membantu dalam hal menyatukan, menyimpan, menganalisis, mengintegrasikan data biologis dan genetik secara lebih efisien. Para ahli bioinformatika menyatakan bahwa bioinformatika merupakan infrastruktur elektronik dari biologi molekuler. Alat bantu bioinformatika dapat berupa program-program yang dapat diakses via internet dan *software* yang dijual secara komersial. Data bioinformatika meliputi struktur dan fungsi gen dan protein. Analisis dan interpretasi dilakukan terhadap berbagai tipe data biologi meliputi sekuen nukleotida dan asam amino, domain protein dan struktur protein. Analisis tersebut menjabarkan hal-hal sebagai berikut yaitu: DNA, RNA, protein, sekuen, struktur, evolusi, *pathways*, interaksi dan mutasi. Contoh data biologi yang digunakan dalam bioinformatika adalah: DNA (Genome), RNA (Transcriptome), Protein (Proteome), Comparative Genomics (Analisis antara spesies dan strain).

Beberapa spesies yang telah terpetakan genomnya adalah: Ragi, *Arabidopsis*, *H. influenza*, *E. Coli*, *Drosophila*, *C. elegans*, tikus, manusia, padi, nyamuk dan mencit. Data RNA meliputi: *Splice variants*, *tissue specific expression*, *struktur*, *single gene analysis* (cloning techniques), *experimental data* mencakup ribuan gen, DNA *Chips* dan *MicroArray* serta *Expression Array* Analisis untuk memahami sistem biologi. Beberapa informasi biologi molekuler yang melimpah antara lain: Sekuen berbeda tetapi sama fungsi, *single gene* yang memiliki multi fungsi, organisme yang memiliki beberapa gen serupa, *genomic sequence redundancy*. Data bioinformatika sangat diperlukan untuk aplikasi medis, memahami proses sehat dan sakit, polimorfisme, industri farmasi dan bioteknologi, disain obat berdasarkan struktur gen, aplikasi pertanian, resistensi.

ORGANISASI DAN FUNGSI GENOM

Genom adalah keseluruhan materi genetik yang terdapat dalam suatu organisme. Genom pada semua sel adalah DNA, sedangkan pada virus genom dapat berupa DNA atau RNA. Umumnya istilah genom mengacu pada DNA yang terdapat dalam kromosom, sedangkan DNA ekstrakromosom seperti DNA mitokondria (mtDNA) pada sel eukariot dan DNA plasmid pada prokariot disebut DNA ekstragenom. Fungsi dari genom adalah membawa materi hereditas yaitu materi yang akan diwariskan pada generasi berikut dan mengatur metabolisme melalui proses sintesis protein. Setiap kehidupan sel hanya dua hal pokok ini saja yang dilakukannya yaitu hidup dengan beraktivitas yaitu ber-metabolisme dan pada saatnya akan menurunkan anak atau progeni untuk kesinambungan generasi.

Fokus bahasan atau studi tentang genom adalah struktur dan organisasi DNA serta replikasinya. Oleh karena itu kajian demikian sering disebut sebagai genomik. Transkripsi untai DNA menjadi mRNA, translasi mRNA menjadi polipeptida, pembentukan protein dan metabolisme termasuk kajian pascagenomik (*postgenomic*). Kajian tentang transkripsi disebut *transcriptomic*, translasi polipeptida dan prosesing protein di Aparatus Golgi termasuk kajian *proteomic* sedangkan metabolisme termasuk kajian *metabolomic*.

Satuan genom sama dengan satuan DNA yaitu pasang basa (base pairs). Bukti menunjukkan bahwa jumlah bp genom suatu organisme tidak berkorelasi dengan tingkat efisiensi suatu organisme misalnya manusia memiliki genom 3,2 milyar bp dan sekitar 30.000 gen sementara sel ragi *Saccharomyces cerevisiae* memiliki genom 12.069 bp dan 6.300 gen. Dapat kita simpulkan bahwa ragi yang hanya memiliki genom sebesar 1/270 ribu dibanding genom manusia, ternyata memiliki jumlah gen seperlima dibanding jumlah gen manusia.

Materi genetik saat ini sudah diketahui dengan jelas yaitu DNA. Pada masa Gregor Mendel (tahun 1800-an) dikatakan adanya *inheritance factor*. Sekitar tahun 1927, Griffith berhasil menunjukkan bahwa *inheritance factor* yang dimaksud Mendel adalah suatu materi yang dapat mentransformasi sel atau *transforming material*. Tahun 1930-an ditemukan bukti bahwa *transforming*

material adalah suatu asam nukleat yang memiliki unsur basa Adenine, Guanine, Timin dan Cytosine dengan perbandingan yang tetap yaitu jumlah A sama dengan jumlah T dan jumlah G sama dengan jumlah G. Pada tahun 1950-an Watson dan Crick berhasil membuat model struktur DNA yang dikenal dengan bentuk *double helix*. Temuan ini menandai awal masa kajian genomik yang terus berkembang pesat dengan ditemukannya kode genetik (codon), hibridisasi asam nukleat, PCR, sekuensing, kloning dan kini *stem cell* serta *gene therapy*.

Gen adalah satuan fungsional dari suatu genom. Fungsional maksudnya akan diterjemahkan menjadi protein. Perlu diketahui bahwa genom adalah DNA yang berupa untaian basa ATCG. Pada manusia jumlah pasangan ATCG mencapai 3,2 milyar. Ternyata dari jumlah tersebut hanya sebagian kecil yang berupa gen yaitu sekitar 30 ribu gen atau sekitar 150 juta bp jika rerata 1 gen panjangnya 5000 bp. Pertanyaannya adalah jumlah 3 milyar bp genom manusia yang bukan gen, apa fungsinya? Sejauh ini baru diketahui bahwa fungsi bagian ini adalah sebagai *back up* atau cadangan.

Genom manusia dikemas secara sempurna di dalam kromosom yang berada dalam inti sel. Jumlah kromosom 23 pasang atau 46 buah terdiri dari 22 pasang kromosom badan atau autosom (22AA) dan 2 kromosom seks atau gonosom (XX atau XY). Kromosom tersusun atas DNA yang terpilin secara kuat dan rapi pada protein histon dan berbentuk *coiled* untuk efisiensi ruang. Dapat dibayangkan jika 3,2 milyar bp tersusun memanjang, maka sel manusia yang hanya berukuran sekitar 10 μm tidak akan mungkin mampu menampungnya! Selain DNA genom, manusia memiliki 16.000 bp DNA di dalam mitokondria yang fungsinya menyandi sebagian kecil protein mitokondria. Struktur kromosom ini sangat kokoh dan hanya terbuka pada saat proses mitosis dimana kromosom akan menjadi dua kali (*double*) untuk diwariskan pada sel berikutnya.

Struktur gen eukariot termasuk gen manusia terdiri dari 2 bagian yaitu bagian regulator dan bagian struktural. Bagian regulator terdiri dari *enhancer*, *silencer* dan promoter. Bagian struktural terdiri dari ekson dan intron. *Enhancer* adalah untaian nukleotida yang bila berikatan dengan protein tertentu akan meningkatkan laju transkripsi. Kebalikan dari *enhancer* adalah *silencer*. Promoter

adalah regio nukleotida tempat inisiasi enzim polimerase atau dengan kata lain tempat awal untuk dimulai transkripsi. Jika promoter dalam keadaan aktif maka transkripsi akan “on” dan sebaliknya. Ekson adalah bagian struktural yang akan diterjemahkan menjadi polipeptida sedangkan intron adalah bagian yang ditranskripsi kemudian akan mengalami pemotongan saat proses *splicing*. Mengapa intron ikut ditranskripsi tetapi kemudian dipotong, belum diketahui maknanya.

Genom prokariot besarnya sekitar 2 juta bp tetapi perbandingan relatif dengan jumlah gen-nya lebih efisien. Tidak ditemukan sekuen non gen pada prokariot, bahkan tidak ada intron sehingga proses transkripsi dan translasi dapat berlangsung simultan, tidak serial seperti pada eukariot. Struktur gen pada prokariot lebih sederhana yaitu tanpa *enhancer* dan *silencer* tetapi lebih efisien karena satu promoter dapat meregulasi beberapa struktur gen yang disebut sistem operon. Genom virus jauh lebih efisien, karena dengan open reading frame berbeda akan dihasilkan protein berbeda.

Isolasi dan identifikasi genom dapat dilakukan dengan metode isolasi DNA. Prinsip isolasi ini adalah mengekstraksi dari sel berinti misalnya lekosit dan memisahkannya dengan bagian lain dari sel. Proses pertama adalah melisis sel dengan detergen kemudian memisahkan DNA dari komponen lain sel dengan sentrifugasi. Protein yang ada dipisahkan dengan memberi protease. RNA yang ada dipisahkan dengan memberi RNase, maka tersisa DNA yang dapat dipresipitasi dengan etanol. DNA yang didapat disimpan dalam suhu -70°C jika kita ingin menggunakannya untuk jangka panjang (tahunan) dan dapat disimpan pada suhu -20°C jika kita ingin menggunakan sehari-hari. DNA genom yang kita peroleh sangat cukup jumlahnya, sebagai contoh dari 200 µl darah kita akan mendapatkan sekitar 150 µl air mengandung DNA. Untuk setiap reaksi PCR kita cukup menggunakan 5 µl sebagai *template* atau jumlah tersebut dapat digunakan untuk 20-30 kali PCR.

ALUR INFORMASI GENETIK: DOGMA SENTRAL

Setiap kita yang ingin memahami bagaimana metabolisme sel dan pewarisan sifat dari induk (parental) ke generasi berikutnya adalah dengan memahami mekanisme kerja DNA. Berbagai eksperimen dan kajian sampai pada kesimpulan bahwa mekanisme kerja DNA adalah replikasi, transkripsi dan translasi. Tiga proses ini dikenal dengan sebutan dogma sentral. Replikasi adalah proses menyalin secara utuh 2 untai DNA menjadi 2 untai yang baru. Transkripsi adalah proses menyalin salah satu untai DNA menjadi mRNA sedangkan translasi adalah proses penterjemahan mRNA menjadi polipeptida.

Replikasi terjadi sebelum fase mitosis agar pada saat mitosis dimana kromosom memadat dan menjadi *double* maka jumlah DNA telah 2 kali lipat. Teori paling mendekati kenyataan bahwa replikasi berlangsung secara semikonservatif yaitu DNA pada turunan (filial) berupa 1 untai DNA lama dari induk dan 1 untai DNA baru. Replikasi berlangsung sempurna artinya seluruh DNA genom disalin menjadi 2 yaitu 1 salinan baru dan 1 salinan DNA yang lama.

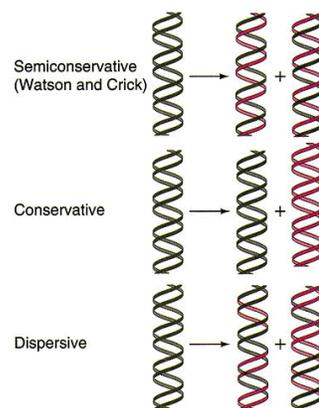
Materi genetik (DNA) yang terdapat pada suatu sel selalu dalam keadaan aktif karena senantiasa melakukan replikasi, transkripsi, translasi, reparasi (perbaikan) dan rekombinasi. Proses penyimpanan dan pemindahan informasi genetik dinyatakan dalam suatu dalil yang disebut dogma sentral, yang ditemukan oleh Francis Crick dan George Gamov pada tahun 1957. Prinsip dogma sentral bahwa DNA menjadi penentu jenis RNA yang selanjutnya akan diterjemahkan menjadi suatu protein.

Dogma yang berlaku universal ini menyatakan bahwa sekali informasi telah diteruskan menjadi protein, maka tidak dapat dikembalikan menjadi bentuk asalnya (DNA). Aliran informasi dari asam nukleat ke asam nukleat memang memungkinkan, tetapi aliran informasi dari protein ke asam nukleat atau dari protein ke protein tidak memungkinkan. Dogma sentral terdiri dari tiga tahap yaitu replikasi, transkripsi dan translasi. Tahap replikasi dilakukan untuk memasok DNA pada setiap organisme, sedangkan tahap transkripsi bertujuan

untuk menulis ulang DNA dalam bentuk mRNA (messenger RNA). Tahap translasi untuk menterjemahkan mRNA tersebut menjadi suatu protein

Replikasi

Replikasi atau proses biosintesis DNA berlangsung dengan komponen-komponen sebagai berikut : DNA polimerase yaitu enzim yang mengkatalis pemanjangan rantai nukleotida satu dengan yang lainnya, deoksiribonukleat trifosfat berupa dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Protein pembentang dan 20 protein enzim lainnya atau sistem replikasi DNA. DNA ligase yang mengkatalis reaksi penyambungan fragmen-fragmen hasil polimerisasi. DNA *template* (DNA induk untuk sintesis DNA baru) dan DNA primer (DNA awal untuk sintesis DNA baru).



Gambar 6. Tiga hipotesa tentang Model Replikasi DNA

Beberapa hipotesa diajukan untuk menjelaskan proses sintesa/replikasi DNA ini yaitu model konservatif, semikonservatif dan dispersif. Pada model konservatif disintesa masing-masing satu untai lama dan satu untai baru, kemudian kedua untai tersebut mensintesa komplemennya. Model ini tidak sesuai dengan struktur DNA yang ada. Demikian pula model dispersif, tidak mungkin terjadi sintesa secara berselang-seling antar yang lama dan yang baru semacam suatu *hybrid*. Sifat komplementer pada model DNA untai ganda (*double helix*) dari Watson dan Crick memberi kesan bahwa replikasi DNA terjadi secara

semikonsevatif. Dengan demikian, jika masing-masing untai pada molekul induk DNA untai ganda terpisah dari komplemennya saat replikasi, setiap bagian tersebut akan berfungsi sebagai cetakan (template), yang dengan cetakan ini disintesis sebuah untai komplementer yang baru. Tahap-tahap proses replikasi molekul DNA adalah sebagai berikut :

Replikasi DNA dimulai pada tempat-tempat khusus yang disebut pangkal replikasi (origin of replication). Pangkal replikasi yaitu satu bagian DNA yang mempunyai urutan nukleotida yang spesifik . Protein yang memulai replikasi DNA mengenali urutan ini dan menempel pada DNA, memisahkan kedua untai dan membuka sebuah ‘gelembung’ replikasi. Tahap pembukaan DNA untai ganda dikatalis oleh 3 macam enzim yaitu :

1. Helikase adalah sejenis enzim yang berfungsi membuka untai ganda di cabang replikasi, dan memisahkan kedua untai lama.
2. Enzim untai *destabilizing* protein , atau *single stranded DNA binding* protein (SSB) , molekul dari protein pengikat untai tunggal kemudian berjajar disepanjang untai-untai lama yang tidak berpasangan menjaga agar untai-untai ini tetap terpisah selama mereka bertindak sebagai cetakan untuk sintesis untai-untai komplementer yang baru
3. DNA girase, enzim ini mengkatalis pembukaan untai ganda sebelum proses replikasi dimulai .

Replikasi DNA kemudian berjalan dalam dua arah sampai seluruh molekul tersebut disalin. Setiap kromosom eukariot mempunyai ratusan atau ribuan pangkal replikasi. Gelembung replikasi terbentuk dan akhirnya menyatu, sehingga mempercepat penyalinan molekul DNA yang sangat panjang ini. Di setiap ujung gelembung replikasi terdapat cabang replikasi (replication fork), suatu daerah berbentuk huruf Y dimana untai DNA baru mulai memanjang.

Pemanjangan DNA baru pada cabang replikasi dikatalis oleh enzim-enzim DNA polimerase. Pada saat nukleotida-nukleotida berjejer dengan basa-basa komplementer sepanjang untai pola cetakan DNA nukleotida ini ditambahkan oleh polimerase, satu demi satu ke ujung yang baru tumbuh dari untai DNA yang

baru. Laju pemanjangan pada bakteri kurang lebih 500 nukleotida per detik sedangkan pada manusia 50 nukleotida per detik.

Struktur untai ganda ini akan mempengaruhi replikasi DNA. DNA polimerase menambahkan nukleotida hanya pada ujung 3' yang bebas dari untai DNA yang sedang terbentuk, tidak pernah pada ujung 5'. Jadi untai DNA baru dapat memanjang hanya pada arah 5'→3'. Di sepanjang salah satu untai cetakan, DNA polimerase dapat mensintesa untai komplementer yang kontinu memanjangkan DNA yang baru dengan arah 5'→3'. Untai DNA yang dibuat dengan metode ini disebut *leading strand*. Untuk memanjangkan untai baru DNA yang lain, polimerase harus bekerja disepanjang cetakan jauh dari cabang replikasi. Untai DNA yang disintesis dalam arah ini disebut *lagging strand*. Berbeda dengan *leading strand*, yang memanjang terus menerus, *lagging strand* pertama kali disintesis sebagai serangkaian segmen. Potongan ini disebut fragmen Okazaki, sesuai dengan nama ilmuwan Jepang yang menemukannya. Panjang fragmen-fragmen ini sekitar 100 sampai 200 nukleotida pada eukariot. Proses ini mengandung satu untai utuh DNA anak mengikuti DNA induk dan satu untai lagi fragmen berupa DNA anak. Fragmen anak ini kemudian dirangkaikan menjadi satu untai utuh oleh enzim DNA ligase sehingga akhirnya satu DNA untai ganda menghasilkan 2 DNA anak untai ganda dan seterusnya.

Fungsi-protein utama yang bekerja dalam replikasi DNA adalah:

1. Heliks ganda membuka, menyediakan cetakan DNA untai tunggal (kerja enzim helikase dan protein pengikat untai tunggal)
2. Sintesa leading strand: Priming (enzim primase), elongasi (enzim DNA polimerase), penggantian RNA dengan DNA (enzim DNA polimerase).
3. Sintesa lagging strand: Priming fragmen Okazaki (enzim primase), elongasi (enzim DNA polimerase), penggantian RNA dengan DNA (enzim DNA polimerase) dan penggabungan fragmen (enzim ligase).

Kesalahan proses replikasi molekul DNA hanya terjadi satu dalam 1 miliar nukleotida, tetapi kesalahan pemasangan awal antara nukleotida yang sudah ada pada untai cetakan dapat mencapai 100.000 kalinya atau sebesar 10.000 pasang

basa. Sel memiliki mekanisme reparasi yaitu perbaikan salah pasang (mismatch repair) yang akan memperbaiki kesalahan-kesalahan yang terjadi ketika DNA disalin. Selama replikasi DNA, DNA polimerase sendirilah yang melakukan perbaikan salah-pasang. Polimerase ini mengoreksi setiap nukleotida terhadap cetaknya begitu nukleotida ditambah pada untai. Dalam rangka mencari nukleotida yang pasangannya tidak benar, polimerase memindahkan nukleotida tersebut kemudian melanjutkan kembali sintesis. Protein lain selain DNA polimerase juga melakukan perbaikan salah-pasang.

Selain perbaikan kesalahan replikasi, pemeliharaan informasi genetik yang dikode dalam DNA juga menuntut perbaikan kerusakan pada DNA yang ada. Molekul-molekul DNA selalu terancam oleh agen fisis dan kimiawi yang bisa melukai. Zat-zat kimia reaktif, emisi, radioaktif, sinar X dan cahaya ultraviolet dapat mengubah nukleotida dengan cara-cara yang dapat berpengaruh pada informasi genetik yang terkode, umumnya berpengaruh buruk. Untunglah, perubahan atau mutasi ini biasanya dapat diperbaiki. Setiap sel terus-menerus memonitor dan memperbaiki materi genetiknya. Karena perbaikan kerusakan DNA sangat penting agar organisme dapat bertahan hidup, tidaklah mengherankan jika banyak jenis enzim perbaikan DNA perlahan-lahan berkembang, hampir 100 jenis ditemukan pada sel *E. Coli*.

