

MODUL 4

TEKNIK REKOMBINAN

BLOK/NAMA BLOK	: 7 / BIOMOLEKULER
MODUL/NAMA MODUL	: 4 / TEKNIK REKOMBINAN
KODE MODUL	: 100251036
SKS	: 1 SKS
PENANGGUNG JAWAB MODUL	: Alhawaris, S.Si., M.Kes.

Capaian Pembelajaran Modul

Setelah menyelesaikan modul ini, diharapkan mahasiswa dapat menjelaskan teknik rekombinan dalam bidang medis sebagai penunjang dalam keilmuan kedokteran gigi

Sasaran Pembelajaran Modul

1. Mahasiswa mampu menjelaskan teknik rekombinan DNA → Tutorial
2. Mahasiswa mampu menjelaskan plasmid, DNA donor, enzim restriksi, vektor, DNA ligase, sel inang → Tutorial
3. Mahasiswa mampu menjelaskan strategi kloning, deteksi klon, dan seleksi klon → Tutorial
4. Mahasiswa mampu menjelaskan plasmid → Kuliah
5. Mahasiswa mampu menjelaskan hidroksiapatit → Kuliah
6. Mahasiswa mampu menjelaskan kromatografi lapis tipis → Kuliah
7. Mahasiswa mampu melaksanakan praktikum kromatografi lapis tipis → Kuliah

Pemetaan Kegiatan Modul

NO	SASARAN PEMBELAJARAN	CAPAIAN		KEGIATAN	WAKTU	PENILAIAN
		C	P			
1	Mahasiswa mampu menjelaskan teknik rekombinan DNA	C2		1. Tutorial 2. Pleno	3x(3x50)	Lembar Observasi dan Ujian Modul (MCQ)
2	Mahasiswa mampu menjelaskan plasmid, DNA donor, enzim restriksi, vektor, DNA ligase, sel inang	C2				
3	Mahasiswa mampu menjelaskan strategi kloning, deteksi klon, dan seleksi klon	C2				
4	Mahasiswa mampu menjelaskan plasmid	C2		Kuliah	2x50	Ujian Modul (MCQ)
5	Mahasiswa mampu menjelaskan hidroksiapatit	C2		Kuliah	1x50	Ujian Modul (MCQ)

6	Mahasiswa mampu menjelaskan kromatografi lapis tipis	C2		Kuliah	1x50	Ujian Modul (MCQ)
7	Mahasiswa mampu melaksanakan praktikum kromatografi lapis tipis		P1	Praktikum	3x50	Ujian Modul (MCQ)

Kegiatan Pembelajaran

I. Tutorial

Skenario

Di Perpustakaan Kampus...

- Mahasiswa 1 : Serius amat bro. lagi ngapain? Dari tadi fokus betul depan laptop.
- Mahasiswa 2 : Haha... Ga bro, sekedar baca-baca literatur aja tentang vaksin. Siapa tahu kelak kita bisa ciptakan vaksin pencegah karies gigi? Kan mantap tuh... Hehe...
- Mahasiswa 1 : Wuih... Mantul bro... Kenapa tidak? Tapi sebelumnya, yang terpenting, kita harus menguasai dan memahami dulu konsep-konsep mengenai Teknik Rekombinan bro... Itulah pondasinya.
- Mahasiswa 2 : Yap, benar sekali. Kita harus tahu dahulu mengenai komponen-komponen utama dalam Teknik Rekombinan, khususnya untuk menghasilkan DNA Rekombinan bro, seperti DNA donor atau DNA target, Plasmid, Vektor, Enzim Restriksi, DNA Ligase, maupun Sel Inang. Apa peran masing-masing dari komponen tersebut, prosesnya, mekanismenya, dan lain sebagainya kita harus pahami secara detail terlebih dahulu.
- Mahasiswa 1 : Iya ya... Oh iya, kalo ga salah di dalam proses Teknik Rekombinan tersebut juga harus dilakukan Kloning, Seleksi Klon dan Deteksi Klon ya? Aku pernah baca sedikit mengenai itu.
- Mahasiswa 2 : That's right. Makin menarik aja pembahasan kita ini bro... Ayo, temani aku diskusi soal ini. Aku butuh teman smart kayak kamu tuk membahas lebih dalam soal ini. Hehe...

Step I : Identifikasi Istilah Sulit

1. Teknik DNA Rekombinan : Teknik menggabungkan DNA dari dua spesies yang berbeda
2. DNA donor : Segmen DNA donor dari suatu organisme yang menghasilkan protein tertentu yang akan di transformasikan kedalam sel inang
3. Enzim restriksi : Protein enzim yang dipakai untuk memotong DNA donor maupun DNA vektor
4. Vektor : Plasmid DNA yang akan dipakai untuk membantu mengekspresikan DNA donor (tempat DNA donor disisipkan)
5. DNA ligase : Enzim yang dipakai untuk menyambung DNA donor ke DNA vektor
6. Sel inang : Sel yang dipakai untuk membantu menumbuhkan DNA rekombinan
7. Kloning : Perbanyakkan sel yang hanya menghasilkan protein tertentu