Jika sel membelah diri berkali-kali, gen yang penting mungkin bisa ikut saja hilang. Kecenderungan ini berlangsung dari generasi ke generasi berikutnya. Prokariot menghindari masalah tersebut dengan memiliki molekul DNA sirkular (yang tidak memiliki ujung), tetapi pada eukariot, molekul molekul DNA kromosom eukariot memiliki urutan nukleotida yang disebut telomer pada ujung-ujungnya. Telomer tidak mengandung gen, sebaliknya DNA-nya terdiri dari banyak pengulangan dari satu urutan nukleotida pendek. Unit berulang pada telomer manusia adalah TTAGGG. Jumlah pengulangan pada telomer bervariasi kurang lebih antara 100 dan 1000. DNA telometrik melindungi gen organisme dari erosi melalui replikasi DNA yang berurutan. Selain itu DNA telometrik dan protein khusus yang terkait dengan DNA ini entah bagaimana ternyata mampu

mencegah ujung-ujung tersebut mengaktifkan sistem sel untuk memonitor kerusakan DNA.

Enzim lain yang dibutuhkan eukariot untuk memecahkan permasalahan ujung-ujung DNA adalah telomerase. Enzim ini mengkatalis pemanjangan telomer. Enzim telomerase memiliki molekul pendek RNA dengan urutan yang bertindak sebagai cetakan untuk pemanjangan ujung 3' telomer. Untai komplementer telomer diperpanjang dengan aksi kombinasi antara primase, DNA polimerase dan ligase. Setelah primer dipindahkan, hasilnya adalah telomer yang lebih panjang.

Telomerase tidak terdapat pada sebagian besar sel organisme multiseluler seperti manusia. DNA dari sel somatik yang membelah diri memang cenderung lebih pendek pada individu yang lebih tua dan pada sel-sel hasil kultur yang telah membelah diri berkali-kali. Jadi, kemungkinan telomer merupakan faktor pembatas dalam rentang hidup jaringan tertentu bahkan organisme sebagai satu kesatuan. Pada keduanya, telomerase memang hadir di dalam sel-sel benih, yaitu sel-sel yang menghasilkan gamet. Enzim menghasilkan telomer-telomer panjang di dalam sel-sel ini dan akibatnya juga dihasilkan pada keturunan baru.

Pada sel somatik juga ditemukan telomerase yang menyebabkan kanker. Sel-sel dari tumor besar sering memiliki telomer yang lebih pendek dari biasanya, sebagaimana yang sudah diperkirakan untuk sel-sel yang telah mengalami banyak pembelahan. Pemendekkan yang berkelanjutan mungkin pada akhirnya bisa menyebabkan sel kanker menghancurkan dirinya sendiri. Jika telomerase dapat menstabilkan panjang telomer maka sel kanker dan juga sel biakan yang tidak bisa mati.

Replikasi DNA menyediakan salinan gen yang akan diwariskan orang tua kepada keturunannya melalui gamet. Akan tetapi gen tidak saja harus disalin ataupun ditransmisikan, gen juga harus diekspresikan, bagaimana sel menterjemahkan informasi genetik yang dikode dalam DNA. Gen memberi perintah untuk membuat protein tertentu, tetapi gen tidak membangun protein secara langsung. Jembatan antara DNA dan sintesis protein adalah RNA .

Asam nukleat maupun protein merupakan polimer dengan urutan monomer spesifik yang menyampaikan informasi. Dalam DNA atau RNA, monomernya merupakan keempat jenis nukleotida, yang berbeda basa nitrogennya. Gen biasanya panjangnya mencapai ratusan atau ribuan nukleotida, masing-masing memiliki urutan basa yang spesifik. Setiap polipeptida dari suatu protein juga memiliki monomer yang tersusun dalam tatanan linear tertentu (struktur primer protein) yaitu asam amino.

Asam nukleat dan protein berisi informasi yang ditulis dalam dua bahasa kimia yang berbeda. Untuk beralih dari DNA-yang ditulis dalam suatu bahasa menjadi protein- yang ditulis dalam bahasa lain, membutuhkan 2 tahapan yaitu transkripsi dan translasi .

Secara prinsip, mekanisme transkripsi dan translasi pada prokariot dan eukariot serupa. Perbedaan ada karena bakteri (prokariot) tidak mempunyai nukleus, DNA-nya tidak tersegresi dari ribosom dan perlengkapan sintesis-protein lainnya. Transkripsi dan translasi berjalan simultan yaitu translasi protein berlangsung pada saat molekul mRNA sedang ditranskripsi. Sebaliknya dalam sel eukariot, selubung nukleus memisahkan transkripsi dan translasi dalam ruang dan waktu. Transkripsi terjadi di dalam nukleus, kemudian mRNA dikirim ke sitoplasma dimana translasi akan berlangsung. Sebelum mRNA meninggalkan nukleus, terjadi *RNA processing* yaitu mRNA dimodifikasi dengan berbagai cara untuk menghasilkan mRNA akhir yang fungsional.

Transkripsi

Transkripsi adalah proses sintesis RNA berdasarkan arahan DNA. Tidak seperti pada replikasi DNA dimana masing-masing untai lama menjadi cetakan, pada transkripsi hanya salah satu untai DNA yang menjadi cetakan (template). Molekul RNA yang dihasilkan merupakan transkrip penuh dari instruksi-instruksi pembangun-protein suatu gen. Molekul RNA ini disebut *messenger RNA* (mRNA). Pada eukariot, setelah molekul mRNA terbentuk dan mengalami modifikasi, mereka berdifusi keluar dari inti dan masuk ke semua bagian sitoplasma, tempat mereka melakukan fungsi selanjutnya. Sedangkan pada

prokariot mRNA langsung berfungsi tanpa harus mengalami proses modifikasi karena sel prokariot tidak bermembran inti.

Messenger RNA merupakan untai lurus yang panjang yang tersuspensi dalam sitoplasma, berfungsi untuk membawa kode genetik ke sitoplasma untuk pembentukan protein. Molekul ini biasanya terdiri dari beberapa ratus sampai beberapa ribu nukleotida dalam untai yang berpasangan dan mengandung kodon yang sebenarnya merupakan komplementer bahasa (kata-kata) dari suatu gen.

Bagian molekul RNA berupa tiga kata kode seperti CCG, UCU dan GAA, menggambarkan tiga asam amino prolin, serin dan asam glutamat disebut kodon. Kodon terdiri atas 'triplet basa' yaitu masing-masing tiga basa yang berurutan. Rangkaian kodon merupakan panduan untuk perangkaian asam amino selama sintesis protein dalam sel.

Kodon RNA menggambarkan sandi untuk 20 asam amino penting yang umumnya terdapat dalam molekul protein. Beberapa asam amino dinyatakan oleh lebih dari satu kode. Beberapa kodon tidak menyandi asam amino melainkan berfungsi sebagai kodon 'stop' tanda bahwa sintesa protein berakhir.

Secara ringkas dapat dikatakan bahwa proses transkripsi berlangsung sepanjang DNA *template*. Enzim RNA polimerase menambahkan nukleotida hanya ke ujung 3' dari polimer yang sedang tumbuh sehingga molekul RNA memanjang dalam arah 5' → 3'. Rentang DNA yang ditranskripsi menjadi molekul RNA ini disebut unit transkripsi.

Bakteri hanya memiliki satu tipe RNA polimerase yang mensintesis tidak saja mRNA tetapi juga tipe RNA lain yang berfungsi dalam sintesis protein. Sebaliknya, eukariot memiliki 3 tipe RNA polimerase dalam nukleusnya yaitu I, II dan III. Tipe yang digunakan untuk sintesis mRNA ialah RNA polimerase II.

Transkripsi dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu: Inisiasi (permulaan), elongasi (pemanjangan), dan terminasi (pengakhiran). Enzim yang bertanggungjawab atas transkripsi adalah RNA polimerase, yang bergerak di sepanjang gen mulai dari promoter hingga persis di belakang terminator. RNA polimerase menyusun molekul RNA dengan urutan nukleotida yang berkomplementer dengan untai cetakan gen tersebut.

Daerah DNA dimana RNA polimerase melekat dan mengawali transkripsi disebut sebagai promoter. Suatu promoter mencakup titik awal (startpoint) transkripsi dan biasanya membentang beberapa lusin pasangan nukleotida ke hulu (upstream) dari titik awal. Di samping menentukan dimana transkripsi dimulai, promoter juga menentukan salah satu dari kedua untai DNA yang digunakan sebagai cetakan.

Bagian-bagian tertentu suatu promoter sangat penting untuk pengikatan RNA polimerase. Pada prokariot, RNA polimerase secara khusus mengenali dan mengikatkan dirinya pada promoter. Sebaliknya pada eukariot suatu kumpulan protein yang disebut faktor transkripsi menjadi perantara pada proses pengikatan polimerase RNA dan inisiator transkripsi. Hanya setelah faktor transkripsi tertentu diikat pada promoter barulah RNA polimerase dapat mengikatkan diri pada promoter tersebut. Susunan yang lengkap antara faktor transkripsi dan RNA polimerase yang mengikatkan diri pada promoter disebut kompleks inisiasi transkripsi.

Interaksi antara RNA polimerase eukariot dan faktor transkripsi merupakan suatu contoh betapa pentingnya interaksi protein-protein dalam mengontrol transkripsi. Salah satu faktor transkripsi adalah *TATA box*. Pada sel eukariot enzim yang mentranskripsi gen pengkode-protein menjadi pra mRNA ialah RNA polimerase II. Enzim ini memulai sintesis RNA pada promoter yang biasanya berupa *TATA box* yaitu suatu urutan nukleotida TATAAAA. TATA ini terletak kira-kira 25 nukleotida *upstream* jauhnya dari titik awal transkripsi. RNA polimerase II tidak dapat mengenali TATA dan tanda-tanda khusus lain pada promoter. Protein lain dari faktor transkripsi yang membantu mengenali TATA ini, mengikatkan diri pada DNA sebelum RNA polimerase memulai transkripsi.

Proses selanjutnya adalah elongasi. Pada saat RNA polimerase bergerak di sepanjang DNA, enzim ini akan terus membuka pilinan untai ganda tersebut, memperlihatkan kira-kira 10-20 basa DNA sekaligus untuk berpasangan dengan nukleotida RNA. Enzim ini menambahkan nukleotida ke ujung 3' dari molekul RNA yang sedang tumbuh. Pada saat sintesis RNA berlangsung, untai ganda DNA terbentuk kembali dan molekul RNA baru akan lepas dari cetakan DNA-

nya. Transkripsi berlangsung dengan kecepatan kira-kira 60 nukleotida per detik pada eukariot.

Tabel. Kodon asam amino, kodon tanda mulai translasi dan kodon stop

Asam amino	Kodon RNA
Alanin	GCU GCC GCA GCG
Arginin	CGU CGC CGA CGG AGA AGG
Asam aspartat	GAU GAC
Asam glutamat	GAA GAG
Asparagin	AAU AAC
Fenilalanin	UUU UUC
Glisin	GGU GGC GGA GGG
Histidin	CAU CAC
Isoleusin	AUU AUC AUA
Leusin	CUU CUC CUA CUG UUA UUG
Lisin	AAA AAG
Metiosin	AUG
Prolin	CCU CCC CCA CCG
Serin	UCU UCC UCA UCG
Sistein	UGU UGC
Tirosin	UAU UAC
Treonin	ACU ACC ACA ACG
Triptofan	UGG
Valin	GUU GUC GUA GUG
Mulai (Start)	AUG GUG
Berhenti (Stop)	UAA UAG UGA

Satu gen tunggal dapat ditranskripsi secara simultan oleh beberapa molekul RNA polimerase yang saling mengikuti seperti barisan truk dalam satu konvoi. Untai RNA yang sedang tumbuh memperlihatkan jejak dari setiap polimerase, dengan panjang setiap untaian baru yang mencerminkan sejauh mana enzim itu telah berjalan dari titik awalnya.

Transkripsi berlangsung sampai RNA polimerase menyalin urutan DNA yang disebut terminator. Terminator merupakan suatu urutan RNA yang berfungsi sebagai sinyal pengakhiran transkripsi. Pada sel prokariot, transkripsi biasanya berhenti tepat pada akhir sinyal terminasi. Ketika polimerase mencapai titik tersebut polimerase melepas RNA dan DNA. Sebaliknya pada sel eukariot transkripsi akan berhenti setelah polimerase melewati sinyal terminasi yaitu suatu urutan AAUAAA di dalam pra-mRNA sejauh kira-kira 10-35 nukleotida. Pra-

mRNA ini akan dipotong hingga terlepas dari enzim tersebut. Tempat pemotongan pada RNA juga merupakan tempat untuk penambahan ekor-poli A.

Sebagaimana disebutkan sebelumnya bahwa sel eukariot akan memodifikasi RNA setelah transkripsi. Enzim-enzim dalam nukleus eukariot memodifikasi pra-mRNA dengan berbagai cara sebelum pesan genetiknya disampaikan ke sitoplasma. Selama pemrosesan RNA ini, kedua ujung transkrip primer biasanya diganti. Dalam banyak kasus, bagian-bagian interior tertentu dari molekul tersebut kemudian dipotong, dan bagian-bagian sisanya disambung menjadi satu kembali.

Tahap yang paling mengagumkan dari pemrosesan RNA didalam nukleus eukariot adalah pemindahan sebagian besar molekul RNA yang mula-mula disintesis, dipotong dan dilekatkan disebut RNA *splicing*. Gen β globin misalnya panjang rata-rata unit transkripsi adalah 8000 nukleotida, sehingga RNA primer juga sepanjang itu. Tetapi hanya dibutuhkan kira-kira 1200 nukleotida untuk mengkode protein yang ukuran rata-ratanya 400 asam amino (ingat, setiap asam amino dikode oleh triplet nukleotida). Ini berarti bahwa sebagian besar eukariot dan transkrip RNA-nya memiliki rentangan nukleotida bukan-penyandi atau daerah yang tidak ditranslasi.

Setelah gen eukariot yang mengandung ekson dan intron ditranskripsi, transkrip RNA bergabung dengan ribonukleoprotein nukleus kecil (snRNP) dan protein lain untuk membentuk kompleks molekuler yang disebut spliosom. Di dalam spliosom, RNA dari snRNP tertentu membentuk pasangan-basa dengan nukleotida di ujung intron, transkrip RNA dipotong untuk melepaskan intron itu, dan ekson disambung menjadi satu. Spliosom kemudian pecah, melepaskan mRNA, yang sekarang hanya mengandung ekson.

Translasi

Translasi (translation = penerjemahan) adalah sintesis polipeptida yang diarahkan oleh RNA. Pada proses translasi, sel menginterpretasikan suatu pesan genetik dan membentuk protein yang sesuai dengan pesan tersebut. Pesan tersebut berupa serangkaian kodon di sepanjang molekul mRNA, interpretasinya adalah

RNA transfer (tRNA). Fungsi tRNA adalah mentransfer asam-asam amino dari sitoplasmanya ke ribosom tempat molekul protein dibentuk sewaktu protein disintesis. Tiap jenis tRNA biasanya hanya bergabung dengan satu jenis asam amino dari 20 asam amino. Suatu sel tetap menjaga sitoplasmanya agar mempunyai persediaan ke 20 asam amino, baik dengan mensintesisnya dari senyawa-senyawa lain atau dengan mengambilnya dari larutan di sekitarnya. Ribosom menambahkan tiap asam amino (yang dibawa tRNA) ke ujung rantai polipeptida yang sedang tumbuh.

Saat molekul mRNA meluncur melalui ribosom, kodon-kodon ditranslasi satu per satu menjadi asam amino. Interpretasinya adalah molekul tRNA, masing-masing dengan antikodon spesifik di satu ujung dan asam amino spesifik diujung lainnya. Suatu tRNA menambahkan muatan asam aminonya ke rantai polipeptida yang sedang tumbuh saat antikodon tersebut berkaitan dengan kodon komplementer pada mRNA.

Molekul-molekul tRNA tidak semuanya identik. Kunci untuk menstranslasi pesan genetik menjadi urutan asam amino spesifik adalah setiap tipe molekul tRNA yang menghubungkan kodon mRNA tertentu dengan asam amino tertentu. Ketika tiba di ribosom, molekul tRNA telah membawa asam amino spesifik pada salah satu ujung. Pada ujung lainnya terdapat triplet nukleotida yang disebut antikodon yang akan mengikatkan diri pada kodon komplementer di mRNA.

Ketiga basa dari suatu kodon mRNA diberi nama sebagai basa pertama, kedua dan ketiga dan dibaca dalam arah 5'→3' disepanjang mRNA. Ketika salah satu dari kodon-kodon ini dibaca di sepanjang molekul mRNA, fenilalanin akan masuk ke dalam rantai polipeptida yang sedang tumbuh. Perhatikan bahwa kodon AUG tidak saja menandakan asam amino metionin (MET) tetapi juga berfungsi sebagai sinyal ' start' untuk ribosom. Tiga dari ke-64 kodon berfungsi sebagai sinyal ' stop'. Salah satu dari kodon-kodon pengakhir ini menandai berakhirnya pesan genetik. Molekul tRNA yang berikatan dengan kodon melalui ikatan hidrogen, memiliki antikodon AAA dan membawa fenilalanin di ujung yang lain. Pada waktu molekul mRNA meluncur melalui ribosom, fenilalanin

akan ditambahkan pada rantai polipeptida ketika berada pada kodon UUU. Demikianlah, pesan genetik ditranslasi kodon demi kodon, tRNA menyimpan asam-asam amino berdasarkan perintah yang telah ditentukan dan ribosom menggabungkan asam-asam amino menjadi rantai. Molekul tRNA ibarat kartu pengingat dengan kata asam nukleat (anti-kodon) di satu sisi dan kata protein (asam amino) di sisi lain .

Jika satu macam tRNA tersedia untuk tiap-tiap kodon mRNA yang menentukan suatu asam amino, maka akan terdapat 61 tRNA. Jumlah sebenarnya lebih kecil yaitu sekitar 45. Angka ini mencukupi karena tRNA mempunyai antikodon-antikodon yang dapat mengenali dua atau lebih kodon-kodon yang berbeda. Kemampuan ini kemungkinan disebabkan karena aturan pemasangan-basa antara basa ketiga suatu kodon dan basa yang terkait dari antikodon tRNA tidaklah seketat aturan untuk kodon-kodon DNA dan mRNA. Misalnya basa U dari antikodon tRNA dapat berpasangan baik dengan A atau G di posisi ketiga dari kodon mRNA. Pelonggaran aturan pasangan basa ini disebut *Wobble*. Molekul tRNA yang paling serbaguna adalah yang mengandung inosin (I), basa termodifikasi, pada posisi wobel antikodon. Inosin dibentuk melalui perubahan adenin secara enzimatik setelah tRNA disintesis. Ketika antikodon-antikodon terhubung dengan dengan kodon-kodon basa I dapat membentuk ikatan hidrogen dengan salah satu dari tiga basa yaitu U, C atau A. Karena itu molekul tRNA yang mempunyai CCI sebagai antikodonna dapat mengikatkan diri pada kodon-kodon GGU, GGC dan GGA, yang semuanya merupakan kode untuk asam amino glisin. Wobel menjelaskan mengapa kodon-kodon bersinonim untuk satu asam amino dapat berbeda pada basa ketiganya tetapi tidak pada basa-basa lain .

Pengikatan kodon-antikodon sebenarnya merupakan bagian kedua dari dua tahap pengenalan yang dibutuhkan untuk translasi suatu pesan genetik yang akurat. Pengikatan ini harus didahului oleh pemasangan yang benar antara tRNA dengan asam amino. Molekul tRNA mengikatkan diri pada kodon mRNA yang menentukan asam amino tertentu, harus membawa hanya asam amino tersebut ke ribosom. Tiap asam amino digabungkan dengan tRNA yang sesuai oleh suatu enzim spesifik yang disebut sintesa tRNA-aminoasil (*aminoacyl-tRNA synthase*).

Terdapat 20 macam enzim ini di dalam sel, satu enzim untuk tiap asam amino. Tempat aktif dari tiap sintetase tRNA aminoasil hanya cocok untuk kombinasi asam amino dan tRNA yang spesifik. Enzim sintetase ini mengkatalis penempelan kovalen dari asam amino pada tRNA-nya dalam suatu proses yang digerakan oleh hidrolisis ATP.

Ribosom memudahkan pemasangan spesifik antara antikodon tRNA dengan kodon mRNA selama sintesis protein. Sebuah Ribosom tersusun atas dua subunit besar dan subunit kecil. Subunit ribosom dibangun oleh protein-protein dan molekul RNA yang disebut RNA ribosom (rRNA). Pada eukariot, subunit-subunit tersebut dibuat dalam nukleus. Gen RNA ribosom pada DNA kromosom ditranskripsi, RNA tersebut diproses dan disusun dengan protein-protein yang di ambil dari sitoplasma. Subunit ribosom yang dihasilkan kemudian diekspor melalui pori-pori nukleus ke sitoplasma. Baik pada eukariot maupun pada prokariot., subunit besar dan kecil bergabung untuk membentuk ribosom fungsional hanya ketika subunit tersebut tersebut terikat pada molekul mRNA. Sekitar 60 % dari berat suatu ribosom adalah rRNA. Karena sebagian besar sel mengandung ribuan ribosom, rRNA merupakan tipe yang paling banyak.

Walaupun ribosom-ribosom eukariot dan prokariot mirip dalam struktur dan fungsinya, ribosom eukariot sedikit lebih besar dan sedikit berbeda dengan ribosom prokariot dalam komposisi molekulernya. Perbedaan itu memiliki pengaruh medis yang penting. Obat tertentu dapat melumpuhkan ribosom prokariot tanpa menghambat kemampuan ribosom eukariot membuat protein. Misalnya obat tetracyclin dan streptomycin yang digunakan sebagai antibiotik untuk melawan infeksi bakteri.

Struktur suatu ribosom merefleksikan fungsinya untuk mengumpulkan mRNA dengan tRNA pembawa-asam amino. Selain satu tempat pengikatan untuk mRNA, tiap ribosom memiliki tiga tempat pengikatan untuk tRNA. Tempat P (tempat tRNA-peptidil) mengikat tRNA yang membawa rantai polipeptida yang sedang tumbuh, sementara tempat A (tempat tRNA-aminoasil) mengikat tRNA yang membawa asam amino berikut yang akan ditambahkan pada rantai polipeptida, tRNA yang tidak bermuatan meninggalkan ribosom dari tempat E

(tempat keluar) yang baru ditemukan. Bertindak seperti alat penjepit, ribosom mengikat tRNA dan mRNA agar tetap berdekatan dan menempatkan asam amino baru untuk penambahan pada ujung karboksil dari rantai polipeptida yang sedang tumbuh.

Pembentukan Polipeptida

Kita dapat membagi translasi menjadi 3 tahap yaitu inisiasi, elongasi dan terminasi. Semua tahapan ini memerlukan faktor-faktor protein yang membantu mRNA, tRNA dan ribosom selama proses translasi. Untuk inisiasi dan elongasi rantai dibutuhkan sejumlah energi yang disediakan oleh GTP (guanin triphospat) yaitu suatu molekul yang mirip ATP. Tahap inisiasi dari translasi membawa bersama-sama mRNA, sebuah tRNA yang memuat asam amino pertama dari polipeptida, dan dua subunit ribosom. Pertama subunit ribosom kecil mengikatkan diri pada mRNA dan tRNA inisiator khusus.

Pada tahap elongasi, asam-asam amino ditambahkan satu persatu pada asam amino pertama. Tiap penambahan melibatkan partisipasi beberapa protein yang disebut faktor elongasi dan terjadi dalam siklus tiga tahap yaitu:

1. Pengenalan kodon. Kodon mRNA pada tempat A dari ribosom membentuk ikatan hidrogen dengan antikodon molekul tRNA yang baru masuk yang membawa asam amino yang tepat. Faktor elongasi membawa tRNA ke tempat A. Langkah ini juga membutuhkan hidrolisis GTP.
2. Pembentukan ikatan peptida. Molekul rRNA dari subunit ribosom besar, berfungsi sebagai ribozim, mengkatalis pembentukan ikatan peptida yang menggabungkan polipeptida yang memanjang dari tempat P ke asam amino yang baru tiba di tempat A. Pada tahap ini, polipeptida memisahkan diri dari tRNA tempat pelekatannya semula, dan asam amino pada ujung karboksilnya berikatan dengan asam amino yang dibawa oleh tRNA di tempat A.
3. Translokasi. Molekul tRNA di tempat A, sekarang terikat pada polipeptida yang sedang tumbuh, ditranslokasikan ke tempat P. Saat RNA berpindah tempat, antikodonya tetap berikatan dengan hidrogen pada kodon

mRNA; mRNA bergerak bersama -sama dengan antikodon ini dan membawa kodon berikutnya untuk ditranslasi pada tempat A. Sementara tRNA yang tadinya berada pada tempat P bergerak ketempat E dan dari tempat ini keluar dari ribosom. Langkah translokasi membutuhkan energi yang disediakan oleh hidrolisis GTP. mRNA bergerak melalui ribosom ke satu arah saja, mulai dari ujung 5' hal ini sama dengan ribosom yang bergerak 5'→3' pada mRNA. Hal yang penting disini adalah ribosom dan mRNA bergerak relatif satu sama lain, dengan arah yang sama, kodon demi kodon. Siklus Elongasi menghabiskan waktu kurang dari 1/10 detik dan terus diulang saat tiap asam amino ditambahkan pada rantai hingga polipeptidanya lengkap .

Tahap akhir proses translasi adalah adalah terminasi. Terminasi translasi terjadi ketika suatu ribosom mencapai kodon terminasi pada untai mRNA, tempat A pada ribosom itu menerima suatu protein yang disebut faktor pelepas sebagai ganti tRNA. Faktor pelepas menghidrolisis ikatan antara tRNA di dalam tempat P dan asam amino terakhir dan rantai polipeptida. Polipeptida ini kemudian dilepaskan dari ribosom. Kedua subunit ribosom dan komponen penyusunan yang lain terdisosiasi.

Elongasi berlanjut hingga kodon stop mencapai tempat A di ribosom. Triplet basa yang istimewa ini-UAA, UAG, dan UGA- tidak mengkode suatu asam amino melainkan bertindak sebagai sinyal untuk menghentikan translasi. Suatu protein yang disebut sebagai faktor pelepas (*release factor*) berlangsung mengikatkan diri pada kodon stop di tempat A. Faktor pelepas ini menyebabkan penambahan molekul air, bukan asam amino, pada rantai polipeptida. Reaksi ini menghidrolisis polipeptida yang sudah selesai ini dari tRNA yang berada di tempat P, melepaskan polipeptida dari ribosom. Sisa -sisa penyusunan translasi kemudian terpisah-pisah.

Suatu ribosom tunggal dapat membuat polipeptida rata-rata dalam waktu kurang dari satu menit. Pada kenyataannya, terdapat beberapa ribosom bekerja mentranslasi pesan pada waktu yang bersamaan. Begitu satu ribosom bergerak

melewati kodon inisiasi, ribosom kedua dapat melekat pada mRNA dan karena itu beberapa ribosom dapat mengikutinya di sepanjang mRNA yang sama. Deretan ribosom semacam itu disebut poliribosom yang dapat dilihat melalui mikroskop elektron. Poliribosom ditemukan baik pada sel prokariot maupun pada sel eukariot.

Dari Polipeptida menjadi Protein Fungsional

Selama dalam proses dan sesudah disintesis, rantai polipeptida mulai menggulung dan melipat secara spontan, membentuk protein fungsional dengan konformasi yang spesifik, suatu molekul tiga dimensi dengan struktur sekunder dan tertier. Suatu gen menentukan struktur primer dan struktur primer ini kemudian akan menentukan konformasi. Pada banyak kasus, protein pengantar (chaperone protein) membantu polipeptida melipat secara benar.

Langkah tambahan ini yang disebut modifikasi pascatranslasi, dibutuhkan sebelum protein dapat memulai tugas khususnya di dalam sel. Modifikasi dapat secara kimiawi dengan pengikatan gula, lipid, gugus fosfat atau penambahan penambahan senyawa lain. Enzim-enzim dapat memindahkan satu atau lebih asam amino dari ujung *leading* (amino) rantai polipeptida. Pada beberapa kasus, rantai polipeptida tunggal dapat membelah secara enzimatik menjadi dua atau lebih potongan misalnya protein insulin pertama kali disintesis sebagai rantai polipeptida tunggal tetapi menjadi aktif hanya setelah suatu enzim menghilangkan bagian tengah dari rantai tersebut. Pada kasus lain, dua atau lebih polipeptida yang disintesis secara terpisah dapat bergabung menjadi subunit-subunit protein yang mempunyai struktur kuaterner.

Perbandingan Sintesis Protein pada Prokariot dan Eukariot

Pada dasarnya sel prokariot dan eukariot melakukan transkripsi dan translasi melalui cara yang sangat mirip. Terdapat beberapa perbedaan tertentu dalam peralatan seluler dan dalam rincian prosesnya. RNA polimerase prokariot dan eukariot berbeda, dan polimerase pada eukariot tergantung pada faktor transkripsi. Transkripsi diselesaikan secara berbeda dalam dua macam sel

tersebut. Ribosom-ribosom eukariot dan prokariot juga sedikit berbeda. Perbedaan yang paling penting muncul dari pengaturan ruangan dari sel eukariot. Seperti ruangan kerja, sel prokariot menjamin operasi satu aliran (stream line). Dengan tidak adanya nukleus, maka sel ini dapat secara simultan mentranskripsi dan mentranslasi gen yang sama, dan protein yang baru dibentuk dapat dengan segera menyebar pada tempat-tempat fungsionalnya. Sebaliknya selubung nukleus sel eukariot memisahkan transkripsi dari translasi dan menyediakan ruangan untuk pemrosesan RNA yang ekstensif. Tahap pemrosesan ini memberikan cara tambahan untuk mengatur dan mengkoordinasi aktivitas rumit sel eukariot. Sel-sel eukariot mempunyai mekanisme yang rumit untuk mengarahkan protein pada ruang seluler (organel) yang tepat.

IDENTIFIKASI GEN DARI GENE BANK

Human Genome Project (HuGo Project) yang sukses pada akhir milenium 2 telah mengantarkan kita pada peta fisik DNA manusia yang berjumlah 3,2 milyar bp (base pair) secara lengkap. Selain itu, beberapa organisme yang penting seperti hewan, parasit, bakteri dan virus pun telah berhasil di-sequensing dan dipetakan. Data-data tersebut dapat diakses secara *free* di *gene bank*. Data tersebut menjadi domain publik yang sangat bermanfaat untuk kita *download* guna kepentingan riset atau untuk kita tambah temuan baru yang kita dapat dari riset.

Berikut ini akan diberikan contoh bagaimana mengambil data gen dari *gene bank* untuk melakukan riset pada gen eukariot yaitu gen HCR pada penyakit psoriasis dan pada gen prokariot yaitu gen *mecA* pada infeksi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Langkah-langkah yang ditempuh adalah:

1. Membuka situs *engine search* misalnya *google*
2. Ketik *gene bank* akan keluar situs: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
3. Buka situs tersebut, kemudian ketik *Human HCR* pada kolom *search* dan klik *gene* pada kolom di sebelah kiri akan keluar:

Results: 11

1.

[CCHCR1](#)

Official Symbol: CCHCR1 and **Name:** coiled-coil alpha-helical rod protein 1 [*Homo sapiens*]

Other Aliases: XXbac-BCX101P6.10-002, C6orf18, **HCR**, SBP. Other Designations: **HCR** (alpha-helix coiled-coil rod homologue); StAR-binding protein; alpha-helical coiled-coil rod protein; pg8; putative gene 8 protein

Chromosome: 6;Location: 6p21.3

Annotation: Chromosome 6, NC_000006.11 (31110216..31126015, complement)

MIM: 605310

ID:54535

[Order cDNA clone](#)

2.

[CCRL2](#)

Official Symbol: CCRL2 and **Name:** chemokine (C-C motif) receptor-like 2 [*Homo sapiens*]

Other Aliases: CKRX, CRAM, CRAM-A, CRAM-B, **HCR**. Other Designations: C-C chemokine receptor-like 2; chemokine receptor CCR11; chemokine receptor X; putative MCP-1 chemokine receptor.

Chromosome: 3; Location: 3p21

Annotation: Chromosome 3, NC_000003.11 (46448721..46451014)

MIM: 608379

ID: 9034

[Order cDNA clone](#)

3.

[EIF2AK1](#)

Official Symbol: EIF2AK1 and **Name:** eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1 [*Homo sapiens*]

Other Aliases: PRO1362, **HCR**, HRI

Other Designations: heme regulated initiation factor 2 alpha kinase; heme sensitive initiation factor 2a kinase; heme-controlled repressor; heme-regulated eukaryotic initiation factor eIF-2-alpha kinase; heme-regulated inhibitor; heme-regulated initiation factor 2-alpha kinase; heme-regulated repressor; hemin-sensitive initiation factor 2-alpha kinase

Chromosome: 7; Location: 7p22

Annotation: Chromosome 7, NC_000007.13 (6061878..6098860, complement)

MIM: 613635

ID: 27102

[Order cDNA clone](#)

4.

[Cchcr1](#)

Official Symbol: Cchcr1 and **Name:** coiled-coil alpha-helical rod protein 1 [*Mus musculus*]

Other Aliases: **Hcr**. Other Designations: **HCR** (a-helix coiled-coil rod homolog); alpha-helical coiled-coil rod protein

Chromosome: 17; Location: 17

Annotation: Chromosome 17, NC_000083.5 (35654061..35667960)

ID: 240084

[Order cDNA clone](#)

4. Pilih no 1 karena opsi 1 adalah gen yang dimaksud dari spesies manusia (Homo sapiens) dan klik akan keluar data gen tersebut secara lengkap tetapi dalam bentuk *link* yang dapat di-klik untuk melihat detail:

Display Settings:

- [Full Report](#)

Send to:

CCHCR1 coiled-coil alpha-helical rod protein 1 [*Homo sapiens*]

Gene ID: 54535, updated on 4-Dec-2011

[Help top of page](#)

Summary

Official Symbol:CCHCR1 provided by [HGNC](#)

Official Full Name:coiled-coil alpha-helical rod protein 1 provided by [HGNC](#)

Primary source: [HGNC:13930](#)

Locus tag:XXbac-BCX101P6.10-002

See related

[Ensembl:ENSG00000204536;](#)
[Vega:OTTHUMG00000031112](#)

[HPRD:05607;](#)

[MIM:605310;](#)

Gene type:protein coding

RefSeq status:VALIDATED

Organism:[Homo sapiens](#)

Lineage:Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo

Also known as:HCR; SBP; C6orf18

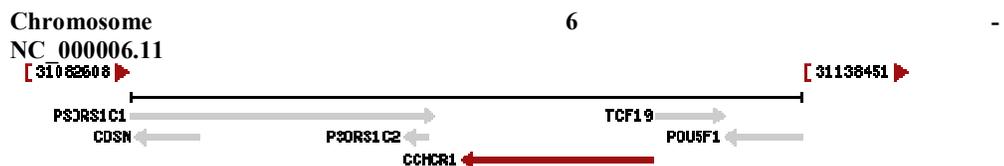
[Help top of page](#)

Genomic context

Location : 6p21.3

Sequence :Chromosome: 6; NC_000006.11 (31110216..31126015, complement)

See CCHCR1 in [Epigenomics](#), [MapViewer](#)



[Help top of page](#)

Genomic regions, transcripts, and products

Genomic Sequence

Go to nucleotide [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)



[Go to reference sequence details](#)

[Help top of page](#)

[Bibliography](#)

Related articles in PubMed

1. [Personalized smoking cessation: interactions between nicotine dose, dependence and quit-success genotype score.](#) Rose JE, *et al.* Mol Med, 2010 Jul-Aug. PMID 20379614.
2. [A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population.](#) Asano K, *et al.* Nat Genet, 2009 Dec. PMID 19915573.
3. [High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions.](#) Barcellos LF, *et al.* PLoS Genet, 2009 Oct. PMID 19851445.
4. [CCHCR1 is up-regulated in skin cancer and associated with EGFR expression.](#) Suomela S, *et al.* PLoS One, 2009 Jun 24. PMID 19551138.
5. [The tumor necrosis factor polymorphism TNF \(-308\) is associated with susceptibility to meningococcal sepsis, but not with lethality.](#) Read RC, *et al.* Crit Care Med, 2009 Apr. PMID 19242354.

[See all \(27\) citations in PubMed](#)

[See citations in PubMed for homologs of this gene provided by HomoloGene](#)

GeneRIFs: Gene References Into Functions [What's a GeneRIF?](#)

1. [Clinical trial of gene-disease association and gene-environment interaction. \(HuGE Navigator\)](#)
2. [CCHCR1 is up-regulated in skin cancer and associated with EGFR expression](#)
3. [the aberrant function of CCHCR1 may lead to abnormal keratinocyte proliferation which is a key feature of psoriatic epidermis.](#)
4. [Observational study of gene-disease association. \(HuGE Navigator\)](#)
5. [These studies show that miR-122, a 22-nucleotide microRNA, is derived from a liver-specific noncoding polyadenylated RNA transcribed from the gene hcr.](#)
6. [These results suggest a role for CCHCR1 in the pathogenesis of psoriasis via the regulation of skin steroid metabolism.](#)
7. [Results show that HLA-Cw6 and CCHCR1 risk allele associations with clinical features of psoriasis are predictably highly similar in a Finnish nationwide cohort of 379 psoriasis patients.](#)
8. [Isolated by a two hybrid assay, StAR binding protein binds StAR protein in cells and enhances the ability of StAR protein to promote syntheses of steroid hormones.\(StAR binding protein\)](#)

Submit: [New GeneRIF Correction](#)

[Help top of page](#)

[Phenotypes](#)

[Review eQTL and phenotype association data in this region using PheGenI](#)

[A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population.](#)

[Help top of page](#)

Interactions

Products	Interactant	Other Gene	ComplexSource	Pubs	Description
NP_061925.1	NP_004286.2	TRAF4	BIND	PubMed	TRAF4 interacts with HCR.
Q8TD31	P19387	POLR2C	HPRD	PubMed	
Q8TD31	P05129	PRKCG	HPRD	PubMed	
Q8TD31	P49675	STAR	HPRD	PubMed	
Q8TD31	Q9BUZ4	TRAF4	HPRD	PubMed	
BioGRID:120022	BioGRID:111428	POLR2C	BioGRID	PubMed	Affinity Capture-Western; Reconstituted Complex; Two-hybrid
BioGRID:120022	BioGRID:112647	STAR	BioGRID	PubMed	Affinity Capture-Western; Two-hybrid

[Help top of page](#)

General gene information

Markers

- RH46639 (e-PCR)
 - [UniSTS:9004](#)
- WI-15384 (e-PCR)
 - [UniSTS:67494](#)
- MARC_26584-26585:1033750163:1 (e-PCR)
 - [UniSTS:269032](#)
- D6S2688 (e-PCR)
 - [UniSTS:256748](#)
- D6S2687 (e-PCR)
 - [UniSTS:256749](#)

Genotypes

- [See CCHCR1 SNP Geneview Report](#)
- [See CCHCR1 SNP Genotype Report](#)
- See CCHCR1 SNP Variation Viewer Report 

Homology

- [Homologs of the CCHCR1 gene](#): The CCHCR1 gene is conserved in chimpanzee, dog, cow, mouse, and zebrafish.
- [Map Viewer](#) (Mouse)

Clone Names

- MGC126371, MGC126372

Gene Ontology Provided by GOA

Process

[cell differentiation](#)
[multicellular organismal development](#)

Component

[cytoplasm](#)
[nucleus](#)
[Help top of page](#)

General protein information

Preferred Names

coiled-coil alpha-helical rod protein 1

Names

coiled-coil alpha-helical rod protein 1
pg8
StAR-binding protein
putative gene 8 protein
alpha-helical coiled-coil rod protein
HCR (a-helix coiled-coil rod homologue)

[Help top of page](#)

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

mRNA and Protein(s)

1. [NM_001105563.1](#) → [NP_001099033.1](#) coiled-coil alpha-helical rod protein 1 isoform 2

Status: VALIDATED

Description

Transcript Variant: This variant (2) uses an alternate in-frame splice site in the 5' coding region, compared to variant 1, resulting in a shorter protein (isoform 2), compared to isoform 1.