8. Plasmid : DNA ekstrakromosomal berukuran kecil, sirkular, dan berpilin ganda yang dapat bereplikasi secara autonom
9. Seleksi Klon : Suatu metode untuk menyeleksi vektor yang mengandung DNA target dengan mengeliminasi vektor yang tidak membawa DNA target
10. Deteksi klon : Metode membuktikan bahwa sekuen DNA donor yang telah di sisipkan ke dalam DNA vektor dapat diperoleh

Step II : Identifikasi Masalah

1. Apakah yang dimaksud dengan teknik rekombinan?
2. Bagaimana peranan komponen-komponen pada teknik rekombinan DNA?
3. Bagaimana proses dalam teknik rekombinan DNA?
4. Apa saja mekanisme yang terjadi selama proses rekombinan DNA?
5. Bagaimana cara melakukan kloning pada rekombinan DNA?
6. Bagaimana cara melakukan seleksi klon?
7. Bagaimana cara melakukan deteksi klon?

Step III : Analisa Masalah Teori dan Konsep

Rekombinan antara molekul DNA dari organisme berbeda merupakan fenomena umum dalam alam. Virus dapat menyisipkan genomnya ke dalam kromosom *E. coli*. Dalam proses tersebut, virus dapat merubah komposisi genetik sel. Kadangkala suatu bakteri dapat menjadi patogen setelah memperoleh informasi genetik dari suatu virus. Sebagai *Corynebacterium diphtheriae* yang diinfeksi oleh virus β menghasilkan toksin yang bertanggung jawab terhadap difteri. Perubahan genetik dalam bakteri ini disebabkan oleh virus dan merupakan suatu rekayasa genetik dalam alam.

Penemuan dalam biologi molekuler telah memungkinkan ilmuwan untuk menduplikasi fenomena alam ini dalam laboratorium dan mengembangkan metode untuk mengintroduksi hampir semua jenis informasi genetik ke dalam suatu organisme. Kebanyakan pengembangan melibatkan manipulasi genetik bakteri seperti *E. coli* dan *Bacillus subtilis*, dan ragi *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi bahan, terutama yang sangat mahal atau tidak mungkin dibuat dengan metode pembuatan tradisional. Sebagai contoh, hibridoma (antibodi), protein (insulin, interferon, albumin serum manusia, hormon pertumbuhan manusia, aktivator, faktor nekrosis tumor, dismutase superoksida, dan gonadosektisida, fiksasi nitrogen), vaksin (hepatitis B, Herpes, influenza, malaria), dan bioremediasi (pengurai lemak/minyak, penghilangan herbisida, pendegradasi pestisida).

Kemajuan yang sangat pesat telah terjadi untuk introduksi gen ke dalam hewan dan tanaman untuk pengobatan penyakit genetik, untuk peningkatan produktivitas tanaman dan ternak, dan untuk pembuatan tanaman lebih resisten terhadap penyakit. Diharapkan juga bahwa gen pengkode subunit β -globin dapat diintroduksi ke dalam penderita anemia *sickle-cell* dan β -thalassemia yang disebabkan karena kerusakan gen β -globin.

Definisi Rekayasa Genetika

Rekayasa genetika adalah suatu proses penciptaan molekul DNA baru, biasanya dengan rekomendasi DNA dari organisme berbeda melalui cara buatan dengan bantuan enzim yang dikenal sebagai enzim restriksi, dan produksi banyak salinan DNA rekombinan melalui suatu proses yang disebut dengan kloning. Kloning adalah suatu proses suatu fragmen DNA disisipkan ke dalam plasmid atau kromosom faga dan kemudian direplikasi untuk

menghasilkan salinan DNA dalam jumlah banyak. Replikasi terjadi bila plasmid atau kromosom faga diintroduksi ke dalam suatu sel inang yang cocok (misalnya bakteri atau sel ragi) dan apparatus sintesis DNA inang mereplikasi DNA yang disisipkan dalam sel inang.

Kloning melibatkan lima komponen utama, yaitu (1) DNA donor (DNA sisipan atau DNA asing), yaitu DNA sumber atau gen yang diklon, (2) enzim restriksi, yaitu enzim yang digunakan untuk memotong kedua DNA donor dan vektor pada lokasi spesifik, sehingga DNA donor dapat disisipkan ke dalam vektor, (3) vektor, yaitu plasmid atau bakteriofaga yang digunakan untuk mengintroduksi gen yang diklon ke dalam sel inang yang sesuai, (4) DNA ligase, enzim yang digunakan untuk menggabungkan ujung vektor dan DNA donor untuk menghasilkan DNA rekombinan, dan (5) sel inang, biasanya bakteri atau sel ragi. Vektor rekombinan dimasukkan ke dalam sel inang untuk menghasilkan jumlah DNA rekombinan dalam jumlah lebih banyak.

DNA Donor

Tujuan kloning adalah mengisolasi gen atau segmen DNA dari suatu organisme dan dimasukkan ke dalam suatu sel inang. DNA yang diklon disebut sebagai DNA donor. Seringkali, DNA donor digunakan untuk produksi skala besar protein penting (lihat pendahuluan). DNA dapat juga digunakan untuk deteksi patogen atau sel abnormal. Biasanya, DNA donor merupakan bagian kecil dari genom suatu organisme, dan berada dalam satu atau dua salinan setiap sel. Untuk memperoleh DNA, maka sel yang mengandung materi genetik yang diinginkan diperbanyak terlebih dahulu. Setelah sel mencukupi, sel dilisis untuk mengeluarkan materi genetik yang terdapat dalam kromosom atau plasmid.