Source sequence(s)

[AA356205](#), [AB112475](#), [AK000533](#), [BC110534](#), [CN428429](#)

Consensus CDS

[CCDS47397.1](#)

UniProtKB/TrEMBL

[E9PE84](#)

UniProtKB/TrEMBL

[Q2TB68](#)

UniProtKB/TrEMBL

[Q769H0](#)

UniProtKB/Swiss-Prot

[Q8TD31](#)

Related

[ENSP00000401039](#),

[OTTHUMP00000165085](#),

[ENST00000451521](#),

[OTTHUMT00000257978](#)

Conserved Domains (1) [summary](#)

Evidence

Code

[IEA](#)

[IEA](#)

Evidence

Code

[IEA](#)

[IEA](#)

Pubs

Pubs

[pfam07111](#)

Location:85

-

835

Blast Score: 1570

HCR; Alpha helical coiled-coil rod protein (HCR)

2. [NM_001105564.1](#) → [NP_001099034.1](#) coiled-coil alpha-helical rod protein 1 isoform 1

Status: VALIDATED

Description

Transcript Variant: This variant (1) represents the longest transcript and encodes the longest isoform (1).

Source sequence(s)

[AA356205](#), [AB112475](#), [AK000533](#), [BC110534](#), [CN428429](#)

Consensus CDS

[CCDS43445.1](#)

UniProtKB/TrEMBL

[Q2TB68](#)

UniProtKB/TrEMBL

[Q769H0](#)

UniProtKB/Swiss-Prot

[Q8TD31](#)

Related

[ENSP00000379566](#), [OTTHUMP00000165080](#), [ENST00000396268](#),

[OTTHUMT00000257971](#)

Conserved Domains (1) [summary](#)

[pfam07111](#)

Location:116

-

871

Blast Score: 1669

HCR; Alpha helical coiled-coil rod protein (HCR)

3. [NM_019052.3](#) → [NP_061925.2](#) coiled-coil alpha-helical rod protein 1 isoform 3

Status: VALIDATED

Description

Transcript Variant: This variant (3) contains a distinct 5' UTR and lacks an in-frame portion of the 5' coding region, compared to variant 1. The resulting isoform (3) has a shorter N-terminus when compared to isoform 1.

Source sequence(s)

[AA356205](#), [AB112474](#), [AB112475](#), [AK000533](#), [BC110534](#), [DC357362](#)

Consensus CDS

[CCDS4695.1](#)

UniProtKB/TrEMBL

[Q2TB68](#)

UniProtKB/TrEMBL

[Q769H0](#)

UniProtKB/Swiss-Prot

[Q8TD31](#)

Related

[ENSP00000365442](#), [OTTHUMP00000029150](#), [ENST00000376266](#),

[OTTHUMT00000076190](#)

Conserved Domains (1) [summary](#)

[pfam07111](#)

Location:27

–

782

Blast Score: 1545

HCR; Alpha helical coiled-coil rod protein (HCR)

RefSeqs of Annotated Genomes: Build 37.3

The following sections contain reference sequences that belong to a specific genome build.

[Explain](#)

Reference GRCh37.p5 Primary Assembly

Genomic

1. NC_000006.11 Reference GRCh37.p5 Primary Assembly

Range 31110216..31126015, complement

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_2

Genomic

1. NT_113891.2 Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_2

Range 2624976..2640772, complement

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_3

Genomic

1. NT_167245.1 Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_3

Range 2407346..2423143, complement

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_4

Genomic

1. NT_167246.1 Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_4

Range 2458574..2474393, complement

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_5

Genomic

1. NT_167247.1 Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_5

Range 2492152..2507972, complement

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_6

Genomic

1. NT_167248.1 Reference GRCh37.p5 ALT_REF_LOCI_6

Range 2406050..2421866, complement

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Alternate HuRef

Genomic

1. AC_000138.1 Alternate HuRef

Range 30912688..30928437, complement

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

[Help top of page](#)

[Related Sequences](#)

Items 1 - 25

<< First < Prev Page of 2 [Next](#) > [Last](#) >>

Nucleotide

Heading Accession and Version

genomic [AB029343.1](#)

genomic [AB088104.1](#)

genomic [AB202104.1](#)

genomic [AC004195.1](#)

genomic [AL662833.4](#) (3603..19399)

genomic [AL662844.12](#) (81925..97724)

genomic [AL773544.5](#)

genomic [BA000025.2](#)

genomic [BX927139.8](#) (133963..135395)

genomic [CH471081.1](#)

genomic [CR753819.5](#) (63664..79461)

genomic [CR759815.3](#) (9072..24892)

genomic [CR847794.5](#) (2000..16386)

mRNA [AA356205.1](#)

mRNA [AB029331.1](#)

mRNA [AB112474.1](#)

mRNA [AB112475.1](#)

Protein

[BAA82158.1](#)

[BAC54937.1](#)

[BAE78628.1](#)

None

None

None

[CAI18483.1](#)

[BAB63313.1](#)

None

[EAX03361.1](#)

[EAX03362.1](#)

None

None

None

None

[BAA81890.1](#)

[BAD05130.1](#)

[BAD05131.1](#)

Nucleotide	Heading Accession and Version	Protein
mRNA	AF216493.1	AAF74221.1
mRNA	AK000204.1	BAA91007.1
mRNA	AK000217.1	BAA91016.1
mRNA	AK000533.1	BAA91236.1
mRNA	AK289446.1	BAF82135.1
mRNA	AK295494.1	BAG58414.1
mRNA	AK310626.1	None

Items 1 - 25

<< First < Prev Page 1 of 2 [Next](#) > Last >>

Protein Accession Links

Protein Accession	GenePept Link	UniProtKB Link
Q0EFB6	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q0EFB6
Q2L6G6	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q2L6G6
Q2TB68	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q2TB68
Q5STF0	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q5STF0
Q5STF1	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q5STF1
Q6IAC8	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q6IAC8
Q769H0	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q769H0
Q8TD31.2	GenPept	UniProtKB/Swiss-Prot:Q8TD31

[Help top of page](#)

[Additional Links](#)

Additional Links

- [Epigenomics](#)
- MIM [605310](#)
- UCSC [UCSC](#)
- UniGene [Hs.485075](#)

Gene LinkOut

The following [LinkOut](#) resources are supplied by external providers. These providers are responsible for maintaining the links.

[Chemical Information](#)

- [Interologous Interaction Database](#)

[Medical](#)

- [Pancreatic Expression Database](#)

[Molecular Biology Databases](#)

- PhosphoSitePlus
 - [comprehensive information related to post-translational modifications](#)
- Pharmacogenomics Knowledge Base
 - [Annotated Pharmacogenomic Information for CCHCR1 \[PharmGKB\]](#)
- [pfsNP](#)
- [NextBio](#)

- [KOMP Repository](#)
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
 - [hsa:54535](#)
- [InnateDB](#)
- [Ingenuity Pathways Analysis](#)
- [iHOP - Information Hyperlinked over Proteins](#)
- HuRef Browser
 - [HuRef Genome Annotation](#)
- [BioGPS](#)
- [GenScript](#)
- [The Gene Wiki](#)
- GeneNetwork
 - [Records for gene expression in Human](#)
- [GeneGo](#)
- [Genetic Association Database](#)
- FuncBase Gene Function Prediction Viewer
 - [Predicted Gene Functions](#)
- Domain Mapping of Disease Mutations
 - [CCHCR1](#)
- [BioLink: Biological knowledge connections](#)
- [CREB Target Gene Database](#)
- [The Comparative Toxicogenomics Database](#)
- [iRefWeb - iRefIndex release 8.0 - Consolidated Interactome](#)

[Research Materials](#)

- NITE Biological Resource Center
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK000533](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK000217](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK000204](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK295494](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK289446](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK310626](#)
- GeneCopoeia Inc.
 - [Order shRNA clones](#)
 - [Order full-length ORF clone](#)
 - [Order miRNA target clones](#)
- antibodies-online
 - [anti-Coiled-Coil alpha-Helical Rod Protein 1 antibodies](#)
- TaqMan® probe and primer sets from Applied Biosystems
 - [Genotyping Assays](#)
 - [Silencer Select siRNA](#)
 - [Gene Expression Assays](#)

[Miscellaneous](#)

- [QIAGEN GeneGlobe](#)
- InterologFinder.org
 - [InterologFinder](#)
- ExactAntigen/Labome
 - [Labome Researcher Resource](#)
 - [others](#)
 - [cDNA clone](#)

- [siRNA and shRNA](#)
- [antibody](#)

5. Klik Primary source: [HGNC:13930](#) untuk mencari sekuen gen secara detail, akan didapat:

CCHCR1

Approved Symbol ±	CCHCR1
Approved Name ±	coiled-coil alpha-helical rod protein 1
HGNC ID ±	HGNC:13930
Previous Symbols & Names ±	C6orf18, "chromosome 6 open reading frame 18"
Synonyms ±	HCR
Locus Type ±	gene with protein product
Chromosomal Location ±	6p21.3
HOMOLOGS ±	MGI:2385321 C Mouse Symbol: Cchcr1 HCOP D TreeFam D GenBank:AF216493 EMBL DDBJ C RefSeq:NM_001105563 D CCDS:CCDS4695.1 C Vega:OTTHUMG00000031112 C
NUCLEOTIDE SEQUENCES ±	Entrez Gene:54535 C Ensembl:ENSG00000204536 C NCBI Sequence Viewer UCSC:uc003nsp.3 D Ensembl Genome Browser Vega:OTTHUMG00000031112 UCSC Genome Browser C Vega Genome Browser
GENE RESOURCES ±	
PROTEIN RESOURCES ±	Uniprot:Q8TD31 D Interpro D OMIM D
CLINICAL RESOURCES ±	GeneTests D DECIPHER D COSMIC D
REFERENCES ±	PMID:10888604 , PMID:10545595 CiteXplore C GENATLAS D GeneCards D GOPubmed D
OTHER DATABASE LINKS ±	H-InvDB D QuickGO D Reactome D WikiGenes D

6. Klik GENATLAS akan didapatkan berbagai link yang dikehendaki untuk mendapat data lengkap struktur skematik gen, panjangnya, nukleotida, protein, promoter, data polimorfisme (single nucleotide polymorphisms atau SNPs) dan keterangan lain.

GENATLAS : GENE Database

[Home Page](#)

References	omim	sequences	Entrez Gene
HGNC	genecards	Ensembl	Unigene

FLASH GENE

Symbol	CCHCR1	<i>last update</i> : 16-02-2006
HGNC name	coiled-coil alpha-helical rod protein 1	
HGNC id	13930	
Location	6p21.3	
Synonym name	<input type="checkbox"/> trichohyalin homolog <input type="checkbox"/> alpha helix coiled coil rod homolog <input type="checkbox"/> chromosome 6 open reading frame 18	
Synonym symbol(s)	PG8, HCR, SBP, C6orf18	

DNA	RNA	EXP/sub-loc	PROTEIN	PATHOLOGY
---------------------	---------------------	-----------------------------	-------------------------	---------------------------

DNA [Back to top](#)

TYPE	functioning gene			
STRUCTURE	15.00 kb 18 Exon(s)			
regulatory sequence	Promoter			
motif	repetitive sequence other			
text structure	two SNP in exon 2			
MAPPING	cloned	Y	linked	N status provisional
Map	see POU5F1			

RNA [Back to top](#)

TRANSCRIPTS	type	messenger
--------------------	-------------	-----------

EXPRESSION / SUBCELLULAR LOCALIZATION [Back to top](#)

Type	ubiquitous						
constitutive of							
expressed in	(based on citations)						
	System	Organ 1	organ 2	organ 3	organ 4	level	Pmid
organ(s)	Digestive	intestine	small intestine			highly	
		liver				highly	

		stomach				moderately
	Lymphoid/Immune	spleen				moderately
		thymus				highly
	Nervous	brain				moderately
	Reproductive	female system	ovary			moderately
		female system	uterus	cervix		predominantly
		male system	testis			highly
	Respiratory	lung				lowly
	Skin/Tegument	skin				moderately
	Urinary	kidney				highly
		System	Tissue	S_Tissue	Ss_Tissue	level
	tissue	Blood / hematopoietic	bone marrow			
		Epithelial	barrier/lining			
		Lymphoid				
		Nervous	peripherous			
		System	Cell			Pmid
	cells	Skin/Tegument	keratinocyte			
	cell lineage					
	cell lines	pituitary tumor cell lines				
	fluid/secretion					
	at STAGE					
	SUBCELLULAR LOCALIZATION	intracellular				
	see intracellular ontology					
		intracellular,cytoplasm				
		intracellular,nucleus				
PROTEIN						
Back to top						
	PHYSICAL PROPERTIES					
	STRUCTURE					
	motifs/domains	<input type="checkbox"/> alpha helical coils				
	HOMOLOGY					
	interspecies	homolog to Drosophila CG6197				
		homolog to C.elegans C50F2.3				
		ortholog to chimpanzee her				
		ortholog to murine Ccher1				
	Homologene					

FAMILY	
CATEGORY	regulatory
basic FUNCTION	<input type="checkbox"/> may be a regulator of keratinocyte proliferation or differentiation
CELLULAR PROCESS	cell life, differentiation
see cell life ontology	
PHYSIOLOGICAL PROCESS	
PATHWAY	
metabolism	
signaling	
a component	
INTERACTION	
DNA	
RNA	
small molecule	
protein	
cell & other	
REGULATION	
inhibited by	interferon-gamma in keratinocytes
ASSOCIATED DISORDERS	
Back to top	
corresponding disease(s)	
Susceptibility	psoriasis (PSORS1)
Variant & Polymorphism SNP	associated with PSORS1
Candidate gene	
Marker	
Therapy target	
animal or cellular model	

6. Silakan kita pilih mana informasi yang kita perlukan
7. Untuk gen *mecA* MRSA juga dapat dilakukan dengan langkah seperti tersebut

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Pendahuluan

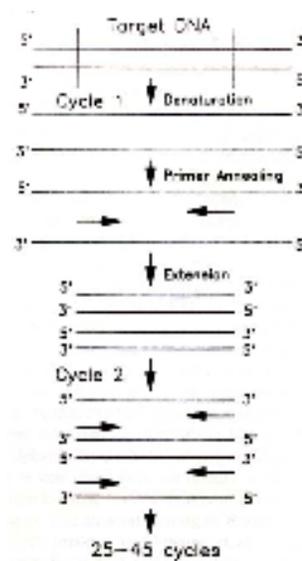
Sejak ditemukannya struktur DNA sebagai bentuk rantai ganda (*double helices*) oleh Watson dkk pada tahun 1953, telah terjadi suatu perkembangan yang luar biasa dalam bidang biologi molekuler. Hal ini dipacu oleh berbagai terobosan sebagai hasil ditemukannya berbagai teknik dan alat, misalnya teknik kloning dan rekombinan DNA. Terobosan-terobosan tersebut secara berantai telah melahirkan inovasi-inovasi baru yang pada akhirnya telah meningkatkan pemahaman terhadap berbagai proses biologis pada berbagai organisme.

Salah satu teknologi yang sangat berperan dalam memacu revolusi tersebut adalah teknik penggandaan sejumlah kecil atau fragmen *deoxyribonucleic acid* (DNA) dari suatu genom yang kompleks secara *in vitro* yang dikenal sebagai *Polymerase Chain reaction* (PCR). Teknik ini mula-mula ditemukan oleh salah seorang anggota pada *Cetus Corporation* yaitu Kary Mullis pada tahun 1983 yang kemudian membawanya memperoleh hadiah nobel dalam bidang kedokteran pada tahun 1984. Teknik ini merupakan reaksi kimia secara *in vitro* yang memungkinkan terjadinya sintesis sejumlah kecil target sekuen asam nukleat sehingga mampu menghasilkan suatu potongan DNA yang diinginkan dalam jumlah besar melalui reaksi enzimatik tanpa keterlibatan suatu unit sel. *Polymerase Chain reaction* mempunyai tiga kelebihan dari teknik sebelumnya yaitu spesifisitas, sensitivitas dan ketepatan. Suatu potongan DNA yang diinginkan dapat diperoleh dalam jumlah besar dan kadar yang murni sebagai hasil amplifikasi dari bahan DNA (template) yang kompleks hanya dalam beberapa jam. Sebelumnya proses ini memerlukan waktu berminggu-minggu atau bahkan berbulan-bulan dengan menggunakan prosedur kloning tradisional. Selama lebih dari satu dasawarsa sejak diperkenalkan, teknik ini telah digunakan secara luas dalam berbagai bidang termasuk bidang kedokteran. Berbagai proses patologis yang didasari oleh adanya defek molekul pada gen yang terdapat pada DNA telah dapat dibuktikan dengan menggunakan teknik ini. Dalam perkembangannya teknik ini telah mengalami berbagai modifikasi dan efisiensi

sesuai tujuan yang diinginkan misalnya teknik mengamplifikasi RNA untuk menghasilkan *complementary DNA* (cDNA) yaitu *Reverse-transcription* PCR (RT-PCR) dan kombinasi teknik *in situ hybridization* (PCR in situ).

Mekanisme PCR

Polymerase chain reaction adalah reaksi dalam sistem tabung untuk replikasi yang memungkinkan target sekuen DNA secara selektif diamplifikasi jumlahnya hingga beberapa juta kali lipat dalam waktu singkat. Berbeda halnya dengan reaksi pembelahan sel, replikasi DNA melibatkan suatu rangkaian reaksi yang diperantarai enzim-enzim, yang berakhir dengan terbentuknya penyalinan seluruh genom, sedangkan dalam tabung reaksi hanya digunakan satu macam enzim yaitu *DNA polymerase* yang akan mengamplifikasi fraksi spesifik dari gen. Dua buah sekuen primer digunakan untuk memblok daerah target untuk diamplifikasi. Sebuah primer adalah komplementer terhadap satu untai DNA di awal daerah target dan primer kedua adalah komplementer terhadap sekuen untai DNA pada ujung daerah target berlawanan.



Gambar 7. Diagram skematik amplifikasi PCR

Untuk melakukan reaksi PCR sejumlah kecil DNA target ditambahkan ke tabung yang berisi *DNA polymerase*, 2 primer oligonukleotida, empat

deoksinukleotida *building blocks* yaitu *dATP*, *dCTP*, *dGTP* dan *dTTP* dan *cofactor* $MgCl_2$. Selanjutnya campuran PCR tersebut masuk ke dalam tahapan siklus replikasi pada mesin *thermo cycler*.

Prinsip PCR

Tujuan PCR adalah menghasilkan sejumlah salinan dari suatu gen. Terdapat tiga langkah di dalam PCR yang diulang selama 30-40 siklus. Langkah ini dilakukan dengan *automated cycles* yang akan memanaskan dan mendinginkan tabung dengan campuran reaksi dalam jangka waktu singkat.

1. Denaturasi pada temperatur 94°C

Selama proses denaturasi yang berlangsung dalam beberapa menit, untai ganda DNA (dsDNA) mencair dan ikatannya terbuka sehingga terjadi pemisahan dsDNA yang menghasilkan untai tunggal DNA (ssDNA).

2. *Primer Annealing* pada temperatur sekitar 54°C

Primer bergerak berputar-putar yang disebabkan oleh gerak Brown. Ikatan ionik secara konstan terbentuk dan terpecah antara primer untai tunggal dan *template* untai tunggal. Reaksi ini menyebabkan terbentuknya ikatan yang lebih stabil pada *double stranded* DNA ini (*template* dan primer) dan selanjutnya *polymerase* dapat mencapainya dan kemudian mengawali proses penyalinan dari *template*. Dengan terbentuknya basa-basa menyebabkan sangat kuatnya ikatan ionik antara *template* dan primer sehingga tidak akan teruraikan. *Primer annealing* (hibridisasi primer) biasanya dilakukan pada temperatur 50-65⁰ C selama 1 menit. Pada tahap ini terjadi penempelan/hibridisasi primer pada bagian sekuen komplementer ssDNA.

Temperatur dan lamanya waktu yang diperlukan untuk *primer annealing* tergantung pada komposisi basa, panjang dan konsentrasi primer yang diamplifikasi. Umumnya dengan temperatur *primer annealing* antara 55-72°C,

reaksi akan berhasil baik. Peninggian temperatur *annealing* akan meningkatkan perbedaan primer yang tidak tepat yang di *annealing*, sehingga diperlukan temperatur yang ketat/*stringent temperature* terutama dalam beberapa siklus pertama dalam usaha meningkatkan spesifisitas. Untuk menghasilkan spesifisitas yang maksimum pada siklus awal, maka enzim dapat ditambahkan setelah tahap denaturasi pertama selama *primer annealing*.

3. Ekstensi atau pemanjangan primer pada temperatur 72⁰ C selama 1 menit.

Pada tahap ini terjadi pemanjangan primer sampai dengan sama dengan *template* hingga terbentuk dsDNA baru. Temperatur ini adalah temperatur yang ideal untuk bekerjanya *polymerase*. Primer yang telah mengandung beberapa basa telah mempunyai ikatan ionik yang kuat menghadapi *template*. Primer yang berada pada posisi yang tidak sesuai akan mengalami pelepasan akibat temperatur yang tinggi dan tidak menghasilkan suatu pemanjangan fragmen. Basa-basa yang komplemen dengan *template* tergabung/*coupled* ke primer pada ujung 3' (*polymerase* menambahkan dNTP dari ujung 5' ke 3', pembacaan *template* dari ujung 3' ke 5', basa akan ditambahkan secara komplementer ke *template*). Waktu untuk pemanjangan tergantung pada panjang dan konsentrasi sekuen target dan temperaturnya. Lazimnya pemanjangan dilakukan pada temperatur 72°C karena temperatur ini mendekati temperatur optimal untuk pemanjangan primer pada *template* model (*M13-based model template*). Waktu pemanjangan selama 1 menit pada temperatur 72°C adalah baik untuk menghasilkan produk sampai panjang 2 kb.

Proses denaturasi DNA, *primer annealing* dan ekstensi oleh *DNA polymerase* diatas berlangsung berulang-ulang sehingga dengan proses amplifikasi ini, setelah setiap siklus maka sekuen DNA akan menjadi dua kali lipat. Setelah 30 siklus berlangsung, maka akan tercapai sekitar 1 milyar salinan. Produk PCR yang dihasilkan pada setiap siklus PCR adalah komplementer dan mampu berikatan dengan primer dan setiap DNA yang disintesis adalah ganda untuk setiap siklus.

Persiapan PCR

Untuk melakukan suatu PCR, maka beberapa hal berikut harus dipersiapkan:

1. Penataan laboratorium
2. Isolasi dan ekstraksi DNA
3. Primer oligonukleotida
4. Persiapan PCR

1. Penataan Laboratorium

Untuk melakukan PCR diperlukan tiga area khusus di laboratorium yaitu:

- a. Ruang preparasi

Ruang ini dikhususkan untuk melakukan isolasi DNA atau RNA dari bahan sel, serum, darah atau jaringan. Karena DNA atau RNA sangat mudah rusak oleh enzim DNAase atau RNAase, maka prinsip sterilitas harus dijaga. Hal ini dimaksudkan untuk mengurangi kemungkinan kontaminasi dan sekaligus melindungi pekerja khususnya bila melakukan ekstraksi DNA dari bahan berbahaya. Selain itu diperlukan beberapa peralatan laboratorium standar, misalnya *microcentrifuge*, *waterbath*, pH meter dan lain-lain.

- b. Ruang PCR

Ruangan ini dikhususkan untuk pencampuran bahan-bahan untuk melakukan reaksi PCR. Pada umumnya bahan-bahan yang digunakan disimpan dalam temperatur beku dan dicampur dalam suhu dingin, oleh karena itu ruangan ini harus dilengkapi refrigerator. Hal yang penting adalah bahan yang dipakai dibutuhkan dalam volume dan molaritas yang relatif sangat kecil sehingga ketepatan dalam pencampuran sangat menentukan hasil PCR. Disamping itu peralatan untuk elektroforesis dapat pula ditempatkan di ruangan ini.

- c. Ruang gelap

Ruangan ini dilengkapi dengan transiluminator ultraviolet dan fotografi untuk mendeteksi hasil PCR dan sekaligus membuat dokumentasi dari bahan yang diperiksa.

2. Isolasi dan ekstraksi DNA

Isolasi dan ekstraksi DNA yang akan digunakan sebagai DNA *template* untuk analisis genetik merupakan prosedur yang harus dipersiapkan oleh peneliti atau klinisi dan yang paling menyita waktu di laboratorium, khususnya bila sampel yang akan diproses terdapat dalam jumlah besar. Berbagai prosedur isolasi yang cepat sesuai dengan jenis sel atau jaringan yang dipakai telah dipublikasi meskipun kadang-kadang dengan menggunakan berbagai bahan kimia yang berbahaya dan mahal. Pada umumnya sel mempunyai dua macam DNA yaitu yang terletak di dalam inti sel (chromosomal DNA) dan di luar inti sel (extrachromosomal). Untuk mengisolasi DNA dari suatu sel maka secara umum diperlukan bahan kimia atau manipulasi fisik untuk merusak dinding dan membran sel. Berbagai enzim misalnya proteinase K dan senyawa organik misalnya *phenol* dan kloroform atau *ion exchanger* dilaporkan memberikan hasil yang cukup baik. Selain itu untuk DNA *template* bisa diperoleh secara komersial baik berupa RNA total, *genomic libraries*, cDNA dan lainnya dan semuanya ini berasal dari spesies binatang yang berbeda serta meliputi juga berbagai jenis tipe sel dan jaringan. Selain itu sejumlah DNA, RNA dari tanaman juga secara komersial telah tersedia. Sampel untuk PCR bisa berupa ssDNA atau dsDNA atau RNA. Apabila yang digunakan RNA maka dipreparasi terlebih dahulu menjadi untai tunggal cDNA sebelum dilakukan PCR. Seringkali konsentrasi *target sequence* pada DNA *template* tidak diketahui oleh karena itu diperlukan optimalisasi PCR dengan mengadakan kontrol positif.

3. Primer oligonukleotida

Primer yang digunakan dalam suatu PCR adalah merupakan oligonukleotida yang disintesis dan dipurifikasi secara khusus dan disebut juga sebagai *amplimers*. Primer adalah molekul DNA yang pendek dan berantai tunggal

yang harus komplementer dengan ujung tertentu urutan DNA *template*. Pembuatan primer harus mengacu pada pedoman tertentu walaupun program komputer dapat membantu pembuatan desain primer. Kebanyakan primer mempunyai panjang 20-30 nukleotida yang disusun berdasarkan urutan basa dari bagian tertentu dari kedua rantai DNA yang akan diamplifikasi. Ukuran sepanjang ini memungkinkan temperatur *annealing* tinggi untuk digunakan. Apabila primer lebih panjang dari 30 nukleotida maka tidak akan meningkatkan spesifisitas. Jumlah yang optimal untuk amplifikasi akan bervariasi. Semakin panjang suatu primer, semakin spesifik rantai DNA targetnya, tetapi juga semakin mahal biaya sintesisnya. Konsentrasi primer yang optimal adalah antara 0,1 sampai 0,5 μM . Konsentrasi primer yang lebih tinggi akan menyebabkan *mispriming* dan penumpukan produk non-spesifik dan akan meningkatkan kemungkinan terbentuknya artefak yang disebut *primer-dimer*. Produk non-spesifik dan artefak dimer adalah substrat untuk PCR dan berkompetesi dengan produk yang diinginkan. Dalam suatu PCR digunakan dua macam primer. Primer pertama disebut sebagai *forward primer* yang disusun berdasarkan urutan basa dari urutan DNA rantai pertama (sense atau codon strand), sedangkan primer kedua disebut sebagai *reverse primer* yang disusun berdasarkan urutan basa dari rantai kedua (antisense atau anticodon). Secara konvensional telah disepakati penulisan urutan itu dari kiri dengan simbol ujung 5' dan ujung kanan ujung 3'. Dalam merancang suatu primer yang ideal yang diharapkan adalah primer dengan panjang 18-28 nukleotida. Sedapat mungkin 50-60% komposisinya berupa basa G dan C oleh karena hal ini berpengaruh pada penentuan suhu leleh (melting temperature = T_m) dan temperatur *annealing* dari PCR. Sebagai rumus sederhana umumnya dipergunakan formula sebagai berikut:

$$T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$$

T_m = *melting temperature*

G= jumlah basa *guanine* dalam primer

C= jumlah basa *cytosine* dalam primer

A= jumlah basa *adenine* dalam primer

T= jumlah basa *thymine* dalam primer

Suhu optimum *annealing* umumnya berlangsung 5° C dibawah atau diatas T_m . Disamping itu di dalam primer harus dihindari adanya urutan basa tertentu yang terlalu panjang. Selain itu harus dihindarkan adanya urutan basa yang berpasangan dengan urutan basa pada primer lainnya khususnya pada ujung 5' dan 3'. Hal ini akan merangsang terjadinya perlekatan antara kedua primer tersebut pada fase *annealing* yang disebut *primer-dimer*. Hal lain yang perlu diperhatikan adalah sedapat mungkin dihindari adanya ketidaksesuaian antara primer dengan DNA *template*.

4. Persiapan PCR

Dalam PCR umumnya dilakukan dalam volume yang relatif kecil (total reaksi antara 5 –100 μ l). Oleh karena itu dapat diperkirakan pentingnya ketelitian dalam penggunaan dan ketepatan pipet. Saat ini berbagai pipet dengan ketepatan sangat kecil dan sederhana penggunaannya telah diproduksi. Oleh karena sangat sedikitnya jumlah volume dari setiap komponen yang dipakai, maka harus diyakinkan bahwa zat dalam pipet memang masih ada atau tidak berlebih dari volume yang diharapkan. Pada penggunaan PCR untuk kepentingan diagnostik, khususnya harus dilakukan lebih hati-hati karena keteledoran dalam pemipetan (misalnya *oversucking*) dapat menyebabkan bercampurnya beberapa sampel dalam pipet. Untuk menghindari kesalahan pencampuran, sebelum PCR sebaiknya telah dibuat rencana kerja dengan tabel komponen yang dipakai dan juga setiap bahan di-*aliquote* dalam beberapa tabung.

Enzim *Taq DNA polymerase*

Pada percobaan awal PCR, digunakan enzim *Klenow fragment* dari DNA *polymerase* I dari *Escherichia coli* pada temperatur 37°C, namun hasil PCR yang diperoleh tidak spesifik. Dengan diisolasinya DNA *polymerase* yang tahan panas dari *Thermus aquaticus* sehingga disebut sebagai *Taq DNA polymerase*, maka

dimungkinkan proses *annealing* dan ekstensi/pemanjangan pada berbagai kondisi temperatur sehingga hasil amplifikasi non-spesifik dapat dikurangi. Kelebihan enzim ini dibandingkan dengan enzim *Klenow fragment* adalah ketahanannya terhadap panas yang memungkinkannya tetap aktif pada berbagai fluktuasi temperatur. Selain itu produk PCR meningkat dengan penggunaan enzim *Taq DNA polymerase* ini, setelah 30 siklus hasil amplifikasi *target sequence* akan menghasilkan 4×10^6 .

Konsentrasi enzim *Taq DNA polymerase* (Perkin-Elmer Cetus) yang direkomendasikan dalam reaksi adalah antara 1–2,5 unit (SA = 20 unit/pmol) per 100- μ l, namun kebutuhan enzim tersebut bisa bervariasi yaitu tergantung pada target individual *template* atau primer. Untuk optimalisasi PCR, direkomendasikan konsentrasi enzim berkisar antara 0,5-5 unit/100 μ l. Apabila konsentrasi enzim terlalu tinggi, maka akan terjadi akumulasi produk yang non-spesifik, sedangkan apabila terlalu sedikit maka produk PCR yang dihasilkan terlalu sedikit.

Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs)

Zat ini merupakan campuran dari keempat macam nukleosida yaitu *dATP*, *dCTP*, *dGTP*, dan *dTTP* yang merupakan dasar reaksi polimerisasi dari primer. Larutan dNTP harus dinetralkan, biasanya dengan NaOH sampai pH 7,0-7,5 dan konsentrasinya harus ditentukan secara spektrofotometer. Sediaan larutan dNTP harus diencerkan menjadi 10 mM dan disimpan pada -20° C. Apabila akan digunakan maka direkomendasikan 1mM untuk setiap dNTP. Konsentrasi keempat dNTP harus ekuivalen untuk mengurangi kesalahan dalam penggabungan.

Magnesium Chloride ($MgCl_2$) dan bufer

Konsentrasi ion magnesium (Mg) perlu dioptimalisasikan, karena konsentrasinya akan mempengaruhi reaksi: *primer annealing*, spesifisitas produk dan hasil PCR, pembentukan artefak *primer-dimer*, dan aktivitas enzim. Disatu sisi enzim *Taq DNA polymerase* harus bebas dari pengaruh Mg waktu berikatan dengan *DNA template*, primer dan dNTP, sedangkan disisi lain PCR harus

mengandung 0,5-2,5 mM Mg untuk konsentrasi dNTP total. Konsentrasi $MgCl_2$ yang optimal adalah 1,0-1,5 mM. Apabila konsentrasinya tidak cukup menyebabkan rendahnya hasil PCR dan kelebihan ion Mg akan menyebabkan akumulasi produk non-spesifik. Komponen dan komposisi bufer dalam setiap PCR bervariasi tergantung pada supliernya. Berbagai peneliti telah menemukan penggunaan pelbagai zat tertentu, misalnya glycerol, *dimethylsulphoxide* (DMSO), dan lainnya. Beberapa komponen dasar dari bufer PCR lainnya yang seringkali digunakan adalah Tris-HCl dalam pH basa dan KCl. Yang direkomendasikan adalah 10-50 mM Tris-HCl (antara pH 8,3-8,8) pada suhu 20° C dimana Tris merupakan bufer ionik dipolar. Untuk membantu *primer annealing* maka dalam reaksi dapat ditambahkan KCl sampai sebanyak 50 mM, sedangkan NaCl atau KCl diatas 50 mM menghambat aktivitas enzim *Taq DNA polymerase*. Gelatin atau albumin serum bovine (100 µg/ml) dan detergen non-ionik seperti Tween 20 merupakan komponen lain dalam PCR yang bermanfaat untuk stabilisasi enzim. Dalam protokol PCR lainnya komponen terakhir ini tidak digunakan dan PCR tetap berjalan baik.

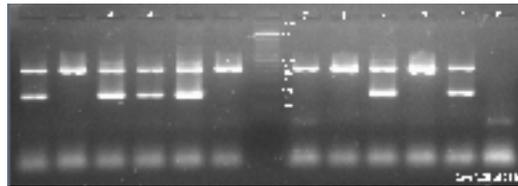
Jumlah Siklus

Jumlah siklus optimum terutama tergantung pada konsentrasi awal DNA target. Kesalahan yang biasa terjadi adalah melakukan terlalu banyak siklus karena hal ini akan meningkatkan jumlah dan kompleksitas produk non-spesifik, dan sebaliknya apabila siklus terlalu sedikit maka akan dihasilkan produk PCR yang sedikit. Pedoman untuk jumlah siklus mengacu pada konsentrasi target awal adalah sebagai berikut:

Jumlah molekul target	Jumlah siklus
3×10^5	25-30
$1,5 \times 10^4$	30-35
1×10^3	35-40
50	40-45

Deteksi Hasil PCR

Hasil PCR dapat dideteksi dengan teknik elektroforesis. Prinsip teknik ini adalah dengan menjalankan DNA pada medium tertentu yang dapat berupa gel agar atau *polyacrilamide gel* dalam konsentrasi tertentu dalam medan listrik. Dalam medium tersebut setiap DNA dengan panjang tertentu (ditentukan dalam pasangan basa = bp) akan mempunyai mobilitas yang berbeda sehingga pada waktu tertentu akan terjadi pemisahan sesuai dengan ukuran pasangannya. Oleh karena DNA diwarnai dengan senyawa tertentu, biasanya *ethidium bromide*, maka hasil pemisahan tadi dapat dideteksi dengan menggunakan sinar ultraviolet.



Gambar 8. Visualisasi produk PCR pada gel agar (Sumber: Yuwono, 2009)

Aplikasi PCR

Polymerase chain reaction merupakan metode yang cepat, dapat dipercaya untuk mendeteksi semua mutasi yang berhubungan dengan penyakit genetik dari mulai insersi, delesi, sampai mutasi titik. Teknik PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi adanya materi genetik yang tidak diinginkan seperti kasus infeksi virus dan bakteri. Pada metode konvensional digunakan kultur mikroorganisme atau serologi antibodi yang memerlukan waktu berminggu-minggu.

Ringkasnya, semua bidang kedokteran yang berkaitan dengan kelainan genetik pada manusia atau adanya infeksi mikroorganisme dapat dilakukan pelacakan asam nukleat dengan metode PCR.

Disain Primer

Bagian penting dari PCR adalah mendisain primer spesifik untuk gen yang akan kita PCR. Sebagai contoh bila kita akan melakukan PCR dengan target gen ACE human, langkah yang dilakukan adalah:

1. Membuka situs gene bank dan mencari gen ACE human.
2. Mendownload sekuen dalam bentuk PASTA dengan sekuen sekitar 500-1000 bp
3. Memasukkan sekuen tersebut kedalam software online untuk menemukan primer yang sesuai. Salah satu software online yang simple dan mudah diakses adalah: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
4. Akan didapatkan primer yang tepat dan beberapa primer alternatif.
5. Selamat mencoba

GEN ACE

[Display Settings:](#)

- [Full Report](#)

[Send to:](#)

ACE angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1 [*Homo sapiens*]

Gene ID: 1636, updated on 1-Jan-2012

[Help top of page](#)

[Summary](#)

Official Symbol ACE provided by [HGNC](#)

Official Full Name angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1 provided by

[HGNC](#)

Primary source [HGNC:2707](#)

See related [Ensembl:ENSG00000159640;](#) [HPRD:00108;](#) [MIM:106180;](#)

[Vega:OTTHUMG00000154927](#)

Gene type protein coding

RefSeq status REVIEWED

Organism [Homo sapiens](#)

Lineage

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo

Also known as DCP; ACE1; DCP1; CD143; MVCD3

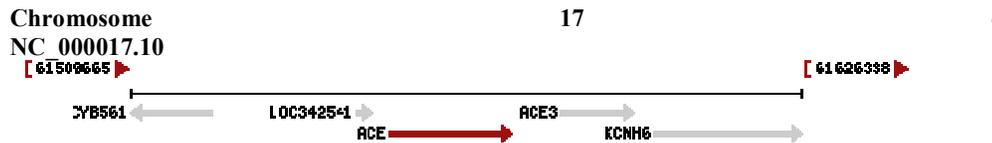
Summary

This gene encodes an enzyme involved in catalyzing the conversion of angiotensin I into a physiologically active peptide angiotensin II. Angiotensin II is a potent vasopressor and aldosterone-stimulating peptide that controls blood pressure and fluid-electrolyte balance. This enzyme plays a key role in the renin-angiotensin system. Many studies have associated the presence or absence of a 287 bp Alu repeat element in this gene with the

levels of circulating enzyme or cardiovascular pathophysiologies. Multiple alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been identified, and two most abundant spliced variants encode the somatic form and the testicular form, respectively, that are equally active. [provided by RefSeq, May 2010]

[Help top of page](#)
[Genomic context](#)

Location :
17q23.3
Sequence :
Chromosome: 17; NC_000017.10 (61554422..61575741)
See ACE in [Epigenomics](#), [MapViewer](#)



[Help top of page](#)
[Genomic regions, transcripts, and products](#)

Genomic Sequence

Go to [nucleotide](#) [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)



Go to [reference sequence details](#)

[Help top of page](#)
[Bibliography](#)

Related articles in PubMed

1. [Association of angiotensin converting enzyme \(ACE\) gene I/D polymorphism and polycystic ovary syndrome \(PCOS\)](#). Bayram B, *et al.* Gene, 2011 Dec 10. PMID 21939743.
2. [No association between angiotensin I converting enzyme \(ACE\) I/D polymorphism and gastric cancer risk among Japanese](#). Hibi S, *et al.* Nagoya J Med Sci, 2011 Aug. PMID 21928698.
3. [Lack of association between gene polymorphisms of Angiotensin converting enzyme, Nod-like receptor 1, Toll-like receptor 4, FAS/FASL and the presence of Helicobacter pylori-induced premalignant gastric lesions and gastric cancer in Caucasians](#). Kupcinskas J, *et al.* BMC Med Genet, 2011 Aug 24. PMID 21864388.
4. [No association of angiotensin I converting enzyme I/D polymorphism with domain-specific cognitive function in aged men without dementia](#). Liu ME, *et al.* Neuromolecular Med, 2011 Sep. PMID 21833743.
5. [Association between polymorphisms of the renin angiotensin system and carotid stenosis](#). Sticchi E, *et al.* J Vasc Surg, 2011 Aug. PMID 21819925.