Enzim Restriksi

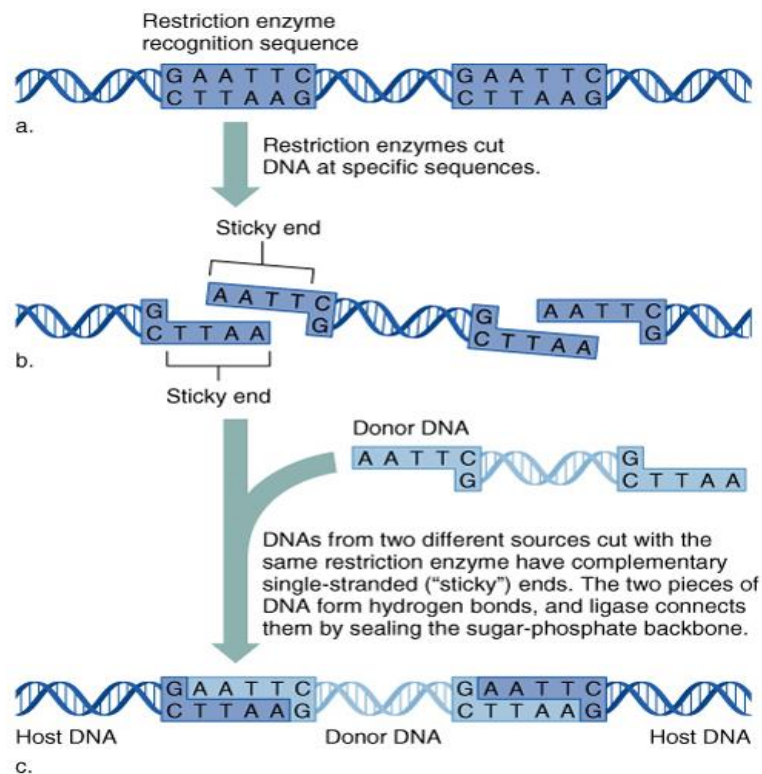
Enzim restriksi adalah enzim bakteri yang mengenali urutan nukleotida spesifik dalam DNA untai ganda dan memotong DNA pada lokasi tersebut. Enzim-enzim ini memotong DNA menjadi fragmen-fragmen dengan berbagai ukuran, tergantung pada jumlah situs pengenalan enzim dalam molekul DNA tersebut. Enzim restriksi tipe II, yang digunakan dalam kloning, mengenali urutan pasangan basa 4 sampai 8 nukleotida dan memotong dalam urutan tersebut. Urutan ini disebut dengan urutan pengenalan yang disebut dengan palindrom. Palindrom adalah urutan 4 sampai 6 pasangan basa yang sama pada kedua untai jika dibaca pada arah yang sama (5' ke 3') tergantung pada lokasi pemotongan pada urutan pengenalan, hasil pemotongan oleh enzim restriksi dapat memberikan ujung runcing (baik ujung 5' atau ujung 3' menonjol) dan ujung tumpul.

Enzim restriksi dinamakan sesuai dengan spesies bakteri dari mana enzim diisolasi. Sebagai contoh, *EcoRI* diperoleh dari bakteri *Escherichia coli* galur R, dan enzim *HindIII* dari bakteri *Haemophilus influenzae* galur D. angka romawi menunjukkan urutan penemuan enzim dari mikroorganisme tersebut. Misalnya, *EcoRI* adalah enzim pertama diisolasi dari *E. coli*, sedangkan *HindIII* adalah enzim ketiga yang diisolasi dari *H. influenzae*.

Fragmen DNA hasil restriksi dapat divisualisasi dengan suatu prosedur yang dikenal sebagai elektroforesis. Prosedur ini melibatkan pergerakan molekul bermuatan atau ion yang distabilkan dalam suatu matriks di bawah suatu medan listrik. Gel agrosa merupakan medium umum untuk elektroforesis DNA. Ethidium bromida ditambahkan dalam agar untuk visualisasi DNA di bawah sinar ultra violet. Senyawa ini berinterkalasi pada molekul DNA dan menyebabkan fluoresensi.

Setelah genom direstriksi oleh enzim restriksi, cara paling umum untuk mengidentifikasi molekul DNA suatu organisme yang menjadi interes adalah dengan hibridisasi Southern blot. Teknik ini dapat digunakan mengidentifikasi urutan DNA spesifik setelah digesi dengan enzim restriksi dan elektroforesis DNA genom. DNA hasil restriksi dielektroforesis terlebih dahulu, kemudian DNA ditransfer pada suatu membran. Setelah fragmen DNA diketahui letaknya pada elektroforesis, elektroforesis diulangi lagi dan

fragmen DNA intere dipotong dari gel dan digunakan dalam kloning. Fragmen DNA tersebut kemudian disisipkan ke dalam vektor yang telah direstriksi dengan enzim restriksi yang sama atau yang kompatibel.



Kinerja enzim restriksi

Vektor

Vektor adalah suatu molekul DNA dimana molekul DNA asing dapat disisipkan dan diintroduksi ke dalam sel inang sehingga molekul DNA rekombinan dapat direplikasi. Vektor dapat diintroduksi ke dalam sel baik dengan transformasi atau transduksi.