[See all \(1816\) citations in PubMed](#)

See citations in PubMed for homologs of this gene provided by HomoloGene

GeneRIFs: Gene References Into Functions What's a GeneRIF?

1. [possible participation of angiotensin-converting enzyme, neutral endopeptidase and aminopeptidase P as an inactivation pathway of bradykinin](#)
2. [The allelic/genotypic frequency of the ACE I/D polymorphism was compared among centenarians and nonagenarians and a control group of healthy young adults.](#)
3. [The D allele or DD genotype is associated with immunoglobulin A nephropathy \(IgAN\) risk in Asian, but not in Caucasian populations; there was no significant association between the D allele or DD gene and IgAN progression for Asians and Caucasians.](#)
4. [combined polymorphisms of A-240T and A2350G seem to affect serum ACE level as well as diastolic blood pressure](#)
5. [This study shows that cardiovascular risk factors \(such as smoking and diabetes\) are associated with higher levels of circulating ACE in men.](#)
6. [The enhanced ACE activity associated with the D allele is associated with higher left ventricular mass.](#)
7. [Maternal glycaemic control during the last weeks of pregnancy seems to be influenced by an interaction of the ACE I/D genotyp and fetal sex.](#)
8. [ACE I/D polymorphism is prognostic factor for Acute Lung Injury \(ALI\); patients with DD genotype have higher mortality; polymorphism influences expression of ACE gene in LPS-stimulated PBMC, DD genotype leads to higher level of mRNA and enzyme activity](#)
9. [could not show a significant role of serum ACE levels and ACE I/D genetic polymorphism in the etiopathogenesis of age-related macular degeneration in the Turkish population](#)
10. [study in Turkish patients with polycystic ovary syndrome\(PCOS\)to determine frequency of I/D polymorphism genotypes of ACE gene and examine role of this polymorphism in PCOS development; DD genotype should be considered a genetic marker in PCOS development](#)

Submit: [New GeneRIF Correction See all \(770\)](#)

[Help top of page](#)

Phenotypes

[Review eQTL and phenotype association data in this region using PheGenI](#)

[A genome-wide association study identifies new loci for ACE activity: potential implications for response to ACE inhibitor.](#)

[Alzheimer disease, susceptibility to](#)

[Diabetic nephropathy, susceptibility to](#)

[Microvascular complications of diabetes 3](#)

[Renal tubular dysgenesis](#)

[SARS, progression of](#)

[Help top of page](#)

[HIV-1 protein interactions](#)

Protein

[Envelope surface glycoprotein gp160.env precursor](#)

GeneInteraction

HIV-1 gp160-derived peptide p18 presented by H-2Dd class I major histocompatibility complex molecules is processed by [PubMed](#) angiotensin-1 converting enzyme (ACE) prior to T cell

Pubs

Protein **GeneInteraction** **Pubs**
stimulation by the peptide p18

[Go to the HIV-1, Human Protein Interaction Database](#)

[Help top of page](#)

[Interactions](#)

Products	Interactant	Other Gene	ComplexSource	Pubs	Description
P12821	P50052	AGTR2	HPRD	PubMed	
P12821	P30411	BDKRB2	HPRD	PubMed	
P12821	P21964	COMT	HPRD	PubMed	
BioGRID:108004	BioGRID:113164	UBC	BioGRID	PubMed	Reconstituted Complex

[Help top of page](#)

[General gene information](#)

[Markers](#)

- SHGC-57821 (e-PCR)
 - [UniSTS:19461](#)
- SHGC-175 (e-PCR)
 - [UniSTS:25620](#)
- ACE (e-PCR)
 - [UniSTS:504596](#)
- GDB:186915 (e-PCR)
 - [UniSTS:155520](#)
- PMC310924P2 (e-PCR)
 - [UniSTS:272813](#)
- PMC310924P3 (e-PCR)
 - [UniSTS:272814](#)
- G59596 (e-PCR)
 - [UniSTS:136900](#)
- RH17589 (e-PCR)
 - [UniSTS:50661](#)
- GDB:631883 (e-PCR)
 - [UniSTS:158438](#)
- GDB:631894 (e-PCR)
 - [UniSTS:158439](#)

Genotypes

- [See ACE SNP Geneview Report](#)
- [See ACE SNP Genotype Report](#)
- See ACE SNP Variation Viewer Report 

Related pseudogene(s)

1 found [Review record\(s\) in Gene](#)

Homology

- [Homologs of the ACE gene](#): The ACE gene is conserved in chimpanzee, dog, mouse, rat, chicken, zebrafish, and mosquito.
- [Map Viewer](#) (Mouse, Rat)

Pathways from BioSystems

- [ACE Inhibitor Pathway, organism-specific biosystem](#) (from WikiPathways)
- [Chagas disease \(American trypanosomiasis\), organism-specific biosystem](#) (from KEGG)
- [Chagas disease \(American trypanosomiasis\), conserved biosystem](#) (from KEGG)
- [Hypertrophic cardiomyopathy \(HCM\), organism-specific biosystem](#) (from KEGG)
- [Hypertrophic cardiomyopathy \(HCM\), conserved biosystem](#) (from KEGG)
- [Renin-angiotensin system, organism-specific biosystem](#) (from KEGG)
- [Renin-angiotensin system, conserved biosystem](#) (from KEGG)

Clone Names

- MGC26566

Gene Ontology Provided by GOA

Function

[actin binding](#)
[bradykinin receptor binding](#)
[carboxypeptidase activity](#)
[chloride ion binding](#)
[drug binding](#)
[metal ion binding](#)
[metallopeptidase activity](#)
[metallopeptidase activity](#)
[peptidase activity](#)
[peptide binding](#)
[peptidyl-dipeptidase activity](#)
[peptidyl-dipeptidase activity](#)
[protein binding](#)
[zinc ion binding](#)

Items 1 - 25

<< First < Prev Page of 2 [Next](#) > Last >>

Process

[angiotensin catabolic process in blood](#)
[arachidonic acid secretion](#)

Evidence Code

[IDA](#)
[IPI](#)
[IEA](#)
[IDA](#)
[IDA](#)
[IEA](#)
[IDA](#)
[ISS](#)
[IEA](#)
[IEA](#)
[IDA](#)
[ISS](#)
[IPI](#)
[IDA](#)

Pubs

[PubMed](#)
[PubMed](#)

[PubMed](#)
[PubMed](#)

[PubMed](#)

[PubMed](#)
[PubMed](#)
[PubMed](#)
[PubMed](#)

Evidence Code

[IC](#)
[IDA](#)

Pubs

[PubMed](#)
[PubMed](#)

Process

[blood vessel remodeling](#)
[eating behavior](#)
[heart contraction](#)
[hemopoietic stem cell differentiation](#)
[hormone catabolic process](#)
[hormone catabolic process](#)
[kidney development](#)
[mononuclear cell proliferation](#)
[neutrophil mediated immunity](#)
[peptide catabolic process](#)
[positive regulation of apoptotic process](#)
[positive regulation of inflammatory response](#)
[positive regulation of neurogenesis](#)
[proteolysis](#)
[regulation of blood pressure](#)
[regulation of renal output by angiotensin](#)
[regulation of smooth muscle cell migration](#)
[regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin](#)
[regulation of vasoconstriction](#)
[regulation of vasodilation](#)
[response to hypoxia](#)
[response to lipopolysaccharide](#)
[response to nutrient levels](#)

Items 1 - 25

<< First < Prev Page of 2 [Next](#) > [Last](#) >>

Component

[endosome](#)
[external side of plasma membrane](#)
[extracellular region](#)
[extracellular space](#)
[integral to membrane](#)
[membrane fraction](#)
[plasma membrane](#)
[Help top of page](#)

General protein information

Preferred Names

angiotensin-converting enzyme

Names

angiotensin-converting enzyme
kininase II
peptidase P
CD143 antigen
testicular ECA
carboxycathepsin
dipeptidyl carboxypeptidase 1
dipeptidyl carboxypeptidase I
angiotensin converting enzyme, somatic isoform

NP_000780.1

- EC [3.4.15.1](#)

Evidence Code

[IC](#) [PubMed](#)
[IEA](#)
[IEA](#)
[IC](#) [PubMed](#)
[IDA](#) [PubMed](#)
[ISS](#) [PubMed](#)
[IMP](#) [PubMed](#)
[IC](#) [PubMed](#)
[IEA](#)
[IDA](#) [PubMed](#)
[IEA](#)
[IEA](#)
[IEA](#)
[ISS](#) [PubMed](#)
[IC](#) [PubMed](#)
[ISS](#)
[IC](#) [PubMed](#)
[IC](#) [PubMed](#)
[IC](#) [PubMed](#)
[IEA](#)
[IEA](#)
[IEA](#)

Pubs

Evidence Code

[IDA](#) [PubMed](#)
[IDA](#) [PubMed](#)
[IEA](#)
[IDA](#) [PubMed](#)
[IEA](#)
[IDA](#) [PubMed](#)
[IDA](#) [PubMed](#)

Pubs

NP_001171528.1

- EC [3.4.15.1](#)

NP_690043.1

- EC [3.4.15.1](#)

[Help top of page](#)
[NCBI Reference Sequences \(RefSeq\)](#)

RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

Genomic

1. NG_011648.1 RefSeqGene

Range

4989..26308

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

mRNA and Protein(s)

1. [NM_000789.3](#) → [NP_000780.1](#) angiotensin-converting enzyme isoform 1 precursor

Status: REVIEWED

Description

Transcript Variant: This variant (1), also known as the endothelial or somatic form, represents the longest transcript and encodes the longest isoform (1).

Source sequence(s)

[AB208971](#), [AC113554](#), [AK296566](#)

Consensus CDS

[CCDS11637.1](#)

UniProtKB/TrEMBL

[B4DKH4](#)

UniProtKB/Swiss-Prot

[P12821](#)

Related

[ENSP00000290866](#),

[OTTHUMP00000206956](#),

[ENST00000290866](#),

[OTTHUMT00000337675](#)

Conserved Domains (2) [summary](#)

[pfam01401](#)

Location:634

–

1228

Blast Score: 3086

Peptidase_M2; Angiotensin-converting enzyme

[cd06461](#)

Location:652

–

1212

Blast Score: 2615

M2_ACE; Peptidase family M2 Angiotensin converting enzyme (ACE)

2. [NM_001178057.1](#) → [NP_001171528.1](#) angiotensin-converting enzyme isoform 3 precursor

Status: REVIEWED

Description

Transcript Variant: This variant (3) lacks multiple 5' exons and an in-frame exon in the 3' region, but has an alternate 5' exon, compared to variant 1. The resulting isoform (3) is shorter, and has a distinct N-terminus and lacks an internal segment, compared to isoform 1.

Source sequence(s)

[AB208971](#), [AC113554](#), [AK301988](#), [BM908222](#), [M26657](#)

Consensus CDS

[CCDS54155.1](#)

UniProtKB/TrEMBL

[B4DX13](#)

UniProtKB/Swiss-Prot

[P12821](#)

Related

[ENSP00000392247](#), [ENST00000413513](#)

Conserved Domains (2) [summary](#)

[pfam01401](#)

Location:66 – 613

Blast Score: 2788

Peptidase_M2; Angiotensin-converting enzyme

[cd06461](#)

Location:78 – 597

Blast Score: 2322

M2_ACE; Peptidase family M2 Angiotensin converting enzyme (ACE)

3. [NM_152830.2](#) → [NP_690043.1](#) angiotensin-converting enzyme isoform 2 precursor

Status: REVIEWED

Description

Transcript Variant: This variant (2), also known as the testicular form, lacks multiple 5' exons, but has an alternate 5' exon, compared to variant 1. The resulting isoform (2) is shorter and has a distinct N-terminus, compared to isoform 1.

Source sequence(s)

[AB208971](#), [AC113554](#), [BM908222](#), [M26657](#)

Consensus CDS

[CCDS45755.1](#)

UniProtKB/Swiss-Prot

[P12821](#)

Related

[ENSP00000290863](#), [ENST00000290863](#)

Conserved Domains (2) [summary](#)

[pfam01401](#)

Location:66 – 654

Blast Score: 3079

Peptidase_M2; Angiotensin-converting enzyme

[cd06461](#)

Location:78 – 638

Blast Score: 2630

M2_ACE; Peptidase family M2 Angiotensin converting enzyme (ACE)

RefSeqs of Annotated Genomes: Build 37.3

The following sections contain reference sequences that belong to a specific genome build. [Explain](#)

Reference GRCh37.p5 Primary Assembly

Genomic

1. NC_000017.10 Reference GRCh37.p5 Primary Assembly

Range 61554422..61575741

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Alternate HuRef

Genomic

1. AC_000149.1 Alternate HuRef

Range 56922781..56944100

Download

[GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Suppressed Reference Sequence(s)

The following Reference Sequences have been suppressed. [Explain](#)

[NM_152831.1](#): Suppressed sequence

Description

NM_152831.1: This RefSeq was permanently suppressed because it is a nonsense-mediated mRNA decay (NMD) candidate.

[Help top of page](#)

Related Sequences

Items 1 - 25

<< First < Prev Page of 2 [Next](#) > Last >>

Nucleotide	Protein
genomic A31567.1	CAA02045.1
genomic AC113554.9 (83903..128672)	None
genomic AF118569.1	AAD28560.1
	AAD28561.1
genomic AF229986.1	None
genomic AY436326.1	AAR03504.1
genomic AY999972.1	ABA39228.1
genomic AY999973.1	ABA39229.1
genomic CH471109.2	EAW94311.1
	EAW94312.1
	EAW94313.1

Nucleotide	Heading	Accession and Version	Protein
			EAW94314.1
			EAW94315.1
			EAW94316.1
			EAW94317.1
			EAW94318.1
			EAW94319.1
			EAW94320.1
			EAW94321.1
genomic		EU332840.1	ABY87529.1
mRNA		AB208971.1	BAD92208.1
mRNA		AK296566.1	BAG59186.1
mRNA		AK300516.1	BAG62228.1
mRNA		AK301988.1	BAG63395.1
mRNA		AK302019.1	BAG63418.1

Items 1 - 25

<< First < Prev Page of 2 Next > Last >>

Protein Accession Links

	GenePept Link	UniProtKB Link
P12821.1	GenPept	UniProtKB/Swiss-Prot:P12821
Q16425	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q16425
Q3KRI5	GenPept	UniProtKB/TrEMBL:Q3KRI5

[Help top of page](#)

[Additional Links](#)

Additional Links

- [Epigenomics](#)
- MIM [106180](#)
- PharmGKB [PA139](#)
- GeneTests for MIM: [106180](#)
- Genes and Disease [Alzheimer.html](#)
- UCSC [UCSC](#)
- UniGene [Hs.298469](#)

Gene LinkOut

The following [LinkOut](#) resources are supplied by external providers. These providers are responsible for maintaining the links.

[Chemical Information](#)

- [Interologous Interaction Database](#)

[Medical](#)

- [Pancreatic Expression Database](#)
- [Breast Cancer TissueBank Bioinformatics Portal](#)

[Molecular Biology Databases](#)

- [CutDB, Proteolytic Event Database \(part of Proteolysis MAP \(PMAP\), proteolysis reasoning environment\)](#)
- PhosphoSitePlus
 - [comprehensive information related to post-translational modifications](#)
- Pharmacogenomics Knowledge Base
 - [Pharmacogenomic Information for ACE \[PharmGKB\]](#)
- [pfSNP](#)
- [NextBio](#)
- [KOMP Repository](#)
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
 - [hsa:1636](#)
 - [Hypertrophic cardiomyopathy \(HCM\)](#)
 - [Chagas disease \(American trypanosomiasis\)](#)
 - [Renin-angiotensin system](#)
- XTractor
 - [Manually annotated facts for ACE](#)
- [InnateDB](#)
- [Ingenuity Pathways Analysis](#)
- [iHOP - Information Hyperlinked over Proteins](#)
- HuRef Browser
 - [HuRef Genome Annotation](#)
- [Human Gene Mutation Database](#)
- [BioGPS](#)
- [GenScript](#)
- [The Gene Wiki](#)
- GeneNetwork
 - [Records for gene expression in Human](#)
- [GeneGo](#)
- [Genetic Association Database](#)
- FuncBase Gene Function Prediction Viewer
 - [Predicted Gene Functions](#)
- Domain Mapping of Disease Mutations
 - [ACE](#)
- [BioLink: Biological knowledge connections](#)
- [CREB Target Gene Database](#)
- [The Comparative Toxicogenomics Database](#)
- [iRefWeb - iRefIndex release 8.0 - Consolidated Interactome](#)

[Research Materials](#)

- NITE Biological Resource Center
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK296566](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK309514](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK302019](#)
 - [Human cDNA clones used in NEDO Project / AK301988](#)
- GeneCopoeia Inc.
 - [Order shRNA clones](#)
 - [Order full-length ORF clone](#)
 - [Order miRNA target clones](#)
- antibodies-online
 - [anti-Carboxypeptidase E antibodies](#)
 - [anti-Angiotensin I Converting Enzyme \(Peptidyl-Dipeptidase A\) 1 antibodies](#)
- TaqMan® probe and primer sets from Applied Biosystems

- [Genotyping Assays](#)
- [Silencer Select siRNA](#)
- [Gene Expression Assays](#)

Tools

- [GeneMANIA](#)

Miscellaneous

- [QIAGEN GeneGlobe](#)
- [InterologFinder.org](#)
 - [InterologFinder](#)
- [ExactAntigen/Labome](#)
 - [antibody review](#)
 - [others](#)
 - [ELISA and assay kit](#)
 - [biochemicals](#)
 - [protein and peptide](#)
 - [cDNA clone](#)
 - [siRNA and shRNA](#)
 - [antibody](#)
 - [Labome Researcher Resource](#)

PASTA SEKUEN: SEKITAR 17.700 BP

Misal kita ambil 900 sekuen dari sekuen 1 sd 900 (warna biru)

Homo sapiens chromosome 17, GRCh37.p5 Primary Assembly

NCBI Reference Sequence: NC_000017.10

[GenBank Graphics](#)

>gi|224589808:61554422-61575741 Homo sapiens chromosome 17, GRCh37.p5

Primary Assembly

```

AGAAGGGGCAGAGCCGAGCACCGCGCACCGCGTCATGGGGGCCGCTCGGGCCGCCGGGGGGCCGGGGCTG
CTGCTGCCGCTGCCGCTGCTGTTGCTGCTGCCGCCGCGAGCCCGCCCTGGCGTTGGACCCCGGGCTGCAGC
CCGGCAACTTTTCTGCTGACGAGGCCGGGGCGCAGCTCTTCGCGCAGAGCTACAACCTCCAGCGCCGAACA
GGTGCTGTTCCAGAGCGTGGCCGCCAGCTGGGCGCACGACACCAACATCACCGCGGAGAATGCAAGGCGC
CAGGTGGGCGCCCGGGCCCGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGCCGCGGGCCAAATCACAGCACGGCCGGCT
TGTGGGGCGGCGAGGCTGGCGCCCCGACCCGAACCCACCCGACCCGGACCCCTCGCCCCGACAGTCA
GCCCGGGGGCCGAGCGCCGGGCTGCGCGCACGGCCTGCGCTCCCAGCATGCACGAGTTGGATGGATGAG
GGTGGCTGCTCCAGGCCGCGCCCGCCTTCGCCGAAGGTGCTGGGCTTGGCTCTGGGGCCCCCGGCTCT
CGGGCAGCTGCCCTTCTCACTCCGGACGCTGTCGCTGTCACCGTCACCGCACTGCAGTGTCCATCCACCC
TCCACTCGCCCGCCTCTTTCTGGTCCCAATTTCTGCTCCACCATTCCCATGAGGCAGATTCCCTCCAG
AAGGAGGAAGCGCGGCTTCCGCAACTAAGGTCTCCCGCAGGGATCTCCCGAGGGCCCGGGCTCTGGAAG
CCCTTGGCCTTCCCTCCCTCCCCAGCACCGTGGCTTCTCCTTTATGGCTGCATCTAAGCAGGGTCTTA
CACCTCCCTGCCCTCCTGGTGCCCAATAGGAGGAAGCAGCCCTGCTCAGCCAGGAGTTTGGCGAGGCT
GGGGCCAGAAGGCCAAGGAGCTGTATGAACCGATCTGGCAGAACTTACGGACCCGAGCTGCGCAGGAT
CATCGGAGCTGTGCGCACCCCTGGGCTCTGCCAACCTGCCCTGGCTAAGCGGCAGCAGGTGGGCTGAGGG
CTGAGGCAGAGCTCGGGGGCGGCTCCTAGTGCCCCATCGTGGGGTGGGGGAGAGCAGCCATCAGGG

```

AGGGAGGAACCCCTGGGATCCACATGGGCCCTGACAGAAGGGAAAGCCCAGGTAAGCACAGAATGGCTTTC
TGAGCATTGATTTTTCTGGAGATGGGGTGGGGAGTTACTTCTGTAAAGGAAGCATTCTGGAGTAGGA
AGCCAAATTCAAATACACTTCTCCCTAGGCTGGTTTATGAGCTTCTTTGGAAGAGTTGAGAAGGGCTGGG
CGTGGTGGCTCAAGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGTGGGCGCATCGCTTGAGCCAGGAG
TTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGGCAAAACCTCGTCTCTACAAAAAATAAGCTGGGCTTGGTGGTG
CGTGACCTACAGTCCCAGCTACTCTTGAACCTGAGGGGGAAGGATCACCTGAGCCCAGGAGGTCAAGGC
TACAGTGAGCTGTGATTGCACTACTGCACCCAGCCTGCGTGACAGAGTGAGACCTCCCCCAAAAAA
GAGAGAGAGAAAAGGTTGAGAAAGACTGGGAAGTCACCAAAGCCAGAGAATGGGAGGGATCTGCCCTCAC
TGCAGGGTGGTGCCAAGCTGGGACTTGACCCCTGACCCCTGACTTTCAGGACTCCTGTCCCCACTCCACAG
GCTGCCCTCCACTGGCAGGGGACTCAGAAGTATCCGGTCACACTAAGTGACACTTAGTGATCAGAAGTGC
CCCCGTGCCACTGAGTGGCCTTGCCAAGCTACATCCACTCTGTGGGCTCCTCCTCTAGCAGCGAGGGG
AGGGCAGATGCCCAGGGGCTGGTCACTGGAGCATTCTCCCCCTGACTCCCCAGTACAACGCCCTGTG
AAGCAACATGAGCAGGATCTACTCCACCCCAAGGTCTGCCCTCCCCAACAAGACTGCCACCTGTGGTCC
CTGGACCCAGGTACGGCCCTTGACAGTCCCTCTCGGCGGTGCCCTAGTGTTCACACATTGCCCTGCTGC
ACTCCAGACCATGCAGTTGTGTAGGGTCTGTGGAGACAGCAGGTAACCCAAAGGTGTTGCCCTCCA
GGGCTGGACGGTGCAGATACCCCAACGCCCTGCTTCTTGCAAGTGGACTTCCGGAATCTCCAGCTG
CAGCCCCACTTCTGTGTGTACCTCGGCCCTCCCATCACCCCTAGGCCTTCTCCTGGCTGCCTGGTTT
CCCCTTTCGTGGGTCCCTCATGTTCCCCAAGAGCCCTCAGGCCAGGGACCCCTCGTGGCTTCCCTTAA
ACCCCGCTCCAGCCCCCTTTATGAGCAGCTTCGAGGAAGGCACTCCATCCAATAGGCCGCTAAGTGTCTG
TCTGGGTTTTGGCCTTTGGGTGTCCCCTTGGTGTACGCCACCTTAGGTGGTTCATGTCTCTGGGGCAGGGG
CCCTGCCCTGGGTGTTTTCTGTAGCTCCAGCCCCCTCCACCAGGCCTGTAGGTGGCCCTGTCTCTGGGG
GCACCGTGATGTTTCAGGAAGCTGGTGGGAGCAGTAAGGACTGGTGCAGGCTCTGGTGAAGGCCGTTGAAG
ACTTCAACGTGGAGGCCTCCTCACCCAGCCTGCTGCTGTGTCTCAGATCTACCAACATCTGGCTTC
CTCGCAAGCTACGCCATGCTCCTGTTGCTGGGAGGGCTGGCACAACGCTGCGGGCATCCCGCTGAAA
CCGCTGTACGAGGATTTCACTGCCCTCAGCAATGAAGCCTACAAGCAGGACGGTGAGCAGGCTCTCCCT
GTCCAGGAACACGCCAGGTGTCTCTCAGCTGTCTCCCCAGAGTCCCAGCCCAGAGTCAAGCAGAGC
AGCTGGTATGACAATTCAGCAGGCCCTGAGTTTCCAGAAAGTGGAGGTGGGACCCGGCCTGCACCCAGT
GTGCTGGACTTTGCTGTGGCCTGCCCCACGTGGCCATCCTGTGTCACTCCTGGCCTGATGTCCCTC
TTTGCTCTGGGAACCTCCAGGATCTGTTTAGCTGGCTGTAGCTAATTAGAAATGTAGAGTGGCAACCC
CCAAGCCAATTTTCCAGCTAGCTGCAGATCCACGGGCTCGAGCCAGTGAAGAGCCGACTTACAGCTGA
GAGGCTGAGGTCCGAGCCTTTGGCCTGAGCTACATACCTCACCCCAACGCCCTTCCAGACACG
GGGGCCTACTGGCGCTCCTGGTACAACCTCCCCACCTTCGAGGACGATCTGGAACACCTCTACCAACAGC
TAGAGCCCTTACCTGAACCTCCATGCCCTTCGTCCGCCGCGACTGCATCGCCGATACGGGACAGATA
CATCAACCTCAGGGGACCCATCCCTGCTCATCTGTGGGTAAGGACCTGGCCTCGCCTCCACATGAGTCC
CACGAAGTGTGGGTCCCGAGGTAGGGGTGGGGATGTCCAGGGTAAGGAAGGTGGGTTGTGACCCCTCA
CATCTCACATGTGTGGGCATCATACTGTTGCTTACATGCAGGAGACCATTGCTGTTCCCACTTTACA
GGTGGGGACCCCTGAGGCTTAGGGTCTGAGGGACTTAGTGGTCAAGAGCTAGGGGCCAAACCAAGGCT
CTGGCCCTGGTCCAGTGGGGGACCCATCAGCTAGCTCATGCCCAAGGAACAAGCACTGTGGCCCTGC
CTCAGGATTGAGTGGCTGGGGCCTGGCACAGCCAGAAATGACAGTGGCAGCATCTTGACGCCCCAGGACA
TGTGGCCCTCGGAGGAGTGTGGGTGGGACTGATGTGTGAGATTTCTGGCCCTAAGCCAGGCTGCAGCCC
TTGAGGGCCCCAGGGTACAGGTGCCGGCCCCAGGGTCCCACTCAGCGATGCATGAAGAAGCAGGCACAGC
CAGGCAGGGAGCCAAGCTGTCCCTTCCCTTCTATCTAGGAGACATGTGGGCCAGAGCTGGGAAAACA
TCTACGACATGGTGGTGCCTTTCCAGACAAGCCCAACCTCGATGTACCAGTACTATGCTGCAGCAGGT
AAGCTCTGGGCTCAAGCCTGGGGTGGTGGGGTGGGGGTCGAGGGGCAAAAAAAGGGAGTCAAGATGGG
CACAGGGGCGGGAAGGTTTCGGGTACTGAGCAGCAGCCTGGTGTGTCTGTAGGAGCAGTGTGGGGTGC
GGCCCCCTCAGTGGGTGCCAGCTCCTCCCTCCAGGCTCCACAGTGGCAGGATGAGAGCAACAACGCACT
TTCATCATCTGCTGTGGGAGTGGGGCCCTGCCTCTGGGAATGGTGGCCACAGAGCAGAGAAGCTTTCA
TGCACAGGGAGTTGACCCGAGATGGGGACCCAGCCCTGTCCCAGGCCAGCCAGAGTGGGCTCCCCCTG
ACCTGGCTCCACACCCCTCCTCCAGGGCTGGAACGCCACGCACATGTTCCGGGTGGCAGAGGAGTCTTTC
ACCTCCCTGGAGCTCTCCCCATGCCTCCCGAGTTCTGGGAAGGGTCGATGCTGGAGAAGCCGGCCGACG
GGCGGGAAGTGGTGTGCCACGCCCTCGGCTTGGGACTTCTACAACAGGAAAGACTTCAAGTTTCCAGCATGG
GAAGAGCACGTTCTGGGGTTCCTCCGGTCTGGGGCCCGGGGAAAGGCAGGCAGCCAGGGCGCAGGGAAGC
TGGTTCCCAGGCCTGCCTTACCTACCCAGCACTGGTTGGAGGCTGGGTCTGTTCAGAGGTAGGGGG
TATAGGAGGCCTATTAGTCCACCTTCTCTGGCAGCTTTGACAAAATAGTCACTTCTATACCTTGGAAATGGA
GGAAGAAGGCCCAAGTGGTGGTGGAGCCAGGGCAGGGTAAAGAAATTTGCTGTTTCTGCCAGGCACGGTGG
TCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGTCAAGGCGGGTGGATCACCTGAGGCCAGGAGTTTCGAGACC
AGCCTGGCCAACATGGCGAAACCCCGTCT.....dst....

INPUT KE PRIMER 3

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.	Checks for mispriming in template.	disclaimer	Primer3 Home
	Primer3plus interface	cautions	FAQ/WIKI

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):

<input checked="" type="checkbox"/> Pick left primer, or use left primer below:	<input type="checkbox"/> Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	<input checked="" type="checkbox"/> Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

[Sequence Id:](#) A string to identify your output.

[Targets:](#) E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

[Excluded Regions:](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

[Product Size Ranges](#)

Number To Return	<input type="text" value="5"/>	Max 3' Stability	<input type="text" value="9.0"/>
Max Repeat Mispriming	<input type="text" value="12.00"/>	Pair Max Repeat Mispriming	<input type="text" value="24.00"/>
Max Template Mispriming	<input type="text" value="12.00"/>	Pair Max Template Mispriming	<input type="text" value="24.00"/>

General Primer Picking Conditions

Primer Size	Min: <input type="text" value="18"/>	Opt: <input type="text" value="20"/>	Max: <input type="text" value="27"/>	
Primer Tm	Min: <input type="text" value="57.0"/>	Opt: <input type="text" value="60.0"/>	Max: <input type="text" value="63.0"/>	Max Tm Difference: <input type="text" value="100.0"/> Table of thermodynamic parameters:
Product Tm	Min: <input type="text"/>	Opt: <input type="text"/>	Max: <input type="text"/>	

Primer GC%	Min: <input type="text" value="20.0"/>	Opt: <input type="text"/>	Max: <input type="text" value="80.0"/>
Max Complementarity:	Self <input type="text" value="8.00"/>	Max 3' Complementarity:	Self <input type="text" value="3.00"/>
Max #N's:	<input type="text" value="0"/>	Max Poly-X:	<input type="text" value="5"/>
Inside Target Penalty:	<input type="text"/>	Outside Target Penalty:	<input type="text" value="0"/>
First Base Index:	<input type="text" value="1"/>	CG Clamp:	<input type="text" value="0"/>
Concentration of monovalent cations:	of <input type="text" value="50.0"/>	Salt correction formula:	
Concentration of divalent cations:	<input type="text" value="0.0"/>	Concentration of dNTPs:	<input type="text" value="0.0"/>
Annealing Concentration:	Oligo <input type="text" value="50.0"/>	(Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template.)	
<input checked="" type="checkbox"/> Liberal Base	<input type="checkbox"/> Show Debuging Info	<input checked="" type="checkbox"/> Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus	<input type="checkbox"/> Lowercase masking

Other Per-Sequence Inputs

[Included Region:](#) E.g. 20,400: only pick primers in the 400 base region starting at position 20. Or use { and } in the [source sequence](#) to mark the beginning and end of the included region: e.g. in ATC{TTC...TCT}AT the included region is TTC...TCT.

[Start Codon Position:](#)

Sequence Quality

Min Sequence Quality:	<input type="text" value="0"/>	Min Sequence Quality:	End <input type="text" value="0"/>	Sequence Quality Range Min:	<input type="text" value="0"/>	Sequence Quality Range Max:	<input type="text" value="100"/>
---------------------------------------	--------------------------------	---------------------------------------	--	---	--------------------------------	---	----------------------------------

Objective Function Penalty Weights for Primers

Tm	Lt: <input type="text" value="1.0"/>	Gt: <input type="text" value="1.0"/>
Size	Lt: <input type="text" value="1.0"/>	Gt: <input type="text" value="1.0"/>
GC%	Lt: <input type="text" value="0.0"/>	Gt: <input type="text" value="0.0"/>
Self Complementarity	<input type="text" value="0.0"/>	
3' Self Complementarity	<input type="text" value="0.0"/>	
#N's	<input type="text" value="0.0"/>	
Mispriming	<input type="text" value="0.0"/>	

[Sequence Quality](#)
[End Sequence Quality](#)
[Position Penalty](#)
[End Stability](#)
[Template Mispriming](#)

Objective Function Penalty Weights for Primer Pairs

[Product Size](#) Lt: Gt:
[Product Tm](#) Lt: Gt:

[Tm Difference](#)
[Any Complementarity](#)
[3' Complementarity](#)
[Pair Mispriming](#)
[Primer Penalty Weight](#)
[Hyb Oligo Penalty Weight](#)
[Primer Pair Template Mispriming Weight](#)

Hyb Oligo (Internal Oligo) Per-Sequence Inputs

[Hyb Oligo Excluded Region:](#)

Hyb Oligo (Internal Oligo) General Conditions

[Hyb Oligo Size:](#) Min Opt Max
[Hyb Oligo Tm:](#) Min Opt Max
[Hyb Oligo GC%:](#) Min: Opt: Max:

[Hyb Oligo Self Complementarity:](#) [Hyb Oligo Max 3' Self Complementarity:](#)
[Max #Ns:](#) [Hyb Oligo Max Poly-X:](#)
[Hyb Oligo Mishyb Library:](#) [Hyb Oligo Max Mishyb:](#)
[Hyb Oligo Min Sequence Quality:](#)
[Hyb Oligo Conc of monovalent cations:](#) [Hyb Oligo DNA Concentration:](#)
[Hyb Oligo conc of divalent cations:](#) [Hyb Oligo \[dNTP\]](#)

Objective Function Penalty Weights for Hyb Oligos (Internal Oligos)

[Hyb Oligo Tm](#) Lt: Gt:

Hyb Oligo Size	Lt:	<input type="text" value="1.0"/>	Gt:	<input type="text" value="1.0"/>
Hyb Oligo GC%	Lt:	<input type="text" value="0.0"/>	Gt:	<input type="text" value="0.0"/>
Hyb Oligo Self Complementarity				<input type="text" value="0.0"/>
Hyb Oligo #N's				<input type="text" value="0.0"/>
Hyb Oligo Mishybing				<input type="text" value="0.0"/>
Hyb Oligo Sequence Quality				<input type="text" value="0.0"/>

Copyright Notice and Disclaimer

Copyright (c) 1996,1997,1998,1999,2000,2001,2004,2006,2007
 Whitehead Institute for Biomedical Research, [Steve Rozen](#), and Helen Skaletsky
 All rights reserved.

Redistribution and use in source and binary forms, with or without modification, are permitted provided that the following conditions are met:

- * Redistributions of source code must retain the above copyright notice, this list of conditions and the following disclaimer.
- * Redistributions in binary form must reproduce the above copyright notice, this list of conditions and the following disclaimer in the documentation and/or other materials provided with the distribution.
- * Neither the names of the copyright holders nor contributors may be used to endorse or promote products derived from this software without specific prior written permission.

THIS SOFTWARE IS PROVIDED BY THE COPYRIGHT HOLDERS AND CONTRIBUTORS "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL THE COPYRIGHT OWNERS OR CONTRIBUTORS BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, INCIDENTAL, SPECIAL, EXEMPLARY, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES (INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO, PROCUREMENT OF SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES; LOSS OF USE, DATA, OR PROFITS; OR BUSINESS INTERRUPTION) HOWEVER CAUSED AND ON ANY THEORY OF LIABILITY, WHETHER IN CONTRACT, STRICT LIABILITY, OR TORT (INCLUDING NEGLIGENCE OR OTHERWISE) ARISING IN ANY WAY OUT OF THE USE

OF THIS SOFTWARE, EVEN IF ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGE.

Citing Primer3

We request that use of this software be cited in publications as

[Steve Rozen](#) and Helen J. Skaletsky (2000) [Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers](#). In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
[Source code available at http://fokker.wi.mit.edu/primer3/](http://fokker.wi.mit.edu/primer3/).

Acknowledgments

The development of Primer3 and the Primer3 web site was funded by Howard Hughes Medical Institute and by the National Institutes of Health, [National Human Genome Research Institute](#), under grants R01-HG00257 (to David C. Page) and P50-HG00098 (to Eric S. Lander).

We thank [Centerline Software, Inc.](#) for use of their TestCenter memory-error, -leak, and test-coverage checker.