Vektor ada dua jenis, yaitu vektor kloning dan vektor ekspresi. Bila dilihat dari sumbernya, vektor kloning ada beberapa tipe. Plasmid dan virus bakteri (bakteriofaga) merupakan vektor yang banyak digunakan karena introduksinya dan manipulasinya di laboratorium mudah. Vektor harus stabil di dalam sel inang sehingga memungkinkan replikasi. Oleh karena itu, vektor mengandung *ori* yang dikenali oleh sel inang sehingga direplikasi oleh DNA polimerase inang. Vektor harus mengontrol replikasinya sendiri sehingga mampu untuk bermultiplikasi dalam jumlah salinan yang tinggi di dalam sel. Kebanyakan vektor yang digunakan membentuk banyak salinan (50 sampai 200) dalam setiap sel. Vektor demikian disebut dengan vektor bersalinan tinggi (*high copy number*). Plasmid yang replikasinya diregulasi dengan ketat biasanya hanya menghasilkan 2 sampai 3 salinan setiap sel (*low copy number*). Keuntungan vektor bersalinan tinggi adalah dimungkinkan untuk mendapatkan DNA yang diinginkan dalam jumlah setiap sel.

Untuk memudahkan manipulasi dan introduksi ke dalam sel dengan transformasi, elektroforesis atau transduksi, vektor hendaknya berukuran kecil. Vektor kloning umumnya mempunyai ukuran antara 2000 sampai 6000 pasangan basa. Vektor dapat dipotong oleh enzim restriksi pada satu situs pengenalan, sehingga memungkinkan DNA donor disisipkan dan plasmid bersirkulasi kembali. Pada umumnya vektor mengandung suatu situs yang dikenali oleh berbagai enzim restriksi padamana DNA donor dapat disisipkan. Situs ini disebut dengan *multiple cloning site* (MCS) yang mengandung beberapa situs restriksi berbeda. Vektor tidak

boleh ditransfer melalui konjugasi sehingga mencegah DNA rekombinan untuk terbebaskan ke populasi bakteri alam.

Untuk membedakan antara sel yang ditransformasi dan yang tidak ditransformasi, vektor harus dilengkapi dengan sifat yang mudah dideteksi. Vektor kloning yang baru mempunyai MCS dalam gen *lacZ*. Gen ini, dengan adanya suatu induser seperti IPTG (isopropiltiogalaktosida), menghasilkan enzim β -galaktosidase, yang mengubah laktosa menjadi galaktosa dan glukosa. Jika suatu segmen DNA donor disisipkan pada situs kloning ini, DNA tersebut mengubah urutan gen *lacZ* sehingga tidak lagi menghasilkan enzim fungsional. Fenomena disebut dengan *insertional inactivation*. Vektor harus mudah diisolasi dari sel, sehingga meningkatkan hasil plasmid rekombinan. Ini banyak digunakan untuk mendeteksi rekombinan dengan suatu metode skrining yang dinamakan skrining biru-putih. Sel dengan gen *lacZ* utuh menghasilkan β -galaktosidase yang menkatabolisme X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol- β -D-galaktosida atau hanya disebut β -D-galaktosidase) menghasilkan pigmen biru yang mewarnai koloni. Sel rekombinan mengandung gen *lacZ* yang tidak aktif dan tidak memetabolisme X-gal. Koloni putih ini mengandung gen yang diinginkan.

Vektor kloning harus mudah diseleksi dan dipertahankan dalam sel. Vektor yang membawa gen resistensi antibiotik dapat dengan mudah diseleksi dan dipertahankan dengan cara menambahkan antibiotik dalam medium pertumbuhan. Bila vektor ini diintroduksi ke dalam sel inang yang sesuai, sel menjadi resistan terhadap antibiotik dan dapat tumbuh dalam medium yang mengandung antibiotik. Sel yang tidak ditransformasi tidak bermultiplikasi dalam medium yang mengandung antibiotik.

Selain vektor kloning yang ditujukan untuk kloning gen tanpa memperhatikan produk gen, dalam rekayasa genetika digunakan juga vektor ekspresi. Salah satu tujuan dalam rekayasa genetika adalah memproduksi gen atau produk gen dalam jumlah banyak. Produksi protein hanya dapat dicapai jika vektor dilengkapi dengan situs regulasi untuk inisiasi transkripsi gen dan translasi mRNA oleh sel inang. Vektor ekspresi adalah vektor yang membawa gen yang dapat secara efisien ditranskripsi dan ditranslasi oleh sel inang. Untuk transkripsi, keberadaan promotor (P) dan situs terminator (TER) dalam vektor diperlukan. Demikian juga situs pengikatan ribosom (RBS) di hulu kodon strat juga diperlukan pada kebanyakan vektor ekspresi. Situs ini diperlukan untuk inisiasi translasi yang efisien dalam bakteri.

DNA Ligase

Molekul DNA donor dan vektor dihubungkan dengan bantuan suatu enzim yang dikenal sebagai DNA ligase atau ligase polinukleotida. DNA ligase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara gugus hidroksi 3' dari DNA donor dan gugus fosfat 5' DNA vektor. DNA ligase yang umum digunakan dalam eksperimen kloning diperoleh dari *E. coli* atau dari bakteriofaga T4.

Umumnya, vektor dicegah dari self-ligation dengan cara menghilangkan fosfat 5'nya dengan alkalin fosfatase. Tanpa fosfat 5', vektor tidak dapat membentuk ikatan kovalen yang dibutuhkan. DNA donor dapat meligasi pada vektor DNA ini masih mempunyai gugus fosfat 5' utuh.

Sel Inang

Sejumlah galur bakteri dan ragi telah dikembangkan terutama untuk eksperimen DNA rekombinan. Sel inang ini mempunyai sejumlah vektor yang harus digunakan untuk mengklon suatu gen dengan sukses. Hal ini disebabkan karena tidak semua vektor kloning mempunyai origin replikasi yang sama (*ori*). Supaya suatu plasmid dapat melakukan replikasi dalam suatu sel, sel harus mengenali ori vektor tersebut. Untuk alasan keamanan, sel inang tidak boleh bereplikasi di alam.

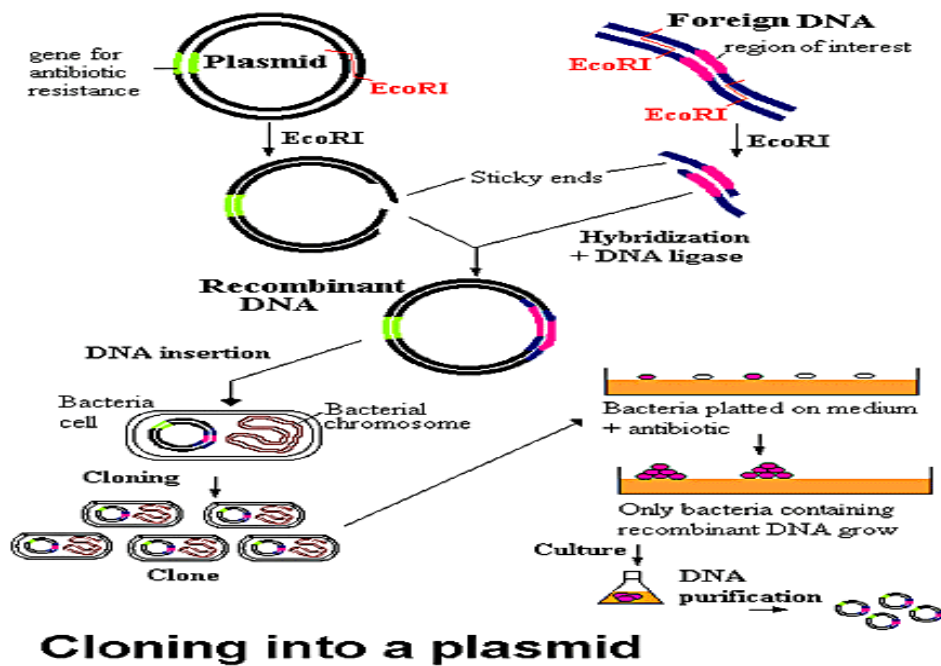
Vektor plasmid rekombinan diintroduksi ke dalam sel melalui suatu proses mirip dengan transformasi. Sel dibuat menjadi kompeten dengan perlakuan CaCl₂ 0,1M, kemudian diinkubasi dengan vektor. Selama periode inkubasi beberapa sel menjadi tertransformasi dengan vektor rekombinan dan sebagai selanjutnya diseleksi menggunakan media kultur tertentu.

Suatu metode sekarang banyak digunakan oleh laboratorium untuk mengintroduksi molekul DNA rekombinan ke dalam sel inang disebut dengan elektroporasi. Dalam metode ini, suspensi sel yang sedang tumbuh eksponensial dicampur dengan larutan molekul DNA rekombinan dan dipaparkan dengan medan listrik tinggi (sampai 2500 volt) untuk beberapa milidetik. Tegangan tinggi mengubah struktur membran sehingga pori-pori terbentuk untuk sementara, menyebabkan DNA plasmid memasuki sel.

Strategi Kloning

Bakteri tidak mempunyai mekanisme untuk memproses pre-mRNA molekul. Sementara itu, bakteri sering digunakan untuk mengekspresi gen eukariot, tetapi informasi genetiknya perlu dibebaskan dari intron terlebih dahulu dan hanya mengandung urutan pengkode saja. Untuk melaksanakan ini, mRNA (telah terjadi penghilangan intron) dari donor sel eukariot. Konversi ssRNA menjadi dsDNA dikatalisis oleh enzim reverse transkriptase yang menggunakan templat RNA untuk sintesis DNA. Molekul DNA yang dihasilkan dikenal sebagai DNA (*complementary DNA*) yang kemudian digunakan untuk kloning dalam bakteri karena cDNA ini hanya mengandung informasi genetik protein bebas intron.

Selain bakteri, organisme lain dapat digunakan untuk kloning. Walaupun demikian, bakteri terutama *E. coli* sangat cocok untuk kloning karena bermultiplikasi dengan sangat cepat dalam medium laboratorium dan genomnya telah banyak dipelajari dan selesai diskues. Namun demikian, *E. coli* tidak selalu sesuai untuk percobaan kloning. Seringkali, kloning dan ekspresi gen eukariot menghasilkan produk terbaik bila dilakukan dalam inang eukariot. Ragi *S.cerevisiae* adalah organisme terpilih untuk tujuan kloning tersebut.