Primer3 was a complete re-implementation of an earlier program: Primer 0.5 (*Steve Lincoln, Mark Daly, and Eric S. Lander*). *Lincoln Stein* championed the idea of making Primer3 a software component suitable for high-throughput primer design. Web interface by [Steve Rozen](#)

OUTPUT PRIMER

Primer3 Output pilihan (warna biru)

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len  tm  gc%  any  3'  seq
LEFT PRIMER      207   20   60.45  55.00  7.00  3.00
AACAGGTGCTGTTCCAGAGC
RIGHT PRIMER     954   20   60.08  50.00  7.00  2.00
GTTCTGCCAGATCGGTTTCAT
SEQUENCE SIZE: 1050
INCLUDED REGION SIZE: 1050
```

PRODUCT SIZE: 748, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

```
1 AGAAGGGGCAGAGCCGAGCACCGCGCACCGCGTCATGGGGGCCGCCTCGGGCCCGGGG
61 GCCGGGGCTGCTGCTGCCGCTGCCGCTGCTGTTGCTGCTGCCGCCGAGCCCGCCCTGGC
121 GTTGGACCCCGGGCTGCAGCCCGCAACTTTTCTGCTGACGAGCCGGGGCGCAGCTCTT
```


PRODUCT SIZE: 731, PAIR ANY COMPL: 7.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

2 LEFT PRIMER	207	20	60.45	55.00	7.00	3.00
AACAGGTGCTGTTCCAGAGC						
RIGHT PRIMER	950	20	59.67	50.00	4.00	1.00
TGCCAGATCGGTTTCATACAG						
PRODUCT SIZE: 744, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00						
3 LEFT PRIMER	207	20	60.45	55.00	7.00	3.00
AACAGGTGCTGTTCCAGAGC						
RIGHT PRIMER	951	20	59.67	50.00	5.00	1.00
CTGCCAGATCGGTTTCATACA						
PRODUCT SIZE: 745, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00						
4 LEFT PRIMER	178	20	60.87	55.00	6.00	2.00
CTTCGCGCAGAGCTACAAC						
RIGHT PRIMER	954	20	60.08	50.00	7.00	2.00
GTTCTGCCAGATCGGTTTCAT						
PRODUCT SIZE: 777, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 0.00						

Statistics

con	too	in	in	no	tm	tm	high	high		
high	sid	many	tar	excl	bad	GC	too	too	any	3'
poly	end	ered	Ns	get	reg	GC% clamp	low	high	compl	compl
X stab	ok									
Left	3361	0	0	0	1147	0	18	2116	0	1
0	17	62								
Right	3012	0	0	0	26	0	105	2585	0	0
0	57	239								

Pair Stats:

considered 81, unacceptable product size 72, ok 9
 primer3 release 1.1.4

(primer3_results.cgi release 0.4.0)

KLONING GEN DAN KLONING ORGANISME

Kloning berasal dari kata *clone* yang berarti keturunan (salinan) yang sama dengan induknya tanpa melalui proses reproduksi (seksual). Dalam bidang biomolekul diketahui ada 2 macam kloning yaitu kloning gen (sekuen DNA) dan kloning organisme. Kloning DNA digunakan untuk tujuan identifikasi dan karakterisasi gen serta untuk tujuan membuat suatu polipeptida. Kloning organisme ditujukan untuk menghasilkan organisme utuh yang memiliki sifat-sifat yang telah dimodifikasi.

Secara rinci, kloning DNA ditujukan untuk:

1. Mengisolasi gen atau sekuen DNA tertentu dan kemudian mendeskripsikan sekuen tersebut.
2. Mengidentifikasi coding region dan control element untuk dianalisis
3. Menelaah fungsi protein/enzim/RNA
4. Mengidentifikasi mutasi gen
5. Memproduksi polipeptida/protein tertentu seperti insulin
6. Memproduksi polipeptida yang langka

Proses pembuatan clone DNA adalah:

1. Menentukan sumber DNA yang akan dikloning seperti DNA virus, tumbuhan, hewan bahkan fosil
2. DNA yang akan dikloning tersebut dipotong dengan enzim restriksi
3. Fragmen atau potongan DNA tersebut disambung (ligasi) dengan plasmid (berfungsi sebagai vektor). Selain plasmid, cosmid, kromosom *artificial* dan virus juga dapat berperan sebagai vektor. Plasmid tersebut sebelumnya juga dipotong dengan enzim restriksi yang sama. Hasil ligasi fragmen DNA dan vektor disebut DNA rekombinan.
4. DNA rekombinan kemudian dimasukkan ke dalam bakteri misalnya *E.coli* agar ikut bermultiplikasi sejalan dengan pembelahan bakteri
5. Jika tujuan kloning DNA untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi DNA maka setelah proses tersebut DNA rekombinan dapat diisolasi. DNA

rekombinan yang telah dikarakterisasi dan hanya diambil bagian coding DNA kemudian disimpan sebagai rujukan disebut complementary DNA (cDNA) atau DNA library. Jika tujuan kloning DNA untuk mendapatkan produk protein maka DNA rekombinan tersebut ditunggu hingga menghasilkan protein tersebut.

Kloning organisme dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu artificial embryo twinning (AET) atau somatic cell nuclear transfer (SCNT). Pada metode AET kloning bersumber dari inti sel (nukleus) embrio sedangkan pada SCNT sumber nukleus adalah sel somatik yang telah matang (sel dewasa).

Artificial embryo twinning (AET) menggunakan teknologi yang relatif mudah karena meniru proses alami pada terjadinya bayi kembar. Bayi kembar terjadi setelah sel ovum dibuahi oleh inti sperma, kemudian zigot membelah menjadi 2 embrio yang terpisah dalam satu rahim ibu. Karena asal zigot sama, maka mereka akan lahir sebagai bayi kembar. Kloning AET dilakukan secara in vitro yaitu memasukan inti sperma ke dalam sel ovum dalam cawan petri, kemudian ditumbuhkan dalam media dan setelah membelah sekitar 16 sel maka “embrio artificial” tersebut dibelah menjadi 2 bagian. Proses pembelahan tersebut dapat diulangi beberapa kali. Hasil pembelahan “embrio artificial” tersebut kemudian dimasukan ke dalam rahim wanita yang berperan sebagai ibu titipan (surrogate mother) hingga ibu tersebut hamil dan pada akhirnya akan melahirkan bayi yang kemungkinan kembar beberapa karena umumnya pada waktu memasukkan ke rahim, jumlah “embrio artificial” yang dimasukkan lebih dari 4. Istilah umum yang dikenal masyarakat luas untuk kloning ini adalah bayi tabung. Secara moral dan agama, kloning ini diperbolehkan jika ovum dan sperma yang digabungkan di dalam cawan petri berasal dari pasangan suami-istri. Secara ilmiah kloning AET menghasilkan clone atau turunan yang tidak berbeda dengan hasil rekombinasi proses reproduksi alami.

Dasawarsa yang lalu, kita dikejutkan dengan keberhasilan kloning kambing Dolly yang berasal dari sel kelenjar mammae kambing dewasa. Kloning organisme seperti ini dilakukan dengan cara somatic cell nuclear transfer (SCNT). Somatic cell adalah sel dewasa dari bagian tubuh manapunkecuali sel sperma dan

sel ovum (sel germinal). Somatic cell pada mamalia memiliki kromosom diploid sedangkan sel germinal memiliki kromosom haploid. Nukleus adalah bagian paling penting pada sel, ibarat otak pada manusia. Nukleus berisi materi genetik yaitu DNA. Kloning SCNT adalah kloning dengan cara:

1. Mengambil sel ovum dari donor kemudian dikeluarkan nukleusnya (enukleasi) sehingga sel tersebut tersisa sitoplasma dan membran saja (tanpa inti sel).
2. Nukleus sel somatik disatukan (fusi) ke dalam sel ovum yang telah dienukleasi tersebut dengan cara dialiri listrik.
3. Sel fusi tersebut akan mirip suatu embrio. Kemudian “embrio” ini dimasukkan ke dalam uterus surrogate mother (ibu titipan) maka ibu tersebut hamil yang kemudian akan melahirkan bayi hasil kloning sel somatik.

Secara teoritis, SCNT terlihat sangat mungkin dan sederhana tetapi sesungguhnya mengandung banyak kelemahan antara lain:

1. Nukleus sel somatik yang merupakan cikal-bakal organisme berusia sesuai dengan usia donornya. Pada kasus kambing Dolly, donor berumur 6 tahun sehingga pada waktu Dolly lahir sesungguhnya telah berusia 6 tahun. Terbukti benar, bahwa 3 tahun setelah bayi Dolly lahir maka kambing Dolly tersebut secara fisik seperti kambing berusia 9 tahun.
2. Kegagalan mencegah keturunan sama tua dengan usia donor ini kemudian diketahui karena pada setiap kromosom terdapat telomer yang semakin bertambah usia telomer ini semakin memendek. Artinya, telomer kambing usia 1 tahun akan lebih panjang dibandingkan dengan telomer kambing usia 6 tahun. Makin pendek telomer maka makin dekat organisme tersebut pada kematian karena penuaan. Saat ini para peneliti tengah berusaha menemukan cara atau formula untuk mencegah pemendekan telomer.
3. Secara empiris ternyata kemungkinan kloning pada kambing tersebut keberhasilannya adalah 0,1 – 3%, artinya diperlukan 1000 ovum untuk menghasilkan 1 kambing Dolly. Sebagaimana kita ketahui bahwa taksonomi manusia lebih tinggi dan kenyataannya manusia lebih kompleks

dibanding kambing. Hal ini berarti, tingkat keberhasilan kloning pada manusia akan jauh lebih kecil dari 1/1000. Sejauh ini belum dilaporkan adanya keberhasilan kloning sel somatik pada manusia.

4. Selain problem penuaan, problem lain adalah kemungkinan terjadinya ekspresi genetik yang tidak normal yang dapat mengakibatkan cacat atau kelainan pada struktur atau metabolisme bayi hasil kloning. Sebagaimana diketahui bahwa makin bertambah usia suatu sel maka makin besar mutasi genetik yang terjadi pada sel tersebut.
5. Kambing Dolly ternyata lahir lebih besar dibanding kambing yang lahir dari embrio normal. Ukuran lebih besar ternyata berbagai organnya juga membesar secara tidaknormal dan strukturnya pun tidak normal.
6. Problem etik dan norma agama juga akan terlanggar bila kloning sel somatik pada manusia dilegalkan karena hasil kloning tersebut lebih banyak keburukannya dibanding manfaatnya.

TERAPI GEN DAN STEM CELL

Kelainan atau mutasi genetik dapat berupa mutasi kromosom maupun mutasi gen. Kelainan kromosom umumnya berat dan viabilitasnya rendah sedangkan kelainan gen umumnya *survive* tetapi rentan atau terkena suatu penyakit seperti mutasi gen globin beta yang menyebabkan thalassemia beta.

Sejauh ini penyakit thalassemia beta hanya mendapat pengobatan suportif yaitu transfusi darah secara rutin untuk meningkatkan kadar hemoglobin. Dalam 10 tahun terakhir terjadi perubahan signifikan berupa terapa transplantasi darah umbilicus (tali pusat) dan terapi gen. Transplantasi tali pusat merupakan terapi sel punca (stem cell) bersumber sel embrionik. Secara ringkas dapat digambarkan bahwa donor yang paling baik adalah saudara kandung yang tidak terkena thalassemia. Sel embrionik darah diisolasi kemudian dipurifikasi dan ditransplantasikan ke dalam sumsum tulang resipien untuk mengganti sel darah yang mengalami kelainan (patologi). Metode ini terbukti telah berhasil menyembuhkan penderita thalassemia. Kesulitan atau kelemahan yang sering dijumpai adalah sulitnya mendapat donor saudara kandung. Jika donor dari orang lain yang bukan saudara kandung (allograft) maka tingkat kesesuaiannya rendah dan cenderung gagal. Saat ini tengah dikembangkan terapisel punca bersumber sel somatik yang dimodifikasi. Jika ini berhasil maka akan sangat bermanfaat dan relatif mudah dan tersedia secara melimpah.

Prinsip terapi gen dilakukan dengan cara mengisolasi gen yang normal kemudian menyisipkan pada *vehicle* seperti plasmid, cosmid, virus, atau *artificial chromosome* kemudian diinjeksikan ke resipien untuk menggantikan gen yang mengalami kelainan. Sejauh ini terapi gen belum berhasil karena gen yang diinjeksikan sulit mencapai target spesifik yang dituju. *Vehicle* atau pembawa juga masih lemah dan seringkali terdegradasi selam proses perjalanan gen tersebut.

STUDI KASUS: THALASSEMIA DAN MRSA

Berikut diberikan contoh nyata bagaimana pendekatan molekuler dapat dilakukan untuk mengatasi problem kesehatan khususnya penyakit genetik.

Thalassemia Beta

Tn A 27 tahun dan Ny D 22 tahun datang berkonsultasi ke dokter spesialis kebidanan untuk mendapat anak kedua. Anak pertama didiagnosis menderita thalassemia beta. Oleh dokter kebidanan disarankan berkonsultasi kepada ahli genetik dan biomolekul. Dokter ahli genetik memberikan penjelasan tentang penyakit thalassemia beta yang merupakan kelainan bentuk dan atau jumlah hemoglobin akibat mutasi gen globin beta. Langkah selanjutnya adalah mengambil sampel darah dari suami istri tersebut dan dari anak pertama mereka. Isolasi DNA dilakukan dengan metode *phenol chloroform*. Amplifikasi gen beta globin dilakukan dengan metode PCR. Identifikasi mutasi dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Hasil menunjukkan ditemukan *multiple mutation* pada anak berupa 2 mutasi titik pada gen globin beta dan delesi gen *anion exchanger 1* (AE1). Ditemukan mutasi heterozigot (carrier) gen globin beta pada Ny D dan ditemukan mutasi heterozigot gen globin beta dan mutasi AE1 pada Tn A. Berdasarkan temuan ini jelas bahwa anak pertama mengalami mutasi multipel pada gen globin beta yang mendasari penyakit thalassemia beta. Juga diketahui bahwa anak tersebut mendapat pewarisan mutasi dari kedua orang tuanya. Pola pewarisan seperti ini bersifat homozigot resesif. Bagaimana kemungkinan mendapat anak kedua yang normal?

Secara matematis dapat dihitung bahwa kedua orang tua yang heterozigot carrier kemungkinan akan memiliki anak 25% homozigot normal, 50% heterozigot carrier dan 25% homozigot mutan. Prediksi matematis ini telah selalu sesuai kenyataan karena banyak faktor yang berpengaruh pada manusia. Pada kenyataannya, presentase untuk mendapatkan anak yang benar-benar normal kemungkinan kurang dari 25%. Oleh karena itu dokter ahli genetika tsb memberi waktu 3 bulan kepada suami istri tsb untuk memutuskan apakah akan hamil

kembali atau tidak. Jika memilih hamil untuk anak kedua maka pada usia kehamilan 10-12 pekan akan dilakukan amniosentesis untuk mengambil sel janin dari cairan ketuban. Jika hasilnya positif thalassemia beta maka kehamilan akan diterminasi. Tiga bulan setelah itu, kedua suami istri memutuskan memilih hamil untuk anak kedua. Pada kehamilan 12 pekan dilakukan amniosentesis, hasilnya menggembirakan yaitu tidak ditemukan mutasi patologi pada gen globin beta kecuali mutasi ringan pada poly A di ujung gen tsb. Secara medis hasil ini diluar prediksi, tetapi sebagai orang beriman kita bersyukur dan mengembalikan pada Yang Maha Kuasa bahwa tidak ada yang mustahil bagi-Nya jika Dia berkehendak.

Setelah anak kedua lahir, dilakukan *recheck* terhadap gen globin beta dan hasilnya sama dengan waktu tes pekan 12. Kemudian dari tali pusat disimpan di bank sel punca untuk direncanakan terapi bagi kakak anak tsb. Kasus ini berlangsung tahun 2005-2006 dan menyedihkan karena hingga tahun 2011 belum dapat dilakukan terapi sel punca karena ketiadaan biaya.

MRSA

MRSA adalah kuman super (superbug) yang kebal terhadap berbagai antibiotik. Kuman ini menyebabkan penyakit yang ringan hingga fatal baik di rumah sakit maupun di komunitas. Pada tahun 2007-2008 dilakukan studi untuk mengidentifikasi kuman ini secara molekuler.

Langkah pertama adalah melakukan isolasi *S. aureus* dari penderita infeksi (terutama infeksi kulit). Kemudian dilakukan uji kepekaan terhadap berbagai antibiotik untuk mendapat pola antibiogram. Identifikasi untuk memastikan bahwa kuman ini adalah MRSA dengan melacak keberadaan gen *mecA* menggunakan metode PCR. Selanjutnya dilakukan identifikasi tipe MRSA dengan cara melacak *SCCmec* menggunakan metode PCR multipleks.

Hasil menunjukkan bahwa sekitar 46% populasi *S. aureus* di RSMH Palembang adalah MRSA. Tipe *SCCmec* adalah kebanyakan tipe III dan sebagian kecil tipe I dan IV. Tipe III dan I bersifat multiresisten namun kurang virulen dan umumnya ditemukan di rumah sakit. Tipe IV tidak multiresisten namun lebih

virulen dan umumnya ditemukan di komunitas. Temuan ini mengindikasikan bahwa MRSA telah menjadi masalah serius di Palembang khususnya RSMH.

Berdasarkan ilustrasi dari 2 kasus di atas dapat disimpulkan bahwa memahami biomolekul dan bioinformatika akan memberikan manfaat yang baik bagi kemajuan ilmu kedokteran khususnya dalam manajemen pasien. Semoga kita mendapat keberkahan dari setiap ilmu yang kita dapat.

Anjuran Bacaan Rujukan

1. Helen M.Kingston. 2002. ABC of Clinical Genetics. 3th edition, The BMJ Publisher. London.
2. Jonathan Pevsner. 2009. Bioinformatic and Functional Genomic. 2nd edition. A John Wiley & Son, New York.
3. Bruce Albert et al.,2002. Molecular iology of The Cell. 4th edition. www.garlandscience.com

SEKILAS PENULIS



Dr. H. Yuwono, dr., M.Biomed.

Jl. Raya Palembang-OI Km 14 Sekolahalam Palembang (SaPa)
Mobile Phone: 08127115678
E-mail: yuwono71@yahoo.com

Pribadi

Tanggal Lahir 10 Oktober 1971
Tempat Lahir Trenggalek Jawa Timur
NIP 197110101998021001
Pangkat/Golongan Pembina/IV-a
Unit Kerja Departemen Mikrobiologi FK Unsri
Jabatan Lektor Kepala
Keluarga Istri : Nurbaiti Ekasari, S.Si.
Anak : M. Jawad Yuwono (12 tahun)
Imadul Aqil Yuwono (11 tahun)
Mamduh Widad Yuwono (9 tahun)
Afaf Nihlah Yuwono (6 tahun)

Pendidikan

2009 Doktor Bidang Ilmu Kedokteran
Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas
Padjadjaran, Bandung
Promotor: Prof. Dr. Imam Supardi, dr., SpMK. ; Prof. Dr.
Sunarjati, dr., SpMK.; Dr. Sadeli Masria dr., SpMK.,
2002 Master Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta
Pembimbing: Prof. dr. Sangkot Marzuki, PhD.; Prof. dr.
Irawan Yusuf, PhD. ; Prof. dr. Herawati, PhD
1996 Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang

Kursus- Kursus

- Maret 2004 Certificate in Clinical Microbiology
Department of Microbiology, Faculty of Medicine
University of Diponegoro, Semarang Indonesia
colaboration with Erasmus Medical Center Amsterdam
Supervisor: Prof. Dr. henry Verbrugh
- Maret 2008 Certificate in Infectious diseases & molecular biology
Department of Microbiology Faculty of Medicine
University of Syahkuala Aceh Indoensia colaboration with
University of Gottingen Germany
Supervisor: Prof. Dr. Uwe Gross
- 2006- 2008 Kursus tentang KBK dan Assessment
Proyek HWS-Dikti Jakarta
- Maret 2009 Certificate in Infectious diseases & molecular biology
University Medical Center of Gottingen Germany
Supervisor: Prof. Dr. Uwe Gross

Pengalaman Kerja

- 1997 – 1998 Kepala Puskesmas, Muntok , Bangka, Indonesia
- 1998 – skrg Kepala Laboratorium Mikrobiologi FK Unsri/ Rumah Sakit
Mohammad Hoesin Palembang
- 2006 – 2008 Ketua Komisi Student Assessment Affairs, FK Unsri
- 2007 – 2009 Ketua Quality Assurance Unit, FK Unsri
- 2009 – 2011 Ketua Unit Program Pendidikan Sarjana Kedokteran
(P2SK) FK Unsri

Thesis

Doktoral	Comparative study of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC <i>mec</i>) type from MRSA Isolates from Bandung & Palembang Indonesia
Magister	Resistance of Southeast Asian Ovalocytosis to Malaria related to ethnic and geography

Penghargaan

2010	Peneliti Terbaik Unsri
2007	Dosen Teladan I FK Unsri
2003-2006	Beasiswa BPPS Dikti
1992 – 1994	Beasiswa Stanvac Oil Company South Sumatera
1991	Beasiswa Supersemar

Pengalaman Riset dan Publikasi

Riset di bidang biomembran (1999 - 2002), Bakteriologi (2002 – sekarang), Biologi Molekul pada Penyakit Kardiovaskuler (2007 – sekarang), Biologi Molekul Kanker (2009 – sekarang), Infeksiologi (2007 – sekarang). Telah mempublikasi sekitar 20 karya ilmiah dan 10 publikasi populer di koran terutama tentang pendidikan.

Keanggotaan Organisasi

1. Ikatan Dokter Indonesia (IDI)
2. Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (Permi)
3. Perhimpunan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik Indonesia (Pamki)
4. Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekul Indonesia (PBBMI)
5. Pendiri Sekolahalam Palembang-suatu sekolah inklusif