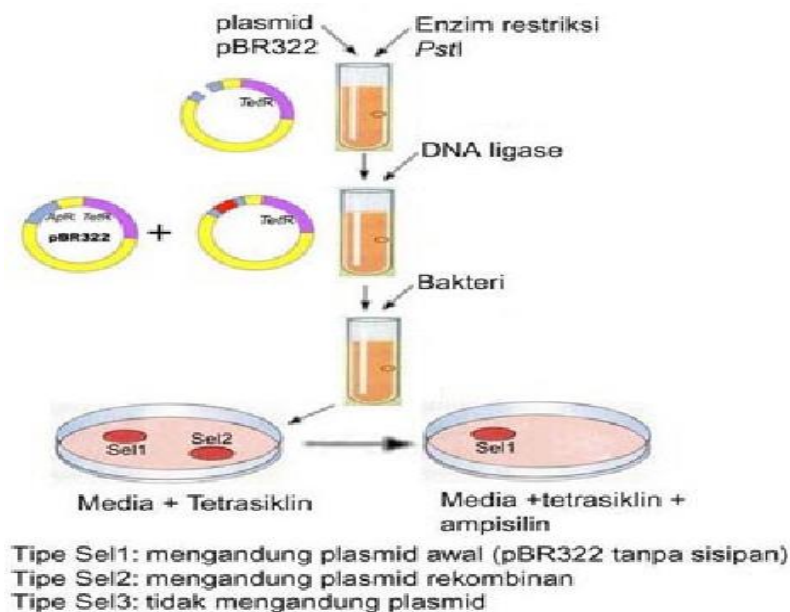
Proses Teknik Rekombinan

Seleksi Klon

1. Seleksi Klon Menggunakan Antibiotik

Contoh tahapan:

- ❖ **Pemotongan plasmid.** Plasmid pBR322 dipotong didalam tabung reaksi menggunakan enzim PstI maka pBR322 akan terpotong pada bagian gen ApR.
- ❖ **Menyisipkan gen atau fragmen DNA.** Bila pBR322 yang sudah terbuka lingkarannya dicampur dengan potongan DNA asing dan kemudian ditambahkan enzim DNA ligase, maka kemungkinan hasilnya adalah berupa campuran yang berisi: 1) plasmid pBR322 yang tersambung kembali atau membentuk lingkaran lagi seperti semula, dan 2) plasmid rekombinan yaitu pBR322 yang telah disisipi oleh DNA asing.
- ❖ **Memasukkan DNA kedalam sel bakteri (transformasi).** Campuran kedua bentuk plasmid ini kemudian dicampurkan dengan kumpulan sel bakteri hidup yang tidak mempunyai plasmid. Kemungkinan hasilnya berupa campuran yang berisi: 1) sel bakteri yang mengandung plasmid pBR322 tanpa sisipan, 2) sel yang mendapatkan plasmid rekombinan (pBR322 yang telah disisipi DNA asing), 3) sel bakteri yang tidak mengandung (tidak dimasuki) plasmid.



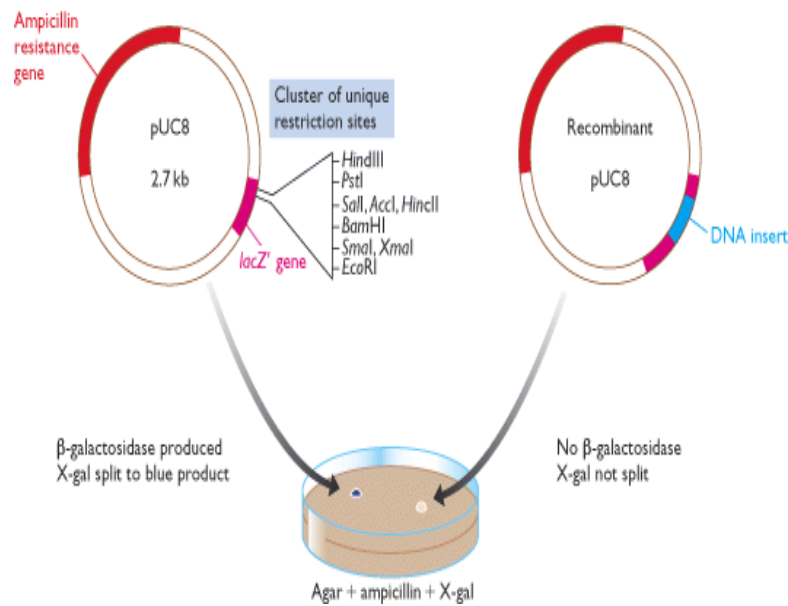
Seleksi Klon Menggunakan Antibiotik

2. Seleksi Klon Menggunakan Metode Seleksi Putih-Biru

Contoh tahapan:

- ❖ Contoh plasmid lainnya yang telah lama digunakan sebagai vektor untuk mengklonkan gen adalah plasmid pUC118 dan pUC119. Plasmid ini merupakan pengembangan dari pBR322. Plasmid pUC118 dan pUC119 mengandung gen lacZ yang menyandikan enzim β -galactosidase.
- ❖ Enzim β -galactosidase akan memecah Xgal menjadi galaktosa dan 5-bromo-4-chloroindigo (biru). Oleh karena itu koloni bakteri yang mengandung plasmid pUC118 atau pUC119 akan berwarna biru bila ditumbuhkan pada media yang mengandung Xgal.
- ❖ Pada lacZ terdapat daerah yang disebut daerah polikloning. Pada daerah polikloning ini terdapat banyak situs restriksi dari berbagai enzim restriksi. Dalam hal ini, kita dapat menggunakan berbagai enzim restriksi untuk memotong pUC118 atau pUC119 pada bagian lacZ. Dengan demikian kita dapat menyisipkan DNA asing pada bagian lacZ. Bila gen lacZ disisipi oleh DNA asing maka gen lacZ tersebut tidak berfungsi (tidak menghasilkan β -galactosidase).

- ❖ Koloni bakteri akan berwarna putih bila pUC118 atau pUC119 telah disisipi DNA asing pada bagian lacZ. Dalam hal ini gen lacZ tidak berfungsi karena disisipi DNA asing. Jadi, koloni yang mengandung plasmid rekombinan adalah koloni yang berwarna putih.



Seleksi Klon Menggunakan Metode Seleksi Putih-Biru

Deteksi Klon

Setelah melakukan kloning, ada masalah bagaimana menemukan klon yang diinginkan diantara kumpulan sel yang mengandung DNA lain yang tidak diinginkan. Ada tiga metode untuk mencari klon yang diinginkan tersebut, yaitu (1) metode berbasis aktivitas, (2) metode hibridisasi, dan (3) metode berbasis protein. Pada metode berbasis aktivitas, maka aktivitas produk gen yang diklon harus mudah ditentukan atau diamati. Sebagai contoh adalah untuk mendeteksi klon yang membawa fragmen DNA pengkode protease. Klon yang membawa gen ini mudah ditemukan dengan menumbuhkannya dalam medium padat mengandung kasein. Klon yang menghasilkan protease melepaskan protease keluar sel dan menguraikan kasein dalam medium tersebut. Klon ditemukan karena adanya zona bening di sekitar koloni. Deteksi klon berbasis aktivitas ini hanya dapat dilakukan bila fragmen DNA yang terkandung dalam klon diekspresi (ditranskripsi dan translasi) dan produk gen dikirimkan ke luar sel.

Metode hibridisasi ditujukan untuk mendeteksi keberadaan sekuens asam nukleat unik yang dibawa oleh suatu klon. Sekuens ini dideteksi dengan suatu fragmen DNA tunggal yang disebut pelacak (*probe*). Pelacak adalah suatu fragmen DNA dengan suatu gugus reporter menempel padanya dan mengenali dengan spesifisitas tinggi sekuens komplemennya pada DNA target. Pelacak dapat mengenali baik DNA maupun RNA dan terdiri dari 20 sampai ribuan nukleotida. Pelacak oligonukleotida (20 – 50 basa) dapat disintesa secara kimia sesuai dengan urutannya menggunakan mesin pensintesis DNA (*DNA synthesizer*). Molekul reporter dapat berupa senyawa radioaktif sudah banyak ditinggalkan dan diganti dengan senyawa non-radioaktif. Untuk molekul non-radioaktif yang sering digunakan adalah biotin. Biotin merupakan senyawa tidak berwarna, sehingga tidak dapat dideteksi. Untuk mendeteksi pelacak yang mengandung biotin, perlu perekasi streptavidin (molekul dengan afinitas tinggi terhadap biotin) yang telah dikongjugasikan dengan suatu enzim, biasanya alkalin fosfatase. Substrat kolorigenik untuk enzim kemudian dapat ditambahkan untuk mendeteksi keberadaan

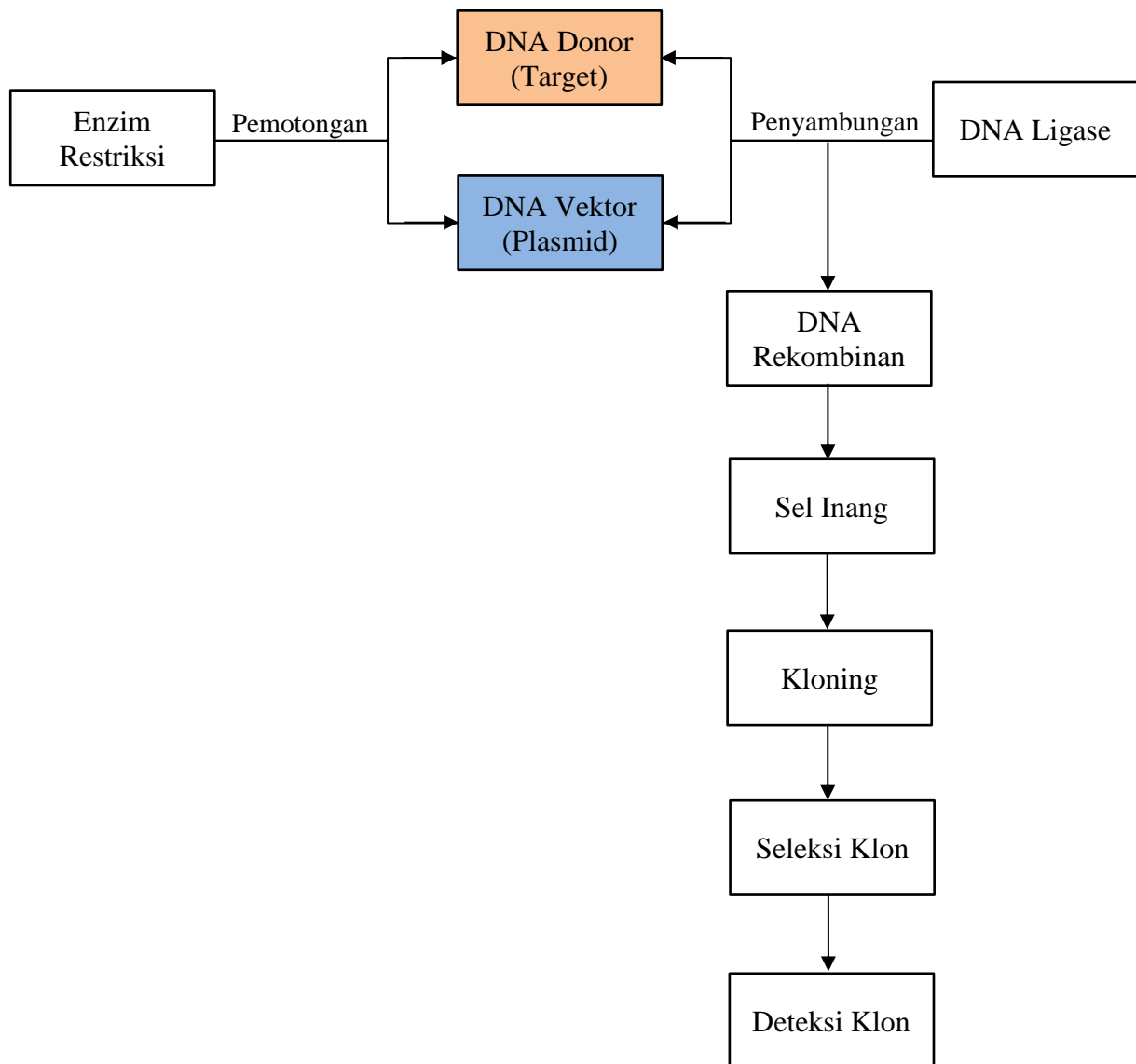
hibrid DNA-pelacak tersebut. Bila enzim berikatan dengan hibrid maka akan dihasilkan produk berwarna hasil urai substrat oleh alkalin fosfate yang dengan mudah dideteksi secara visual. Format hibridasi untuk mendeteksi klon adalah hibridasi koloni. Dalam format ini, koloni dilisis untuk memaparkan asam nukleat yang berada di dalam sel. DNA tersebut kemudian perlu didenaturasi untuk mengubahnya menjadi untai tunggal (dalam keadaan ini, DNA untai tunggal dapat berikatan dengan pelacak). DNA yang telah didenaturasi kemudian ditransfer ke suatu membran (dapat membran nitroselulosa). DNA yang menempel di membran, kemudian direaksi dengan pelacak. Deteksi klon menggunakan metode ini tidak membutuhkan ekspresi gen. Keberadaan fragmen DNA saja sudah cukup untuk dideteksi dengan metode ini.

Metode ketiga untuk deteksi klon adalah metode berbasis protein. Dalam metode ini, dibutuhkan antibodi yang mengenali produk gen yang dicari. Antibodi tersebut dikenali dengan suatu konjugat, yang mengenali antibodi tersebut secara spesifik dan membawa molekul reporter, misalnya alkalin fosfatase. Keberadaan alkalin fosfatase dideteksi menggunakan substrat kolorimetrik. Seperti pada metode yang berbasis aktivitas, metode ini juga membutuhkan ekspresi gen.

Karakteristik Klon Melalui Sekuensing

Hasil sekuensing asam nukleat memberikan informasi kode genetik suatu molekul DNA. Ini dapat dilaksanakan melalui salah satu dari dua metoda yang keduanya menghasilkan fragmen DNA dengan panjang bervariasi dan berbeda satu sama lain. Metoda yang sampai saat ini digunakan adalah metoda Sanger yang dimodifikasi dan dikenal sebagai sekuensing terminasi dideoksi. Saat ini sekuensing dilakukan secara otomatis menggunakan *automatic DNA sequencer*. Dari hasil sekuensing dapat dilakukan berbagai macam analisa, misalnya analisa homologi dengan urutan nukleotida yang telah dideposit di data Bank untuk memprediksi fungsi fragmen DNA tersebut.

Step IV : Kerangka Konsep



Step V : Learning Objectives

1. Mahasiswa mampu menjelaskan proses dalam teknik rekombinan DNA
2. Mahasiswa mampu menjelaskan cara melakukan kloning DNA rekombinan
3. Mahasiswa mampu menjelaskan cara melakukan seleksi klon
4. Mahasiswa mampu menjelaskan cara melakukan deteksi klon

Referensi

1. Debbie S. Retnoningrum, Rekayasa genetik. MIPA institute teknologi bandung.
2. Tien C.KO. Molecular and Cell Biology. Chapter 3 (ClinicalKey).
3. Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyasari, S., rahayu S. (2011). Biologi Molekuler, Prinsip dasar analisis. Penerbit erlangga.